

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Memeli Grainy Head-Like 3 (Grhl3) Promotör Bölgesinin İşlevsel Tanımı

İLKİN AYGÜN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc/2014970104

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Memeli Grainy Head-Like 3 (Grhl3) Promotör Bölgesinin İşlevsel Tanımı

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İLKİN AYGÜN

Yrd. Doç Dr. Hani Alotaibi

Bu araştırma TÜBİTAK 114Z245 nolu proje ve DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube
Müdürlüğü tarafından 2014.KB.SAG.060 sayı ile desteklenmiştir

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc/2014

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı **Tıbbi Biyoloji ve Genetik** Yüksek Lisans programı öğrencisi **İlkin Aygün**'ün '**Memeli Grainy Head-Like 3 Promotör Bölgesinin İşlevsel Tanımı**' konulu Yüksek Lisans tezini 22/06/2017 tarihinde başarı ile tamamlamıştır.



Yrd. Doç. Dr. Hani Alotaibi
BAŞKAN



Yrd. Doç. Dr. Yavuz Oktay
ÜYE



Prof. Dr. Uygur Halis Tazebay
ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Sinan Güven
YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Metiner Tosun
YEDEK ÜYE

İçindekiler

TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
KISALTMALAR.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi	3
1.2 Araştırmanın Amacı	4
1.3 Araştırma Soru ve Hipotezleri	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm (EMT)	5
2.2 Mezenkimal-Epitelyal Dönüşüm (MET)	8
2.3 Grainy Head Like-3 (Grhl3)	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1Araştırmanın Tipi.....	17
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı	17
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	17
3.4 Çalışma Materyali	17
3.5 Araştırmanın Değişkenleri	17
3.6 Veri Toplama Araçları	17
3.6.1 NMuMG (Normal Murine Mammary Gland) ve MEF (Mouse embryonic fibroblast) Hücre Hatları	17
3.6.2 Hücre Kültürü	17

3.6.3	Transfeksiyon	18
3.6.4	Lusiferaz İle Reporter Aktivitesinin Ölçülmesi	20
3.6.5	MEF Hücre Hattında, Elf3 Aşırı Ekspresyonu	21
3.6.6	siRNA İle Gen Susturulması	23
3.6.7	Enzimatik Kesim Yöntemi	24
3.6.8	Transformasyon	31
3.6.9	Plazmid İzolasyonu	31
3.6.10	Kromatin immünopresipitasyonu (ChIP)	32
3.6.11	Bölgesel Yönlendirilmiş Mutasyon	35
3.7	Araştırma Planı ve Takvimi	37
3.8	Verilerin Değerlendirilmesi	38
3.9	Araştırmanın Sınırlılıkları	38
3.10	Etik Kurul Onayı	38
4.	BULGULAR	39
4.1	Grhl3 Promotörü Üzerindeki Korunmuş Sekanslarının Belirlenmesi	39
4.2	Grhl3 Genin Promotör Bölgesinin Biyoinformatik Olarak İncelenmesi	40
4.3	Grhl3 Promotör Bölgesinin Fonksiyonel Elementlerinin Belirlenmesi	42
4.4	Grhl3 Promotör Bölgesi Üzerinde Aktivasyon Gösteren Transkripsiyon Faktörlerinin Belirlenmesi	44
4.5	Grhl3 Promotör Bölgesi Üzerinde Elf3 Bağlanma Noktalarının Tayin Edilmesi	45
4.6	Grhl3 Promotör Bölgesinin Elf3'e Bağlı Reporter Aktivitesinin Belirlenmesi	46
4.6.1	Elf3'ün Farklı Miktarlarda Grhl3 Promotörü üzerine etkisi	47
4.7	Elf3 Aşırı Ekspresyonunda Grhl3 Ekspresyonunun Belirlenmesi	48
4.8	Elf3'ün Susturulması Durumunda Grhl3 Ekspresyonunun Belirlenmesi	49
4.8	Grhl3 Promotörü Üzerinde aktif Elf3 Bağlanma Noktalarının Belirlenmesi	50
4.9	Kromatin immünopresipitasyonu (ChIP)	52

4.10 Bölgesel Yönlendirilmiş Mutasyon.....	53
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
7. KAYNAKLAR.....	59
8. EKLER.....	68
8.1 Etik Kurul.....	68
8.2 Özgeçmiş	70



TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1: Transfeksiyon hesaplama.....	20
Tablo 3.2: ELf3 aşırı ekspresyonu plazmid miktarları	21
Tablo 3.3: cDNA Sentezi Protokolü	23
Tablo 3.4: PCR Primerleri.....	23
Tablo 3.5: XhoI/BsaI Kesim	25
Tablo 3.6: Psp1406I/HindIII Kesim	25
Tablo 3.7: XhoI/Psp1406I Kesim	25
Tablo 3.8: Klenow Protokolü.....	27
Tablo 3.9: Pfu Polimeraz İle PCR Reaksiyonu	28
Tablo 3.10: Ligasyon Protokolü	30
Tablo 3.11: Koloni PCR	31
Tablo 3.12 : Mutasyon Primerleri.....	35
Tablo 3.13: Araştırma Takvimi.....	38

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Epitelyal - Mezenkimal dönüş (EMT)	6
Şekil 2.2: Kanser metastazında EMT - MET rolü.....	10
Şekil 2.3: Grhl3, Hnf4a ekspresyonunun düzenlenmesine ve MET sürecine katkıda bulunur.	16
Şekil 3.1:pGL4.10[luc2] Vektör Promega	18
Şekil 3.2 : Plazmidler üzerindeki restriksiyon bölgeleri.	24
Şekil 3.4: Klonlama için vektör hazırlanması	29
Şekil 3.3: Mutasyon primerleri sekans analiz sonuçları..	36
Şekil 3.5: Araştırma planı	37
Şekil 4.1: Grhl3 promotör bölgesi üzerindeki korunmuş sekanslar..	40
Şekil 4.2: Grhl3 promotör bölgesi.	41
Şekil 4.3: Grhl3 promotörü aktivasyon grafiği	43
Şekil 4.4: Grhl3 promotörü üzerinde ETS ailesi bağlanma bölgeleri.....	44
Şekil 4.5: Grhl3 Promotörü üzerinde Elf3 bağlanma noktaları	45
Şekil 4.6: Elf3 Aktivitesine Bağlı Grhl3 ekspresyonu	46
Şekil 4.7: Farklı Miktarlarda Elf3 Aktivitesine Bağlı Grhl3 Promotör Aktivitesi	47
Şekil 4.8: Elf3 Aşırı Ekspresyonunda Grhl3 Ekspresyonu.	48
Şekil 4.9: Elf3'ün Susturulması Durumunda Grhl3 Ekspresyonu.	49
Şekil 4.10: Grhl3 Promotörü Üzerindeki aktif Elf3 Bağlanma Noktaları	51
Şekil 4.11: ChIP yöntemi ile Elf3 - Grhl3 promotörü ilişkisinin gösterilmesi	52
Şekil 4.12: Bölgesel Yönlendirilmiş Mutasyon ile aktif Elf3 bağlanma bölgelerinin belirlenmesi	53

KISALTMALAR

ChIP: Kromatin immünopresipitasyonu

EMT : Epitelyal - mezenkimal d n    m

Grhl3 : Grainy Head Like3

MEF: Mouse embryonic fibroblas

MET: Mezenkimal - epitelyal d n    m

NMuMG: Normal murine mammary gland

PCR: Polimerase Chain Reaction

TBN: Transkripsiyon ba lama noktası



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen ve her zaman daha iyisini yapabileceğim konusunda beni teşvik eden danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Hani Alotaibi'ye çok teşekkür ederim.

Sanem ablam, güzel kalbin o kadar büyük ki.. Senden bu kısa sürede çok şey öğrendim. Tüm desteklerin için çok teşekkür ederim.

Laboratuvardaki katkılarından dolayı Burcu Şengez'e ve bu süreçte yanımda olan tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Dedecim... Işığın daima beni daha ileriye taşıdı. Bu başarımın en büyük mimarı sensin. Kattığın her değer için sonsuz teşekkürler.

Annecim, babacım, kardeşim, desteğiniz ve sevginiz sahip olduğum en büyük şey. Bu süreçte her an yanımda olduğunuz için çok teşekkür ederim.

Levent'im, hayatıma girdiğin andan bu zamana kadar sevgin ve desteğin ile bir çok şeyin üstesinden gelmeme yardımcı olduğun için çok teşekkür ederim.

Bu araştırma TÜBİTAK 114Z245 nolu proje ve DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2014.KB.SAG.060 sayı ile desteklenmiştir

Memeli Grainy Head-Like 3 (Grhl3) Promotör Bölgesinin İşlevsel Tanımı

İlkin Aygün, Deü Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Ad, Inciraltı/İzmir

ÖZET

Epitelyalden mezenkimale dönüşüm (EMT) ve mezenkimalden epiteyale dönüşüm (MET) aşamaları, düzgün bir embriyonik gelişim için çok hayati olmanın yanı sıra, kanser oluşumu sırasında tümör hücreleri tarafından farklı aşamalarda kullanılırlar. Son yıllarda yapılan çalışmalar MET'in yalnızca EMT'nin tersi olmadığını, kendi başına da karmaşık bir süreci ifade ettiğini göstermiştir. Bu verilerden yola çıkarak MET'i kontrol eden yeni tanımlanacak transkripsiyon ağları oluşturabileceği hipotezini kurmak mümkündür. EMT-MET modeli (NMuMG hücreleri) kullanılarak yapılan çalışmalarda, Grhl3 ve Hnf4a'nın E-cadherin'in ekspresyonu için önemli rol üstlendikleri ve MET sürecinin başlaması için çok gerekli oldukları gösterilmiştir. EMT - MET süreçlerinde kritik bir role sahip olan Grhl3 geninin bu süreçlere ne gibi bir katkı sağladığını aydınlatabilmek amacıyla, Grhl3 genini karakterize etmenin önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bu tez kapsamında da Grhl3 promotör bölgesi karakterize edilmeye çalışılmıştır. Öncelikle gen üzerindeki daha sonra promotör bölge üzerindeki korunmuş sekanslar belirlenmiştir. Biyoinformatik analizlerden elde edilen promotör bölgesi üzerindeki TATA kutusu ve Sp1 elementlerin işlevsel olup olup olmadıklarını, promotör bölgesi üzerinde kısaltmalar yaparak lusiferaz aktiviteleri ile gösterilmiştir. Daha sonra yine biyoinformatik analizlerle belirlenen Elf3'ün Grhl3 promotör bölgesi ile ilişkili olduğu ve, Grhl3 promotör bölgesini 2 kat aktive ettiği gösterilmiştir. Ayrıca Elf3'ü susturulduğunda ve aşırı eksprese edildiğinde Grhl3 ekspresyonunun da doğru orantılı olarak azalıp arttığını gösterilmiştir. Elf3 Grhl3'ün regülatörü gibi davranmaktadır.

Anahtar Kelimeler: MET, EMT, Grhl3, promotör, TATA kutusu, Sp1

Functional Characterization of the Mammalian Grainy Head-Like 3 (Grhl3) Promoter Region

İlkin Aygün, Deü Institute of Health Science, Department of Medical Biology and
Genetics, İnciraltı/İzmir

ABSTRACT

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal to epithelial transition (MET) are very vital for proper embryonic development, as well as being used at different stages by tumor cells during cancer formation. Studies conducted in recent years have shown that MET is not only the opposite of EMT, but also is a complicated process on its own. It is possible to establish the hypothesis that these data could lead to the establishment of newly defined transcriptional networks controlling the MET process. Studies carried out using the EMT-MET model (NMuMG cells) showed that Grhl3 and Hnf4a play an important role in the expression of E-cadherin, as well as for the initiation of proper MET. We think it is important to characterize the Grhl3 gene in order to elucidate the contribution of the Grhl3 gene, which has a critical role in EMT - MET processes. In this thesis we tried to characterize the Grhl3 promoter region. We first identified the conserved sequences in the promoter region of Grhl3. Using luciferase reporter assays we demonstrated that the TATA box and Sp1 elements on the promoter region were functional and gross deletions of the promoter region led us to identify the minimum required sequence for a functional promoter. We next found that Elf3, which is related to the Grhl3 promoter region we determined by bioinformatic analysis, activated the Grhl3 promoter region 2 fold. Moreover, we performed both loss and gain of function experiments and as a result have identified Elf3 as a regulator of Grhl3 both in vitro and in vivo.

Key Words: MET, EMT, Grhl3, promoter, TATA box, Sp1

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMT); 1) embriyogenez ve gelişim, 2) yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu, organ fibrozisi ve 3) neoplazi gibi fizyolojik ve patolojik olaylarda gözlemlenmektedir (Choi and Diehl 2009). Her ne kadar klasik tanımlar mezenkimal epitelyal dönüşümü (MET) basitçe EMT sürecinin tersi olarak tanımlasa da, son yıllarda yapılan çalışmalarda MET'nin çok daha karmaşık ve dinamik bir süreci tarif ettiği gösterilmektedir. Yani MET süreci sadece Vimentin, N-cadherin gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonlarının azalması ve E-cadherin gibi epitelyal belirteçlerin ekspresyonunun artması ile sınırlı değildir. Yine son yıllarda yapılan çalışmalarda kanser oluşumu ve gelişiminde de tümör hücreleri tarafından EMT ve/veya MET mekanizmalarının kullanılmakta olduğu farklı kanser türlerinde ve farklı deney modellerinde gösterilmektedir (Micalizzi ve ark., 2010). Epitelyal orijinli tümör hücreleri kan doku bariyerini EMT mekanizmasının başlatılması ile aşmakta ve dolaşıma geçerek başka bir dokuya göç etme sürecinde yararlanmaktadır. Ardından dolaşımdaki bu hücreler MET sürecini başlatarak, tümör hücresinin epitel hücre özelliklerini yeniden kazanarak yeni dokuda yerleşmesi ve ikincil tümör oluşturması ile metastaz süreci tamamlanmaktadır. Yapılan birçok çalışmada E-cadherin ekspresyonunun EMT-MET sürecinin merkezinde yer aldığı; EMT sürecinde azalırken, MET sürecinde yeniden eksprese olduğunu ortaya koymuştur (Kim, Jackson ve ark., 2016). MET sürecinde E-cadherin ekspresyonunun yeniden aktivasyonu kısmen E-cadherin represörlerinin azalması ve promotöründen ayrılması ile açıklanabilir. Sonuç olarak bu da bize MET sürecinin, EMT'den ayrı olarak, kendine özgü mekanizma ve düzenleyicilerinin olabileceğini ve MET'i kontrol eden sürece özgün bir transkripsiyon ağının olduğunu düşündürmektedir.

Daha önce EMT-MET modeli kullanılarak yapılan çalışmalarda, Grhl3 ve Hnf4a düzenleyicilerinin E-cadherin ekspresyonunda ve MET sürecinde anahtar rol üstlendikleri belirlenmiştir (Alotabi ve ark., 2015). Evrimsel süreç esnasında korunmuş olan Grainy Head-Like 3 (Grhl3) geni, Grainyhead like ailesine dahil olan transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır. Grhl3'ün özellikle MET sürecinde nasıl bir

düzenleyici rol üstlendiğinin açıklanabilmesi için, genin karakterize edilmesi bu noktada oldukça önemlidir.

Bu çalışma kapsamında Grhl3 gen bölgesi karakterizasyonu ve dolayısıyla MET sürecinin aydınlatılması ile belirlenebilecek olan mekanizmaların ileride, özellikle meme, akciğer gibi metastatik özellikteki agresif kanser türlerinin tedavisinde hedeflenebilecek molekül ve/veya mekanizmalar olarak kullanılabilme potansiyelleri yüksektir.

1.2 Araştırmanın Amacı

Bu tez kapsamında; memeli Grhl3 promotörü karakterize edilerek, üzerindeki promotör elementlerin işlevsel olup olmadığı ortaya konulacak, varsa diğer transkripsiyon faktörleri ile olan ilişkisi aydınlatılacaktır.

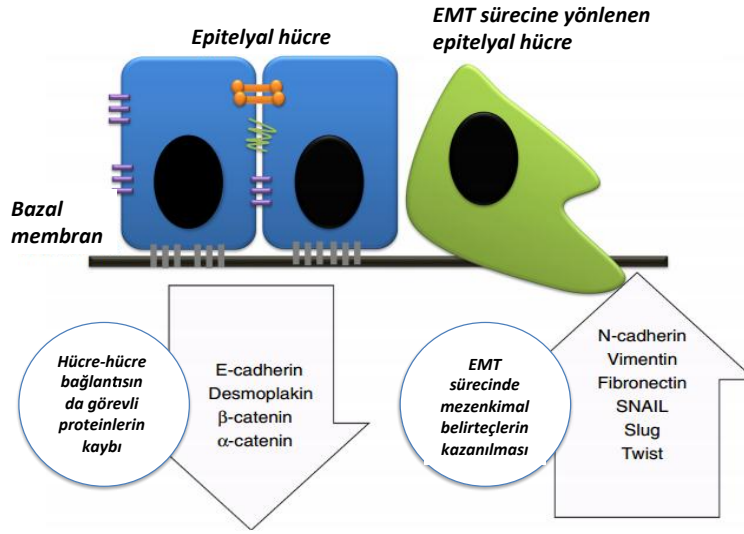
1.3 Araştırma Soru ve Hipotezleri

Grhl3'ün 1kb promotör sekansı üzerinde, işlevselliği sağlayan kısmın çok daha küçük bir bölümü oluşturduğu, ayrıca bu bölge üzerine bağlanan ve geni regüle eden farklı transkripsiyon faktörlerinin varlığı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm (EMT)

Organizmal fonksiyonlar, ontogenez sırasındaki gen ürünleri, çevresel koşullar ve ontogenetik süreçler arasındaki karmaşık etkileşimler yoluyla ortaya çıkar (Raff, 1996; West-Eberhard, 2003). Bu etkileşimlerin nedenleri ve sonuçları epigenetik araştırmaların odak noktasında bulunmaktadır (Hallgrimsson ve Hall, 2011). Bu araştırmalar, genellikle, fenotiplerin gelişimsel süreçler yoluyla nasıl ortaya çıktıklarını ve bu sürecin evrimsel modifikasyon ve yeniliği sağlamak için nasıl değiştirildiğini anlamaya çalışmaktadır. Bu süreçte gelişimsel plastisite büyük rol oynamaktadır. Plastisite kavramı, bireyin kendi fenotipik özelliklerini, genellikle uyarlanabilir bir şekilde ayarlayarak, çevresel değişikliklere cevap verebilme kabiliyetini ifade eder. Her durumda, tek bir genotip, çok farklı fenotiplere neden olabilir. Plastisitenin sağlanması ve hücre fenotipinin daimliği bu noktada, çok hücreli canlılar için büyük önem taşımaktadır. Epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMT) ve mezenkimal epitelyal dönüşüm (MET) süreçleri de bu dinamik sürecin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır (Somarelli, Shetler ve ark., 2016). Epitelyal hücrelerin, epitelyal karakterini kaybedip, mezenkimal karakter elde edebilecekleri düşüncesi, 1980'lerin başında Elizabeth Hay tarafından tavuk embriyosunda yaptığı gözlemler sonucu ortaya atılmıştır (Hay, 1995). Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), başlangıçta erken gelişme sırasındaki normal hücre farklılaşması bağlamında tanımlanmıştır (Micalizzi ve ark., 2010). Evrimsel olarak, mezenkimal hücrelerin indüklenen farklılaşması, çeşitli organizmalarda oldukça özel dokuların ve organ sistemlerinin organizasyonuna izin vermektedir. Bu nedenle, Snail / Slug, Twist, Six1, Cripto, TGF- β ve Wnt / β -catenin gibi EMT ile ilişkili moleküler yolların türler arasında oldukça korunmuş olması şaşırtıcı değildir. (Micalizzi ve ark., 2010). EMT sürecinde epitelyal kökenli hücrelerin polarize yapılarının ve hücre-hücre etkileşimlerinin kaybolması sonucunda, polarize olmayan, mezenkimal fenotip kazanmış hücreler oluşur. Bu hücreler, göç edebilme, hücre dışı matrisi parçalayabilme ve kan doku bariyerini geçme yeteneği kazanırlar. Bu aşamada EMT süreci başta embriyogenez olmak üzere pek çok önemli süreçte rol alır. Ayrıcayara iyileşmesi (wound healing) ve fibroz açısından da kritik öneme sahiptir (Lamouille, Xu et al. 2014).



Şekil 2.1: Epitelyal - Mezenkimal dönüş (EMT)

(Serrano-Gomez ve ark., 2016)

Son yıllarda yapılan çalışmalar EMT'nin, kanser hücrelerinde, metastaz sürecinin en kritik basamağını oluşturarak hücrelerin bir dokudan diğer dokuya göç etmesini sağladığını göstermektedir. Bazı kanserojen tümörlerin fibröz ve metastazında EMT rolü tarif edilmiştir (Micalizzi ve ark., 2010). Bu yeni paradigma, EMT'yi daha net tanımlamak için farklı bir bakış açısı sağlamıştır. Bu bakış açısı, araştırmacılara normal hücre farklılaşması süreci ve benzer patolojik, EMT süreçleri arasındaki ilişkiyi daha doğru bir şekilde değerlendirebilmesine yardımcı olabilir. Bu tür EMT süreçleri hem epitelyal hem de epitelyal dışı kanserlerde görülür.

Embriyonik gelişim; büyüme ve farklılaşmayı içeren kompleks bir süreçtir. Bu işlemin önemli bir kısmı hücresel farklılaşma ve doku oluşumunu içerir ve tüm büyük yapılar oluştuktan sonra büyüme ve hacim artışı yolunda devam eder. Giderek farklılaşmış hücrelere ayrılan ya da büyüyen ve özelleşen hücrelere bölünen, tek bir hücre süreci, epigenetik kontrollerle programlanmıştır (Reik ve ark., 2001). Bununla birlikte, benzer epigenetik modifikasyonlar kanser hücrelerinde ortaya çıktığında, bu hücreler metastatik hale gelir. Kanser hücrelerinin metastaz yapabilmesi için öncelikle, integrinleri çevreleyen eksra selüler matriksten ayrıldığında, anoikisi, programlanmış bir hücre ölümünün bir biçimini aşması gerekmektedir (Kim, 2012). Normal koşullar altında, epitelyal hücre yüzeyindeki integrinler ekstra selüler matriks ile temasa

girdiğinde, FAK (Focal Adhesion Kinase) fosforilasyon ile aktive edilir ve bu da fosforilasyon kaskadını tetikleyerek Akt (Protin Kinaz B olarak da bilinmektedir) aktivasyonu ile sonuçlanır ve böylece hücre sağ kalımı artar. İntegrin, ekstra selüler matriks ile temasını kaybederse, hücre hayatta kalma sinyalleri durur ve pro-apoptotik proteinler, Bad (Bcl-2-associated death promoter), engellenmemiş halde bırakılır ve hücre ölümünü başlatabilirler. Kanseri hücreleri, EMT ile ilişkili olan çeşitli şekillerde, bu durumun üstesinden gelebilir. Örneğin, E-cadherin ekspresyonunda bir kayıp ve N-cadherin ekspresyonunda bir artış, anoikis direnci ve artmış invazivlik ile korelasyon gösterir (Derksen ve ark., 2006). Büyüme faktörü reseptörlerinin disregülasyonunun anoikislere direnç gösterebileceği de gösterilmiştir. Kanseri hücrelerinin farklılaşması için; gerekli genleri aktive edilmesi, proliferasyon olaylarını yavaşlatılması, bazı apoptotik yolların indüklenmesi, epitelialden mezenkimale hücresel özelliklerin değiştirilmesi gerektiği gösterilmiştir. Bunlar; hücre-hücre bağlantısında yardım edilmesi, hücre hareketine katkı sağlayan hücre adezyon moleküllerinin yukarı-regüle edilmesi, hücre-hücre bağlantılarının indirgenmesi ve hücre dışı matrisin kesilmesi için hücre yüzeyinde proteazlarının harekete geçirilmesi gibi süreçler içermektedir. Farklı kanser popülasyonları, bu değişiklikleri destekleyen değişken epigenetik kalıplara sahiptir ve her bir model farklı bir klinik önem taşır. EMT ve metastazın karmaşıklığı popülasyonun heterojenliğinde yatar. Tüm hücreler aynı anda EMT'ye uğramaz ve EMT geçiren tüm hücreler başarıyla metastaz yapamaz. Kanseri progenitörü hücre özellikleri, çevresel faktörler, hücre dışı ve hücre içi sinyalizasyon ve epigenetik değişiklikler, bir hücrenin EMT'ye ve metastaza girip girmeyeceğini etkiler.

Son yıllarda ortaya atılan iki hipotez EMT'yi ve metastazı açıklamaya çalışmaktadır (Sarkar ve ark., 2013). Birinci hipoteze göre, bir tümörde bulunan kanseri progenitör hücreleri aynı anda EMT'ye girmez, bu nedenle kanserli popülasyon farklı aşamalardaki farklı hücreleri içerir. Ancak, bu aşamalar sabit değildir. Farklılaşmanın herhangi bir aşamasında kanseri öncül hücreleri farklılaşmanın daha ileri bir aşamasını gerçekleştirmek ve gelişmiş kanseri derecesine ulaşmak için EMT'den geçebilir. Aslında, bu noktada farklılık göstermekle birlikte, aynı öncü hücreden kaynaklanır ve farklı zaman aralığında farklı EMT'ye uğrarlar. İkinci hipoteze göre ise, bazı kanseri öncül hücrelerinin, başlangıçta EMT'den

geçtikten sonra klonal genişlemeyi takiben metastaz yapacağını düşündürmektedir. Bu durumda, metastatik bir tümör, başlangıçta EMT yapılan hücre ile bir belirteç paylaşacak ve bu nedenle her kanser derecesi farklı bir progenitör hücreden gelecektir. Meme kanseri üzerine yapılan çalışmalar, heterojen, metastatik göğüs kanseri tümörlerinin, birinci hipotezi destekleyen birkaç kanser progenitör hücrelerden elde edilir olduğu göstermektedir (Byler ve Sarkar, 2014; Hajj ve ark., 2003). Bununla birlikte, metastatik kanserin heterojenliğinin, farklı kanser dereceleri üretmek için farklı zamanlarda farklılaşan bir çok kanser öncül hücresi tarafından üretilmesi hala mümkündür (Campbell ve Polyak, 2007). Sadece birkaç kanser öncül hücresinin metastatik meme kanserine katkısı, metastatik meme kanseri hücrelerinin yüksek genetik çeşitliliğe sahip olduğu bulguları ile tutarlı değildir (Park ve ark., 2010). Bu anomalinin, kanserdeki heterojenliğin rasgele genetik farklılaşmadan gelmediği, evrimsel olarak korunmuş ve organize bir şekilde işleyen bir mekanizma tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Meacham ve Morrison, 2013). Bu organize mekanizma, EMT'yi, yani farklı epigenetik değişim modelini içerir (Byler ve Sarkar, 2014; Hajj ve ark., 2003; Sarkar ve ark., 2013) .

2.2 Mezenkimal-Epityyal Dönüşüm (MET)

Epityyal hücrelerin mezenkimal hücrelere kısmen veya tamamen dönüşebilmesi veya mezenkimal hücrelerin epityyal özellik kazanması, epityyal fenotipin doğal bir plastisitesini gösterir. Mezenkimalden epityyale dönüş (MET) de bu dinamik sürecin bir başka önemli basamağıdır.

MET hem gelişimsel, hem rejeneratif hem de patolojik bir çok oluşum için temel hücresel bir süreçtir (Antonello, Reiff ve ark., 2015; Kim, Jackson ve ark., 2016). EMT ve MET, ayrıca embriyonik kök hücre differensiyasyonu ve pluripotensinin indüklenmesini de düzenlemektedir. Klasik tanımlar MET'i basitçe EMT sürecinin tersi olarak tanımlasa da, son yıllarda yapılan çalışmalar bunun öyle olmadığını açıkça vurgulamaktadır. MET sadece vimentin, N-cadherin gibi mezenkimal belirteçlerin azalarak düzenlenmesi (downregulation) ve E-cadherin gibi epityyal belirteçlerin artarak düzenlenmesinden (upregulation) çok daha karmaşık ve dinamik bir süreci tarif etmektedir. Bu dinamik ve kompleks sürecin sadece EMT ve MET

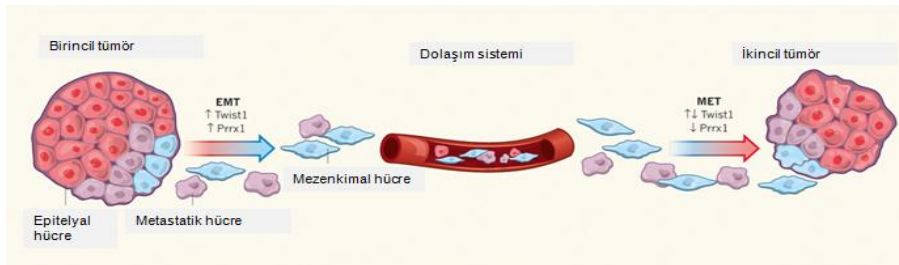
belirteçlerinin artması veya azalmasıyla anlatılması ve düzenlenmesi mümkün değildir (Kim, Jackson ve ark., 2016).

Hem EMT hem de MET süreçleri başlangıçtan sonuca kadar transkripsiyonel, post-transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel birçok basamakta farklı düzenleyiciler tarafından kontrol edilmektedir (Lamouille, Subramanyam ve ark., 2013). Bu ekspresyon seviyesindeki düzenlenmenin yanı sıra epigenetik modifikasyonlar da hücrenin fenotipik plastisite açısından dengede kalmasını sağlamaktadır (Somarelli, Shetler ve ark., 2016). Bu sıkı düzenlenmeden transkripsiyonel faktörler, kromatin tekrar düzenleyici faktörler (chromatin reorganisation factors), yüzey reseptörleri ve adhezyon molekülleri gibi birçok faktörün sorumlu olduğu bilinmektedir (Bozzi, Brich ve ark., 2016). Epigenomun dinamizmi transkripsiyon faktörlerinin kromatin ve kromatin düzenleyici enzimlerle ilişkisiyle sağlanmaktadır. Transkripsiyon faktörleri aktive edilerek kromatin altyapısı değişmekte ve bu faktörler DNA düzenleyici bölgelerine bağlanmaktadır. Tüm bu süreçte kromatinde değişiklik yapabilen enzimler (chromatin modifying and remodeling enzymes) aktif rol oynamaktadır (Brettingham-Moore, Taberlay ve ark., 2015).

Epigenetik modifikasyonlar DNA sekansından bağımsız olarak gen aktivitesi ve ekspresyonunu düzenleyebildiği ve tersinebilir olduğu için birçok biyolojik süreçte büyük önem arz etmektedir (McDonald, Wu ve ark., 2011; Serrano-Gomez, Maziveyi ve ark., 2016). Epigenetik regülasyonun büyük bir kısmını proteinlerin enzim bağımlı olarak değişimine neden olan translasyon sonrası (post-translational) modifikasyonlar (PTMs) ve histon modifikasyonları oluşturmaktadır. Asetilasyon en önemli modifikasyonlardan biridir ve transkripsiyonel aktivasyonun düzenlenmesinden DNA/protein bağlanma becerisine kadar birçok hücresel olayla yakından ilişkilidir (Gregoire, Fleury ve ark., 2016; Serrano-Gomez, Maziveyi ve ark., 2016). Çünkü tüm DNA kalıbına ihtiyaç duyan süreçler (transkripsiyon, replikasyon, rekombinasyon gibi) kromatin altyapısının kompleks yapısından etkilenmektedir (Stadler ve Allis 2012). Asetilasyonun global olarak balansı HAT (histon asetiltransferaz) ve HDAC (histon deasetiltransferaz) histon asetilasyon düzenleyicileri tarafından düzenlenmektedir (Zhang, Liu ve ark., 2013). p300, CBP, ve PCAF en çok bilinen HAT substratları

arasındadır. MYC ve p53 gibi önemli onkogen ve tümör supresörlerin bazıları da histon proteinleri olmamalarına rağmen asetilasyon substratı olabilmektedir (Zhang, Liu ve ark., 2013). CBP ve p300'ün gen düzenleyici ağlara etkisi nedeniyle 400'den fazla proteinle ilişkide olduğu bilinmektedir. Bu moleküller histon ve diğer düzenleyici proteinlerin asetilasyonu ile harekete geçmekte ve birçok transkripsiyon faktörü için transkripsiyonel ko-aktivatör görevi üstlenmektedir (Mizuguchi, Specht ve ark., 2012). p300'ün EMT'deki rolü ise tartışmalıdır. Bazen yüksek p300 ekspresyonu EMT'ye neden olurken, bazen tam tersi olmaktadır. p300'ün EMT'deki rolünün duruma ve diğer transkripsiyon faktörleriyle ilişkisine bağlı olarak değişebildiği düşünülmektedir (Mizuguchi, Specht ve ark., 2012).

Gelişimsel olayları ve yara iyileşmesi gibi süreçleri destekleyen MET, aynı zamanda başarılı bir metastaz için önemli bir ön koşuldur. EMT geçirmiş ve vücudun diğer bölgelerinde dolaşan kanser hücreleri, başka dokulara entegre olmalarına ve klinik açıdan önemli tümör sinyalleri üretmelerine izin veren bir mekanizmaya sahip olmalıdır. Bunu yapabilmek için de, öncelikle çevresindeki dokuya bağlanacak şekilde epitelyal özelliklere sahip olmaları gerekmektedir. Bu fenomenin bir örneği, uyarılmış pluripotent kök hücrelerde (iPSC'ler) gözlenmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, MET'i tetikleyen faktörlerin ekspresyonunu arttırarak, iPSC'lerin üretilmesinin EMT mediatörlerini bastırdığını göstermektedir (Polo ve Hochedlinger, 2010). Uzak dokulardaki metastatik ve başarılı implantasyon arasındaki bu modülasyon, metastazın son derece organize olmuş ve evrilmiş EMT / MET hipotezini daha da destekler özelliktedir.



Şekil 2.2: Kanser metastazında EMT - MET rolü

(Van Denderen ve Thompson, 2013)

Kök hücre differensiyasyonu ve germ hücre gelişimi gibi EMT sırasındaki epigenetik tekrar programlamaya da kromatin modifikasyonlarındaki değişimlerle sağlanmaktadır (McDonald, Wu ve ark., 2011). Son yıllardaki çalışmalar, mezenkimal fenotipin genom üzerindeki lokus spesifik epigenetik tekrar programlamayla inşa edildiğini işaret etmektedir. Bir hipoteze göre, fenotipik geçiş transkripsiyon faktör aktivitesinin kromatin aracılıklı stabilizasyonuna bağlıdır. Kısaca, epitelyal ve mezenkimal fenotipler kromatin durumundaki değişimlerle koordine edilmektedir (Cieslik, Hoang ve ark., 2013).

EMT sırasında görev alan bazı transkripsiyon faktörleri ve histon modifikasyonları arasındaki ilişki uzun yıllardır çalışılmasına rağmen epigenetik tekrar programlanmanın doğası henüztümüyle aydınlatılabilmiş değildir. Bu genom boyunca süre gelen epigenetik programlanmanın EMT/MET sürecindeki tam fonksiyonu ve mekanizmasına değinen çok az literatür bilgisi bulunmaktadır. Tüm bu veriler, EMT/MET transkripsiyonel faktörlerinin kromatinde değişim yapabilen enzimler aracılığıyla düzenlenmesinin hem gelişim hem de kanser gibi patolojik koşullardaki önemini ve bu konudaki bilgi açığını vurgulamaktadır (Cieslik, Hoang ve ark., 2013; Tam ve Weinberg, 2013; Lee ve Kong, 2016; Sun ve Fang, 2016). Bu faktörlerin transkripsiyon faktörleriyle olan ilişkisinin anlaşılması ve biyolojik önemlerinin kavranmasının gelişim ve kanser süreçlerindeki bu dinamik EMT/MET değişimlerinin anlaşılmasında önemli rol oynayacağı yadsınamaz bir gerçektir. Hepatosit nükleer faktör 4 α (Hnf4 α), orfan nükleer reseptör (orphan nuclear receptor) sınıfına ait bir transkripsiyon faktörüdür. Hnf4 α 'nın fetal karaciğer organogenezi boyunca E-cadherin gibi birçok adhezyon molekülünü regüle edebildiği bilinmektedir (Alotaibi, Basilicata ve ark., 2015). Anti-mezenkimal rolü sayesinde ana EMT düzenleyicilerini (Snail gibi) ve mezenkimal genleri baskılayarak hepatik epitelyal fenotipin korunmasını kontrol ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, Hnf4 α 'nın MET indükleyici bir faktör olarak hareket ettiği bilinmektedir (Santangelo, Marchetti ve ark., 2011; Alotaibi, Basilicata ve ark., 2015; Cicchini, Amicone ve ark., 2015). Hnf4 α 'nın hepatosit epitelyal kimliği sağlamadaki rolünün epigenetik modifikasyonlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Cicchini, de Nonno ve ark., 2015). Ayrıca diğer hücrelerden farklı olarak olgun hepatositlerin tekrar hücre siklusuna katılabildiği ve karaciğerin ana fonksiyonlarını sağlamayı sürdürürken prolifer olabildiği bilinmektedir. Bunu

sağlayan faktörlerden birinin de transkripsiyon faktörü Cebpα'nın ekspresyonundaki azalma olduğu düşünülmektedir (Cicchini, Amicone ve ark., 2015).

CCAAT/enhansır-binding protein Cebpα, bZIP (basic leucine zipper) transkripsiyon ailesinin bir üyesidir. Birçok hücre tipinde hepatogenez, adipogenez ve hematopoezin düzenlenmesi gibi önemli biyolojik fonksiyonları bulunmaktadır. (Yuan, Wen ve ark., 2015). C/EBP proteinlerinin p300 ile kompleks içinde bulundukları bilinmektedir. Cebpα'nın kromatin düzenleyici proteinler p300 ve HDAC1 ile ilişki içerisinde olduğu bazı hücre tiplerinde saptanmıştır (Breux, Lewis ve ark., 2015).

2.3 Grainy Head Like-3 (Grhl3)

Yapılan pek çok çalışmada, sınırlı sayıda genin, sinek embriyolarında kütikül oluşumunun düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Ostrowski, Dierick ve ark., 2002). Saptanan bu genler arasında bulunan grainy head (grh) transkripsiyon faktörlerinin (Bray and Kafatos. 1991) büyük ölçüde, yüzey ektodermd eksprese olan (Hislop, Caddy ve ark., 2008; Boglev, Wilanowski ve ark., 2011), epidermal bariyer oluşumunun düzenlenmesinde ve tamir mekanizmasında rol oynayan, korunmuş faktörler olduğu görülmüştür (Yu, Mannik ve ark., 2009). Meyve sinekleri (Drosophila) üzeri yapılan araştırmalarda, graniy head mutasyonuna uğramış olan embriyoların yumurtadan çıkamadığı ve gevşek kütiküllere, damarlı, kesintili iskelet yapısına ve düzensiz trakeal tüpe sahip oldukları gözlemlenmiştir (Gustavsson, Copp ve ark., 2008). Bu araştırmaları takip eden süreçte, grh transkripsiyon faktörlerinin, PCP (planar cell polarity) sinyal yolunun bir bileşeni olarak kanat kıllarının ve ommatidia oryantasyonlarının düzenlenmesinde de yer aldığı gösterilmiştir (Lee ve Adler, 2004). Ayrıca, trakeal uzama (Hemphala ve ark., 2003), dorsal kapanma (Attardi ve ark., 1993), nöronal tüp kapanması ve omurgalılarda yara iyileşmesi de dahil olmak üzere epitelyal morfogenetik olaylar için bir paradigma olarak hizmet etmektedir.

Grh, kütikül proteinlerini ve kitini çapraz bağlayan kinonlar üreteren Dopa dekarboksilaz (Ddc) regülasyonu yolu ile kütikülün bütünlüğünü korur (Bray, Burke ve ark., 1989). Dopa dekarboksilazın memelilerdeki TGase1 (transglutaminaz 1) benzer işlevsel fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir.

Grh homologları, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Anopheles gambiae* ve *Balarus amphitrite* türlerinde de saptanmış olup, 700 milyon yıl boyunca korunmuş olduğu kanıtlanmıştır. (Ting, Caddy ve ark., 2005; Wilanowski ve ark., 2002; Kudryavtseva ve ark., 2003; Venkatesan ve ark., 2003). Omurgalılarda *Drosophila grainyhead*'e benzer genler, Grhl (grainyhead benzeri) genler olarak adlandırılmakta ve bilinen üç üyesi bulunmaktadır: Grhl1, Grhl2 and Grhl3 (Ting, Caddy ve ark., 2005; Chalmers, Lachani ve ark., 2006, Mlacki, Kikulska ve ark., 2015). Bu genlerin embriyonik gelişim sürecindeki ve erişkin derisindeki birçok ektodermal ve endotermal hücre tipinde eksprese olduğu bilinmektedir (Gustavsson, Copp ve ark., 2008). Ekspresyonları doku ve gelişime yönelik şekilde özgülleşmiştir (Mlacki, Kikulska ve ark., 2015).

Grhl3 (grainy head-like 3) fare embriyogenezi sırasında epidermal differansiyasyon ve bariyer oluşumundan sorumlu, büyük ölçüde korunmuş bir transkripsiyon faktörüdür (Darido ve Jane 2010; Hopkin, Gordon ve ark., 2012; Gordon, Zeller ve ark., 2014; Xu, Liu ve ark., 2014). CP2 benzeri transkripsiyon faktör ailesinin üyelerinden biridir (Gordon, Zeller ve ark., 2014). Kökeni meyve sineği (*Drosophila*) grainy head (grh) genine dayanmaktadır. grh geninin ets transkripsiyon faktörü Elf1 genine karşılık geldiği saptanmıştır (Bray ve Kafatos, 1991). Elf-1 dışında NTF-1 olarak da adlandırılmaktadır (Chalmers, Lachani ve ark., 2006, Hislop, Caddy ve ark., 2008). Daha önce GET1 (Kudryavtseva, Sugihara ve ark., 2003), MGR, LBP-32, SOM ve BOM olarak da adlandırılmıştır (Chalmers, Lachani ve ark., 2006). GRHL3 birçok türde gelişim ve yüzey ektoderminin homeostazı için kritik bir faktördür (Xu, Liu ve ark., 2014). Grhl3 sitoplazmada lokalize olmaktadır (Xu, Liu ve ark., 2014). Grhl3 erişkin fare epidermisinde düşük seviyede eksprese olmaktadır ve normal epidermal homeostazı için zorunlu bir faktör olmamasına rağmen mekanik ve immün bir epidermal zarar durumunda upregüle olmaktadır (Gordon, Zeller ve ark., 2014). Grhl3 geni, farede kromozom 4'te lokalize olmaktadır (Gustavsson, Copp ve ark., 2008). Grhl3 açısından mutant olan farelerde nöral tüp defektine bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalık olan spina bifida görülmektedir (Chalmers, Lachani ve ark., 2006; Gustavsson, Greene ve ark., 2007, Ting ve ark., 2003). Fare embriyogenezi sırasında Grhl3 ekspresyonunun büyük oranda yüzey ektoderm ile sınırlandırıldığı gösterilmiş olup, bu tabaka boyunca 12.5. embriyonik günden itibaren ifade edildiği

ve epidermal bütünlüğün idame ettirilmesindeki rolü kanıtlanmıştır. (Ting, Caddy ve ark., 2005). Grhl3 olmayan fareler uygun bir deri bariyeri oluşturamamakta ve doğar doğmaz dehidrasyondan ölmektedir (Ting, Caddy ve ark., 2005; Lukosz, Mlynek ve ark., 2011; Mlacki, Kikulska ve ark., 2015).

Grh'nin epigenetik morfogeneziste önemi olan Lmo-4 (LIM-only protein 4) proteiniyle de etkileştiği bilinmektedir (Kudryavtseva, Sugihara ve ark., 2003). Memeli Grhl3 proteininin de direkt olarak Lmo-4'e bağlanmamasına rağmen, Lmo-4 ile birlikte çoklu bir protein kompleksinde görev aldığı ve bu birlikteliğin özellikle nöral tüpün kapanması ve epidermal bariyer oluşumu için gerekli olduğu saptanmıştır (Yu, Lin ve ark., 2006; Hislop, Caddy ve ark., 2008).

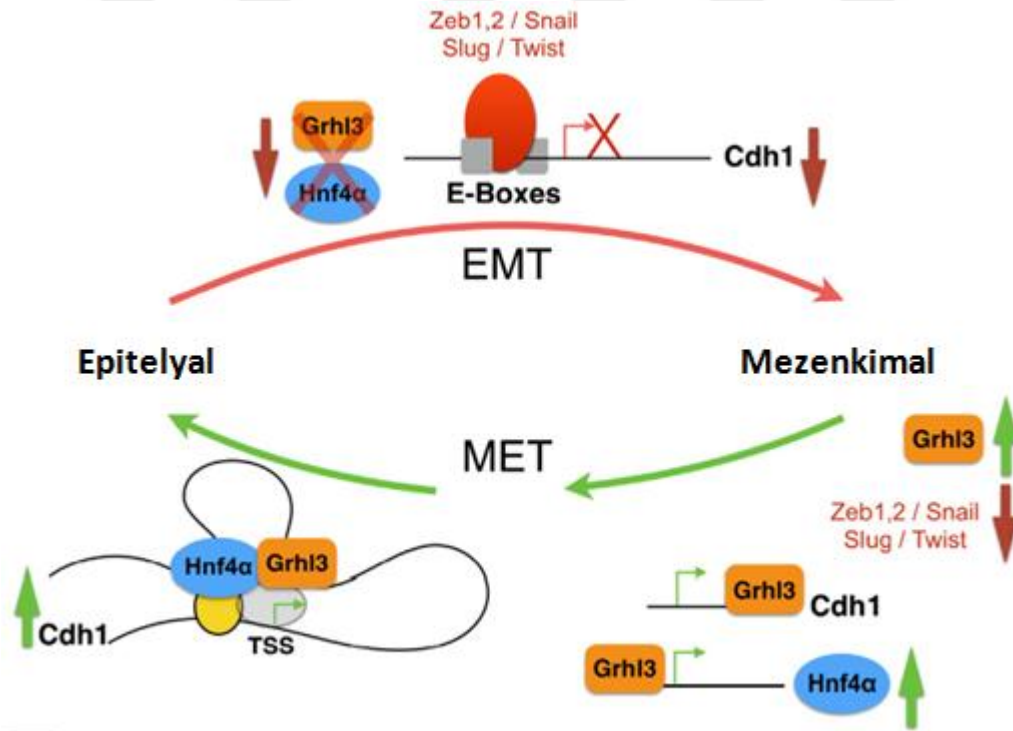
Grh ortologlarının hayvan epitelyal hücrelerde bir çok değişik fonksiyon için gerekli olduğu bilinmektedir (Hislop, Cadd ve ark., 2008). Fare ve meyve sineğindeki korunmuş fonksiyonlardan bir tanesi de epidermal bariyer çapraz bağlanma genlerinin transkripsiyonel aktivasyonu ve yara sonrası bu epidermal bariyerin rejenerasyonudur (Mace, Pearson ve ark., 2005). Grhl3 silinmesi lipid sürecinden sorumlu enzimler, hücre-hücre adhezyon molekülleri ve yapısal proteinleri de içeren bariyer oluşumunda kritik rolleri olan birçok genin ekspresyonunda azalmaya neden olmaktadır (Ting, Caddy ve ark. 2005; Boglev, Wilanowski ve ark., 2011; Gordon, Zeller ve ark., 2014)

Memelilerde Grhl3 göz kapağı füzyonu, nöral tüpün kapanması ve yara tamiri gibi epidermal morfogenez olaylarda gereklidir. Ayrıca insan epidermal differensiyasyon gen ekspresyon programının aktivasyonundan da sorumlu olduğu bilinmektedir. Grhl3'ün WDR5 aracılığıyla trxG (Trithorax grubu proteinler)'yi epidermal differensiyasyon promotörüne çağırdığı düşünülmektedir (Hopkin, Gordon ve ark. 2012). Grhl3'ün mesane epitelyimu differensiyasyonunda da önemli rol oynadığı bilinmektedir (Hopkin, Gordon ve ark. 2012). Tüm bu özelliklerinin yanısıra Grhl3'ün antiapoptotik etkisi olduğu da saptanmıştır. Bu etkiyi Kaspaz-3'ü inhibe ederek eNOS (endotel nitrik oksit sentaz) aktivasyonu ile yaptığı düşünülmektedir (Lukosz, Mlynek ve ark. 2011).

Son yıllarda yapılan çalışmalar Grhl3'ün kanser çalışmalardaki yerini de vurgulamaktadır. Grhl faktörlerinin deri skuamöz hücreli karsinom, meme kanseri, mide kanseri, hepatosellüler karsinoma, kolorektal kanser, prostat ve servikal kanser gibi kanser tipleriyle ilişkisi olduğu bilinmektedir (Mlacki, Kikulska ve ark. 2015). Özellikle insan deri ve boyun skuamöz hücreli karsinomunda Grhl3 ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmektedir. Grhl3'ün skuamöz hücreli karsinomlarda kritik tümör baskılayıcı yolda görev aldığı düşünülmektedir. Grhl3'ün meme kanserindeki spesifik rolü bilinmese de meme kanserinde koruyucu bir faktör olabileceği varsayılmaktadır (Mlacki, Kikulska ve ark. 2015). Ayrıca Grhl3'ün memeli karsinom hücre hattı MCF-7'de TNF- α tarafından indüklendiği bilinmekte ve tümör hücre göçü ve metastazı için olası bir rolü olabileceği düşünülmektedir (Xu, Liu ve ark. 2014). Grhl3'ün meme kanserindeki önleyici rolünün ve olası tümör baskılayıcı yolağa katkısının Grhl3'ün direkt olarak E-cadherin'i regüle etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Mlacki, Kikulska ve ark. 2015, Zhao, Guo ve ark. 2016). Çünkü Grhl3'ün tümörejenik olmayan meme bezi hücrelerinde ve akciğer kanseri gibi bazı kanser türlerinde E-cadherin'in MET (mezenkimalden epitelyale geçiş) sürecindeki ekspresyonunu pozitif olarak düzenleyebildiği bulunmuştur (Alotaibi, Basilicata ve ark. 2015, Mlacki, Kikulska ve ark. 2015).

EMT ve MET süreçlerinin arasındaki geçişlerde, E-cadherin ekspresyonun değişimi ve bunu regüle eden diğer molekülerin ekspresyonundaki değişim önemlidir. EMT sürecinde, E-cadherin ekspresyonundaki azalma, MET sürecinde hızlı bir şekilde eski haline dönebiliyor. EMT sürecini tetikleyen çok sayıda sinyal ileti yolağı aracılığı ile Snail, Slug, Zeb1, Zeb2, Twist gibi molekülerin E-cadherin ekspresyonunu baskılaması ile gerçekleşmektedir. E-cadherinin transkripsiyonel düzeyde kontrolü oldukça kompleksdir (Battle ve ark., 2000; Cano ve ark., 2000; Carver ve ark., 2001; Comijn et al. ve ark., 2001; Conacci-Sorrell ve ark., 2003; Grooteclaes ve Frisch, 2000; Peinado ve ark., 2004; Perez-Moreno ve ark., 2001; Yang ve ark., 2004). MET sürecinde ise E-cadherin ekspresyonunu baskılayan molekülerin ekspresyonunda azalma olmaktadır. Ancak bu tek başına MET sürecinde E-cadherin ekspresyonundaki değişim için yetersiz olmaktadır. Stemmler ve ark. çalışmalarında, fare modelinde, E-cadherinin promotorunun tek başına E-cadherin ekspresyonunu düzenlemekte yetersiz olduğunu göstermişlerdir (Stemmler ve ark., 2003). Stemmler

ve ark. yaptıkları çalışmada cis-düzenleyici bölgelerin E-cadherin ekspresyonunu düzenlediğini ve bunların transkripsiyonun başladığı bölgenin aşağısında yer aldığını göstermişlerdir (Stemmler 2003). Bunun yanında E-cadherin geninde intron 2 delesyonu durumunda, E-cadherin lokusunun baskılandığı gösterilmiştir (Stemmler 2005). Bu da bazı transkripsiyon aktivatörlerinin cis-regülatör bölgelere bağlanarak E-cadherin ekspresyonunu düzenlediğini göstermektedir. Werth ve ark. çalışmalarında Grhl2'nin E-cadherinin intron 2 bölgesine bağlanarak, E-cadherin ekspresyonunu düzenlediğini göstermişlerdir (Werth ve ark., 2010). Ayrıca Grhl3'ün Hnf4a'nın promotor bölgesine bağlanarak ekspresyonunu düzenlediğini, daha sonra Hnf4a ile birlikte E-cadherin ekspresyonunu çok daha güçlü bir şekilde uyardığını görülmektedir (Alotaibi ve ark., 2015)



Şekil 2.3: Grhl3, Hnf4a ekspresyonunun düzenlenmesine ve MET sürecine katkıda bulunur.

(Alotaibi ve ark., 2015)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel niteliktedir.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir Biyotıp ve Genom Enstitüsü laboratuvarlarında 2016 Eylül- 2017 Haziran tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada insan üzerinde bir çalışma yapılmamış, deneyler in vitro olarak hücreler ile gerçekleştirilmiştir.

3.4 Çalışma Materyali

Araştırmada, grubumuzda bulunan NMuMG (Normal Murine Mammary Gland) ve MEF (Mouse embryonic fibroblast) hücre hatları kullanılmıştır.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Araştırma kapsamında kullanılan NMuMG hücre hattı bağımsız değişkendir. Hücrelerin transfekte edildiği vektörler bağımlı değişkendir. Promotör sekansı üzerinde belirlenen Elf3 bağlanma bölgeleri bağımlı değişkendir.

3.6 Veri Toplama Araçları

3.6.1 NMuMG (Normal Murine Mammary Gland) ve MEF (Mouse embryonic fibroblast) Hücre Hatları

Projede kullanılan NMuMG (ATCC: The Global Bioresource Center/ CRL-1636) hücre hattı ticari olarak, MEF hücre hattı İzmir Biyotıp ve Genom Enstitüsü'nden Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından temin edilmiştir.

3.6.2 Hücre Kültürü

NMuMG ve MEF hücre hattı, normal koşullarda %10 Donor Horse Serum (Biochrom/ S9131), 100u/ml penisilin, 0,1mg/ml streptomisin (Thermo Fisher Scientific 15140122) ve % 1 esansiyel olmayan aminoasit karışımı içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Thermo Fisher Scientific/ 41965039) besin ortamlarında üretilmişlerdir. Hücre kültürü işlemleri biogüvenlik 2 düzeyinde laminar kabinet içerisinde yapılmıştır NMuMG hücreleri 37°C'de, %10 CO₂'li inkübatörde

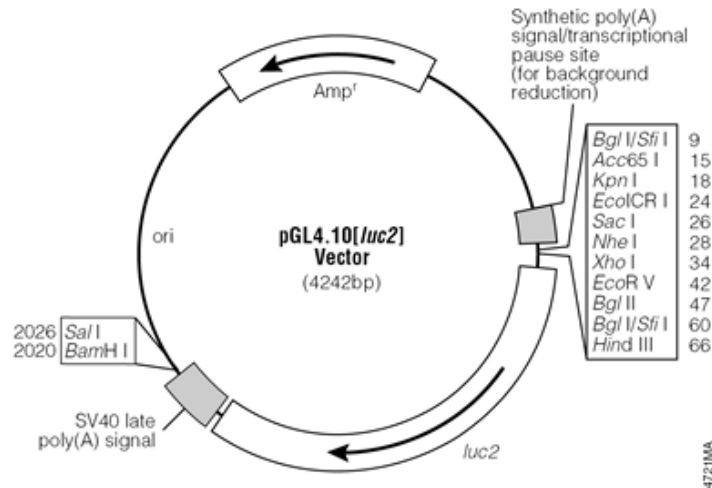
(Eppendorf / Galaxy® 170 S)MEF hücreleri 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücreler büyüme hızlarına ve başlangıç yoğunluklarına göre değişmekle birlikte 2 ila 3 günlük aralıklarla bir altkültüre edilmiştir. Hücreler yaklaşık 80% yoğunluğa ulaştığı zaman kültür kaplarındaki ortam çekilip, 2 defa 10ml steril PBS (Merck/ L1825) ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılıp kültür kabına 1 ml Tripsin-EDTA (Biochrom/ L2163) solüsyonu konulmuş ve inkübatörde hücreler tutundukları yüzeyden ayrılana kadar 1-2 dakika bekletilmiştir. Tripsinizasyonu durdurmak üzere hücrelere FBS içeren 9ml ortam konularak pipetlendikten sonra santrifüj edilmiş ve supernatant uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan hücre pelleti 10ml DMEM ile yeniden pipetlenerek istenilen miktarda hücre önceden içerisine ortam eklenen yeni kültür kaplarına ekilmiştir. NMuMG hücre dizilerinin ortamına, her kültür esnasında taze olacak şekilde 10µg/ml insülin (Sigma-Aldrich/ I9278-5ML) eklenmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında, hücre çoğalmasını takip etme amacı ile ters bakışlı faz kontrast ışık mikroskopundan yararlanılmıştır.

3.6.3 Transfeksiyon

3.6.3.1 Plazmidlerin Elde Edilmesi

Tez kapsamında kullanılan Grhl3 promotor bölgesinin (1kb) pGL4.10 lusiferaz reporter vektörüne XhoI/HindIII kesim bölgeleri arasına klonlanmasıyla elde edilmiştir.



Şekil 3.1: pGL4.10[luc2] Vektör Promega

NMuMG hücreleri hücre kültürüne uygun koşullarda büyütölüp dördüncü pasajı geçmeyecek şekilde transfeksiyona hazırlanmıştır. Hücreler süspanse halde iken deney koşullarına göre, pGL410-luc Grhl3 promotör ve pCMV10-luc Elf3 vektörleri ile transfekte edilmiştir. Transfeksiyon için 3:1 (DNA:Reaktif) oranında Promega™ E2311 transfeksiyon reaktifi kullanılmıştır. 48 kuyulu hücre kültürü kaplarına 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir.

Transfeksiyondan önce hücrelerin %80 civarında yoğunlukta olması beklenmektedir. Transfeksiyon için;

1. Kurulan deney modeline göre (Promotör aktivitesi ve/veya Grhl3 promotöründe Elf3 aktivasyonu) tablo 3.1'deki hesaplama dikkate alınarak, etiketlenmiş, 1,5ml endorff tüpleri içerisinde, vektör ve reporterlar hazırlanmıştır.
2. Yoğunluğu %80 civarında olan ve 10 cm'lik kültür kaplarında büyütölen NMuMG hücrelerinin ortamları uzaklaştırılmıştır.
3. Hücreler 2 kere 1x PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine 1ml tripsin eklenerek kalkması için inkübatörde 1 ile 2 dakika arasında bekletilmiştir.
4. Bu sırada boş besi yeri içerisinde 3:1 (DNA:Reaktif) olacak şekilde transfeksiyon reaktifi eklenmiş ve 5 dakika beklenmiştir.
5. İnkübatörden alınan hücreler 9ml antibiyotik içermeyen besi ortamı ile süspanse edildikten sonra santrifüj edilmiş ve hücre pelleti 10ml antibiyotik içermeyen besi ortamında tekrar çözülmüştür.
6. Önceden hazırlanan vektör ve reporter karışımı üzerine Tablo 3.1'de belirtilen miktarda DMEM ve transfeksiyon reaktifi içeren karışım eklenmiş ve ortalama yarım saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
7. Bu sırada 10ml ortam içerisinde bulunan hücreler sayılmış ve 1×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir.
8. Yarım saat inkübe edilen transfeksiyon reaktifi ve vektör-reporter karışımı (Tablo 3.1) hücrelere eklenmiştir.
9. Hücreler 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

Tablo 3.1: Transfeksiyon hesaplama

İsim	pGL4.10	pGrhl3	pGrhl3-XB	pGrhl3_XB-PH	pGrhl3_XB-XP	pGrhl3_XB+TS
Büyüklik (bç)	4242	5216	4781	4618	4367	4568
Konsantrasyon ng/ul	100	100	100	100	100	100
pmol/ul	0,036	0,029	0,032	0,033	0,035	0,033
75 ng (ul)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	75
75 ng in pmol	0,027	0,0218	0,024	0,02475	0,02625	2,475
0,02175	0,523611	0,65	0,5890625	0,571212121	0,538571429	0,571212121
ng	52,36111	65	58,90625	57,12121212	53,85714286	57,12121212
Ren ng	5	5	5	5	5	5
pcmv10 ng	12,63889	0	6,09375	7,878787879	11,14285714	7,878787879
pcmv10 (µl)	0,126389	0	0,0609375	0,078787879	0,111428571	0,078787879
Elf3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tek koşul için						
	pGL4.10	G3p	pGrhl3-XB	pGL4.10-PH	pGrhl3_XB-XP	pGrhl3_XB+TS
DMEM/FuGene	23,65	23,65	23,65	23,65	23,65	23,65
Reporter	0,52	0,65	0,59	0,57	0,54	0,571212121
pcmv10	0,13	0,00	0,06	0,08	0,11	0,078787879
pcmv10 or elf3	0,20	0,20	0,20	0,20	0,2	0,2
RenTK	0,50	0,50	0,50	0,50	0,5	0,5
	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00
4 koşul için						
	pGL4.10	G3p	pGrhl3-XB	pGL4.10+PH	pGrhl3_XB-XP	pGrhl3_XB+TS
DMEM/FuGene	94,60	94,60	94,60	94,60	94,60	94,60
Reporter	2,09	2,60	2,36	2,28	2,16	2,28
pGL4.10	0,51	0,00	0,24	0,32	0,44	0,32
Sport or Grhl3	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
RenTK	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	FuGene	DMEM	Total			
1	0,35	23,30	23,65			
4	1,4	93,2	94,60	1229,80		
13	18,2	1211,6	1229,8			

3.6.4 Lusiferaz İle Reporter Aktivitesinin Ölçülmesi

48 saat transfekte edilen hücrelerin lusiferaz reporter aktiviteleri Dual Glo lusiferaz assay kit kullanılarak ölçülmüştür.

1. 48 kuyulu kültür kabı içerisinde besiyeri uzaklaştırılmıştır.
2. 2 kere 1x PBS ile hücreler yıkanmıştır.

3. Yüzeye yapışık halde bulunan hücrelerin üzerine 30µl PBS ve 30µl lusiferaz assay kit içerisinde bulunan lizis buffer eklenerek hücreler kaldırılmıştır.
4. Lize edilen hücreler Grainer 96 kuyulu plaka içerisinde sırası ile eklenmiş ve lusiferaz aktivitesinin ölçümü luminometre cihazı (Berthold Centro XS³ LB 960) ile her kuyu için bir saniye olacak şekilde yapılmıştır.
5. Daha sonra, lusiferaz assay kiti dahilinde bulunan 30µl stop & glo buffer ve 1:100 seyreltilmiş renilla substratı içeren karışım eklenerek renilla aktiviteleri ölçülmüştür.

3.6.5 Elf3 Aşırı Ekspresyonu

Hücreler, transfeksiyon reaktifi (promega) kullanılarak Elf3 vektörü ile transfekte edilmiştir. Öncelikle 1.5ml ependorf içerisinde 100ng DNA içerecek şekilde plazmid karışımları hazırlanmıştır (Tablo 3.2). Transfeksiyon reaktifi önerilen koşullarda DNA:Reaktif oranı 3:1 olacak şekilde hazırlanmıştır. Aynı zamanda 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında, kuyucuk başına 50µl DMEM içerisine 3µl Fugene eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra hazırlanan plazmid karışımı üzerine eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hücre kültürüne uygun koşullarda büyütülmüş ve pasaj sayısı dördü aşmayacak şekilde transfeksiyona hazır hale getirilmiş hücreler, bu inkübasyon sürecinde 50.000 hücre/kuyu olacak şekilde 48 kuyucuklu hücre kültürü kabına ekilmiştir. Inkübasyonu tamamlanan reaktif/DNA karışımı hücrelerin üzerine hücreler süspansiyon halinde iken eklenmiştir.

Tablo 3.2: ELf3 aşırı ekspresyonu plazmid miktarları

Plazmid DNA	PCMV10 (100ng)	ELF3 (100ng)	GFP (100ng)
Koşul 1	9µl	-	1µl
Koşul 2	4,5µl	4,5µl	1µl

48 saat 37°C'de transfekte edilen hücrelerden RNA izolasyon kiti (Macharey- Nagel NucleoSpin® RNA) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır.

3.6.5.1 RNA İzolasyonu

48 saat inkübe edilen hücrelerin ortamları uzaklaştırıldıktan sonra 1X PBS ile iki kere yıkanmıştır. Daha sonra kit protokolünde önerilen basamaklar uygulanmıştır.

1. Hücrelerin üzerine, her bir kuyucuğa, 350µl kit içerisinde bulunan RA1 solüsyonu ve 3,5 µl beta-merkaptoethanol eklenmiştir.
2. Hüce lizatları kit dahilinde bulunan filtreli tüpler içerisine aktararak 11,000xg'de bir dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
3. Filtre atılarak dipte kalan lizat üzerine 350µl %70 ethanol eklenmiştir.
4. Tekrar yeni bir filtreli tüpe aktarılan hücre lizatı 11,000xg' de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
5. Filtreli kolonun altında bulunan tüp, santrifüj sonrası altta kalan lizat ile birlikte atıldı ve kolonun altına yeni toplama tüpü konulmuştur.
6. Kolonun üzerine 10µl rDNase ve 90µl rDNase reaksiyon solüsyonu karışımında 95µl eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.
7. Kolon üzerine daha sonra 200u RAW2 solüsyonu eklendi ve 30saniye 11,000g'de santrifüj edilmiştir.
8. Tüp ve lizat atıldı. Yeni tüpe yerleştirilen kolonun üzerine 600µl RA3 solüsyonu eklenerek 11,000g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.
9. Lizat atıldıktan sonra aynı tüpe yerleştirilen kolonun üzerine 250µl RA3 solüsyonu eklenerek 11,000g'de iki dakika santrifüj edilmiştir.
10. Kolon yeni bir tüpe yerleştirildikten sonra filtrede kalan RNA'yı elde etmek amacı ile 30µl nükleazdan arındırılmış su eklenerek 1 dakika boyunca 11,000g'de santrifüj edilmiştir.

3.6.5.2 cDNA Sentezi

1. Nano-drop kullanarak RNA miktarları ölçüldükten sonra cDNA kiti (Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit) ile cDNA sentezi yapılmıştır.
2. Kit içerisinde bulunan 5x Reaksiyon Mix, Maxima Enzyme ve RNA pcr tüpü içerisinde, kit protokülünde önerilen oranlarda karıştırılmıştır (Tablo 3.3)
3. Termal Cyler cihazı kullanılarak; 10 dakika 25°C, 15 dakika 50°C ve 5 dakika 85°C'de inkübe edilmiştir.

Tablo 3.3: cDNA Sentezi Protokolü

5x Reaksiyon Miks	4µl
Maksima Enzim	2µl
RNA	1ug
Nükleazdan arındırılmış su	RNA miktarına göre 20µl'ye tamamlanır
Toplam	20µl

3.6.5.3 qPCR (Gerçek Zamanlı PCR)

1. Elde edilen cDNA 1/20 oranında nükleazlardan arındırılmış su ile seyreltilmiştir.
2. Reaktifler tablo 'da belirtilen ölçülerde karıştırılmıştır.
3. 96 kuyucuklu qPCR plakası içerisine 10'ar µleklenmiştir.
4. Daha sonra üzerlerine 2,5µl seyreltilmiş cDNA eklenmiştir.
5. Applied Biosystem (SimpliAmp Thermal Cycler) gerçek zamanlı PCR cihazı kullanılarak; 95°C'de 15 dakika, 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 45 saniye olacak şekilde 40 tekrarlı programlama yapılmıştır.

Tablo 3.4: PCR Primerleri

GL2	CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA
RV3	CTAGCAAATAGGCTGTCCC
Grhl3_52 Forward	TCTAGTTCTCCCGTTCCTTCC
Grhl3_52 Reverse	CTCACCCCTCAGCTAAGAA
Grhl3_108 Forward	GGAGAAAAAGAGAGGGGACTCA
Grhl2_108 Reverse	TTTCCGGGTAGAGAAGGTGA

3.6.6 siRNA İle Gen Susturulması

NMuMG hücreleri, uygun koşullarda büyütüldükten sonra 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında siRNA ile transfekte edilmiştir.

1. Hücreler, RNAi *duplex-Lipofectamine™ RNAiMAX* complex ile transfekte edildi.
 - a. Seyreltilmiş 50 nM RNAi duplex, 250 µl DMEM (serum ve pen/strep içermeyen) ile birlikte ependorf tüp içerisinde karıştırıldı. Beş dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
 - b. Lipofectamine™ RNAiMAX solüsyonu kullanılmadan önce nazikçe karıştırılmış daha sonra 7.5 µl Lipofectamine™ RNAiMAX, 250

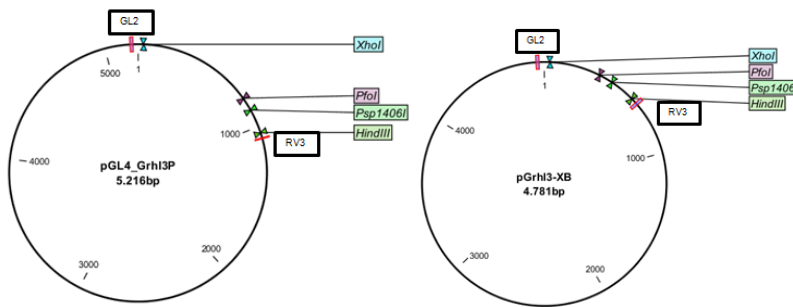
µlDMEM (serum ve pen/strep içermeyen) ile birlikte ependorf tüp içerisinde karıştırılmıştır.

c. a ve b' de hazırlanan karışımlar bir ependorf tüp içerisinde karıştırılmış ve 15-20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

2. 72 saat sonra yoğunlukları %80-90'a ulaşması amaçlanarak hücreler, antibiyotik içermeyen DMEM içerisinde (total hacim 2ml olacak şekilde) seyreltilmiş ve 6 kuyucuklu hücre kültürü plakasına ekilmiştir.
3. Her kuyucuğa 500µl hazırlanan karışımdan eklenmiştir.
4. 72 saat 37°C'de inkübe edilmiştir.
5. *MN Nucleospin* RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır.
6. *Thermo Scientific* cDNA kiti kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır.
7. *LSG-AB1138B-ABsolute qPCR rox mix* kullanılarak qPCR yapılmıştır.

3.6.7 Enzimatik Kesim Yöntemi

"*CLC Sequence Viewer*" programı kullanılarak Grhl3 promotör bölgesi üzerindeki enzimatik kesim yerleri belirlenmiştir. Enzim bölgeleri belirlenirken, Grhl3 promotör bölgesinin içerisine klonlanmış olduğu plazmidi farklı yerlerden kesmemesine dikkat edilmiştir. New England Biolabs (*XhoI*, *HindIII*, *BsaI*, *PfoI*) ve Thermo Scientific Fisher (*Psp1406i*) kesim enzimleri kullanılmıştır.



Şekil 3.2 : Plazmidler üzerindeki restriksiyon bölgeleri. *CLC Sequence*

Viewer programı kullanılarak sırası ile pGrhl3 ve pGrhl3_XB plazmidleri biyoinformatik olarak oluşturulmuştur. GL2 ve RV3 plazmidler üzerindeki *reverse* ve *forward* primer sekanslarını göstermektedir. *XhoI*, *HindIII*, *Psp1406i* ve *PfoI* restriksiyon bölgeleridir.

3.6.7.1 pGrhl3-XB (XhoI/BsaI) Plazmidinin Elde Edilmesi

Tablo 3.5: XhoI/BsaI Kesim

Reaktifler	Çift Kesim
H ₂ O	14 µl
Enzim Tamponu	2µl
Enzim 1 (XhoI)	1 µl
Enzim 2 (BsaI)	1 µl
DNA (1ug)	2 µl

3.6.7.2pGrhl3-PH (Psp1406I/ HindIII) Plazmidinin Elde Edilmesi

Tablo 3.6: Psp1406I/HindIII Kesim

Reaktifler	Çift Kesim
H ₂ O	14 µl
Enzim Tamponu	2µl
Enzim 1 (PSP1406I)	1 µl
Enzim 2 (HindIII)	1 µl
DNA (1ug) (pGrhl3-XB)	2 µl

3.6.7.3 pGrhl3-XP (XhoI/Psp1406I) Plazmidinin Elde Edilmesi

Tablo 3.7: XhoI/Psp1406I Kesim

Reaktifler	Çift Kesim
H ₂ O	14 µl
Enzim Tamponu	2µl
Enzim 1 (XhoI)	1 µl
Enzim 2 (HindIII)	1 µl
DNA (1ug) (pGrhl3-XB)	2 µl

- Kesim enzimlerinin protokollerinde belirtilen şekilde reaktifler bir tüpün içerisinde karıştırılmıştır. (Tablo 3.5, 3.6, 3.7)
- 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir.
- Kesim işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacı ile %2'lik agaroz jelde 6x New England Biolabs yükleme boyası ile elektroforez tankında yürütülmüştür.
- 1gr agaroz (Sigma Aldrich) tartılarak, 50ml TBE (Tris-Borate-EDTA) ile birlikte bir beher içerisine konulmuştur.
- Agaroz eriyene kadar mikrodalgada ısıtılmıştır.

- Bir miktar soğuduktan sonra %2.5 safe view eklenmiştir.
- Elektroforez tankına döküldü ve üzerine 10 kuyucuklu tarak yerleştirilmiştir.
- Jel donduktan sonra tarak çıkarıldı ve ilk kuyuya 4µl kesilen parçanın büyüklüğüne uygun DNA ladder eklenmiştir.
- Diğer kuyulara sırasıyla DNA ve yükleme boyası karışımı eklenmiştir.
- Yaklaşık 40-45 dakika 90V'da yürütülmüştür.
- UV ışığı altında görüntülenmiştir.

3.6.7.1 Klenow

- 5'-3' yönünde kesim yapan enzimler ile kesildikten sonra ortaya çıkan yapışkan uçların doğru bir şekilde birleşmesi amacıyla klenow yapılmıştır. (Tablo 3.8)
- 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Klenow aktivitesini inaktive etmek için 25 dakika 70 °C'de inkübe edildi veya tüm DNA jele yüklenerek jelden tekrar izole edildi. Jelden izolasyon için Zymo Gel Extraction Kit kullanılmıştır.
- UV ışığı altında jelden ilgilenilen bölge kesilip 1,5ml'lik ependorf tüp içerisine konulmuştur.
- Tüpün darası alınarak tartıldı ve jelin gramajı belirlenmiştir.
- Jelin gramajına göre, kitten önerildiği üzere, üç kat fazlası olacak şekilde ADB solüsyonu eklenmiştir. (Örneğin 100mg jel için 300µl ADB solüsyonu)
- Jelin solüsyon içerisinde tamamen çözünmesini sağlamak için 55 °C'de inkübe edilmiştir.
- Sıvı, kit dahilinde bulunan kolona yüklenmiştir.
- 30 saniye boyunca 11,000xg'de santrijüj edilmiştir.
- Tüpte kalan sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Kolona 200µl kit dahilinde bulunan DNA Wash Buffer eklenmiştir.
- 30 saniye boyunca 11,000xg'de santrijüj edilmiştir.
- Kolonda bulunan DNA'yı elde etmek amacı ile yeni bir tüp yerleştirilmiştir.
- 30µl Elution Buffer eklendi ve 1 dakikaboyunca 11,000xg'de santrijüj edilmiştir.

Tablo 3.8: Klenow Protokolü

10x Klenow Tamponu	2 µl
dNTP	0,5 µl
Klenow	1 µl
DNA	18 µl

3.6.7.4 Ligasyon

Kesilen plazmid DNA'nın tekrar birleştirilmesi amacı ile ligasyon yapılmıştır.

1. Kesilen ve klenow yapılan karışımın üzerine 1 µl ligaz enzimi eklenmiştir.
2. 30 dakika oda sıcaklığında veya bir gece boyunca 16°C'de inkübe edilmiştir.

Ligaz enzim aktivitesini inaktive etmek için 10 dakika 65 °C'de inkübe edilmiştir.

3.6.7.5 pGrhl3+TS Plazmidinin Elde Edilmesi (Klonlama)

PfoI enzimi metil duyarlı bir enzim olduğu için plazmid DNA'yı kesememektedir. Bu nedenle pGrhl3 plazmidi pfu polimeraz kullanarak PCR ile çoğaltılmıştır. Pfu polimeraz, PCR ürününü iki tarafı kör uç (blunt end) yapmaktadır. Daha sonra elde edilen insört, içerisinde XhoI ve HindIII kesim noktaları arasına klonlanmış, 1kb Grhl3 promotör sekansı çıkarılmış, vektör içerisine klonlanarak pGrhl3+TS vektörü elde edilmiştir.

3.6.7.5.1 İnsörtün Hazırlanması

Klonlama için gerekli olan insört parçasını hazırlarken ilgilenilen DNA sekansı öncelikle PCR ile çoğaltılmıştır. PCR yaparken Pfu polimeraz enzimi kullanılmıştır (Tablo 3.9). Lineer hale gelen DNA sekansını önce PfoI ve HindIII enzimleri ile iki farklı yerden kesilmiştir. Daha sonra klenow reaksiyonu ile her iki ucun kör uç olmasını sağlanmıştır. Klenow aktivitesinin tamamen sıfırlanması için tüm DNA ürününü agaroz jele yükledik ve jelden tekrarizole edilmiştir. Ardından XhoI enzimi ile kesilmiştir. Böylelikle XhoI ucu yapışkan uç HindIII ucu kör uç olan bir insört sekansı hazırlanmıştır.

Tablo 3.9: Pfu Polimeraz İle PCR Reaksiyonu

Reaktifler	Miktar
H ₂ O	12 µl
Pfu Buffer	2,5µl
GL2 (reverse primer)	1 µl
Grhl3_108 (forward primer)	1 µl
dNTP	0,5µl
DNA(20ng)	2 µl
Pfu	1 µl

PfoI ve HindIII ile kesim

- PCR ürünü üzerine 1µl PfoI ve 1µl HindIII eklendi.
- 1 saat 37°C'de inkübe edildi.



Klenow

- 1ul klenow + 0,5ul dNTP eklendi.
- 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.



Klenow inaktivasyonu

- Örnek %2 agaroz jele yüklendi
- 45 dakika 90V'da yürütüldü.
- Jelden izole edildi.



XhoI ile kesim

- 1µl XhoI eklendi.
- 1 saat 37°C'de inkübe edildi.

Şekil 3.3: Klonlama için insört hazırlanması

3.6.7.5.2 Vektörün Hazırlanması

Vektörün hazırlanması için pGrhl3 plazmidi kullanılmıştır. pGrhl3 önce HindIII enzimi ile kesildikten sonra klenow ve sonrasında klenow inaktivasyonu yapılmıştır.

Daha sonra XhoI enzimi ile kesim ve böylelikle, hazırlanan insörtlü uyumlu, XhoI ucu yapışkan uç, HindIII ucu kör uç olan vektör elde edilmiştir.

HindIII İle Kesim

- 1ul HinIII eklendi.
- 1 saat 37 °C'de inkübe edildi.



Klenow

- 1ul klenow + 0,5ul dNTP eklendi.
- 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.



Klenow inaktivasyonu

- 75°C'de 20 dakika inkübe edildi.



XhoI ile kesim

- 1ul XhoI eklendi.
- 1 saat 37 °C'de inkübe edildi.

Şekil 3.4: Klonlama için vektör hazırlanması

3.6.7.5.3. Klonlama

Hazırlanan insört ve vektörün ligasyonda kullanılmak üzere, "*Insilico Ligation Calculator*" kullanılarak, 3:1 (insört:vektör) olacak şekilde, miktarları hesaplanmıştır.

3.6.7.5.3.1 Ligasyon

- Reaktifler uygun uygun miktarlarda karıştırılmıştır (Tablo 3.10).
- 16°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.

- Ertesi gün tüm ligasyon örneği Top10F' kompetent hücreleri ile transforme edilmiştir.
- Amfisilin içeren agar plaka üzerine ekim yapılmış ve 16 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir.
- Plaka üzerinde büyüyen kolonilerden seçilerek, koloni PCR yapılmıştır.
- Koloni PCR ile doğrulanan örneklerden mini prep ile plazmid izole edilmiştir.

Tablo 3.10: Ligasyon Protokolü

Reaktifler	Miktar
H ₂ O	6,14µl
NEB Ligation Buffer	1,5µl
Ligaz	1µl
İnsört	3,46µl
Vektör	2,9µl

3.6.7.5.3.2 Koloni PCR

- 16 saat boyunca, amfisilinli plaka üzerinde, 37°C'de kültüre edilen bakterilerden 10luk pipet ucu yardımıyla koloni seçilmiştir.
- PCR karışımı (Tablo 3.11) üzerine, bir adet koloni içeren pipet ucu dokundurulmuştur.
- Daha sonra pipet ucu, koloni, PCR ile doğrulandığı takdirde plazmid izolasyonu yapılabilmesi için 2ml amfisilinli LB içeren 15ml falkon tüpler içerisine atılarak 37°C'de 16 saat boyunca kültüre edilmiştir.
- PCR karışımı; 95°C'de 10 dakika, 30 tekrar olacak şekilde 95°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye ve 72°C'de 5 dakika koşullarında PCR yapılmıştır.

Tablo 3.11: Koloni PCR

Reaktifler	Miktar
H ₂ O	13µl
Taq Polimeraz Buffer	2,5µl
MgCl ₂	1,5µl
dNTP	0,5µl
GL2	1µl
RV3	1µl
DNA	Seçilen koloni
Taq polimeraz	0,5µl

3.6.8 Transformasyon

Transformasyonun gerçekleştirilmesi için Top10F' kompetenet hücre (Thermo Fisher Scientific #C303003) kullanılmıştır.

1. 50µl kompetent hücre üzerine 1ug civarında DNA eklenmiştir.
2. 30 dakika boyunca buz üzerinde (+4°C) inkübe edilmiştir.
3. 90 saniye boyunca 42 °C'de bekletilmiştir.
4. 2 dakika boyunca buz üzerinde bekletilmiştir.
5. 1ml antibiyotiksiz LB içerisinde bir saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir.
6. Tüm lizat 5000rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. (Ligasyon ürünü değilse 1ml içerisinde direkt 50µl alınıp, ekilmiştir.)
7. Pellet, 50µl LB ile çözülüp antibiyotikli agar plakada 16 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir.

3.6.9 Plazmid İzolasyonu

Plazmid izolasyonu için Macharey- Nagel NucleoBond® Xtra Midi / Maxi kullanılmıştır.

1. Agar plaka üzerinde büyütülen bakteri kolonilerinden bir koloni seçilip antibiyotikli LB içerisinde 16 saat 37°C'de büyütülmüştür.
2. Elde edilen bakteri kültürü 15 dakika boyunca 5000xg'de santrifüj edilmiştir.
3. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti 12ml RES Buffer ile çözüldü.
4. Üzerine kit dahilinde bulunan 12ml LYS Buffer eklendi.
5. Daha sonra yine kit dahilinde bulunan NEU Buffer'dan 12ml eklendi.

6. Kit içerisinde bulunan filtreler 25ml EQU Buffer ile ıslatıldı. 50ml falkon üzerine yerleştirilmiştir.
7. Hazırlanan bakteri lizati filtreler eklenerek yer çekimi ile kolondan aşağı inmesi sağlanmıştır.
8. Daha sonra filtreye 15ml EQU Buffer eklenerek ilk yıkama yapıldı.
9. Filtre, kolondan uzaklaştırılmıştır.
10. İkinci yıkama için direkt kolon üzerine 25ml kit içerisinde bulunan Buffer Wash eklendi. Yer çekimi ile kolondan süzülmesi sağlanmıştır.
11. Elüsyon aşaması için kolonun altında bulunan falkon değiştirilerek, kit içerisinde bulunan Buffer ELU'dan 15ml eklendi ve yer çekimi ile kolondan geçmesi sağlanmıştır.
12. Kolondan geçen lizat 10,5ml izopropanol eklenerek 10,000xg'de yarım saat santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılmıştır.
13. Dipte kalan pellet üzerine 4ml %70 ethanol eklendi ve 10,000xg'de yarım saat santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılmıştır.
14. Pellet 300µl nükleazlardan arındırılmış H₂O (su) ile çözüldü.
15. DNA -20°C'de saklanmıştır.

3.6.10 Kromatin immünopresipitasyonu (ChIP)

1. NMuMG hücreleri 10cm hücre kültürü kaplarında, 8ml ortam içerisinde, %80 yoğunluğa gelecek şekilde uygun koşullarda büyütüldü.
2. Hücreleri fikse etmek için üzerlerine 222µl %37'lik formaldehit eklendi.
3. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
4. Üzerlerine 1ml 1.25M Glisin eklendi.
5. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
6. Ortam aspiratör yardımı ile uzaklaştırıldı.
7. Hücreler 2 kere 1X PBS ile yıkandı.
8. 1,5ml toplama solüsyonu eklendi ve hücreler, kültür kabından kazınarak 1,5ml ependorf içerisine toplandı.
9. 3000xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
10. Süpernatant uzaklaştırıldı ve dipte kalan pellet 400µl liziz solüsyonu ile lize edildi.
11. 2µl içerisinde ayrıldıktan sonra 60 dakika boyunca sonike edildi.

12. Maksimum hızda 10 dakika santrifüj edildi.
13. Süpernatant dilüsyon solüsyonu ve taze olarak eklenen PIC (protein inhibitor cocktail) ile 5ml'ye tamamlandı.
14. Elde edilen karışımdan IgG (Immünglobulin G) ve Elf3 antikorları için 1'er ml, input için 100µl ayrıldı.
15. 2µg antikor eklendi ve 50'şer µl protein A sefaroze boncuklarından eklenip 2 saat boyunca +4°C'de inkübe edildi.
16. 3000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
17. Süpernatant uzaklaştırıldı.
18. 750µl yıkama solüsyonu 1'den eklendi.
19. 3000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
20. 750µl yıkama solüsyonu 2'den eklendi.
21. 3000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
22. 750µl yıkama solüsyonu 3'den eklendi.
23. 3000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
24. 750µl yıkama solüsyonu 4'ten eklendi.
25. 3000xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
26. Süpernatant uzaklaştırıldı.
27. 100µl %10 Chelex eklendi.
28. Vorteks edildi ve 95°C'de 10 dakika inkübe edildi.
29. 2µl Proteinaz K solüsyonundan eklendi.
30. Vortex edildi ve 55°C'de 30 dakika inkübe edildi.
31. 95°C'de 10 dakika inkübe edildi. (Proteinaz K'yı inaktive etmek için)
32. Maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi.
33. Süpernatant yeni bir tüpe transfer edildi.
34. 100µl nükleazlardan arındırılmış su eklendi ve vortekslenip 2 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj edildi.
35. Süpernatant yeni bir tüpe transfer edildi.
36. Gerçek zamanlı pcr yapılarak ekspresyon seviyeleri ölçüldü.

3.6.10.1 ChIP için gerekli solüsyonlar

ChIP Dilüsyon Solüsyonu(50ml)

1. %10 SDS- 50µl
2. %10 TritonX - 5500µl
3. EDTA- 120µl
4. Tris-HCL pH=8,0 - 835µl
5. NaCl 5M - 167µl
6. 50ml'ye tamamlanacak miktarda distile su

ChIP Toplama Solüsyonu(50ml)

1. Tris - 500µl
2. NaCl - 1500µl
3. EDTA - 100µl
4. 50ml'ye tamamlanacak miktarda distile su

Liziz Solüsyonu (50ml)

1. %10 SDS - 5ml
2. EDTA - 1ml
3. Tris - 2,5ml
4. 50ml'ye tamamlanacak miktarda distile su

Yıkama Solüsyonu 1 (250ml)

1. %10 SDS - 2,5ml (son konsantrasyon %0,1)
2. %10 TritonX-100 - 25ml (son konsantrasyon %1)
3. 500mM EDTA - 1ml (son konsantrasyon 2mM)
4. 1M Tris - 5ml (pH 8,0) (son konsantrasyon 20mM)
5. 5M NaCl - 7,5ml (son konsantrasyon 150mM)

Yıkama Solüsyonu 2

1. %10 SDS - 2,5ml (son konsantrasyon %0,1)
2. %10 TritonX-100 - 25ml (son konsantrasyon %1)
3. 500mM EDTA - 1ml (son konsantrasyon 2mM)

4. 1M Tris - 5ml (pH 8,0) (son konsantrasyon 20mM)
5. 5M NaCl - 25ml (son konsantrasyon 500mM)

Yıkama Solüsyonu 3 (250ml)

1. 500mM EDTA - 0,5ml (son konsantrasyon 1mM)
2. %10 NP-40 - 25ml (son konsantrasyon %1)
3. 8M LiCl - 7,8125ml (son konsantrasyon 0,25mM)
4. 1M Tris - 2,5ml (pH 8,0) (son konsantrasyon %20mM)
5. Sodyum deoksilat - 2,5g (son konsantrasyon %1)

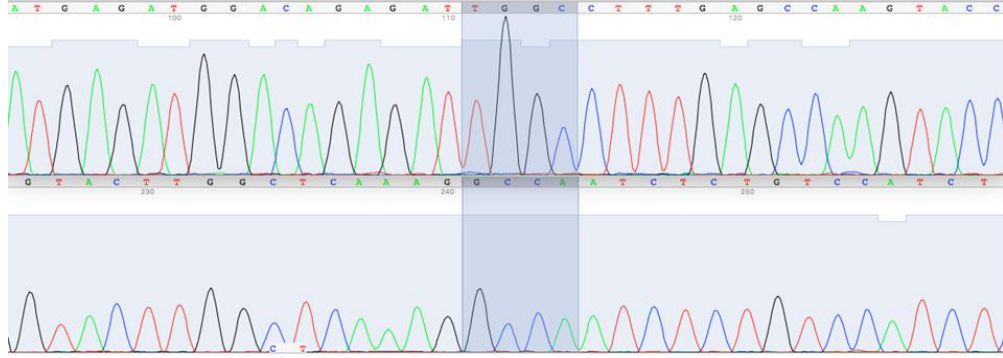
3.6.11 Bölgesel Yönlendirilmiş Mutasyon

Tablo 3.12 : Mutasyon Primerleri

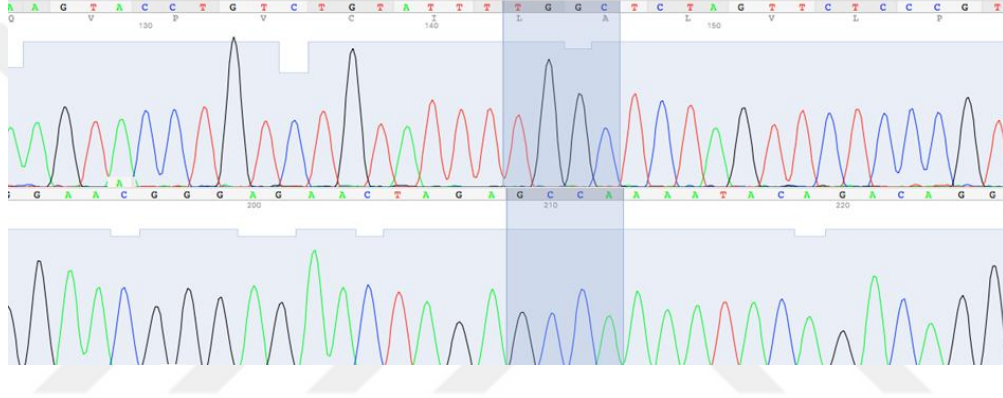
-186 sense	5' -CCAAGTACCTGTCTGTATTTTggCTCTAGTTCTCCCGTTC-3'
-186 anti-sense	3'-GAACGGGAGAACTAGAGccAAAATACAGACAGGTACTTGG-5'
-217 sense	5'-GATGAGATGGACAGAGATTggCCTTTGAGCCAAGTACCTGT-3'
-217 anti-sense	3'ACAGGTACTTGGCTCAAAGGccAATCTCTGTCCATCTCATC-5'

- Mutasyona uğraticak bölgeler için özel primerler dizayn edilmiştir (Tablo 3.12)
- Dizayn edilen primerler ile ve pfu- turbo (stratagene) kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur.
- PCR reaksiyonu 95°C'de 30 saniye ve devam eden basamaklar 15 tekrar olacak şekilde 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 1 dakika ve 68°C'de 10 dakika son basamak olarak 68 °C'de 20 saniye olacak şekilde tamamlanmıştır.
- Elde edilen PCR ürünü Dpn1 enzimi ile 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- 5 µl'si transforme edilmiştir.
- Transformasyon sonrası plaka üzerinde büyüyen koloniler 2ml bakteri ortamında 16 saat kültüre edildikten sonra mini prep ile plazmid izolasyonu yapılmıştır.
- Elde edilen plazmidler doğrulanmak üzere sekanslatılmıştır (Şekil 3.5)
- Doğrulanen plazmidler NMuMG hücrelerine transfekte edilmiştir.
- 48 saatlik trafeksiyon sonrasında lusiferaz aktiviteleri ölçülmüştür.

-207 sense / anti-sense

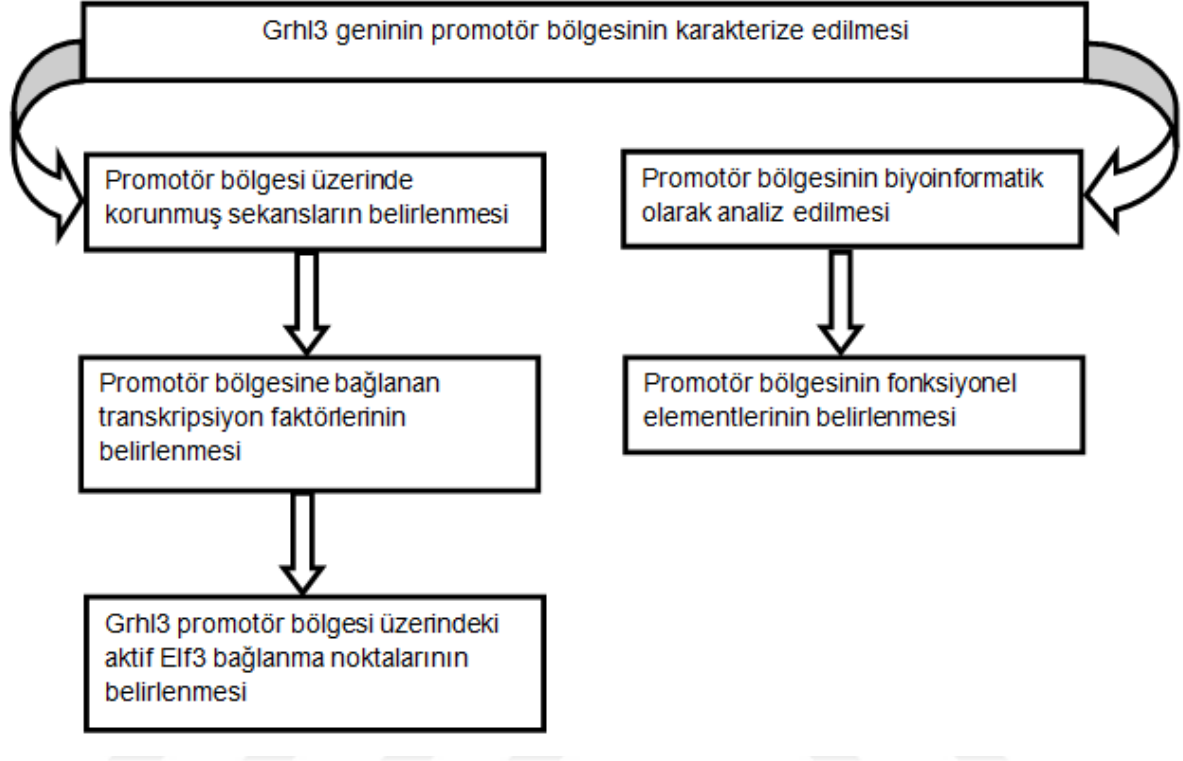


-186 sense / anti-sense



Şekil 3.3: Mutasyon primerleri sekans analiz sonuçları. Grhl3 promotörü üzerinden lusiferaz ve ChIP sonuçları baz alınarak, korunmuş bölge üzerinde bulunan iki adet Elf3 bağlanma noktası seçilmiştir (-186,-217). Oluşturulan mutatanların sekans grafiği şekildeki gibidir. İşaretli kısım mutasyonun yapıldığı yeri göstermektedir.

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi



Şekil 3.5: Araştırma planı

Tablo 3.13: Araştırma Takvimi

Zaman/Yapılacak İş	Eylül (2016)	Ekim Kasım	Aralık - Ocak (2017)	Şubat-Mart	Nisan	Mayıs	Haziran
Malzeme elde edilmesi ve literatür taraması	X						
Grhl3 promotör bölgesinin biyoinformatik analizleri		X					
Grhl3 promotör bölgesi klonlanmış lusiferaz reporter vektörü ve Elf3 ifade eden vektörü ile birlikte NMuMG hücrelerine transfekt edilecek ve Elf3e bağlı olarak reporter aktivitesi incelenecektir			X				
Grhl3 promotör bölgesi klonlanmış vekör üzerinden uygun enzimler kullanılarak promotör bölgesi kısıtılarak minimal promotör ve işlevsel promotör bölgeleri tanımlanacaktır.				X			
Gerekli görülürse, promotör bölgesi üzerinde olası Elf3 bağlanma noktaları ChIP ve mutasyonlar ile deneyerek Elf3'ün Grhl3 promotörü üzerindeki bağlanma bölgesi tespit edilecektir.					X	X	
Verilerin toplanması ve tez yazım aşaması						X	X

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma kapsamında belirtilen deneyler en az üç kere test edilmiştir. İstatistik analizlerde Paired T-test kullanılmıştır. Dizilerin anlamlandırılması için NCBI, *Genome Browser* Database kullanılmıştır.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızda daha önceden denenmiş olan protokol doğrultunda sürdürülecek olan lusiferaz deneylerinde herhangi bir sorun çıkması beklenmemiştir.

3.10 Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul onayı alınmıştır.

4. BULGULAR

MET sürecinde kritik bir role sahip olan Grhl3 geninin, bu sürecin düzenlenmesindeki rolünün belirlenmesinde ilk basamak Grhl3 promotör bölgesinin karakterize edilmesidir. Bu amaçla tez çalışması kapsamında öncelikle genin promotör bölgesi üzerindeki korunmuş sekanslar belirlenmiştir. Daha sonra biyoinformatik analizlerle incelediğimiz promotör bölgesi üzerindeki elementlerin işlevsel olup olmadıkları gösterilmiştir. Sonrasında yine biyoinformatik analizlerle belirlediğimiz transkripsiyon faktörlerin Grhl3 promotör bölgesi ile ilişkisi incelenmiştir.

4.1 Grhl3 Promotörü Üzerindeki Korunmuş Sekanslarının Belirlenmesi

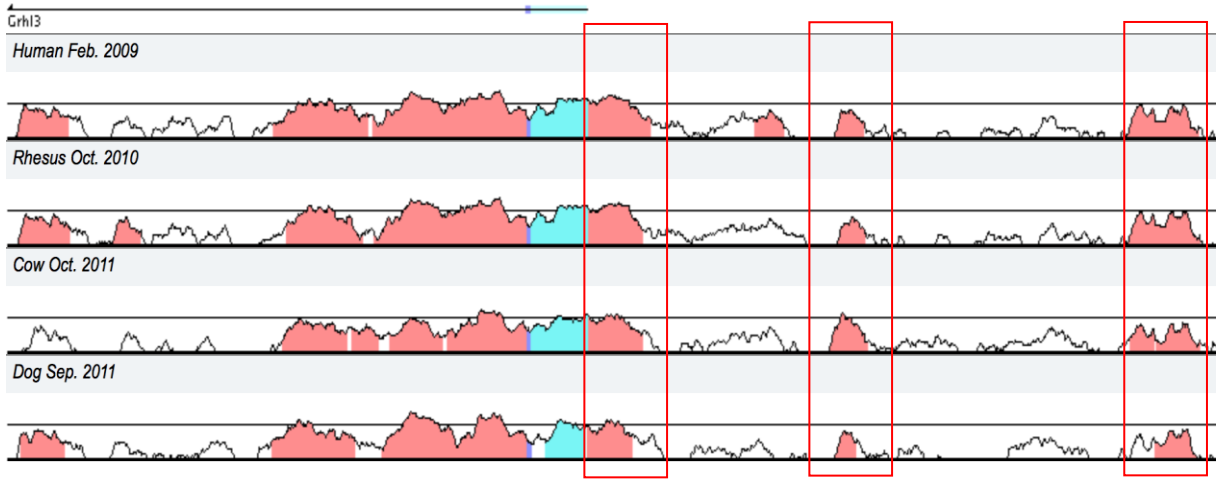
Bir geni karakterize ederken evrimsel olarak korunmuş sekanslarının belirlenmesi, geni regüle eden diğer transkripsiyon faktörlerinin ortaya çıkarılmasında ve ilgili genin işlevsel kısımlarının aydınlatılmasında önemli bir faktördür. Bu çalışma kapsamında fare Grhl3 promotör bölgesi farklı türlerle karşılaştırarak, korunmuş sekansları belirlenmiştir. *Genome Browser* aracılığı ile Grhl3 promotör sekansı FASTA formatında elde edilmiştir. Daha sonra, *mVista* veri bankalarını kullanarak yapılan analizde öncelikle fare Grhl3 promotör sekansını insan, maymun, inek ve köpek türleri ile karşılaştırılmıştır. Bu analizde sadece intergenik sekanslar dikkate alınmıştır ve 100bp' lik bölgede %70 özdeşliğin saptanacağı değerle elde edilen veriler doğrultusunda;

135573621 (75324698) - 135573778 (75324864) = 168bp at 73.8% intergenik

135574476 (75325530) - 135574563 (75325617) = 88bp at 75.0% intergenik

135575620 (75326789) - 135575776 (75326943) = 167bp at 67.7% intergenik

bölgelerde 3 adet korunmuş sekans belirlenmiştir. (Şekil 4.1)



Şekil 4.1: Grhl3 promotör bölgesi üzerindeki korunmuş sekanslar. 1kb promotör sekansı üzerindeki korunmuş bölgeler kırmızı çerçeveli dikdörtgenler ile gösterilmiştir. Şekil üzerindeki pembe dalgalarda korunmuş bölgeleri, mavi dalgalarda UTR (untranslated region) bölgesini ifade etmektedir.

4.2 Grhl3 Promotör Bölgesinin Biyoinformatik Olarak İncelenmesi

Genome Browser veri tabanını kullanılarak Grhl3 promotör sekansı FASTA formatında elde edilmiştir. *CLC Sequence Viewer* programı ile promotör bölgesi üzerinde bulunan TATA kutusu ve diğer promotör bölgesi elementleri taranmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda Grhl3 promotör bölgesi üzerinde bir adet olası TATA kutusu sekansı (-289) ve bir adet olası Sp1 sekansı (-64) (CCGCCCC) saptanmıştır.

```

-1000 tgcctagcac agagcactta cagtgtactg gccagctaag actcctgagg caaccacctt
-940 caacttttcc atccttttctg ggctggccag aggcattgtg tctgcccaca tcccgttcag
-880 attggcatcg cacaagatga aaggctgccc tgccctaatt ccctgattcc ccaccccatc
-820 tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctcac acacacacac acacacacac
-760 acacactcat gcacattggg ggaggggggg ctctcctga atagaaacca gcatttttctt
-700 tccccgctat tgccccagaa cccagagcga ggagacctg cactctcggg acttagtaaa
-640 tgtcccctgt caactgaggg caccaacttc aactcaagga gtagctagtc tcccagatga
-580 ctgaacgggt ctctgacact ggctctcacc cttaggcaag gcaccctgcc tctccaacct
-520 acattttcctc gatcacctgt agagggcatg gggttgggtg gggtggaagg gagagttgac
-460 agaaagtcct tcctagctgg ttactgggag aataggaaga aatcacttag ctaacaagac
-400 tagaacctgt ggtgtttgtt acccgaaggg gaaagtctg gagaaaagag aggggactca

TATA Kutusu
-340 cagagagcta cctgctctct tccgtgaaat tttccgggta gagaagggtga cTATAAAgag
-280 atatggtgtc tgtggggaga tgtttggtgg atccaggatc cgagcgatga gatggacaga
-220 gatttccctt tgagccaagt acctgtctgt atttttcctc tagttctccc gttccttccc
-160 aacgtttgtc tcctcccttt tccctcgtct ccacccctc acccctcag ctaagaagga

Sp1
-100 attggccggc tccaccagtc cagccccccg gagctccgccc cctgctgggtg ggccaaaagt

TBN
-40 taacatctgc acctgctgtg gtctagctgc agtcggcacc TGTGCTTCCA GCCAATCAGC
30 GCCACCGCAG CCGGGGACCG CTGTCAGCAA AATCTCAACA TCCAAAGCGC AACGTAGAGC
90 AAACGCTTCC CCGGGCAGGA AGGGAATGTC TGTGTCAGAG GAGAATTAAG AGACGAGTGG
150 TCAGCAGCGC CTGCGAGCCA ACCAGAGACG GATCGCTGGA ACCTCGGAGA AGGAAG

```

Şekil 4.2: Grhl3 promotör bölgesi. Grhl3 geninin 1kb promotör sekansı incelendiğinde koyu, siyah renkli sekanslar sırası ile TATA kutusu ve Sp1 sekanslarını göstermektedir. Kırmızı renkli sekanslar Grhl3 promotör bölgesi üzerindeki korunmuş sekansları göstermektedir. TBN: Transkripsiyon Başlama Noktası

4.3 Grhl3 Promotör Bölgesinin Fonksiyonel Elementlerinin Belirlenmesi

Grhl3 promotör bölgesini biyoinformatik yöntemle inceledikten sonra elde edilen sonuçlar doğrultusunda TATA kutusu ve Sp1 sekanslarının işlevsel olup olmadığını tayin etmek, aynı zamanda da Grhl3 promotör bölgesinin işlevsel özelliğe sahip en küçük sekansını (minimal promotör bölgesi) bulmak amacı ile kesim enzimleri kullanılarak promotör bölgesi kısaltılmış ve lusiferaz aktivitesi incelenmiştir. Kesim enzimleri sekanslarının konumu ve kesim motifleri CLC *Sequence Viewer* programı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.2).

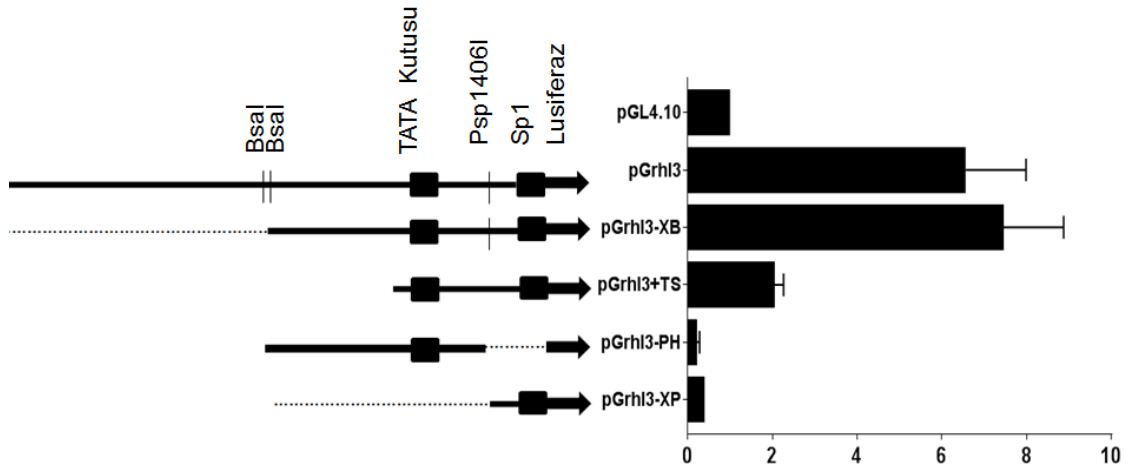
Öncelikle pGL410 plazmidi içerisine 1kb Grhl3 promotör bölgesi klonlanarak oluşturulan pGrhl3 vektörünün, pGL4.10 boş lusiferaz vektörüne göre ortalama 6,5 kat daha fazla ifade olduğu gösterilmiştir (Şekil4.3).

Daha sonra XhoI (C/TCGAG) ve Bsal (GGTCT/C) enzimleri kullanılarak kısaltılan plazmidin (pGrhl3-XB) pGL4.10'a göre ortalama 7,4 kat daha fazla ifade olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.3).

Oluşturulan pGrhl3-XB vektörü sırası ile Psp1406I ve HindIII ile enzimatik olarak kesildiği zaman Sp1 sekansı uzaklaştırılmaktadır. Ortaya çıkan yeni vektörün (pGrhl3-PH) pGL4.10 'a göre bir aktivasyon göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4.3).

Yine Psp1406I ve XhoI enzimleri kullanılarak oluşturulan yeni, TATA sekansı içermeyen vektörün pGL4.10'a göre bir aktivasyon göstermediği gösterilmiştir (Şekil 4.3). TATA uzaklaştırıldığında herhangi bir promotor aktivasyonu belirlenememesi bize Grhl3 promotör bölgesi aktivasyonu açısından TATA kutusunun işlevsel olduğunu düşündürmektedir.

Son olarak, TATA ve Sp1'in bir arada olduğu pGrhl3+TS vektörünün pGL4.10'a göre yaklaşık iki kat daha fazla aktivasyon gösterdiği belirlenmiştir (Şekil4.3).



Şekil 4.3: Grhl3 promotörü aktivasyon grafiği. Şekil üzerinde (solda) sırası ile restriksiyon enzimleri kullanılarak oluşturulmuş pGrhl3, pGrhl3-XB, pGrhl3+TS, pGrhl3-PH ve pGrhl3-XP vektörlerinin şematize edilmiş hali görülmektedir. Grafik üzerinde (sağda) oluşturulan yeni vektörlerin boş vektöre göre aktivasyonu gösterilmektedir.

4.5 Grhl3 Promotör Bölgesi Üzerinde Elf3 Bağlanma Noktalarının Tayin Edilmesi

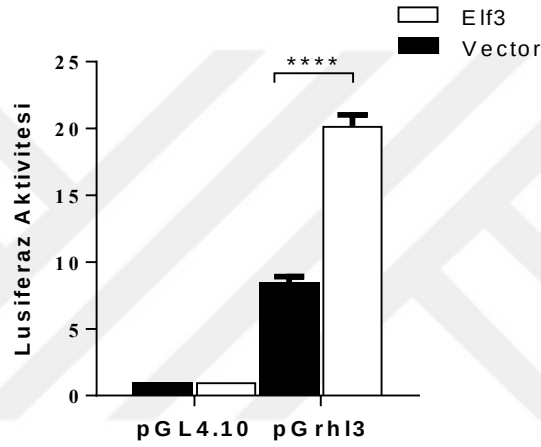
Genome Browser veri tabanı kullanılarak Grhl3 geninin promotör bölgesinin sekansı *FASTA* formatında elde edilmiştir. JASPAR veri tabanı ile fare gen sekansında Elf3 bağlanma bölgesi belirlenmiştir (GGAA). *CLC Sequence Viewer* programına Grhl3 promotör sekansı *FASTA* formatında eklenerek olası Elf3 bağlanma bölgeleri taranmıştır.

```
-1000 tgcctagcac agagcactta cagtgtactg gccagctaag actcctgagg caaccacctt
-940 caacttttcc atccttttct ggctggccag aggcattgtg tctgcccaca tcccgttcag
-880 attggcatcg cacaagatga aaggctgccc tgccctaatt ccctgattcc ccaccccatc
-820 tctctctctc tctctctctc tctctctctc tctctctcac acacacacac acacacacac
-760 acacactcat gcacattggg ggaggggggg ctctctctga atagaaacca gcatttttct
-700 tccccgctat tgccccagaa cccagagcga ggagaccttg cacactcggt acttagtaaa
-640 tgtccccgtg caactgaggc caccacttcc aactcaagga gtagctagtc tcccagatga
-580 ctgaacgggt ctctgacact ggctctcacc cttaggcaag gcaccctgcc tctccaacct
-520 acatttccct gatcacctgt agagggcatg gggttgggtg ggttggaaagg gagagttgac
-460 agaaagtcc tccctagctgg ttactgggag aataggaaaga aatcacttag ctaacaagac
Grhl3_108F
-400 tagaacctgt ggtgtttgtt acccgaagg gaaagtctg gagaaaagag aggggactca
Grhl3_108R TATA Kutusu
-340 cagagagcta cctgctctct tccgtgaaat tttccgggta gagaagggtga cTATAAAgag
-280 atatggtgtc tgtggggaga tgtttgggg atccaggatc cgagcgatga gatggacaga
Grhl3_52F
-220 gatttccctt tgagccaagt acctgtctgt atttttccctc tagttctccc gttcccttccc
Grhl3_52R
-160 aacgtttgtc tcttccctt tccctcgtct ccacccctc accccctcag ctaagaaggga
Sp1
-100 attggccggc tccaccagc cagcccccg gagctccgcc cctgctgggtg ggccaaaagt
TBN
-40 taacatctgc acctgctgtg gtctagctgc agtcgggcacc TGTGCTTCCA GCCAATCAGC
30 GCCACCGCAG CCGGGGACCG CTGTCAGCAA AATCTCAACA TCCAAAGCGC AACGTAGAGC
90 AAACGCTTCC CCGGGCAGGA AGGGAATGTC TGTGTCAGAG GAGAATTAAG AGACGAGTGG
150 TCAGCAGCGC CTGCGAGCCA ACCAGAGACG GATCGCTGGA ACCTCGGAGA AGGAAG
```

Şekil 4.5: Grhl3 Promotörü üzerinde Elf3 bağlanma noktaları. 1kb promotör sekansı üzerinde (siyah/normal); kırmızı/normal punto ile gösterilmiş olan nükleotidler korunmuş sekansları, yeşil/normal punto ile ifade edilenler Elf3 bağlanma noktalarını işaret etmektedir. Siyah/kalın punto ile TATA kutusu, kırmızı/kalın punto ile korunmuş sekans üzerindeki Sp1 bağlanma noktaları gösterilmiştir. Siyah/kalın punto ile işaret edilen kare içindeki nükleotid transkripsiyon başlama noktasını (TBN) göstermektedir. Promotör sekansı üzerinde ayrıca Grhl3_108 ve Grhl3_52 forward,reverse primer sekansları işaret edilmiştir.

4.6 Grhl3 Promotör Bölgesinin Elf3'e Bağlı Reporter Aktivitesinin Belirlenmesi

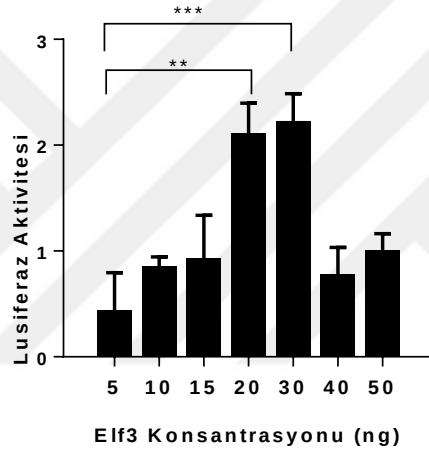
Elf3'ün Grhl3 aktivasyonunu nasıl regüle ettiğini görmek amacıyla, lusiferaz bağımlı reporter aktivitesi ölçülmüştür. 20ng Elf3 ile transfekte edilen NMuMG hücre hattında, transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacı ile GFP vektörü transfekte edilmiştir. 48 saat inkübasyondan sonra lusiferaz aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler doğrultusunda Elf3'ün, Grhl3 promotörünü 2 kat aktive ettiği gösterilmiştir.



Şekil 4.6: Elf3 Aktivitesine Bağlı Grhl3 ekspresyonu. pGL4.10 boş lusiferaz vektörüne göre sırası ile pGrhl3 vektörü ve Elf3 ile indüklenmiş vektörün aktivasyon seviyeleri gösterilmektedir. (**** $p < 0,0001$)

4.6.1 Elf3'ün Farklı Miktarlarda Grhl3 Promotörü üzerine etkisi

Elf3'ün farklı konsantrasyonlarda nasıl davrandığını görmek amacıyla sırası ile 5ng, 10ng, 15ng, 20ng, 30ng, 40ng ve 50ng Elf3 plasmidi kullanılarak NMuMG hücreleri transfeke edilmiştir. 48 saatlik transfeksiyondan sonra lusiferaz aktiviteleri ölçüldüğünde, 20ng ve 30ng konsantrasyonlarında en iyi aktive ettiğibelirlenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda ve yüksek konsantrasyonlarda aynı etkiyi göstermemektedir. Daha sonra yapılan transfeksiyonlarda 20ng kullanılmaya devam edilmiştir.

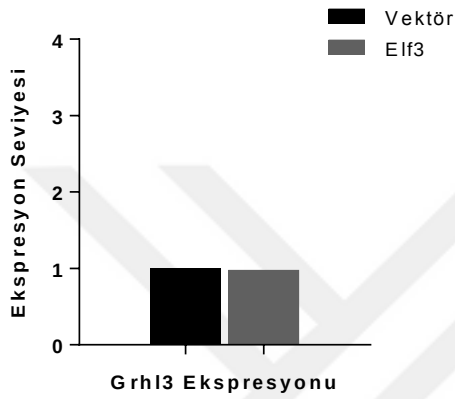


Şekil 4.7: Farklı Miktarlarda Elf3 Aktivitesine Bağlı Grhl3 Promotör Aktivitesi. Grafik, farklı konsantrasyonlardaki Elf3 transfeksiyonlarında Grhl3'ün değişen lusiferaz aktivasyonlarını göstermektedir. (** p=0,0018 , *** p=0,0010)

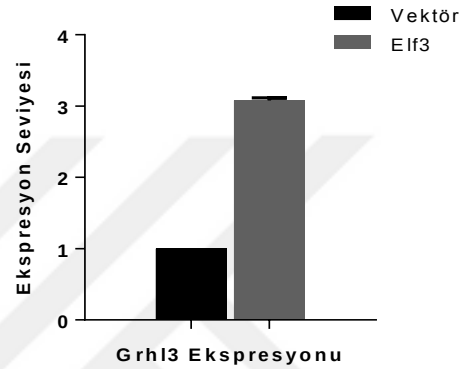
4.7 Elf3 Aşırı Ekspresyonunda Grhl3 Ekspresyonunun Belirlenmesi

NMuMG hücrelerinde Elf3 aşırı ekspresyonu yapıldığında Grhl3 ekspresyon seviyesinde herhangi bir farklılık olmamıştır. Daha sonra MEF hücre hattında Elf3 aşırı ekspresyonu ile Grhl3 aktivasyon seviyesi ölçülmüştür. Kontrol grubuna göre, Elf3'ün Grhl3 ekspresyonunu yaklaşık olarak 3 kat arttırdığı belirlenmiştir.

A)



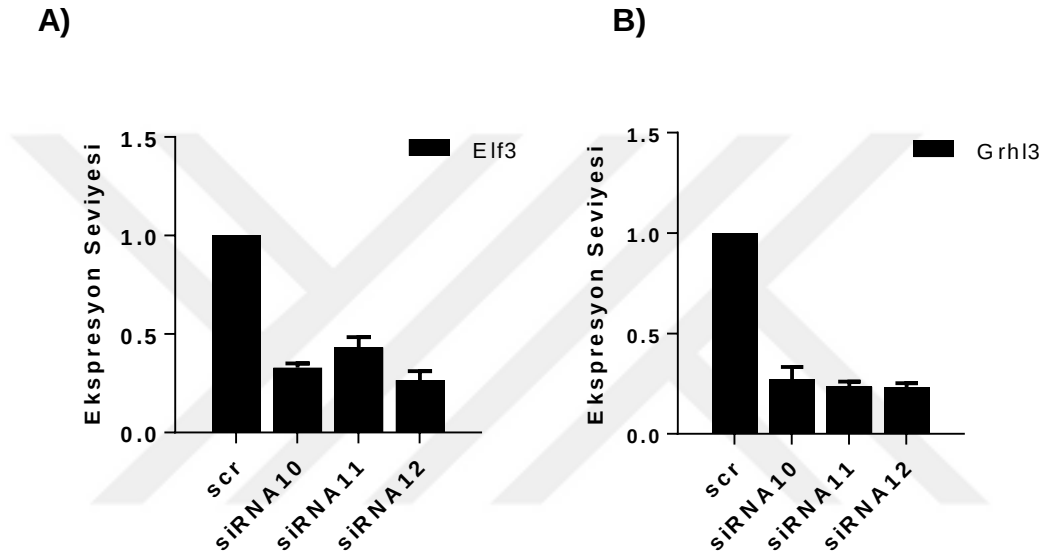
B)



Şekil 4.8: Elf3 Aşırı Ekspresyonunda Grhl3 Ekspresyonu. NMuMG hücre hattında Elf3 aşırı ekspresyonundan Grhl3 ekspresyon seviyesi değişmemektedir (A). MEF hücre hattında Elf3 aşırı eksprese edildiğinde Grhl3 ekspresyon seviyesinin 3 kat arttığı görülmektedir (B).

4.8 Elf3'ün Susturulması Durumunda Grhl3 Ekspresyonunun Belirlenmesi

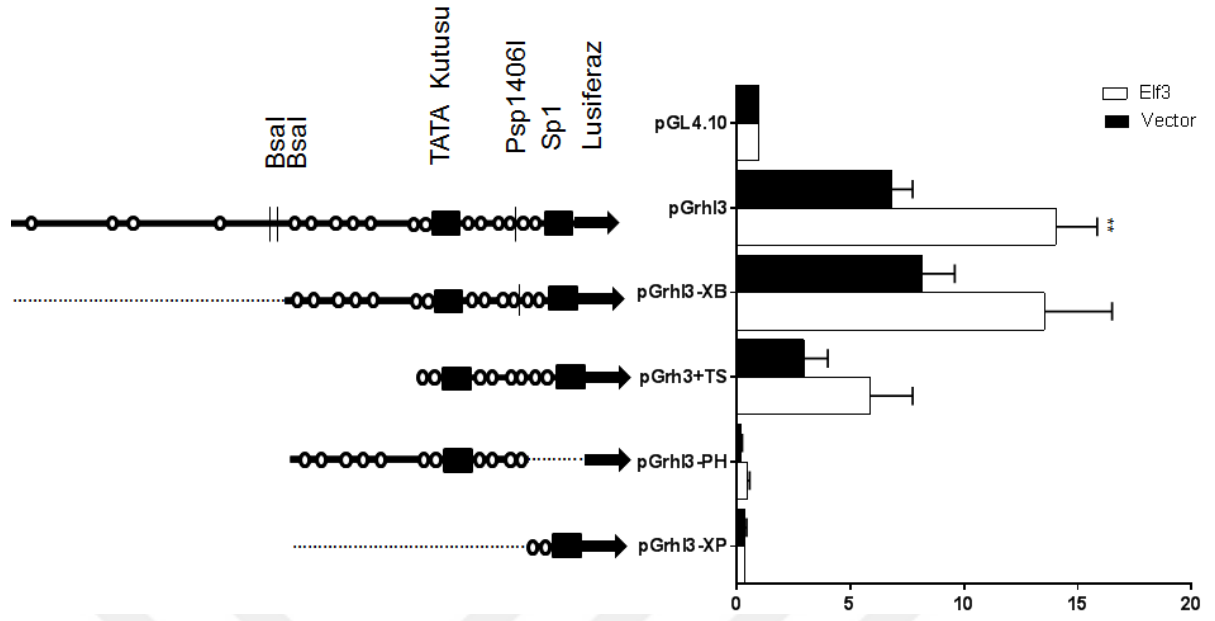
NMuMG hücre hattında farklı siRNA'lar kullanılarak Elf3 geni susturulmuş ve öncelikle Elf3 ekspresyon seviyesibelirlenmiştir (şekil 4.9 A) Daha sonra Elf3'ün susturulduğu hücrelerde Grhl3 ekspresyon seviyesi belirlenmiştir. Elf3 ekspresyonunun olmadığı koşulda, kontrol grubuna göre Grhl3 ekspresyon seviyesinin yaklaşık %80 oranında azaldığı gösterilmiştir (şekil 4.9 B).



Şekil 4.9: Elf3'ün Susturulması Durumunda Grhl3 Ekspresyonu. Grafik üzerinde, Elf3 genini susturduğumuz NMuMG hattında Elf3 ekspresyon seviyesinin kontrol siRNA (scr) içeren gruba göre ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir (A). Aynı siRNA'lar kullanılarak Elf3'ün susturulduğu durumda Grhl3 seviyesi gösterilmiştir (B).

4.9 Grhl3 Promotörü Üzerinde aktif Elf3 Bağlanma Noktalarının Belirlenmesi

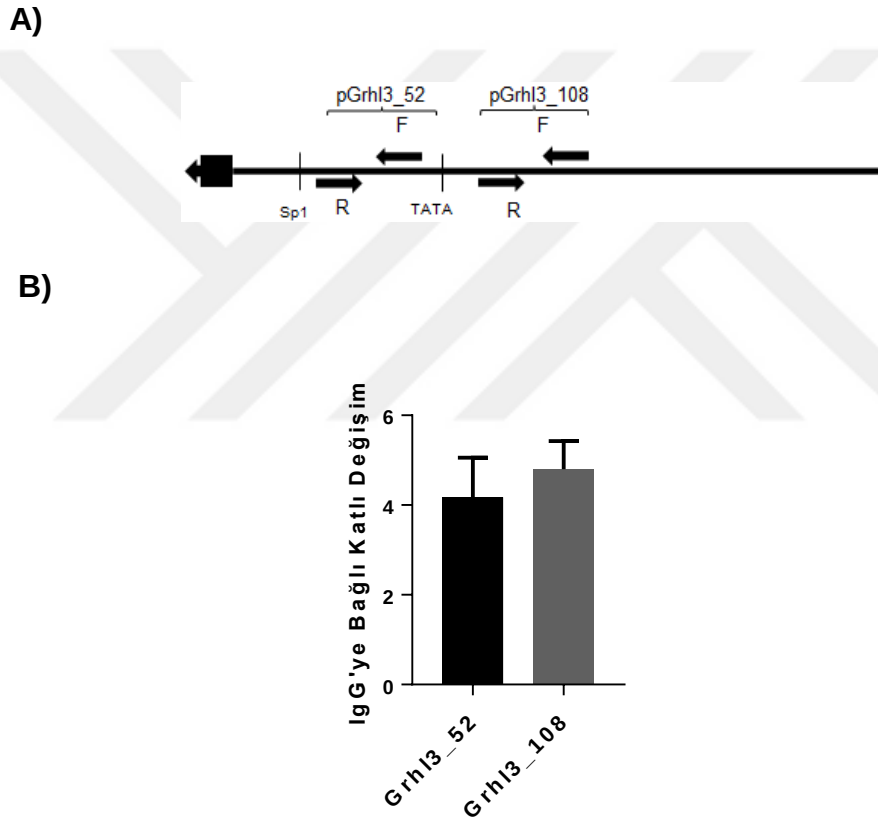
Grhl3 promotör bölgesi kesim enzimleri kullanılarak kısaltılmıştır. Oluşturulan yeni vektörler, Elf3 ifade eden vektörle birlikte NMuMG hücrelerine transfeke edildikten sonra lusiferazaktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 4.10). Şekil 4.10'da sırasıyla pGrhl3, pGrh3-XB, pGrhl3+TS, pGrhl3-PH ve pGrhl3-XP plazmidlerin, boş vektöre (pGL4.10) göre aktivasyon seviyelerini ve Elf3'le indüklenmiş halleri gösterilmektedir. pGrhl3, pGrh3-XB, pGrhl3+TS vektörlerinde hem promotör aktivitesi gözlenmiş hem de Elf3 tarafından aktive edilmeye devam ettiği belirlenmiştir. pGrhl3-PH ve pGrhl3-XP vektörlerinde promotör aktivitesi gözlenmediği için, bu bölgelerde bulunan Elf3 bağlanma bölgelerinin aktif bağlanma bölgeleri olup olmadığı konusunda belirsizlik devam etmektedir, bu nedenle yorumlanamamıştır.



Şekil 4.10: Grhl3 Promotörü Üzerindeki aktif Elf3 Bağlanma Noktaları. Şekil üzerinde (solda) Grhl3 promotör bölgesinin restriksiyon enzimleri ile kısaltılmasıyla elde edilen yeni vektörler, grafikte (sağda) ise bu vektörlerdeki promotör aktivitesi ve Elf3 transfeksiyonunda lusiferaz aktivasyonları gösterilmiştir. Beyaz noktalar promotör sekansı üzerindeki Elf3 bağlanma noktalarını göstermektedir. Siyah kare ile ifade edilenler sırası ile TATA kutusu ve Sp1 sekanslarıdır. Şekil üzerinde promotörü kısaltma amacıyla kullanılan restriksiyon enzimleri de gösterilmiştir (Bsal, Psp1406I)

4.9 Kromatin immünopresipitasyonu (ChIP)

Grhl3 promotör bölgesi kısaltılarak Elf3'ün bağlanma bölgeleri en aza indirgenmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak elde ettiğimiz en küçük promotör sekansı 8 adet Elf3 bağlanma noktası ayrıca TATA ve Sp1 bölgelerini içermektedir. Bu promotör bölgesini içeren plazmid pGrhl3+TS olarak tanımlanmıştır. Grhl3 promotör bölge üzerindeki bu Elf3'ün olası bağlanma noktaları, Elf3 antikoru kullanılarak gerçekleştirilen kromatin immünopresipitasyonu (ChIP) yöntemi ile de gösterilmiştir. Grhl3_52 ve Grhl3_108 bölgelerinde (Şekil 3.5) Elf3 regülasyonunun olduğu belirlenmiştir.



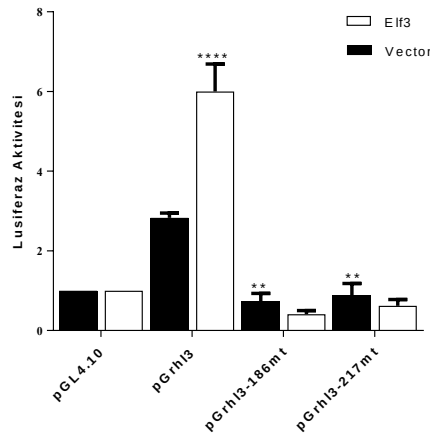
Şekil 4.11: ChIP yöntemi ile Elf3 - Grhl3 promotörü ilişkisinin gösterilmesi.

Şekil üzerinde Grhl3 1kb promotör bölgesi ve bu bölgedeki Grhl3_52 ve Grhl3_108 forward, reverse primerlerinin yerleri gösterilmiştir (A). Grafik üzerinde iki farklı primer kullanılarak (Grhl3_52 ve Grhl3_108), bu bölgelerde Elf3 regülasyonunun Grhl3 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (B).

4.10 Bölgesel Yönlendirilmiş Mutasyon

Grhl3 promotör bölgesi kısaltılarak aktivasyonu ölçülmüş ve olası aktif Elf3 bağlanma noktaları en aza indirilmiştir. Geriye kalan Elf3 noktalarından hangisi veya hangilerinin aktif Elf3 bağlanma noktası olduğunu bulmak için sırayla bu noktalar mutasyona uğratılıp, aktivasyonun devam edip etmediği denenesi gerekmektedir. Bu tez kapsamında öncelikle korunmuş bölgede bulunan ve TATA kutusuna en yakın iki nokta (-186, -217) denenmiştir. Bu noktaları mutasyona uğratmak için tasarlanan primerler ile nokta mutasyonu yapılmış, oluşturulan yeni vektör hücrelere transfekte edilmiştir. Daha sonra lusiferaz ile aktivasyonları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda seçilen iki nokta da Elf3'ün aktif bağlanma bölgeleri olduğunu kanıtlamaktadır. Grhl3 promotörü içeren vektöre göre hem vektör aktivasyonu düşmüştür hem de Elf3 regülasyonunda ortaya çıkan ekspresyon artışı ortadan kalkmıştır.

Wt: 5'-CCAAGTACCTGTCTGTATTTTCCTCTAGTTCTCCCGTTC-3'
Mt (-186): 5'-CCAAGTACCTGTCTGTATTTTggCTCTAGTTCTCCCGTTC-3'
Wt: 5'-GATGAGATGGACAGAGATTTCCTTTGAGCCAAGTACCTGT-3'
Mt (-217): 5'-GATGAGATGGACAGAGATTggCCTTTGAGCCAAGTACCTGT-3'



Şekil 4.12: Bölgesel Yönlendirilmiş Mutasyon ile aktif Elf3 bağlanma bölgelerinin belirlenmesi. Transkripsiyon başlangıç noktasına göre -186 ve -217 lokasyonundaki iki Elf3 bağlanma noktası mutasyona uğratıldığında prromotör aktivasyonu ve Elf3 aktivasyonu ortadan kalkmaktadır. (**** $p < 0,0001$, ** $p = 0,0018$)

5. TARTIŞMA

Epitelyal mezenkimal dönüşüm ve mezenkimal epitelyal dönüşüm, yara iyileşmesi, fibroz ve embriyongenez gibi kritik süreçlerde rol oynadığı kadar, son yıllarda yapılan çalışmalarda, kanser metastazında da önemli bir yeri olduğu gösterilmiştir. EMT sürecini kontrol eden snail, slug, zeb1 (Micalizzi ve ark., 2010) gibi önemli transkripsiyon faktörlerinin MET sürecinde de tersinir bir yol izleyerek bu süreci regüle ettiği bilinse de son yıllarda yapılan çalışmalar yalnızca bu mekanizmaların MET süreci için yeterli olmadığını ortaya koymuştur. MET süreci EMT'nin tersinir süreci olmaktan çok daha öte, kendi başına kompleks bir süreci ifade etmektedir. Yapılan birçok çalışmada E-cadherin ekspresyonunun EMT-MET sürecinde anahtar rol oynadığını; EMT sürecinde azalırken, MET sürecinde yeniden eksprese olduğunu ortaya koymuştur (Kim, Jackson ve ark., 2016). MET sürecinde E-cadherin ekspresyonunun yeniden aktivasyonu kısmen E-cadherin represörlerinin azalması ve promotöründen ayrılması ile açıklanabilir. Sonuç olarak bu da bize MET sürecinin, EMT'den ayrı olarak, kendine özgü mekanizma ve düzenleyicilerinin olabileceğini ve MET'i kontrol eden sürece özgün bir transkripsiyon ağının olduğunu düşündürmektedir.

Daha önce EMT-MET modeli kullanılarak yapılan çalışmalarda, Grhl3 ve Hnf4a düzenleyicilerinin E-cadherin ekspresyonunda ve MET sürecinde anahtar rol üstlendikleri belirlenmiştir (Alotaibi ve ark.,2015). Bu tez kapsamında, daha sonra yapılacak olan EMT-MET çalışmalarına ışık tutması amacı ile, MET sürecinde kritik bir rol üstlenen Grhl3 geninin promotör bölgesi karakterize edilmiştir. Böylelikle olası bir MET transkripsiyon yolağı belirleneceği zaman Grhl3 promotörünün nasıl regüle edildiğinin bilinmesi, yapılacak çalışmalara yardımcı olacaktır.

Genlerin promotör bölgelerinde, ifadelerini regüle eden DNA dizileri bulunur. Ökaryotik hücrelerde, özgül DNA bölgelerinin RNA polimeraz II tarafından tanınması transkripsiyonun başlayabilmesi için gereklidir. Polimeraz II'nin etkin bir biçimde transkripsiyonu başlatabilmesi için en az 3 tane "cis-acting element" bulunur (Buratowski ve ark., 1989; Sopta ve ark., 1989). Bunlar TATA kutusu, CAAT kutusu ve enhansırlardır. İlgilendiğimiz geni kontrol eden diğer transkripsiyon faktörlerinin belirlenmesi, TATA, CAAT, Sp1 gibi promotör elementlerinin işlevselliğinin ortaya konulması araştırılan genin, ilgili yolaklarda nasıl bir fonksiyona sahip olduğunu

belirlemede büyük önem taşımaktadır. Bu süreç esnasında korunmuş bölgelerin araştırılması promotör elementlerinin işlevselliğini kanıtlamaya giden yolda yardımcı olmaktadır. Bu yüzden öncelikle promotör bölgesinin (1kb) korunmuş sekanslarını bularak, bu bölgelerde promotör elementlerinin varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Yapılan biyoinformatik analizler doğrultusunda TATA (-289) ve Sp1 (-64) elementlerine rastlanmıştır. Bu elementlerin aktif olup olmadığı göstermek, ayrıca promotör bölgesi üzerindeki aktif en küçük sekansı belirlemek amacı ile promotör bölgesini kısaltarak aktivasyonunun devam edip etmediği incelenmiştir. TATA ve Sp1'i promotör bölgesinden uzaklaştırdığımızda, her hangi bir promotör aktivasyonu görülmemiştir. Ancak bu iki element birlikte olduğunda, Grhl3 promotörü aktivasyon göstermektedir. Böylelikle TATA ve Sp1 elementlerinin Grhl3 promotör aktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir ve promotör bölgesi kısaltıldığında transkripsiyon başlangıç noktasından önce 361bp'lik bir bölümün promotör aktivitesi için yeterli olduğu gösterilmiştir. Daha sonra yapılan biyoinformatik analizler sonucunda Grhl3 promotörüne bağlanan pek çok transkripsiyon faktörüne rastlanmıştır. Bunlar içerisinde Oct1, ETS ve Pax4 faktörleri en çok korelasyon gösterenler olarak belirlenmiştir. Daha önceki yapılan çalışmalar bir ETS ailesi üyesi olan Elf3 ve Grhl3 ilişkisine değinmiştir. Yapılan bir çalışmada keratinosit diferensiyasyonunda görevli RIPK4 düzenlenmesinde *downstreaminde* Grhl3, IRF6 ve ELf3 ilişkisi tanımlanmıştır (Scholz ve ark., 2016). Bu sebeplerden dolayı bu tez kapsamında Elf3'ün Grhl3 promotörünü nasıl regüle ettiği araştırılmıştır. Öncelikle NMuMG hücre hattında, Elf3 aşırı ekspresyonunda Grhl3 ekspresyonu yapılmıştır ve Grhl3 ekspresyonunda her hangi bir değişiklik görülmemiştir. NMuMG hücreleri epitelial hücreler oldukları için Elf3'ün aşırı eksprese edilmesi bu hücreler için Grhl3 ekspresyonunu değiştirmedeği düşünülmektedir. Aynı aşırı ekspresyon deneyi mezenkimal hücreler olan MEF hücrelerine uygulandığı zaman Elf3 aşırı eksprese olduğunda Grhl3 ekspresyonun da üç kata kadar arttığı görülmüştür. Bu durum Elf3'ün mezenkimal hücrelerde Grhl3 ekspresyonu arttırdığını düşündürmektedir. Daha sonra Elf3 susturulduğunda Grhl3 ekspresyonunun %80'e varıncaya kadar azaldığı tespit edilmiştir. Elf3'ün tam olarak hangi nokta veya noktalara bağlandığını bulmak amacı ile öncelikle biyoinformatik olarak Grhl3 promotörü üzerinde bağlanma noktaları belirlenmiştir. Daha sonra promotör bölgesi kısaltılarak aktif Elf3 bağlanma

noktaları araştırılmıştır. Elde edilen, en küçük promotör bölgesini içeren pGrhl3+TS vektörü üzerinde 8 adet Elf3 bağlanma noktası bulunmaktadır. ChIP yöntemi ile de bu bölgede Elf3 aktivasyonu olduğu doğrulanmıştır. ChIP primerlerinin yerleşim yerleri ve korunmuş bölgeler esas alınarak TATA'ya en yakın konumda bulunan iki Elf3 bağlanma noktası mutasyon yapılmak üzere belirlenmiştir. Bölgesel yönlendirilmiş mutasyon tekniği ile bu iki nokta mutasyona uğratılmış ve NMuMG hücrelerine transfekte edildikten sonra lusiferaz aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler doğrultusunda hem promotör hem de Elf3 aktivasyonunun ortadan kalktığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak Elf3, Grhl3 promotörünü regüle ederken bu iki noktaya bağlanmaktadır. Daha sonraki çalışmalarda diğer Elf3 bağlanma noktalarının da aktif olup olmadığı denenecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Grhl3 promotör bölgesi (1kb) insan, fare, inek ve köpek türlerinde karşılaştırıldığında 3 korunmuş sekanslara rastlanmaktadır.
2. Elde edilen korunmuş sekanslar üzerinde TATA ve Sp1 gibi promotör elementlerine rastlanmıştır.
3. Grhl3 promotörü (1kb), boş vektöre göre yaklaşık olarak 7 kat aktivite göstermektedir.
4. Promotör bölge üzerinde enzimsel kesimlerle kısaltmalar yapıp, promotör bölgesi üzerindeki en küçük aktif sekansı (minimal promotör) tespit edilmiştir (-361).
5. Tespit edilen Grhl3 minimal promotörü TATA kutusu ve Sp1 sekanslarını içermektedir.
6. Biyoinformatik analizler sonucu Grhl3 promotörüyle ilişkili olan pek çok transkripsiyon faktörü saptanmıştır. Bu faktörler arasından korunmuş sekanslar üzerinde bir çok bağlanma bölgesine sahip olan Elf3 transkripsiyon faktörünü seçilmiş ve Grhl3 ile olan ilgisini araştırılmıştır.
7. Elf3'ün Grhl3 promotörü üzerinde 17 farklı bağlanma noktası (GGAA) bulunmuştur.
8. Elf3'ün Grhl3 promotörü üzerindeki lusiferaz aktivasyonu incelenmiştir ve 2 kat aktive ettiği görülmüştür..
9. NMuMG hücre hattında Elf3 aşırı ekspresyonunda Grhl3 ekspresyon seviyesi değişmemektedir fakat mezenkimal kökenli olan MEF hücre hattında Elf3 aşırı eksprese edildiğinde Grhl3, yaklaşık 3 kat daha fazla eksprese olmaktadır. Bu durum mezenkimal hücrelerin Elf3 ile indüklendikleri zaman Grhl3 ekspresyonu arttırdığını düşündürmektedir. Daha sonraki çalışmalarda Elf3 aşırı ekspresyonunda Grhl3 ekspresyon seviyesinin, farklı mezenkimal ve epitelyal hücre hatlarında araştırılması düşünülmektedir. Ayrıca mezenkimal hücre hatlarında Elf3 aşırı ekspresyonunda e-cadherin gibi MET regülatörlerinin ekspresyon seviyelerinin araştırılması, bu sürecin aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.
10. Elf3'ün susturulması durumunda Grhl3 ekspresyonu yaklaşık %80 azalmaktadır.

11. Grhl3 promotörü kısaltılarak Elf3'ün aktif bağlanma noktaları en aza indirilmeye çalışılmış ve son olarak 8 adet bağlanma bölgesinin bulunduğu pGrhl3+TS vektörü elde edilmiştir.
12. Elf3'ün bağlanabileceği düşünülen olası bölgeler ChIP yöntemi ile tekrar teyit edilmiştir.
13. Korunmuş bölge üzerinde bulunan, mutasyon ve ChIP ile doğrulanmış, iki adet Elf3 bağlanma noktası mutasyonla denenmiştir. Elf3'ün en az bu iki noktaya bağlandığı tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda pGrhl3+TS vektörü üzerinde bulunan diğer Elf3 bağlanma noktaları da mutasyona uğratılacaktır.



7. KAYNAKLAR

1. Al-Hajj M, Wicha M, Benito-Hernandez A, Morrison S, Clarke M. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983–8. doi: 10.1073/pnas.0530291100.
2. Alotaibi, H., et al. (2015). "Enhancer cooperativity as a novel mechanism underlying the transcriptional regulation of E-cadherin during mesenchymal to epithelial transition." *Biochim Biophys Acta* 1849(6): 731-742.
3. Antonello, Z. A., et al. (2015). "Mesenchymal to epithelial transition during tissue homeostasis and regeneration: Patching up the *Drosophila* midgut epithelium." *Fly (Austin)* 9(3): 132-137.
4. Attardi, L.D., Von Seggern, D., Tjian, R., 1993. Ectopic expression wild type or a dominant negative mutant of transcription factor NTF-1 disrupts normal *Drosophila* development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90,10563–10567.
5. B. Hallgrímsson and B. K. Hall, *Epigenetics: Linking Genotype and Phenotype in Development and Evolution*, University of California Press, 2011.
6. Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., & de Herreros, A. G. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature cell biology*, 2(2), 84-89.
7. Boglev, Y., et al. (2011). "The unique and cooperative roles of the Grainy head-like transcription factors in epidermal development reflect unexpected target gene specificity." *Dev Biol* 349(2): 512-522.
8. Bozzi, F., et al. (2016). "Epithelioid peritoneal mesothelioma: a hybrid phenotype within a mesenchymal-epithelial/epithelial-mesenchymal transition framework." *Oncotarget*.
9. Bray, S. J. and F. C. Kafatos (1991). "Developmental function of Elf-1: an essential transcription factor during embryogenesis in *Drosophila*." *Genes Dev* 5(9): 1672-1683.
10. Breaux, M., et al. (2015). "p300 Regulates Liver Functions by Controlling p53 and C/EBP Family Proteins through Multiple Signaling Pathways." *Mol Cell Biol* 35(17): 3005-3016.

11. Brettingham-Moore, K. H., et al. (2015). "Interplay between Transcription Factors and the Epigenome: Insight from the Role of RUNX1 in Leukemia." *Front Immunol* 6: 499.
12. Byler S, Sarkar S. Do epigenetic drug treatments hold the key to killing cancer progenitor cells *Epigenomics*. 2014;6(2):161–5. doi: 10.2217/epi.14.4.
13. Campbell L, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution. *Cell Cycle*. 2007;6(19):2332–8. doi: 10.4161/cc.6.19.4914.
14. Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., ... & Nieto, M. A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology*, 2(2), 76-83.
15. Carlson, D. B. and G. H. Perdew (2002). "A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins." *J Biochem Mol Toxicol* 16(6): 317-325.
16. Carver, E. A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K. F., & Gridley, T. (2001). The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Molecular and cellular biology*, 21(23), 8184-8188.
17. Ceribelli, M., et al. (2008). "The histone-like NF-Y is a bifunctional transcription factor." *Mol Cell Biol* 28(6): 2047-2058.
18. Chalmers, A. D., et al. (2006). "Grainyhead-like 3, a transcription factor identified in a microarray screen, promotes the specification of the superficial layer of the embryonic epidermis." *Mech Dev* 123(9): 702-718.
19. Cicchini, C., et al. (2015). "Epigenetic control of EMT/MET dynamics: HNF4alpha impacts DNMT3s through miRs-29." *Biochim Biophys Acta* 1849(8): 919-929.
20. Cicchini, C., et al. (2015). "Molecular mechanisms controlling the phenotype and the EMT/MET dynamics of hepatocyte." *Liver Int* 35(2): 302-310.
21. Cieslik, M., et al. (2013). "Epigenetic coordination of signaling pathways during the epithelial-mesenchymal transition." *Epigenetics Chromatin* 6(1): 28.
22. Conacci-Sorrell, M., Simcha, I., Ben-Yedidia, T., Blechman, J., Savagner, P., & Ben-Ze'ev, A. (2003). Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin–

cadherin interactions the roles of β -catenin signaling, Slug, and MAPK. *The Journal of cell biology*, 163(4), 847-857.

23. Darido, C. and S. M. Jane (2010). "Grhl3 and GEF19 in the front rho." *Small GTPases* 1(2): 104-107.

24. Deng, H., et al. (2007). "Transcription factor NFY globally represses the expression of the *C. elegans* Hox gene Abdominal-B homolog egl-5." *Dev Biol* 308(2): 583-592.

25. Derksen PWB, Liu X, Saridin F, van der Gulden H, Zevenhoven J, Evers B, et al. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. *Cancer Cell*. 2006;10(5):437–49. doi: 10.1016/j.ccr.2006.09.013.

26. Dolfini, D., et al. (2012). "NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 47(1): 29-49.

27. Englert, N. A., et al. (2012). "Genetic and epigenetic regulation of AHR gene expression in MCF-7 breast cancer cells: role of the proximal promoter GC-rich region." *Biochem Pharmacol* 84(5): 722-735.

28. Fleming, J. D., et al. (2013). "NF-Y coassociates with FOS at promoters, enhancers, repetitive elements, and inactive chromatin regions, and is stereopositioned with growth-controlling transcription factors." *Genome Res* 23(8): 1195-1209.

29. Gordon, W. M., et al. (2014). "A GRHL3-regulated repair pathway suppresses immune-mediated epidermal hyperplasia." *J Clin Invest* 124(12): 5205-5218.

30. Gregoire, J. M., et al. (2016). "Identification of epigenetic factors regulating the mesenchyme to epithelium transition by RNA interference screening in breast cancer cells." *BMC Cancer* 16:700.

31. Grooteclaes, M. L., & Frisch, S. M. (2000). Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene*, 19(33), 3823.

32. Gustavsson, P., et al. (2007). "Increased expression of Grainyhead-like-3 rescues spina bifida in a folate-resistant mouse model." *Hum Mol Genet* 16(21): 2640-2646.

33. Gustavsson, P., et al. (2008). "Grainyhead genes and mammalian neural tube closure." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 82(10): 728-735.
34. Hahn, S., Buratowski, S., Sharp, P. A., & Guarente, L. (1989). Identification of a yeast protein homologous in function to the mammalian general transcription factor, TFIIA. *The EMBO journal*, 8(11), 3379.
35. Hankinson, O. (2005). "Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor." *Arch Biochem Biophys* 433(2): 379-386.
36. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat.* 1995;154:8–20.
37. Hemphala, J., Uv, A., Cantera, R., Bray, S., Samakovlis, C., 2003. Grainy head controls apical membrane growth and tube elongation in response to Branchless/FGF signalling. *Development* 130, 249–258.
38. Hestermann, E. V. and M. Brown (2003). "Agonist and chemopreventative ligands induce differential transcriptional cofactor recruitment by aryl hydrocarbon receptor." *Mol Cell Biol* 23(21): 7920-7925.
39. Hislop, N. R., et al. (2008). "Grhl3 and Lmo4 play coordinate roles in epidermal migration." *Dev Biol* 321(1): 263-272.
40. Hopkin, A. S., et al. (2012). "GRHL3/GET1 and trithorax group members collaborate to activate the epidermal progenitor differentiation program." *PLoS Genet* 8(7): e1002829.
41. Kim YN, Koo KH, Sung JY, Yun UJ, Kim H. Anoikis Resistance: An Essential Prerequisite for Tumor Metastasis. *Int J Cell Biol.* 2012; 2012 : 306879. Doi: 10.1155 / 2012/306879.
42. Kim, H. Y., et al. (2016). "On the role of mechanics in driving mesenchymal-to-epithelial transitions." *Semin Cell Dev Biol.*
43. Kudryavtseva, E. I., et al. (2003). "Identification and characterization of Grainyhead-like epithelial transactivator (GET-1), a novel mammalian Grainyhead-like factor." *Dev Dyn* 226(4): 604-617.
44. Lamouille, S., et al. (2013). "Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs." *Curr Opin Cell Biol* 25(2): 200-207.

45. Lamouille, S., et al. (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(3): 178-196.
46. Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(3), 178-196.
47. Lee H, Adler PN. The grainy head transcription factor is essential for the function of the frizzled pathway in the *Drosophila* wing. *Mech Dev*. 2004;121:37–49. [PubMed]
48. Lee, J. Y. and G. Kong (2016). "Roles and epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors in cancer initiation and progression." *Cell Mol Life Sci* 73(24): 4643-4660.
49. Lukosz, M., et al. (2011). "The transcription factor Grainyhead like 3 (GRHL3) affects endothelial cell apoptosis and migration in a NO-dependent manner." *Biochem Biophys Res Commun* 412(4): 648-653.
50. M. J. West-Eberhard, *Developmental Plasticity and Evolution*, Oxford University Press, New York, NY, USA, 2003.
51. Mace, K. A., et al. (2005). "An epidermal barrier wound repair pathway in *Drosophila* is mediated by grainy head." *Science* 308(5720): 381-385.
52. Mace, K. A., Pearson, J. C., & McGinnis, W. (2005). An epidermal barrier wound repair pathway in *Drosophila* is mediated by grainy head. *Science*, 308(5720), 381-385.
53. Manni, I., et al. (2008). "Posttranslational regulation of NF-YA modulates NF-Y transcriptional activity." *Mol Biol Cell* 19(12): 5203-5213.
54. Marlowe, J. L., et al. (2004). "The aryl hydrocarbon receptor displaces p300 from E2F-dependent promoters and represses S phase-specific gene expression." *J Biol Chem* 279(28): 29013-29022.
55. McDonald, O. G., et al. (2011). "Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition." *Nat Struct Mol Biol* 18(8): 867-874.
56. Meacham C, Morrison S. Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013;501:328–37. doi: 10.1038/nature12624.
57. Micalizzi D, Farabaugh S, Ford H. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J*

Mammary Gland Biol Neoplasia. 2010; 15 (2): 117-34. Doi: 10.1007 / s10911-010-9178-9.

58. Mizuguchi, Y., et al. (2012). "Cooperation of p300 and PCAF in the control of microRNA 200c/141 transcription and epithelial characteristics." PLoS One 7(2): e32449.

59. Mlacki, M., et al. (2015). "Recent discoveries concerning the involvement of transcription factors from the Grainyhead-like family in cancer." Exp Biol Med (Maywood) 240(11): 1396-1401.

60. Nardini, M., et al. (2013). "Sequence-specific transcription factor NF-Y displays histone-like DNA binding and H2B-like ubiquitination." Cell 152(1-2): 132-143.

61. Park S, Gonen M, Kim H, Michor F, Polyak K. Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype. J Clin Invest. 2010;120(2):636–44. doi: 10.1172/JCI40724.

62. Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M., & Cano, A. (2004). Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. Molecular and cellular biology, 24(1), 306-319.

63. Pérez-Moreno, M. A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M. A., & Cano, A. (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. Journal of Biological Chemistry, 276(29), 27424-27431.

64. Polo J, Hochedlinger K. When fibroblasts MET iPSCs. Cell Stem Cell. 2010;7:5–6. doi: 10.1016/j.stem.2010.05.018.

65. R. Raff, The Shape of Life: Genes, Development, and the Evolution of Animal Form, University Of Chicago Press, 1996.

66. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development 2001; 10 (293): 1089-93. Doi: 10.1126 / science.1063443.

67. S. B. Ting et al., Nat. Med. 9, 1513 (2003).

68. S. Ostrowski, H. A. Dierick, A. Bejsovec, Genetics 161,171 (2002)

69. Santangelo, L., et al. (2011). "The stable repression of mesenchymal program is required for hepatocyte identity: a novel role for hepatocyte nuclear factor 4alpha." Hepatology 53(6): 2063-2074.

70. Sarkar S, Goldgar S, Byler S, Rosenthal S, Heerboth S. Demethylation and re-expression of epigenetically silenced tumor suppressor genes: sensitization of cancer cells by combination therapy. *Epigenomics*. 2013;5(1):87–94. doi: 10.2217/epi.12.68.
71. Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, et al. Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):21087–113. doi: 10.3390/ijms141021087.
72. Serrano-Gomez, S. J., et al. (2016). "Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications." *Mol Cancer* 15: 18.
73. Serrano-Gomez, S. J., Maziveyi, M., & Alahari, S. K. (2016). Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Molecular cancer*, 15(1), 18.
74. Somarelli, J. A., et al. (2016). "Mesenchymal-Epithelial Transition in Sarcomas Is Controlled by the Combinatorial Expression of MicroRNA 200s and GRHL2." *Mol Cell Biol* 36(19): 2503-2513.
75. Sptta, M., Burton, Z. F., & Greenblatt, J. (1989). Structure and associated DNA-helicase activity of a general transcription initiation factor that binds to RNA polymerase II. *Nature*, 341(6241), 410-414.
76. Stadler, S. C. and C. D. Allis (2012). "Linking epithelial-to-mesenchymal-transition and epigenetic modifications." *Semin Cancer Biol* 22(5-6): 404-410.
77. Stemmler, M. P., Hecht, A., & Kemler, R. (2005). E-cadherin intron 2 contains cis-regulatory elements essential for gene expression. *Development*, 132(5), 965-976.
78. Stemmler, M. P., Hecht, A., Kinzel, B., & Kemler, R. (2003). Analysis of regulatory elements of E-cadherin with reporter gene constructs in transgenic mouse embryos. *Developmental dynamics*, 227(2), 238-245.
79. Sun, L. and J. Fang (2016). "Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition." *Cell Mol Life Sci* 73(23): 4493-4515.
80. Tam, W. L. and R. A. Weinberg (2013). "The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer." *Nat Med* 19(11): 1438-1449.

81. Ting, S. B., et al. (2005). "A homolog of *Drosophila* grainy head is essential for epidermal integrity in mice." *Science* 308(5720): 411-413.
82. Ting, S. B., et al. (2005). "The epidermis of *grhl3*-null mice displays altered lipid processing and cellular hyperproliferation." *Organogenesis* 2(2): 33-35.
83. Tohkin, M., et al. (2000). "Aryl hydrocarbon receptor is required for p300-mediated induction of DNA synthesis by adenovirus E1A." *Mol Pharmacol* 58(4): 845-851.
84. Tue, N. T., et al. (2011). "NF- κ B transcriptionally regulates the *Drosophila* p53 gene." *Gene* 473(1): 1-7.
85. Van Denderen, B. J., & Thompson, E. W. (2013). Cancer: the to and fro of tumour spread. *Nature*, 493(7433), 487-488.
86. Venkatesan, K., McManus, H.R., Mello, C.C., Smith, T.F., Hansen, U., 2003. Functional conservation between family members of an ancient duplicated transcription factor family, LSF/Grainy head. *Nucleic Acids Res.* 31, 4304–4316.
87. Vincent-Salomon A, Thiery J. Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. *Breast Cancer Res.* 2003;5(2):101–6. doi: 10.1186/bcr578.
88. Wang, S., et al. (2004). "Role of mediator in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor." *J Biol Chem* 279(14): 13593-13600.
89. Werth, M., Walentin, K., Aue, A., Schönheit, J., Wuebken, A., Podewski, N., ... & Barasch, J. (2010). The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. *Development*, 137(22), 3835-3845.
90. Xu, H., et al. (2014). "Clinical implications of GRHL3 protein expression in breast cancer." *Tumour Biol* 35(3): 1827-1831.
91. Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., ... & Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *cell*, 117(7), 927-939.
92. Yu, Z., et al. (2006). "The Grainyhead-like epithelial transactivator Get-1/Grhl3 regulates epidermal terminal differentiation and interacts functionally with LMO4." *Dev Biol* 299(1): 122-136.

93. Yu, Z., et al. (2009). "The epidermal differentiation-associated Grainyhead gene *Get1/Grhl3* also regulates urothelial differentiation." *EMBO J* 28(13): 1890-1903.
94. Yuan, H., et al. (2015). "CCAAT/enhancer-binding protein alpha is required for hepatic outgrowth via the p53 pathway in zebrafish." *Sci Rep* 5: 15838.
95. Zhang, L., et al. (2013). "The landscape of histone acetylation involved in epithelial-mesenchymal transition in lung cancer." *J Cancer Res Ther* 9 Suppl 2: S86-91.
96. Zhao, P., et al. (2016). "Grhl3 induces human epithelial tumor cell migration and invasion via downregulation of E-cadherin." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 48(3): 266-274.

8. EKLER

8.1 Etik Kurul

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL 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:	2945-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Memeli Grainy Head-Like 3 (Grhl3) Promotör Bölgesinin İşlevsel Tanımı
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Yard.Doç.Dr.Hani ALOTAİBİ İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi
	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:2016/26-12	Tarih:06.10.2016
	Yard.Doç.Dr.Hani ALOTAİBİ'nin sorumlusu olduğu "Memeli Grainy Head-Like 3 (Grhl3) Promotör Bölgesinin İşlevsel Tanımı" 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 ☒	Banu
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	Reyhan
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Nejat
Prof.Dr.Fce BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılacağı
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Vesile
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılacağı
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	M. Gümüştekin
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Ayşe
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	Katılacağı
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Müge
Doç.Dr.Şeyda SEREN İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	Şeyda
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	Sefa
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	S. Özkardeşler
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	Katılacağı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	M. Erhan

8.2 Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI İLKİN AYGÜN

TC Kimlik No / Pasaport No:	25892480716
Doğum Yılı:	1991
Yazışma Adresi :	İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü (iBG-izmir) Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi Balçova 35340 İzmir
Telefon :	05071940933
Faks :	
e-posta :	ilkin.aygun@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TC	Ege Üniversitesi	Fen fakültesi	Biyoloji bölümü	2.77	2014
TC	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.	3.31	Devam etmekte

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme 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
☐			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

