

**TGF- $\beta$  aracılı KHDAK Hücre EMT ve İnvazyonunda  
SATB2'nin Rolünün Moleküler Mekanizmalarıyla  
Araştırılması**

**Program Kodu: 1001**

**Proje No: 215Z283**

Proje Yürütücüsü:  
**Prof. Dr. Hakan AKÇA**

Bursiyer:

Hakan KÜÇÜKSAYAN

NİSAN 2018  
DENİZLİ

## ÖNSÖZ

Akciğer kanseri, yüksek metastatik kapasiteye ve yüksek tekrarlama riskisine sahip olmasıyla en agresif kanser türlerinden biridir. Dolayısıyla kanser ilişkili ölümlerin en yaygın nedeni durumundadır. Günümüzde kanser progresyonundaki rolleri nedeniyle tümör mikroçevresinde aktif roller üstlenen sitokinler, kanser araştırmalarının odak noktası haline gelmiştir. Son bulgular, tümörgenezin büyük oranda tümör ilişkili stromadan (tümör mikroçevresi) alınan büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokine bağımlı olduğunu önermektedir. Sonuç olarak bu büyüme faktörü ve sitokinler, birçok onkogenik yolağın aktivasyonlarını indüklemekte, kanser hücrelerine devamlı ve aktif bir destek sağlamak suretiyle tümör progresyonunda aktif bir rol üstlenmektedirler. Akciğer kanseri dahil çoğu kanser türünün karsinogenezinde önemli roller üstlenen TGF- $\beta$  sinyal yolağı, kansere karşı tedavi stratejileri oluşturmak açısından ideal bir odak noktasıdır. İşte bu sebeplerden dolayı TGF- $\beta$  sinyal yolağının mekanistik olarak tüm yönleriyle ve ayrıntılarıyla aydınlatılması önem arz etmektedir.

Metastatik kaskatta invazyon süreci ve invazyon için en agresif indüksiyon mekanizmalarından biri olan EMT süreci, metastazın önlenmesi adına yapılan araştırmalarla yoğun olarak çalışılmaktadır. EMT, akciğer kanserlerinde de yüksek insidansa sahip çeşitli mutasyonlarla aşırı aktif olan EGF ve RAS yolaklarının yanısıra TGF- $\beta$  yolağı tarafından da güçlü bir şekilde indüklenebilmektedir. Yapılan çalışmalarla her geçen gün TGF- $\beta$  tarafından indüklenen EMT ve invazyon süreçlerinde gerek aktivatör gerekse inhibitör olarak görev alan miRNA, lncRNA, transkripsiyon faktörler, histon modifiye edici ve kromatin yeniden modelleme proteinleri gibi çeşitli moleküllerin rolleri aydınlatılarak bilim dünyasına literatür bilgisi olarak kazandırılmaktadır. Elde etmiş olduğumuz ön sonuçlar neticesinde, hakkında daha çok bilgi sahibi olunmayan ve kromatin yeniden modelleme proteini sınıfında yer alan SATB2'nin, TGF- $\beta$ -indüklü EMT ve invazyon süreçleri için potansiyel düzenleyici role sahip olabileceğini hipotez ettik. Sonuç olarak gerçekleştirmiş olduğumuz bu proje, KHDAK kanser hücrelerinde TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT ve invazyon süreçlerinin moleküler mekanizmasını, bilinmeyen yönleriyle araştırarak aydınlatılabilmeyi amaçlamıştır.

TÜBİTAK 1001- Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında yapmış olduğumuz bu çalışma Kimya ve Biyoloji Araştırma Destek Grubu (KBAG) tarafından 215Z283 kodu ile desteklenmiştir. TÜBİTAK Kimya ve Biyoloji Araştırma Destek Grubuna destekleri için teşekkürlerimizi sunuyoruz.

Prof. Dr. Hakan AKÇA

## ÖZET

Akciğer kanseri, Dünya genelinde 5 yıllık sağkalım oranının %10-15'den daha az olması ile kanser ilişkili ölümlerin en yaygın nedenidir. Epitelden mezankimale geçiş (EMT), kanser invazyonunun kilit olaylarından biridir. EMT'nin indüklenmesinden sorumlu birçok düzenleyici proteinin aydınlatılmasına rağmen altında yatan mekanizmalar hala belirsizdir. SATB2, osteoblastik farklılaşma ve yüz-kafatası oluşumuna katılan nükleer matriks ile ilişkili transkripsiyon faktörü ve epigenetik düzenleyicidir. KHDAK hücrelerinin TGF- $\beta$  tarafından indüklenen EMT ve invazyonunda SATB2'nin etkileri bilinmemektedir. Bu nedenle, SATB2'nin TGF- $\beta$  ile indüklenen KHDAK hücre EMT ve invazyon için düzenleyici bir rolünün olup olmadığını moleküler mekanizmalarıyla tespit etmeyi amaçladık. Bu kapsamda, A549 hücrelerinde SATB2'nin düşük seviyede eksprese olduğunu ve TGF- $\beta$ 'nin bu hücrelerde EMT'yi indükleyebildiğini bulduk. Ancak TGF- $\beta$ , SATB2'yi yüksek seviyede eksprese eden PC3 ve Hcc193 hücrelerinde EMT'yi indükleyememiştir. siRNA aracılı SATB2 susturulmasının KHDAK hücrelerinde EMT ve invazyonu indüklemek için yeterli olduğunu ve bu süreçlerdeki TGF- $\beta$ 'nin indükleyici etkisini artırdığını gördük. Dahası, A549 hücrelerindeki SATB2'nin aşırı ifadesi TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT ve invazyonu nispeten inhibe etmiştir. Mekanistik olarak, SATB2 baskılanması ile Slug ve Zeb1 gibi EMT düzenleyicilerinin indüklendiği, fakat Smad yolağı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Bu, SATB2'nin Smad yolağından bağımsız olarak Slug ve Zeb1 transkripsiyon faktörlerini regüle ederek TGF- $\beta$ -aracılı EMT ve invazyona karıştığını göstermektedir. Projemizde daha sonra TGF- $\beta$ 'nin SATB2 ekspresyonunu nasıl regüle ettiğini araştırdık ve bioinformatik analizlerimiz aracılığıyla SATB2 promotorunun E-box, CTCF and SBE motiflerini içerdiğini bulduk. Daha sonra, TGF- $\beta$ -aracılı SATB2 downregülasyonundan hangisinin sorumlu olduğunu tespit etmek için A549 hücrelerinde Snail, Slug, Zeb1, CTCF and Smad4 ekspresyonlarını baskıladık ve siRNA aracılı Snail ve Smad4 susturulmasının bu inhibisyonu baskıladığını bulduk. Ayrıca ChIP-PCR sonuçlarımız, SATB2 ekspresyonunun TGF- $\beta$  uyarımına yanıt olarak Snail ve Smad4 tarafından transkripsiyonel olarak düzenlendiğini göstermiştir. Tüm bu bulgularımız, TGF- $\beta$ 'nin SATB2 ekspresyonunu inhibe etmek için Snail ve Smad4 transkripsiyon faktörlerini ko-represör olarak görevlendirdiğini ve böylece SATB2'nin KHDAK hücre EMT ve invazyonu üzerindeki inhibi edici etkisini elimine ettiğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar kelimeler:** TGF- $\beta$ , SATB2, EMT, İnvazyon, KHDAK

## ABSTRACT

Lung cancer is one of the most common causes of death by cancer worldwide with less than 10–15% of survival rate at 5 years. EMT (Epithelial–mesenchymal transition) is a key event in invasion of cancer. There are lots of regulator proteins responsible for induction of EMT, but underlying mechanisms are still unknown. SATB2 is a nuclear matrix-associated transcription factor and epigenetic regulator that is involved in osteoblastic differentiation and craniofacial patterning. It is unknown that the effects of SATB2 on TGF- $\beta$ -induced EMT and invasion of NSCLC cells. Therefore, we aimed to determine whether SATB2 has a regulatory role for TGF- $\beta$ -induced EMT and invasion of NSCLC cells with underlying molecular mechanisms. We found that SATB2 is downregulated in A549 cells and TGF- $\beta$  can induce EMT in these cells, however, it can not induce EMT in SATB2 expressing cells such as PC3 and Hcc193. Our results demonstrated that siRNA-mediated knockdown of SATB2 is sufficient to induce EMT and invasion and improves the inducing effects of TGF- $\beta$  on these processes in NSCLC cells. Moreover, SATB2 overexpression slightly inhibited TGF- $\beta$ -induced EMT and invasion in A549 cells. Especially, EMT regulators Slug and Zeb1 expression was found to be upregulated by SATB2 knockdown. However, it has not a regulatory effect on Smad pathway, indicating that SATB2 implicated in TGF- $\beta$ -induced EMT and invasion by regulating transcription factors such as Slug and Zeb1 independent of Smad pathway. We further investigated how TGF- $\beta$  regulates SATB2 expression and observed that the promoter of SATB2 contains E-box, CTCF and SBE motifs via our bioinformatics analyses. Next, we knockdowned expressions of Snail, Slug, Zeb1, CTCF and Smad4 to determine being responsible for TGF- $\beta$ -mediated SATB2 downregulation and found that siRNA-mediated knockdowns of Snail and Smad4 suppressed this inhibition in A549 cells., CHIP-PCR experiments also showed that SATB2 is transcriptionally regulated by Snail and Smad4 in response to TGF- $\beta$ . All our findings reveal that TGF- $\beta$  recruits Snail and Smad4 transcription factors as co-repressors to inhibit SATB2 expression, thereby eliminating the inhibitory effects of SATB2 on EMT and invasion of NSCLC cells.

**Key words:** TGF- $\beta$ , SATB2, EMT, Invasion, NSCLC

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLULAR DİZİNİ .....	viii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	2
3. GEREÇ ve YÖNTEM .....	6
3.1 Hücre Kültürü.....	6
3.2 SATB2 cDNA'sının klonlanması.....	6
3.3 Western blot.....	7
3.4 İmmunofloresans deneyi.....	8
3.5 siRNA (small interfering RNA) transfeksiyonu .....	8
3.6 İnvazyon deneyi .....	9
3.7 CHIP deneyi .....	9
4. BULGULAR.....	12
4.1 SATB2 cDNA'sının klonlanması.....	12
4.1.1 SATB2 İnsert'nün Eldesi.....	12
4.1.2 SATB2 İnsert'in ve pcDNA'nın Vektörünün XhoI Restriksiyon Enzimi İle Kesilmesi .....	13
4.1.3 pcDNA3.1 Vektörünün CIAP (Calf-intestinal alkaline phosphatase) ile Muamelesi .....	14
4.1.4 SATB2 cDNA'sının pcDNA3.1 Vektörüne T4 DNA Ligaz Enzimi ile Klonlanması..	16
4.1.5 SATB2 İnsört Taşıyan Koloninin Tespiti.....	16
4.1.6 Klonlanan pcDNA3.1-SATB2 Vektörünün Western Blot Analizi ile Teyiti .....	17

4.1.7 A549-SATB2 Hücrelerinin Seçilmesi.....	18
4.2 SATB2'nin TGF- $\beta$ ile indüklenen KHDAK EMT'sindeki düzenleyici rolünün araştırılması.....	18
4.2.1 A549 hücrelerindeki SATB2 susturulmasının, TGF- $\beta$ ile indüklenen EMT sürecindeki etkisi.....	21
4.2.2 Hcc193 hücrelerindeki SATB2 susturulmasının, TGF- $\beta$ ile indüklenen EMT sürecindeki etkisi.....	25
4.2.3 PC3 hücrelerindeki SATB2 susturulmasının, TGF- $\beta$ ile indüklenen EMT sürecindeki etkisi.....	28
4.2.4 A549 hücrelerindeki SATB2 overekspresyonunun, TGF- $\beta$ ile indüklenen EMT sürecindeki etkisi.....	30
4.3 SATB2 promotor bölgesinde var olan E-box, CTCF ve SMAD4 bağlanma bölgelerine bağlanması muhtemel düzenleyici faktörlerin TGF- $\beta$ tarafından indüklenen SATB2 downregülasyonundaki potansiyel rollerinin araştırılması .....	33
4.4 SATB2 ekspresyonunun TGF- $\beta$ ile indüklenen KHDAK hücre invazyonu üzerindeki etkisinin araştırılması .....	35
4.5 TGF- $\beta$ aracılı SATB2 ekspresyonunun düzenlenmesinde rolü olduğu tespit edilen gen ürünlerinin, ChIP assay yöntemi ile SATB2 promotor bölgesine spesifik olarak bağlanarak SATB2 ekspresyonunun düzenlenmesindeki rolünün araştırılması.....	37
5. TARTIŞMA/SONUÇ .....	40
KAYNAKLAR.....	45

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2-1.</b> Epitel kökenli kanserlerde metastatik kaskatın şematik gösterimi (Thompson vd. 2011).....	3
<b>Şekil 2-2.</b> TGF- $\beta$ ile muamele edilen A549 hücrelerinde miR-31 ekspresyon seviyesinin RT-PCR ile belirlenmesi. ....	5
<b>Şekil 3-1</b> A549 kromatin örneğini istenilen fragmentasyonda elde etmek için 2.5, 5 ve 10 dakika enzim ile muamele ederek gerçekleştirilen agaroz jel analizi. ....	11
<b>Şekil 4-1</b> PCR yöntemi ile SATB2 cDNA'sının amplifikasyonunun %0,75'lik agaroz jelde gösterilmesi. ....	13
<b>Şekil 4-2</b> XhoI enzimi ile kesilmemiş ve kesilmiş pcDNA3.1 vektörünün %0,75 agaroz jelde görüntülenmesi.....	14
<b>Şekil 4-3</b> XhoI enzimi ile kesilmemiş, XhoI enzimi ile kesilmiş ve CIAP ile muamele edilmiş pcDNA3.1 ve XhoI enzimi ile kesilmiş SATB2 insert'ünün %0,75 agaroz jelde görüntülenmesi.....	15
<b>Şekil 4-4</b> SATB2 inserti içeren pcDNA3.1 vektörü transforme edilmiş DH5 $\alpha$ bakterilerinin amfisilin içeren Agar LB besiyerinde kültürü ve oluşan kolonilerinin görüntüsü. ....	16
<b>Şekil 4-5</b> Ligasyon sonrası hangi koloninin SATB2 insörtü içerdiğinin analizi. ....	17
<b>Şekil 4-6</b> A549 hücrelerinde SATB2 ekzojen ekspresyonunun Western Blot yöntemi ile gösterilmesi. ....	17
<b>Şekil 4-7</b> Neomisin aracılığıyla seçilmiş kalıcı olarak SATB2 overeksprese olan A549 hücreleri. ....	18
<b>Şekil 4-8</b> PC3, II-18, Hcc78 ve Hcc193 hücre hatlarında 48 saatlik TGF- $\beta$ uyarımının SATB2 ve E-cadherin ekspresyonları üzerindeki etkisi. ....	19
<b>Şekil 4-9</b> SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş II-18 ve Hcc78 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının E-cadherin ifadesi üzerine etkisi. ....	20
<b>Şekil 4-10</b> SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.....	23
<b>Şekil 4-11</b> SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin İmmunofloresans boyama analizi ile gösterimi.....	24
<b>Şekil 4-12</b> SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş Hcc193 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.....	26
<b>Şekil 4-13</b> SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş Hcc193 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin İmmunofloresans boyama analizi ile gösterimi.....	27
<b>Şekil 4-14</b> SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş PC3 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.....	29

<b>Şekil 4-15</b> pcDNA3.1-SATB2 transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.....	31
<b>Şekil 4-16</b> pcDNA3.1-SATB2 transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin İmmunofloresans boyama analizi ile gösterimi.....	32
<b>Şekil 4-17</b> SMAD4, CTCF, Snail, Slug ve Zeb1 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının SATB2 ifadesi üzerindeki etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.....	34
<b>Şekil 4-18</b> SMAD4, CTCF, Snail ve Slug siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının SATB2 ifadesi üzerindeki etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.....	34
<b>Şekil 4-19</b> SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının hücre invazyonu üzerindeki etkisi.....	35
<b>Şekil 4-20</b> pcDNA3.1-SATB2 transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının hücre invazyonu üzerindeki etkisi.....	36
<b>Şekil 4.21.</b> SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş Hcc193 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının hücre invazyonu üzerindeki etkisi.....	37
<b>Şekil 4-22</b> JASPAR web tabanlı program kullanarak yapılan analizde elde ettiğimiz Snail ve Smad4 bağlanma bölgelerinin şematik gösterimi (BB=bağlanma bölgesi).....	38
<b>Şekil 4-23</b> Snail ve Smad4 transkripsiyon faktörlerinin SATB2 promotoruna bağlanmasının CHIP-PCR yöntemi ile tespit edilmesi.....	39



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1</b> ChIP-PCR için kullanılan primerler listesi. ....	11
---	----

## SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

EMT.....	Epitelyal-Mezenkimal Transisyon
NSCLC.....	Non-small-cell lung carcinoma
KHDAK.....	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
ml.....	Mililitre
mM.....	Milimolar
µM.....	Mikromolar
nM.....	Nanomolar
DAPI.....	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
PVDF.....	Poliviniliden diflorid
SATB2.....	Special AT-rich sequence-binding protein 2
SDS.....	Sodyum Dodesil Sülfat
siRNA.....	Small interfering RNA
EGF.....	Epidermal Büyüme Faktörü
RAS.....	Rat sarcoma viral oncogene homolog
TGF-β.....	Transforme Edici Büyüme Faktörü
µl.....	Mikrolitre
µg.....	Mikrogram
IF.....	İmmunofloresans
SBE.....	SMAD binding element
ChIP.....	Chromatin immunoprecipitation
CTCF.....	CCCTC-Binding Factor (Zinc Finger Protein)
miRNA.....	MikroRNA
lnRNA.....	Uzun kodlamayan RNA

## 1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, yüksek metastatik kapasiteye ve yüksek tekrarlama riskine sahip olmasıyla en agresif kanser türlerinden biridir. Dolayısıyla kanser ilişkili ölümlerin en yaygın nedeni durumundadır. Günümüzde kanser progresyonundaki rolleri nedeniyle tümör mikroçevresinde aktif roller üstlenen sitokinler, kanser araştırmalarının odak noktası haline gelmiştir. Hem normal hücreyel olaylarda hem de kanser progresyonunda oynadığı önemli roller ile TGF- $\beta$ , sitokinler içerisinde kilit bir yere sahiptir. Yapılan araştırmalar TGF- $\beta$ 'nın, akciğer kanseri, meme kanseri gibi birçok kanser türünün tümörogenezinde, invazyonunda, metastazında ve kemoterapik ilaçlara dirençlilik kazanması gibi süreçlerindeki rollerini göstermiştir.

Çeşitli kanser hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda TGF- $\beta$ , invazyonun kilit bir adımı olan Epidermal Mezenkimal Transisyon (EMT) sürecini tetiklediği bilinmektedir. Son güncel araştırmalar; TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT sürecinde birçok yolağın, aktif roller üstlendiklerini göstermektedir. Bu nedenle, TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT ve invazyon süreçlerinde rol alan yolakların moleküler mekanizmalarının aydınlatılması önem arz etmektedir. Bu bağlamda projemiz, TGF- $\beta$  sinyal yolağı ile SATB2'nin ilişkisini ve bu ilişkinin KHDAK hücre EMT'sinde ve invazyonundaki rolünü ayrıntılı mekanizmalarıyla aydınlatılabilmeyi amaçlamaktadır.

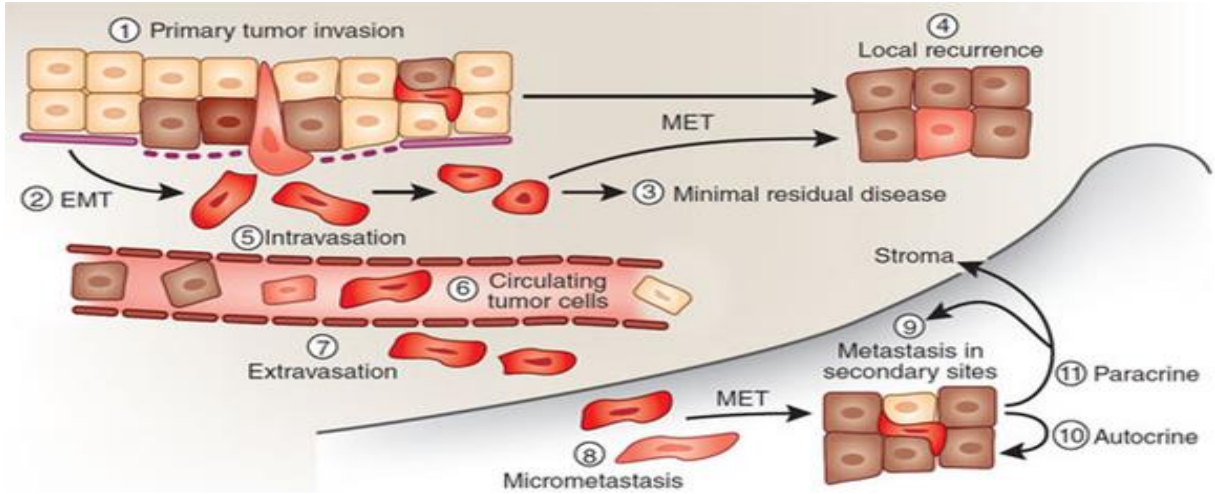
Akciğer kanseri, yüksek invaziv yeteneklere sahip olmasıyla en agresif kanser türlerinden biridir. Dolayısıyla kanser ilişkili ölümlerin en yaygın nedeni durumundadır. İnvazyonun gerçekleşebilmesi için gerekli en önemli adımı ise, epitel kökenli kanser hücrelerinin hücre-hücre bağlantıları gibi epitelyal özelliklerini kaybettiği, artan migrasyon ve invazyon yeteneği gibi mezenşimal özellikleri kazanılmaları ile sonuçlanan EMT sürecidir. Günümüzde kanser invazyonu ve metastazındaki rolleri nedeniyle tümör mikroçevresinde aktif roller üstlenen sitokinler, kanser araştırmalarının odak noktası haline gelmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

Akciğer kanseri, dünya genelinde 5 yıllık sağkalım oranının %10-15'den daha az olması nedeni ile kanser ilişkili ölümlerin en yaygın nedenidir. Bu kötü netice, sıklıkla ilerlemiş lezyonlara ve metastaza sahip hastaların geç teşhisi ile ilişkilidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) güncel sınıflandırmasına göre akciğer kanserinin bir alt türü olan Küçük Hücre-dışı Akciğer Kanseri'nin (KHDAK), akciğer kanseri vakalarını yaklaşık olarak %80 oranında temsil ettiği ifade edilmektedir. Ayrıca; KHDAK, özellikle yüksek invaziv özelliklere ve metastatik potansiyele sahip olmasıyla agresif bir tümördür (Dauphin vd. 2013)

Kanser metastazı, akciğer kanser hastalarının kötü prognozlarının başlıca nedenidir. Cerrahi olarak tümörün tamamen rejekte edildiği hastalarda bile kanser sıklıkla metastaz ile nüksetmektedir. İşte bu nedenle, akciğer kanserinin etkili tedavisi için metastaz gelişiminin mekanizmaları, en çok araştırılan konuların başında gelmektedir (Hanahan vd. 2000). Ancak tüm bu yoğun araştırmalara karşın, metastaz süreci hala yeteri seviyede anlaşılabilmiş değildir (Bhowmick vd. 2004). Dolayısıyla, bu problemlerin çözümü için, akciğer kanser hücrelerinin yayılımının moleküler mekanizmalarını tüm ayrıntılarıyla anlamaya ihtiyacımız vardır (Hanahan vd. 2000).

Kanser metastazının patogenezi birbiri ile bağlantılı ve art arda gelen bir seri aşamadan oluşan kompleks bir süreçtir (Hanahan vd. 2000). Şekil 2.1'de görüldüğü üzere metastazın gerçekleşmesi için gerekli adımlar; tümör hücrelerinin birbirlerinden ve kendilerini çevreleyen Ekstra Selüler Matriks (ESM)'den ayrılması, çeşitli proteazlarla ESM'nin degrade edilmesi, bazal membranın degrade edilmesi ve komşu dokulara invazyon, endotel hücrelerindeki çeşitli adezyon moleküllere bağlanmaları aracılığıyla kan veya lenf damar sistemine giriş, damar sisteminde sağ kalım ve yine damar sistemi aracılığıyla metastaz yapacağı bölgeye taşınması, metastatik lezyon oluşturacağı bölgede damar sisteminden çıkış ve son olarak metastatik lezyonun oluşumudur (Bhowmick vd. 2004, Bissell vd. 2001, Mueller vd. 2004, Shimoda vd. 2010). Bu metastatik kaskat içerisinde en kritik adımlardan birisi invazyon sürecidir (Bhowmick vd 2004). İnvazyonun gerçekleşebilmesi için gerekli en önemli adım ise, epitel kökenli kanser hücrelerinin hücre-hücre bağlantıları gibi epitelyal özelliklerini kaybettiği, artan migrasyon ve invazyon yeteneği gibi mezenşimal özellikleri kazanmaları ile sonuçlanan EMT sürecidir (Polyak vd. 2009).



**Şekil 2-1.** Epitel kökenli kanserlerde metastatik kaskadın şematik gösterimi (Thompson vd. 2011).

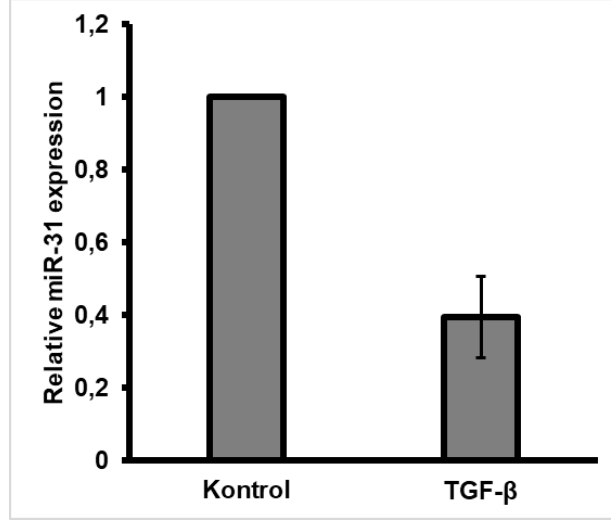
EMT indüksiyonu hem embriyonik gelişim sırasında hem de kanser hücrelerinde birçok sinyal yolağı tarafından yürütülmektedir (Xiao vd. 2010). Bu sinyal yolakları çoğunlukla TGF- $\beta$  süper ailesi üyeleri, epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), fibroblast growth factor (FGF) dür. TGF- $\beta$  süper ailesinin önemli bir üyesi olan TGF- $\beta$ 1, sadece embriyonik gelişim sırasında değil, aynı zamanda kanser progresyonunda EMT'yi indükleyebilmektedir. Çeşitli araştırmalar TGF- $\beta$ 1'i, akciğer ve böbrek fibrozisinde, pankreas kanseri, meme kanseri ve KHDAK hücrelerinde EMT'nin en önemli indükleyicileri arasında tanımlamaktadır (Heldin vd. 2012, Katsuno vd. 2013, Moustakas vd. 2012). TGF- $\beta$ 1 sinyal yolağı, EMT sürecini yöneten SMAD, p38, JNK, Rho GTPase ve PI3K/Akt sinyal iletim ağlarında merkezi bir yer işgal etmektedir (Chen vd. 2012).

EMT sürecinde ekspresyonu baskılanan epitelyal genler (E-kaderin gibi) ve ekspresyonu uyarılan mezenşimal genler (N-kaderin gibi) çeşitli EMT indükleyici transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilir. Bunlar; zinc finger proteini ailesi içinde yer alan Snail1, Snail2 (Slug), Zeb1, Zeb2/SIP1 ve basic helix-loop-helix faktörler olarak adlandırılan Twist1 ve E47 transkripsiyon faktörleridir (Coussens vd. 2002, Orimo vd. 2006). Bu transkripsiyonel faktörler EMT'yi gerçekleştirmek üzere E-kaderin, klaudinler, okludinler, plakofilinler, MUC1 ve sitokeratin gibi çeşitli epitelyal markerları kodlayan birtakım genlerin ekspresyonlarını baskılamaktadır (Kalluri vd. 2006).

TGF- $\beta$  sinyal yolağı tarafından ekspresyonları ve/veya aktivasyonları uyarılan Snail ve Zeb1 gibi EMT sürecini yöneten transkripsiyon faktörlerinin, EMT sürecinde kritik düzenleyici oldukları bugüne kadar gerçekleştirilen birçok çalışmayla kesinlik kazanmıştır (Tania vd.

2014, Zheng vd. 2014). Ancak bu transkripsiyon faktörleri, E-kaderin gibi EMT markerlarının ekspresyonlarını düzenleme olaylarında tek başlarına görev almazlar. Bu transkripsiyon faktörleri, EMT sürecini yönetmek için çeşitli histon deasetilazlar (HDACs) ve DNA metiltransferaz gibi epigenetik düzenleyiciler ile iş birliği yapmaktadırlar (Aghdassi vd. 2012, Lin vd. 2014, Liu vd. 2013, Peinado vd. 2004, von Burstin vd. 2009). Lei ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada, HDAC1'in TGF- $\beta$  tarafından indüklenen EMT'de gerekli olduğu sonucuna varmışlardır (Lei vd. 2010). Bir diğer çalışmada ise DNA metiltransferaz-1 proteininin, TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT sürecinde baskılayıcı bir rol üstlenen SCARA5 ekspresyonunun baskılanması için Snail ile iş birliği yaptığı gösterilmiştir (Liu vd. 2013). Bu doğrultuda gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda; TGF- $\beta$  tarafından indüklenen EMT sürecinde bu epigenetik düzenleyicilerin rolü açıkça görülmektedir.

Gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alan mekanizmaların anlaşılması konusunda, onların kompleks ve ince detaylara sahip özelliklerinin değerlendirilmesi ile günümüzde sınırlar aşılmış durumdadır. Dokuya spesifik transkripsiyon, genin "enhancer" ve "promotor" bölgelerine bağlanarak o genin ekspresyonunu gerek artırıp gerek baskılayarak kontrol eden transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir (Patani vd. 2009). Gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde, transkripsiyon faktörlerine ilaveten DNA'nın kromatin olarak paketlenmesi ve sonrasında kromatin organizasyonu da genlerin ekspresyonlarını düzenlemede önemli role sahiptir (Fry vd. 2001). Bu nedenle, transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonları; hem aracı komplekslerle olan etkileşimleri aracılığıyla gerçekleştirilen RNA polimerazın uyarımını hem de histon modifiye eden enzimlerin ve nükleozom yeniden modelleme komplekslerinin çalıştırılması aracılığıyla gerçekleştirilen kromatin erişilebilirliğini kapsamaktadır (Freiman vd. 2003, Zhang vd. 2001). Güncel çalışmalar, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yüksek düzeyde organize olmuş kromatin yapısının önemini ortaya koymaktadır (Schubeler vd. 2000, Spector 2003). Birçok genin ekspresyonunun düzenlenmesinde kromatin yapısının yeniden modellenmesinin önemini de kanıtlamıştır (Brown 2003, de Laat vd. 2003, Ho vd. 2010). Special AT-rich sequence-binding protein-2 (SATB2), DNA'nın AT bazlarınca zengin bölgelerine bağlanan ve kromatinin yapısını değiştirerek gen ekspresyonlarını kontrol eden bir protein grubudur (Dobrevva vd. 2003, Szemes vd. 2006). SATB2 embriyonik dönemde doğrudan yüz-kafatası gelişimi ve kortikal nöron farklılaşmasını düzenlemektedir (Britanova vd. 2008, Dobrevva vd. 2006, Gyorgy vd. 2008, Leoyklang vd. 2007). Ayrıca iskelet gelişimini, osteoblast farklılaşmasını ve immünooglobulin gen ekspresyonlarını düzenlemektedir (Coussens vd. 2002, Dobrevva vd. 2006).



**Şekil 2-2.** TGF- $\beta$  ile muamele edilen A549 hücrelerinde miR-31 ekspresyon seviyesinin RT-PCR ile belirlenmesi.

Literatürde SATB2'nin KHDAK invazyonudaki rolünü ya da etkisini gösteren herhangi bir çalışma olmadığı görülmektedir. SATB2'nin diğer kanser hücrelerinde EMT sürecinde ekspresyonunun önemli olduğunu gösteren kolon kanserleri üzerine iki çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar göstermektedir ki; SATB2 ekspresyonu yüksek olduğunda kolon kanseri hücreleri EMT'ye girememekte; SATB2 ekspresyonu miR-31 ve miR-182 mikroRNA'ları ile baskılandığında ise aynı kolon kanser hücreleri EMT'ye girmektedirler (Yang vd. 2013, Yang vd. 2014). Şekil 2.2'de görüldüğü üzere, TGF- $\beta$  aracılı KHDAK hücre EMT'sinde SATB2 ekspresyonunun baskılanmasının miR-31 miRNA aracılığıyla olmadığı görülmektedir. Bu bilgi, TGF- $\beta$ 'nin KHDAK hücrelerinde SATB2 ekspresyonunu, post-transkripsiyonel olarak değil, transkripsiyonel olarak baskıladığı hipotezimizi destekler niteliktedir. Ayrıca, SATB2'nin osteosarkoma hücrelerinde Epithelial Protein Lost In Neoplasm (EPLIN) gibi hücre iskeleti elemanlarının ekspresyonlarını düzenleyerek hücre migrasyonu ve invazyonu üzerinde rolü olduğu görülmektedir (Seong vd. 2015). SATB2'nin kolon kanserlerinde invazyon dahil kanser progresyonunun birçok mekanizmasındaki rolleri sıkça çalışılmaktadır. Bu çalışmalarda; SATB2 ekspresyonunun, hücre migrasyonu ve invazyon kapasitesi ile olan negatif ilişkisi hipotezimizi destekler niteliktedir (Mansour vd. 2015, Mansour vd. 2015). Ancak EMT, hücre migrasyonu ve invazyonunda kritik bir uyarıcı olan TGF- $\beta$  sinyal yolağının, SATB2 ekspresyonunu nasıl düzenlediğini ve TGF- $\beta$  tarafından indüklenen EMT, hücre migrasyonu ve invazyonunda SATB2'nin düzenleyici rolünün olup olmadığı bilinmemektedir. Bu veriler bize kolon kanser hücrelerinde de SATB2'nin ekspresyonunun EMT'yi düzenlediğini göstermekte ve hipotezimizi desteklemektedir.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 Hücre Kültürü

Proje önerimizde hipotezimizi test etmek için iki farklı hücre grubu model olarak seçilmiştir. Bu gruplar; TGF- $\beta$  tarafından EMT sürecinin indüklendiği epitel karakterde olan A549 hücresi ile TGF- $\beta$  ile EMT sürecinin indüklenemediği epitelyal karakterde olan HCC193, HCC78, II-18 ve PC3 hücreleridir. A549 hücre dizisi %10 Fetal Bovine Serum ve %0,5'lik penisilin/streptomisin içeren DMEM besi ortamında, HCC193, HCC78, II-18 ve PC3 hücre dizileri ise %10 Fetal Bovine Serum ve % 0,5'lik penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besi ortamında 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava ortamında kültüre edilmiştir.

#### 3.2 SATB2 cDNA'sının klonlanması

SATB2 cDNA'sının klonlanması için SATB2 geninde mutasyon olmadığını bildiğimiz A549 hücreleri kullanıldı. Önce bu hücrelerden Trizol ile total RNA izole edildi. Ardından elde ettiğimiz total RNA'dan cDNA kütüphanesi oluşturuldu. SATB2 cDNA'sı 2201 baz çiftinden oluşmaktadır. SATB2'nin klonlanabilmesi için öncelikle SATB2 cDNA'nın kendi tasarladığımız klonlama primerleri ile amplifiye edildi. SATB2'nin klonlanabilmesi için, SATB2 cDNA'sını kesmeyecek ve pcDNA3.1 vektörünün multiple cloning site (MCS) bölgesinden kesim noktası bulunan restriksiyon enzimi araştırıldı ve bu enzimin XhoI olduğu görüldü. Klonlama primerleri, XhoI enzim kesim bölgesini içerecek şekilde tasarlandı. Tasarladığımız primer dizileri aşağıda görülmektedir. Bu primerlerde italik şekilde yazılanlar, insan SATB2 cDNA'sının sırasıyla 5' ve 3' uçlarına komplementer bazlardır. Bu bazların 5' ucuna doğru yeşil renkle gösterilen bazlar, iki Marilyn Kozak (GCC ve ACC) dizileridir. Sarı renk ile gösterilen diziler XhoI enziminin kesim (CTCGAG) bölgeleridir. Kırmızı renk ile gösterilenleri ise, XhoI enziminin kesim bölgesini daha etkin kesmesi için tarafımızdan eklenen dizilerdir. Bu primerler (5'-TAAACTCGAGGCCACCATGGAGCGGCGGAGCGAGA-3' ve 5'-GGCGTCTCGAGTTATCTCTGGTCAATTCGGCAAGGTGCT-3') kullanılarak önce PCR yardımıyla SATB2 cDNA elde edildi. Ardından, PCR ile amplifiye etmiş olduğumuz SATB2 cDNA'sı ve boş pcDNA3.1 vektörü XhoI ile 37 °C'de 24 saat kesildi ve SATB2 cDNA'sı ve pcDNA3.1 klonlama için hazır hale getirildi. Ardından, XhoI ile kesilmiş pcDNA3.1 vektörü alkalin fosfotaz enzimi kullanılarak 5' uçları defosforile edilerek insert almadan kendi kendine kapanma olasılığı azaltıldı. XhoI ile kesilmiş SATB2 cDNA'sı, XhoI ile kesilmiş ve alkalin fosfotaz ile defosforile edilmiş pcDNA3.1 vektörü 4 insert, 1 vektör oranında T4 DNA ligaz kullanılarak 16°C'de geceboyu ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Ligasyon aşamasından sonra



kompetent bakteriler (E.coli-DH5alpha suşu) tüm ligasyon ürünü ile transforme edildi. Transforme edilen bakteriler 100ug/ml amfisilin içeren katı besiyerine ekilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından, kolonilerden miniprep yöntemi ile plasmid izolasyonu yapıldı. Elde edilen plasmidler XhoI ile kesilerek insert alan ve almayan koloniler tespit edildi. SATB2 insertünü sense mi anti-sense mi yönünde klonlandığını anlamak için SATB2 inserti taşıdığı tespit edilen koloniler SATB2 cDNA'sını ve pcDNA3.1'i ayrı ayrı tek kesim noktasından kesen ikinci bir restriksiyon enzimi ile ayrıca kesidi ve oluşan fragment boylarına göre agaroz jel elektroforezi kullanılarak, SATB2 cDNA'sının sense mi, anti-sense mi olarak klonlandığı tespit edildi.

### 3.3 Western blot

SATB2 siRNA transfekte edilmiş, kontrol siRNA transfekte edilmiş A549, HCC193, HCC78, Il-18 ve PC3 hücreleri, SATB2-pcDNA3.1 kalıcı transfekte edilmiş ve pcDNA3.1 boş vektör transfekte edilmiş A549 hücreleri, 24 saat serum starvasyonunun ardından TGF- $\beta$  ile 0-24-48 saatlerinde muamele edilen ve edilmeyen gruplara ayrıldı. İnkübasyon süresinin ardından, bu hücre protein özütleri RIPA (0.15 molar NaCl, %10 SDS, 0,05 molar tris-HCl pH: 7,65, %1 NP-40 ve % 0,5 deoxycholate) tamponu içerisinde toplandı, ardından 12.000 x g'de, 4°C'de 3 dakika santrifüj edilerek istenmeyen hücre artıklarının ortamdaki uzaklaştırılması sağlandı. Toplanan protein örneklerinin konsantrasyonu Bradford yöntemi ile tayin edildi. Daha sonra örneklerden, 100 mikrogram protein olacak şekilde alındı. Bunların üzerlerine protein yükleme boyasından da (100 mM Tris-HCL (pH6.8), %12 - $\beta$ merkaptotanol, 2% SDS, 1% Bromofenol blue, 20% gliserol) 1:1 oranında eklenerek, örnekler 3,5 dakika 100°C'de kaynatıldı. Kaynatma işleminin hemen ardından 10 mikrolitrelik otomatik pipet kullanılarak, ependorf tüp içindeki örnekler %20-4 gradientli veya %10'luk SDS jeli (PIERCE) yüklendi ve yürüme tamponu (Tris baz 0.1 M, Hepes 0,1 M, SDS 3 mM) ile 80 voltta 45 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez işleminin ardından proteinler transfer tamponu (20% metanol, 50 mM Tris, 40 mM glisin) içinde 4 °C'de 75 mA akım şiddetinde bir gece boyunca immünobolin membran (Thermo) üzerine transfer edildi. Bu işlemden sonra membran, %5'lik kuru süt tozu içeren TBST (34 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH:7,6 %1 Tween 20) çözeltisi içinde oda sıcaklığında 2 saat bloklandı. Ardından aynı membran %5 kuru süt içinde 1:5000 (SATB2, E-kaderin, ZO-1, Occludin, Claudin-1, N-kaderin, Vimentin, Fibronektin, Snail, Slug, Twist, Zeb1, p-SMAD2/3, SMAD2/3, SMAD4) ve 1:50.000 (GAPDH) oranlarındaki primer antikolarla oda sıcaklığında 1 saat işaretlendi. Membran üzerindeki spesifik proteinlerin ilgili primer antikolarla işaretlenmesinin ardından, membran 15, 5 ve 5 dakika olmak üzere üç set TBST ile oda sıcaklığında yıkandı. Yıkama

işleminde sonra membran primer antikorların immüno globulinlerine karşı spesifik olarak geliştirilmiş olan ve 1:10000 oranında HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor bulunduran %5 kuru sütlü TBST çözeltisi içerisinde tekrar işaretlendi. İşaretleme oda sıcaklığında 1 saat yapıldıktan sonra, membran tekrar 15, 5 ve 5 dakika olmak üzere üç set TBST ile oda sıcaklığında yıkandı. Yıkama işleminin ardından ECL (Enhanced Chemiluminescence) solüsyonu kullanılarak kemilüminesans reaksiyonu başlatıldı ve spesifik protein bantları proje kapsamında alımı yapılan Odyssey® Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) görüntüleme cihazı tarafından fotoğraflandı.

### **3.4 İmmunofloresans deneyi**

SATB2 siRNA transfekte edilmiş, kontrol siRNA transfekte edilmiş, SATB2-pcDNA3.1 kalıcı transfekte edilmiş ve pcDNA3.1 boş vektör transfekte edilmiş A549 hücreleri TGF- $\beta$  ile 48 saat muamele edilen ve edilmeyen gruplara ayrılarak, SATB2, E-kaderin, ZO-1, Occludin, Claudin-1, N-kaderin, Vimentin, Fibronektin antikorları kullanılarak immunofloresans boyama yapıldı. Bunun için; 12-well plate'lerde deney prosedürümüz gereği muamele ettiğimiz hücrelerin besiyeri alınarak PBS ile yıkandı. Ardından hücreleri %4 taze hazırlanmış formaldehit ile fikse edildi ve geçirgenliğin sağlanabilmesi için %0,1 Triton X-100 içeren PBS ile oda ısısında 5 dk. inkübe edildi. Daha sonra hücreler, 1:100 oranında ilgili antikor, %3 BSA ve %0,08 glisin içeren PBS içerisinde 4°C'de gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, 1:300 oranında Alexa Fluor-488-conjugated goat anti-rabbit, %3 BSA ve %0,08 glisin içeren PBS içerisinde 2 saat oda ısısında inkübe edildi. Sürenin sonunda hücre normalizasyonu için DAPI boyası ekledi 5 dk. inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücreler floresans mikroskop ile görüntülendi ve 40X büyütmede fotoğraflandı.

### **3.5 siRNA (small interfering RNA) transfeksiyonu**

Petri kabında %80 yoğunluğa ulaşmış olan hücreleri 6-well plakelere sırasıyla %10 FBS içeren fakat antibiyotik içermeyen 2'şer ml DMEM ve RPMI 1640 besiyerlerinde  $2 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekildi ve 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava ortamında bir gece inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından hiçbir geni hedef almayan kontrol siRNA'sı, SATB2, Snail, Zeb1, CTCF ve SMAD4'ü hedefleyen siRNA'lar (Santa Cruz) ile lipofectamine 2000 ajanla (Life Technology) transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra, serum-free besiyeri kullanılarak hücreler 24 saat serum-starved edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, TGF- $\beta$  ile muamele edilmiş ve edilmemiş hücre kontrol grupları SATB2, Snail, Zeb1, CTCF ve SMAD4 spesifik antikorlar kullanılarak ilgili siRNA aracılı gen sessizleştirilmesinin

verimliliği ve Snail, Zeb1, CTCF ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin TGF- $\beta$ -indüklü SATB2 baskılanmasındaki potansiyel rolleri western blot analizi ile tespit edildi.

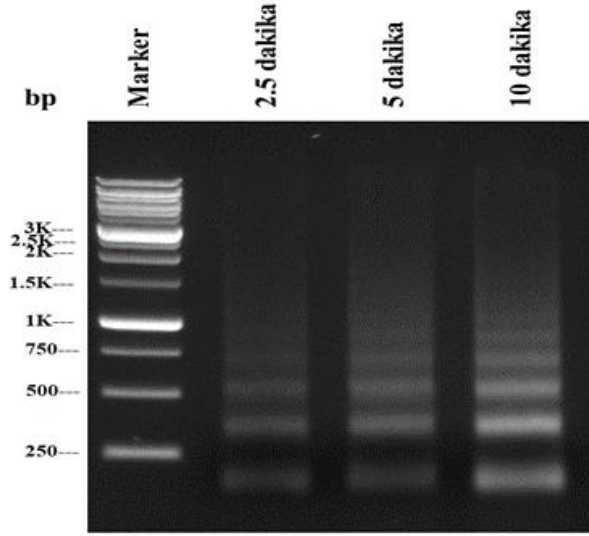
### 3.6 İnvazyon deneyi

Bunun için BioCoat Matrigel İnvazyon Chamber-ınvazyon odaları (BD Biosciences, Clontech) kullanıldı. Bu invazyon odacıklarının hücrelere sağladıkları özel şartlar sayesinde biz *in vitro* koşullar altında hücrelerin invaziv özelliklerini saptayabilmekteyiz. Bu invazyon odacıkları 8  $\mu$ m çaplı porlar içeren bir membran ile örtülüdür ve bu porlu membran ayrıca bir matrijel matris ile kaplıdır. Bu matrigel matris bize bazal membranı *in vitro* koşullarda oluşturma imkânı sağlar. Bu membran sayesinde invaziv özelliği olmayan hücrelerin membranın diğer yüzeyine geçmesi engellenmektedir. Bu membrandan diğer yüze ancak invaziv hücreler geçebilmektedir. Dolayısıyla matrijel membran bize invaziv ve invaziv olmayan hücrelerin birbirinden ayırabilme imkânı sunar. Kontrol siRNA transfekte edilmiş, SATB2 siRNA transfekte edilmiş A549 ve Hcc193 hücreleri, SATB2 ile kalıcı transfekte edilmiş ve pcDNA3.1 boş vektör transfekte edilmiş A549 hücreleri TGF- $\beta$  ile muamele edilen ve edilmeyen grupları, 0,5 ml serum içermeyen besiyerinde  $1,25 \times 10^5$  olacak şekilde invazyon odalarına ekildi, invazyon odacığının dışına 0.75 ml %10 FBS içeren besiyeri konularak kemoatraktant ortam sağlandı. Hücreler 24 saat 37°C de CO<sub>2</sub>'li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda invaziv özellikte olan hücreler invazyon odacığının porlu olan membranının dış yüzeyine geçeceklerinden invazyon odacığının içindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve ardından spatülle iç yüzeyindeki hücreler kazınıp atıldı. İnvazyon odacığının dış yüzeyine geçen hücreler önce metanol ile fikse edildi, ardından da Toluidine (%1) ile boyanıp kurutuldu ve mikroskop altında invaziv hücreler sayıldı.

### 3.7 ChIP deneyi

Western blot deneylerimizin sonucunda TGF- $\beta$  aracılı SATB2 ekspresyonunun düzenlenmesinde rolü olduğu tespit edilen Snail ve Smad4 transkripsiyon faktörlerinin, ChIP assay yöntemi ile SATB2 promotor bölgesine spesifik olarak bağlanarak SATB2 ekspresyonunu regüle edip etmediğini kesinleştirmek için gerçekleştirildi. ChIP assay deneyimiz, Liu ve arkadaşlarının (2013) çalışmalarında belirttikleri şekilde gerçekleştirildi (Liu vd. 2013). Daha önceki deneylerimizden valide ettiğimiz gerekli hücre sayısını elde etmek için, A549 hücreleri 15 cm'lik özel petrilere petri başına 6 milyon olacak şekilde ekildi. 48 saat kültüre edilen ve istenilen sayıya ulaşan hücrelere TGF- $\beta$  muamelesi yapıldı. 1 saat sonra TGF- $\beta$  muamele edilmiş ve edilmemiş hücre grupları ChIP-IT® Express Enzymatic Kit

(ActiveMotif) kullanılarak önce %37 formaldehit ile 10 dakika muamele edilerek kromatin ve kromatine bağlanan transkripsiyon faktörleri arasında çapraz bağlar oluşturuldu. Ardından, formaldehitin etkisini durdurmak için uygun hacimde 125 mM glisin ilave edildi, petripler hafifçe sallanarak 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra besiyeri aspire edilip petripler buzda bekletildi ve 3 kez uygun hacimdeki soğuk ve steril PBS ile hücreler yıkandı. Proteaz inhibitör koktail içeren 1,25 ml (petri için) PBS ile hücreler cell scraper yardımı ile kazındı ve hücreler steril bir eppendorfa aktarıldı. Kitin, lizis tamponu kullanılarak nükleer ekstrakt izole edildi. CHIP yönteminde, yaklaşık 200 – 1500 bp arasında kromatin parçalarına ihtiyaç duyulduğundan A549 hücrelerinden elde edilen kromatin örnekleri kite göre enzimatik olarak yukarıda belirtilen (200-1500 bp) miktarda parçalanması için optimize edildi. Optimizasyon için kromatin örnekleri 2.5, 5 ve 10 dakika zaman aralıklarında enzim ile muamele edildi. Örnekler, RNaz A, Proteinaz K ile muamele edilip Fenol/Kloform saflaştırılmasının ardından %1'lik Agaroz Jel'de görüntülendi (Şekil 3.7.1). Elde edilen fragmentasyonda en uygun süre olan 10 dakika seçilerek kalan kromatin örneklerinin tamamı için bu süre enzimatik muamele yapıldı. Ardından, CHIP uyumlu Snail ve Smad4 spesifik antikoları kullanılarak, protokole göre magnetik boncuklar yardımıyla ilgili transkripsiyon faktörünün bağlandığı DNA fragmentleri ayrıştırıldı. DNA fragmentleri, kitin protokolünde belirtildiği gibi Proteinaz K ile proteinlerden uzaklaştırılıp CHIP DNA Clean & Concentrator (Zymo Research) kiti ile saflaştırıldı. Proje önerisinde belirttiğimiz gibi, biyoenformatik araçlar yardımıyla tahmini olarak SATB2'yi düzenlediğini tespit ettiğimiz genlerin siRNA aracılığıyla susturularak gerçekleştirilen western blot analizlerinde belirlediğimiz Snail ve Smad4'ün SATB2 promotorunda bağlandığı bölgeleri tam olarak tespit edebilmek için web tabanlı JASPAR (<http://jaspar.genereg.net>) programı kullanıldı. Programda tespit edilen Snail ve Smad4 bağlanma bölgelerini çoğaltan CHIP-PCR primerleri NCBI Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kullanılarak tasarlandı. İnsan genomunda belirlenen bölge dışında başka hedefleri olmadığı saptanan primerler seçilerek IDT Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) yardımıyla primerlerin haripin yapıları ve dimerizasyon durumları kontrol edildikten sonra sentezletti (Tablo 1). Saflaştırdığımız DNA fragmentleri kullanılarak tasarladığımız primerleri ile RT-PCR gerçekleştirildi.



**Şekil 3-1** A549 kromatin örneğini istenilen fragmentasyonda elde etmek için 2.5, 5 ve 10 dakika enzim ile muamele ederek gerçekleştirilen agaroz jel analizi.

**Tablo 1** ChIP-PCR için kullanılan primerler listesi.

ChIP-PCR Primer	Forward Primer	Reverse Primer
SATB2 prom Snail Bağlanma Bölgesi 1	AGAGCGCCCACGAGGAT	CACCTGATGAAACGGCGCTC
SATB2 prom Snail Bağlanma Bölgesi 2	AATAACGATTGTAGCGCCCG	ACCCCTTGAATACCCGCTTT
SATB2 prom Smad4 Bağlanma Bölgesi	GCCGCCAGTGTAAGGTTG	CACGTGATAGACGTTTCAGGC

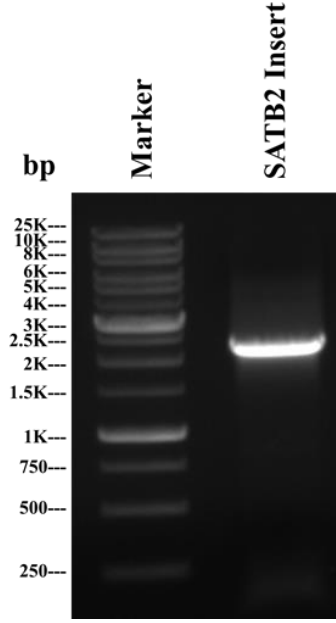
## 4. BULGULAR

Proje kapsamında elde etmiş olduğumuz bulgularımız, “SATB2 cDNA’sının klonlanması”, “SATB2’nin TGF- $\beta$  ile indüklenen KHDAK EMT’sindeki Düzenleyici rolünün araştırılması”, “SATB2 promotor bölgesinde var olan E-box, CTCF ve SMAD4 bağlanma bölgelerine bağlanması muhtemel düzenleyici faktörlerin TGF- $\beta$  tarafından indüklenen SATB2 downregülasyonundaki potansiyel rollerinin araştırılması”, “SATB2 ekspresyonunun TGF- $\beta$  ile indüklenen KHDAK hücre invazyonu üzerindeki etkisinin araştırılması” ve “TGF- $\beta$  aracılı SATB2 ekspresyonunun düzenlenmesinde rolü olduğu tespit edilen gen ürünlerinin, CHIP assay yöntemi ile SATB2 promotor bölgesine spesifik olarak bağlanarak SATB2 ekspresyonunun düzenlenmesindeki rolünün araştırılması” alt başlıkları altında açıklanmıştır.

### 4.1 SATB2 cDNA’sının klonlanması

#### 4.1.1 SATB2 İnsert’nün Eldesi

Uygun hacimde trizol ile toplanan 293T hücrelerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen total mRNA’lardan, cDNA sentez kiti (applied biosystems, MA ABD) ile cDNA kütüphanesi elde edildi. XhoI restriksiyon enzim kesim bölgesi içerek şekilde tasarladığımız SATB2 klonlama primerleri (5’-TAAACTCGAGGCCACCATGGAGCGGCGGAGCGAGA-3’ ve 5’-GGCGTCTCGAGTTATCTCTGGTCAATTCGGCAAGGTGCT-3’) ve cDNA kütüphanemiz kalıp olarak kullanarak Termal Cycler cihazında amplifikasyon gerçekleştirildi. PCR şartları: 94°C’de 5 dk. ön denatürasyon; 40 döngü olmak üzere 94°C’de 45 sn, 58°C’de 45 sn, 72°C’de 1 dk ve son uzatma 72°C’de 7 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde teyit edildi (Şekil 4.1).

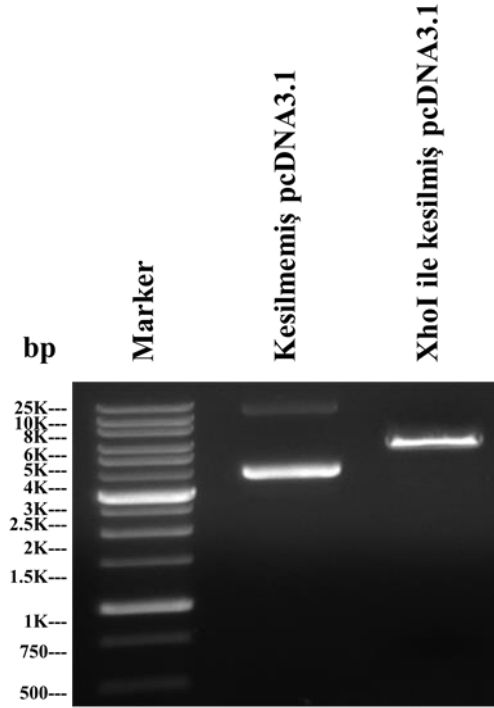


**Şekil 4-1** PCR yöntemi ile SATB2 cDNA'sının amplifikasyonunun %0,75'lik agaroz jelde gösterilmesi.

Klonlama primerlerimizde italik şekilde yazılan bazlar insan SATB2 cDNA'sının sırasıyla 5' ve 3' uçlarına komplementer bazlardır. Koyu punto ile yazılan bazlar, iki Marilyn Kozak (GCC ve ACC) dizileridir. Kırmızı renk ile gösterilen diziler XhoI enziminin kesim (GAATTC) bölgeleridir. Yeşil renk ile gösterilenleri ise, XhoI enziminin kesim bölgesini daha etkin kesmesi için tarafımızdan eklenen dizilerdir.

#### **4.1.2 SATB2 Insert'in ve pcDNA'nın Vektörünün XhoI Restriksiyon Enzimi İle Kesilmesi**

pcDNA3.1 ve SATB2 insertin kesimi için New England Biolabs XhoI enzimi ve ilgili tamponları kullanıldı. Reaksiyon; 1X reaksiyon tamponu, 1 unit XhoI enzimi, 1µg pcDNA3.1 veya SATB2 insert ve dH<sub>2</sub>O ile 50 µl'e tamamlanarak gece boyu 37°C koşullarında gerçekleştirildi. Şekil 4.2'de görüldüğü üzere pcDNA3.1 vektörü başarıyla kesilmiştir.



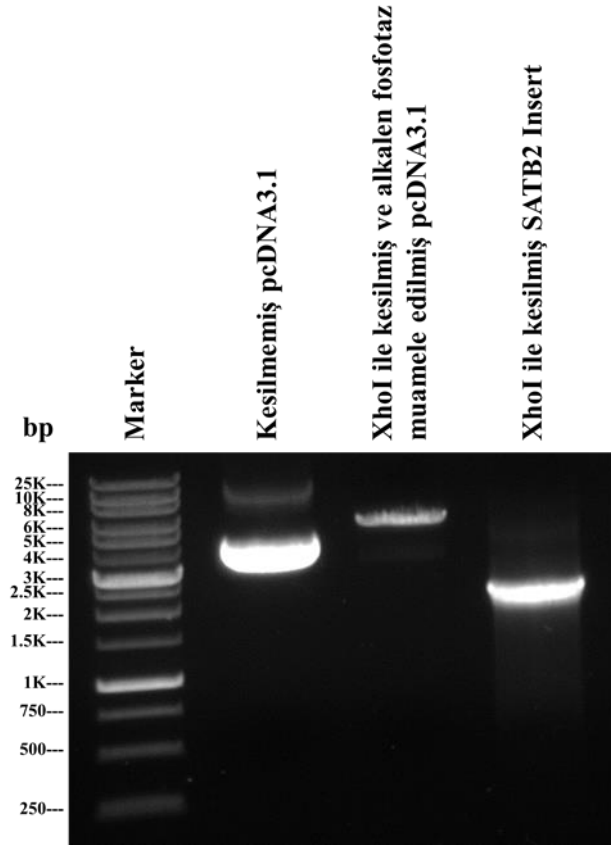
**Şekil 4-2** XhoI enzimi ile kesilmemiş ve kesilmiş pcDNA3.1 vektörünün %0,75 agaroz jelde görüntülenmesi.

#### 4.1.3 pcDNA3.1 Vektörünün CIAP (Calf-intestinal alkaline phosphatase) ile Muamelesi

Enzim kesimi yapılmış pcDNA3.1 vektörünün self ligasyonunu minimale indirmek için 5'-terminal kısımlarındaki fosfat gruplarının defosforile olması gerekmektedir. Klonlama işlemi için hazırlanan vektörün CIAP (Calf-intestinal alkaline phosphatase) reaksiyonu İnvitrogen kiti (18009-27) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon; 1X reaksiyon tamponu, 0,01 unit CIAP enzimi, 1µg pcDNA3.1 vektörü ve dH<sub>2</sub>O ile 40 µl'e tamamlanarak 30 dk 37°C koşullarında gerçekleştirildi. İnkübasyon süresinin sonunda pcDNA3.1 vektörü, fenol-kloroform-izoamilalkol ile saflaştırıldı. Bunun için; örneğe 1:1 hacminde phenol eklendi, 15 sn vortex yapılarak buza koyuldu. 10 dk inkübe edildi. 12.000xg'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Supernatant temiz bir tüpe alındı ve tekrar 1:1 hacminde fenol konularak az önceki işlem tekrarlandı. Şeffaf faz alınarak ve temiz bir tüpe alındı. DNA'nın çöktürülmesi için 1:10 hacminde 3M NaAc eklendi. Son olarak 2,5 kat hacminde soğuk 100% EtOH eklendi ve -20°C'de 2 saat veya -80°C'de 1 saat inkübe edildi. 12.000xg'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Supernatant enzim kesimi yapılmış pcDNA3.1 vektörünün self ligasyonunu minimale indirmek için 5'-terminal kısımlarındaki fosfat gruplarının defosforile olması gerekmektedir. Defosforilasyon CIAP (Calf-intestinal alkaline phosphatase) İnvitrogen kiti (18009-27) kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon; 1X reaksiyon tamponu, 0,01 unit CIAP enzimi, 1µg pcDNA3.1 vektörü ve dH<sub>2</sub>O ile 40 µl'e tamamlanarak 30 dk 37°C koşullarında gerçekleştirildi. İnkübasyon süresinin sonunda pcDNA3.1 vektörü, fenol-kloroform-izoamilalkol ile



saflaştırıldı. Bunun için; örneğe 1:1 hacminde phenol eklendi, 15 sn vortex yapılarak buza koyuldu. 10 dk inkübe edildi. 12.000xg'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Supernatant temiz bir tüpe alındı ve tekrar 1:1 hacminde fenol konularak az önceki işlem tekrarlandı. Şeffaf faz alınarak temiz bir tüpe koyuldu. DNA'nın çöktürülmesi için 1:10 hacminde 3M NaAc eklendi. Son olarak 2,5 kat hacminde soğuk 100% EtOH eklendi ve -20°C'de 2 saat veya -80°C'de 1 saat inkübe edildi. 12.000xg'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi ve supernatant atıldı. Örnek 5-10 dk kurumaya bırakıldı ve son olarak pellet uygun hacim steril dH<sub>2</sub>O ile süspanse edildi. Bu işlemin sonunda, ligasyon için gerekli tüm komponentler %0,75 agaroz jelde miktarlarının teyiti için yürütüldü. Ligasyon için gerekli bileşenlerin (vektör ve insert) miktarlarının tam olarak belirlenmesi, ligasyonun başarısını önemli ölçüde etkilediği için gerekliydi. Nanodrop cihazında miktarlarını ölçülen kesilmemiş pcDNA3.1 vektörü 1µg, XhoI enzimi ile kesilmiş ve CIAP ile muamele edilmiş pcDNA3.1 vektörü 100 ng, SATB2 insert 500 ng olacak şekilde jele yüklendi (Şekil 4.3). Dansitometrik analizlerimiz sonucunda yüklenen miktarların doğruluğu tespit edildi.



**Şekil 4-3** XhoI enzimi ile kesilmemiş, XhoI enzimi ile kesilmiş ve CIAP ile muamele edilmiş pcDNA3.1 ve XhoI enzimi ile kesilmiş SATB2 insert'ünün %0,75 agaroz jelde görüntülenmesi.

#### 4.1.4 SATB2 cDNA'sının pcDNA3.1 Vektörüne T4 DNA Ligaz Enzimi ile Klonlanması

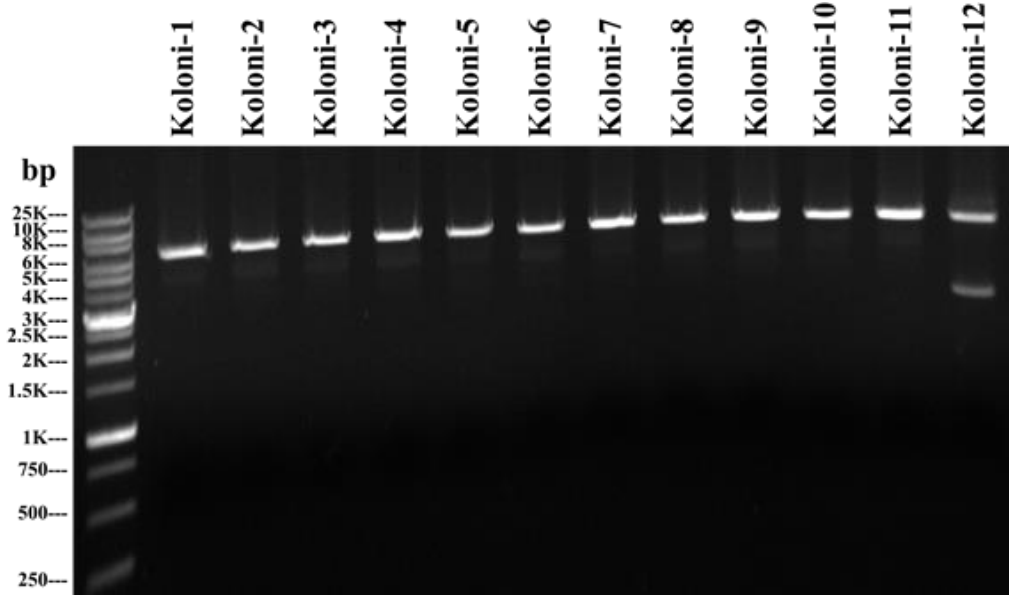
XhoI ile kesilmiş SATB2 insert'i, XhoI enzimi ile kesilmiş ve CIAP ile muamele edilmiş pcDNA3.1, T4 DNA Ligaz yardımıyla klonlandı. Reaksiyon; 1X reaksiyon tamponu, 4 hacim (600 ng) SATB2 insert, 1 hacim (150 ng) pcDNA3.1, 1 unit T4 DNA Ligaz, dH<sub>2</sub>O ile 20 µl'ye tamamlanarak 20 dk 16°C koşullarında gerçekleştirildi. Ligasyon ürününün tümü ticari olarak satın almış olduğumuz kompetent DH5α suşunu içeren tüpe aktarıldı ve nazikçe karıştırıldı. Tüp 30 dk boyunca buzda bekletildi. Daha sonra 42°C'de 90 sn bekletildi ve hemen akabinde tekrar buzda 5 dk bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda 1 ml zenginleştirilmiş LB besiyeri eklenerek 37°C'de 1 saat ön kültürasyon gerçekleştirildi. Son olarak, transforme ettiğimiz bakterileri daha öncesinden hazırlamış olduğumuz amfisilin içeren LB Agar besiyerine ekildi ve gece boyunca 37°C'de kültüre edildi. 24 saat inkübasyonun ardından koloniler belirmeye başladı (Şekil 4.4).



**Şekil 4-4** SATB2 inserti içeren pcDNA3.1 vektörü transforme edilmiş DH5α bakterilerinin amfisilin içeren Agar LB besiyerinde kültürü ve oluşan kolonilerinin görüntüsü.

#### 4.1.5 SATB2 İnsört Taşıyan Koloninin Tespiti

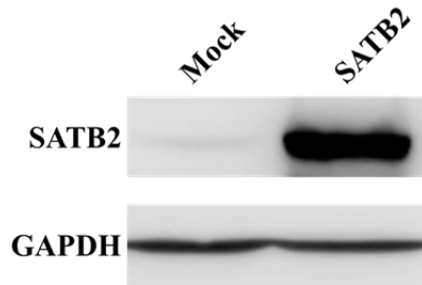
Öncelikli olarak Şekil 4.4'de görülen koloniler steril pipet ucu yardımıyla 15 ml'lik falkonlarda daha önceden hazırlamış olduğumuz 50 µg/ml amfisilin içeren sıvı LB besiyerine ekildi. Gece boyunca 37°C'de kültüre edildiler. Çoğalan her bir koloniden mini prep plazmit izolasyon kiti kullanılarak plazmid izolasyonu gerçekleştirildi ve sonrasında kolonilerden izole edilmiş olan bu plazmidler XhoI enzimi ile 1 saat kesim işlemine tabi tutuldu. Bu işlemle SATB2 içeren pcDNA3.1 plazmidinin varlığı tespit edilmeye çalışıldı. Şekil 4.5'de görüldüğü üzere, 12 nolu koloninin SATB2 insert taşıdığı dolayısıyla ligasyonunun sadece bu kolonide başarılı bir şekilde gerçekleştiği tespit edilmiştir.



**Şekil 4-5** Ligasyon sonrası hangi koloninin SATB2 insörtü içerdiğinin analizi.

#### 4.1.6 Klonlanan pcDNA3.1-SATB2 Vektörünün Western Blot Analizi ile Teyiti

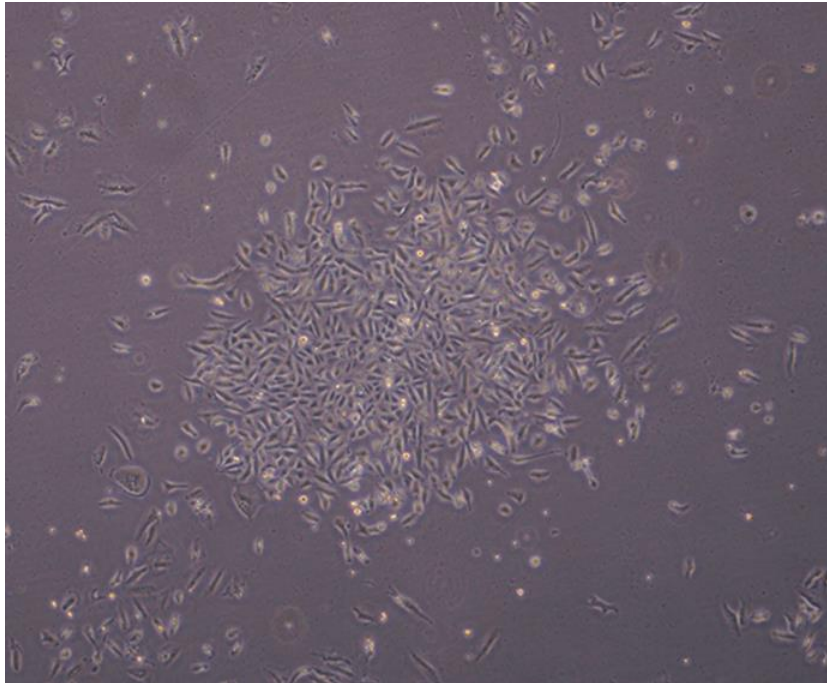
Klonlanmış olduğumuz pcDNA3.1-SATB2 ve pcDNA3.1-Mock vektörlerini Lipofectamine 3000 transfeksiyon reagent aracılığıyla A549 akciğer kanser hücre dizisine geçici olarak transfekte ettik. 24 saat sonra RIPA tamponu ile hücreler toplandı ve protein izolasyonu gerçekleştirildi. pcDNA3.1-SATB2 ile transfekte ettiğimiz A549 hücrelerinde SATB2'nin, aşırı ekspresyonunun olup olmadığı Western Blot analizli ile tespit edildi. Şekil 4.6'da görüldüğü üzere, pcDNA3.1-SATB2 ile geçici olarak transfekte edilen A549 hücrelerinde, pcDNA3.1-Mock grubuna göre SATB2 ekspresyonunu kuvvetli bir şekilde artmaktadır (Şekil 4.6). Proje önerisinde, insertün vektöre sense veya antisense yönünde klonlandığını tespit etmek için ikinci bir restriksiyon enzim ile kesim işlemi yapmayı planlamıştık. Ancak, Western Blot analiz sonucumuz, insertün pcDNA3.1 vektörüne sense yönünde klonlandığını ve transfekte edilen A549 hücrelerinde başarıyla aşırı ekspresyonunun gerçekleştiğini kanıtlamak adına yeterli olduğu için bu deneyi yapma gereği duymadık.



**Şekil 4-6** A549 hücrelerinde SATB2 ekzojen ekspresyonunun Western Blot yöntemi ile gösterilmesi.

#### 4.1.7 A549-SATB2 Hücrelerinin Seçilmesi

A549 hücreleri neomisin ile seçileceklerinden ilk önce bu hücrelerin neomisin doz duyarlılık testleri yapıldı. Hücreler 24 well plakelere ekilip değişik dozlarda (0 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, 200 ng/ml, 250 ng/ml, 300 ng/ml, 350 ng/ml, 400 ng/ml, 450 ng/ml, 500 ng/ml, 550 ng/ml, 600 ng/ml, 700 ng/ml ve 800 ng/ml) neomisin ile 14 gün muamele edildi. 14 gün ardından seçim için uygun neomisin konsantrasyonu (hücrelerin tümünü öldüren en az konsantrasyon) belirlendi. Klonlamış olduğumuz pcDNA3.1-SATB2 ile geçici olarak transfekte ettiğimiz A549 hücrelerinde SATB2 aşırı ekspresyonunun gerçekleştiğini ve ekspresyon vektörünün çalıştığını gösterdikten sonra, sürekli olarak SATB2 aşırı ifade eden A549 hücrelerini oluşturmak için klonladığımız pcDNA3.1-SATB2 vektörü ile A549 hücrelerini transfekte ettik. Transfeksiyondan 48 saat sonra, kalıcı transfeksiyon için hücreler daha önceden belirlenmiş olan konsantrasyonda (700 ng/ml) neomisin ile kültüre edilmeye başlandı. Şekil 4.7’de görüldüğü üzere kalıcı olarak SATB2 aşırı ifade A549 hücreleri seçilmeye başlanmıştır.

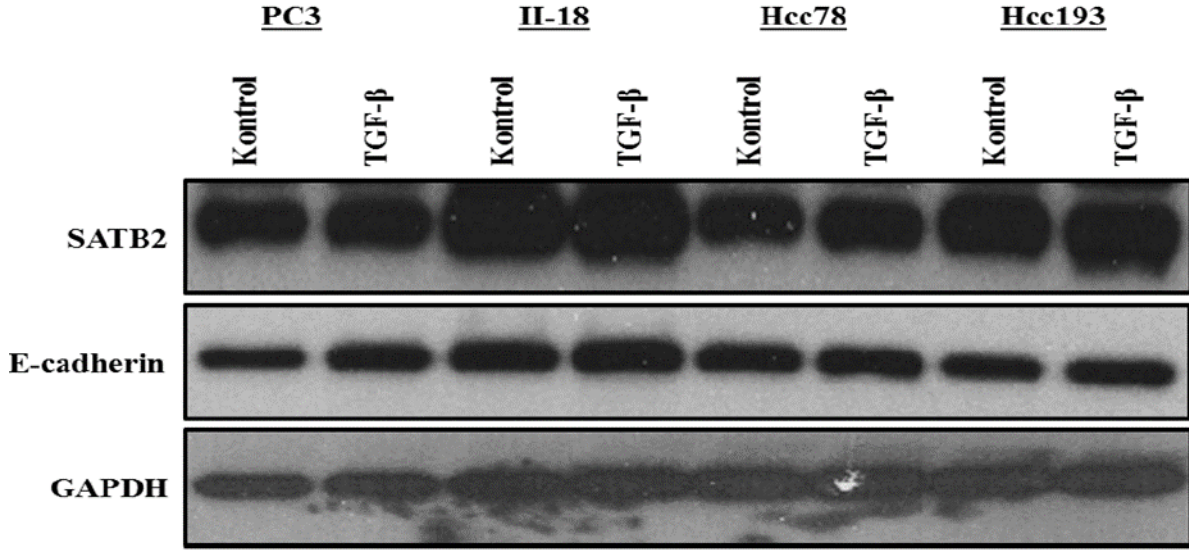


**Şekil 4-7** Neomisin aracılığıyla seçilmiş kalıcı olarak SATB2 overeksprese olan A549 hücreleri.

#### 4.2 SATB2'nin TGF- $\beta$ ile indüklenen KHDAK EMT'sindeki düzenleyici rolünün araştırılması

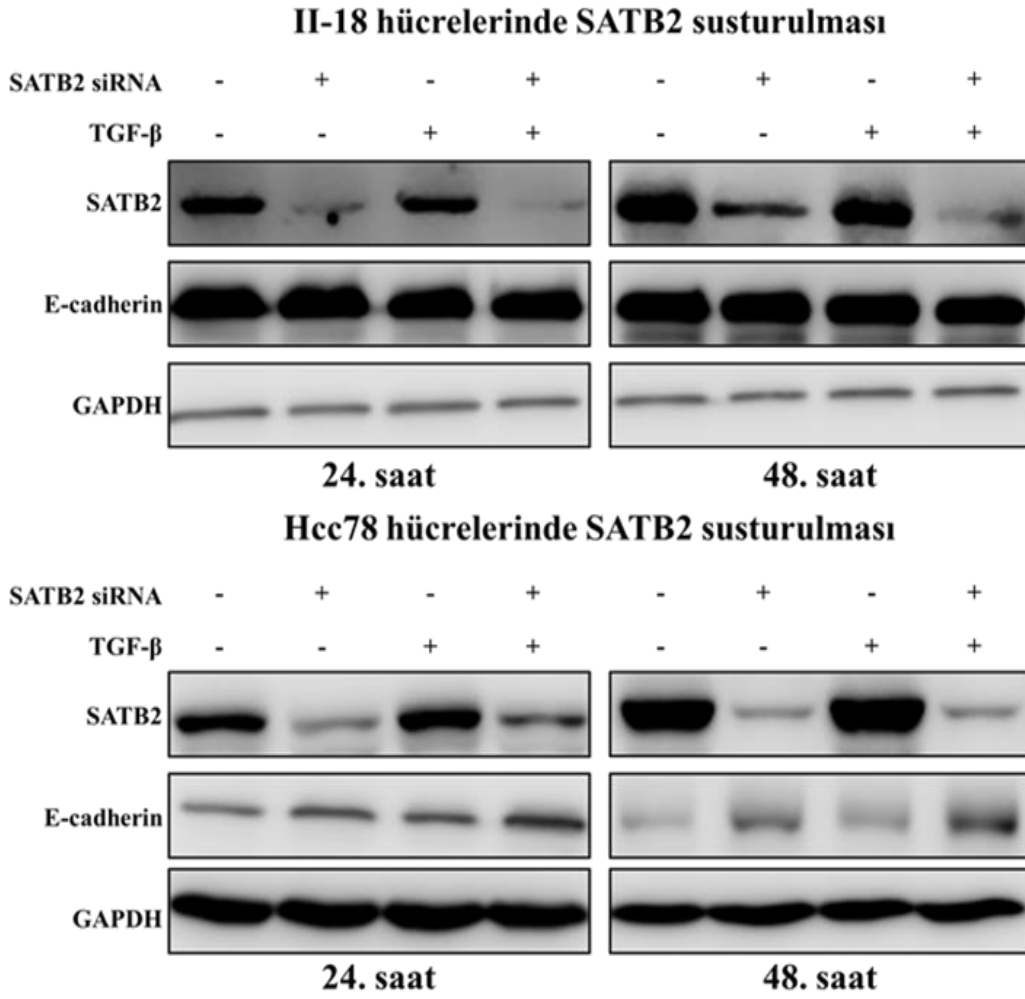
Proje önerimizde taahhüt etmiş olduğumuz 2. iş paketi "SATB2'nin TGF- $\beta$  ile indüklenen KHDAK EMT'sindeki Düzenleyici rolünün araştırılması" Western blot ve Immunoflorasans

boyama analizleri ile başarıyla tamamlanmıştır. Proje önerimizde taahhüt ettiğimiz üzere, TGF- $\beta$  tarafından EMT'nin indüklenmediği ve SATB2 ekspresyonunun baskılanmadığı Hcc78, Hcc193, PC3 ve Il-18 KHDAK hücre hatlarından hangilerinin A549 hücresi ile beraber projenin daha ileri deneyleri için kullanılacağını tespit etmeyi amaçladık (Şekil 4.8). Seçmiş olduğumuz Hcc78, Hcc193, PC3 ve Il-18 hücre hatlarından elde ettiğimiz veriler doğrultusunda bu iş paketinde bazı yöntem değişikliklerine gidilmiştir. Bu değişiklikler gerekçeleriyle birlikte aşağıda maddeler halinde izah edilmiştir.



**Şekil 4-8** PC3, Il-18, Hcc78 ve Hcc193 hücre hatlarında 48 saatlik TGF- $\beta$  uyarımının SATB2 ve E-cadherin ekspresyonları üzerindeki etkisi.

1- Proje önerimizde de ifade ettiğimiz üzere, SATB2'nin E-cadherin ifadesi üzerinde negatif düzenleyici etkisi temel alınmıştır. Bu kapsamda, TGF- $\beta$  tarafından SATB2 downregülasyonunun gerçekleşmediği ve ayrıca EMT'nin indüklenmediği Il-18, PC3, Hcc78 ve Hcc193 hücreleri kullanılmıştır. Il-18 hücrelerindeki SATB2'nin downregülasyonu E-cadherin ifadesini hiçbir saatte düşürmemiştir. Bununla birlikte, Hcc78 hücrelerindeki SATB2 downregülasyonu E-cadherin ifadesini hipotezimizin aksine indüklemiştir (Şekil 4.8). Ancak projemizde kullandığımız A549, PC3 ve Hcc193 hücrelerinde, hipotezimiz doğrultusunda SATB2 ve E-cadherin ilişkisi tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Bu sebeplerden dolayı Il-18 ve Hcc78 hücreleri projemizden çıkartılmıştır.



**Şekil 4-9** SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş II-18 ve Hcc78 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının E-cadherin ifadesi üzerine etkisi.

2- Proje önerimizde ifade ettiğimiz üzere, Immunofloresans boyama analizi Western blot sonuçlarımızın teyiti için proje kapsamına alınmıştı. Proje önerimizde Immunofloresans boyaması yapılacak olan proteinlerin (SATB2, E-cadherin, N-cadherin, Zo1, Occludin, Claudin, Vimentin ve Fibronektin) 24 ve 48. saatlerdeki TGF- $\beta$  uyarımı sonucundaki ekspresyon değişikliklerini tespit etmek amaçlanmıştır. Western blot sonuçlarımızda SATB2 ve E-cadherin ilişkisinin en iyi tespit edildiği saat 48. saat olarak değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, Immunofloresans analizlerimizde yalnızca 48. saatlik TGF- $\beta$  uyarımındaki etkiler belirlenmiştir.

Proje önerimizde, TGF- $\beta$ 'nın A549 hücrelerinde EMT sürecini indüklediğini, bunun aksine PC3, II-18, Hcc78 ve Hcc193 gibi diğer KHDAK hücre dizilerinde EMT sürecinin indüklenemediğini ve bu sonuçlarla paralel olarak SATB2 ekspresyonunun yalnızca EMT'nin indüklediği A549 hücrelerinde downregüle olduğunu ön sonuç olarak göstermiştik.

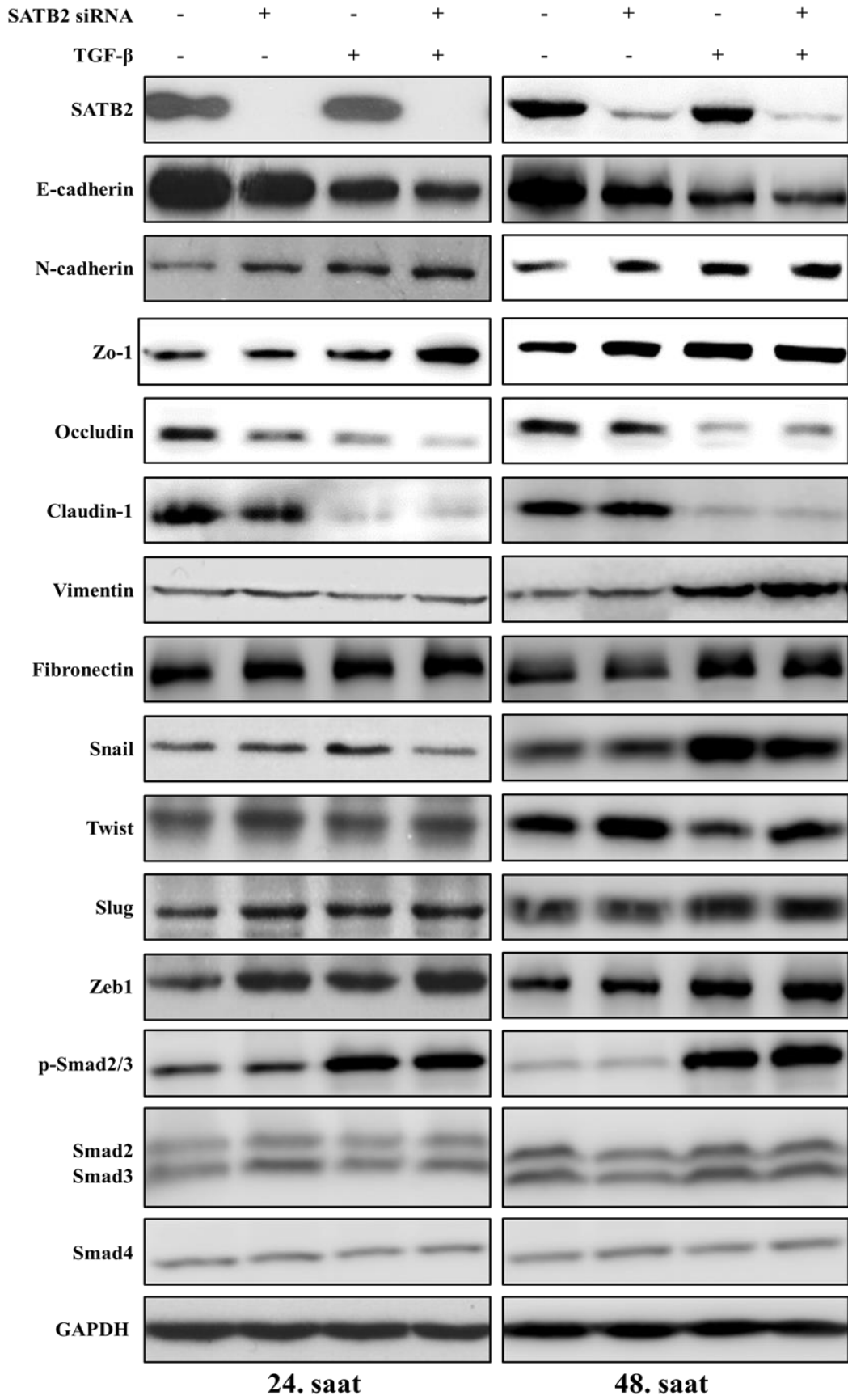
Projemizin bir çıktısı olan “*Lung Cancer*” dergisinde “Downregulation of SATB2 is critical for induction of epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of NSCLC cells” başlıklı makalemizde A549 hücrelerindeki SATB2 ekspresyonunun, PC3, H1299, Hcc78 ve Hcc193 hücrelerine kıyasla downregüle olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple; 2. iş paketimizde genel hatlarıyla SATB2 ekspresyonunun yüksek olduğu PC3 ve Hcc193 hücrelerinde SATB2 ekspresyonunu siRNA aracılığıyla baskılama, SATB2 ifadesinin düşük olduğu A549 hücrelerinde ise 1. iş paketinde klonlamış olduğumuz pCDNA-SATB2 vektörü ile SATB2’i overeksprese etme stratejisi izlenmiştir. Ayrıca; A549 hücrelerinde SATB2 ifadesinin baskılanmasının TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT sürecinin daha kuvvetli bir şekilde indüklenmesine yol açıp açmayacağını tespit etmek için A549 hücrelerinde de SATB2 ifadesini siRNA aracılığıyla baskıladık (Şekil 4.9).

#### **4.2.1 A549 hücrelerindeki SATB2 susturulmasının, TGF- $\beta$ ile indüklenen EMT sürecindeki etkisi**

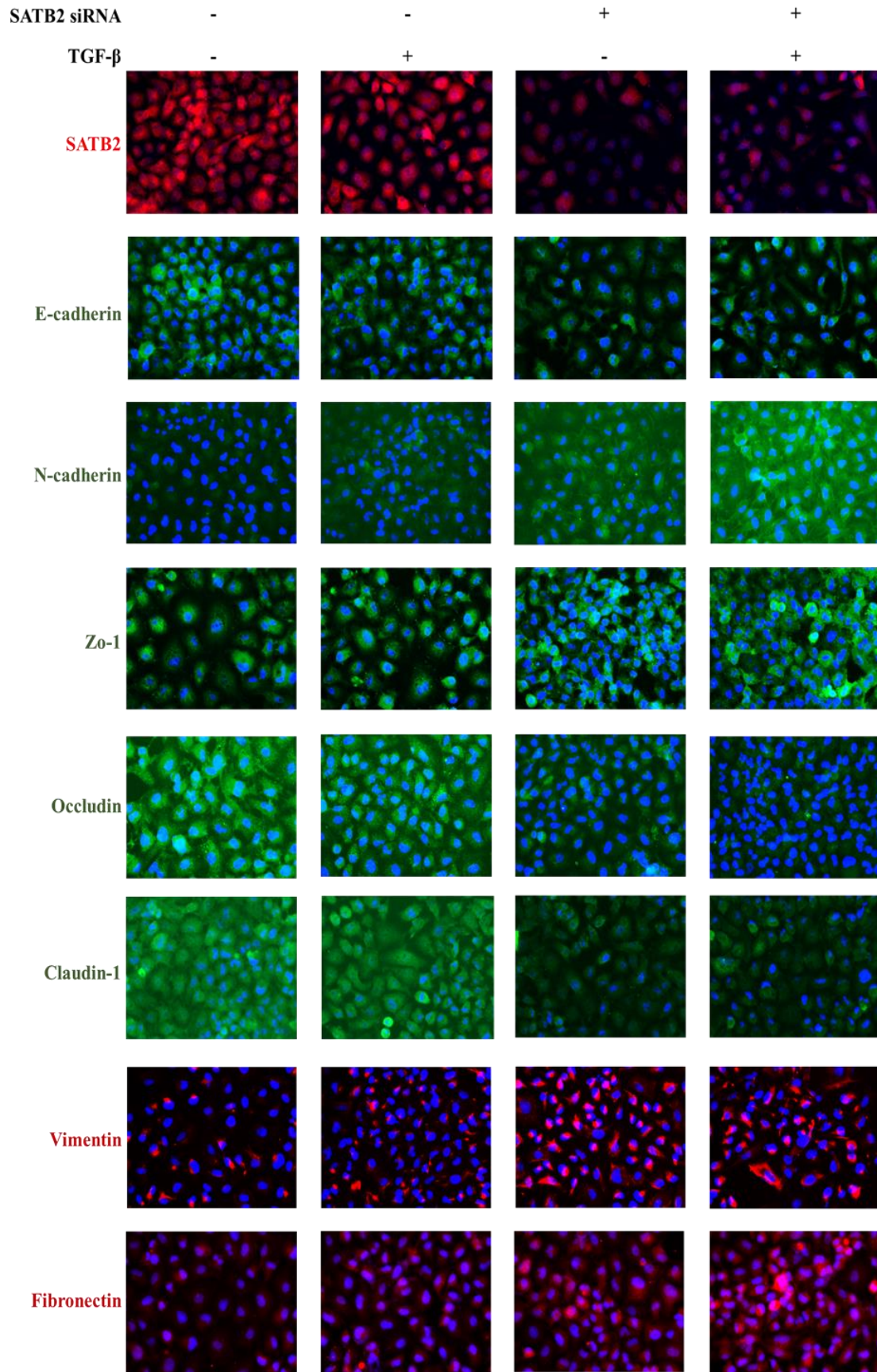
Öncelikle SATB2 siRNA veya kontrol siRNA transfekte ettiğimiz A549 hücrelerinde SATB2 baskılanmasının ve akabinde EMT indüksiyonu için olmazsa olmaz olarak kabul edilen E-cadherin downregülasyonunun teyiti yapıldı. Şekil 4.9’da açıkça görüldüğü üzere, TGF- $\beta$  uyarımı hem 24. hem de 48. saatlerde SATB2 ekspresyonunu başarılı bir şekilde baskılamıştır. SATB2’nin baskılanması TGF- $\beta$  uyarımına gerek kalmaksızın E-cadherin ekspresyonunu her iki zamanda da downregüle etmiştir. Ayrıca, yukarıda da ifade ettiğimiz üzere; TGF- $\beta$  muamelesi, A549 hücrelerinde tek başına EMT sürecini dramatik bir şekilde indüklemiştir (Şekil 4.10 ve 4.11). Bu bağlamda, SATB2 susturulmasının TGF- $\beta$  ile indüklenen E-cadherin downregülasyonunu artırdığı gözlemlenmiştir. E-cadherin ile birlikte EMT en yaygın olarak kullanılan mezenchimal bir belirteç olan N-cadherin ekspresyonu ise SATB2 susturulması ile indüklenmiştir (Şekil 4.10 ve 4.11). Diğer epitelyal belirteçler olan Zo-1, Occludin ve Claudin gibi sıkı bağlantı proteinlerini incelediğimizde Zo1 proteininde enteresan sonuçlar gözlemlenmiştir. Zo1 beklenen aksine TGF- $\beta$  tarafından baskılanmamakta, aksine ekspresyonu indüklenmiştir (Şekil 4.10 ve 4.11). SATB2’nin, bir diğer sıkı bağlantı proteini olan Occludin ifadesi üzerine olan etkisine baktığımızda (özellikle TGF- $\beta$  uyarımının 24. Saatinde), E-cadherin üzerindeki etkisine benzer bir sonuçla karşılaşmıştır. Son olarak; Claudin ifadesinin TGF- $\beta$  tarafından baskılandığını, ancak SATB2 ile herhangi bir ilişkisi olmadığı görülmüştür (Şekil 4.10 ve 4.11). N-cadherin’in yanısıra EMT sürecinin mezenchimal belirteçleri olarak sıklıkla kullanılan Fibronectin ve Vimentin protein seviyelerinin SATB2 ile ilişkisini de taahhüt ettiğimiz üzere inceledik. Ancak; A549 hücrelerinde SATB2 ile Fibronectin ve Vimentin ifadeleri arasında bir ilişki bulunamamıştır (Şekil 4.10 ve 4.11). Diğer taraftan EMT sürecinin yönetiminde görev alan

Snail, Slug, Twist ve Zeb1 transkripsiyon faktörlerini araştırdık. Şekil 4.10'da görüldüğü üzere, TGF- $\beta$  Twist hariç diğer bütün transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını indüklemiştir. Bu bağlamda, özellikle Slug ve Zeb1 transkripsiyon faktörlerinin TGF- $\beta$  aracılı indüksiyonlarında SATB2'nin düzenleyici bir rol oynadığını gördük. Ayrıca, TGF- $\beta$ 'nin kanonik olarak değerlendirilen SMAD yolağının ana bileşenleri p-SMAD2/3, SMAD2/3 ve SMAD4 ekspresyonlarını inceledik. Şekil 10'da görüldüğü üzere, TGF- $\beta$  uyarımının 24 ve 48. saatlerinde dahi p-SMAD2/3 seviyesi oldukça yüksektir. Ancak SMAD4 ifadesinin, TGF- $\beta$  tarafından etkilenmediğini ve SATB2'nin de bu proteinlerin ifadesinde herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür (Şekil 4.10). Elde ettiğimiz bu sonuçlardan, SATB2'nin TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT sürecindeki rolü, kanonik SMAD yolağından ziyade Slug ve Zeb1 gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları üzerindeki etkisinden kaynaklandığı anlaşılmaktadır.





**Şekil 4-10** SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.

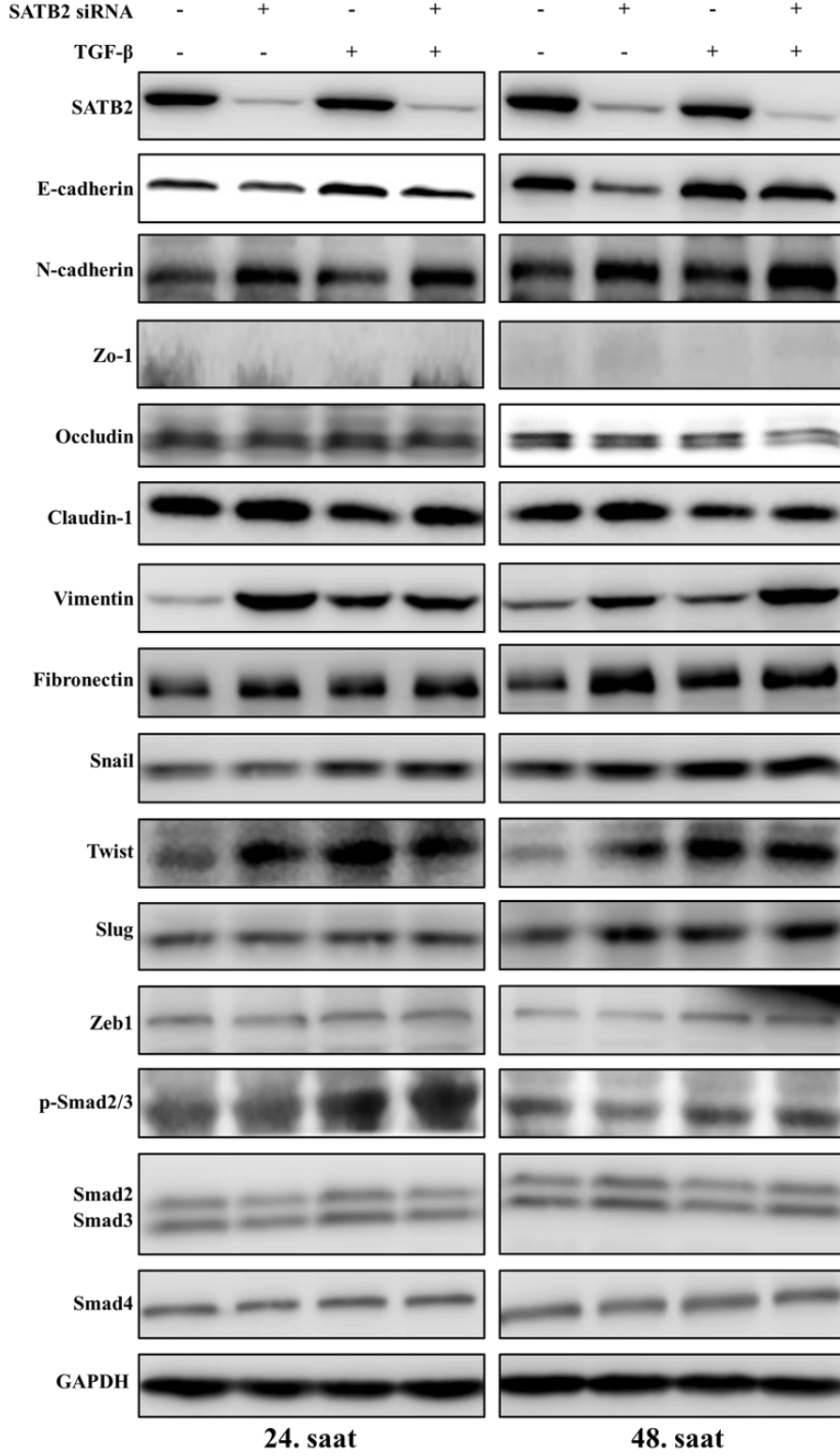


**Şekil 4-11** SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin İmmunofloresans boyama analizi ile gösterimi.

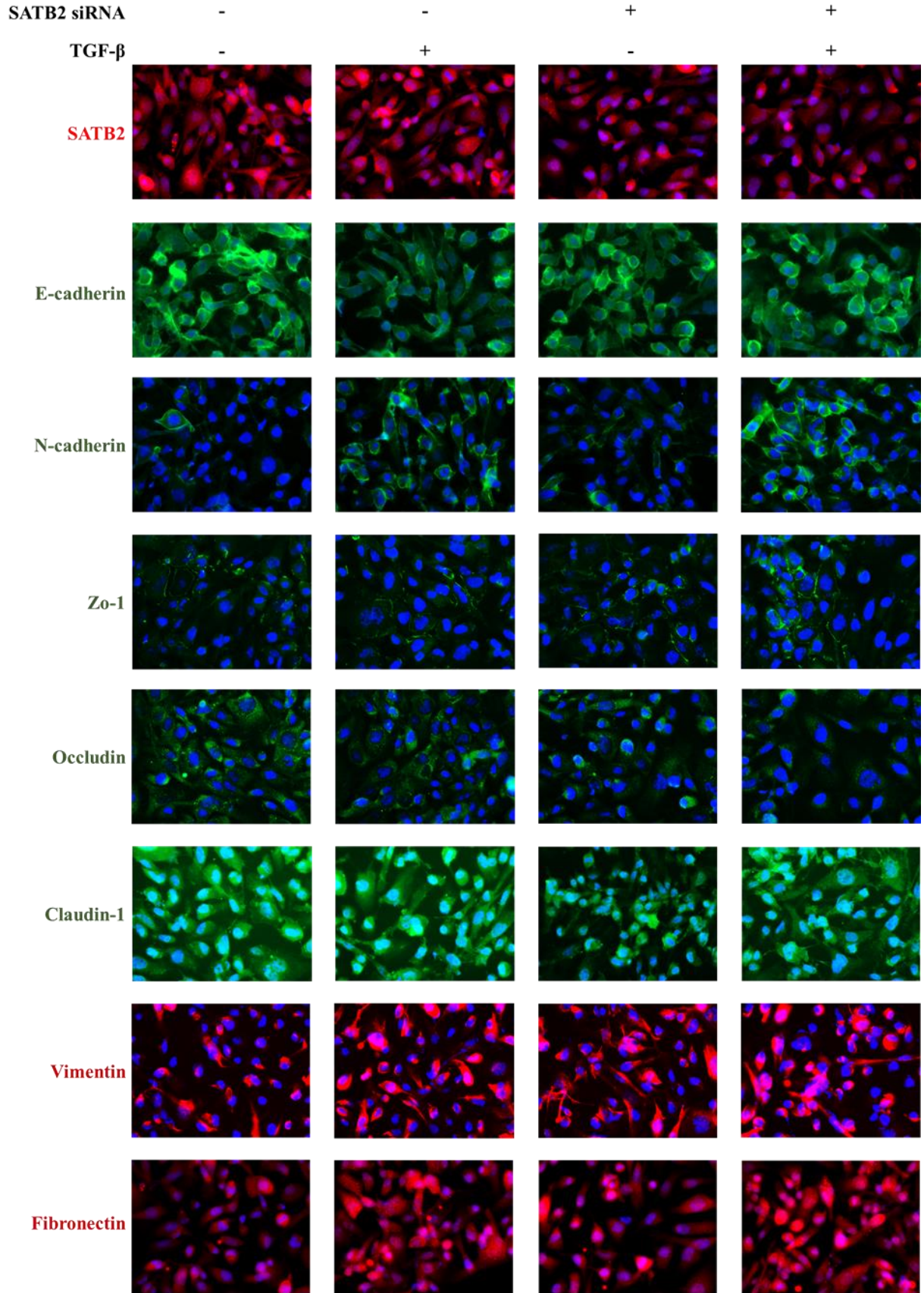
#### 4.2.2 Hcc193 hücrelerindeki SATB2 susturulmasının, TGF- $\beta$ ile indüklenen EMT sürecindeki etkisi

Öncelikle SATB2 siRNA transfeksiyonu ile SATB2 susturulmasının Hcc193 hücrelerinde başarılı olup olmadığı tespit edilmiştir. Hcc193 hücreleri A549 hücrelerine kıyasla yüksek SATB2 ekspresyonuna sahip hücre dizileridir. Şekil 4.12 ve 4.13'de görüldüğü üzere TGF- $\beta$  uyarımının hem 24. hem de 48. saatlerinde, siRNA aracılı SATB2 susturulması başarıyla gerçekleşmiştir. Daha sonra, SATB2 baskılanmasının EMT indüksiyonunun en önemli belirteci E-cadherin ifadesi üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Şekil 4.12 ve 4.13'de görüldüğü üzere SATB2 baskılanması, TGF- $\beta$  uyarımının olmadığı gruplarda her iki saatte de E-cadherin ekspresyonunu inhibe edebilmiştir. Ancak; TGF- $\beta$  uyarımı, SATB2 baskılanması ile kazanılan E-cadherin downregülasyonunu geriye çevirmiştir (Şekil 4.12 ve 4.13). Bununla birlikte, TGF- $\beta$  uyarımının özellikle 48. saatinde SATB2 baskılanması ile TGF- $\beta$  aracılığıyla indüklenen N-cadherin ekspresyonunu artırdığı açıkça görülmektedir (Şekil 4.12 ve 4.13). Sonrasında, Hcc193 hücrelerinde, sıkı bağlantı proteinlerinin SATB2 ile olan ilişkisini tespit etmeye çalıştık. Hcc193 hücreleri Zo1 ekspresyonu çok düşük bir hücre olduğu için immunofloresans boyamalardan sonuç almamıza rağmen, western blot analizlerimizde görüntü almakta zorlandık (Şekil 4.12). Bu nedenle immunofloresans analizlerimiz sonucuna göre; Hcc193 hücrelerindeki ne SATB2 baskılanmasının ne de TGF- $\beta$  uyarımının Zo1 ekspresyonu açısından anlamlı bir etkiye sahip olmadığını gördük (Şekil 4.13). Occludin ifadesinin, hem TGF- $\beta$  uyarımı hem de SATB2 baskılanması ile downregüle olduğunu ve ikisinin birlikte uygulandığı grupta daha kuvvetli bir şekilde downregüle olduğunu gözlemledik (Şekil 4.12 ve 4.13). Bununla birlikte bir diğer sıkı bağlantı proteini olan Claudin ifadesinin ise aynı A549 hücrelerinde olduğu gibi, yalnızca TGF- $\beta$  ile uyarılan hücrelerde düştüğü görüldü (Şekil 4.12 ve 4.13). Proje kapsamımızda değerlendirilen diğer mezenşimal belirteçler Fibronectin ve Vimentin ekspresyonları ise hem SATB2 baskılanması hem de TGF- $\beta$  uyarımı ile indüklenmekte olduğunu, her iki faktörün de Fibronectin ve Vimentin ekspresyonları üzerindeki etkilerini kantitatif olarak artırdıklarını gördük (Şekil 4.12 ve 4.13). Sonrasında; EMT sürecinin transkripsiyonel olarak idaresinden sorumlu Snail, Slug, Twist ve Zeb1 transkripsiyon faktörlerini inceledik. Şekil 4.12'de görüldüğü üzere, Hcc193 hücrelerindeki TGF- $\beta$  uyarımının daha çok Snail ve Twist ekspresyonlarını indüklemektedir. Slug ifadesi üzerinde yalnızca 48. saatte bir indüklenme görülürken, Zeb1 ifadesinde üzerinde TGF- $\beta$  uyarımının herhangi bir etkiye sahip olmadığını gördük (Şekil 4.12). Hcc193 hücrelerindeki SATB2 susturulmasının ise özellikle Slug ve bunun yanında Twist ekspresyonu üzerinde etkili olduğunu açıkça görülmektedir (Şekil 4.12). SMAD yolağı, TGF- $\beta$  uyarımı sonucunda A549 hücrelerindeki kadar olmasa da aktive olmakta ve SATB2'nin bu aktivasyonda herhangi bir rolü bulunmamaktadır (Şekil 4.12). Ayrıca, SMAD4 ifadesi ne TGF- $\beta$  uyarımı ne de

SATB2 baskılanması ile değişmemektedir (Şekil 4.12). Sonuç olarak; elde ettiğimiz verilerden SATB2'nin Hcc193 hücrelerindeki E-cadherin üzerindeki etkisini özellikle Slug ve Twist ekspresyonu üzerinden gerçekleştirdiğini düşünüyoruz.



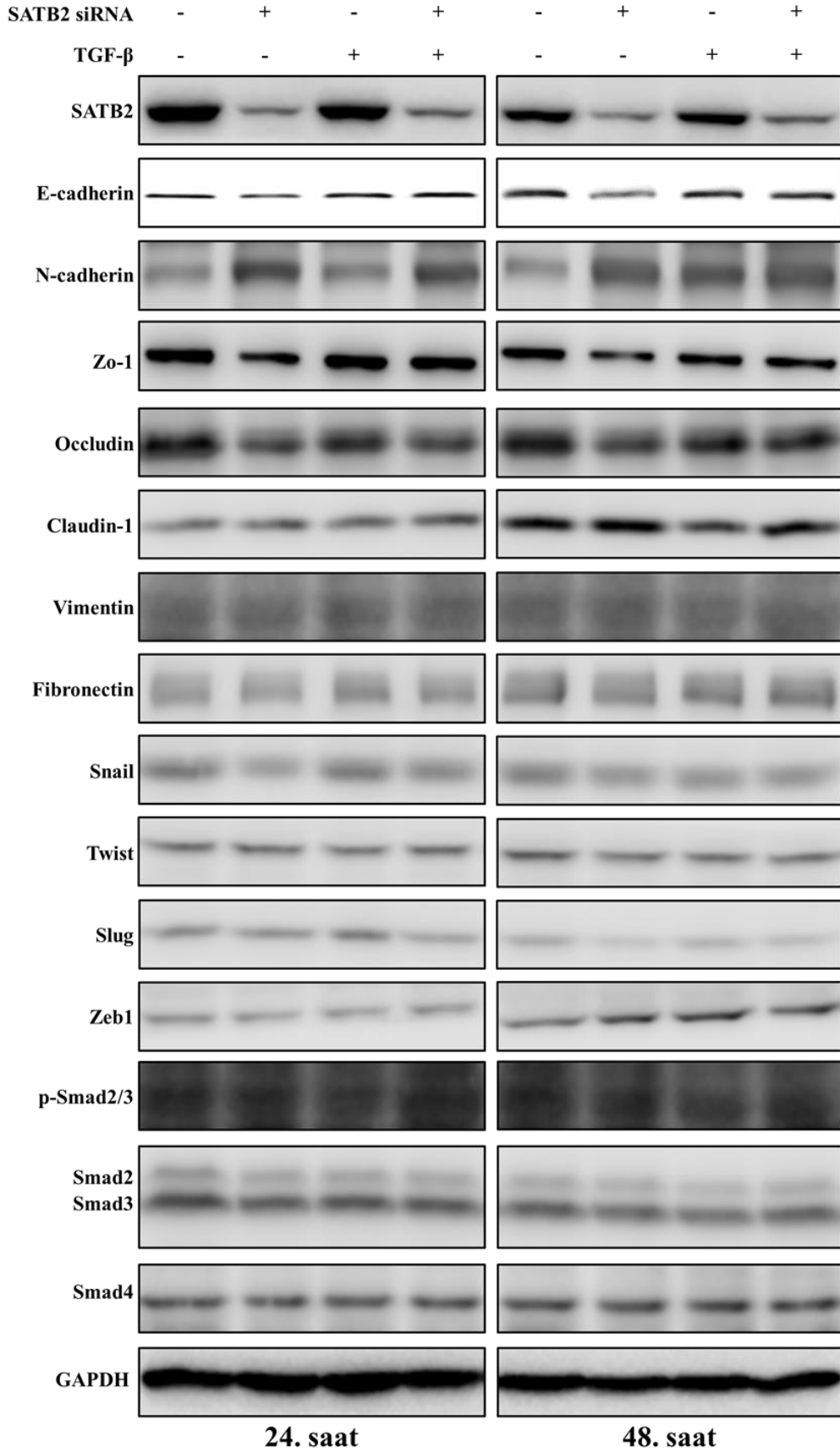
**Şekil 4-12** SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş Hcc193 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.



**Şekil 4-13** SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş Hcc193 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin İmmunofloresans boyama analizi ile gösterimi.

### 4.2.3 PC3 hücrelerindeki SATB2 susturulmasının, TGF- $\beta$ ile indüklenen EMT sürecindeki etkisi

PC3 hücreleri A549 hücrelerinden daha fazla SATB2 ifadesine sahip olduklarından dolayı başarılı bir baskılama kritikti. Açıkça görülmektedir ki; TGF- $\beta$  uyarımının her iki saatinde de SATB2 başarılı bir şekilde baskılanmıştır (Şekil 4.14). Sonrasında EMT sürecinin indüksiyonu için olmazsa olmaz olan E-cadherin downregülasyonunun varlığı incelendi. Şekil 4.14'te görüldüğü üzere her iki saatte de SATB2 downregülasyonu E-cadherin ifadesinin azalmasına sebep olmuştur. Ancak; SATB2 susturulması tarafından indüklenen E-cadherin downregülasyonu, tıpkı Hcc193 hücrelerinde olduğu gibi TGF- $\beta$  uyarımının varlığında geriye dönmüştür (Şekil 4.14). EMT indüksiyonunun kritik bir mezenkimal belirteci olan N-cadherin proteininin ekspresyonu ise, SATB2 baskılanmasıyla indüklenmiştir (Şekil 4.14). Sonrasında Zo1, Occludin ve Claudin sıkı bağlantı proteinlerinin ifadesi incelenmiştir. SATB2 baskılanması, her iki saatte de Zo1 ifadesini düşürdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.14). TGF- $\beta$  uyarımı, E-cadherin ifadesinde karşılaştığımız sonuca paralel olarak SATB2 baskılanması ile indüklenen Zo1 downregülasyonunu inhibe etmiştir (Şekil 4.14). Occludin ifadesi SATB2 ekspresyonundaki herhangi bir manipülasyona gerek kalmaksızın düşük seviyede de olsa TGF- $\beta$  tarafından baskılanmaktadır. Ancak; bu downregülasyonun derecesi TGF- $\beta$  uyarımına kıyasla SATB2 baskılanması ile artmıştır (Şekil 4.14). Claudin ifadesi, her iki saatte de SATB2 baskılanması ile değişmemiştir. Yalnızca, 48. saatte TGF- $\beta$  uyarımı ile downregüle olmuştur. Ne SATB2 baskılanması ne de TGF- $\beta$  uyarımı Fibronectin, Vimentin, Snail, Slug, Twist ve Zeb1 ekspresyonlarında ise anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 4.14). Tıpkı diğer hücrelerde olduğu gibi, SMAD4 ekspresyonu hiçbir grupta herhangi bir değişikliğe uğramamıştır (Şekil 4.14). Bu sonuçlar; TGF- $\beta$  tarafından EMT'nin indüklenmesinde elzem olan SMAD yolağının aktive olmaması, EMT sürecini yöneten bu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarının indüklenememesinden kaynaklanıyor olabilir (Şekil 4.14). Proje önerimizde de ifade ettiğimiz üzere, immunofloresans analizleri için A549 hücrelerinin yanında sadece bir hücre daha seçileceği ifade edilmiştir. Western blot sonuçlarımıza göre Hcc193 hücresi seçilmiştir. Bu sebeple, PC3 hücrelerinde immunofloresans analizi yapılmamıştır.

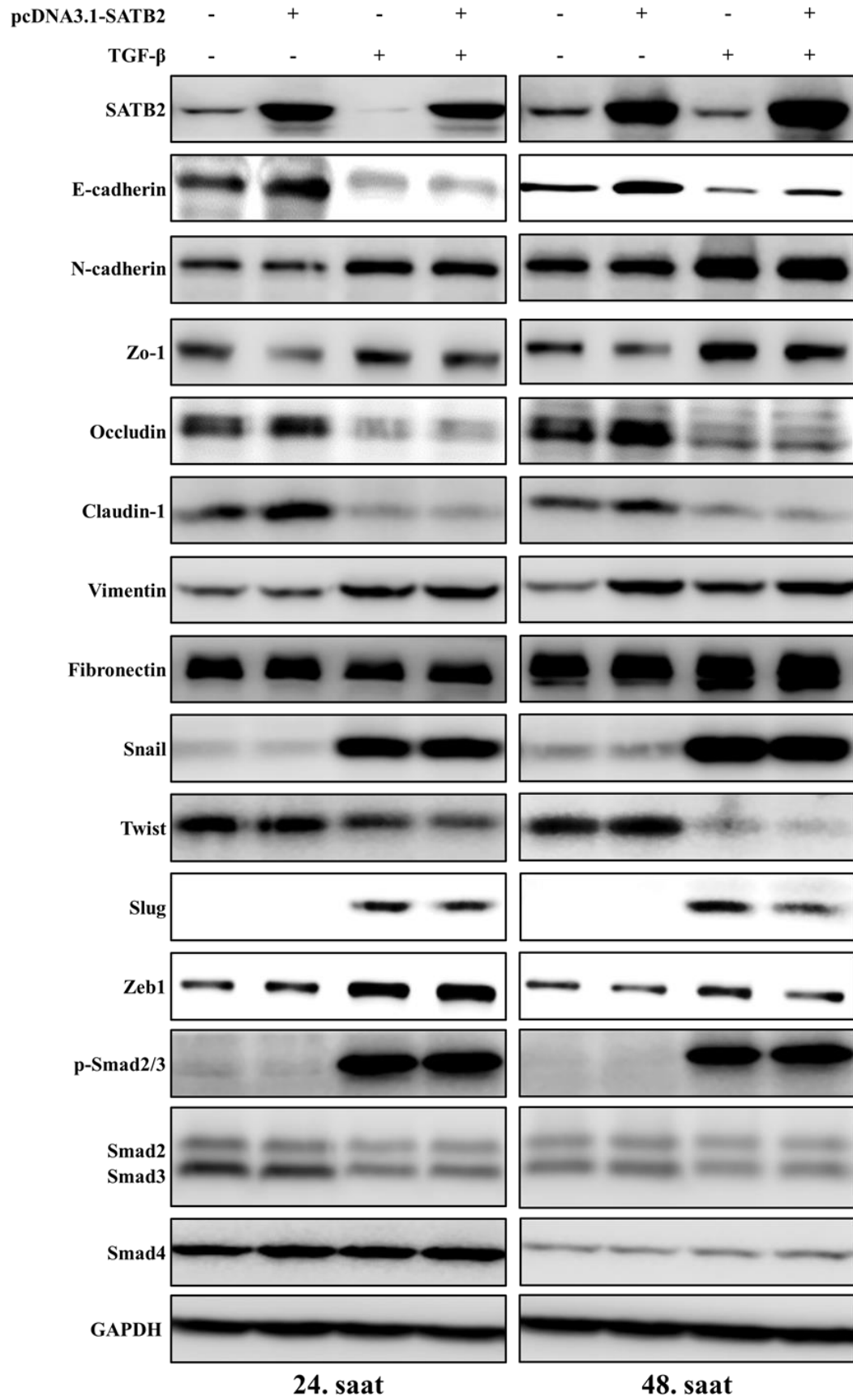


**Şekil 4-14** SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş PC3 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.

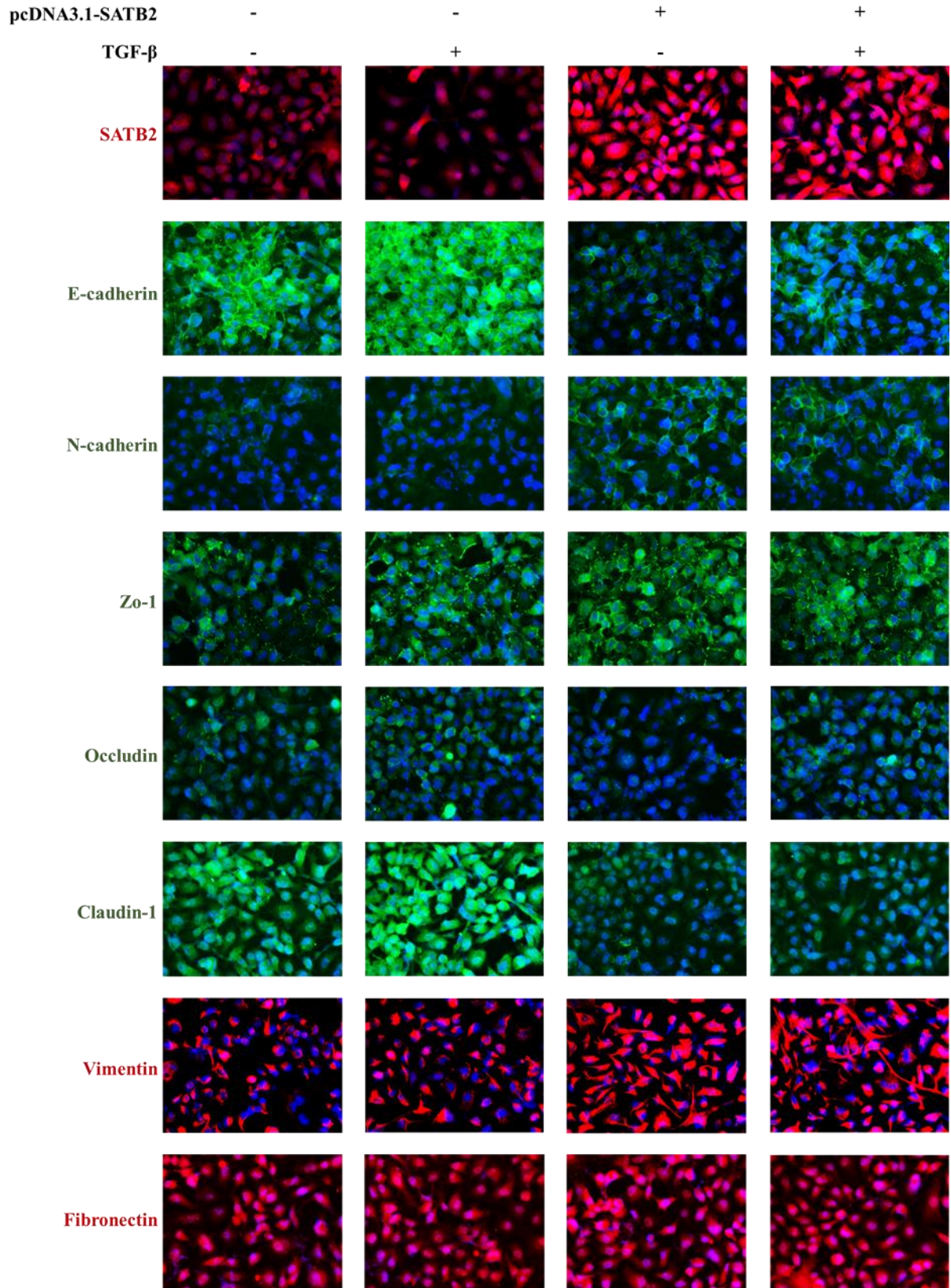
#### 4.2.4 A549 hücrelerindeki SATB2 overekspresyonunun, TGF- $\beta$ ile indüklenen EMT sürecindeki etkisi

Yukarıda da ifade ettiğimiz üzere; TGF- $\beta$  uyarımı, A549 hücrelerinde EMT sürecini indüklemekte ve EMT'nin indüklenmediği diğer hücrelerden farklı olarak SATB2 ekspresyonunda downregülasyona yol açmaktadır. Bu sebeple çalışmamızın bu kısmında, "SATB2 overeksprese edilen A549 hücrelerinde TGF- $\beta$  EMT sürecini indükleyebilir mi?" sorusuna yanıt aranmıştır. İlk olarak SATB2 overekspresyonunun teyiti yapıldı. Şekil 4.15 ve 4.16'da görülmektedir ki; pcDNA3.1-SATB2 transfekte edilen A549 hücrelerinde pcDNA3.1-mock transfekte edilenlere kıyasla SATB2 ekspresyonu upregüle olmuştur. Akabinde SATB2 overekspresyonunun, TGF- $\beta$  ile indüklenen ve indüklenmeyen A549 hücrelerindeki E-cadherin ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırdık. TGF- $\beta$  uyarımı yapılmayan A549 hücrelerindeki SATB2 upregülasyonu, her iki saatte de E-cadherin ekspresyonunu artırmıştır (Şekil 4.15 ve 4.16). Bununla birlikte; TGF- $\beta$  ile uyarılan hücrelerde 24. saatte E-cadherin downregülasyonu üzerinde bir etkiye sahip olmasada, 48. saatte TGF- $\beta$  tarafından indüklenen E-cadherin downregülasyonun şiddeti, sadece TGF- $\beta$  ile uyarılan hücrelere kıyasla daha az olduğu görülmektedir (Şekil 4.15 ve 4.16). Ancak, SATB2 upregülasyonunun TGF- $\beta$  ile indüklenen N-cadherin ekspresyonunu etkileyemediği görülmüştür (Şekil 4.15 ve 4.16). Yukarıda ifade ettiğimiz gibi TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT sürecinde Zo1 sıkı bağlantı proteininin ekspresyonu indüklenmektedir. Bu bağlamda SATB2 upregüle edilen A549 hücrelerinde Zo1 ekspresyonu düşmekte, düşük bir seviyede de olsa özellikle 24. saat gruplarında TGF- $\beta$  ile indüklenen Zo1 ekspresyonu inhibe olmaktadır (Şekil 4.15 ve 4.16). Diğer sıkı bağlantı proteinleri Occludin ve Claudin ifadeleri SATB2 overeksprese edilen hücrelerde inhibe olduğu, ancak TGF- $\beta$  ile indüklenen A549 hücrelerinde SATB2 upregülasyonunun, bu proteinlerin ifadeleri üzerinde bir etkisi olmadığı görüldü (Şekil 4.15 ve 4.16). SATB2 upregülasyonu Fibronectin ve Vimentin mezenkimal belirteçlerin üzerinde herhangi bir anlamlı değişime neden olmamıştır (Şekil 4.15 ve 4.16). EMT yürütücü transkripsiyon faktörlerinden Snail ve Twist ifadeleri SATB2 upregülasyonu ile etkilenmemiştir. Ancak; Slug ve Zeb1 ekspresyonları özellikle 48. saatte TGF- $\beta$  tarafından indüklenen ekspresyonları SATB2 upregülasyonu ile inhibe olmuştur (Şekil 4.15). TGF- $\beta$  ile indüklenen SMAD yolağı ve TGF- $\beta$  uyarımı sonucunu ekspresyonu değişmeyen SMAD4, SATB2 upregülasyonu ile etkilenmemiştir (Şekil 4.15). Bu sonuçlar SATB2 susturulan A549 hücrelerindeki gözlemlenen sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Yani, SATB2'nin EMT sürecindeki etkisinin Slug ve Zeb1'in ekspresyonları üzerindeki etkisinden kaynakladığını düşünüyoruz.





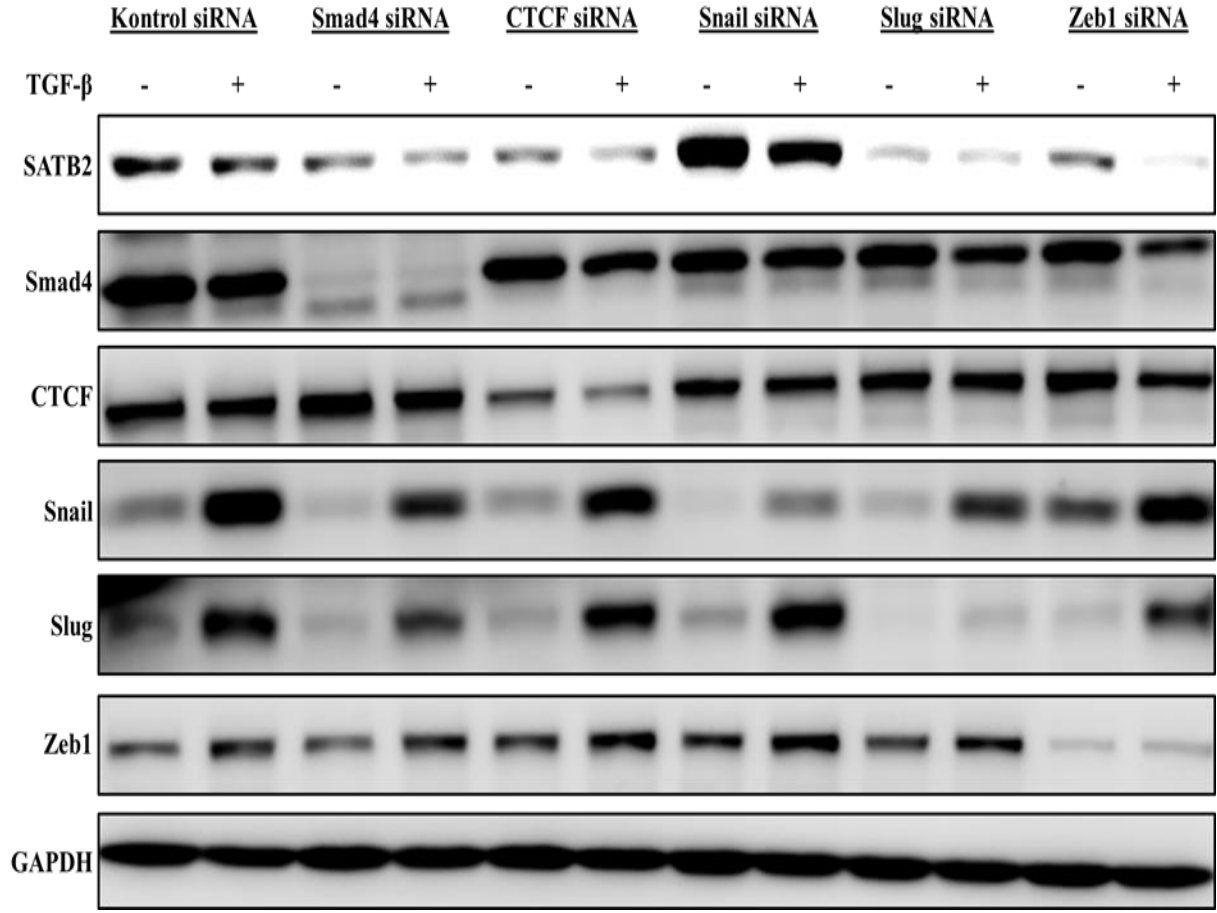
**Şekil 4-15** pcDNA3.1-SATB2 transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.



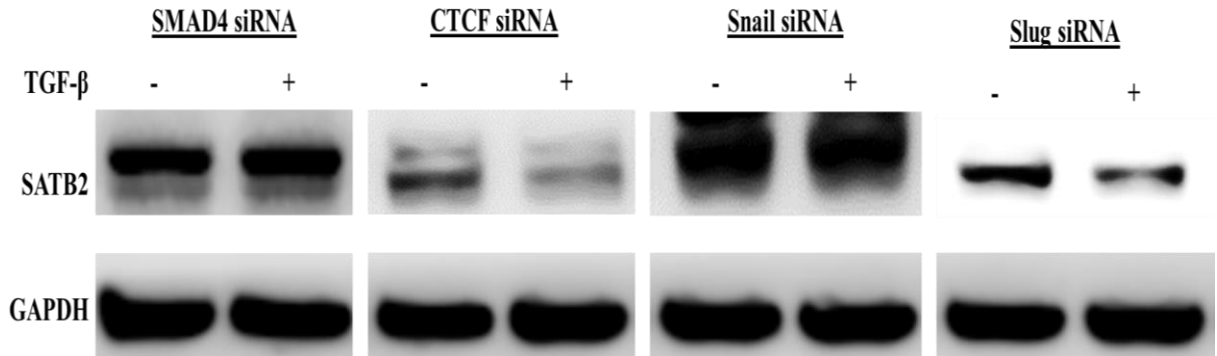
**Şekil 4-16** pcDNA3.1-SATB2 transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin İmmunofloresans boyama analizi ile gösterimi.

### 4.3 SATB2 promotör bölgesinde var olan E-box, CTCF ve SMAD4 bağlanma bölgelerine bağlanması muhtemel düzenleyici faktörlerin TGF- $\beta$ tarafından indüklenen SATB2 downregülasyonundaki potansiyel rollerinin araştırılması

SATB2'nin TGF- $\beta$  tarafından indüklenen EMT sürecindeki rolünü tespit ettikten sonra, SATB2 ekspresyonunun TGF- $\beta$  tarafından nasıl düzenlendiği sorusuna cevap aradık. Proje önerimizde ifade ettiğimiz üzere, bioinformatik analizlerimizde SATB2 promotör bölgesinde E-box, CTCF ve SMAD4 bağlanma motifleri olduğunu tespit etmiştik. Bu bağlamda, TGF- $\beta$  yolağında önemli görevleri olan transkripsiyonel faktörlerden SMAD4, CTCF, Snail, Slug ve Zeb1'nin, SATB2 ekspresyonu üzerindeki etkilerini tespit etmeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda, SMAD4, CTCF, Snail, Slug ve Zeb1 transkripsiyon faktörlerini hedef alan siRNA'larla A549 hücrelerini transfekte ettik. Öncelikle tek tek bu siRNA'ların hedeflerini baskılamadaki başarısını analiz ettik ve tüm hedeflerin başarıyla susturulmuş olduğunu gördük (Şekil 4.17). Daha sonra, bu transkripsiyon faktörlerden hangisinin veya hangilerinin SATB2 ekspresyonunu düzenlemede sorumlu olduğunu araştırdık. Şekil 4.17'de açıkça görülmektedir ki; Snail ekspresyonunun baskılanması, SATB2 ekspresyonunu dramatik bir şekilde artırmıştır. Bu sonuç, TGF- $\beta$  tarafından ekspresyonu indüklenen EMT sürecinde önemli bir role sahip olan Snail transkripsiyon faktörünün SATB2 ifadesi için negatif bir regülatör olduğunu göstermektedir. Ancak, diğer transkripsiyon faktörlerinin de SATB2 ifadesinin regülasyonunda rol oynadığı görülmektedir. Özellikle; bizim bu iş paketindeki amacımız TGF- $\beta$  aracılı SATB2 downregülasyonunda hangi molekülün veya moleküllerin sorumlu olduğunu tespit etmektir. Bu nedenle özellikle TGF- $\beta$  ile indüklenen SATB2 downregülasyonunu kısmen veya tamamen inhibe eden molekülü tespit etme yolunu izledik. Bu bağlamda, Snail, Slug, SMAD4 ve CTCF'nin baskılandığı A549 hücrelerinde TGF- $\beta$  tarafından indüklenen SATB2 downregülasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.17). Bu sonuçlardan yola çıkarak sonuçlarımızın doğruluğunu teyit etmek amaçlı Snail, Slug, Smad4 ve CTCF siRNA susturulan grupları bağımsız deneylerle tekrarladık. Şekil 4.18'de görüldüğü üzere, CTCF ve Slug ifadelerinin baskılandığı A549 hücrelerindeki TGF- $\beta$  uyarımı sonucu SATB2 ekspresyonunun baskılanmasının etkilenmediği görüldü. Ancak, Snail ve Smad4 ifadelerinin baskılanması TGF- $\beta$  ile indüklenen SATB2 downregülasyonunu engellediği görülmüştür (Şekil 4.18). Bu sonuçlardan Snail ve Smad4 transkripsiyon faktörlerinin, SATB2 ifadesinin doğrudan promotör bölgesine bağlanarak ekspresyonunda düzenleyici rol oynayabileceğini düşünerek, bunu göstermek yaptığımız CHIP deneyi için bu iki transkripsiyon faktörü seçilmiştir.



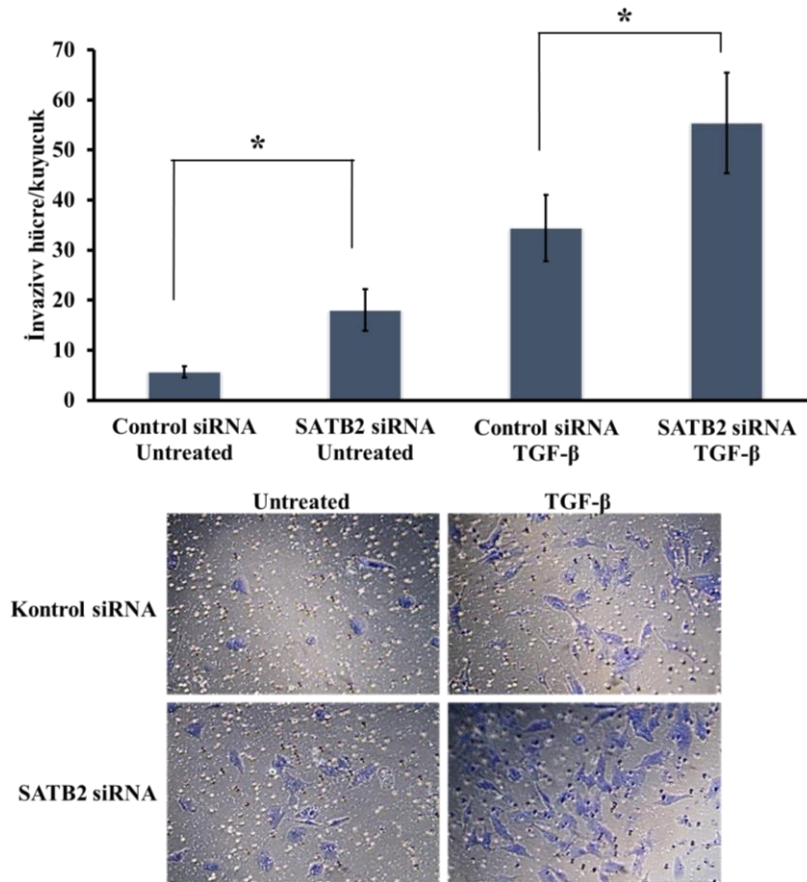
**Şekil 4-17** SMAD4, CTCF, Snail, Slug ve Zeb1 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının SATB2 ifadesi üzerindeki etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.



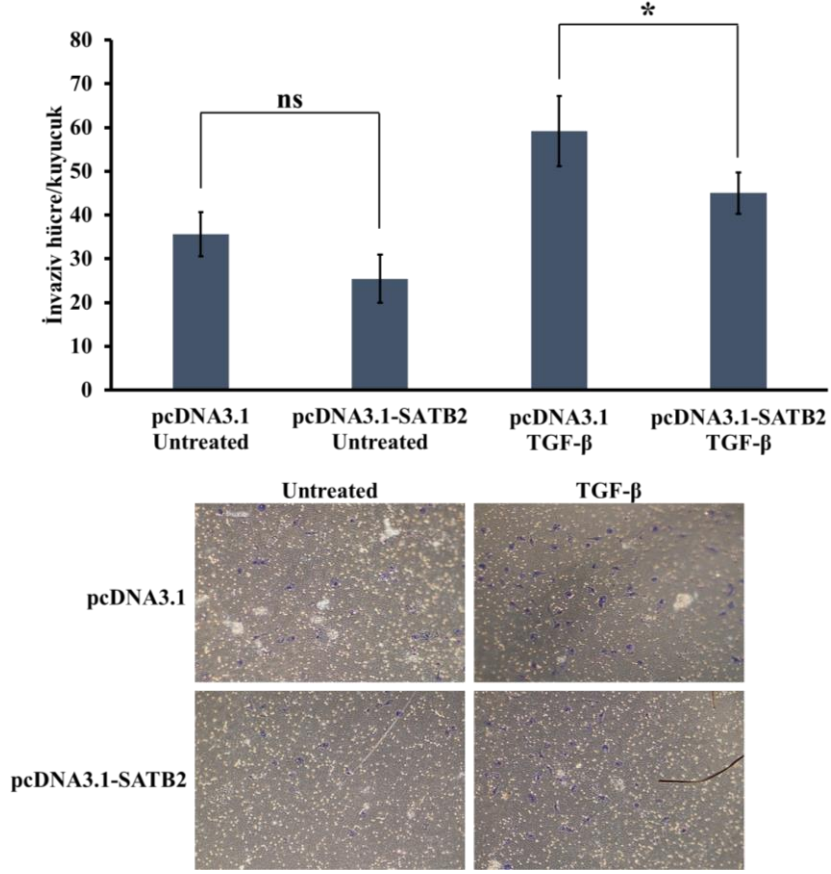
**Şekil 4-18** SMAD4, CTCF, Snail ve Slug siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının SATB2 ifadesi üzerindeki etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.

#### 4.4 SATB2 ekspresyonunun TGF- $\beta$ ile indüklenen KHDAK hücre invazyonu üzerindeki etkisinin araştırılması

SATB2'nin A549 ve Hcc193 hücre dizilerindeki TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT sürecindeki rollerini tespit ettikten sonra, hücre invazyonları üzerindeki rolünü de belirlemeyi amaçladık. Yukarıda da ifade ettiğimiz üzere, A549 hücrelerinde SATB2 ifadesinin baskılanması TGF- $\beta$  uyarımına gerek kalmaksızın EMT sürecini indüklemiş ve TGF- $\beta$  etkisini de artırmıştı. İnvazyon deneyimiz sonucunda bu elde ettiğimiz veriler ile paralel olarak, SATB2 ifadesinin baskılanması A549 hücre invazyonunu arttırmıştır. Ayrıca önemli bir EMT indükatörü olduğu kadar hücre invazyonunu artırmada da güçlü bir uyarıcı olan TGF- $\beta$ 'nin etkisi SATB2 ifadesinin baskılanması ile anlamlı ölçüde artmıştır (Şekil 4.19). SATB2'nin overekspresye edildiği A549 hücrelerinin invazyon kapasiteleri düşse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.20). Ancak A549 hücrelerinin TGF- $\beta$  ile indüklenen invazyon kapasitesi SATB2 overekspresyonu ile anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.20).

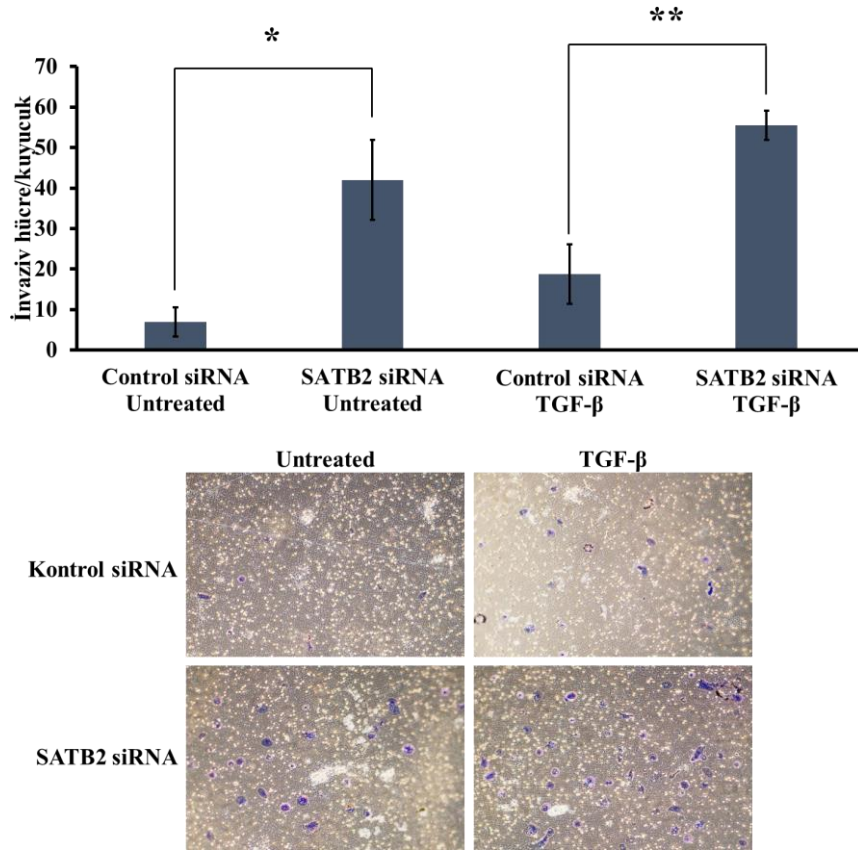


**Şekil 4-19** SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının hücre invazyonu üzerindeki etkisi.



**Şekil 4-20** pcDNA3.1-SATB2 transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF-β uyarımının hücre invazyonu üzerindeki etkisi.

SATB2'nin A549 hücre invazyonu üzerindeki etkilerini tespit ettikten sonra, 3. iş paketinden seçtiğimiz Hcc193 hücrelerindeki etkisini de tespit etmeyi amaçladık. SATB2'nin susturulduğu hücrelerde TGF-β uyarımı olmaksızın güçlü bir şekilde hücre invazyonunu indüklediğini, SATB2 ekspresyonunun manipüle edilmediği hücrelerde TGF-β uyarımı EMT sürecini indükleyemediği halde hücre invazyonunu artırdığını gördük. Bununla birlikte hem SATB2 ekspresyonunun baskılandığı hem de TGF-β'nin uygulandığı Hcc193 hücrelerinde invazyon daha kuvvetli şekilde indüklenmiştir (Şekil 4.21).

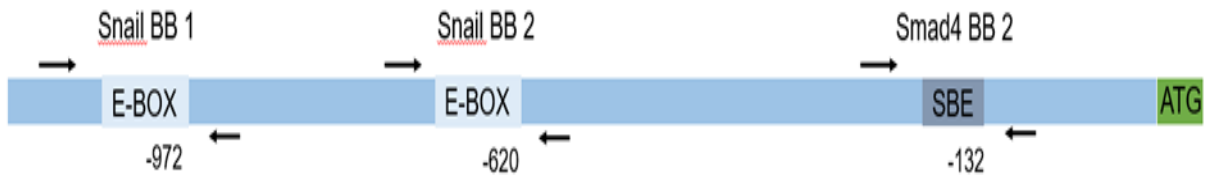


**Şekil 4.21.** SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş Hcc193 hücrelerinde TGF-β uyarımının hücre invazyonu üzerindeki etkisi.

#### 4.5 TGF-β aracılı SATB2 ekspresyonunun düzenlenmesinde rolü olduğu tespit edilen gen ürünlerinin, CHIP assay yöntemi ile SATB2 promotor bölgesine spesifik olarak bağlanarak SATB2 ekspresyonunun düzenlenmesindeki rolünün araştırılması

“SATB2 promotor bölgesinde var olan E-Box, CTCF ve SMAD4 bağlanma bölgelerine bağlanması muhtemel düzenleyici genlerin TGF-β tarafından indüklenen SATB2 downregülasyonundaki potansiyel rollerinin araştırılması” başlığı altındaki iş paketinden elde ettiğimiz veriler ışığında, Snail ve Smad4 transkripsiyon faktörlerinin TGF-β aracılı SATB2 downregülasyonunda doğrudan sorumlu olabileceği sonucuna vardık (Şekil 4.18). Proje önerimizde bu iş paketi için “Bir önceki iş paktinde saptamayı umduğumuz SATB2 ekspresyonunun düzenlenmesinde etkili olan bir yada birden fazla gen ürünü siRNA ile susturulmuş veya kontrol siRNA transfekte edilmiş hücre grupları transfeksiyondan 24 saat sonra serum free besiyeri kullanılarak 24 saat serum-starved yapıldıktan sonra, 1 saat TGF-β ile muamele edilmiş ve edilmemiş gruplar” şeklinde gruplandırma yapılarak deney tasarlanmıştır. Ancak CHIP, çok aşamalı bir deney olmasının yanı sıra her aşamasında

deneyin doğruluğunu teyit etmek amaçlı birçok kontrol deneyi yapılmaktadır (hücre lizisinin her grup için eşit şartlarda yapılması, kromatin miktarının her grup için eşit miktarlarda izole edilebilmesi, immunopresipitasyona her grup için eşit miktarda kromatin ile girilmesi vb). Bu nedenle deneyin başta hücrelerin eşit şekilde ekilmesi ve toplanmasından başlanarak her kademesinde eşit hücre ve kromatin miktarı ile yürütülmesi elzemdir. Yukarıda ifade ettiğimiz sebeplerden dolayı deneyimizi, literatür ile uyumlu olarak yalnızca TGF- $\beta$  ile uyarılan ve uyarılmayan hücreler şeklindeki bir gruplandırmayı tercih ederek tasarladık (Nawshad vd. 2007, Rodon vd. 2014, Vincent vd. 2009). Bu bağlamda Snail ve Smad4 transkripsiyon faktörlerinin SATB2 geninin promotor bölgesindeki bağlanma bölgelerini JASPAR kullanarak analiz ettik ve yüksek skor bağlanma gösteren bölgeleri belirledik (Şekil 4.22). Tahmini olarak belirlediğimiz bu bölgelere gerçekten Snail ve Smad4 transkripsiyon faktörlerinin bağlanıp bağlanmadığını tespit edebilmek için CHIP-PCR deneyleri gerçekleştirdik. Bunun için TGF- $\beta$ 'nın 1 saat uygulandığı hücreler ve uygulanmadığı A549 hücrelerinden elde edilen kromatin örneklerini, Snail ve Smad4 antikorları kullanarak kromozom immünpresipitasyon gerçekleştirdik. Presipitasyon sonucunda elde edilen DNA örneklerini ayrı ayrı Snail ve Smad4 bölgeleri için tasarladığımız primerleri kullanarak qRT-PCR analizlerini gerçekleştirdik. Snail antikorlu ile elde ettiğimiz CHIP DNA örneklerinin Snail bağlanma bölgesini hedef alan primerler ile yapılan qRT-PCR sonuçlarında, her iki bağlanma bölgesinde TGF- $\beta$  ile muamele edilen örneklerde kontrole oranla yaklaşık 3 katlık bir artış gösterdiğini belirledik (Şekil 4.23). Aynı şekilde Smad4 antikorlu ile elde edilen CHIP DNA örneklerinin Smad4 bağlanma bölgesini hedef alan primer ile yapılan qRT-PCR sonuçlarında, TGF- $\beta$  uygulanan örnekte kontrole oranla yaklaşık 5 katlık artış gözlemledik (Şekil 4.23).

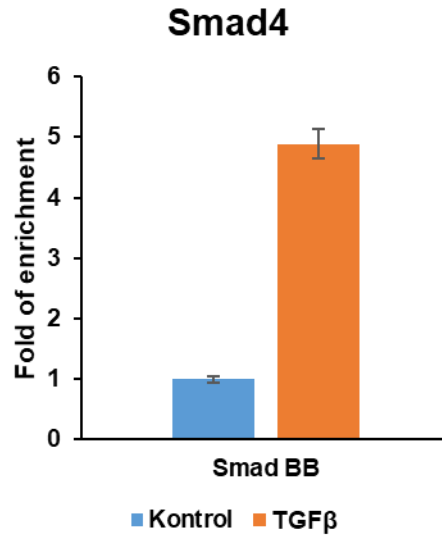
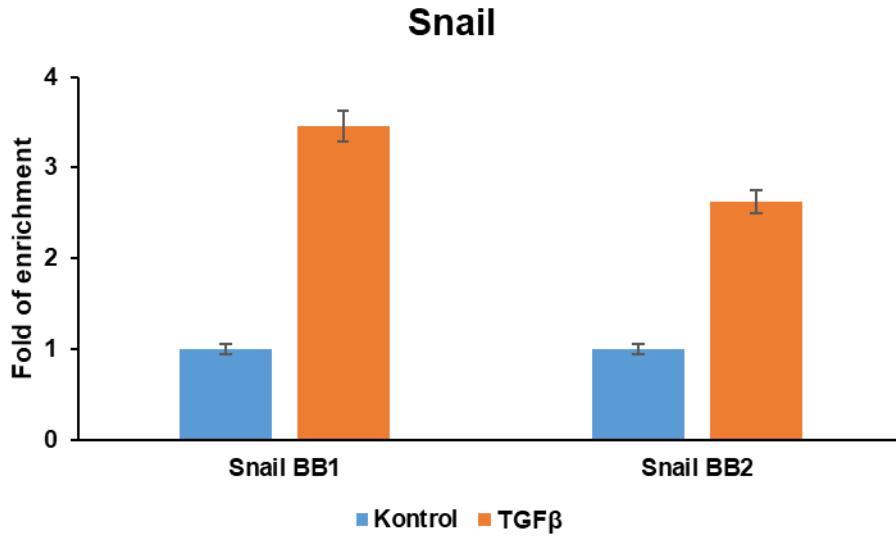


**SATB2 Promotor** (hg38 chr2:199,456,034-199,457,116)

**Şekil 4-22** JASPAR web tabanlı program kullanarak yapılan analizde elde ettiğimiz Snail ve Smad4 bağlanma bölgelerinin şematik gösterimi (BB=bağlanma bölgesi).

CHIP-PCR sonuçlarımız, TGF- $\beta$  uyarımının Snail ve Smad4 transkripsiyon faktörlerinin SATB2 promotoruna bağlanmalarını önemli ölçüde arttırdığını göstermektedir. Böylece bu sonuçlar, Snail ve Smad4 transkripsiyon faktörlerinin TGF- $\beta$  aracılı SATB2 downregülasyonuna doğrudan karıştığını göstermektedir.





**Şekil 4-23** Snail ve Smad4 transkripsiyon faktörlerinin SATB2 promotoruna bağlanmasının CHIP-PCR yöntemi ile tespit edilmesi.

## 5. TARTIŞMA/SONUÇ

Proje kapsamında KHDAK hücrelerinin TGF- $\beta$  tarafından indüklenen EMT ve invazyon süreçlerinde, SATB2'nin düzenleyici rolünü moleküler mekanizmalarıyla aydınlatılması amaçlanmıştır. EMT, epitel kökenli hücrelerin hücre-hücre bağlantıları ve apikobazal polarite gibi epitel karakterlerini kaybettikleri, bununla birlikte artan migrasyon-invazyon yeteneği ve ön-arka polariteye sahip olma gibi mezenkimal hücre özellikleri kazandıkları bir süreçtir. Her geçen gün EMT'nin indüksiyonundan sorumlu birçok regülatör protein, miRNA ve lncRNA'lar tanımlanmasına karşın, EMT sürecinin altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. SATB2, ilk olarak yüz-kafatası gelişimi ve osteoblast farklılaşması gibi biyolojik süreçlerde önemli regülatör olarak tanımlanan hem bir transkripsiyon faktör hem de kromatin yeniden modellemede görev alan bir protein olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte SATB2'nin çeşitli kanser tiplerinin progresyonlarındaki rolünü aydınlatmak adına yapılan çalışmalar artmaktadır. Halihazırda mevcut projenin bazı çıktıları "Downregulation of SATB2 is critical for induction of epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of NSCLC cells" başlığıyla "Lung Cancer" dergisinde yayınlamadan çok kısa bir süre önce bizim raporlandığımız bulgularla paralel iki farklı makale yayınlanmıştır (Yang vd. 2013, Yang vd. 2014). Kolon kanserinde çalışılan bu iki makalede de SATB2'nin EMT ve invazyon süreçlerinde baskılayıcı bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, makalemizi referans göstererek akciğer kanseri EMT ve invazyonunda SATB2'nin etkilerini aydınlatan çalışmalar da yayınlanmıştır. Projemiz ile, SATB2'nin EMT ve invazyon üzerindeki etkisi ve TGF- $\beta$  sinyal yolağındaki rolü daha kapsamlı bir şekilde aydınlatılmıştır.

Proje kapsamında ilk olarak TGF- $\beta$  tarafından EMT'nin indüklenmediği ve SATB2 ekspresyonunun baskılanmadığı Hcc78, Hcc193, PC3 ve H127 KHDAK hücre hatlarında SATB2 ifadesinin baskılanarak bu hücrelerden hangilerinde EMT'nin indüklendiği tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Şekil 4.9'de görüldüğü üzere H127 hücre hatlarında EMT indüklenemezken, Hcc78 hücre hatlarında SATB2 baskılanması epitel karakterin daha da güçlenmesine neden olmuştur. Yakın zamanda kolorektal kanser hücresi CRL-1831 üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada SATB2'nin Hcc78 hücrelerinde olduğu gibi EMT'nin baskılanması değil aksine indüklenmesine yönelik fonksiyon gösterdiği rapor edilmiştir (Yu vd. 2017). SW480 ve DLD-1 kolon kanseri hücreleriyle gerçekleştirilmiş yukarıda bahsettiğimiz çalışmalarda da tam tersi sonuçların olması, bu zıt sonuçların hücre spesifik bir etkiden olduğunu desteklemektedir. Akciğer kanserinde A549, H1650, Hcc193 ve PC3 olmak üzere 4 farklı KHDAK hücre hattında SATB2 ekspresyonu ve epitelial karakterin zıt bir ilişki

içinde olduğunu göstermiş bulunmaktayız. Bu bulgular SATB2'nin EMT üzerinde baskılayıcı rolü olduğu fikrinin daha baskın ve güçlü bir kanı olduğunu göstermektedir.

EMT'nin indüklenmesinin en önemli belirteçleri olarak kabul edilen E-cadherin/N-cadherin değişimidir. SATB2 ekspresyonunun baskılandığı A549 hücrelerinde, TGF- $\beta$  uyarımına gerek kalmaksızın E-cadherin/N-cadherin değişiminin indüklendiğini ve ayrıca TGF- $\beta$  tarafından indüklenen bu değişimin daha da dramatik olarak gerçekleştiği tespit ettik. Sonrasında, "SATB2 KHDAK EMT'si üzerindeki bu etkisini TGF- $\beta$  sinyal yolağındaki hangi faktörler üzerinden gerçekleştirmektedir" sorusuna yanıt aradık. Bunun için öncelikle TGF- $\beta$  tarafından EMT sürecini yönetmekte etkin ve aktif roller üstlenen Snail, Slug, Twist ve Zeb1 gibi transkripsiyon faktörlerinin SATB2 ekspresyon değişimlerinden nasıl etkilendiğini inceledik. SATB2 ifadesi baskılanan A549 hücrelerinde özellikle TGF- $\beta$  ile ekspresyonları indüklenen Slug ve Zeb1 transkripsiyon faktörlerinin daha kuvvetli bir şekilde indüklenmesinin yanısıra SATB2 overeksprese edilen A549 hücrelerinde bu iki proteindeki TGF- $\beta$  tarafından indüklenen ekspresyon artışının azaldığı gözlemlendi. Hcc193 hücrelerinde de özellikle Slug ve Twist transkripsiyon faktörlerinin, SATB2 tarafından negatif regüle edildiklerini tespit ettik. Bu sonuçlar; SATB2'nin, E-cadherin/N-cadherin değişiminde rol alan Slug, Zeb1 ve Twist gibi transkripsiyon faktörleri üzerinde baskılayıcı bir role sahip olduğunu ve bu yönüyle TGF- $\beta$  tarafından indüklenen E-cadherin/N-cadherin değişiminin şiddetini etkileyebildiğini göstermektedir. Bir diğer olası mekanizma olarak SATB2'nin TGF- $\beta$ /SMAD yolağının aktivasyonu üzerindeki etkisini araştırdık. SATB2'nin downregüle veya overeksprese edildiği A549 hücrelerinde SMAD2/3 transkripsiyon kompleksinin aktivasyonu üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü. Ayrıca bu transkripsiyon kompleksinin TGF- $\beta$  ile indüklenen ve baskılanan gen ekspresyonlarında gerekli aracı transkripsiyon faktörü SMAD4 ekspresyonu üzerinde de SATB2'nin bir etkisinin olmadığı görüldü. Benzer sonuçlar Hcc193 ve PC3 hücrelerinde de görülmüştür. Özet olarak; tüm bu sonuçlar, SATB2'nin E-cadherin/N-cadherin değişimindeki etkisinin EMT sürecini yöneten Slug ve/veya Zeb1 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları üzerindeki baskılayıcı etkisinden kaynaklandığı görüşümüzü desteklemektedir.

SATB2'nin E-cadherin/N-cadherin değişiminin dışında diğer epitelyal belirteçler (Occludin, Claudin ve Zo1) üzerindeki etkilerini araştırdık. Beklentimiz üzere TGF- $\beta$ 'nin EMT sürecini başarılı bir şekilde indüklediği A549 hücrelerinde Occludin ve Claudin ekspresyonlarının baskılandığını, Fibronectin ve Vimentin ekspresyonlarının ise başarılı bir şekilde indüklendiği görüldü. Ancak TGF- $\beta$  muamelesinin A549 hücrelerinde epitelyal bir belirteç olan bir sıkı bağlantı proteini Zo1 ekspresyonunu, beklenilen aksine indüklediğini gördük. Ayrıca, hem SATB2'nin susturulduğu hem de aşırı ifade edildiği A549 hücrelerinde,

TGF- $\beta$ 'nin Zo1 üzerindeki etkisinin SATB2 tarafından negatif yönde etkilediğini de gösterdik. Zo1 proteinin tümör baskılayıcı rolünün yanısıra onkogenik rolünü gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Kleeff vd. 2001, Smalley vd. 2005). Hatta projemizde kullandığımız ana hücre dizisi olan A549 hücrelerinde TGF- $\beta$ 'nin bizim sonuçlarımızla paralel olarak Zo1 ekspresyonunu indüklediğini ve hücre migrasyonunu regüle ettiğini gösteren bir çalışma da mevcuttur (Lee vd. 2015). Bu nedenle bulgularımız literatür ile uyumludur. Bununla birlikte, SATB2'nin E-cadherin/N-cadherin haricindeki EMT belirteçleri üzerindeki etkilerini incelediğimizde, özellikle TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT sürecinde E-cadherin ile birlikte Occludin'in de SATB2 tarafından negatif olarak regüle edildiğini tespit ettik. Meme kanser hücre modelinde TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT sürecini araştıran bir çalışmada, Snail-Smad3/4 kompleksinin *E-cadherin*, *Occludin* ve diğer bir sıkı bağlantı proteinini kodlayan *CAR* geninin ekspresyonlarını promotor bölgelerine bağlanarak baskıladıkları gösterilmiştir (Vincent vd. 2009). Yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde, SATB2'nin de Snail-Smad2/3/4 kompleksinin gibi E-cadherin ve Occludin genlerini transkripsiyonel olarak baskılayıcı etkisini tespit ettik. Bu durum, SATB2'nin TGF- $\beta$ - Snail-Smad2/3/4- E-cadherin ve Occludin aks'ında rol alabileceğini gösteriyor. Bununla birlikte tüm hücrelerdeki bulguları birlikte ele aldığımızda SATB2'nin mezenkimal belirteçler (Fibronectin ve Vimentin) üzerindeki anlamlı ve tutarlı bir etkiye sahip olmadığını gözlemledik. Bu durum SATB2'nin, KHDAK EMT'sinde TGF- $\beta$  yolağının indükleyici aksiyonundan ziyade baskılayıcı aksiyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. SATB2'nin kromatinin sıkı paketlenmesini sağlayan ve ilgili kromatin bölgesinde bulunan genlerin transkripsiyonlarının baskılanması sürecinde görev alan histon deasetilaz-1 (HDAC1) gibi proteinler ile etkileştiği ve bu proteinlerin fonksiyonlarında da düzenleyici role sahip olduğu rapor edilmiştir (Britanova vd. 2008, Gyorgy vd. 2008). Bu bağlamda; SATB2'nin çeşitli HDAC proteinleri ve Snail-Smad2/3/4 transkripsiyon baskılayıcı komplekslerle etkileştiğini ve bunun neticesinde E-cadherin ve Occludin ekspresyonlarının baskılanması sürecinde engelleyici bir faktör olarak fonksiyon gösterdiğini düşünmekteyiz. A549 hücrelerinde E-cadherin ve Occludin ekspresyonlarının baskılanmasıyla doğrudan ilişkili olduğunu düşündüğümüz SATB2'nin, Hcc193 ve PC3 hücrelerinde de benzer etkiye sahip olduğu görülmüştür. Dolayısıyla SATB2'nin E-cadherin ve Occludin ekspresyonlarıyla olan negatif ilişkisini gösteren bulgularımız bu ilişkinin hücre spesifik olmadığını göstermektedir. Diğer taraftan Hcc193 ve PC3 hücrelerinde SATB2 baskılanması tarafından indüklenen E-cadherin inhibisyonunun TGF- $\beta$  uyarımıyla tersine döndüğü gözlenmiştir. TGF- $\beta$ , SMAD yolağının yanısıra Akt, p38, protein kinaz C (PKC) gibi SMAD-dışı yolları da aktive edebilmektedir (Chow vd. 2008, Massague 2012). Diğer taraftan hem bizim hem de Irie ve arkadaşları tarafından Akt aktivasyonunun EMT indüksiyonu için negatif bir unsur olabileceği de gösterilmiştir (Irie vd. 2005, Kucuksayan vd. 2017). Bu bilgilere dayanarak

TGF- $\beta$  tarafından aktive olan Akt ve PKC gibi yolakların, SATB2 susturulması ile indüklenen E-cadherin downregülasyonunu olumsuz yönde etkileyebileceğini düşünüyoruz. Ayrıca, SATB2 ile yüksek oranda homoloji gösteren ve aynı aileye mensup SATB1 proteinin, protein kinaz C ve Akt aracılığıyla regüle edildiği rapor edilmiştir (Pavan Kumar vd. 2006). Bu regülasyon SATB1'nin HDAC proteinleriyle olan etkileşimleriyle ve DNA'da ilgili genlerin promotor bölgelerine bağlanma yeteneğiyle ilişkilidir (Pavan Kumar vd. 2006). Sonuç olarak; bu tip bir mekanizmanın SATB2 için de geçerli olabileceğini ve TGF- $\beta$  tarafından aktive olan PKC ve Akt gibi kinazların, SATB2'nin HDAC ve diğer baskılayıcı komplekslerle olan etkileşimini sağlayarak E-cadherin downregülasyonunu inhibe etme potansiyelinin yüksek olduğu kanısındayız.

SATB2'nin KHDAK EMT'sindeki düzenleyici rolünün yanısıra KHDAK hücrelerinin invaziv kapasiteleri üzerindeki etkilerini de tespit ettik. Elde etmiş olduğumuz veriler doğrultusunda SATB2 ekspresyonunun baskılanmasının A549 ve Hcc193 hücre hatlarında invazyonu güçlü bir şekilde indüklediği görülmüştür. Ancak bu iki hücre arasındaki SATB2 inhibisyonu ile artan hücre invazyonunun A549 hücrelerinde kıyasla Hcc193 hücrelerinde daha kuvvetli olduğu görülmüştür. Hücre invazyonunun indüklenmesinde metalloproteazların (MMP) yanısıra N-cadherin, Vimentin ve Fibronectin gibi mezenkimal belirteçler önemli rol oynamaktadırlar. Western blot sonuçlarımızı incelediğimizde Hcc193 hücrelerinde SATB2 baskılanmasıyla indüklenen N-cadherin, Vimentin ve Fibronectin proteinlerindeki ekspresyon artışlarının, A549 hücrelerine kıyasla daha kuvvetli olduğu belirlenmiştir. SATB2'nin Hcc193 hücrelerinin invazyon kapasiteleri üzerindeki bu kuvvetli etkisini N-cadherin, Vimentin ve Fibronectin aracılığıyla gerçekleştirdiğini düşünüyoruz. Ayrıca her iki hücre de TGF- $\beta$  uyarımı invazyonu indeklerken, SATB2'nin baskılanması bu indüksiyonunun şiddetini artırdığı görülmüştür. Bunun altında yatan mekanizmanın, özellikle iki hücrede de ortak olarak gözlemlediğimiz N-cadherin üzerinden olduğu kanısındayız. Çünkü her iki hücrede de SATB2'nin baskılanması TGF- $\beta$  ile indüklenen N-cadherin ekspresyon artışını daha da artırmıştır. Bununla birlikte, SATB2 ekspresyonunun aşırı ifade edildiği A549 hücrelerindeki TGF- $\beta$  indüklü invazyon araştırılmıştır. SATB2'nin tek başına aşırı ifadesi hücre invazyonunu azaltsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak, TGF- $\beta$  ile indüklenen hücre invazyonunu çok güçlü etkiyle olmasa da istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe edebildiği görülmüştür. Western blot sonuçlarımıza baktığımızda yukarıda da ifade ettiğimiz mezenkimal belirteçlerdeki değişimler invazyon sonuçlarını açıklayamamaktadır. SATB2 aşırı ifadesinin hücre invazyonu üzerindeki etkisinin, mezenkimal belirteçler kadar hücre invazyonu üzerinde güçlü bir etkiye sahip olmayan E-cadherin ekspresyonu ile ilişkili olduğunu düşünüyoruz. Çünkü SATB2 aşırı ifadesi TGF- $\beta$  ile indüklenen N-cadherin, Vimentin ve Fibronectin

ekspresyon artışlarını inhibe etme de yetersiz olsa da E-cadherin downregülasyonunu inhibe edebilmiştir.

Projemizden elde etmiş olduğumuz veriler ile TGF- $\beta$  tarafından EMT sürecinin indüklendiği KHDAK hücrelerinde SATB2 ekspresyonunun baskılandığı, EMT'nin indüklenemediği KHDAK hücrelerinde ise SATB2 ekspresyonu baskılanmadığını tespit ettik ve KHDAK hücrelerinde TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT için SATB2 downregülasyonunu bir belirteç olarak literatürde ilk kez raporlandırık (Kucuksayan vd. 2016). Akabinde proje kapsamında, "KHDAK hücrelerinde TGF- $\beta$  ile indüklenen SATB2 downregülasyonunu hangi faktörler tarafından regüle edilmektedir" sorusunu moleküler mekanizmalarıyla aydınlatmayı amaçladık. Proje önerimizde de belirttiğimiz üzere, TGF- $\beta$  yolağı tarafından aktive olan çeşitli transkripsiyon faktörlerin SATB2'nin baskılanmasından sorumlu olabileceğini hipotez ettik ve biyoenformatik olarak olası mekanizmaları araştırdık. İncelemelerimiz neticesinde TGF- $\beta$  yolağında görev alan SMAD, CTCF ve Snail, Slug, Zeb1 gibi EMT indükleyici transkripsiyon faktörlerinin SATB2'nin promotorunda bağlanma bölgelerinin olduğunu tespit ettik. Öncelikle, A549 hücrelerinde bu transkripsiyon faktörlerin ekspresyonlarını baskılayarak TGF- $\beta$  aracılı SATB2 downregülasyonunun hangisinin veya hangilerinin sorumlu olduğunu belirlemeyi amaçladık. Bağımsız olarak üç kez tekrarladığımız deneyler neticesinde Snail ve Smad4 transkripsiyon faktörlerinin TGF- $\beta$  aracılı SATB2'nin downregülasyonundan sorumlu olduğunu tespit ettik. Bu transkripsiyon faktörleri hem birbirleriyle hem de transkripsiyonun baskılanmasından sorumlu DNA metiltransferaz ve HDAC gibi epigenetik faktörlerle de etkileşerek *SCARA5* ve *Cdh1* genlerin ekspresyonlarını baskılamakta görev almaktadırlar (De Herreros vd. 2010, Kucuksayan vd. 2017, Liu vd. 2013, Massague 2012). Bu bağlamda TGF- $\beta$  ile uyarılan A549 hücrelerinde Snail ve Smad4 transkripsiyon faktörlerinin SATB2 promotor bölgesine doğrudan bağlanarak ekspresyonunu regüle ettiğini ilk kez aydınlatmış olduk. TGF- $\beta$  aracılı Snail ve Smad4 proteinlerinin SATB2 promotorlarındaki bağlanma bölgelerinin ve enrichment değerlerinin birbirine yakınlığı, bu iki faktörün E-cadherin downregülasyonu sürecini birlikte yönetmesine benzer şekilde SATB2 downregülasyonu sürecini de birlikte yönettikleri kanısındayız.

Sonuç olarak; KHDAK hücrelerinde TGF- $\beta$  tarafından indüklenen EMT sürecinde Snail-Smad2/3/4 kompleksinin SATB2 ekspresyonunu doğrudan baskıladığı ve bunun sonucunda Snail-Smad2/3/4 kompleksinin E-cadherin, Occludin gibi epitel belirteçlerin ekspresyonlarını regüle etmesinde SATB2'nin negatif etkisini engellediği açıklanmıştır.

## KAYNAKLAR

- Aghdassi, A., M. Sendler, A. Guenther, J. Mayerle, C. O. Behn, C. D. Heidecke, H. Friess, M. Buchler, M. Evert, M. M. Lerch and F. U. Weiss 2012. "Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer", *Gut*, 61(3), 439-448.
- Bhowmick, N. A., E. G. Neilson and H. L. Moses 2004. "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression", *Nature*, 432(7015), 332-337.
- Bissell, M. J. and D. Radisky 2001. "Putting tumours in context", *Nat Rev Cancer*, 1(1), 46-54.
- Britanova, O., C. de Juan Romero, A. Cheung, K. Y. Kwan, M. Schwark, A. Gyorgy, T. Vogel, S. Akopov, M. Mitkovski, D. Agoston, N. Sestan, Z. Molnar and V. Tarabykin 2008. "Satb2 is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex", *Neuron*, 57(3), 378-392.
- Brown, K. E. 2003. "Chromatin folding and gene expression: new tools to reveal the spatial organization of genes", *Chromosome Res*, 11(5), 423-433.
- Chen, X. F., H. J. Zhang, H. B. Wang, J. Zhu, W. Y. Zhou, H. Zhang, M. C. Zhao, J. M. Su, W. Gao, L. Zhang, K. Fei, H. T. Zhang and H. Y. Wang 2012. "Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways", *Mol Biol Rep*, 39(4), 3549-3556.
- Chow, J. Y., H. Dong, K. T. Quach, P. N. Van Nguyen, K. Chen and J. M. Carethers 2008. "TGF-beta mediates PTEN suppression and cell motility through calcium-dependent PKC-alpha activation in pancreatic cancer cells", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294(4), G899-905.
- Coussens, L. M. and Z. Werb 2002. "Inflammation and cancer", *Nature*, 420(6917), 860-867.
- Dauphin, M., C. Barbe, S. Lemaire, B. Nawrocki-Raby, E. Lagonotte, G. Delepine, P. Birembaut, C. Gilles and M. Polette 2013. "Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas", *Lung Cancer*, 81(1), 117-122.
- De Herreros, A. G., S. Peiró, M. Nassour and P. Savagner 2010. "Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression", *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15(2), 135-147.
- de Laat, W. and F. Grosveld 2003. "Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub", *Chromosome Res*, 11(5), 447-459.
- Dobрева, G., M. Chahrouh, M. Dautzenberg, L. Chirivella, B. Kanzler, I. Farinas, G. Karsenty and R. Grosschedl 2006. "SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation", *Cell*, 125(5), 971-986.
- Dobрева, G., J. Dambacher and R. Grosschedl 2003. "SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression", *Genes Dev*, 17(24), 3048-3061.
- Freiman, R. N. and R. Tjian 2003. "Regulating the regulators: lysine modifications make their mark", *Cell*, 112(1), 11-17.
- Fry, C. J. and C. L. Peterson 2001. "Chromatin remodeling enzymes: who's on first?", *Curr Biol*, 11(5), R185-197.
- Gyorgy, A. B., M. Szemes, C. de Juan Romero, V. Tarabykin and D. V. Agoston 2008. "SATB2 interacts with chromatin-remodeling molecules in differentiating cortical neurons", *Eur J Neurosci*, 27(4), 865-873.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg 2000. "The hallmarks of cancer", *Cell*, 100(1), 57-70.
- Heldin, C. H., M. Vanlandewijck and A. Moustakas 2012. "Regulation of EMT by TGFbeta in cancer", *FEBS Lett*, 586(14), 1959-1970.
- Ho, L. and G. R. Crabtree 2010. "Chromatin remodelling during development", *Nature*, 463(7280), 474-484.

Irie, H. Y., R. V. Pearline, D. Grueneberg, M. Hsia, P. Ravichandran, N. Kothari, S. Natesan and J. S. Brugge 2005. "Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition", *J Cell Biol*, 171(6), 1023-1034.

Kalluri, R. and M. Zeisberg 2006. "Fibroblasts in cancer", *Nat Rev Cancer*, 6(5), 392-401.

Katsuno, Y., S. Lamouille and R. Derynck 2013. "TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression", *Curr Opin Oncol*, 25(1), 76-84.

Kleeff, J., X. Shi, H. P. Bode, K. Hoover, S. Shrikhande, P. J. Bryant, M. Korc, M. W. Buchler and H. Friess 2001. "Altered expression and localization of the tight junction protein ZO-1 in primary and metastatic pancreatic cancer", *Pancreas*, 23(3), 259-265.

Kucuksayan, H. and H. Akca 2017. "The crosstalk between p38 and Akt signaling pathways orchestrates EMT by regulating SATB2 expression in NSCLC cells", *Tumour Biol*, 39(9), 1010428317706212.

Kucuksayan, H., O. N. Ozes and H. Akca 2016. "Downregulation of SATB2 is critical for induction of epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of NSCLC cells", *Lung Cancer*, 98, 122-129.

Lee, S. H., A. R. Paek, K. Yoon, S. H. Kim, S. Y. Lee and H. J. You 2015. "Tight junction protein 1 is regulated by transforming growth factor-beta and contributes to cell motility in NSCLC cells", *BMB Rep*, 48(2), 115-120.

Lei, W., K. Zhang, X. Pan, Y. Hu, D. Wang, X. Yuan, G. Shu and J. Song 2010. "Histone deacetylase 1 is required for transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition", *Int J Biochem Cell Biol*, 42(9), 1489-1497.

Leoyklang, P., K. Suphapeetiporn, P. Siriwan, T. Desudchit, P. Chaowanapanja, W. A. Gahl and V. Shotelersuk 2007. "Heterozygous nonsense mutation SATB2 associated with cleft palate, osteoporosis, and cognitive defects", *Hum Mutat*, 28(7), 732-738.

Lin, Y., C. Dong and B. P. Zhou 2014. "Epigenetic regulation of EMT: the Snail story", *Curr Pharm Des*, 20(11), 1698-1705.

Liu, J., G. Hu, D. Chen, A. Y. Gong, G. S. Soori, T. J. Dobleman and X. M. Chen 2013. "Suppression of SCARA5 by Snail1 is essential for EMT-associated cell migration of A549 cells", *Oncogenesis*, 2, e73.

Mansour, M. A., E. Asano, T. Hyodo, K. A. Akter, M. Takahashi, M. Hamaguchi and T. Senga 2015. "Special AT-rich sequence-binding protein 2 suppresses invadopodia formation in HCT116 cells via palladin inhibition", *Exp Cell Res*, 332(1), 78-88.

Mansour, M. A., T. Hyodo, S. Ito, K. Kurita, T. Kokuryo, K. Uehara, M. Nagino, M. Takahashi, M. Hamaguchi and T. Senga 2015. "SATB2 suppresses the progression of colorectal cancer cells via inactivation of MEK5/ERK5 signaling", *FEBS J*, 282(8), 1394-1405.

Massague, J. 2012. "TGFbeta signalling in context", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(10), 616-630.

Moustakas, A. and C. H. Heldin 2012. "Induction of epithelial-mesenchymal transition by transforming growth factor beta", *Semin Cancer Biol*, 22(5-6), 446-454.

Mueller, M. M. and N. E. Fusenig 2004. "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer", *Nat Rev Cancer*, 4(11), 839-849.

Nawshad, A., D. Medici, C. C. Liu and E. D. Hay 2007. "TGFβ3 inhibits E-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex", *J Cell Sci*, 120(Pt 9), 1646-1653.

Orimo, A. and R. A. Weinberg 2006. "Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type", *Cell Cycle*, 5(15), 1597-1601.

Patani, N., W. Jiang, R. Mansel, R. Newbold and K. Mokbel 2009. "The mRNA expression of SATB1 and SATB2 in human breast cancer", *Cancer Cell Int*, 9, 18.

Pavan Kumar, P., P. K. Purbey, C. K. Sinha, D. Notani, A. Limaye, R. S. Jayani and S. Galande 2006. "Phosphorylation of SATB1, a global gene regulator, acts as a molecular switch regulating its transcriptional activity in vivo", *Mol Cell*, 22(2), 231-243.

Peinado, H., E. Ballestar, M. Esteller and A. Cano 2004. "Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex", *Mol Cell Biol*, 24(1), 306-319.



Polyak, K., I. Haviv and I. G. Campbell 2009. "Co-evolution of tumor cells and their microenvironment", *Trends Genet*, 25(1), 30-38.

Rodon, L., A. Gonzalez-Junca, M. Inda Mdel, A. Sala-Hojman, E. Martinez-Saez and J. Seoane 2014. "Active CREB1 promotes a malignant TGFbeta2 autocrine loop in glioblastoma", *Cancer Discov*, 4(10), 1230-1241.

Schubeler, D., C. Francastel, D. M. Cimborra, A. Reik, D. I. Martin and M. Groudine 2000. "Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus", *Genes Dev*, 14(8), 940-950.

Seong, B. K., J. Lau, T. Adderley, L. Kee, D. Chaukos, M. Pienkowska, D. Malkin, P. Thorner and M. S. Irwin 2015. "SATB2 enhances migration and invasion in osteosarcoma by regulating genes involved in cytoskeletal organization", *Oncogene*, 34(27), 3582-3592.

Shimoda, M., K. T. Mellody and A. Orimo 2010. "Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression", *Semin Cell Dev Biol*, 21(1), 19-25.

Smalley, K. S., P. Brafford, N. K. Haass, J. M. Brandner, E. Brown and M. Herlyn 2005. "Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion", *Am J Pathol*, 166(5), 1541-1554.

Spector, D. L. 2003. "The dynamics of chromosome organization and gene regulation", *Annu Rev Biochem*, 72, 573-608.

Szemes, M., A. Gyorgy, C. Paweletz, A. Dobi and D. V. Agoston 2006. "Isolation and characterization of SATB2, a novel AT-rich DNA binding protein expressed in development- and cell-specific manner in the rat brain", *Neurochem Res*, 31(2), 237-246.

Tania, M., M. A. Khan and J. Fu 2014. "Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer", *Tumour Biol*, 35(8), 7335-7342.

Thompson, E. W. and I. Haviv 2011. "The social aspects of EMT-MET plasticity", *Nat Med*, 17(9), 1048-1049.

Vincent, T., E. P. Neve, J. R. Johnson, A. Kukalev, F. Rojo, J. Albanell, K. Pietras, I. Virtanen, L. Philipson, P. L. Leopold, R. G. Crystal, A. G. de Herreros, A. Moustakas, R. F. Pettersson and J. Fuxe 2009. "A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition", *Nat Cell Biol*, 11(8), 943-950.

von Burstin, J., S. Eser, M. C. Paul, B. Seidler, M. Brandl, M. Messer, A. von Werder, A. Schmidt, J. Mages, P. Pagel, A. Schnieke, R. M. Schmid, G. Schneider and D. Saur 2009. "E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex", *Gastroenterology*, 137(1), 361-371, 371 e361-365.

Xiao, D. and J. He 2010. "Epithelial mesenchymal transition and lung cancer", *J Thorac Dis*, 2(3), 154-159.

Yang, M. H., J. Yu, N. Chen, X. Y. Wang, X. Y. Liu, S. Wang and Y. Q. Ding 2013. "Elevated microRNA-31 expression regulates colorectal cancer progression by repressing its target gene SATB2", *PLoS One*, 8(12).

Yang, M. H., J. Yu, D. M. Jiang, W. L. Li, S. Wang and Y. Q. Ding 2014. "microRNA-182 targets special AT-rich sequence-binding protein 2 to promote colorectal cancer proliferation and metastasis", *J Transl Med*, 12(109), 1479-5876.

Yu, W., Y. Ma, S. Shankar and R. K. Srivastava 2017. "SATB2/beta-catenin/TCF-LEF pathway induces cellular transformation by generating cancer stem cells in colorectal cancer", *Sci Rep*, 7(1), 10939.

Zhang, Y. and D. Reinberg 2001. "Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails", *Genes Dev*, 15(18), 2343-2360.

Zheng, H. and Y. Kang 2014. "Multilayer control of the EMT master regulators", *Oncogene*, 33(14), 1755-1763.

**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. HAKAN AKÇA
Proje No:	215Z283
Proje Başlığı:	Tgf- $\beta$ Aracılı Khdak Hücre Emt ve İnvazyonunda Satb2'nin Rolünün Moleküler Mekanizmalarıyla Araştırılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. TIP F. TEMEL TIP BİLİMLERİ B. TIBBİ BİYOLOJİ ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2016 - 15/04/2018
Onaylanan Bütçe:	494876.0
Harcanan Bütçe:	387686.26
Öz:	<p>Epitelden mezenkimale geçiş (EMT), kanser invazyonunun kilit olaylarından biridir. EMT'nin indüklenmesinden sorumlu birçok düzenleyici proteinin aydınlatılmasına rağmen altında yatan mekanizmalar hala belirsizdir. SATB2, osteoblastik farklılaşma ve yüz-kafatası oluşumuna katılan nükleer matriks ile ilişkili transkripsiyon faktörü ve epigenetik düzenleyicidir. Çeşitli miRNA'lar aracılığıyla SATB2'nin baskılanmasının kolorektal kanser hücrelerinde EMT sürecini indüklediği gösterilmesine rağmen SATB2'nin baskılanması ile ilişkili EMT'nin moleküler mekanizmaları henüz net olarak anlaşılamamıştır. Ayrıca, akciğer kanseri de dahil olmak üzere hiçbir kanser türünde; SATB2'nin, TGF-<math>\beta</math> gibi çeşitli EMT indükleyicileri tarafından düzenlenip düzenlenmediği hala bilinmemektedir. Güçlü bir EMT indikatörü olan TGF-<math>\beta</math>, akciğer kanser hücre EMT'sinde ve invazyonunda önemli rol oynamaktadır. Ön çalışmalarımızda, TGF-<math>\beta</math> ile muamele edilen KHDAK kanser hücrelerinde SATB2 ekspresyonunun baskılandığını ilk kez gösterdik. Ayrıca siRNA aracılı SATB2'nin susturulması, KHDAK hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunun baskılanmasına ve N-kaderin ekspresyonunun indüklenmesine neden oldu. Bu nedenle bulgularımız, SATB2 ekspresyonunun baskılanmasının KHDAK hücre EMT ve invazyonunda kritik bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada, TGF-<math>\beta</math> aracılı KHDAK hücre EMT ve invazyonunda SATB2'nin rolünü moleküler mekanizmalarıyla açıklamayı amaçladık.</p>
Anahtar Kelimeler:	NSCLC, SATB2, EMT, SMAD, TGF-beta
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	<ol style="list-style-type: none"><li>1- The crosstalk between p38 and Akt signaling pathways orchestrates EMT by regulating SATB2 expression in NSCLC cells (Makale - İndeksli Makale),</li><li>2- The crosstalk between p38 and Akt signaling pathways orchestrates EMT in NSCLC cells via regulation of SATB2 expression (Makale - İndeksli Makale),</li><li>3- Downregulation of SATB2 is critical for induction of epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of NSCLC cells (Makale - İndeksli Makale),</li></ol>