



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE TGF- $\beta$  İLE  
İNDÜKLENEN EMT VE İNVAZYONUNA SATB2'NİN  
ROLÜNÜN MOLEKÜLER MEKANİZMALARıyla  
ARAŞTIRILMASI

Hakan KÜÇÜKSAYAN

Ekim 2019  
DENİZLİ

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE TGF- $\beta$  İLE İNDÜKLENEN  
EMT VE İNVAZYONUNA SATB2'NİN ROLÜNÜN MOLEKÜLER  
MEKANİZMALARIYLA ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

**Hakan KÜÇÜKSAYAN**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan AKÇA

Denizli, 2019

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar" gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Tam metin/metinleri ekte sunulmuştur):

Ek-1. Kucuksayan, H., Ozes, O.N., and Akca, H. (2016). Downregulation of SATB2 is critical for induction of epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of NSCLC cells. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands) 98, 122-129.

Ek-2. Kucuksayan, H., and Akca, H. (2017). The crosstalk between p38 and Akt signaling pathways orchestrates EMT by regulating SATB2 expression in NSCLC cells. Tumor Biology 39, 1010428317706212.

Ek-3. Kucuksayan H, Akgun S, Ozes O N, Alikanoglu A S, Yildiz M, Dal E, Akca H. TGF-beta-SMAD-miR-520e axis regulates NSCLC metastasis through a TGFBR2-mediated negative feedback loop. Carcinogenesis 2018.

Ek-4. Akgun S, Kucuksayan H, Ozes O N, Can O, Alikanoglu A S, Yildiz M, Akca H. NF-kappaB-Induced Upregulation of miR-548as-3p Increases Invasion of NSCLC by Targeting PTEN. Anticancer Agents Med Chem 2019.

## DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Hakan KÜÇÜKSAYAN tarafından Prof. Dr. Hakan AKÇA yönetiminde hazırlanan "Akciğer kanseri hücrelerinde TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT ve invazyonuna SATB2'nin rolünün moleküler mekanizmalarıyla araştırılması" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR  
Pamukkale Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Hakan AKÇA  
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Arzu YAREN  
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Ali Nur Turgut ULUTİN  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

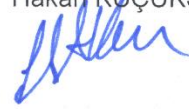
Üye: Prof. Dr. Mustafa AKKİPRİK  
Marmara Üniversitesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
25/10/2019 tarih ve 2019/33/14 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hakan AKÇA  
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Hakan KÜÇÜKSAYAN  
İmza :



## ÖZET

### AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE TGF- $\beta$ İLE İNDÜKLENEN EMT VE İNVAZYONUNA SATB2'NİN ROLÜNÜN MOLEKÜLER MEKANİZMALARıyla ARAŞTIRILMASI

Hakan KÜÇÜKSAYAN  
Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji AD  
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Hakan AKÇA

Ekim 2019, 146 Sayfa

Epitelden mezenkimale geçiş (EMT), kanser invazyonunun kilit olaylarından biridir. EMT'nin indüklenmesinden sorumlu birçok düzenleyici moleküllerin aydınlatılmasına rağmen altında yatan mekanizmalar hala belirsizdir. SATB2, osteoblastik farklılaşma ve yüz-kafatası oluşumuna katılan nükleer matriks ile ilişkili bir kromatin yeniden modelleyici ve transkripsiyon faktördür. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hücrelerinin TGF- $\beta$  tarafından indüklenen EMT ve invazyonunda SATB2'nin etkileri tam olarak 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 ve TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT sürecinde SATB2 ekspresyon kaybının önemli bir belirteç olduğunu gözledik. Akabinde, siRNA-aracılı SATB2 susturulmasının KHDAK hücrelerinde EMT ve invazyonu indüklemek için yeterli olduğunu ve bu süreçlerdeki TGF- $\beta$ 'nin indükleyici etkisini artırdığını gösterdik. Dahası, A549 hücrelerindeki SATB2'nin aşırı ifadesinin TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT ve invazyonu kısmi olarak inhibe ettiği gözlemlendi. Mekanistik olarak, SATB2'nin doğrudan SNAI2 ve ZEB1 gibi EMT düzenleyicilerinin regüle edebildiğini, fakat SMAD transkripsiyonel kompleksinin üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını tespit ettik. Bu, SATB2'nin SMAD yolağından bağımsız olarak SNAI2 ve ZEB1 transkripsiyon faktörlerini regüle ederek TGF- $\beta$ -aracılı EMT ve invazyona karıştığını göstermiştir. Ayrıca, TGF- $\beta$ 'nin SATB2 ekspresyonunu nasıl regüle ettiğini araştırdık ve biyoenformatik analizlerimiz aracılığıyla SATB2 promotorunun E-box, CTCF and SBE motiflerini içerdiğini bulduk. Daha sonra, TGF- $\beta$ -aracılı SATB2 baskılanmasından hangisinin sorumlu olduğunu tespit etmek için A549 hücrelerinde SNAI1, SNAI2, ZEB1, CTCF and SMAD4 ekspresyonlarını siRNA aracılı olarak baskıladık. SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin susturulmasının TGF- $\beta$ -aracılı SATB2 downregülasyonunu baskıladığını gösterdik. ChIP-PCR sonuçları, TGF- $\beta$  uyarımına yanıt olarak SATB2 ekspresyonunun, SNAI1 ve SMAD4 aracılığıyla transkripsiyonel olarak doğrudan düzenlendiğini doğrulamıştır. Ayrıca, KHAK hücrelerindeki SATB2 ekspresyonunun, KHDAK hücrelerine kıyasla dramatik bir şekilde yüksek seviyede olduğunu ve EGFR, CK7, NCAM1 ve ENO2 gibi akciğer kanserinde nöroendokrin fenotipin tespit edilmesinde kullanılan KHAK belirteçlerinin ekspresyonları ile anlamlı bir korelasyona sahip olduğunu bulduk. Mikroarray ve qPCR sonuçlarımız, SATB2'nin miR-1243 ve miR4779 ekspresyonları üzerinde baskılayıcı bir etkisinin olduğunu gösterdi. Sonuç olarak çalışmamız, SATB2'nin EMT, invazyon ve KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşma süreçlerini regüle ederek KHDAK karsinogenezinde kritik bir öneme sahip olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** SATB2, KHDAK, TGF- $\beta$ , EMT, invazyon ve nöroendokrin farklılaşma

**Bu çalışma, TÜBİTAK (Proje No: 215Z283) ve PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri**

**Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2017SABE004).**

**ABSTRACT****INVESTIGATION OF THE ROLE OF SATB2 WITH MOLECULAR MECHANISMS IN TGF- $\beta$ -INDUCED EMT AND INVASION IN LUNG CANCER CELLS**

KÜÇÜKSAYAN, Hakan  
PhD Thesis in Medical Biology  
Supervisor: Prof. Dr. Hakan AKÇA (PhD)

October 2019, 146 Pages

EMT (Epithelial–mesenchymal transition) is a key event in invasion of cancer. There are lots of regulator molecules responsible for induction of EMT, but underlying mechanisms are still unclear. SATB2 is a nuclear matrix-associated chromatin remodeling and transcription factor that is involved in osteoblastic differentiation and craniofacial patterning. It is completely 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 and observed that loss of SATB2 is a significant marker for TGF- $\beta$ -induced EMT process. Then, we demonstrated that siRNA-mediated knockdown of SATB2 is sufficient to induce EMT and invasion, and promotes the inducing effects of TGF- $\beta$  on EMT and invasion in NSCLC cells. Furthermore, it was observed that SATB2 overexpression slightly inhibited TGF- $\beta$ -induced EMT and invasion in A549 cells. Mechanistically, we established that SATB2 directly regulated EMT-mediating transcription factors SNAI2 and ZEB1 whereas it hadn't regulatory effect on SMAD transcriptional complex, indicating that SATB2 implicated in TGF- $\beta$ -induced EMT and invasion by regulating transcription factors such as SNAI2 and ZEB1 in SMAD pathway independent manner. We further investigated how TGF- $\beta$  regulates SATB2 expression and observed that SATB2 promoter contains E-box, CTCF and SBE motifs by bioinformatics analyses. Next, we knockdowned expressions of SNAI1, SNAI2, ZEB1, CTCF and SMAD4 to determine which one is responsible for TGF- $\beta$ -mediated SATB2 repression in A549 cells and showed that siRNA-mediated repressions of SNAI1 and SMAD4 abolished TGF- $\beta$ -mediated SATB2 downregulation. ChIP-PCR results verified that SATB2 is transcriptionally regulated by SNAI1 and SMAD4 in response to TGF- $\beta$ . Also, we found that SATB2 is dramatically upregulated in SCLC cells compared to NSCLC cells, and had a significant correlation with the expressions of SCLC markers such as EGFR, CK7, NCAM1 and ENO2, which are used to detect the neuroendocrine phenotype in lung cancer. Microarray and qPCR results showed that SATB2 has a repressive effect on miR-1243 and miR-4779 expression. Consequently, our study clearly indicated that SATB2 plays a crucial role for NSCLC carcinogenesis by regulating EMT, invasion and SCLC-like neuroendocrine differentiation.

**Keywords:** SATB2, NSCLC, TGF- $\beta$ , EMT, invasion, neuroendocrine differentiation

**This study was supported by TUBITAK (Project numbers: 215Z283) and Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project numbers: 2017SABE004).**

## TEŐEKKÖR

Beni öğrencisi olarak kabul ederek bu konuda çalışma olanağı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyip çalışmalarımız için tüm imkanlarını kullanan, bilimsel tecrübelerinden istifade ettiğim, eleŐtri ve fikirleri ile tezimin bu aŐamaya gelmesinde büyük emek veren, değerli hocam Prof. Dr. Hakan AKÇA'ya,

Tez çalıŐmam sırasında değerli zamanlarını ayırarak bilimsel katkı ve desteklerinden dolayı Prof Dr. Arzu YAREN ve Prof. Dr. A. Gaye TOMATIR'a

Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm saygıdeğer hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma,

Çalışma boyunca desteğini esirgemeyen Őakir AKGÖN'e ve laboratuvar arkadaşlarıma,

Tez projemin maddi desteğini sağlayan TÜBİTAK ve Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Beni maddi-manevi karŐılıksız olarak her koŐulda destekleyen ve yanımda olan aileme sonsuz teŐekkör ederim.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
TABLolar DİZİNİ .....	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Amaç .....	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI .....	3
2.1. Akciğer Kanseri .....	3
2.1.1. Epidemiyolojisi .....	3
2.1.2. Etiyolojisi .....	5
2.1.2.1. Tütün ve sigara tüketimi .....	5
2.1.2.2. Çevresel ve mesleksel faktörler .....	7
2.1.2.3. Enfeksiyon .....	7
2.1.2.4. Diyet .....	8
2.1.2.5. Genetik Faktörler .....	8
2.1.3. Histolojik Sınıflandırması .....	9
2.1.4. Evrelemesi .....	12
2.2. İnvazyon ve Metastaz .....	13
2.2.1. İnvazyon modelleri .....	14
2.2.1.1. Amipsi invazyon .....	14
2.2.1.2. Mezenkimal invazyon .....	15
2.2.1.3. Çoklu-hücre invazyon .....	15

2.2.1.4. Kolektif invazyon .....	16
2.2.1.5. Yayılmacı büyüme ile invazyon .....	16
2.3. Epitelyal-Mezenkimal Transisyon .....	18
2.3.1. Hücresel ve moleküler özellikleri .....	19
2.3.2. EMT indükleyici sinyal yolları.....	20
2.3.2.1. TGF- $\beta$ sinyal yolağı ve aktivasyonu .....	22
2.3.2.2. TGF- $\beta$ ile indüklenen EMT sürecinin moleküler mekanizması.....	23
2.3.3. Transkripsiyonel regülasyonu .....	24
2.3.4. Epigenetik regülasyonu.....	24
2.3.4.1. DNA Metilasyonu.....	25
2.3.4.2. Histon modifikasyonları .....	27
2.3.4.3. Kodlanmayan RNA'lar (ncRNA).....	29
2.3.5. Translasyonel ve translasyon sonrası regülasyonu .....	30
2.3.6. Akciğer kanseri ve EMT .....	33
2.4. Hücresel Plastisite.....	34
2.4.1. EMT-MET plastisitesi .....	34
2.4.2. Transdiferensiyon ve plastisite .....	36
2.5. Special AT-rich sequence-binding protein-2 (SATB2).....	39
2.5.1. Yapısı, regülasyonu ve fonksiyonları.....	39
2.5.2. Akciğer kanseri ve SATB2 .....	41
2.5.3. SATB2 ve EMT .....	41
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	44
3.1. Hücre Kültürü .....	44
3.2. Kullanılan Kimyasallar .....	44
3.3. SATB2'nin pcDNA3.1 Vektörüne Klonlanması.....	45
3.3.1. SATB2 insert'nün eldesi.....	45

3.3.2. SATB2 Insert ve pcDNA'nın Vektörünün XhoI Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi	46
3.3.3. pcDNA3.1 vektörünün alkalin fosfataz ile muamelesi	46
3.3.4. SATB2'nin pcDNA3.1 Vektörüne T4 DNA Ligaz Enzimi ile Klonlanması	48
3.3.5. SATB2 klonlanmış vektörü taşıyan koloninin tespiti	49
3.3.6. Plazmit DNA izolasyonu	50
3.4. Plazmit DNA ve siRNA transfeksiyonları	51
3.5. Western Blot	52
3.5.1. Protein izolasyonu	52
3.5.2. Protein miktarının belirlenmesi	53
3.5.3. SDS-PAGE için jelin dökülmesi, örneklerin yürütülmesi ve transferi	53
3.5.4. İmmunoblotlama	55
3.6. İmmunofloresans	56
3.7. miRNA ve mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Real-Time PCR ile Ölçümü	56
3.7.1. Total RNA izolasyonu	56
3.7.2. cDNA sentez reaksiyonları	57
3.7.2.1. miRNA için cDNA sentezi	57
3.7.2.2. mRNA için cDNA sentezi	58
3.7.3. Real-Time PCR	59
3.7.3.1. miRNA ekspresyon seviyelerin real-time PCR ile ölçümü	59
3.7.3.2. mRNA ekspresyon seviyelerin real-time PCR ile ölçümü	59
3.8. CHIP-PCR	60
3.9. Mikrodizin analizi (Microarray)	62
3.10. İnvazyon deneyi	62
3.11. Biyoinformatik araçların kullanımı	63
3.12. İstatistiksel Analiz	63
4. BULGULAR	64

4.1. TGF- $\beta$ indüklü EMT sürecinin SATB2 ekspresyonuna etkisi .....	64
4.2. SATB2'nin EMT sürecinin belirteçleri üzerindeki etkisi .....	65
4.3. SATB2'nin EMT süreci üzerindeki etkisinin moleküler temelini tespiti .....	69
4.4. SATB2'nin TGF- $\beta$ ile indüklenen KMDAK hücre invazyonu üzerindeki etkisi .....	70
4.5. TGF- $\beta$ indüklü SATB2 baskılanmasının olası moleküler mekanizmasının tespiti ...	72
4.6. SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin SATB2 ekspresyonu üzerindeki etkilerinin CHIP-PCR analizi ile teyit edilmesi .....	74
4.7. Küçük hücreli akciğer karsinomasında (KHAK) TGF- $\beta$ sinyal yolağı ve SATB2 arasındaki ilişkinin belirlenmesi .....	76
4.8. KHAK ve KMDAK hücrelerinin SATB2 profilleri.....	77
4.9. SATB2'nin KMDAK hücrelerinin KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşmalarındaki olası düzenleyici rolünün tespiti.....	79
4.10. Mikroarray .....	81
4.10.1. Mikroarray örneklerinin hazırlanması .....	82
4.10.2. Mikroarray analizinin genel hatlarıyla değerlendirilmesi.....	82
4.10.3. Mikroarray sonuçlarının filtrelenerek analizi .....	84
4.10.4. Mikroarray sonuçlarının Gen Set Zenginleştirme Analizi (GSEA) .....	85
4.10.5. Filtrelenen mikroarray sonuçlarının Real-Time PCR ile teyit edilmesi.....	86
4.10.6. SATB2 ile regüle edilen miR-1243 ve miR-4779'un olası hedeflerinin tespiti.	88
5. TARTIŞMA .....	90
6. SONUÇLAR.....	105
7. KAYNAKLAR .....	106
8. ÖZGEÇMİŞ .....	123
9. EKLER.....	124

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2-1 Türkiye genelindeki 2018 yılında beklenen erkek ve kadın bireylerdeki tahmini yeni vaka ve ölüm sayıları (WEB_1 2019) .....	4
Şekil 2-2 Akciğer kanserinin histolojik olarak basitleştirilmiş sınıflandırması.....	10
Şekil 2-3 Metastatik kaskatın şematik gösterimi (Massague vd. 2016).....	13
Şekil 2-4 İnvazyon modellerinin sınıflandırılması ve karakteristik özellikleri.....	17
Şekil 2-5 Farklı EMT modları ve onların proliferasyon, invazyon, plastisite, kök hücrelilik ve metastaz kapasitelerinin şematik olarak gösterilmesi (Chaffer vd. 2016, Pastushenko vd. 2019). .....	19
Şekil 2-6 EMT sürecinde meydana gelen hücresel ve moleküler değişimlerin şematik gösterimi (Skrypek vd. 2017). .....	20
Şekil 2-7 EMT sürecinin indüklenmesinden sorumlu çeşitli hücre içi sinyal yolları (Dongre vd. 2019).....	21
Şekil 2-8 TGF- $\beta$ 'nın kanonikal ve non-kanonikal sinyal iletimi (Lamouille vd. 2014). .....	22
Şekil 2-9 EMT sürecinin epigenetik regülasyonundan sorumlu mekanizmaların şematik gösterimi (Skrypek vd. 2017) .....	25
Şekil 2-10 EMT sürecinin yönetilmesinde kritik bazı metilasyon aracılı mekanizmalar (Skrypek vd. 2017).....	26
Şekil 2-11 EMT sürecinin yönetilmesinde rol alan çeşitli histon modifikasyon mekanizmaları (Skrypek vd. 2017).....	28
Şekil 2-12 miR-34 ve miR-200 üyesi miRNA'ların EMT-TF ve çeşitli kromatin modifiye edici faktörler ile olan etkileşimleri (Tam vd. 2013). .....	30
Şekil 2-13 SNAIL, bHLH ve ZEB grubu EMT-TF'lerin çeşitli modifikasyonlar aracılığıyla translasyon sonrası regülasyonları (Lamouille vd. 2014).....	32
Şekil 2-14 EMT-MET plastisitesinin metastazın oluşumundaki rolü (Chaffer vd. 2016). ...	35
Şekil 2-15 LKB1 gen kaybı KRAS-indüklü akciğer adenokarsinomaların skuamoz hücreli karsinomaya transformasyonunu yönetir (Zhang vd. 2017).....	37
Şekil 2-16 KHDAK hücrelerinin hücresel plastisite tarafından indüklenen KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşması ile kazanılan kemoterapiye direnç (Yuan vd. 2019). .....	38
Şekil 2-17 SATB1 ve SATB2 protein yapısının şematik gösterimi (Chen vd. 2019).....	40
Şekil 2-18 SATB proteinlerinin EMT sürecindeki dinamik düzenleyici etkisi (Naik vd. 2019). .....	42

Şekil 3-1 PCR yöntemi ile amplifiye edilen SATB2 cDNA'sının %0,75'lik agaroz jelde gösterilmesi. ....	45
Şekil 3-2 XhoI enzimi ile kesilmemiş ve kesilmiş pcDNA3.1 vektörünün %0,75 agaroz jelde görüntülenmesi. ....	46
Şekil 3-3 XhoI enzimi ile kesilmemiş vektör, XhoI enzimi ile kesilmiş ve alkalen fosfotaz ile muamele edilmiş vektör ve XhoI enzimi ile kesilmiş SATB2 insert'ünün %0,75 agaroz jelde görüntülenmesi. ....	47
Şekil 3-4 SATB2 ile klonlanan pcDNA3.1 vektörü ile transforme edilmiş DH5 $\alpha$ bakterilerinin amfisilin içeren Agar LB besiyerinde kültürü ve oluşan kolonilerinin görüntüsü. ....	49
Şekil 3-5 Ligasyon sonucu hangi koloninin SATB2 klonlanmış vektörü taşıdığına tespiti. ....	49
Şekil 3-6 Optimum DNA fragmentasyonu elde etmek için 2.5, 5 ve 10 dakika enzim ile muamele ederek gerçekleştirilen agaroz jel analizi. ....	61
Şekil 4-1 TGF- $\beta$ ile 24 saat inkübe edilen A549, H1299, PC3, H1-18, Hcc78, Hcc193, MDA-MB-231 ve MG-63 hücre hatlarındaki E-kaderin ve SATB2 ekspresyonlarındaki değişimlerin Western blot analizi ile tespit edilmesi. ....	64
Şekil 4-2 SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerindeki TGF- $\beta$ uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin immunofloresans boyama analizi ile gösterilmesi. ....	66
Şekil 4-3 SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerindeki TGF- $\beta$ uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin Western blot analizi ile gösterilmesi. ....	67
Şekil 4-4 pcDNA3.1-SATB2 vektörü transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerindeki TGF- $\beta$ uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin immunofloresans boyama analizi ile gösterilmesi. ....	68
Şekil 4-5 pcDNA3.1-SATB2 vektörü transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerindeki TGF- $\beta$ uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin Western blot analizi ile gösterilmesi. ....	69
Şekil 4-6 SATB2'nin TGF- $\beta$ 'nin kanonik sinyal yolağı ve EMT-TF'ler üzerindeki olası düzenleyici etkilerinin Western blot analizi ile gösterilmesi. ....	70
Şekil 4-7 SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının hücre invazyonu üzerindeki etkisi. *P <0.05. ....	71
Şekil 4-8 pcDNA3.1-SATB2 transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının hücre invazyonu üzerindeki etkisi. *P <0.05. ....	72
Şekil 4-9 SMAD4, CTCF, SNAI1, SNAI2 ve ZEB1 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının SMAD4, CTCF, SNAI1, SNAI2 ve ZEB1 ifadeleri üzerindeki etkisinin Western blot analizi ile gösterimi. ....	73

Şekil 4-10 SMAD4, CTCF, SNAI1, SNAI2 ve ZEB1 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$ uyarımının SATB2 ifadesi üzerindeki etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.....	74
Şekil 4-11 SATB2 promotor bölgesi üzerindeki SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin şematik olarak gösterimi. ....	75
Şekil 4-12 SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin SATB2 promotoruna bağlanmasının ChIP-PCR yöntemi ile tespit edilmesi. ....	75
Şekil 4-13 TGF- $\beta$ ile 2 saat süresince inkübe edilmiş A549, H1703, H1299, H82, H209 ve N417 hücre hatlarındaki p-Smad2/3 ve Smad2/3 seviyelerinin Western blot ile belirlenmesi. ....	76
Şekil 4-14 SMAD2/3, SMAD4, SNAI1 ve Kontrol siRNA ile transfekte edilmiş N417 hücresinin TGF- $\beta$ ile 24 saat süre inkübasyonu sonucunda SATB2 ekspresyon değişimlerin qPCR yöntemi ile tespit edilmesi. *P <0.05. ....	77
Şekil 4-15 TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD7 ve SATB2'nin, KHDAK ve KHAK akciğer kanser alt gruplarındaki ekspresyonlarının heatmap ile profillendirilmesi.....	78
Şekil 4-16 Normal kültür şartlarındaki KHDAK hücre hatlarındaki (H1299, A549, H1703, H1975, PC-9 ve H1650) ve KHAK (H82, H209 ve N417) hücre hatlarındaki SATB2 protein seviyelerinin Western blot analizi ile tespit edilmesi. ....	79
Şekil 4-17 187 adet KHDAK ve KHAK hücre hatlarındaki NCAM1, NSE, EGFR ve CK7 mRNA seviyelerinin SATB2 mRNA seviyesi ile aralarındaki ilişkilerin regresyon analizi ile tespit edilmesi.....	80
Şekil 4-18 SATB2'nin aşırı ifade edildiği NCI-H1299 hücre gruplarında EGFR ve CK7 ekspresyonlarındaki değişimlerin qPCR ile tespit edilmesi. *P <0.05. ....	81
Şekil 4-19 H1299 hücrelerinde SATB2 ekzojen ekspresyonunun ve N417 hücrelerinde SATB2'nin baskılanmasının Western Blot ve qPCR yöntemleri ile teyit edilmesi. **P < 0.01. ....	82
Şekil 4-20 SATB2'nin baskılandığı N417 ve aşırı ifade edildiği H1299 hücre gruplarındaki gen ekspresyon değişim profillerinin heatmap ile genel gösterimi. ....	83
Şekil 4-21 SATB2'nin baskılandığı N417 ve aşırı ifade edildiği H1299 hücre gruplarında  FC >=1,5 veya >=2 değerlerine göre ekspresyonun arttığı/azaldığı tespit edilen gen sayıları.....	84
Şekil 4-22 SATB2'nin baskılandığı N417 ve aşırı ifade edildiği H1299 hücre gruplarında anlamlı değişimi gözlenen ve filtrelenen genlerin heatmap ile gösterilmesi. ....	85

Şekil 4-23 SATB2'nin baskılandığı N417 ve aşırı ifade edildiği H1299 hücre gruplarında değişimi gözlenen genlerin rol aldığı moleküler mekanizmaların GSEA analizi ile tespit edilmesi. ....	86
Şekil 4-24 SATB2'nin baskılandığı N417 ve SATB2'nin aşırı ifade edildiği H1299 hücre gruplarındaki miRNA'ların ekspresyonlarındaki değişimlerin qPCR yöntemi ile tespit edilmesi. *P <0.05 ve **P < 0.01. ....	87
Şekil 4-25 Normal kültür şartlarındaki H1299 ve N417 hücrelerindeki SATB2, miR-1243 ve miR-4779 ekspresyon seviyelerinin qPCR yöntemi ile tespit edilmesi. *P <0.05 ve **P < 0.01. ....	88
Şekil 4-26 miR-1243 ve miR-4779 genlerinin tahmini hedeflerine dayalı "gene enrichment" analiz sonuçları. ....	89
Şekil 5-1 SATB2'nin TGF- $\beta$ indüklü EMT sürecindeki regülasyonu ve rolünün gösterilmesi. ....	96
Şekil 5-2 Bulgularımız doğrultusunda ortaya çıkan KHDAK ve KHAK hücre profillerinin şematik özet olarak gösterilmesi. ....	104



**TABLolar DİZİNİ**

Tablo 2-1 Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılındaki son güncellemesi ile oluşturulan akciğer kanserinin detaylı histopatolojik sınıflandırılması.....	11
Tablo 2-2 Akciğer Kanseri Çalışma Derneği'nin (IASLC) 2017 yılındaki son güncellemesi oluşturulan 8. TNM evreleme sistemi .....	12
Tablo 3-1 Separating (Ayrıştırma) ve Stacking (Yükleme) jel formülasyonları. ....	54
Tablo 3-2 miRNA için cDNA reaksiyon koşulları ve formülasyonu.....	58
Tablo 3-3 mRNA için cDNA reaksiyon koşulları ve formülasyonu. ....	58
Tablo 3-4 miRNA için Real-Time PCR şartları ve bileşenlerin miktarları. ....	59
Tablo 3-5. Tez çalışması boyunca kullanılan mRNA Real-time PCR primerleri.....	60
Tablo 3-6 ChIP-PCR için kullanılan primerler listesi .....	62
Tablo 4-1 SATB2 promotorunda bağlanma bölgesi bulunan transkripsiyon faktörlerinin Transfac (Biobase) analiz sonuçları.....	73
Tablo 4-2 miR-1243 ve miR-4779'un ilgili sinyal yollarındaki tahmini hedef genleri. ....	89

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS.....	Amonyum Persülfat
ASCL1.....	Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1
BHLH.....	Basic helix-loop-helix
BSA.....	Dana Serum Albumin
cDNA.....	Komplementer DNA
CDH1.....	Cadherin 1, E-cadherin
CDH2.....	Cadherin 2, E-cadherin
ChIP.....	Chromatin Immunoprecipitation
CK7.....	Cytokeratin 7
CTCF.....	CCCTC-Binding Factor
DNMT.....	DNA (cytosine-5)-methyltransferase
ECL.....	Enhanced Chemiluminescence
ECM.....	Ekstraselüler Matriks
EGF.....	Epidermal Growth Factor
EGFR.....	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFR-TKI.....	Epidermal Growth Factor Receptor- tyrosine kinase inhibitor
EMT.....	Epitelyal-Mezenkimal Transisyon
EMT-TF.....	EMT-ilişkili transkripsiyon faktörler
ENO2.....	Enolase 2
ERK.....	Extracellular Signal-regulated Kinase
FAK.....	Fokal Adezyon Kinaz
FBS.....	Fetal Dana Serumu
GABA.....	Gama-aminobütirik asit
GSEA.....	Gene Set Enrichment Analysis
HDAC.....	Histone deacetylase
HRP.....	Horseradish Peroksidaz
IARC.....	Uluslararası kanser araştırma kurumu
IASLC.....	Akciğer Kanseri Çalışma Derneği
IRES.....	Internal ribosome entry site
KHAK.....	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK.....	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
KRAS.....	GTP-ase Kirsten rat sarcoma virüs
lncRNA.....	long non-coding RNA
LSD1.....	Lysine Demethylase 1A
MAPK.....	Mitogen-activated Protein Kinase
MET.....	Mezenkimal-epitelyal transisyon
miRNA.....	mikroRNA
ml.....	Mililitre
mM.....	Milimolar
MMP2.....	Matrix Metalloproteinase 2
mRNA.....	Mesajcı RNA
nAChR.....	Nikotinik asetilkolin reseptör

NF-Kb.....	Nuclear factor-kappa B
nM.....	Nanomolar
NCAM1.....	Neural Cell Adhesion Molecule 1
NEUROD1.....	Neurogenic Differentiation Factor 1
NNK.....	Nitrozaminketon
PAK1.....	p21 activated kinase 1
PAR6.....	Partitioning defective 6
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
PI3K.....	Fosfotidilinozitol 3 Kinaz
PRC1.....	Polycomb repressive complex 1
PRC2.....	Polycomb repressive complex 2
PTEN.....	Phosphatase And Tensin Homolog
PVDF.....	Poliviniliden diflorid
RTK.....	Reseptör Tirozin Kinaz
SATB1.....	Special AT-rich sequence-binding protein 1
SATB2.....	Special AT-rich sequence-binding protein 2
SBE.....	SMAD-binding element
SDS.....	Sodyum Dodesil Sülfat
siRNA.....	Small interfering RNA
SMAD.....	SMA- And MAD-Related Protein
SMURF1.....	E3 ubiquitin ligase SMAD ubiquitylation regulatory factor 1
SNAI1.....	Snail Family Transcriptional Repressor 1
SNAI2.....	Snail Family Transcriptional Repressor 2
Sox-2.....	SRY (sex determining region Y)-box 2
STAT.....	Signal transducer and activator of transcription
TCGA.....	The Cancer Genome Atlas
TGF- $\beta$ .....	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TGF $\beta$ R1.....	TGF- $\beta$ receptor type 1
TGF $\beta$ R2.....	TGF- $\beta$ receptor type 2
TNF- $\alpha$ .....	Tumor Necrosis Factor-Alpha
TSNA.....	Tütün-spesifik N-nitrozamine
TTF-1.....	Thyroid transcription factor 1
TWIST1.....	Twist Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 1
TWIST2.....	Twist Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 2
$\mu$ l.....	Mikrolitre
$\mu$ g.....	Mikrogram
ZEB1.....	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
ZEB2.....	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2
ZO-1.....	Zona occludens-1

## 1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, yüksek insidansa, metastaz yeteneğine ve tekrarlama riskine sahip olması bakımından hem en agresif kanser türü özelliğini taşımakta, hem de kanser ilişkili ölümlerin en yaygın nedeni konumundadır. İki büyük histolojik alt türünden biri olan küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK), tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık olarak %85'ini temsil etmektedir. KHDAK hücrelerine yüksek metastatik kapasite özelliğini veren ve hastalığın tekrarlaması ile ilişkili tedaviye karşı direnç kazandıran mekanizmalarının tüm yönleriyle aydınlatılması, akciğer kanseriyle mücadelede büyük önem arz etmektedir.

*In vitro* ve *in vivo* koşullarda gerçekleştirilen sayısız çalışmalarla, TGF- $\beta$  sinyal yolağının KHDAK dahil olmak üzere neredeyse tüm kanser türlerinin proliferasyonu, apoptozu, EMT, invazyonu, immün sistemden kaçışı, kemoterapi ve immünoterapiye karşı gelişen direnç gibi birçok biyolojik süreçte merkezi bir rol üstlendiği kanıtlanmıştır. Bununla birlikte TGF- $\beta$  sinyal yolağında gerek düzenleyici gerekse de fonksiyonel role sahip çeşitli moleküllerin (TGFB2, SMAD3, SMAD4 ve SMAD7 vb) KHDAK hasta örneklerinde sıklıkla genetik ve epigenetik olarak regülasyonlarında bozukluk saptanmaktadır. TGF- $\beta$  sinyal yolağı, adenokarsinomaların metastazları için kritik önemdeki kanser hücrelerinin primer tümör bölgesinden invazyon ile ayrılmasına olanak sağlayan Epiteyal-Mezenkimal Transisyon (EMT) sürecinin indüklenmesi ve sekonder bölgede makrometastatik lezyonların oluşturulması için de tam tersi bir mekanizma ile Mezenkimal-Epiteyal Transisyon (MET) sürecinin tetiklenmesinde büyük rol oynamaktadır.

EMT-MET süreçlerinin regülasyonları metastatik kaskat boyunca oldukça dinamiktir ve epigenomda büyük değişimlerin gerçekleşmesini gerektirmektedir. Kanser hücrelerine fenotipik olarak plastisite özelliğini kazandıran bu dinamikliğin korunması ve büyük çaplı gen ekspresyon profilindeki değişimlerin regülasyonunda, kromatin yeniden modelleme proteinleri kritik rol almaktadır. Bu bağlamda hücrel plastisitenin en belirgin şekilde fonksiyon gösterdiği gelişim ve farklılaşma süreçlerindeki düzenleyici rolleri nedeniyle bir kromatin yeniden modelleme elemanı ve transkripsiyon faktörü olan SATB2'nin, hem metastaz için kritik bir öneme sahip Epiteyal-Mezenkimal Plastisite'de (EMP) hem de kanser hücreleri tarafından bir çeşit tedaviye karşı direnç mekanizması olarak kullanılan plastisite indüklü transdiferensiyon süreçlerinde düzenleyici role sahip olacağını öngörmekteyiz.

## 1.1. Amaç

Bu tez ile, KHDAK karsinogenezi ve metastazı için gerekli olan TGF- $\beta$  sinyal yolağı tarafından indüklenen EMT ve invazyon süreçlerinde, hem SATB2'nin düzenleyici rolünü aydınlatmaya hem de SATB2 ekspresyonunun nasıl düzenlendiği sorularına yanıt bulmanın yanısıra KHDAK hücrelerinin bir direnç mekanizması olarak kullandığı KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşması sürecindeki potansiyel rolünü ortaya çıkarmayı da amaçladık.



## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Akciğer Kanseri

#### 2.1.1. Epidemiyolojisi

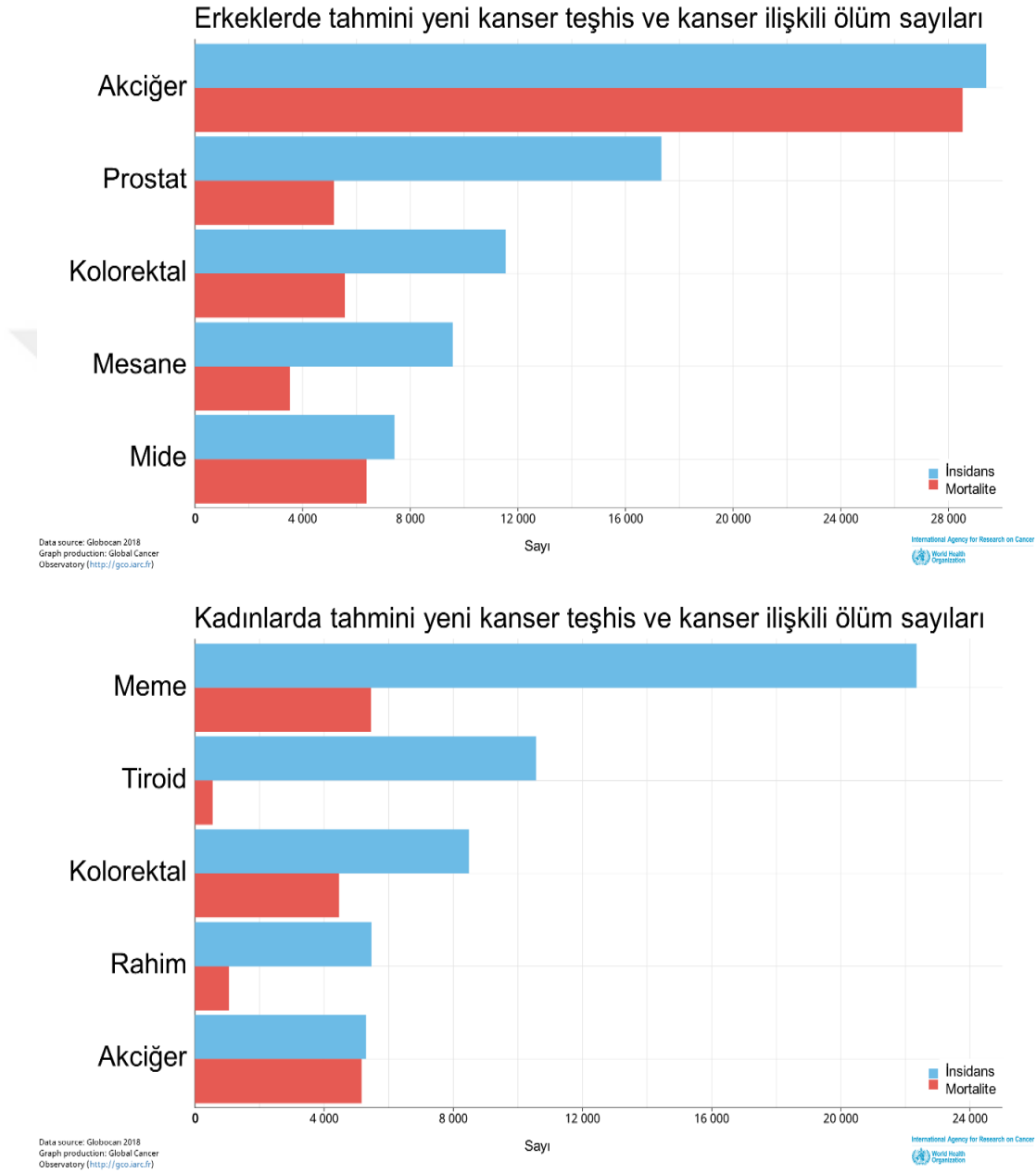
Akciğer kanseri, son yüzyılda nadir görülen ve bilinmeyen bir hastalık konumundan, dünyada en yaygın görülen ve kansere bağlı ölümlerin en büyük etmeni olan bir hastalık konumuna erişmiştir (de Groot vd. 2018, Debakey 1999). Adler tarafından, 1912 yılında sadece 374 adet akciğer vakası yayınlamıştır (Rubin 1991). Günümüze geldiğimizde ise 2008'de yayınlanan verilere göre, dünya çapında 1,6 milyon yeni vaka ve aynı yıl için 1,4 milyon kişinin akciğer kanseri nedeniyle ölümü rapor edilmiştir (Ferlay vd. 2010). Uluslararası kanser araştırma kurumu (IARC) tarafından 2012 yılında yayınlanan dünya çapındaki en güncel istatistiklerine göre, yeni vaka sayısının 1,8 milyon ve aynı yıl için akciğer kanseri ilişkili ölümlerin de 1,6 milyon olduğu rapor edilmiştir (Ferlay vd. 2015).

Dünya genelinde akciğer kanseri insidansı erkekler ve kadınlar için değişiklik gösterebilmekte ve bu değişkenliğin temeli, coğrafi bölgelerdeki hava kirliliğine ve sigara tüketiminin yaygınlığına bağlı olarak tarihsel, kültürel ve bölgesel farklılıklara dayanmaktadır (de Groot vd. 2018, Ferlay vd. 2015). Bunun yanısıra bazı coğrafi bölgelerdeki popülasyonlardaki gen varyasyonlarındaki farklılıklar da insidansı etkileyen önemli etmenler arasındadır (Herbst vd. 2008, Schwartz vd. 2016).

Uluslararası kanser araştırma kurumu tarafından yayınlanan verilere göre ülkemizde 2018 yılı itibarıyla 210,537 (118,882 Erkek, 91,655 Kadın) yeni kanser olgusu (malign melanom dışı deri kanserleri hariç) tanı alacağı tahmin edilmiştir (Şekil 2.1). Aynı verilere dayanarak erkeklerde akciğer kanserin 29,405/28,525; prostat kanserin 17,332/5,165; kolorektal kanserin 11,548/5,571; mesane 9,578/3,532 ve mide kanserinin ise 7,414/6,376 sırasıyla tahmini yeni vaka/ölüm sayısına sahip olacağı tahmin edilmiştir. Bu rakamlar ile erkek bireyler için hem insidans hem de mortalite bakımından akciğer kanserinin tüm kanserler arasında ilk sırada olduğu görülmektedir. Kadınlarda ise meme kanserin 22,345/5,452; tiroid kanserin 10,563/548; kolor

ektal kanserin 8,483/4,462; rahim kanserin 5,463/1,051 ve akciğer kanserinin ise 5,298/5,158 sırasıyla tahmini yeni vaka/ölüm sayısına sahip olacağı tahmin edilmiştir. Kadınlarda erkeklerden farklı olarak insidans açısından akciğer kanserinin beşinci sırada

olduğu, ancak mortalite bakımından meme kanserinin ardından çok az bir farkla ikinci sırada olduğu görülmektedir (WEB\_1 2019).



**Şekil 2-1** Türkiye genelindeki 2018 yılında beklenen erkek ve kadın bireylerdeki tahmini yeni vaka ve ölüm sayıları (WEB\_1 2019)

## 2.1.2. Etiyolojisi

Akciğer kanserinin oluşumunda başta sigara kullanımı olmak üzere çevresel, mesleki, genetik ve yaşam tarzı gibi birçok faktör sorumlu olabilmektedir. Akciğer kanseri insidansının ve ölümlerinin azaltılmasına yönelik çalışmaların başarıya ulaşabilmesi için, akciğer kanserinin oluşum nedenleri ve risk faktörlerinin tüm detaylarıyla tespit edilmesi ve gerekli önlemlerin alınması gereklidir.

### 2.1.2.1. Tütün ve sigara tüketimi

Sigara ve tütün ürünlerinin bağımlılık yapıcı bileşeni olan nikotin, asetilkolin antagonisti olarak fonksiyon gösteren doğal bir alkaloiddir ve sinir sistemi hücrelerindeki nikotinik asetilkolin reseptörlerine (nAChR) bağlanarak dopamin, serotonin, nöroepinefrin, endorfin ve gama-aminobütirik asit (GABA) gibi nörotransmitterlerin salınımına neden olmaktadır. Aslında nikotin bir kanserojen bir madde değildir, fakat, nikotine maruz kalan hücrelerde nikotinik reseptörlerin ifadesi artmakta, buna bağlı olarak da nikotin bağımlılığını destekleyecek ve akciğer karsinogeneziyle ilişkili gen ekspresyon değişimleri gerçekleşmektedir (Benowitz 2008, Costa vd. 2009, Saccone vd. 2007).

Sigara en azından bilinen 60 kanserojen içermektedir. Bunların en önemlileri, benzopiren, nitratları içine alan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), 4-(dimetilnitrozamin)-1-(3-piridil-1-bütanol) veya nikotin kökenli nitrozaminketon (NNK) gibi tütün-spesifik N-nitrozamine (TSNA) ve bileşikleridir (Hecht 1998, Hoffmann vd. 1997). Sigara dumanı gaz faza ve partikül faza sahiptir ve bu fazlar sırasıyla gram başına 1015 ve 1017 serbest radikaller içermektedir (Costa vd. 2009). On yıllardır sigara içeriğindeki katran ve benzopiren miktarları azaltılmaktadır, ancak sigaranın zararlarının azaltılması adına atılan bu adımların sigaranın daha güvenli olduğuna dair hiçbir kanıt bulunmamaktadır (Thun vd. 2001). Bununla birlikte, 1978 yılından itibaren tütün-spesifik N-nitrozamine (TSNA) ve nitratların sigaradaki konsantrasyonları artırılmaktadır (Hoffmann vd. 1997). *In vivo* olarak yapılan çalışmalar sonucunda nikotin kökenli nitrozaminketon (NNK) ve N'-nitrozonornikotin (NNN) bileşiklerinin güçlü kanserojenler olduğunu ortaya koyulmuş ve Uluslararası kanser araştırma kurumu (IARC) tarafından da insanlar için kanserojen maddeler sınıfında değerlendirilmiştir (Hecht 2014). Ayrıca, güçlü kanserojenler olarak değerlendirilen NNN,



NNK ve NNK metaboliti olan NNAL bileşiklerinin, sigara kullananların yanısıra pasif içici insanların idrar örneklerinde bile bulunduğu rapor edilmiştir (Hecht 2014).

Sigara tüketimi ile ilişkili karsinogenez; sigara içeriğindeki kanserojenik bileşiklerin, hücrelerde meydana getirdikleri genotoksik etkiler ve kanserleşme sürecini destekleyici sinyal yolak aktivasyonlarının tetiklenmesi olmak üzere iki temel esasa dayanmaktadır (Xue vd. 2014). NNK gibi kanserojenlerin DNA'ya bağlanarak DNA eklentilerini oluşturmaları ve yine sigara dumanında bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAHs) gibi kanserojenik kimyasalların bu oluşan DNA eklentilerine kovalent olarak bağlanmasına dayanmaktadır (Dela Cruz vd. 2011). Hücrel DNA tamir ve kontrol mekanizmaları oluşan DNA eklentilerini tamir ederek DNA molekülünü eski haline geri getirebilmektedir veya bu hasarlı DNA'lara sahip hücreleri apoptotik mekanizmalar aracılığıyla ölüme yönlendirebilmektedir. Ancak, bu DNA eklentilerini ortadan kaldıracak olan tamir mekanizmalarındaki başarısızlıklar, hücreleri kanserleşme sürecine götüren DNA molekülündeki kalıcı mutasyonlara yol açabilmektedir.

Sigara ile ilişkili karsinogenezde, genotoksik olmayan onkogenik yolakların aktivasyonu da önemli bir yer tutmaktadır. Sigarada bulunan ve doğal bir alkaloid olan nikotinin hücrede nikotinic asetilkolin reseptörlerine (nAChR) bağlanması sonucu anjiyogenez, kanser hücrelerinin çoğalması, migrasyonları ve invazyonlarını artıran *Phosphoinositide 3-kinase/ Protein Kinase B* (PI3K/AKT), *Extracellular Signal-regulated Kinase* (ERK) 1/2, *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK), *Mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK), *nuclear factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B),  *$\beta$ -arrestin-1*, Src kinaz ve Rb-Raf-1 gibi sinyal yolaklarını aktive ederek kanser progresyonunu desteklediği rapor edilmiştir (Grando 2014, Imabayashi vd. 2019, Schaal vd. 2014, Xue vd. 2014). Bir nikotin türevi olan NNK'ların da tümör genezi destekleyici gen değişimlerine yol açan bir dizi sinyal yolaklarını da aktive edebilmektedir (Akopyan vd. 2006, Dela Cruz vd. 2011). Bu bağlamda NNK'nın, ERK1/2 sinyal yolağı bağımlı  $\mu$ -calpains (kalpin I) ve m-calpains (kalpin II) proteinlerinin fosforilasyonları aracılığıyla hem küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) hem de küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hücrelerinde invazyonu artırabildiği gösterilmiştir (Xu vd. 2004).

### 2.1.2.2. Çevresel ve mesleksel faktörler

1920'lerin başlarında hava kirliliğinin, akciğer kanseri için potansiyel bir risk faktörü olarak değerlendirilmesi önerilmiştir (de Groot vd. 2018). Bu durumun sebebi, giderek gelişen endüstrileşmeden kaynaklanan petrol ve türevi fosil yakıtların kullanımı sonucu PAH (polisiklik aromatik hidrokarbonlar) ve kükürt dioksit gibi kanserojen maddelerin havadaki miktarlarının aşırı artmasıdır (Alberg vd. 2013, de Groot vd. 2018). Bu maddelere uzun süre maruz kalmayı gerektiren mesleklerde akciğer kanseri riskinin arttığı belirtilmektedir. Örneğin, kamyon taşımacılığı endüstrisinde çalışan bireylerde akciğer kanserine yakalanma riskinin %50 oranında arttığı rapor edilmiştir (Dela Cruz vd. 2011).

Özellikle Asya kıtasının bazı bölümlerindeki toplumlarda ısınma ve yemek pişirme amacıyla kullanılan yumuşak kömür, odun ve diğer bitki bazlı biyoyakıtlar gibi işlenmemiş yakıtların kullanılmasından kaynaklanan ev-içi hava kirliliğinin akciğer kanseri riskini artırdığı belirtilmektedir (Alberg vd. 2013, Lee vd. 2011, Torok vd. 2011). Bir çalışma ise bu yakıtların kullanıldığı ortamların uygun şekilde havalandırılmasının, akciğer kanseri riskini %50 oranında azaltabileceğini göstermiştir (Alberg vd. 2013).

Akciğer kanseri ile yakından ilişkili ve risk faktörü olarak değerlendirilen çeşitli meslek grupları bulunmaktadır. Bu meslek gruplarında çalışan bireylerde IACR tarafından kanserojen olarak belirtilen arsenik, asbest, berilyum, kadmiyum, klorometil eterler, krom, nikel, radon, silika ve vinil klorürü gibi maddelere maruziyet gerçekleşmektedir (Dela Cruz vd. 2011). Dünya genelinde bu maddelere maruziyetten kaynaklanan akciğer kanseri ile ilişkili ölümlerin 2010 yılı için erkeklerde %10 (88,000 ölüm), kadınlarda ise yaklaşık %5 (14,300 ölüm) oranında olacağı öngörülmüştür (Driscoll vd. 2005, Fingerhut vd. 2006).

### 2.1.2.3. Enfeksiyon

Akciğer dokusunda oluşan enflamasyon ve enfeksiyonların, özellikle sigara kullanmayan bireylerdeki akciğer kanserinin gelişiminde önemli rol oynayabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Coussens vd. 2002, Engels 2008, Fitzpatrick 2001). Enflamasyonun akciğer kanseri patogeneziindeki etkisinin, artan genetik mutasyonlar, anti-apoptotik sinyallerin artışı ve anjiyogenez sürecinin indüklenmesi üzerinden olabileceği ifade edilmektedir (Kim vd. 2013, Lin vd. 2007). Brenner ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir meta-analiz çalışmasında, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), amfizem, kronik

bronşit, zatürree ve tüberküloz ile akciğer kanseri riski arasında tutarlı bir pozitif ilişki olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, HIV enfeksiyonu olan kişilerde en sık görülen kanser türünün akciğer kanserinin olduğu belirtilmiştir (Engels vd. 2008). Daha etkili antiretroviral tedavi yöntemlerinin geliştirildiği günümüzde bile akciğer kanseri, HIV-enfekte hastaların ölüm sebeplerinin arasında %30'luk bir oran ile ilk sırada yer almaktadır (Winstone vd. 2013).

#### **2.1.2.4. Diyet**

Akciğer kanserinin oluşumundaki diyetin rolü, geçmişten günümüze kadar yoğun araştırma konusu olmuştur. Bunun başlıca sebebi, sigara dumanı ve çevresel faktörlerden kaynaklanan serbest radikallerin, sağlıklı hücrelerin kanserleşme süreçlerindeki rolleri ve bu serbest radikallerin hücre içinde etkisiz hale getirilmesini sağlayan antioksidanlarca fakir diyetin kanserleşme sürecine katkı sağlayabileceği düşüncesidir. Çünkü, antioksidan vitaminlerin karsinogenezde önemli etkilere sahip DNA metilasyonunun modülasyonu, DNA hasarlarının tamiri ve detoksifiye edici enzimlerin indüklenmeleri gibi süreçlerde kritik role sahip oldukları bilinmektedir (Cooper vd. 1999, Wettasinghe vd. 2002, Ziegler 1991). Bu bağlamda, antioksidan karakterdeki C ve E vitaminleri ile akciğer kanseri riski arasındaki ilişkiyi araştıran iki güncel meta-analiz bulunmaktadır (Chen vd. 2015, Luo vd. 2014). Bu meta-analiz sonuçlarına göre, 100 mg/gün oranındaki C vitamini içeren diyetin akciğer kanseri riskini %7 oranında azaltabileceği ve E vitaminince zengin bir diyetin ise bu riski %14.2 oranında azaltabileceği rapor edilmiştir (Chen vd. 2015, Luo vd. 2014). Diğer güncel bir meta-analizde ise, yine antioksidan karaktere sahip A vitaminince ( $\beta$ -karoten) zengin bir diyetin azalan akciğer kanseri riskiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yu vd. 2015).

#### **2.1.2.5. Genetik Faktörler**

Tüm sigara kullanıcılarında akciğer kanserinin görülmemesi, genetik yatkınlığın akciğer karsinogenez için önemli bir etken olabileceği düşüncesini güçlendirmiştir. Akciğer kanseri açısından pozitif bir aile öyküsüne sahip vakaların, akciğer kanseri gelişimi riskinde 1.7 katlık bir artışla ilişkili olduğu belirtilmektedir (Lissowska vd. 2010). Bazı çalışmalar ise, aile öyküsündeki akciğer kanseri hastaların 1. derece akraba olması durumunda bu riskin 2-4 kat artışa ulaşabileceğini göstermiştir (Coté vd. 2005, Schwartz vd. 2006).

Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (Genome wide association studies, GWAS) özellikle 5p15, 15q25-26 ve 6q21 kromozom bölgelerinin akciğer kanseri için artan risk ile

ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Herbst vd. 2008, Schwartz vd. 2016). 5p15 lokusu, akciğer kanseri gelişimde hücre çoğalması ile önemli rol oynayan ve sigara içme öyküsü olan/olmayan akciğer adenokarsinomu ile ilişkili *TERT* (telomeraz revers transkriptaz) genini kodlamaktadır (Landi vd. 2009). 15q25-26 kromozom bölgesindeki mutasyonların hem akciğer kanserine yatkınlık hem de nikotin bağımlılığı ile çok sıkı bir ilişkisi olduğu belirtilmektedir (Thorgeirsson vd. 2008). 6q21 lokusunun ise G-protein aracılı sinyal yolağını regüle eden genleri kodladığı ve bu genlerdeki varyasyonların sigara kullanımı ile ilişkili olmayan akciğer karsinomu riskini önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (Yokota vd. 2010). Ayrıca, Çin ve Japon popülasyonları üzerinde gerçekleştirilen genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında, 3q28 kromozom lokusundaki çeşitli poliformizmlerin, bu popülasyondaki insanlar için artan akciğer kanseri riski ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Schwartz vd. 2016).

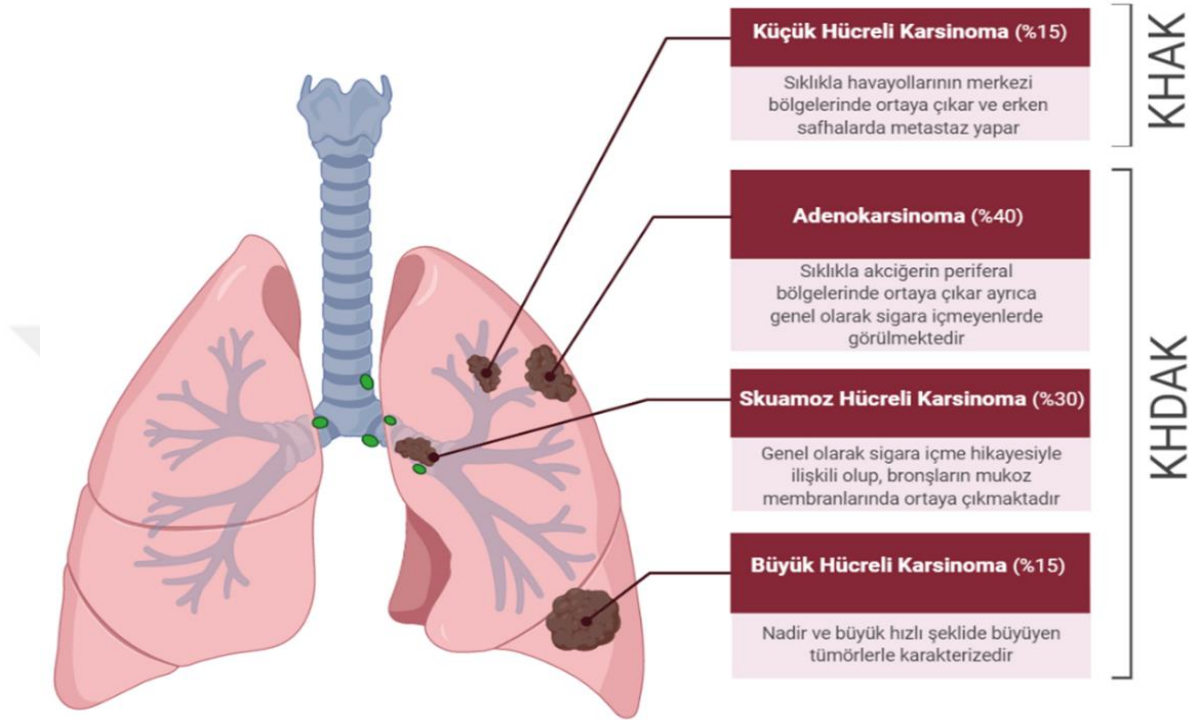
Akciğer kanser vakalarının büyük çoğunluğunda tümör hücreleri, ErbB protein ailesi (*EGFR/HER1-4*) ve *KRAS* (GTP-ase Kirsten rat sarcoma virüs) genlerinin dahil olduğu onkogenik hücre içi sinyal yolaklarının aktivasyonlarına neden olan intrinsik genetik mutasyonlar kazanmaktadır (Herbst vd. 2008). Diğer taraftan da *p53*, *CDKN2A* ve *PTEN* gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonlarına neden olan çeşitli genetik ve epigenetik değişimler sıklıkla gerçekleşmektedir (Herbst vd. 2008).

Akciğer karsinogenezi ile yakından ilişkili gen mutasyonlarının oranları popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir. Güncel bir çalışmada, akciğer kanseri vakalarında yaygın olarak görülen gen mutasyonlarının oranları Çin popülasyonu ve The Cancer Genome Atlas (TCGA) verileri kıyaslayarak analiz edilmiştir (Shen vd. 2019). Bu oranlar, EGFR (Çin: %39–59; TCGA: %14), KRAS (Çin: %7–11; TCGA: %31), TP53 (Çin: %44; TCGA: %53), CDKN2A (Çin: %22; TCGA: %15), NFE2L2 (Çin: %28; TCGA: %17), LKB1 (Chinese: %4–7; TCGA: %16), KEAP1 (Çin: %3–5; TCGA: %18) ve NF1 (Çin: %<2; TCGA: %12) olarak tespit edilmiştir (Shen vd. 2019).

### 2.1.3. Histolojik Sınıflandırması

Akciğer kanseri ile etkin ve başarılı bir mücadele için prognozun ve tedavi planlarının büyük bir hassasiyetle belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda da öncelikle sınıflandırmanın doğruluğu büyük önem arz etmektedir. Akciğer kanseri histolojik olarak tüm akciğer kanserlerinin %10-15'ini oluşturan Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve geriye kalan tüm vakaların yaklaşık %85'ini temsil eden Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılabilir. Şekil 2.2'de görüldüğü üzere,

KHDAK grubu da genel itibariyle Adenokarsinom (%40), skuamoz hücreli karsinom (%30) ve büyük hücreli karsinom (%15) olarak alt gruplarda incelenmektedir (Travis vd. 2015).



**Şekil 2-2** Akciğer kanserinin histolojik olarak basitleştirilmiş sınıflandırması.

Ancak son yirmi yıl içerisinde moleküler tekniklerdeki gelişmelere bağlı olarak akciğer kanserinin histolojik sınıflandırmasında önemli değişimler ve güncellemeler yapılmıştır. 2015 yılında yayınlanan Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization-WHO) raporuna göre, akciğer kanserinin histopatolojik sınıflandırması Tablo 2-1'de görüldüğü şekliyle yeniden düzenlenmiştir (Travis vd. 2015). Bu güncel sınıflandırmaya göre akciğer kanserlerinin %90-95'ini karsinomlar (epitelyal kökenli), %2-5'ini ise mezankimal ve diğer alt gruplar temsil etmektedir (Zeren EH 2015).

**Tablo 2-1** Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılındaki son güncellemesi ile oluşturulan akciğer kanserinin detaylı histopatolojik sınıflandırılması.

A. EPİTELYAL TÜMÖRLER	
<b>I. Adenokarsinoma</b>	<b>IV. Büyük hücreli karsinom</b>
1. Lepidik adenokarsinoma	<b>V. Adenoskuamöz karsinom</b>
2. Asiner adenokarsinoma	<b>VI. Sarkomatoid karsinom</b>
3. Papiller adenokarsinom	1. Pleomorfik karsinom
4. Mikropapiller adenokarsinom	2. İğsi hücreli karsinom
5. Solid adenokarsinom	3. Dev hücreli
6. İnvaziv müsinöz adenokarsinom	4. Karsinosarkom
— Mikst invaziv müsinöz ve müsin içermeyen adenokarsinom	<b>5. Pulmoner blastom</b>
<b>7. Kolloid adenokarsinom</b>	<b>VII. Tükrük bezi tipi tümörler</b>
<b>8. Fetal adenokarsinom</b>	1. Mukoepidermoid karsinom
<b>9. Minimal invaziv adenokarsinom</b>	2. Adenoid kistik karsinom
— Müsinöz minimal invaziv adenokarsinom	3. Epitelial-Myoepitelial karsinom
— Non-müsinöz minimal invaziv adenokarsinom	4. Pleomorfik adenom
<b>10. Preinvaziv lezyonlar</b>	<b>VIII. Papillomlar</b>
— Atipik adenomatöz hiperplazi	1. Skuamöz hücreli papillom
— Adenokarsinoma insitu	— Egzofitik Skuamöz hücreli papillom
a. Müsinöz adenokarsinoma insitu	— Endofitik Skuamöz hücreli papillom
b. Non-müsinöz adenokarsinoma insitu	2. Glandüler papillom
<b>II. Skuamöz hücreli karsinom</b>	3. Miks skuamöz hücreli ve glandüler papillom
1. Keratinize skuamöz hücreli karsinom	<b>IX. Adenomlar</b>
2. Non-keratinize skuamöz hücreli karsinom	1. Sklerozan pnemositom
3. Bazaloid skuamöz hücreli karsinom	2. Alveolar adenom
4. Preinvaziv lezyon	3. Papiller adenom
— Skuamöz hücreli karsinoma insitu	4. Müsinöz kistadenom
<b>III. Nöroendokrin tümörler</b>	5. Muköz bez adenomu
1. Küçük hücreli karsinom	<b>X. NUT karsinom</b>
— Kombine küçük hücreli karsinom	<b>XI. Lenfoepiteliyoma benzeri karsinom</b>
2. Büyük hücreli nöroendokrin karsinom	<b>C. LENFOHİSTİOSİTİK TÜMÖRLER</b>
— Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom	<b>I. MALT Tipi Ekstranodal Marjinal Zon B Hücreli Lenfoma</b>
3. Karsinoid tümör	<b>II. Diffüz büyük B hücreli lenfoma</b>
— Tipik karsinoid	<b>III. Lenfomatoid granülomatosis</b>
— Atipik karsinoid	<b>IV. İntravasküler büyük B hücreli lenfoma</b>
4. Preinvaziv lezyon	<b>V. Pulmoner Langerhans hücreli histiositoz</b>
— Diffüz idiopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi	<b>VI. Erdheim-Chester hastalığı</b>
<b>B. MEZENKİMAL TÜMÖRLER</b>	<b>D. EKTOPIK KÖKENLİ TÜMÖRLER</b>
<b>I. Pulmoner hamartom</b>	<b>I. Germ hücreli tümör</b>
<b>II. Kondrom</b>	1. Matür teratom
<b>III. PEComatöz tümörler</b>	2. İmmatür teratom
1. Lenfanjioleiomyomatosis	<b>II. İntrapulmoner timoma</b>
2. Benign PEComa	<b>III. Melanoma</b>
— Şeffaf hücreli tümör	<b>IV. Meningioma</b>
3. Malign PEComa	<b>E. METASTATİK TÜMÖRLER</b>
<b>IV. Konjenital peribronşiyal myofibroblastik tümör</b>	
<b>V. Diffüz pulmoner lenfanjiomatosis</b>	
<b>VI. İnflamatuar myofibroblastik tümör</b>	
<b>VII. Epiteloid hemanjiyoteliyoma</b>	
<b>VIII. Plöropulmoner blastoma</b>	
<b>IX. Sinavyal sarkoma</b>	
<b>X. Pulmoner arteriyal intimal sarkom</b>	
<b>XI. EWSR1-CREB1 translokasyonlu pulmoner mikst sarkom</b>	
<b>XII. Myoepitelial tümörler</b>	
1. Myoepiteliyoma	
2. Myoepitelial karsinom	

#### 2.1.4. Evrelemesi

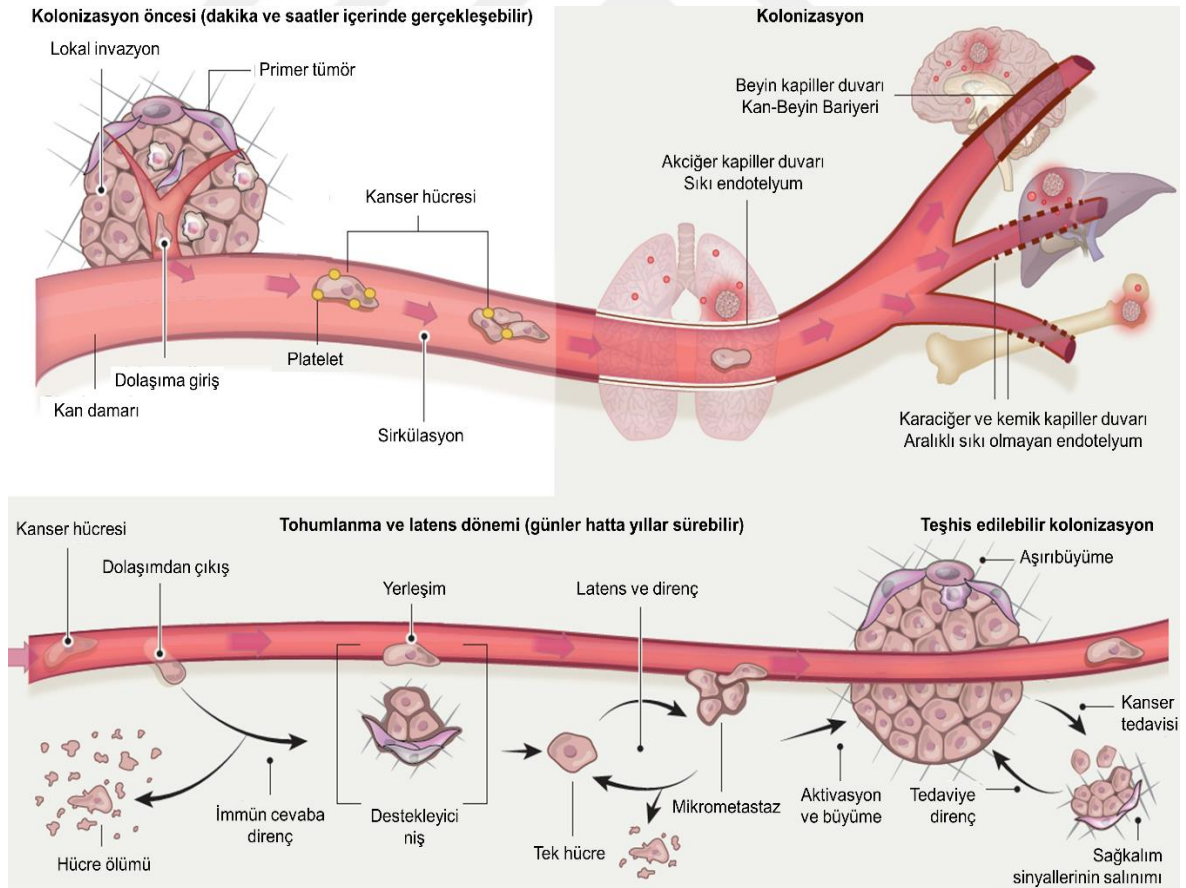
Akciğer kanseri tanısı almış hastaların tedavi stratejilerinin belirlenmesi için sınıflandırmanın yanısıra hastalığın evrelemesi de büyük bir önem arz etmektedir. Akciğer kanseri hastalarının evrelendirilmesi için Tümör-nodül-metastaz (TNM) evreleme sistemi kullanılmakta ve böylece hastalığa uluslararası yaklaşım ile standardizasyon da kazandırılmaktadır. Akciğer kanserinin evrelemesi, Akciğer Kanseri Çalışma Derneği'nin (IASLC) Ocak 2017 yılında "Uluslararası Evreleme Projesi" tarafından yayınlamış olduğu 8. TNM evreleme sistemi ile yapılmaktadır (Lim vd. 2018). Bu TNM sisteminde; (T) primer tümörün özelliklerini, (N) lenf nodu ve (M) metastaz varlığını/yokluğunu ifade etmektedir. Akciğer kanserinin evrelenmesi için kullanılan en güncel olan 8. TNM evreleme sistemi aşağıda Tablo 2-2'de özetlenmiştir.

**Tablo 2-2** Akciğer Kanseri Çalışma Derneği'nin (IASLC) 2017 yılındaki son güncellemesi oluşturulan 8. TNM evreleme sistemi

EVRE		T Skoru	N Skoru	M Skoru	
Gizli (occult) karsinom		T	N	M	
Evre 0		Tx	N0	M0	
Evre 0		Tis	N0	M0	
Evre I	IA1	T1mi	N0	M0	
		T1a	N0	M0	
	IA2	T1b	N0	M0	
	IA3	T1c	N0	M0	
Evre II	1B	T2a	N0	M0	
	IIA	T2b	N0	M0	
		IIB	T1a	N1	M0
			T1b	N1	M0
			T1c	N1	M0
			T2a	N1	M0
T2b	N1		M0		
Evre III	IIIA	T3	N0	M0	
		T1a	N2	M0	
		T1b	N2	M0	
		T1c	N2	M0	
		T2a	N2	M0	
		T2b	N2	M0	
		T3	N1	M0	
	IIIB	T4	N0	M0	
		T4	N1	M0	
		T1a	N3	M0	
		T1b	N3	M0	
		T1c	N3	M0	
		T2a	N3	M0	
		T2b	N3	M0	
IIIC	T3	N2	M0		
	T4	N2	M0		
	T4	N3	M0		
Evre IV	IVA	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a	
		Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1b	
	IVB	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1c	

## 2.2. İnvazyon ve Metastaz

Metastaz, kanser ilişkili ölümlerin en önde gelen sebebidir ve kanser hücrelerinin ortaya çıktıkları primer tümör bölgesinden metastatik kaskat adı verilen birbiri ardınca gelen kompleks aşamaların sonucunda vücudun uzak dokularında yeni tümör kolonileri oluşturmak için yayılmasıdır (Gupta vd. 2006, Talmadge vd. 2010). Şekil 2.3'deki modelde görüldüğü üzere, metastatik kaskat adı verilen bu çok adımlı süreç temel olarak; primer tümör hücrelerinin göç ederek (migrasyon) çevredeki stromal dokuya lokal invazyonu, lenf veya kan dolaşımına sistemine geçişi, dolaşım sistemi boyunca sağkalımı ve immün sistem mekanizmalarından kaçıışı, dolaşım sisteminden çıkarak uzak dokunun parankimasına geçişi, ilgili parankimde mikrometastaz kolonilerin oluşumu ve son olarak oluşan bu mikrometastaz kolonilerinin seri çoğalmaları ile klinik olarak belirlenebilir metastatik lezyonların oluşmaları olarak tanımlanmaktadır (Lambert vd. 2017).



**Şekil 2-3** Metastatik kaskatın şematik gösterimi (Massague vd. 2016).



Kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyon süreçleri, metastatik kaskatın en kritik safhalarıdır. İnvazyon ise neoplazm gösteren hücre ya da hücre grubunun çeşitli hücre migrasyonu mekanizmaları ile ilgili komşu dokuyu işgal etmesidir. Böylece kanser, lokal olarak büyüyen primer bir tümörden, sistemik, metastatik ve hastanın yaşamını tehdit edebilen bir hastalığa evrilmektedir (Friedl vd. 2011). Lokal invazyon, hücre iskeleti dinamiklerini kontrol eden birçok sinyal iletim yollarının aktivasyonu tarafından yönetilen hücre-matriks, hücre-hücre bağlantılarının değişkenliği ve artan migrasyon yeteneği ile gerçekleşebilmektedir (Friedl vd. 2003, Sahai 2007).

### 2.2.1. İnvazyon modelleri

Kanser invazyonu mekanistik olarak hücrenin şekil değiştirdiği, morfolojik asimetri kazandığı ve akabinde yer değiştirdiği döngüsel bir süreçtir. Kanser hücreleri hücre tipine ve doku mikroçevresine bağlı olarak hücre-hücre bağlantılarının olmadığı bireysel olarak veya hücre-hücre bağlantılarının korunduğu kolektif olmak üzere 2 ana mekanizma ile migrasyonu gerçekleştirmektedir (Friedl vd. 2010). Her iki hücre migrasyon mekanizması, bir nevi motor görevi gören hücre iskeleti dinamiklerine ve bu motorun vitesi gibi hizmet eden komşu doku yapılarıyla etkileşen hücre yüzey reseptörlerinin eşlik etmesine dayanmaktadır (Friedl vd. 2011). Hücre migrasyonu ve invazyonu temel olarak aşağıdaki modelleme ile kategorize edilebilmektedir (Şekil 2.4). İşlevsel olarak bireysel ve çoklu hücre migrasyonları aktif bir hücre hareketini gerektirirken, çoklu hücre büyümesi şeklindeki invazyon modeli ise doku matriksini itme kuvveti sonucu oluşan pasif hücre hareketi ile gerçekleşmektedir (Friedl vd. 2011).

#### 2.2.1.1. Amipsi invazyon

Düşük bir adezyon kuvveti ve yüksek düzeyde aktomyozin (aktin ve miyozin kompleksi) aracılı kasılma hareketi yapabilme kabiliyetine sahip olarak migrate olan hücreler morfolojik olarak küresel bir fenotipe adaptasyon sağlamaktadır (Friedl vd. 2001). Amipsi invazyonda kanser hücreleri, mikroçevresindeki substratlarla ihmal edilebilir zayıf bir adezyon ile etkileşen ve *Rac (Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate veya Rac Family Small GTPase)* bağımlı oluşturduğu çok sayıda filopod adı verilen yalancı ayakları kullanmaktadır (Lammermann vd. 2009). Amipsi hücre invazyonunun en belirleyici ve ayırıcı özellikleri, ECM'e (ekstraselüler matriks) adezyonun olmaması, hücre polaritesinin tamamen

kaybolması ve çok yüksek bir kemotaksis yeteneğinin olmasıdır (Condeelis vd. 2003). Mezenkimal invazyon ile karşılaştırıldığında, amipsi invazyonda kanser hücrelerinde stres fibrillerin oluşmaması, ECM'i yeniden modellememesi, integrin proteinlere bağımlı olmaması ve süspanse olarak çoğalabilmesi gibi önemli farklılıklar bulunmaktadır (Friedl vd. 2003). Amipsi invazyondaki hücre hareketinin diğer hücre hareketleriyle kıyaslandığında en hızlı olduğu bilinmektedir. Örneğin, 0.1-1 mm/dk'lık bir hızla gerçekleşen mezenkimal invazyona kıyasla amipsi invazyonda hücreler 20 mm/dk gibi muazzam bir hıza ulaşabilmektedir (Friedl vd. 2003). Amipsi invazyonun bir diğer önemli karakteristik özelliği ise mezenkimal ve kolektif invazyon modellerinde gözlenen proteaz aktivitesine bağımlı olmamasıdır ve bu da kanser hücrelerine MMP (*Matrix Metalloproteinase*) hedefli tedavi girişimlerine karşı doğal bir direnç kazandırmaktadır (Friedl vd. 2011, van Zijl vd. 2011). Amipsi invazyon, özellikle lösemi, lenfoma, KHAK gibi hematopoietik ve nöroektodermal kökenli kanser türlerinde görülmektedir (Madsen vd. 2010).

#### **2.2.1.2. Mezenkimal invazyon**

Mezenkimal kanser hücreleri mekanistik olarak yalancı ayak protrusyonları (çıkıntı) ve fokal adezyonların oluşumu, aktomyozin kasılmalar ve son olarak hücrenin hareket yönünün tersi olan arka kısmının adezyonunu kaybederek ayrılmasını içeren migrasyon döngüsünü kullanmaktadır (Friedl vd. 2003). Bu mekanizmada hücre iskeleti çıkıntıları ve adezyon yeteneği güçlü bir şekilde oluşmaktadır. Mezenkimal invazyon sürecini geçiren kanser hücreleri, çoklu integrin molekül kompleksleriyle ve ECM substratlarının proteolitik aktivitesiyle yıkımını içeren hücre-matriks etkileşimlerini kullanır. Morfolojik olarak da iğsi ve uzamış morfolojiye neden olan bir transformasyon süreci geçirirler (Wolf vd. 2007). Mezenkimal invazyon, yumuşak doku sarkomalarının da dahil olduğu bağ dokusu tümörlerinin yanısıra epitelyal kökenli tümörlerdeki (adenokarsinoma) hücrelerde EMT (epitelyalden-mezenkimale geçiş) sürecinin indüklenmesi yoluyla gerçekleşmektedir (Friedl vd. 2009).

#### **2.2.1.3. Çoklu-hücre invazyon**

Bireysel olarak invazyon sürecini geçiren bir kanser hücrelerinin dokuda izlediği yolu diğer kanser hücrelerinin de kullandığı bir invazyon modeli olarak tanımlanmaktadır. Esasen bu model, bireysel kanser hücrelerinin benzer kemotaktik sinyaller tarafından stromal

dokuya hareket etmeleri akabinde stabil olmayan hücre-hücre bağlantılarla sıralı kesintisiz bir şekilde invazyon yapmasına dayanmaktadır. Çoklu-hücre invazyonu gerçekleştiren hücrelerde hücre-hücre bağlantı molekül seviyelerinin artmasına bağlı olarak kolektif hücre invazyonu indüklenebilmektedir. Bu tip bir invazyon mezenkimal invazyon yapabilen tüm hematolojik ve solid tümörlerde görülmektedir (Friedl vd. 2011).

#### **2.2.1.4. Kolektif invazyon**

Kolektif invazyon, tümör ve stroma dokuları arasında oluşan kümesel veya zincirimsi yapıdaki ve hücre-hücre bağlantılarının kuvvetli olup hücrelerarası koordinasyonun yüksek olduğu çoklu-hücre gruplarının gerçekleştirdiği invazyon modelidir (Ilna vd. 2009). Kolektif invazyon, invaze olunan dokunun yapısına, birlikte hareket eden oluşumdaki hücrelerin sayısına ve tipine bağlı olarak farklı morfolojilere adapte olabilmektedir. Örneğin; hücre grupları küçük kümeler, solid zincirler şeklinde yapılar oluşturabildiği gibi hücre polaritesinin korunduğu durumlarda bu yapılar lümene de sahip olabilmektedir (Friedl vd. 2009). Kolektif invazyonların çoğunda, ilgili stromada proteoliz ile yollar açan ve ileri doğru çekme kuvveti oluşturan bir veya daha fazla sayıda mezenkimal karaktere sahip hücrelerden oluşan bir lider (uç) bölge bulunmaktadır (Friedl vd. 2010, Gaggioli vd. 2007). Kolektif invazyonun diğer modeli ise diğer modeldeki gibi tek bir yönde oluşan lider mezenkimal hücrelerden oluşan bir uç bölgesine sahip değildir. Bunun yerine, pozisyonları değişken olan birçok hücre grubunu içeren küt görünümdeki tomurcukların olduğu bir yapıya sahiptir (Ewald vd. 2008). Kolektif invazyon modeli daha çok kuvvetli epitelyal polariteye karsinomalar ve yumuşak doku tümörlerde yaygın olarak görülse de çoğu epitelyal ve mezenkimal tümör tiplerinde gözlenmektedir (Friedl vd. 2009).

#### **2.2.1.5. Yayılmacı büyüme ile invazyon**

Bazı stroma dokuları, çoğalan tümör hücrelerine fiziksel sınırlama getirmez veya çok az sınırlar ve bu nedenle tümör lezyonunun genişlemesi engellenemez. Bu tip dokularda tümör hücrelerinin çoğalmaları sonucunda artan tümör hacminin etkisiyle dış bölgelere doğru itme kuvveti şeklinde olan ve aktif bir migrasyondan yoksun bir invazyon meydana gelmektedir (Iguchi vd. 2008). Migrasyondan yoksun bu yayılmacı büyümede, kollajen fibriller ile çevresi sarılan ve ECM içinde bir kapsül yapısına sahip küresel lezyonlar gözlenir

(Ishizaki vd. 2001). Bazı durumlarda ise aktif migrasyonun indüklenmesiyle kolektif invazyona dönüşebilmektedir (Ilna vd. 2011).

		Hücre-hücre bağlantıları	Kanser tipi
Bireysel hücre migrasyonu	Tek-hücre migrasyonu		
	Amipsi	-	Sıklıkla Lösemi, Lenfoma ve KHAK olmak üzere tüm kanser türlerinde de görülebilir
	Mezenkimal	-	Stromal tümörler ve EMT sürecinin indüklediği epitel tümörler
	Amipsi (çoklu-hücre)	?	Amipsi hücre yayılımı yapabilen tüm kanser türlerinde de görülebilir
Çoklu hücre migrasyonu	Çoklu-hücre Akımı		
	Mezenkimal (çoklu-hücre)	(+)	Mezenkimal invazyon yapabilen tüm kanser türleri (fibroblastlar kanser hücrelerine öncülük eder)
	Kümesel	++	Kısmen farklılaşmış olan epitelyal tümörler
	Solid zincir	++	Kısmen farklılaşmış ve alt bölgelerinde EMT'nin indüklediği epitelyal tümörler (Bazal ve skuamoz karsinomalar)
Büyüme	Kolektif hücre migrasyonu		
	Lümenli zincir	++	Farklılaşmış olan epitelyal tümörler (vaskular tümör)
	Protrusif zincir	++	Kısmen farklılaşmış ve EMT'nin indüklenmediği epitelyal tümörler
Yayılan büyüme	Dışa doğru iten tümör	++	Tüm solid tümörler

Şekil 2-4 İnvazyon modellerinin sınıflandırılması ve karakteristik özellikleri

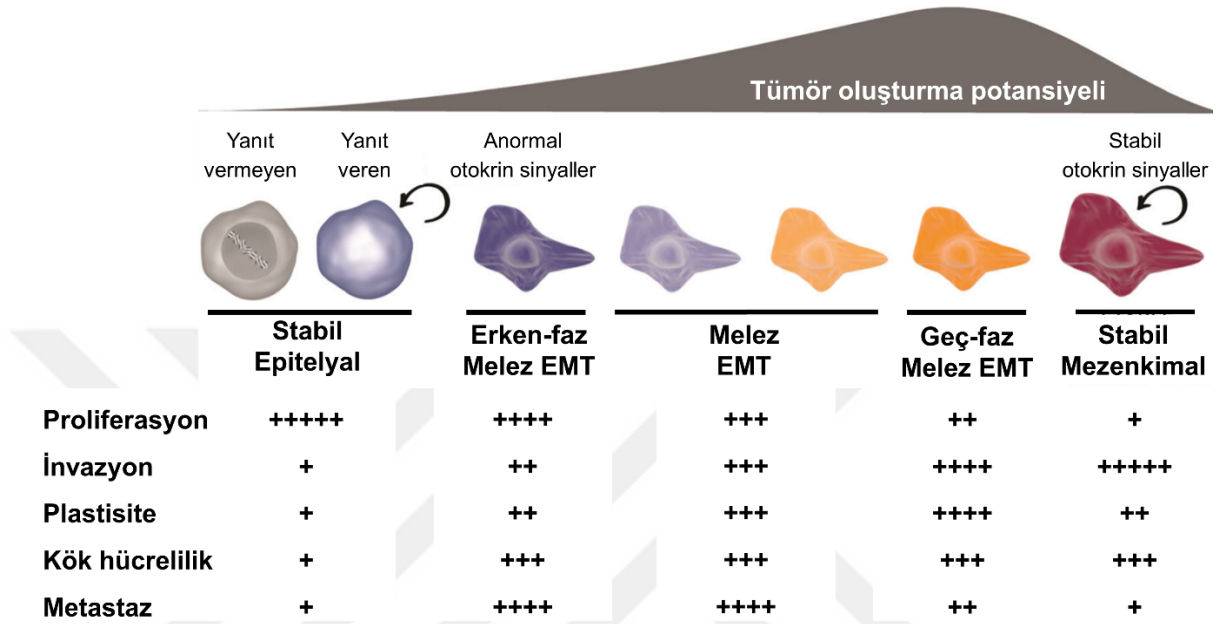
### 2.3. Epitelyal-Mezenkimal Transisyon

Epitelyal-Mezenkimal Transisyon (EMT), polarize epitel kökenli hücrelerin yüksek hareket yeteneğine sahip mezenkimal fenotipe transforme olmasına olanak sağlayan hücresel bir programdır. Esasında EMT, gastrulasyon evresini kolaylaştıran rolü ile embriyonik gelişim, nöral krest hücrelerinin farklılaşmaları ve çok çeşitli hücre ve doku tipinin oluşumları gibi hayati süreçlerde önemli fonksiyonlar üstlenmektedir (Nieto vd. 2016). Diğer taraftan, bu program organ fibrozisleri ve kanser gibi patolojik durumlarda da anormal bir şekilde aktifleşebilmektedir. Karsinoma hücreleri (epitelyal kökenli kanser hücreleri) invaziv bir fenotip kazanmak ve metastatik progresyonuna katkı sağlamak için EMT sürecini indükler. EMT, kanser hücrelerinin kök hücre fenotipine sahip olması, metabolizmalarının desteklenmesi, immunoterapi ve kemoterapiye karşı direnç kazanmaları gibi çeşitli süreçlerine de hizmet etmektedir (Lu vd. 2019, Nieto vd. 2016).

EMT programı basitçe yapılan tanımına rağmen, hassas ve değişken dengeler ile çok çeşitlilik gösteren intrinsik (içsel) ve ekstrinsik (dışsal) faktörlerle aktive edilerek kontrol edilen bir süreçtir (Lamouille vd. 2014). Tümörün görüldüğü dokunun tipine, fizyolojik durumuna ve tümör mikroçevresine bağlı olarak kanser hücreleri, progresyon ve metastazları boyunca sergileyecekleri davranışlarında çok kapsamlı farklılıklara yol açan EMT modları indüklenebilmektedir. Bu bağlamda EMT, geniş bir spektrumda farklı modlarda indüklenebilmesi nedeniyle yüksek plastisite yeteneğine sahip dinamik bir süreçtir. Sahip olduğu bu yüksek plastisite yeteneği ile EMT süreci, hem embriyogenezde özelleşmiş organ ve dokuların gelişimine hem de karsinogenez ve malignan progresyon boyunca makrometastazın oluşumuna imkân vermektedir (Lu vd. 2019).

EMT'nin farklı modlarının indüklendiği kanser hücreleri epitel ve mezenkimal hücre fenotipleri arasında farklı morfolojik, transkripsiyonel ve epigenetik karakterler sergilemektedir. Şekil 2.5'da görüldüğü üzere, EMT profillerini stabil epitelyal, erken-faz melez EMT, melez EMT, geç-faz melez EMT ve stabil mezenkimal olmak beş farklı mod ile sınıflandırabiliriz (Pastushenko vd. 2019). Ksenograft (xenograft) modellerden elde edilen kolorektal, meme, pankreas, akciğer ve over gibi çok çeşitli kanser hücrelerindeki epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin ekspresyonları incelendiğinde aynı hücrede her iki fenotip belirteçlerinin eksprese edildiğinin görülmesiyle melez EMT modunun varlığı kanıtlanmıştır. Benzer şekilde klinik olarak aralarında akciğer, meme, kolorektal baş-boyun ve pankreas gibi çeşitli insan tümör dokularında da epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin aynı hücrede eksprese olabildiği gösterilmiştir. Ayrıca, *in vitro* ortamda bu melez EMT fenotipin artan

migrasyon, invazyon ve tutunma (anchorage) bağımsız çoğalma yeteneği ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Pastushenko vd. 2019).



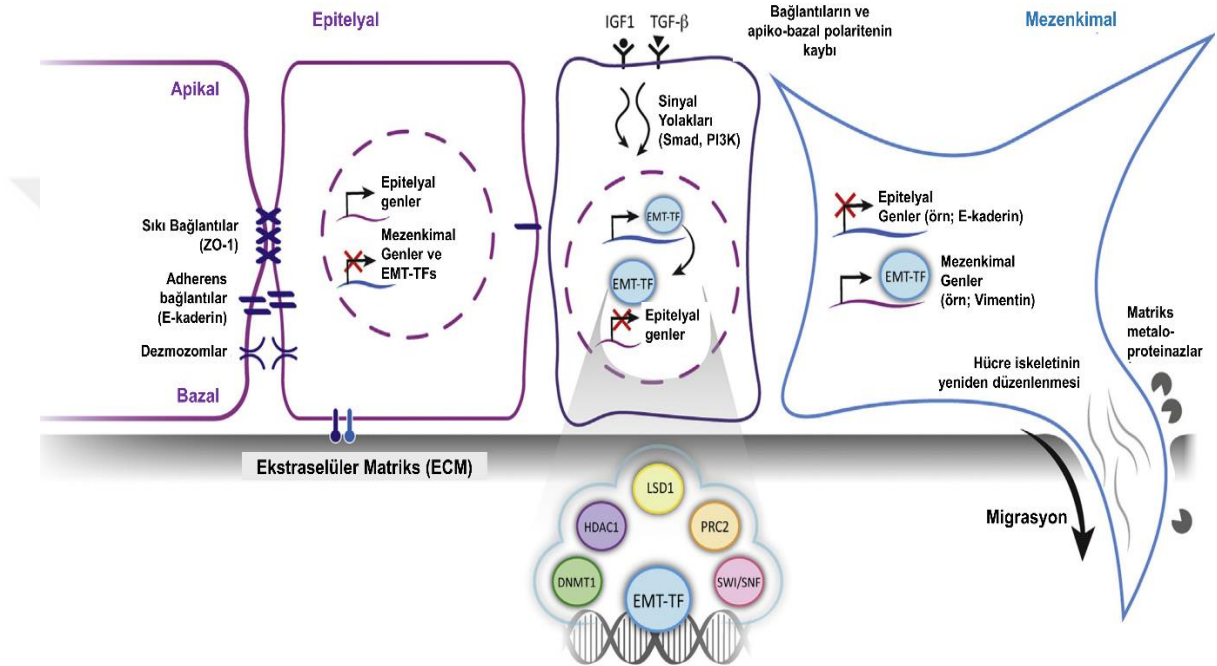
**Şekil 2-5** Farklı EMT modları ve onların proliferasyon, invazyon, plastisite, kök hücrelilik ve metastaz kapasitelerinin şematik olarak gösterilmesi (Chaffer vd. 2016, Pastushenko vd. 2019).

### 2.3.1. Hücresel ve moleküler özellikleri

EMT, hem gelişimde hem de patolojik durumlarda indüklenirse de değişkenlik göstermeyen karakteristik özelliklere sahiptir (Nieto vd. 2016). EMT sürecinde sıkı bağlantılar, adherens bağlantılar ve dezmozomlarının dahil olduğu epitelyal hücre-hücre bağlantılarının bozulması ve apiko-bazal polaritesinin kaybolmasından, iğsi şekilli mezenkimal morfolojiye ve hareket yeteneğini kazandıran aktin hücre iskeletinin yeniden organize edilmesi gibi önemli değişimler gerçekleşir. Dahası, EMT süreci indüklenen hücreler çeşitli matriks metalo-proteinazlar türlerini (MMP) eksprese ederek bulunduğu dokudaki bazal membranı degrade ederek invazyon yeteneği kazanmaktadırlar (Lu vd. 2019).

Moleküler olarak Şekil 2.6'deki modellemede gösterildiği üzere, EMT sürecini geçiren bir hücrede E-kaderin, çeşitli sitokeratinler, ZO-1 (*zona occludens-1*) gibi sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonları baskılanırken; integrin beta 1, integrin beta 3, vimentin, fibronektin, N-kaderin gibi mezenkimal fenotipin belirteçlerinin ekspresyonları indüklenmektedir. Bu kompleks sürecin tetiklenmesi, Ras mutasyonu gibi intrinsik ve TGF-

$\beta$  (Transforming growth factor-  $\beta$ ), IGF1 (Insulin-like growth factor) ve hipoksi gibi ekstrinsik sinyaller ile gerçekleşebilir. EMT indükleyicilere cevap veren hücrelerde çok çeşitli epigenetik, transkripsiyonel sonrası, translasyon öncesi ve sonrası düzenleyiciler ile fonksiyon gösteren farklı EMT-ilişkili transkripsiyon faktörleri (EMT-TF) bu süreci koordineli bir şekilde yönetmektedir (Lu vd. 2019, Skrypek vd. 2017).



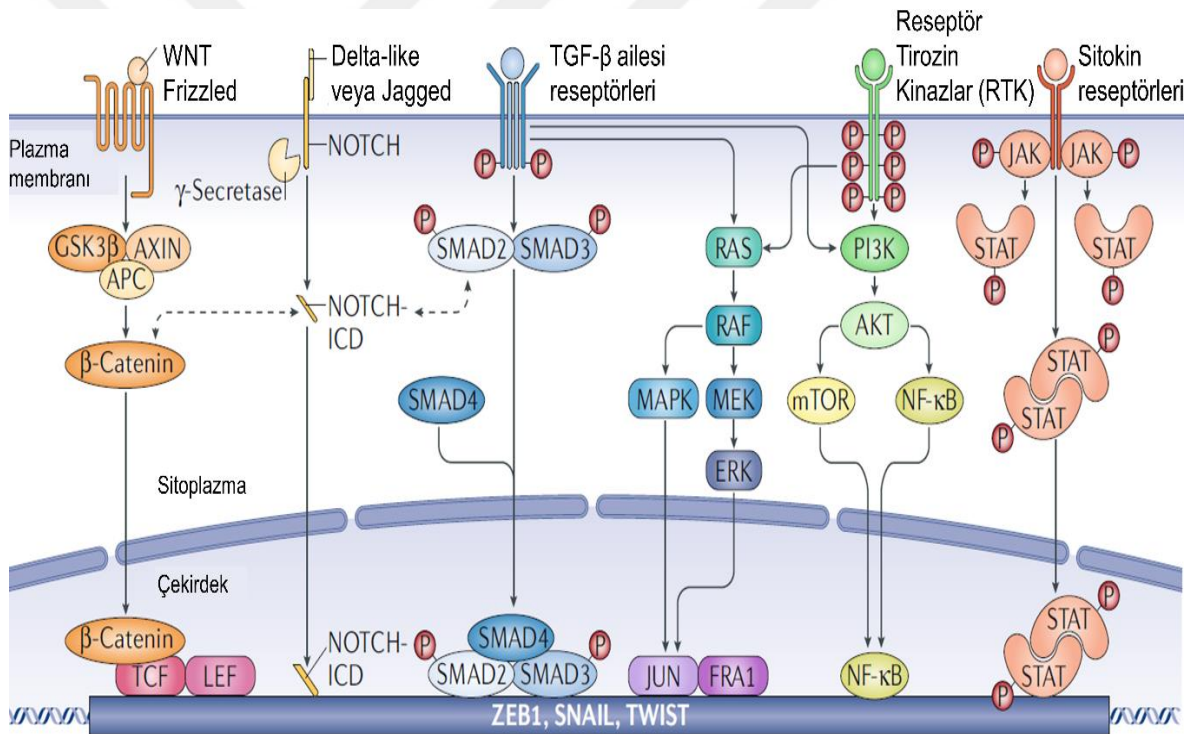
**Şekil 2-6** EMT sürecinde meydana gelen hüresel ve moleküler değişimlerin şematik gösterimi (Skrypek vd. 2017).

### 2.3.2. EMT indükleyici sinyal yolları

EMT süreci temel olarak aralarında TGF- $\beta$ , WNT, NOTCH ve çok çeşitli büyüme faktörleri (EGF, VEGF, FGF ve IGF1 gibi) aracılığıyla aktive olabilen reseptör tirozin kinazların (RTK) dahil olduğu gelişimsel sinyal yolları tarafından indüklenmektedir (Şekil 2.7). Bunun dışında ekseriyetle tümör mikroçevresindeki immün sistem hücreleri tarafından salınan IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinler de EMT indüksiyonunu gerçekleştirebilirler. EMT indükleyici faktörlerin ilgili hücre içi sinyal yollarını aktive etmesi sonucunda ise EMT sürecini organize eden SNAIL, TWIST ve ZEB transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonları sağlanır (Yeung vd. 2017).

TGF- $\beta$ , WNT, NOTCH, çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin spesifik reseptörlerine bağlanmaları sonucu aktive olan hücre içi sinyal yolları, EMT-TF'lerin transkripsiyonlarını

indüklemek üzere sırasıyla SMAD,  $\beta$ -katenin-TCF-LEF kompleksi, *intracellular domain of the NOTCH receptor* (NOTCH-ICD), NFKB ve STAT gibi önemli transkripsiyon faktör ve transkripsiyonel ko-aktivatörler görevlendirir (Şekil 2.13). Bu çeşitli sinyal yollarını birbirleriyle çok sıkı bir şekilde ilişki kurmakta, birbirlerinin aktivasyonlarını destekleyerek EMT sürecinin indüklenmesinde koordineli bir şekilde çalışırlar (Dongre vd. 2019). Ayrıca bu sinyal yollarını, EMT-TF'lerin seviyelerini transkripsiyonel indükledikleri gibi fosforilasyon, defosforilasyon, asetilasyon, sumolasyon ve ubiquitasyon gibi çeşitli transasyon sonrası modifikasyonlar aracılığıyla aktivitelerini ve stabilitelelerini de kontrol etmektedirler (Skrypek vd. 2017). Hem kanser hücreleri hem de tümör mikroçevresindeki çok çeşitli stromal hücreleri tarafından salınan TGF- $\beta$ , karsinogenezde EMT sürecinin indüklenmesinden sorumlu en önemli sinyal olarak kabul edilmektedir (Katsuno vd. 2013).

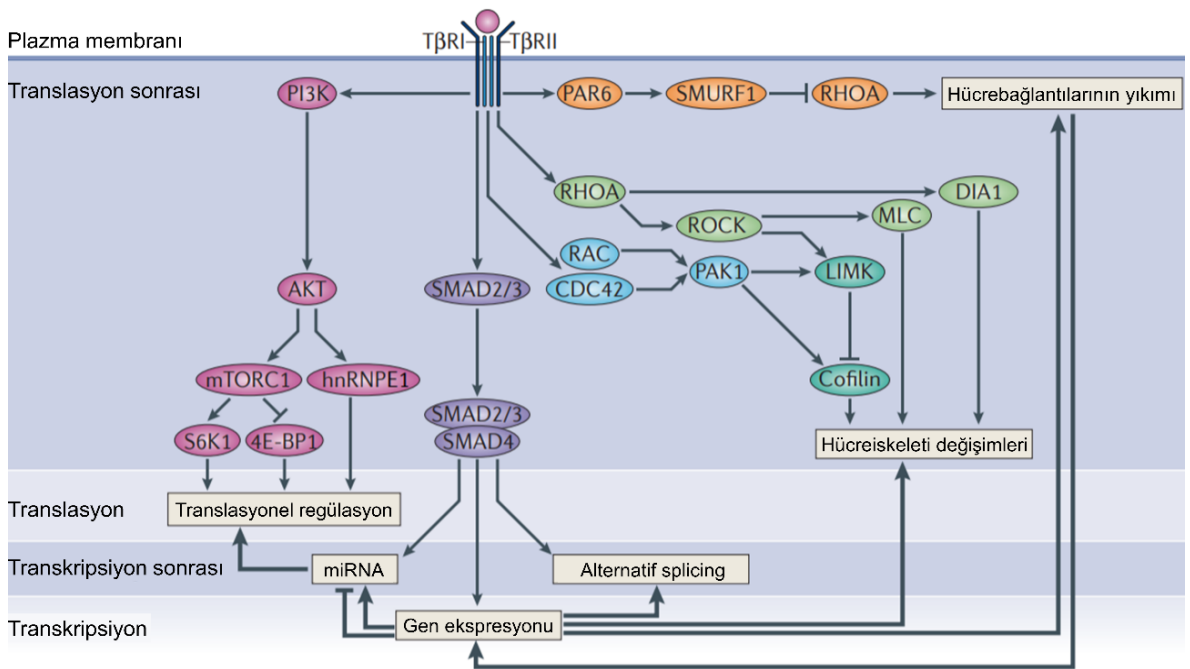


**Şekil 2-7** EMT sürecinin indüklenmesinden sorumlu çeşitli hücre içi sinyal yollarını (Dongre vd. 2019)



### 2.3.2.1. TGF- $\beta$ sinyal yolağı ve aktivasyonu

TGF- $\beta$  sinyal yolağı birçok doku tipinde EMT'nin indüklenmesinde merkezi bir role sahiptir ve aktivasyonu üç farklı TGF- $\beta$  izoformu, iki farklı aktivin (*Activin A*, *activin AB alpha polypeptide*) ve çeşitli *bone morphogenetic protein* (BMP) ligandlarını içine alan çok geniş bir uyarıcı grubu tarafından indüklenebilmektedir (Bierie vd. 2006, Xu vd. 2009). TGF- $\beta$  ligandı hedef hücredeki transmembran serin-treonin kinaz üyesi olan TGF- $\beta$  receptor type 2 (TGF $\beta$ R2) reseptörüne bağlanmasının akabinde TGF $\beta$ R2 TGF- $\beta$  receptor type 1 (TGF $\beta$ R1) reseptörü ile etkileşir ve onu fosfatlatarak aktifleştirir. Aktifleşen TGF $\beta$ R1 reseptörü SMAD2 ve SMAD3 transkripsiyon faktörlerini fosfatlar ve fosfatlanan SMAD2-SMAD3 ikilisi sitoplazmada yer alan SMAD4 proteine bağlanarak SMAD2-SMAD3-SMAD4 üçlü kompleksini oluştururlar (Şekil 2.8). BMP ligandları ile indüklenen TGF- $\beta$  yolağında ise farklı olarak SMAD1-SMAD5-SMAD4 üçlü kompleksi oluşmaktadır. TGF- $\beta$ 'nin kanonik sinyal yolağını oluşturan bu üçlü kompleksler, bir transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon göstermek üzere hücre çekirdeğine geçerek EMT, apoptoz, anjiyogenez, senesans, hücre hareketi, invazyonu, çoğalması ve büyümesi gibi birçok biyolojik süreçte rol alan genlerin transkripsiyonlarını regüle etmektedirler (Xu vd. 2009). TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT sürecini desteklemek için MAPK, PI3K ve RHO-benzeri GTPaz gibi çeşitli kanonik olmayan sinyal yolları aktive olmaktadır (Lamouille vd. 2014).



**Şekil 2-8** TGF- $\beta$ 'nin kanonik ve non-kanonik sinyal iletimi (Lamouille vd. 2014).

### 2.3.2.2. TGF- $\beta$ ile indüklenen EMT sürecinin moleküler mekanizması

EMT sürecinin indüklenmesi ve ilerlemesi TGF- $\beta$ 'nın hem kanonikal hem de kanonikal olmayan yolları tarafından transkripsiyonel, transkripsiyon sonrası, translasyonel ve translasyon sonrası mekanizmalarla çok sıkı bir şekilde denetlenir (Şekil 2.8). TGF- $\beta$ 'nın kanonikal yolağı aracılığıyla aktifleşen SMAD kompleksleri hem EMT-TF'lerin ekspresyonlarını indükler hem de bu transkripsiyon faktörlerle etkileşerek onların transkripsiyonel aktivitelerini artırır.

TGF- $\beta$  sinyal yolağı, doğrudan epitelyal proteinlerin ekspresyonlarını baskılayan miRNA'ları indükleyebildiği gibi mezenkimal molekülleri hedef alan miRNA'ların ekspresyonlarını EMT-TF'leri aracılığıyla baskılayabilirler (Lamouille vd. 2014). Ayrıca *epithelial splicing regulatory proteins* (ESRPs) gibi epitelyal fenotipin korunmasında rol alan alternatif splicing proteinlerinin ekspresyonlarını TGF- $\beta$  sinyal yolağı tarafından baskılanabilmektedir (Warzecha vd. 2010). TGF- $\beta$  tarafından aktive olan PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı, hem hücre büyümesini destekleyerek hem de *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (4E-BP1) ve *ribosomal S6 kinase 1* (S6K1) proteinlerini görevlendirerek hücrenin translasyon kapasitesini artırır ve EMT sürecinin indüklenmesi sürecine katılır (Lamouille vd. 2014). Ayrıca aktif AKT tarafından fosfatlanan *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1* (hnRNPE1) proteini, translasyonları baskılanmış olan spesifik mRNA'ların translasyonlarını yeniden aktifleştirerek EMT sürecine katkı sağlar (Chaudhury vd. 2010).

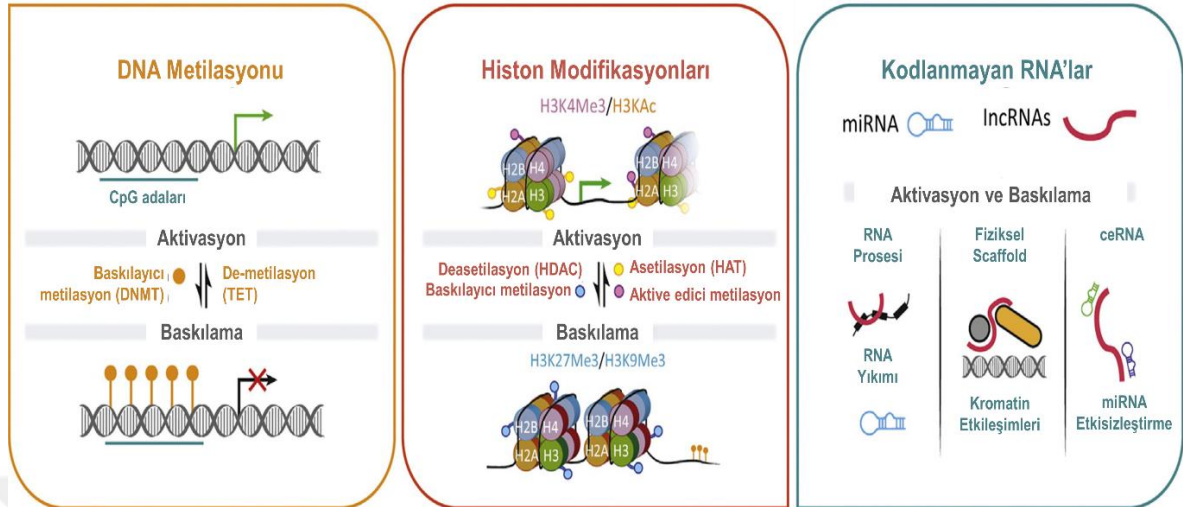
TGF- $\beta$  hücre migrasyonun gerçekleşebilmesi için RHO-GTPaz sınıfı enzimleri regüle ederek hücre-hücre bağlantılarının kaybını ve hücre iskeleti değişimlerini indüklemektedir. Sıkı bağlantıların kaybı, aktive olan TGF $\beta$ R2 reseptörünün *partitioning defective 6* (PAR6) proteinini fosfatlamasına olanak sağlaması ve böylece *E3 ubiquitin ligase SMAD ubiquitylation regulatory factor 1* (SMURF1) enziminin görevlendirilerek RHOA'nın ubikitin aracılı degreasyonu içeren bir seri süreç ile gerçekleşmektedir (Ozdamar vd. 2005). Diğer taraftan TGF- $\beta$ , hücre hareketi için elzem olan aktin yeniden-düzenlenmesi sürecinin yönetiminden sorumlu *diaphanous* (DIA1) ve *RHO-associated kinase* (ROCK) proteinlerini görevlendiren RHOA'nın aktivitesini de artırmaktadır (Bhowmick vd. 2001). TGF- $\beta$ 'nın aktive ettiği PI3K ve RHO-benzeri GTPaz gibi kanonikal olmayan sinyal yolları aktive olan RAC ve CDC42 proteinleri de hücre iskeletinin yeniden organizasyonu sürecine katılır. Bunun yanısıra *p21 activated kinase 1* (PAK1) aracılığıyla lamellipod ve filopod oluşumlarını artırarak hücre migrasyonunu da indüklemektedir (Ridley 2011, Whale vd. 2011).

### 2.3.3. Transkripsiyonel regülasyonu

EMT programının yönetilmesinden temel olarak içerisinde “*zinc-finger E-box binding homeobox factors*” olarak adlandırılan ZEB1, ZEB2, SNAIL (SNAI1), SLUG (SNAI2) ve “*basic-helix-loop-helix factors*” olarak nitelendirilen TWIST1, TWIST2 EMT-TF’ler sorumludur. Bu EMT-TF’ler birbirlerinin ekspresyonlarını düzenleyebildikleri gibi farklı kombinasyonları yüzlerce epitelyal fenotiple ilişkili genlerin baskımlarını ve mezenkimal fenotipin sağlanmasında görevli genlerin ekspresyonlarını indüklemektedir (Dongre vd. 2019). SNAIL grubu EMT-TF’ler, E-kaderin proteinini kodlayan *CDH1* geninin promotor bölgesindeki E-box bölgesine bağlanarak “polycomb repressive complex” (PRC) komplekslerini görevlendirerek bu genin ekspresyonunu baskımlar (Batlle vd. 2000, Herranz vd. 2008). Benzer şekilde ZEB1 transkripsiyon faktörleri *CDH1* geninin baskılanmasını ve ve diğer kromatin modifiye edici faktörler aracılığıyla da *VIM* (Vimentin) ve *CDH2* (N-kaderin) genlerinin ekspresyonlarını transkripsiyonel olarak indüklemektedir (Sánchez-Tilló vd. 2010). EMT-TF’ler hücre polaritesi ile ilişkili çeşitli genlerin transkripsiyonel olarak regülasyonlarından da sorumludur. Sıkı bağlantıların oluşumundan ve apiko-bazal polaritenin korunmasından sorumlu bir transmembran protein olan *Crumbs 1* (CRB1), bir “scaffold” olarak fonksiyon gösteren *PALS1-associated tight junction protein* (PATJ) ve bir hücre iskeleti proteini olan *lethal giant larvae* (LGL) gibi moleküllerinin ekspresyonları SNAIL ve ZEB1 transkripsiyon faktörleri tarafından baskılanabilmektedir (Aigner vd. 2007, Spaderna vd. 2008). Ayrıca, SNAIL ve ZEB2 transkripsiyon faktörleri bazal membranın yıkımını için MMP proteinlerinin ifadelerini de transkripsiyonel olarak indüklemektedir (Miyoshi vd. 2005).

### 2.3.4. Epigenetik regülasyonu

EMT-TF’lerin EMT süreciyle ilişkili genleri transkripsiyonel olarak regüle etmesi stabil olmayan gen değişimlerini sağlar. Ancak, EMT sürecinin stabil ve uzun vadeli olarak indüklenmesinin yanısıra hücresel plastisitenin sağlanması için kritik olan geri dönülebilir olma özelliğinin korunması da epigenetik regülasyon mekanizmaları ile gerçekleşmektedir. Şekil 2.9’daki modeldeki gibi EMT sürecinin epigenetik kontrolü temel olarak DNA metilasyon, histon modifikasyonları ve RNA enterferans olarak sınıflandırabileceğimiz mekanizmalar ile sağlanmaktadır (Skrypek vd. 2017).



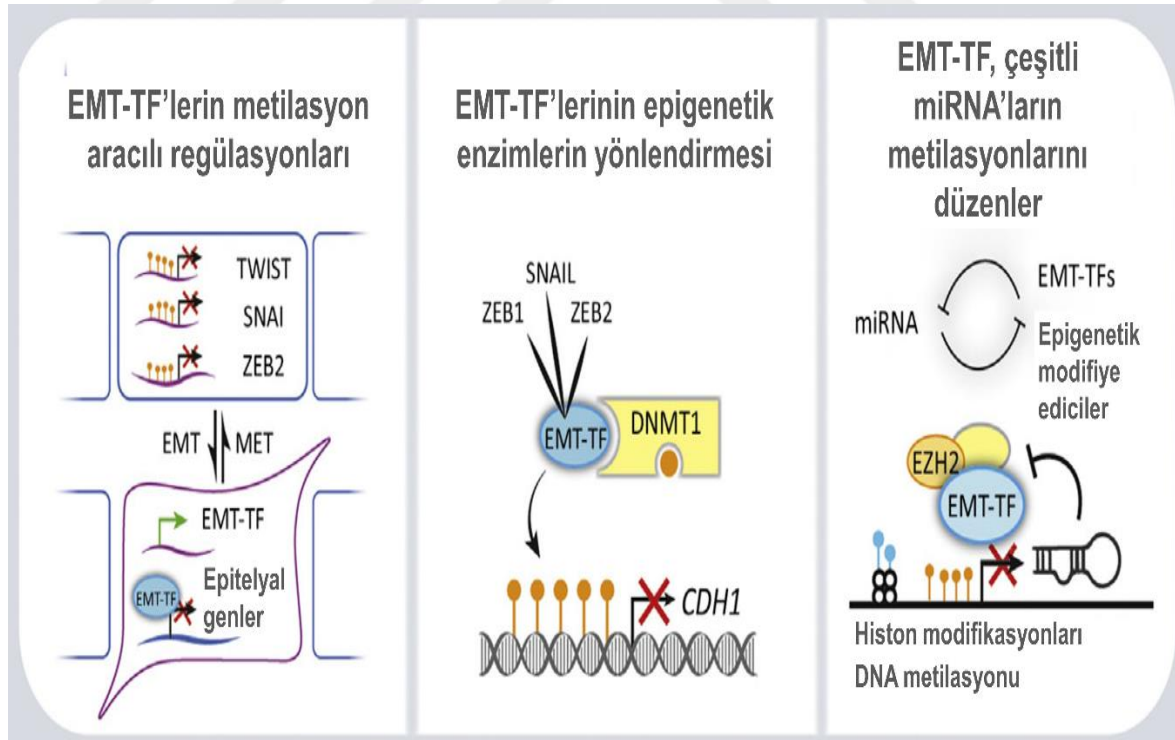
**Şekil 2-9** EMT sürecinin epigenetik regülasyonundan sorumlu mekanizmaların şematik gösterimi (Skrypek vd. 2017)

EMT-TF'ler, EMT ile ilişkili genlerin ekspresyonlarını regüle etmek için çok çeşitli epigenetik enzimler ile koordineli bir şekilde fonksiyon göstermektedir. Bu epigenetik enzimler de EMT sürecini indükleyici sinyallere cevap olarak aktive olmaktadır. TGF- $\beta$  ile indüklenen SMAD, PI3K/AKT ve MAPK/ERK sinyal yolları, kromatin yeniden modelleme komplekslerinin kromatinde görevlendirilmesini ve kromatin yapının sıkıştırılmasını/açılmasını düzenleyen epigenetik enzimlerin ve histonların modifikasyonlarını yönetir (Arzate-Mejía vd. 2011, Liu vd. 2016).

### 2.3.4.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, genomik imprinting, X kromozomunun inaktivasyonu ve genom stabilitesinin sağlanması gibi çok kritik süreçlerde rol alan ve temel olarak gen ekspresyonlarının baskılanmasını gerçekleştiren stabil ve kalıtlılabir bir mekanizmadır. Bu mekanizma ilgili gen lokusunda CpG adaları olarak isimlendirilen bölgedeki sitozin nükleotitlerine DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri aracılığıyla metil gruplarının kovalent olarak bağlanması şeklinde gerçekleşmektedir (Bird 2002). Akabinde kromatinin daha ileri modifikasyonlarını gerçekleştirecek olan histon modifiye edici enzimlerin fonksiyon göstermesi için methyl-CpG binding-domain (MBD) proteinleri metillenmiş sitozinlere bağlanır. Bu süreç geri döndürülebilir bir süreç olup, *ten-eleven translocation* (TET) oksidaz enzimleri aracılığıyla eklenmiş metil grubunun çıkarılması şeklinde yürütülür (Bhutani vd. 2011).

EMT sürecinin yönetilmesinde metilasyon, çok kritik mekanizmalardan biridir (Şekil 2.10). EMT sürecinde *CDH1* geninin metilasyon aracılı olarak baskılanması, farklı kanser türlerinde sıklıkla gözlenen ve en çok araştırılan mekanizmalardan biridir. *CDH1* geninin metilasyon aracılı baskılanması, DNMT1 enziminin farklı EMT-TF'ler aracılığıyla etkileşmesi ile gerçekleşir. DNMT1 enzimleri SNAIL transkripsiyon faktörlerinin SNAG domainleri ile ZEB transkripsiyon faktörlerinin ise SMAD-bağlanma domainleri ile etkileşerek *CDH1* geninin metilasyon aracılı baskılanmasını yönetir (Espada vd. 2011, Fukagawa vd. 2015). Bununla birlikte, EMT-TF'lerin ekspresyonları da DNA metilasyonu yoluyla düzenlenmektedir. Çeşitli kanser türlerinde TWIST ve ZEB transkripsiyon faktörü ailelerinin üyelerini kodlayan gen bölgelerinde sıklıkla metilasyon görülmekte ve bu durumun prognostik faktör olarak kabul edilmesi tartışılmaktadır (Skrypek vd. 2017). Ayrıca EMT sürecinin plastisitesinde önemli rol oynayan birçok EMT-TF ve epigenetik modifiye edici enzimlerin transkripsiyonel olarak regülasyonundan sorumlu miR-200 ailesinin üyelerinin ekspresyonları da regüle ettikleri EMT-TF'lerin öncülük ettiği metilasyon mekanizması ile baskılanmaktadır (Skrypek vd. 2017).



**Şekil 2-10** EMT sürecinin yönetilmesinde kritik bazı metilasyon aracılı mekanizmalar (Skrypek vd. 2017).

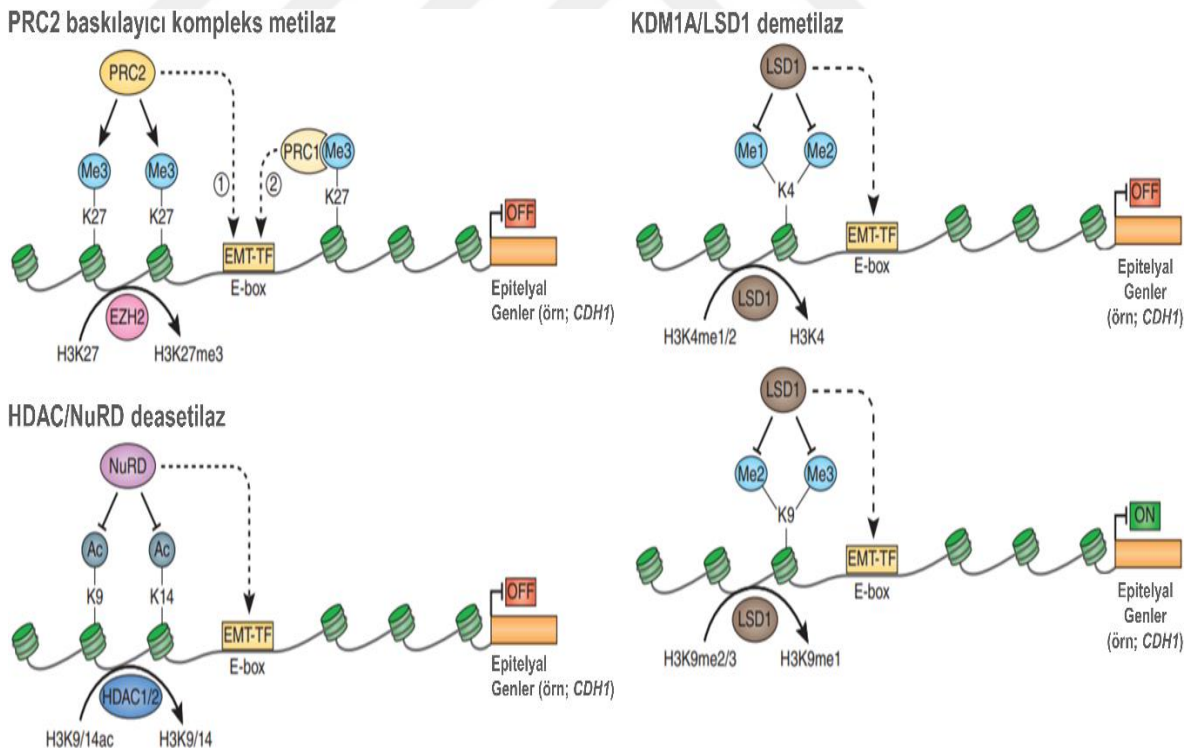
### 2.3.4.2. Histon modifikasyonları

Nükleozom yapısını oluşturan H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinleri DNA'nın paketlenmesindeki kritik rollerine ilaveten gen ekspresyonlarının transkripsiyonel düzeyde regülasyonunda da önemli rol oynamaktadırlar. Histon proteinlerinin N-terminal kuyruk bölgelerindeki lizin (K) ve arjinin (R) aminoasitlerinde metilasyon, asetilasyon, ubikitinasyon, fosforilasyon ve sumolasyon gibi birçok post-translasyonel modifikasyonlar gerçekleşmektedir. Bu modifikasyonlar hem histon-DNA etkileşimlerini doğrudan değiştirerek hem de farklı kromatin yeniden düzenleme proteinleri ve RNA polimeraz kompleksinin fonksiyon göstermesine olanak vererek dolaylı yoldan gen ekspresyonlarını regüle etme kabiliyetindedir (Bannister vd. 2011).

EMT sürecinin indüklenmesi ile epitelyal fenotipi sağlayan genlerin bulunduğu kromatin bölgeleri, H3Kac asetilasyonu ve H3K4me3 metilasyonu ile aktif bir durumdan, öncelikle H3K27me3 ve H3K4me3 metilasyonları ile tam olarak inaktif olmayan ara bir duruma, akabinde de H3K27me3 ve H3K27me3 metilasyonları ile epitelyal genlerin ekspresyonlarının stabil olarak baskılandığı nihai durumuna dönüşmektedir. Bunun tam tersi şekildeki bir mekanizma ile mezenkimal fenotipin kazanılmasına neden olan genlerin bulunduğu kromatin bölgeleri kademeli olarak inaktif konumdan aktif bir konuma geçmesiyle EMT süreci başarılı bir şekilde indüklenmektedir (Skrypek vd. 2017).

Şekil 2.10'daki modelde görüldüğü üzere flavin içeren amino oksidaz enzimi olan *Lysine Demethylase 1A* (LSD1) H3 histon proteinlerindeki 4. lizin (K) grubundaki tek veya ikili metil gruplarını çıkarmakta ve böylece aktif konumdaki kromatini inaktive edebilmektedir. Bunun yanısıra H3 proteinindeki 9.lizindeki 2 veya 3 adet bulunan metil grubunun tek metil grubuna döndürülmesi ile epitelyal genlerin bulunduğu kromatin aktivelebilmektedir (Tam vd. 2013). Çeşitli kanser tiplerinde LSD1 ekspresyon seviyesinin artmış olduğu rapor edilmiştir ve bu aşırı ifadenin *CDH1* geninin baskılanmasının yanısıra hücre migrasyonu-invazyonu ile ilişkili birçok mezenkimal genin aşırı ifadesine neden olduğu gösterilmiştir (Amente vd. 2013, Lin vd. 2010). Birçok alt ünitelerden oluşan *Mi-2/Nucleosome-Remodeling and the Deacetylase* (NuRD) adı verilen bir protein kompleksi de deasetilasyon kromatin modifikasyonu aracılığıyla gen ekspresyonlarını baskılayabilmektedir (Şekil 2.10). Bu kompleks, TWIST ve ZEB gibi EMT-TF'ler ile etkileşerek aktif kromatin bölgelerindeki H3K9, H3K14 ve H3K27'deki asetil gruplarını çıkararak *CDH1* gen ifadesini baskılayabilmektedir (Fu vd. 2010, Skrypek vd. 2017, Tam vd. 2013).

Histon modifikasyonları ile gen ifadesini düzenleyen *Polycomb repressive complex 1* (PRC1) ve *Polycomb repressive complex 2* (PRC2) protein kompleksleri de EMT sürecinde kritik öneme sahiptir (Paranjape vd. 2014). Bu kompleksler kanser hücrelerinde EMT sürecinin birçok farklı mekanizmalarında düzenleyici role sahiptirler (Şekil 2.11). PRC2 kompleksi, SNAIL transkripsiyon faktörlerinin SNAG domainleri ile doğrudan etkileşerek ve ZEB transkripsiyon faktörleriyle ise *C-terminal binding protein* (CtBP) proteini aracılığıyla dolaylı yoldan etkileşerek *CDH1* geninin kalıcı olarak baskılanmasında kritik öneme sahiptir (Herranz vd. 2008, Skrypek vd. 2017, Tong vd. 2011). Bunu ilgili bölgedeki kromatinin H3K27'deki trimetilasyon mekanizmasının sonucu kromatini inaktif hale döndürerek gerçekleştirmektedir (Tam vd. 2013). Ayrıca, TGF- $\beta$  ile uyarılan kanser hücrelerinde PRC2 kompleksi miR-200 ailesi üyelerinin ekspresyonlarını baskılayarak, ZEB1 ve ZEB2 transkripsiyon faktörlerinin ifadelerini artırmaktadır. Bununla birlikte bir diğer PRC kompleksi olan PRC1, hipoksi koşullarındaki hücrelerde EMT sürecini indüklemek amacıyla *TWIST1* gen ekspresyonunun artışıyla rol oynamaktadır (Skrypek vd. 2017).



**Şekil 2-11** EMT sürecinin yönetilmesinde rol alan çeşitli histon modifikasyon mekanizmaları (Skrypek vd. 2017).

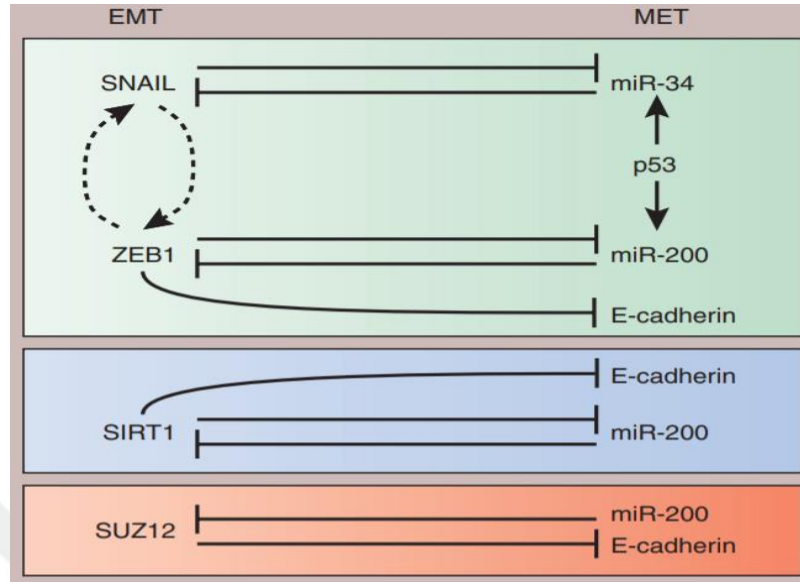
### 2.3.4.3. Kodlanmayan RNA'lar (ncRNA)

Geçmişte biyolojik olarak herhangi bir fonksiyona sahip olmadığı düşünülen kodlanmayan RNA moleküllerinin artık gen ekspresyonunun regülasyonlarının olmazsa olmaz bir parçası oldukları ve embriyonik gelişim, farklılaşma ve hatta kanser dahil birçok hastalığın patogeneğinde kritik rol oynadıkları bilinmektedir. Bu kodlanmayan RNA içerisinde karsinogenezdeki rolleri en çok araştırılan ve bilgi sahibi olunan mikroRNA (miRNA) ve uzun kodlanmayan RNA (lncRNA) molekülleridir. Her iki molekül sınıfı da kanser hücrelerinin EMT süreçlerinde önemli fonksiyonlara sahiptirler (Esteller 2011, Skrypek vd. 2017).

miRNA'lar, hem doğrudan EMT-TF'lerin hem de bu transkripsiyon faktörlerin ko-faktörleri olarak fonksiyon gösteren SUZ12 (PRC2 kompleksinin yapısına katılan bir protein), DNMT, SIRT deasetilaz gibi epigenetik modifiye edici ve kromatin yeniden modelleme moleküllerinin ekspresyonlarını regüle ederek EMT sürecine katkıda bulunmaktadır (Tam vd. 2013). EMT sürecinin yönetilmesinde miR-34 ve miR-200 ailesi üyesi olan miRNA'lar en kritik öneme sahiptir (Şekil 2.12). Bu miRNA ailelerine mensup olan miR-34 ve miR-200 üyeleri, EMT sürecinin epigenetik olarak regülasyonunu gerçekleştiren EMT-TF'leri ve kromatin modifiye edici molekülleri doğrudan regüle edebilmektedir.

Ayrıca bu miR-34 ve miR-200 üyelerinin ekspresyonları negatif feedback olarak bu EMT-TF'ler ve epigenetik modifiye edici kompleksler tarafından sıkı bir şekilde denetlenmektedir. Bu önemli mekanizma, kanser hücrelerine metastaz sürecinin başarılı bir şekilde gerçekleştirmesine olanak sağlayan plastisite özelliğini kazandırmaktadır (Tam vd. 2013). EMT sürecini kontrol eden en önemli miRNA üyeleri doğrudan EMT-TF'ler ve invazyon ile ilişkili faktörleri regülasyonundan sorumlu olanlardır. Ancak bunun dışında miR-21 ve miR-544a gibi çeşitli epitelyal belirteçleri hedef alarak EMT indükleyici olarak fonksiyon gösteren miRNA'lar da önemlidir (Liu vd. 2015, Yanaka vd. 2015).





**Şekil 2-12** miR-34 ve miR-200 üyesi miRNA'ların EMT-TF ve çeşitli kromatin modifiye edici faktörler ile olan etkileşimleri (Tam vd. 2013).

miRNA'lara benzer şekilde, bazı lncRNA'lar da EMT-TF'lerin ekspresyonlarını doğrudan regüle etmektedir. ZEB1 antisens-1 (ZEB1-AS1) and ZEB2 antisens-1 (ZEB2-AS1) lncRNA'ları, sırasıyla ZEB1 ve ZEB2 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını artırarak birçok kanser türünde metastaz kapasitesinin artmasına ve kötü prognoza yol açmaktadır. Bu mekanizma ile ZEB mRNA'sının translasyonunda önemli rol oynayan *internal ribosome entry site* (IRES) bölgesini içeren 5' ucundaki bir intron kırılması engellenir ve ZEB protein seviyesinin artmasına sağlanır (Beltran vd. 2008, Li vd. 2015). Aralarında HOTAIR, EBIC, H19, MALAT1, SPRY4-IT1 ve UBC gibi birçok lncRNA, PRC2 kompleksi ile fiziksel olarak etkileşerek bu baskılama kompleksini spesifik kanser gen bölgelerine yönlendirir ve EMT'nin epigenetik kontrolüne de bu şekilde katkı sağlayabilirler (Skrypek vd. 2017). Bu tip mekanizmanın haricinde HOTAIR, SNAI1 ve EZH2 proteinleri arasında fiziksel bir "scaffold" olarak görev alır ve sonuç olarak SNAI1'in baskılayıcı aktivitesi için gereklidir (Battistelli vd. 2016).

### 2.3.5. Translasyonel ve translasyon sonrası regülasyonu

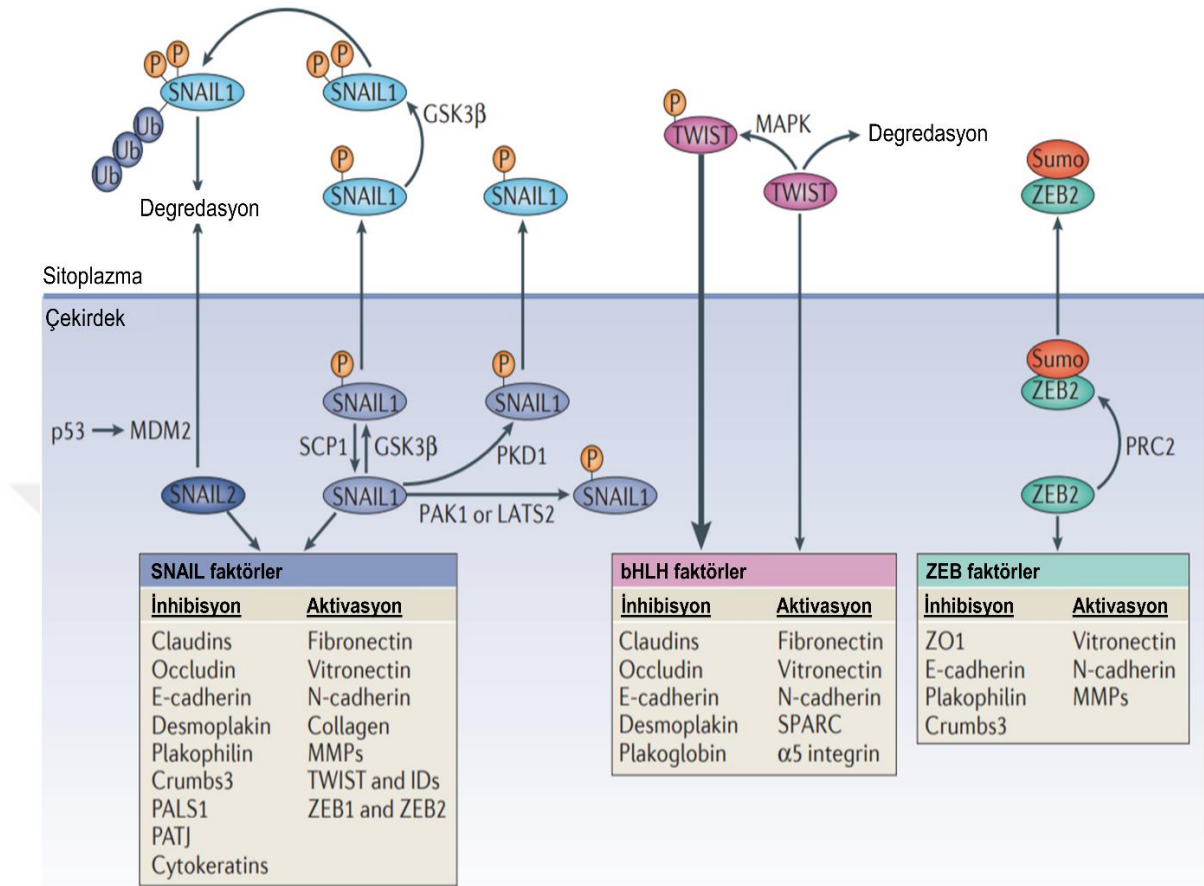
EMT süreci translasyonel olarak ve translasyon sonrası çeşitli mekanizmalar aracılığıyla sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Translasyonel kontrole en güzel örneklerden biri, *Y-box-binding protein-1* (YB-1) artan seviyesine bağlı olarak SNAI1 mRNA'sının cap-

independent translation (CITE) mekanizması aracılığıyla translasyonunun artırmasıdır. Bunun sonucunda da EMT indüksiyonu ve metastaz kapasitesinde artış olmaktadır (Evdokimova vd. 2009).

EMT sürecinin yönetilmesinden başlıca sorumlu olan SNAIL, ZEB ve bHLH EMT-TF'lerinin ekspresyon seviyelerinin artışı EMT'nin başarılı bir şekilde indüklenmesi için yeterli değildir. Bu EMT-TF'lerin ekspresyon seviyelerindeki artışlarına ilaveten aktivitelerinin, hücresel lokalizasyonlarının ve stabiltelerinin kontrol edildiği translasyon sonrası regülasyonları da kritik bir öneme sahiptir (Lamouille vd. 2014).

Genel olarak kanonikal WNT sinyal yolağı olmak üzere NOTCH ve NFKB gibi sinyal yollarında da görev alan bir serin-treonin kinaz olan Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) proteini, SNAI1 transkripsiyonunun translasyon sonrası kontrolü için kritik bir öneme sahiptir (Şekil 2.13). SNAI1'in GSK3 $\beta$  tarafından birinci fosforilasyonu sonucunda bu proteinin çekirdek dışına geçişi sağlanır, bunun akabinde gerçekleşen ikinci bir fosforilasyon ise SNAI1'in ubiquitin aracılı proteozomal degradasyonuna neden olur (Lamouille vd. 2014). Yine aynı şekilde protein kinaz D1 (PKD1) tarafından SNAI1 fosforilasyonu, bu proteinin çekirdek dışına geçişini indüklemektedir. Bunun aksine *p21 activated kinase 1* (PAK1) ve *large tumour suppressor 2* (LATS2) proteinleri tarafından gerçekleşen SNAI1 fosforilasyonları bu transkripsiyonun hücre çekirdeğindeki lokalizasyonunu stabil hale getirmektedir. Ayrıca, *small C-terminal domain phosphatase1* (SCP1) ise GSK3 $\beta$  tarafından fosforillenmiş SNAI1 proteinini fosfataz aktivitesi ile defosforile eder ve SNAI1'in hücre çekirdeğindeki lokalizasyonuna katkı sağlar (Du vd. 2010, Lamouille vd. 2014).

SNAI2 transkripsiyon faktörünün translasyon sonrası regülasyonu ise önemli bir tümör baskılayıcı olan p53 tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (Şekil 2.13). Hem KHDAK hasta örneklerinde hem hücre hatlarında herhangi bir mutasyona sahip olmayan (wt) p53'ün MDM2 seviyesinin yükselmesine ve akabinde SNAI2'in MDM2 aracılı ubiquitin aracılı proteozomal degradasyonunu sağladığı ve sonucunda EMT sürecinin ve invazyonun indüklenmesini engellediği gösterilmiştir (Wang vd. 2009). TWIST transkripsiyon faktörlerinin translasyon sonrası kontrolü p38, JNK ve ERK MAPK proteinleri tarafından gerçekleşmektedir. Bu MAPK üyeleri tarafından fosforile edilen TWIST transkripsiyon faktörü proteozomal degradasyondan korunur ve hücre çekirdeğine göçünün indüklenmesiyle aktivasyonu sağlanır (Hong vd. 2011). ZEB2 transkripsiyon faktörünün translasyon sonrası kontrolü ise PRC2 tarafından sumolasyon adı verilen modifikasyonla sağlanır (Şekil 2.13). PRC2 tarafından sumolasyonu sağlanan ZEB2 hücre çekirdeği dışına gönderilir ve transaktivasyonu inhibe edilir (Long vd. 2005).



**Şekil 2-13** SNAIL, bHLH ve ZEB grubu EMT-TF'lerin çeşitli modifikasyonlar aracılığıyla translyasyon sonrası regülasyonları (Lamouille vd. 2014).

Fosforilasyonun ve sumolasyon gibi mekanizmalara ilaveten bazı EMT-TF'lerin asetilasyonları da önemli translyasyon sonrası modifikasyonlardır. *CREB Binding Protein* (CBP) proteini tarafından SNAI1 transkripsiyon faktörüne asetil gruplarının eklenmesi onun gen ekspresyonunu baskılayıcı proteinlerle kompleks oluşturmasını engeller. Bunun sonucunda SNAI1 molekülü, bir gen baskılayıcı faktörden bir gen aktivatörüne dönüşerek karsinogeneze EMT sürecinin dışındaki farklı mekanizmalarla katkı sağlar (Hsu vd. 2014). Ayrıca, hiperglisemik şartlar altında kanser hücrelerinde SNAI1 proteini serin-112 bölgesinden O-GlcNAcylation modifikasyonu gerçekleşir. Bu modifikasyon sonucunda SNAI1 transkripsiyonunun transaktivasyonu sağlanarak EMT süreci indüklenebilmektedir (Park vd. 2010).

### 2.3.6. Akciğer kanseri ve EMT

*In vitro* ve *in vivo* çalışma modelleriyle EMT'nin, kanser hücrelerinin migrasyon-invazyonları, kemoterapötik ilaçlara direnç mekanizmalarının geliştirilmesi ve kök hücre fenotipinin kazanılması gibi malignant karakterlerine katkı sağladığı kanıtlanmıştır. Klinik olarak korelatif çalışmalarda da tümör hücrelerinin mezenkimal fenotip ile kötü derecede farklılaşma (*poor differentiation*) ve hastaların kötü prognozları ile korele oldukları rapor edilmiştir (Sato vd. 2012). EMT sürecinin en önemli olmazsa olmaz belirteci kalsiyum-bağımlı hücre-hücre adezyonu ve epitelyal polarizasyon için elzem olan E-kaderin ekspresyonunun baskılanmasıdır. Akciğer kanserindeki genetik veya epigenetik mekanizmalar ile gerçekleşen E-kaderin ekspresyon veya fonksiyon kaybı diğer kanser türleri ile kıyaslandığında çok yaygın değildir. Bazı çalışmalarda ise E-kaderin akciğer kanser hastalarının kötü prognozları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Nakata vd. 2006, Toyooka vd. 2001).

*Thyroid transcription factor 1* (TTF-1) akciğer morfogenezi için olmazsa olmaz bir transkripsiyon faktördür ve ekspresyonu akciğer kanseri vakalarının diagnostik değerlendirmesi için rutin olarak kullanılmaktadır (Schilsky vd. 2017). Akciğer adenokarsinomalarında genellikle eksprese olmaktadır ve varlığı KHDAK hastaları için iyi bir prognostik belirteç olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca, TTF-1 ekspresyon kaybının da akciğer adenokarsinoma tümörlerinin kötü derecede farklılaşması ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Chang vd. 2004, Schilsky vd. 2017). TTF-1 bir transkripsiyon faktör olarak TGF- $\beta$  ile indüklenen SNAI1 ve SNAI2 ekspresyonlarını inhibe edebildiği ve TTF-1 ekspresyon seviyesinin akciğer adenokarsinoma tümörlerin epitelyal fenotipi ve azalan migrasyon ve invazyona kapasitesi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Saito vd. 2009).

Akciğer kanser vakalarında sıklıkla *EGFR* gen mutasyonları görülmektedir ve bu mutasyonlar EGFR proteinin aktivasyonuna yol açan ve akciğer karsinogenezi için önemli onkogenik değişimlerdendir (Sato vd. 2007). Bu reseptörün önemli bir ligandı olan EGF ise EMT sürecinin güçlü indükleyicileri arasındadır (Said vd. 2011). Bu sebeple EGFR proteinin ligand bağımsız aktivasyonuna yol açan mutasyonların da akciğer kanser hücrelerinin mezenkimal fenotipine katkı sağlayacağı düşünülmekteydi. Ancak hem akciğer kanser hücre hatlarında hem de klinik örneklerde *EGFR* mutasyonlarının hücrelerin epitelyal fenotip ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Deng vd. 2009, Takeyama vd. 2010). Ayrıca, SNAI2 ve ZEB1 EMT-TF'lerin akciğer kanser hücrelerinin gefinitib gibi EGFR-tirozin kinaz inhibitörlerine (EGFR-TKI) karşı direnç kazanmalarında rol oynamaktadır (Sato vd. 2012).

## 2.4. Hücresel Plastisite

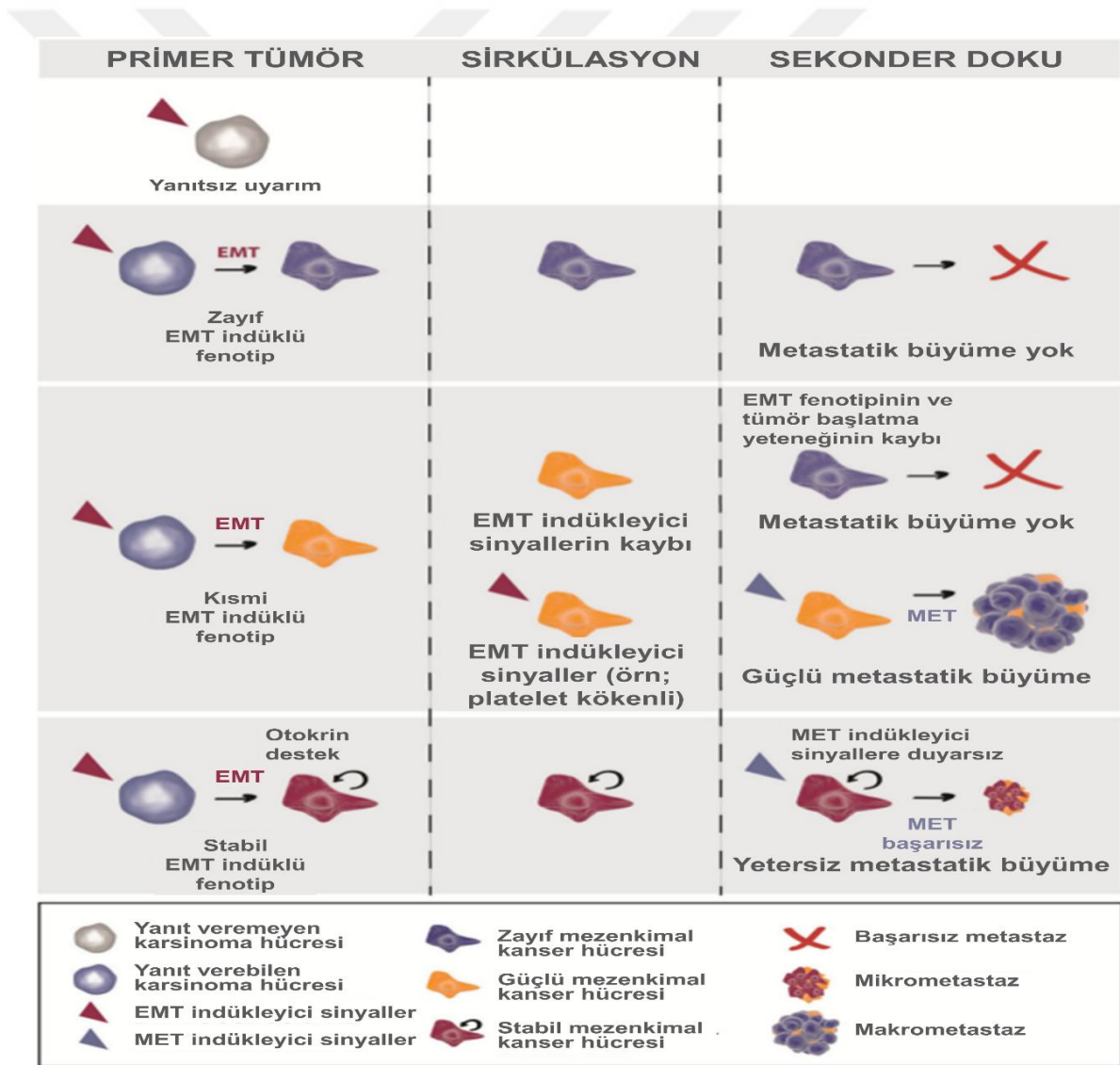
Son birkaç yılda, hücre ve kanser biyologları tarafından hem sağlıklı hem de malignant hücrelerde hücre adezyonu ve hücre iskeleti dinamiklerini kontrol eden hücre migrasyonu mekanizmaları aydınlatılmıştır (Sanz-Moreno vd. 2010). Ancak, invaziv ve metastatik kanser hücre migrasyonunu yöneten baskın sinyal iletim yollarını, reseptör-ligand ve proteaz-substrat etkileşimlerini etkin bir şekilde engelleyebilecek mekanizmaların tanımlanması büyük oranda başarısız olmuştur. Bunun altında kanser invazyonu ve metastazının heterojen ve adaptif bir süreçler olması yatmaktadır. Bu doğrultuda odaklanmamız gerekenin kanser hücrelerinin farklı yapısal, moleküler ve hatta elverişsiz tümör mikroçevrelerinde bile invazyonunu ve metastazını gerçekleştirmesine olanak sağlayan, kök hücre fenotipi kazanması-farklılaşması süreçlerini ve kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen direnç kazanmalarını yöneten “hücresel plastisite” mekanizmasının olduğu savunulmaktadır (Friedl vd. 2010, Sanz-Moreno vd. 2010).

### 2.4.1. EMT-MET plastisitesi

Metastaz sürecinin başarıya ulaşabilmesindeki en önemli nokta, karsinoma hücrelerinin primer tümörden ayrılmasına, dolaşım sisteminde sağ kalabilmesi ve sekonder tümör bölgesine ulaşabilmesine olanak sağlayacak derecede mezenkimal özelliklerin kazanması ve aynı zamanda da kısmi olarak epitelyal fenotipinin korunduğu *partial*-EMT mekanizmasıdır. Kısmi ölçüde indüklenen bu EMT süreci, karsinoma hücrelerinin sekonder bölgede kolonizasyonunu ve makrometastatik lezyonları oluşturması için mezenkimal-epitelyal transisyon (MET) süreci ile yeniden epitelyal özelliklerin ağırlıklı olduğu bir fenotipe dönüşmesine olanak sağlar (Chaffer vd. 2016, Gunasinghe vd. 2012, Stankic vd. 2013).

Primer tümör mikroçevresindeki karsinoma hücreleri, EMT sürecini indükleyici faktörler aracılığıyla migrasyon-invazyon yeteneklerinin yanısıra yeniden tümör başlatma potansiyeli de kazanırlar. Bu EMT indüksiyonunun minimum seviyede gerçekleşmesi metastazın başarıya ulaşmasına katkı sağlayamaz (Şekil 2.14). Bununla birlikte EMT'nin geri dönüşümsüz şekilde maksimum seviyedeki indüksiyonu da stabil mezenkimal kanser hücrelerin oluşmasına neden olur. Bu stabil mezenkimal kanser hücreleri azalan kolonizasyon yetenekleri sonucunda makrometastatik lezyonları oluşturamazlar. Ancak, EMT sürecinin yukarıda da ifade edildiği üzere kısmi derecedeki indüksiyonu ile kanser hücrelerin metastatik kaskat boyunca hücresel plastisitelerini koruması ve sekonder tümör

bölgesinde de EMT'nin tam tersi olan süreci olan MET'i indüklemesi ile metastaz başarıya ulaşabilmektedir. Sekonder tümör bölgesindeki MET sürecinin indüklenmesi EMT indükleyici sinyallerin kaybolması ile olabildiği gibi, doğrudan o bölgeden kaynaklı MET indükleyici sinyaller tarafından da gerçekleşebilmektedir. Diğer taraftan, kanser hücrelerinin sekonder bölgeye ulaşmadan EMT özelliklerinin erken kaybı da metastatik kolonizasyonun başarısız olmasına neden olabilmektedir (Chaffer vd. 2016). Bu bilgiler ışığı altında, karsinoma hücrelerine EMT-MET plastisitesi yeteneğini kazandıran mekanizmalarının belirlenmesi; hastalığın şiddetini teşhis etme, progresyonun ve nüksetme risklerinin belirlenmesi ve etkili tedavi yöntemleri geliştirilmesi için kritik bir önem arz etmektedir.



**Şekil 2-14** EMT-MET plastisitesinin metastazın oluşumundaki rolü (Chaffer vd. 2016).

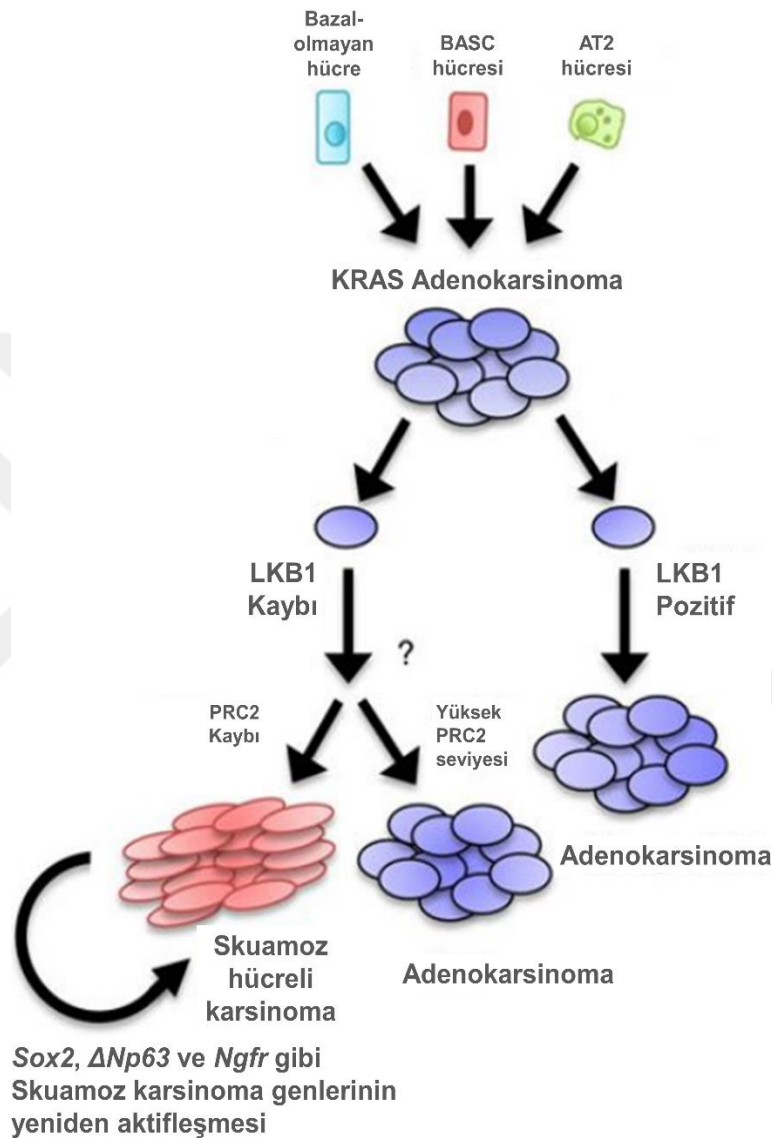
### 2.4.2. Transdiferensiyon ve plastisite

Farklılaşmasını tamamlamış ve fonksiyonel olgun dokularda gelişen yaralanma veya inflamasyona fizyolojik cevabın bir parçası olarak ilgili dokudaki hücreler transforme olarak kimliklerini değiştirebilirler. Bu tür transformasyonlar hücresel düzeyde olabildiği gibi (transdiferensiyon olarak adlandırılır), tüm doku düzeyinde de (metaplazi olarak adlandırılır) gerçekleşebilmektedir (Merrell vd. 2016). Bu süreçler dokudaki kronik bir hasar durumunda hem hasar gören bölgelerin yeniden oluşturulması hem de hasarın daha da ilerlememesi için bir tampon bölgenin oluşturulması amacıyla koruyucu bir mekanizma olarak indüklenmektedir.

Farklı organlarda bu süreçlerin birçok örneği bulunmaktadır. Örneğin, pankreasta meydana gelen pankreatitis (inflamasyon) sonucunda asinar tip hücreler duktal tip hücrelere transforme olmaktadır (Rijkers vd. 2017). Diğer bir sık rastlanan örnek ise "*Helicobacter pylori*" enfeksiyonu, sigara, alkol ve aşırı tuz tüketimi gibi durumlarda asit salgılayan "*parietal*" hücreleri ve enzim üreten "*chief*" hücreleri tubular tip intestinal epitelyum hücrelerine transforme olmaktadır (Giroux vd. 2017). Tüm bu örneklerdeki transdiferensiyon süreçleri, ilgili dokularda karsinogenez ile çok sıkı bir ilişki içindedir (Yuan vd. 2019). Akciğer dokusunda da kronik hasara cevaben koruyucu bir mekanizma olarak skuamoz metaplazisi oluşur ve çoğunlukla skuamoz karsinomaya evrilen malign transformasyonu tetiklemektedir. (Dotto vd. 2016).

Günümüzde artık metaplazinin ve transdiferensiyon süreçlerinin, hücreleri onkogenik uyarıcıların transforme edici etkilerine karşı duyarlı hale getirdiği hipotezi kabul görmektedir. Transdiferensiyon, geniş kromatin bölgelerindeki büyük yapısal değişimlerle sağlanan gen ekspresyonlarındaki dinamik ve büyük çaplı değişimlerle meydana gelmektedir. Dokunun akut hasarlarla mücadele edebilmesine olanak sağlayan bu epigenetik ve transkripsiyonel değişimler, onkogenik genlerin aktifleşmesine ve tümör baskılayıcı genlerin ise baskılanmasına neden olarak malign transformasyonun yolunu açmaktadır. Ayrıca epigenomdaki bu tür büyük değişimler, karsinogenez süresince onkogenlerin daha etkili fonksiyon göstermelerine bağlı olarak kanser hücrelerinin transdiferensiyon ve plastisite yeteneklerinin ortaya çıkması için daha elverişli bir ortam oluşturmaktadır (Yuan vd. 2019). Şekil 2.15'teki modelde görüldüğü üzere, akciğerde "*alveolar type II*" (AT2) ve "*bronchioalveolar*" kök hücrelerindeki (BASC) önemli bir tümör baskılayıcı olan *serine/threonine kinase 11* (LKB1) kaybı, hem KRAS-indüklü akciğer adenokarsinomaların

karsinogenezine destek olur hem de oluşan bu adenokarsinomaların skuamoz karsinomaya transformasyonu sürecine de katkı sağlamaktadır (Zhang vd. 2017).

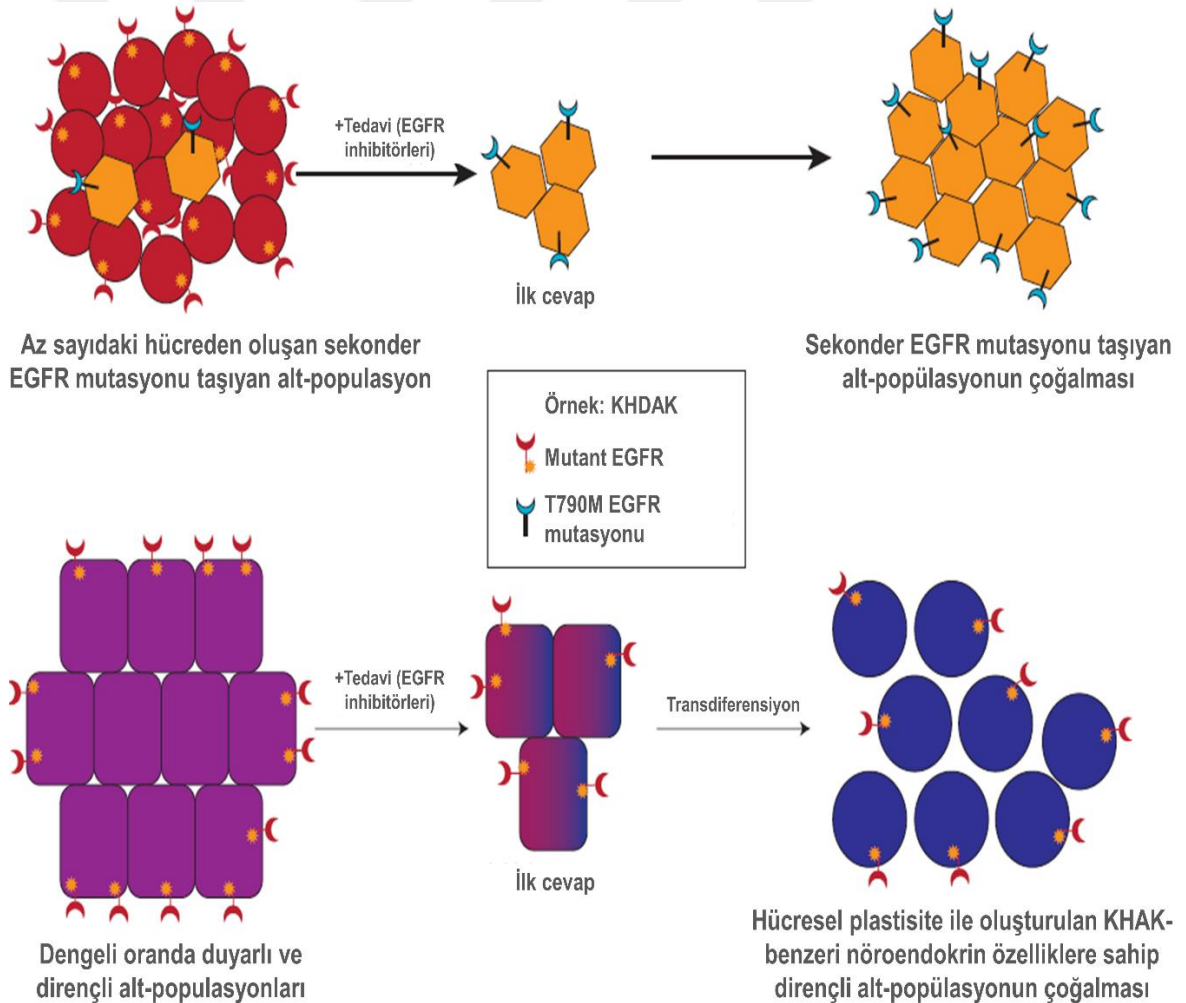


**Şekil 2-15** LKB1 gen kaybı KRAS-indüklü akciğer adenokarsinomalarının skuamoz hücreli karsinomaya transformasyonu yönetir (Zhang vd. 2017).

Transdiferensiyon ve hüresel plastisite mekanizmaları kanser hücrelerinin kemoterapiye karşı direnç kazanmalarında da kritik rol oynarlar. *EGFR* geninde aktive edici mutasyonlara sahip akciğer kanser hastaların çoğunda *EGFR* inhibitörlerine olumlu bir cevap alınmaktadır. Ancak bu olumlu gidişat, tipik olarak kanserin nüksetmesi ve ilerlemesine devam etmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu direnç, genel olarak *EGFR* sinyal yolağının “downstream” onkogenik faktörlerinde aktive edici mutasyonların oluşması veya epigenetik aktivasyonları, *EGFR*



geninde sekonder mutasyonlar (T790M mutasyonu gibi) ve EMT sürecinin indüklenmesi gibi mekanizmalarla kazanılmaktadır (Zhang vd. 2017). Ancak bunlardan farklı olarak bir direnç mekanizması daha bulunmaktadır (Şekil 2.16). Bu direnç mekanizmasında plastisite yeteneği kazanabilen akciğer karsinoma hücreleri (KHDAK), transdiferensiyon süreci ile KHAK benzeri nöroendokrin transformasyonu gerçekleştirebilirler (Sequist vd. 2011, Tulchinsky vd. 2019, Yu vd. 2013). KHAK hücreleri *EGFR* genini eksprese etmezler ve karsinogenezleri boyunca sağkalımları ve çoğalmaları EGFR sinyal yolağından bağımsız yönetilir. KHDAK hücrelerinin KHAK benzeri nöroendokrin farklılaşmaları ile EGFR ekspresyon kaybı gerçekleşmekte ve hücreler EGFR inhibitörlerine karşı dirençli hale gelmektedir (Tulchinsky vd. 2019, Yuan vd. 2019).



**Şekil 2-16** KHDAK hücrelerinin hüresel plastisite tarafından indüklenen KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşması ile kazanılan kemoterapiye direnç (Yuan vd. 2019).

## 2.5. Special AT-rich sequence-binding protein-2 (SATB2)

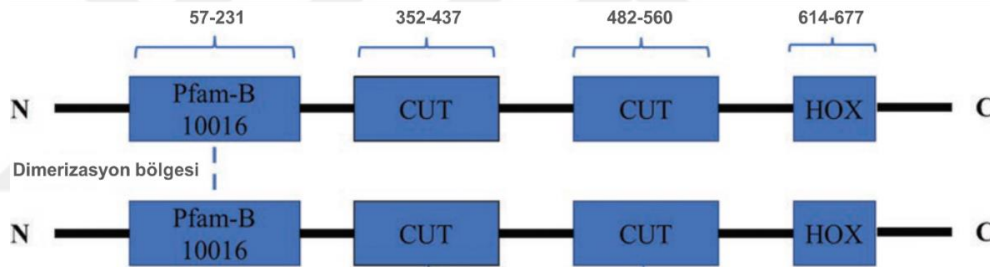
*Special AT-rich sequence-binding protein-2* (SATB2), DNA'da nüklear matriks ilişkili (*Nuclear/Scaffold Matrix Associated Region*; MAR/SAR) bölgelerine bağlanan kromatin yeniden modelleme proteindir. MAR/SAR, kromatin loop domainlerinin oluşumuna aracılık eden ve spesifik olarak nüklear matrikse bağlanan DNA sekanslarıdır. Bu DNA sekansları yaklaşık olarak 200 bp uzunluğunda, A-T nükleotidlerce zengin ve topoizomeraz II konsensüs sekanslarını içermektedir (Wang vd. 2010). Bu protein, az sayıda gene sahip 2. kromozomun uzun kolunun 2q32-2q33 bölgesinde lokalize olan 191 kb uzunluğundaki *SATB2* geninden transkribe olmaktadır. Olgun mRNA'sı 11 ekzon içermekte olup, proteini 733 aminoasitten oluşur ve 82 kDa ağırlığındadır. İlk keşfedildiğinde KIAA1034 adı verilen bu protein, daha sonrasında gen ekspresyonunu üst seviyede kromatin organizasyonu ile entegre edebilen kilit bir regülatör olarak bilinen *Special AT-rich binding protein 1* (SATB1) proteinine olan çarpıcı yapısal ve fonksiyonel benzerliğinin fark edilmesi ile SATB2 olarak yeniden isimlendirilmiştir (Britanova vd. 2005, Zhao vd. 2014).

### 2.5.1. Yapısı, regülasyonu ve fonksiyonları

SATB proteinleri, gelişimde çok kritik rollere sahip olan transkripsiyon faktörler ve genel transkripsiyonel düzenleyiciler olarak fonksiyon gösteren *homeobox* (HOX) gen ailesine ait CUT üst sınıfının üyeleridir. Bu CUT üst sınıfı da kendi içinde CUX, ONECUT ve SATB olmak üzere üç sınıfa ayrılır. SATB1 ve SATB2 proteinlerin dahil olduğu SATB sınıfı, diğer sınıflarına göre çok farklıdır. SATB proteinleri bir adet homeodomain ve onun upstream bölgesinde iki adet CUT domainleri içermektedir (Şekil 2.17). Temel olarak DNA'a bağlanma bölgeleri olarak fonksiyon gösteren bu üç domain birbirlerinin DNA'a bağlanma afinitelerini de artırmaktadır (Chen vd. 2019, Harada vd. 1994). Bunların haricinde yapısı %81 oranında korunan Pfam-B\_10016 adında dördüncü bir domaini bulunur ve bu domain fonksiyonel dimer yapısında SATB-SATB kompleksinin oluşması için gerekli etkileşim bölgesidir (FitzPatrick vd. 2003, Galande vd. 2001). SATB2, zebra balığı ve tavuktan memelilere kadar omurgalı türlerinde yüksek oranda korunmaktadır (Sheehan-Rooney vd. 2010).

SATB2 transkripsiyonel olarak BMP2/4/7 ligandları tarafından aktive olan SMAD1/5 kompleksi tarafından pozitif olarak regüle edildiği rapor edilmiştir (Bonilla-Claudio vd. 2012). Bunun dışında TNF- $\alpha$  ile aktivasyonu indüklenen NF $\kappa$ B transkripsiyon faktörünün doğrudan promotor bölgesine bağlanması sonucu SATB2 ekspresyonunu transkripsiyonel olarak

baskılanmaktadır (Zuo vd. 2018). SATB2 ekspresyonunun düzenlenmesine p38 ve ERK gibi MAPK sinyal yolları da katılmaktadır (Kucuksayan vd. 2017, Zuo vd. 2018). SATB2'nin regülasyonunda miRNA'larda önemli rol oynamaktadır. miR-31, miR-34c ve miR-182, SATB2'yi doğrudan hedef alarak negatif yönde regüle etmektedir (Naik vd. 2019). SATB1 proteinlerinin fosforilasyonları, transkripsiyonel aktivitelerini doğrudan regüle eden bir translayon sonrası modifikasyondur. Ancak, SATB2'nin regülasyonu hakkında kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, SATB1'e yüksek homoloji gösteren bir yapıda olduğu için benzer mekanizmaların SATB2'nin regülasyonunda da rol oynayabileceği düşünülmektedir (Naik vd. 2019). Fosforilasyon haricinde önemli bir translayon sonrası modifikasyon olan sumolasyon, SATB2'nin regülasyonunda kritik bir öneme sahiptir. *Protein Inhibitor Of Activated STAT 1* (PIAS1), SATB2'nin 233. ve 350. aminoasitlerine SUMO grupları ekleyerek proteini çekirdeğin periferik bölgelerine yönlendirmesine aracılık eder ve böylece transkripsiyonel aktivitesini engellemektedir (Dobrevva vd. 2003).



**Şekil 2-17** SATB1 ve SATB2 protein yapısının şematik gösterimi (Chen vd. 2019).

SATB2, kromatin yapısını üst seviyede yeniden modelleme yeteneğiyle aynı anda yüzlerce gen ekspresyonunu regüle edebilmesinin yanısıra doğrudan bir transkripsiyon faktör olarak da fonksiyon göstermesi nedeniyle eşsiz bir proteindir. Ayrıca, MAR/SAR bölgelerine bağlanarak gerçekleştirdiği kromatin yeniden modelleme işlemini, çeşitli histon deasetiltransferaz (örn; PCAF) ve deasetiltransferazları (örn; HDAC1) görevlendirerek de yapabilmektedir. SATB2 tarafından indüklenen bu global kromatin değişimleri gelişim süresince hücrelerin farklılaşması ve olgunlaşmasına olanak vermektedir (Chen vd. 2019, Gyorgy vd. 2008). SATB2 ilk olarak osteoblast hücrelerinin farklılaşmasında ve iskelet gelişiminin regülasyonunda kritik rol oynayan bir transkripsiyon faktör olarak keşfedilmiştir. Daha sonrasında nöron, kök ve immün sistem hücrelerinin de dahil olduğu çok farklı hücre tipinin farklılaşmasında düzenleyici role sahip olduğu gösterilmiştir (Dobrevva vd. 2006).

### 2.5.2. Akciğer kanseri ve SATB2

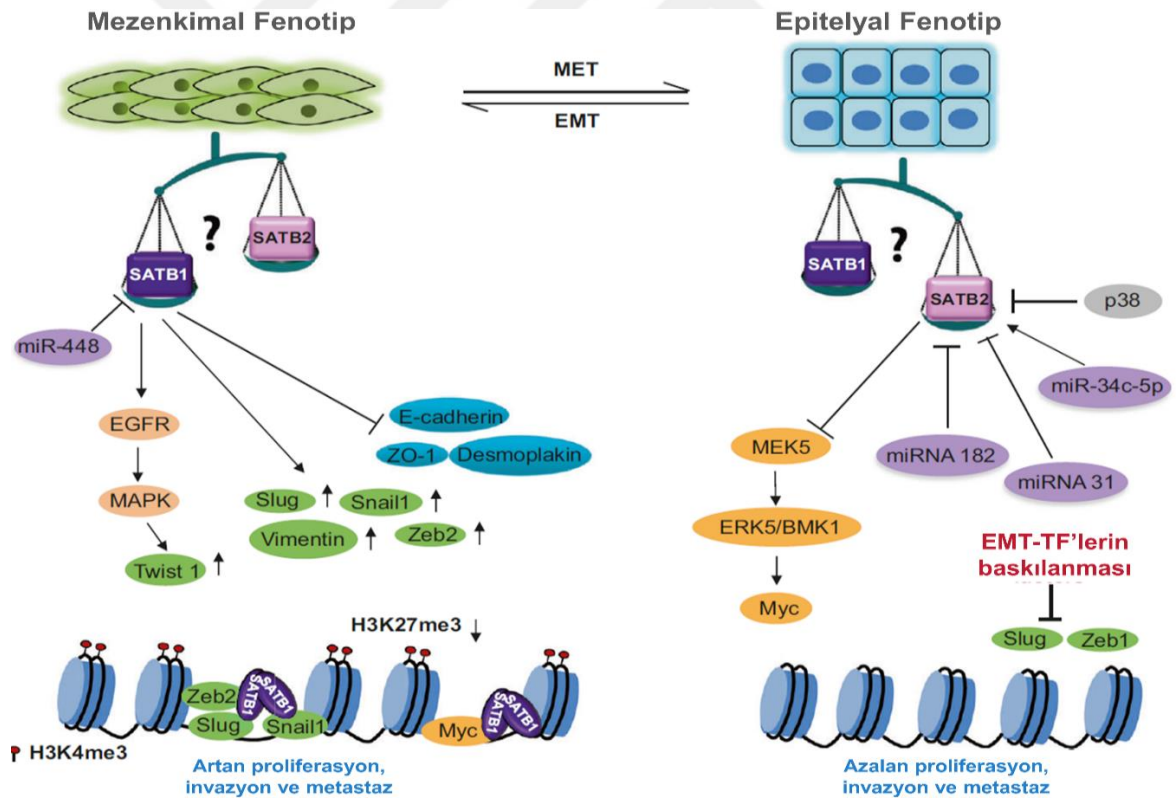
SATB2'nin, farklı kanser türlerinde hem tümör baskılayıcı hem de onkogen aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir. Diğer kanser türlerine nazaran, SATB2 daha çok kolorektal kanserde çalışılmakta ve hatta bu kanser türü için rutin olarak diagnostik bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Brocato vd. 2014). Larenks (gırtlak) kanserinde bir tümör baskılayıcı olarak fonksiyon gösterir ve ekspresyon kaybı hastalığın nüksetmesi ve ileri tümör evresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Brocato vd. 2014). Osteosarkomalarda SATB2 ekspresyonu hücre migrasyonunu ve invazyonunu artırmaktadır (Seong vd. 2014). Baş-boyun kanserlerinde ise, SATB2'nin artan ifadesinin hastalarda kemoterapiye karşı dirence neden olduğu rapor edilmiştir (Chung vd. 2010).

SATB2'nin akciğer kanseri üzerindeki rolü ilk olarak çalışma grubumuz tarafından aydınlatılmıştır. SATB2 kaybının, KHDAK hücre EMT ve invazyonunu indüklediği gösterilmiştir (Kucuksayan vd. 2016). Ayrıca, SATB2'nin azalan ekspresyonunun KHDAK hastalarının kötü prognozları ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir. Aynı çalışmada SATB2'nin artan ekspresyonunun, bir histon metil transferaz "*G9A Histone Methyltransferase*" (G9a) enziminin ifadesini baskıladığı ve sonucunda H3K9me3, H3K27me3, H4K20me3 kromatin modifikasyonları ile KHDAK hücrelerinde EMT ve invazyonu inhibe ettiği de gösterilmiştir (Ma vd. 2018). Diğer bir çalışmada ise miR-875'nin SATB2'yi doğrudan hedef aldığı ve KHDAK hasta örneklerinde aralarında ters bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca farklı bir çalışmada, SATB2 ekspresyon seviyesinin KHDAK dokularında sağlıklı komşu dokulara kıyasla düşük seviyede olduğu gösterilmiştir (Wang vd. 2018). Bununla birlikte SATB2 aşırı ifadesinin sağlıklı insan bronş epitelyal hücrelerinde arsenik ile indüklenen malign transformasyonu yönettiği de keşfedilmiştir (Chen vd. 2018).

### 2.5.3. SATB2 ve EMT

SATB gibi kromatin yeniden modelleme proteinleri tarafından indüklenen büyük çaptaki kromatin değişimleri ve bu kromatin yapısındaki değişimlerin esnekliği, kanser hücrelerinin fenotipik plastisitelerinin yönetmek için olmazsa olmaz özelliklerdir. Bu bağlamda SATB proteinleri, kanser hücrelerinin kök hücre fenotipinin sağlanması-farklılaşması, EMT süreci ve malign transformasyonu gibi hücresel plastisitenin varlığını gerektiren birçok biyolojik olayda önemli role sahiptirler (Chen vd. 2019, Naik vd. 2019).

Literatürdeki bilgiler birlikte ele alındığında, kanser hücrelerinde indüklenen EMT sürecinin ve EMT-MET plastisitesinin, SATB1 ve SATB2 ekspresyon seviyelerinin arasındaki dinamik dengeye dayandığını öngören bir modelleme sunulmuştur (Şekil 2.18). Bu modele göre, SATB1 ve SATB2 ekspresyon seviyelerindeki orana bağlı olarak tümör invazyonu ve metastazı süresince EMT-MET plastisitesinin yönetimi sağlanmaktadır. SATB1 ekspresyonu, EMT-TF'lerin upregülasyonları ile pozitif bir ilişki içindeyken, epitelyal fenotipin korunmasından sorumlu E-kaderin, dezmozoplakin, ZO-1 gibi adezyon proteinlerinin ekspresyonları ile negatif bir korelasyona sahiptir (Tu vd. 2012). Buna karşın SATB2 ekspresyonunun artışı ile SNAI2 ve ZEB1 gibi EMT-TF'lerin baskılanarak epitelyal fenotipin korunmasına neden olmaktadır (Naik vd. 2019). miR-31, miR-34c ve miR-182 gibi miRNA'lar ise SATB2 ekspresyonunu regüle ederek EMT sürecinde önemli etkiye sahiptirler (Gu vd. 2018, Yang vd. 2014, Yang vd. 2014).



Şekil 2-18 SATB proteinlerinin EMT sürecindeki dinamik düzenleyici etkisi (Naik vd. 2019).

**Hipotez:** Gelişim ve farklılaşmada kritik öneme sahip hem bir kromatin yeniden modelleme proteini hem de bir transkripsiyon faktör olan SATB2'nin, KHDAK hücrelerinin EMT, invazyonu ve KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşmaları gibi süreçlerinin yönetilmesinde de önemli rol oynayacağını öngörmekteyiz.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda PC3, PC9, II-18, Hcc78, Hcc193, H1299, H1650, H1703, H1975 ve A549 KHDAK hücre hatları, H82, H209 ve N417 KHAK hücre hatları ve ostrosarkoma MG63 ve meme karsinoması MDA-MB-231 hücre hatları ile çalışıldı. A549 ve MG63 hücre hatlarının kültürü için %10 FBS içeren (FBS, Kat. No:10500064, Gibco) DMEM (Kat. No:41965-039, Gibco) kullanılırken diğer tüm hücre hatlarının kültürü için %10 Fetal Bovine Serum içeren RPMI 1640 (Kat. No:52400-025, Gibco) besiyerleri kullanıldı. Hücrelerin tamamı %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem ve 37°C'de koşullarında kültüre edildi.

#### 3.2. Kullanılan Kimyasallar

Tez kapsamı süresince kullanılan kimyasallar katalog numaraları ve temin edilen marka isimleri ile aşağıda yazılmıştır.

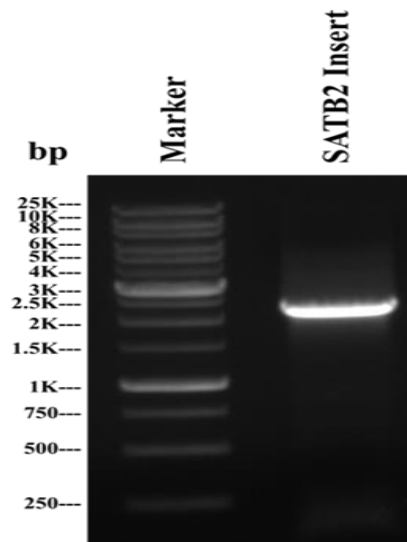
Rekombinat TGF- $\beta$ 1 (Kat. No: 580704) ligandı Biolegend Inc.'den temin edildi. SATB2 (Kat. No: sc-76456), SMAD2/3 (Kat. No: sc-37238), SMAD4 (Kat. No: sc- 29484), CTCF (Kat. No: sc- 35124), SNAI1 (Kat. No: sc- 38398), SNAI2 (Kat. No: sc- 38393) ve ZEB1 (Kat. No: sc- 38643) mRNA'larını spesifik olarak hedef alan *small interfering-RNA* (siRNA)'lar SantaCruz Biotechnology'den temin edildi. Hiçbir mRNA'ı hedef almayan negatif kontrol siRNA (Kat. No:6568) ise Cell Signaling Technology'den alındı. Çalışma kapsamında kullanılan antikorlar ise E-cadherin (Kat. No: 3195), N-cadherin (Kat. No: 13116), Zo-1 (Kat. No: 13663), Claudin-1 (Kat. No: 13255), CTCF (Kat. No: 3418), p-SMAD2/3 (Kat. No: 8828), SMAD2/3 (Kat. No: 8685), SMAD4 (Kat. No: 46535), SNAI1 (Kat. No: 3879), ZEB1 (Kat. No: 3396) ve GAPDH (Kat. No:5174) antikorları Cell Signaling Technology'den temin edildi. SATB2 (Kat. No: sc-81376) ve SNAI2 (Kat. No: sc-166476) antikorları SantaCruz Biotechnology'den temin edildi. Fibronektin (Kat. No: NBP1-91258) ve Occludin (Kat. No: H00004950-M01) antikorları ise Novus Biologicals'dan temin edildi. HRP-konjuge anti-rabbit sekonder antikor (Kat. No: 5450-0010) ve anti-mouse sekonder antikor (Kat. No: 5450-0011) Seracare Inc.'den temin edilmiştir. İmmünfloresans deneylerinde kullanılan Alexa Fluor-488-konjuge anti-rabbit (Kat. No: A27034), Alexa Fluor-555-kojuge anti-rabbit (Kat. No: A27039) ve DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) nüklear floresans boya (Kat. No: D1306) Thermo Fisher Scientific'den temin edildi. Plasmid vektör transfeksiyonları ve siRNA transfeksiyonları

için Lipofectamin 2000 (Kat. No:11668019, Thermo Fisher Scientific) ve Opti-MEM besiyeri (Kat. No:31985062, Thermo Fisher Scientific) kullanıldı. qPCR için kullanılan miRNA primerleri hsa-miR-657 (Kat. No: MS00010479), hsa-miR-1200 (Kat. No: MS00042392), hsa-miR-1229 (Kat. No: MS00042378), hsa-miR-1234 (Kat. No: MS00044555), hsa-miR-1243 (Kat. No: MS00014203), hsa-miR-3147 (Kat. No: MS00020657), hsa-miR-4779 (Kat. No: MS00039165) ve Snord61 (Kat. No: MS00033705) Qiagen Company'den temin edildi.

### 3.3. SATB2'nin pcDNA3.1 Vektörüne Klonlanması

#### 3.3.1. SATB2 insert'nün eldesi

Uygun hacimde trizol ile toplanan 293T hücrelerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen total mRNA'dan, cDNA sentez kiti (Kat no: 4368814, Applied biosystems) 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 3.1).



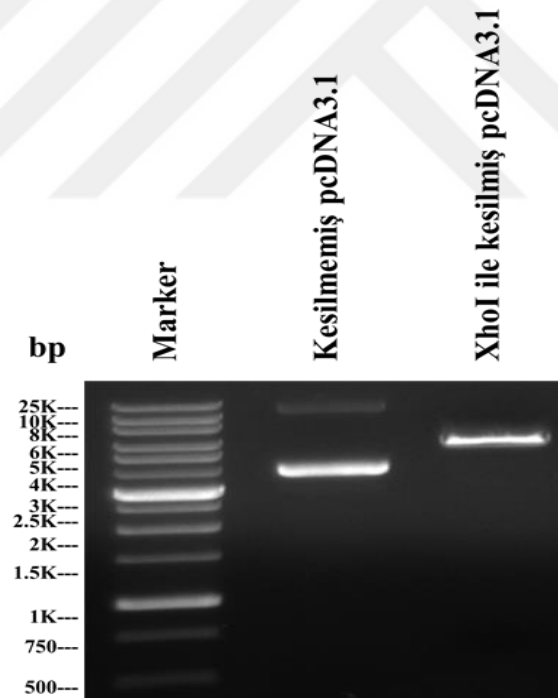
**Şekil 3-1** PCR yöntemi ile amplifiye edilen SATB2 cDNA'sının %0,75'lik agaroz jelde gösterilmesi.



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.

### 3.3.2. SATB2 Insert ve pcDNA'nın Vektörünün XhoI Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

pcDNA3.1 vektörünün ve SATB2 insertin kesimi için New England Biolabs XhoI enzimi (Kat. No: R0146, NEB) 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. Bu işlem sonucunda pcDNA3.1 vektörü başarıyla kesilmiştir (Şekil 3.2).

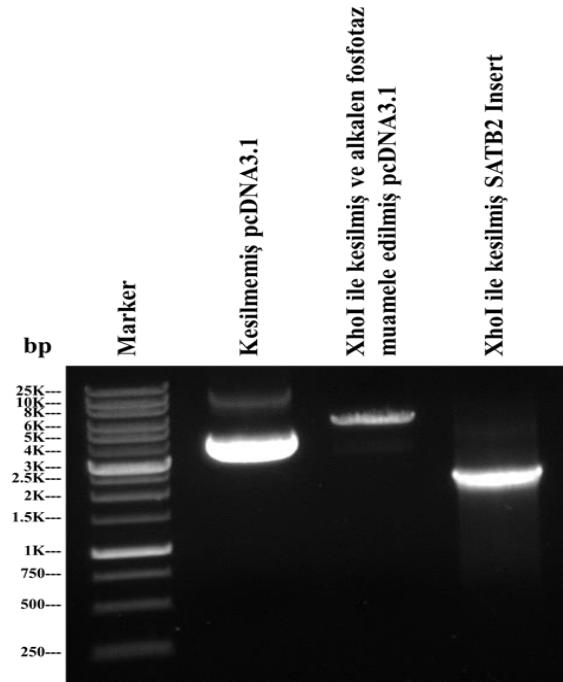


**Şekil 3-2** XhoI enzimi ile kesilmemiş ve kesilmiş pcDNA3.1 vektörünün %0,75 agaroz jelde görüntülenmesi.

### 3.3.3. pcDNA3.1 vektörünün alkalin fosfat ile muamelesi

Enzim kesimi yapılmış pcDNA3.1 vektörünün self ligasyonunu en aza indirmek için 5'-terminal kısımlarındaki fosfat gruplarının defosforile olması gerekmektedir. Klonlama işlemi

için hazırlanan vektörün alkalen fosfataz reaksiyonu FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Kat no: 18009-27) enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon; 1X reaksiyon tamponu, 1 ul unit alkalen fosfataz enzimi, 1 µg pcDNA3.1 vektörü ve ddH<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 fenol eklendi, 15 saniye vortex yapılarak ve buza kondu. 10 dakika inkübe edildi. 12.000 g'de 10 dk +4 °C'te santrifüj edildi. Supernatant temiz bir tüpe alındı ve tekrar 1:1 hacminde fenol konularak az önceki işlem tekrarlandı. Aquas 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 inkübe edildi. Örnek 12.000 g'de 10 dakika +4 °C'te santrifüj edilerek supernatantı atıldı ve 5-10 dakika kurumaya bırakıldı. Son olarak pellet 30 µl nükleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü. DNA miktarı ve kalitesi Nanodrop cihazı kullanılarak ölçüldü. Ayrıca, ligasyon için gerekli tüm komponentler %0,75'lik agaroz jelde miktarlarının teyiti için yürütüldü. Nanodrop cihazında miktarları ölçülen kesilmemiş pcDNA3.1 vektöründen 1 µg, XhoI enzimi ile kesilmiş ve alkalen fosfataz ile muamele edilmiş pcDNA3.1 vektöründen 100 ng, XhoI enzimi ile kesilmiş SATB2 insert 500 ng olacak şekilde jele yüklendi (Şekil 3.3). Dansitometrik analizlerimiz sonucunda yüklenen miktarların doğruluğu tespit edilmiştir.



**Şekil 3-3** XhoI enzimi ile kesilmemiş vektör, XhoI enzimi ile kesilmiş ve alkalen fosfotaz ile muamele edilmiş vektör ve XhoI enzimi ile kesilmiş SATB2 insert'ünün %0,75 agaroz jelde görüntülenmesi.

### 3.3.4. SATB2'nin pcDNA3.1 Vektörüne T4 DNA Ligaz Enzimi ile Klonlanması

Öncelikle gerekli solüsyonlar hazırlandı. Sıvı Luria-Bertani Broth (LB) besiyerinin hazırlanması: 6.25 gr LB Broth (Kat. No:110285, Merck) tartıldı ve 250 ml dH<sub>2</sub>O ile çözüldü. Ardından 121 °C'de 15 dakika otoklav ile sterilizasyon gerçekleştirildi ve 4°C'de muhafaza edildi.

Katı LB besiyerinin hazırlanması: 2.5 gr LB Broth ve 1.5 g Agar (Kat. No:05039, Sigma-Aldrich) tartılarak 100 ml'ye dH<sub>2</sub>O ile çözüldü. Ardından 121 °C'de 15 dakika otoklav ile sterilizasyon gerçekleştirildi ve yaklaşık olarak 50 °C'e kadar soğuması beklendi. İstenilen sıcaklığa ulaştığında hızlı bir şekilde 100 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde amfisilin (Kat. No: BP1760, Fisher Scientific) ilave edildi ve bek alevi altında petrilere uygun hacimde döküldü. Besiyeri soğuyup katılaştıktan sonra parafin ile etrafı sarılarak 4°C'de ışık görmeyen ortamda saklandı.

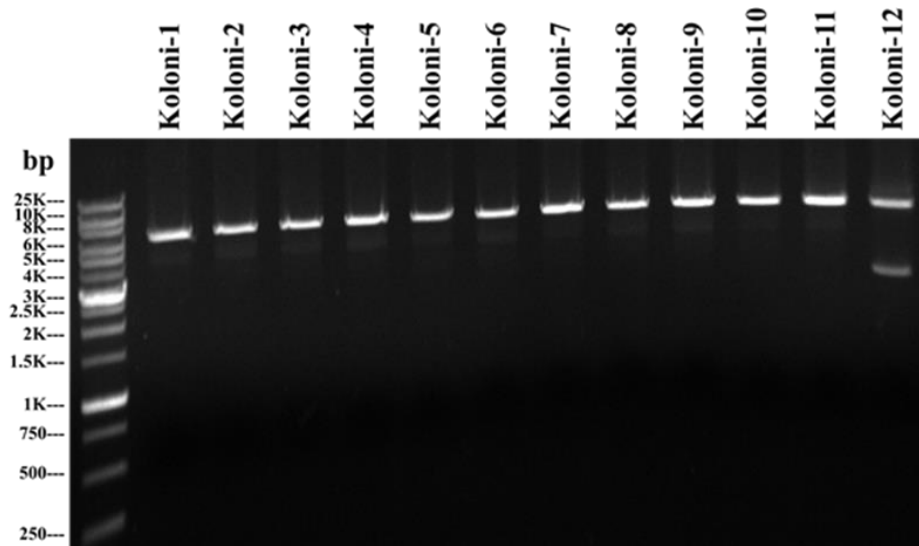
XhoI ile kesilmiş SATB2 insert'i, XhoI enzimi ile kesilmiş ve alkalin fosfotaz ile muamele edilmiş pcDNA3.1, T4 DNA Ligaz (Kat. No: EL0014, Thermo Fisher Scientific) aracılığıyla klonlandı. Reaksiyon; 1X reaksiyon tamponu, 4x hacim (600 ng) SATB2 insert, 1x hacim (150 ng) pcDNA3.1, 1 µl T4 DNA Ligaz, ddH<sub>2</sub>O ile 20 µl'e tamamlanarak 20 dakika 16 °C koşullarında gerçekleştirildi. Ligasyon ürününün tümü ticari olarak satın almış olduğumuz kompetent DH5α suşunu (Kat. No: C2987H, NEB) içeren tüpe aktarıldı ve nazikçe karıştırıldı. Tüp 30 dakika boyunca buzda bekletildi. Daha sonra 42 °C'de 90 saniye bekletildi ve hemen akabinde tekrar buzda 5 dakika bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda 1 ml SOC medium (Kat. No: C2987H, NEB) eklenerek 37 °C'de 1 saat çalkalanarak ön-kültürasyon gerçekleştirildi. Son olarak, transforme ettiğimiz bakterileri daha öncesinden hazırlamış olduğumuz amfisilin (Kat. No: BP1760, Fisher Scientific) içeren Agar LB besiyerine yayma ekim yapıldı ve gece boyunca 37 °C'de çalkalanarak kültüre edildiler. 24 saat inkübasyonun ardından koloniler belirmeye başlamıştır (Şekil 3.4).



**Şekil 3-4** SATB2 ile klonlanan pcDNA3.1 vektörü ile transforme edilmiş DH5 $\alpha$  bakterilerinin amfisinilin içeren Agar LB besiyerinde kültürü ve oluşan kolonilerinin görüntüsü.

### 3.3.5. SATB2 klonlanmış vektörü taşıyan koloninin tespiti

Öncelikli olarak Şekil 3.4'te görülen koloniler pipet ucu yardımıyla 15 ml'lik falkonlarda daha önceden hazırlanmış olduğumuz 50  $\mu$ g/ml amfisinilin içeren sıvı LB besiyerine ekildi. Gece boyunca 37 °C'de kültüre edildiler. Çoğalan her bir koloniden mini prep plasmid izolasyon kiti (Kat no: D4208T, Zymo Research) kullanılarak plasmid izolasyonu gerçekleştirildi ve sonrasında kolonilerden izole edilmiş olan bu plasmidler XhoI enzimi ile 1 saat kesim işlemine tabi tutuldu. Şekil 3.5'te görüldüğü üzere, 12 nolu koloninin SATB2 klonlanmış vektörü taşıdığı tespit edilmiştir.



**Şekil 3-5** Ligasyon sonucu hangi koloninin SATB2 klonlanmış vektörü taşıdığına tespiti.

### 3.3.6. Plazmit DNA izolasyonu

Şekil 3.5'te görüldüğü üzere 12.koloni SATB2 klonlanmış pcDNA3.1 vektörünü içermektedir. *In vitro* transfeksiyon uygulamalarımız için bu koloniyi çoğaltarak plazmit izolasyonu gerçekleştirdik. İzolasyon için HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Kat. No:12663, Qiagen) kiti kullanıldı ve deney üretici firmanın protokolüne göre yapıldı.

1. Daha önceden hazırlamış olduğumuz 250 ml'lik sıvı LB besiyerine 50 µg/ml amfisilin eklendi ve bek alevi altında SATB2 klonlanmış vektörü içeren 12.koloniden pipet ucu yardımıyla bir miktar alınarak besiyerine ekildi. Ekimi yapılan bakteriler bir gece, 37°C'de ve 250 rpm'de çalkamalı şekilde kültüre edildi.
2. Bir sonraki gün çoğalmış olan bakteriler 50 ml'lik falkon tüplerine aliquatlandı ve 4°C'de 6000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Bu aşamada kitin içeriğindeki Buffer P3 soğuması için buza konuldu.
3. Falkondaki bakteri pelletleri 10 ml Buffer P1 ile süspanse hale getirildi ve tüm pelletler tep tüpte birleştirildi.
4. 10 ml Buffer P2 eklenerek 4-6 kez ters-yüz edildi ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon esnasında daha sonraki aşama için kit içeriğindeki QIAfilter Maxi Cartridge'in çıkış yeri vidalandı ve bir spora yerleştirildi.
5. İnkübasyon süresi dolan falkon tüpteki örneğe 10 ml soğuttuğumuz Buffer P3 ilave edilerek 4-6 kez ters-yüz edildi, hemen akabinde daha önce vidalayarak spora yerleştirdiğimiz QIAfilter Maxi Cartridge'in içine döküldü ve 10 dakika beklendi. (Bekleme esnasında daha ileriki aşamada kullanılacak olan kit içeriğindeki HiSpeed Maxi Tip uygun bir spora yerleştirildi ve dengelenmesi için 10 ml Buffer QBT içine pipet yardımıyla konuldu ve süzülmesi sağlandı.)
6. İnkübasyon süresi dolan QIAfilter Maxi Cartridge'in içindeki örneğimiz vidası açılarak piston yardımıyla bir önceki aşamada dengelenmiş olan HiSpeed Maxi Tip'in içine döküldü ve yerçekimi etkisiyle kolondan süzülmesi için beklendi.
7. HiSpeed Tip'den lizatın tamamen süzülmesinin ardından 60 ml Buffer QC döküldü ve yerçekimi etkisiyle kolondan süzülmesi için beklendi.
8. Buffer QC'nin tamamen kolondan süzülmesi ile HiSpeed Tip steril bir 50 ml'lik falkona yerleştirildi ve içerisine 15 ml Buffer QF eklenerek yine yerçekimi etkisiyle kolondan süzülmesi için beklendi.
9. Falkona süzülmüş olan örneğimize 10.5 ml izopropanol eklendi ve nazikçe karıştırılarak plazmit DNA'nın çökmesi için 5 dakika beklendi. Bekleme esnasında

30 ml enjektörün pistonu çıkartıldı ve ucuna kit içeriğindeki QIAprecipitator Maxi Module filtresi takıldı.

10. Süresi dolan örneğimiz daha önceden hazırlamış olduğumuz enjektörün içine döküldü pistonu takıldı ve yavaşça itilerek örneğin QIAprecipitator Maxi Module filtresinden geçirilmesi sağlandı.
11. QIAprecipitator Maxi Module filtresi daha küçük hacimdeki (10 ml) pistonu çıkartılan enjektöre takıldı ve 2 ml %70 etanol enjektöre döküldü ve piston yardımıyla geçirilerek filtredeki plasmit yıkandı.
12. Enjektörün pistonu birkaç kez çıkarılıp hızlıca bastırıldı ve filtre 10 dakika boyunca kurumaya bırakıldı Böylece filtredeki etanol kalıntısı tamamen giderildi.
13. Tamamen kuruyan filtrenin takılı olduğu enjektöre 1 ml Buffer TE pipet yardımıyla eklendi. Filtrenin ucu steril bir ependorf tüpün içinde olacak şekilde konumlandırıldı ve enjektörün pistonu takılarak Buffer TE filtreden geçirildi. Böylece filtredeki plazmit Buffer TE içerisinde ependorfa tüpe aktarılmış oldu.
14. İzolasyonu gerçekleştirilen plasmitin kalitesi ve miktarı Nanodrop cihazı yardımıyla ölçüldü ve plazmit  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### 3.4. Plasmit DNA ve siRNA transfeksiyonları

SATB2'nin aşırı ifadesinin sağlanması için klonlamış olduğumuz pcDNA3.1-SATB2 vektörünün transfeksiyonu için aşağıdaki protokol uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak pcDNA3.1-Mock vektörü kullanıldı.

1. Petride kültüre edilen A549 ve H1299 hücre hatları, konfluent olduklarında tripsin edilerek 6 kuyucuklu plaklara sırasıyla  $1 \times 10^6/\text{ml}$  ve  $7.5 \times 10^5/\text{ml}$  hücre olacak şekilde ekildi ve bir gece %5  $\text{CO}_2$  ve %95 nem ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'de koşullarında inkübe edildi.
2. İnkübasyonun ardından transfeksiyon işlemi için A tüpü (3  $\mu\text{g}$  plasmit ve Opti-MEM ile 125  $\mu\text{l}$  tamamlandı) ve B tüpü (5  $\mu\text{l}$  Lipofectamine 2000 ve 120  $\mu\text{l}$  Opti-MEM) olacak şekilde iki adet tüp hazırlandı.
3. A tüpündeki plasmit-Opti-MEM Lipofectamine 2000-Opti-MEM karışımını içeren B tüpüne aktarıldı ve nazikçe pipetaj yapıldı ve 15-20 dakika oda ısısında inkübe edildi.
4. İnkübasyon süresi bitene kadar transfeksiyon için ekilen hücrelerin besiyerleri çekildi ve yerine 1750  $\mu\text{l}$  hacminde taze besiyeri ile eklendi.

5. İnkübasyon süresi biten transfeksiyon karışımı 6 kuyucuklu hücrelerdeki besiyerine nazikçe ilave edildi.

SATB2, CTCF, SMAD2/3, SMAD4, SNAI1, SNAI2 ve ZEB1 ekspresyonlarının geçici baskılanması için siRNA transfeksiyonu aşağıdaki protokol izlenerek gerçekleştirildi. Negatif kontrol olarak hiçbir mRNA hedef almayan siRNA kullanıldı.

1. Petride kültüre edilen A549 ve N417 hücre hatları, konfluent olduklarında tripsin edilerek 6 kuyucuklu plaklara sırasıyla  $3 \times 10^5$ /ml ve  $1 \times 10^6$ /ml hücre olacak şekilde ekildi ve bir gece %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem ve 37°C'de koşullarında inkübe edildi.
2. İnkübasyonun ardından transfeksiyon işlemi için A tüpü (10 µM ana stoktan 5 µl siRNA ve 120 µl Opti-MEM) ve B tüpü (5 µl Lipofectamine 2000 ve 120 µl Opti-MEM) olacak şekilde iki adet tüp hazırlandı.
3. A tüpündeki siRNA-Opti-MEM Lipofectamine 2000-Opti-MEM karışımını içeren B tüpüne aktarıldı ve nazikçe pipetaj yapıldı ve 15-20 dakika oda ısısında inkübe edildi.
4. İnkübasyon süresi bitene kadar transfeksiyon için ekilen hücrelerin besiyerleri çekildi ve yerine 1750 µl hacminde taze besiyeri ile eklendi.
5. İnkübasyon süresi biten transfeksiyon karışımı 6 kuyucuklu plaklardaki hücrelerin besiyerine nazikçe ilave edildi.

### 3.5. Western Blot

#### 3.5.1. Protein izolasyonu

Western blot çalışmalarımız için protein izolasyonu aşağıdaki protokol izlenerek gerçekleştirildi.

1. İnkübasyon süresi biten hücrelerin besiyerleri çektirildi ve 2 kere soğuk Phosphate-buffered saline (PBS) ile yıkandı.
2. PBS'i çektirilen hücrelerin bulunduğu plaklar buzun üstüne alındı ve vakit kaybetmeden daha önceden hazırlanmış 1x proteaz (Kat. No: 5871, Cell Signaling Technology) inhibitör kokteyli içeren RIPA (Kat. No: 9806, Cell Signaling Technology) tamponundan hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak 200-250 µl hücrelerin üzerine eklendi.
3. RIPA tamponu eklenen hücreler 5-10 dakika buzun üstünde inkübe edildi.

4. Son olarak %95 güçte ve 1 saniye döngü olacak şekilde ayarlanan sonikatör cihazı (Serie 2000.2, Bandelin Sonoplus) yardımıyla ile örnekler 30 saniye açık, 15 saniye sonikasyon işlemine tabi tutuldu.
5. Sonikasyon işleminin ardından örnekler, 12.000 g'de 10 dk +4 °C'te santrifüj edildi ve süpernatant temiz bir tüpe alınarak protein saflaştırıldı ve örnekler kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

### 3.5.2. Protein miktarının belirlenmesi

Saflaştırmış olduğumuz protein örneklerimizin miktarları Bradford protein miktar tayini yöntemi ile gerçekleştirildi. 1/1000 sulandırılan 800 µl olacak şekilde hazırlanan örneklerden ve BSA standartları için 25, 12.5, 5, 2.5 ve 1 µg/ml olacak şekilde sulandırılan 800 µl hacminde BSA solüsyonlarından hazırlandı ve her birine 200 µl Bradford reaktifi (Kat. No:500-0006, BioRad) eklendi. Hazırlanan örnekler ve standartlar üç tekrarlı olarak 96 kuyucuklu plaklara konuldu ve 595 nm dalga boyunda Glomax Multi Detection System (Promega) cihazı kullanılarak absorbans değerleri tespit edildi.

### 3.5.3. SDS-PAGE için jelin dökülmesi, örneklerin yürütülmesi ve transferi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) için jel dökümü için gerekli solüsyonların hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir. Separating (Ayrıştırma) ve Stacking (Yükleme) jellerin dökümü, yürütme ve transfer işlemleri için kullanılan kimyasalların oranları ve miktarları Tablo 3-1'te verilmiştir.

1. Separating (Ayrıştırma) Tamponu: 1,5 M Tris Base (pH: 8.8). Tris (Kat. No: TRS001, BioShop) kimyasalından 18.17 gr tartıldı ve yaklaşık 80 ml dH<sub>2</sub>O ile çözüldü pH: 8.8'e ayarlandı, dH<sub>2</sub>O ile 100 ml'e tamamlandı ve 0.8 µm'lik filtreden geçirelerek kullanılıncaya kadar +4 °C'te saklandı.
2. Stacking (Yükleme) Tamponu: 0,5 M Tris Base (pH: 6.8). Tris (Kat. No: TRS001, BioShop) kimyasalından 6.04 gr tartıldı ve yaklaşık 80 ml dH<sub>2</sub>O ile çözüldü pH: 6.8'e ayarlandı, dH<sub>2</sub>O ile 100 ml'e tamamlandı ve 0.8 µm'lik filtreden geçirelerek kullanılıncaya kadar +4 °C'te saklandı.
3. %10 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS): 10 gr SDS tartıldı, 100 ml dH<sub>2</sub>O ile çözüldü ve 0.8 µm'lik filtreden geçirelerek kullanılıncaya kadar +4 °C'te saklandı.



4. %10 Amonyum persülfat (APS): Her jel dökümü için günlük taze hazırlandı. 0.1 gr APS (Kat. No:1610700, BioRad) tartıldı ve 1 ml dH<sub>2</sub>O ile çözüldü ve kullanılıncaya kadar +4 °C 'de saklandı.
5. 4X Yükleme tamponu: 900 µl Laemli Buffer (Kat.No: 1610747, BioRad), 100 µl β-merkaptoetanol (Kat. No:805740, MerckMillipore)
6. Running (Yürütme) Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0.1 SDS): 3.03 gr Tris Base, 14.26 gr Glisin (Kat. No: GLN002, BioShop) ve 1 gr SDS (Kat. No: SDS001, BioShop) tartıldı ve dH<sub>2</sub>O ile çözüldü.
7. Transfer Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0.05 SDS): 2.42 gr Tris Base, 11.41 gr Glisin ve 0.4 gr SDS tartıldı ve dH<sub>2</sub>O ile çözüldü. Ayrı bir mezüre 200 ml metanol konuldu. Transfer işlemine kadar hem tampon hem de metanol 4°C'de soğutuldu. Transfer işleminden hemen önce tampon ve metanol karıştırıldı.

**Tablo 3-1** Separating (Ayrıştırma) ve Stacking (Yükleme) jel formülasyonları.

	Separating (Ayrıştırma) Jeli %10	Stacking (Yükleme) Jeli %5
dH <sub>2</sub> O	6.15 ml	3.05 ml
%30 Akrilamid/bis-akrilamid (29:1, Kat. No: 1610156, BioRad)	5 ml	850 µl
1.5 M Tris pH: 8.8	3.75 ml	-
0.5 M Tris pH: 6.8	-	1.25 ml
%10 SDS	150 µl	50 µl
%10 Amonyum persülfat	75 µl	25 µl
TEMED (Kat. No:1610800, BioRad)	7.5 µl	5 µl
TOPLAM	~15 ml	~5 ml

Western blot çalışmalarımız her aşaması Mini-PROTEAN (BioRad) sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Jel dökümü için sistemin kalın ve ince camları önce saf su ile yıkanarak ve alkol ile silinerek temizlendi ve sistemin jel dökme aparatına düzgünce yerleştirildi. Öncelikle ayrıştırma jeli tablo 3-3'te verilen formülasyona göre hazırlandı.

Temed kimyasalı konulduktan sonra seri ve nazik şekilde mümkün olduğunca köpürtmeden karıştırıldı ve kalın camın üst kısmından 1 cm kalacak şekilde döküldü. Vakit kaybetmeden üstüne 1 ml izopropanol alkol döküldü. Ayırıştırma jeli tamamen polimerize olduğunda izopropanol kurutma kâğıdı yardımıyla alındı ve yükleme jeli tablo 3-3'te verilen formülasyona göre hazırlanarak döküldü. Ardından taraklar nazikçe yerleştirildi ve polimerize olması için yaklaşık 1 saat beklendi.

Dökülen ayırıştırma jeli polimerize olurken örnekler yüklemek için hazırlandı. Daha önceden konsantrasyonlarını tayin ettiğimiz örneklerden 50 µg olacak şekilde alınarak steril bir ependorfa aktarıldı. Daha sonra örnek hacminin 1/3'ü oranında 4x yükleme tamponu eklendi ve 95°C'de 5 dakika kaynatıldı. Tamamen polimerize olmuş olan SDS-PAGE jel sistemin yürütme tankına alındı ve yürütme tamponu eklendi. Hazırlanan örnekler kuyulara yüklendi ve 100 V'ta 90 dakika yürütüldü. Yürütme işlemi ile ayrışan protein örnekleri, SDS-PAGE jelden Polyvinylidene flüoride (PVDF, Kat. No: IPVH00010, Merck Millipore) membrana daha önceden hazırlanan transfer tamponu içinde 4°C'te 90 mAmp'de 16 saat süresince ıslak transfer yöntemi ile transfer edildi.

#### 3.5.4. İmmunoblotlama

PVDF membrana transfer olan protein örneklerimiz immünoblotlama için ilgili primer antikorla işaretlendi. Bunun için, membran %5'lik kuru süt tozu (Kat. No: 170-6404, BioRad) içeren 25 mM Tris pH:7.6, 34 mM NaCl (Kat. No: SOD001, BioShop), %1 Tween 20 (Kat. No:1706531, BioRad) TBS-T çözeltisi içinde oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Daha sonra membran ilgili primer antikorlar ile 1:1000 oranında hazırlanan %5'lik süt tozu içeren TBS-T solüsyonu ile 4°C'te 1 gece boyunca çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon süresi biten membran oda ısısında TBS-T solüsyonu ile 10'ar dakika olacak şekilde 3 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından membran ilgili HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor (Kat. No: 5450-0010, Seracare) ile 1:10000 oranında hazırlanan %5'lik süt tozu içeren TBS-T solüsyonu ile oda ısısında 1 saat boyunca çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon süresi biten membran tekrar oda ısısında TBS-T solüsyonu ile 10'ar dakika olacak şekilde 3 kez yıkandı. Yıkama işlemleri sonunda Enhanced Chemiluminescence (ECL Kat. No: WBLUF0500, Millipore) solüsyonu kullanılarak kemilüminesans reaksiyonu başlatıldı ve spesifik protein bantları Odyssey® Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) görüntüleme cihazı tarafından fotoğraflandı.

### 3.6. İmmunofloresans

Deney prosedürümüz gereği muamele edilerek inkübasyon süreleri biten hücrelerin besiyeri alınarak PBS ile yıkandı. Ardından hücreler %4 taze hazırlanmış formaldehit (Kat no: 252549, Sigma) ile fikse edildi ve geçirgenliğin sağlanabilmesi için %0,1 Triton X-100 (Kat no: 28314, Thermo Fisher Scientific) içeren PBS ile oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitince Triton X-100 solüsyonu çektirildi ve 1:100 oranında ilgili antikor, %3 BSA (Kat no: sc-2323, Santa Cruz) ve %0,08 glisin içeren PBS içerisinde 4 °C'de 1 gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, 1:300 oranında Alexa Fluor-488-kojuge anti-rabbit (Kat. No: A27034, Thermo Fisher Scientific) veya Alexa Fluor-555-kojuge anti-rabbit (Kat. No: A27039, Thermo Fisher Scientific), %3 BSA ve %0,08 glisin içeren PBS içerisinde 2 saat oda ısısında inkübe edildi ve sürenin sonunda hücre normalizasyonu için DAPI (Kat. No: D1306, Thermo Fisher Scientific) nüklear floresans boya ekledi 5 dk. inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücreler floresans mikroskop (EVOS XL Core Cell Imaging System) ile görüntülendi ve 40X büyütmede fotoğraflandı.

### 3.7. miRNA ve mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Real-Time PCR ile Ölçümü

Hücreden miRNA içeren total RNA izolasyonu, miRNeasy Micro Kit (Kat. No:217084, Qiagen) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. miRNA için cDNA reaksiyonları miScript II RT Kit (Kat. No:218161, Qiagen), mRNA'lar için ise RT2 First Strand Kit (Kat. No:330404, Qiagen) kitleri kullanılarak gerçekleştirildi. miRNA için Real-Time QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Kat. No:204143, Qiagen), mRNA'lar için ise PCR RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix (Kat. No:330500, Qiagen) kitleri kullanılmıştır.

#### 3.7.1. Total RNA izolasyonu

Tez çalışması boyunca miRNA izolasyonları miRNeasy Micro Kit (Kat. No:217084, Qiagen) ile aşağıda yazılı protokole uyularak gerçekleştirildi.

1. Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS yıkandı.
2. 500 µl Qiazol Lysis Reagent ile hücreler pipetajlanarak toplandı ve steril bir ependorfa aktarıldı.

3. Örnekler 30 saniye vortekslenerek homojenize edildi ve 2-3 dakika oda ısısında bekletildi.
4. Homojenize olan örneklere 125 µl kloroform eklendi, 20 saniye şiddetli şekilde vortekslendi ve 2-3 dakika oda ısısında bekletildi. Sonrasında örnekler 15 dakika 4°C'de 12000 x g'de santrifüj edildi.
5. Akuaz faz, beyaz renkte ve orta kısımda bulunan DNA içeriğine temas etmeden pipet yardımıyla alınarak steril bir ependorfa alındı ve üzerine alınabilen akuaz hacmin 1.5 katı kadar %100'lük etanol nazikçe pipetaj yaparak eklendi.
6. Karışım vakit geçirmeden RNeasy MinElute spin kolon'a aktarıldı ve 15 saniye oda ısısında 8000 x g'de santrifüj edildi ve kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
7. Ardından kolon sırasıyla 700 µl RWT ve 500 µl RPE tamponları eklenerek 15 saniye 8000 x g'de santrifüj edildi (her yıkama sonunda filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı).
8. Ardından kolona 500 µl %80 etanol eklendi ve 2 dakika 8000 x g'de santrifüj ile edildi.
9. Kolon, tekrar yeni bir toplama tüpüne aktarılarak kurutulması için 5 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
10. Son olarak kolon steril bir ependorf tüpe alındı ve kolonun tam ortasına denk gelecek şekilde 14 µl nükleaz içermeyen dH<sub>2</sub>O eklenerek 1 dakika oda ısısında inkübe edildi ve ardından 1 dakika oda ısısında 16000 x g'de santrifüj edildi. Total RNA örneklerinin kalite ve miktarları Nanodrop cihazı ile ölçülerek kullanılıncaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

### **3.7.2. cDNA sentez reaksiyonları**

#### **3.7.2.1. miRNA için cDNA sentezi**

İzole edilen total RNA örneklerindeki hsa-miR-657 (Kat. No: MS00010479), hsa-miR-1200 (Kat. No: MS00042392), hsa-miR-1229 (Kat. No: MS00042378), hsa-miR-1234 (Kat. No: MS00044555), hsa-miR-1243 (Kat. No: MS00014203), hsa-miR-3147 (Kat. No: MS00020657), hsa-miR-4779 (Kat. No: MS00039165) ve Snord61 miRNA'larının ekspresyon seviyelerini Real-Time PCR ile tespit etmek için miScript II RT Kit (Kat. No:218161, Qiagen) kiti kullanılarak cDNA reaksiyonları gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları ve bileşenlerin miktarları Tablo 3-2'de verilmiştir.

**Tablo 3-2** miRNA için cDNA reaksiyon koşulları ve formülasyonu.

Total RNA (1 µg olacak şekilde konuldu)	x µl
5x HiSpec Buffer	4 µl
10x Nucleics Mix	2 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µl
Nükleaz içermeyen su	20-(x+8) µl
TOPLAM	20 µl
Reaksiyon koşulları: 37°C'de 60 dakika ve 95°C'de 5 dakika	

**3.7.2.2. mRNA için cDNA sentezi**

İzole edilen total RNA örneklerindeki *SATB2*, *EGFR*, *Sitokeratin 7 (CK7)* gen ekspresyon seviyelerini Real-Time PCR ile tespit etmek için RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Kat. No:330404, Qiagen) kiti kullanılarak cDNA reaksiyonları gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları ve bileşenlerin miktarları Tablo 3-3'te verilmiştir.

**Tablo 3-3** mRNA için cDNA reaksiyon koşulları ve formülasyonu.

Total RNA (2 µg olacak şekilde konuldu)	x µl
Buffer GE	2 µl
Nükleaz içermeyen su	10-(x+2) µl
TOPLAM	10 µl
42°C'de 5 dakika ve buzda 1 dakika	
RNA+Buffer GE+su karışımı	10 µl
Control P2	1 µl
5x Buffer BC3	4 µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl
Nükleaz içermeyen su	3 µl
TOPLAM	20 µl
Reaksiyon koşulları: 42°C'de 15 dakika ve 95°C'de 5 dakika	

### 3.7.3. Real-Time PCR

Çalışmamız boyunca ilgili miRNA ve mRNA'ların ekspresyon seviyeleri Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) cihazı kullanılarak gerçekleştirilen Real Time PCR tekniği ile tespit edildi.

#### 3.7.3.1. miRNA ekspresyon seviyelerin real-time PCR ile ölçümü

*MIR657, MIR1200, MIR1229, MIR1234, MIR1243, MIR3147, MIR4779* ve normalizatör olarak *SNORD61* miRNA genlerinin ekspresyon seviyeleri QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Kat. No:204143, Qiagen) kiti ile gerçekleştirilen Real-Time PCR yöntemi ile gerçekleştirildi. Real-Time PCR şartları ve bileşenlerin miktarları Tablo 3-4'te verilmiştir. Sonuçlar  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  metodu kullanılarak analiz edildi.

**Tablo 3-4** miRNA için Real-Time PCR şartları ve bileşenlerin miktarları.

cDNA (nükleaz içermeyen su ile 1/5 oranında sulandırıldı)	2 µl
10x miScript Primer Assays	2 µl
10x Universal Primer	2 µl
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	10 µl
Nükleaz içermeyen su	4 µl
TOPLAM	20 µl
PCR şartları: 95°C 15 dakika 1 döngü, (95°C 15 saniye, 55°C 30 saniye, 72°C 30 saniye) 40 döngü ve 55-90 °C arası 0.1°C hassasiyette erime eğrisi (melting curve)	

#### 3.7.3.2. mRNA ekspresyon seviyelerin real-time PCR ile ölçümü

*SATB2, EGFR, Sitokeratin 7 (CK7)* ve normalizatör olarak *β-Aktin (ACTB)* genlerinin ekspresyon seviyeleri RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix (Kat. No:330500, Qiagen) kiti ile gerçekleştirilen Real-Time PCR yöntemi ile gerçekleştirildi. Real-Time PCR şartları ve bileşenlerin miktarları Tablo 3-5'te verilmiştir. Sonuçlar  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  metodu kullanılarak analiz edildi. Ayrıca tez çalışması boyunca kullanılan genlerin ekspresyon seviyelerinin tespiti için kullanılan primerlerin sekansları Tablo 3-6'da verilmiştir.

**Tablo 3-5** mRNA için Real-Time PCR şartları ve bileşenlerin miktarları.

cDNA (nükleaz içermeyen sudan 91 µl eklenerek sulandırıldı)	4 µl
Forward (ileri) primer (10 µM)	0.5 µl
Reverse (geri) primer (10 µM)	0.5 µl
10x RT <sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix	10 µl
Nükleaz içermeyen su	5 µl
TOPLAM	20 µl
PCR şartları: 95°C'de 10 dakika 1 döngü, (95°C 15 saniye, 60°C 60 saniye) 40 döngü ve 55-90 °C arası 0.1°C hassasiyette erime eğrisi (melting curve)	

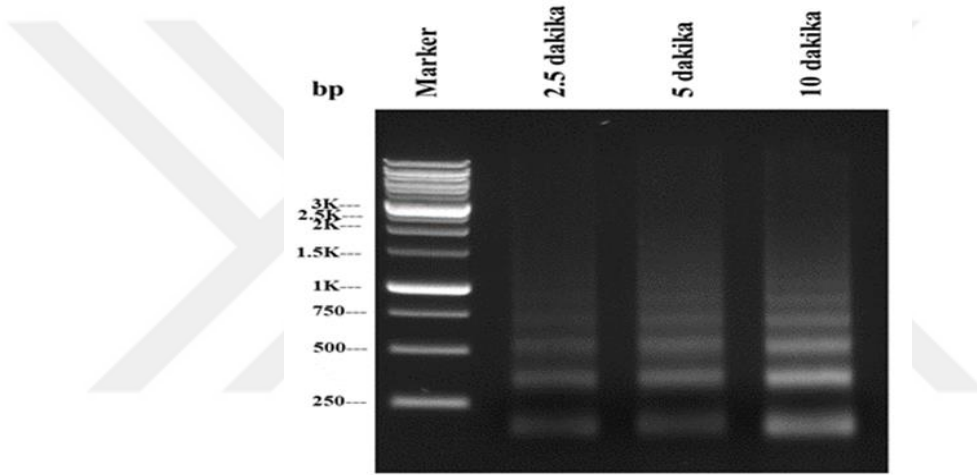
**Tablo 3-5.** Tez çalışması boyunca kullanılan mRNA Real-time PCR primerleri.

Real-time primerleri	İleri primer	Geri primer
SATB2	5'-GCCCTGGGGTATTCTCACA-3'	5'-ACTGAGGGGGAGAGGGTTC-3'
EGFR	5'-GGAGAGGAGAACTGCCAGAA-3'	5'-AGCAGTCACTGGGGGACTT-3'
CK7	5'-AGATCGACAACATCAAGAACCA-3'	5'-CCGTGCCATATCCTGCTT-3'
ACTB	5'-GAAGGTGACAGCAGTCGGTT-3'	5'-ACGCATCTCATATTTGGAATGACTA-3'

### 3.8. ChIP-PCR

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) deneyi, ChIP-IT® Express Enzymatic Kit (Kat no: 53009, ActiveMotif) kiti kullanılarak üretici firmanın standartlarına ve protokolüne uyularak gerçekleştirildi. A549 hücreleri 150x20mm boyutlarındaki 6 adet petriye 6'şar milyon olacak şekilde ekildi. İstenilen sayıya ulaşan hücrelerin (15 milyon, daha önce optimize edildi) besiyerleri çektirilerek yerine 20 ml serum içermeyen besiyeri konuldu ve hücreler 1 saat TGF-β ile muamele edilmiş (3 petri) ve edilmemiş gruplara (3 petri) ayrıldı. İnkübasyon süresinin sonunda 20 ml besiyerine %37 formaldehit (Kat no: 252549, Sigma) solüsyonundan 540 µl eklendi 10 dakika muamele edilerek kromatin ve kromatine bağlanan transkripsiyon faktörleri arasında çapraz bağlar oluşturuldu. Ardından, formaldehit içeren besiyeri çektirildi ve formaldehitin etkisini durdurmak için 10 ml 1x glisin ilave edildi, petripler hafifçe sallanarak 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra besiyeri çektirilerek 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 nüklear ekstrakt izole edildi. ChIP yönteminde, yaklaşık 200-1500 baz çifti (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 (Kat. No: P2069, Sigma-Aldrich) saflaştırılmasının ardından %1'lik Agaroz Jel'de görüntülendi (Şekil 3.6).



**Şekil 3-6** Optimum DNA fragmentasyonu elde etmek için 2.5, 5 ve 10 dakika enzim ile muamele ederek gerçekleştirilen agaroz jel analizi.

Elde edilen fragmentasyonda en uygun olan 10 dakika seçilerek kalan kromatin örneklerinin tamamı için bu süre enzimatik muamele yapıldı. Elde ettiğimiz DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezi ile doğrulandıktan sonra, ChIP uyumlu SNAI1 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 (Kat no: D5205, Zymo Research) kiti ile saflaştırıldı. SNAI1 ve SMAD4'ün SATB2 promotorunda bağlandığı bölgeleri tam olarak tespit edebilmek için web tabanlı JASPAR (WEB\_2 2019) programı kullanıldı. Programda SNAI1 ve SMAD4 bağlanma bölgelerine ait ChIP-PCR primerleri NCBI Primer Blast (WEB\_3 2019) kullanılarak tasarlandı (Tablo 3-6). İnsan genomunda belirlenen bölge dışında başka hedefleri olmadığı saptanan primerler seçilerek IDT Oligo Analyzer (WEB\_4 2019) yardımıyla primerlerin haripin yapıları



ve dimerizasyon durumları kontrol edildikten sonra sentezletti. Saflaştırdığımız DNA fragmentleri kullanılarak tasarladığımız primerler ile Real Time-PCR gerçekleştirildi.

**Tablo 3-6** ChIP-PCR için kullanılan primerler listesi

ChIP-PCR Primer	Forward Primer	Reverse Primer
<b>SATB2 Snail</b> Bağlanma Bölgesi 1	5'-AGAGCGCCCACGAGGAT-3'	5'-CACCTGATGAAACGGCGCTC-3'
<b>SATB2 Snail</b> Bağlanma Bölgesi 2	5'-AATAACGATTGTAGCGCCCG-3'	5'-ACCCCTTGAATACCCGCTTT-3'
<b>SATB2 Smad4</b> Bağlanma Bölgesi	5'-GCCGCCAGTGTAAGGTTG-3'	5'-CACGTGATAGACGTTTCAGGC-3'

### 3.9. Mikrodizin analizi (Microarray)

SATB2'nin aşırı ifade edildiği H1299 hücreleri ve SATB2'nin baskılandığı N417 hücrelerinden izole edilen total RNA örneklerin kalite ve miktarları Nanodrop ile ölçüldü. Örneklerin kalitelerinin istenilen değerlerde olduğu tespit edildikten sonra mikrodizin analizi Macrogen Inc. (GüneyKore) firmasından hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. Mikroarray analizi sonuçları heatmap ile gösterildi. Heatmap, web tabanlı Morpheus programı kullanılarak çizildi (WEB\_5 2019).

### 3.10. İnvazyon deneyi

İnvazyon deneyi için BioCoat Matrigel İnvazyon Chamber-İnvazyon odaları (Kat. No:354480, Corning) kullanılarak aşağıda yazılı protokole uyularak gerçekleştirildi.

1. -20 °C'de saklanan İnvazyon kuyucukları çıkartıldı ve 1 saat oda ısısında bekletildi.
2. Serum içermeyen besiyeri su banyosuna konularak 37 °C'e gelmesi sağlandı ve ısınan İnvazyon kuyucukların alt ve üst bölmelerine 500 µl besiyeri eklenerek 2 saat %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem ve 37°C'de koşullarında inkübe edildi.
3. İnkübasyon süresi bitmeden önce hücreler tripsinizasyon işleminden sonra sayılarak serum içermeyen besiyerinde 5x10<sup>4</sup> hücre/ml konsantrasyonunda olacak şekilde ayarlandı.

4. İnvazyon kuyucuklarının alt bölümüne kemoatraktant olarak %10 serum içeren besiyerinden 750 µl eklendi.
5.  $5 \times 10^4$  hücre/ml konsantrasyonunda hazırlanan hücreler, güzelce pipetaj yapılarak her bir invazyon kuyucuğunun üst bölmesine 500 µl olacak şekilde ekildi ve 22 saat %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem ve 37°C'de koşullarında inkübe edildi.
6. İnkübasyon süresi bittiğinde invazyon kuyucuklarının üst bölümünde kalan invaziv olmayan hücreler pamuklu çubukla dikkatli bir şekilde temizlendi.
7. Ardından invaziv hücrelerin fiksasyonu için invazyon kuyucukları önceden soğutulmuş %100 metanol içine aktararak 10 dakika buzdolabında inkübe edildi ve seri şekilde kuyucuklar Toluidine blue (%1) boya solüsyonunda 10 dakika bekletilerek hücrelerin boyanması sağlandı.
8. Son olarak kuyucuklar güzelce yıkanarak boyanın fazlası temizlendi ve invaziv hücreler ışık mikroskobu altında x20 büyütmede fotoğraflanarak sayıldı.

### 3.11. Biyoinformatik araçların kullanımı

KHDAK ve KHAK hücre hatlarındaki TGF- $\beta$  sinyal yolağındaki moleküllerin ekspresyon profilleri, web tabanlı Morpheus programındaki “*Cancer Dependency Map*” datasetinden elde edilen verilerle tespit edilerek heatmap haritalama yöntemi ile gösterildi (WEB\_5 2019). Ayrıca KHDAK ve KHAK hücre grupları arasındaki gen ekspresyon farklılıkların istatistiksel olarak anlamlılıkları Student’s t-test kullanılarak tespit edildi. Ayrıca tüm akciğer kanser hücre hatlarındaki *SATB2* gen ekspresyon seviyelerinin *EGFR*, *CK7*, *NCAM1* ve *ENO2* gen ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkiler, GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) programı kullanılarak gerçekleştirilen regresyon analizi ile tespit edildi. İstatistiksel analizleri de GraphPad Prism 7 ile gerçekleştirildi. Akciğer kanser hücre hatlarındaki *SATB2*, *EGFR*, *CK7*, *NCAM1* ve *ENO2* gen ekspresyon seviyeleri web tabanlı Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) programı ile tespit edildi (WEB\_6 2019).

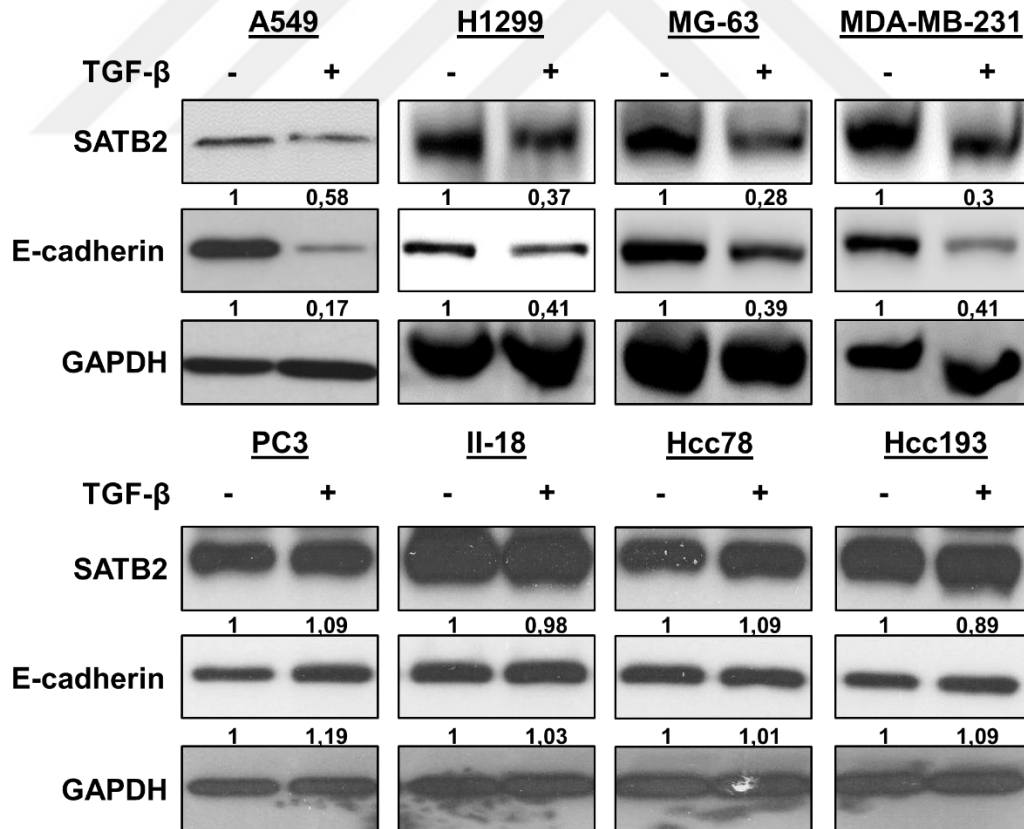
### 3.12. İstatistiksel Analiz

Çalışma boyunca gerçekleştirilen Real-Time PCR, ChIP-PCR ve invazyon sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlılıkları, IBM-SPSS 23.0 kullanarak Student’s t-test yöntemi ile analiz edildi.  $p < 0.05$  değerine sahip sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçların ortalama değerleri  $\pm$  standart sapmaları belirtilerek gösterildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. TGF- $\beta$ indüklü EMT sürecinin SATB2 ekspresyonuna etkisi

Öncelikle, TGF- $\beta$  ile çeşitli KHDAK hücre hatlarında (A549, H1299, PC3, II-18, Hcc78 ve Hcc193) EMT sürecinin indüklenip, indüklenmediğini tespit etmek için amaçlandı ve hücreler TGF- $\beta$  ile 24 saat süresince kültüre edildi. İndüklenmenin başarılı olması, EMT sürecinin en önemli belirteci olan E-kaderin ekspresyon seviyesinin baskılanması baskılanmamasına göre değerlendirildi. TGF- $\beta$ , A549 ve H1299 gibi KHDAK hücre hatlarında E-kaderin ifadesini başarılı bir şekilde baskılayarak EMT sürecini indüklerken, PC3, II-18, Hcc78 ve Hcc193 KHDAK hücre hatlarında E-kaderin ekspresyonunu baskılayamadığı ve dolayısıyla bu hücrelerde EMT sürecini indüklemeye başarısız olduğu tespit edildi (Şekil 4.1).



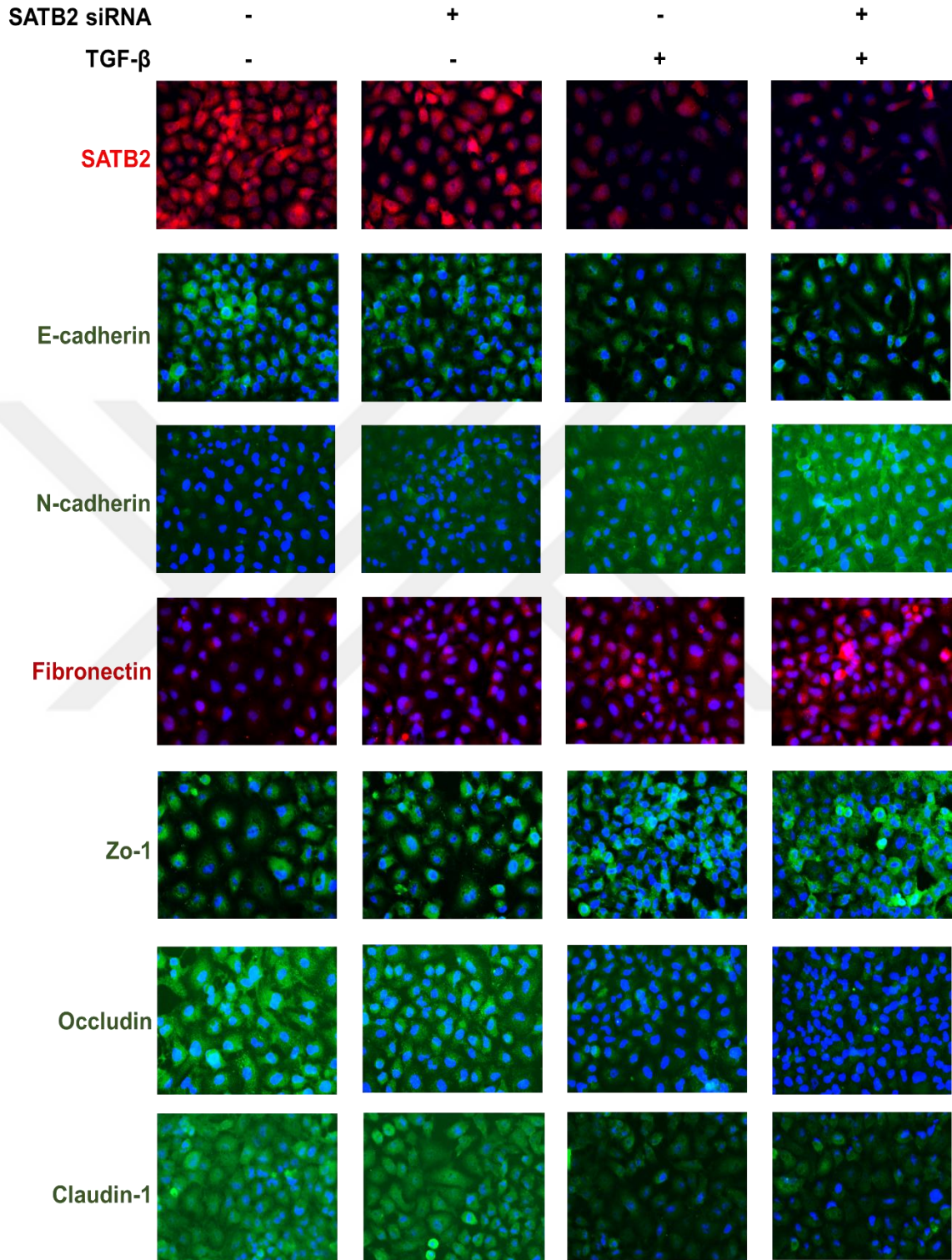
**Şekil 4-1** TGF- $\beta$  ile 24 saat inkübe edilen A549, H1299, PC3, II-18, Hcc78, Hcc193, MDA-MB-231 ve MG-63 hücre hatlarındaki E-kaderin ve SATB2 ekspresyonlarındaki değişimlerin Western blot analizi ile tespiti.

Daha sonra SATB2'nin bu hücrelerdeki ekspresyon durumunu değerlendirildi. EMT sürecinin indüklendiği A549 ve H1299 hücre hatlarında SATB2 ifadesi azalırken, PC3, H1-18, Hcc78 ve Hcc193 hücre hatların SATB2 ifadesinde herhangi bir değişim gözlenmedi (Şekil 4.1). Bu sonuçlar doğrultusunda SATB2 ifadesindeki baskılanmanın TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT için önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini ve yine SATB2'nin bu süreçte düzenleyici bir role sahip olabileceğini düşündük. Bu sonuçların sadece akciğer kanserine spesifik olup olmadığını da aydınlatmak istedik. Bunun için TGF- $\beta$  uyarımına cevap veren hücreler olarak bilinen MDA-MB-231 (meme kanseri) ve MG63 (ostesarkoma) kanser hücre hatlarını da TGF- $\beta$  ile uyardık. TGF- $\beta$ 'nin her iki hücre hattında da EMT sürecini başarılı bir şekilde indüklediğini ve SATB2 ifadesinin baskılayabildiğini gördük (Şekil 4.1). Bu sonuçlar, SATB2 ifadesi ile TGF- $\beta$  indüklü EMT süreci arasındaki ilişkinin, akciğer kanser türüne spesifik olmadığı tüm kanser türleri için ortak bir mekanizma olduğunu göstermiştir.

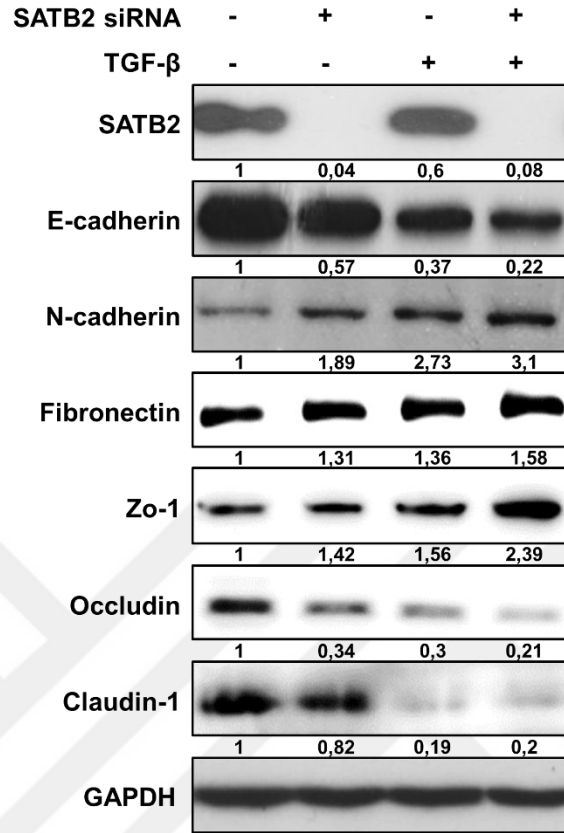
#### **4.2. SATB2'nin EMT sürecinin belirteçleri üzerindeki etkisi**

KHDAK'de TGF- $\beta$  indüklü EMT sürecinin konu olduğu araştırmalarda sıkça kullanılan A549 hücre hattı, çalışmamız için model hücre olarak seçildi. SATB2'nin TGF- $\beta$  indüklü EMT'de düzenleyici bir role sahip olup olmadığını belirlemek istedik. Bunun için, SATB2 ifadesinin baskılandığı ve aşırı ifade edilen A549 hücrelerini TGF- $\beta$  uyararak EMT sürecini indükleyerek çeşitli epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimleri belirledik. Öncelikle SATB2 ifadesi baskılanan A549 hücrelerde, TGF- $\beta$  uyarımına gerek kalmaksızın E-kaderin, Occludin ve Claudin-1 gibi epitelyal belirteçlerin ifadesi baskılandığı, N-kaderin ve Fibronektin gibi mezenkimal belirteçlerin ifadesinin ise arttığı gözlemlendi (Şekil 4-2 ve Şekil 4-3).

TGF- $\beta$  indüklü E-kaderin ve Occludin gibi epitelyal belirteçlerin baskılanması SATB2 susturulan hücrelerde daha kuvvetli şekilde gerçekleştiği tespit edildi (Şekil 4-2 ve Şekil 4-3). Bununla birlikte, N-kaderin ve Fibronektin gibi TGF- $\beta$  ile ekspresyonları artan mezenkimal belirteçlerdeki bu artışların SATB2 baskılanan hücre gruplarında daha fazla olduğu görüldü (Şekil 4-2 ve Şekil 4-3). TGF- $\beta$  indüklü Claudin-1 baskılanmasında SATB2 ekspresyon seviyesinin bir önemi olmadığı da gözlemlendi. Ancak enteresan bir şekilde TGF- $\beta$  indüklü EMT sürecinde baskılanmasını beklediğimiz Zo-1 protein seviyesinin hem SATB2 ifadesinin baskılandığı hücrelerde hem de TGF- $\beta$  ile uyarılan hücrelerde arttığı gözlemlendi. Ayrıca SATB2'nin baskılandığı hücrelerde, TGF- $\beta$  tarafından indüklenen Zo-1 artışının daha kuvvetli olduğu tespit edildi (Şekil 4-2 ve Şekil 4-3).

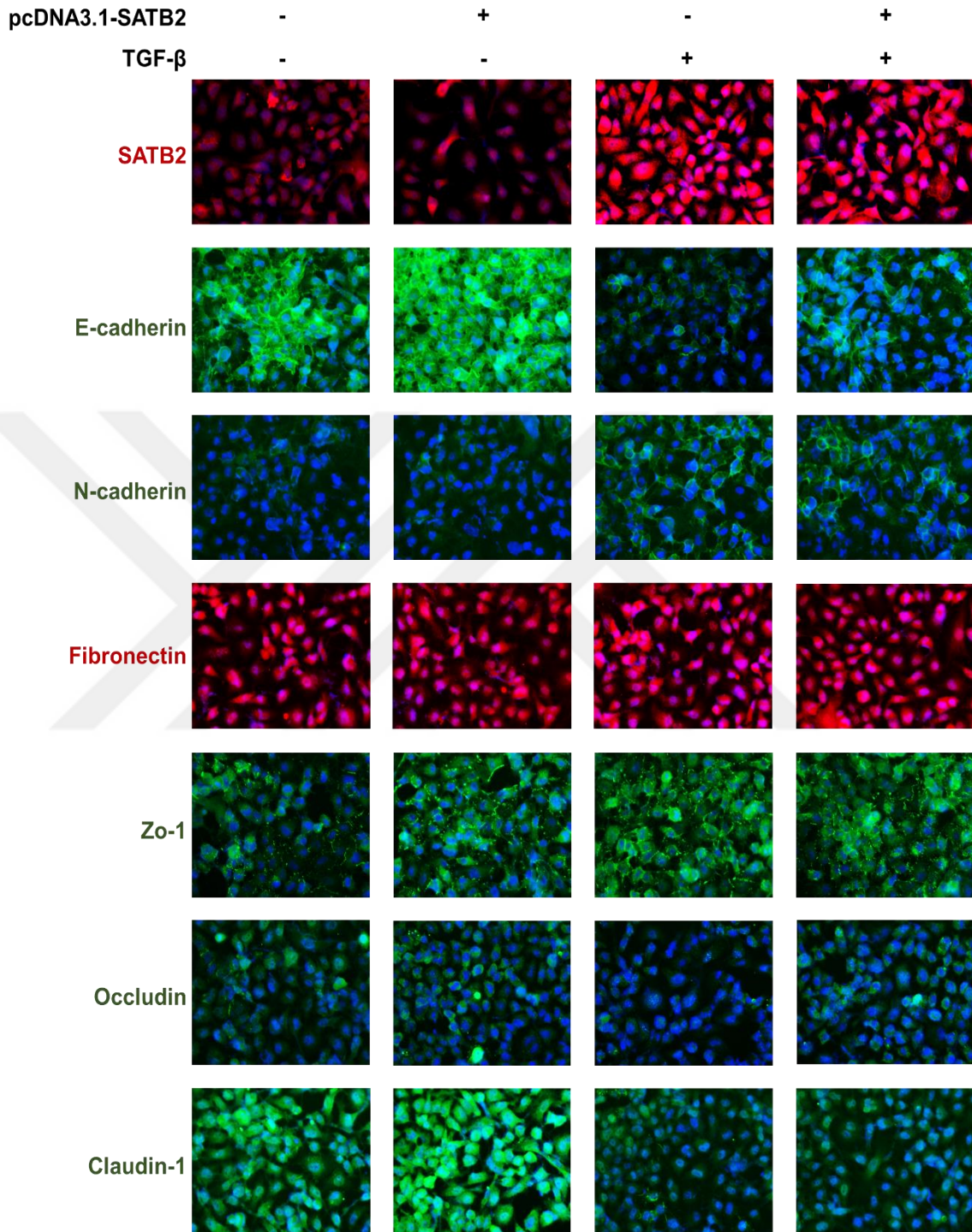


**Şekil 4-2** SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerindeki TGF- $\beta$  uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin immunofloresans boyama analizi ile gösterilmesi.

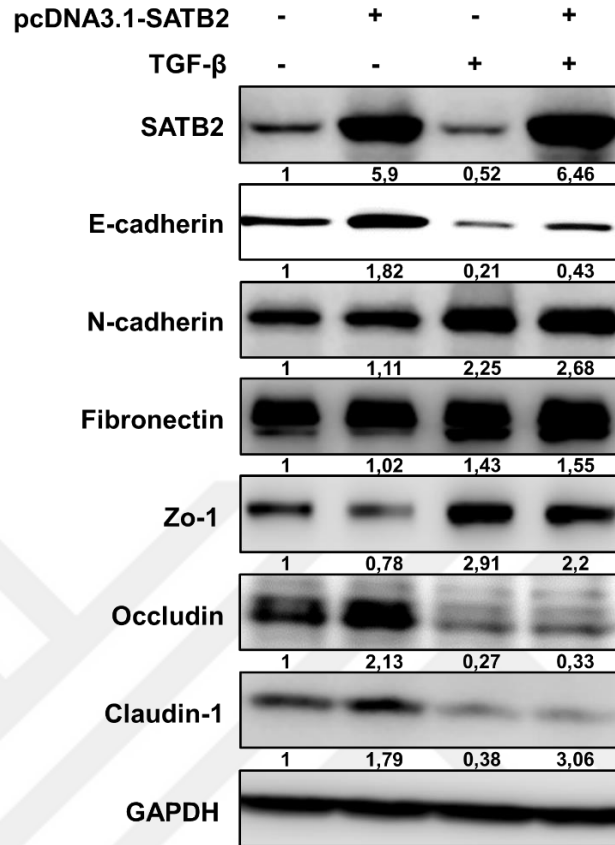


**Şekil 4-3** SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerindeki TGF- $\beta$  uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin Western blot analizi ile gösterilmesi.

Tez çalışmamızın bu bölümünde “TGF- $\beta$  uyarımının EMT sürecini kuvvetli bir şekilde indüklediği A549 hücrelerinde SATB2’nin aşırı ifadesi, bu indüksiyonu engelleyebilir mi veya hafifletebilir mi?” sorusuna yanıt bulmaya çalıştık. Şekil 4-4 ve Şekil 4-5’te görüldüğü üzere, SATB2’nin aşırı ifadesi, TGF- $\beta$  ile indüklenen ve indüklenmeyen A549 hücrelerindeki E-kaderin ekspresyonunu artırdığı saptandı. Bununla birlikte SATB2’i aşırı ifade A549 hücrelerindeki TGF- $\beta$  indüklü E-kaderin downregülasyon şiddetinin, sadece TGF- $\beta$  ile uyarılan hücrelere kıyasla daha az olduğu gözlemlendi (Şekil 4-4 ve Şekil 4-5). SATB2 aşırı ifade edilmiş A549 hücrelerinde Occludin ve Claudin-1 gibi epitelyal belirteçlerin ekspresyon seviyelerinin arttığı görüldü. Ancak, SATB2 aşırı ifadesinin TGF- $\beta$  indüklü Occludin ve Claudin-1 inhibisyonlarına etki edemediği tespit edildi (Şekil 4-4 ve Şekil 4-5). Diğer taraftan SATB2’nin aşırı ifade edildiği hücrelerde, N-kaderin ve Fibronectin gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyon seviyelerinde bir değişim gözlenmedi. SATB2’nin overeksprese edildiği hücrelerde Zo-1 ekspresyon seviyesinin anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. Ancak, SATB2 overekspresyonunun TGF- $\beta$  indüklü Zo-1 artışına etki edemediği gözlemlendi. (Şekil 4-4 ve Şekil 4-5).



**Şekil 4-4** pcDNA3.1-SATB2 vektörü transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerindeki TGF- $\beta$  uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin immunofloresans boyama analizi ile gösterilmesi.



**Şekil 4-5** pcDNA3.1-SATB2 vektörü transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerindeki TGF- $\beta$  uyarımının EMT süreci üzerine etkisinin Western blot analizi ile gösterilmesi.

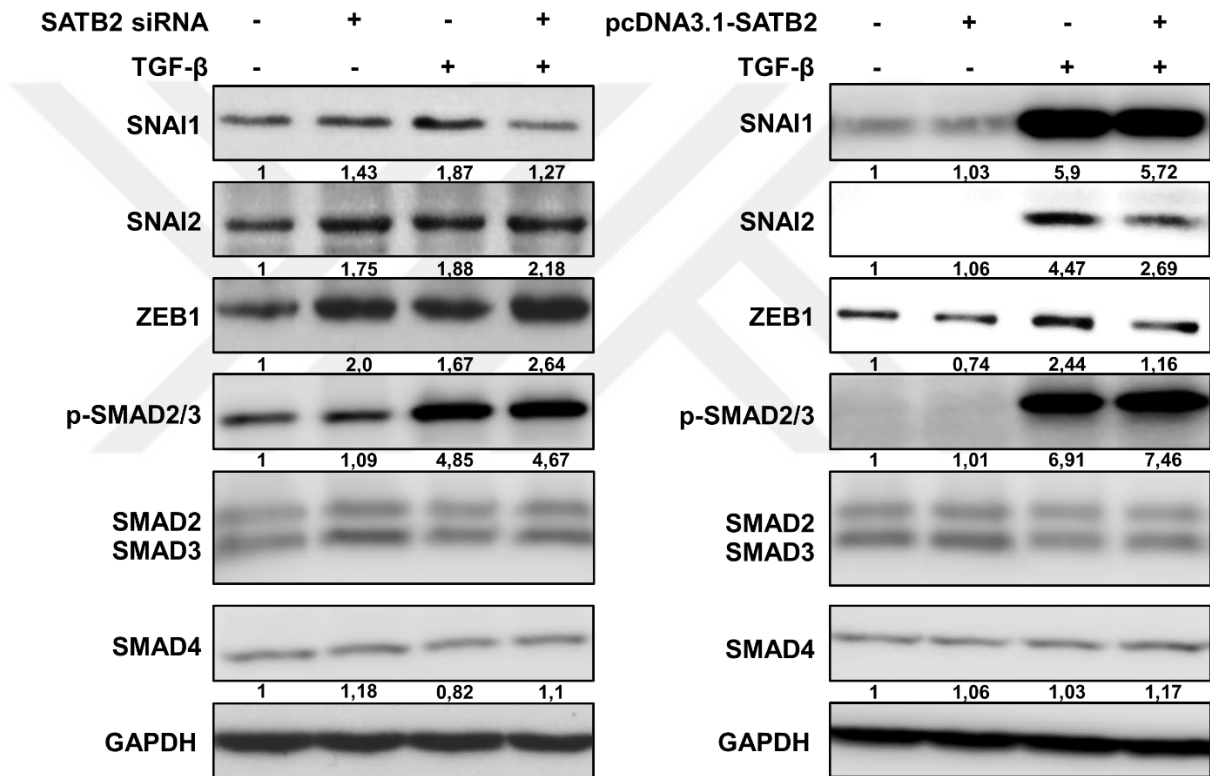
#### 4.3. SATB2'nin EMT süreci üzerindeki etkisinin moleküler temelini tespiti

TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT süreci, epitelyal genlerin baskılanmasını ve mezenkimal genlerin de indüksiyonunu gerçekleştiren transkripsiyon faktörler (EMT-TF) aracılığıyla yönetilir. Bu nedenle SATB2'nin, SMAD transkripsiyon faktörlerinin oluşturduğu TGF- $\beta$ 'nin kanonikal sinyal yolağınının yanısıra SNAI1, SNAI2 ve ZEB1 gibi EMT-TF'lerin regülasyonları üzerindeki etkilerini tespit etmeyi amaçladık. SATB2'nin baskılanması ve aşırı ifadesi SMAD yolağının aktifliğinin belirteci olan p-SMAD2/3 seviyesi üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı görüldü. Benzer şekilde TGF- $\beta$ 'nin kanonikal sinyal yolağınının diğer faktörü olan SMAD4 ekspresyon seviyesinin de SATB2 ifadesindeki değişimlerden etkilenmediği saptandı (Şekil 4-6).

Diğer taraftan EMT sürecini yöneten SNAI1, SNAI2 ve ZEB1 transkripsiyon faktörlerinin SATB2 ile ilişkisi araştırıldı. Hem SATB2'nin baskılandığı hem de aşırı ifade edildiği hücre gruplarına bakıldığında, SATB2'nin özellikle SNAI2 ve ZEB1 transkripsiyon



faktörleri üzerindeki negatif bir regülatör olarak davrandığını tespit ettik (Şekil 4-6). Ayrıca, SATB2 aşırı ifadesinin TGF- $\beta$  indüklü SNAI2 ve ZEB1 ekspresyonlarındaki artışı inhibe ettiği, SATB2 downregülasyonunun ise TGF- $\beta$  indüklü SNAI2 ve ZEB1 indüksiyonunu artırdığı tespit edildi (Şekil 4-6). Diğer taraftan, SATB2'nin upregüle/downregüle edilmiş ve TGF- $\beta$  ile uyarılmamış hücrelerin SNAI1 ekspresyonunda herhangi bir değişim gözlenmedi. Ancak, ilginç bir şekilde TGF- $\beta$  indüklü SNAI1 ekspresyon artışında, SATB2 varlığının gerekli olduğu sonucuna vardık (Şekil 4-6).

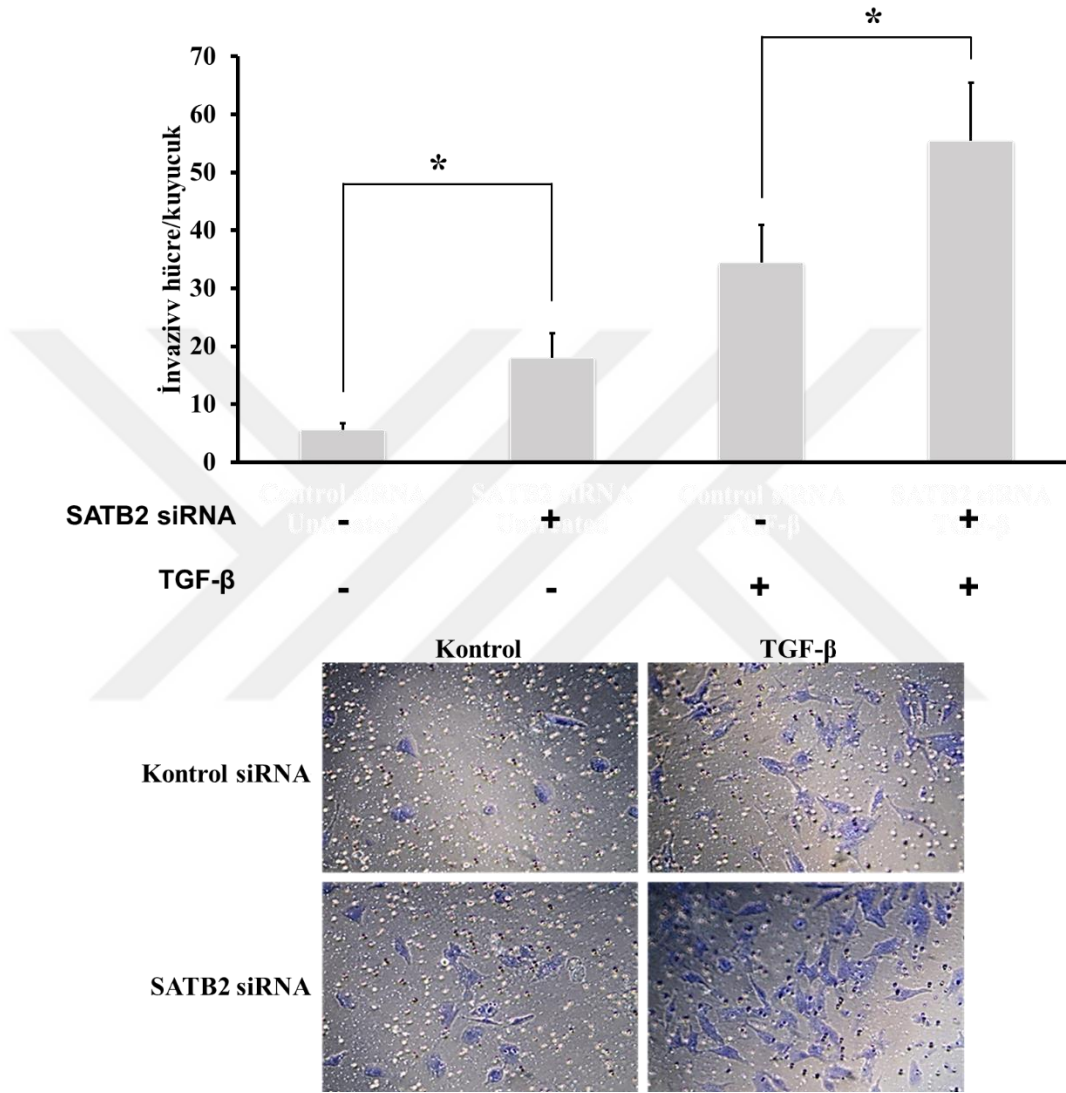


**Şekil 4-6** SATB2'nin TGF- $\beta$ 'nin kanonikal sinyal yolağı ve EMT-TF'ler üzerindeki olası düzenleyici etkilerinin Western blot analizi ile gösterilmesi.

#### 4.4. SATB2'nin TGF- $\beta$ ile indüklenen KHDAK hücre invazyonu üzerindeki etkisi

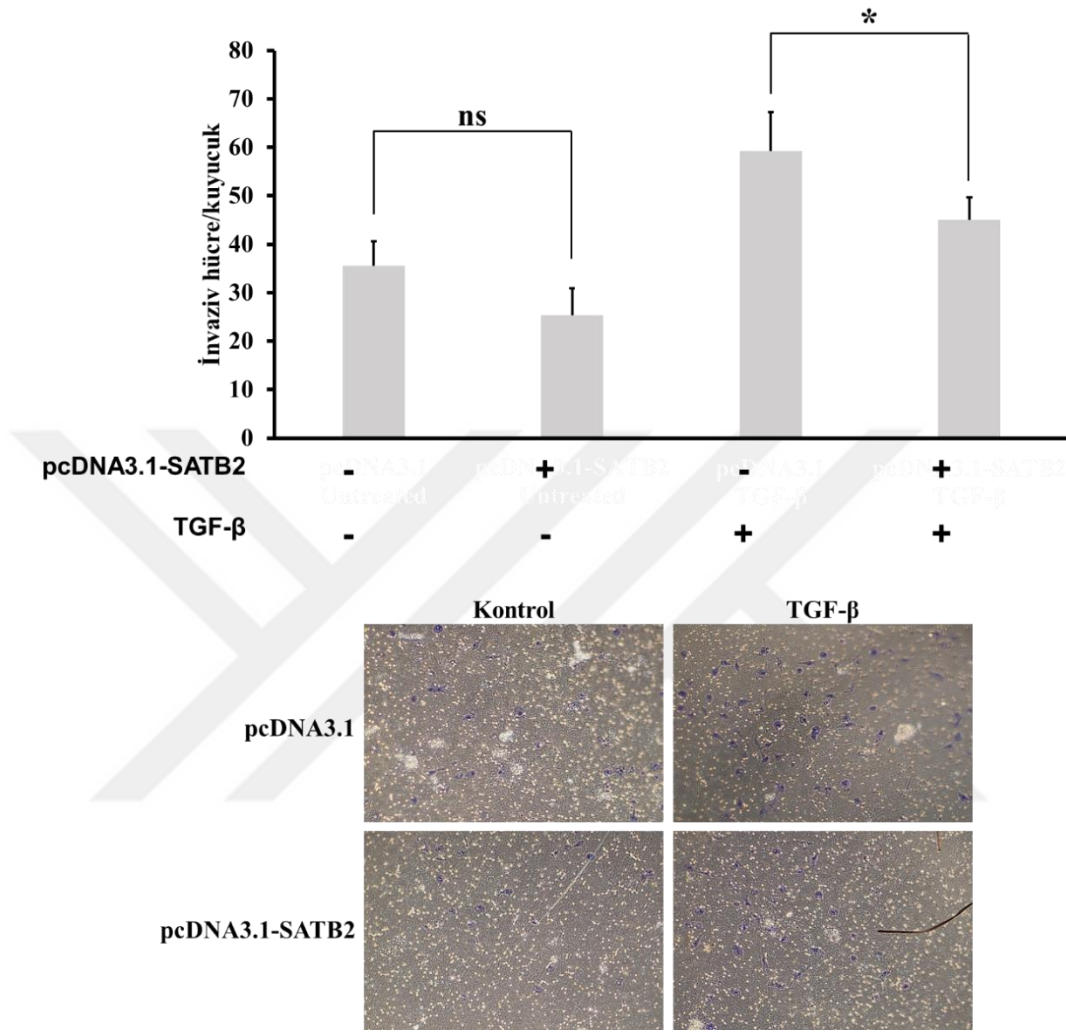
SATB2'nin TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT sürecindeki rolünü tespit ettikten sonra, hücre invazyonları üzerindeki rolünü belirlemeyi amaçladık. EMT sürecinin indüklendiği kanser hücrelerinin invazyon kapasiteleri, indüksiyonunu şiddeti ile doğru orantılı olarak artmaktadır. SATB2 ifadesinin baskılanması, TGF- $\beta$  uyarımına gerek kalmaksızın EMT sürecini indüklemekte başarılı olmuş ve TGF- $\beta$ 'nin EMT indükleyici etkisini de artırmıştı. Bu sonuçlar ile paralel olarak, SATB2 ifadesinin baskılanmasının A549 hücre invazyonunu

arttırdığı tespit edildi. Ayrıca, TGF- $\beta$ 'nin invazyon indükleyici etkisinin, SATB2 ifadesinin baskılanması ile anlamlı ölçüde arttığı da saptandı (Şekil 4-7).



**Şekil 4-7** SATB2 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının hücre invazyonu üzerindeki etkisi. \*P <0.05.

Bununla birlikte, SATB2 ekspresyonunun baskılandığı A549 hücrelerinde, SATB2 ekspresyonunun aşırı ifade olması TGF- $\beta$  ile indüklenen EMT indüksiyonunun şiddetini azaltmıştı (Şekil 4-4 ve Şekil 4-5). SATB2'nin overeksprese edildiği A549 hücrelerinin invazyon kapasitelerinde bir inhibisyon gözlenirse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.18). Ancak, A549 hücrelerinin TGF- $\beta$  ile indüklenen invazyon kapasitesindeki artışın SATB2 overekspresyonu ile anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4-8).



**Şekil 4-8** pcDNA3.1-SATB2 transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının hücre invazyonu üzerindeki etkisi. \*P <0.05.

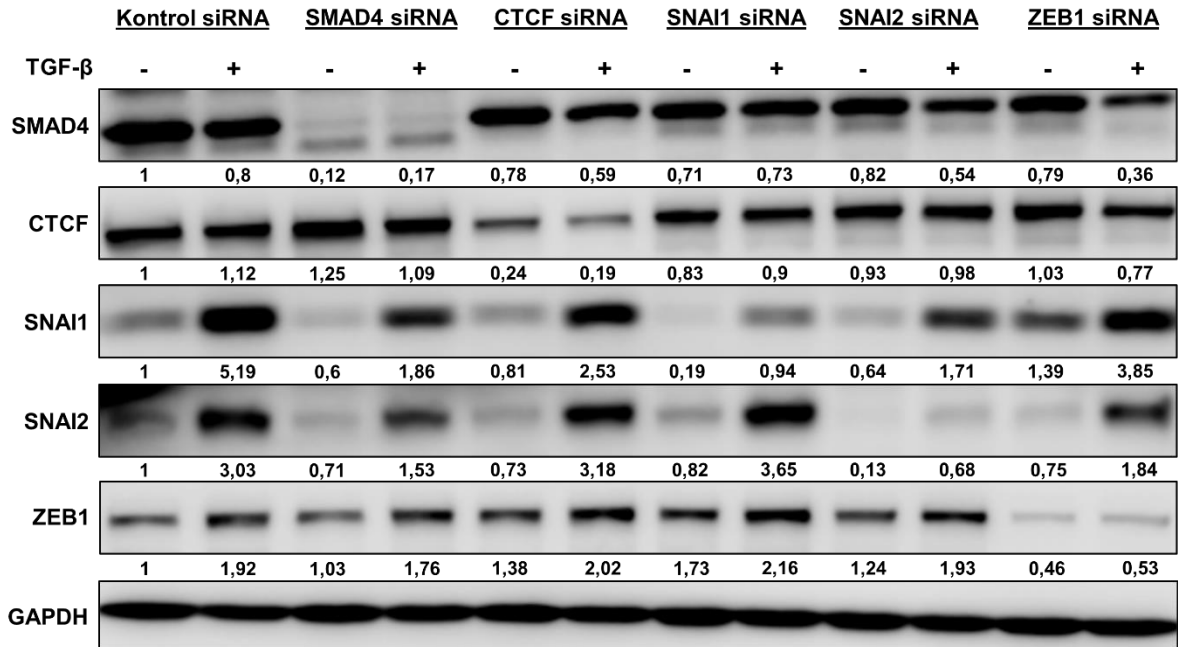
#### 4.5. TGF- $\beta$ indüklü SATB2 baskılanmasının olası moleküler mekanizmasının tespiti

SATB2'nin TGF- $\beta$  tarafından indüklenen EMT sürecindeki rolünü tespit ettikten sonra, "SATB2 ekspresyonu TGF- $\beta$  tarafından nasıl düzenleniyor?" sorusuna cevap aradık. TGF- $\beta$  sinyal yolağının EMT-TF'lerin ekspresyon seviyelerini transkripsiyonel olarak düzenledikleri bilgisinden yola çıkarak, SATB2 ekspresyonunu da transkripsiyonel olarak regüle edebileceğini düşündük. Biyoenformatik analizlerimizde SATB2 promotör bölgesinde E-box, CTCF ve SMAD4 bağlanma motifleri olduğunu tespit ettik (Tablo 4-1).

**Tablo 4-1** SATB2 promotorunda bağlanma bölgesi bulunan transkripsiyon faktörlerinin Transfac (Biobase) analiz sonuçları.

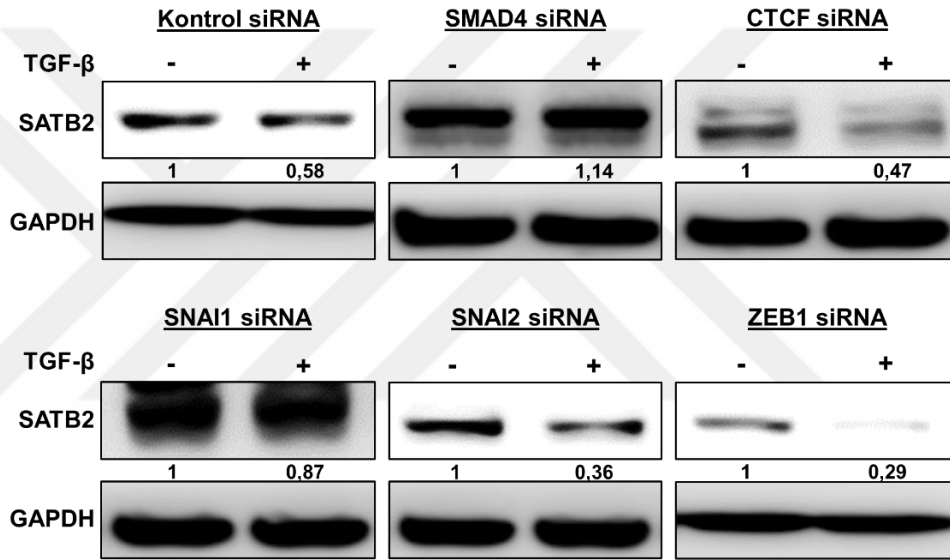
Matriks	Faktör	Sınıflandırma	Bağlanma Motifi	Kategori	Bölge/Sekans
VSEBOX_Q6_01	Ebox	BHLH	NCACVTGNYN	Matrix compiled from individual genomic sites	2.20
VSSMAD4_Q6_01	Smad4	SMAD	GNSRKBCAGMCANCY	Matrix compiled from individual genomic sites	3.00
V\$CTCF_01	CTCF	ZFC2H2	NBNRCCWSNAGRKGGMRSNV	ChIP-on-chip	2.00

Analizlerimiz sonucunda, TGF- $\beta$  yolağında önemli görevleri olan transkripsiyonel faktörlerden SMAD4, CTCF, SNAI1, SNAI2 ve ZEB1'nin, SATB2 ekspresyonu üzerindeki etkilerini tespit etmeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda, SMAD4, CTCF, SNAI1, SNAI2 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 4-9).



**Şekil 4-9** SMAD4, CTCF, SNAI1, SNAI2 ve ZEB1 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının SMAD4, CTCF, SNAI1, SNAI2 ve ZEB1 ifadeleri üzerindeki etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.

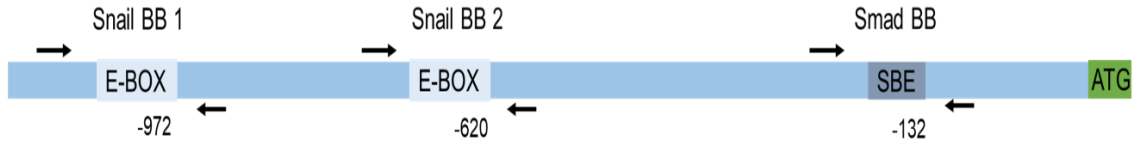
Daha sonra, özellikle TGF- $\beta$  ile indüklenen SATB2 baskılanmasının şiddetini kısmen veya tamamen inhibe eden molekülü veya molekülleri tespit etme yolunu izledik. Tekrarlı western blot analizlerimiz sonucunda, TGF- $\beta$  ile indüklenen SATB2 baskılanmasından SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin sorumlu olduğunu tespit ettik (Şekil 4-10). Bu sonuçlar ile SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin, SATB2 ifadesinin doğrudan promotor bölgesine bağlanarak ekspresyonunda transkripsiyonel düzenleyiciler olarak rol oynayabileceğini hipotez ettik ve daha ileri analizler için bu iki transkripsiyon faktörü ile yola devam edildi.



**Şekil 4-10** SMAD4, CTCF, SNAI1, SNAI2 ve ZEB1 siRNA transfekte edilmiş veya edilmemiş A549 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımının SATB2 ifadesi üzerindeki etkisinin Western blot analizi ile gösterimi.

#### 4.6. SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin SATB2 ekspresyonu üzerindeki etkilerinin CHIP-PCR analizi ile teyit edilmesi

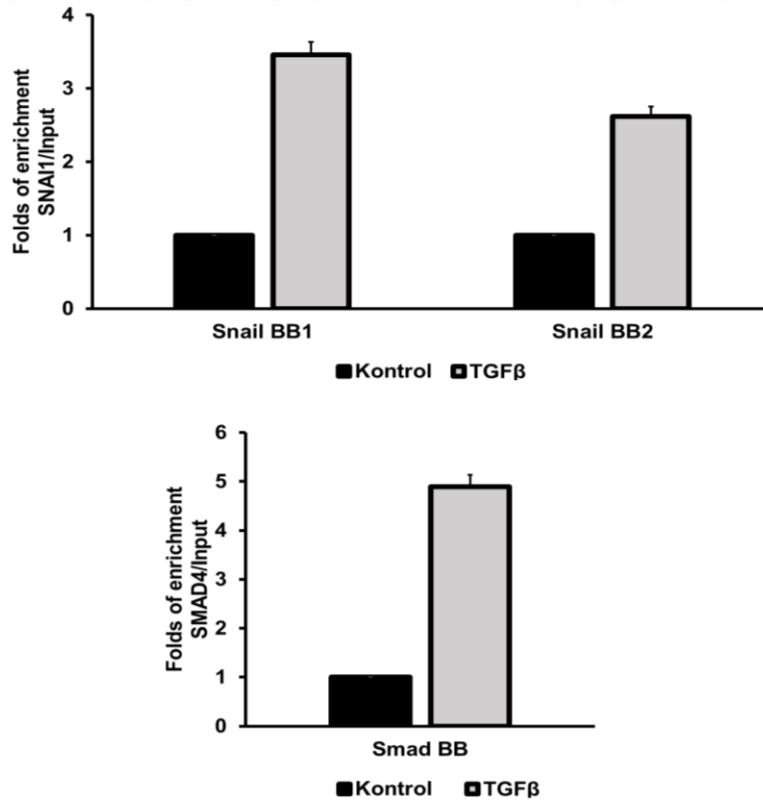
SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin SATB2 geninin promotor bölgesindeki bağlanma bölgelerini JASPAR kullanarak analiz ettik ve yüksek skorda bağlanma gösteren bölgeleri belirledik (Şekil 4.20). Tahmini olarak belirlediğimiz bu bölgelere SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin bağlanıp bağlanmadığını tespit edebilmek için CHIP-PCR deneyleri gerçekleştirdik. Bunun için TGF- $\beta$ 'nın 1 saat uygulandığı hücreler ve uygulanmadığı A549 hücrelerinden elde edilen kromatin örneklerini, SNAI1 ve SMAD4 antikorları kullanarak kromozom immünpresipitasyon gerçekleştirdik.



#### SATB2 Promotor

**Şekil 4-11** SATB2 promotor bölgesi üzerindeki SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin şematik olarak gösterimi.

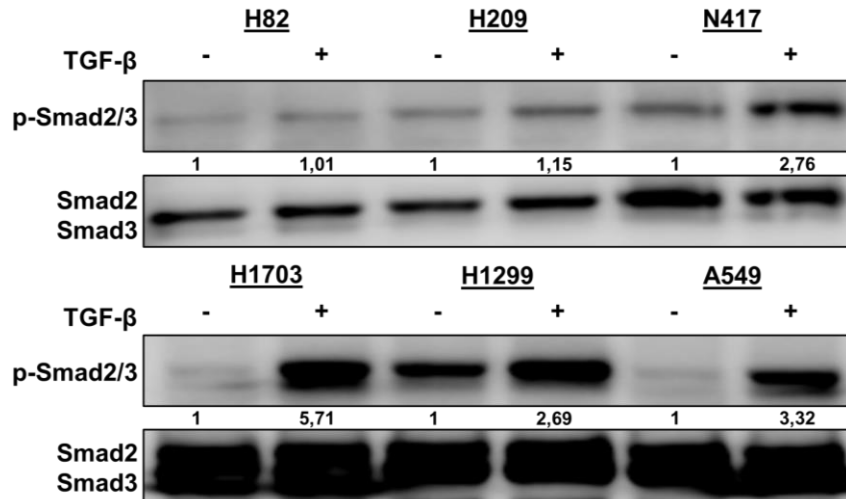
Presipitasyon sonucunda elde edilen DNA örneklerini ayrı ayrı SNAI1 ve SMAD4 bölgeleri için tasarladığımız primerleri kullanarak qRT-PCR analizlerini gerçekleştirdik (Tablo 3-6). SNAI1 antikoru presipite ettiğimiz ChIP DNA örnekleri ve Snail bağlanma bölgesini hedef alan primerler kullanarak gerçekleştirdiğimiz qPCR yöntemi aracılığıyla her iki bağlanma bölgesinde, TGF- $\beta$  ile muamele edilen örneklerde kontrole oranla yaklaşık 3 katlık bir artış olduğunu tespit ettik (Şekil 4.21). Aynı şekilde SMAD4 antikoru presipite edilen ChIP DNA örneklerinin Smad4 bağlanma bölgesini hedef alan primer ile yapılan analizlerde de TGF- $\beta$  uygulanan örnekte kontrole oranla yaklaşık olarak 5 katlık bir artış saptadık (Şekil 4.21).



**Şekil 4-12** SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin SATB2 promotoruna bağlanmasının ChIP-PCR yöntemi ile tespit edilmesi.

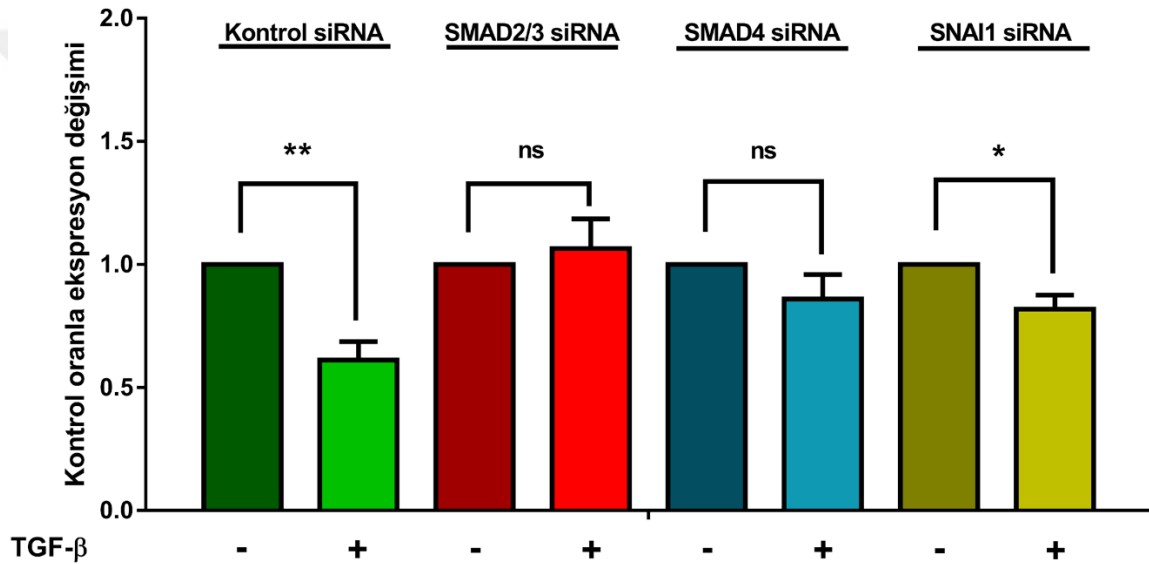
#### 4.7. Küçük hücreli akciğer karsinomasında (KHAK) TGF- $\beta$ sinyal yolağı ve SATB2 arasındaki ilişkinin belirlenmesi

Çalışmamız boyunca elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin TGF- $\beta$  ile indüklenen SATB2 baskılanmasından doğrudan sorumlu olduğu ve TGF- $\beta$  sinyal yolağının aktivasyonu ile SATB2 ekspresyon seviyesi arasında ters bir korelasyonun varlığını gösterildi. Bu kapsamda TGF- $\beta$  sinyal yolağının inaktif olduğu literatürdeki birçok çalışma ile bilinen akciğer kanserinin diğer histolojik alt grubunu temsil eden Küçük hücreli akciğer karsinoması (KHAK) çalışmamıza dahil edildi (Murai vd. 2015). Böylece SATB2'nin akciğer kanser patogenezindeki rolünü tüm yönleriyle aydınlatmayı amaçladık. Öncelikle, KHDAK ve KHAK hücre dizilerinin TGF- $\beta$  uyarımına karşı cevaplarını test ettik. TGF- $\beta$ 'nın, KHDAK hücre hatlarında (A549, H1703 ve H1299) p-SMAD2/3 seviyesini artırarak bu yolağı aktive etmesine karşın, H82 ve H209 gibi KHAK hücre hatlarında ise yolağı aktive edemediği gözlemlendi. Ancak, N417 hücre hattında düşük seviyede bir aktivasyonun gerçekleştiği saptandı (Şekil 4-13). Bu bağlamda, TGF- $\beta$  uyarımına kısmi olarak yanıt verebilmesi ve adherent çoğalabilmesi gibi diğer KHAK hücre hatlarından farklı karakterlere sahip olması açısından, çalışmamızda KHAK hücre modeli olarak N417 hücre dizisinin kullanılması uygun bulundu.



**Şekil 4-13** TGF- $\beta$  ile 2 saat süresince inkübe edilmiş A549, H1703, H1299, H82, H209 ve N417 hücre hatlarındaki p-Smad2/3 ve Smad2/3 seviyelerinin Western blot ile belirlenmesi.

N417 hücrelerinde TGF- $\beta$  uyarımına karşı gözlenen kısmi cevabın, SATB2 ekspresyonu üzerindeki etkisini inceledik. Bu bağlamda, TGF- $\beta$  ile uyarılan N417 hücrelerinde SATB2 ekspresyonunun başarılı bir şekilde baskılandığını saptadık (Şekil 4-14). Ayrıca, KHDAK hücrelerinde TGF- $\beta$  aracılı SATB2 baskılanmadan sorumlu olduğunu tespit ettiğimiz SNAI1 ve SMAD transkripsiyon faktörlerinin susturulduğu N417 hücrelerinde, TGF- $\beta$  indüklü SATB2 baskılanmasının anlamlı şekilde inhibe olduğu gözlemlendi (Şekil 4-14). Bu sonuçlar ile KHDAK hücrelerindeki TGF- $\beta$  yolağının aktivasyonu ve SATB2 ekspresyonu arasındaki ilişkinin KHAK hücrelerinde de korunduğunu gösterildi.

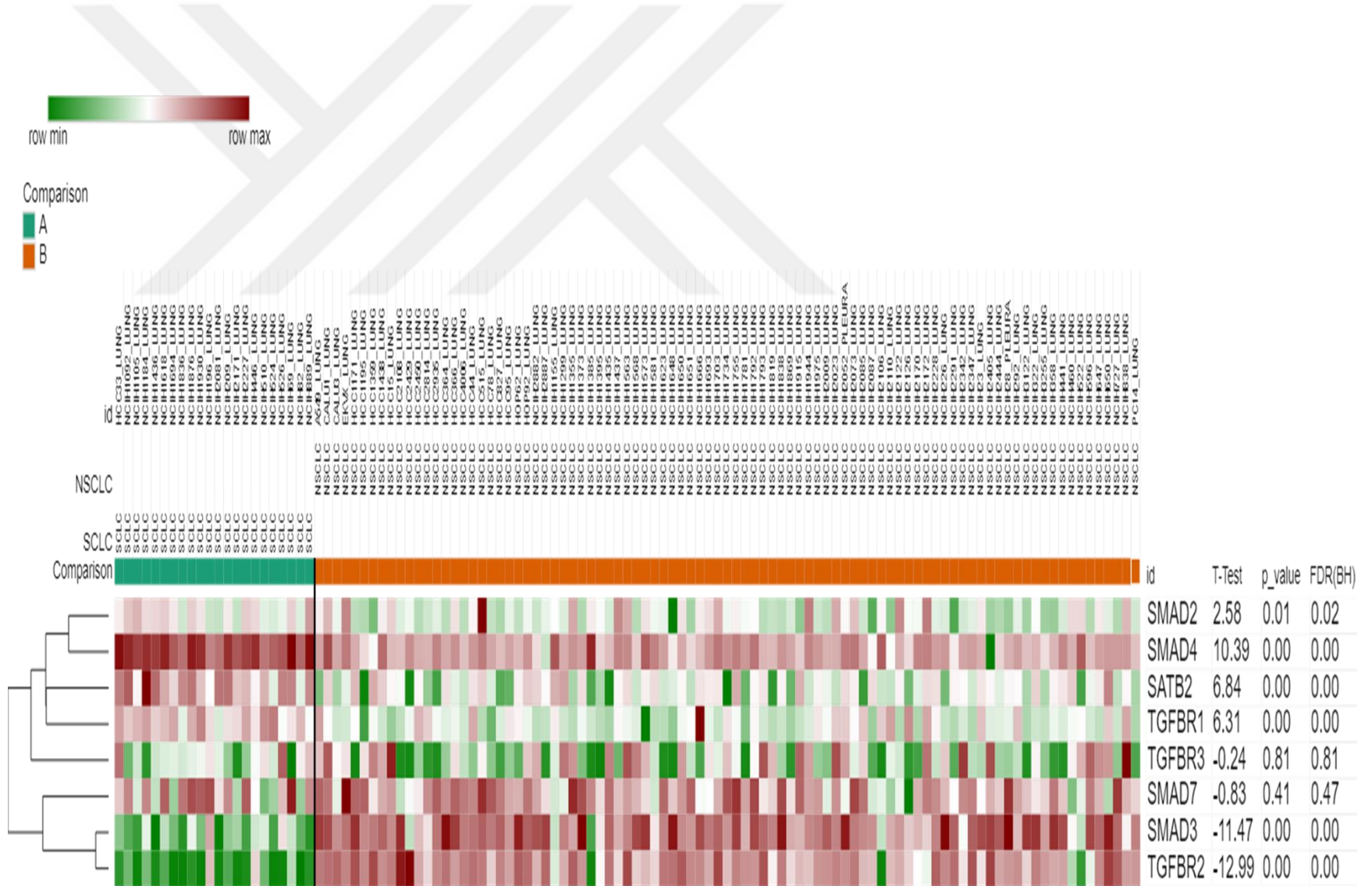


**Şekil 4-14** SMAD2/3, SMAD4, SNAI1 ve Kontrol siRNA ile transfecte edilmiş N417 hücrelerinin TGF- $\beta$  ile 24 saat süre inkübasyonu sonucunda SATB2 ekspresyon değişimlerinin qPCR yöntemi ile tespit edilmesi. \*P <0.05.

#### 4.8. KHAK ve KHDAK hücrelerinin SATB2 profilleri

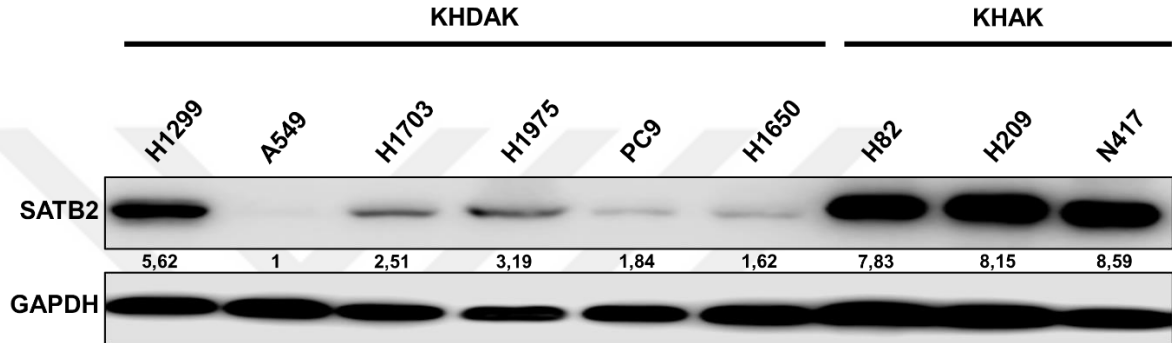
“MORPHEUS” adlı biyoinformatik yazılım programında 500’den fazla hücre hatlarının gen ekspresyon profillerinin yer aldığı “depmap” platformu kullanılarak KHDAK ve KHAK akciğer kanser alt gruplarındaki TGF- $\beta$  sinyal yolağında fonksiyon gösteren kilit moleküllerin SATB2 ile ilişkisini heatmap yöntemiyle araştırdık. Şekil 4-15’te görüldüğü üzere, TGF- $\beta$  sinyal yolağının aktivasyonu için kritik olan TGFBR2 ve SMAD3 ekspresyonlarının KHAK hücrelerinde downregüle olduğu, SATB2’nin ise upregüle olduğu tespit edildi (Şekil 4-15).





**Şekil 4-15** TGFB1, TGFB2, TGFB3, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD7 ve SATB2'nin, KHDAK ve KHAK akciğer kanser alt gruplarındaki ekspresyonlarının heatmap ile profilendirilmesi.

Şekil 4-15'te görülen biyoenformatik programından elde etmiş olduğumuz verileri, çeşitli KHDAK ve KHAK hücre hatlarındaki SATB2 ekspresyon seviyelerini karşılaştırarak teyit etmeyi amaçladık. Bunun için normal kültür şartlarında proteinleri izole edilmiş çeşitli KHDAK ve KHAK hücre hatlarındaki SATB2 protein seviyelerini tespit ettik ve beklediğimiz üzere TGF- $\beta$  yolağı aktif olmayan KHAK hücre dizilerindeki SATB2 ekspresyonunun, KHDAK hücre dizilerindekine göre daha yüksek olduğunu gördük (Şekil 4-16).

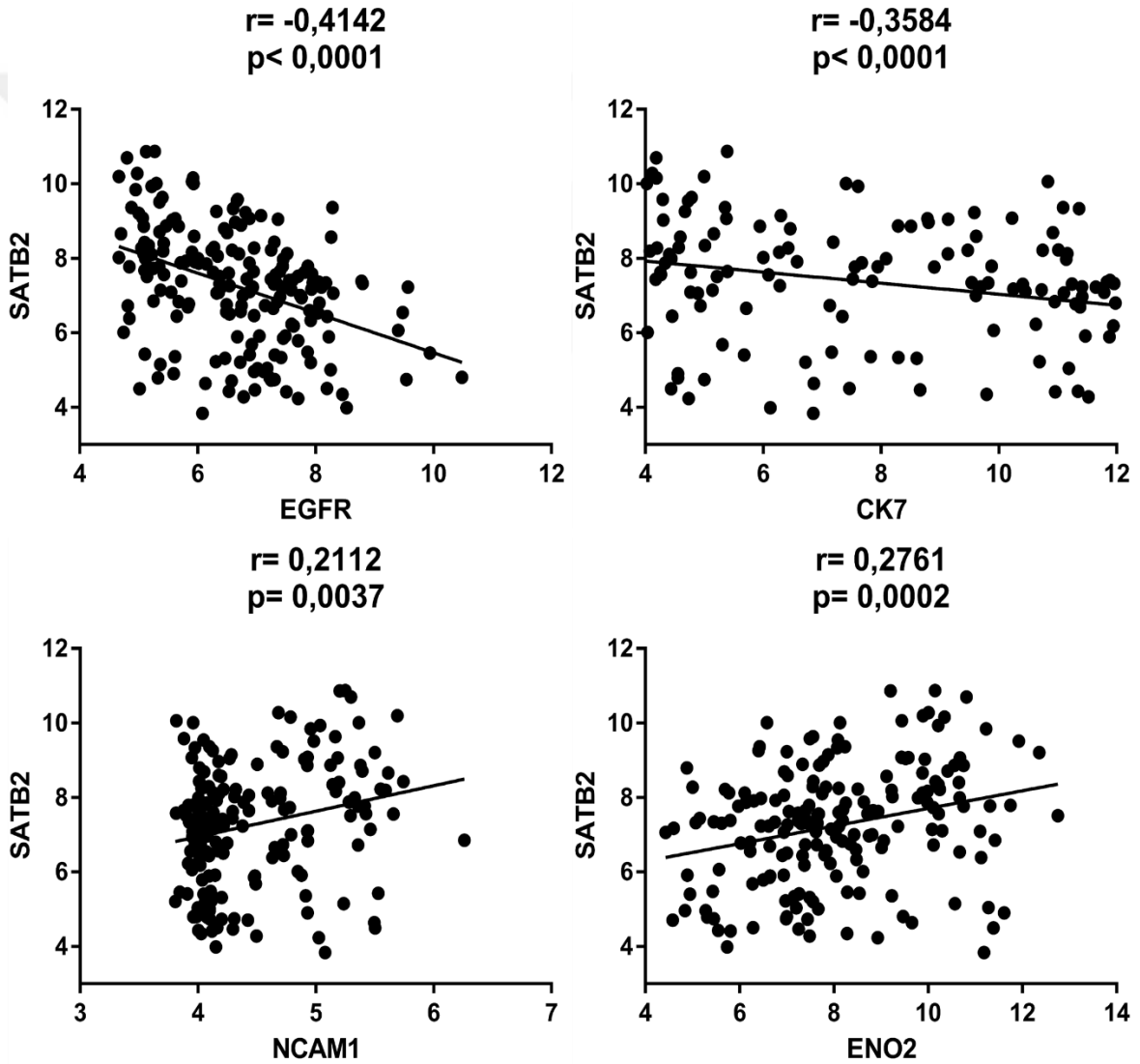


**Şekil 4-16** Normal kültür şartlarındaki KHDAK hücre hatlarındaki (H1299, A549, H1703, H1975, PC-9 ve H1650) ve KHAK (H82, H209 ve N417) hücre hatlarındaki SATB2 protein seviyelerinin Western blot analizi ile tespit edilmesi.

#### 4.9. SATB2'nin KHDAK hücrelerinin KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşmalarındaki olası düzenleyici rolünün tespiti

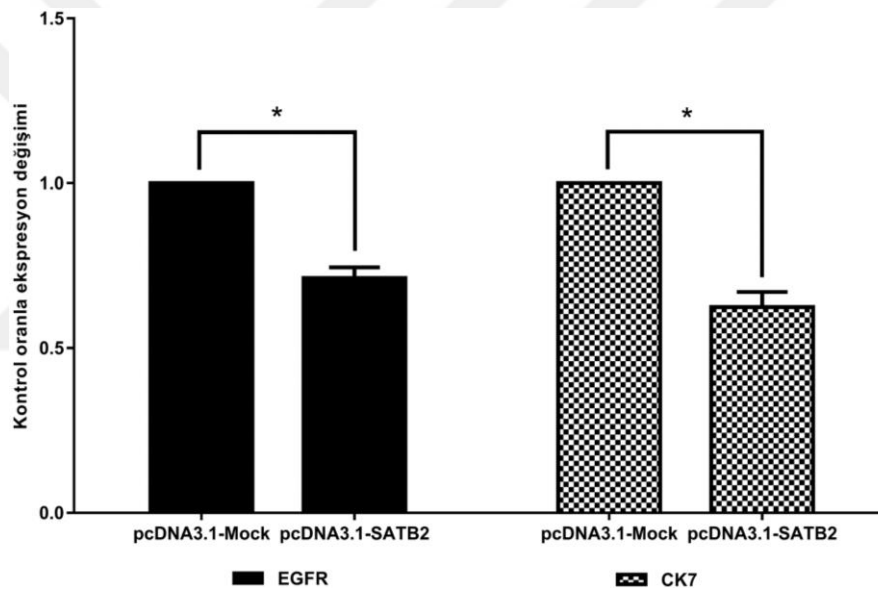
Nöroendokrin tümörler, akciğer kanserlerinin yaklaşık olarak %20'sini oluşturmakta ve bunun da büyük bir çoğunluğunu KHAK alt grubu temsil etmektedir (van Meerbeeck vd. 2011). Nöroendokrin fenotip sergilemesinden dolayı KHAK'nin histopatoloji tanılarında çeşitli nöroendokrin belirteçleri kullanılmaktadır. SATB2 proteininin ise çeşitli nöron hücrelerinin farklılaşmasını düzenleyerek nöronal hücrelerin fizyolojisinde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir (Gyorgy vd. 2008). Ayrıca yakın zamanda yapılan çalışmalarla KHDAK hastalarında uygulanan kanser terapisine karşı gelişen farklı bir direnç mekanizmasının varlığı rapor edildi. Bu mekanizmanın da KHDAK hücrelerinin farklılaşarak KHAK-benzeri nöroendokrin hücre özelliklerinin kazanmasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Yuan vd. 2019). Bu kapsamda KHAK hücre dizilerinde ve KHDAK alt grubuna bağlı nöroendokrin hücre karakteri sergileyen büyük hücreli akciğer karsinomu kategorisinde olan H1299 hücre dizisinde SATB2 ekspresyonunun aşırı ifade edilmesi, nöroendokrin tümörlerin gelişimlerinde ve KHDAK hücrelerinin nöroendokrin farklılaşmalarında SATB2'nin önemli bir role sahip olabileceğini hipotez ettik. Bu doğrultuda hipotezimizi doğrulamak adına CCLE

bioinformatik programı aracılığıyla KHAK tanısında kullanılan çeşitli belirteçlerin SATB2 ekspresyonu ile korele olup olmadıklarını inceledik (WEB\_6 2019). Bu biyoenformatik analizlerimiz sonucu, SATB2 ekspresyonun nöroendokrin özelliklere sahip KHAK hücrelerinde aşırı ifade edilen NCAM1 ve ENO2 (NES) ekspresyonları ile pozitif anlamlı bir korelasyona sahip olduğu, bunun aksine KHAK hücrelerinde ifadelerinin baskılandığı bilinen EGFR ve CK7'nin SATB2 ekspresyonu ile negatif bir korelasyon sergilediğini tespit ettik (Şekil 4-17).



**Şekil 4-17** 187 adet KHDAC ve KHAK hücre hatlarındaki NCAM1, NSE, EGFR ve CK7 mRNA seviyelerinin SATB2 mRNA seviyesi ile aralarındaki ilişkilerin regresyon analizi ile tespit edilmesi.

Ayrıca, KHDAK hücrelerinin KHAK benzeri nöroendokrin farklılaşma sürecinde ekspresyonları baskılanan EGFR ve CK7 moleküllerinin SATB2'nin aşırı ifade edildiği H1299 hücresinde azalıp azalmadığını qPCR ile belirlemek istedik. Şekil 4-17'deki sonuçlarla paralel bir şekilde, SATB2'nin aşırı ifadesinin EGFR ve CK7 ekspresyonlarının anlamlı bir şekilde baskılanmasına yol açtığını ve böylece SATB2'nin, KHDAK hücrelerinin KHAK benzeri nöroendokrin farklılaşmasını *in vitro* olarak indükleyebileceğini tespit ettik (Şekil 4-18). Tüm bu sonuçlar, SATB2'nin hem nöroendokrin tümörlerin patogenezinde hem de KHDAK hücrelerinin terapiye karşı direnç mekanizması olarak geliştirdikleri nöroendokrin farklılaşmaları süreçlerinde önemli bir role sahip olacağı yönündeki hipotezimi desteklemiştir



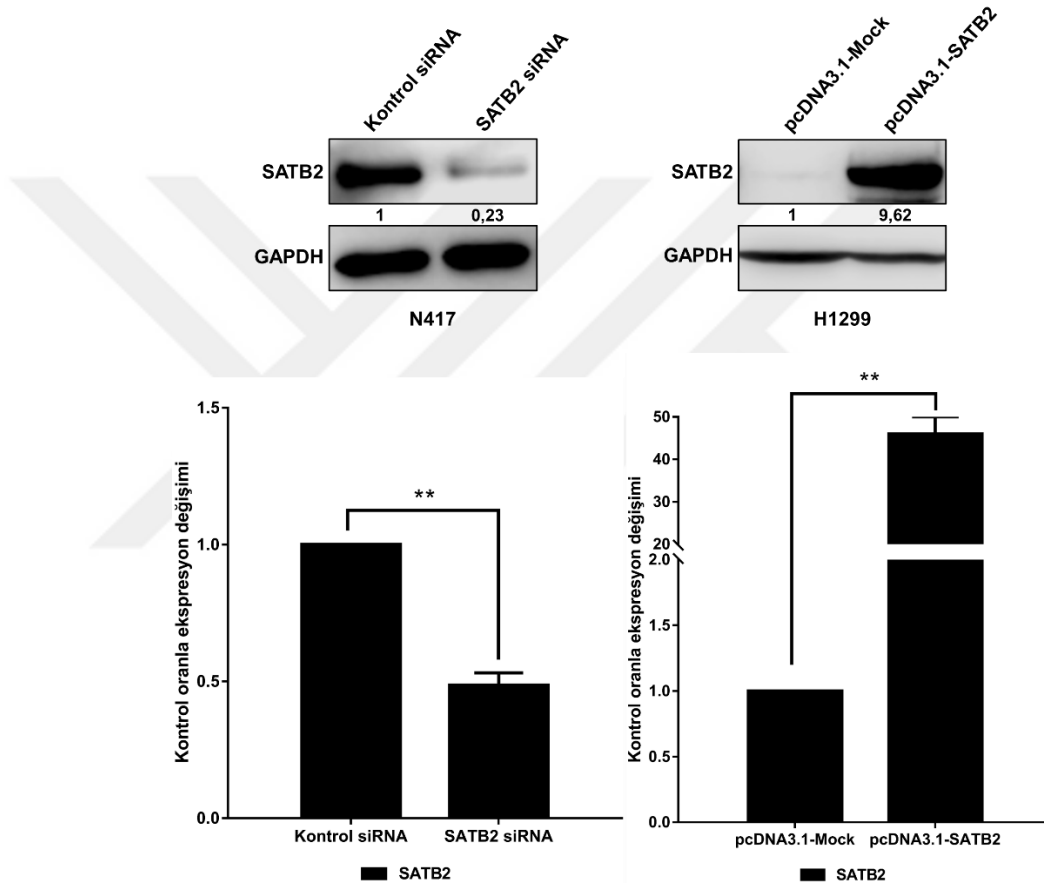
**Şekil 4-18** SATB2'nin aşırı ifade edildiği NCI-H1299 hücre gruplarında EGFR ve CK7 ekspresyonlarındaki değişimlerin qPCR ile tespit edilmesi. \*P < 0.05.

#### 4.10. Mikroarray

Çalışmamızın bundan sonraki sürecinde H1299 KHDAK hücre hatlarında SATB2'nin aşırı ifade edilmesi ve H1299 hücrelerine kıyasla SATB2 ifadesinin daha yüksek olduğu N417 KHAK hücre hatlarında da SATB2 ekspresyonunun baskılanması yoluyla akciğer kanser hücrelerindeki genel ekspresyon profil değişimlerini Mikroarray (Affymetrix's Human GeneST array) aracılığıyla tespit etmeyi amaçladık. Böylelikle, SATB2'nin KHDAK ve KHAK hücrelerinin EMT ve invazyon gibi süreçlerin yanısıra nöroendokrin farklılaşma sürecindeki rolünü de aydınlayabileceğimizi düşündük.

#### 4.10.1. Mikroarray örneklerinin hazırlanması

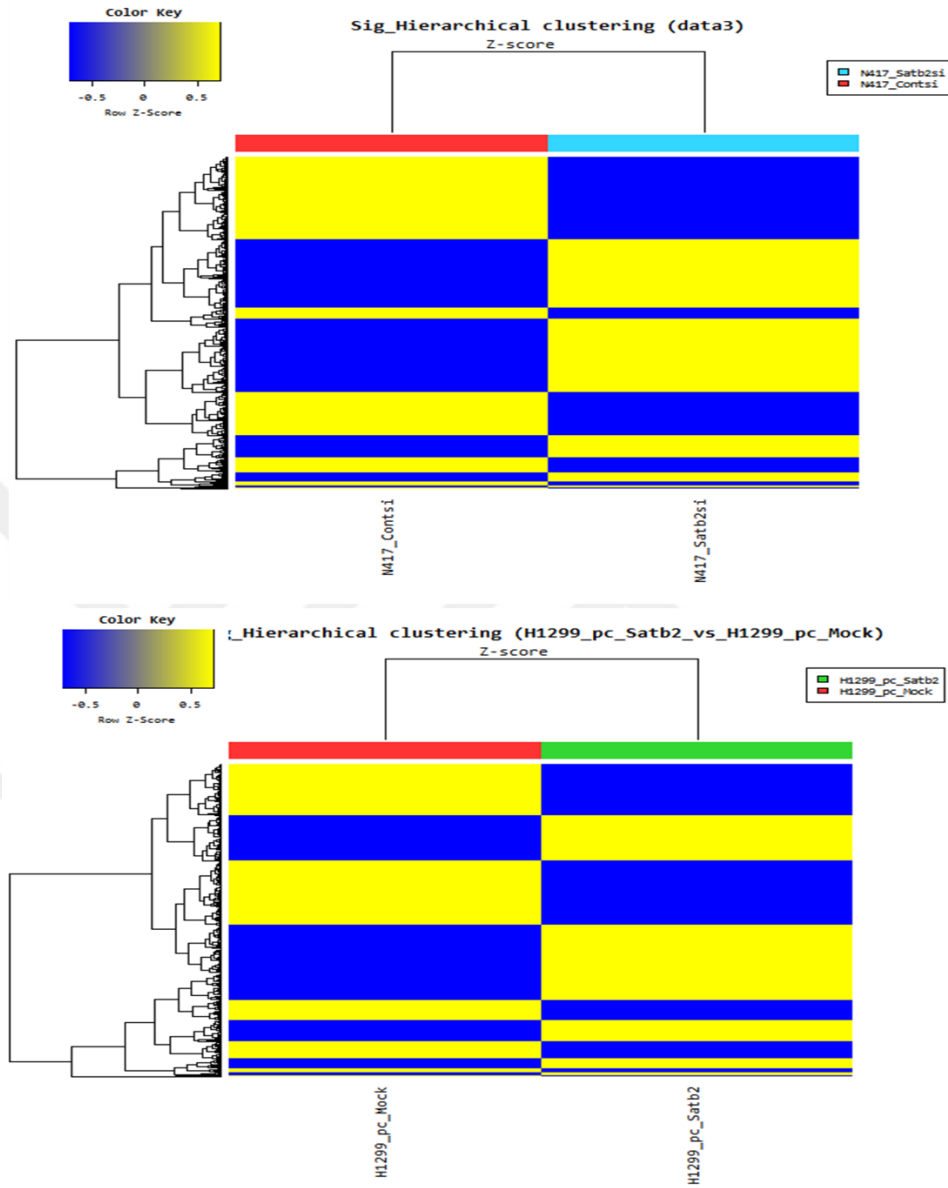
Öncelikle array çalışmalarına göndereceğimiz örneklerdeki SATB2 aşırı ifadesinin ve baskılanmasının başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini teyit ettik. H1299 hücrelerinde SATB2'nin başarılı bir şekilde aşırı ifade edildiği ve N417 hücrelerinde de SATB2'nin anlamlı olarak baskılandığını tespit ettik (Şekil 4-19).



**Şekil 4-19** H1299 hücrelerinde SATB2 ekzojen ekspresyonunun ve N417 hücrelerinde SATB2'nin baskılanmasının Western Blot ve qPCR yöntemleri ile teyit edilmesi. \*\*P < 0.01.

#### 4.10.2. Mikroarray analizinin genel hatlarıyla değerlendirilmesi

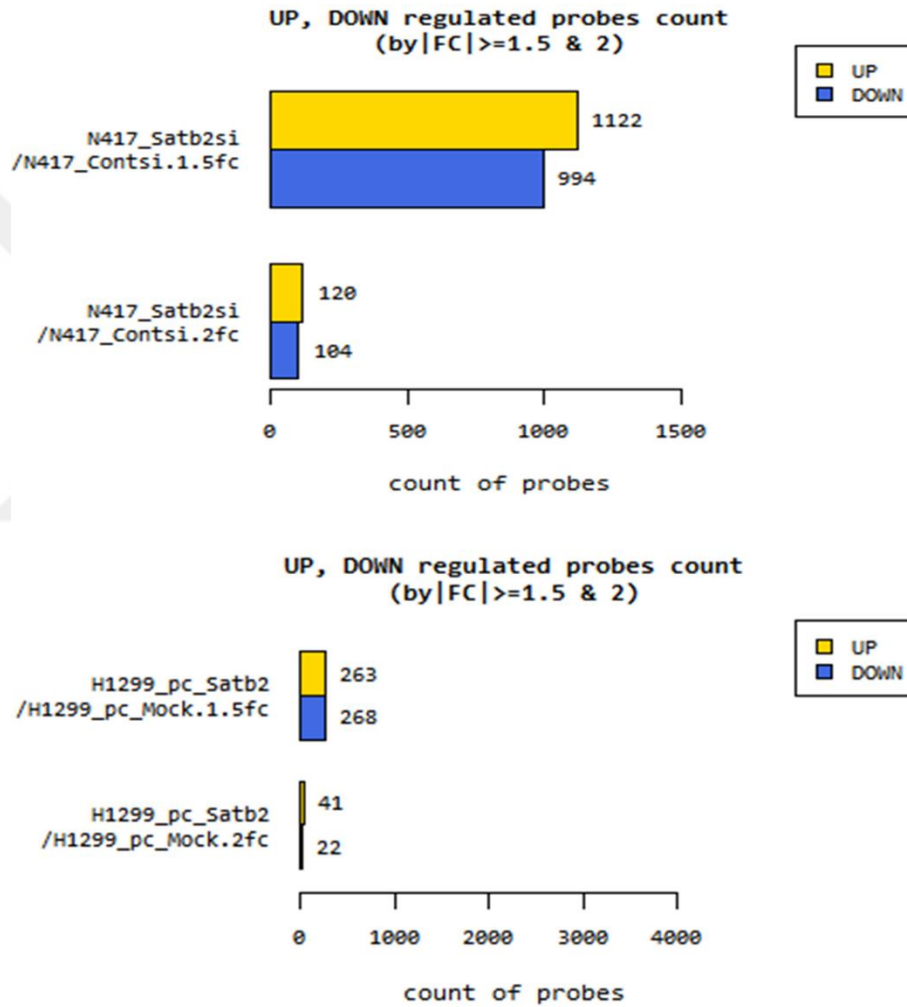
SATB2 ekspresyon değişimleri başarılı bir şekilde doğrulanan örnekler, mikroarray gerçekleştirici firmanın (Macrogen) kurallarına uygun şekilde hazırlanarak gönderildi. Mikroarray çalışmamız 33500 kodlanan transkriptleri ve 11000 kodlanmayan transkriptleri tespit edilmesi için tasarlanan "Affymetrix's Human GeneST array" platformunda gerçekleştirildi. Array sonuçları genel itibariyle hiyerarşik sınıflama yapılarak heatmap haritası üzerinde Şekil 4-20'de gibi gösterildi.



**Şekil 4-20** SATB2'nin baskılandığı N417 ve aşırı ifade edildiği H1299 hücre gruplarındaki gen ekspresyon değişim profillerinin heatmap ile genel gösterimi.

Elde edilen array sonuçlarına göre "cut-off" kat değişimi (fold change, FC) değeri "1,5" kat üzeri olarak değerlendirildiğinde SATB2'nin baskılandığı N417 hücresinde 1122 genin upregüle, 994 genin de downregüle ve "cut-off" kat değişimi (fold change, FC) değeri "2" kat üzeri olarak değerlendirildiğinde ise 120 genin upregüle, 104 genin de downregüle oldukları belirlenmiştir (Şekil 4-21).

SATB2'nin aşırı ifade edildiği H1299 hücresindeki değerleri incelediğimizde, "cut-off" kat değişimi (fold change, FC) değerinin "1,5" kat üzeri olarak uygulanmasında 263 genin upregüle, 268 genin de downregüle ve "cut-off" kat değişimi (fold change, FC) değeri "2" kat üzeri olarak baz alındığında ise 41 genin upregüle, 22 genin de downregüle oldukları görülmüştür (Şekil 4-21).

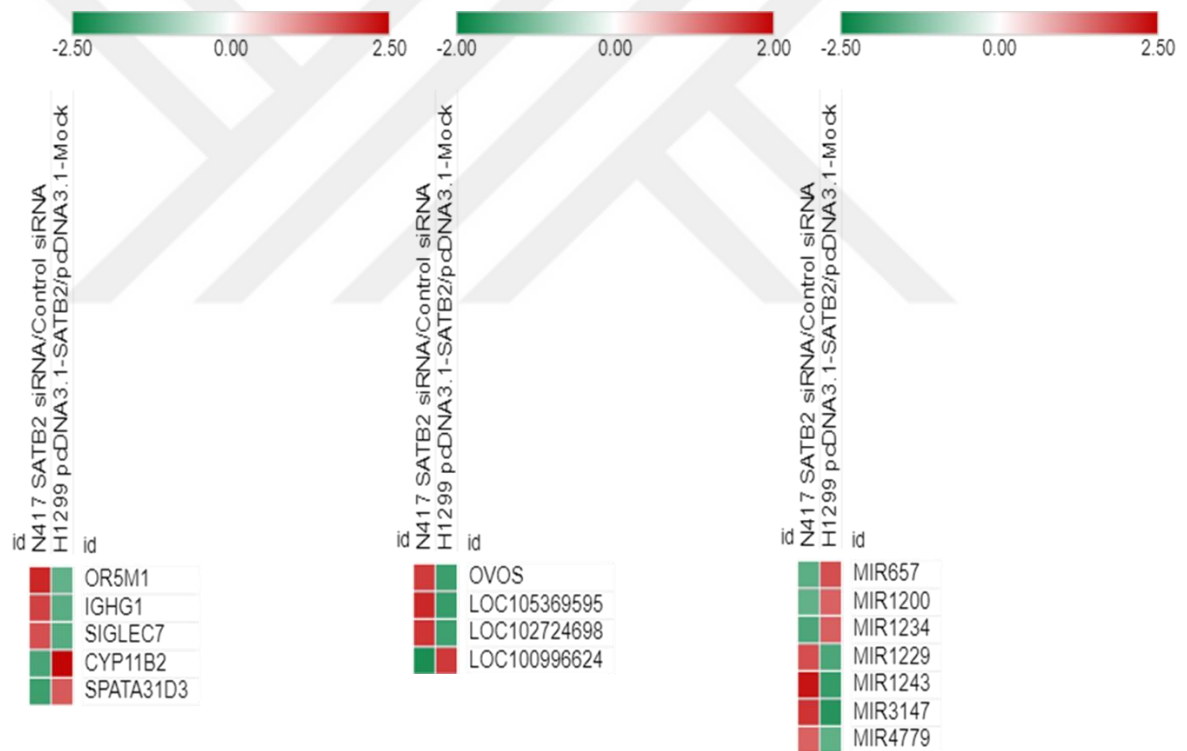


**Şekil 4-21** SATB2'nin baskılandığı N417 ve aşırı ifade edildiği H1299 hücre gruplarında  $|FC| \geq 1,5$  veya  $\geq 2$  değerlerine göre ekspresyonun arttığı/azaldığı tespit edilen gen sayıları.

#### 4.10.3. Mikroarray sonuçlarının filtrelenerek analizi

SATB2'nin baskılandığı hücre grubunda ekspresyon seviyelerinin artarak SATB2'nin aşırı ifade edildiği hücre grubunda ise ekspresyonları azalan veya tam tersi SATB2'nin

baskılandığı hücre grubunda ekspresyon seviyelerinin azalarak SATB2'nin aşırı ifade edildiği hücre grubunda ise ekspresyonları artan genleri tespit etmeyi amaçladık. Böylece, ekspresyonları doğrudan SATB2 ile ilişkili olan genleri daha sağlıklı bir şekilde filtreleyeceğimizi düşündük. Array sonuçlarımızı bu bağlamda değerlendirdiğimizde, 5 adet kodlanan RNA (mRNA), 4 adet uzun-kodlanmayan RNA (lncRNA) ve 7 adet de miRNA (mikroRNA) sınıfına ait gen tespit ederek heatmap yöntemi ile gösterildi (Şekil 4-22). Filtrelenen mikroarray sonuçlarımıza bu genlerin *OR5M1*, *IGHG1*, *SIGLEC7*, *CYP11B2* ve *SPATA31D3* (mRNA), *OVOS*, *LOC105369595*, *LOC102724698* ve *LOC100996624* (lncRNA) ve *MIR657*, *MIR1200*, *MIR1229*, *MIR1234*, *MIR1243*, *MIR3147* ve *MIR4779* (miRNA) olduğu tespit edildi (Şekil 4-22).



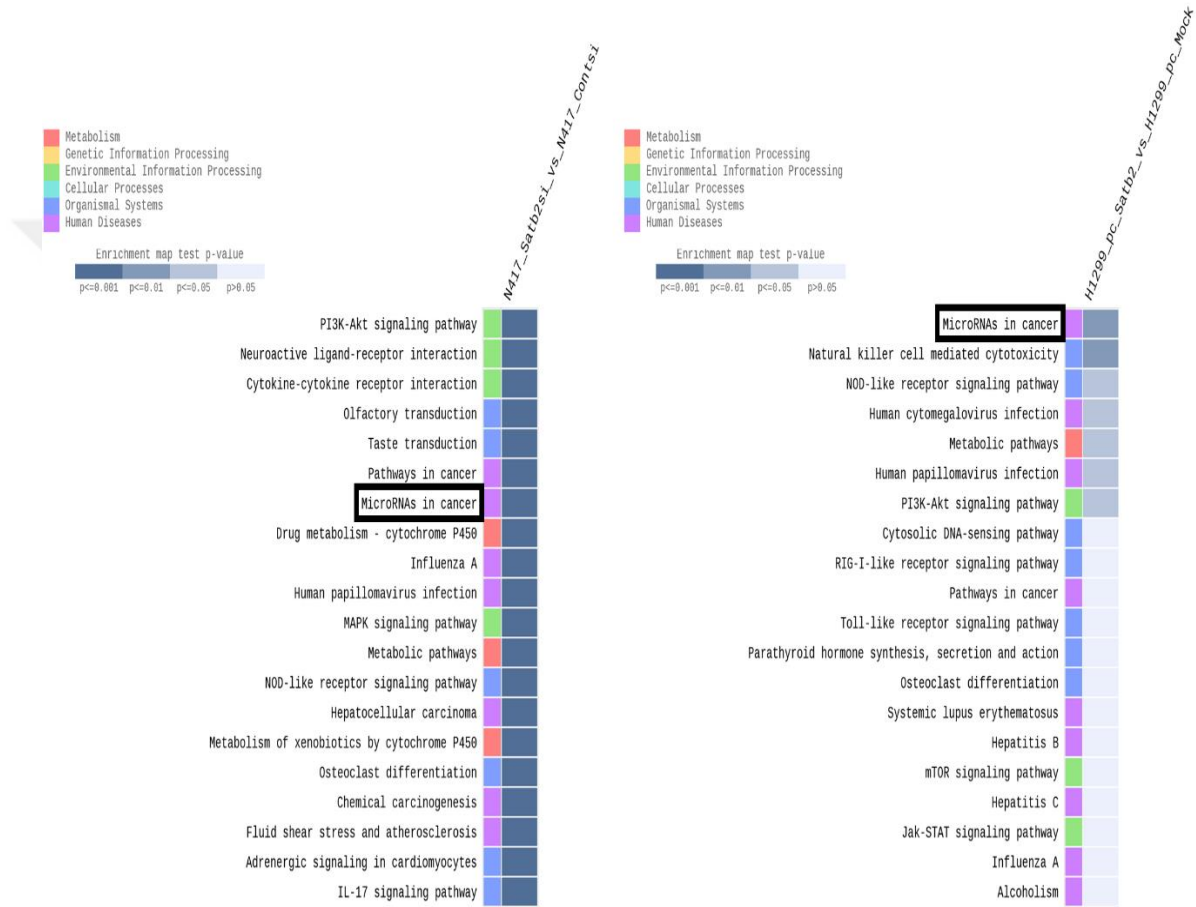
**Şekil 4-22** SATB2'nin baskılandığı N417 ve aşırı ifade edildiği H1299 hücre gruplarında anlamlı değişimi gözlenen ve filtrelenen genlerin heatmap ile gösterilmesi.

#### 4.10.4. Mikroarray sonuçlarının Gen Set Zenginleştirme Analizi (GSEA)

Gen Set Zenginleştirme Analizi (GSEA) analizi kullanılarak bu değişimi gözlenen genlerin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde hangi moleküler mekanizmalarda rol alan gen setlerinde yer aldığını araştırdık. Her iki hücre grubunda da ortak olarak "kanserde rol alan



miRNA” ve “PI3K-Akt signaling pathway” sınıfına ait gen setindeki değişimlerin istatistiksel öneme sahip olduğunu tespit ettik. PI3K-Akt sinyal yolağına ait herhangi bir genin filtrelediğimiz genler içerisinde olmamasından dolayı, sadece SATB2 ile ilişkili miRNA'lara odaklandık (Şekil 4-23).

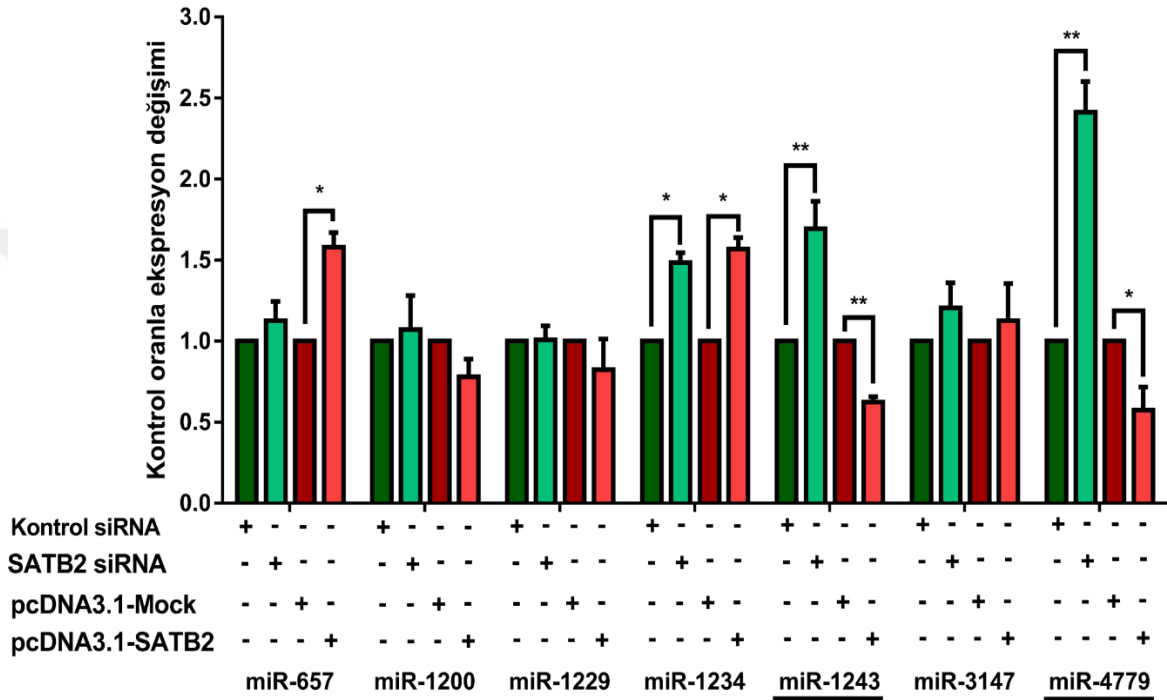


**Şekil 4-23** SATB2'nin baskılandığı N417 ve aşırı ifade edildiği H1299 hücre gruplarında değişimi gözlenen genlerin rol aldığı moleküler mekanizmaların GSEA analizi ile tespit edilmesi.

#### 4.10.5. Filtrelenen mikroarray sonuçlarının Real-Time PCR ile teyit edilmesi

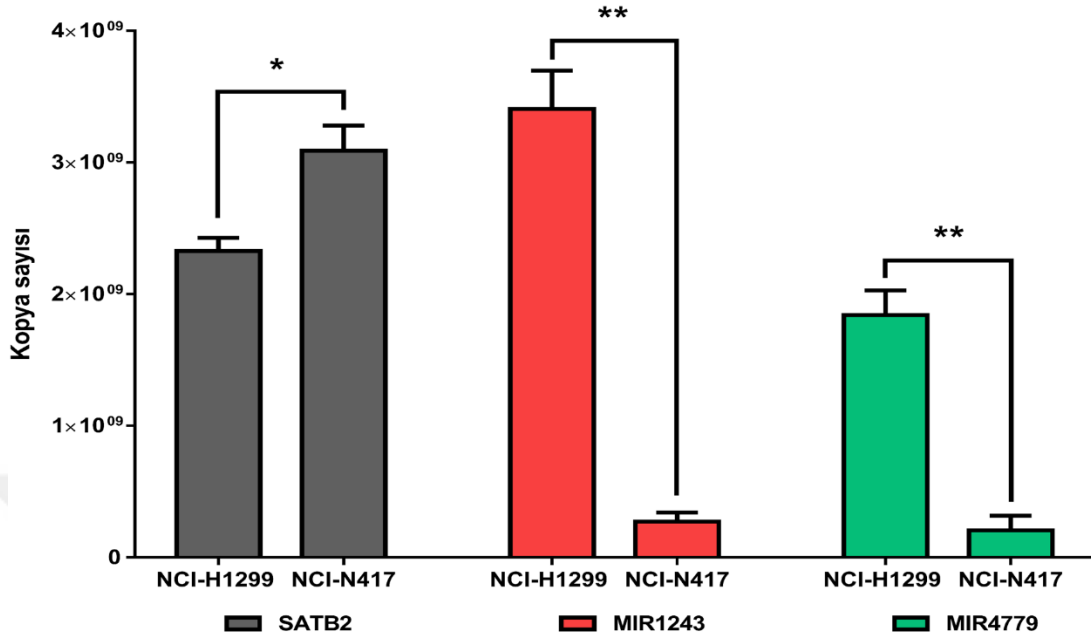
Mikroarray sonuçlarımıza uygulamış olduğumuz filtrelemeler ile tespit edilen miR-657, miR-1200, miR-1229, miR-1234, miR-1243, miR-3147 ve miR-4779 genlerin ekspresyonlarındaki değişimleri, tekrarlanan bağımsız hücre gruplarımızda Real-Time PCR yöntemi ile teyit etmeyi amaçladık. miR-1243 ve miR-4779 ekspresyon seviyelerinin SATB2'nin baskılandığı N417 hücresinde arttığı ve SATB2'nin aşırı ifade edildiği H1299

hücrelerinde ise azaldığı tespit edildi (Şekil 4-24). Ancak diğer miRNA genlerinde gözlenen ekspresyon değişimleri mikroarray sonuçlarımızla tutarlı olmadığı saptandı. Sonuç olarak, sadece miR-1243 ve miR-4779'deki değişimlerin, mikroarray sonuçlarıyla anlamlı şekilde tutarlı olduğu belirlendi.



**Şekil 4-24** SATB2'nin baskılandığı N417 ve SATB2'nin aşırı ifade edildiği H1299 hücre gruplarındaki miRNA'ların ekspresyonlarındaki değişimlerin qPCR yöntemi ile tespit edilmesi. \*P < 0.05 ve \*\*P < 0.01.

Son olarak miR-1243 ve miR-4779 ekspresyonlarının, SATB2'nin ve akciğer kanser hücrelerinin nöroendokrin karakter sergilemesi arasında negatif bir korelasyon olabileceğini hipotez ettik. Daha sonra bu hipotezimizi doğrulamak adına KHDAK hücre dizisi H1299 ve KHAK hücre dizisi N417'deki miR-1243 ve miR-4779 ekspresyon seviyelerini karşılaştırdık. Beklediğimiz üzere, SATB2 ifadesinin daha yüksek olduğu nöroendokrin kökenli KHAK hücre dizisi N417'deki miR-1243 ve miR-4779 ekspresyon seviyelerinin KHDAK hücre dizisi H1299'a kıyasla dramatik şekilde düşük seviyede olduğu tespit edildi (Şekil 4-25).



**Şekil 4-25** Normal kültür şartlarındaki H1299 ve N417 hücrelerindeki SATB2, miR-1243 ve miR-4779 ekspresyon seviyelerinin qPCR yöntemi ile tespit edilmesi. \*P <0.05 ve \*\*P < 0.01.

#### 4.10.6. SATB2 ile regüle edilen miR-1243 ve miR-4779'un olası hedeflerinin tespiti

SATB2 tarafından regüle edildiğini tespit etmiş olduğumuz miR-1243 ve miR-4779 miRNA genlerinin olası hedeflerinin tespiti için, web tabanlı "DIANATOOLS" miRNA-hedef gen tahmin aracı kullanıldı (WEB\_7 2019). Bu biyoenformatik araç, hem miRNA'ların tahmini hedef genlerinin tespit edilmesinde hem de bu olası hedef genlerin hangi sinyal yollarında rol aldıklarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Öncelikle, tümdengelimci bir yaklaşımla miR-1243 ve miR-4779 miRNA genlerinin, karsinogenez sürecine katılan hangi sinyal yollarını regüle edebileceklerini tespit etmeyi amaçladık. Bu bağlamda, miR-1243 ve miR-4779 genlerinin ortak bir şekilde TGF- $\beta$ , Hippo ve tiroid hormon sinyal yollarını hedef alabileceklerini tespit ettik (Şekil 4-26). Bu analizlere göre, miR-1243'ün TGF- $\beta$  sinyal yolağında 4, Hippo sinyal yolağında 3 ve tiroid hormon sinyal yolağında da 3 farklı geni tahmini olarak hedef alabileceği, diğer taraftan miR-4779'un ise TGF- $\beta$  sinyal yolağında 4, Hippo sinyal yolağında 8 ve tiroid hormon sinyal yolağında da 6 farklı geni tahmini olarak hedef alabileceği görüldü (Şekil 4-26).

#	KEGG pathway	p-value	#genes	#miRNAs	<a href="#">download results</a>
1.	<a href="#">TGF-beta signaling pathway_(hsa04350)</a>	7.61906192499e-05	8 <a href="#">see genes</a>	2	<a href="#">details</a>
	hsa-miR-4779 microT-CDS		4 <a href="#">see genes</a>		
	hsa-miR-1243 microT-CDS		4 <a href="#">see genes</a>		
2.	<a href="#">Hippo signaling pathway_(hsa04390)</a>	0.000127248160215	11 <a href="#">see genes</a>	2	<a href="#">details</a>
	hsa-miR-1243 microT-CDS		3 <a href="#">see genes</a>		
	hsa-miR-4779 microT-CDS		8 <a href="#">see genes</a>		
3.	<a href="#">Amino sugar and nucleotide sugar metabolism_(hsa00520)</a>	0.00350929034868	3 <a href="#">see genes</a>	2	<a href="#">details</a>
4.	<a href="#">GABAergic synapse_(hsa04727)</a>	0.00350929034868	8 <a href="#">see genes</a>	2	<a href="#">details</a>
5.	<a href="#">Thyroid hormone signaling pathway_(hsa04919)</a>	0.00437544123673	9 <a href="#">see genes</a>	2	<a href="#">details</a>
	hsa-miR-4779 microT-CDS		6 <a href="#">see genes</a>		
	hsa-miR-1243 microT-CDS		3 <a href="#">see genes</a>		
6.	<a href="#">Mucin type O-Glycan biosynthesis_(hsa00512)</a>	0.0242363435101	2 <a href="#">see genes</a>	2	<a href="#">details</a>
7.	<a href="#">Amphetamine addiction_(hsa05031)</a>	0.0242363435101	5 <a href="#">see genes</a>	2	<a href="#">details</a>
8.	<a href="#">Morphine addiction_(hsa05032)</a>	0.0242363435101	8 <a href="#">see genes</a>	2	<a href="#">details</a>
9.	<a href="#">Axon guidance_(hsa04360)</a>	0.0405022492208	11 <a href="#">see genes</a>	2	<a href="#">details</a>

**Şekil 4-26** miR-1243 ve miR-4779 genlerinin tahmini hedeflerine dayalı “gene enrichment” analiz sonuçları.

Son olarak, “gene enrichment” analizi ile tespit edilen miR-1243 ve miR-4779 miRNA genlerinin ilgili sinyal yollarındaki tahmini hedef genleri aşağıda Tablo 4-2’de listelenmiştir.

**Tablo 4-2** miR-1243 ve miR-4779’un ilgili sinyal yollarındaki tahmini hedef genleri.

	<b>TGF-β yolağı</b>	<b>Hippo yolağı</b>	<b>Tiroid hormon yolağı</b>
<b>miR-1243</b>	<i>SMAD2, SMURF2, SKP1 ve SMAD4</i>	<i>SMAD2, SMAD4 ve CTNNA1</i>	<i>SLC16A10, KRAS ve MED4</i>
<b>miR-4779</b>	<i>ACVR1B, SMURF1, SMAD5 ve BMPR2</i>	<i>BTRC, APC, YWHAB, WWTR1, DLG3, BBC3, FBXW11 ve BMPR2</i>	<i>ATP1B2, SLC01C1, THRA, NCOR1, STAT1 ve PRKACB</i>

## 5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, 5 yıllık sağ kalım oranının yaklaşık %18 olması ile dünya çapında kansere bağlı ölümlerin en önde gelen nedenidir ve erken tanısının zorluğu nedeniyle akciğer kanseri hastalarının %80 gibi büyük bir çoğunluğuna etkin bir tedavi uygulanamamaktadır (Quintanal-Villalonga vd. 2019). Akciğer kanseri temel olarak, vakaların yaklaşık %85'ini temsil eden küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve yine yaklaşık olarak %15'ini temsil eden küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere iki ana histolojik grupta sınıflandırılmaktadır. KHDAK ise kendi içinde adenokarsinoma, skuamoz hücreli karsinoma ve büyük hücreli karsinoma olarak alt gruplara ayrılmaktadır ve bu alt gruplar akciğer kanser vakalarının sırasıyla %40, %30 ve %10'unu oluşturmaktadırlar (Travis vd. 2015). Ancak, akciğer kanser patobiolojisinin aydınlatılması yönündeki gelişmeler, yeni hedeflenmiş terapi stratejilerinin ve kemoterapötik ajanların geliştirilmesinin göz önüne alındığı daha kapsamlı bir histopatolojik bir sınıflandırmayı zorunlu kılmıştır (Zugazagoitia vd. 2017) ve bu bağlamda akciğer kanserinin histopatolojik sınıflandırılması güncellenmiştir (Tablo 2-1).

Akciğer kanser vakalarında *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *ALK*, *ROS1*, *FGFR1* ve *PI3K* gibi çeşitli proto-onkogenlerdeki genetik mutasyonlar veya yeniden düzenlenmeler (rearrangement) sıklıkla görülmektedir. Bunun yanında gün geçtikçe onkogenik aktivasyona yol açan bu mutasyonları veya yeniden düzenlenmeleri hedef alan yeni inhibitörler ve ajanlar geliştirilmektedir. Ancak tüm bu ilerlemelere karşın, akciğer kanserinin olağanüstü derecede heterojenite göstermesi, genelleştirilmiş bir tedavi yaklaşımına olanak vermemektedir. Bu nedenle, öncelikle akciğer kanser tedavisindeki en büyük zorluklardan biri olan bu heterojenik fenotipin tüm yönleriyle aydınlatılması gerekmektedir. Akciğer kanserinin erken teşhisi için etkili diagnostik metodların geliştirilmesi ve klinik tedavi yöntemlerinin etkinliğin artıracak yeni stratejilerin tanımlanması, akciğer kanseri ile etkin bir mücadelenin temelini oluşturmaktadır. Son dönemde moleküler tekniklerdeki olağanüstü gelişmeler ile akciğer kanseri gelişiminin ve heterojenitesinin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında büyük ilerlemeler kaydedilmektedir. (Quintanal-Villalonga vd. 2019).

Epigenetik mekanizmalar, akciğer kanserinin oluşumunda, gelişiminde ve heterojenitesinde kritik bir öneme sahiptirler. Bu kapsamda *HOXA2*, *HOXA4*, *NKX2-1* (TTF-1), *ZNF132*, *GATA2*, *KCNIP4*, *ZEB2* ve *FOXF1* gibi transkripsiyon faktörleri, akciğer kanserinin tetikleyici faktörleri olarak tanımlanmıştır. Ancak, kromatin modifiye edici faktörler olarak bilinen moleküller, büyük çaplı gen ekspresyon değişimlerini kontrol edebilmeleri ve

genomik stabiliteinin korunmasındaki rolleri nedeniyle transkripsiyon faktörlerden daha kapsamlı bir şekilde hücrenin kaderini belirleme yeteneğine sahiptirler. Örneğin; EZH2, LSD1, SMARCA4, DNMT1 ve DNMT3A gibi kromatin modifiye edici karaktere sahip epigenetik faktörlerdeki anormal ekspresyonları, akciğer kanser hücrelerinin agresif bir fenotipe sahip olmasına yol açmaktadırlar. Bunlar büyük çaplı gen ekspresyon değişimlerinin regülasyonunu sağlayarak akciğer kanserinin oluşumuna, gelişimine ve heterojenitesine büyük katkı sağlamaktadırlar (Quintanal-Villalonga vd. 2019). Bu bağlamda kromatin yapısını epigenetik faktörlerden daha kapsamlı bir şekilde değiştirebilme kabiliyetinde olan, büyük çaplı gen ekspresyon profillerinin belirlenmesinde ve kontrolünde rol olarak embriyonik gelişim ve farklılaşma süreçlerini yöneten kromatin yeniden modelleme moleküllerinin, kanserleşme sürecinde de kritik roller üstlendikleri rapor edilmektedir (Chen vd. 2019, Naik vd. 2019). Sonuç olarak akciğer kanserinin gelişiminin hemen her kademesinde kritik rol oynayan epigenetik regülasyondaki bozuklukların aydınlatılması, hem güvenilir diagnostik ve prognostik belirteçlerin belirlenmesi hem de etkili tedavi stratejilerinin keşfedilmesi için elzemdir.

Tez çalışmamızda, KHDAK hücrelerinin TGF- $\beta$  tarafından indüklenen EMT ve invazyon süreçlerinde, SATB2'nin düzenleyici rolünü moleküler mekanizmalarıyla aydınlatılmayı amaçladık. 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 (Nieto vd. 2016, Pastushenko vd. 2019). EMT'nin indüksiyonundan sorumlu birçok yeni regülatör protein, miRNA ve lncRNA'lar tanımlanmasına karşın, EMT sürecinin altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Metastatik kaskatın hemen her aşamasında kritik öneme sahip olan EMT süreci, büyük çaplı epigenetik yeniden programlamanın gerektiği ve buna bağlı olarak da çok çeşitli kromatin modifiye edici ve kromatin yeniden modelleme proteinlerinin görevlendirildiği yüksek plastisiteye sahip, oldukça karmaşık bir süreçtir (Dongre vd. 2019, Lamouille vd. 2014). Bu bağlamda, yüz-kafatası gelişimi ve osteoblast farklılaşması gibi biyolojik süreçlerde önemli görevler üstlenen ve hem bir transkripsiyon faktör hem de kromatin yeniden modelleme fonksiyonlarına sahip olan SATB2'nin, EMT sürecinin yönetilmesinde de kritik rol oynayabileceğini hipotez ettik.

EMT indüksiyonunun fenotipik belirteçlerinden en önemlisi, E-kaderin/N-kaderin değişimidir. SATB2 ekspresyonunun baskılandığı A549 hücrelerinde, TGF- $\beta$  uyarımına gerek kalmaksızın E-kaderin/N-kaderin değişiminin indüklendiğini ve ayrıca TGF- $\beta$  tarafından indüklenen bu değişimin daha dramatik şekilde gerçekleştiği tespit edildi (Şekil 4-2 ve Şekil 4-3). Diğer taraftan SATB2'nin aşırı ifade edildiği A549 hücrelerindeki E-kaderin ve N-kaderin protein seviyelerini incelediğimizde, TGF- $\beta$  ile indüklenen E-kaderin baskılanmasındaki şiddetin kısmen azaldığı, N-kaderin upregülasyonunda ise bir inhibisyonun olmadığı gözlemlendi (Şekil 4-4 ve Şekil 4-5). Bu sonuçlar SATB2'nin, E-kaderin ekspresyonunun regülasyonuna doğrudan katıldığını, N-kaderin ekspresyonunu ise dolaylı yollardan etkileyebildiğini göstermektedir. E-kaderin ve N-kaderin genlerinin transkripsiyonel regülasyonunda her ne kadar benzer transkripsiyon faktörler görev alsalar da bu süreçler birbirinden bağımsız bir şekilde ve EMT-TF'lerin farklı kromatin modifiye edici moleküller ile oluşturdukları kompleksler tarafından yönetilmektedir (Lamouille vd. 2014, Skrypek vd. 2017). Bu bağlamda, EMT sürecinde E-kaderin ekspresyonunun baskılanmasında H3K27'daki deasetilasyon ve metilasyon modifikasyonlarının kullanıldığı ve N-kaderin ekspresyonunun indüklenmesinde ise H3K4me metilasyon mekanizmasının rol oynadığı bilinmektedir. Bu mekanizmalar aracılığıyla *E-kaderin* geninin olduğu kromatin yapısı inaktif duruma gelirken, *N-kaderin* gen bölgesindeki kromatin yapısı aktifleşmektedir (Wu vd. 2012). Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada ise SATB2 ekspresyonundaki artışın H3K4me seviyesi üzerinde bir etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir (Wang vd. 2019). Bu bulgular, SATB2'nin N-kaderin gibi mezenkimal genlerin indüksiyonunda doğrudan rol oynamadığını göstermekte ve sonuçlarımızı desteklemektedir. Yine aynı çalışmada, SATB2 ekspresyon seviyesinin E-kaderin ekspresyonunun baskılanmasında önemli kromatin modifikasyonlarından biri olan H3K27ac bölgesinin deasetilasyon seviyesi ile pozitif bir korelasyona sahip olduğu rapor edilmiştir (Wang vd. 2019). Ayrıca, farklı bir çalışmada ise SATB2 ekspresyonunun mezenkimal gen ekspresyonlarından ziyade E-kaderin ekspresyonu ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Xu vd. 2019). Bu bilgiler ışığında, SATB2'nin E-kaderin regülasyonuna doğrudan katıldığını gösteren bulgularımızın literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir.

SATB2'nin, E-kaderin/N-kaderin değişiminin dışında diğer epitelyal belirteçler (Occludin, Claudin ve Zo-1) ve mezenkimal belirteçler (Fibronektin) üzerindeki etkileri de araştırıldı. Bu bağlamda TGF- $\beta$ 'nın, A549 hücrelerindeki Occludin ve Claudin ekspresyonlarını baskılandığını, Fibronektin ekspresyonunu ise başarılı bir şekilde indüklediği görüldü. Ancak, TGF- $\beta$ 'nın diğer bir epitelyal belirteç olan sıkı bağlantı proteini Zo-1 ekspresyonunu baskılamak yerine indüklediğini tespit ettik. SATB2'nin susturulduğu

A549 hücrelerinde, TGF- $\beta$ 'nin Zo-1 üzerindeki etkisinin arttığı görülürken, SATB2'nin aşırı eksprese edildiği A549 hücrelerinde ise TGF- $\beta$  indüklü Zo-1 upregülasyonunun negatif yönde etkilediği gözlemlendi (Şekil 4-2, Şekil 4-3, Şekil 4-4 ve Şekil 4-5). Bu sonuçlar, SATB2'nin EMT sürecindeki Zo-1'in pozitif regülasyonunda doğrudan görev aldığını göstermiştir. Zo-1 proteinin tümör baskılayıcı rolünün yanısıra onkogenik rolünü gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Kleeff vd. 2001, Smalley vd. 2005). Ayrıca bir başka çalışmada ise TGF- $\beta$ 'nin, sonuçlarımızla paralel olarak A549 hücrelerinde Zo-1 ekspresyonunu indüklediğini ve hücre migrasyonunu regüle ettiğini raporlandırılmıştır (So Hee vd. 2015). Dolayısıyla bu çalışmalar, literatürde ilk kez ortaya çıkarmış olduğumuz SATB2 ve Zo-1 arasında beklenmeyen ilişkiyi destekler niteliktedir.

SATB2'nin hücre-hücre bağlantılarını sağlayan diğer EMT belirteçleri üzerindeki etkilerini incelediğimizde, özellikle TGF- $\beta$  indüklü EMT sürecinde E-kaderin ile birlikte Occludin ekspresyonunun da doğrudan SATB2 tarafından negatif olarak regüle edildiği tespit edilmiştir (Şekil 4-2, Şekil 4-3, Şekil 4-4 ve Şekil 4-5). Literatürde SATB2 ve Occludin ekspresyonları arasında ilişkiyi gösteren bir veri bulunmamaktadır ve çalışmamız, bu iki protein arasındaki ilişkiyi açıklayan ilk çalışma olması bakımından literatüre katkı sağlamıştır. Temel olarak sonuçlarımız, EMT sürecinde E-kaderin ve Occludin ekspresyonlarının baskılanma olaylarının birlikte yürütüldüğünü ve SATB2'nin bu süreçlere bir regülatör olarak karıştığını açıkça göstermektedir. Bu kapsamda sonuçlarımızla uyumlu olarak meme kanser hücre modelinde TGF- $\beta$  indüklü EMT sürecini araştıran bir çalışmada, SNAI1-SMAD3/4 kompleksinin *E-kaderin*, *Occludin* ve diğer bir sıkı bağlantı proteinini kodlayan *CAR* geninin ekspresyonlarını promotor bölgelerine bağlanarak eş-zamanlı olarak baskıladıkları gösterilmiştir (Vincent vd. 2009). Dolayısıyla, *E-kaderin* ve *Occludin* gen ekspresyonları üzerinde benzer etkiye sahip olan SATB2'nin, SNAI1-SMAD2/3/4 kompleksinin *E-kaderin* ve *Occludin* genlerinin transkripsiyonel olarak baskılaması sürecine karıştığını düşünüyoruz.

Kritik bir mezenkimal belirteç olan N-kaderin seviyesinin kontrolünde doğrudan görev almadığını tespit etmiş olduğumuz SATB2'nin, bir diğer mezenkimal belirteç olan Fibronektin üzerinde de anlamlı ve tutarlı bir etkiye sahip olmadığını belirledik (Şekil 4-2, Şekil 4-3, Şekil 4-4 ve Şekil 4-5). Literatürde, SATB2 ve Fibronektin proteinleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, farklı kanser türlerinde gerçekleştirilmiş çalışmalarda SATB2'nin, Fibronektin gibi mezenkimal bir belirteç olan Vimentin ekspresyon seviyesi ile tutarlı bir ilişkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Kucuksayan vd. 2016, Xu vd. 2019). Literatür bilgilerini ve bulgularımızı birlikte ele aldığımızda, SATB2'nin, KHDAK EMT'sinde



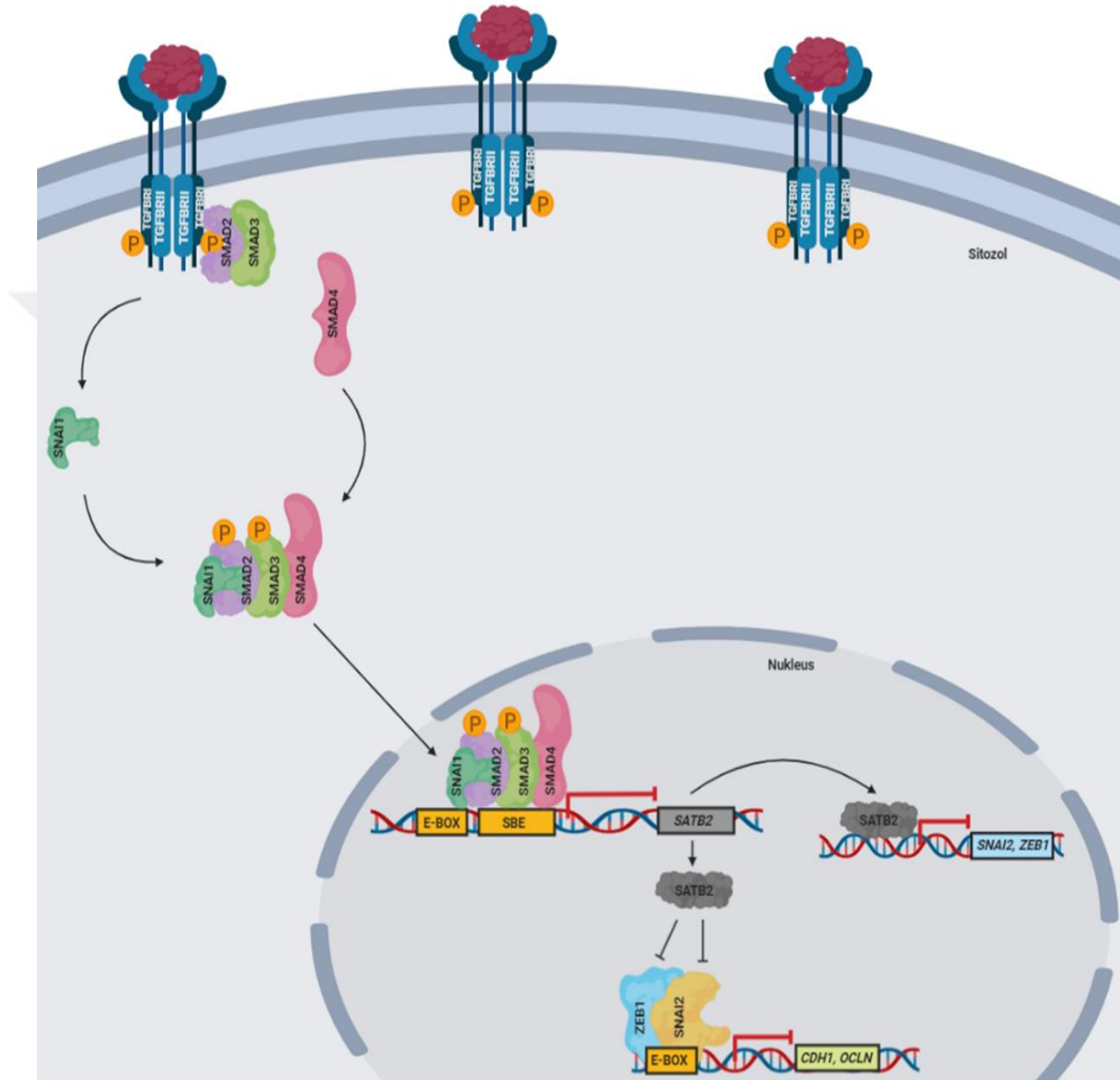
hücrelerin mezenkimal fenotipi kazanmasını sağlayan indükleyici bir faktör olarak rol oynamadığı, buna karşın epitelyal fenotipin kaybı ile ilişkili olan bir baskılayıcı olarak görev aldığı açıkça görülmektedir. SATB2'nin, kromatinin sıkı paketlenmesini sağlayan ve ilgili kromatin bölgesinde bulunan genlerin transkripsiyonlarının baskılanması sürecinde görev alan histon deasetilaz-1 (HDAC1) gibi proteinler ile etkileştiği ve bu proteinlerin fonksiyonlarında düzenleyici role sahip olduğu rapor edilmiştir (Britanova vd. 2008, Gyorgy vd. 2008). Bu çalışma, SATB2'nin bir gen aktivatörü olmaktan ziyade bir represör olarak gen regülasyon mekanizmalarına katıldığını göstermekte ve bulgularımızı desteklemektedir. Sonuç olarak, SATB2'nin, çeşitli HDAC proteinleri ve SNAI1-SMAD2/3/4 transkripsiyon baskılayıcı komplekslerle etkileştiğini ve bunun neticesinde özellikle E-kaderin ve Occludin gibi ekspresyonlarının baskılanması sürecinde engelleyici bir faktör olarak fonksiyon gösterdiğini düşünmekteyiz.

SATB2'nin EMT belirteçleri üzerindeki etkilerini tespit ettikten sonra, "SATB2 KHDAK EMT'si üzerindeki bu etkisini TGF- $\beta$  sinyal yolağındaki hangi faktörler üzerinden gerçekleştirmektedir" sorusuna yanıt aradık. EMT sürecinin transkripsiyonel kontrolü "zinc-finger E-box binding homeobox factors" olarak adlandırılan ZEB1, ZEB2, SNAIL (SNAI1), SLUG (SNAI2) ve "basic-helix-loop-helix factors" olarak nitelendirilen TWIST1, TWIST2 EMT-TF'ler tarafından gerçekleşmektedir (Dongre vd. 2019). Bunun için öncelikle TGF- $\beta$  tarafından EMT sürecini yönetmekte aktif roller üstlenen SNAI1, SNAI2 ve ZEB1 gibi transkripsiyon faktörlerinin SATB2 ekspresyon değişimlerinden nasıl etkilendiğini inceledik. SATB2 ifadesi baskılanan A549 hücrelerinde, TGF- $\beta$  ile ekspresyonları artan SNAI2 ve ZEB1 transkripsiyon faktörlerinin daha kuvvetli bir şekilde indüklendiği, bunun yanısıra SATB2 aşırı ifade edilen A549 hücrelerinde ise bu iki transkripsiyon faktördeki TGF- $\beta$  tarafından indüklenen ekspresyon artışının azaldığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, SATB2 kromatin yeniden modelleyicisinin, E-kaderin, N-kaderin, Occludin, Claudin ve Zo-1 gibi birçok EMT belirtecinin transkripsiyonel regülatörü olan SNAI2 ve ZEB1 gibi transkripsiyon faktörleri üzerinde baskılayıcı bir role sahip olduğunu ve buna bağlı olarak TGF- $\beta$  aracılı EMT indüksiyonunun şiddetini kontrol edebildiğini göstermektedir. Benzer bir mekanizmanın varlığı kolorektal kanser hücrelerinde gösterilmiştir. Bu çalışmada SATB2'nin, HDAC1 ile birlikte SNAI1 ekspresyonunun baskılanmasında rol oynadığı rapor edilmiştir (Wang vd. 2019). Bu bağlamda SATB2'nin, EMT-TF'lerin ekspresyonlarını baskılayarak EMT sürecinin regülasyonuna katıldığını gösteren bulgularımız, literatür ile uyumludur. Diğer taraftan, kolorektal kanser hücrelerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise SATB2 kaybının, SNAI1 ekspresyon seviyesinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Yu vd. 2017).

Çalışmamızda ise TGF- $\beta$  ile uyarılmayan hücrelerde oluşturduğumuz SATB2 ifadesindeki değişimlerin SNAI1 ekspresyonu üzerinde bir etkisinin olmadığı, ancak ilginç bir şekilde TGF- $\beta$  indüklü SNAI1 ekspresyon artışında SATB2 varlığının gerekli olduğu bulundu. Tüm bu bilgiler ışığında, SATB2'nin, SNAI1 ekspresyonu üzerindeki düzenleyici etkisinin benzer kanser türünde bile farklılık gösterdiği açıkça görülmektedir. Bu bağlamda SATB2'nin SNAI1 regülasyonunda oynadığı rol, tüm yönleriyle kapsamlı bir şekilde aydınlatılmalı ve çelişkiler giderilmelidir.

TGF- $\beta$  indüklü EMT sürecinde SMAD transkripsiyon faktörleri hem doğrudan E-kaderin ve N-kaderin gibi EMT belirteçlerinin transkripsiyonel regülasyonunda hem de EMT sürecini yöneten SNAI1 ve SNAI2 gibi EMT-TF'lerin ekspresyonlarının indüklenmesinde kritik rol oynamaktadırlar (Lamouille vd. 2014, Xu vd. 2009). Bu nedenle bir diğer olası mekanizma olarak SATB2'nin, TGF- $\beta$ /SMAD kanonikal yolağının aktivasyonu üzerindeki etkisini de araştırdık. SATB2'nin baskılandığı veya aşırı ifade edildiği A549 hücrelerinde SMAD2/3 transkripsiyon kompleksinin aktivasyonunda bir değişim olmadığını tespit ettik. Ayrıca SATB2'nin, TGF- $\beta$ /SMAD kanonikal yolağının aktivasyonu için gerekli *common-mediator Smad* (Co-SMAD) olarak da adlandırılan SMAD4 transkripsiyon faktörünün ekspresyonu üzerinde bir etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Şekil 4-6'da görüldüğü üzere, SATB2 ekspresyonunun baskılanması veya aşırı ifade edilmesi SMAD4'ün ekspresyon seviyesinde bir değişikliğe yol açmamıştır. Bu sonuçlar SATB2'nin, EMT belirteçlerinin üzerindeki etkisinin SNAI2 ve ZEB1 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları üzerindeki baskılayıcı etkisinden kaynaklandığı görüşümüzü desteklemektedir (Şekil 5-1). Literatürde SATB2'nin, TGF- $\beta$ /SMAD kanonikal yolağının aktivasyonu üzerindeki etkisini gösteren bir çalışma mevcut değildir. Bu bağlamda sonuçlarımızın literatüre katkı sağlayacağını düşünüyoruz. Ancak, SATB2'nin SMAD yolağı üzerindeki etkisinin olmadığını kesin olarak kanıtlanabilmesi adına sonuçlarımız yeterli değildir ve tam olarak aydınlatılabilmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir. SMAD transkripsiyon kompleksleri aktive olarak hücre çekirdeğine göç ettiklerinde DNA'da hedef genlerin promotor bölgelerindeki *Smad-binding element* adı verilen (SBE) sekanslara bağlanırlar. Ayrıca, SMAD-aracılı transkripsiyonel aktivasyonun tetiklenmesi ve şiddeti, SMIF, MSG1, CPB/p300 gibi çeşitli ko-aktivatörler ve c-Ski, SIP, c-Myc ve ATF3 gibi ko-represör ile kontrol edilmektedir (Derynck vd. 2003). Bu bağlamda, SMAD transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon veya aktivasyon seviyeleri üzerinde bir etkiye sahip olmadığını tespit ettiğimiz SATB2, SMAD-aracılı transaktivasyonu kontrol eden çeşitli ko-aktivatör veya ko-represörler üzerinde bir etkiye sahip olabilir. Bu olası mekanizmanın aydınlatılabilmesi için SATB2'nin aşırı ifade

edildiği ve susturulduğu hücrelerdeki SMAD aktivasyon seviyesindeki değişimlerin, SBE motifi içeren promotor lusiferaz vektörleri aracılığıyla tespit edilmesi gerekmektedir.



**Şekil 5-1** SATB2'nin TGF-β indüklü EMT sürecindeki regülasyonu ve rolünün gösterilmesi.

TGF-β, SMAD yolağının yanısıra PI3K/Akt, p38, protein kinaz C (PKC) gibi SMAD-dışı kanonikal olmayan sinyal yollarını da aktive edebilmektedir (Chow vd. 2008). Bu bağlamda, Akt aktivasyonunun, EMT indüksiyonu için negatif bir unsur olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. (Irie vd. 2005, Kucuksayan vd. 2017). Bu bilgilere dayanarak TGF-β tarafından aktive olan Akt ve PKC gibi yolların, SATB2 susturulması ile indüklenen

E-kaderin downregülasyonunu olumsuz yönde etkileyebileceğini düşünüyoruz. Ayrıca, SATB2 ile yüksek oranda homoloji gösteren ve aynı aileye mensup SATB1 aktivasyonunun, protein kinaz C ve Akt aracılığıyla regüle edildiği rapor edilmiştir. 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, HDAC ve diğer baskılayıcı komplekslerle olan etkileşimlerini kontrol ederek SATB2'nin, EMT sürecindeki rolünü etkileyebileceğini düşünüyoruz. Diğer bir ifadeyle, SATB2 aşırı ifadesinin TGF- $\beta$  ile indüklenen N-kaderin ve Fibronektin gibi mezenkimal proteinlerin artan ifadeleri üzerinde bir etkiye sahip olamamasının sebebi, TGF- $\beta$ 'nin kanonikal olmayan sinyal yollarının SATB2'nin indükleyici transaktivasyonunu engellemiş olması da olabilir. Diğer bir olası mekanizma, TGF- $\beta$  yolağı ile aktivasyonu sağlanan sumolasyon mekanizmasının SATB2'nin transaktivasyonunu engellemiş olması olabilir. TGF- $\beta$  kanonikal sinyal yolağının transkripsiyonel aktivasyonu için PIAS1 ile indüklenen SMAD4 sumolasyonun önemli bir mekanizma olduğu rapor edilmiştir (Liang vd. 2004). Ayrıca PIAS1'in, SATB2'nin 233. ve 350. aminoasitlerine SUMO grupları ekleyerek transkripsiyonel aktivitesini engellediği de gösterilmiştir (Dobrevva vd. 2003). Bu bağlamda TGF- $\beta$  ile indüklenen PIAS1 aracılı sumolasyon mekanizmaları, SATB2'nin kromatin modelleme fonksiyonunu etkilemeden transaktivasyonunu inhibe ediyor olabilir. Bu olasılıkların aydınlatılabilmesi için SATB2'nin fonksiyonel domainlerinin ayrı ayrı mutant olarak klonlandığı vektörlerle aşırı ifadenin sağlanmasıdır. Böylece SATB2'nin, hangi genlerin regülasyonuna kromatin modelleyici veya bir transkripsiyon faktör olarak katıldığı ve tespit edilebilir.

Çalışmamızda SATB2'nin, KHDAK EMT'sindeki düzenleyici rolünün yanısıra KHDAK hücrelerinin *in vitro* invaziv kapasiteleri üzerindeki etkisini saptamak için invazyon deneyleri yapıldı. Elde etmiş olduğumuz veriler doğrultusunda SATB2 baskılanmasının A549 hücre hatlarında invazyonu güçlü bir şekilde indüklediği ve TGF- $\beta$  ile indüklenen invazyon kapasitesindeki artışın şiddetini de artırdığı görüldü (Şekil 4-7). Bununla birlikte, SATB2 ekspresyonunun aşırı ifade edildiği A549 hücresindeki TGF- $\beta$  indüklü invazyon kapasitesindeki değişimler de araştırıldı. SATB2'nin tek başına aşırı ifadesi hücre invazyonunu azaltsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4-8). Diğer taraftan SATB2'nin aşırı ifadesi, TGF- $\beta$  ile indüklenen hücre invazyonunu anlamlı bir şekilde inhibe edebildiği saptandı (Şekil 4-8). SATB2'nin, akciğer kanser hücre invazyonu üzerindeki etkisinin ilk kez ortaya koyan bulgularımız, yayınlanarak literatüre kazandırılmıştır

(Kucuksayan vd. 2016). Daha sonra sonuçlarımızla paralel olarak SATB2'nin, akciğer kanser invazyonu üzerinde baskılayıcı bir etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar da yayınlanmıştır (Ma vd. 2018, Wang vd. 2018). Ayrıca SATB2'nin, kolorektal kanser hücre invazyon kapasitesinde negatif bir etkiye sahip olduğu da rapor edilmiştir (Gu vd. 2018, Wang vd. 2019). Dolayısıyla SATB2 ve kanser invazyonu arasındaki ilişkiyi açıklayan sonuçlarımız literatür ile uyumludur.

Kanser invazyonun başarıya ulaşabilmesi, büyük oranda ECM proteinlerinin yıkımını sağlayan metalloproteazların (MMP) proteinlerine bağlıdır ve bu proteinlerin ekspresyon seviyeleri hücrelerin invaziv kapasiteleri için önemli belirteçlerdir (Stamenkovic 2000). Çalışmamızda SATB2'nin, akciğer kanseri invazyonunda rol oynayan MMP-2 gibi belirteçlerin seviyeleri üzerindeki etkileri araştırılmamıştır. Ancak, literatüre baktığımızda, SATB2'nin MMP-2 ekspresyonu seviyesi üzerinde bir etkiye sahip olmadığı rapor edilmiştir (Xu vd. 2019). Bu bilgiler ışığında, SATB2'nin akciğer kanser invazyonu üzerindeki etkisinin, MMP proteinlerinden bağımsız olarak diğer epitelyal veya mezenkimal genlerin regülasyonlarındaki rollerinden kaynaklandığı görülmektedir. Akciğer kanser hücre invazyonunun indüklenmesinde MMP proteinlerinin yanısıra N-kaderin ve Fibronectin gibi mezenşimal belirteçler de önemli rol oynamaktadırlar (Meng vd. 2009, Mrozik vd. 2018). Western blot ve immunofloresans sonuçlarımızı incelediğimizde, özellikle SATB2 baskılanmasıyla indüklenen N-kaderin proteininde önemli bir artış gözlenmişti (Şekil 4-3 ve Şekil 4-4). Bu nedenle SATB2'nin, TGF- $\beta$  ile indüklenen invazyon üzerindeki etkisinin N-kaderin ilişkili olabileceği kanısındayız. Diğer taraftan, SATB2 aşırı ifade edilen hücrelerdeki invazyon sonuçlarının altında yatan mekanizmayı da açıklamak istedik. Bu kapsamdaki Western blot ve immunofloresans sonuçlarımıza baktığımızda, mezenkimal belirteçlerdeki değişimlerin ortaya koyduğu tablo, invazyon sonuçlarını açıklayamamaktadır. Bu nedenle, SATB2 aşırı ifadesinin hücre invazyonu üzerindeki etkisinin, mezenkimal genler kadar olmasa da hücre migrasyonu ve invazyonu üzerinde bir etkiye sahip olan E-kaderin ekspresyonu ile ilişkili olabileceğini düşünüyoruz. Çünkü SATB2 aşırı ifadesi TGF- $\beta$  ile indüklenen N-kaderin ve Fibronectin gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyon artışlarını inhibe etmezken, TGF- $\beta$  indüklü E-kaderin baskılanmasının şiddetini azalttığını tespit etmiştik. E-kaderin seviyesindeki artışın, KHDAK hücre migrasyonunu ve invazyonunu baskılayabildiği bilinmektedir (Bremnes vd. 2002, Sato vd. 2012). Bu bağlamda, SATB2 aşırı ifadesiyle azalan TGF- $\beta$  indüklü E-kaderin downregülasyon sonucu, hücre-hücre bağlantılarının arttığını ve buna bağlı olarak da hücre invazyon kapasitesinin azalmış olabileceğini düşünüyoruz. Sonuç olarak, SATB2'nin akciğer kanser invazyonunda

baskılayıcı bir role oynadığını ve TGF- $\beta$  indüklü invazyon kapasitesinin şiddetini de kontrol edici bir faktör olarak davrandığını gösteren bulgularımızın, literatür ile uyumlu olduğu açıkça görülmektedir.

Çalışmamızda, “KHDAK hücrelerinde TGF- $\beta$  ile indüklenen SATB2 downregülasyonu hangi faktörler tarafından regüle edilmektedir” sorusunun cevabını, moleküler mekanizmalarıyla aydınlatmayı amaçladık. Bu bağlamda, TGF- $\beta$  yolağı tarafından aktive olan çeşitli transkripsiyon faktörlerinin SATB2'nin baskılanmasından sorumlu olabileceğini hipotez ettik ve biyoenformatik olarak olası mekanizmaları araştırdık. Analizlerimizin neticesinde TGF- $\beta$  yolağında görev alan SMAD, CTCF ve SNAI1, SNAI2 ve ZEB1 gibi EMT indükleyici transkripsiyon faktörlerinin, SATB2 promotor bölgelerinde bağlanma bölgelerinin olduğunu tespit ettik. Öncelikle, A549 hücrelerinde bu transkripsiyon faktörlerin ekspresyonlarını baskılayarak TGF- $\beta$  aracılı SATB2 baskılanmasından hangisinin veya hangilerinin sorumlu olduğunu belirlemek istedik. Bağımsız olarak tekrarladığımız Western blot deneylerimizin neticesinde SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin TGF- $\beta$  aracılı SATB2'nin downregülasyonundan sorumlu olduğunu tespit ettik. SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörleri hem birbirleriyle hem de DNA metiltransferaz ve HDAC gibi epigenetik faktörlerle etkileşerek *SCARA5* ve *Cdh1* gen ekspresyonlarının baskılamasında görev almaktadırlar (de Herreros vd. 2010, Liu vd. 2013, Massagué 2012). Bu bilgiler ışığında sonuçlarımızın, literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca, bu iki transkripsiyon faktörünün benzer bir mekanizma aracılığıyla SATB2 gen ekspresyonunun baskılanmasında da görev aldığı, çalışmamız tarafından ilk kez gösterilmiştir. Bununla birlikte, ChIP-PCR deneylerimiz sonucunda, TGF- $\beta$  ile uyarılan KHDAK hücrelerinde SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörlerinin SATB2 promotor bölgesine doğrudan bağlanarak ekspresyonunu regüle ettiğini saptadık (Şekil 5-1). Sonuç olarak, TGF- $\beta$  aracılı SNAI1 ve SMAD4 proteinlerinin SATB2 promotorlarındaki “*enrichment*” değerlerinin birbirine benzer olması ve bağlanma bölgelerinin birbirine yakınlığı, bu iki transkripsiyon faktörünün SATB2'nin baskılanması da birlikte yönettiklerini açıkça göstermektedir.

EMT süreci kendi içinde indüksiyonunun şiddetine bağlı olarak stabil epitelyal, erken-faz melez EMT, melez EMT, geç-faz melez EMT ve stabil mezenkimal olmak üzere beş farklı formda sınıflandırılmaktadır (Şekil 2-5). Bu formlardan hem epitelyal hem de mezenkimal belirteçlerin birlikte eksprese olabildiği melez EMT'nin, metastazın başarıya ulaşabilmesi için en uygun fenotip olduğu belirtilmektedir (Pastushenko vd. 2019). Bu çerçevede tüm sonuçlarımız birlikte ele alındığında, SATB2 kaybının EMT'nin daha şiddetli bir indüklenmesine yol açtığı, aşırı ekspresyonun ise mezenkimal belirteçlerin

ekspresyonları üzerinde bir etkiye sahip olmadığı ortaya konulmuştur. Ayrıca, SATB2 aşırı ifadesinin TGF- $\beta$  ile indüklenen E-kaderin downregülasyonunu kısmen azalttığı saptanmıştır. Bu bilgiler ışığında, SATB2 ifadesinin hücrelere plastisite özelliğini kazandırarak melez EMT fenotipinin korunmasında gerekli olduğu ve dolayısıyla KHDAK hücrelerinin metastazında kritik bir öneme sahip olduğu açıkça görülmektedir.

SATB2'nin EMT sürecinde hücresel plastisitenin korunmasındaki etkisi nedeniyle, KHDAK hücrelerinin kemoterapiye direnç kazanmalarıyla ilişkili olan hücresel plastisite aracılı transdiferensiyon mekanizmasında da rol oynayabileceğini düşündük. Bu mekanizmada, hücresel plastisite özelliği kazanan KHDAK hücreleri, transdiferensiyon süreci ile KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşmakta ve sonucunda kemoterapiye direnç kazanabilmektedir (Tulchinsky vd. 2019). Ayrıca, KHDAK hücreleri genel olarak TGF- $\beta$  uyarımına cevap verebilirken, KHAK hücreleri istisnalar dışında TGF- $\beta$  uyarımına cevap veremezler ve sonuç olarak bu hücrelerdeki TGF- $\beta$  sinyal yolağının aktivasyonu görülmez veya çok kısıtlı düzeydedir (Murai vd. 2015). Çalışmamızda ilk kez, TGF- $\beta$ 'nin SATB2 ekspresyonunu baskıladığı, bir diğer ifadeyle TGF- $\beta$  sinyal yolağı aktivasyonu ve SATB2 ekspresyonu arasında negatif bir korelasyon bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 4-1). Tüm bu bilgiler ışığında, TGF- $\beta$  yolağının inaktif olduğu KHAK hücrelerindeki SATB2 ekspresyon seviyesinin TGF- $\beta$  yolağının aktif olduğu KHDAK hücrelerine kıyasla yüksek olduğunu düşündük. Biyoenformatik analizlerimiz, SATB2 ekspresyonunun KHDAK hücrelerine kıyasla KHAK hücrelerinde anlamlı şekilde yüksek olduğunu gösterdi. Ayrıca, "Hierarchical clustering" analizi kullanılarak SATB2'nin TGF- $\beta$  sinyal yolağının aktivasyonu için gerekli moleküllerin ekspresyonları ile negatif bir korelasyona sahip olduğu da tespit edildi (Şekil 4-15). Tüm bu bulgular, hipotezimizin literatür ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Akabinde bu ilişkinin varlığını *in vitro* ortamda da göstermek istedik. Beklediğimiz üzere, KHAK hücrelerinin (N417 hücre hattı hariç) TGF- $\beta$  uyarımına cevap vermediğini ve SATB2 ekspresyonunun bu hücrelerde KHDAK hücrelerine göre oldukça yüksek olduğunu tespit ettik (Şekil 4-13 ve Şekil 4-16). Ancak, diğer KHAK hücrelerinden farklı olarak N417 hücresinde TGF- $\beta$  yolağının kısıtlı da olsa aktive olabildiği görüldü (Şekil 4-13). Bu bağlamda, N417 hücresindeki TGF- $\beta$  yolak aktivasyonunun, SATB2'nin baskılanmasına yol açacağını düşündük. KHDAK hücrelerinde elde etmiş olduğumuz bulgularla tutarlı olarak, TGF- $\beta$  ile indüklenen N417 hücresinde SATB2 ekspresyonun başarıyla baskılandığı ve bu süreçte de SNAI1 ve SMAD transkripsiyon faktörlerinin sorumlu olduğu tespit edildi (Şekil 4-14). Sonuç olarak, TGF- $\beta$  sinyal yolağının aktivasyonu ve SATB2 ekspresyonu arasındaki negatif ilişkinin tüm akciğer kanser hücrelerinde korunduğunu açıkça gösterdik. Tüm bu

bilgiler ışığında, hücresel plastisitenin kazanılmasında kritik bir öneme sahip olan SATB2'nin benzer bir mekanizma ile KHDAK hücrelerinin KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşması sürecinde de düzenleyici bir rol oynayabileceğini hipotezimizi desteklemiştir.

KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşma sürecinin tespiti için *EGFR*, *RB1*, *CK7* ve *p53* çeşitli genlerin ekspresyon kaybı kullanılmaktadır (Oser vd. 2015). Ayrıca akciğer kanseri hastalarının teşhisi esnasında KHDAK ve KHAK histolojik alt grupların ayırt edilmesi için *NCAM1*, *ENO2*, *CK7*, *ASCL1* ve *NEUROD1* gibi çeşitli nöroendokrin belirteçler kullanılmaktadır (Borromeo vd. 2016, Tan vd. 2008, Thunnissen vd. 2017). Bu bağlamda TCGA verilerini kullanarak tüm akciğer kanser hücre hatlarındaki SATB2 ekspresyonunun, *EGFR*, *CK7*, *NCAM1* ve *ENO2* gibi çeşitli KHAK belirteçleri ile olan ilişkisini araştırdık. Beklediğimiz üzere, nöroendokrin farklılaşma sürecinde ekspresyonu azalan *EGFR* ve *CK7* ekspresyonlarının SATB2 ekspresyonu ile negatif bir korelasyona sahip olduğu saptandı. Ayrıca, SATB2'nin tüm akciğer kanser hücrelerindeki *NCAM1* ve *ENO2* nöroendokrin belirteçleri ile pozitif bir korelasyonla ifade edildiği de tespit edildi (Şekil 4-17). *In vitro* olarak SATB2'nin *EGFR* ve *CK7* gibi belirteçlerle olan ilişkilerini teyit etmek istedik. TCGA verileri ile paralel bir şekilde, SATB2'nin baskılandığı KHDAK hücrelerinde *EGFR* ve *CK7* ekspresyonlarının anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu (Şekil 4-18). Tüm bu sonuçlar, SATB2'nin hücresel plastisitenin kazanılmasındaki rolü ile KHDAK hücrelerinin KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşma sürecinde de düzenleyici bir molekül olduğunu açıkça göstermektedir. Yakın zamandaki bir çalışma, ortaya koymuş olduğumuz bu sonuçları destekler nitelikte olan benzer bir mekanizmayı ortaya koymuştur. Bu çalışmada, KHAK biyogenezinde kritik bir öneme sahip olan basic helix-loop-helix (BHLH) ailesi üyesi olan bir transkripsiyon faktör olan *ASCL1* molekülünün, WNT yolağı aracılığıyla KHDAK hücrelerinin KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşma sürecini kontrol ettiği gösterilmiştir (Tenjin vd. 2019). Bu bağlamda, KHAK hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilen, nöroendokrin belirteçlerin ekspresyonları ile kuvvetli korelasyonlara sahip olan ve bunun yanısıra hem bir transkripsiyon faktör hem de kromatin yeniden modelleyici olarak fonksiyon gösterebilen SATB2 molekülünün, KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşması sürecinde kritik rol oynadığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, SATB2 molekülünün EMT, invazyon ve nöroendokrin farklılaşması süreçleri başta olmak üzere akciğer karsinogenezindeki rolünü geniş bir perspektiften tespit edebilmek amacıyla Mikroarray tekniğini gerçekleştirdik. Mikroarray sonuçlarımızın güvenilirliğini artırmak amacıyla hem SATB2'nin aşırı ifade edildiği hem de baskılandığı hücre grupları kullanıldı ve böylece SATB2'nin doğrudan regülasyonunda görev aldığı genlerin



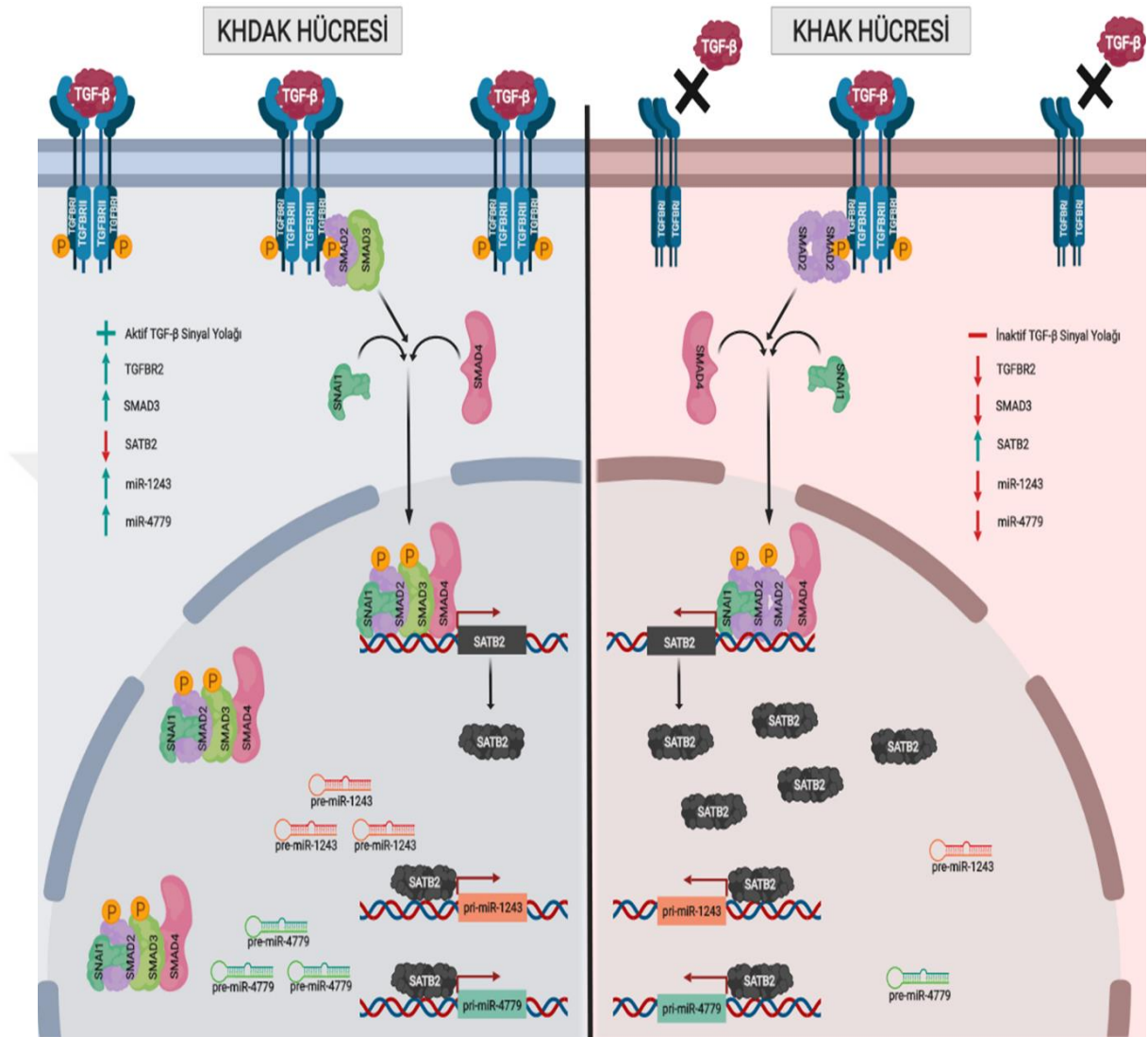
daha güvenilir bir şekilde tespit edilmesi sağlandı. Bu kapsamda Mikroarray analizimizle SATB2'nin ekspresyonlarını regüle ettiği kodlanan ve kodlanmayan genler tespit edildi. Analizlerimiz sonucunda SATB2'nin downregüle edildiği gruplarda ekspresyon seviyeleri artıp, SATB2'nin overeksprese edildiği gruplarda ekspresyonları azalan veya SATB2'nin downregüle edildiği gruplarda ekspresyon seviyeleri azalıp, SATB2'nin overeksprese edildiği gruplarda ise ekspresyonları artan genler incelendi. Bu filtreleme yöntemi aracılığıyla SATB2'nin doğrudan ilişkili olduğu genlerin tespiti sağlandı. Filtrelemelerimiz ve GSEA analizlerimiz sonucunda SATB2'nin, kanser hücrelerindeki miRNA ekspresyonları ile doğrudan ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-22 ve Şekil 4-23). Yakın zamanda SATB2'nin, geniş çapta miRNA gen ekspresyon profillerini regüle edebildiği rapor edilmiştir (Chen vd. 2019). Mikroarray ve qPCR sonuçlarımız, miR-1243 ve miR-4779 ekspresyonlarının SATB2 tarafından doğrudan negatif olarak regüle edildiğini gösterdi (Şekil 4-22 ve Şekil 4-24). Ayrıca SATB2'nin aşırı ifade edildiği KHAK hücre hattındaki bu miRNA ekspresyonlarının, KHAK hücre hattına kıyasla oldukça düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4-25). Bu sonuçlar doğrultusunda, SATB2 ile indüklenen miR-1243 ve miR-4779 ekspresyonlarındaki baskılanmanın nöroendokrin farklılaşmada kritik bir öneme sahip olabileceğini düşünmekteyiz (Şekil 5-2).

Çalışmamızda, biyoenformatik olarak bu miRNA'ların tahmini hedef genlerini ve sinyal yollarını tespit ettik. İlginç bir şekilde, hem miR-1243 hem de miR-4779 genlerinin özellikle TGF- $\beta$  sinyal yolağında görev alan genleri hedef alabileceği belirlendi (Tablo 4-2). Özellikle KHDAK hücrelerine kıyasla KHAK hücrelerinde downregüle olan miR-1243'ün olası hedef genleri arasında *SMAD2* ve *SMAD4* genlerinin olduğu gözlemlendi. *SMAD2* ve *SMAD4* genlerinin KHDAK hücrelerine kıyasla KHAK hücrelerinde aşırı ifade edildiğini de tespit etmiştik (Şekil 4-15). Bu bağlamda, KHDAK ve KHAK hücrelerinde gözlenen *SMAD2* ve *SMAD4* ekspresyon profilleri arasındaki farkın, SATB2 aracılı regüle edilen miR-1243'ün olabileceğini düşünüyoruz. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada miR-1243'ün pankreas hücrelerinde *SMAD2* ve *SMAD4* genlerini doğrudan hedef alarak regüle ettiği tespit edilmiştir (Hiramoto vd. 2017). Bu bulgular, yapmış olduğumuz biyoenformatik analizlerin ve hipotezimizin doğruluğunu destekler niteliktedir.

miR-1243 ve miR-4779 miRNA genlerinin, fonksiyonları ve biyolojik etkileri üzerine literatürde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. miR-1243'ün pankreas hücrelerinde EMT sürecini baskılayarak tümör baskılayıcı bir gen olarak fonksiyon gösterdiği rapor edilmiştir (Hiramoto vd. 2017). Bu bağlamda, doğrudan EMT sürecinin regülasyonunda rol aldığını tespit etmiş olduğumuz SATB2 molekülünün, aynı zamanda miR-1243 gibi genlerin

ekspresyonlarını regüle ederek de EMT sürecine dolaylı yoldan etki edebileceğini düşünüyoruz. Diğer taraftan pankreas kanseri, akciğer kanseri gibi nöroendokrin fenotip gösteren alt grupları içeren bir kanser türüdür ve nöroendokrin farklılaşma pankreas kanser hücreleri tarafından da bir direnç mekanizması olarak kullanılmaktadır (Gradiz vd. 2016). Ayrıca, bu çalışma nöroendokrin farklılaşma özelliğine sahip olan pankreas kanser hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla miR-1243 ekspresyonunun, nöroendokrin fenotip gösteren pankreas kanser progresyonunda önemli rol oynaması, KHDAK hücrelerinin nöroendokrin farklılaşması sürecine katılması ihtimalini kuvvetlendirmektedir.

miR-4779'nin ise kolorektal kanserlerinde apoptoz ve hücre arrestini indükleyerek tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (Koo vd. 2018). SATB2, kolorektal karsinogenezinde kritik bir rol oynamakta ve histopatolojik olarak kolorektal hastaların tanısında belirteç olarak kullanılmaktadır (Dabir vd. 2018, Ma vd. 2019, Meagher vd. 2019). Bu bağlamda yüksek seviyede SATB2 ifade eden kolorektal kanser hücrelerinin çok düşük miR-4779 ekspresyon seviyesine sahip olması, SATB2 ve miR-4779 arasında ilk kez göstermiş olduğumuz ters ilişkiyi doğrulamaktadır. Sonuç olarak SATB2'nin, tümör baskılayıcı karakterdeki miR-1243 ve miR-4779 genlerinin ekspresyonlarını baskılayarak nöroendokrin farklılaşma, EMT, kemoterapiye direnç ve apoptoz gibi süreçlerde bir regülatör olarak fonksiyon gösterdiğini ve bu mekanizma aracılığıyla akciğer karsinogenezine katkı sağlayabileceğini düşünüyoruz.



**Şekil 5-2** Bulgularımız doğrultusunda ortaya çıkan KHDAK ve KHAK hücre profillerinin şematik özet olarak gösterilmesi.

## 6. SONUÇLAR

1. SATB2'nin, KHDAK hücre EMT ve invazyonunda düzenleyici bir role sahiptir.
2. SATB2, mezenkimal genlerin regülasyonundan ziyade doğrudan E-kaderin ve Occludin gibi epitelyal genlerin regülasyonlarına katılmaktadır.
3. SATB2'nin EMT sürecindeki düzenleyici rolünün moleküler temeli, SNAI2 ve ZEB1 transkripsiyon faktörleri üzerindeki etkisine dayanmaktadır.
4. TGF- $\beta$  kanser türüne spesifik olmadan tüm kanser türlerinde SATB2 ekspresyonunu baskılamaktadır.
5. TGF- $\beta$  indüklü SATB2 baskılanması, SNAI1 ve SMAD4 transkripsiyon faktörleri aracılığıyla transkripsiyonel olarak gerçekleşir.
6. SATB2 ekspresyonu TGF- $\beta$  tarafından indüklenen invazyon kapasitesinin şiddetini doğrudan kontrol edebilmektedir.
7. Nöroendokrin kökenli KHAK hücrelerindeki SATB2 ekspresyonu, KHDAK hücrelerine kıyasla dramatik bir şekilde yüksek seviyededir.
8. SATB2 KHDAK hücrelerinin KHAK-benzeri nöroendokrin farklılaşması sürecinde düzenleyici role sahiptir.
9. SATB2, miR-1243 ve miR-4779 ekspresyonlarını baskıladığı tespit edilmiştir.
10. SATB2 tarafından regüle edilen miR-1243 ve miR-4779'un akciğer karsinogenezinde kritik rol oynayabilecekleri öngörülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, Mikulits W, Brabletz T, Strand D, Obrist P, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R, Eger A. The transcription factor ZEB1 ( $\delta$ EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. ***Oncogene*** 2007; 26: 6979.

Akopyan G, Bonavida B. Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis. ***Int J Oncol*** 2006; 29 (4): 745-752.

Alberg A J, Brock M V, Ford J G, Samet J M, Spivack S D. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. ***Chest*** 2013; 143 (5 Suppl): e1S-e29S.

Amente S, Lania L, Majello B. The histone LSD1 demethylase in stemness and cancer transcription programs. ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*** 2013; 1829 (10): 981-986.

Arzate-Mejía R G, Valle-García D, Recillas-Targa F. Signaling epigenetics: Novel insights on cell signaling and epigenetic regulation. ***IUBMB Life*** 2011; 63 (10): 881-895.

Bannister A J, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. ***Cell Research*** 2011; 21: 381.

Battle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García de Herreros A. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. ***Nat Cell Biol*** 2000; 2 (2): 84-89.

Battistelli C, Cicchini C, Santangelo L, Tramontano A, Grassi L, Gonzalez F J, de Nonno V, Grassi G, Amicone L, Tripodi M. The Snail repressor recruits EZH2 to specific genomic sites through the enrollment of the lncRNA HOTAIR in epithelial-to-mesenchymal transition. ***Oncogene*** 2016; 36: 942.

Beltran M, Puig I, Peña C, García J M, Álvarez A B, Peña R, Bonilla F, de Herreros A G. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial–mesenchymal transition. ***Genes & Development*** 2008; 22 (6): 756-769.

Benowitz N L. Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. ***Clin Pharmacol Ther*** 2008; 83 (4): 531-541.

Bhowmick N A, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist C A, Engel M E, Arteaga C L, Moses H L. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism. ***Molecular Biology of the Cell*** 2001; 12 (1): 27-36.

Bhutani N, Burns David M, Blau Helen M. DNA Demethylation Dynamics. ***Cell*** 2011; 146 (6): 866-872.

Bierie B, Moses H L. TGF- $\beta$  and cancer. ***Cytokine & Growth Factor Reviews*** 2006; 17 (1): 29-40.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 2002; 16 (1): 6-21.

Bonilla-Claudio M, Wang J, Bai Y, Klysiak E, Selever J, Martin J F. Bmp signaling regulates a dose-dependent transcriptional program to control facial skeletal development. *Development* 2012; 139 (4): 709-719.

Borromeo M D, Savage T K, Kollipara R K, He M, Augustyn A, Osborne J K, Girard L, Minna J D, Gazdar A F, Cobb M H, Johnson J E. ASCL1 and NEUROD1 Reveal Heterogeneity in Pulmonary Neuroendocrine Tumors and Regulate Distinct Genetic Programs. *Cell Rep* 2016; 16 (5): 1259-1272.

Bremnes R M, Veve R, Hirsch F R, Franklin W A. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer* 2002; 36 (2): 115-124.

Britanova O, Akopov S, Lukyanov S, Gruss P, Tarabykin V. Novel transcription factor Satb2 interacts with matrix attachment region DNA elements in a tissue-specific manner and demonstrates cell-type-dependent expression in the developing mouse CNS. *European Journal of Neuroscience* 2005; 21 (3): 658-668.

Britanova O, de Juan Romero C, Cheung A, Kwan K Y, Schwark M, Gyorgy A, Vogel T, Akopov S, Mitkovski M, Agoston D, Šestan N, Molnár Z, Tarabykin V. Satb2 Is a Postmitotic Determinant for Upper-Layer Neuron Specification in the Neocortex. *Neuron* 2008; 57 (3): 378-392.

Brocato J, Costa M. SATB1 and 2 in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2014; 36 (2): 186-191.

Chaffer C L, San Juan B P, Lim E, Weinberg R A. EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 2016; 35 (4): 645-654.

Chang Y-L, Lee Y-C, Liao W-Y, Wu C-T. The utility and limitation of thyroid transcription factor-1 protein in primary and metastatic pulmonary neoplasms. *Lung Cancer* 2004; 44 (2): 149-157.

Chaudhury A, Hussey G S, Ray P S, Jin G, Fox P L, Howe P H. TGF- $\beta$ -mediated phosphorylation of hnRNP E1 induces EMT via transcript-selective translational induction of Dab2 and ILEI. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 286.

Chen G, Wang J, Hong X, Chai Z, Li Q. Dietary vitamin E intake could reduce the risk of lung cancer: evidence from a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8 (4): 6631-6637.

Chen Q Y, Des Marais T, Costa M. Dereglulation of SATB2 in carcinogenesis with emphasis on miRNA-mediated control. *Carcinogenesis* 2019; 40 (3): 393-402.

Chen Q Y, Li J, Sun H, Wu F, Zhu Y, Kluz T, Jordan A, DesMarais T, Zhang X, Murphy A, Costa M. Role of miR-31 and SATB2 in arsenic-induced malignant BEAS-2B cell transformation. *Molecular Carcinogenesis* 2018; 57 (8): 968-977.

Chow J Y C, Dong H, Quach K T, Nguyen P N V, Chen K, Carethers J M. TGF- $\beta$  mediates PTEN suppression and cell motility through calcium-dependent PKC- $\alpha$  activation in

pancreatic cancer cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2008; 294 (4): G899-G905.

Chung J, Lau J, Cheng L S, Grant R I, Robinson F, Ketela T, Reis P P, Roche O, Kamel-Reid S, Moffat J, Ohh M, Perez-Ordenez B, Kaplan D R, Irwin M S. SATB2 augments  $\Delta Np63\alpha$  in head and neck squamous cell carcinoma. *EMBO reports* 2010; 11 (10): 777-783.

Condeelis J, Segall J E. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 2003; 3 (12): 921-930.

Cooper D A, Eldridge A L, Peters J C. Dietary carotenoids and lung cancer: a review of recent research. *Nutr Rev* 1999; 57 (5 Pt 1): 133-145.

Costa F, Soares R. Nicotine: a pro-angiogenic factor. *Life Sci* 2009; 84 (23-24): 785-790.

Coté M L, Kardia S L R, Wenzlaff A S, Ruckdeschel J C, Schwartz A G. Risk of Lung Cancer Among White and Black Relatives of Individuals With Early-Onset Lung Cancer. *JAMA* 2005; 293 (24): 3036-3042.

Coussens L M, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420 (6917): 860-867.

Dabir P D, Svanholm H, Christiansen J J. SATB2 is a supplementary immunohistochemical marker to CDX2 in the diagnosis of colorectal carcinoma metastasis in an unknown primary. *APMIS* 2018; 126 (6): 494-500.

de Groot P M, Wu C C, Carter B W, Munden R F. The epidemiology of lung cancer. *Translational lung cancer research* 2018; 7 (3): 220-233.

de Herreros A G, Peiró S, Nassour M, Savagner P. Snail Family Regulation and Epithelial Mesenchymal Transitions in Breast Cancer Progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2010; 15 (2): 135-147.

Debakey M. Carcinoma of the lung and tobacco smoking: a historical perspective. *The Ochsner journal* 1999; 1 (3): 106-108.

Dela Cruz C S, Tanoue L T, Matthay R A. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine* 2011; 32 (4): 605-644.

Dela Cruz C S, Tanoue L T, Matthay R A. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine* 2011; 32 (4): 605-644.

Deng Q F, Zhou C C, Su C X. Clinicopathological features and epidermal growth factor receptor mutations associated with epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Respirology* 2009; 14 (3): 371-376.

Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* 2003; 425 (6958): 577-584.

Dobrova G, Chahrour M, Dautzenberg M, Chirivella L, Kanzler B, Fariñas I, Karsenty G, Grosschedl R. SATB2 Is a Multifunctional Determinant of Craniofacial Patterning and Osteoblast Differentiation. *Cell* 2006; 125 (5): 971-986.

Dobrova G, Dambacher J, Grosschedl R. SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin  $\mu$  gene expression. *Genes & Development* 2003; 17 (24): 3048-3061.

Dongre A, Weinberg R A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2019; 20 (2): 69-84.

Dotto G P, Rustgi Anil K. Squamous Cell Cancers: A Unified Perspective on Biology and Genetics. *Cancer Cell* 2016; 29 (5): 622-637.

Driscoll T, Nelson D I, Steenland K, Leigh J, Concha-Barrientos M, Fingerhut M, Pruss-Ustun A. The global burden of disease due to occupational carcinogens. *Am J Ind Med* 2005; 48 (6): 419-431.

Du C, Zhang C, Hassan S, Biswas M H U, Balaji K C. Protein Kinase D1 Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition through Phosphorylation of Snail. *Cancer Research* 2010; 70 (20): 7810.

Engels E A. Inflammation in the development of lung cancer: epidemiological evidence. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8 (4): 605-615.

Engels E A, Biggar R J, Hall H I, Cross H, Crutchfield A, Finch J L, Grigg R, Hylton T, Pawlish K S, McNeel T S, Goedert J J. Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. *Int J Cancer* 2008; 123 (1): 187-194.

Espada J, Peinado H, Lopez-Serra L, Setién F, Lopez-Serra P, Portela A, Renart J, Carrasco E, Calvo M, Juarranz A, Cano A, Esteller M. Regulation of SNAIL1 and E-cadherin function by DNMT1 in a DNA methylation-independent context. *Nucleic Acids Research* 2011; 39 (21): 9194-9205.

Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics* 2011; 12: 861.

Evdokimova V, Tognon C, Ng T, Ruzanov P, Melnyk N, Fink D, Sorokin A, Ovchinnikov L P, Davicioni E, Triche T J, Sorensen P H B. Translational Activation of Snail1 and Other Developmentally Regulated Transcription Factors by YB-1 Promotes an Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer Cell* 2009; 15 (5): 402-415.

Ewald A J, Brenot A, Duong M, Chan B S, Werb Z. Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis. *Dev Cell* 2008; 14 (4): 570-581.

Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* 2010; 127 (12): 2893-2917.



Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D M, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 2015; 136 (5): E359-E386.

Fingerhut M, Nelson D I, Driscoll T, Concha-Barrientos M, Steenland K, Punnett L, Pruss-Ustun A, Leigh J, Corvalan C, Eijkemans G, Takala J. The contribution of occupational risks to the global burden of disease: summary and next steps. *Med Lav* 2006; 97 (2): 313-321.

FitzPatrick D R, Carr I M, McLaren L, Leek J P, Wightman P, Williamson K, Gautier P, McGill N, Hayward C, Firth H, Markham A F, Fantes J A, Bonthron D T. Identification of SATB2 as the cleft palate gene on 2q32–q33. *Hum Mol Genet* 2003; 12 (19): 2491-2501.

Fitzpatrick F A. Inflammation, carcinogenesis and cancer. *Int Immunopharmacol* 2001; 1 (9-10): 1651-1667.

Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 2011; 147 (5): 992-1009.

Friedl P, Borgmann S, Brocker E B. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol* 2001; 70 (4): 491-509.

Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10 (7): 445-457.

Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; 3 (5): 362-374.

Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 2010; 188 (1): 11-19.

Fu J, Qin L, He T, Qin J, Hong J, Wong J, Liao L, Xu J. The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. *Cell Research* 2010; 21: 275.

Fukagawa A, Ishii H, Miyazawa K, Saitoh M.  $\delta$ EF1 associates with DNMT1 and maintains DNA methylation of the E-cadherin promoter in breast cancer cells. *Cancer Medicine* 2015; 4 (1): 125-135.

Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, Grosse R, Marshall J F, Harrington K, Sahai E. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9 (12): 1392-1400.

Galante S, Dickinson L A, Mian I S, Sikorska M, Kohwi-Shigematsu T. SATB1 cleavage by caspase 6 disrupts PDZ domain-mediated dimerization, causing detachment from chromatin early in T-cell apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001; 21 (16): 5591-5604.

Giroux V, Rustgi A K. Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia–cancer sequence. *Nature Reviews Cancer* 2017; 17: 594.

Gradiz R, Silva H C, Carvalho L, Botelho M F, Mota-Pinto A. MIA PaCa-2 and PANC-1 – pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. **Sci Rep** 2016; 6: 21648.

Grando S A. Connections of nicotine to cancer. **Nat Rev Cancer** 2014; 14 (6): 419-429.

Gu J, Wang G, Liu H, Xiong C. SATB2 targeted by methylated miR-34c-5p suppresses proliferation and metastasis attenuating the epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. **Cell Proliferation** 2018; 51 (4): e12455.

Gunasinghe N P A D, Wells A, Thompson E W, Hugo H J. Mesenchymal–epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews** 2012; 31 (3): 469-478.

Gupta G P, Massagué J. Cancer Metastasis: Building a Framework. **Cell** 2006; 127 (4): 679-695.

Gyorgy A B, Szemes M, De Juan Romero C, Tarabykin V, Agoston D V. SATB2 interacts with chromatin-remodeling molecules in differentiating cortical neurons. **European Journal of Neuroscience** 2008; 27 (4): 865-873.

Harada R, Dufort D, Denis-Larose C, Nepveu A. Conserved cut repeats in the human cut homeodomain protein function as DNA binding domains. **Journal of Biological Chemistry** 1994; 269 (3): 2062-2067.

Hecht S S. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. **Chem Res Toxicol** 1998; 11 (6): 559-603.

Hecht S S. It is time to regulate carcinogenic tobacco-specific nitrosamines in cigarette tobacco. **Cancer Prev Res (Phila)** 2014; 7 (7): 639-647.

Herbst R S, Heymach J V, Lippman S M. Lung cancer. **N Engl J Med** 2008; 359 (13): 1367-1380.

Herranz N, Pasini D, Diaz V M, Franci C, Gutierrez A, Dave N, Escriva M, Hernandez-Munoz I, Di Croce L, Helin K, Garcia de Herreros A, Peiro S. Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. **Mol Cell Biol** 2008; 28 (15): 4772-4781.

Herranz N, Pasini D, Díaz V M, Francí C, Gutierrez A, Dave N, Escrivà M, Hernandez-Muñoz I, Di Croce L, Helin K, García de Herreros A, Peiró S. Polycomb Complex 2 Is Required for <em>&lt;/em>E-cadherin</em> Repression by the Snail1 Transcription Factor. **Mol Cell Biol** 2008; 28 (15): 4772.

Hiramoto H, Muramatsu T, Ichikawa D, Tanimoto K, Yasukawa S, Otsuji E, Inazawa J. miR-509-5p and miR-1243 increase the sensitivity to gemcitabine by inhibiting epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. **Sci Rep** 2017; 7 (1): 4002.

Hoffmann D, Djordjevic M V, Hoffmann I. The changing cigarette. **Prev Med** 1997; 26 (4): 427-434.

Hong J, Zhou J, Fu J, He T, Qin J, Wang L, Liao L, Xu J. Phosphorylation of Serine 68 of Twist1 by MAPKs Stabilizes Twist1 Protein and Promotes Breast Cancer Cell Invasiveness. **Cancer Research** 2011; 71 (11): 3980.

Hsu Dennis S-S, Wang H-J, Tai S-K, Chou C-H, Hsieh C-H, Chiu P-H, Chen N-J, Yang M-H. Acetylation of Snail Modulates the Cytokinome of Cancer Cells to Enhance the Recruitment of Macrophages. **Cancer Cell** 2014; 26 (4): 534-548.

Iguchi T, Aishima S, Taketomi A, Nishihara Y, Fujita N, Sanefuji K, Maehara Y, Tsuneyoshi M. Extracapsular penetration is a new prognostic factor in human hepatocellular carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2008; 32 (11): 1675-1682.

Iliina O, Bakker G J, Vasaturo A, Hofmann R M, Friedl P. Two-photon laser-generated microtracks in 3D collagen lattices: Principles of MMP-dependent and -independent collective cancer cell invasion. **Physical Biology** 2011; 8 (1).

Iliina O, Friedl P. Mechanisms of collective cell migration at a glance. **J Cell Sci** 2009; 122 (Pt 18): 3203-3208.

Imabayashi T, Uchino J, Osoreda H, Tanimura K, Chihara Y, Tamiya N, Kaneko Y, Yamada T, Takayama K. Nicotine Induces Resistance to Erlotinib Therapy in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells Treated with Serum from Human Patients. **Cancers (Basel)** 2019; 11 (3).

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

Ishizaki M, Ashida K, Higashi T, Nakatsukasa H, Kaneyoshi T, Fujiwara K, Nouse K, Kobayashi Y, Uemura M, Nakamura S, Tsuji T. The formation of capsule and septum in human hepatocellular carcinoma. **Virchows Arch** 2001; 438 (6): 574-580.

Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF- $\beta$  signaling and epithelial–mesenchymal transition in cancer progression. **Current Opinion in Oncology** 2013; 25 (1): 76-84.

Kim V, Criner G J. Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med** 2013; 187 (3): 228-237.

Kleeff J, Shi X, Bode H P, Hoover K, Shrikhande S, Bryant P J, Korc M, Büchler M W, Friess H. Altered Expression and Localization of the Tight Junction Protein ZO-1 in Primary and Metastatic Pancreatic Cancer. **Pancreas** 2001; 23 (3): 259-265.

Koo K H, Kwon H. MicroRNA miR-4779 suppresses tumor growth by inducing apoptosis and cell cycle arrest through direct targeting of PAK2 and CCND3. **Cell Death Dis** 2018; 9 (2): 77.

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

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

Lambert A W, Pattabiraman D R, Weinberg R A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 2017; 168 (4): 670-691.

Lammermann T, Sixt M. Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21 (5): 636-644.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014; 15: 178.

Landi M T, Chatterjee N, Yu K, Goldin L R, Goldstein A M, Rotunno M, Mirabello L, Jacobs K, Wheeler W, Yeager M, Bergen A W, Li Q, Consonni D, Pesatori A C, Wacholder S, Thun M, Diver R, Oken M, Virtamo J, Albanes D, Wang Z, Burdette L, Doheny K F, Pugh E W, Laurie C, Brennan P, Hung R, Gaborieau V, McKay J D, Lathrop M, McLaughlin J, Wang Y, Tsao M S, Spitz M R, Krokan H, Vatten L, Skorpen F, Arnesen E, Benhamou S, Bouchard C, Metspalu A, Vooder T, Nelis M, Valk K, Field J K, Chen C, Goodman G, Sulem P, Thorleifsson G, Rafnar T, Eisen T, Sauter W, Rosenberger A, Bickeboller H, Risch A, Chang-Claude J, Wichmann H E, Stefansson K, Houlston R, Amos C I, Fraumeni J F, Jr., Savage S A, Bertazzi P A, Tucker M A, Chanock S, Caporaso N E. A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma. *Am J Hum Genet* 2009; 85 (5): 679-691.

Lee Y J, Kim J H, Kim S K, Ha S J, Mok T S, Mitsudomi T, Cho B C. Lung cancer in never smokers: change of a mindset in the molecular era. *Lung Cancer* 2011; 72 (1): 9-15.

Li T, Xie J, Shen C, Cheng D, Shi Y, Wu Z, Deng X, Chen H, Shen B, Peng C, Li H, Zhan Q, Zhu Z. Upregulation of long noncoding RNA ZEB1-AS1 promotes tumor metastasis and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2015; 35: 1575.

Liang M, Melchior F, Feng X-H, Lin X. Regulation of Smad4 Sumoylation and Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling by Protein Inhibitor of Activated STAT1. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279 (22): 22857-22865.

Lim W, Ridge C A, Nicholson A G, Mirsadraee S. The 8(th) lung cancer TNM classification and clinical staging system: review of the changes and clinical implications. *Quant Imaging Med Surg* 2018; 8 (7): 709-718.

Lin W W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007; 117 (5): 1175-1183.

Lin Y, Wu Y, Li J, Dong C, Ye X, Chi Y-I, Evers B M, Zhou B P. The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1. *The EMBO Journal* 2010; 29 (11): 1803-1816.

Lissowska J, Foretova L, Dabek J, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, Fabianova E, Cassidy A, Mates D, Bencko V, Janout V, Hung R J, Brennan P, Boffetta P. Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control* 2010; 21 (7): 1091-1104.

Liu F, Wang L, Perna F, Nimer S D. Beyond transcription factors: how oncogenic signalling reshapes the epigenetic landscape. **Nature Reviews Cancer** 2016; 16: 359.

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

Liu Z, Jin Z Y, Liu C H, Xie F, Lin X S, Huang Q. MicroRNA-21 regulates biological behavior by inducing EMT in human cholangiocarcinoma. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8 (5): 4684-4694.

Long J, Zuo D, Park M. Pc2-mediated Sumoylation of Smad-interacting Protein 1 Attenuates Transcriptional Repression of E-cadherin. **Journal of Biological Chemistry** 2005; 280 (42): 35477-35489.

Lu W, Kang Y. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. **Dev Cell** 2019; 49 (3): 361-374.

Luo J, Shen L, Zheng D. Association between vitamin C intake and lung cancer: a dose-response meta-analysis. **Sci Rep** 2014; 4: 6161.

Ma C, Henn P, Miller C, Herbst C, Hartman D J, Pai R K. Loss of SATB2 Expression Is a Biomarker of Inflammatory Bowel Disease-associated Colorectal Dysplasia and Adenocarcinoma. **Am J Surg Pathol** 2019; 43 (10): 1314-1322.

Ma Y-n, Zhang H-Y, Fei L-R, Zhang M-Y, Wang C-C, Luo Y, Han Y-C. SATB2 suppresses non-small cell lung cancer invasiveness by G9a. **Clinical and Experimental Medicine** 2018; 18 (1): 37-44.

Madsen C D, Sahai E. Cancer dissemination--lessons from leukocytes. **Dev Cell** 2010; 19 (1): 13-26.

Massagué J. TGF $\beta$  signalling in context. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2012; 13: 616.

Massague J, Obenauf A C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature** 2016; 529 (7586): 298-306.

Meagher N S, Wang L, Rambau P F, Intermaggio M P, Huntsman D G, Wilkens L R, El-Bahrawy M A, Ness R B, Odunsi K, Steed H, Herpel E, Anglesio M S, Zhang B, Lambie N, Swerdlow A J, Lubiński J, Vierkant R A, Goode E L, Menon U, Toloczko-Grabarek A, Oszurek O, Bilic S, Talhouk A, García-Closas M, Wang Q, Tan A, Farrell R, Kennedy C J, Jimenez-Linan M, Sundfeldt K, Etter J L, Menkiszak J, Goodman M T, Klonowski P, Leung Y, Winham S J, Moysich K B, Behrens S, Kluz T, Edwards R P, Gronwald J, Modugno F, Hernandez B Y, Chow C, Kelemen L E, Keeney G L, Carney M E, Natanzon Y, Robertson G, Sharma R, Gayther S A, Alsop J, Luk H, Karpinskyj C, Campbell I, Sinn P, Gentry-Maharaj A, Coulson P, Chang-Claude J, Shah M, Widschwendter M, Tang K, Schoemaker M J, Koziak J M, Cook L S, Brenton J D, Daley F, Kristjansdottir B, Mateoiu C, Larson M C, Harnett P R, Jung A, deFazio A, Goringe K L, Pharoah P D P, Minoo P, Stewart C, Bathe O F, Gui X, Cohen P, Ramus S J, Köbel M. A combination of the immunohistochemical

markers CK7 and SATB2 is highly sensitive and specific for distinguishing primary ovarian mucinous tumors from colorectal and appendiceal metastases. **Modern Pathology** 2019.

Meng X N, Jin Y, Yu Y, Bai J, Liu G Y, Zhu J, Zhao Y Z, Wang Z, Chen F, Lee K Y, Fu S B. Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. **British Journal of Cancer** 2009; 101: 327.

Merrell A J, Stanger B Z. Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2016; 17: 413.

Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, Shimonishi T, Matsuyama S, Kitahara K, Miyazaki K. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. **British Journal of Cancer** 2005; 92 (2): 252-258.

Mrozik K M, Blaschuk O W, Cheong C M, Zannettino A C W, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. **BMC Cancer** 2018; 18 (1): 939.

Murai F, Koinuma D, Shinozaki-Ushiku A, Fukayama M, Miyaozono K, Ehata S. EZH2 promotes progression of small cell lung cancer by suppressing the TGF- $\beta$ -Smad-ASCL1 pathway. **Cell Discovery** 2015; 1: 15026.

Naik R, Galande S. SATB family chromatin organizers as master regulators of tumor progression. **Oncogene** 2019; 38 (12): 1989-2004.

Nakata S, Sugio K, Uramoto H, Oyama T, Hanagiri T, Morita M, Yasumoto K. The methylation status and protein expression of CDH1, p16INK4A, and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer** 2006; 106 (10): 2190-2199.

Nieto M A, Huang Ruby Y-J, Jackson Rebecca A, Thiery Jean P. EMT: 2016. **Cell** 2016; 166 (1): 21-45.

Oser M G, Niederst M J, Sequist L V, Engelman J A. Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. **Lancet Oncol** 2015; 16 (4): e165-172.

Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang H-R, Zhang Y, Wrana J L. Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGF $\beta$  Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity. **Science** 2005; 307 (5715): 1603-1609.

Paranjape A N, Balaji S A, Mandal T, Krushik E V, Nagaraj P, Mukherjee G, Rangarajan A. Bmi1 regulates self-renewal and epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells through Nanog. **BMC Cancer** 2014; 14 (1): 785.

Park S Y, Kim H S, Kim N H, Ji S, Cha S Y, Kang J G, Ota I, Shimada K, Konishi N, Nam H W, Hong S W, Yang W H, Roth J, Yook J I, Cho J W. Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. **The EMBO Journal** 2010; 29 (22): 3787-3796.

Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. **Trends in Cell Biology** 2019; 29 (3): 212-226.

Pavan Kumar P, Purbey P K, Sinha C K, Notani D, Limaye A, Jayani R S, Galande S. Phosphorylation of SATB1, a Global Gene Regulator, Acts as a Molecular Switch Regulating Its Transcriptional Activity In Vivo. **Molecular Cell** 2006; 22 (2): 231-243.

Quintanal-Villalonga Á, Molina-Pinelo S. Epigenetics of lung cancer: a translational perspective. **Cellular Oncology** 2019.

Ridley Anne J. Life at the Leading Edge. **Cell** 2011; 145 (7): 1012-1022.

Rijkers A P, Bakker O J, Ahmed Ali U, Hagens J C J P, van Santvoort H C, Besselink M G, Bollen T L, van Eijck C H, Group f t D P S. Risk of Pancreatic Cancer After a Primary Episode of Acute Pancreatitis. **Pancreas** 2017; 46 (8): 1018-1022.

Rubin S A. Lung cancer: past, present, and future. **J Thorac Imaging** 1991; 7 (1): 1-8.

Saccone S F, Hinrichs A L, Saccone N L, Chase G A, Konvicka K, Madden P A, Breslau N, Johnson E O, Hatsukami D, Pomerleau O, Swan G E, Goate A M, Rutter J, Bertelsen S, Fox L, Fugman D, Martin N G, Montgomery G W, Wang J C, Ballinger D G, Rice J P, Bierut L J. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. **Hum Mol Genet** 2007; 16 (1): 36-49.

Sahai E. Illuminating the metastatic process. **Nat Rev Cancer** 2007; 7 (10): 737-749.

Said N A, Williams E D. Growth factors in induction of epithelial-mesenchymal transition and metastasis. **Cells Tissues Organs** 2011; 193 (1-2): 85-97.

Saito R-A, Watabe T, Horiguchi K, Kohyama T, Saitoh M, Nagase T, Miyazono K. Thyroid Transcription Factor-1 Inhibits Transforming Growth Factor- $\beta$ -Mediated Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Adenocarcinoma Cells. **Cancer Research** 2009; 69 (7): 2783-2791.

Sánchez-Tilló E, Lázaro A, Torrent R, Cuatrecasas M, Vaquero E C, Castells A, Engel P, Postigo A. ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. **Oncogene** 2010; 29: 3490.

Sanz-Moreno V, Marshall C J. The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. **Curr Opin Cell Biol** 2010; 22 (5): 690-696.

Sato M, Shames D S, Gazdar A F, Minna J D. A Translational View of the Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. **Journal of Thoracic Oncology** 2007; 2 (4): 327-343.

Sato M, Shames D S, Hasegawa Y. Emerging evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in lung carcinogenesis. **Respirology** 2012; 17 (7): 1048-1059.

Schaal C, Chellappan S P. Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. **Mol Cancer Res** 2014; 12 (1): 14-23.

Schilsky J B, Ni A, Ahn L, Datta S, Travis W D, Kris M G, Chaft J E, Rekhtman N, Hellmann M D. Prognostic impact of TTF-1 expression in patients with stage IV lung adenocarcinomas. **Lung Cancer** 2017; 108: 205-211.

Schwartz A G, Cote M L. Epidemiology of Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol* 2016; 893: 21-41.

Schwartz A G, Ruckdeschel J C. Familial lung cancer: genetic susceptibility and relationship to chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173 (1): 16-22.

Seong B K A, Lau J, Adderley T, Kee L, Chaukos D, Pienkowska M, Malkin D, Thorner P, Irwin M S. SATB2 enhances migration and invasion in osteosarcoma by regulating genes involved in cytoskeletal organization. *Oncogene* 2014; 34: 3582.

Sequist L V, Waltman B A, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke A B, Fidias P, Bergethon K, Shaw A T, Gettinger S, Cosper A K, Akhavanfard S, Heist R S, Temel J, Christensen J G, Wain J C, Lynch T J, Vernovsky K, Mark E J, Lanuti M, Iafrate A J, Mino-Kenudson M, Engelman J A. Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Science Translational Medicine* 2011; 3 (75): 75ra26-75ra26.

Sheehan-Rooney K, Pálincášová B, Eberhart J K, Dixon M J. A cross-species analysis of Satb2 expression suggests deep conservation across vertebrate lineages. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2010; 239 (12): 3481-3491.

Shen H, Zhu M, Wang C. Precision oncology of lung cancer: genetic and genomic differences in Chinese population. *npj Precision Oncology* 2019; 3 (1): 14.

Skrypek N, Goossens S, De Smedt E, Vandamme N, Berx G. Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends in Genetics* 2017; 33 (12): 943-959.

Smalley K S M, Brafford P, Haass N K, Brandner J M, Brown E, Herlyn M. Up-Regulated Expression of Zonula Occludens Protein-1 in Human Melanoma Associates with N-Cadherin and Contributes to Invasion and Adhesion. *The American Journal of Pathology* 2005; 166 (5): 1541-1554.

So Hee L, It, sup, gt, Paek A R, Kyungsil Y, Seok Hyun K, Soo Young L, amp, Hye Jin Y. Tight junction protein 1 is regulated by transforming growth factor- $\beta$  and contributes to cell motility in NSCLC cells. *BMB Rep.* 2015; 48 (2): 115-120.

Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, Hlubek F, Jung A, Strand D, Eger A, Kirchner T, Behrens J, Brabletz T. The Transcriptional Repressor ZEB1 Promotes Metastasis and Loss of Cell Polarity in Cancer. *Cancer Research* 2008; 68 (2): 537.

Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* 2000; 10 (6): 415-433.

Stankic M, Pavlovic S, Chin Y, Brogi E, Padua D, Norton L, Massague J, Benezra R. TGF-beta-Id1 signaling opposes Twist1 and promotes metastatic colonization via a mesenchymal-to-epithelial transition. *Cell Rep* 2013; 5 (5): 1228-1242.



Takeyama Y, Sato M, Horio M, Hase T, Yoshida K, Yokoyama T, Nakashima H, Hashimoto N, Sekido Y, Gazdar A F, Minna J D, Kondo M, Hasegawa Y. Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. **Cancer Letters** 2010; 296 (2): 216-224.

Talmadge J E, Fidler I J. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. **Cancer Research** 2010; 70 (14): 5649.

Tam W L, Weinberg R A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. **Nature Medicine** 2013; 19: 1438.

Tan D, Zander D S. Immunohistochemistry for assessment of pulmonary and pleural neoplasms: a review and update. **Int J Clin Exp Pathol** 2008; 1 (1): 19-31.

Tenjin Y, Kudoh S, Kubota S, Yamada T, Matsuo A, Sato Y, Ichimura T, Kohrogi H, Sashida G, Sakagami T, Ito T. Ascl1-induced Wnt11 regulates neuroendocrine differentiation, cell proliferation, and E-cadherin expression in small-cell lung cancer and Wnt11 regulates small-cell lung cancer biology. **Laboratory Investigation** 2019.

Thorgeirsson T E, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson K P, Manolescu A, Thorleifsson G, Stefansson H, Ingason A, Stacey S N, Bergthorsson J T, Thorlacius S, Gudmundsson J, Jonsson T, Jakobsdottir M, Saemundsdottir J, Olafsdottir O, Gudmundsson L J, Bjornsdottir G, Kristjansson K, Skuladottir H, Isaksson H J, Gudbjartsson T, Jones G T, Mueller T, Gottsater A, Flex A, Aben K K H, de Vegt F, Mulders P F A, Isla D, Vidal M J, Asin L, Saez B, Murillo L, Blondal T, Kolbeinsson H, Stefansson J G, Hansdottir I, Runarsdottir V, Pola R, Lindblad B, van Rij A M, Dieplinger B, Haltmayer M, Mayordomo J I, Kiemeny L A, Matthiasson S E, Oskarsson H, Tyrfinngsson T, Gudbjartsson D F, Gulcher J R, Jonsson S, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. **Nature** 2008; 452 (7187): 638-642.

Thun M J, Burns D M. Health impact of "reduced yield" cigarettes: a critical assessment of the epidemiological evidence. **Tob Control** 2001; 10 Suppl 1: i4-11.

Thunnissen E, Borczuk A C, Flieder D B, Witte B, Beasley M B, Chung J-H, Dacic S, Lantuejoul S, Russell P A, den Bakker M, Botling J, Brambilla E, de Cuba E, Geisinger K R, Hiroshima K, Marchevsky A M, Minami Y, Moreira A, Nicholson A G, Yoshida A, Tsao M-S, Warth A, Duhig E, Chen G, Matsuno Y, Travis W D, Butnor K, Cooper W, Mino-Kenudson M, Motoi N, Poleri C, Pelosi G, Kerr K, Aisner S C, Ishikawa Y, Buettner R H, Keino N, Yatabe Y, Noguchi M. The Use of Immunohistochemistry Improves the Diagnosis of Small Cell Lung Cancer and Its Differential Diagnosis. An International Reproducibility Study in a Demanding Set of Cases. **Journal of Thoracic Oncology** 2017; 12 (2): 334-346.

Tong Z T, Cai M Y, Wang X G, Kong L L, Mai S J, Liu Y H, Zhang H B, Liao Y J, Zheng F, Zhu W, Liu T H, Bian X W, Guan X Y, Lin M C, Zeng M S, Zeng Y X, Kung H F, Xie D. EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin. **Oncogene** 2011; 31: 583.

Torok S, Hegedus B, Laszlo V, Hoda M A, Ghanim B, Berger W, Klepetko W, Dome B, Ostoros G. Lung cancer in never smokers. **Future Oncol** 2011; 7 (10): 1195-1211.

Toyooka S, Toyooka K O, Maruyama R, Virmani A K, Girard L, Miyajima K, Harada K, Ariyoshi Y, Takahashi T, Sugio K, Brambilla E, Gilcrease M, Minna J D, Gazdar A F. DNA Methylation Profiles of Lung Tumors. *Molecular Cancer Therapeutics* 2001; 1 (1): 61.

Travis W D, Brambilla E, Nicholson A G, Yatabe Y, Austin J H M, Beasley M B, Chirieac L R, Dacic S, Duhig E, Flieder D B, Geisinger K, Hirsch F R, Ishikawa Y, Kerr K M, Noguchi M, Pelosi G, Powell C A, Tsao M S, Wistuba I. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 2015; 10 (9): 1243-1260.

Tu W, Luo M, Wang Z, Yan W, Xia Y, Deng H, He J, Han P, Tian D. Upregulation of SATB1 promotes tumor growth and metastasis in liver cancer. *Liver International* 2012; 32 (7): 1064-1078.

Tulchinsky E, Demidov O, Kriajevska M, Barlev N A, Imyanitov E. EMT: A mechanism for escape from EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2019; 1871 (1): 29-39.

van Meerbeeck J P, Fennell D A, De Ruyscher D K M. Small-cell lung cancer. *The Lancet* 2011; 378 (9804): 1741-1755.

van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res* 2011; 728 (1-2): 23-34.

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

Wang J, Lu Y, Ding H, Gu T, Gong C, Sun J, Zhang Z, Zhao Y, Ma C. The miR-875-5p inhibits SATB2 to promote the invasion of lung cancer cells. *Gene* 2018; 644: 13-19.

Wang S-P, Wang W-L, Chang Y-L, Wu C-T, Chao Y-C, Kao S-H, Yuan A, Lin C-W, Yang S-C, Chan W-K, Li K-C, Hong T-M, Yang P-C. p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 694.

Wang T-Y, Han Z-M, Chai Y-R, Zhang J-H. A mini review of MAR-binding proteins. *Molecular Biology Reports* 2010; 37 (7): 3553-3560.

Wang Y-Q, Jiang D-M, Hu S-S, Zhao L, Wang L, Yang M-h, Ai M-L, Jiang H-J, Han Y, Ding Y-Q, Wang S. SATB2-AS1 suppresses colorectal carcinoma aggressiveness by inhibiting SATB2-dependent Snail transcription and epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Research* 2019: canres.2900.2018.

Warzecha C C, Jiang P, Amirikian K, Dittmar K A, Lu H, Shen S, Guo W, Xing Y, Carstens R P. An ESRP-regulated splicing programme is abrogated during the epithelial–mesenchymal transition. *The EMBO Journal* 2010; 29 (19): 3286-3300.

WEB\_1. Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2018. <http://gco.iarc.fr/today/home>, (son güncelleme tarihi: 2018, alındığı tarih: 05.09.2019).

WEB\_2. JASPAR. <http://jaspar.genereg.net>, (son güncelleme tarihi: 04.06.2018, alındığı tarih: 05.09.2019).

WEB\_3. NCBI Primer BLAST. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, (son güncelleme tarihi: 17.10.2018, alındığı tarih: 05.09.2019).

WEB\_4. OligoAnalyzer and UNAFold Tools. <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>, (son güncelleme tarihi: 01.01.2019, alındığı tarih: 05.09.2019).

WEB\_5. MORPHEUS. (son güncelleme tarihi: 05.06.2018, alındığı tarih: 05.09.2019).

WEB\_6. Cancer Cell Line Encyclopedia <https://portals.broadinstitute.org/ccle>, (son güncelleme tarihi: 01.01.19, alındığı tarih: 05.09.2019).

WEB\_7. TargetScan. [http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/), (son güncelleme tarihi: 1.03.2018, alındığı tarih: 19.10. 2019).

Wettasinghe M, Bolling B, Pihak L, Xiao H, Parkin K. Phase II enzyme-inducing and antioxidant activities of beetroot (*Beta vulgaris* L.) extracts from phenotypes of different pigmentation. *J Agric Food Chem* 2002; 50 (23): 6704-6709.

Whale A, Hashim F N, Fram S, Jones G E, Wells C M. Signalling to cancer cell invasion through PAK family kinases. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011; 16: 849-864.

Winstone T A, Man S F P, Hull M, Montaner J S, Sin D D. Epidemic of lung cancer in patients with HIV infection. *Chest* 2013; 143 (2): 305-314.

Wolf K, Wu Y I, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, Stack M S, Friedl P. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2007; 9 (8): 893-904.

Wu C-Y, Tsai Y-P, Wu M-Z, Teng S-C, Wu K-J. Epigenetic reprogramming and post-transcriptional regulation during the epithelial&#x2013;mesenchymal transition. *Trends in Genetics* 2012; 28 (9): 454-463.

Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research* 2009; 19: 156.

Xu L, Deng X. Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of mu- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion. *J Biol Chem* 2004; 279 (51): 53683-53690.

Xu M, Xu X, Pan B, Chen X, Lin K, Zeng K, Liu X, Xu T, Sun L, Qin J, He B, Pan Y, Sun H, Wang S. LncRNA SATB2-AS1 inhibits tumor metastasis and affects the tumor immune cell microenvironment in colorectal cancer by regulating SATB2. *Molecular Cancer* 2019; 18 (1): 135.

Xue J, Yang S, Seng S. Mechanisms of Cancer Induction by Tobacco-Specific NNK and NNN. **Cancers (Basel)** 2014; 6 (2): 1138-1156.

Yanaka Y, Muramatsu T, Uetake H, Kozaki K-i, Inazawa J. miR-544a induces epithelial-mesenchymal transition through the activation of WNT signaling pathway in gastric cancer. **Carcinogenesis** 2015; 36 (11): 1363-1371.

Yang M-H, Yu J, Chen N, Wang X-Y, Liu X-Y, Wang S, Ding Y-Q. Elevated MicroRNA-31 Expression Regulates Colorectal Cancer Progression by Repressing Its Target Gene SATB2. **PLOS ONE** 2014; 8 (12): e85353.

Yang M-H, Yu J, Jiang D-M, Li W-L, Wang S, Ding Y-Q. microRNA-182 targets special AT-rich sequence-binding protein 2 to promote colorectal cancer proliferation and metastasis. **Journal of Translational Medicine** 2014; 12 (1): 109.

Yeung K T, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. **Molecular Oncology** 2017; 11 (1): 28-39.

Yokota J, Shiraishi K, Kohno T. Genetic basis for susceptibility to lung cancer: Recent progress and future directions. **Adv Cancer Res** 2010; 109: 51-72.

Yu H A, Arcila M E, Rekhtman N, Sima C S, Zakowski M F, Pao W, Kris M G, Miller V A, Ladanyi M, Riely G J. Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. **Clinical Cancer Research** 2013; 19 (8): 2240-2247.

Yu N, Su X, Wang Z, Dai B, Kang J. Association of Dietary Vitamin A and beta-Carotene Intake with the Risk of Lung Cancer: A Meta-Analysis of 19 Publications. **Nutrients** 2015; 7 (11): 9309-9324.

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

Yuan S, Norgard R J, Stanger B Z. Cellular Plasticity in Cancer. **Cancer Discovery** 2019; 9 (7): 837-851.

Zeren EH G D (2015). Akciğer kanseri patolojisi. Göğüs Cerrahisi "Kırmızı Kitap". B. A. Yüksel M. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 32: 389-398.

Zhang H, Fillmore Brainson C, Koyama S, Redig A J, Chen T, Li S, Gupta M, Garcia-de-Alba C, Paschini M, Herter-Sprie G S, Lu G, Zhang X, Marsh B P, Tuminello S J, Xu C, Chen Z, Wang X, Akbay E A, Zheng M, Palakurthi S, Sholl L M, Rustgi A K, Kwiatkowski D J, Diehl J A, Bass A J, Sharpless N E, Dranoff G, Hammerman P S, Ji H, Bardeesy N, Saur D, Watanabe H, Kim C F, Wong K-K. Lkb1 inactivation drives lung cancer lineage switching governed by Polycomb Repressive Complex 2. **Nature Communications** 2017; 8: 14922.

Zhao X, Qu Z, Tickner J, Xu J, Dai K, Zhang X. The role of SATB2 in skeletogenesis and human disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews** 2014; 25 (1): 35-44.

Ziegler R G. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. **Am J Clin Nutr** 1991; 53 (1 Suppl): 251S-259S.

Zugazagoitia J, Molina-Pinelo S, Lopez-Rios F, Paz-Ares L. Biological therapies in nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Journal* 2017; 49 (3): 1601520.

Zuo C, Zhao X, Shi Y, Wu W, Zhang N, Xu J, Wang C, Hu G, Zhang X. TNF-alpha inhibits SATB2 expression and osteoblast differentiation through NF-kappaB and MAPK pathways. *Oncotarget* 2018; 9 (4): 4833-4850.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

Hakan KÜÇÜKSAYAN 1987 yılında Denizli’de doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Denizli’de tamamladı. 2006-2010 yılları arasında Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü okudu ve 2010 yılında bu bölümden mezun oldu. 2011 yılında askerlik görevini tamamladı. 2012 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD’da yüksek lisans eğitimine başladı ve bu bölümden 2015 yılında mezun oldu. 2015 yılında ise Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD’da doktora lisansüstü eğitimine başladı.





## Downregulation of SATB2 is critical for induction of epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of NSCLC cells



Hakan Kucuksayan<sup>a</sup>, Osman Nidai Ozes<sup>b</sup>, Hakan Akca<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Medical Biology Department, School of Medicine, Pamukkale University, Kınıklı, Denizli, Turkey

<sup>b</sup>Medical Biology Department, School of Medicine, Akdeniz University, Antalya, Turkey

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 January 2016

Received in revised form 21 April 2016

Accepted 31 May 2016

#### Keywords:

SATB2

TGF- $\beta$

NSCLC

EMT

Invasion

Stemness

### ABSTRACT

**Objectives:** The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is considered as a key step in invasion of cancer cells. There are several regulator proteins responsible for induction of EMT, but underlying mechanisms are still unclear. SATB2 is an epigenetic regulator involved in osteoblastic differentiation. The role of SATB2 in EMT and invasion of NSCLC cells is unknown. Therefore, we aimed to explain roles of SATB2 with underlying molecular mechanisms in EMT and invasion of NSCLC cells.

**Materials and methods:** We used A549 and NCI-H1650 cells as a model to evaluate the effects of SATB2 in EMT and invasion of NSCLC cells. Cell culture, western blot analysis, siRNA-mediated gene knockdown, and invasion assay were performed in this study.

**Results and conclusion:** In this study, we investigated the regulatory role of SATB2 expression in TGF- $\beta$ -induced EMT and invasion of NSCLC cells, and found that SATB2 is downregulated in A549 cells and TGF- $\beta$  can induce EMT in these cells, however, TGF- $\beta$  can not induce EMT in SATB2 expressing cells such as H1650, PC3, H-18, Hcc78 and Hcc193. Our results demonstrated that SATB2 knockdown is sufficient to induce generation of fibroblast-like morphology, EMT and invasion of NSCLC cells by upregulating the expressions of Slug, Twist and Zeb1. Moreover, SATB2 knockdown promotes TGF- $\beta$ -induced EMT and invasion in NSCLC cells. These results strongly suggest that SATB2 prevents induction of EMT by suppressing expression of EMT-inducing transcription factors in NSCLC cells. Furthermore, SATB2 could inhibit tumour initiation by suppressing stemness marker genes such as CD44, Nanog, Oct-4A and Sox-2. Consequently, our results clearly indicate that SATB2 plays pivotal role in EMT, invasion and stemness of NSCLC cells.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Non-small cell lung carcinoma (NSCLC) is a major cause of cancer-associated death worldwide with 5-year survival rate less than 15%. Despite the improvements in surgery and chemotherapy, formation of distant metastasis are still the main cause of death in patients with NSCLC [1]. The development of the more effective therapeutic strategies for lung cancer patients depend on understanding of the molecular mechanisms underlying the formation of distant metastases. Increasing evidence reveals that epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays a key role in tumorigenesis, drug resistance, relapse, invasion and metastasis of various cancers

[2]. Cancer cells undergoing EMT display reduced epithelial properties such as cell-cell junctions and apical-basolateral polarity and mesenchymal cell phenotype with enhanced invasive properties [2]. The hallmarks of EMT process are generally confirmed as loss of E-cadherin and up-regulation of mesenchymal markers, such as N-cadherin and vimentin. EMT process is mediated by a variety of transcription factors, including Slug, Twist and Zeb1, which are also known as EMT markers [3–5].

Recent studies suggest that various external signals such as growth factors, cytokines and chemokines play significant role to promote EMT. Among these external factors, TGF- $\beta$  has a crucial role in progression of lung cancer by regulating EMT and invasion [6,7]. Although recent studies have revealed several key molecules for TGF- $\beta$ -induced EMT, the underlying molecular mechanisms of TGF- $\beta$ -induced EMT still remains poorly understood.

Special AT-rich binding protein 2 (SATB2) is transcription factor and binds to AT-rich DNA sequences in nuclear matrix attachment regions [8,9]. SATB2 regulates gene expressions by remodelling

Abbreviations: SATB2, Special AT-rich binding protein 2; TGF- $\beta$ , Transforming growth factor beta; NSCLC, Non-small-cell lung carcinoma; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition.

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [hakca@pau.edu.tr](mailto:hakca@pau.edu.tr), [hakanakca@yahoo.com](mailto:hakanakca@yahoo.com) (H. Akca).

## The crosstalk between p38 and Akt signaling pathways orchestrates EMT by regulating SATB2 expression in NSCLC cells

Tumor Biology  
September 2017: 1–9  
© The Author(s) 2017  
Reprints and permissions:  
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/1010428317706212  
journals.sagepub.com/home/tub  


Hakan Kucuksayan and Hakan Akca

### Abstract

Epithelial–mesenchymal transition is a crucial event for metastasis and could be mediated by several pathways such as phosphoinositide 3-kinase/Akt, mitogen-activated protein kinases, as well as many epigenetic regulators. Special AT-rich sequence-binding protein 2 is an epigenetic regulator involved in epithelial–mesenchymal transition and osteoblastic differentiation. It has been reported that the crosstalk between several pathways is responsible for the regulation of epithelial–mesenchymal transition in cancer cells. However, crosstalks between p38 and Akt pathways involved in epithelial–mesenchymal transition are still unknown. We recently reported that there is a crosstalk between p38 and Akt pathways in non-small-cell lung carcinoma cells, and this crosstalk is associated with E-cadherin and special AT-rich sequence-binding protein 2 expressions. Therefore, we aimed to determine whether this crosstalk has a mediator role in the regulation of epithelial–mesenchymal transition in non-small-cell lung carcinoma. Our results showed that inhibition of p38 leads to the disruption of this crosstalk via decreased expression of phosphatase and tensin homolog (PTEN) and subsequently increased activation of Akt in non-small-cell lung carcinoma cells. Then, we found that p38 inhibition upregulated special AT-rich sequence-binding protein 2 expression and reversed epithelial–mesenchymal transition in non-small-cell lung carcinoma cells. Furthermore, special AT-rich sequence-binding protein 2 knockdown abolished the effect of p38 inhibition on epithelial–mesenchymal transition in non-small-cell lung carcinoma cells. In conclusion, our results strongly indicate that the crosstalk between p38 and Akt pathways can determine special AT-rich sequence-binding protein 2 expression and epithelial character of non-small-cell lung carcinoma cells, and special AT-rich sequence-binding protein 2 is a critical epigenetic regulator for epithelial–mesenchymal transition mediated by p38 pathway in non-small-cell lung carcinoma. Our findings will contribute to illuminate the molecular mechanisms of the epithelial–mesenchymal transition process that has a critical significance for lung cancer metastasis.

### Keywords

p38, Akt, SATB2, epithelial–mesenchymal transition, non-small-cell lung cancer

Date received: 6 November 2016; accepted: 13 March 2017

### Introduction

Epithelial–mesenchymal transition (EMT) is a significant event for invasion and metastasis of cancer cells. In this process, epithelial-derived cancer cells display decreased epithelial properties such as cell–cell junctions and apical–basolateral polarity and gains mesenchymal cell phenotype with enhanced invasive properties. The hallmarks of EMT are downregulation of epithelial markers such as E-cadherin and upregulation of mesenchymal markers such as N-cadherin and vimentin.<sup>1,2</sup> EMT can be regulated by several signaling pathways including SMADs, signal

transducers and activators of transcription (STATs), phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt, and mitogen-activated protein (MAP) kinases.<sup>2,3</sup>

Department of Medical Biology, School of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey

**Corresponding author:**  
Hakan Akca, Department of Medical Biology, School of Medicine, Pamukkale University, Kinikli, Denizli 20180, Turkey.  
Email: hakca@pau.edu.tr; hakanakca@yahoo.com



Creative Commons Non Commercial CC BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).



## ORIGINAL ARTICLE

# TGF- $\beta$ -SMAD-miR-520e axis regulates NSCLC metastasis through a TGFBR2-mediated negative-feedback loop

Hakan Kucuksayan, Sakir Akgun, Osman Nidai Ozes<sup>1</sup>, Arsenal Sezgin Alikanoglu<sup>2</sup>, Mustafa Yildiz<sup>3</sup>, Egemen Dal<sup>4</sup> and Hakan Akca\*

Medical Biology Department, School of Medicine, Pamukkale University, Kinikli, Denizli, Turkey, <sup>1</sup>ALTAY Biopharma, San Bruno, CA, USA, <sup>2</sup>Pathology Department and <sup>3</sup>Medical Oncology, Antalya Training and Research Hospital, Antalya, Turkey and <sup>4</sup>Faculty of Medicine, Pamukkale University, Kinikli, Denizli, Turkey

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +905388638078; Fax: +902582963968; Email: hakca@pau.edu.tr

## Abstract

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pathway plays crucial roles during the carcinogenesis and metastasis. TGF- $\beta$  receptor 2 (TGFBR2) is a key molecule for the regulation of TGF- $\beta$  pathway and frequently downregulated or lost in several cancer types including non-small cell lung cancer (NSCLC), and TGF- $\beta$  pathway is often regulated by negative-feedback mechanisms, but little is known about the mechanism of TGFBR2 downregulation in NSCLC. Here, we found that the expression of miR-520e is upregulated in metastatic tumor tissues compared with non-metastatic ones, and its expression is inversely correlated with that of TGFBR2 in clinical samples. We also discovered that TGF- $\beta$  dramatically increased the expression of miR-520e, which targeted and downregulated TGFBR2, and the suppression of miR-520e significantly impaired TGF- $\beta$ -induced TGFBR2 downregulation. Chromatin immunoprecipitation-PCR experiments further showed that miR-520e is transcriptionally induced by SMAD2/3 in response to TGF- $\beta$ . Our findings reveal a novel negative-feedback mechanism in TGF- $\beta$  signaling and the expression level of miR-520e could be a predictive biomarker for NSCLC metastasis.

## Introduction

Lung cancer has the highest rates of incidence and mortality compared with other cancer types (1). Lung cancer is histologically categorized as two different subtypes, small cell lung cancer (SCLC) or non-small cell lung cancer (NSCLC), with incidences of 15 and 84%, respectively (2). NSCLC is the leading cause of cancer-related deaths and has a 5 year survival rate of <15% (3). Although the use of novel treatment options increased the survival of NSCLC patients, the survival rate of NSCLC patients is still poor due to distant metastasis. Therefore, understanding the molecular mechanisms of metastasis of NSCLC cells is essential to develop novel and effective strategies for NSCLC therapy.

The transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a multi-functional cytokine and has dual effects in cancer progression including NSCLC (4-6). TGF- $\beta$  plays a crucial role in cancer

metastasis by activating epithelial-mesenchymal transition (EMT). However, TGF- $\beta$  also regulates the cell cycle by inducing expression of CDK inhibitor p21 and causes G1 arrest (6,7). Mechanistically, when TGF- $\beta$  binds to TGF- $\beta$ -receptor type 2 (TGFBR2), which is a transmembrane serine-threonine kinase, it recruits and phosphorylates TGF- $\beta$ -receptor type 1 (TGFBR1). Activated TGFBR1 phosphorylates receptor-regulated Smads (R-SMADs), SMAD2 and SMAD3, which interact with SMAD4 (co-SMADs), resulting in the formation of the SMAD2/3-SMAD4 complex. This complex accumulates in the nucleus, binds to the regions called as SMAD-binding elements (SBEs) on the promoter of target genes (8,9) and induces or represses their transcription. The activated SMAD complex not only represses the expressions of E-cadherin and CAR1, which are epithelial markers, but also

Received: May 9, 2018; Revised: November 11, 2018; Accepted: November 20, 2018

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

## RESEARCH ARTICLE

NF- $\kappa$ B-Induced Upregulation of miR-548as-3p Increases Invasion of NSCLC by Targeting PTEN

Sakir Akgun<sup>a,d</sup>, Hakan Kucuksayan<sup>a</sup>, Osman N. Ozes<sup>e</sup>, Ozge Can<sup>a</sup>, Arsenal S. Alikanoglu<sup>f</sup>, Mustafa Yildiz<sup>g</sup> and Hakan Akca<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Medical Biology, <sup>b</sup>Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, <sup>c</sup>ILTAM Cancer Biology Laboratory, Pamukkale University, Kinikli, Denizli, Turkey; <sup>d</sup>Medical Biology Department, Faculty of Medicine, Kafkas University, Kars, Turkey; <sup>e</sup>Department of Medical Biology and Genetics, Akdeniz University, Antalya, Turkey; <sup>f</sup>Pathology Department, <sup>g</sup>Medical Oncology, Antalya Training and Research Hospital, Antalya, Turkey

**Abstract: Background:** Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) is an aggressive cancer type due to high metastatic capacity. Nuclear Factor Kappa B (NF- $\kappa$ B) is a consistently active transcription factor in malignant lung cancer cells and has crucial significance in NSCLC progression. It is also implicated in the transcriptional regulation of many genes including microRNAs (miRNAs) that function as tumor suppressor or oncogene. It has been increasingly reported that several miRNAs defined as gene members are induced by NF- $\kappa$ B. The present study aimed to find novel miRNAs that are regulated by NF- $\kappa$ B.

**Methods:** Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq) experiment and bioinformatic analysis were used to determine NF- $\kappa$ B-dependent miRNAs. Western blot analysis, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), luciferase reporter gene assays were carried out to investigate the target genes of miRNAs. To determine biologic activity, transwell invasion and MTT assay were carried out on H1299 NSCLC cell line. miRNA expression level was evaluated in metastatic and non-metastatic tissue samples of NSCLC patients.

**Results:** ChIP-Seq and qRT-PCR experiments showed that miR-548as-3p is transcriptionally regulated by NF- $\kappa$ B in response to Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) treatment. Then, we found that tumor suppressor Phosphatase and Tension homolog (PTEN) is a direct target of miR-548as-3p. Furthermore, miR-548as-3p mediates phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K)/Akt pathway and NF- $\kappa$ B-implicated genes including Matrix Metalloproteinases 9 (MMP9), Slug and Zeb1. We further showed that miR-548as-3p increased invasiveness of NSCLC cells and was upregulated in metastatic tumor tissues compared to non-metastatic ones.

**Conclusion:** All these findings provide a miRNAs-mediated novel mechanism for NF- $\kappa$ B signaling and that miR-548as-3p could be a biomarker for NSCLC metastasis.

## ARTICLE HISTORY

Received: November 11, 2018  
Revised: January 24, 2019  
Accepted: January 26, 2019

DOI:  
10.2174/1871520619666190206165215

**Keywords:** NF-kappa B, neoplasm metastasis, invasion, miR-548as-3p, carcinoma, non-small-cell lung, PTEN.

## 1. INTRODUCTION

Lung cancer is the main cause of cancer-related deaths worldwide and more than a million new cases are added every year [1]. Incidence and prevalence of lung cancers are increasing at an alarming rate, particularly in the western world. Nearly 90% of lung cancers are NSCLC, including Squamous Cell Carcinoma (SCC), Large Cell Carcinoma (LCC), adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma. In spite of advanced diagnostic and therapeutic improvements, 5-year survival rate increased only by 15% in the past 40 years [2]. Therefore, understanding the molecular mechanisms underlying carcinogenesis and progression of lung cancer is very important to fight against this cancer type.

As a multifunctional transcription factor, NF- $\kappa$ B induces cell survival, invasion, metastasis, angiogenesis, differentiation and prevents apoptosis in a variety of cancer cells, including lung cancer [3-6]. NF- $\kappa$ B is constitutively active in many types of cancer, especially in NSCLC [7, 8]. NF- $\kappa$ B is normally sequestered in the

cytoplasm of uninduced cells by binding to Inhibitor kappa B (I $\kappa$ B) family proteins. NF- $\kappa$ B can be activated by a series of stimuli including epidermal growth factor (EGF), insulin, K-Ras, (TNF- $\alpha$ ), and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in human cancers [4]. While TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  induces NF- $\kappa$ B activation via canonical pathway, the others use non-canonical pathway to activate NF- $\kappa$ B. At the end, regardless of whether the activated pathway is canonical or not, all these stimuli induce activation of I $\kappa$ B kinases, consisting of IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , IKK- $\gamma$ . When activated, IKKs phosphorylate I $\kappa$ Bs and induce their degradation by proteasome. Subsequently, NF- $\kappa$ B subunits releasing from I $\kappa$ Bs translocate to nucleus and induce the transcription of target genes by binding to NF- $\kappa$ B-binding sites on the promoters of responsive genes [6, 9].

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules containing approximately 22 nucleotides that negatively regulate the translations of messenger RNAs (mRNA) by binding to their 3' untranslated regions (UTR). miRNAs play important regulatory roles in many biological processes including invasion, proliferation, apoptosis and differentiation of cells [10]. Recent studies have shown that miRNAs are frequently dysregulated in most human cancer types including lung cancer [11, 12]. Transcriptions of miRNA genes are controlled by various transcription factors such

\*Address correspondence to this author at the Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli 20160, Turkey; Tel: +90 258 296 4804, +90 538 863 8078; E-mail: [hakca@pau.edu.tr](mailto:hakca@pau.edu.tr)