

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

TWIST1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN
AKTİVASYON MEKANİZMASININ VE DOĞAL
İNHİBİTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Suray PEHLİVANOĞLU

Doktora Tezi

Antalya, 2014

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**TWIST1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN
AKTİVASYON MEKANİZMASININ VE DOĞAL
İNHİBİTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Suray PEHLİVANOĞLU

Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (Proje no: 2011.03.0122.002) ve TÜBİTAK (SBAG-110S185) tarafından desteklenmiştir.

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2014

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayın ve diğer yayınlar aşağıdadır.

1. Nur B.G.*, Pehlivanoglu S.*, Mihci E, Caliskan M.O., Demir D., Alper O.M., Kayserili H., Luleci G. Clinicogenetic Study of Turkish Patients with Syndromic Craniosynostosis and Literature Review. *Pediatr Neurol.* 2014; 50: 482-490.

*equally responsible for the work described in this paper.

2. Gorgisen G, Ozes D, Pehlivanoglu S, Erdogan A, Dertsiz L, Ozbilim G, Ozbudak IH, Savas B, Ozes ON. Differential expression and activation of Epidermal Growth Factor Receptor 1 (EGFR1), ERK, AKT, STAT3, and TWIST1 in nonsmall cell lung cancer (NSCLC). *Exp Lung Res.* 2013 Nov;39(9):387-98.

3. Turkkahraman D, Alper OM, Pehlivanoglu S, Aydin F, Yildiz A, Luleci G, Akcurin S, Bircan I. Analysis of TPO gene in Turkish children with iodide organification defect: identification of a novel mutation. *Endocrine* . 2010; 37(1):124-128.

4. Turkkahraman D, Alper OM, Aydin F, Yildiz A, Pehlivanoglu S, Luleci G, Akcurin S, Bircan I. Final Diagnosis in Children with Subclinical Hypothyroidism and Mutation Analysis of the Thyroid Peroxidase Gene (TPO). *Journal of Pediatric Endocrinology&Metabolism.* 2009;22(9):845-851.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. **22./08/2014**

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Osman Nidai ÖZES**
Akdeniz Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM**
Akdeniz Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Özgül ALPER**
Akdeniz Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Hakan AKÇA**
Pamukkale Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : **Doç Dr. Ahter ŞANLIOĞLU**
Akdeniz Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/....../.... tarih ve/.... kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), kanser metastazına neden olan temel mekanizmadır. Bu süreçte, ekstraselüler matriks (ECM) proteinlerinin ya degradasyonu ya da ekspresyonlarının baskılanması tümör hücrelerinin hareketi ile sonuçlanır. EMT’de tümör hücrelerinin invazyon oranına bağlı olarak kanserle ilişkili ölüm oranları artar. Bu ölümlerin büyük bir çoğunluğu (yaklaşık olarak % 90) kanser metastazı ile ilişkilidir. Son zamanlarda tanımlanan ve bazik Heliks-Loop-Heliks (b-HLH) yapısal özelliği gösteren bir transkripsiyon faktörü olan TWIST1, ECM ana elemanlarından olan E-Kaderin transkripsiyonunu baskılaması nedeniyle EMT ile ilişkilendirilmiştir. TWIST1 ekspresyon artışına bağlı olarak EMT ve kanser metastazı artmaktadır. TWIST1’in EMT süreci ile ilişkisini bilmemize rağmen aktivasyon mekanizması hakkındaki bilgilerimiz sınırlıdır. TWIST1’in protein dizisini incelediğimizde RxRxxS/T konsensus motifi yapısında 3 adet AKT bağlanma bölgesini belirledik. İnsan TWIST1 yapısında bunlar Ser42, Tre121 ve Ser123 amino asitleridir. Çalışmamızda, doku özėü büyüme faktörleri ile aktive edilen AKT’nin belirlenen amino asitlerden TWIST1’i fosforile ettiğini gösterdik. Bu amino asit rezidularının anlamlılığını belirlemek için ilgili amino asitleri fosforile olamayan Alanin ve fosforilasyonu taklit eden negatif yüklü Gutamik asid formlarına çevirdik. Alanin mutantları TWIST1’i inaktive ederken Glutamik asid mutantları ise aktive etmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre; TWIST1, AKT tarafından fosforile edilmektedir ve bu fosforilasyon aktivasyonu için gereklidir. Öngöröldüğü gibi aktive olan TWIST1 E-Kaderin transkripsiyonunu baskımlarken N-Kaderin ve Vimentin ekspresyonlarını ise indükler. Sonuç olarak, TWIST1 aktivasyonu AKT tarafından fosforilasyona ihtiyaç duyar ve bu durum EMT regölasyonu için gereklidir.

Anahtar Kelimeler:AKT/PKB, TWIST1, Epitelyal Mezenkimal Transisyon (EMT).

ABSTRACT

Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) is a major mechanism that causes cancer metastasis. In this process, proteins of extracellular matrix (ECM) are either degraded or their expression is suppressed resulting in mobilization of tumor cells. Depending on tumor dissemination, cancer associated mortality rates increase with EMT. The majority of deaths (about 90%) associated with cancer are due to the metastasis. Recently discovered transcription factor TWIST, a transcription factor with bHLH motif, is tightly associated with EMT because of its ability to repress transcription of E-Cadherin, a major constituent of ECM. Therefore, increased expression of TWIST1 contributes to EMT and cancer metastasis. Although, we know the involvement of TWIST1 in EMT, little is known about the mechanism of activation of TWIST1. By searching the amino acid sequence of TWIST1 we have found 3 conserved AKT/PKB phosphorylation sites in the consensus RxRxxS/T motif. These sequences are Ser42, Thr121, and Ser123 in human TWIST1. In our study, we showed that AKT is activated by tissue specific growth factors and phosphorylates TWIST1 at indicated sites. To further analyse the significance of phosphorylation of these sites, we converted above residues to unphosphorylatable Alanine or phosphorylation mimicking negatively charged Glutamic acid. Alanine mutants of TWIST1 turn out to be inactive whereas Glutamic acid mutants are active. Our results indicate that TWIST1 is phosphorylated by AKT and this phosphorylation is required for its activation. As anticipated, activated TWIST1 represses the transcription of E-Cadherin while inducing the expression of N-cadherin and Vimentin. In conclusion, TWIST1 activation requires phosphorylation by AKT and this is necessary for TWIST1-regulated EMT.

Keywords: AKT/PKB, TWIST1, Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT).

TEŞEKKÜR

Tez projemin planlanmasında, araştırılmasında ve yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, doktora eğitimim boyunca engin bilgisi ve tecrübelerinden yararlandığım, bilimsel ve ahlaki değerler açısından örnek aldığım ve yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam, sayın Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ'e,

Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer tüm hocalarıma, araştırma görevlisi ve teknisyen arkadaşlarıma, sekreterlerimize ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Tez çalışmalarımındaki katkılarından dolayı Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri ve Uygulama Merkezi ve Tıp Fakültesi'ndeki değerli hocalarım ve çalışanlarına,

Bugüne gelebilmemde verdikleri destek, her zaman yanımda hissettiğim sevgi ve güvenleri, gösterdikleri anlayış için dostlarıma ve sevgili aileme tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
GRAFİKLER DİZİNİ	xvi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Epitelyal Mezenkimal Transisyon	2
2.1.1. Epitelyal Mezenkimal Transisyon ve Kanser	2
2.1.2. EMT Sürecinde Hücresel Komponentler	3
2.1.2.1. Hücre İskeleti Elemanı: E-Kaderin	3
2.1.2.2. Ekstraselüler Proteinler	5
2.1.2.3. Transkripsiyon Faktörleri	6
2.1.2.4. Büyüme Faktörleri ve Sinyal Yolakları	6
2.2. EMT’de PKB/AKT’nin Rolü	6
2.2.1. AKT’nin Protein Yapısı	6
2.2.2. AKT Aktivasyonu	7
2.2.3. AKT’nin Substrat Özgüllüğü	10
2.2.4. AKT ve EMT	10
2.2.5. Hücre İskeleti Proteinlerinin AKT Tarafından Düzenlenmesi	12
2.3. TWIST1 Transkripsiyon Faktörü	14
2.3.1. <i>TWIST1</i> Gen Yapısı	14
2.3.2. TWIST1 Protein Yapısı	17
2.3.3. TWIST1 Dimerizasyonu	18
2.3.4. TWIST1 Fonksiyonu	19
2.3.5. TWIST1’in Embriyonal Gelişimdeki Rolü	20
2.3.6. TWIST1 ve Kanser Metastazı	20
2.3.7. Metastatik Karsinomlarda Epigenetik TWIST1 Modifikasyonları	21
2.3.8. Kanserde <i>TWIST1</i> Geninin Transkripsiyonel Aktivasyonu	21
2.3.9. EMT ilişkili Kanser Kök Hücre Oluşumunda TWIST1’in Rolü	22
2.3.10. TWIST1’in Apoptoz ile İlişkisi	23
2.3.11. Kemoterapötik Hedef Olarak TWIST1’in Önemi	23
2.4. Hipotez	24

	Sayfa
MATERYAL VE YÖNTEMLER	26
3.1. Hücre Kültürü	26
3.2. Hücrelerden TRIZOL ile RNA İzolasyonu	26
3.3. RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü	26
3.4. İzole edilen RNA'nın cDNA'ya Dönüştürülmesi Reaksiyonu	27
3.5. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi	27
3.5.1. PCR Reaksiyonu, İçeriği ve Koşulları	27
3.5.2. İnsan TWIST1 cDNA'sının Amplifiye Edilmesi İçin Kullanılan Klonlama Primerleri	27
3.6. Amplifiye Edilen İnsan TWIST1 cDNA'sının pcDNA 3.1 (A) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması	27
3.6.1. İnsan cDNA'sının ve pcDNA3.1(A) Vektörünün BamHI Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi	27
3.6.2. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme Sistemi	28
3.6.2.1. % 1,5 Agaroz Jelin Hazırlanması	28
3.6.3. pcDNA3.1(A) Vektörünün ve TWIST1 cDNA'sının Fenolle Çöktürme Yöntemiyle Temizlenmesi	28
3.6.4. pcDNA3.1(A) Vektörünün Dana Intestin Alkalen Fosfataz CIAP ile muamelesi	28
3.6.5. İnsan TWIST1 cDNA'sının pcDNA3.1(A) Vektörüne T4 DNA Ligaz Enzim Reaksiyonuyla Klonlanması	29
3.6.6. İnframe Klonlama İşleminin Oryantasyon Yönünün Belirlenmesi için ApaI Enzim Kesiminin Gerçekleştirilmesi	29
3.7. Doğru Oryantasyon Klonlama Yönüne Sahip pcDNA3.1(A) Vektörün Çoğaltılması için E.coli DH5α suşuna Transformasyonu	29
3.7.1. CaCl ₂ Yöntemiyle Kompetan DH5α Hazırlanması	29
3.7.2. E. Coli DH5α suşuna Plazmid Transformasyonu	30
3.7.3. Agar Hazırlanması	30
3.8. Bakteriden Plazmid İzolasyonu	30
3.9. Hücrelere Kalsiyum Fosfat Yöntemiyle Plazmid Transfeksiyonu	31
3.10. Transfekte Olan 293T Hücrelerinin Seçilmesi	32
3.11. Hücrelere EGF ve LY294002 (PI3K İnhibitörü) Muamelesi	32
3.12. Hücre Lizatı Hazırlanması	32
3.13. Protein Miktar Tayini	33
3.14. İmmünopresipitasyon Yöntemi	33
3.15. Western Blot Yöntemi	34
3.15.1. Jelin Hazırlanması	35
3.15.2. Örneklerin Jelde Yürütülmesi	35
3.15.3. Proteinlerin Jelden PVDF Membrana Transferi	35
3.15.4. PVDF Membranın İşaretlenmesi	35
3.15.5. Strip Off Uygulaması	36
3.16. <i>In vitro</i> Kinaz Reaksiyonu	36

	Sayfa
3.17.	Site-Directed Mutagenesis Yöntemi 37
3.18.	Plazmitlerin Dpn-I Enzimi ile Kesilmesi 37
3.19.	PCR veya Restriksiyon Enzim Kesimi Ürünlerinin Temizlenmesi 38
3.20.	DNA Dizi Analizi PCR Yöntemi 38
3.20.1.	DNA Dizi Analizi PCR Sonrası Sodyum Asetat ile Temizleme ve Örneklerin Cihaza Yüklenmesi 39
3.21.	Jel Retardasyon Deneyi 39
3.21.1.	Örneklerin %5 Akrilamid Jelinde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi 40
3.22.	WST-1 Hücre Proliferasyon Testi 40
3.23.	Tümör Hücresi Migrasyon Testi 41
3.24.	İmmü floresan Sitokimya Yöntemi 41
3.25.	Metanolik Bitki Ekstraktının Hazırlanması ve Organik Molekül İzolasyonu 42
3.26.	İzole edilen Organik Moleküllerin IC50 Değerlerinin Belirlenmesi 42
3.27.	İstatistiksel Analiz 42
BULGULAR	43
4.1.	Çeşitli İnsan Kanseri Hücre Hatlarında Endojen TWIST1 Ekspresyonunun Gösterilmesi 43
4.2.	İnsan TWIST1 Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması 44
4.2.1.	MDA-MB 231 Hücrelerinden cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması 44
4.2.2.	cDNA Kütüphanesi Kullanılarak TWIST1 cDNA'sının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifiye Edilmesi ve DNA Dizi Analizinin Gerçekleştirilmesi 44
4.2.3.	İnsan TWIST1 cDNA (NM_000474) ve Protein Dizisi (NP_000465.1) 45
4.2.4.	İnsan TWIST1 cDNA'sının DNA Dizi Analizi Sonucu 46
4.2.5.	pcDNA3.1(A) Ekspresyon Vektörü ve Çoklu Klonlama Bölgesi 47
4.2.6.	pcDNA3.1(A) Ekspresyon Vektörünün Klonlama İşlemi için Hazırlanması 48
4.2.7.	Klonlanmış pcDNA3.1(A) Vektörlerin Belirlenmesi 48
4.2.8.	TWIST1 cDNA'sı Klonlanmış pcDNA3.1(A) Vektöründe İntert Yönünün Belirlenmesi 49
4.3.	İnsan TWIST1 Ekspresyon Vektöründen Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi 49
4.4.	293T Hücrelerinde EGF Muamelesi ile Zamana Bağlı AKT Fosforilasyon Düzeyinin Belirlenmesi 50
4.5.	TWIST1 ve AKT'nin Birbirine Bağlanmasının İmmünopresipitasyon ile Gösterilmesi 51

4.6.	TWIST1'in AKT Tarafından Fosforile Edilmesinin Gösterilmesi	51
4.7.	İnsan TWIST1 Proteinlerinin Site-Directed Mutagenesis (SDM) Yöntemi ile Mutantlarının Oluşturulması	52
4.8.	İnsan TWIST1 Mutantlarının Ekspresyonlarının Gösterilmesi	55
4.9.	Yabancı Tip ve Mutant TWIST1'in DNA'ya Bağlanma Kabiliyetinin Jel Retardasyon Deneyi ile Gösterilmesi	56
4.9.1.	İnsan TWIST1'in Alanin Mutantlarının DNA'ya Bağlanma Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi	56
4.9.2.	PI3K İnhibitörünün (LY-294002) EGF-aracılı TWIST1 Aktivasyonu Üzerine Olan Etkisi	57
4.9.3.	Dominant Negatif ve Sürekli Aktif AKT Formlarının EGF-aracılı TWIST1 Aktivasyonu Üzerine Olan Etkileri	58
4.10.	TWIST1 Tarafından Pozitif veya Negatif Olarak Düzenlenen Genlerin Ekspresyonlarının Belirlenmesi	59
4.10.1.	MDA-MB-231 Hücrelerinde TWIST1 Baskılanmasının EMT Markerlarının Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi	59
4.10.2.	293T Hücrelerinde Eksprese Edilen Yabancı Tip ve Mutant TWIST1 Proteinlerinin EMT Markerları Üzerindeki Gen Ekspresyon Etkisi	59
4.11.	Yabancı Tip ve Mutant TWIST1 Proteinlerini Eksprese Eden 293T Hücrelerinin Proliferasyon Oranları	62
4.12.	Yabancı Tip ve Mutant TWIST1 Proteinlerini Eksprese Eden 293T Hücrelerinin Migrasyon Oranları	62
4.13.	<i>Dracunculus vulgaris</i> ve <i>Achillea millefolium</i> Metanolik Bitki Ekstraktlarından Elde Edilen Moleküllerin TLC Plakalarda Ayrıştırılması	63
4.14.	İzole Edilen Organik Moleküllerin IC50 Değerlerinin Belirlenmesi	64
4.15.	İzole Edilen Organik Moleküllerin TWIST1 ve EMT Markerları Üzerindeki Etkileri	64
TARTIŞMA		66
SONUÇLAR		71
KAYNAKLAR		72
ÖZGEÇMİŞ		82

SİMGELER ve KISALTMALAR

EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş (Epithelial Mesenchymal Transition)
PKB	: Protein Kinaz B (Protein Kinase B)
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor)
IGF	: İnsülin Büyüme Faktörü (Insulin Growth Factor)
MMP	: Matriks Metalloproteinaz (Matrix Metalloproteinase)
GSK3β	: Glikojen Sentaz Kinaz 3- β (Glycogen Synthase Kinase-3 beta)
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz (Receptor Tyrosine Kinase)
PIP	: Fosfatidilinositol fosfat (Phosphatidylinositol phosphate)
GPCR	: G protein-coupled receptor
PTEN	: Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
AGC ailesi	: Protein Kinaz A, G, C ailesi (Protein Kinase A, G, C family)
PDGF	: Trombosit kökenli büyüme faktörü (Platelet-derived growth factor)
bHLH	: bazik Heliks Loop Heliks (basic Helix-Loop-Helix)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
cDNA	: Komplementer DNA
RNA	: Ribonükleik asit
FBS	: Fetal Dana Serumu (Fetal Bovine Serum)
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
CIAP	: Dana İntestin Alkalen Fosfataz (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)
BSA	: Dana Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)
PSA	: Penisilin Streptomisin Amfoterisin
PVDF	: Poliviniliden diflorid (Polyvinylidene difluoride)
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi (Polyacrylamide gel electrophoresis)
LB	: Luria-Bertani broth

EDTA	: 2,2',2'',2'''-(Etan-1,2-diildinitril) tetraasetik asit
TEMED	: N,N,N,N-tetrametiletilediamin
DTT	: Ditiyotretiol
TBE	: Tris Borat EDTA
TE	: Tris EDTA
HRP	: Horseradish Peroksidaz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
APS	: Amonyum Persülfat
IP	: İmmünopresipitasyon
MA	: Moleküler Ağırlık
dk	: Dakika
sn	: Saniye
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
bç	: Baz çifti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Epitelyal Mezenkimal Transisyon	2
2.2.	Kanser progresyonunda EMT'nin rolü	3
2.3.	E-Kaderin-katenin kompleksinin şematik gösterimi	4
2.4.	AKT'nin protein yapısı ve hedef substrat motifi	7
2.5.	AKT yolağı	9
2.6.	İnsan <i>TWIST1</i> geninin şematik gösterimi	15
2.7.	İnsan <i>TWIST1</i> DNA dizisi	15-16
2.8.	Omurgalı canlılar arasında TWIST1 protein dizisinin karşılaştırılması	18
2.9.	TWIST1 transkripsiyon faktörünün homodimer ve heterodimer yapısı	19
2.10.	TWIST1 transkripsiyon faktörünün gen regülasyonunu düzenlemesi	19
2.11.	TWIST1'in AKT-aracılı aktivasyonu ve etkileri	25
4.1.	Western Blot yöntemi ile insan kanser hücrelerinde TWIST1 ekspresyon seviyelerinin gösterilmesi	43
4.2.	MDA-MB 231 hücrelerinden hazırlanan cDNA kütüphanesinin %1 agaroz jelde gösterilmesi	44
4.3.	PCR yöntemi ile TWIST1 cDNA amplifikasyonunun %2 agaroz jelde gösterilmesi	44
4.4.	TWIST1 cDNA'sının DNA dizi analizi	46
4.5.	DHα5 suşunda çoğaltılıp izole edilen pcDNA3.1(A) plazmiti ve BamHI ile kesilmiş formunun %1 agaroz jelde gösterilmesi	48
4.6.	Ligasyon sonrası TWIST1 cDNA insertünü içeren vektörlerin %1 agaroz jelde belirlenmesi	48
4.7.	pcDNA3.1(A) vektörüne klonlanan insan TWIST1 cDNA'sını Sense ve Anti-sense orientasyonda bulunduran plazmitlerin ApaI ile kesimden elde edilen fragmentlerin %2 agaroz jeldeki görüntüsü	49
4.8.	293T hücrelerinde insan TWIST1 ekzojen ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi	50
4.9.	293T hücrelerinde zamana bağlı EGF muamelesinde AKT fosforilasyon düzeylerinin belirlenmesi	50
4.10.	TWIST1 ve AKT'nin fiziki olarak bağlanmasının immünopresipitasyon ve western blot yöntemleri ile gösterilmesi	51
4.11.	TWIST1'in AKT tarafından fosforile edilmesinin <i>in vitro</i> kinaz reaksiyonu ile gösterilmesi	51
4.12.	İnsan TWIST1 S42A mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	52

Şekil		Sayfa
4.13.	İnsan TWIST1 T121A mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	53
4.14.	İnsan TWIST1 S123A mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	53
4.15.	İnsan TWIST1 S42E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	54
4.16.	İnsan TWIST1 T121E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	54
4.17.	İnsan TWIST1 S123E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi	55
4.18.	Site-directed mutagenез yöntemi ile oluşturulmuş insan mutant TWIST1 gen ekspresyonlarının 293T hücrelerinde western blot yöntemi ile gösterilmesi	55
4.19.	İnsan TWIST1'in Alanin mutantlarının TWIST1'in hedef DNA'ya bağlanmasına olan etkileri	56
4.20.	PI3K İnhibitörü LY294002'nin TWIST1'in DNA'ya bağlanmasına olan etkisi	57
4.21.	CA- ve DN-AKT ekspresyonlarının EGF-aracılı TWIST1 aktivasyonuna etkileri	58
4.22.	Anti-sense vektörü ile TWIST1 ekspresyonu baskılanan MDA-231 hücrelerinde bu baskılamanın E-Kaderin ve Vimentin ekspresyonlarına olan etkisi	59
4.23.	293T hücrelerine yabancı tip ve mutant formları içeren TWIST1-pcDNA3.1(A) transfeksiyonu neticesinde E-Kaderin, N-Kaderin ve Vimentin ekspresyon değişimlerinin western blot yöntemi ile gösterilmesi	60
4.24.	Yabancı Tip ve Mutant TWIST1 proteinlerinin E-Kaderin, Vimentin ve N-Kaderin ekspresyonlarına etkisinin immünfloresan sitokimya yöntemi ile gösterilmesi	61
4.25.	<i>Dracunculus vulgaris</i> (Dv) ve <i>Achillea millefolium</i> (Am) bitki ekstraktlarından elde edilen beş molekülün TLC plakalardaki görüntüsü	63
4.26.	İzole edilen Dv1, Dv2, Am1, Am2, Am3 moleküllerinin MDA-MB 231 hücrelerinde Twist1, E-Kaderin, N-Kaderin ve Vimentin ekspresyonları üzerindeki etkilerinin western blot yöntemi ile gösterilmesi	65

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik		Sayfa
4.1.	Yabancı tip ve mutant TWIST1'lerin transfekte edildiği 293T hücrelerinde WST-1 aracılı proliferasyon deneyi sonucu	62
4.2.	TWIST1 transkripsiyon faktörünün yabancı ve mutant tiplerini eksprese eden 293T hücrelerinin migrasyon oranları	63
4.3.	Dv1, Dv2, Am1, Am2 ve Am3 moleküllerinin IC50 değerlerinin hesaplandığı regresyon eğrileri	64

GİRİŞ VE AMAÇ

TWIST1, bazik Heliks-Loop-Heliks (bHLH) yapısal özelliği gösteren bir transkripsiyon faktörüdür. İlk olarak, *Drosophila*'da mezoderm spesifik genlerin transkripsiyonel aktivasyonu için gerekli bir faktör olarak klonlanmıştır. TWIST1, promotorlarında E-Box dizisi "CANNTG" bulunduran genlerin transkripsiyonunu düzenler. TWIST1 aktivitesi embriyonik gelişim sürecinde büyük önem taşımaktadır. TWIST1'in embriyonik tabakaların oluşumunda, morfogenezde, osteogenezde ve tümörigenezde önemli rolleri vardır. *TWIST1* geninin bir kopyasının eksik olduğu (haplo insufficiency) embriyolarda Saethre-Chotzen sendromu olarak bilinen gelişme bozukluğu görülmektedir. Ayrıca tanımlanan *TWIST1* mutasyonları bu sendrom ile ilişkilendirilmiştir. Osteogenik ve myogenik gen ekspresyonlarını baskılamasına karşın son yıllarda TWIST1'in bir onkogen olduğu iddia edilmiştir, çünkü; TWIST1 bir proto-onkogen olan AKT2'nin ekspresyonunu indüklemekte, tümör baskılayıcı genler olan p53 ve E1A proteinlerinin fonksiyonunu baskılamakta, osteosarkoma hastalarında aşırı ekspresyon göstermekte, bir tümör baskılayıcı olan p14 ARF ekspresyonunu baskılamakta, meme kanseri hücre hatlarında gösterildiği gibi IL-6 ve EGF'e (Epidermal Büyüme Faktörü-Epidermal Growth Faktor) bağımlı STAT3 ve c-SRC onkogenlerini indüklenmekte, glioma, prostat, mide, karaciğer, endometriyal ve gastrik kanser hücrelerinde aşırı ekspresyon göstermekte ve kanser metastazını indükleyerek kötü prognoza sebep olmaktadır.

Tüm bunlardan da önemlisi, TWIST1 kanser metastazında son derece önemli rol oynayan epitelyal mezenkimal geçiş (EMT-Epithelial Mesenchymal Transition) sürecine katılmakta ve epitelyal bir marker olan E-Kaderin ekspresyonunu baskımlarken, mezenkimal bir marker olan N-Kaderin ekspresyonunu indüklemektedir. Bu aşamada kanıtlanmış ilk değişim hücreler arası fiziki kontaktların zayıflatılması ve daha sonrasında hücrelerin bulunduğu yerden koparılmasıdır. EMT her metastazda tek başına yeterli olmasa da tümör metastazının başlangıç aşamasını oluşturur. Çeşitli hücrelerle yapılan çalışmalar sonucunda AKT aktivasyonunun EMT sürecinin başlamasına aracılık ettiği ileri sürülmüştür. AKT klasik bir serin/treonin kinaz enzimdir ve hedef substrat proteinlerini RxRxxS/T konsensus dizisinden fosforile eder. TWIST1 proteininin amino asit dizilimine bakıldığında 3 adet çok spesifik AKT enziminin tanıma ve fosforilasyon amino asit dizileri mevcuttur. Bu amino asit dizileri RKRRSS42, RERQRT121 ve RQRTQS123 sırasına sahiptir. Bu bilgiler ışığında, EGF gibi dokuya spesifik büyüme faktörleri tarafından aktive edilecek olan AKT'nin TWIST1'i yukarıda belirtilen amino asitlerden fosforile ederek TWIST1'in aktivasyonuna, hücre çekirdeğine göçüne ve hedef genlerin promotorlarına bağlanarak bu genlerin transkripsiyonunu indükleyerek hem hücre proliferasyonunun artmasına hem de EMT mekanizmasını aktive ederek kanser hücrelerinin metastazına sebep olacağını öngörmekteyiz. Buna bağlı olarak TWIST1-hedefli olası doğal inhibitörlerinin araştırılmasını amaçlamaktayız.

GENEL BİLGİLER

2.1. Epitelyal Mezenkimal Transisyon

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), epitelyal karakterli hücrelerin mezenkimal-benzer karakter kazanması sürecidir [1]. EMT temel olarak Tip1, 2 ve 3 olmak üzere üç ana başlıkta incelenmektedir. Tip1 EMT, implantasyon, embriyogenez ve organ gelişimini; Tip2 EMT, doku rejenerasyonu ve organ gelişimini; Tip3 EMT ise kanser progresyonu ve metastaz olayındaki epitelyal-mezenkimal değişimi ifade eder [2].

EMT’de ilk olarak, epitelyal kökenli hücrelerde E-Kaderin gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyon seviyelerinin azalması ile hücre-hücre kontaktının azalması ve apiko-bazal polaritenin kaybı meydana gelir. E-Kaderin, hücrelerin epitelyal homeostazisi açısından oldukça önemli bir role sahiptir. EMT sürecinin ikinci aşamasında, epitelyal homeostazisin bozulması ile hücrede epitelyal belirteçlerin, desmosomal ve sıkı bağlantı (tight junction) proteinlerinin oluşturduğu yapılar dağılır. nc aşamaya gelindiğinde, hücrenin polarite proteinlerinin yapısı ve organizasyonu bozulur. Buna ilave olarak, N-Kaderin, Vimentin ve Fibronektin gibi mezenkimal hücre iskeleti proteinlerinin ekspresyonu artar [1]. Son olarak, bazal membran yapısı da bu süreçte değişime uğrar. Hücre-ekstraselüler matriks interaksiyonları ve sinyal yolakları da değiştiğinde mezenkimal karakterli bir hücre meydana gelmiş olur (şekil 2.1) [2].

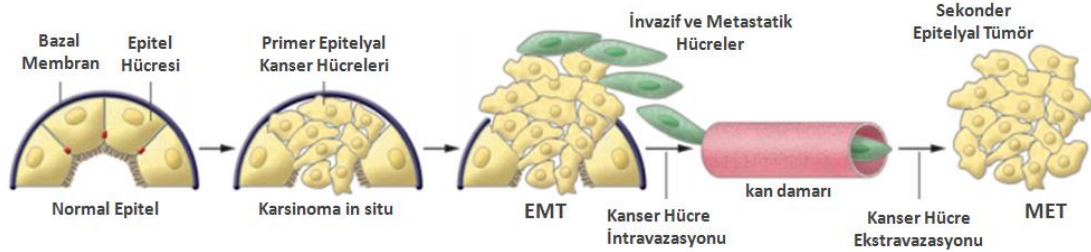


şekil 2.1. Epitelyal Mezenkimal Transisyon.

2.1.1. Epitelyal Mezenkimal Transisyon ve Kanser

EMT, epitelyal kökenli bir hücrenin mezenkimal karakter yapısı kazanması ve buna bağlı olarak bulunduğu ortamdan ayrılması olayıdır. İnvazyon olarak da tanımlanan bu olay, ilk olarak 1980’lerde embriyogenezin bir özelliği olarak belirlenmiştir. Araştırmalar, EMT olayının tümör invazyonu ve metastazda önemli role sahip olduğunu göstermiştir [3]. Bu süreç, patolojik tümör gelişimi ve invazyonu ile karşılaştırdığımızda embriyogeneze büyük benzerlik gösterir. Bu bakımdan EMT, tümör progresyonunda anahtar role sahip olduğu söylenebilir [4]. Kanser progresyonunda normal epitel yapısından invaziv karsinoma doğru geçişte birçok aşama vardır. Bu progresyonda öncelikle epitel hücreleri polaritelerini kaybeder ve

bazal membrandan ayrılmaya başlar [2]. EMT ile birlikte anjiogeneze devreye girer ve tümör büyümesine ve malign faza geçişe büyük katkı sağlanır [2]. Malign özellik kazanan hücreler EMT olayı neticesinde metastatik karakter kazanarak kan dolaşımına geçer. Bu sayede çeşitli dokulara yayılım göstererek makro/mikro-metastazların oluşmasına neden olur (Şekil 2.2) [2].



Şekil 2.2. Kanser progresyonunda EMT'nin rolü [2].

EMT, tümör metastazının başlangıç aşamasını oluşturur. Bu süreç, dinamik bir süreçtir ve kanser hücrelerinde mutasyonlar, epigenetik modifikasyonlar ve transkripsiyonel yeni düzenlemeler sonucunda E-Kaderin gibi epitelyal özelliği kazandıran moleküllerin azalması, N-Kaderin, Vimentin ve Fibronektin gibi mezenkimal özellik kazandıran moleküllerin artışı meydana gelir. Bu süreç ayrıca tümörü çevreleyen stromal hücreleri tarafından veya matriks komponentlerindeki değişimler sonucu da başlatılabilir [5].

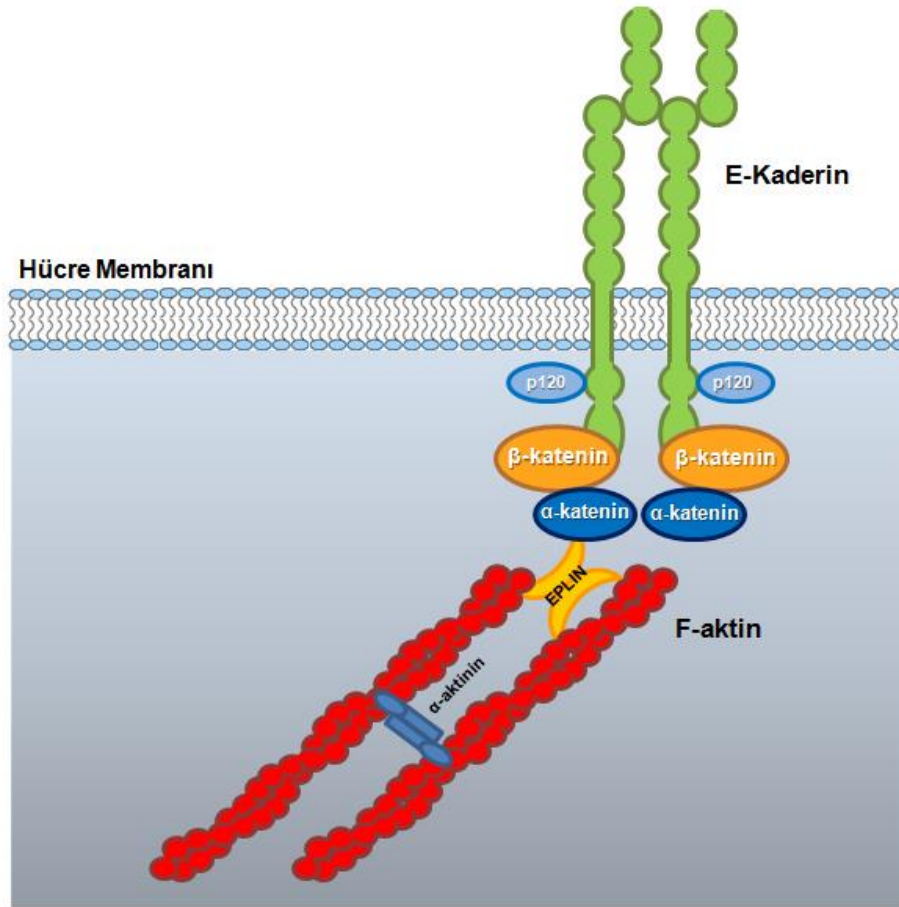
2.1.2 EMT Sürecinde Hücresel Komponentler

2.1.2.1. Hücre İskeleti Elemanı: E-Kaderin

EMT'de kanıtlanmış ilk değişim hücreler arası fiziki kontaktların zayıflatılması ve hücrelerin bulunduğu yerden koparılmasıdır. Bu hücreler arası kontaktlar doğrudan iki hücre iskeletinin E-Kaderin aracılığıyla birbirine bağlanması şeklinde oluşarak çok sıkı bir bağlantı meydana getirir. Kaderinler Ca^{+2} -bağımlı hücre adhezyon molekülleridir ve hücre-hücre kontaklarını sağlayan temel yapılardır. E-kaderinlerin oluşturduğu hücreler arası sıkı bağlantı CCC olarak tanımlanan E-kaderin/ β -katenin/ α E-katenin kompleksi ile sağlanır. β -katenin armadillo olarak tanımlanan N-terminal bölgesi aracılığıyla E-kaderinin sitoplazmik C-terminal bölgesine bağlanır. α E-katenin de benzer şekilde N-terminali ile komplekse katılır. Ayrıca C-terminal bölgesi olan aktin-bağlanma bölgesi (VH3) ile aktin fiberlerine (F-aktin) bağlanarak hücre iskeleti ile ilişki kurar. Araştırmalar ayrıca F-aktin ile CCC kompleksi arasındaki bağlanmada EPLIN olarak tanımlanan aktin-bağlanma proteininin görev aldığını göstermiştir. Bu kompleks yapıyla birlikte hücre-hücre bağlanması çok sıkı bir şekilde sağlanabilmektedir [6], [7] (Şekil 2.3).

Transmembran veya membran-ilişkili glikoproteinler olan E-kaderinler beş ana alt sınıfa ayrılır. Bunlar, klasik tip (Tip I), Tip II, dezmozomal kaderinler, protokaderinler ve kaderin ilişkili moleküllerdir. EMT açısından E-kaderinin en

önemli kısmı sitoplazmik bölgesidir. Proteinin C-terminalinde bulunan bu bölge, membran proksimal/jukstamembran bölge ve β -katenin bağlanma bölgesi olmak üzere iki alt bölgeden oluşur. Bu yapılarda 30-35 amino asitlik CH2 ve CH3 olarak tanımlanan kaderin homoloji bölgeleri (CH) mevcuttur. C-terminal bölgenin delesyonu veya sekiz adet Serin amino asitinin Alanine dönüşümü mutasyonları β -katenin bağlanmasını engeller ve hücre-hücre kontağını bozar [7]. Ayrıca, E-kaderinin transkripsiyonel ekspresyonu baskılandığı zaman β -katenin bağlanacak yer bulamaz ve hücre çekirdeğine göç ederek mezenkimal hücrelerin belirteçleri sayılan Vimentin, Fibronektin ve İntegrin sentezine aracılık eder. Bu durum EMT sürecini başlatarak hücrenin bulunduğu yerden göç etmesine veya invazyonuna neden olur [8].



Şekil 2.3. E-Kaderin-katenin kompleksinin şematik gösterimi.

EMT'nin başlamasını sağlayan temel olay E-kaderinin ekspresyon kaybıdır. Bu durum E-Kaderin geninde meydana gelmiş bir mutasyon neticesinde, *E-kaderin* (CDH1- NG_008021) geninin promotor bölgesindeki hipermetilasyon sonucunda veya transkripsiyonel baskılanma ile meydana gelir [9]. E-kaderinin transkripsiyonel baskılanmasında iki farklı etkidenden söz edilmektedir. Birincisi, Snail, Zeb, E47 ve KLF8 gibi faktörlerin E-Kaderin promotoruna bağlanarak transkripsiyonu engellemesi ve ikincisi ise FoxC2, Goosecoid, E2.2 ve TWIST gibi

faktörlerin transkripsiyon sürecini bloke etmesidir [10]. E-Kaderin kaybı hücrede birçok transkripsiyonel ve fonksiyonel değişikliğe neden olur. E-Kaderin kaybıyla beraber serbest kalan β -katenin birçok genin transkripsiyonel indüksiyonuna aracılık eder. Bu değişimler neticesinde EMT süreci başlayarak epitelyal hücreler mezenkimal-benzer karakter kazanır. Mikroarray çalışmaları, E-Kaderin kaybına bağlı olarak düzenlenen EMT genlerinin %84'ünün β -kateninden bağımsız olarak gerçekleştiğini belirlemiştir [11]. Sadece E-Kaderin kaybına bağlı olarak, 19 farklı transkripsiyon faktörünün ekspresyon seviyeleri 3 katından fazla miktarda arttığı tesbit edilmiştir. Bu transkripsiyon faktörlerinden biri de TWIST1'dir. TWIST1'in fonksiyonunun veya ekspresyonunun baskılandığı durumlarda kazanılmış metastatik özelliklerde gerileme olduğu saptanmıştır. Benzer durum β -katenin için de tesbit edilmiştir. Mutasyon spektrum çalışmalarıyla E-Kaderinin ekstraselüler bölgesinde saptanan nokta mutasyonları metastaza neden olmaz. Bu durum E-Kaderinin intraselüler bölgesinin EMT sürecinde önemli olduğunu göstermektedir [11].

2.1.2.2.Ekstraselüler Proteinler

EMT sürecinde, daha önce bahsedildiği gibi epitelyal bir hücrenin tutunduğu bazal membran yapısı dağılır. Bu yapı, tip IV kollojen, laminin, nidojen ve sülfat taşıyan proteoglikanlar gibi proteinlerin biraraya gelmesiyle meydana gelen bir ağ yapısıdır [12]. Bazal membran yapısı, tümör invazyonuna ve metastaza karşı doğal biyolojik bir bariyerdir. Tümör hücrelerinde özellikle tip IV kollojeni yıkan kollojenazlar sentezlenir. Tip IV kollojen bazal membran yapısını koruyan temel yapılardan biridir. Bu yapının yıkılarak azalması kanser progresyonunu ilerletmektedir [13]. Ancak bazı araştırmalar, nativ yapıdaki tip IV kollojenin tümörjenik olmayan epitel meme hücrelerinde EMT'yi indüklediğini göstermiştir. Bu araştırmalar neticesinde bazal membran komponentlerinin sadece yapısal değil çeşitli yollarla aktive ederek regülatör görevi de üstlendiği anlaşılmaktadır [14]. Bazal membran yapısının önemli bir diğer komponenti de laminin proteinleridir. Lamininler heterotrimerik glikoproteinlerdir ve şimdiye kadar 12 çeşidi tanımlanmıştır [15]. Özellikle laminin-5 bazal membran yapısı için önemlidir. Bu glikoproteini oluşturan üç alt zincir proteini olan Lama3, Lamb3 ve Lamc3'den birisinde meydana gelebilecek stokiyometrik bir değişim bazal membran yapısını zayıflatır. Lama3 zincirinin düşük ekspresyonu ve ayrıca Lamc3 zincirinin yüksek ekspresyonu hücre invazyonuna sebebiyet verir. Dolayısıyla mevcut bazal membranın dağılması ve proteolitik enzimlerin katkısı sonucunda tümör invazyonu tetiklenir [16].

Matriks metalloproteinazlar (MMP), çinko bağımlı proteolitik enzimlerdir. Kollajen, Laminin ve Fibronektin gibi ekstraselülmatriks (ECM) elemanlarını, hücre yüzey reseptörlerini ve büyüme faktörleri gibi matriks dışı proteinleri parçalarlar. Tümör metastazı ve invazyonunda MMP'lerin deregülasyonu söz konusudur [17]. Tümör ve stromal hücre orijinli MMP'ler tümör mikroçevresinde etkin olarak faaliyet gösterirler. Tümör invazyonunda, öncelikle, hücre membran tipine özgü MMP'ler eksprese edilir. İkinci aşamada, membran reseptörleri çözünür (soluble) MMP'leri bağlar. Üçüncü aşamada ise hücre yüzey reseptörleri MMP proenzimlerinin aktifleşmesine aracılık eder [18]. Aktif MMP'ler ekstraselüler matriks elemanlarını yıkarak hücre-bazal membran ve hücre-hücre kontaktlarını

koparır. Her MMP'nin kendine özgü matriks ve matriks olmayan hedef substratları mevcuttur. Örneğin MMP-3 ve MMP-7 E-Kaderini yıkarak hücrel migrasyona neden olduğu gösterilmiştir [19], [20]. Ayrıca birçok karsinom çeşitleri ile ilgili yapılan araştırmalarda MMP-1,-2,-3,-7,-9,-11 ve -13 enzimlerinin yüksek ekspresyonları tümör metastazına yol açtığı gösterilmiştir [17].

2.1.2.3. Transkripsiyon Faktörleri

Son zamanlarda transkripsiyon faktörlerini kodlayan birçok genin EMT sürecine katkı sağladığı tespit edilmiştir. Bu faktörler çinko parmak yapısındaki Snail, Slug, Zeb1, Zeb2 ve bHLH yapısındaki TWIST1 transkripsiyon faktörleridir [21], [22], [23], [24], [25]. Bunlar arasında TWIST1, epitel kökenli hücrelerin EMT sürecinde çok önemlidir ve EMT'yi tek başına indüklemeye özelliğine sahiptir [25].

2.1.2.4. Büyüme Faktörleri ve Sinyal Yolakları

E-Kaderin sentezini engelleyecek olan her faktör mezenkimal geçişi sağlayacak değişimleri başlatır. Nitekim, ERK aktivasyonu, SMADlar, TGF- β , Rho GTPazlar ve PI3K/AKT yolağı EMT'yi aktive etmektedir. Bu bağlamda, farklı hücre tipleriyle yapılan çalışmalarda AKT aktivasyonunun EMT sürecinde çok önemli rolü olduğunu göstermektedir [26], [27], [28], [29], [30].

2.2. EMT'de PKB/AKT'nin Rolü

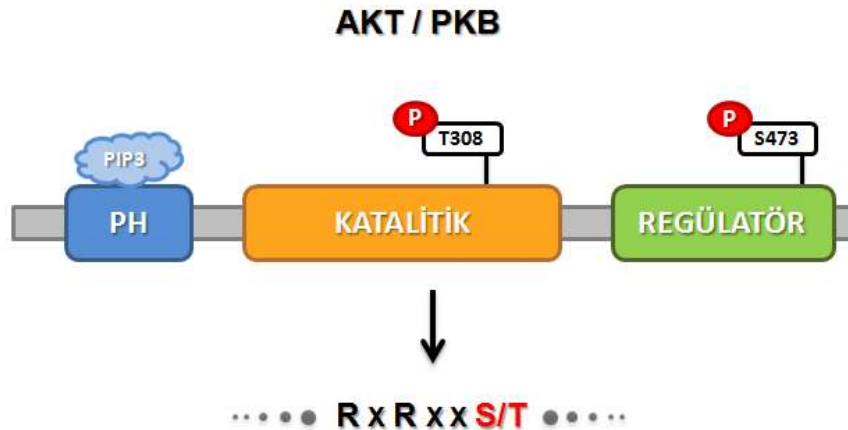
AKT, büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer hücrel stimülatör moleküllerin aktive ettiği ve birçok hücrel sinyalizasyon mekanizmasında rol alan bir Serin/Treonin kinazdır [31]. Aktive ettiği önemli hücrel faaliyetlerden biri de EMT'dir. EMT mekanizmasının açığa kavuşması için AKT aktivasyonunun nasıl gerçekleştiğinin ve nasıl fonksiyon gördüğünün belirlenmesi önemlidir. AKT'nin bu süreçteki hedef efektör molekülleri nelerdir ve hangi mekanizma ile EMT'yi indüklemektedir. Bu açıdan bakıldığında AKT enziminin ve olası hedef moleküllerinin yapısı ve fonksiyonlarının açığa kavuşturulması gerekir.

2.2.1. AKT'nin Protein Yapısı

Protein kinaz B (PKB) olarak da bilinen AKT ilk olarak 1991 yılında yapılan homoloji çalışmaları sonucunda bir Serin/Treonin kinaz olarak tanımlanmıştır [32], [33]. Sonraki yıllarda AKT2 ve AKT3 izoformları da bulunmuştur [34], [35]. Ökaryot canlılar arasında AKT kinazlar yüksek homoloji gösterir. DNA dizi çalışmalarıyla fare, sıçan ve insanda %95 oranında amino asit dizi benzerliği belirlenmiştir [36]. AKT kinazlar yapısal olarak plekstrin homoloji (PH), katalitik ve regülatör olmak üzere üç bölgeden meydana gelir (Şekil 2.4). AKT izoformları farklı genler tarafından kodlanmalarına rağmen kendi aralarında %80'den fazla dizi benzerliği gösterirler. Her üç izoformun da plekstrin homoloji (PH) bölgeleri büyük ölçüde aynı amino asitlerden oluşur. Katalitik ve regülatör bölgeleri arasında da glisince zengin bir bölge mevcuttur [37].

AKT'nin PH bölgesi, hücre membranı yapısında bulunan fosfatidilinositol (3,4,5)/PIP3 trifosfat ile interaksyona girer. Biyokimyasal analizler PH bölgesinin membran lipidlerinden olan fosfatidilinositol (4,5)/PIP2 ve PIP3'e aynı affinite ile bağlanabildiğini göstermiştir [38], [39].

AKT'nin katalitik bölgesi, AGC kinaz ailesine [cAMP-bağımlı protein kinaz (PKA)/protein kinaz G/protein kinaz C (PKC)] benzerdir. AGC kinaz ailesinin fonksiyonel regülasyonu Ca^{+2} , fosfoinositidler ve siklik mononükleotidler gibi sekonder mesajcılarla düzenlenir. Ayrıca bu ailedeki proteinlerin C-ter bölgesinde hidrofobik motifler ile karakterizedir [36]. Benzer şekilde üç AKT izoformu da C-ter bölgesinde yaklaşık 40 amino asitlik F-x-xF/Y-S/T-Y/F hidrofobik amino asitlerden oluşan bir bölgeye sahiptir [40]. AKT'nin bu bölgesinde yer alan F-P-Q-F-S-Y motifi Serin (S473) amino asidinden fosforillendiğinde aktive olur. Bu motifte meydana gelen nokta mutasyonları AKT'nin aktivitesini tamamen bozar ve enzimi inhibe eder [41]. AKT aktivasyonunda S473 amino asidinin yanı sıra T308 fosforilasyonu da önemlidir. Bu iki amino asidin beraber fosforilasyonu AKT'nin tam aktivasyonu için şarttır [42]. AKT aktive olduktan sonra RxRxxS/T motifini taşıyan hedef molekülleri Serin veya Treonin amino asitlerinden fosforilleyerek aktive eder [31] (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. AKT'nin protein yapısı ve hedef substrat motifi.

2.2.2. AKT Aktivasyonu

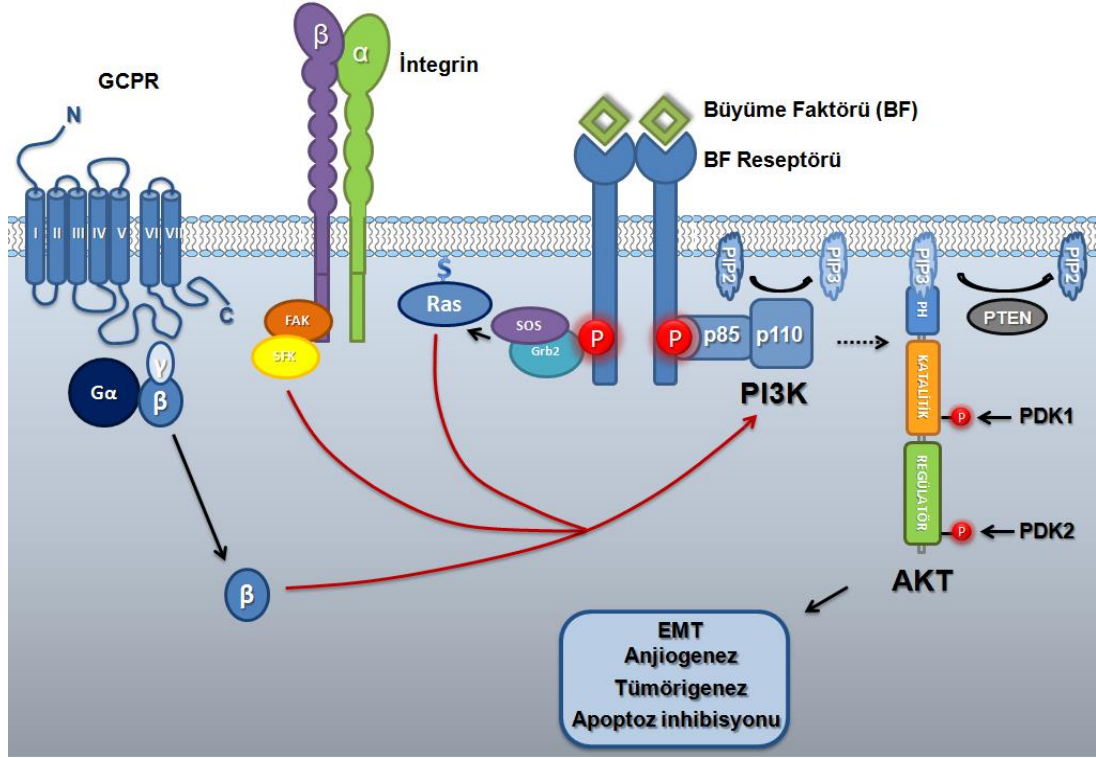
AKT fosforilasyona uğradığında bir “master regülatör” olarak çalışır ve birçok proteini modifiye ederek normal ve tümör hücrelerinde birçok yolağın başlamasını sağlar. Genel olarak Reseptör Tirozin Kinaz (RTK) aktivasyonuna yol açan büyüme faktörleri, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), insülin, insülin-benzer büyüme faktörü-1 (IGF-1) vs., AKT aktivasyonunu sağlar. Aktive olan AKT hücrede hedefleri olan NFkB, mTOR, Forkhead, Bad, GSK-3 β ve MDM-2 gibi efektör molekülleri fosforile ederek hücre proliferasyonunu artırır [43].

AKT aktivasyonunu sağlayan önemli faktörlerden biri EGF'dir. Bu faktör, Epidermal Büyüme Faktör Reseptörüne (EGFR) bağlanarak homodimer veya heterodimer oluşturmasını sağlayarak aktivasyonunu sağlar. EGFR, ErbB ailesi

içerisinde değerlendirilen ve HER1-2-3-4 olmak üzere dört çeşit izoformu bulunan bir reseptör ailesidir. Reseptörün heterodimerizasyonunda bu izoformlar arasında en çok tercih edilen ve kanserde (meme ve over kanserinde %25-30 oranında) yüksek ekspresyon göstermesi ile karakterize olan HER2 izoformudur. Ligand bağlanması neticesinde reseptör dimerize olarak tirozin otofosforilasyonu gerçekleşir ve bu sayede reseptör aktive olur [43], [44]. Bundan sonra reseptörün fosfotirozin bölgesine Grb2 proteini SH2 bölgesi aracılığıyla bağlanır. Bu bağlanma reseptördeki hedef pY-[ϕ Q]-[NQFDK] (ϕ -hidrofobik) amino asit dizi motifine özgü olarak gerçekleşir [45]. Ayrıca, Grb2, SH3 bölgesi aracılığıyla da guanin nükleotid değiştirici faktör (GEF) olan SOS proteinine bağlanır. SOS proteini C-terminal bölgesinde SH3 bağlanmasını sağlayan prolince zengin amino asit dizilimine (P ψ ψ PPR) sahiptir. Bu şekilde fosforile reseptöre bağlı Grb2-SOS kompleksi meydana gelir ve burada SOS aktive olur [46]. Aktive olan SOS, genellikle H-Ras ve K-Ras RAS olmak üzere RAS ailesi proteinlere bağlı GDP'yi uzaklaştırıp GTP bağlanmasını sağlar. Bu sayede RAS proteinleri aktive olur ve RAF kinazı fosforile ederek RAS-RAF-MEK-ERK yolakını aktive eder [47].

PI3K intraselüler lipid kinaz ailesindendir ve I, II ve III olmak üzere üç ana sınıfta değerlendirilir. Sınıf I PI3K'lar Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK), İntegrinler ve G Protein Coupled Reseptörler (GPCR)'le bağlanarak eksternal sinyali hücre içine aktarılmasını sağlar. PI3K iki alt üniteden meydana gelir. Bunlar, katalitik alt ünite (p110) ve adaptör/regülatör alt ünitesi (p85)'dir. PI3K p110 katalitik alt ünitesinin α , β ve γ olmak üzere üç izoformu mevcuttur. p85 alt ünitesi ise üç farklı genden (p85 α , p85 β ve p85 γ) kodlanan 7 farklı izoformu vardır ve pYxxM bağlanma motifine sahiptir. Sınıf I PI3Klar kendi içinde Sınıf1A ve 1B olmak üzere ikiye ayrılır. Sınıf 1A PI3K RTK'lar, sınıf 1B ise GPCR'ler tarafından aktive edilir. Reseptör ligand bağlanması ile otofosforilasyonla aktive olduğunda YxxM motifinden fosforile olan PI3K regülatör ünite için bağlanma noktası oluşturulmuş olur. Reseptöre bağlanan regülatör üniteye katalitik ünite bağlanır ve böylece membranın iç yüzeyine çekilmiş olur. Membranda bulunan PI3K, reseptörün bu fosfotirozin bölgesine yapısındaki SH2 bölgesi sayesinde bağlanarak aktive olur. Fosfatidil inositol (4,5) bisfosfat (PIP2)'a 3. karbondan fosfat takarak fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfat (PIP3)'ı oluşturur [48]. Meydana gelen fosforilasyon ile oluşan PIP3, sinyali ileten bir sekonder mesajcı olarak görev yapar. PIP3, yapısında plekstrin homoloji (PH) bölgesi taşıyan moleküller için membranda bir bağlanma noktası oluşturur. Bu şekilde hücre membranına bağlanan moleküller fosforillenmek suretiyle aktive edilirler [36], [42], [49]. Bu bilgiler ışığında baktığımızda, PI3K'ın önemli hedeflerinden biri de AKT'dir. AKT yapısında bulunan PH bölgesi sayesinde PIP3'e bağlanarak membranın iç yüzeyine transloke olur. Hücre membranına bağlı bulunan AKT bu bölgedeki PDK1 tarafından T308 bölgesinden fosforile edilir. Bu fosforilasyon AKT'nin aktivasyon loop bölgesinin stabilizasyonunu sağlayarak enzimin aktif konformasyonda kalmasını sağlar. Bu fosforilasyon AKT'nin aktivasyonu için yeterli olsa da C-terminalde bulunan S473 fosforilasyonu enzimin tam aktivasyonu için önemlidir. Bu fosforilasyon PDK2/mTORC2 tarafından gerçekleştirilmektedir [48]. Aktive olan AKT EMT'yi, angiogenezi ve tümörigenezi indükleyen, apoptozu ise inhibe eden yolakların kontrolünde görev alır [48].

PI3K-AKT yolağının negatif regülasyonu bir tümör baskılayıcı gen olan PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) tarafından sağlanmaktadır [50]. PTEN lipid/protein fosfatazdır ve PIP3'ü defosforile ederek PIP2'ye dönüştürmesi sonucunda AKT yolağını bloke eder. PTEN'den yoksun olan hücrelerin yüksek PIP3 oranı ve konstitütif aktif PI3K-AKT yolağı ile karakterize olduğu yapılan araştırmalarca doğrulanmıştır [51] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. AKT yolağı.

Anlaşıldığı üzere hücrede EGF gibi büyüme faktörleri ile aktive edilen PI3K-AKT yolağının sinyal kontrolü endojen olarak PTEN aracılığıyla gerçekleşmektedir. Ancak günümüzde bu yolağın kontrol edilebilmesi için çeşitli kimyasal ajanlar kullanılmaktadır. Bunlardan Wortmannin (100nM) veya LY294002 (20uM) gibi PI3K inhibitörleri PIP3 oluşumunu engelleyerek AKT'nin membrana translokasyonunu ve fosforilasyonunu bloke eder. Wortmannin bütün PI3K tiplerine özgü olması nedeniyle çok düşük miktardaki dozu bile PI3K-bağımlı tüm yolakların inhibisyonu için yeterlidir. Son zamanlarda yolağa spesifik olacak şekilde AKT'ye özgü olarak üretilmiş inhibitörler de kullanılmaktadır. Bu moleküller AKT'nin ATP bağlanma bölgesine spesifik olduğundan diğer AGC kinazların da inhibisyonunu sağlayabilmektedir. AKT'ye özgü inhibitörlerin kullanılması yeni AKT substratlarının belirlenmesi ve yolağın hücrel spektrumunun daha iyi anlaşılması açısından önemli olmaktadır [31].

2.2.3. AKT'nin Substrat Özgüllüğü

AKT substratlarının belirlenmesi, ekzojen AKT'nin aktive edilmesi ve daha sonrasında AKT-hedef moleküllerinin fosforilasyon düzeyleri tesbiti ile yapılmaktadır. Ancak bunun gibi tek yönlü çalışmalar AKT substratlarının tanımlanması için yeterli olamamaktadır. Dolayısıyla hücrede kinaz-substrat birlikteliğinin spatiyal ve temporal regülasyonları ortaya konmalıdır. Bunun için PI3K aktivitesinden bağımsız olarak miristik asit ile konjuge olan AKT formları oluşturulmuştur. Bu formlar PH bölgesine ihtiyaç bile duymadan (mir-ΔPH-AKT) hücre membranının iç yüzeyine bağlanabilmektedir. Bunlar konstitüif AKT aktivasyonunun ve hücresel etkilerinin belirlenmesinde çok yaygın olarak kullanılmıştır [31], [41], [52]. Alternatif olarak AKT'nin devamlı aktif olan fosfo-mimetik mutantı kullanılmaktadır. Bu mutant form AKT-T308D/S473D mutantıdır. Aspartik asit (D) ve glutamik asit (E) amino asitleri yapılarında birden fazla karboksil grubu (OH) taşıyan negatif yüklü amino asitlerdir ve protein yapısında fosforile olmuş amino asitleri taklit ederler. Site directed mutagenesis (SDM) yöntemi ile D ve E amino asitlerin fosforile olacak olan S veya T amino asiti ile değiştirilmesi AKT'nin PI3K'den bağımsız konstitüif aktivasyonuna sebep olur. Aksi yönde ise AKT'nin dominant negatif formu (AKT-T308A/S473A) da fosforile edilemez özelliktedir. Çünkü alanin (A) amino asidi nötr bir amino asittir ve fosfat grubu takılamamaktadır. Bu mutasyonların SDM ile oluşturulması sayesinde hedef molekülde meydana gelebilecek fosforilasyonların AKT tarafından gerçekleştirilip gerçekleştirilmediği anlaşılabilir. AKT'nin konstitüif aktif ve dominant negatif mutant formlarının etkilerinin belirlenmesi hedef substrat özgüllüğünün tanımlanmasında oldukça önemli olmaktadır [31]. Biyokimyasal analizler, AKT aktivasyonu sonucunda fosforile olan substratların yapısında gerekli olan minimal tanıma dizisini "RxxS/T-B" olarak tanımlamıştır (Şekil 2.4). Bu motifte "B" hidrofobik amino asitleri ifade ederken, "x" ise herhangi bir amino asidi belirtmektedir. Fosforile edilen amino asitten -3 ve -5 pozisyonundaki amino asitlerin arjinin (R) olması kritik derecede önemlidir. Ancak nadir olarak AKT'nin hedef substratını RxxS/T motiflerinden de fosforilleyebildiğini gösteren araştırmalar mevcuttur [31].

2.2.4. AKT ve EMT

AKT başlangıçta bir onkogen olarak tanımlanmıştır ve hücre AKT1-3 olmak üzere üç izoformu izole edilmiştir. AKT2 over, meme ve pankreatik tümörlerde sıklıkla aşırı eksprese edildiği ve aktif formda olduğu belirlenmiştir [30], [53]. AKT'nin rol aldığı PI3K/AKT yolu proliferasyon ve EMT sürecinin merkezinde yer alır [53], [54].

Normal ve kanser hücrelerinde EMT olayını tetikleyen birçok etken vardır. Bunlara baktığımızda E-kaderin molekülünün azalması veya kaybı kilit noktayı oluşturmaktadır. Bu konudaki bilimsel yayınlar E-kaderinin transkripsiyonel baskılanmasının Snail, Slug, TWIST ve ZEB1 gibi transkripsiyon faktörlerince gerçekleştirildiğini belirlemiştir. Ancak bu transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu için hücresel yolakların aktivasyonu gereklidir. Fibroblast büyüme faktör 2 (FGF2), hepatosit büyüme faktörü (HGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri PI3K/AKT yolunu aktive eder. Araştırmalar E-kaderin azalması veya

sekestrasyonunda AKT aktivitesinin önemli ölçüde etkisi olduğunu ortaya koymaktadır. AKT yukarıda belirtilen transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon artışı ve aktivasyonunu sağlayarak E-kaderin ekspresyonunun baskılanmasına neden olur. Bu sayede hücre, epitelyal karakterini kaybederek mezenkimal bir özellik kazanır [7], [9], [43], [55], [56], [57].

AKT aktivasyonunda proteinler, ligantlar, reseptörler ve efektör moleküller gibi çeşitli faktörler etken olarak rol alır. Bu bağlamda, birçok hücrel sinyal yolları AKT molekülünde keşismektedir. Örneğin, büyüme faktörü Cripto-1 (Cr-1), hyaluronan (HA) ve Ras AKT'yi aktive ederek EMT'ye yol açar [30]. Cr-1, GPI-bağlı membran proteinidir ve meme, kolon, mide, pankreas, over ve testis olmak üzere birçok kanser tipinde yüksek ekspresyon gösterir. Yapılan bilimsel çalışmalar Cr-1'in AKT'yi aktive ettiğini ve EMT sürecine katkı sağladığını *in vitro* ve *in vivo* olarak belirlemiştir. Fare meme epitel hücrelerde aktif AKT artışına paralel olarak Snail ve Vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin artışı söz konusuysa, E-kaderin gibi epitelyal belirteçler azalmaktadır [58]. EMT sinyal trafiğinde AKT ile etkileşen bir diğer molekül de HA'dır. HA, epitelyal olmayan bağ ve kıkırdak doku gibi mezenkimal hücrelerin ekstraselüler matriksinde yer alan bir glikozaminoglikandır. Epitel hücrelerinde HA sentezi arttığında bu hücreler mezenkimal özellik kazanmaktadır. HA, hücre yüzey reseptörleri olan CD44 izoformlarıyla bağlanarak birçok efektör molekülü (örn: sitoskeletal proteinler-ankyrin; GTPazlar-RhoA, Rac1 ve Cdc42) ve çeşitli yolları (örn: Ca^{+2} , Rho, PI3K/AKT, NHE1) aktive etmektedir. CD44, normal ve tümör kök hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen ve belirteç molekül olarak kabul edilen bir reseptördür. Bu bağlamda, EMT aynı zamanda HA ve CD44 artışıyla beraber PI3K/AKT yolağı üzerinden indüklenebilen bir olaydır. Hücre membranı yüzeyinde HA-CD44 interaksyonu sonucunda p115RhoGEF yapıya sıkıca bağlanır ve RhoA ve ROK aktivasyonunu gerçekleştirir. Aktive olan ROK linker/bağlayıcı molekül olan Gab1'i fosforile eder ve membrana lokalizasyonunu sağlar. Bu arada Gab1 PI3K'in CD44 ile bağlanmasını sağlayarak aktivasyonuna aracılık eder. PI3K aktivitesiyle membranda PIP3 oluşumu gerçekleşerek AKT yolağının aktivasyonu gerçekleşir [59]. Bu şekilde, AKT üzerinden EMT'yi indükleyen bir diğer molekül de Ras proteinidir. Bu protein, Ras GTP-bağlayan protein süperailisine ait bir proteindir. Ras proteinleri membrana bağlanabilen proteinlerdendir ve intraselüler sinyal yollarının adaptör molekülleridir. Ras'ın beyinde ve miyoblastlarda yaygın olarak eksprese edildiği bilinmektedir. Bu protein plasma membranına bağlı olduğundan pseudopod gibi periferik membran oluşumlarında yapısal olarak yer alır. Bunun yanı sıra, fibroblast hücrelerinde Ras'ın G22V veya Q71L mutantlarının yüksek ekspresyonu, AKT aktivasyonu üzerinden EMT yoluyla hücrel transformasyona neden olduğu yapılan araştırmalarca tespit edilmiştir [30], [60], [61].

AKT ilişkili EMT olayını tetikleyen temel sinyalizasyon yollarından biri de Wnt/ β -katenin yolağıdır ve önemli bir komponenti Glikojen Sentaz Kinaz-3 β (GSK-3 β) enzimidir. Bu enzim Wnt yolağında non-fosforile formda iken aktiftir ve β -katenin ve Snail'in degradasyonundan sorumludur. EMT'de AKT aktive olduğunda, GSK-3 β enzimini fosforile ederek inhibisyonuna neden olur. Bunun sonucunda transkripsiyon faktörleri β -katenin ve Snail degradasyondan kurtularak hücre

çekirdeğine göç ederler ve EMT olayını tetikleyen gen regülasyonlarını gerçekleştirirler [54].

EMT ile ilişkili bir diğer olay da hücrede siklik Adenozin Mono Fosfat (cAMP) düzeyinin artışıdır. Buna bağlı olarak, AKT membrana lokalize olur ve aktive edilir. Aktif AKT, p21-aktive serin/treonin kinaz 1(PAK1)'i Treonin 579 ve Serin 21 amino asidinden fosforile eder. Bu fosforilasyonla aktive olan PAK1 hücre migrasyonunu tetiklemektedir [62], [63], [64]. T579 fosforilasyonunun inhibe edildiği durumlarda ise hücrelerde miyozin 2 bütünlüğünün bozularak ve hücrel polarite kaybına bağlı olarak migrasyon oranı azalmaktadır [63].

2.2.5. Hücre İskeleti Proteinlerinin AKT Tarafından Düzenlenmesi

EMT sürecine giren hücreler mezenkimal özellik kazanarak invazyon kabiliyetleri artar. Bu açıdan hücrelerin hangi mekanizmalarla harekete geçtiklerini anlamak önemlidir. Hücre hareketliliği sinyal yollarının aktivasyonu neticesinde hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ile meydana gelen bir olaydır. Günümüze kadar yapılan çalışmalar hücre göçünde hücre içi filamentlerin nasıl yeniden düzenlediğini ortaya koymaktadır. Hücre göçü dört temel basamakta ele alınmıştır. Birincisi, başlama basamağı ve polarizasyon; ikincisi, hücre membranında hareketi sağlayacak çıkıntılarının oluşması; üçüncüsü, hücrenin hareket yönünde kontraksiyonu ve dördüncüsü de hücre adhezyonunun yeniden oluşturulması şeklindedir [31]. Hücrenin migrasyon potansiyeli üç temel elementin sinerjistik etkisi ile oluşmaktadır. Bunlar filamentöz aktin, mikrotübüller ve intermediate filament olan Vimentindir [65].

Hücre göçü aktin polimerizasyonu ile sağlanan çok dinamik bir prosestir. Göç eden hücrelerin filopodia, pseudopodia ve invadopodia gibi yapılarına bakıldığında aktince zengin oldukları anlaşılmıştır. Hücre göçünün gerçekleşebilmesi için bu yapıların yapımı kadar yıkımdan korunması ve stabilitesinin sağlanması da oldukça önemlidir. Göç eden hücrelerde AKT Fosforilasyon Enhancer (APE/girdin) proteini aktinlere bağlanarak filament yapılarını hücrel yıkımdan korunmalarını ve stabilizasyonlarını sağlar. APE bir aktin-bağlanma proteinidir ve AKT tarafından Serin1416 amino asidinden fosforile edilir. Fosforile olan APE aktin filamentleri boyunca aktine bağlanarak yapının stabilizasyonunu sağlar. APE depleasyonu olan hücrelerde aktin demetlerinin kaybıyla yönelimli hücre göçü engellenir [66]. EGF muamelesiyle AKT aktivasyonu sağlandığında APE-Ser1416 fosforilasyonu artar ve hücre migrasyonu tetiklenir. Ser-1416-Ala mutasyonu varlığında ise APE fosforile edilemediğinden hücrelerin AKT bağlı göç kabiliyetinin azaldığı saptanmıştır. Ayrıca, metastatik potansiyeli yüksek olan insan karsinomlarında bu proteinin yüksek seviyede eksprese edildiği klinik araştırmalar neticesinde gösterilmiştir [66], [67], [68]. Hücre göçü aktin polimerizasyonu, konvergensi ve çapraz bağlanmalarıyla oluşan filopodia formasyonu sonucunda meydana gelmektedir. Kanser hücrelerindeki filopodia oluşumu incelendiğinde AKT-bağlı aktivasyonla meydana geldiği açığa çıkarılmıştır. İlgili hücrelere API-2 AKT allosterik inhibitörü verildiğinde filopodia formasyonunun bloke edildiği gözlenmiştir [69]. Aynı durum

AKT aktivitesi ile bağlantılı olan, integrin-benzer kinaz-indüklü hücrel aktin yeni düzenlenmesi ve hücre hareketinde de görülmektedir [70].

Aktin ilişkili olan bir diğer protein de filamindir. Filamin, aktin-ilişkili kros-bağlayıcı proteindir ve AKT tarafından Serin 2152 amino asidinden fosforile edilmektedir. Bu protein, IGF yolağında kaveolin-1 yönlendirmeli hücre migrasyonunda rol almaktadır [71], [72]. Buna ilave olarak, insülin ve PDGF tarafından indüklenen Sodyum-Hidrojen değiştirici izoform 1 (NHE1) de stres fiberlerin oluşumunda görev alır. NHE1 de AKT tarafından Serin 648 amino asidinden fosforillenerek aktive edilir [73]. Bu fosforilasyon neticesinde NHE1, bir aktin regülatörü olan kontraktin proteinine bağlanarak, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde rol almaktadır [74].

Hücre hareketinde önemli bir diğer hücre iskeleti komponenti de intermediate veya ara filamenlerdir. Bu yapılardan tip 3 filamentöz protein olan Vimentin, hücre integritesinde en yoğun olarak yer alan bir ara proteindir. Vimentin özellikle kanser gibi fizyolojik ve patolojik durumlarda hücrelerin invazyonu ve migrasyonunu tetikler. AKT1, Vimentini Serin 39 amino asidinden fosforile ederek degradasyondan korunmasına sebep olur [75]. Yumuşak doku orijinli sarkomalarda aktif AKT, Vimentini fosforile etmek suretiyle proteozomik yıkımdan koruyarak metastazı indükler. Bu durum, Vimentinin fosforile edilemeyen ve fosforilasyonu mimik eden AKT hedef bölge mutasyonları varlığında yapılan araştırmalarca tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra Vimentinin yüksek ekspresyonu da birçok metastatik kanser tipinde karşımıza çıkmaktadır. Vimentinin özellikle akciğer metastazlarında yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu nedenle kanser tedavisi açısından hedef molekül olarak da düşünülmüştür [76], [77].

Hücrel hareket, hücre içi filament ilişkili proteinlerin kooperatif interaksiyonları ile sağlanır. Bunlardan önemli olan bir grubu da mikrotübüller oluşturur. Hücrel mikrotübül dinamiği AKT tarafından düzenlenebilen bir süreçtir. Bu düzenleme AKT/GSK3 β aksisi üzerinden gerçekleşmektedir. Bu yolak aktive olduğunda bir mikrotübül bağlanma proteini olan adenomatoz poliposis koli (APC) aktive olur. Neticede APC aktivasyonu ile mikrotübül bağlanması ve stabilitesi sağlanarak hücrel hareketi tetiklenmiş olur [78].

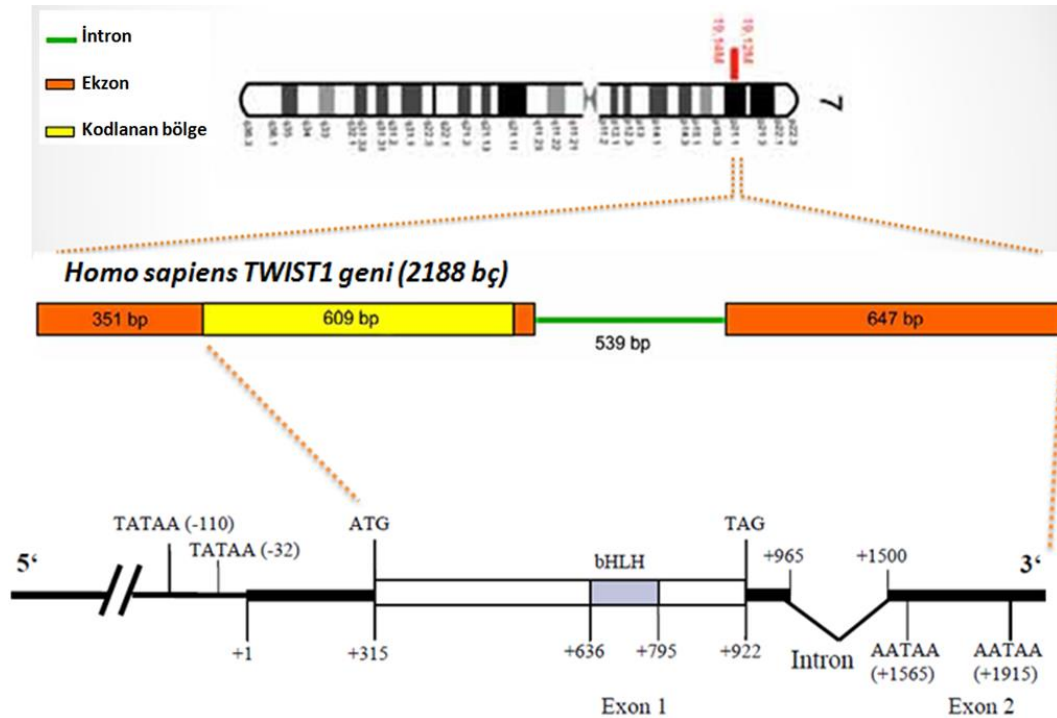
Bu bilgiler doğrultusunda AKT'nin direkt olarak hücre hareketini sağladığını söyleyebiliriz. Ancak, metastatik tümör progresyonunun gelişimi açısından baktığımızda, AKT-indüklü metastaz mekanizmaları tam olarak açığa kavuşmuş değildir. AKT substratlarının hücrel hareketi nasıl regüle ettiği ve hangilerinin kilit öneme sahip olduğu halen tam olarak ortaya konmamıştır. Bu bağlamda günümüzde metastaz ile ilişkili hedef molekül ve buna özgül ilaç tedavisi araştırmaları devam etmektedir [65].

2.3. TWIST1 Transkripsiyon Faktörü

TWIST1, bazik-helix-loop-helix (bHLH) yapısal özelliği gösteren bir transkripsiyon faktörüdür. İlk olarak, *Drosophila*'da mezoderm spesifik genlerin transkripsiyonu için gerekli bir faktör olarak klonlanmıştır [79]. Yapılan çalışmalar TWIST1 transkripsiyon faktörünün hücre göçünü ve dolayısıyla tümör metastazını indükleyen kilit molekül olduğunu ortaya çıkarmıştır [25]. Bu transkripsiyon faktörünün fonksiyonunun net olarak anlaşılabilmesi için gen ve protein yapısının analiz edilmesi yararlı olacaktır.

2.3.1. TWIST1 Gen Yapısı

TWIST geni ilk olarak *Drosophila*'da embriyogeneze dorsoventral paternin gelişiminde gerekli zigotik bir gen olarak tanımlanmıştır. Letal mutant *Drosophila*'larda gözlenen bükülmüş "TWISTed" yapıdaki morfolojiden esinlenerek bu faktöre TWIST ya da TWIST1 adı verilmiştir [80] [81]. Günümüzde insanda bu faktöre ek olarak fare dermisinde TWIST2 olarak tanımlanan 2q37.3 gen bölgesinden kodlanan ve benzer yapıya sahip bir faktör daha belirlenmiştir [82]. İnsan *TWIST1* geni 7p21'de lokalize ve iki ekzondan oluşur. Genin 5' uç bölgesinde -32 ve -110 nükleotidlerinde iki adet TATA kutusu yer alır. Başlangıç ATG kodu (+315) devamında tek parça halinde 609 bç uzunluğundaki 1. ekzon olan açık okuma çerçevesi 202 amino asit kodlar ve TAG (+922) dur koduna kadar devam eder. İntronik bölge ise 536 bç (+965 - +1500) uzunluğundadır (GenBank Accession No. NM_000474) [83]. Ayrıca 1. ekzonun dur kodundan sonraki 45 bç'lik bölge ve 2. ekzon transkripsiyona uğramaz. Genin 3' ucunda ise +1565 ve +1915 pozisyonlarında yani 2. ekzonun 5' ucundaki 65. ve 145. bç pozisyonlarında iki adet poliadenilasyon bölgesi bulunur [84] [85](Şekil 2.6-7).



Şekil 2.6. İnsan *TWIST1* geninin şematik gösterimi.

Homoloji çalışmaları, insan ve fare *TWIST1* genleri arasında %96 oranında dizi benzerliğinin olduğunu göstermiştir. Bu benzerlik sadece kodlama bölgesinde değil promotor dizilerinde de mevcuttur. Özellikle kodlama bölgesinin 5' ucundan 300 bçlik kısmı kapsayan promotor bölgesinde %71 oranında dizi benzerliği vardır. İnsan *TWIST1* promotor bölgesinde birçok regülatör proteinin bağlanması için uygun diziler mevcuttur. Bu bölgenin -824 nükleotidlik bölgesi incelendiğinde NF -kB, SP1, Rb, AP2, ATF/CREB [85] ve STAT3 bağlanma bölgeleri saptanmıştır [86].

```

CATTGGA CTGGGTTTCCTTCCACCGAAGAGTGA ACTTCTGCCTCTTTTCGAGCACCTTCCGAGGCC
-800
TAGTCCTTTGGATGTTGGGGAGCGTCAGACTGGGTCGTTGTAGAGGGGAAAGGAGGGCCCCAGAAG
-700
GGCGAGAGAGCAGGCCGGGACGCAAATCCTCAGCCCCCGCGGCGGCCACGTCTTCAGAAACGCC
AGGACCTCCGGGCTGGGCCGCCGCGGTTTGGCCTTTGGAACTCAAGGGTTTCGTCTACCTGACCAI
-600
TGGGTGGCTCCGCGGTTGACACTTTTCTTGGCATGCCCCCCCCACCCCGCGCCACACCACCCCCC
-500
AGCCCCAGCAATCCAAATCGGCCCCACGGACCTAGAGGGCTCTTGGGCGAGATGAGACATCACCC
ACTGTGTAGAAGCTGTTGCCATTGCTGCTGTACAGCCACTCCGGATGGGGCTGCCACCGTGGCC
-400
AGGACAGTCTCCTCCGACCGCTTCTTGGGCTGCGCTAGGGTTCGGGGGCGCTGCCCGCACGCTCC
GGCGGGGAAGGAAATCGCCCCGCGCCCGCGGAGGAAGGCGACGGGGAGGGAAGGGGGAGGGCGG
-300
CTAGGAGGCGGGTGGAGGGGCGGCGCCCGGGGCCAGGTCGTTTGAATGGTTTGGGAGGACGA
-200
ATTGTTAGACCCCCGAGGAAGGGAGGTGGGACGGGGGAGGGGGACTGGAAACGGAAACTTTCTTA
TAAAACTTCGAAAAGTCCCTCCTCCTCACGTCAGGCCAATGACACTGCTGCCCCAACTTTCCG
-100
CCTGCACGGAGGTATAAGAGCCTCCAAGTCTGCAGCTCTCGCCCCAACTCCAGACACCTCGCGGG
+1
CTCTGCAGCACCGGCACCGTTTCCAGGAGGCCTGGCGGGGTGTGCGTCCAGCCGTTGGGCGCTTI
CTTTTTGGGACCTCGGGGCCATCCACACCGTCCCCCTCCCCCTCCCGCCTCCCTCCCCGCCTCCCC
+100
CGCGCGCCCTCCCCCGGAGGTCCCTCCCGTCCGTCTCTGCTCTCTCTCCGCGGGCCGCATC
+200
GCCCGGGCCGGCGCCGCGCGGGGGAAGCTGGCGGGCTGAGGCGCCCCGCTCTTCTCCTCTGCC
M M Q D V S S S P V
CCGGGCCCCGAGGCCACGCGTCGCGCTCGAGAGATGATGCAGGACGTGTCCAGCTCGCCAGTC
+300
S P A D D S L S N S E E E P D R Q Q P P S G
TCGCCGGCCGACGACAGCCTGAGCAACAGCGAGGAAGAGCCAGACCGGCAGCAGCCGCCGAGCGG
+400
K R G G R K R R T S R R T A G G G A G P G
CAAGCGCGGGGACGCAAGCGGCGCACGAGCAGGCGCACGGCGGGCGGCGCGGGGGCCCGGCG

```

Şekil 2.7. İnsan *TWIST1* DNA dizisi.

[illegible]

2.3.2. TWIST1 Protein Yapısı

TWIST1 geni, bazik heliks-loop-heliks (bHLH) yapısında, 202 aminoasitten oluşan ve 21 kDa ağırlığında bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır [83] [84]. TWIST1 transkripsiyon faktörünün dahil olduğu bHLH transkripsiyon faktörleri üç alt-ailede incelenmektedir. Bunlar; sınıf A, sınıf B ve sınıf C'dir. Sınıf A proteinleri memeli hücrelerinde yaygın olarak eksprese edilen E12, E47, HEB, E2-2 ve Daughterless'dir. Sınıf B proteinleri, E-kutusu DNA dizilerine bağlanabilmek için sınıf A proteinleri ile dimer oluşturan ve dokuya özgü ekspresyon gösteren transkripsiyon faktörleridir. Sınıf C proteinleri ise sınıf A veya B ile heterodimer oluşturmeyen proteinlerdir. Buna göre, TWIST1 transkripsiyon faktörü, E2A olarak da tanımlanan E12 ve E47 ile heterodimer oluşturan ve dokuya özgü ekspresyon gösteren sınıf B transkripsiyon faktörü sınıfına dahildir [84] [87].

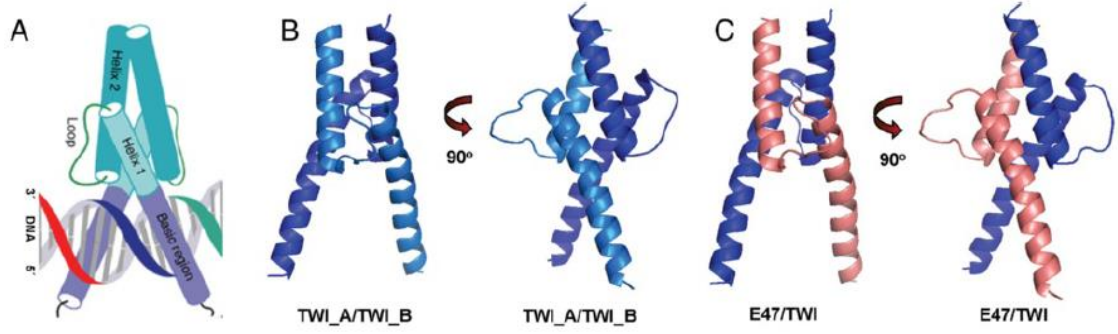
TWIST1 protein dizisi üç ana bölgeden oluşur. Bunlar, N-terminal bölge (aa 1–108), bHLH bölge (aa 109–163) ve C-terminal bölge (TWIST-box ve WR motif aa–202)'dir. TWIST1 proteininin N-terminalindeki amino asitler çoğunlukla polar olup lizin ve arjinin amino asitlerince zengindir [88]. C-terminalindeki amino asitler ise genellikle non-polardır. Dolayısıyla proteinin N-terminalindeki yapısı C-terminaline göre daha fazla hidrofilitiktir [84]. TWIST1'in N-terminalinde şimdilik fonksiyonu bilinmeyen NSEEE motifi (aa 19-23) oldukça korunmuştur. Bunun yanı sıra N-terminalde iki adet nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) bulunur. Bu bölgeler; NLS1, RKRR (aa 37–40) ve NLS2 KRGKK (aa 73-77) bölgeleridir [88]. Ayrıca N-terminal bölgede HAT ve p300/CREB bağlanma proteini (CBP) (aa 30-64) fonksiyonel motifi yer alır [89]. p300/CREB histon asetilasyonunu, TWIST1'in hücre çekirdeğine göçünü ve transkripsiyonel aktivitesini sağlamaktadır [87],[90]. Bunun yanı sıra Glisin amino asiti bakımından zengin bir bölge (aa 80-98) de mevcuttur. Bu bölgenin devamında dimerizasyon için gerekli olan bHLH yapısı (aa 108-161) yer alır. E12 ve E47 gibi dimerizasyon partnerlerinin bağlandığı bHLH bölgesinin yanında kaspaz-3 için tanıma dizisi olan DELD motifi (aa 170-173) bulunmaktadır. Bu dizi TWIST1 inaktivasyonunun düzenlenmesini sağlar. C-terminale yakın bölgede ise WR motifi/TWIST kutusu yüksek oranda korunmuştur ki bu bölge Runx2 bağlanma dizisi (aa 183-202) olarak tanımlanmıştır [88] [87] (Şekil 2.8).

		NSEEE- motif	NLS1	
	**			
<i>Fugu rubripes</i>	-----MRDEDCSPMDSAG-----NSEEETERQLP-----RRGRKRPRPRSSGGE : 41			
<i>Danio rerio</i>	MFEFEAMHEDSSSPSEVD-SLGNSEEEELDRQF-----RRVSRKKRASKNAE-- : 48			
<i>Xenopus laevis</i>	-----MMQEESSSPVSEVD-SLGNSEEEELDKQF-----SKRGGRKRSSARKSPE-- : 43			
<i>Gallus gallus</i>	----MMQDESNSPVSPADDSLSNSEEEEPDRQQLPSARRGGRKRSSRRSAG-- : 48			
<i>Rattus norvegicus</i>	-----MMQDVSSSPVSPADDSLSNSEEEEPDRQQPASGRGRGRKRSSRRSAGGS : 49			
<i>Mus musculus</i>	-----MMQDVSSSPVSPADDSLSNSEEEEPDRQQPASGRGRGRKRSSRRSAGGS : 49			
<i>Homo sapiens</i>	-----MMQDVSSSPVSPADDSLSNSEEEEPDRQQPPSGRGRGRKRSSRRSAGGG : 49			
		NLS2		
	**			
<i>Fugu rubripes</i>	EEEG-----DTESSPSPGTKKCRKSSSEGGGG-----SAGSGGSEGGSS : 77			
<i>Danio rerio</i>	-----DSISPTPG-KESKK-----CSNSSS : 67			
<i>Xenopus laevis</i>	-----DTESSPISV-KRKK-----ASSTGS : 62			
<i>Gallus gallus</i>	-----GAVGADEPCSPAQG-KRGKK---CGAG---AGGGGGGGSSGGG : 86			
<i>Rattus norvegicus</i>	AGPGGATGGGIGGGDEFGSPAQG-KRGKKSSAGGGGG---AGGGGGGGSSGGG : 99			
<i>Mus musculus</i>	AGPGGATGGGIGGGDEFGSPAQG-KRGKKSSAGGGGGGGAGGGGGGGSSGGG : 102			
<i>Homo sapiens</i>	AGPGGAAGGGVGGGDEFGSPAQG-KRGKKSSAGCGGG---GGAGGGGGSSGGG : 98			
		basic	helix - loop - helix	
	**			
<i>Fugu rubripes</i>	SPELSFDDLQTORVLANVRERQRTQSLNEAFSLRKIIPTLP SDKLSKIQT LKL :131			
<i>Danio rerio</i>	SP-SLELQTORVLANVRERQRTQSLNEAFSLRKIIPTLP SDKLSKIQT LKL :120			
<i>Xenopus laevis</i>	SP-SFEELQSORVLANVRERQRTQSLNEAFSLRKIIPTLP SDKLSKIQT LKL :115			
<i>Gallus gallus</i>	SP-SYEELQTORVLANVRERQRTQSLNEAFALRKIIPTLP SDKLSKIQT LKL :139			
<i>Rattus norvegicus</i>	SP-SYEELQTORVLANVRERQRTQSLNEAFALRKIIPTLP SDKLSKIQT LKL :152			
<i>Mus musculus</i>	SP-SYEELQTORVLANVRERQRTQSLNEAFALRKIIPTLP SDKLSKIQT LKL :155			
<i>Homo sapiens</i>	SP-SYEELQTORVLANVRERQRTQSLNEAFALRKIIPTLP SDKLSKIQT LKL :151			
		WR-motif		
<i>Fugu rubripes</i>	ARRYIDFLQVLSDELDERGTSCSYVAHERLSYAFSVWRMGAWSLSTTSH :183			
<i>Danio rerio</i>	ARRYIDFLQVLSDELD SKMSSCSYVAHERLSYAFSVWRMGAWSS-TSH :171			
<i>Xenopus laevis</i>	ARRYIDFLQVLSDELD SKMASCSYVAHERLSYAFSVWRMGAWSS-ASH :166			
<i>Gallus gallus</i>	ARRYIDFLQVLSDELD SKMASCSYVAHERLSYAFSVWRMGAWSS-ASH :190			
<i>Rattus norvegicus</i>	ARRYIDFLQVLSDELD SKMASCSYVAHERLSYAFSVWRMGAWSS-ASH :203			
<i>Mus musculus</i>	ARRYIDFLQVLSDELD SKMASCSYVAHERLSYAFSVWRMGAWSS-ASH :206			
<i>Homo sapiens</i>	ARRYIDFLQVLSDELD SKMASCSYVAHERLSYAFSVWRMGAWSS-ASH :202			

Şekil 2.8. Omurgalı canlılar arasında TWIST1 protein dizisinin karşılaştırılması.

2.3.3. TWIST1 Dimerizasyonu

TWIST1 dimerize olarak fonksiyon gösterir ve bunun için bazik amino asitlerce zengin olan amfipatik 1. α -heliks bölgesi önemlidir [91]. Bu bölge ile TWIST1 hem homodimer hem de heterodimer oluşturabilir [92] (Şekil 2.9). Heterodimer yapıların homodimerlere göre daha fazla fonksiyon gösterdiği anlaşılmıştır, çünkü heterodimerler homodimerlere göre daha karardır. Bunun nedeni heterodimerizasyonun TWIST1'i ubiquitin-bağlı degradasyondan korumasıdır. [89].

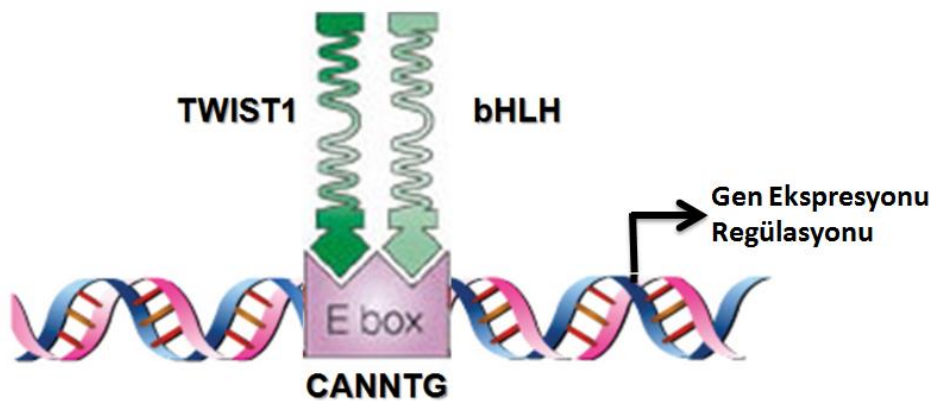


Şekil 2.9. TWIST1 transkripsiyon faktörünün homodimer ve heterodimer yapısı.

TWIST1, homodimer veya heterodimerleri farklı genlerin indüksiyonunu sağlar. Bu şekilde farklı hücresel yollar indüklenebilir. Örneğin, E2A (E12 ve E47) ile oluşturduğu heterodimerler Trombospondin ekspresyonunu indüklerken, TWIST1 homodimerleri ise FGFR2 ve Periostin ekspresyonlarını indüklemektedir. Bu özgülük bHLH bölgesinin fonksiyonudur [89]. Buna kanıt olarak, TWIST1 bHLH bölgesini kodlayan gen bölgesinde meydana gelen yanlış anlamlı (missense) mutasyonlarının protein dimerizasyonunu ve DNA bağlanmasını engellemesi verilebilir [93].

2.3.4. TWIST1 Fonksiyonu

Transkripsiyonel regülasyonda TWIST1, genlerin promotor bölgesinde yer alan ve E-kutusu olarak bilinen “CANNTG” tanıma dizilerinden DNA’ya non-kovalent bağlanarak işlev görür [88] [89] (Şekil 2.10). TWIST1 bağlandığı promotorlarda transkripsiyonu aktive veya inhibe eder. TWIST1 morfogenezde [94], miyogenez hücre farklılaşmasında [95], nörogenezde [96], kardiyogenezde [97], hematopoiezde [94], osteogenezde [98], inflamasyonda [99] ve tümör oluşumunda [94] rol alan pek çok genin ekspresyonunu kontrol eder. Örneğin AKT2, STAT3 ve c-SRC gibi proto-onkogenlerin ekspresyonunu indüklerken [86], [100], [101], p53, p14 ARF ve E1A gibi tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu inhibe etmektedir [102], [103] [104].



Şekil 2.10. TWIST1 transkripsiyon faktörünün gen regülasyonunu düzenlemesi.

2.3.5. TWIST1'in Embriyonal Gelişimdeki Rolü

TWIST1 ilk olarak *Drosophila*, *Xenopus* ve fare türlerinde karakterize edilmiştir. Bu çalışmalarla plasenta ve mezodermal kökenli doku ve hücre tiplerinde fazla miktarda eksprese edildiği tespit edilmiştir. [85]. Bütün embriyonik gelişim aşamalarında nükleer lokalizasyon gösterir. Blastoderm aşamasında iki kutupta ve endoderm-mezoderm farklılaşması olan orta-ventral bölgede eksprese edilirken, ilerleyen embriyonik aşamalarda ise sadece mezoderm tabakasında yüksek ekspresyon gösterir. TWIST1 homozigot mutant embriyolara bakıldığında gastrülasyon aşamasındaki ventral yarık oluşumunda bozulma, mezoderm ve internal organların kaybı meydana gelmektedir [105].

Embriyogenez çalışmaları TWIST1'in önemi açısından aydınlatıcı olmaktadır. *Drosophila* embriyolarında mezoderm formasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda TWIST1'in Snail ekspresyonunu arttırdığı ve mezoderm farklılaşmasına sebep olduğu belirlenmiştir. Nöral krest gelişiminde ise Snail ve Slug ekspresyonları ile TWIST1 ekspresyonunun gözlendiği nöral plate sınırında kolokelize oldukları saptanmıştır [106]. Ayrıca TWIST1-Hand2 heterodimerizasyonu ekstremit gelişimi açısından önemli genlerin ekspresyonunu düzenler [107]. İskeletal gelişim sırasında TWIST1 "TWIST kutusu" bölgesi (aa 183-202) aracılığıyla Runx2'ye bağlanarak fonksiyonu inhibe edilir. Bu inhibisyon anti-osteojenik etki sağlar. Dolayısıyla erken farklılaşmayı engelleyerek iskeletal malformasyonların gelişmesini önler [108].

Embriyonik evrelerde TWIST ekspresyon seviyesinin oldukça yüksek olmasına karşın yetişkin dokularda ekspresyonunun baskılandığı gösterilmiştir. Yapılan doku incelemeleriyle sadece belirli mezenkimal kökenli dokularda ekspresyonunun devam ettiği ortaya çıkarılmıştır. Bu dokulardaki TWIST mutasyonları, erken hücre farklılaşmasına bağlı olarak çeşitli malformasyonlara neden olmuştur. Bu durum ilk olarak Howard H.D., ve arkadaşlarının 1997'deki araştırmasıyla ortaya konmuştur. Saptanan TWIST mutasyonları kranyofasiyal ve ekstremit anomalileri ile karakterize Saethre-Chotzen Sendromu olarak tanımlanan otozomal dominant karakterli kranyosinostosis sendromuna neden olmaktadır [83].

2.3.6. TWIST1 ve Kanser Metastazı

Metastaz, tümör hücrelerin invazyon kabiliyeti kazanarak dolaşım sistemi aracılığıyla farklı doku ve organlara yayılmasıdır. Kanserin tedavisini zorlaştıran en önemli olay metastazdır ve buna bağlı ölümlerin %90'ı metastaz nedeniyle meydana gelmektedir [43]. Tümör invazyonu ve metastaz ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda kilit noktanın E-Kaderin kaybı olduğu gösterilmiştir. Örneğin, meme kanserinin progresyonu ile ilişkili olarak invazif duktal karsinoma örneklerinin %97'sinde E-Kaderin kaybı meydana geldiği saptanmıştır [109].

Epitelyal kökenli dokularda TWIST ekspresyonu baskılanmış vaziyettedir. Fakat metastatik karsinoma doku örneklerine bakıldığında EMT sürecinde olan hücrelerde, normalde susturulmuş olan TWIST'in tekrar eksprese edildiği gösterilmiştir. Metastatik olmayan ve metastatik meme karsinoma hücre hatları arasındaki TWIST ekspresyonları kıyaslandığında metastatik fenotipin artışına

paralel şekilde TWIST ekspresyonunda da artış meydana geldiği gösterilmiştir. Ayrıca, bu durum *in vivo* olarak da BALB/c farelerde doğrulanmıştır. Ekzojen olarak TWIST ekspresyonunun sağlandığı normal epitelyal kökenli böbrek hücrelerinde (MDCK) EMT sürecinin başladığı, hücrelerin E-Kaderin baskılanmasıyla beraber mezenkimal markerlarının arttığı ve hücrelerin invazyon kabiliyetini kazandığı belirlenmiştir [25].

TWIST1'in yüksek ekspresyonu kanser gelişimi ve düşük sağkalım oranları ile koreledir. TWIST1'in bu yöndeki etkisinin temel mekanizması hücre proliferasyonunu ve EMT'yi indüklemesidir [110]. TWIST1 meme, prostat, akciğer, uterus, karaciğer, özofagus, osteosarkoma, gastrik karsinoma, melanoma, rabdomiyosarkoma gibi birçok kanser türünde yüksek ekspresyon göstermektedir. Bu bakımdan günümüzde TWIST1 bir onkogen olarak kabul edilmektedir [110].

2.3.7. Metastatik Karsinomlarda Epigenetik TWIST1 Modifikasyonları

Epigenetik çalışmalar, kanserin erken evrelerinde *TWIST1* promotorunun metilasyon artışını belirlemiştir [111]. Araştırmalar TWIST1 hipermetilasyon durumunun gen ekspresyon artışıyla korele olduğunu ileri sürmektedir. Meme, Serviks, Over, Mesane, Kolon, Rektum, Gastrik, Akciğer, Kemik ve Beyin kanserlerinde yapılan incelemelerde *TWIST1*'in promotor hipermetilasyonu gözlenmektedir [112]. İnvazif meme karsinomu örnekleri incelendiğinde *TWIST1* promotor hipermetilasyon oranları %16-77 arasında değişmektedir [113]. Meme kanserinin lokal ve uzak metastaz (kemik, beyin ve akciğer) örnekleri *TWIST1* geni ile ilişkili olarak kıyaslandığında hipermetilasyon oranının arttığı tespit edilmiştir [114]. Ancak, invazif meme kanseri olgularıyla yapılan çalışmalarda *TWIST1*'in CpG hipermetilasyonu ile mRNA ve protein seviyesi karşılaştırıldığında bir ilişkinin olmadığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra *TWIST1* promotor bölgesinin proksimal kısmının gen ekspresyonunu etkilemediği ortaya konmuştur. Dolayısıyla *TWIST1* geninin epigenetik paterni ile protein ekspresyon seviyeleri paralellik göstermemektedir [113].

2.3.8. Kanserde TWIST1 Geninin Transkripsiyonel Aktivasyonu

Kanser metastazını sağlayan önemli moleküllerden biri de EGF'dir. Kronik EGF muamelesi hücrelerde E-kaderin baskılanmasına ve hücre-hücre bağlantılarının zayıflamasına neden olmaktadır. EGF muamelesi ile beraber bu baskılanma TWIST1 aktivasyonu ile özdeşleşmiştir. Ayrıca, EGFR ekspresyon artışı ile beraber TWIST1 ekspresyonunun da arttığı EGFR-null hücrelerde gösterilmiştir. EGFR ve JAK/STAT3 inhibitörleri varlığında ve STAT3 dominant-negatif formunun eksprese edildiği hücrelerde TWIST1'in transkripsiyonel ekspresyonu baskılanmaktadır. Kromatin immünopresipitasyon çalışmaları EGF indüksiyonu neticesinde JAK/STAT yolağının aktivasyonu ile STAT3 transkripsiyon faktörünün TWIST1 promotoruna bağlandığını göstermiştir. STAT3, *TWIST1* promotor bölgesinde 26 nükleotidlik bir bölgeye bağlanır ve TWIST1 ekspresyonunu indükler [101].

TWIST1 gen ekspresyonunu arttıran faktörlerden biri de distal-less homeobox gene 4 (DLX4)'dir. Yetişkin dokularda eksprese edilmemektedir ancak

lösemi, akciğer, meme, over ve prostat kanserlerinde ekspresyonu artmaktadır. Moleküler hedefleri ve mekanizması tam olarak açıklanmamış olsa da tümör metastazını indüklediği tespit edilmiştir. Araştırmalar DLX4'ün tümör metastazını EMT sürecinde TWIST1 üzerinden tetiklediğini göstermektedir. DLX4 yüksek ekspresyonu TWIST1 ekspresyonunu da artırır. DLX4 ekspresyonu baskılandığında TWIST1 ekspresyonu da azalır. DLX4, *TWIST1* geninin regülatör bölgesine bağlanarak TWIST1'in transkripsiyonel indüksiyonunu sağlar [115].

Epigenetik regülasyonda önemli fonksiyonları olan enzimlerden biri Histon Deasetilaz (HDAC)' lardır. Bu enzimler epigenetik modifikasyonlarla kanser hücrelerinin büyümesi, farklılaşması ve apoptozu üzerinde önemli rolleri olan bir aile içerisinde ele alınır. Bu aileden HDAC5 enzimi ilk olarak osteosarkomada tespit edilmiştir. HDAC5 osteosarkoma hücrelerinde proliferasyonun artışına sebep olmaktadır. HDAC5'in bu süreçte TWIST1 mRNA'sının artışına neden olduğu ve bu sayede tümörigenezi tetiklediği ileri sürülmektedir [116].

2.3.9. EMT ilişkili Kanser Kök Hücre Oluşumunda TWIST1'in Rolü

Tümör yapısında mevcut olan kanser kök hücreleri (CSC) tümör gelişimini, tekrarını ve metastazını devam ettiren, yüksek membran transporter ve telomeraz aktivitesine sahip hücrelerdir ve tedavide başarısızlığa neden olurlar [117], [118], [119]. Meme kanseri hücrelerinin alt popülasyonu olan ve CSC karakteristiği gösteren hücrelerin yüksek CD44 ve düşük CD24 (CD44⁺/CD24⁻) ekspresyonu gösterdikleri belirlenmiştir. Bu hücreler aynı zamanda yüksek TWIST1 ekspresyonu gösterir. TWIST1 CD24 promotorundaki E-kutusu dizilerine bağlanarak bu genin ekspresyonunu baskılar, CD44 ve aldehit dehidrogenaz (ALDH) genlerinin ekspresyonunu ise indüklemektedir. Bu durumda CD44⁺/CD24⁻ olan meme kanseri hücreleri oluşumunda TWIST1 önemli rol oynamaktadır [118]. EMT-ilişkili olarak baktığımızda yüksek TWIST1 ekspresyonu gösteren hücrelerde CD44 artışı ile beraber nükleer β -katenin birikimi söz konusudur. E-kaderin baskılanması sonucunda β -katenin serbest kalarak hücre çekirdeğine göç eder TCF/LEF transkripsiyon faktörü ile bağlanarak transkripsiyonel regülasyonda rol oynar. TWIST1 eksprese eden hücrelerde β -kateninin GSK3 β tarafından fosforilasyonu azalmaktadır ve bu sayede proteozomal degradasyondan korunmaktadır. GSK3 β baskılanmasının yanı sıra TWIST1 eksprese eden hücrelerde AKT aktivasyonunun da yüksek olduğu ve Snail düzeyinin arttığı belirlenmiştir. CD44 ekspresyonunda β -katenin ve AKT etkisini belirlemek için bu yollar inhibe edilmiştir. Sonuçta bu hücrelerde CD44 ekspresyonu azalmıştır. İkisi beraber inhibe edildiğinde ise CD44 baskılanması daha da artmaktadır. Bu sonuçlar, EMT-ilişkili CSC özelliklerinin kazanılmasında TWIST1 ve neticede β -katenin yüksek ekspresyonunun ve AKT aktivasyonunun önemli rol oynadığını göstermektedir [120].

2.3.10. TWIST1'in Apoptoz ile İlişkisi

p53 hücre döngüsünün ve apoptozun kontrolünde önemli rol oynamaktadır [104], [121]. DNA hasarı meydana geldiğinde p53 fosforile edilerek aktifleşir ve hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak DNA onarımının gerçekleşmesi için zaman kazandırır. Hücrenin bu fazda durdurulması p53'ün p21'i transaktive etmesi ve Rb fosforilasyonunun engellenmesi sonucunda gerçekleşir. DNA hasarı çok büyük ve tamir edilemeyecek düzeyde ise p53 apoptoz sürecinin başlatılmasını sağlar. p53-indüklü apoptoz olayı temel olarak Bax ekspresyonunun artmasıyla ve mitokondri membranındaki Bcl-2/Bax oranının değişmesiyle sitokrom c salınımı neticesinde başlar. Bir transkripsiyon faktörü olan Mdm2 (murine double minute 2) p53 proteinine bağlanarak inhibisyonuna veya gen ekspresyonunu azaltılmasına neden olur. DNA hasarı olduğunda p53 fosforile edilerek Mdm2'den ayrılır ve serbest kalarak aktivasyon kazanır [122]. Aktif p53, hedef genlerin promotor dizilerindeki 10 bp'nden oluşan konsensus DNA tanıma dizisine "5'-PüPüPüC(A/T)(A/T)GPiPiPi-3'" bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu gerçekleştirir [123]. p53, hücre döngüsü aresti, DNA tamiri, senesens veya apoptozda önemli olan CDKN1A, PCNA, GADD45, BAX, NOXA, MDM2 ve miR-34a genlerinin transkripsiyonunu artırır [124]. Neticede p53-bağımlı apoptoz, mitokondriden sitokrom c salınımı ile Apaf1-kaspaz 9 yoluyla üzerinden gerçekleşerek hücre ölümünü sağlar [123].

Bunun yanı sıra p53 kaybının hücrede invazyon kabiliyetinin kazanılmasında da önemli olduğu belirlenmiştir. Araştırmalar p53 kaybının hücrede polarite ve morfoloji değişimlerine ve EMT sürecine girerek invazif özellik kazanmasına sebep olabildiğini göstermiştir. [124]. Gastrik kanser hücrelerinde TWIST1 ekspresyon değişikliğine bağlı olarak p53 ekspresyonu değişmektedir. TWIST1'in yüksek ekspresyonu durumunda p53 ekspresyonunda 3 kat azalma ve TWIST1'in tamamen baskılandığı durumda ise p53 ekspresyon seviyesinde %100 oranda artış saptanmıştır. Bu araştırmayla gastrik kanserinde TWIST1'in p53'ün ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir [125]. TWIST1, p53 regülatörü olan ARF tümör baskılayıcı proteinin ekspresyonunu da baskılar. Bu sayede ARF/MDM2/p53 yolunu bloke eder ve p53-indüklü apoptozu baskılar [104].

2.3.11. Kemoterapötik Hedef Olarak TWIST1'in Önemi

Günümüzde araştırmalar kanser gelişimi ve metastazdaki rolü açısından TWIST1 ve sinyalleşmesinin üzerine yoğunlaşmaktadır. Terapötik hedef olarak ele alınan TWIST1 için çeşitli hedefe yönelik stratejiler geliştirilmektedir. Bunlar RNA teknolojileriyle TWIST1 inaktivasyonu, TWIST1-özü kemoterapötik ilaçların geliştirilmesi, antioksidan tedavi, TWIST1 aktivatör antagonistlerin uygulanması, TWIST1-nükleozom bağlanmasının bloklanması, TWIST1'in ubiquitinasyonla degradasyonu, *Twist1* geninin epigenetik modifikasyonlarla ekspresyonunun baskılanması şeklinde özetlenebilir [112].

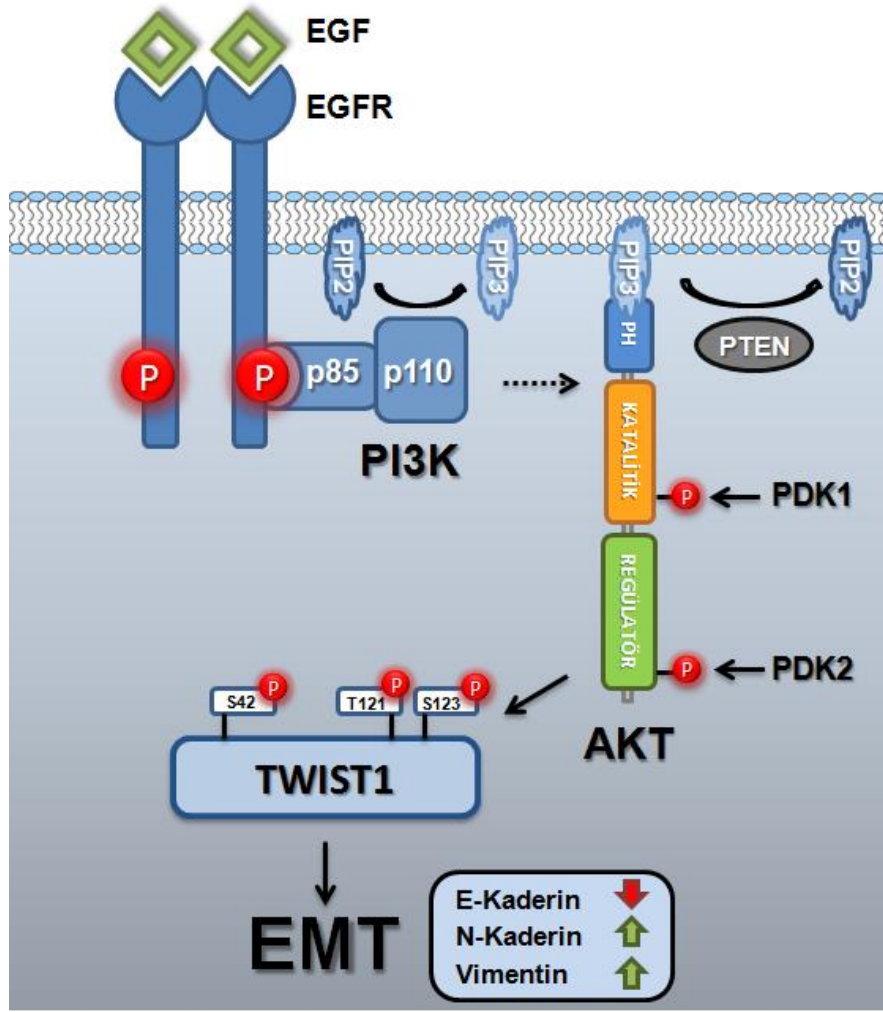
Terapötik hedef olarak TWIST1'in RNA interferans (RNAi) aracılığı ile baskılanması, tümör metastazı tedavisi açısından umut verici sonuçlar göstermiştir. Bu baskılanma neticesinde A549 akciğer kanseri hücre hattında hücresel senesensin

tetiklendiği ve aynı zamanda cisplatin tedavisine de duyarlılık geliştiği saptanmıştır. Cisplatin (DDP) DNA'ya hasar veren bir ajandır ve yıllardır küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak birçok hastada cisplatine karşı direnç gelişebilmektedir. Kemosenitiviteyi arttırmak adına çeşitli yeni tedavi seçenekleri halen denenmektedir. Yapılan araştırmalar TWIST1'in antikanser ajanlara karşı direnci arttırdığını göstermiştir. A549 hücrelerinde TWIST1 ekspresyonu RNAi ile baskılandığında JNK/mitokondriyal yolak aktive olmaktadır. Bunun neticesinde, A549 hücrelerinin cisplatine duyarlılığı artmaktadır. Bu durumda TWIST1 deplesyonu cisplatin dirençli kanserlerde umut verici bir yaklaşım olarak düşünülmektedir [126]. Buna ilave olarak benzer şekilde, metastatik meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinde TWIST1'in RNAi-aracılı baskılanması kemoterapötik ajan olan Adriamycinin hücreler üzerindeki etkisini arttırmaktadır [127].

RNAi stratejisi ile TWIST1 baskılanmasının yanı sıra, çeşitli kemoterapötik ajanlar da TWIST1'in ekspresyonunu baskılayabilmektedir. Daha önce de bahsedildiği gibi potansiyel kemoterapötik olan Paclitaxel uygulaması laringeal karsinoma Hep-2 hücre hattında apoptozu indüklemektedir. Paclitaxel bu indüksiyonu, TWIST1 ekspresyonunu baskılayarak yapmaktadır. Bunun aksine yüksek TWIST1 ekspresyonu varlığında ise hücrelerin paclitaxele karşı direnç geliştirdiği ve tedaviye yanıt vermediği belirlenmiştir [128]. Dolayısıyla tedavi açısından TWIST1 ekspresyonunun baskılanması veya aktivasyonunun engellenmesi gerekmektedir.

2.4. Hipotez

EGF muamelesi ile AKT aktivasyonu neticesinde, TWIST1 yapısındaki S42, T121 ve S123 amino asitlerinin AKT-aracılı fosforilasyonu ile aktive olacağını ve aktive olan TWIST1'in hücre çekirdeğine göç ederek, E-Kaderin ekspresyonunu baskılaması ve N-Kaderin ile Vimentin ekspresyonlarını indüklemesi sonucunda EMT sürecini başlatacağını öngörmekteyiz (Şekil 2.11). Bu nedenle AKT-aracılı TWIST1'in aktivasyonunu sağlayan hedef amino asitlerin belirlenmesi çalışmamızın hipotezini oluşturmaktadır. Ayrıca, TWIST1 aktivasyonunu veya ekspresyonunu baskılayabilecek hedef terapötik moleküllerin araştırılması projemizin ikinci aşamasını oluşturmaktadır. Bunun için antikanser etkileri olduğu belirlenmiş *Dracunculus vulgaris* (Yılan yastığı) [129] ve *Achillea millefolium* (Civan perçemi) [130] bitkilerinden organik molekül ekstraksiyonu ile olası TWIST1 inhibitör moleküllerin araştırılmasını amaçladık.



Şekil 2.11. TWIST1'in AKT-aracılı aktivasyonu ve etkileri.

MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda SV-40 transforme insan embriyonik böbrek hücreleri (293T) ve MDA-MB 231 (metastatik insan meme kanseri) hücrelerinin kullandık. Hücrelerin tamamı L-glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum prüvat, %10 Fetal Bovin serum (FBS-Biochrom cat. no: S0115) ve Penisilin /Streptomisin Amfoterisin (BI- 03 033 113) eklenmiş DMEM (Dulbecco's modified eagle medium-Biochrom FG0415) içinde monolayer kültürler olarak % 5 CO₂'lik atmosfer ve 37°C'lik inkübatörde (Shellab) çoğaltıldı.

3.2. Hücrelerden TRIZOL ile RNA İzolasyonu

1. Hücre kültürü kabından medium uzaklaştırıldı.
2. Hücreler üzerine 100mm'lik petriye (Corning-430167) 6ml olacak şekilde direkt olarak TRIZOL (Sigma-T9424) eklendi.
3. Oda sıcaklığında 5dk inkübasyondan sonra süspansiyon 1'er ml.lik hacimlerde 1,5 ml'lik ependorf tüplere (Axygen MCT-150-C) bölündü.
4. Üzerine 100 µl 1-Bromo-3-chloropropane (BCP- Sigma B9673) eklendi ve vorteksle karıştırıldı.
5. Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyondan sonra 12.000 g'de 15dk 4°C'de santrifüj (Eppendorf-minispin) edildi.
6. Oluşan iki fazdan üstteki renksiz kısım yeni bir ependrofa aktarıldı.
7. Üzerine 500 µl izopropanol (Merck 995.1000) eklendi ve altüst edilerek karıştırıldı.
8. Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyondan sonra 12.000 g'de 4 °C'de 8 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant atılarak RNA pelleti üzerine 1mL %75'lik etanol (Merck 100967) ilave edilerek yıkandı.
10. 7500 g'de, 4 °C'de, 5 dk santrifüj edildi.
11. Süpernatant atılarak RNA pelleti 3-5 dk kurumaya bırakıldı.
12. Pelletin yoğunluğuna göre RNaz içermeyen H₂O eklendi.

3.3. RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü

İzole edilen RNA örneklerinin saflık ve miktarları spektrofotometre (Thermo Multiskan GO) ile ölçüldü ve aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı. cDNA sentezi için 1 µg RNA kullanıldı.

$$\text{RNA } (\mu\text{g/mL}) = 40 \times A_{260} \times \text{DF (Dilüsyon Faktörü)}$$

3.4. İzole Edilen RNA'nin cDNA'ya Dönüştürülmesi Reaksiyonu

Bu reaksiyon için Roche Kiti (05 081 955 001) kullanıldı. Spektrofotometre ölçümü miktarı belirlenen RNA'dan 1 µg, Random hekzamerden 2 µl ve steril H₂O'dan 8,4 µl alınarak 0,2'lik ependorf tüpüne kondu ve 65°C'de 10 dk denatüre edildi. Bu karışımın üzerine 4 µl 5x reaksiyon tamponu, 0,5 µl RNAz inhibitörü, 2 µl dNTP karışımı, 1 µl DTT (Dithiothreitol D0632) ve Revers Transkriptaz enzimi ilave edilerek final hacmi 20 µl olan bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon 55 °C'de 30 dk ve 85 °C'de 5 dk olacak şekilde thermal cycler cihazında gerçekleştirildi.

3.5. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi

PCR reaksiyonu Bio-Rad (MyCycler) ve PCR System 9700 (Gene Amp ®) marka thermal cyclerlarda gerçekleştirildi.

3.5.1. PCR Reaksiyonu, İçeriği ve Koşulları

İnsan TWIST1 klonlama primerleri ile yaptığımız PCR koşulları şöyledir; 1x Tampon, 2mM MgCl₂, 1pmol dNTP, 1'er pmol ileri ve geri primerler, %5 DMSO (Sigma cat. No: D5879), 2 ünite Taq Polimeraz ve 100 ng cDNA'dır (Kit: Thermo scientific-Fermentas-EP0401). Thermal Cycler cihazında 94°C'de 5 dk ön denatürasyon, 35 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 amplifikasyon gerçekleştirildi. Reaksiyon agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi.

3.5.2. İnsan TWIST1 cDNA'sının Amplifiye Edilmesi İçin Kullanılan Klonlama Primerleri

İleri primer: 5'- CGC GGA TCC GCC ACC ATG ATG CAG GAC GTG
TCC AGC TCG CCA GTC TCG CCG G -3'

Geri primer: 5'-CGC GGA TCC GTG GGA CGC GGA CAT GGA CCA
GGC CCC C -3'

BamHI kesim bölgesi altı çizgili olarak gösterilmiştir.

3.6. Amplifiye Edilen İnsan TWIST1 cDNA'sının ve pcDNA 3.1 (A) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Klonlama işlemi için, insert ve vektör BamHI enzimi ile kesildi ve fenolle temizlendi. Vektörün 5'-terminali defosforile edildikten sonra insert ile ligasyon işlemine tabi tutuldu. Ligasyon sonrasında vektördeki insert yönü ApaI enzim kesimi ile belirlendi.

3.6.1. İnsan cDNA'sının ve pcDNA3.1(A) Vektörünün BamHI Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

BamHI enzim kesimi için Fermentas (ER0051) kiti kullanıldı. Reaksiyon koşulları: 1x Reaksiyon Tamponu, 10 ünite BamHI enzimi, 1 µg pcDNA3/ TWIST1 cDNA ve steril H₂O'dur. Reaksiyon 50 µl'de gerçekleştirildi ve gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.6.2. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme Sistemi

3.6.2.1. % 1,5 Agaroz Jelin Hazırlanması

1,5 gram agaroz (Sigma-A5093) tartılarak 100 ml 1XTBE'de (Tris-Sigma T1503/Borat-Merck 1.00165.1000/EDTA-Sigma E5134) çözüldü. 50-55°C'ye gelene kadar soğutuldu. 0.5 µg/ml etidyum bromür (Sigma E8751) ilave edildi. Elektroforez küvetine taraklar yerleştirilerek sıvı agaroz jel elektroforez küvetine döküldü. Oda sıcaklığında 15-20 dk polimerize olması için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra taraklar jelden alındı ve agaroz jel elektroforez tankına yerleştirildi (BioRad).

İşlemler

%1.5'lik agaroz jel, içerisinde 1XTBE bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünü ve 50bç'lik marker yükleme tamponu kullanılarak kuyucuklara mikropipet yardımıyla yüklendi. Elektroforez tankına bağlı güç kaynağı ile 100 voltta 45 dk yürütüldü. Süre sonunda örnekler UV ışık veren transilluminatör yardımıyla incelendi. Syngene (İngenius) transilluminatör aletine bağlı olan monitörlü sistem kullanılarak fotoğraflar alındı.

3.6.3. pcDNA3.1(A) Vektörünün ve TWIST1 cDNA'sının Fenolle Çöktürme Yöntemiyle Temizlenmesi

1. Enzim kesimi yapılmış örnek (50 µl) üzerine 250 µl 1xTE (Tris-EDTA) eklendi.
2. Üzerine 300 µl Fenol (AppliChem A1624.0500)/Kloroform (Merck 1.02445.2500) /İzoamil alkol (Merck 977.1000) (25:24:1) eklendi.
3. 30 sn vorteksle (Biosan V1 plus) karıştırıldıktan sonra 15 dk buzda bekletildi.
4. 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
5. Ayrı bir tüpe üst fazın 250 µl'si alınarak 25 µl 3M Sodyum Asetat (pH:5.4) (Sigma S2889) ile karıştırıldı.
6. Bu karışım üzerine 2 volum (550 µl) soğuk absolut etanol eklenerek 1 saat -20°C'de bekletildi.
7. Süre sonunda 14.000 rpm'de, 4°C'de, 30 dk santrifüj edildi.
8. Etanol uzaklaştırılarak kuruması sağlanır ve steril H₂O'da çözüldü.

3.6.4. pcDNA3.1(A) Vektörünün Dana Intestin Alkalen Fosfatase ile Muamelesi

Enzim kesimi yapılmış vektörün klonlamada kullanılabilmesi için 5'-terminal kısımlarındaki fosfat gruplarının defosforile olması gerekmektedir. Klonlama işlemi için hazırlanan vektörün CIAP reaksiyonu Invitrogen kiti (18009-027) kullanılarak gerçekleştirildi. Kit koşulları şöyledir: 1x Buffer, 0,01 ünite CIAP enzimi, 1 µg vektör ve steril H₂O. Reaksiyon 40 µl'de hazırlanmış ve 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda vektör tekrar fenolle temizleme işlemine tabi tutuldu ve %1 agaroz jelde kontrol edildi.

3.6.5. İnsan TWIST1 cDNA'sının pcDNA3.1(A) Vektörüne T4 DNA Ligaz Enzim Reaksiyonuyla Klonlanması

BamHI ile kesilmiş ve fenolle çöktürme yöntemi ile temizlenmiş olan vektör ve insertün T4 DNA ligaz (İnvitrogen 15224-017) yardımıyla klonlandı. Reaksiyon koşulları şöyledir: 1xReaksiyon Tamponu, 3 volum (750 µg) insert (TWIST1), 1 volum (250 µg) vektör (pcDNA3.1), 1 ünite T4 DNA Ligaz ve steril H₂O. Reaksiyon karışımı 4-16°C'de geceboyu inkübasyona bırakıldı. Klonlamanın gerçekleşip gerçekleşmediği %1 agaroz jelde kontrol edildi.

3.6.6. İnframe Klonlama İşleminin Oryantasyon Yönünün Belirlenmesi için ApaI Enzim Kesiminin Gerçekleştirilmesi

T4 DNA Ligaz reaksiyonu sonrasında insert içeren vektörler %1 agaroz jelde belirlendi. Insertün vektörde oryantasyon yönünün saptanması için ilgili vektörün ApaI enzimi (New England Biolabs RO1145) ile kesimi gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları şöyledir: 1x Reaksiyon Tamponu, 1x BSA (Bovine Serum Albumin- İrvine Scentific 1024), 1 ünite ApaI, 1µg vektör ve steril H₂O. Reaksiyon karışımı 30 °C'de geceboyu inkübasyona bırakıldı ve %2'lik agaroz jelde kontrol edilerek vektörün sense veya antisense oryantasyon yönü belirlendi.

3.7. Doğru Oryantasyon Klonlama Yönüne Sahip pcDNA3.1(A) Vektörün Çoğaltılması İçin E.coli DH5α Suşuna Transformasyonu

Transformasyon işleminin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle DH5α bakterilerinin plazmit vektörü alabilmeleri için kompetan hale getirildi ve ardından transformasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.7.1. CaCl₂ Yöntemiyle Kompetan DH5α Hazırlanması

Kullanılan Solüsyonlar

1. 200 ml LB broth (Merck 1.10285.0500)(2g/100mL) hazırlandı ve otoklav edildi.
2. 50 mM CaCl₂ (Sigma C1016)/10 mM Tris (pH:7.4)
3. %100 gliserol (Sigma G2025).

Uygulama

1. Bir koloni ya da dondurulmuş DH5α E.coli suşundan 20 µl alınır ve 10 ml LB sıvı besiyerine konuldu.
2. 37 °C çalkalamalı etüvde geceboyu inkübe edildi.
3. Inkübasyon sonucunda 1-2 ml alınarak 200 ml LB besiyerine kondu ve 4 saat inkübe edildi.
4. O.D₆₀₀=0,2-0,5 aralığında olmalıdır.
5. 200 ml besiyeri 10 dk buzda bekletildi.
6. 50 ml.'lik falkonlara bölündü ve 2000 rpm'de +4' te 5 dk santrifüj edildi.
7. Süpernatant atıldı. Önceden soğutulmuş 50 mM CaCl₂ /10 mM Tris (pH:7.4)'den 100 ml ilave edildi.

8. 15 dk buzda bekletildi. 2000 rpm'de 4°C'de te 5 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant atıldı. Pelet üzerine 9 ml 50 mM CaCl₂/10 mM Tris (pH:7.4) ve 1 ml %100 gliserol karışımından konarak homojenizasyon sağlandı.
10. 250 µL miktarlarında 1,5 ml'lik ependorf tüplere bölündü ve -80°C'de saklandı.

3.7.2. E. Coli DH5α suşuna Plazmid Transformasyonu

1. DH5α kompetan E.colilerden 75 µl ve plazmidten 5µl alınarak ependorfa kondu.
2. 30 dk. buzda bekletildi.
3. 1 dk. 42 C'de su banyosunda bekletilerek tekrar buza alındı.
4. Tüpe 1 ml LB besiyeri kondu ve 1 saat 37 C' de 150 rpm'de çalkalayıcıda (Sartorius) inkübasyon bırakıldı.
5. Petriye ekim yapılacaksa 4°C'de 5000 rpm'de 10 dk ya da 2500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatanın 900 µl'si atılır. Geri kalan 100µl ile pelet süspanse edildi.
6. "L" şeklindeki pastör pipeti ile 50µg/ml ampisilinli (Sigma A9393) LB agara yayarak ekildi.
7. Sıvı LB içerisinde kültürasyon yapılacak ise ampisilinli 200 ml LB' de gece boyu 37°C'de 150 rpm'de inkübasyon yapılır.
8. 2500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pelet -20°C'de saklandı.
9. Daha sonra peletten plazmit izolasyonu gerçekleştirilecektir.

3.7.3. Agar Hazırlanması

2 gr LB Broth ve 1 gr Bakteriyolojik agar (Oxoid L11) üzerine 100ml distile H₂O ilave edilerek otoklavlandı. Agar donmadan hemen önce (yaklaşık 40°C'de) 100ml agara 100µl ampisilin(50mg/ml) eklendi ve petri kaplarına dağıtılarak soğuması beklendi.

3.8. Bakteriden Plazmit İzolasyonu

Kullanılan Solüsyonlar

Solüsyon I

1. 50 mM D-Glukoz (Sigma 16301) (MA:180) hazırlanışı: 0,9 gr glukoz 100 ml distile H₂O'da çözüldü.
2. 10N NaOH (Sigma 06203) (MA:40) hazırlanışı:40 gr NaOH 80 ml distile suda çözüldükten sonra hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Solüsyon I Hazırlanışı:

1. 50 mM D-Glukoz : 0,9 gr D-Glukoz
 2. 25 mM TrisHCl(pH:8.0): 2,5 ml (1M tris stoktan)
 3. 10 mM EDTA : 10 ml (100mM EDTA stoktan)
- Karışım 100 ml'ye tamamlandı.

Solüsyon II (Kullanımdan hemen önce hazırlanır)

1. 0,2 N NaOH :2 ml (10 N NaOH stoktan)
2. %1 SDS :10 ml (%10' luk SDS stoktan)
(SDS-Merck 8.22050.1000)

Karışım 100 ml' ye tamamlandı.

Solüsyon III

1. 5M potasyum asetat (Codex 358907), 49,075g 100 ml' de çözülerek 60 ml'si kullanıldı.
2. 11,5 ml glacial asetik asit (Sigma 27222),
3. 28,5 ml steril H₂O.

Uygulama

1. 100 µg/ml Ampisilin içeren 100 ml besiyerinde geceboyu üretilen transforme bakteriler çoğaldıktan sonra 50 ml' lik falkonlara bölündü.
2. 5000 rpm' de 5 dk. santrifüj edildi.
3. Süpernatant atıldı ve pelet kaldırıldı. Pelet üzerine 5 ml Solüsyon I' den ilave edilerek vortekslendi ve 5 dk buzda bekletildi.
4. Üzerine 10 ml Solüsyon II'den ilave edildi. Tüp alt üst edilerek buzda 5 dk bekletildi.
5. Buzda bekletilen tüplere 7,5 ml Solüsyon III'den ilave edildi ve karıştırılarak 10 dk buzda bekletildi.
6. Tüpler, 5000-8000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
7. Üst faz yeni tüpe alınır, final konsantrasyonu 0,5µg/ml olacak şekilde RNAz ilave edildi. 37 °C' de 30 dk su banyosunda inkübasyona bırakıldı.
8. Süre sonunda eşit hacimde üzerine fenol/kloroform/izoamilalkol(25:24:1) ilave edildi ve 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant yeni tüplere aktarıldı. Üzerine 2 hacim saf etanol eklendi. - 80°C'de 1 saat ya da geceboyu bekletildi.
10. Tüpler 8000 rpm' de 1 saat santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı, pelet kurutuldu ve 1 ml TE' de çözüldü.

3.9. Hücrelere Kalsiyum Fosfat Yöntemiyle Plazmid Transfeksiyonu**Kullanılan Solüsyonlar**

1. 2XHEPES – pH: 7,05

500 ml hazırlamak için;

280mM NaCl (Merck 1.06404.1000)	8g (susuz)
10mM KCl (Sigma H3375)	0,37g
1,5 mM Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O (Merck 1.06345.1000)	0,3g
12 mM D-Glukoz (Sigma 16301)	1g
50 mM Hepes (Sigma H3375)	5g

2. 2M Ca₂Cl (Sigma C1016): 5,88 gr 20 ml distile suda çözülür. Deney aşamasında 0,25 M oranında kullanılır.
3. 0,1X TE pH:8.0
4. %10 gliserol içeren DMEM.

Uygulama

293T hücreleri transfeksiyondan bir gün önce 100 mm'lik petrilere pasajlandı ve ertesi gün yaklaşık %70-80 konfluent olan hücrelere transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyonda 30 µg vektör DNA'sı Sodyum asetat/Etanol çöktürme yöntemi ile sterilize edildi ve çöken pelet 1 ml 2xHEPES pH:7.05 içinde çözöldü. Bunun üzerine 0.25 Molar 1 mL CaCL₂ Solösyonu damlalar halinde ilave edildi ve iyice karıştıran örnek laminar kabin içinde 30 dk bekletildi. Bu süre sonunda oluşan ve net olarak görölen kalsiyum fosfat-DNA kompleksi pipetaj ile daha küçük parçalara bölündü ve örnek 10 mL besiyerinde bulunan hücrelerin üzerine 20 cm mesafeden damlalar halinde bırakıldı. Gece boyu inkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler %10 gliserol içeren DMEM ile 1 dk şoklandı. Şoklamanın ardından bu ortam da uzaklaştırıldı ve normal büyüme ortamı (PSA ve %10 serum içeren DMEM) hücrelere verildi.

3.10. Transfekte Olan 293T Hücrelerinin Seçilmesi

pcDNA3.1(A) vektörünün seçim markerı olarak yapısında neomycin/G418 geni mevcuttur. Bu nedenle vektör ile transfekte olan 293T hücrelerinin seçilimi için neomycin/G418 (Calbiochem 345810) (0,4g/mL) içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır. Transfeksiyon işleminden iki gün sonra 293T hücreleri tripsinize edilerek kaldırıldı ve 96 kuyucuklu neomycinli DMEM içeren kültür kaplarına ekildi. Yaklaşık 1 ay süresince yapılan seçimde neomycinli ortamda çoğalabilen koloniler seçildi.

3.11. Hücrelere EGF ve LY294002 (PI3K İnhibitörü) Muamelesi

1. Hücreler %70-80 konfluent olana kadar %10 FBS içeren DMEM besi ortamı içerisinde %5CO₂'li etüvde kültüre edildi.
2. Hücrelerin bulunduğu besi ortamı uzaklaştırıldı.
3. İki defa 1xPBS ile yıkandı.
4. Hücrelere serum içermeyen besiyeri verildi.
5. Hücreler gece boyu veya 16 saat süresince serumsuz ortamda bekletildi. Süre sonunda 10 ng/ml EGF (Endothelial Cell Systems 4017C) içeren DMEM veya final konsantrasyonu 20 µM LY294002 (Sigma L9908) içeren DMEM eklendi ve 1 saat bekletildi.
6. Muamele sonunda hücreler tekrar 1xPBS ile iki defa yıkandı.
7. Hücre kazıyıcısı (Greiner cell scraper 541 080) yardımıyla hücreler Liziz tamponu içerisinde kaldırıldı ve lizatları hazırlandı.

3.12. Hücre Lizatı Hazırlanması

Besi ortamı uzaklaştırılarak, hücreler 10 mL soğuk 1xPBS ile yıkandıktan sonra 1 mL Triton-X Lizis tamponu hücrelerin üzerine konarak hücreler kazınmış ve steril 1,5 mL'lik ependorf tüpüne alınmışlardır. Buz içinde 10 dk tutulan örnekler 1 dk. vorteksledikten sonra 10.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant lizat olarak steril bir ependorf tüpe transfer edilmiştir. Örnekler kullanılana kadar -80°C'de (Thermo scientific 994) saklanmıştır.

Triton-X Liziz Tamponunun İçeriği: 100mM Sodyum Flörür (NaF-Sigma S7920), 50mM HEPES (Sigma H3375), 150mM Sodyum Klorür (NaCl- Merck 1.06404.1000), %10 Gliserol (Sigma G2025), %1,2 Triton-X100 (Merck 1.08603.1000), 1mM Magnezyum Klorür (MgCl₂-Sigma M8266), 1mM EGTA (Amresco 0732), 1mM Sodyum-o-vanadat (Sigma S6508) ve 1x proteaz inhibitör kokteyli (Roche-cat. no: 11 836 145 001), pH: 7,4 (pH metre:Hanna Instruments pH 211).

3.13. Protein Miktar Tayini

Toplanan hücre lizatlarının protein miktarı Bradford (BioRad 500-0006) reaktifi kullanılarak BSA standartına karşı gerçekleştirildi. Stok BSA (10mg/mL) Solüsyonundan 1µg/µl olacak şekilde Solüsyon hazırlanır. Standart eğrinin çizilmesi için bu Solüsyondan üçlü tekrarlar olacak şekilde 96 kuyucuklu kaplara 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 ve 15 µg olacak şekilde ayrı ayrı konuldu. Yine -80°C'deki hücre lizatları buzda eritilerek aynı 96 kuyucuklu kaba üçer tekrar olacak şekilde 1'er µl ilave edildi. BSA standardı ile örnekler spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okundu. Üçlü tekrarların ortalama verisi alınarak oluşturulan standart eğrinin formülüne göre örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

3.14. İmmünopresipitasyon Yöntemi

AKT ve TWIST1'in fiziki olarak birbirine bağlandığını göstermek için her iki protein hem ekspresyon yapılmamış hem de 48 saat boyunca ekspresyonu yapılmış 293T hücrelerinden hazırlanan 2 mg hücre lizatı kullanılarak immünopresipitasyona tabii tutuldu. Bunun için gece boyu serumsuz ortamda inkübe edilen MDA-231 hücrelerini EGF ile 60 dk. inkübe ettikten sonra bu hücrelerden lizat hazırlayıp bu lizatın 2 miligramını IP deneyi için kullandık.

Uygulama

1. 2mg protein lizatları üstüne 950 µl' ye tamamlayacak şekilde Triton X liziz tamponu eklendi.
2. Karışımın üstüne 50µl Agaroz G/A bead (sc-2003) eklendi ve 1 ml' ye tamamlandı. Bu aşamada beadlerin homojenizasyonu oldukça önemlidir. Bu nedenle pipetaj yapılmalıdır.
3. Karışım nutatör yardımıyla 4°C'de 30 dk çalkalandı.
4. Süre sonunda tüp 10.000 rpm'de 4°C'de 1 dk santrifüj edildi.
5. Süpernatant yeni ependorflara dökülerek aktarıldı, bead içeren pellet atıldı.
6. 20 µl Anti-TWIST1 (Sc-15393) veya anti-AKT (Sc-5298) antikorı eklendi.
7. Nutatörde, 4°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyon sonunda üzerine 100µl agaroz A/G bead eklenir ve gece boyu soğukta çalkalandı.
9. Ertesi gün örnekler 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
10. Süpernatant atılır ve pelet üzerine 1 ml Triton-X Liziz Tamponu eklenerek alt üst edilir ve bu yıkama işlemi iki kez daha tekrarlandı.

11. A/G beadler üzerinde tampon kalmayacak şekilde süpernatant atıldı.
12. Pelet üzerine 100µl β-merkaptotanol içeren SDS yükleme tamponu konuldu ve tüpler kaynar suda bekletilerek vortekslendi.
13. Son olarak, örnekler 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
14. A/G beadlerden kurtulan ve süpernatantta mevcut olan proteinlerin 50 µl'si western blot yöntemiyle analiz edildi.

3.15. Western Blot Yöntemi

Kullanılan Solüsyonlar:

1. Resolving (Ayrıştırma) Tamponu: 1,5M TrisBase pH: 8.8.
1 lt.' si için 181,64 gr Tris base tartıldı ve distile H₂O'da çözöldü.
2. Stacking (Yükleme) Tamponu: 0,5M TrisBase pH:6,8.
1 lt' si için 60,5 gr trisbase tartıldı ve distile H₂O'da çözöldü.
3. Running Buffer (5X): 15 gr. TrisBase, 94 gr. Glisin (Vivantis PR0608), 50 ml %10 SDS karışımı 1lt' ye distile H₂O ile tamamlandı. Solüsyon pH ayarı gerektirmemektedir.
4. 1xPBST: 1 lt 1xPBS solüsyonuna 1ml Tween20 (Merck 8.22184.1000) ilave edildi.
5. SDS Yükleme Tamponu: 1ml gliserol, 3ml %10 SDS (Merck 8.22050.1000),1,25 ml (1M) Tris-HCl pH:6,7, 1-2 µg bromofenol mavisi eklendi. Filtreden geçirilerek kullanıldı. Kullanmadan önce 1ml'ye 50 µl β-merkaptotanol (Sigma M3148) ilave edildi.
6. %10 Amonyum persölfat (APS): 0,1 gr APS (Sigma A3678) 1 ml disitle suda çözöldü. Taze hazırlandı ve 4°C'de saklandı.
7. Transfer Tamponu: 3,75g Glisin ve 7,25g TrisBase 1 lt distile suda çözölerek karışına 250 ml metanol eklendi.
8. Akrilamid/Bisakrilamid (29/0.8): 29g Akrilamid (Merck 8.00830.1000) ve 0,8g Bisakrilamid (Merck 2610) 100 ml bidistile H₂O'da çözölerek filtre edildi.

3.15.1. Jelin Hazırlanması

Resolving	%7	%10	%12	%15	Stacking	5ml' lik	10ml' lik
Su	15ml	11,55ml	10,5ml	7,05ml	Su	3ml	6ml
Resolving Buffer	7,5ml	7,5ml	7,5ml	7,5ml	Stacking Buffer	1,25ml	2,5ml
Acr(29:08)	7,05ml	10,5ml	12ml	15ml	Acr(29:08)	0,625ml	1,25ml
%10SDS	0,3ml	0,3ml	0,3ml	0,3ml	%10SDS	50µl	100µl
%10 APS	0,3ml	0,3ml	0,3ml	0,3ml	%10 APS	50µl	100µl
Temed	30µl	30µl	30µl	30µl	Temed	5µl	10µl
Toplam	30ml	30ml	30ml	30ml		5 ml	10 ml

3.15.2. Örneklerin Jelde Yürütülmesi

Bradford yöntemiyle protein miktarı belirlenen örneklerden 100 µg alınarak üzerine eşit volumde β-merkaptoetanol içeren SDS yükleme tamponu konuldu ve kaynayan suda 5 dk bekletildi. Uygun pipet uçlarıyla hazırlanan poliakrilamid jele yüklendi. Jele yüklenen örnekler stacking jeli geçene kadar 120 voltta, resolving jelde ise 150 voltta yürütüldü (Cihaz : Amersham 80-6171-96). Yürüme sonunda PVDF membrana transfer aşamasına geçildi.

3.15.3. Proteinlerin Jelden PVDF Membrana Transferi

Örnekler yürütüldükten sonra transfer için kullanılacak süngerler transfer tamponunda ıslatıldı. Transfer aparatının siyah veya negatif yüklü olacak kısmına süngerlerden biri yerleştirildi. Üzerine transfer tamponunda ıslatılmış whatman kağıdı yerleştirildi. Bunun üzerine örneklerin yürütüldüğü jel cam plakalar arasından dikkatli çıkarılarak kondu. Jel üzerine saf metanolde ıslatılmış PVDF membran (Millipore IPVH00010) hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Üzerine transfer tamponuyla ıslatılmış whatman kağıdı (Sigma Z691011) ve diğer sünger konularak transfer aparatı kapatıldı. Bekletmeden transfer tamponuyla doldurulan ve buz içerisine konulmuş transfer cihazına yerleştirildi. Örnekler gece boyu 40 voltta transfer edildi.

3.15.4. PVDF Membranın İşaretlenmesi

Transferin ardından blot PBST-BSA (1X PBS, %0.1 Tween-20, %1 BSA) Solüsyonunda 2 saat bloklandı. Bunun ardından, PBST-BSA içinde hazırlandı primer antikorunun 1/1000 dilüsyonu ile 1 saat işaretlendi, takiben, antikor uzaklaştırıldı ve blot PBST (1X PBS, %0.1 Tween-20) ile 15'er dakikadan 2 kez oda sıcaklığında yıkandı. Ardından, PBST-BSA içinde hazırlanmış uygun anti-mouse veya anti-rabbit sekonder antikorunun 1/2000 dilüsyonu ilave edildi ve işaretleme 1 saat oda sıcaklığında yapıldı. Sekonder antikorun uzaklaştırılmasının ardından blot PBST ile 30 dk yıkandı. ECL reaktifi (GE Health care RPN2209) ilave edildi ve 1 dk beklendikten sonra bu da uzaklaştırıldı ve kemilüminas'a duyarlı film karanlık odada blot'ın üzerine konarak 5 dk bekletildi. Görüntüleme için film (Kodak 8116428) banyo edildi.

AKT fosforilasyonunun seviyesinin belirlenmesi için kuyucuklara eşit miktarda protein koyduktan sonra kullanılan blot “strip off” edildi. Strip off Solüsyonu, 12.5 ml 0.5 M Tris PH.6.8, 20 mL %10'luk SDS, 704 mikrolitre β -merkaptoetanol, 67 ml steril distile su olacak şekilde hazırlandıktan sonra 55°C'e ısıtıldı (Stuart-Heat stir SB162). Ağzı kapalı plastik kaba konan blot'ın üzerine ısıtılmış strip off solüsyonu konuldu. Blot aynı dereceye ısıtılmış çalkalamalı inkübatörde 30 dk çalkalandı. Bunun ardından solüsyon uzaklaştırıldı ve blot PBST (1X PBS, %0.1 Tween-20) ile 15'er dakikadan 2 kez oda sıcaklığında yıkandı. Ardından, total AKT antikoru ve sekonder antikör ile yapılan işaretleme yukarıda belirtilen şekilde yapıldı.

3.15.5. Strip Off Uygulaması

20 ml %10 SDS, 12,5 ml Stacking tamponu, 67,5 ml H₂O Solüsyonu 55°C'ye ısıtılarak western blot yönteminde kullanılan PVDF membranı 30 dk boyunca bu Solüsyonda çalkalandı. Sonrasında, β -merkaptoetanol uzaklaştırılana kadar 45 dk PBST ile çalkalanarak yıkandı ve tekrar işaretleme için kullanıldı.

3.16. *In vitro* Kinaz Reaksiyonu

Hazırlık Aşaması

AKT enziminin TWIST1'i fosforile ettiğinin gösterilmesi için 293T hücrelerinde 72 saat boyunca ekspresyonu sağlanan TWIST1 proteini anti-TWIST1 antikoru kullanılarak immünopresipitasyon yöntemi ile saflaştırılmıştır. AKT enzimi ise EGF ile 1 saat muamele edilen hücrelerden benzer şekilde IP yöntemi ile saflaştırılmıştır.

Uygulama

EGF ile muamele edilen/edilmeyen petrilere elde edilen lizatların 2 miligramı sırası ile aktive olmuş/olmamış AKT'yi IP ile çöktürmede kullanıldı. EGF ile muamele edilmeyen petriden elde edilen lizatın 2 mg'ı ise substrat olacak TWIST1 IP'si için kullanıldı. Aynı anda elde edilen peletler üç kez lizis tamponu ile yıkandıktan sonra *in vitro* “AKT kinaz Kiti” (Cell Signaling-9840) içinde bulunan kinaz reaksiyon tamponu ile de 2 kez yıkandı ve örneklerin üçü de 50 μ l 1X Kinaz tamponunda çözüldü. Elde edilen her iki AKT IP tüplerinden 25'er μ l birer ependorfa konulduktan sonra bunların üzerine 25 μ l TWIST1 IP örneğinden konuldu ve her iki tüpe de 10 μ M ATP ilave edildikten sonra örnekler 37°C'de 30 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ProteinA/G-Agaroz'a bağlı her iki protein de santrifüjasyon ile çöktürülmüş ve lizis tamponu ile üç kez yıkandıktan sonra final peletin üzerine 50 μ l β -merkaptoetanol içeren 2X SDS-yükleme tamponu konuldu ve kaynayan suda 5 dk tutulduktan sonra örnek vortekslendi. Santrifüj edildi ve süpernatantın 50 μ l'si %10'luk SDS-PAGE de elektroforeze tabi tutuldu. Proteinlerin gece boyu PVDF membrana transferinin ardından membran sadece AKT tarafından fosforile edilen proteinleri tanıyan “anti-fosfo AKT substrat antikoru” (Cell signaling-9614) ile işaretlendi ve film banyosunda görüntüsü alındı.

3.17. Site-Directed Mutagenesis Yöntemi

İnsan yabanıl tip TWIST1 ekspresyon vektörü üzerinde oluşturmak istenilen Alanin (S42A,T121A ve S123A) ve Glutamik asit (S42E, T121E ve S123E) mutantları için <https://www.genomics.agilent.com> internet sitesi aracılığıyla ilgili bölgelere özgü primer çiftlerini dizayn edildi. Bu mutagenез primerlerinin dizileri aşağıdaki gibidir.

Alanin Mutant Primerler:

S42A sense	5'-aagcggcgcagc gcc aggcgcagcgc-3'	(26 mer; Tm: 79°C)
S42A antisense	5'-gcgctgcgcct ggc gtgcgccgctt-3'	(26 mer; Tm: 79°C)
T121A sense	5'-agcgccagcgc gcc cagtcgctg-3'	(23 mer; Tm: 78°C)
T121A antisense	5'-cagcgactg ggc gcgctggcgct-3'	(23 mer; Tm: 78°C)
S123A sense	5'-cagcgcacccag ggc gtgaacgagg-3'	(25 mer; Tm: 78°C)
S123A antisense	5'-cctcgttcag ggc ctgggtgcgctg-3'	(25 mer; Tm: 78°C)

Glutamik Asit Mutant Primerler:

S42E sense	5'-caagcggcgcagc gag aggcgcagcgcg-3'	(28 mer; Tm: 81°C)
S42E antisense	5'-cgcgctgcgcct ctc gtgcgccgctt-3'	(28 mer; Tm: 81°C)
T121E sense	5'-ggagcgccagcgc gag cagtcgctgaac-3'	(28 mer; Tm: 78°C)
T121E antisense	5'-gttcagcgactg ctc gcgctggcgctcc-3'	(28 mer; Tm: 78°C)
S123E sense	5'-cgccagcgcacccag gag ctgaacgaggcgttc-3'	(33 mer; Tm: 78°C)
S123E antisense	5'-gaacgcctcgttcag ctc ctgggtgcgctggcg-3'	(33 mer; Tm: 78°C)

Uygulama

TWIST1'in mutant formlarını oluşturmak için yukarıda belirtilen primer çiftleri ile Pfu DNA Polimeraz (Fermentas EP0501) kullanılarak PCR gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları: 1x Reaksiyon Tamponu, 125'er ng ileri ve geri primerler, 1pmol dNTP, 2,5 ünite PFU DNA Polimeraz, 50 ng kalıp plazmit ve steril H₂O. Reaksiyon 50 µl'de kuruldu ve ön denatürasyon 95°C'de 30 sn, 16 döngü olmak üzere 95°C'de 30 sn, 55°C'de 1 dk ve 68°C'de 14 dk ve daha sonrasında 4°C'de ∞, şeklinde reaksiyon koşullarında amplifikasyon gerçekleştirildi.

3.18. Plazmitlerin Dpn-I Enzimi ile Kesilmesi

In vitro plazmit amplifikasyonu gerçekleştirildikten sonra reaksiyonda kullanılan kalıp plazmit önceden DH5α'dan izole edildiği için GATC dizilerinden metile vaziyettedir. Bu metillenmiş dizilere spesifik kesim yapan Dpn-I enzimi (invitrogen 15242-019) kullanılarak ana yabanıl tip TWIST1 vektörü parçalanmıştır. Mutant dizileri içeren vektörler Dpn-I resistant olduğundan enzim kesimi sonucunda sağlam olarak kalacaklardır. Dpn-I enzim kesimi; 1x Reaksiyon tamponu, 20 µl SDM ürünü plazmit, 1 µl protokole göre dilüe edildi Dpn-I enzimi ve steril H₂O şeklinde gerçekleştirildi. Reaksiyon 50 µl'de kurulmuş ve 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

Dpn-I enzim kesimi yapılmış bu vektörler DH5 α 'ya transforme edilerek Ampicilinli agar petrilerinde koloniler seçildi ve her biri geceboyu LB besi ortamında çoğaltılarak plazmid izolasyonları gerçekleştirildi. Beklenen mutasyonları tanımlamak için ilgili bölgelerin dizi analizini yapıldı.

3.19. PCR veya Restriksiyon Enzim Kesimi Ürünlerini Temizlenmesi

PCR veya enzim kesimi sonrası tüp içerisindeki ürün dışı reaksiyon bileşenlerinin uzaklaştırılmasını sağlayan pürifikasyon basamağı Invitrogen PCR Purification Kit(250'lik K3100-01) kullanılarak uygulandı.

Uygulama

1. PCR ürününün üzerine 100 μ l B3 buffer eklendi.
2. Pipet ile biraz karıştırıldıktan sonra, önceden hazırlanmış filtreler içerisine yerleştirilmiş receiver tüplerine aktarıldı.
3. 10 000 rpm de 1 dk. santrifüj edildi.
4. Receiver tüpünün altı boşaltılmadan üzerine 325 μ l Wash Buffer eklendi.
5. 10 000 rpm de 1 dk. santrifüj edildi.
6. Receiver tüplerin altı boşaltıldı.
7. 14 000 rpm de 2 dk. kuru santrifüj yapıldı.
8. Sonra filtreler ependorf tüplerine alındı.
9. Üzerine 30 μ l elution buffer eklendi.
10. Oda sıcaklığında 1 dk bekletildi.
11. 14 000 rpm de 2 dk. santrifüj edildi ve filtreler atıldı.

3.20. DNA Dizi Analizi PCR Yöntemi

1. 4'er μ l Big Dye terminator v3.1 (Cycle Sequencing Kit-Applied Biosystems) tüplere dağıtıldı.
2. 30-90 ng (5 μ l) PCR ürünü eklendi.
3. 3,2 pmol ileri primer eklendi.
4. Toplam hacim 20 μ l olacak şekilde steril deiyonize H₂O ile tamamlandı.
5. İyice karıştırılıp spin edilerek çöktürüldü.
6. ABI Prism 9700 PCR cihazının Perkin Elmer (PE) menüsünün Big Dye Terminator programında PCR dizileme işlemi gerçekleştirildi.

Big Dye Terminator programı:

1. Başlangıç denatürasyonu: 96 °C'de 1 dk.
2. 96 °C'de 10 sn.
3. 50 °C'de 5 sn.
4. 60 °C'de 4 dk.

25 döngü halinde gerçekleştirildi. Pürifikasyon işlemine kadar tüpler +4°C'de bekletildi.

3.20.1. DNA Dizi Analizi PCR Sonrası Sodyum Asetat ile Temizleme ve Örneklerin Cihaza Yüklenmesi

1. Dizileme reaksiyonundan sonra PCR cihazından çıkarılan örneklerin üzerine 2'şer µl 3 M sodyum asetat eklendi.
2. Üzerine %95-99'luk -20 °C'de soğutulmuş etanolden 50 µl ilave edilerek hafifçe pipetle karışması sağlandı.
3. Bu karışım 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınarak -20 °C'de 15 dk tutuldu.
4. Bu işlem sonrasında 13000 rpm de 20 dk. santrifüj yapıldı.
5. Santrifüj sonrasında dökelti uzaklaştırıldıktan sonra çökeltinin üzerine 4°C'de muhafaza edilen %70'lik etanolden 250 µl eklendi ve pipet yardımıyla hafifçe karıştırıldı.
6. 13000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonunda dökelti uzaklaştırıldı ve örnekler 37°C'deki etüvde kurumaya bırakıldı.
8. Kuruma işleminden sonra her örneğin üzerine 22 µl Hi-Di Formamid (Applied Biosystems) eklendi.
9. Formamid eklenmiş olan dizileme reaksiyonu ürünleri tüp (Applied Biosystems) içerisine alındı.
10. Tüpün ağzı septa (Applied Biosystems) ile kapatıldıktan sonra 95 °C'de 5 dk. denatüre edildi.
11. Buzda 2 dk. bekletildikten sonra ABI Prism dizi analizi cihazına örnekler yüklendi. Daha sonra kapiller (Applied Biosystems), POP-6 polimer (Applied Biosystems), EDTA içeren Buffer (10x) (Applied Biosystems) ile dizi analizi cihazında (ABI 310 Prism) 36 dk. yürütüldü.
12. Örnekler yürütüldükten sonra, NCBI aracılığıyla TWIST1 cDNA dizisi referans alınarak diziler okundu.

3.21. Jel Retardasyon Deneyi

Yabani tip ve mutant TWIST1 ekspresyonu yapan hücreler EGF ile 60 dk. inkübe edildikten sonra hücreler 1xPBS ile iki kez yıkandı. Hücre kazıyıcısı yardımıyla 100mm²'lik petriye 1 ml nükleer ekstrakt liziz tamponu eklenerek hücreler kaldırıldı ve lizatlar hazırlandı. Ayrıca *Tinnman* geninin promotorunda TWIST1 bağlayan bölgesi (5-GATCTCCCCTGGCATATGTTGAA-3) biotin işaretli olarak satın alındı.

Nükleer Ekstrakt Liziz Tamponu: 20mM HEPES (pH:7.0), 400mM KCl, 0,5mM EDTA, 0,1mM EGTA, 1mM DTT, 1mM MgCl₂, %20 Gliserol, %1 NP-40, 1mM PMSF ve 1x proteaz inhibitör kokteyli (Roche, Cat. no: 11 836 145 001).

Uygulama

Jel retardasyon deneyi için hazırlanan lizatlar ve solüsyonlar buzda eritilerek final konsantrasyonları aşağıda belirtilen oranlarda 30 µl hacimdeki reaksiyon tüpü hazırlandı. Prob hariç karışım hazırlanarak 10 dk buzda bekletildi. Karışıma prob eklendikten sonra tüpler oda sıcaklığında 30 dk süresince inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 1,5 µl SDS içermeyen 2x yükleme tamponu (%50 Gliserol, %0.1 gram Bromfenol blue-Sigma B0126) eklendi. Pipet ucuyla karıştırılarak denatüre edici olmayan %5 akrilamid jele yüklendi.

Jel Retardasyon Reaksiyonu: 1xTE (Tris-EDTA), 0,8 mM DTT (ditriyotretiyol), 20 mM KCl, 66,6 ng/μl Poli dIdC (Amersham 27-7880-03), %5 Gliserol, 6μg lizat, 500ng biotin işaretli Tinnman probu ve steril H₂O.

3.21.1. Örneklerin %5 Akrilamid Jelinde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

%5 Akrilamid Jel Hazırlanması: 2 ml 10xTBE, 5 ml (29:0,8) Akrilamid/Bisakrilamid, 200 μl %10 APS, 40 μl TEMED (Sigma T2,250-0) ve 33 ml distile H₂O.

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan jel örneklerin yüklenmesinden önce 15 dk 120 voltta %0,5xTBE tamponunda boş olarak yürütüldü. Jel retardasyon reaksiyonun inkübasyon süresi bittiğinde örneklerin tamamı bu jele yüklendi. 1cm'ye 1mA olacak şekilde, yaklaşık 120 voltta 2 saat oda sıcaklığında yürütüldü. Süre sonunda jeldeki örnekler 0,5xTBE tamponu kullanılarak 25mA'de (yaklaşık 4 volt) geceboyu PVDF membran üzerine transfer edildi. Blotlar biotin-streptavidin HRP (Invitrogen 43-4323) antikorları ile işaretlenip retard olan DNA bantları film banyo cihazıyla görüntüledi.

3.22. WST-1 Hücre Proliferasyon Testi

Hücre kültürasyonu için 96 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı. Hücre sayımı için hücreler tripsinize edilerek homojenize edildi ve Thoma lamı kullanılarak hücre sayısı belirlendi. Hem 0. gün hem de 72. saat WST-1 (Roche 11 644 807 001) okuması için iki ayrı kap hazırlandı.

Uygulama

1. Kontrol, yabanıl tip ve mutant TWIST1 eksprese eden 293T hücrelerinden her kuyucuğa 1000 hücre ve üç tekrar olacak şekilde ekim gerçekleştirildi.
2. Hücreler %10 FBS içeren normal DMEM besi ortamı eklendi ve geceboyu tutunmaları sağlandı.
3. Ertesi gün besi ortamı uzaklaştırılarak %10 WST-1 ajanı içeren normal besi ortamı ile değiştirildi. WST-1 ajanı ışıktaki bozulmaya uğradığı için karanlık ortamda çalışıldı.
4. WST-1 içeren ortamda hücreler 3 saat boyunca inkübe edildi.
5. Inkübasyondan sonra 96 kuyucuklu kültür kabı 420-600 nm dalgaboyunda spektrofotometrede okundu.
6. Aynı işlem 72 saat boyunca bu kez 10 ng/ml EGF içeren ortamda inkübe edilen hücreler için de yapıldı.
7. Spektrofotometre okuma değerleri alınarak 0. ve 72. saat verileri kıyaslanarak istatistiksel analizler yapıldı.

3.23. Tümör Hücresi Migrasyon Testi

Hücre migrasyon testi için Oris Migrasyon Assay (Platypus CMAUFL4) kiti kullanıldı. Hücre sayımı gerçekleştirilerek her kuyucuğa kontrol, yabancı tip ve mutant TWIST1 eksprese eden 293T hücrelerinden 10^5 'er kanser hücresi ve üçer tekrar olacak şekilde ayarlandı.

Uygulama

1. Kit içerisinde mevcut olan 96 kuyucuklu kültür kabına kuyucukta stoper yerleştirilmiş vaziyette iken belirlenen miktarda ilgili hücreler normal besi ortamlarında ekildi ve gece boyu kültüre edildi.
2. Ertesi gün tutunan hücrelerin kuyucuklarındaki stoperler dikkatlice çıkarıldı. Kuyucuğun ortasındaki boş alan dikkate alınarak ve 0. gün kabul edilerek uygun mikroskop büyütmesinde fotoğrafları çekildi.
3. Mevcut besi ortamı uzaklaştırılarak 10 ng/ml EGF içeren besi ortamı ilave edildi.
4. 72 saat boyunca hücreler %5 CO₂'li etüvde kültüre edildi.
5. Süre sonunda ortadaki boş alan daha önce çekildiği şekli ile ve aynı büyütme gücünde fotoğrafları çekildi.
6. Image J programı yardımıyla fotoğraf görüntülerindeki hücre migrasyon alanı belirlendi.
7. Alan verileri hesaplanarak kontrol, yabancı tip ve mutant TWIST1 eksprese eden 293T hücrelerinin migrasyon oranları belirlendi.
8. Verilerin anlamlılık değerlendirilmesi istatistiksel olarak hesaplandı.

3.24. İmmünfloresan Sitokimya Yöntemi

Kontrol, yabancı tip ve mutant TWIST1 eksprese eden 293T hücreleri 96 kuyucuklu kültür kaplarında 3 gün boyunca 10 ng/ml EGF içeren DMEM içerisinde %70-80 konfluent olana kadar kültüre edildi. Bütün hücre tiplerinin ayrı ayrı anti-TWIST1 (sc-15393), anti-Vimentin (sc-6260), anti-N-Cadherin (sc-8424) ve anti-E-Cadherin (sc-8426) antikorları kullanılarak immünfloresan olarak boyamaları gerçekleştirildi.

Uygulama

1. Hücrelerin bulunduğu besi ortamı uzaklaştırıldı.
2. Üzerine 100 µl soğuk metanol eklendi ve -20°C'de 20 dk bekletildi.
3. Kuyucuklar üç defa 5'er dk bekletilerek 1xPBS ile yıkandı.
4. Her kuyucuk 50 µl 1xPBS'te hazırlanmış %5 Donkey serumla (Jackson 017-000-001) oda sıcaklığında 1 saat bloklandı.
5. İlgili primer antikor immünohistokimya için kullanılan dilüent ile 1/25 oranında hazırlandıktan sonra geceboyunca 4°C'de inkübe edildi.
6. Ertesi gün, kuyucuklar üç defa 5'er dk bekletilerek 1xPBS ile yıkandı.
7. İlgili sekonder antikor ile 1 saat inkübasyon yapıldı. Sekonder antikor immünfloresan özellik taşıdığından bundan sonraki aşamalar karanlıkta çalışılır.
8. Kuyucuklar üç defa 5'er dk bekletilerek 1xPBS ile yıkandı.
9. 50 µl Hoechst boyası (Sigma H6024) damlatılarak floresan mikroskopunda görüntüler alındı.
10. Örnekler 4°C'de alüminyum folyoya sarılarak saklandı.

3.25. Metanolik Bitki Ekstraktının Hazırlanması ve Organik Molekül İzolasyonu

1. Bitki örnekleri küçük parçalara ayrıldıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmaya bırakıldı.
2. Kurutulan bitki örnekleri mekanik öğütücü yardımıyla toz haline getirildikten sonra 500 gr alınarak 1 lt absolut metanolle gece boyu oda sıcaklığında çalkalandı.
3. Metanol ekstraktı whatman filtre kağıdı yardımıyla geniş bir kaba süzüldü ve metanolün uçması için oda sıcaklığında bekletildi.
4. Çökelti 50 ml metanolde tekrar çözüldü ve 1'er ml olacak şekilde 1,5 ml'lik ependorf tüplere kullanılacak miktarda bölündü.
5. Ependorf tüpler 10.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
6. Süpernatant'tan 400 µl alınarak TLC Silica Gel 60F (1.05554.0001) plakaya yüklendi.
7. TLC plakalar uygun TLC tankında kloroform/eter (1:1) karışımı yardımıyla yürütüldü ve Transillüminatörde görüntüleri incelendi.
8. TLC plakada ayrılan moleküllerden tercih edilenler makas yardımıyla kesilerek alındı. (Molekül izolasyonu için 50 adet TLC plaka kullanıldı.)
9. TLC plakalardan kesilerek isimlendirilen ve cam şişede biriktirilen parçalar tekrar metanol ile ıslatıldı ve çözünmesi için gece boyu oda sıcaklığında bekletildi.
10. Her biri farklı bir molekülü içeren ve metanolde çözündürülen TLC parçaları cam petri kaplarına süzüldü ve kurutuldu.
11. Çökelti 4 ml metanolde çözüldü ve silikadan kurtulmak için 0,20 µm filtreden geçirilerek 1,5 ml'lik ependorflarda 10.000 rpm'de 1dk santrifüj edildi.
12. Süpernatant darası alınmış ependorflara alındı ve SpeedVac Concentrator (Thermo-DNA120) cihazında kurutuldu.
13. Ependorflar tartılarak çökeltideki molekülün miktarı belirlendi, 10 µg/µl olacak şekilde metanolde çözüldü ve -20°C'de saklandı.

3.26. İzole Edilen Organik Moleküllerin IC50 Değerlerinin Belirlenmesi

Elde edilen moleküllerin IC50 değerini MDA-MB-231 hücre hatlarını kullanarak belirledik. Bu hücreler 1500 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve gece boyu kültüre edildi. İzole edilen her molekül için 5'er tekrar olacak şekilde 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 ve 0 µg/ml konsantrasyonlarında 72 saat boyunca uygulama gerçekleştirildi. Aynı şekilde 5'er tekrar, kontrol amaçlı, kullanılan dilüsyon hacimlerinde metanol uygulaması gerçekleştirildi. Süre sonunda WST-1 Assay uygulandı ve spektrofotometrede okutuldu. Sonuçlar normalize edilerek GraphPad Prism 5.1 programı yardımıyla IC50 değerleri belirlendi.

3.27. İstatistiksel Analiz

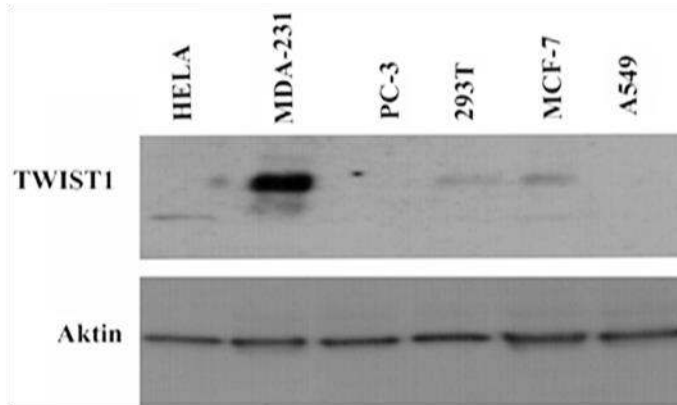
Elde edilen verilerin analizleri Microsoft Excell ve GraphPad Prism 5.1 programları kullanılarak gerçekleştirildi. Deney sonuçlarının *p* değerleri One way ANOVA (Dunnet t-test) ile hesaplandı. Sonuçlar normalize edilerek ve $\pm$ standart hata değerleri belirlenerek gösterildi.

BULGULAR

EMT sürecinde ve onkogenik transformasyonda önemli rol oynayan TWIST1 transkripsiyon faktörünün her zaman her şartta aktif olamayacağını ve bu faktörün aktivasyonunun tümör mikroçevresinde bulunan büyüme faktörleri tarafından kontrol edilebileceğini öngörmüştük. Bu bağlamda çeşitli büyüme faktörleri tarafından aktive edilen PI3K/AKT yolağının bu işte rolü olabileceğini düşündük. Bunun nedeni insan TWIST1 proteininde 3 adet mükemmel derecede korunmuş konsensus AKT fosforilasyon motifinin (RxRxxS/T) bulunmasıdır. Bu diziler RKRRSS42, RERQRT121 ve RQRTQS123 dizisi şeklindedir. Bu dizlerin bir proteinde bulunması mutlaka AKT tarafından fosforile edileceği anlamına gelmez. Hipotezin doğru olup olmadığını test etmek için bir dizi biyokimyasal ve genetik çalışmalar yaptık. Bu bağlamda ilk olarak insan TWIST1 geninin ökaryotik ekspresyon vektörünü oluşturduk ve fosforilasyonunu gösterdik. Ardından bu mutasyonların TWIST1'in fonksiyonuna olan etkilerini test ettik.

4.1. Çeşitli İnsan Kanser Hücre Hatlarında Endojen TWIST1 Ekspresyonun Gösterilmesi

Proje çalışmamızda ilk olarak elimizde mevcut bulunan hücre hatlarının endojen TWIST1 ekspresyonlarına Western Blot yöntemiyle baktık. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi farklı tümör hücrelerinde farklı TWIST1 ekspresyonları görülmektedir. En yüksek TWIST1 ekspresyonunu metastatik meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB 231 hücrelerinde gördük. Bu durum TWIST1'in metastaz ile ilişkili olabileceğini kısmen de olsa göstermektedir.



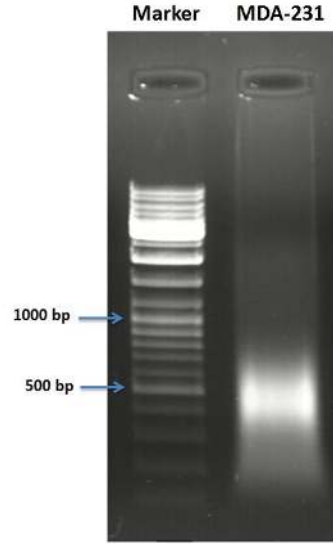
Şekil 4.1. Western Blot yöntemi ile insan kanser hücrelerinde TWIST1 ekspresyon seviyelerinin gösterilmesi.

HeLa (servikal karsinoma), MDA231 (metastatik meme kanseri), PC3 (Prostat kanseri), 293T (böbrek hücre hattı), MCF7 (metastatik olmayan meme kanseri) ve A549 (akciğer kanseri)

4.2. İnsan TWIST1 Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması

4.2.1 MDA-MB 231 Hücrelerinden cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması

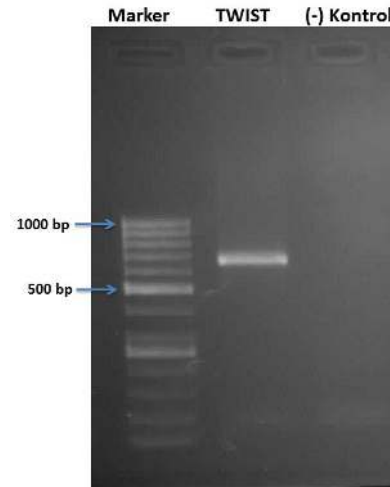
TWIST1 geninin cDNA'sını insan cDNA kütüphanesini kullanarak klonlandı. Bunun için konvansiyonel yöntemlerle bu MDA-MB 231 hücrelerinden total RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA kütüphanesi oluşturuldu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. MDA-MB 231 hücrelerinden hazırlanan cDNA kütüphanesinin %1 agaroz jelde gösterilmesi.

4.2.2. cDNA Kütüphanesi Kullanılarak TWIST1 cDNAsının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Amplifiye Edilmesi ve DNA Dizi Analizinin Gerçekleştirilmesi

cDNA kütüphanesinin hazırlanmasının ardından PCR amplifikasyonu sonunda olması gerektiği gibi 630 nükleotit uzunluğundaki TWIST1 cDNA'sını amplifiye edildi ve DNA dizi analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.3-4.).



Şekil 4.3. PCR yöntemi ile TWIST1 cDNA amplifikasyonunun %2 agaroz jelde gösterilmesi.

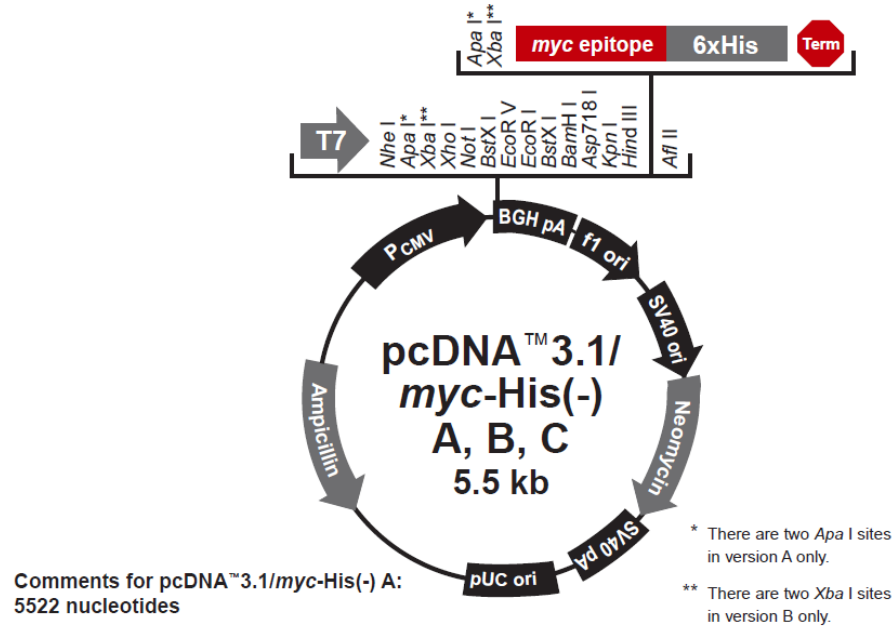
M M Q D V S S S P V S P A D D S L S N S
+1 ATGATGCAGGACGTGTCCAGCTCGCCAGTCTCGCCGGCCGACGACAGCCTGAGCAACAGC
E E E P D R Q Q P P S G K R G G **R K R R**
61 GAGGAAGAGCCAGACCGGCAGCAGCCGCCGAGCGGCAAGCGCGGGGGACGCAAGCGGCGC
S **S** R R S A G G G A G P G G A A G G G V
121AGC**AGC**AGGCGCAGCGCGGGCGGCGGCGCGGGGCCCGGCGGAGCCGCGGGTGCGGGGCGTC
G G G D E P G S P A Q G K R G K K S A G
181GGAGGCGGCGACGAGCCGGGCAGCCCGGCCAGGGCAAGCGCGGCAAGAAGTCTGCGGGC
C G G G G G A G G G G G S S S G G G S P
241TGTGGCGGCGGCGGCGGCGGGCGGCGGCGGCGGCAGCAGCAGCGGCGGCGGGAGTCCG
Q S Y E E L Q T Q R V M A N V **R E R Q R**
301CAGTCTTACGAGGAGCTGCAGACGCAGCGGGTCATGGCCAACGTGCGGGAGCGCCAGCGC
T **Q** **S** L N E A F A A L R K I I P T L P S
361**ACC**CAG**TCC**GCTGAACGAGGCGTTTCGCCGCGTGCAGGAAGATCATCCCCACGCTGCCCTCG
D K L S K I Q T L K L A A R Y I D F L Y
421GACAACTGAGCAAGATTGAGACCCCTCAAGCTGGCGGCCAGGTACATCGACTTCCTCTAC
Q V L Q S D E L D S K M A S C S Y V A H
481CAGGTCTCTCCAGAGCGACGAGCTGGACTCCAAGATGGCAAGCTGCAGCTATGTGGCTCAC
E R L S Y A F S V W R M E G A W S M S A
541GAGCGGCTCAGCTACGCCTTCTCGGTCTGGAGGATGGAGGGGGCCTGGTCCATGTCCGCG
S H *
601TCCCACTAG

S42, T121 ve S123 kodon ve amino asitleri sırasıyla altı çizgili olarak gösterilmiştir.

[illegible]

TWIST1 cDNA'sının amplifikasyonundan sonra BamHI restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilerek pürifikasyonu yapıldı.

4.2.5. pcDNA3.1(A) Ekspresyon Vektörü ve Çoklu Klonlama Bölgesi



pcDNA™ 3.1/myc-His(-) A MCS

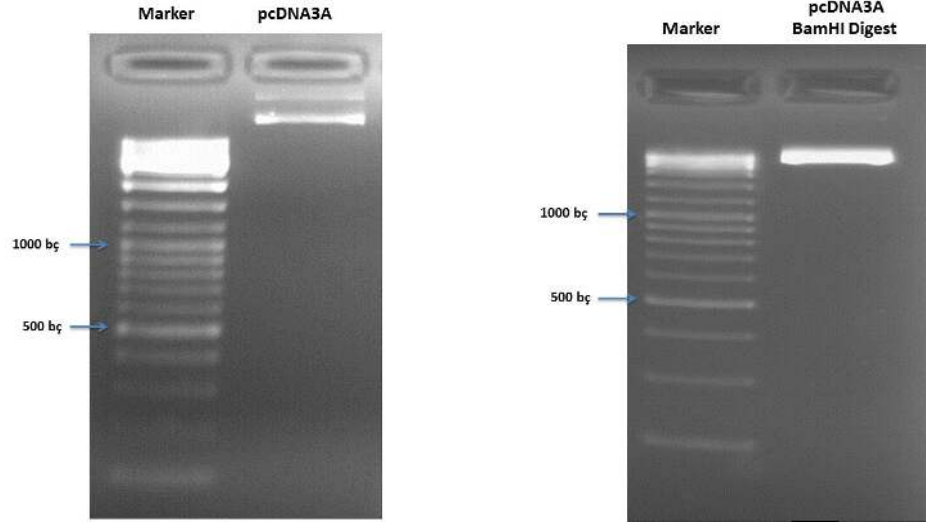
```

741  AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
                                     CAAT
801  GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG GCTTATCGAA
                                     putative transcriptional start
861  ATTAATACGA CTCACATATAG GGAGACCCAA GCTGG CTA GCG TTT AAA CGG GCC CTC
                                     T7 promoter/priming site
                                     Nhe I
                                     Apa I* Xba I
917  TAG ACT CGA GCG GCC GCC ACT GTG CTG GAT ATC TGC AGA ATT CCA CCA CAC
    *** Thr Arg Ala Ala Thr Val Leu Asp Ile Cys Arg Ile Pro Pro His
                                     Xho I Not I BstX I* EcoR V EcoR I BstX I*
968  TGG ACT AGT GGA TCC GAG CTC GGT ACC AAG CTT GGG CCC GAA CAA AAA CTC
    Trp Thr Ser Gly Ser Glu Leu Gly Thr Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys Leu
                                     BamH I Asp718 I Kpn I Hind III Apa I* myc epitope
1019 ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT
    Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
                                     Polyhistidine tag
1070 TGA GTTTAAACGG TCTCCAGCTT AAGTTTAAAC CGCTGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTA
    ***                                     Afl II BGH Reverse priming site

```

4.2.6. pcDNA3.1(A) Ekspresyon Vektörünün Klonlama İşlemi İçin Hazırlanması

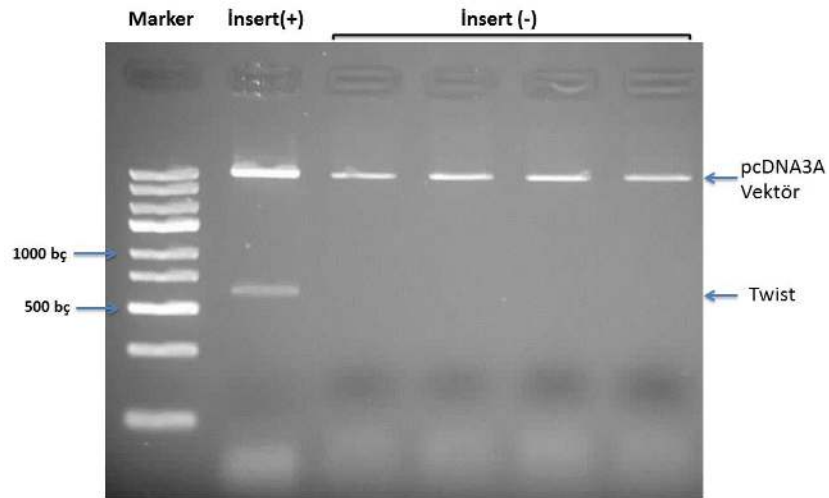
TWIST1 cDNA'sının PCR ile amplifikasyonunun ardından E.coli'nin DH5 α suşunda çoğaltılan pcDNA3.1(A) plazmiti konvansiyonel plazmit izolasyonu yöntemi ile elde edildi, BamHI enzimi ile kesildi ve CIP (calf intestinal phosphatase) ile plazmit uçlarındaki fosfatlar uzaklaştırıldıktan sonra ligasyon işlemi için hazır hale getirildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. DH5 α suşunda çoğaltılıp izole edilen pcDNA3.1(A) plazmiti ve BamHI ile kesilmiş formunun %1 agaroz jelde gösterilmesi.

4.2.7. Klonlanmış pcDNA3.1(A) Vektörlerin Belirlenmesi

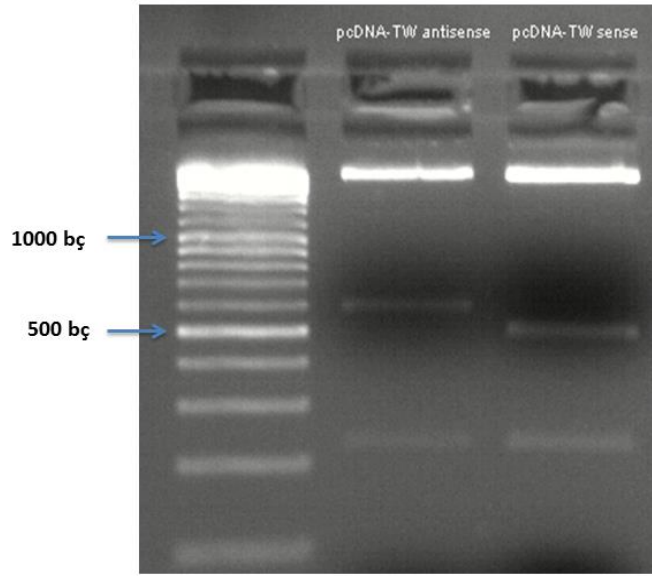
Vektör ve TWIST1 cDNA'sının BamHI kesim ürünleri T4-Ligaz ile ligasyona tabii tutuldu. Elde edilen ilk 5 koloniden izole edilen plazmitler BamHI ile kesildiğinde 630 bp uzunluğundaki TWIST1 cDNA'sı 1 numaralı koloniden elde edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Ligasyon sonrası TWIST1 cDNA insertünü içeren vektörlerin %1 agaroz jelde belirlenmesi.

4.2.8. TWIST1 cDNA'sı Klonlanmış pcDNA3.1(A) Vektöründe İnsert Yönünün Belirlenmesi

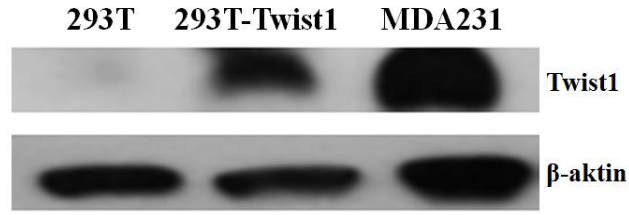
TWIST1 cDNA'sı BamHI fragmenti olarak klonlandığı için teorik olarak bu reaksiyondan hem Sense hem de Anti-sense oriyantasyonda klonlama mümkündür. Bu göz önüne alındığında klonlamanın yönünü belirlemek için ApaI enzimi kullanıldı. Çünkü, plazmitin 914. ve 1006., TWIST1 cDNA'sının ise 155. pozisyonunda ApaI kesim bölgesi vardır. Sense oriyantasyonda ligasyon yapan insert bu kesimden 497 ve 231 bç, Anti-Sense oriyantasyonda ligate olan insert ise 533 ve 195 bç uzunluğunda bantlar oluşturmaktadır. Bu iş için daha fazla koloniden plazmit izolasyonu yapıp BamHI kesimi ile insert varlığını gösterdikten sonra insert içeren örneklerin ikisi ApaI ile kesildi. Kolonilerden biri Anti-sense diğeri ise Sense oriyantasyonda TWIST1 cDNA'sını içermektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. pcDNA3.1(A) vektörüne klonlanan insan TWIST1 cDNA'sını Sense ve Anti-sense oriyantasyonda bulunduran plazmitlerin ApaI ile kesiminden elde edilen fragmentlerin %2 agaroz jeldeki görüntüsü.

4.3. İnsan TWIST1 Ekspresyon Vektöründen Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi

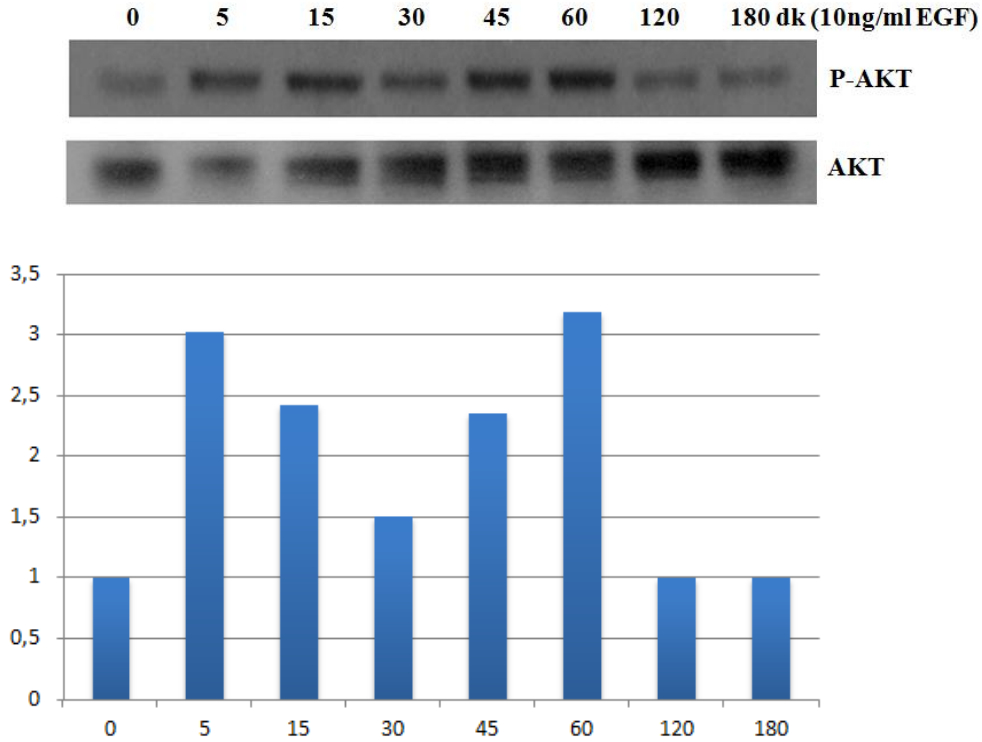
İnsan TWIST1 cDNA'sının pcDNA3.1(A) vektörüne klonlanmasının ardından sense vektörden protein ekspresyonunun olup olmadığının gösterilmesi gerekirdi. Bunun için konvansiyonel plazmit izolasyonu ile ekspresyon vektörü fazla miktarda izole edildi ve 293T hücrelerine transfeksiyonda kullanıldı. TWIST1'in ektopik ekspresyonunu göstermek için transfekt edilmemiş 293T hücre lizatının yanısıra aşırı TWIST1 ekspresyonu yapan MDA-MB 231 hücrelerinin lizatı da “pozitif kontrol” olarak kullanıldı. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi klonlanan vektörden başarılı bir şekilde protein ekspresyonu gerçekleştirildi.



Şekil 4.8. 293T hücrelerinde insan TWIST1 ekzojen ekspresyonunun western blot yöntemi ile gösterilmesi.

4.4. 293T Hücrelerinde EGF Muamelesi ile Zamana Bağlı AKT Fosforilasyon Düzeyinin Belirlenmesi

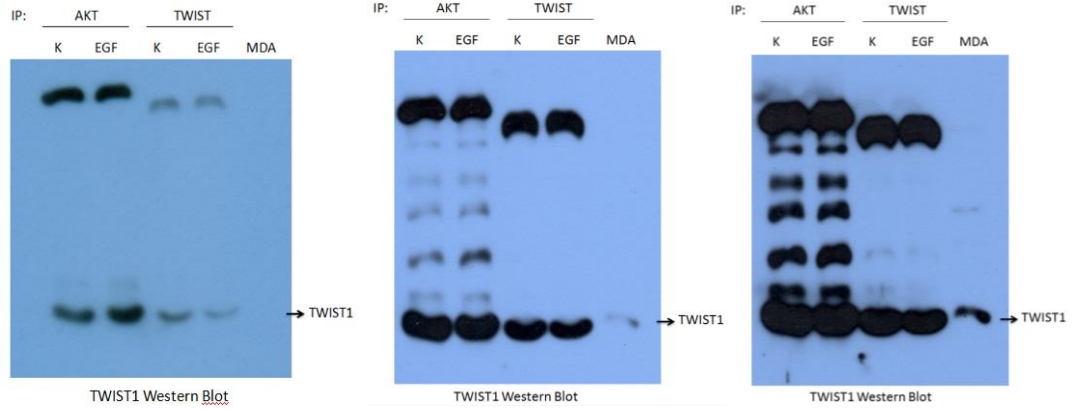
TWIST1 ekspresyonunun 293T hücrelerinde gösterilmesinden sonra yapılan çalışmaların çoğu 293T hücrelerinde yapıldı. EGF-aracılı AKT aktivasyonu çalışmamız için önemli olduğundan bu hücrelerde EGF-aracılı AKT fosforilasyonunun belirlenmesi gerekiyordu. Bunun için, %70-80 konfluent olan hücreleri bir gece boyunca serumsuz ortamda tutup hücrede var olan AKT aktivasyonunun yok olmasını veya minimum seviyeye inmesini sağladıktan sonra hücrelere 10 ng/mL insan Epidermal Growth Factor (EGF) vererek hücreleri 0, 5, 15, 30, 45, 60, 120 ve 180 dk. EGF ile inkübe ettik. Bu çalışmanın sonucuna göre, EGF bu hücrelerde çok hızlı AKT aktivasyonu yapmaktadır. En yüksek fosforilasyon 60. dakikada gözlenmiş ve bu seviye ilerleyen saatlerde hızla azalmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. 293T hücrelerinde zamana bağlı EGF muamelesinde AKT fosforilasyon düzeylerinin belirlenmesi.

4.5. TWIST1 ve AKT'nin Birbirine Bağlanmasının İmmünopresipitasyon ile Gösterilmesi

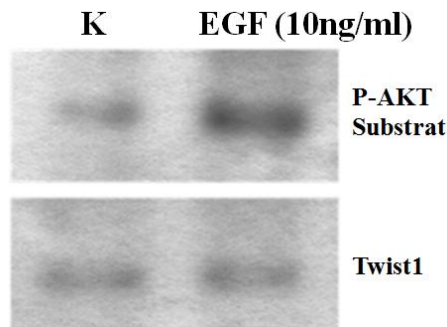
EGF aracılı AKT aktivasyon kinetiğinin belirlenmesinin ardından AKT'nin TWIST1 ile en iyi bağlanacağı zaman açısından 60. dakikanın uygun olduğuna karar verip İmmünopresipitasyon (IP) deneyi yapıldı. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi AKT enzimi Kontrol (K) örneğinde bile TWIST1 ile bağlanmaktadır, EGF muamelesi bu bağlanmayı daha da artırmıştır. TWIST1'in tam pozisyonunu belirlemek için MDA-231 lizatı jelde 5. kuyucuğa yüklendi. Işıma süresinin artırılması ile bağlantı daha net görülmektedir.



Şekil 4.10. TWIST1 ve AKT'nin fiziki olarak bağlanmasının immünopresipitasyon ve western blot yöntemleri ile gösterilmesi.

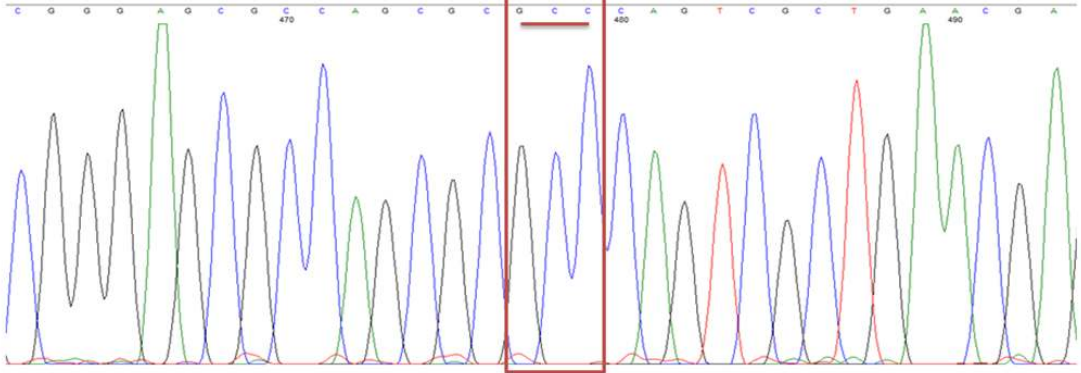
4.6. TWIST1'in AKT Tarafından Fosforile Edilmesinin Gösterilmesi

AKT ve TWIST1'in fiziki olarak birbirine bağlandığını gösterdikten sonra EGF muamelesi ile aktive edilmiş olan AKT'nin TWIST1'i *in vitro* şartlar altında fosforile edip etmediğinin gösterilmesi gerekirdi. Bu soruya cevap vermek için iki ayrı petride çoğaltılan %70-80 konfluent MDA-231 hücreleri gece boyu serumsuz ortamda tutulduktan sonra petrilere biri 60 dk. EGF ile muamele edilmiş diğeri ise muamele edilmemiştir. IP saflaştırmasından sonra Şekil 10'da görüldüğü gibi EGF muamelesi ile aktive olan AKT çok net bir şekilde TWIST1'i fosforile etmektedir. (Şekil 4.11)

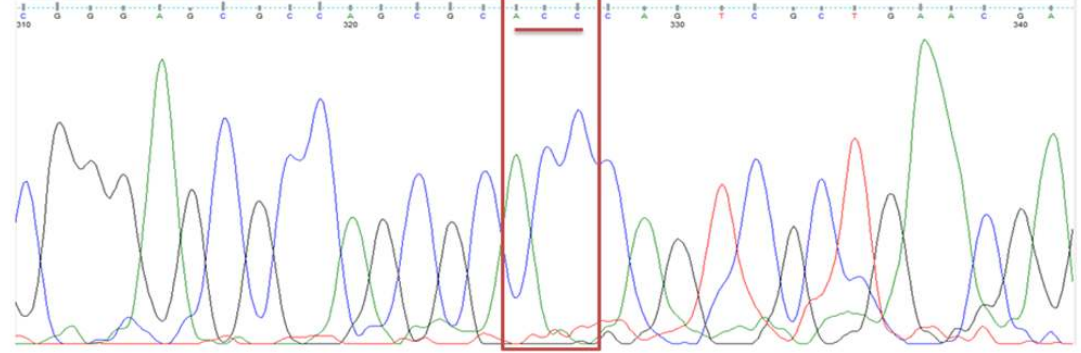


Şekil 4.11. TWIST1'in AKT tarafından fosforile edilmesinin *in vitro* kinaz reaksiyonu ile gösterilmesi.

İnsan TWIST1 T121A (ACC->GCC)

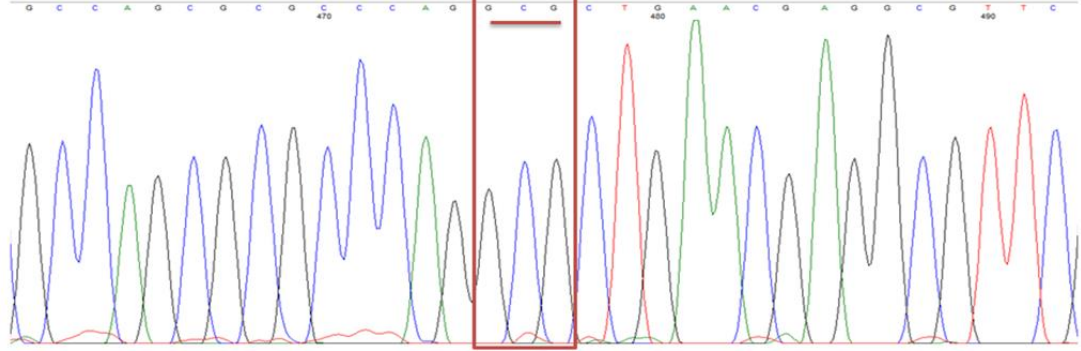


İnsan TWIST1 Normal

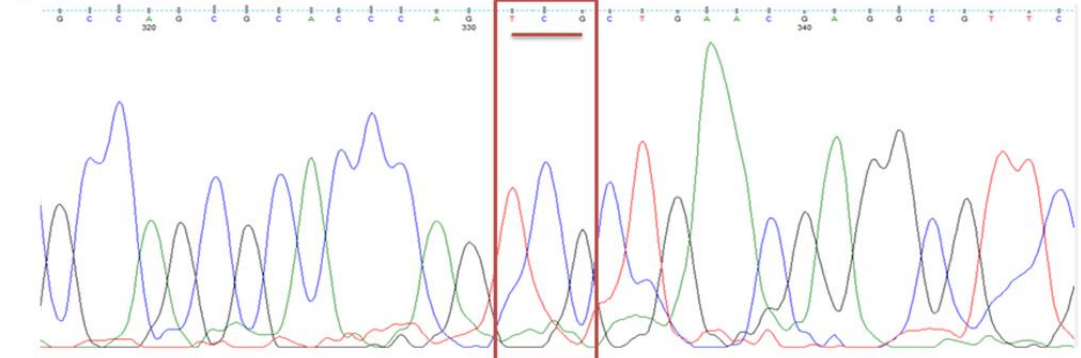


Şekil 4.13. İnsan TWIST1 T121A mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

İnsan TWIST1 S123A (TCG->GCG)

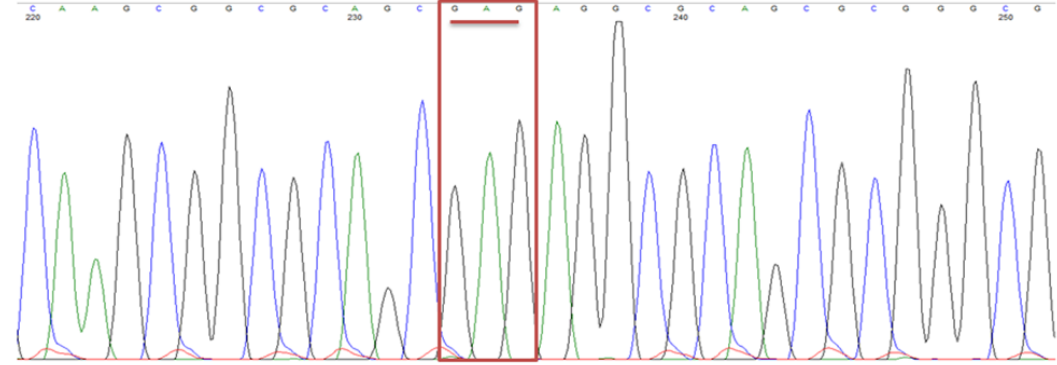


İnsan TWIST1 Normal

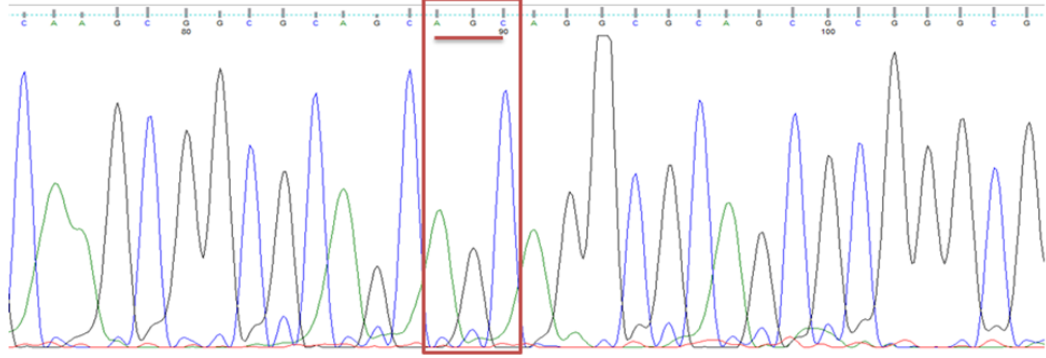


Şekil 4.14. İnsan TWIST1 S123A mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

İnsan TWIST1 S42E (AGC->GAG)

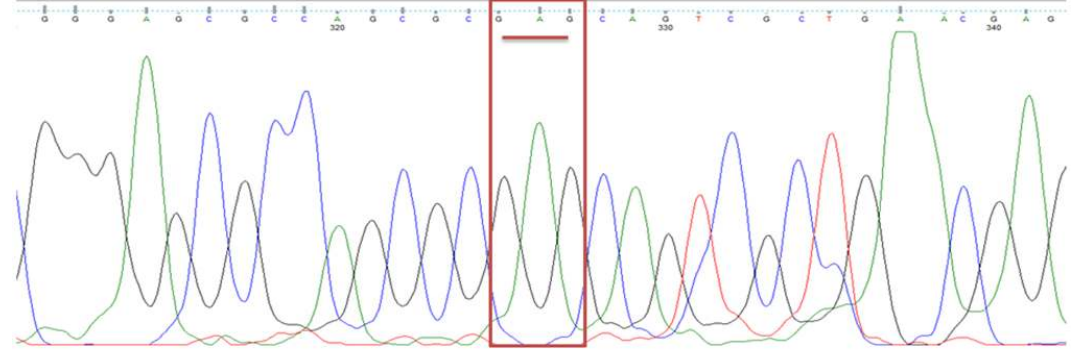


İnsan TWIST1 Normal

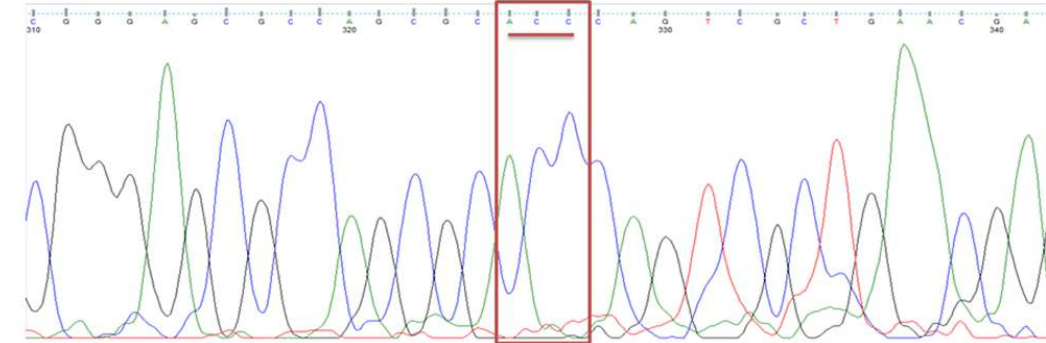


Şekil 4.15. İnsan TWIST1 S42E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

İnsan TWIST1 T121E (ACC->GAG)

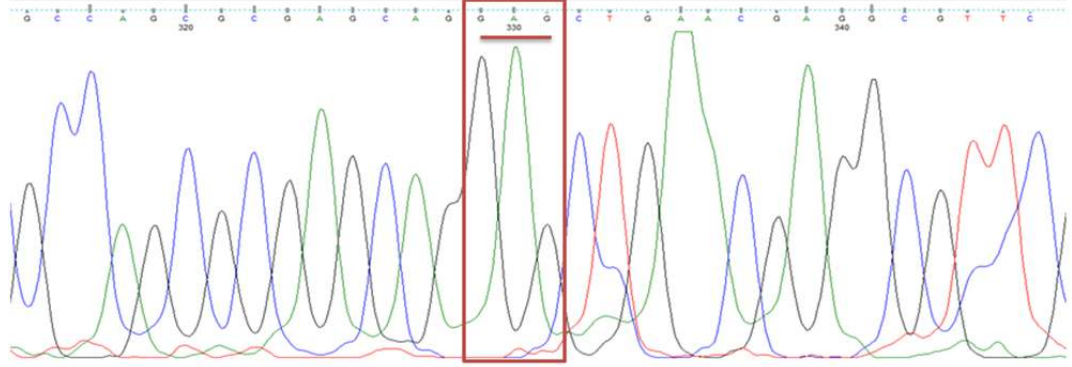


İnsan TWIST1 Normal

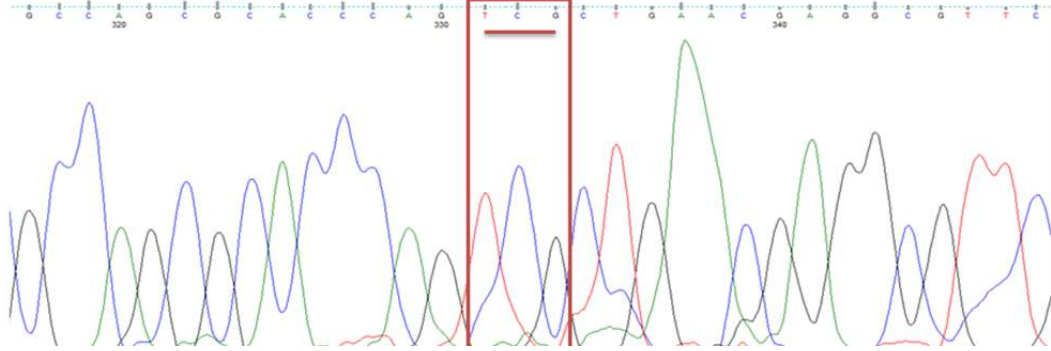


Şekil 4.16. İnsan TWIST1 T121E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

İnsan TWIST1 S123A (TCG->GAG)



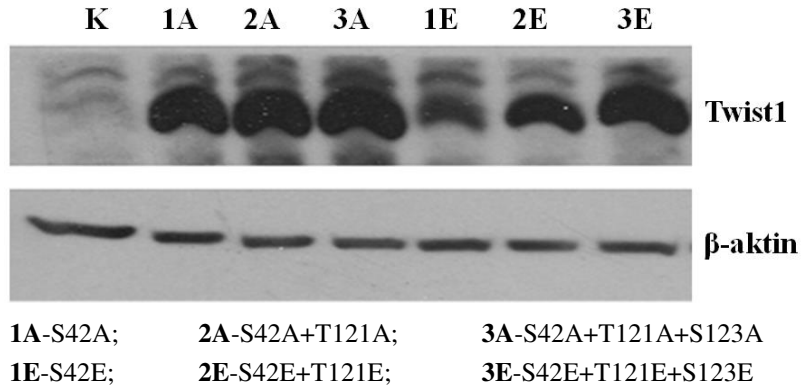
İnsan TWIST1 Normal



Şekil 4.17. İnsan TWIST1 S123E mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

4.8. İnsan TWIST1 Mutantlarının Ekspresyonlarının Gösterilmesi

SDM yöntemi ile mutasyonlar oluşturulduktan sonra elde edilen SDM yöntemine bağlı olarak vektörde meydana gelebilen sonlandırma kodonlarından dolayı protein ekspresyonlarının doğrulanması gerekir. Bu nedenle Kalsiyum Fosfat transfeksiyon yöntemi ile 30 µg plazmit DNA'ları 293T hücrelerine verilmiş ve 72 saat boyunca protein ekspresyonuna devam edilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen lizatlar kullanılarak western blot yöntemi uygulanmıştır. Şekil 4.18'de görüldüğü gibi SDM sürecinde mutantların ekspresyonunu olumsuz etkileyecek bir durum oluşmamış ve tüm mutant proteinler yüksek miktarda ekspresyon göstermişlerdir.

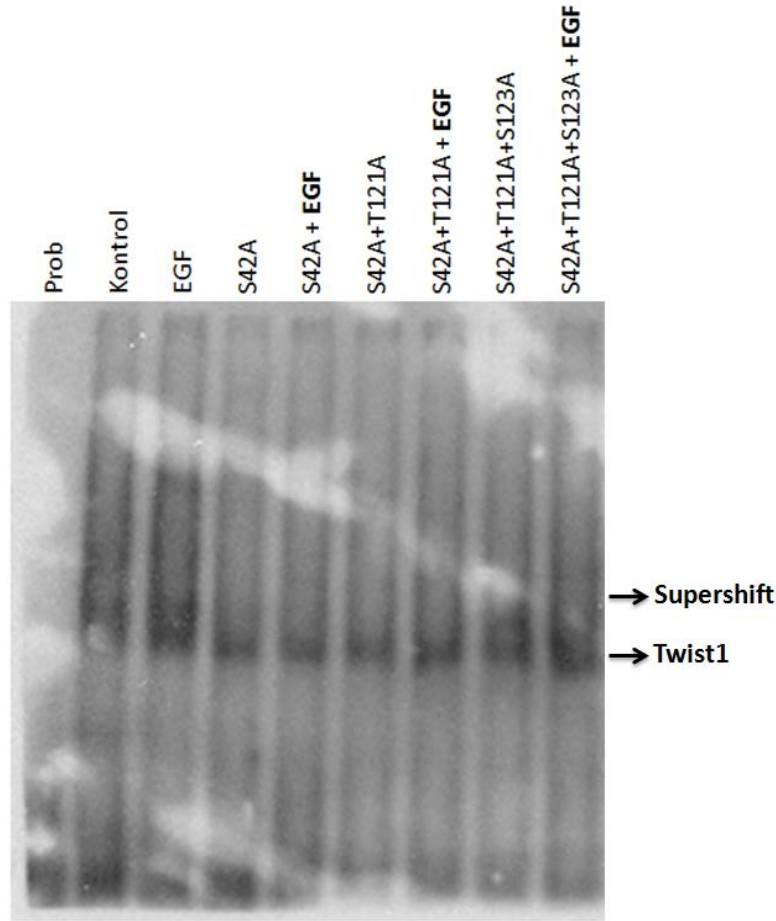


Şekil 4.18. Site-directed mutagenesis yöntemi ile oluşturulmuş insan mutant TWIST1 gen ekspresyonlarının 293T hücrelerinde western blot yöntemi ile gösterilmesi.

4.9. Yabanıl Tip ve Mutant TWIST1'in DNA'ya Bağlanma Kabiliyetinin Jel Retardasyon Deneyi ile Gösterilmesi

4.9.1. İnsan TWIST1'in Alanin Mutantlarının DNA'ya Bağlanma Üzerindeki Etkisinin Gösterilmesi

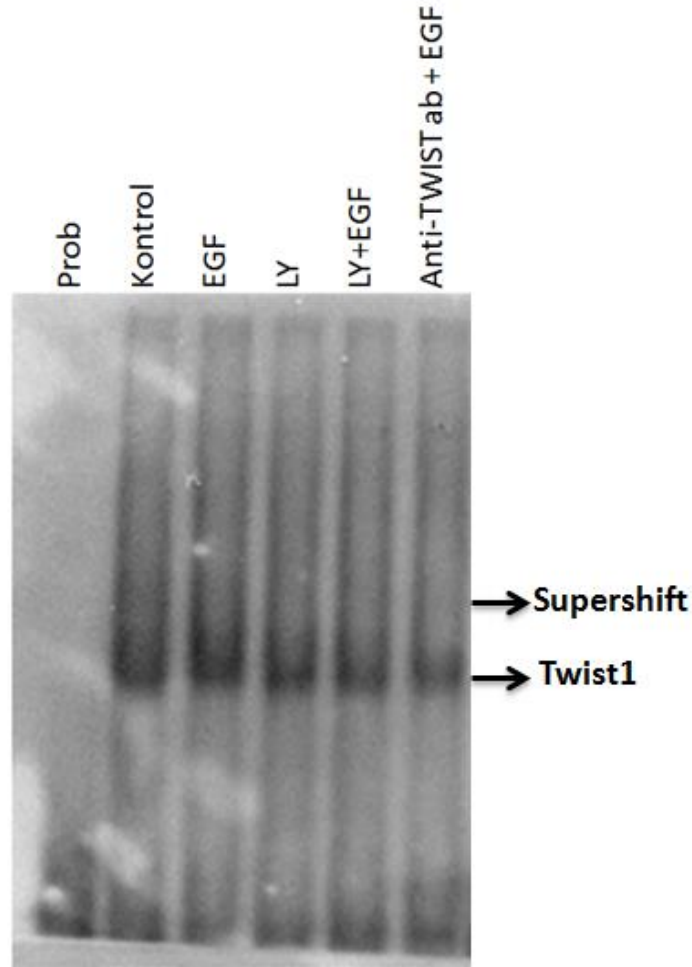
Oluşturulan ve ekspresyonları gösterilen TWIST1'in özellikle Alanin mutantlarının bu proteinin hedef DNA'ya bağlanmasını etkileyip etkilemediği araştırıldı. Bunun için Alanin mutantlarını 293T hücrelerine transfekt ettikten sonra Jel Retardasyon deneyi için uygun hücre lizatları hazırlandı ve deney protokolü uygulandı. Şekil 4.19'da görüldüğü gibi EGF muamelesi yabanıl tip TWIST1'in DNA'ya bağlanmasını yaklaşık 2 kat artırmıştır. Daha önemlisi EGF verilmeyen örneklerde kullandığımız bütün Alanin mutantları TWIST1'in DNA'ya bağlanmasını etkin bir şekilde azaltmıştır, zira buralardaki bant yoğunluğu kontrol örneğin verdiği yoğunluktan daha azdır. Bunun yanı sıra, Alanin mutantlarını taşıyan hücrelere EGF verildiğinde bu örneklerden elde edilen TWIST1 bantının yoğunluğu yabanıl tip TWIST1 bulunduran ve EGF ile muamele edilen hücrelerden elde edilen TWIST1 bant yoğunluğundan çok daha zayıftır. Bu sonuçlar TWIST1'in en azından belirlenen noktalarından AKT-aracılı fosforilasyonunun bu faktörün hedef DNA'ya bağlanmak için gerekli olduğunu göstermektedir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. İnsan TWIST1'in Alanin mutantlarının TWIST1'in hedef DNA'ya bağlanmasına olan etkileri.

4.9.2. PI3K İnhibitörünün (LY-294002) EGF-aracılı TWIST1 Aktivasyonu Üzerine Olan Etkisi

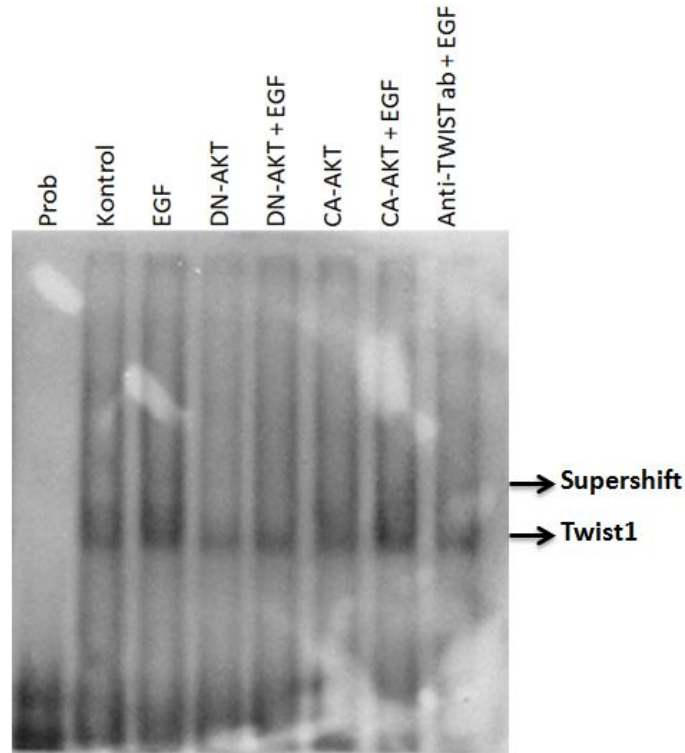
Alanin mutantlarının etkinliği belirledikten sonra AKT aktivasyonunun inhibe edilmesi durumunda bunun yabancı tip TWIST1'in aktivitesini nasıl etkileyeceğini araştırdık. Bunun için devamlı olarak yabancı tip TWIST1 ekspresyon vektörünü bulunduran 293T hücreleri EGF muamelesinden önce 20 μ M PI3K inhibitörü olan LY294002 ile 1 saat muamele edildi. Ardından hücreler 10 ng/mL EGF ile 60 dk. muamele edildi ve Jel Retardasyon deneyi uygulandı. Şekil 4.20'de görüldüğü gibi LY ile ön muamele EGF-aracılı TWIST1 aktivasyonunu belirgin şekilde engellemiştir. Bu deneyde elde ettiğimiz TWIST1 bantının gerçekten TWIST1'e ait olup olmadığını belirlemek için TWIST1+EGF örneğine anti-TWIST1 antikoru (200 ng) reaksiyon süresince ilave edilmiştir. Bu tip reaksiyonlarda antikor, bağlanma reaksiyonu sırasında ya TWIST1'e bağlanarak onun DNA'ya bağlanmasını engeller ya da DNA'ya bağlanmış TWIST1'e bağlanarak daha ağır kompleks oluşumunu sağlayarak "supershift" oluşmasına sebep olur. Bu deneyimizde "supershift" çok zayıf görünmektedir ve oluşan shift'in yoğunluğu TWIST1+EGF sırasından elde edilen yoğunluktan daha azdır. Bu en azından shift oluşturan faktörün TWIST1 olduğunu gösterir.



Şekil 4.20. PI3K İnhibitörü LY294002'nin TWIST1'in DNA'ya bağlanmasına olan etkisi.

4.9.3. Dominant Negatif ve Sürekli Aktif AKT Formlarının EGF-aracılı TWIST1 Aktivasyonu Üzerine Olan Etkileri

AKT inhibisyonunun TWIST1 aktivitesine etkisini ölçtüğümüz bir diğer deneyimiz de AKT'nin "dominant negatif" özellik gösteren formu (DN-AKT) ile sürekli aktif (CA-AKT) formunu ektopik TWIST1 ekspresyonu yapan 293T hücrelerine Kalsiyum Fosfat yöntemi ile transfekte ettik. Bu proteinleri 48 saat sentezledikten sonra hücreler gece boyu serumsuz ortamda tutuldu. Ardından EGF muamelesi yapılarak hücre lizatları toplandı ve belirtilen şekilde Jel Retardasyon deneyi yapıldı. Şekil 4.21'de görüldüğü gibi özellikle DN-AKT'nin eksprese edildiği örneklerde yabancı tip TWIST1'in DNA'ya bağlanma aktivitesi ciddi düzeyde azaltılmıştır, ayrıca DN-AKT, EGF muamelesi ile elde edilen TWIST1 shift'ini de tamamen inhibe etmiştir. Sürekli aktif CA-AKT ekspresyonu yapan hücrelerde TWIST1+EGF örneğinde elde edilen sonuçtan daha güçlü bir sonuç elde edilmemiştir. Bu tip deneylerde dominant negatif örneklerin etkisini görmek daha kolaydır, çünkü TWIST1'in aktivasyonu için ihtiyaç duyulan aktif AKT miktarı genomik AKT tarafından rahatlıkla sağlanabilir. Netice itibarı ile fosforilasyon reaksiyonlarında hem substrat (TWIST1) hem de bunu fosforile edecek aktif AKT için bir üst sınır (treshhold) vardır. Bizim sonucumuza göre endojen AKT bu üst sınırı oluşturabilmektedir. Bir önceki deneyimizde yaptığımız gibi bu deneyde de "supershift" görmek için reaksiyon ortamına anti-TWIST1 antikorundan koyduk, bu kez antikor miktarını 400 ng olarak ilave ettik. Aşağıdaki şekilde de görüldüğü gibi antikor bulunduran örnekte hem orijinal TWIST1 shiftinin yoğunluğu beklenildiği gibi azalmış hem de görünür bir TWIST1'den kaynaklanan "supershift" oluşmuştur.



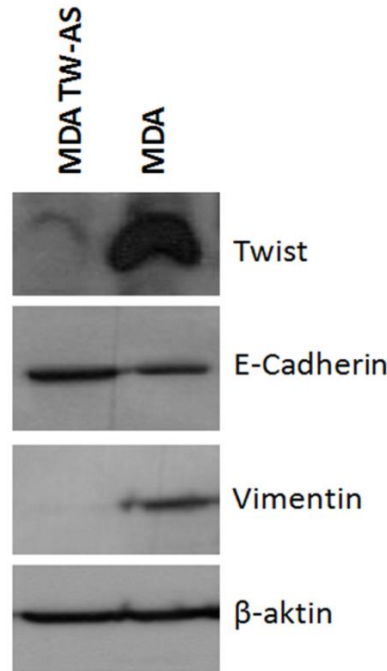
Şekil 4.21. CA- ve DN-AKT ekspresyonlarının EGF-aracılı TWIST1 aktivasyonuna etkileri.

4.10. TWIST1 Tarafından Pozitif veya Negatif Olarak Düzenlenen Genlerin Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Bu çalışmamızda transkripsiyonu TWIST1 tarafından indüklenen Vimentin ve N-Kaderin genleri ile transkripsiyonu TWIST1 tarafından baskılanan E-Kaderin geninin ekspresyonlarına bakıldı. Bu çalışma söz konusu proteinleri bulunduran seçilmiş populasyon üzerinde yapıldı ve hücre lizatı normal büyüme şartlarında aktif proliferasyon aşamasında olan hücrelerden elde edildi.

4.10.1. MDA-MB-231 Hücrelerinde TWIST1 Baskılanmasının EMT Markerlarının Ekspresyonları Üzerindeki Etkisi

Pozitif kontrol olarak kullanarak kullandığımız MDA-MB-231 hücrelerine klonlama sürecinde elde ettiğimiz TWIST1-antisense vektörünü vererek seçtiğimiz MDA-231 klonlarından en yüksek TWIST1 baskılanmasını gösteren klondaki TWIST1, E-Kaderin ve Vimentin ekspresyonları incelendi. TWIST1 deplesyonu durumunda E-Kaderin ekspresyonunda artış, Vimentin ekspresyonunda ise büyük oranda baskılanma meydana gelmiştir (Şekil 4.22).

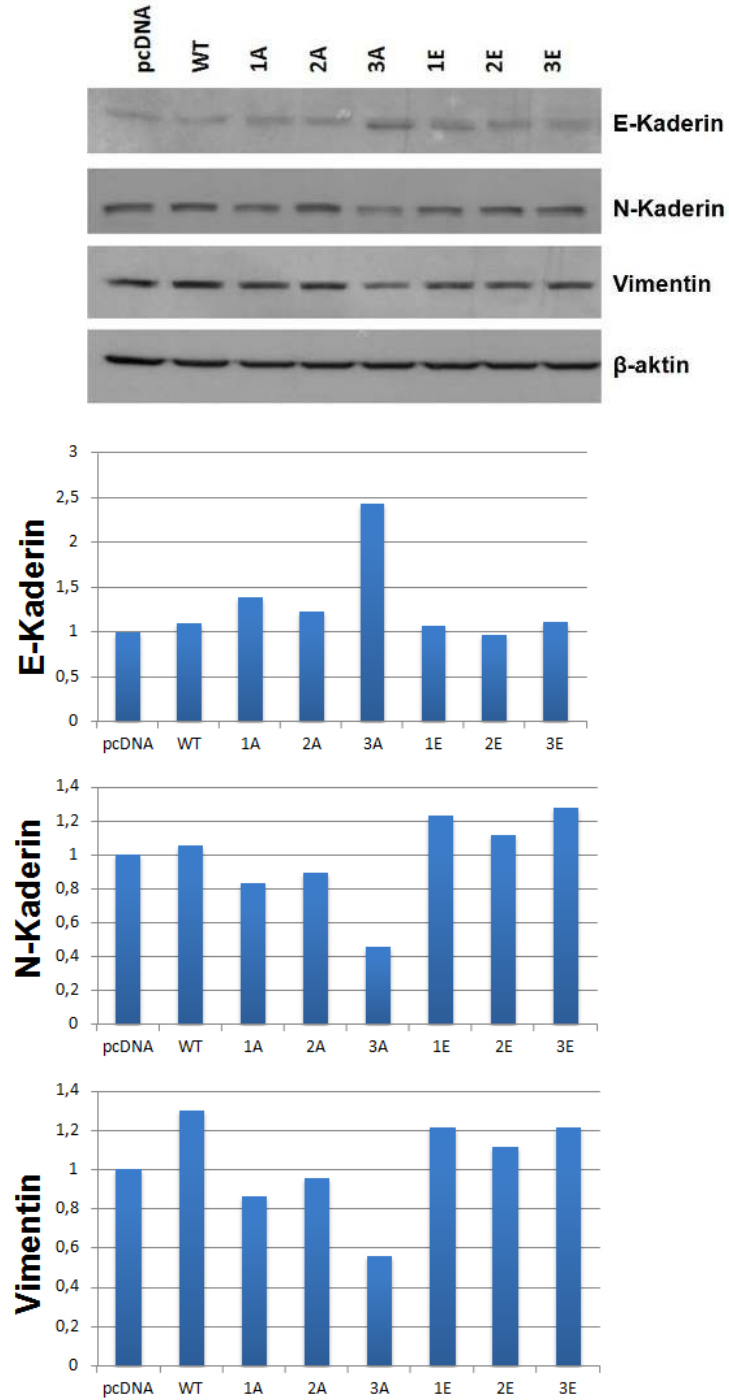


Şekil 4.22. Anti-sense vektörü ile TWIST1 ekspresyonu baskılanan MDA-231 hücrelerinde bu baskılanmanın E-Kaderin ve Vimentin ekspresyonlarına olan etkisi.

4.10.2. 293T Hücrelerinde Eksprese Edilen Yabancı Tip ve Mutant TWIST1 Proteinlerinin EMT Markerları Üzerindeki Gen Ekspresyon Etkisi

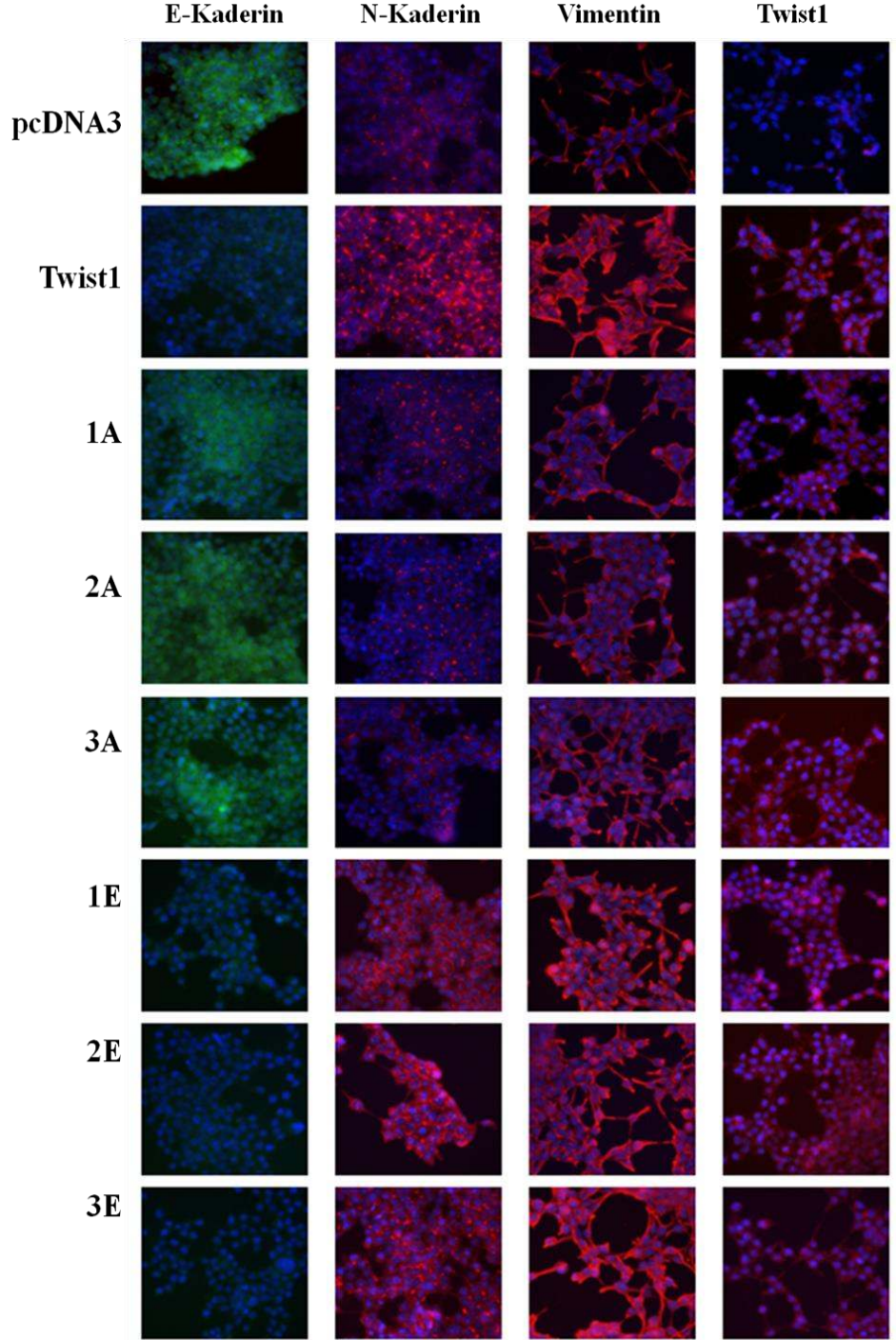
Yabancı Tip ve Mutant TWIST1 proteinlerini eksprese eden populasyonlardan elde edilen ekspresyon seviyeleri aynı blottan elde edilen GAPDH'e (internal kontrol) bölünerek indüksiyon/represyon miktarları nümerik olarak da ifade edilmiştir. Şekil 4.23'de görüldüğü gibi transkripsiyonu yabancı tip TWIST1 tarafından baskılanan E-Kaderin geninin ekspresyonu Alanin mutantlarında kademeli olarak artmış ve 3A mutantında baz alınan seviyenin çok üzerinde bir E-

Kaderin ekspresyonu elde edilmiştir. Bunun aksine yine üç Alanin mutasyonunu taşıyan 3A mutan t ı N-Kaderin ve Vimentin ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ciddi derecede baskılamıştır. Ayrıca yabancı tip TWIST1 gibi 1E ve 3E mutan t ları N-Kaderin ve Vimentin ekspresyonlarını arttırmıştır. Bu ekspresyonların artışında özellikle 1E mutan t ı anlamlı derecede dikkat çekicidir.



Şekil 4.23. 293T hücrelerine yabancı tip ve mutant formları içeren TWIST1-pcDNA3.1(A) transfeksiyonu neticesinde E-Kaderin, N-Kaderin ve Vimentin ekspresyon değişimlerinin western blot yöntemi ile gösterilmesi.

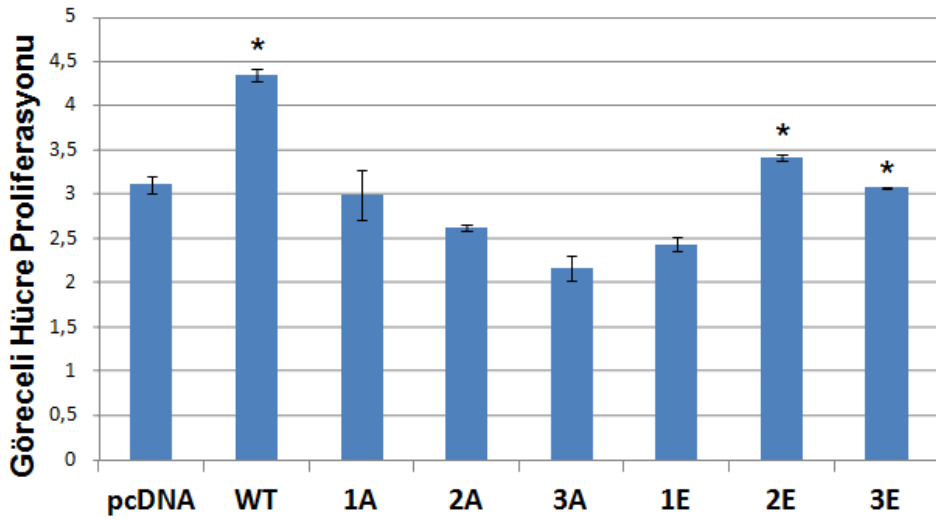
Western blot yöntemiyle gösterdiğimiz bu bulguları doğrulamak adına, ek olarak immünfloresan sitokimya yöntemi ile de yabanıl tip ve mutant TWIST1 proteinlerinin E-Kaderin, N-Kaderin ve Vimentin ekspresyonları üzerindeki etkisini belirledik (Şekil 4.24). Sonuçlara baktığımızda, E-Kaderin ekspresyonu TWIST1'in yabanıl tip ve E mutantlarında baskılanırken, A mutantlarında artmaktadır. N-Kaderin ve Vimentin ekspresyonları ise TWIST1'in yabanıl tip ve E mutantlarında indüklenirken, A mutantlarında baskılanmaktadır.



Şekil 4.24. Yabanıl Tip ve Mutant TWIST1 proteinlerinin E-Kaderin, Vimentin ve N-Kaderin ekspresyonlarına etkisinin immünfloresan sitokimya yöntemi ile gösterilmesi.

4.11. Yabancı Tip ve Mutant TWIST1 Proteinlerini Eksprese Eden 293T Hücrelerinin Proliferasyon Oranları

Bu çalışmamızda oluşturduğumuz TWIST1 mutantlarının biyolojik etkinliklerini hücre doku kültürü şartlarında test etmek istedik. Bunun için Neomisin/G-418 varlığında kararlı olarak ektopik TWIST1 ekspresyonu gösteren hücre populasyonları 4 hafta boyunca seçildi ve göreceli proliferasyon hızları belirlendi (Grafik 4.1). Yabancı Tip TWIST1 eksprese eden hücrelerde anlamlı derecede proliferasyon hızı artmıştır. Bunun aksine Alanin mutantları ise çok net bir şekilde proliferasyonu olumsuz olarak etkilemişlerdir, ancak, Glutamik asit mutantlarından beklenen yabancı tipin üzerinde bir proliferasyon hızı saptanmamıştır.

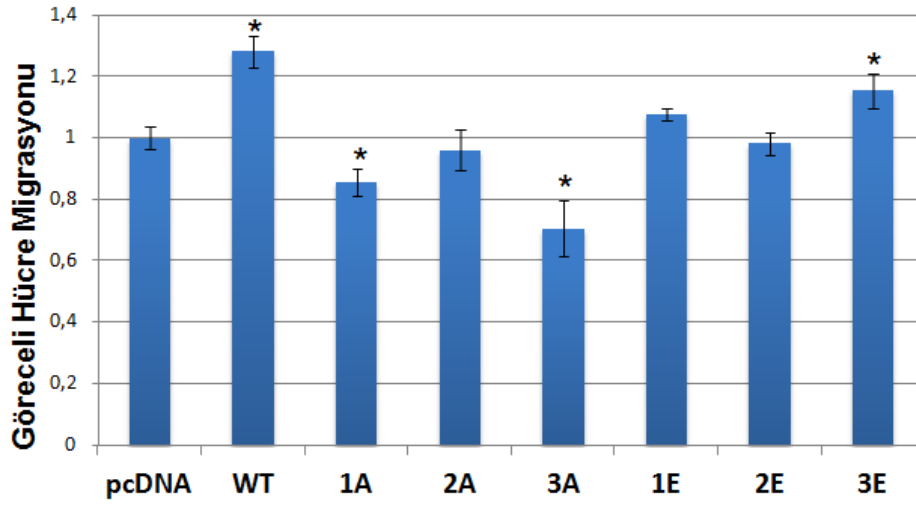


Grafik 4.1. Yabancı tip ve mutant TWIST1'lerin transfekte edildiği 293T hücrelerinde WST-1 aracılı proliferasyon deneyi sonucu.
(ANOVA *p* değerleri; WT-0.001, 2E-0.006, 3E-0.002)

4.12. Yabancı Tip ve Mutant TWIST1 Proteinlerini Eksprese Eden 293T Hücrelerinin Migrasyon Oranları

Yabancı tip ve Mutant TWIST1 eksprese eden hücreler Neomisinli ortamda seçildikten sonra migrasyon oranları Oris Migrasyon Assay deneyi ile belirlendi. Bu deneyde yabancı tip ve altı adet TWIST1 mutantı içeren 293T hücreleri 96 kuyucuklu platede her kuyucuğun ortasına yerleştirildi ve hücreler kitte mevcut olan stoper çevresine ekildi. Hücreler stoperin çevresinde tamamen dolduktan (konfluent) sonra stoper uzaklaştırıldı. Hücreler 10 ng/ml EGF ile muamele edilerek 48-72 saat boyunca orta boşluğa doğru göç etmeleri sağlandı ve göç edilen alanlar belirlendi. Çalışmamızda her bir örnek için 3 kuyucuk kullanıldığından örneklerden elde edilen numerik değerlerin ortalaması alınarak hesaplandı (Grafik 4.2). Bu sonuca göre yabancı tip TWIST1 ekspresyonu yapan hücreler boş vektörü bulunduran hücrelere göre %25 daha hızlı göç etmişlerdir. Tüm çalışmalarımız boyunca gördüğümüz gibi Alanin mutantlarının etkisi burada da net bir şekilde görülmekte ve hücre göçünü baskıladığı anlaşılmaktadır. Tüm sonuçların genel ortalaması düşünüldüğünde oluşturduğumuz Alanin mutantlarının “dominat negatif” etki göstermesi beklenen bir durumdur. Glutamik asit mutantları ise yabancı tip hücre migrasyon oranını

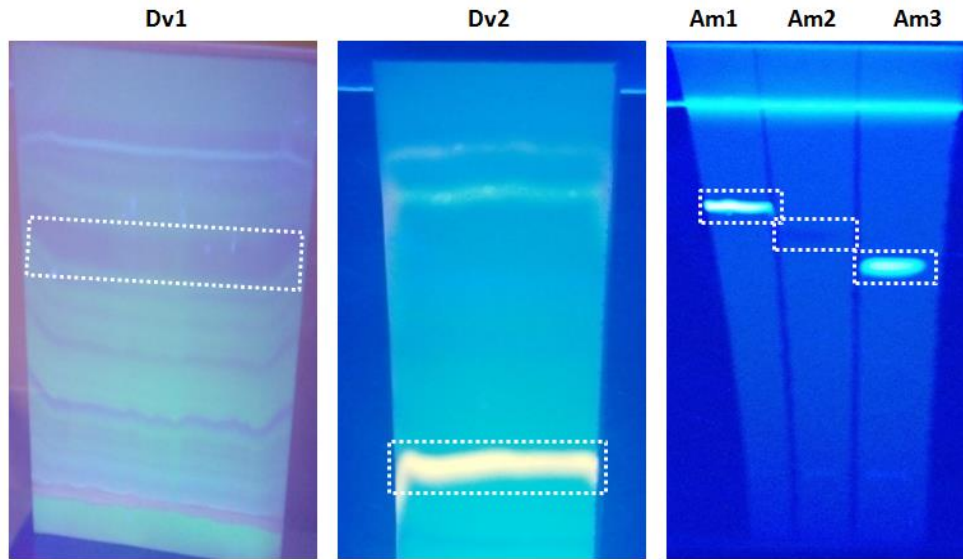
geçmemiştir. Ancak, 3E mutantını eksprese eden hücreler kontrole oranla daha yüksek migrasyon kabiliyeti göstermiştir.



Grafik 4.2. TWIST1 transkripsiyon faktörünün yabancıl ve mutant tiplerini eksprese eden 293T hücrelerinin migrasyon oranları. (ANOVA *p* değerleri; WT-0.000, 1A-0.014, 3A-0.000, 3E-0.014)

4.13. *Dracunculus vulgaris* ve *Achillea millefolium* Metanolik Bitki Ekstraktlarından Elde Edilen Moleküllerin TLC Plakalarda Ayırıştırılması

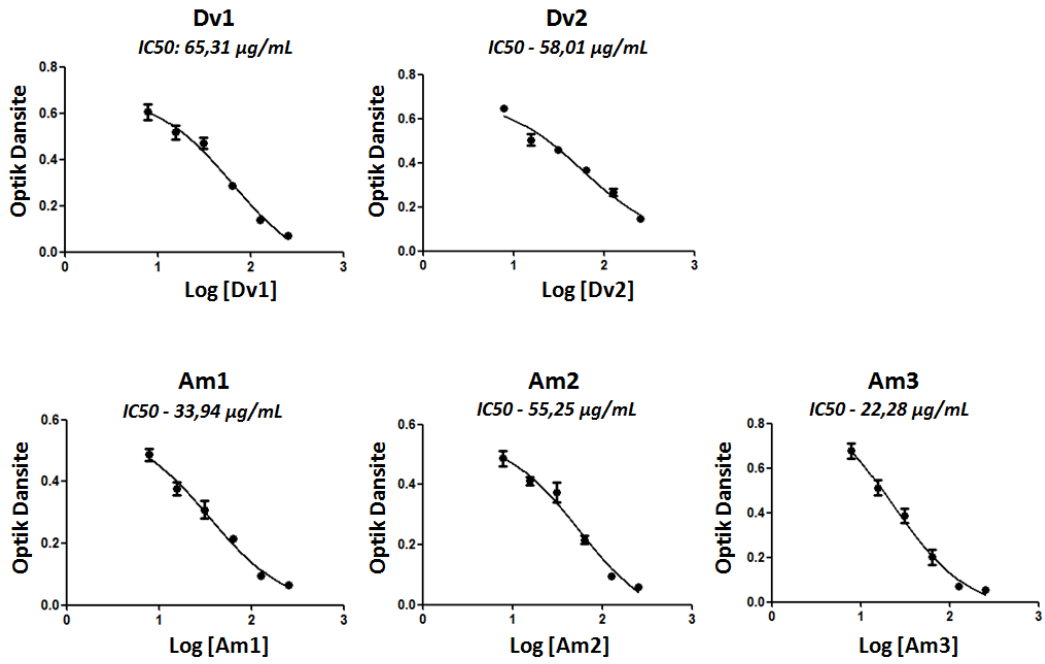
Dracunculus vulgaris (Dv) ve *Achillea millefolium* (Am) bitkilerinin metanolik ekstraktarı hazırlanarak TLC plakalarda kloroform/eter karışımında yürütüldü. Şekil 4.25'te görüldüğü gibi *Dracunculus vulgaris*'ten iki (Dv1 ve Dv2) ve *Achillea millefolium*'dan üç molekül (Am1, Am2 ve Am3) stabil ve yoğun miktarda elde edildiğinden dolayı tercih edilmiştir. Bu moleküller TLC plakada bulundukları yerden kesilerek izole edilmiştir.



Şekil 4.25. *Dracunculus vulgaris* (Dv) ve *Achillea millefolium* (Am) bitki ekstraktlarından elde edilen beş molekülün TLC plakalardaki görüntüsü.

4.14. İzole edilen Organik Moleküllerin IC50 Değerlerinin Belirlenmesi

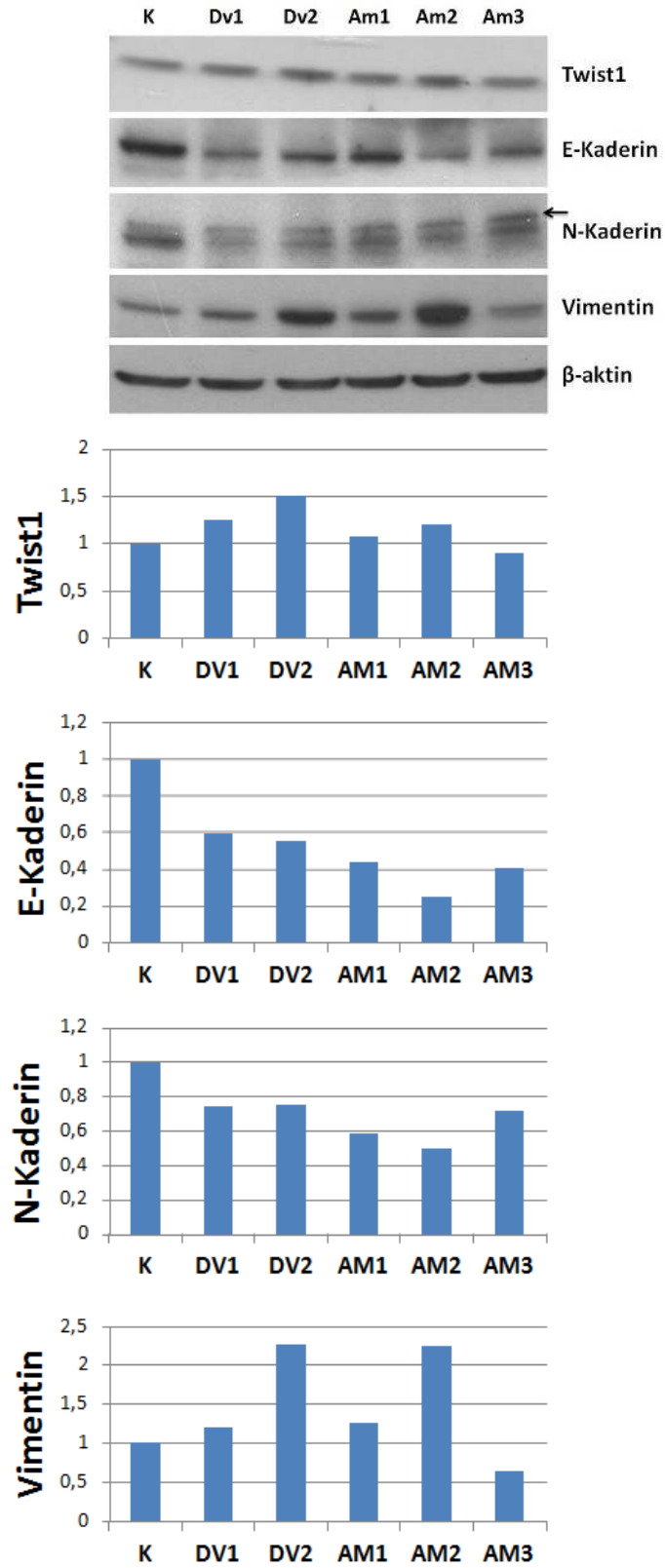
MDA-MB 231 hücrelerinin saflaştırılan Dv1, Dv2, Am1, Am2 ve Am3 moleküllerine duyarlılığını test etmek için bu moleküllerin maksimum inhibitör konsantrasyonun yarısı (IC50) değerlerinin belirlenmesi gerekmektedir. MDA MB 231 hücrelerine 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 ve 0 µg/ml konsantrasyonlarında 72 saat boyunca izole edilen moleküller muamele edildi. WST-1 deneyi ile sitotoksite optik dansite değerleri belirlendi. Buna göre GraphPad Prism 5.1 programı yardımıyla regresyon analizi gerçekleştirilerek grafikler oluşturuldu ve IC50 değerleri belirlendi (Grafik 3).



Grafik 4.3. Dv1, Dv2, Am1, Am2 ve Am3 moleküllerinin IC50 değerlerinin hesaplandığı regresyon eğrileri.

4.15. İzole Edilen Organik Moleküllerin TWIST1 ve EMT Markerleri Üzerindeki Etkileri

IC50 değerleri belirlenen Dv1, Dv2, Am1, Am2 ve Am3 moleküllerinin MDA-MB231 hücrelerindeki TWIST1 ve EMT markerlerinin ekspresyonları üzerindeki etkisini görmek için western blot yöntemi uygulandı. Bunun için %70 konfluent olarak ekilen hücrelere izole edilen her molekülün IC50 değeri kadar miktarda gece boyunca uygulama gerçekleştirildi. Süre sonunda hücre lizatları hazırlandı ve TWIST1, E-Kaderin, N-Kaderin ve Vimentin ekspresyonları gösterildi. Sonuçlar image J programı kullanılarak bant yoğunlukları hesaplandı ve β-aktin ekspresyonuna göre normalize edilerek kontrole kıyaslandı. Bulgularımıza göre Dv1, Am1, Am2 ve Am3 molekülleri TWIST1 ekspresyonunu değiştirmede, yalnız Dv2 TWIST1 ekspresyonunu kontrole göre 1,5 kat arttırdı. Bütün moleküllerin E-Kaderin ekspresyonunu baskıladığını gösterdik. En fazla olarak Am2 molekülü, kontrole göre %75 oranında E-Kaderin ekspresyonunu baskıladı. Ayrıca, Dv2 ve Am2 molekülleri, kontrole oranla iki kattan fazla olmak üzere Vimentin ekspresyonunu indükledi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. İzole edilen Dv1, Dv2, Am1, Am2 ve Am3 moleküllerinin MDA-MB 231 hücrelerinde Twist1, E-Kaderin, N-Kaderin ve Vimentin ekspresyonları üzerindeki etkilerinin western blot yöntemi ile gösterilmesi.

TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2012 yılı verilerine göre Dünya'da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası tanımlanmış ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşmiştir [131]. Bu ölümlerin %90'ı metastaz nedeniyle meydana gelmektedir [43].

Kanser metastazı, primer tümör oluşması neticesinde, mutasyonların artışı ve epigenetik modifikasyonlarla gen ekspresyon düzeylerinin değişimine bağlı olarak gelişir. Bu olayda hücreler Epitelyal Mezenkimal Transisyon (EMT) sürecine girerek epitelyal kökenli bir tümör hücresinin karakterini kaybederek invazyon kabiliyeti yüksek metastatik mezenkimal özellikler kazanır. Bu nedenle araştırmacılar hücresel yollarla etkileşimi olan kavşak noktalarındaki regülatör moleküllerin araştırılması yoluna odaklanmışlardır. Bu moleküllerden birisi AKT Serin/Treonin kinaz enzimidir. AKT, birçok regülatör proteinin fonksiyonunu düzenleyen master regülatör olarak tanımlanan bir enzimdir. Yapılan araştırmalar AKT'nin onkogenik süreçte hücre büyümesi, proliferasyonu, apoptotik hücre ölümü, EMT, anjiyogenez ve metastazda merkezi bir role sahip olduğunu ortaya koymuştur [42], [43], [48].

Metastaz süreci çok yönlü ve kompleks basamakları olan bir süreçtir. Bu süreçte kilit nokta EMT'nin de başlangıç ve en önemli aşamasını oluşturan E-Kaderin kaybıdır. Örneğin, meme kanserinin progresyonu ile ilişkili olarak invazif duktal meme kanseri dokularında %50 oranında E-Kaderin geninde inaktivasyon mutasyonları tanımlanmıştır. İnfiltrate lobular meme kanser dokularında ise çoğu örnekte E-Kaderin kaybının meydana geldiği sonucuna varılmıştır. Buna bağlı olarak tümör dokularında invazif fenotipin geliştiği belirlenmiştir. E-Kaderin ekspresyonunun tekrar sağlandığı durumda ise tümör agresivitesinde azalma meydana gelmektedir [109].

Şimdiye kadar EMT ile ilişkili metastazın moleküler mekanizmasını anlamaya yönelik yapılan araştırmalarda, olayın AKT aktivasyonu ile başladığı ve E-Kaderin ekspresyonunun transkripsiyonel olarak baskılanması ile sonuçlandığı anlaşılmıştır. Metastaz olayında AKT ve E-Kaderin kaybı arasındaki ilişki çok net bir şekilde ortaya konmuştur. Bu bağlamda olayın mekanizmasını açıklamak adına AKT ve E-Kaderin arasındaki ilişkiyi sağlayan fonksiyonel moleküllerin tesbiti çalışmaları hız kazanmıştır. Yang J. ve arkadaşlarının 2004 yılında yayınladıkları çalışmada metastatik olmayan ve metastatik meme karsinoma hücre hatları arasındaki TWIST1 ekspresyonları kıyaslandığında metastatik fenotipin artışına paralel olarak TWIST1 ekspresyonunda da artış meydana geldiği gösterilmiştir. Bu durum *in vivo* olarak da BALB/c farelerde doğrulanmıştır. Ayrıca ekzojen olarak TWIST1 ekspresyonunun sağlandığı normal epitelyal kökenli böbrek hücrelerinde (MDCK) EMT sürecinin başladığı, hücrelerin E-Kaderin baskılanmasıyla beraber

mezenkimal markerlarının arttığı ve hücrelerin invazyon kabiliyetini kazandığı belirlenmiştir. Dolayısıyla, EMT-aracılı metastatik patern gösteren hücrelerde TWIST1 ekspresyonu artmaktadır [25].

EMT-aracılı metastaz indüksiyonunda TWIST1 ve PI3K-AKT yolağı önemli rol oynamaktadır [132], [132]. AKT aktivasyonuna bağlı olarak E-Kaderin sentezinin baskılanması sonucu hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks etkileşiminin azaldığı bilinmektedir [53]. Ancak, AKT aktivasyonuna bağlı E-Kaderin baskılanmasının moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle projemizde bu ilişkiyi açıklayabilecek faktörün TWIST1 olabileceğini düşündük. Bu doğrultuda TWIST1'in protein dizisini incelediğimizde TWIST1'in AKT-aracılı fosforilasyonla aktive olabileceğini öngördük, zira TWIST1 yapısında "RxRxxS/T" konsensus dizisi içinde üç adet AKT fosforilasyon noktası belirledik. Genetik ve biyokimyasal çalışmalara başlamadan hipotezimizi test edebileceğimiz uygun kanser hücre hatlarını belirlemek istedik. Elimizdeki hücrelerde TWIST1 ekspresyon seviyesine baktığımızda metastatik olan hücre hatlarında TWIST1 ekspresyonunun literatürde belirtildiği gibi yüksek olduğunu gösterdik [132]. Endojen TWIST1 seviyesinin yüksek olduğu hücrelerde metastaz ve invazyon kabiliyeti TWIST1'e bağlı olarak gelişiyorsa, metastatik olmayan ve TWIST1 ekspresyonu yapmayan veya çok az yapan hücrelere ekzojen olarak TWIST1 ekspresyonunu sağladığımızda invazyonun artması gerekir diye düşünerek ekzojen TWIST1 ekspresyonlarını çok az TWIST1 ekspresyonu yapan 293T hücrelerinde yaptık. Böylece yabancı tip ve mutant TWIST1'in hücre proliferasyonu ve migrasyona olan etkilerini bu hücrelerde test ettik.

Çalışmamızda, metastatik meme karsinomu hücre hattı olan ve yüksek TWIST1 ekspresyonu gösteren MDA-MB 231 hücrelerini pozitif kontrol ve cDNA kaynağı olarak kullandık. İnsan TWIST1 cDNA'sını amplifiye ettikten sonra bir memeli ekspresyon vektörü olan pcDNA3.1(A) vektörüne in frame olarak klonladık ve ekspresyonunu gösterdik. TWIST1'in AKT tarafından fosforile edildiğini göstermek istediğimizden hem AKT hem de TWIST1 antikorları kullanarak saflaştırdığımız proteinlerle hem AKT ve TWIST1'in birbirine bağlandığını hem de *in vitro* kinaz deneyi ile TWIST1'in AKT tarafından fosforile edildiğini gösterdik. Fosforile olan TWIST1'in fonksiyonelliğini göstermek için hücre çekirdeğinde hedef DNA'ya bağlanmasını "gel retardation" deneyi ile gösterdik. AKT aktivasyonuna sebep olan EGF ile muamele sonunda kontrole göre TWIST1'in DNA'ya bağlanma kabiliyetinde artış, AKT aktivasyonunu engelleyen PI3K inhibitörü LY294002 varlığında ise TWIST1'in DNA'ya bağlanma kabiliyetinde %50 oranında azalma saptadık. Bu deneyi doğrulamak için AKT'nin devamlı aktif formu olan CA-AKT (Constitutively Active-AKT) ve fosforilasyonla aktive olamayan DN-AKT (Dominant Negative-AKT) mutant formlarını ekzojen olarak eksprese ettiğimiz durumda da tekrarladık. DN-AKT eksprese eden hücrelerde TWIST1'in kontrole oranla DNA'ya bağlanma özelliğinde büyük bir azalma meydana gelmiş ve CA-AKT ekspresyonu varlığında ise EGF verilen durumdaki kadar yüksek DNA bağlanması saptanmıştır. Bu sonuçlar TWIST1'in hedef DNA'ya bağlanma özelliğinin AKT tarafından fosforilasyonuna bağlı olduğunu göstermiştir.

TWIST1 protein dizisinde saptadığımız üç adet AKT tanıma dizilerinin hangisi ya da hangilerinin fonksiyonel olup olmadığını doğrulamak için hedef dizilerde Site-Directed Mutagenesis (SDM) yöntemiyle fosforile olan Serin (S) ve Treonin (S) amino asitlerinin fosforile edilemeyen Alanin (A) ve fosforilasyonu taklit eden Glutamik asid (E) formlarına çevirdik. Bunun için S42, S42+T121 ve S42+T121+S123 mutant TWIST1 formlarını oluşturduk ve 293T hücrelerinde ekspresyonlarını gösterdik. TWIST1, “CANNTG” konsensus dizisine uyan “E-Box” bulunduran genlerin promotoruna bağlanarak bu genlerden transkripsiyonel indüksiyon veya represyon yapar. DNA’daki E-kutusu dizi çeşitliliği dimerize haldeki TWIST1 açısından önemlidir. Yapılan araştırmalar homodimer veya heterodimer oluşumuna göre ve TWIST1’in dimerizasyon partnerine göre farklı genlerin transkripsiyonel regülasyonunu sağlayabilmektedir [89]. Örneğin, TWIST1 tercihli olarak TWIST1-E2A dimerizasyonu durumunda “CATATG” dizisine bağlanır [132]. Dolayısıyla, DNA’ya bağlanma dizi özgüllüğünde TWIST1’in dimerizasyon partneri de belirleyici olmaktadır.

Saethre-Chotzen Sendromu (SCS) olgularında DNA bağlanma bölgesindeki T121 ve S123 mutasyonları TWIST1’in PKA tarafından fosforilasyonunu engellemekte ve dimerizasyon partnerleri değiştiğinden SCS ilişkili ekstremitelerde gelişiminde bozukluklar meydana gelmektedir [107]. Fare modelleriyle yapılan çalışmalar AKT-aracılı fosforilasyonla oluşan TWIST1-Hand1 heterodimerlerinin kalp gelişimi açısından önemli olduğunu göstermiştir. Mutasyonlar ile bu dimerizasyon engellediğinde kalp gelişiminde bozukluklar meydana gelmektedir. T121 ve S123 mutantlarını bulunduran farelerde hipertrofi, atriyal ve ventriküler septal defektler gelişmektedir. Bunun yanı sıra Hand1 mutant farelerde de hipertrofi gelişmekte ve doğumdan sonra 1-2 aylık dönemde ölüm görülmektedir [133]. Bunlara göre, TWIST1’in fosforilasyon bölgeleri dimerizasyon partnerinin ve hedef genlerin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu açıdan Alanin mutantlarıyla gerçekleştirdiğimiz jel retardasyon deneyine baktığımızda S42A ve S42A+T121A mutant formlarının DNA’ya bağlanma kabiliyetinin S42A+T121A+S123A mutant formuna göre daha zayıf olduğu görülmektedir. Bu verilere göre özellikle S42 ve T121 amino asitlerinin fosforilasyonunun TWIST1’in hedef DNA’ya bağlanması açısından çok önemli olduğu görülmektedir.

TWIST1 promotorlarına bağlandığı genlerin bazılarının transkripsiyonunu indüklerken bazılarınınkini de baskılar. Literatürde EMT belirteçlerine baktığımızda standart olarak E-Kaderin epitelyal, N-Kaderin ve Vimentin ise mezankimal belirteç olarak değerlendirilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre TWIST1’in Alanin mutantları E-Kaderin ekspresyonundaki baskılamayı ortadan kaldırmaktadır. Normal şartlarda aktif TWIST1 E-Kaderin ekspresyonunu baskılayıp N-Kaderin ve Vimentin ekspresyonlarını indüklediğinden elde edilen Alanin (A) mutantlarının TWIST1 fonksiyonunu tersine çevirmesinin bu bölgelerden fosforilasyonun aslında ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. TWIST1’in Glutamik asit (E) mutantlarına baktığımızda ise Alanin (A) mutantlarının tersine N-Kaderin ve Vimentin ekspresyonunu indüklerken E-kaderin ekspresyonunu baskılamaktadır. Bu sonuçlar fosforilasyona bağlı TWIST1 aktivasyon kurgumuzun doğru olduğunu göstermektedir.

TWIST1'in hücre proliferasyonu üzerindeki etkisine baktığımızda literatürde de belirtildiği gibi yabancı tip TWIST1 hücre proliferasyonunu arttırmaktadır [134], [135]. Oluşturduğumuz mutantlara baktığımızda Alanin mutantlarının tedrici olarak hücre proliferasyonunu baskıladığı görülmektedir. Hücre migrasyonuna baktığımızda ise yabancı tip TWIST1 literatüre uyumlu olarak hücre migrasyonunu arttırmaktadır [136-138]. Elde ettiğimiz bulgulara göre 3A ve 3E mutantları en anlamlı sonuçları vermektedir. 3A mutantı en düşük, 3E mutantı ise yabancı tipe en yakın migrasyon oranını sağlamıştır. Literatürde de belirtildiği gibi fosforile TWIST1 aktin polimerizasyonunu tetikleyerek hücresel morfolojisinin mezenkimale kaymasına ve migrasyon kabiliyeti kazanmasına neden olmaktadır [139].

Son zamanlarda özellikle kanser metastazında TWIST1-aracılı sinyal yolları önemini daha da arttırmıştır. RNAi teknolojisiyle TWIST1'in baskılandığı koşullarda buna paralel olarak tümör hücrelerinde metastaz kabiliyeti azalmaktadır [135]. Bu nedenle TWIST1 kemoterapötik tedavi araştırmalarında yeni bir hedef molekül olarak değerlendirilmektedir. İnhibitör geliştirme çalışmalarında hedef molekülün bağlanma bölgesinin belirlenmiş olması etkinliği açısından önemlidir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre TWIST1'in DNA'ya bağlanma bölgesini hedef alan kimyasal veya peptido-mimetiklerin belirlenmesinde bizim sonuçlarımızın yön gösterici olacağını umuyoruz.

Projemizde *Dracunculus vulgaris* (Yılan yastığı) ve *Achillea millefolium* (Civan perçemi) bitkileri kullanılarak olası TWIST1 inhibitörü tespiti çalışmasını gerçekleştirdik. Bu bitkilerden metanol ekstraksiyonu ile elde ettiğimiz ve saflaştırdığımız Dv1, Dv2, Am1, Am2 ve Am3 moleküllerinin metastatik MDA-MB 231 hücrelerinde TWIST1 ekspresyonu ve EMT markerları olan E-Kaderin, N-Kaderin ve Vimentin üzerindeki etkilerini belirledik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre etkin düzeyde TWIST1 ve EMT baskılanması gerçekleşmedi. Aksine bütün moleküller kontrole göre E-Kaderini baskıladı. Bunun yanı sıra Dv2 ve Am2 molekülleri kontrole göre iki kattan fazla oranda Vimentin ekspresyonunu indükledi. Özellikle Am2 molekülü, E-Kaderini en fazla baskılayan (%75 oranında) ve Vimentini en yüksek oranda (2,5 kat) indükleyen molekül olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre izole ettiğimiz moleküller hedeflediğimiz etkiyi ve TWIST1 baskılanmasını göstermedi, aksine EMT'yi indükleyici etki olan E-Kaderin baskılanmasını sağladı. Ayrıca Vimentin ekspresyonundaki artış da EMT indüksiyonuna katkı sağlamaktadır.

Dv(1,2) ve Am(1,2,3) moleküllerini elde ettiğimiz *Dracunculus vulgaris* ve *Achillea millefolium* bitkilerinin antiproliferatif ve sitotoksik etkileri bilinmektedir [129], [130]. Ancak EMT sürecindeki etkileri hakkındaki bilgilerimiz sınırlıdır. Bu bulgulara göre elde ettiğimiz moleküller MDA-MB 231 hücrelerinde TWIST1'den bağımsız olarak EMT sürecini tetiklediği söylenebilir. Bu etki epitelyal kökenli metastatik kanser hücresi olan MDA-MB 231 hücrelerine özgü olarak da gerçekleşmiş olabilir. Bu nedenle izole ettiğimiz bu moleküllerin farklı hücre tiplerindeki etkileri de araştırılmalıdır.

RNAi temelli araştırmalar TWIST1-hedefli inhibitör moleküllerin geliştirilmesinin metastaz ve kanser kök hücre tedavisini kolaylaştıracakını öngörmektedir [112]. Bu bağlamda projemizde kurguladığımız inhibitör araştırma stratejisi etkin ve pratik bir yöntem olarak değerlendirilebilir. Bu yöntemle farklı bitkisel kaynaklardan yeni moleküllerin araştırılması yoluna gidilebilir. Bu sayede TWIST1 aktivasyonunu ve EMT sürecini baskılayan etkin moleküllerin tespiti, LS-MS gibi yöntemlerle bu moleküllerin karakterizasyonu yapılabilir ve yeni tedavi protokolleri geliştirilebilir.

SONUÇLAR

1. Metastatik epitelyal kökenli kanser hücreleri metastatik olmayanlara göre yüksek TWIST1 ekspresyonu göstermektedir.
2. Ekzojen TWIST1 ekspresyonu epitelyal kökenli hücrelerde metastazı EMT yoluyla indüklemektedir.
3. EGF muamelesi ile aktive olan AKT TWIST1 transkripsiyon faktörüne fiziksel olarak bağlanabilmektedir.
4. Aktif AKT TWIST1'i S42, T121 ve S123 amino asitlerinden fosforile ederek aktivasyonuna neden olur.
5. AKT-aracılı aktive olan TWIST1 hücre çekirdeğine göç ederek E-Kaderin ekspresyonunu baskılamak ve N-Kaderin ve Vimentin ekspresyonlarını indüklemek neticesinde EMT sürecini başlatır.
6. Aktif TWIST1 hücre proliferasyonu ve migrasyonunu indükler.
7. TWIST1'in proliferasyonu, migrasyonu ve EMT'yi indüklemesi bakımından yabanıl tip formu, 3A ve 3E mutant formları önem arz etmektedir. Dolayısıyla TWIST1 amino asit dizilimindeki üç AKT bölgesi de aktivasyon açısından önemlidir.
8. TWIST1'in AKT-aracılı aktivasyon bölgelerinin tanımlanması hedef terapötik moleküllerin araştırılmasında yön gösterici olacaktır.
9. Projemizde *Dracunculus vulgaris* ve *Achillea millefolium* bitkilerinden izole ettiğimiz Dv1, Dv2, Am1, Am2 ve Am3 molekülleri TWIST1 ve EMT'yi baskılayıcı etkileri tespit edilmemiştir.
10. TWIST1-hedefli inhibitör araştırma stratejimiz etkin ve pratik bir yöntem olarak değerlendirilebilir ve bu yöntemle yeni terapötiklerin araştırılması yoluna gidilebilir.

KAYNAKLAR

1. Nakamura M., and Tokura Y. *Epithelial-mesenchymal transition in the skin*. J Dermatol Sci, 2011. **61**(1): p. 7-13.
2. Kalluri R., and Weinberg R.A. *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
3. Kang Y. and Massague J. *Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis*. Cell, 2004. **118**(3): p. 277-9.
4. Yang J., and Weinberg R.A. *Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis*. Dev Cell, 2008. **14**(6): p. 818-29.
5. Tse J.C., and Kalluri R. *Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment*. J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 816-29.
6. Gavert N., and Ben-Ze'ev A. *beta-Catenin signaling in biological control and cancer*. J Cell Biochem, 2007. **102**(4): p. 820-8.
7. van Roy F., and Berx G. *The cell-cell adhesion molecule E-cadherin*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(23): p. 3756-88.
8. Yook J.I., Li X.Y., Ota I., Hu C., Kim H.S., Kim N.H., Cha S.Y., Ryu J.K., Choi Y.J., Kim J., Fearon E.R., Weiss S.J. *A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(12): p. 1398-406.
9. Lau M.T., W.K. So, and Leung P.C. *Fibroblast growth factor 2 induces E-cadherin down-regulation via PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK signaling in ovarian cancer cells*. PLoS One. 2013. **8**(3): p. e59083.
10. Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
11. Onder T.T., Gupta P.B., Mani S.A., Yang J., Lander E.S., Weinberg R.A., *Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways*. Cancer Res, 2008. **68**(10): p. 3645-54.
12. Stahl P.J. and Felsen D. *Transforming growth factor-beta, basement membrane, and epithelial-mesenchymal transdifferentiation: implications for fibrosis in kidney disease*. Am J Pathol, 2001. **159**(4): p. 1187-92.
13. Wang Z.N. and Xu H.M. *Relationship between collagen IV expression and biological behavior of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2000. **6**(3): p. 438-439.
14. Espinosa Neira, R. and Salazar E.P. *Native type IV collagen induces an epithelial to mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A*. Int J Biochem Cell Biol. 2012. **44**(12): p. 2194-203.
15. Colognato, H. and Yurchenco P.D. *Form and function: the laminin family of heterotrimers*. Dev Dyn, 2000. **218**(2): p. 213-34.
16. Spaderna S., Schmalhofer O., Hlubek F., Berx G., Eger A., Merkel S., Jung A., Kirchner T., Brabletz T. *A transient, EMT-linked loss of basement*

- membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. Gastroenterology*, 2006. **131**(3): p. 830-40.
17. Yoon S.O., Park S.J., Yun C.H., Chung A.S. *Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. J Biochem Mol Biol*, 2003. **36**(1): p. 128-37.
 18. Deryugina E.I. and Quigley J.P. *Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer Metastasis Rev*, 2006. **25**(1): p. 9-34.
 19. Fuchs, M., Hermannstädter C., Specht K., Knyazev P., Ullrich A., Rosivatz E., Busch R., Hutzler P., Höfler H., Lubber B. *Effect of tumor-associated mutant E-cadherin variants with defects in exons 8 or 9 on matrix metalloproteinase 3. J Cell Physiol*, 2005. **202**(3): p. 805-13.
 20. Lee K.H., Choi E.Y., Hyun M.S., Jang B.I., Kim T.N., Kim S.W., Song S.K., Kim J.H., Kim J.R. *Association of extracellular cleavage of E-cadherin mediated by MMP-7 with HGF-induced in vitro invasion in human stomach cancer cells. Eur Surg Res*, 2007. **39**(4): p. 208-15.
 21. Hajra K.M., D.Y. Chen, and Fearon E.R. *The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. Cancer Res*, 2002. **62**(6): p. 1613-8.
 22. Peinado H., Ballestar E., Esteller M., Cano A. *Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. Mol Cell Biol*, 2004. **24**(1): p. 306-19.
 23. Sanchez-Tillo, 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*, 2007. **29**(24): p. 3490-500.
 24. Vandewalle C., Comijn J., De Craene B., Vermassen P., Bruyneel E., Andersen H., Tulchinsky E., Van Roy F., Berx G. *SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(20): p. 6566-78.
 25. Yang J., Mani S.A., Donaher J.L., Ramaswamy S., Itzykson R.A., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg R.A. *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell*, 2004. **117**(7): p. 927-39.
 26. Arboleda M.J., Lyons J.F., Kabbinnavar F.F., Bray M.R., Snow B.E., Ayala R., Danino M., Karlan B.Y., Slamon D.J. *Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. Cancer Res*, 2003. **63**(1): p. 196-206.
 27. 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): p. 1023-34.
 28. Kim D., Kim S., Koh H., Yoon S.O., Chung A.S., Cho K.S., Chung J. *Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. FASEB J*, 2001. **15**(11): p. 1953-62.
 29. Tanno S., Tanno S., Mitsuuchi Y., Altomare D.A., Xiao G.H. Testa JR. *AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. Cancer Res*, 2001. **61**(2): p. 589-93.

30. Larue L. and Bellacosa A: *Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways*. *Oncogene*, 2005. **24**(50): p. 7443-54.
31. Manning, B.D. and Cantley L.C. *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
32. Coffey P.J. and Woodgett J.R. *Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families*. *Eur J Biochem*, 1991. **201**(2): p. 475-81.
33. Jones P.F., Jakubowicz T., Pitossi F.J., Maurer F., Hemmings B.A., *Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(10): p. 4171-5.
34. Cheng J.Q., Godwin A.K., Bellacosa A., Taguchi T., Franke T.F., Hamilton T.C., Tsichlis P.N. Testa JR. *AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(19): p. 9267-71.
35. Brodbeck D., Cron P., and Hemmings B.A. *A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(14): p. 9133-6.
36. Hanada M., Feng J., and Hemmings, B.A. *Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1697**(1-2): p. 3-16.
37. Walker K.S., Deak M., Paterson A., Hudson K., Cohen P., Alessi D.R. *Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha*. *Biochem J*, 1998. **331** (Pt 1): p. 299-308.
38. James S.R., Downes C.P., Gigg R., Grove S.J., Holmes A.B., Alessi D.R. *Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation*. *Biochem J*, 1996. **315** (Pt 3): p. 709-13.
39. Frech M., Andjelkovic M., Ingley E., Reddy K.K., Falck J.R., Hemmings B.A. *High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(13): p. 8474-81.
40. Peterson, R.T. and Schreiber S.L. *Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family*. *Curr Biol*, 1999. **9**(14): p. R521-4.
41. Andjelkovic M., Alessi D.R., Meier R., Fernandez A., Lamb N.J., Frech M., Cron P., Cohen P., Lucocq J.M., Hemmings B.A. *Role of translocation in the activation and function of protein kinase B*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(50): p. 31515-24.
42. Kandel E.S. and Hay N. *The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB*. *Exp Cell Res*, 1999. **253**(1): p. 210-29.
43. Qiao, M., Sheng S., and Pardee A.B. *Metastasis and AKT activation*. *Cell Cycle*, 2008. **7**(19): p. 2991-6.
44. Kallergi G., Agelaki S., Kalykaki A, Stournaras C, Mavroudis D, Georgoulas V. *Phosphorylated EGFR and PI3K/Akt signaling kinases are expressed in circulating tumor cells of breast cancer patients*. *Breast Cancer Res*, 2008. **10**(5): p. R80.

45. Schulze W.X., Deng L. and Mann M. *Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family*. Mol Syst Biol, 2005. **1**: p. 2005 0008.
46. Zarich N., Oliva J.L., Martínez N., Jorge R., Ballester A., Gutiérrez-Eisman S., García-Vargas S., Rojas J.M. *Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(8): p. 3591-7.
47. McCubrey J.A., Steelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L., Wong E.W., Chang F., Lehmann B., Terrian D.M., Milella M., Tafuri A., Stivala F., Libra M., Basecke J., Evangelisti C., Martelli A.M., Franklin R.A. *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1263-84.
48. Fresno Vara J.A., Casado E., de Castro J., Cejas P., Belda-Iniesta C., González-Barón M. *PI3K/Akt signalling pathway and cancer*. Cancer Treat Rev, 2004. **30**(2): p. 193-204.
49. Brazil D.P. and Hemmings B.A. *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(11): p. 657-64.
50. Maehama, T. and Dixon J.E. *The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13375-8.
51. Zhou M., Gu L., Findley H.W., Jiang R., Woods W.G. *PTEN reverses MDM2-mediated chemotherapy resistance by interacting with p53 in acute lymphoblastic leukemia cells*. Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6357-62.
52. Kohn A.D., Takeuchi F., and Roth, R.A. *Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 21920-6.
53. Grille S.J., Bellacosa A., Upson J., Klein-Szanto A.J., van Roy F., Lee-Kwon W., Donowitz M., Tsichlis P.N., Larue L. *The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines*. Cancer Res, 2003. **63**(9): p. 2172-8.
54. Guarino M., Rubino B., and Ballabio G. *The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology*. Pathology, 2007. **39**(3): p. 305-18.
55. Wang W.S., Yu S.L., Yang X.S., Chang S.D., Hou J.Q. *Expression and significance of twist and E-cadherin in ovarian cancer tissues*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013 **14**(2): p. 669-72.
56. Doble B.W. and Woodgett J.R. *Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial-mesenchymal transitions*. Cells Tissues Organs, 2007. **185**(1-3): p. 73-84.
57. Kanayama S., Yamada Y., Kawaguchi R., Tsuji Y., Haruta S., Kobayashi H. *Hepatocyte growth factor induces anoikis resistance by up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in uterine endometrial cancer cells*. Oncol Rep, 2008. **19**(1): p. 117-22.
58. Strizzi L., Bianco C., Normanno N., Seno M., Wechselberger C., Wallace-Jones B., Khan N.I., Hirota M., Sun Y., Sanicola M., Salomon D.S. *Epithelial mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from MMTV-Cripto-1 transgenic mice*. J Cell Physiol, 2004. **201**(2): p. 266-76.

59. Bourguignon, L.Y., *Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(4): p. 251-9.
60. Quilliam, L.A., Castro A.F., Rogers-Graham K.S., Martin C.B., Der C.J., Bi C. *M-Ras/R-Ras3, a transforming ras protein regulated by Sos1, GRF1, and p120 Ras GTPase-activating protein, interacts with the putative Ras effector AF6*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 23850-7.
61. Ward, K.R., Zhang K.X., Somasiri A.M., Roskelley C.D., Schrader J.W. *Expression of activated M-Ras in a murine mammary epithelial cell line induces epithelial-mesenchymal transition and tumorigenesis*. Oncogene, 2004. **23**(6): p. 1187-96.
62. Bokoch, G.M., *Biology of the p21-activated kinases*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 743-81.
63. Kumar, R., Gururaj A.E., and Barnes C.J. *p21-activated kinases in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 459-71.
64. Zhou, G.L., Zhuo Y., King C.C., Fryer B.H., Bokoch G.M., Field J. *Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(22): p. 8058-69.
65. Xue, G. and Hemmings B.A. *PKB/Akt-dependent regulation of cell motility*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(6): p. 393-404.
66. Enomoto, A., Murakami H., Asai N., Morone N., Watanabe T., Kawai K., Murakumo Y., Usukura J., Kaibuchi K., Takahashi M. *Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE*. Dev Cell, 2005. **9**(3): p. 389-402.
67. Jiang, P., Enomoto A., Jijiwa M., Kato T., Hasegawa T., Ishida M., Sato T., Asai N., Murakumo Y., Takahashi M. *An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells*. Cancer Res, 2008. **68**(5): p. 1310-8.
68. Natsume A., Kato T., Kinjo S., Enomoto A., Toda H., Shimato S., Ohka F., Motomura K., Kondo Y., Miyata T., Takahashi M., Wakabayashi T. *Girdin maintains the stemness of glioblastoma stem cells*. Oncogene, 2012. **31**(22): p. 2715-24.
69. Yang L., Dan H.C., Sun M., Liu Q., Sun X.M., Feldman R.I., Hamilton A.D., Polokoff M., Nicosia S.V., Herlyn M., Sebt S.M., Cheng J.Q. *Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt*. Cancer Res, 2004. **64**(13): p. 4394-9.
70. Qian Y., Zhong X., Flynn D.C., Zheng J.Z., Qiao M., Wu C., Dedhar S., Shi X., Jiang B.H. *ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling*. Oncogene, 2005. **24**(19): p. 3154-65.
71. Ravid D., Maor S., Werner H., Liscovitch M. *Caveolin-1 inhibits cell detachment-induced p53 activation and anoikis by upregulation of insulin-like growth factor-I receptors and signaling*. Oncogene, 2005. **24**(8): p. 1338-47.
72. Ravid D., Chuderland D., Landsman L., Lavie Y., Reich R., Liscovitch M. *Filamin A is a novel caveolin-1-dependent target in IGF-I-stimulated cancer cell migration*. Exp Cell Res, 2008. **314**(15): p. 2762-73.

73. Meima M.E., Webb B.A., Witkowska H.E., Barber D.L. *The sodium-hydrogen exchanger NHE1 is an Akt substrate necessary for actin filament reorganization by growth factors*. J Biol Chem, 2009. **284**(39): p. 26666-75.
74. Magalhaes M.A., Larson D.R., Mader C.C., Bravo-Cordero J.J., Gil-Henn H., Oser M., Chen X., Koleske A.J., Condeelis J. *Cortactin phosphorylation regulates cell invasion through a pH-dependent pathway*. J Cell Biol, 2011. **195**(5): p. 903-20.
75. Zhu Q.S., Rosenblatt K., Huang K.L., Lahat G., Brobey R., Bolshakov S., Nguyen T., Ding Z., Belousov R., Bill K., Luo X., Lazar A., Dicker A., Mills G.B., Hung M.C., Lev D. *Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion*. Oncogene, 2011. **30**(4): p. 457-70.
76. Lahat G., Zhu Q.S., Huang K.L., Wang S., Bolshakov S., Liu J., Torres K., Langley R.R., Lazar A.J., Hung M.C., Lev D. *Vimentin is a novel anti-cancer therapeutic target; insights from in vitro and in vivo mice xenograft studies*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10105.
77. Satelli, A. and Li S., *Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(18): p. 3033-46.
78. Zumbunn J., Kinoshita K., Hyman A.A., Näthke I.S. *Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation*. Curr Biol, 2001. **11**(1): p. 44-9.
79. Thisse, B., el Messal M., and Perrin-Schmitt F. *The twist gene: isolation of a Drosophila zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(8): p. 3439-53.
80. Simpson, P., *Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in Drosophila Embryos*. Genetics, 1983. **105**(3): p. 615-32.
81. Wieschaus, E., Nusslein-Volhard C., and Kluding H. *Kruppel, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation*. Dev Biol, 1984. **104**(1): p. 172-86.
82. Franco H.L., Cassasnovas J., Rodriguez-Medina J.R., Cadilla C.L. *Redundant or separate entities?--roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(4): p. 1177-86.
83. Howard T.D., Paznekas W.A., Green E.D., Chiang L.C., Ma N., Ortiz de Luna R.I., Garcia Delgado C., Gonzalez-Ramos M., Kline A.D., Jabs E.W. *Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome*. Nat Genet, 1997. **15**(1): p. 36-41.
84. Qin Q., Xu Y., He T., Qin C., Xu J. *Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms*. Cell Res, 2012. **22**(1): p. 90-106.
85. Wang S.M., Coljee V.W., Pignolo R.J., Rotenberg M.O., Cristofalo V.J., Sierra F., *Cloning of the human twist gene: its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues*. Gene, 1997. **187**(1): p. 83-92.
86. Cheng, G.Z., , Zhang W.Z., Sun M., Wang Q., Coppola D., Mansour M., Xu L.M., Costanzo C., Cheng J.Q., Wang L.H., *Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function*. J Biol Chem, 2008. **283**(21): p. 14665-73.

87. Wallerand H., Robert G., Pasticier G., Ravaud A., Ballanger P., Reiter R.E., Ferrière J.M., *The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers*. Urol Oncol, 2010. **28**(5): p. 473-9.
88. Singh, S. and Gramolini A.O. *Characterization of sequences in human TWIST required for nuclear localization*. BMC Cell Biol, 2009. **10**: p. 47.
89. Maia A.M., da Silva J.H., Mencalha A.L., Caffarena E.R., Abdelhay E., *Computational modeling of the bHLH domain of the transcription factor TWIST1 and R118C, S144R and K145E mutants*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 184.
90. Shiota M., Yokomizo A., Tada Y., Uchiumi T., Inokuchi J., Tatsugami K., Kuroiwa K., Yamamoto K., Seki N., Naito S., *P300/CBP-associated factor regulates Y-box binding protein-1 expression and promotes cancer cell growth, cancer invasion and drug resistance*. Cancer Sci, 2010. **101**(8): p. 1797-806.
91. Kadesch T., *Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins*. Cell Growth Differ, 1993. **4**(1): p. 49-55.
92. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 415-28.
93. El Ghouzzi V., Legeai-Mallet L., Benoist-Lasselin C., Lajeunie E., Renier D., Munnich A., Bonaventure J., *Mutations in the basic domain and the loop-helix II junction of TWIST abolish DNA binding in Saethre-Chotzen syndrome*. FEBS Lett, 2001. **492**(1-2): p. 112-8.
94. Lister, J.A. and Baron M.H. *Induction of basic helix-loop-helix protein-containing complexes during erythroid differentiation*. Gene Expr, 1998. **7**(1): p. 25-38.
95. Olson, E.N., *MyoD family: a paradigm for development?* Genes Dev, 1990. **4**(9): p. 1454-61.
96. Anderson D.J., Groves A., Lo L., Ma Q., Rao M., Shah N.M., Sommer L. *Cell lineage determination and the control of neuronal identity in the neural crest*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1997. **62**: p. 493-504.
97. Thomas T., Yamagishi H., Overbeek P.A., Olson E.N., Srivastava D. *The bHLH factors, dHAND and eHAND, specify pulmonary and systemic cardiac ventricles independent of left-right sidedness*. Dev Biol, 1998. **196**(2): p. 228-36.
98. Murray, S.S., Glackin C.A., Winters K.A., Gazit D., Kahn A.J., Murray E.J. *Expression of helix-loop-helix regulatory genes during differentiation of mouse osteoblastic cells*. J Bone Miner Res, 1992. **7**(10): p. 1131-8.
99. Pettersson A.T., Laurencikiene J., Mejhert N., Näslund E., Bouloumié A., Dahlman I., Arner P., Rydén M. *A possible inflammatory role of twist1 in human white adipocytes*. Diabetes. **59**(3): p. 564-71.
100. Cheng G.Z., Chan J., Wang Q., Zhang W., Sun C.D., Wang L.H. *Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel*. Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 1979-87.
101. Lo H.W., Hsu S.C., Xia W., Cao X., Shih J.Y., Wei Y., Abbruzzese J.L., Hortobagyi G.N., Hung M.C. *Epidermal growth factor receptor*

- cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression.* Cancer Res, 2007. **67**(19): p. 9066-76.
102. Hamamori, Y., Sartorelli V., Ogryzko V., Puri P.L., Wu H.Y., Wang J.Y., Nakatani Y., Kedes L., *Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A.* Cell, 1999. **96**(3): p. 405-13.
 103. Kwok W.K., Ling M.T., Yuen H.F., Wong Y.C., Wang X. *Role of p14ARF in TWIST-mediated senescence in prostate epithelial cells.* Carcinogenesis, 2007. **28**(12): p. 2467-75.
 104. Maestro R., Dei Tos A.P., Hamamori Y., Krasnokutsky S., Sartorelli V., Kedes L., Doglioni C., Beach D.H., Hannon G.J. *Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis.* Genes Dev, 1999. **13**(17): p. 2207-17.
 105. Thisse B., Stoetzel C., Gorostiza-Thisse C., Perrin-Schmitt F. *Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early Drosophila embryos.* EMBO J, 1988. **7**(7): p. 2175-83.
 106. Yang J., Mani S.A., and Weinberg R.A. *Exploring a new twist on tumor metastasis.* Cancer Res, 2006. **66**(9): p. 4549-52.
 107. Firulli B.A., Krawchuk D., Centonze V.E., Vargesson N., Virshup D.M., Conway S.J., Cserjesi P., Laufer E., Firulli A.B. *Altered Twist1 and Hand2 dimerization is associated with Saethre-Chotzen syndrome and limb abnormalities.* Nat Genet, 2005. **37**(4): p. 373-81.
 108. Bialek P., Kern B., Yang X., Schrock M., Sasic D., Hong N., Wu H., Yu K., Ornitz D.M., Olson E.N., Justice MJ, Karsenty G. *A twist code determines the onset of osteoblast differentiation.* Dev Cell, 2004. **6**(3): p. 423-35.
 109. Acs G., Lawton T.J., Rebbeck T.R., LiVolsi V.A., Zhang P.J. *Differential expression of E-cadherin in lobular and ductal neoplasms of the breast and its biologic and diagnostic implications.* Am J Clin Pathol, 2001. **115**(1): p. 85-98.
 110. Je E.C., Lca B.S., and Ga G.A. *The Role of Transcription Factor TWIST in Cancer Cells.* J Genet Syndr Gene Ther, 2013. **4**(124).
 111. Ruppenthal R.D., Nicolini C., Filho A.F., Meurer R., Damin A.P., Rohe A., Alexandre C.O., Damin D.C. *TWIST1 promoter methylation in primary colorectal carcinoma.* Pathol Oncol Res. **17**(4): p. 867-72.
 112. Khan M.A., Chen H.C., Zhang D., Fu J. *Twist: a molecular target in cancer therapeutics.* Tumour Biol. **34**(5): p. 2497-506.
 113. Gort E.H., Suijkerbuijk K.P., Roothaan S.M., Raman V., Vooijs M., van der Wall E., van Diest P.J. *Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(12): p. 3325-30.
 114. Mehrotra J., Vali M., McVeigh M., Kominsky S.L., Fackler M.J., Lahti-Domenici J., Polyak K., Sacchi N., Garrett-Mayer E., Argani P., Sukumar S. *Very high frequency of hypermethylated genes in breast cancer metastasis to the bone, brain, and lung.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(9): p. 3104-9.
 115. Zhang L., Yang M., Gan L., He T., Xiao X., Stewart M.D., Liu X., Yang L., Zhang T., Zhao Y., Fu J. *DLX4 upregulates TWIST and enhances tumor migration, invasion and metastasis.* Int J Biol Sci, 2012. **8**(8): p. 1178-87.

116. Chen J., Xia J., Yu Y.L., Wang S.Q., Wei Y.B., Chen F.Y., Huang G.Y., Shi J.S. *HDAC5 promotes osteosarcoma progression by upregulation of Twist 1 expression*. Tumour Biol, 2014. **35**(2): p. 1383-7.
117. Lobo N.A., Shimono Y., Qian D., Clarke M.F. *The biology of cancer stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 675-99.
118. Vesuna F., Lisok A., Kimble B., Raman V. *Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression*. Neoplasia, 2009. **11**(12): p. 1318-28.
119. Munoz, P., Iliou M.S., and Esteller M. *Epigenetic alterations involved in cancer stem cell reprogramming*. Mol Oncol. **6**(6): p. 620-36.
120. Li, J. and Zhou B.P. *Activation of beta-catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters*. BMC Cancer. **11**: p. 49.
121. Shen, Y. and White E. *p53-dependent apoptosis pathways*. Adv Cancer Res, 2001. **82**: p. 55-84.
122. ULUKAYA, D.E., *Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide İlkeler ve Uygulamalar*. Bölüm III. Hücre Siklusu ve Apoptozis ed. P.D.N.Ö. Prof. Dr. Kayıhan ENGİN. 2001: Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti. 1-15.
123. Benchimol S., *p53-dependent pathways of apoptosis*. Cell Death Differ, 2001. **8**(11): p. 1049-51.
124. Powell E., D. Piwnica-Worms D., and Piwnica-Worms H. *Contribution of p53 to Metastasis*. Cancer Discov, 2014. **4**(4): p. 405-14.
125. Feng M.Y., Wang K., Song H.T., Yu H.W., Qin Y., Shi Q.T., Geng J.S. *Metastasis-induction and apoptosis-protection by TWIST in gastric cancer cells*. Clin Exp Metastasis, 2009. **26**(8): p. 1013-23.
126. Zhu, W.L., Wang Y., Zhuo X.L., Zhang Y.S., Chen Z.T. *Short interfering RNA directed against TWIST, a novel zinc finger transcription factor, increases A549 cell sensitivity to cisplatin via MAPK/mitochondrial pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **369**(4): p. 1098-102.
127. Li Q.Q., Xu J.D., Wang W.J., Cao X.X., Chen Q., Tang F., Chen Z.Q. Liu XP, Xu ZD. *Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(8): p. 2657-65.
128. Yu L., Li H.Z., Lu S.M., Liu W.W., Li J.F., Wang H.B., Xu W. *Alteration in TWIST expression: possible role in paclitaxel-induced apoptosis in human laryngeal carcinoma Hep-2 cell line*. Croat Med J, 2009. **50**(6): p. 536-42.
129. Aslanturk O., and Celik, TA., *Potential Antioxidant Activity and Anticancer Effect of Extracts from Dracunculus vulgaris Schott. Tubers on MCF-7 Breast Cancer Cells*. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2013. **4**(2): p. 10.
130. Csupor-Löffler B., H.Z., Zupko I., Rethy B., and F.P.a.H.J. Falkay G., *Antiproliferative Effect of Flavonoids and Sesquiterpenoids from Achillea millefolium s.l. on Cultured Human Tumour Cell Lines*. Phytother. Res., 2009. **23**: p. 5.
131. [cited; Available from: <http://www.kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html>.

132. Kophengnavong T., Michnowicz J.E., and Blackwell T.K. *Establishment of distinct MyoD, E2A, and twist DNA binding specificities by different basic region-DNA conformations.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(1): p. 261-72.
133. Lu S., Nie J., Luan Q., Feng Q., Xiao Q., Chang Z., Shan C., Hess D., Hemmings B.A., Yang Z. *Phosphorylation of the Twist1-family basic helix-loop-helix transcription factors is involved in pathological cardiac remodeling.* PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19251.
134. Qian J., Luo Y., Gu X., Zhan W., Wang X. *Twist1 promotes gastric cancer cell proliferation through up-regulation of FoxM1.* PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77625.
135. Lee M.P. and Yutzey K.E. *Twist1 directly regulates genes that promote cell proliferation and migration in developing heart valves.* PLoS One, 2011. **6**(12): p. e29758.
136. Dai W., Zhang E.J., Duan W.Y., Zhou Q. *[Overexpression of Twist1 promotes tumor invasion in human tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113].* Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2012. **28**(12): p. 1246-9.
137. Mikheeva S.A., Mikheev A.M., Petit A., Beyer R., Oxford R.G., Khorasani L., Maxwell J.P., Glackin C.A., Wakimoto H., González-Herrero I., Sánchez-García I., Silber J.R., Horner P.J., Rostomily R.C. *TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma.* Mol Cancer, 2010. **9**: p. 194.
138. Weiss M.B., Abel E.V., Mayberry M.M., Basile K.J., Berger A.C., Aplin A.E. *TWIST1 is an ERK1/2 effector that promotes invasion and regulates MMP-1 expression in human melanoma cells.* Cancer Res, 2012. **72**(24): p. 6382-92.
139. Eckert M.A., Lwin T.M., Chang A.T., Kim J., Danis E., Ohno-Machado L., Yang J. *Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis.* Cancer Cell, 2011. **19**(3): p. 372-86.

ÖZGEÇMİŞ

Suray Pehlivanoglu, 08.05.1980 tarihinde Bulgaristan'ın Silistre ilinde doğdu. İlköğretimini Silistre'de Vasil Levski ve Hristo Botev ilköğretim okullarında tamamladı. Eğitimine 1993 yılında Tekirdağ'da 50. Yıl Orta Okulu ve Tuğlacılar Lisesi'nde devam etti. 2003 yılında Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. Mezuniyetinden sonra askerlik hizmetini, 297. kısıdönem yedek subay olarak 2005 yılında tamamladı. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Yüksek Lisans programına başlamış ve araştırma görevlisi olarak atanmıştır. 2008 yılında aynı bölümde ve programda doktora eğitimine devam etmiştir. Şimdiye kadar 7 proje çalışmasında yer almış ve biri ulusal olmak üzere 5 adet bilimsel yayını mevcuttur.