DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANSER HÜCRELERİNDE EPİTEL MEZENKİMAL PLASTİSİTENİN MOLEKÜLER KÖKENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Souhaila ELALAOUI

Temmuz, 2023

İZMİR

KANSER HÜCRELERİNDE EPİTEL MEZENKİMAL PLASTİSİTENİN MOLEKÜLER KÖKENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Programı

Souhaila ELALAOUI

Temmuz, 2023

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

SOUHAILA ELALAOUI, tarafından **DR.ÖĞR. ÜYESİ ASLI SADE MEMİŞOĞLU** yönetiminde hazırlanan **"KANSER HÜCRELERİNDE EPİTEL MEZENKİMAL PLASTİSİTENİN MOLEKÜLER KÖKENLERİNİN ARAŞTIRILMASI"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

.....

Dr. Öğr. Üyesi Aslı SADE MEMİŞOĞLU

Yönetici

.....

Doç. Dr. Kemal UĞUR TÜFEKCİ

Jüri Üyesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Mehtap YÜKSEL EĞRİLMEZ

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Okan FISTIKOĞLU

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Öncelikle, değerli tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Aslı Sade MEMİŞOĞLU, kıymetli bilgi ve deneyimlerini paylaşıp büyük bir sabır ve rehberlikle beni yönlendirdiği için teşekkür ederim. Kendisiyle çalıştığım için çok mutluyum.

Bana sürekli inanan, aramızda farklı kıtalar ve uzak mesafeler olsa bile, sevgisi ile kollayan, her daim manevi olarak yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Siz olmasaydınız her şey zor olurdu.

Bu süreçte beni bir an bile yalnız bırakmayan, kıymetli deneyimleri ile sürekli yönlendiren ve motive eden sevgili Dr. Zehra TAVŞAN' a çok teşekkür ederim.

Benimle çalışan bütün arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum, özellikle arkadaşım Ayşenur BODUR 'a tez yazma sürecinde bana gösterdiği yardım için çok teşekkür ederim.

Souhaila ELALAOUI

KANSER HÜCRELERİNDE EPİTEL MEZENKİMAL PLASTİSİTENİN MOLEKÜLER KÖKENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZ

Kolorektal kanser (KRK), anormal hücre büyümesi ve istilası ile karakterize karmaşık bir hastalıktır. Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve hücresel plastisite, KRK progresyonu, metastaz ve tedavi direncinde önemli rol oynamaktadır. Ek olarak, histon modifikasyonları, özellikle H3K4me3 ve H3K27me3'ün bivalansı, kanser biyolojisinde önemli düzenleyiciler olarak ortaya çıkmıştır. EMT, epitelyal hücrelerin mezenkimal bir fenotipe dönüşümünü içerir, tümör agresifliğini ve tedaviye direnci artırır. Hücresel plastisite, kanser hücrelerinin farklı durumlar arasında geçiş yapmasına izin vererek tümör heterojenitesini ve tedavi direncini teşvik eder. Hem aktive edici hem de baskılayıcı işaretlere sahip olan H3K4me3 ve H3K27me3'ün bivalansı, gen ifadesini ve transkripsiyonel plastisiteyi etkiler. KRK'de EMT, plastisite ve histon bivalansı arasındaki etkileşimin anlaşılması, terapötik hedefler hakkında bilgi sağlayabilir ve hasta sonuçlarını iyileştirebilir. Bu mekanizmaların daha fazla araştırılması, KRK'ye karşı etkili tedavilerin geliştirilmesi için umut vaat etmektedir. Bu çalışmada, kolon kanserinde EMT'ye özgü farklı genlerin promotorlarında H3K4me3 ve H3K27me3 bivalansı incelenmiş ve ilgili genlerin ifadedeleri ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır. Sonuçlar, hücreler MET-EMT'den geçerken, incelenen üç genin de promotorlarındaki bivalansın ortadan kalktığını göstermektedir. Kök hücre belirteçleri CD133 ve CD44'ün mRNA seviyeleri, hücreler epitel fenotipe geçerken önemli ölçüde azalmış ve mezenkimal durumda tekrar artmıştır. Aksine, epitel kolon kanseri grubunda CDX2'nin mRNA seviyesinde bir artış ve mezenkimal durumda bir azalma gözlemlenmiştir. Bu gözlemler, gen ifadesi ile ilgili promotorlardaki H3K4me3 ve H3K27me3 histon modifikasyonlarının bivalansı arasındaki ilişki hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Hücreler daha tanımlı durumlara geçtikçe ve gen ifadesi durumu buna göre değiştikçe bivalans durumu kayboluyor gibi görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bivalentlik, epigenetik regülasyon, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), histon metilasyonu, kolorektal kanser

INVESTIGATION OF THE MOLECULAR BACKGROUND OF EPITHELIAL MESENCHYMAL PLASTICITY IN CANCER CELLS

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a complex disease characterized by abnormal cell growth and invasion. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cellular plasticity play crucial roles in CRC progression, metastasis, and therapy resistance. Additionally, histone modifications, particularly the bivalency of H3K4me3 and H3K27me3, have emerged as important regulators in cancer biology. EMT involves the transformation of epithelial cells into a mesenchymal phenotype, enhancing tumor aggressiveness and resistance to treatment. Cellular plasticity allows cancer cells to transition between different states, promoting tumor heterogeneity and therapy resistance. The bivalency of H3K4me3 and H3K27me3, which possess both activating and repressive marks, influences gene expression and transcriptional plasticity. Understanding the interplay between EMT, plasticity, and histone bivalency in CRC can provide insights into therapeutic targets and improve patient outcomes. Further investigation into these mechanisms holds promise for developing effective treatments against CRC. In this study, we aim to inquire about promoter bivalency in genes related to EMT and MET in colon cancer. Our research findings indicate that as cells undergo MET-EMT, bivalency in the promoters of all three genes under study has disappeared. The mRNA levels of stem cell markers CD133 and CD44 decreased significantly as the cells transition to an epithelial phenotype and increased in the mesenchymal state. On the contrary, we observed an increase in mRNA expression of CDX2 in the epithelial colon cancer group and a decrease in the mesenchymal state. These observations provide valuable insights into the relationship between gene expression and the bivalency of H3K4me3 and H3K27me3 histone modifications in these cells. The bivalency state seems to be lost as the cells transition into more defined states and the gene expression status changes accordingly.

Keywords: Bivalency, epigenetic regulation, epithelial-mesenchymal transition (EMT), histone methylation, colorectal cancer

İÇİNDEKİLER

Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU ii

TEŞEKKÜR iii

ÖZ iv

ABSTRACT v

ŞEKİLLER LİSTESİ viii

TABLOLAR LİSTESİ ix

BÖLÜM BİR - GİRİŞ 1

1.1 Kanser ve Kolorektal Kanser 1

1.2 Epitel - Mezenkimal Geçiş (EMT) 2

1.2.1 EMT'nin Kanser İlerlemesi ve Metastazdaki Rolü 2

1.3 Epigenetik Mekanizmalar 4

1.3.1 DNA Metilasyonu 4

1.3.2 Histon Modifikasyonu 5

1.3.2.1 Histon Asetilasyonu 6

1.3.2.2 Histon Metilasyonu 7

1.3.2.2.1 H3K27me3 7

1.3.2.2.2 H3K4me3 9

1.3.2.3 Diğer Histon Modifikasyonları 9

1.4 Bivalent Genler 10

1.4.1 Bivalent Genler ve Kanser 11

1.4.2 Bivalent Genler, EMT ve Kolorektal Kanser 12

1.5 Çalışmanın Amacı 13

BÖLÜM İKİ - MATERYAL ve YÖNTEM 14

2.1 Hücre Kültürü 14

2.2 Kromatin İmmünçöktürme 14

2.3 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu 15

2.4 RNA İzolasyonu ve qPCR Analizi 16

2.5 İstatistiksel Analizler 17

BÖLÜM ÜÇ - BULGULAR 18

3.1 Caco-2 Hücrelerinde EMT-MET Modeli 18

3.2 ChIP DNA Parçalama Koşullarının Optimizasyonu 18

3.3 Sonikasyon ile Kromatin Kesme İşleminin Optimizasyonu 20

3.4 MET-EMT Geçişlerinde Bivalent Promotorlardaki Değişim 21

3.5 MET-EMT Geçişleri Sırasında Bivalent Genlerin İfade Düzeyleri 23

BÖLÜM DÖRT - TARTIŞMA ve SONUÇ 26

KAYNAKLAR 30

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Kanser gelişimi ve metastazda hücrelerin plastisitesini gösteren EMT ve MET 3
Şekil 1.2 Polycomb-Baskıcı kompleksler (PCR'ler) ve enzimatik aktiviteleri..... 9
Şekil 1.3 TrxG ve PcG kompleksleri ve bivalent genler 10
Şekil 2.1 qPCR'daki çalışma sıcaklık ve süreleri 16
Şekil 3.1 Caco-2, Caco-2 ve Caco-2 konfluent Hücrelerine ait 20X mikroskop görüntüleri..... 18
Şekil 3.2 aCaco-2 eCaco-2 ve mCaco-2 hücreleri, hücre patlatma aşaması mikroskop görüntüleri..... 19
Şekil 3.3 Sonikasyon işleminden sonra aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 shearing optimizasyon görüntüleri 20
Şekil 3.4 CD133-1 bölgesinde H3K4me3+IgG negatif kontrole göre H3K4me3+H3K27me3 bağlanması 21
Şekil 3.5 CD133-2 bölgesinde H3K4me3+IgG negatif kontrole göre H3K4me3+H3K27me3 bağlanması. 22
Şekil 3.6 CD44-2 promotor bölgesinde H3K4me3+IgG negatif kontrole göre H3K4me3+H3K27me3 bağlanması..... 22
Şekil 3.7 CDX2 promotor bölgesinde H3K4me3+IgG negatif kontrole göre H3K4me3+H3K27me3 bağlanması..... 23
Şekil 3.8 aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 hücrelerinde CD133 mRNA seviyeleri..... 24
Şekil 3.9 aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 hücrelerinde CD44 mRNA seviyeleri..... 24
Şekil 3.10 aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 hücrelerinde CD44 mRNA seviyeleri..... 25

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 ChIP-qPCR primer dizileri ve ürünlerin uzunlukları …….15
Tablo 2.2 mRNA-qPCR primer dizileri ve ürünlerin uzunlukları…….16

BÖLÜM BİR

GİRİŞ

1.1 Kanser ve Kolorektal Kanser

Kanser, insan vücudundaki anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmeye ve büyümeye başladığı ve metastaz olarak bilinen süreçle, kan ve lenfatik sistem yoluyla diğer dokuları istila edebildiği bir hastalıktır (Bardhan ve Liu., 2013).

Kolorektal kanser (KRK), dünya çapında kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. KRK, gastrointestinal (GI) kanalda kolonun veya kalın bağırsağın rektum kısmının epitel astarında meydana gelen poliplerle başlar ve onlarca yıl içinde yavaş yavaş gelişir. Bu polipler iyi huylu (örneğin hiperplastik polip), pre-malign (örneğin tübüler adenom) veya kötü huylu (örneğin kolorektal adenokarsinom) olabilir (Bardhan ve Liu., 2013)

KRK hastalarının %50'den fazlasında yaşamları boyunca karaciğer metastazı gelişir (Misiakos vd., 2011). Tedavi rejimlerinin gelişmesine rağmen, metastazlı ilerlemiş CRC için etkili bir tedavi halen bulunmamaktadır. KRK vakalarının yaklaşık %20'sinin ailede KRK öyküsü olduğu tahmin edilmektedir. KRK vakalarının bu alt kümesinde kalıtsal genetik yatkınlık önemli bir role sahip olsada, vakaların büyük çoğunluğu sporadiktir ve kalıtsal genetik değişikliklerden ziyade çevresel faktörlerle bağlantılıdır (Rustgi, 2007). KRK'nın oluşumu, diyet, yaşam tarzı, çevresel ve gıda kaynaklı mutajenler dahil olmak üzere diğer çevresel parametreler gibi çeşitli faktörlere bağlı olabilir(Yang vd., 2008). Ek olarak, KRK risk faktörleri ayrıca bağırsak mikrobiyotasını ve tümör gelişiminden önce gelen kronik bağırsak iltihabını da içerir. Muhtelmen düzensiz bağırsak mikrobiyotasının neden olduğu kronik inflamasyonun, tüm KRK vakalarının yaklaşık %20'sine katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir (Terzic vd., 2010).

Sporadik pre-neoplastik lezyonlar, kontrolsüz çoğalmaya ve hücre sağkalımına izin veren genetik ve epigenetik modifikasyonları kademeli olarak biriktirir ve ardından kolorektal karsinomun tipik invaziv ve metastatik özellikleri ortaya çıkar (Kinzler vd.,

1996). Bu geçişlerin altında yatan moleküler mekanizmaların, özellikle de kolorektal kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik özellikleri nasıl kazandığının anlaşılması, KRK tedavisine yönelik optimize edilmiş stratejilerin geliştirilmesi için önemlidir.

1.2 Epitel- Mezenkimal Geçiş (EMT)

Epitel-mezenkimal geçiş (EMT), epitel hücrelerin mezenkimal bir fenotip kazandığı karmaşık bir hücresel süreçtir. EMT, fizyolojik doku bağlamına göre üç tipe ayrılmıştır: (1) embriyonik gelişim ve organ oluşumu, (2) yara iyileşmesi ve organ fibrozu ve (3) kanser ilerlemesi. Tip 3 EMT, invaziv veya metastatik bir fenotiple ilişkilidir. Son on yılda, artan sayıda çalışma, EMT'nin kanser ilerlemesi ve metastazında oynadığı hayati rol için güçlü kanıtlar sağlamıştır (Vu ve Datta, 2017).

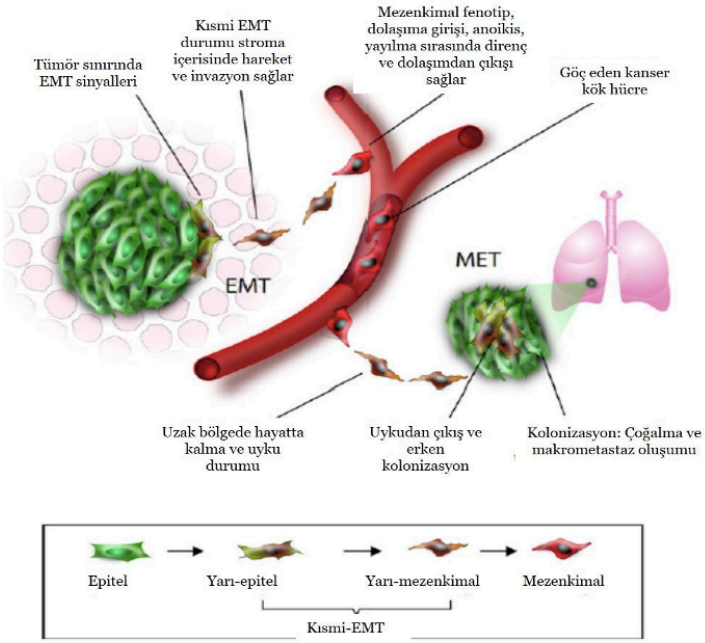
EMT, epitel hücrelerin parke taşı fenotipinden uzamış fibroblastik fenotipe geçişle karakterize edilen dikkate değer morfolojik değişikliklere uğradığı bir süreçtir (Thiery ve Sleeman., 2006). EMT süreci, hücre-hücre bağlantılarının sökülmesini, aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini, artan hücre hareketliliği ve istilasını içerir (Kong et all.,2011). Moleküler düzeyde bu süreç, E-cadherin ve zonula occludens-1'in (ZO-1) (Gregory vd., 2008) aşağı regülasyonu ve yer değiştirmesinin yanı sıra β-catenin'in aşağı regülasyonu ve hücre zarından çekirdeğe yer değiştirmesi, vimentin (Berx vd., 2007), fibronektin ve N-cadherin gibi mezenkimal moleküler belirteçlerin yukarı regülasyonu ile karakterize edilir (Hugo vd., 2007). EMT süreçleri sırasında, düzenli hücre-hücre bağlantılarına ve adezyona sahip hareketli olmayan epitel hücreler, hücre-hücre bağlantılarını kaybeder ve bireysel, hareketli ve invaziv mezenkimal fenotipte hücrelere dönüşür (Kong vd., 2011)

1.2.1 EMT'nin Kanser İlerlemesi ve Metastazdaki Rolü

EMT sırasında, tümör hücreleri sıkı bağlantıların, apikal-bazal polaritenin bozulmasına ve hücrelerin invaziv bir fenotip geliştirmesini sağlayan hücre iskeleti mimarisinin yeniden düzenlenmesine maruz kalır. Kanser hücrelerinde EMT, hipoksi gibi tümör içi fiziksel streslerin yanı sıra büyüme faktörleri ve enflamatuar sitokinler de dahil olmak üzere tümör mikroçevresinden türetilen hücre dışı uyaranlar tarafından anormal şekilde düzenlenir (Hiery vd., 2009). Bu nedenle, EMT programlaması tümör

hücrelerinin insan tümör mikroçevresinin sürekli değişikliklerine uyum sağlamasına ve böylece başarılı bir şekilde metastaz yapmasına olanak tanır.

EMT'nin kanserle ilgili olduğu fikri başlangıçta şüpheyle karşılanmıştır çünkü patologlar insan tümör örneklerinde EMT'nin varlığını destekleyen kesin kanıtlar bulamamışlardır (Christiansen ve Rajasekaran., 2006). Bununla birlikte, artan kanıtlar EMT sürecinin kanser ilerlemesi ve metastazında hayati önem taşıdığını göstermiştir (Hollier ve Evans., 2009). Katı tümörlerin ilerlemesi, EMT'nin uzamsal ve zamansal olarak ortaya çıkmasıyla gerçekleşir, böylece tümör hücreleri daha invaziv ve metastatik bir fenotip kazanır. Mezenkimal fenotipe sahip metastatik tümör hücrelerinin, karşılık gelen primer tümörün patolojisini kazanmak için, metastaz bölgesinde ters dönüşüm, yani Mezenkimalden Epitele Geçiş (MET) geçirdiğine inanılmaktadır (Christiansen ve Rajasekaran., 2006). Bu süreç, metastatik tümör hücrelerinin ikincil bölgede büyümesini sağlayan kritik bir adımdır. Son çalışmalar, primer kolon karsinomlarının ve bunlara karşılık gelen metastazların karma bir epitel-mezenkimal fenotip sergilediğini göstermiştir (Brabletz vd., 2001).



Şekil 1.1 Kanser gelişimi ve metastazda hücrelerin plastisitesini gösteren EMT ve MET (Tam ve Wieberg, 2013)

EMT programı, kanser kök hücresi (CSC) fenotipinin kritik bir düzenleyicisidir ve tümör içi heterojenliğin doğasını ve antikanser ilaç direncinin olası mekanik temelini araştırmak için bir fırsat sunmaktadır. Yeni tümörleri oluşturma yeteneğine sahip küçük alt popülasyonların varlığını öne süren CSC kavramının ortaya atılması, tümör içi heterojenliğin anlaşılması için bir çerçeve sağlamıştır. Kazanılmış direnç kısmen bu heterojenlikten, yani tek bir tümör kitlesinde birlikte yaşayan kanser hücrelerinin fenotipik çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır. Biriken kanıtlar geleneksel tedavilerin, EMT programının aktifleşmesi sonucu CSC'ye dönüşen hücreleri ortadan kaldırmada genellikle başarısız olduğunu ve böylece CSC aracılı klinik nükse yol açtığını göstermektedir (Shibue ve Weinberg., 2017).

1.3 Epigenetik Mekanizmalar

Başlangıçta genetik bir hastalık olarak kabul edilen kanserin, artık genetik değişikliklerin yanı sıra epigenetik anormallikleri de içerdiği bilinmektedir. Mikroçevre aracılı epigenetik bozulmaların neoplazi gelişiminde önemli bir rol oynadığı netleşmektedir (Burger vd., 2011). Epigenetik, DNA dizisinde bir değişiklik olmadan meydana gelen ve gen ifadesini düzenlemek için yeterince güçlü olan kalıtsal değişiklikleri ifade eder (Rodenhiser ve Mann., 2006).

Epigenetik düzenlemeden sorumlu temel süreçler DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar tarafından transkripsiyon sonrası gen düzenlemesidir (Ducassa ve Brown., 2006). Bu mekanizmalar hücrelerin normal gelişiminde ve büyümesinde kritik bileşenlerdir ve modifikasyonları neoplastik fenotiplere katkıda bulunur (Kanwal ve Grupta., 2010).

1.3.1 DNA Metilasyonu

Ökaryotlarda metilasyon, genom bütünlüğünün korunması, genomik damgalama, transkripsiyon düzenlemesi ve gelişim süreçlerinde önemli bir rol oynayan epigenetik DNA modifikasyonları ile karakterize edilir (Zhang vd., 2010). DNA metilasyonu genellikle CpG dinükleotidleri içindeki sitozin halkasının 5′ pozisyonunda gerçekleşir ve bunun sonucu genlerin ve kodlamayan genomik bölgelerin susturulmasıyla

sonuçlanır. 5-metil sitozindeki modifikasyon DNA metiltransferaz (DNMT) enzimi tarafından katalizlenir (Rodriguez-Paredes ve Esteller, 2011).

DNA üzerindeki sitozinin metilasyonu epigenetik alanında iyi çalışılmış bir konudur. CpG dinükleotidlerinin oluşturduğu CpG açısından zengin bölgeler CpG adaları olarak bilinir (Bird, 1986). Gen promotor bölgesindeki CpG adaları genellikle metillenmez ve gen gövdesindeki sporadik CpG bölgeleri normalde metillenir. Bununla birlikte yaşlanma veya karsinogenez sırasında, durum genel hipometilasyon ve promotor bölge hipermetilasyonu haline gelmektedir (Laird, 2003).

Epigenetik düzenlemede yer alan proteinler DNA metiltransferaz (DNMT), metil-CpG-bağlayıcı protein (MBP), histon deasetilaz (HDAC), histon asetilaz (HAT) ve histon metiltransferazdır (HMT) (Jair, 2006). DNMT3A ve 3B, esas olarak metilasyon kalıpları oluşturmak için işlev gören de novo metiltransferazlardır, DNMT1 ise metilasyon kalıplarını koruyan bir metiltransferazdır (Laird., 2003). Dolayısıyla, bu enzimler hücresel DNA metilasyon modellerini düzenlemek için iş birliği yapar. Diğer DNMT'ler DNMT3L ve DNMT2'dir. DNMT3L'nin germ hücrelerinde baskılanmış genlerin metilasyonu için gerekli olduğu bildirilmiştir ve de novo metiltransferaz aktivitesinde DNMT3A ve 3B ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. DNMT2'nin biyolojik işlevi belirsizliğini korusada, DNA'ya güçlü bir şekilde bağlanması, genomdaki belirli dizileri hedef alabileceğini düşündürmektedir (Cedar ve Bergman, 2009).

MBP'ler, kromatin yeniden şekillendirici korepressor komplekslerini bölgeye çekerek DNA'ya transkripsiyon faktörü bağlanmasını engelleyebilir. HAT'lar, HDAC'lar ve HMT'ler esas olarak histon modifikasyonu ve kromatin yeniden şekillenmesinden sorumludur (Sparmann ve Lohuizen., 2006).

1.3.2 Histon Modifikasyonu

Histon modifikasyonları, gen regülasyonu ve karsinogenezde önemli bir rol oynayan kromatin yapısını etkiler (Cedar ve Bergman., 2009). Kromatin, bağlayıcı DNA ile bağlanmış nükleozom tekrarlarından oluşan oldukça düzenli bir yapıdır. Her

bir nükleozom, histon proteinlerinden oluşan bir oktamerin etrafına sarılmış ~146 bp DNA'yı kapsar. Bu oktamerler, çekirdek histon proteinlerinin, H2A, H2B, H3 ve H4, her birinin iki biriminden oluşur (Bots ve Johnstone, 2009).

Kromatin, DNA, histonlar ve nükleoprotein kompleksleri halinde yoğunlaşmış histon olmayan proteinlerden oluşur ve tüm ökaryotik genetik bilginin fizyolojik şablonu olarak işlev görür. Kromatin iki farklı konformasyon durumuna ayrılır: yoğun bir şekilde sıkıştırılmış ve transkripsiyonel olarak aktif olmayan heterokromatin ve daha gevşek ve transkripsiyonel olarak aktif olan ökromatin. Histonlar, globüler bir alan ve nükleozomdan çıkıntı yapan histon kuyruğu olarak bilinen esnek yüklü bir NH_2 terminali içeren küçük temel proteinlerdir. Gen ifadesinin düzenlenmesi, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon, sumoyilasyon, prolin izomerizasyonu ve ADP ribozilasyonu gibi kovalent modifikasyonlar tarafından sağlanan histon kuyruklarının posttranslasyonel modifikasyonları yoluyla gerçekleşir (Landan vd., 2012). Histon kuyruklarındaki posttranslasyonel modifikasyonlar, kromatinin yapısal durumunu ve bunun sonucunda belirli bir lokus içindeki genlerin transkripsiyonel durumunu yönetir. Bu modifikasyonlar geri dönüşümlüdür ve histon asetiltransferaz (HAT'), deasetilaz (HDA), metiltransferaz (HMT) ve demetila (HDM), kinaz, fosfataz, ubikitin ligaz ve deubikitinaz, SUMOligazlar gibi bu tür modifikasyonları ekleyen ve kaldıran proteazları içeren bir grup enzim tarafından kontrol edilir.

1.3.2.1 Histon Asetilasyonu

Histon asetilasyon durumu, zıt etkiler gösteren iki enzim grubu, histon asetiltransferazlar (HAT'lar) ve histon deasetilazlar (HDAC'lar) tarafından düzenlenir. HAT'lar, asetil-CoA'dan bir asetil grubunun histon kuyruklarındaki hedef lizin grubuna transferini katalizler, bu da histonlar üzerindeki pozitif bir yükün kaldırılmasına yol açarak histonlar ve (negatif yüklü) DNA fosfat grupları arasındaki etkileşimi zayıflatır. Bu da tipik olarak kromatini daha az kompakt ve dolayısıyla transkripsiyon proteinleri için daha erişilebilir hale getirir. HDAC'ler asetil gruplarını histon kuyruğu lizin bölgelerinden uzaklaştırır ve böylece gen ifadesinin baskılayıcıları olarak çalışırlar (Harbe vd., 2011).

1.3.2.2 Histon Metilasyonu

Histon metiltransferazlar (HMT'ler) ve histon demetilazlar (HDM'ler) tarafından katalizlenen geri dönüşümlü bir reaksiyon olan histon metilasyonu, histon proteinlerinin lizin veya arginin bölgelerinde meydana gelebilir. Lizinler mono-, di- veya tri-metillenmiş olabilir ve argininler asimetrik veya simetrik di-metillenmiş veya mono-metillenmiş olabilir. Histon metilasyonu transkripsiyonel düzenleme üzerinde önemli bir etkiye sahiptir; metillenmiş amino asite bağlı olarak transkripsiyonun aktif bir işareti veya baskılayıcı bir işareti olarak kabul edilebilir. Örneğin, histon H3'ün lizin 4 (H3K4), lizin 36 (H3K36), lizin 79 (H3K79) veya arginin 17 (H3R17) üzerindeki metilasyonu büyük ölçüde transkripsiyonel aktivasyonda rol oynar. Buna karşılık, lizin 9 (H3K9) ve lizin 27'deki (H3K27) histon H3 veya lizin 20'deki (H4K20) histon H4 metilasyonu genellikle transkripsiyonel baskılama ile ilgilidir (Di Nisio vd., 2021). Histon lizin metilasyonu, histon lizin metiltransferazlar (KMT'ler) tarafından katalizlenir ve histon lizin demetilazlar (KDM'ler) tarafından silinir.

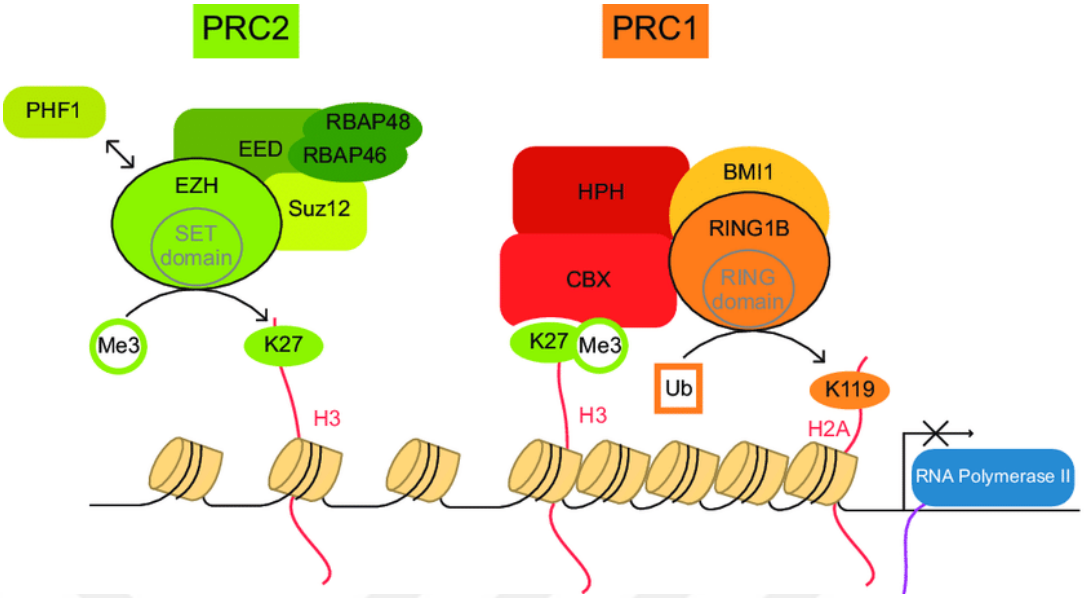
*1.3.2.2.1 H3K27me3.*Polycomb grup (PcG) proteinleri ilk olarak *D. melanogaster*'de gelişimsel yolaklar için önemli olan genlerde tanımlanmıştır. PcG proteinlerindeki mutasyonlar, homeobox proteini gibi anahtar transkripsiyon faktörlerini içeren spesifik transkripsiyonel kaskadların yanlış düzenlenmesi nedeniyle gelişimsel kusurlara neden olur; bu da tipik homeotik fenotiplere yol açar (Dejardin vd., 2005). Son araştırmalar, Polycomb işlevlerinin mekanik temeline ilişkin anlayışı genişletmiş, homeotik fenotiplerin ne kadarının meydana geldiğini açıklamıştır (Bantignies ve ark., 2011). Bununla birlikte, moleküler mekanizmanın birçok yönünün anlaşılması halen güçtür. Sineklerde, DNA Polycomb elementlerine çekilen Polycomb kompleksleri genleri susturmak için çalışırken, Trithorax ailesinin proteinleri bunun tam tersine aynı genleri aktive eder. Polycomb proteinlerinin memeli hücrelerinde kromatine nasıl bağlandığı hala belirsizdir. Bununla birlikte, polycomb baskılayıcı kompleksler (PRC'ler) tarafından gen susturmanın epigenetik mekanizmaları ökaryotlarda korunur (Margueron ve Reinberg., 2011). İki Polycomb kompleksi, PRC1 ve PRC2, derinlemesine karakterize edilmiştir. Bu iki kompleksin sinerjik

olarak ya da birbirinden bağımsız olarak genleri susturabildiği gösterilmiştir (Leeb vd., 2010).

Bununla birlikte, mevcut kanıtlar PRC2'nin PRC1 kompleksinin ortak hedef genlerinin promotorlarına getirilmesinde rol oynadığını göstermektedir. Memelilerde PRC2 en az dört alt birimden oluşur, bunlardan biri SET alanı aracılığıyla lizin 27'deki (H3K27me3) H3 histonunun trimetilasyonunu katalizleyen bir histon metiltransferaz (HMT) olan EZH2'dir. H3K27'deki trimetil modifikasyonu gen baskılanması için bir ayırt edici özelliktir ve genellikle gelişimsel genlerin promotör bölgelerinde bulunur. Bu modifikasyonun chromobox (CBX) alanı barındıran proteinler için kenetlenme bölgesi olduğu gösterilmiştir. CBX protein ailesi PRC1 kompleksinin alt birimleri olarak işlev görebilir ve CBX proteinlerinin PCR2 tarafından belirlenen H3K27me3 modifikasyonları ile etkileşimleri yoluyla PCR1 kompleksini kromatine çekmeye yardımcı olduğuna inanılmaktadır (Richly vd., 2011).

PRC1'in daha önce histon H2A ubikitinasyonu yoluyla genlerin susturulmasında ana belirleyici olduğuna inanılıyordu (Wang vd., 2004). PRC1 ayrıca birçok genin transkripsiyonunu kolaylaştırır (Pherson vd., 2017). PRC1, aktive edilmiş RNA polimeraz II ön başlatma kompleksi montajını inhibe etmek için işe alınan aracılara müdahale ederek gen susturmayı sürdürür (Lehmann vd., 2012). PRC2 tarafından indüklenen Histon H3K27me, PRC1 Pc alt biriminin N-terminal kromodomini için bir bağlanma bölgesi sağlar; ayrıca PRC1, Gerçekten İlginç Yeni Gen (RING) alanı E3 ubikitin ligaz aktivitesi sergileyen RING1a / b alt birimi aracılığıyla H2Aub'yi katalize eder (Lehman vd., 2012). BMI1 ve RING1a, H2A ubikitilasyonunu pozitif olarak düzenleyerek Hox geninin susturulmasına neden olur (Cao vd., 2005).

BAH domain proteinleri EBS/SHL-EMF1 kompleksi, H3K27me3'ü etkileyerek genom çapında transkripsiyonel baskılamaya aracılık eder. PRC1 aktif genlerin transkripsiyonunu doğrudan etkiler. PRC1 alt birim mutasyonları, RNA polimeraz II'nin fosforilasyonunu ve çoğu aktif gende Spt5 duraklama-uzama faktörü tarafından işgal edilmesini değiştirir (Pherson vd., 2017). RING1a ve BMI1 ayrıca kromatinle ilişkili protein ubikitinasyon yoluyla genleri aktive eder (Paschos vd., 2019). Şekil 1.2'de Polycomb proteinleri gösterilmiştir.



Şekil 1.2 Polycomb-Baskıcı kompleksler (PCR'ler) ve enzimatik aktiviteleri (Viessers vd., 2012)

*1.3.2.2.2 H3K4me3.*Oldukça fazla sayıda çalışma, trithorax grubu (TrxG) proteinlerinin Polycomb proteinlerinin işlevine ters çalıştığını ve böylece genleri aktive ettiğini göstermiştir (Kia vd., 2008). TrxG proteinleri, Polycomb proteinleri gibi transkripsiyonel aktivasyonla bağlantılı histon işaretlerini biriktiren çoklu protein kompleksleri oluşturur. TrxG kompleksleri genellikle, aktive edici bir kromatin işareti olan histon 3'ün lizin 4'ünü (H3K4me3) metilleyen SET alanları içeren HMT'lerden oluşur (Schuettengruber vd., 2007). Özetle, Polycomb ve TrxG ailelerinin üyelerinin ve onlarla etkileşime giren ya da kromatindeki dolulukları üzerinde etkisi olan proteinlerin yanlış düzenlenmesi genellikle kanser fenotipine yol açar.

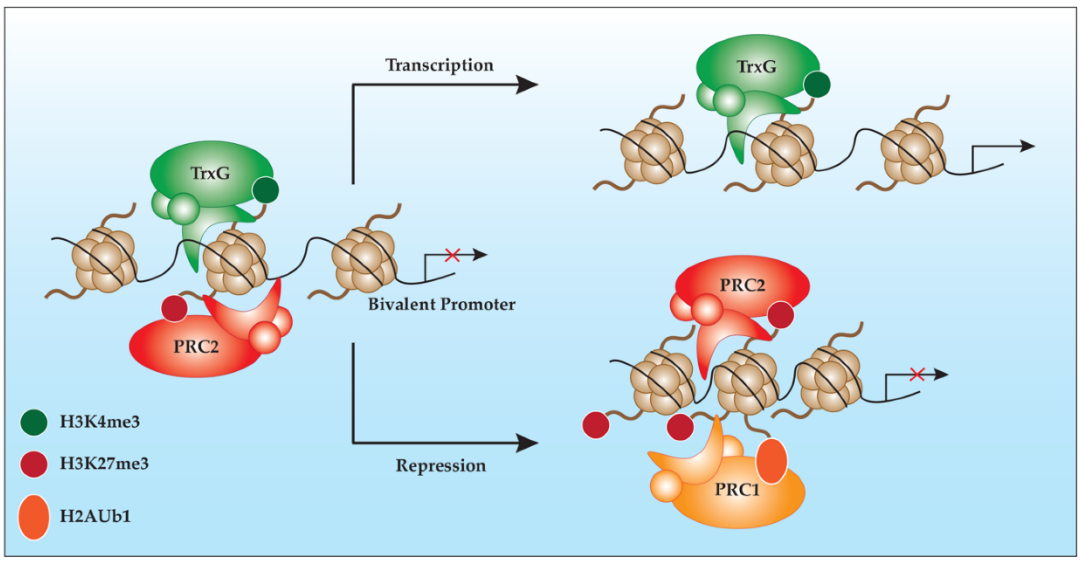
1.3.2.3 Diğer Histon Modifikasyonları

Histon fosforilasyonu serin, treonin ve tirozin üzerinde meydana gelir. Birçok kinaz ve fosfataz, kromatin yoğunlaşması, DNA hasarı yanıtı ve transkripsiyon ile bağlantılı olan histon fosforilasyonunu düzenler (Sawicka vd., 2014). Histonlar lizin üzerinde ubikuitin ile yoğun bir şekilde modifiye edilebilir. Ubikitinasyon enzimleri (E1 aktive edici, E2 konjugasyon ve E3 ligaz enzimleri) ve deubikitinasyon enzimleri, genom stabilitesi, hücre döngüsü ve transkripsiyon ile ilişkili histon ubikitinasyonunu modüle eder. Kütle spektrometresi teknolojisindeki gelişmelerle birlikte, nörogelişim ve nöro

hastalıklarda krotonilasyon, asetilasyon ve serotonilasyon gibi yeni modifikasyonlar bulunmuştur (Xu vd., 2021).

1.4 Bivalent Genler

Histon modifikasyonları ve kromatinle ilişkili protein kompleksleri, gen ifadesinin kontrolünde, hücre kaderi kararlarının denetlenmesinde ve farklılaşmada önemli rol oynar. Embriyonik kök (ES) hücrelerdeki birçok promotor, aktive edici H3K4me3 işaretini ve baskılayıcı H3K27me3 işaretini birleştiren ayırt edici bir histon modifikasyon imzası barındırır. ES hücrelerindeki kromatin modifikasyonlarının genom çapında haritalama çalışmaları, aktif arttırıcılarda H3K4me1 ve H3K27 asetilasyonu (H3K27ac) ve H3K4me3 ve H3K27me3 gibi, sırasıyla aktif ve baskılanmış promotorlarda belirli genomik alanlarda farklı histon işaretlerinin varlığını ortaya koymuştur (Calo ve Wysocka., 2013). Bu korelasyonlar neredeyse tüm memeli hücre tipleri için geçerli olsa da bazı kromatin imzalarının ES hücrelerine daha spesifik olduğu görülmektedir. Örneğin, aynı anda hem aktive edici H3K4me3 hem de baskılayıcı H3K27me3 modifikasyonları ile işaretlenen geniş bir gelişimsel gen promotor grubu vardır. Aynı promotor üzerindeki görünüşte karşıt histon işaretlerinin bu modellerine, ilk olarak (Bernstein vd., 2006) tarafından ortaya atılan bir terim olan "bivalent" alanlar denir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 TrxG ve PcG kompleksleri ve bivalent genler (Kuehner, 2019)

Bu alanların, farklılaşma sinyallerinin yokluğunda baskıyı sürdürürken zamanında aktivasyona izin vererek gelişimsel genlerin ifadesini dengelediği düşünülmektedir. İlk olarak en yaygın oldukları ES hücreleri için tanımlanmış olsalar da daha sonraki gözlemler sınırlı güce sahip hücre tiplerinde de bivalent alanlar tespit etmiştir. Hem aktif hem de baskılayıcı özellikler sergileyen bivalent genlerin, uygun gelişimsel ipuçları ve/veya çevresel uyaranlar üzerine hızla aktive olmalarını sağlayan hazır bir durumda oldukları varsayılmaktadır. Son gelişmeler, bivalent alanların oluşumuna ve işlevine ışık tutmaktadır; ancak, gelişmekte olan organizmalardaki işlevlerini araştırmak için uygun genetik modeller eksik olduğundan, gelişimdeki rolleri tartışmalı olmaya devam etmektedir (Voigt ve Reinberg., 2013).

1.4.1 Bivalent Genler ve Kanser

Bivalent modifikasyonların varlığına dair ilk kanıt, pluripotent fare ESC'lerinde yapılan çalışmalardan gelmiştir (Yang vd., 2008). Normal embriyonik ve yetişkin kök hücre durumlarında, birçok gelişimsel gen, promotör bölgelerinde hem aktif (H3K4me3) hem de baskılanmış (H3K27me3) işaretleri veya bivalent kromatini muhafaza eder. Normal farklılaşma sırasında, bivalent alanlar ya farklılaşma ile ilgili bazı genlerin aktif transkripsiyonuna eşlik eden aktif işaretlere (H3K4me3) ya da kök hücre ile ilgili genlerin susturulmasına eşlik eden baskılayıcı işaretlere (H3K27me3) dönüşecektir. Belirli koşullar altında, bivalent alanların dönüşümü tersine çevrilebilir ve hücreler geri farklılaşmaya uğrayabilir. Ayrıca, kök hücre durumlarından uzak hücre popülasyonlarında da bivalent genler ortaya çıkabilir. Bir kanser hücresinde, bu kromatin değişimleri hücresel plastisite için hayati öneme sahip olabilir.

Bivalent genlerin bazıları kansere özgü promotor DNA hipermetilasyonunu üstlenebilir ve böylece daha kalıcı olarak susturulmuş bir durumda kilitlenebilir. Kanserde, DNA metilasyonunun bivalent işaretleme bölgelerinin yerini aldığı gen promotorları için, anormal susturma, kanserin başlamasında ve/veya ilerlemesinde olayların seçilmesine yardımcı olabilir. Belirli gen gruplarının susturulması veya aktivasyonu, hücrelerin anormal bir kendini yenileme potansiyeli durumunda nasıl tutulduğuna dair mekanizmalara katkıda bulunması olasıdır (Easwaran vd., 2012). Bu durum kanser hücrelerinin ve özellikle de kanser "kök hücreleri" olarak

adlandırılanların temel bir kusurudur. Son çalışmalar, epigenetik anormalliklerin bu hücre özelliklerini nasıl yönlendirebileceğini göstermekte ve genetik değişikliklerle nasıl iş birliği yapabileceklerinin bir başka örneği olarak hizmet etmektedir.

1.4.2 Bivalent Genler, EMT ve Kolorektal Kanser

Kolorektal kanserde EMT, invaziv veya metastatik bir fenotip ile ilişkilidir. Bazı çalışmalar epigenetik düzenlemelerin rolünü ve bu epigenetik değişikliklerin kolorektal kanserde (KRK) EMT sırasında nasıl önemli bir rol oynadığını tartışmaktadır (Yang vd., 2022). Kolorektal kanser gelişiminde histon modifikasyonu üzerine yapılan önceki araştırmalar göz önüne alındığında, kolorektal kanser ile arasındaki ilişki giderek daha iyi anlaşılmaktadır.

Onkogenlerin aktivasyonunda ve tümör baskılayıcı genlerin susturulmasında rol oynayan histon modifikasyon modellerinin işlev bozukluğunun, alerjik hastalıklar, multipl skleroz ve gastrointestinal kanser dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarının etiyolojisi ile ilişkili olduğu doğrulanmıştır (Alaskhar vd., 2018). Dahası, histon modifikasyon modellerinin değiştirilmesi, kolorektal kanser oluşumunda önemli rol oynayan genlerin ifadelerinin düzensizleşmesine yol açmıştır. Kolon tümörlerinde, birçok genin transkripsiyonu, genelde hücre hatlarında çalışılan zayıf tanımlanmış epigenetik mekanizmalarla düzensiz hale gelir. Bazı çalışmalar (Hahn vd., 2014) gibi kolorektal kanserde histon modifikasyonu ve DNA metilasyonunu tartışmaktadır ve DNA metilasyonunun hem histon işaretlerini kaybeden hem de DNA metilasyonu kazanan bivalent H3K4me3 ve H3K27me3 ilşkili promotorları güçlü bir şekilde hedeflendiğini göstermiştir.

Bununla birlikte, Polycomb işareti H3K27me3'ün bivalent promotorlardan kaybıyla birlikte çok sayıda kök hücre düzenleyicisi, onkogen ve proliferasyonla ilişkili gen dahil olmak üzere kanser ilerlemesiyle ilişkili genlerin aktivasyonu gösterilmiştir. Ayrıca, bu genlerin çoğunun, kronik enflamasyonun kolon kanserine yatkınlık yarattığı ülseratif kolit hastalarında da aktifleştiği anlaşılmıştır. Bu bulgulara dayanarak, bivalent genlerde Polycomb baskısının kaybının, tümöre yol açan olaylar için bir seçilimle birleştiğinde kanser ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı açıktır.

1.5 Çalışmanın Amacı

Kolon kanseri, EMT ve MET gibi temel biyolojik süreçlerde yer alan genlerin düzensiz ifadesi ile karakterize, karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Bu süreçler, metastaz sırasında tümör hücrelerinin invazif ve göç özelliklerinin ve ilaç direncinin kazanılması için önemlidir. Bivalent promotorlar, gelişim ve farklılaşma sırasında gen ifadesinin düzenlenmesi ile ilgili iyi karakterize edilmiş bir epigenetik mekanizmadır.

Bivalent genlerin kanser ilerlemesinde hücre plastisitesi açısından önemli oldukları düşünülmekle birlikte altta yatan moleküler mekanizmalar henüz aydınlatılmış değildir. Bu çalışmada, daha önceki çalışmalarda geliştirilen bir MET-EMT modelinden yararlanarak bu süreçte promotor bivalansındaki değişimlerin ve gen ifadesine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu sayede kanserde önemli rol oynayan hücre plastisitesine ilişkin daha detaylı bilgi edinilmiş olacak ve ileride uygulanabilecek tedavi hedefleri ortaya çıkabilecektir.

BÖLÜM İKİ

MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 Hücre Kültürü

Caco-2 hücre hattı, ODTÜ Banerjee Laboratuvarı'ndan alınmıştır. MET-EMT modeli, kendiliğinden farklılaşan Caco-2 hücreleri ile oluşturulmuştur. Caco-2 hücreleri, %20 FBS içeren EMEM büyüme ortamında 37 oC'de büyütülmüştür. %60-70 yoğunluğa ulaşan hücreler, atasal Caco-2 yani aCaco-2 hücreleri olarak deneylerde kullanılmışlardır. Hücreler, %100 yoğunluğa ulaştıktan sonra 20 gün büyütüldüklerinde kendiliğinden epitel hücrelere farklılaşmışlar ve eCaco-2 hücreleri olarak deneylerde kullanılmışlardır. Epitel farklılaşmanın sonrasında geri farklılaşmayı uyarmak için hücreler tripsinlerek toplanmış ve 1:40 oranında yeniden ekilmişlerdir. 6 gün geri farklılaşmanın sonrasında epitel hücreler mezenkimal hücrelere geri farklılaşarak mCaco-2 hücreleri olarak deneylerde kullanılmışlardır.

2.2 Kromatin İmmünçöktürme

aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 hücreleri, ChIP Express Shearing kit (Active Motif, Cat No# 53032) protokolü doğrultusunda formaldehit ile 10 dakika fikse edildikten sonra Glisin tamponu ile fiksasyon durdurulmuştur. PBS ile yıkamalar sonrasında PMSF içeren PBS içinde kazınarak toplanmıştır. Santrifüj sonrasında elde edilen hücre pelleti, kromatin izolasyonu yapılana kadar -80oC'de saklanmıştır. -80oC'den alınan hücre pelleti, buz içinde çözüldükten sonra proteaz inhinbitörü ve PMSF içeren soğuk lizis tamponu içinde buz üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Santirfüj sonrasında elde edilen çekirdek içeren pellet kromatin parçalama tamponu içinde süspansiye edilmiştir. Sonikasyon işlemi, 60 saniye çalışma 60 saniye dinlenme şeklinde 15 döngü şeklinde yapılmıştır. Sonikasyon sonrasında santrifüj işlemi ile ayrılan süpernatandaki DNA, DNA izolasyon kiti (Active Motif, Cat No#58002) ile ayrılmıştır. DNA fragmentlerinin yaklaşık 200-500 baz çifti aralığında olduğunu görmek için izole edilen DNA, %1 agaroz jelde ayrılmıştır. Smear görüntüsü, uygun DNA fragmentlerinin elde edildiğinin göstergesidir. Nanodrop ile DNA miktarı ölçülmüştür. Kromatin fragmentleri, -80 C'de saklanmıştır. Kromatin fragmentleri ile

Re-ChIP-IT kiti (Active Motif, Cat No# 53016) (Kinkley et al., 2016) kullanılarak sırasıyla H3K4me3 and H3K27me3 antikorları ile kromatin immünçöktürme yapılmıştır. Negatif kontrol olarak, H3K4me3 kromatin immünçöktürme işlemi sonrasında IgG antikoru kullanılarak immünçöktürme yapılmıştır.

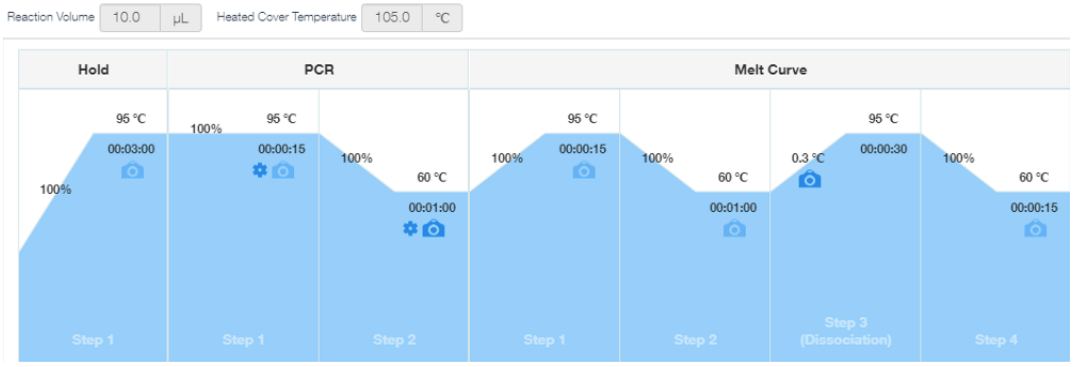
2.3 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

CD133, CD44 ve CDX2 ve gen promotorlarındaki bivalent bölgeler Court ve Arnoud (2017) tarafından yapılan analizlerde araştırmacıların kullanımına sunulmuştur. Analizlerde hedef gen promotorlarına karşılık gelen ve bivalent olan bölgeler için belirtilen problar UCSC Genome Browser kullanılarak görüntülenmiş ve karşılık gelen DNA bölgeleri qPCR ile analiz edilebilecek boyutlarda (80-250 bp) olacak şekilde, gerektiğinde küçültülerek, primerler tasarlanmıştır. Primer tasarımı için IDT DNA (Integrated DNA Technologies) ve NCBI primer blast programları çapraz kontrollü olarak kullanılmıştır. Daha önce CDX2 için tespit edilen bivalent promotor primerleri pozitif kontrol olarak kullanılacaktır (Sun vd. 2017). Tasarlanan ChIP primerleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 ChIP-qPCR primer dizileri ve ürünlerin uzunlukları

Gen	Primer dizisi
pCDX2F	GTGACAAATATCCGAGCGAAAC
pCDX2R	TTTGAGCGCTCTCAGAACC
pCD44F	GGAGGGCTGCTACTTCTTAAA
pCD44R	GTGACCTAAGACGGAGGGA
pCD133F1	CTCGGGTTTCGCGATCTTTA
pCD133R1	CCGCCGTAATGGAAAGGAT
pCD133F2	CACGGCTGTAGAAAGTCAGAG
pCD133R2	GCGATCTTGCCAGAGAGAAG

İncelenen genlerin promotor bölgelerindeki olası bivalentlik, qPCR ile BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix (Abm, G891) kullanılarak belirlenmiştir. İleri ve geri primerlerin son derişimleri, 0,5 µM'dır. Input DNA'sının hazırlanması sırasında, DNA 1/5 oranında seyreltilmiştir, seyreltme çözeltisinden 2 µL mix'e eklenmiştir. qPCR'daki çalışma sıcaklık ve süreleri Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1 qPCR'daki çalışma sıcaklık ve süreleri

Veriler Design and Analysis programı kullanılarak Ct değerleri analiz edilmiştir. Olası bağlanma oranları, hedef gen promotorunda H3K4me3+ H3K27me3 ile H3K4me3 + IgG için elde edilen Ct değerleri oranlanarak hesaplanmıştır.

2.4 RNA İzolasyonu ve qPCR Analizi

Total RNA, üreticinin talimatları izlenerek Gene Jet RNA Saflaştırma Kiti (kat No# K0731) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Onescript Plus cDNA Sentez Kiti (kat No# G236) kullanılarak sentezlenmiş ve qPCR FastStart Essential DNA Green Master karışımı (Kat No# 06402712001) ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Light Cycler 480 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

Tablo 2.2 mRNA-qPCR primer dizileri ve ürünlerin uzunlukları

Primer	Oligo dizisi
CD133F	CACTACCAAGGACAAGGCGTTC
CD133R	CAACGCCTCTTTGGTCTCCTTG
CD44F	TCCAACACCTCCCAGTATGACA
CD44R	GGCAGGTCTGTGACTGATGTACA
CDX2F	CGAGTGGTGTACACGGACCA
CDX2R	CTGAAACCAGATTTTAACCTGCCTC

2.5 İstatistiksel Analizler

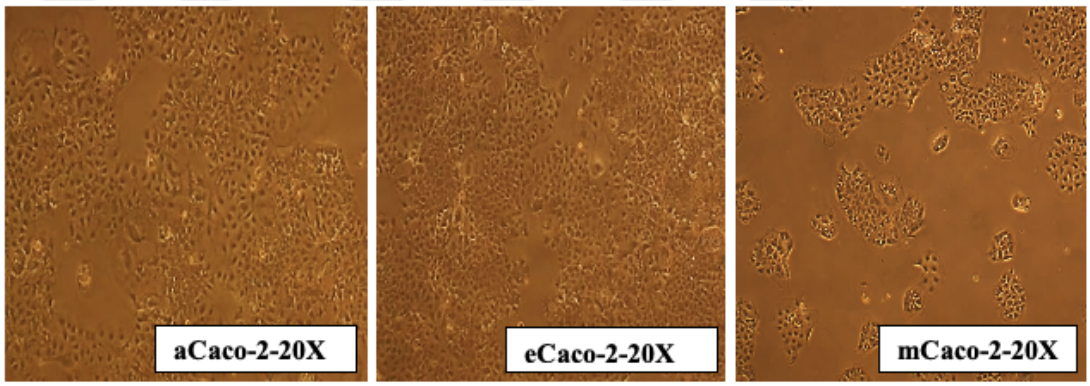
Veriler, tek yönlü veya iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından hangi grup çiftlerinin önemli ölçüde farklı olduğunu belirlemek için Türkiye'nin çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel analiz GraphPad Prism 8 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizlerde anlamlılık için $p<0,05$ değeri baz alınmıştır.

BÖLÜM ÜÇ

BULGULAR

3.1 Caco-2 Hücrelerinde EMT-MET Modeli

Bu çalışmada, kolorektal EMT-MET hücre hattı modeli kullanılmıştır. EMT ile ilişkili genlerin promotor bivalansı, aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 olmak üzere üç alt popülasyonda incelenmiştir. H3K4me3 ve H3K27me3 adlı iki modifikasyonun, gen ifadelerinde bastırıcı veya aktive edici bir rolünün olup olmadığını belirlemek için incelenmiştir. Her hücre hattı için istenen konfluent durumu değerlendirmek için mikroskopik görüntüler kaydedilmiş ve Şekil 3.1'şeklinde sunulmuştur.

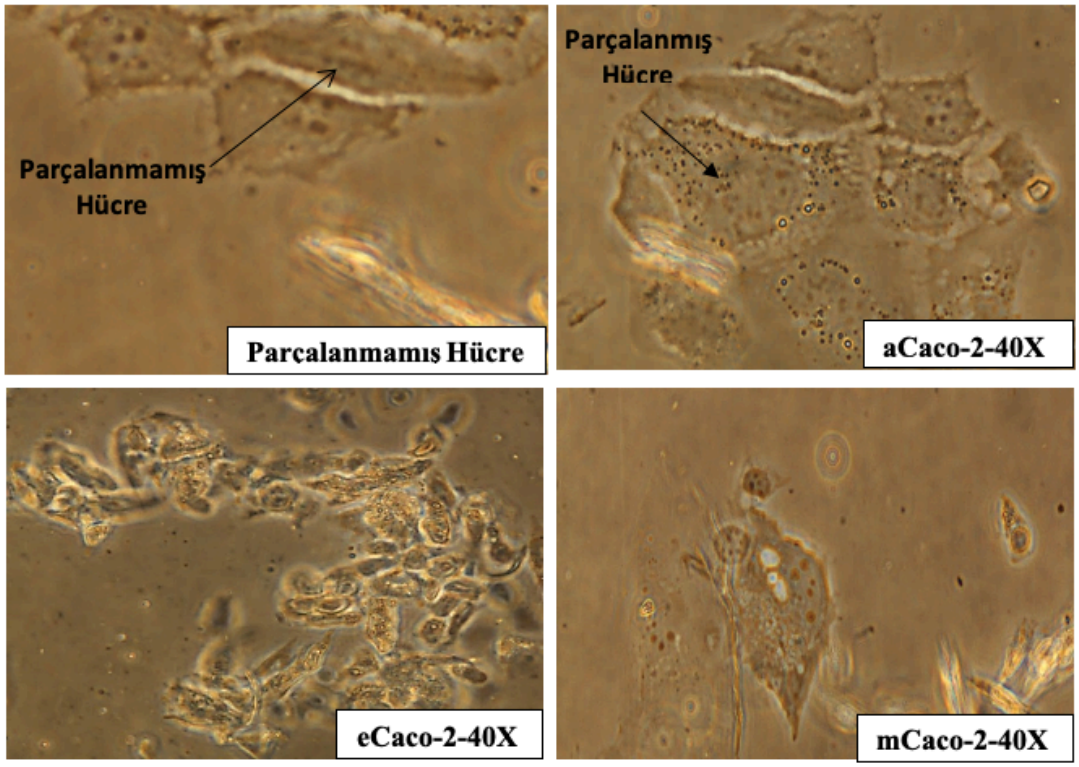


Şekil 3.1 Caco-2, Caco-2 ve Caco-2 konfluent hücrelerine ait 20X mikroskop görüntüleri

3.2 ChIP DNA Parçalama Koşullarının Optimizasyonu

Kolon kanseri hücrelerinden kromatin izolasyonu için kesme koşullarının optimizasyonu birkaç kritik adımı içerir. İlk olarak, hücrelerin sağlıklı ve stabil olduklarından emin olmak için %70-%80 oranında fikse edilmeleri gerekir. Hücreler fikse edildikten sonra, kromatini izole etmek için işlemden geçirilmek üzere bir hücre peleti elde edilir. Kromatin izolasyonu işlemi sırasında başarılı hücre lizisi ve çekirdek salınımını sağlamak için kritik bir adım, faz kontrast mikroskobu ve hemositometre kullanılarak çekirdek salınımının doğrulanmasını içerir. 10 µl hücre lizatı dounce'dan alınır ve faz kontrast mikroskobu altında incelenir. Bu inceleme, çekirdeklerin ve hücre lizisinin boyutunun görsel olarak değerlendirilmesini sağlar. Hücrelerin lizis adımından önce ve sonra gözlemlenmesi, sağlam hücreler ve çekirdekler arasında

ayrım yapmayı kolaylaştırır. Şekil 3.2 aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 hücrelerinden elde edilen lizatları göstermektedir.

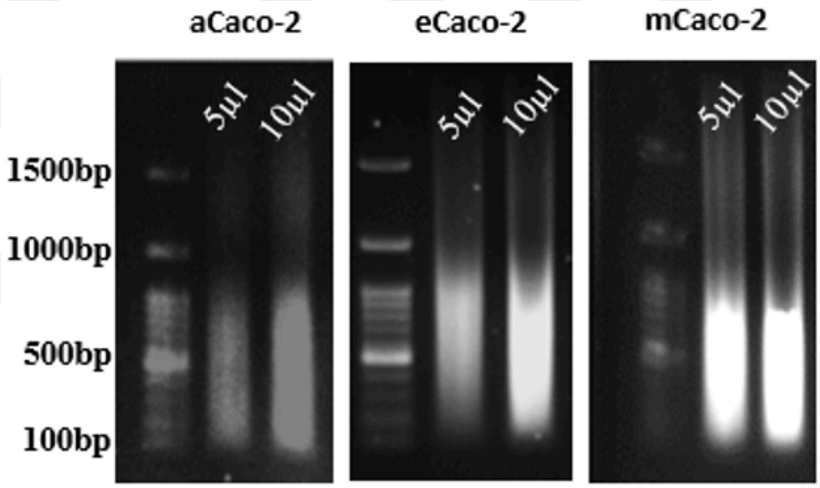


Şekil 3.2 aCaco-2 eCaco-2 ve mCaco-2 hücreleri, hücre patlatma aşaması mikroskop görüntüleri

İnceleme sonuçlarına göre, lize edilmiş aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 hücrelerinde çekirdekler, asimetrik kalıntılarla çevrili olarak belirgin noktalar halinde görünmektedir. Ancak sağlam hücrelerde, koyu merkezi bölge çekirdeği temsil ederken, daha az yoğun bir sitoplazmik hale ile çevrilidir. Eğer hücreler tam olarak lize olmamışsa, istenen lizis elde edilene kadar buz üzerinde ekstra 10 vuruşla patlatma işlemi gerçekleştirilir. Bu doğrulama adımı, çekirdeklerin başarılı bir şekilde salınmasını sağlar ve hücre lizis işleminin etkinliğini doğrular. Bu şekilde, kromatin, parçalama işlemleri için hazırlanmış olur.

3.3 Sonikasyon ile Kromatin Kesme İşleminin Optimizasyonu

Kromatindeki DNA-protein etkileşimlerini etkili bir şekilde incelemek için uygun boyutta kromatin parçaları elde etmek esastır. Kromatini kesmek için genellikle sonikasyon kullanılır. Sonikasyonun ardından, kesme işleminin etkinliği bir agaroz jel elektroforez ile değerlendirilmiştir. Kesilmiş kromatin parçaları için en uygun aralık 200-1500 bp arasındadır ve bu aralıktaki parçalar jel üzerinde bir smear olarak görünecektir. Uygun büyüklükte parçaların başarılı bir şekilde elde edilmesiyle kromatin yapısı ve gen düzenleme çalışmalarında güvenle ilerlenebilir. Şekil 3.3, aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 hücrelerinden elde edilen DNA'nın sonikasyon sonrası agaroz jel elektroforez kullanılarak kesme optimizasyonunu göstermektedir.



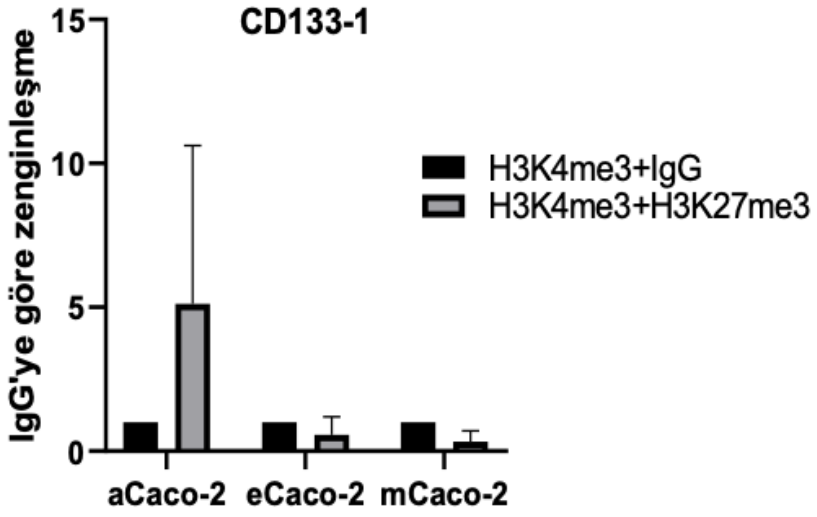
Şekil 3.3 Sonikasyon işleminden sonra aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 shearing optimizasyon görüntüleri

Kromatin fragmantasyon optimizasyonu sonucunda aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 hücrelerinden 200-1500 baz çifti (bp) kromatin fragmanları elde edilmiştir. Sonikasyon işlemi, 60 saniye sonikasyon ve 60 saniye dinlenme olmak üzere 15 döngüde gerçekleştirilmiştir. Smear, kromatin parçalarının istenen aralıkta çeşitli boyutlarda dağılımını temsil eder.

3.4 MET-EMT Geçişlerinde Bivalent Promotorlardaki Değişim

aCaco-2, e-Caco-2 ve mCaco-2 hücre popülasyonlarında epitel belirteç CDX2 ile kök hücre belirteçleri CD133 ve CD44'ün promotorları üzerindeki H3K27me3 ve H3K4me3'ün bivalans durumu araştırılmıştır. Bu analiz, yeniden Kromatin İmmünopresipitasyon (re-ChIP) protokolünün ardından kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yaklaşımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Re-ChIP prosedürü, kromatin komplekslerinin başlangıçta H3K24me3 veya H3K4me3'e özgü antikorlar kullanılarak çöktürüldüğü iki ardışık immünopresipitasyon adımını içerir. Elde edilen kromatin parçaları daha sonra hedef dizilerin zenginleşmesini ölçmek için qPCR analizine tabi tutulmuştur.

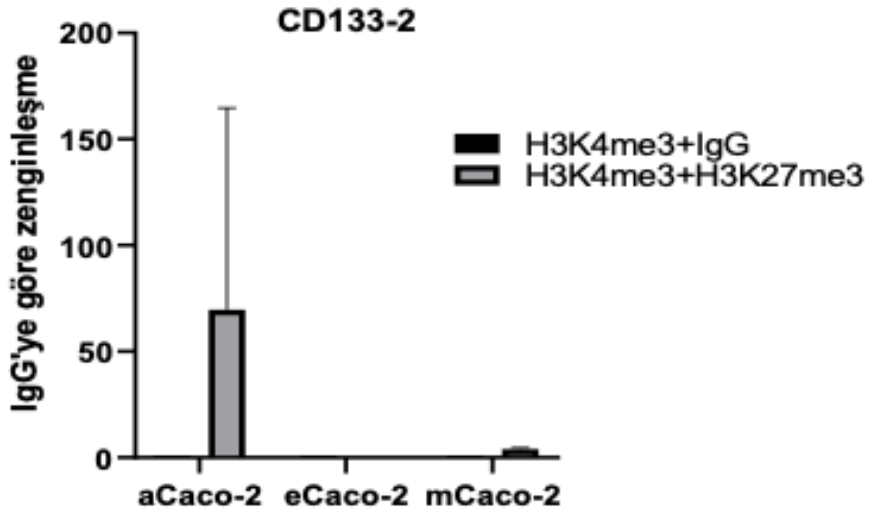
CD133 geninin promotoru CD133-1 ve CD133-2 olmak üzere iki bölge olarak elealınmıştır. Sonuçlar Şekil 3.4 ve 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4 CD133-1 bölgesinde H3K4me3+IgG negatif kontrole göre H3K4me3+H3K27me3 bağlanması

CD133-1 bölgesi için atasal hücrelerde her iki işaret de bulunurken, epitel ve mezenkimale geçişte bivalentlik ortadan kalkmıştır.

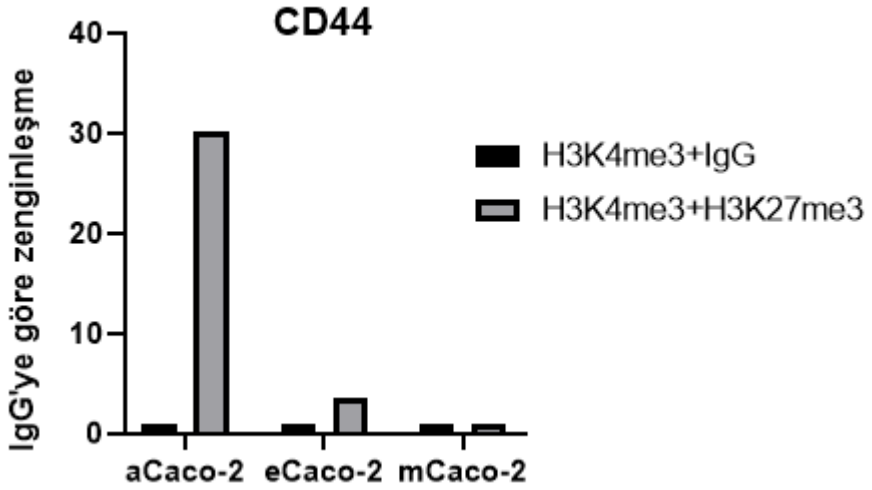
aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 hücrelerinde CD133-2 bölgesindeki olası bivalentlik qPCR ile belirlenmiştir ve sonuçlar Şekil 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.5 CD133-2 bölgesinde H3K4me3+IgG negatif kontrole göre H3K4me3+H3K27me3 bağlanması. Her nokta 2 biyolojik replike ve 2 teknik replike ortalamasını göstermektedir.

Sonuçlar CD133-2 bölgesinde bivalentliğin atasal hücrelerde yüksek olduğunu ve epitel ile mezenkimal hücrelerde azaldığını göstermektedir.

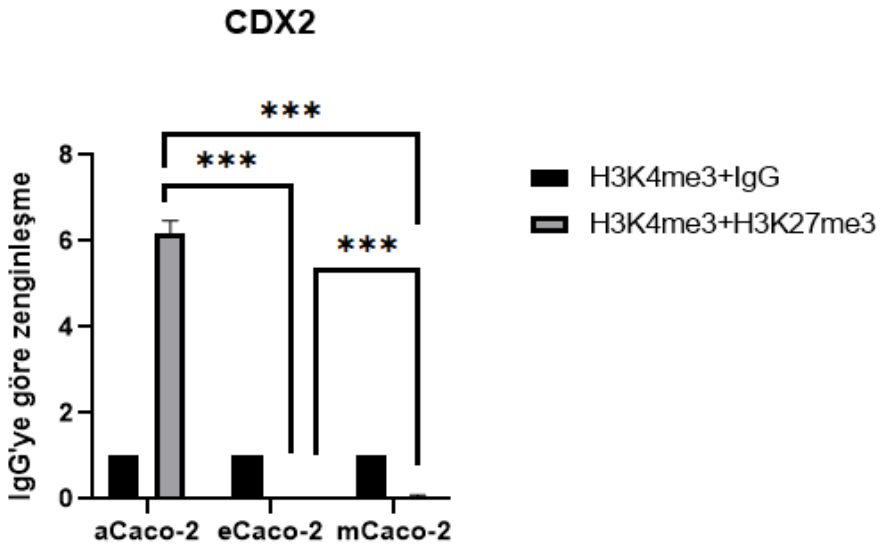
Diğer bir kök hücre belirteci olan CD44 geninin promotorundaki olası bivalentbağlanma qPCR ile belirlenmiştir ve sonuçlar Şekil 3.6'te gösterilmiştir.



Şekil 3.6 CD44 promotor bölgesinde H3K4me3+IgG negatif kontrole göre H3K4me3+H3K27me3 bağlanması. Her nokta 2 biyolojik replike ve 2 teknik replike ortalamasını göstermektedir.

Sonuçlara göre atasal grup hücrelerde yüksek oranda bivalent bağlanma görülürken, epitel veya mezenkimal grup hücrelerinde bu durum görülmemektedir.

Son olarak epitel belirteç, CDX-2 geninin promotor bölgelerindeki olası bivalent bağlanma qPCR ile belirlenmiştir ve sonuçlar Şekil 3.7'te gösterilmiştir.

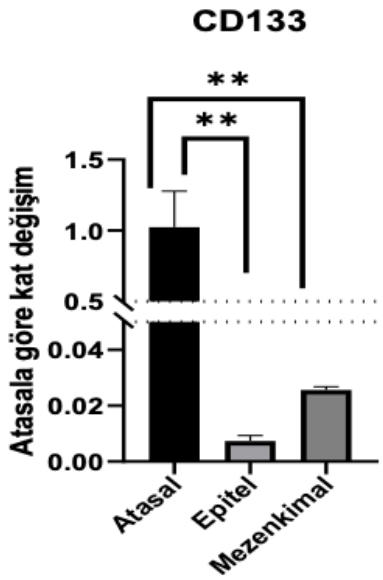


Şekil 3.7 CDX2 promotor bölgesinde H3K4me3+IgG negatif kontrole göre H3K4me3+H3K27me3 bağlanması. Ortalama ±SEM. 2 way ANOVA, ***p<0,001

Sonuçlara göre, CDX2 promotorunda her iki işaret atasal hücrelerde yüksek oranda bulunurken, epitel ve mezenkimal grup hücrelerde bivalent bağlanma görülmemektedir.

3.5 MET-EMT Geçişleri Sırasında Bivalent Genlerin İfade Düzeyleri

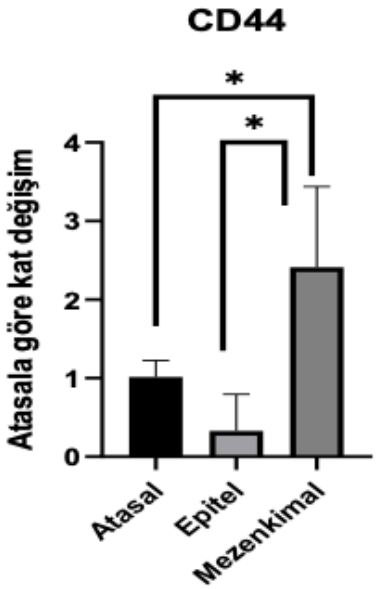
aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2'de kök hücre ve epitel farklılaşma ile ilişkili kilit belirteçler olan CD133, CD44 ve CDX-2 genlerinin mRNA ifade düzeyleri qPCR ile belirlenmiştir. Şekil 3.8 aCaco-, eCaco-2 ve mCaco-2 hücrelerinde CD133'ün mRNA seviyelerini göstermektedir.



Şekil 3.8 aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 hücrelerinde CD133 mRNA seviyeleri. Her değer ortalama±SEM'yi temsil etmektedir. 2 way ANOVA, **p<0,01

Sonuç, eCaco-2 hücrelerinde mRNA ifadesinde önemli bir düşüş olduğunu gösterirken, mCaco-2 hücreleri atasal hücrelere kıyasla mRNA ifadesinde hafif bir artış sergilemiştir.

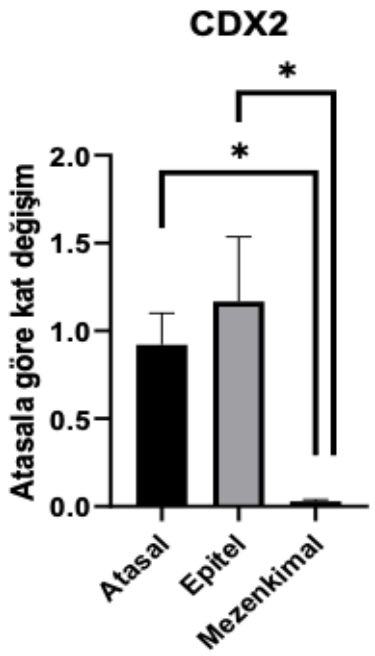
aCaco-2, eCaco- ve eCaco-2 hücre hatlarında CD44'ün mRNA ifadesi qPCR kullanılarak analiz edilmiş ve sonuçlar Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.9 aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 hücrelerinde CD44 mRNA seviyeleri. Her değer ortalama±SEM'yi temsil etmektedir. 2 way ANOVA, *p<0,005

aCaco-2 hücrelerinden eCaco-2 hücrelerine geçiş sırasında mRNA ifadesinde bir miktar bir azalma gözlenmiştir. Ancak, mCaco-2 hücrelerinde bu mRNA ifadesi tekrar önemli bir artış göstermiştir.

CDX-2 geninin aCaco-2, eCaco- ve eCaco-2 hücrelerindeki mRNA ifadesi qPCR kullanılarak analiz edilmiş ve sonuçlar Şekil 3.10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.10 aCaco-2, eCaco-2 ve mCaco-2 hücrelerinde CD44 mRNA seviyeleri. Her değer ortalama±SEM'yi temsil etmektedir. 2 way ANOVA, *p<0,005

aCaco-2 hücrelerinden eCaco-2 hücrelerine geçiş sırasında mRNA ifadesinde hafif bir artış gözlenmiştir. Ancak, mCaco-2 hücrelerinde bu mRNA ifadesi önemli bir düşüş sergilemiştir.

BÖLÜM DÖRT

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, kanserde hücresel plastisitenin önemli bir etkeni olan epigenetik bivalans durumu, CDX-2, CD133 ve CD44 genlerinin promotorlarında incelenmiş ve ekspresyon seviyeleri ile ilişkisi, bir MET/EMT hücre hattı modeli kullanılarak araştırılmıştır. Genler, bivalans alanlarının yerini gösteren önceki çalışmalara (Court vd., 2017; Sun vd., 2017) ve EMT süreciyle ilişkilerine göre seçilmiştir.

Atasal grup hücrelerde, incelenen tüm genlerin promotorlarında yüksek bir H3K4me3 ve H3K27me3 bivalansı gözlenmiştir. ES hücrelerinde, birçok gelişimsel gen, histon proteinleri üzerinde hem Lys27 hem de Lys4 metilasyonu içeren kromatin bölgeleri olan bivalent alanlarla işaretlenir. Bu durum, ES hücrelerinin pluripotensi ya da farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneğini korumasını sağlarken aynı zamanda genomun gelişimsel potansiyelini de korur. ES hücreleri farklılaştıkça, bivalent alanlar Lys27 veya Lys4 ile zenginleştirilmiş bölgelere çözülme eğilimindedir ve böylece sonrasında gen ifadesi basit bir şekilde düzenlenir. Bu, hücrenin belirli bir gelişim yoluna bağlanmasına ve diğerlerini baskılarken uygun gen setini aktive etmesine olanak tanır. Genel olarak, ES hücrelerinde bivalent alanların varlığı, pluripotensi ve gelişimsel potansiyeli korumak için bir mekanizma olarak önerilirken, aynı zamanda farklılaşma sırasında uygun gen ifadesini sağlar (Bernstein vd.,2006). Benzer bir model MET/EMT modelinde de gözlemlenmiştir; hücreler daha fazla/az farklılaşmış bir duruma geçtikçe bivalans durumu ortadan kalkmıştır. Her iki geçiş sırasında da daha istikrarlı bir fenotipe geçişi gösteren bir bivalans azalması görülmüştür. Diğer çalışmalar da geçişe hazır kromatinin genel olarak pluripotens ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır: pluripotent hücreler daha farklılaşmış hücrelere kıyasla yüksek sayıda bivalent alana sahiptir ve bu alanlar farklılaşma sırasında tamamen aktif veya baskılanmış bir duruma doğru çözülme eğilimindedir (Mikkelsen vd., 2007, Cui vd., 2009, Hattori vd., 2013).

Kanser sürecinde, kromatin bivalansı büyük ölçüde kaybolur. Bazı çalışmalar, normal hücrelerin aksine, kanser hücre hatlarındaki bivalent segmentlerin genomik

konumlarının yanı sıra sayılarında da güçlü bir farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır (Bernhart vd., 2016). Çalışmalar ayrıca kanser hücre hatlarının diğer tüm kromatin türlerinden daha az bivalent segmente sahip olduğunu göstermektedir. KRK için, bazı çalışmalar yakın zamanda KRK'de bivalent promotorların yüksek istikrarsızlığını veya değişkenliğini" tanımlamıştır (Hahn vd., 2014). KRK hücrelerinin bivalent kromatin işaretlerindeki değişiklikler, hücre kaderiyle ilişkili farklı gen ekspresyon modelleriyle ilişkilendirilen farklılaşma sırasında gözlenmiştir (Perdigao-Henriques ve ark., 2016). Benzer şekilde, KRK hücrelerindeki kromatin durumunun tümör ilerlemesi ve klinik sonuçlarla ilişkili olduğu bulunmuştur (Terry vd., 2016).

H3K4me3 ve H3K27me3'ün gen düzenlemesi üzerindeki işlevsel etkisi hakkında daha derin bilgiler edinmek için mRNA analizi gibi ek teknikler çok önemlidir. İncelenen genlerin ifade düzeyleri, hücresel plastisitede bivalansın rolü hakkında daha iyi bir fikir vermektedir. Bu nedenle CD133, CD44 ve CDX2'nin mRNA seviyeleri değerlendirilmiştir. Epitel fenotipe geçiş sırasında CD133 seviyelerinde dramatik bir düşüş gözlenmiştir. Hücreler daha mezenkimal bir fenotipe geçtikçe CD3133 ifadesi artmış ancak atasal hücreler kadar yüksek olmamıştır. Kanser alanında yapılan çeşitli çalışmalarda epitel kanser hücrelerinde CD133'ün mRNA seviyelerinde azalma ve mezenkimal kanser hücrelerinde artış bildirilmiştir; bu da farklı hücre fenotipleriyle ilişkili farklı ekspresyon modellerine işaret etmektedir. Örneğin, glioblastoma (Ricci-Vitiani vd., 2007) ve yumurtalık kanseri hücrelerinde (O'Brien vd., 2007) mezenkimal muadillerine kıyasla epitel benzeri kanser hücrelerinde CD133 ifadesinde bir azalma gösterilmiştir. Bu bulgular, CD133 ifadesinin, hücresel fenotipte ve invazyonda bir değişim ile karakterize edilen EMT süreci sırasında dinamik olarak düzenlendiğini göstermektedir. CD133'ün epitel kanser hücrelerindeki aşağı ve mezenkimal kanser hücrelerindeki yukarı regülasyonu, CD133'ün tümör ilerlemesinin farklı aşamalarındaki rolünü ve mezenkimal özelliklerin kazanılmasını yansıtabilir. CD133 ifadesindeki bu değişikliklerin altında yatan mekanizmaları ve bunların kanser ilerlemesi ve metastazındaki işlevsel etkilerini tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Epitel grupta CDX-2'nin mRNA ifadesinde ve mezenkimal grupta CD44'ün mRNA ifadesinde gözlenen artış, bu hücre gruplarında gen ifadesi ile H3K4me3 ve H3K27me3 histon modifikasyonlarının bivalansı arasındaki ilişkinin anlaşılması açısından önemli çıkarımlara sahiptir. CDX-2, epitel hücre kimliğinin ve farklılaşmasının sürdürülmesiyle ilişkili bir epitel belirteçtir. Epitel kolon kanseri grubunda CDX-2 mRNA ekspresyonunun yukarı regülasyonu, CDX-2'nin promotor bölgesinde aktive edici bir işaret olarak H3K4me3 için potansiyel bir rol önermektedir. Bu, H3K4me3'ün gen aktivasyonu ve transkripsiyonel aktivite ile ilişkili olduğunu gösteren önceki çalışmalarla tutarlıdır (Bernstein vd., 2006, Azuara vd., 2006, Mikkelsen vd., 2007). Epitel geçiş sırasında CDX2 mRNA seviyesindeki artış, CDX2 promotorunda H3K4me3 varlığının bu hücrelerde epitel özelliklerin korunmasına katkıda bulunabileceği anlamına gelir. Sonrasında hücreler daha mezenkimal bir fenotipe geçtikçe, baskılayıcı H3K27me3 işareti CDX2 promotöründe daha bol hale gelebilir ve bu nedenle ifadesi bastırılır. Öte yandan, CD44 mezenkimal özellikler ve invazif özelliklerin kazanılması ile ilişkili mezenkimal bir belirteçtir. Epitel kolon kanseri grubunda CD44'ün azalmış mRNA seviyesi, CD44 promotor bölgesinde baskılayıcı bir işaret olarak H3K27me3 için potansiyel bir rol önermektedir. H3K27me3 genellikle gen baskılanması ve transkripsiyonel susturma ile ilişkilidir (Cao vd., 2002, Bracken vd., 2003, Raaphorst, 2003). CD44 mRNA ifadesinin azalması, CD44 promotorundaki H3K27me3 varlığının CD44 ifadesinin baskılanmasında ve epitel kolon kanseri hücrelerinde mezenkimal özelliklerin kazanılmasının engellenmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Bunun tersi mezenkimal hücreler için de geçerli olabilir; hücreler daha mezenkimal bir fenotipe geçtikçe H3K4me3 doluluğu artabilir ve dolayısıyla ekspresyon seviyeleri yükselebilir.

Dolayısıyla, epitelyal kolon kanseri grubunda CDX2'nin artmış mRNA seviyesi ve CD44 ve CD133'ün azalmış olması, gen ifadesinin düzenlenmesinde H3K4me3 ve H3K27me3'ün potansiyel katılımına işaret etmektedir. CDX-2, CD133 ve CD44'ün promotor bölgelerindeki bu histon modifikasyonlarının bivalansı, EMT süreci sırasında gen ifadesinin ince ayarlı bir kontrolüne işaret etmektedir. CDX-2, CD133 ve CD44'ün mRNA seviyeleri ile ilgili promotor bölgelerindeki H3K4me3 ve

H3K27me3 bivalansı arasında gözlenen korelasyon, EMT sırasında hücresel plastisitede epigenetik düzenleme kavramını desteklemektedir. Bu bulgular, seçilen genlerin promotor bölgelerindeki H3K4me3 ve H3K27me3'ün bivalent durumunun EMT süreci sırasında gen ifadesinin dinamik düzenlenmesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Aktive edici ve baskılayıcı histon modifikasyonları arasındaki denge, kolon kanseri hücrelerinin fenotipik plastisitesini ve metastatik potansiyelini belirlemede kritik bir rol oynayabilir. H3K4me3 ve H3K27me3'ün CD133, CD44 ve CDX2 ifadesinin düzenlenmesine katkıda bulunduğu kesin mekanizmaları ve bunların kolon kanserinde hücresel plastisite ve metastaz üzerindeki etkilerini aydınlatmak için ilerleyen süreçlerde daha ayrıntılı incelenmesi gerekliliği açıktır.

Sonuç olarak, mevcut çalışmada MET-EMT geçişlerinde bivalent kromatin işaretlerinde gözlemlenen değişiklikler, bu işaretlerin hücre kaderi kararlarını teşvik etmede ve hücrelerin çevresel ipuçlarına hızla yanıt vermesini sağlamada oynadığı kritik rolü vurgulamaktadır. Bu bulgular, tümörijenik ilerlemenin altında yatan mekanizmalar hakkında daha fazla bilgi sağlamakta ve tümör büyümesini engellemek ve kanser hücresi fenotiplerinde stabiliteyi teşvik etmek için bivalent kromatin işaretlerini hedefleme potansiyelini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

Alaskhar Alhamwe, B., Khalaila, R., Wolf, J., von Bülow, V., Harb, H., Alhamdan, F., ... & Potaczek, D. P. (2018). Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, *14*(1), 1-16.

Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jørgensen, H. F., John, R. M., ... & Fisher, A. G. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nature cell biology*, *8*(5), 532-538.

Bantignies, F., Roure, V., Comet, I., Leblanc, B., Schuettengruber, B., Bonnet, J., ... & Cavalli, G. (2011). Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in Drosophila. *Cell*, *144*(2), 214-226.

Bardahan, K. and Liu, K. (2013). Epigenetic and colorectal cancer pathogenesis. Cancers.2013,5,676-713

Bao, B., Wang, Z., Ali, S., Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., ... & Sarkar, F. H. (2011). Over-expression of FoxM1 leads to epithelial–mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, *112*(9), 2296-2306.

Bernhart, S. H., Kretzmer, H., Holdt, L. M., Jühling, F., Ammerpohl, O., Bergmann, A. K., ... & Hoffmann, S. (2016). Changes of bivalent chromatin coincide with increased expression of developmental genes in cancer. *Scientific reports*, *6*(1), 37393.

Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., ... & Lander, E. S. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, *125*(2), 315-326.

Berx, G., Raspé, E., Christofori, G., Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2007). Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clinical & experimental metastasis*, *24*, 587-597.

Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, *321*(6067), 209-213.

Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L. A., ... & Kirchner, T. (2001). Variable β-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(18), 10356-10361.

Bracken, A. P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., & Helin, K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *The EMBO journal*, *22*(20), 5323-5335.

Bratkowski, M., Yang, X., & Liu, X. (2018). An evolutionarily conserved structural platform for PRC2 inhibition by a class of Ezh2 inhibitors. *Scientific reports*, *8*(1), 9092.

Bots, M., & Johnstone, R. W. (2009). Rational combinations using HDAC inhibitors. *Clinical cancer research*, *15*(12), 3970-3977.

Burger, R. A., Brady, M. F., Bookman, M. A., Fleming, G. F., Monk, B. J., Huang, H., ... & Liang, S. X. (2011). Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *New England Journal of Medicine*, *365*(26), 2473-2483.

Calo, E., & Wysocka, J. (2013). Modification of enhancer chromatin: what, how, and why?. *Molecular cell*, *49*(5), 825-837.

Cao, R., Tsukada, Y. I., & Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A

ubiquitylation and Hox gene silencing. *Molecular cell*, *20*(6), 845-854.

Cao, Y., & Prescott, S. M. (2002). Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *Journal of cellular physiology*, *190*(3), 279-286.

Cedar, H., & Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*, *10*(5), 295-304.

Chen, F., D'Auria, J. C., Tholl, D., Ross, J. R., Gershenzon, J., Noel, J. P., & Pichersky, E. (2003). An Arabidopsis thaliana gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *The Plant Journal*, *36*(5), 577-588.

Christiansen, J. J., & Rajasekaran, A. K. (2006). Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer research*, *66*(17), 8319-8326.

Court, F., & Arnaud, P. (2017). An annotated list of bivalent chromatin regions in human ES cells: a new tool for cancer epigenetic research. *Oncotarget*, *8*(3), 4110.

Déjardin, J., Rappailles, A., Cuvier, O., Grimaud, C., Decoville, M., Locker, D., & Cavalli, G. (2005). Recruitment of Drosophila Polycomb group proteins to chromatin by DSP1. *Nature*, *434*(7032), 533-538.

Dhar, G. A., Saha, S., Mitra, P., & Nag Chaudhuri, R. (2021). DNA methylation and regulation of gene expression: Guardian of our health. *The Nucleus*, *64*(3), 259-270.

Di Nisio, E., Lupo, G., Licursi, V., & Negri, R. (2021). The role of histone lysine methylation in the response of mammalian cells to ionizing radiation. *Frontiers in genetics*, *12*, 639602.

Ducasse, M., & Brown, M. A. (2006). Epigenetic aberrations and cancer. *Molecular cancer*, *5*, 1-10.

Easwaran, H., Johnstone, S. E., Van Neste, L., Ohm, J., Mosbruger, T., Wang, Q., ... & Baylin, S. B. (2012). A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer. *Genome research*, *22*(5), 837-849.

Golbabapour, S., Majid, N. A., Hassandarvish, P., Hajrezaie, M., Abdulla, M. A., & Hadi, A. H. A. (2013). Gene silencing and Polycomb group proteins: an overview of their structure, mechanisms and phylogenetics. *Omics: a journal of integrative biology*, *17*(6), 283-296.

Gregory, P. A., Bert, A. G., Paterson, E. L., Barry, S. C., Tsykin, A., Farshid, G., ... & Goodall, G. J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature cell biology*, *10*(5), 593-601

Hahn, M. A., Li, A. X., Wu, X., Yang, R., Drew, D. A., Rosenberg, D. W., & Pfeifer, G. P. (2014). Loss of the Polycomb Mark from Bivalent Promoters Leads to Activation of Cancer-Promoting Genes in Colorectal TumorsActivation of Bivalent Genes in Colorectal Cancer. *Cancer research*, *74*(13), 3617-3629.

Harb, H., Alashkar Alhamwe, B., Garn, H., Renz, H., & Potaczek, D. P. (2016). Recent developments in epigenetics of pediatric asthma. *Current opinion in pediatrics*, *28*(6), 754-763.

Hollier, B. G., Evans, K., & Mani, S. A. (2009). The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, *14*, 29-43.

Hugo, H., Ackland, M. L., Blick, T., Lawrence, M. G., Clements, J. A., Williams, E. D., & Thompson, E. W. (2007). Epithelial—mesenchymal and mesenchymal—epithelial transitions in carcinoma progression. *Journal of cellular physiology*, *213*(2), 374-383.

Jair, K. W., Bachman, K. E., Suzuki, H., Ting, A. H., Rhee, I., Yen, R. W. C., ... & Schuebel, K. E. (2006). De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer research*, *66*(2), 682-692.

Kanwal, R., & Gupta, S. (2010). Epigenetics and cancer. *Journal of applied physiology*.

Kanwal, R., & Gupta, S. (2012). Epigenetic modifications in cancer. *Clinical genetics*, *81*(4), 303-311.

Kia, S. K., Gorski, M. M., Giannakopoulos, S., & Verrijzer, C. P. (2008). SWI/SNF mediates polycomb eviction and epigenetic reprogramming of the INK4b-ARF-INK4a locus. *Molecular and cellular biology*, *28*(10), 3457-3464.

Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell, 87, 159–170.

Kong, D.; Li, Y.; Wang, Z.; Sarkar, F. (2011). Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins?. *Cancers.*3,716-729

Kuehner, J. N., Bruggeman, E. C., Wen, Z., & Yao, B. (2019). Epigenetic regulations in neuropsychiatric disorders. *Frontiers in genetics*, *10*, 268.

Laird, P. W. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Reviews Cancer*, *3*(4), 253-266.

Landan, G., Cohen, N. M., Mukamel, Z., Bar, A., Molchadsky, A., Brosh, R., ... & Tanay, A. (2012). Epigenetic polymorphism and the stochastic formation of differentially methylated regions in normal and cancerous tissues. *Nature genetics*, *44*(11), 1207-1214.

Leeb, M., & Wutz, A. (2012). Establishment of epigenetic patterns in development. *Chromosoma*, *121*, 251-262.

Lehmann, S., Bykov, V. J., Ali, D., Andrén, O., Cherif, H., Tidefelt, U., ... & Andersson, P. O. (2012). Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. *J Clin Oncol*, *30*(29), 3633-3639.

Li, M., Bu, X., Cai, B., Liang, P., Li, K., Qu, X., & Shen, L. (2019). Biological role of metabolic reprogramming of cancer cells during epithelial-mesenchymal transition. *Oncology Reports*, *41*(2), 727-741.

Ma, H., Bernstein, L., Pike, M. C., & Ursin, G. (2006). Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Research*, *8*(4), 1-11.
distinct functions in active and inactive genes. *Cell*, *138*(5), 1019-1031.

Maki, G., Hayes, G. M., Naji, A., Tyler, T., Carosella, E. D., Rouas-Freiss, N., & Gregory, S. A. (2008). NK resistance of tumor cells from multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia patients: implication of HLA-G. *Leukemia*, *22*(5), 998-1006.

Margueron, R., & Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, *469*(7330), 343-349.

Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., ... & Bernstein, B. E. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, *448*(7153), 553-560.

Misiakos, E. P., Karidis, N. P., & Kouraklis, G. (2011). Current treatment for colorectal liver metastases. *World journal of gastroenterology: WJG*, *17*(36), 4067.

O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, *445*(7123), 106-110.

Perdigao-Henriques, R., Petrocca, F., Altschuler, G., Thomas, M. P., Le, M. T. N., Tan, S. M., ... & Lieberman, J. (2016). miR-200 promotes the mesenchymal to epithelial transition by suppressing multiple members of the Zeb2 and Snail1 transcriptional repressor complexes. *Oncogene*, *35*(2), 158-172.

Pherson, M., Misulovin, Z., Gause, M., Mihindukulasuriya, K., Swain, A., & Dorsett, D. (2017). Polycomb repressive complex 1 modifies transcription of active genes. *Science Advances*, *3*(8), e1700944.

Raaphorst, F. M., Meijer, C. J., Fieret, E., Blokzijl, T., Mommers, E., Buerger, H., ... & Van Diest, P. J. (2003). Poorly differentiated breast carcinoma is associated with increased expression of the human polycomb group EZH2 gene. *Neoplasia*, *5*(6), 481-488.

Rodríguez-Paredes, M., & Esteller, M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature medicine*, *17*(3), 330-339.

Rodenhiser, D., & Mann, M. (2006). Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Cmaj*, *174*(3), 341-348.

Richly, H., Aloia, L., & Di Croce, L. (2011). Roles of the Polycomb group proteins in stem cells and cancer. *Cell death & disease*, *2*(9), e204-e204.

Rustgi, A. K. (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes & development*, *21*(20), 2525-2538.

Sawicka, A., & Seiser, C. (2014). Sensing core histone phosphorylation—A matter of perfect timing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, *1839*(8), 711-718.

Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., & Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*, *128*(4), 735-745.

Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature reviews Clinical oncology*, *14*(10), 611-629.

Sparmann, A., & van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *6*(11), 846-856.

Tam, W. L., & Weinberg, R. A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature medicine*, *19*(11), 1438-1449.

Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, *138*(6), 2101-2114.

Thiery, J.P.; Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*.7, 131-142.

Van DIjk, M., Visser, A., Posthuma, J., Poutsma, A., & Oudejans, C. B. (2012). Naturally occurring variation in trophoblast invasion as a source of novel (epigenetic) biomarkers. *Frontiers in genetics*, *3*, 22.

Voigt, P., Tee, W. W., & Reinberg, D. (2013). A double take on bivalent promoters. *Genes & development*, *27*(12), 1318-1338.

Vu, T. and Datta, P. (2017) Regulation of emt in colorectal cancer: a culprit in metastasis. *Cancers*. 9,171.

Xu, H., Wu, M., Ma, X., Huang, W., & Xu, Y. (2021). Function and mechanism of novel histone posttranslational modifications in health and disease. *BioMed Research International*, *2021*.

Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D. E., Barski, A., Peng, W., & Zhao, K. (2009). Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals.

Wang, J., Tian, L., Madlung, A., Lee, H. S., Chen, M., Lee, J. J., ... & Chen, Z. J. (2004). Stochastic and epigenetic changes of gene expression in Arabidopsis polyploids. *Genetics*, *167*(4), 1961-1973.

Yang, H., Wang, Y., Wang, Z., Yuan, S., Niu, C., Liu, Y., ... & Song, Y. (2022). Effect of polytetrafluoroethylene nanoplastics on combined inhibition of ciprofloxacin and bivalent copper on nitrogen removal, sludge activity and microbial community in sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, *360*, 127627.

Zhang, W., Zhu, X. D., Sun, H. C., Xiong, Y. Q., Zhuang, P. Y., Xu, H. X., ... & Tang, Z. Y. (2010). Depletion of tumor-associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effectsmacrophage depletion ımproves the effect of sorafenib. *Clinical Cancer Research*, *16*(13), 3420-3430.