



**Östrojen Yanıt Geni CXXC5'in Östrojen Tarafından Düzenlenen
Hücre Çoğalmasındaki Etkisi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 114Z243

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Mesut Muyan

Danışman:

Prof. Dr. Tolga Can

Bursiyer:

Gizem Kars

Burcu Karakaya

Negin Razizadeh

Ocak 2018

ANKARA



ÖNSÖZ

Östrojen hormonları, özellikle kandaki en etkin östrojen olan 17β -östradiyol (E2), meme dokusu dahil bir çok doku ve organ fizyolojisinde önemli bir rol oynar. E2, meme kanserinin başlamasından ve ilerlemesinden de sorumludur. Meme epitel hücrelerinde E2 sinyali, bir transkripsiyon faktörü olan östrojen reseptörü α (ER α) tarafından taşınır. E2-ER α hücre çoğalmasından ölümüne kadar bir çok süreçte rol oynayan genlerin ekspresyonunu östrojen yanıt elamanı (estrogen response element, ERE)-bağımlı ve ERE-bağımsız sinyal yollarıyla düzenleyerek hücre yanıtına yol açar. E2-hedef genlerinin belirlenmesi, gen ifade mekanizmalarının tanımlanması ve protein ürünlerinin işlevlerinin belirlenmesi, meme kanserinin nasıl başladığının/ilerlediğinin anlaşılmasına önemli katkılarda bulunabilir. Önceki çalışmalarımız, CXXC5 gen ifadesinin E2-ER α sinyal yolağı ile düzenlediğini önermektedir. CXXC5 proteininin yapısı henüz bilinmemektedir. Ancak, yapısal öngörüler, CXXC5 proteinini DNA'nın metile-olmamış CpG dinükleotid dizilerine bağlanan bir protein ailesinin üyesi olarak tanımlamaktadır. CXXC5'in işlevleri üzerine yapılan sınırlı sayıda çalışma, CXXC5'in bir transkripsiyon faktörü ve/veya protein partneri olarak çeşitli sinyal yollarının tetiklediği hücre yanıtını düzenleyen gen transkripsiyonunda rol oynadığını önermektedir. Projemizin amacı, E2-ER α tarafından sentezi düzenlenen CXXC5'in E2'nin regüle ettiği hücre çoğalmasında temel bir rol oynadığı öngörümüzü *in vitro* ve *in cellula* çalışmalarla sınamaktır. Bu amaca yönelik çalışmalarımızda, CXXC5'in E2-ER α tarafından ERE-bağımlı sinyal yolağı ile düzenlenen E2 yanıt geni olduğunu gösterdik. CXXC5'in metile-olmamış CpG dinükleotidlere bağlanan bir protein olduğunu, E2 ile tetiklenen kimi gen ekspresyonlarının düzenlemesine katılarak hücre çoğalmasında rol oynadığını bulguladık. TÜBİTAK-KBAG 114Z243 tarafından desteklenen bu çalışmalarımızla, E2 yanıt genlerinin hücre çoğalmasındaki rolleri ve etki mekanizmalarının tanımlanmasına katkıda bulunduğumuzu düşünmekteyiz.



TEŞEKKÜR

Çalışmalarımız sırasında bize her zaman destek olan TÜBİTAK-Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu personeline; projenin gerçekleşmesinde kullanılan laboratuvar olanaklarını sağlayan ve alt yapısı ile destek veren Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümü'ne; Yapısal çalışmalarımıza laboratuvar olanaklarını açan Toronto Üniversitesi Fizyoloji Bölümü (Toronto, Kanada)'nden Dr. Jinrong Min'e; Meme kanseri ile ilgili klinikopatolojik bulgularına erişimi ve analizine olanak sağlayan Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Dr. Özgür Şahin'e; Biold deney ve sonuçlarına yönelik bilimsel ve teknik önerileri için Koç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Dr. Nurhan Özlü'ye; Dinamik protein ağı ve protein-protein ilişkilenmelerine yönelik çalışmalarda yol göstericiliği için ODTÜ Enformatik Enstitüsü'den Dr. Nurcan Tuçbağ'a teşekkürü borç biliriz.

ŞEKİL LİSTESİ	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
SONUÇ RAPORU	1
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM	5
3.1 qPCR (Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu PCR; Quantitative PCR, qPCR)	5
3.2 <i>In silico</i> ERE Analizleri	5
3.3 PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu, Polymerase chain reaction, PCR)	5
3.4 CXXC5 sentezi	6
3.4.1 Western Blot (WB)	6
3.4.2 İmmünositokimya (Immunocytochemistry, ICC)	6
3.5 Raportör Deneyi (Dual Luciferase Reporter Assay)	6
3.6 Kromatin İmmünçökeltme (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)	7
3.7 Elektroforetik Kayma Analizi (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)	8
3.8 Rekombinant CXXC5 ve CXXC Domainin Klonlanması ve Ekspresyonu	8
3.8.1 pET28-6xHis-CXXC5 (1-322) ve pET28-6xHis-CXXC5 (250-309) Klonlanması.....	9
3.8.2 Rekombinant Protein Ekspresyonu.....	9
3.8.3 İmmobilize Metal Afinite Kromatografi (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC)	9
3.8.4 İyon Değişim (Ion-exchange) Kromatografi	10
3.8.5 Jel Filtrasyonu Kromatografi	10
3.9 CXXC5 Proteininin DNA Bağlanma Özelliğinin Belirlenmesi	10
3.9.1 İzotermal Titrasyon Kalorimetre	10
3.9.2 EMSA	11
3.10 Tetrasiklin Tetiklenebilir Lentiviral Ekspresyon Sistemi	11
3.11 siRNA Transfeksiyonu	11
3.12 Hücre Çoğalması Deneyleri	12
3.13 Aneksin V Deneyleri	12

3.14 Genome Düzeyinde Gen Ekspresyon Deneyleri	12
3.15 Klinikopatolojik Meme Kanseri Hasta Veri Değerlendirmeleri	13
3.16 Proteinlerin Kimlik Belirlemeleri	13
3.16.1 Yakınlık Bağımlı Biotin Kimlik Sistemi (Proximity Biotinylation Assay, BioID)	13
3.16.2 Eş-Lokalizasyon (Co-localization)	13
3.16.3 Eş-İmmünçökeltme (Co-Immunoprecipitation, Co-IP)	14
4. İstatiksel Analiz	14
4. BULGULAR	16
4. 1 E2-ER α CXXC5 gen ekspresyonu ERE-bağımlı sinyal yoluyla düzenler .16	
4. 2 CXXC5 metile-olmamış CpG dinükleotidlere bağlanan bir protein olup E2 ER α tarafından düzenlenen hücre çoğalmasına katılır	21
4.2.1 Rekombinant Doğal (Wild-type, WT) CXXC5 ve CXXC Domain Proteinlerinin Sentezi, Saflaştırılması ve İşlev Belirlemesi	22
4.2.2 ChIP-Sekanslama (ChIP-Sequencing, ChIP-Seq)	23
4.3 CXXC5'in E2'nin Düzenlediği Hücre İşlevlerindeki Rolü	24
4.3.1 Lentivirüs Enfeksiyonları	24
4.3.2 siRNA Transfeksiyonları	28
4.3.3 Hücre Çoğalması ve Apoptoz Deneyleri	28
4.3.4 CXXC5'in E2-ER α sinyali tarafından düzenlenen gen ekspresyonları üzerine etkisi	28
4.3.5 Meme kanserinde CXXC5 ekspresyonu ve klinikopatolojik özellikler	30
4.4 CXXC5 proteiniyle ilişkilenen protein partnerlerinin belirlenmesi	32
4.4.1 BioID Sistemi	32
4.4.2 Biotinlenmiş Hücre Proteinlerinin İzolasyonu	34
4.4.3 Protein Kimlikleri	34
4.4.4 Eş-Lokalizasyon	36
4.4.5 Eş-İmmünçökeltme	36
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	38
6. KAYNAKLAR	42

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. pET28-MHL vektör şeması	9
Şekil 2. E2'nin CXXC5 geni üzerine etkisi	16
Şekil 3. ER-ERE ilişkilenmeleri	17
Şekil 4. ERE içeren CXXC5 gen lokusunun E2-ER'α yanıtı	19
Şekil 5. Rekombinant doğal CXXC5 (CXXC5 Full lenght) ve CXXC domain (CXXC) proteinlerin saflaştırılması	21
Şekil 6. Saflaştırılmış rekombinant FL-CXXC5 ve CXXC5-CXXC domain proteinlerin metile-olmamış (Non-methylated), metile-olmuş (methylated) CpG dinükleotidi içeren veya içermeyen (No CpG) içeren DNA fragmanı ilişkilenmesinin ITC ile testi	22
Şekil 7. Saflaştırılmış rekombinant WT-CXXC5 ve CXXC5-CXXC domain proteinlerin metile-olmamış (CG DNA) ya da metile-olmuş (mCG) CpG dinükleotidi içeren DNA fragmanına bağlanmasının EMSA ile testi	23
Şekil 8. Tetrasiklin ile gen ekspresyonu tetiklenebilir pINDUCER Viral Vektörleri	25
Şekil 9. Rekombinant lentivirüs ile MCF7 hücrelerinin enfeksiyonu	26
Şekil 10. MCF7 hücrelerinde endojen CXXC5 sentezinin baskılanmasının hücre çoğalması üzerine etkisi	27
Şekil 11. CXXC5'in meme tümörlerinde ekspresyonu	31
Şekil 12. CXXC5'in olası protein partnerlerinin BioID yaklaşımıyla belirlenmesi	33
Şekil 13. CXXC5 ve MECP2 proteinin eş-lokalizasyonu ve protein-protein ilişkilenmeleri ..	35

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. CXXC5 sentezinin azaltılmasının E2 tarafından düzenlenen kimi gen ekspresyonları üzerine etkisi	29
---	----

ÖZET

Dolaşımdaki en önemli östrojen hormonu 17β -östradiyol (E2) meme fizyolojisi ve patolojisinde rol oynayan başlıca faktörlerden biridir. E2'nin meme epitel hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi bir transkripsiyon faktörü olan östrojen reseptörleri (ER), özellikle ER α , tarafından östrojen yanıt elemanı (estrogen response element, ERE)-bağımlı ve ERE-bağımsız genomik sinyal yollarıyla düzenlenir. ERE-bağımlı sinyali, E2-ER α 'nın ERE'lere bağlanarak gerçekleştirdiği gen ifadelerini; ERE-bağımsız sinyal yolağı da, E2-ER α 'nın DNA üzerindeki kendine özgü yanıt dizisine bağlanmış transkripsiyon faktörleriyle işlevsel bir ilişkiye girerek düzenlediği transkripsiyon süreçlerini tanımlar. E2-hedef genlerinin belirlenmesi, gen ifade mekanizmalarının tanımlanması ve protein ürünlerinin işlevlerinin belirlenmesi, meme kanserinin nasıl başladığının ve ilerlediğinin anlaşılmasıyla birlikte ek veya yeni tanı/tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine önemli katkılarda bulunabilir.

Önceki çalışmalarımız, E2-ER α sinyalinin CXXC5 gen ifadesini düzenlediğini önermekteydi. Öngörülen yapısal özellikleri nedeniyle, CXXC5'in metile-olmamış CpG dinükleotidlerine bağlanıp çeşitli sinyal yollarına yanıtta şekillenen gen ifadelerinin düzenlenmesine katılarak hücre işlevlerinde rol oynadığı önerilmiştir. Bu projede amacımız, E2-ER α tarafından ERE-bağımlı sinyal yolağıyla sentezlenen CXXC5'in metile-olmamış CpG dinükleotid bağlanan bir protein olarak E2 tarafından tetiklenen gen ifadelerinin yol açtığı hücre çoğalmasına katıldığı öngörüsünü test etmektir. Bu amaçla gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda, E2-ER α 'nın ERE-bağımlı sinyal yolağıyla CXXC5 gen ifadesini ve protein sentezini düzenlediğini gösterdik. Bunun yanında, CXXC5'in metile-olmamış CpG dinükleotidlerine bağlanan bir protein olduğunu ve E2-ER α ile düzenlenen gen ekspresyonlarının düzenlenmesine katılarak E2 sinyaliyle tetiklenen hücre çoğalmasında önemli bir rol oynadığını bulduk.

Sonuçlarımızın, E2 yanıt gen ürünü olarak senteze edilen proteinlerin E2 tarafından tetiklenen hücre çoğalmasındaki rolleri ve etki mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağladığını düşünmekteyiz. Bulgularımız, meme kanserine karşı ek veya yeni tanı/tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine de yol açabilir.

Anahtar Kelimeler: meme kanseri, östrojen, östrojen reseptör, gen ekspresyonu, CXXC5, hücre çoğalması



ABSTRACT

17 β -estradiol (E2), the main estrogen hormone in circulation, is one of important factors involved in the physiology and pathophysiology of breast tissue. The proliferative effect of E2 on mammary epithelial cells is mediated by estrogen receptors, particularly ER α , which is a transcription factor. The interaction of the E2-ER α with specific DNA sequences, estrogen response elements (EREs), constitutes the initial stage of the ERE-dependent signaling. The interaction of E2-ER α with other transcription factors bound to their cognate response elements defines the ERE-independent signaling. The identification of E2 responsive genes, characterization of mechanisms and discerning the function of protein products could lead to important gains in understanding of the initiation/progression of breast cancer and in the development of additional and/or new prognostic/therapeutic approaches in combating the disease.

Our previous studies suggested that the expression of *CXXC5* is regulated by E2-ER α . Based on homology studies, *CXXC5* is considered to be a non-methylated CpG dinucleotide binding protein. Studies also suggest that *CXXC5* is involved in the transcriptional regulation of cellular events in response to various signaling pathways. We therefore predicted that *CXXC5*, synthesized as the primary response gene product, participates in the regulation of E2-ER α regulated gene expressions, thereby contributing to E2-mediated cellular proliferation. Aimed at testing this prediction, our studies revealed that E2-ER α regulates *CXXC5* gene expression through the ERE-dependent signaling pathway. Moreover, we found that *CXXC5* is a non-methylated CpG dinucleotide-binding protein and is involved in the regulation of E2-mediated cellular proliferation by participating in the regulation of gene expressions by E2-ER α .

Our results provide important insights into the role and mechanism of an E2-responsive gene product in E2-mediated cellular proliferation. Our results could lead to the development of additional and/or new prognostic/treatment modalities against breast cancer.

Key Words: breast cancer, estrogen, estrogen receptor, gene expression, *CXXC5*, cellular proliferation

SONUÇ RAPORU

1. GİRİŞ

Meme kanseri, meme epitel hücrelerinin çoğalmasını, farklılaşmasını ve ölümünü düzenleyen entegre sistemlerin bozulmasının sonucunda ortaya çıkar. Kalıtsal mutasyonlar, kansere yatkın genlerin polimorfizmi, besinsel ve çevresel faktörlerin yanı sıra sistemik ve yerel hormonlar/faktörler gibi birçok etken meme kanseri etiolojisine katkıda bulunabilir (Huang et al., 2005). Ancak sistemik/yerel faktörlerden östrojen hormonu, özellikle dolaşımdaki en önemli östrojen hormonu olan 17β -estradiol (E2), meme kanserinin başlamasında ve ilerlemesinde başat bir rol oynar (Huang et al., 2005).

Hücre çoğalmasında temel bir rol oynayan E2 sinyali, hücre nükleusunda bulunan ve transkripsiyon faktörleri olarak çalışan östrojen reseptör (ER) α ve β tarafından gerçekleştirilir. Meme dokusunda sentezlenen başlıca östrojen reseptörü ER α 'dır. Genomik E2 sinyal yolağı, yeni gen ifadelerine ve bu gen proteinlerinin sentezine neden olarak hücrelerde kalıcı fenotipik değişikliklere yol açan olayları kapsar. ER α , gen ifadelerinin düzenlenmesini DNA ile doğrudan ya da dolaylı olarak etkileşime girerek sağlar. Gen ifadesinin DNA ile doğrudan etkileşime girerek düzenlenmesinin ilk ayağı, ER α 'nın östrojen yanıt elemanlarına (estrogen response element, ERE) bağlanmasıdır. Konsensüs ERE, üç özel olmayan nükleotidin (n) ayırdığı beşer nükleotidlik iki yarımdan oluşan palindromik DNA dizisidir (5'-GGTCA_nTTGACC-3'). Bu konsensüs ERE dizisinden üç nükleotide kadar farklılık gösteren türev DNA dizileri de ER α tarafından tanınmakta ve ERE işlevi görmektedir (Yi vd., 2002). ER α 'nın ERE dizilerine bağlanarak gen ifadelerini düzenlemesi ERE-bağımlı (ERE-dependent) ER sinyal yolağı olarak tanımlanır (Huang vd., 2005). Bu sinyal yolağında, ERE ile ilişkilendirilmiş ER'lere E2'nin bağlanması reseptörde yapısal değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler, ER dimerlerinin ve dimer-ERE ilişkilerinin stabilizasyonunu ve ER dimerlerin kromatin modifikasyonunda rol oynayacak birçok yardımcı-regülatör (co-regulator) proteinle etkileşime girmesini sağlar. E2-ER tarafından ERE üzerinde konumlandırılan protein kompleksleri de yerel kromatin yapısının yeniden düzenlenmesini ve bunun sonucunda da genel transkripsiyon faktörlerinin promotör elemanlarına bağlanıp transkripsiyonu düzenlemesini sağlar (Yaşar vd., 2017). E2-ER kompleksi ERE-bağımlı veya ERE-bağımsız yolaklarla, birincil yanıt gen (primary response gene) ifadelerini düzenler. Bu birincil genler; transkripsiyon faktörlerini, nükleik asit ve protein metabolizmasında rol oynayan proteinleri, membran sinyal proteinleri/reseptörlerini kodlar (Bourdeau vd., 2008; Hah ve Kraus, 2014; Hah vd., 2011; Jagannathan ve Robinson-Rechavi, 2011; Li vd., 2008; Lin vd., 2004; Nott vd., 2009). Birincil yanıt genlerinin sentezlenen protein ürünleri de DNA sentez ve modifikasyonunda, hücre döngüsü ve bölünmesinde rol oynayan ikincil gen ifadelerini düzenlerler (Bourdeau vd., 2008; Hah ve Kraus, 2014; Hah vd., 2011;

Jagannathan ve Robinson-Rechavi, 2011; Li vd., 2008; Lin vd., 2004; Nott vd., 2009). E2 sinyalinin ardışık olarak düzenlediği gen yanıtları, hücre çoğalması sürecinin temel mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır.

E2-ER α sinyalinin hücre çoğalmasında oynadığı temel rol nedeniyle, meme kanserlerinin üçte ikisini oluşturan ER α -pozitif meme kanserine karşı en etkin güncel yaklaşımlar E2 sentezinin engellenmesi ve/veya ER işlevlerinin baskılanmasına yöneliktir (Huang vd., 2005). E2, aromataz enzimleri aracılığıyla androjenik steroid hormonlarından sentezlenir. Aromataz işlevlerinin doğal ya da sentetik aromataz enzim inhibitörleri ile önlenmesi E2 sentezini azaltır/durdurur. Diğer taraftan, antagonist moleküller E2 ile rekabet ederek ER α 'ya bağlanırlar. Bu bağlanma sonucu ER α 'da oluşan yapısal değişiklikler, reseptörün yardımcı proteinlerle ilişkiye girmesini azaltarak/önleyerek E2 yanıt gen ifadelerini ve sonrasında kanser hücrelerinin çoğalması baskılar. Ancak bu tür güncel tedavi yaklaşımlarına yanıt verebilen ER α -pozitif meme kanseri hastalarının hemen hemen tümünde, çoğalması baskılanmış tümör hücreleri bir süre sonra tedavi moleküllerine karşı direnç kazanarak yeniden çoğalmaya başlar (Huang vd., 2005). Tedaviye dirençli kanser fenotiplerinin nasıl ortaya çıktığı tam olarak bilinmemekle birlikte, mikroçevre düzensizliklerinin yol açtığı E2-ER α sinyal yollarının bozulması ve/veya anormal büyüme sinyallerinin E2-ER α 'nın hücredeki düzenleyici rolünü değiştirmeleri/aşmaları güncel tedavi yaklaşımlarını sınırlamaktadır.

E2-hedef genlerinin belirlenmesi, gen ifade mekanizmalarının tanımlanması ve proteinlerinin işlevsel olarak incelenmesi, meme kanserinin nasıl başladığının/ilerlediğinin ve tedaviye direncin nasıl geliştiğinin anlaşılmasına önemli kazanımlar getirebilir. Bu kazanımlar da meme kanserine karşı etkin alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

E2-hedef genlerini belirlemek için yaptığımız önceki mikrodizin çalışmalarımızda (Li vd., 2008; Nott vd., 2009), epigenetik değişikliklere yol açan süreçlerde rol oynayan birçok gen ifadesinin E2-ER α sinyali tarafından ERE-bağımlı yolk ile düzenlendiğini bulguladık (Nott vd., 2009). E2-ER α yanıtı genlerden biri olan CXXC5 içerdiği çinko parmak-CXXC ünitesi (zinc finger, ZF-CXXC domain) nedeniyle kromatin-bağlanan bir protein grubunun üyesi olarak tanımlanmaktadır (Long vd., 2013). Cfp1 (CXXC finger protein 1), Mbp1 (Methyl-CpG Binding Domain Protein 1), Kdm2A & B (Lysine (K)-Specific Demethylase 2A & 2B), DNMT1 (DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 1) ve Tet1, 2 ve 3 (Tet Methylcytosine Dioxygenase 1, 2, 3) proteinlerini de içeren bu grubun şimdiye kadar tanımlanan 12 üyesinin ZF-CXXC ünitesi aracılığı ile metile-olmamış (un-methylated) CpG dinükleotidlerinin yoğun olarak bulunduğu DNA CpG adalarına (CpG islands, CGI) bağlandığı gösterilmiştir (Long vd., 2013).

DNA metilasyonu, kovalent histon modifikasyonları, nükleozom pozisyonlanması ve miRNA'ları içeren epigenetik mekanizmalar, gelişimsel biyolojide ve kanser gibi hastalıklarda gen ifadesinin düzenlenmesi için önemlidirler. Genomik DNA'nın kimyasal modifikasyonu sitozin nükleotidinin metilasyonu ile sınırlıdır ve genel olarak CpG dinükleotidlerini içermektedir. Genomda yaygın olan metile olmuş (mCpG) CpG dinükleotidlerine bağlanan proteinler (methyl-CpG binding proteins) heterokromatin bölgelerini tanımlar ve bu durumun sürekliliğini sağlayarak transkripsiyonu düzenler. Ancak, gen promotörlerinin büyük bir çoğunluğu, CGI'larla tanımlanan ve RNA pol II içeren, transkripsiyonel olarak aktif (Core vd., 2008) ökromatik bölgelerde bulunur. Bu metile olmamış CGI'lara bağlanan ZF-CXXC proteinleri DNA metilasyonunu önler. Bunun yanında, ZF-CXXC proteinleri histonları post-translasyonel olarak modifiye eden proteinlerle doğrudan ya da dolaylı ilişkiye girerek gen transkripsiyonunun düzenlenmesine katılır.

CXXC5 geni ilk kez 2000 yılında hematopoetik kök hücrelerinde tanımlanmıştır (Zhang vd., 2000). CXXC5 proteininin işlevlerine yönelik çalışmalar sınırlı olmasına rağmen, CXXC5'in hücre çoğalması, farklılaşması, metabolizması ve ölümünde rol oynadığı öngörülmektedir. Tümör baskılayıcı bazı genlerle birlikte CXXC5 genini de içeren lokusun miyelodisplazi sendromu (myelodysplasia syndrome, MDS) ve akut miyeloid lösemi (acute myeloid leukemia, AML) hastalarında sıklıkla delesyona uğradığı bulunmuştur (Pendino vd., 2009; Treppendahl vd., 2013). Bu gözlemlerle birlikte, CXXC5'in hem sitokin sinyali aracılığı ile düzenlenen hematopoetik kök hücrelerin miyelopoiezinde hem de retinoik asit tarafından başlatılan lösemik hücrelerin farklılaşmasında düzenleyici etkileri olduğunun gösterilmesi (Pendino vd., 2009; Treppendahl vd., 2013), CXXC5'in hücre işlevlerinde DNA metilasyonunun düzenlenmesine katılarak önemli bir rol oynadığı düşündürmektedir.

CXXC5'in hücre farklılaşmasına katkısı miyelopoezle sınırlı değildir; hücre nükleusunda lokalize olan CXXC5'in BMP4 (Bone morphogenic protein 4) sinyalinde bir transkripsiyon faktörü olarak görev aldığı, CXXC motifi aracılığı ile Flk-1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, Flk-1/KDR) gen ifadesini düzenlediği ve böylece endotel hücrelerinin farklılaşması ve damar oluşumuna katıldığı bulgulanmıştır (Kim vd., 2013).

Wnt/ β -Catenin sinyal yolağı kök hücre pluripotensisini, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını regüle ederken, bu sinyal yolağının bozulmasının tümör oluşumuna ve ilerlemesine yol açtığı bilinmektedir (Bernatik vd., 2011). Wnt/ β -Catenin sinyalinin hücre içinde aktarılmasına DVL (Dishevelled) proteinleri aracılık eder. CXXC5'in Wnt/ β -catenin sinyalini, DVL proteinin PDZ modülüne protein partneri olarak bağlanarak önlediği gösterilmiş ve bu nedenle CXXC5'in tümör baskılayıcı olduğu önerilmiştir (Kim vd., 2010).

Hücre enerji üretimi ve regülasyonunda rol oynayan elektron taşınım zincirinin terminal bir enzimi olan COX (Cytochrome C Oxidase) nükleer ve mitokondrial genom tarafından kodlanan birçok farklı altüniteden oluşmaktadır. Bu altünitelerden biri olan COX4/2 (Subunit 4/2), COX enzim kompleksinin dokuya özgü hücre enerji gereksinimlerini düzenlemesinde önemli bir rol oynar. Hücrelerin, değişen oksijen seviyelerine uyum sağlamasında da CXXC5'in önemli bir transkripsiyon faktörü olarak rol aldığı bulgulanmıştır. Çalışmalar, yüksek oksijen seviyelerinde CXXC5'in COX4/2 promotörüne bağlanması sonucu COX4/2 gen ifadesinin baskılandığını, düşük oksijen seviyelerinde ise CXXC5'in promotörden uzaklaştırılması sonucu COX4/2 gen ifadesinin arttığını göstermiştir (Aras vd., 2013).

CXXC5 proteininin birbirinden bağımsız yolların düzenlediği programlı hücre ölümünde (apoptosis) de rol aldığı bulunmuştur. Hücre ölümüne yol açan yollardan biri, tümör baskılayıcı p53 sinyalidir. Hücrede DNA hasarı, özellikle çift zincir kırılması, hücre döngüsünü farklı mekanizmalar aracılığıyla kesintiye uğratar. Hasarın düzeltilebilmesi halinde, hücre döngüsü kaldığı yerden devam eder. Eğer DNA hasarı düzeltilemezse, bir protein kinaz olan ATM (Ataxia telangiectasia mutated) p53 proteinini fosforile ederek p53'ü aktive eder. Çalışmalar CXXC5'in ATM ile fiziksel bir etkileşime girerek p53'ün fosforillenmesinde ve böylece p53 aracılığıyla düzenlenen hücre ölümünde rol oynadığını göstermiştir (Min vd., 2009). Ayrıca CXXC5'in TNF α (Tumor necrosis factor α) ile düzenlenen programlı hücre ölümünde, SMAD transkripsiyon faktörleri ile ilişkiye girerek bir rol oynadığı bulunmuştur (Wang vd., 2013).

Bu çalışmaların bütünü, CXXC5'in bir transkripsiyon faktörü ve/veya protein partneri olarak çeşitli sinyal yolları tarafından düzenlenen hücre çoğalması, farklılaşması, metabolizması ve/veya ölümünde rol oynadığına işaret etmektedir. Bu bulgularla birlikte, CXXC5 geninin ilerlemiş meme tümörlerinde, malign melanomlarda ve tiroid kanserlerinde normal doku seviyelerine göre yüksek düzeyde ifade edilmesi (Knappskog vd., 2011) ve AML'de ise gen ifadesinin normalden düşük olması (Kühnl vd., 2013), CXXC5 gen ifadesindeki düzensizliklerin, doku patolojisinin başlamasında/gelişmesinde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

Projemizin amacı, E2-ER α sinyaliyle birincil gen ürünü olarak sentezlenen CXXC5'in, ikincil E2 yanıt gen ifadelerinin düzenlenmesine katılarak E2'nin regüle ettiği hücre çoğalmasında temel bir rol oynadığı öngörümüzü *in vitro* ve ER-pozitif meme kanserlerine model olarak kullanılan hücre hatlarında *in cellula* olarak sınamaktır.

Proje hedeflerimiz, 1) E2-ER α tarafından düzenlenen CXXC5 gen ifade mekanizmasının *in vitro* ve ER-pozitif meme kanserine model olarak kullanılan meme kanserlerinden türemiş

model hücre hatlarında tanımlanması; 2) CXXC5'in metile olmamış CpG dinükleotidlerine bağlanan bir protein olduğunun belirlenmesi; ve 3) CXXC5'in E2'nin düzenlediği hücre işlevlerindeki rolünün transkriptom analizi de içeren yöntemlerle tanımlanmasıydı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

3.1 qPCR (Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu PCR; Quantitative qPCR, qPCR).

Mikrodizin çalışmalarında ERE-bağımlı olarak regüle edildiğini bulduğumuz CXXC5 gen ifadesinin E2-ER α sinyali ile düzenlendiğini doğrulamak için CXXC5 ekspresyonun seviyelerin belirlenmesini CXXC5 transcriptine özgü primer setleri kullanarak qPCR yöntemiyle yaptık. E2'nin CXXC5 gen ifadesi üzerine etkisini ER α sentezleyen ve ER α -pozitif meme kanserlerine model olarak kullanılan MCF7 hücrelerinde gerçekleştirdik.

3.2 *In silico* ERE Analizleri. CXXC5 gen ifadesinin E2-ER α ile düzenlenmesinde rol oynayan işlevsel ERE dizisi/dizilerini bulmak için *in silico* ERE analizi gerçekleştirdik. CXXC5 gen lokusunu (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51523>), Estrogen Responsive Element Finder (DRAGONV3) algoritimini (<http://datam.i2r.a-star.edu.sg/ereV3/>) kullanarak taradık. Bu lokusta CXXC5 genini kodlayan sekansın 10 kb'lık yakın/uzak 5' ve 3' uçlarında ERE-benzeri diziler belirledik. Bu ERE'lerden CXXC5 geninin ikinci eksonunun 240 baz yukarısında olan bir sekansı ER α 'ın bağlandığı olası ERE olarak tanımladık (Yaşar vd., 2016).

3.3 PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu, Polymerase chain reaction, PCR):

CXXC5 veya CXXC5 protein partnerlerinin memeli hücrelerde sentezi için, PCR ile elde edilen cDNA'lar ekspresyon vektörlerine klonlandı. cDNA'ların açık okuma çerçevesi (open reading frame, ORF) dizisi PCR yöntemi ile çoğaltıldı ve bu ORF'ların amino-ucuna Flag epitope (Yaşar vd., 2016) ya da HA epitope kodlayan DNA dizileri ekleyerek memeli ekspresyon vektörü olan pcDNA3.1 (Life Technologies, California, ABD) veya pINDUCER lentivirüs vektörüne yerleştirildi. CXXC5'in cDNA'sını Dr. F. Peldino'dan (Paris Üniversitesi, Fransa) temin ettik. CXXC5'in açık okuma çerçevesi (open reading frame, ORF) dizisini PCR yöntemi ile çoğalttık. Elde ettiğimiz cDNA'ları sekansladık. CXXC5'in pcDNA3.1'de bulunan ORF dizisini, amino-ucuna 6xHis etiketi ekleyecek şekilde bakteriyel ekspresyon vektörü olan pET28-MHL vektörüne de yerleştirdik. Benzer olarak, olası ERE benzeri diziyi de içeren 429 nükleotidlik DNA parçası MCF7 hücrelerinden elde edilen genomik DNA ile PCR aracılığıyla elde edildi. DNA parçası sekanlandıktan sonra bir *Firefly Luciferase* raportör vektörü olan pGL3-Basic'e uygun restriksiyon enzim kesimleriyle yerleştirildi. Bu CXXC5 proksimal promotörünün E2 ve ER yanıtı olup olmadığını meme kanserlerinden türemiş ER-pozitif MCF7 ve ER-negatif MDA-MB-231 hücrelerinde test ettik.

3.4 CXXC5 Sentezi. CXXC5'in hücre içinde geçici olarak transfekte edilen hücrelerde inceledik. Protein sentezini Western Blot (WB) ve immünohistokimya (immunocytochemistry; ICC) analizleri ile değerlendirdik.

3.4.1 Western Blot (WB). Model hücrelerde endojen veya eksojen olarak eksprese edilen CXXC5 sentezinin ve hücre-içi lokalizasyonu belirlemek için ab106533 antikoru (Abcam, ABD) kullandık. CXXC5 ve/veya olası CXXC5 protein partnerlerinin hücrede beklenen moleküler ağırlıkta sentezlendiklerini ve lokasyonda bulduklarını doğrulamak için WB deneyi kullandık. Hücre kültürü plaklarına yerleştirip %10 CD-FBS içeren besi ortamında 48 saat süreyle bekletilen hücreler cDNA'sı içeren vektörlerle transfekte edildi. Transfeksiyondan sonra 24 ve/veya 48 saat sonra, hücreler toplanıp, proteaz inhibitör kokteyli (Roche), 1 mM sodyum ortovanadat ve 1 mM sodyum florid içeren lizis tamponu (400 mM KCl, 20% gliserol, 40 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 0.1% Igepal CA-630) ile lize edildi. Total protein miktarı süpernatant kullanarak Coomassie Plus Deney kiti (Pierce, Illinois, ABD) ile belirlendi ve %10 sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)'inde yürütüldü. Proteinler daha sonra WB için PVDF membrana transfer edildi. Membranın bloke ettikten sonra, proteine göre uygun antikolar ile tarayıp işaretli ikincil antikor ve substratlar (ECL Plus, Pierce) ile muamele edildi. İmajlar Bio-Rad image analizatörü ile belirlendi ve kayıt edildi.

3.4.2 İmmünohistokimya (Immunocytochemistry, ICC). CXXC5'in ve olası CXXC5 protein partnerlerin içi lokalizasyonlarını incelemeye kullandığımız ICC için, hücre kültürü plakları içindeki cam lamellere yerleştirdiğimiz hücreler %10 CD-FBS içeren besi ortamında 48 saat süreyle bekletildi. Hücreler daha sonra transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler %4 paraformaldehid içeren fosfat tamponlu salin (PBS) ile sabitleştirilip, %0.4 Triton X-100 içeren PBS ile geçirgen hale getirildi. Hücreler, CXXC5, Flag-M2 veya HA antikoru ile ve bunu takiben de floresanla-konjuge edilmiş ikincil antikorla (Santa Cruz) ile muamele edildi. Hücre nükleusunu 4-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI, Vector Laboratories, California, ABD) ile boyadıktan sonra, imajlar floresan mikroskopu ile incelendi.

3.5 Raportör Deneyi (Dual Luciferase Reporter Assay): *In situ* CHIP ve *in vitro* EMSA deneylerimizde belirlediğimiz DNA dizilerinin işlevsel ERE olduğunu teyit etmek için daha önce tanımladığımız (Huang vd., 2004; Yi vd., 2002b) raportör deneyleri kullandık. ERE dizisini içeren sentetik DNA'yı TATA kutusu promotörünün 5' ucuna klonlayarak E2-ER'ye yanıt verebilen *Firefly lusiferaz* raportör vektörünü inşa ettik. Bunun yanında, ER α 'ya bağlanan ERE dizisini içeren ve içermeyen (kontrol olarak kullanılacak mutant DNA) CXXC5 geninin transkripsiyon başlama noktasına kadar olan tüm DNA fragmanını genomik DNA'dan çoğaltarak promotörü olmayan *Firefly lusiferaz* raportör vektörüne (pBasic-Luc, Promega, Wisconsin, ABD) yerleştirdik. Bu lusiferaz raportör vektörlerini, MCF7 hücrelerine geçici

olarak TurboFect transfeksiyon sistemi (ThermoScientific, CA, ABD) kullanarak transfekte ettik.

Transfeksiyonların normalizasyonunda timidin kinaz (TK)-promotörünce yönlendirilen *Renilla lusiferaz* raportör vektöründen yararlandık. ER α 'nın E2'nin varlığında ERE'ye bağlanarak TATA ya da doğal CXXC5 promotörüne etkileri sonucu değişen lusiferaz enzim seviyelerini ikili lusiferaz deney kitiyle (Promega) ve Turner Biosystems Luminometre (Promega, Wisconsin, ABD) kullanarak spektrofotometrik olarak belirledik. *Firefly* ve *Renilla* lusiferazı oranını relatif lusiferaz aktivitesi olarak aldık. İki teknik tekrar olarak üç biyolojik tekrardan elde ettiğimiz relatif lusiferaz aktivitesinde yalnızca E2 varlığında artışa neden olan ERE sekansını işlevsel ERE olarak değerlendirdik.

3.6 Kromatin İmmünçökeltme (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP). ChIP deneylerinde, *in silico* ERE analizi ile bulguladığımız CXXC5 gen lokusu ERE dizilerini temel alarak Primer3 algoritimi (<http://primer3.ut.ee/>) aracılığıyla ERE dizilerini kapsayan 120-200 bp'lik DNA fragmanlarını çoğaltabilecek PCR primerleri dizayn ettik.

Daha önce tanımladığımız gibi (Huang vd., 2005; Muyan vd., 2012; Nott vd., 2009), ChIP analizi için T-75 hücre kültürü kutucuklarında 72 saat süre ile %10 oranında CD-FBS içeren besi ortamında %70-80 konflüansa ulaşan 25×10^7 MCF7 hücrelerini kullandık. Bu hücreleri daha sonra yeni besi ortamında 10^{-9} M E2'nin varlığında ve yokluğunda bir (1) saat muamele ettik. Hücreleri hemen ertesinde son konsantrasyonu %1 olacak şekilde formaldehit içeren fosfat-tuz tamponunda (phosphate buffered saline, PBS) 10 dakikalığına muamele edip geri döndürülebilir protein-DNA etkileşimini sabitleştirdik. Hücreleri sonikasyonla (QSonica, Q700, CupHorn Sonicator, Connecticut, ABD) parçalayıp kromatini fragmanlar haline getirdik. Daha sonra, ER α 'ya özgü antikorun (HC-20, Santa Cruz Biotech., California, ABD) varlığında ve yokluğunda (kontrol IgG, Santa Cruz Biotech., California, ABD) kromatini immünçökertmeye maruz bıraktık.

ER α ile etkileşim içindeki DNA fragmanları immünçöktürmeye uğrayacağından bu DNA fragmanlarının miktarı kontrol olarak kullanacağımız normal IgG varlığında çöktürülmüş kromatin fragmanlarına göreceli olarak artmış olacaktır. İmmünçöktürme işleminden sonra protein-DNA arasında sabit ilişkiyi ısı ile geri döndürüp DNA fragmanlarını izole ettik. ER α 'ya özgü antikor ve özgün olmayan antikorlarla yapılan immün çöktürme işleminden elde edilen DNA miktar farklılığını qPCR yöntemi aracılığıyla PCR primer çiftleri kullanarak belirledik. qPCR ile bulgularacağımız ERE dizisi/dizilerini ER α 'nın bağlandığı olası işlevsel *in situ* ERE dizileri olarak tanımladık.

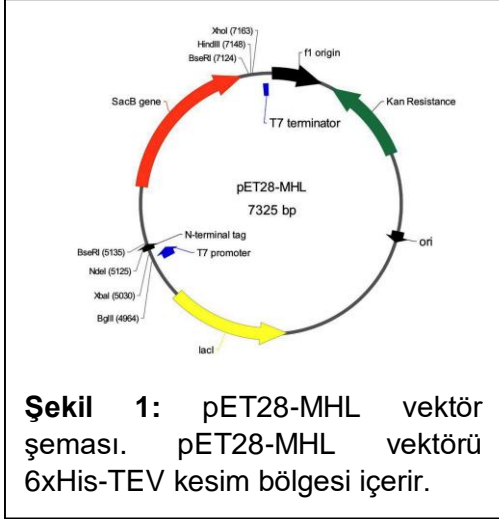
Benzer olarak CXXC5'in olası DNA bağlanma sekansları (motif analizleri) belirlemek için de ChIP gerçekleştirdik. T-75 kültür plakalarında büyüttüğümüz 25×10^7 MCF7 hücrelerini ChIP deneyleri için hazırladık. CXXC5 özgü CXXC5 antikorunu ile ChIP deneyleri gerçekleştirdik. İzole edilen DNA fragmanlarını ChIP-Seq analizleri için hazırladık. ChIP-Seq analizlerini University of Rochester (Rochester, New York, ABD)'da hizmet alımı olarak gerçekleştirdik.

3.7 Elektroforetik Kayma Analizi (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA). EMSA önceden bilinen DNA dizilerine bağlanan protein komplekslerini tanımlamada ve bu bağlanmanın afinitesi ile etkileşimin özgünlüğünü incelemede kullanılır. EMSA testini daha önce tanımladığımız yaklaşımla gerçekleştirdik (Huang vd., 2005; Nott vd., 2009; Yi vd., 2002). Bunun için, ChIP analizi ile bulduğumuz ERE'yi içerecek şekilde tasarlanan, uçları biotin-etiketli sentetik DNA fragmanları kullandık. Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, Iowa, ABD)'den sağladığımız primerlerle DNA çift sarmalı olarak hazırladığımız DNA fragmanını ER α sentezleyen MCF7 hücrelerinin nükleer ekstraktlarıyla inkübe ettik. ERE'lere bağlanan proteinlerin ER α içerdiğini kanıtlamak için de ER α 'ya özgün antikor (HC-20, Santa Cruz) kullandık. Daha sonra bu reaksiyonu poliakrilamid jel elektroforezine tabi tuttuk ve naylon membrana elektroforez ile aktardık. Uçları biotin etiketli DNA fragmanını, streptavidin-horseradish peroksidaz (HRP; horseradish peroxidase) konjügesi ve LightShift Chemiluminescent EMSA Kiti (ThermoScientific, Illinois, ABD) kullanarak kemilüminesans substrat ile saptadık. Kemilüminesans sinyalini Bio-Rad image analizatörü (Bio-Rad Inc., Hercules, California, ABD) ile belirlendi ve kayıt edildi.

3.8 Rekombinant CXXC5 ve CXXC Domainin Klonlanması ve Ekspresyonu

Rekombinant CXXC5 ve CXXC domain üretimi ve işlevsel deneyleri Toronto Üniversitesi Fizyoloji Bölümü'nde öğretim üyesi olan Dr. Jinrong Min laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Dr. Min çeşitli biyokimyasal ve biyofiziksel tekniklerle birlikte kromatini düzenleyen proteinlerin moleküler düzeyde karakterizasyonu üzerine araştırmalar yapan laboratuvarında Haziran 2016-Haziran 2017 arasında Doktora öğrencimiz Gamze Ayaz, TÜBİTAK Doktora Sırası Yurtdışı Bursiyeri olarak CXXC5 proteininin yapısal karakterizasyonuna yönelik çalışmalar yürütmüştür. Bu çalışmalarda, yüksek miktarda ve düzeyde saflaştırılan rekombinant CXXC5 proteini elde etmek mümkün olmuş ve elde edilen proteinle birlikte rekombinant proteinin izotermal titrasyon kalorimetresi (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) ve EMSA yaklaşımlarıyla CXXC5'in DNA bağlanma özellikleri çalışılmıştır.

3.8.1 pET28-6xHis-CXXC5 (1-322) ve pET28-6xHis-CXXC5 (250-309) Klonlaması: Recombinant CXXC5 ve CXXC domain sentezi için in-füzyon klonlama gerçekleştirdik (Takara-Clontech, California, ABD). CXXC5 gen sekansının tamamı ve CXXC domainin içeren



kısmı BseRI/BsaI enzimi ile doğrusal hale getirilmiş ve oluşacak proteinin amino-ucunda 6xHis içerecek sekanları taşıyan pET28-MHL vektörünün içine klonlanladı (Şekil 1). Vektörde, ayrıca antibiyotik seçilimi için kanamisin direnç geni bulunmaktadır. Vektör içerisinde yer alan kloramfenikol direnç geni ise protein ekspresyonu sırasında vektörün karşı seçilimini (counter selection) sağlar. In-füzyon klonlama primerleri kullanılarak hem vektör sekansı ve hem de gen spesifik (CXXC5) cDNA sekansları PCR ile çoğaltıldı. Reaksiyon karışımı önce 37°C'de

15 dakika daha sonra 50°C'de 15 dakika inkübe edildi ve bakteriyel transformasyon işlemi uygulandı. Antibiyotik dirençli koloniler seçilerek stoklama yapıldı.

3.8.2 Rekombinant Protein Ekspresyonu: Amino ucunda 6xHis, TEV kesim yeri içeren CXXC5 proteini (322 amino acid) E. Coli BL21(DE3)V2R hücrelerinde eksprese edildi. 50 µg/ml kanamisin ve 34 µg/ml kloramfenikol içeren LB besiyerine tek bakteri kolonisi seçilerek gece boyu 37°C'de büyütüldü. 50 ml başlangıç kültürü, 0.8% gliserol, 50 µg/ml kanamisin, 17 µg/ml kloramfenikol, 50 µM ZnCl₂ ve 800 µl antifoam-204 (Sigma A-8311) içeren 1600 ml TB besiyerine aktarıldı ve 37°C'de büyümeye bırakıldı. OD₆₀₀ değeri 1.5' e ulaştığında sıcaklık 16°C'ye düşürüldü ve protein ekspresyonunu indüklemek için 250 µl IPTG (1M) eklendi. Kültür gece boyunca 16°C'de 200 rpm çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Hücre pelletleri 7000 rpm'de 15 dakika santrifüj ile yapıldı.

3.8.3 İmmobilize Metal Afinite Kromatografi (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC). Hücre pelletleri 200 ml lizis çözelti (50 mM Tris pH8.0, 2M NaCl, 1mM PMSF, 3 mM beta-mercaptoetanol, 50 µM ZnCl₂ ve Benzonase) içinde parçalandı ve maksimum ayarda 60 saniye botunca homojenizer ile homojen hale getirildi. Homojen hücre çözeltisi, buz üzerinde 5 saniye aktif 7 saniye dinlenme periyotları ile 10 dakika boyunca sonikasyona tabi tutuldu. 15000 rpm'de 4°C soğutmalı santrifüjde bir (1) saat santrifüj edildi ve supernatant önceden dengelenmiş (equilibrated) nikel resin kolona yüklendi. 300 ml yıkama çözeltisi (50 mM Tris pH 8.0, 2 M NaCl, 20 mM imidazole pH 8.0, 3 mM beta merkuptoetanol, 50 µM ZnCl₂) ile yıkanarak nikel resine bağlanan spesifik olmayan proteinler uzaklaştırıldı.

Hedef protein 20 ml elüsyon çözeltisi (50 mM Tris pH 8.0, 250 mM imidazole pH 8.0 ve 1 mM TCEP) ile nikel resinden ayrıştırıldı. Protein konsantrasyonu nanodrop ile ölçüldü.

3.8.4 İyon Değişim (Ion-exchange) Kromatografisi. Daha ileri protein saflaştırma yöntemi olan iyon değişim kromatografisi yardımıyla nikel kolumlarından elde edilen proteinler HisTrap SP-FF (GE Healthcare) kolonuna yüklendi. Tampon çözeltinin iyonik gücü (Tampon çözelti A: 50 mM Tris pH 8.0; 1 mM TCEP ve Tampon çözelti B: 50 mM Tris pH 8.0; 1 M NaCl; 1 mM TCEP) kademeli olarak artırılarak hedef proteinin uygun tuz konsantrasyonunda izolasyonu gerçekleştirildi. CXXC5 ve CXXC5-CXXC domain içeren protein artışına karşılık gelen fraksiyonlar SDS-PAGE (%4-20) jele yüklendi ve InstantBlue coomassie boya (Expedeon) yardımıyla görüntüledi. Hedef protein fraksiyonları toplandı ve jel filtrasyonu için 2 ml hacmi olacak şekilde konsantre edildi.

3.8.5 Jel Filtrasyonu Kromatografisi. Jel filtrasyon kromatografisi, hem proteinlerin moleküler boyutuna göre ayrıştırılmasında hem de proteinlerin istenilen tampon çözeltisine aktarılmasında kullanılan bir saflaştırma yöntemidir. Bu izolasyon yöntemi için Superdex 200 jel filtrasyon kolonu (GE Healthcare) 20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl ve 1 mM TCEP içeren tampon çözelti ortamında kullanıldı. Hedef protein pikine karşılık gelen fraksiyonlar SDS-PAGE (%4-20) jele yüklendi ve InstantBlue coomassie boya (Expedeon) yardımıyla görüntüledi. Saf CXXC5 ve CXXC domainine karşılık gelen fraksiyonlar toplandı ve örnek hacmi 2 ml olacak şekilde konsantre edildi. Protein konsantrasyonu nanodrop yardımıyla ölçüldü.

3.9 CXXC5 proteininin DNA Bağlanma Özelliğinin Belirlenmesi

3.9.1 İzotermal Titrasyon Kalorimetre: İzotermal Titrasyon Kalorimetre (ITC) bağlayıcı bir bileşenin eklenmesiyle başlatılan bir kimyasal reaksiyonun gözlemlenmesi için kullanılan termodinamik bir tekniktir. Bu yaklaşım, biyomoleküllerin etkileşimlerinin karakterizasyonunun belirlenmesinde tercih edilir. Özellikle iki farklı biyomolekülün (DNA-protein, protein-protein, protein-ligand etkileşimi gibi) bağlanma katsayısı (K_b), reaksiyon sitokiyometrisi (n), entalpi (ΔH) ve entropi (ΔS) değerlerinin belirlenmesini sağlar. ITC deneyinde kullanılan bütün tek zincirli DNA oligonükleotitleri Integrated DNA Technologies (IDT) şirketinden sipariş edildi. Her bir tek zincirli DNA oligonükleotitleri 1:1 molar oranında karıştırıldı ve çift zincirli DNA elde edebilmek için 95°C'de ısıtılıp oda sıcaklığına soğumaya bırakıldı. ITC ölçümleri VP-ITC MikroKalorimetre (MicroCal Inc.) cihazı yardımıyla 25°C'de gerçekleştirildi. 10 μ l miktarındaki (enjeksiyon hacmi) 1 mM palidromik olmayan ve metile olmamış CpG dinükleotid içeren (kırmızı) DNA (5'-GTGATACCGGATCAGT-3'), metile olmuş CpG DNA (5'-GTGATACmCGGATCAGT-3') veya CG sekansı içermeyen ve kontrol olarak kullanılan DNA (5'-GTGATACATGATCAGT-3') parçaları 20 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl ve 1 mM TCEP

içeren tampon çözeltide 25 µM konsantrasyonundaki CXXC5 proteinine enjekte edildi. 15 µcal/sec referans gücü kullanılarak 180 saniye aralıklarla toplam 25 enjeksiyon gerçekleştirildi. Origin Software (MicroCal Inc.) programı kullanılarak bağlanma grafikleri çizildi ve sonuçlar analiz edildi. ITC hesaplamaları tek noktadan bağlanma modeli (one-site binding model) kullanılarak yapıldı.

3.9.2 EMSA. ITC deneyleri yanında, 3.7 bölümünde tanımladığımız EMSA deneyleri gerçekleştirdik. EMSA da test deneyi olarak kullandığımız çift zincirli DNA fragmantının konsantrasyonları 50 µM'dı. Elde edilen rekombinant CXXC5-CXXC domain veya CXXC5 proteini çeşitli konsantrasyonlarda ve DNA miktarıyla belirli molar oranında olacak şekilde metile olmuş veya olmamış DNA fragmanları ile buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra bu reaksiyonlar %5 TBE hazır jele yüklenerek 0.5XTBE çözeltide yürütüldü ve SybrGold boyası yardımıyla UV altında görüntüleme yapıldı.

3.10 Tetrasiklin Tetiklenebilir Lentiviral Ekspresyon Sistemi. CXXC5 gen ifadesinin MCF7 hücrelerinde azaltılmasını/susturulmasını sağlayarak CXXC5'in E2'ye yanıtta gen ekspresyonundan hücre işlevleri üzerinde olan rolünü aydınlatma amacıyla yaptığımız çalışmalarda Addgene (<https://www.addgene.org/>)'den elde etmiş olduğumuz tetrasiklin tetiklenebilir pINDUCER Lentiviral sistemini (Meerbrey vd, 2011) hücre çalışmalarında kullandık. Bu üç vektörlü sistemde, psPAX2 (<https://www.addgene.org/12260/>) ve pMD2.G (<https://www.addgene.org/12259/>) paketleme ve zarf vektörleri olarak pINDUCER ise (<https://www.addgene.org/44011/>) tetiklenebilir cDNA/shRNA ekspresyonunu sağlayan taşıyıcı viral vektör olarak kullanılmaktadır.

Yayınımızda (Yaşar vd, 2016) gösterdiğimiz gibi, CXXC5 geninin ekspresyonunu azaltmak/susturmak için özel olarak CXXC5 proteininin MCF7 hücrelerinde sentezini etkin bir şekilde baskılayan siRNA#2 ve siRNA#10'nun sekaslarını shRNA olarak sentezleterek (IDT) hem pINDUCER10 ve hem de pINDUCER11 vektörlerine klonladık. Benzer şekilde AllStar kontrol shRNA'sinin de klonlamalarını gerçekleştirdik.

Bunun yanında, 5' ucunda Flag etiketi; 3' ucunda PolyA sinyali taşıyan CXXC5 cDNA'sını ya da boş vektörü (kontrol olarak) uygun restriksiyon enzim sekanslarıyla PCR aracılığıyla oluşturduk ve pINDUCER20 ve 21 vektörlerine klonladık.

3.11 siRNA Transfeksiyonu

Model hücrelerde endojen CXXC5 sentezinin ve hücre içi lokalizasyonu belirlemek için ab106533 antikoru (Abcam, ABD) kullandık. Hücre tarafından endojen olarak sentezlenen ve yüksek-miktarda (over-expressed) proteinlerin incelenmesi amacıyla CXXC5 cDNA'sını ve

Flag ile etiketlenmiş CXXC5 cDNA'sını içeren veya içermeyen memeli ekspresyon vektörü pcDNA3.1(-) kullanıldı. Bu proteinler arasında endojen CXXC5'i belirlemek için siRNA kullandık. Bu sebeple, CXXC5'e özel FlexitubeGene Solution (Qiagen, Almanya) ürününden sipariş edildi. Negatif kontrol olarak ise hiçbir nükleotid dizisine homolojisi olmadığı bilinen AllStars Negative Control siRNA kullanıldı. siRNA transfeksiyonları için, altı-kuyucuklu doku kültürü plakalarına ekilen MCF7 hücreleri 10 nM CXXC5 ya da kontrol (AllStar) siRNA (FlexiTube GeneSolution GS51523, Qiagen) içeren solusyonda HiPerfect transfeksiyon reaktifi (Qiagen) ile geçici olarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra, hücreler toplam RNA izolasyonu (ZymoResearch) veya protein ekstraksiyonu (Thermo-Fisher) tabii tutuldu (Yaşar vd., 2016).

3.12 Hücre Çoğalması Deneyleri. CXXC5'in hücre çoğalması üzerine etkilerini incelemek amacıyla hematositometrik hücre sayımı ve MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid, MTT] yaklaşımı kullanıldı. Hücre kültürü plakalarındaki 72 saat boyunca E2'nin (CD-FBS içeren medyumda) yokluğunda büyütülmüş hücreler siRNA'lerle 10^{-9} M E2'nin varlığında ya da yokluğunda transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra sonra besiyeri 10^{-9} M E2'nin varlığında ya da yokluğunda değiştirildi ve transfeksiyondan 72 saat sonra hücre büyümesi hemotositometre ya da MTT ile belirlendi. Renk değişikliği olarak belirlenen MTT değerleri Bio-Rad 680 Spektrofotometre (Bio-Rad Inc., ABD) ile ölçüldü.

3.13 Aneksin V Deneyleri. Hücre membranı simetrisinin bozulmasıyla iç hücre membranında bulunan fosfatidil-serin (PS)'in dış hücre membranına translokale oluşu hücrenin apoptoza uğradığını belirtir. CXXC5'in hücre apoptozuna bir etkisi olup olmadığını incelemek için, hücre kültürü plakalarındaki 72 saat boyunca E2'nin varlığında ya da yokluğunda ekilmiş MCF7 hücrelerini, CXXC5'ya özel siRNA'lar veya AllStars kontrol siRNA ile 10^{-9} M E2'nin varlığında ya da yokluğunda transfekte ettik. Transfeksiyondan 72 saat sonra, hücreler toplandı ve FITC-konjuge Aneksin V bileşimi (Vybrant Apoptosis Assay, Invitrogen, California, ABD) ve propidyum iyodid ile muamele edilip akış sitometrisi (BD Accuri C6 flow cytometry) cihazıyla analiz edildi.

3.14 Genome Düzeyinde Gen Ekspresyon Deneyleri. CXXC5'in E2-ER α tarafından düzenlenen gen ekspresyonları üzerine etkisini incelemek için, T-25 hücre kültürü plakalarına 72 saat boyunca E2'nin (CD-FBS içeren medyumda) yokluğunda büyütülmüş hücreler 10^{-9} M E2'nin varlığında AllStars kontrol veya siRNA#10 ile geçici olarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra, hücreler toplandı ve total RNA izolasyonuna tabii tutuldu. Toplam RNA izolasyonu için Quick-RNA MiniPrep kiti (Zymo Research, ABD, R1055) kullanıldı. RNA numunelerinin konsantrasyonu, NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, ABD) ile ölçüldü. Örnekler genome düzeyinde gen ekspresyonu analizi için University of Rochester'in

Genomics Research Center'ına (ABD) gönderildi. TruSeq Stranded Total RNA Library (Illumina, San Diego, California, ABD) kit hazırlığından sonra Illumina HiSeq 2500 sekans sistemiyle RNA-sekanslamasına tabi tutuldu. Gen ekspresyonlarındaki farklılıklar, Trimmomatic-0.32 (pre-processing workflow) kullanılarak temizlenen sekans okumaları STAR-2.4.2a yazılımı ile GRCh38.p2 insan referans genomuna eşleştirildi. Gen ekspresyonları arasındaki farklılıklar, %95 güvenlik aralığı ile belirlendi.

3.15 Klinikopatolojik Meme Kanseri Hasta Veri Değerlendirmeleri. Meme kanseri hasta verileri NCBI GEO veritabanından ve Meme Kanseri Uluslararası Konsorsiyumunun Moleküler Taksonomisi (METABRIC) projesinden alınmıştır ve veriler EMBL Avrupa Genome-Phenome Arşivi (<http://www.ebi.ac.uk/ega/>), üyelik numarası EGAS00000000122 (Dr. Özgür Şahin, Bilkent Üniversitesi, Ankara, Türkiye) ile sağlanmıştır. Göğüs kanseri hastalarında CXXC5 ekspresyonu normal meme dokusu ile karşılaştırıldı. Meme kanseri hastalarının Kaplan Meier sağkalım eğrileri, sistemik relapsız sağkalım yüzdesini temsil eden veri setlerine göre yapılmıştır.

3.16 Proteinlerin Kimlik Belirlemeleri.

3.16.1 Yakınlık Bağımlı Biotin Kimlik Sistemi (Proximity Biotinylation Assay, BioID). BioID sistemi olarak adlandırılan bu yaklaşım, proteinler arasında mekansal ve zamansal ilişkileri tanımlamak için kullanılmaktadır (Roux et al., 2012). BioID yöntemi, "av" proteinin genetik olarak konjuge edilmiş *E. coli* biotin ligazı olan mutant BirA enziminin av proteinin ile yakın ilişkiye giren proteinleri biyotinleyerek etiketlemesi esasına dayanmaktadır. Biotinlenmiş proteinler streptavidin afinite yakalanıp kütle spektrometresi ile tanımlanabilirler.

Önceki gelişme raporlarında detayladığımız şekilde CXXC5 cDNA'sını Addgene'den elde ettiğimiz BioID sistem vektörlerine (<https://www.addgene.org/>) klonlamamızın ardından CXXC5-BirA füzyon protein sentezini ve lokalizasyonunu geçici transfeksiyonlarla MCF7 hücrelerinde ICC ve WB deneyleriyle doğruladık. Bu doğrulamayı takiben, CXXC5-BirA füzyon proteinin biyotinle etiketleyebildiği, proteinleri CXXC5'in olası protein partnerlerinin tanımlanmasında kullanılabileceğini bulguladık.

3.16.2 Eş-Lokalizasyon (Co-Localization). 48-kuyucuklu hücre kültürü plaklarında büyüttüğümüz MCF7 hücrelerinde geçici olarak transgen cDNA'sı taşımayan veya taşıyan ekspresyon vektörleriyle transfekte ettiğimiz deney grupları: 1) transgen cDNA'sı taşımayan kontrol vektörü; 2) Flag-CXXC5 (veya HA-CXXC5) cDNA; 3) HA-CXXC5'in "Olası Partner" (ya da Flag-CXXC5'in "Olası Partner") cDNA, 4) Flag-CXXC5 + 'HA-CXXC5'in "Olası Partner" (veya HA-CXXC5 + Flag-CXXC5'in "Olası Partner") cDNA'sı taşıyan vektör'lerden oluşmaktaydı. Transfeksiyondan 4 saat sonra, hücreleri yeni besi ortamında transgen

sentezinin maksimal düzeyde sentezi için 36 saat süreyle bekletildi. Hücreler daha sonra %4 paraformaldehit içeren fosfat tamponlu salin (PBS) ile sabitleştirilip %0.4 Triton X-100 içeren PBS ile geçirgen hale getirildi. Hücreleri kullanılan antikora uygun olan %10'luk bloklama ajanı ile blokladıktan sonra, 1) proteine özgü olmayan antikor (kontrol, IgG), 2) monoklonal Flag antikor (M2-Flag), 3) poliklonal HA antikor (Abcam), ve 4) Flag + HA antikorlarıyla muamele ettik. Bunu takiben, hücreleri farklı floresanlarla konjuge edilmiş ikincil antikor (Goat-anti mouse ve goat-anti-rabbit, Santa Cruz Inc.) ile inkübe edildi. Hücrelerin nükleusunu DAPI ile boyadıktan sonra proteinlerin hücre içi lokalizasyonu ile eş-lokalizasyonunu floresan mikroskobu ile incelendi.

3.16.3 Eş-immünçökeltme (Co-Immunoprecipitation, Co-IP): Eş-immünçökeltme protein-protein etkileşimlerini belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yaklaşım, protein etkileşimlerinin bozulmasını minimize eden koşullarda parçalanmış hücre ekstraktlarındaki *in situ* 'av' proteiniyle ilişkide olan 'yem' proteinlerinin belirlenmesini temel alır. Bu işlem, 'av' proteinine özgü antikorlar kullanılarak yem proteini ile etkileşimi olan 'yem' proteininin çöktürülmesi ve 'yem' proteininin kendine özgü antikorla dolaylı olarak, örneğin WB, belirlenmesine olanak sağlar. İşlemlerin, 'yem' proteinine özgü antikorla 'av' proteininin çöktürülmesi ve sonrasında 'av' proteine özgü antikorla WB ile tanımlanması, *in situ* protein-protein etkileşiminin doğrulanması olarak yorumlanır.

Eş-immünçökeltme için 100 mm çapında hücre kültürü plaklarına 10×10^6 sayıda ekilmiş MCF7 hücrelerini %10 FBS içeren besi ortamında 48 saat süreyle büyüttükten sonra geçici olarak TurboFect transfeksiyon sistemi ile transfekte ettik. Transfeksiyonlarda: 1) Vektör, 2) Flag-CXXC5, 3) HA-'Av' cDNA, 4) Flag-CXXC5 + HA-'Av' cDNA gruplarından yaralandık. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler NE-PER izolasyon kiti (Thermo Scientific) kullanılarak nükleer fraksiyonlarına ayrıştırıldı. Ayrı ayrı elde edilen protein grupları HA-konjuge primary antikor ve Protein A ve G magnetik boncuklar kullanılarak eş-immünçökeltmeye tabi tutuldu. Magnetik boncuklara tutunan protein kompleksi 150 mM NaCl, 10 mM HEPES pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.5% Igepal CA-630, proteaz ve fosfotaz inhibitör kokteyli içeren buffer ile iki kez yıkandı. Magnetik boncukların üzerine 3X laemmlerli SDS-jel yükleme bufferi eklenerek %10 SDS-PAGE jel elektroforezinde ayrıştırıldı ve Flag antikor kullanılarak western blot yapıldı. Eş-immünçökeltme işleminin spesifik olarak HA ya da Flag antikoruna bağlı olduğunu göstermek için eş zamanda Rabbit IgG antikor ile de non-spesifik bağlanma olup olmadığı test edildi.

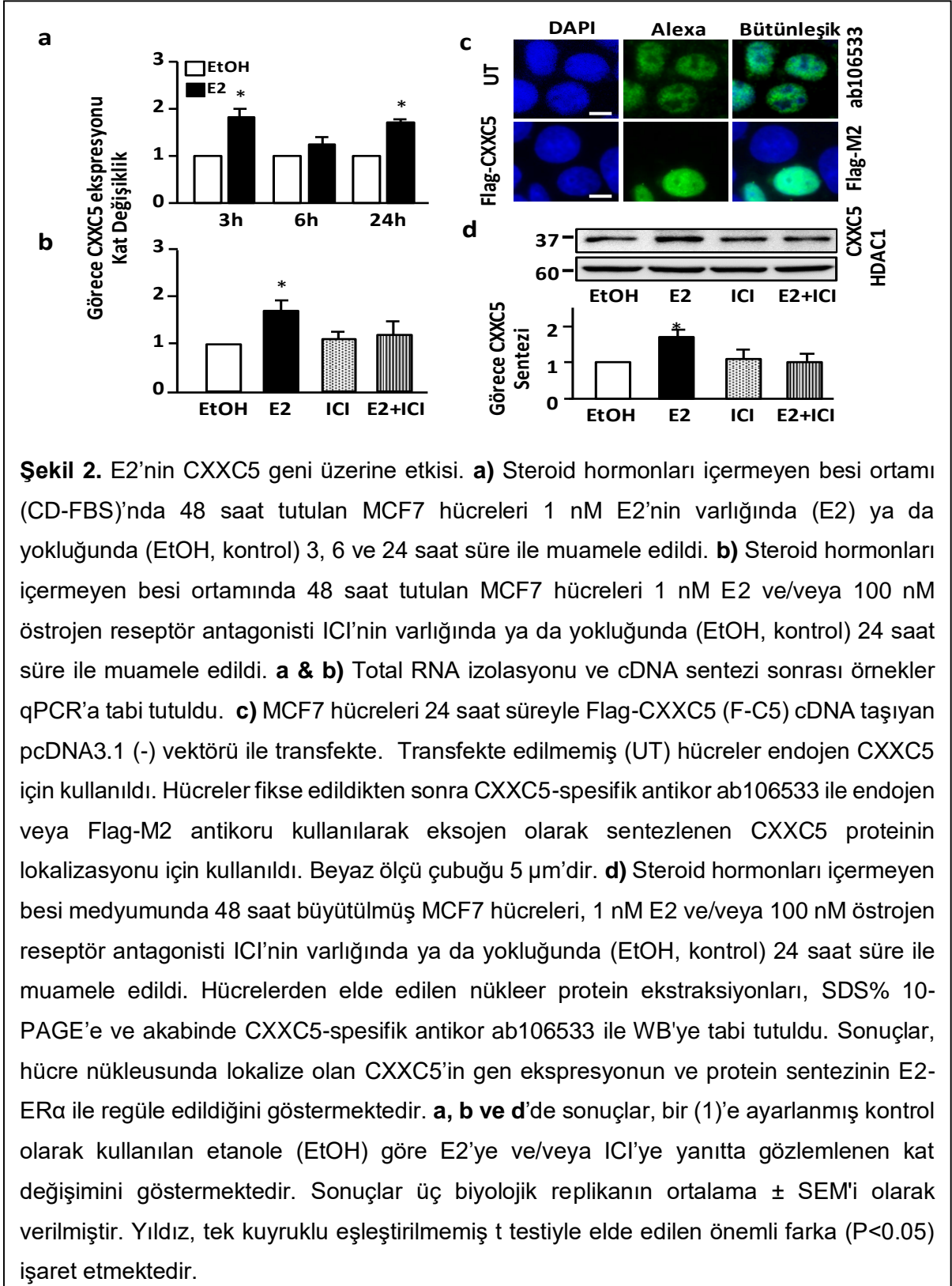
3.17 İstatistiksel analiz. Deneysel sonuçlar, üç biyolojik replikanın ortalama \pm SEM'i olarak sunuldu. Anlamlılık, tek kuyruklu eşleştirilmemiş t testiyle elde edilen sonuçlara dayanmaktadır. $P < 0.05$ değerleri sonuçların istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir.



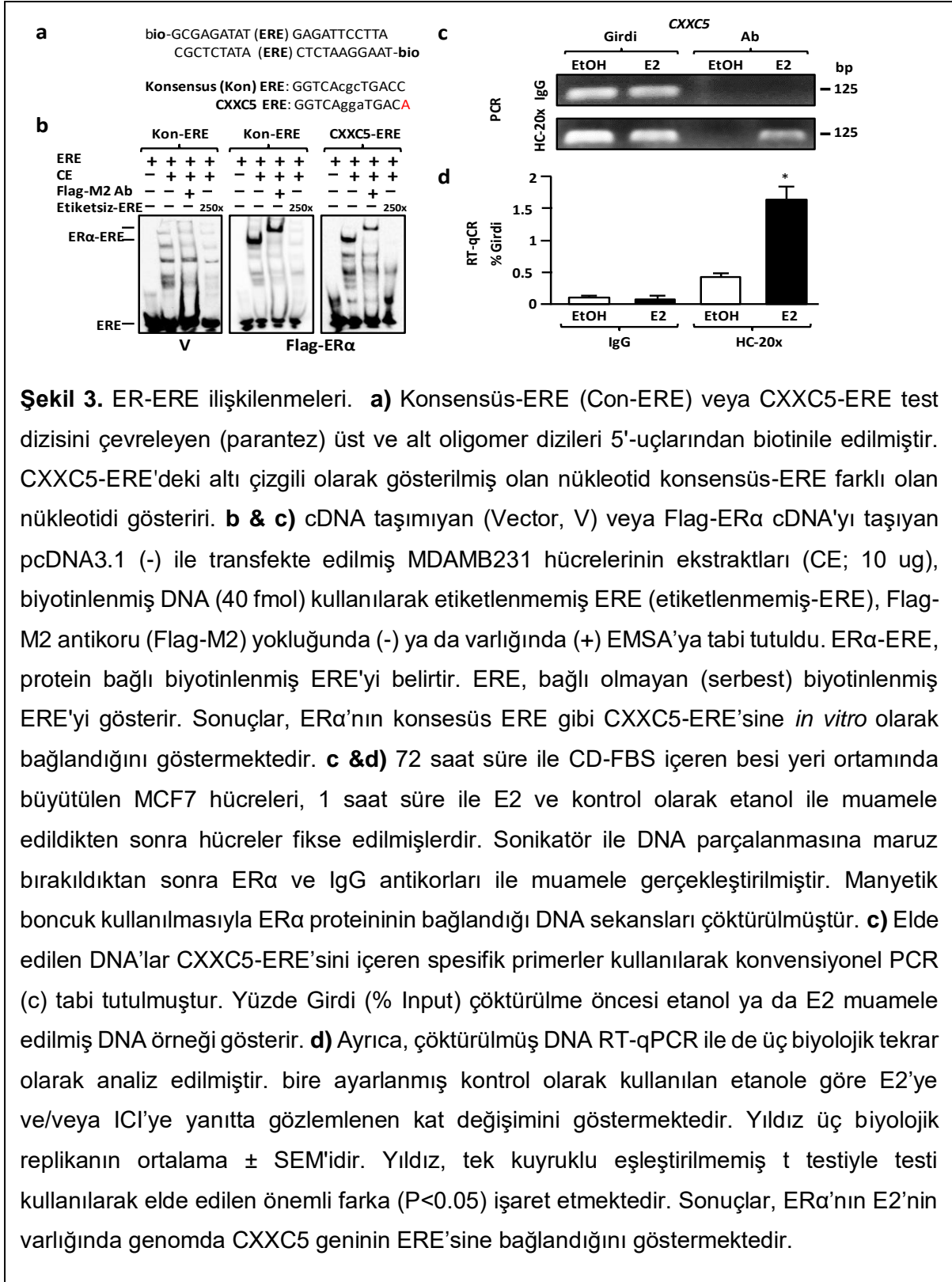
RNA-sekaranlaması (RNA-Seq) veri analizi için de, okunan RNA dizilimleri, Trimmomatic-0.32 yazılımını kullanarak temizlendi. Temizlenen veriler, insan referans genomuna (GRCh38.p2) eşlendi. Daha sonra (% 99 güven aralığı) 0.05 FDR kesintisi ile farklı ekspresyon ifade analizine cufflinks2.0.2 yazılımını kullanarak tabi tutuldu.

4. BULGULAR

4. 1 E2-ER α CXXC5 gen ekspresyonu ERE-bağımlı sinyal yoluyla düzenler (Çalışmamız yayınlanmış bulunmaktadır: Sci. Rep. 6, 37808; doi: 10.1038/srep37808, 2016). Daha önce



yapmış olduğumuz mikrodizin çalışmaları, CXXC5 geninin E2-ER α yanıt geni olduğunu ve ERE-bağımlı sinyal yolağı üzerinden düzenlendiğini önermektedir. Bu önerinin doğrulamasını, meme kanserlerinden türemiş olan ER-pozitif MCF7 hücrelerinde ve ER α sentezini transfeksiyonlarla gerçekleştirdiğimiz ER-negatif MDAMB231 hücrelerinde yaptık. E2 ve/veya

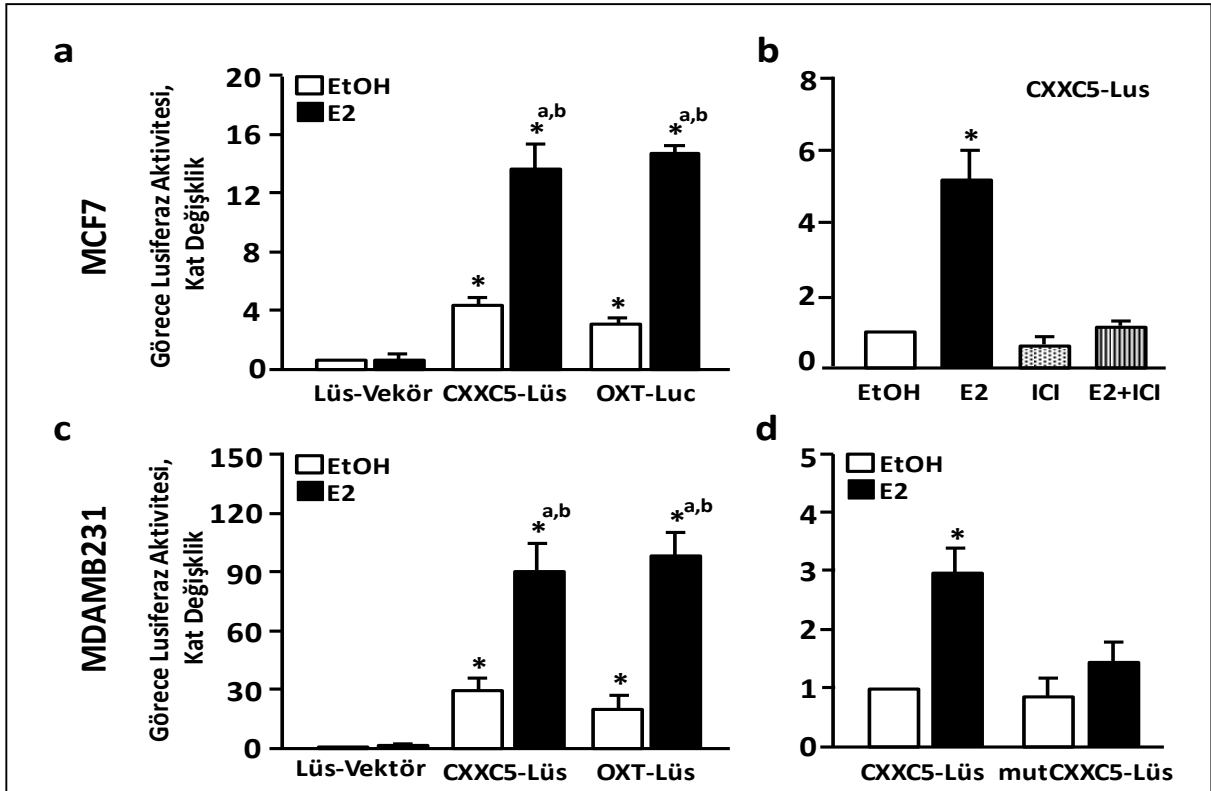


Şekil 3. ER-ERE ilişkilenmeleri. **a)** Konsensüs-ERE (Con-ERE) veya CXXC5-ERE test dizisini çevreleyen (parantez) üst ve alt oligomer dizileri 5'-uçlarından biotinitle edilmiştir. CXXC5-ERE'deki altı çizgili olarak gösterilmiş olan nükleotid konsensüs-ERE farklı olan nükleotidi gösterir. **b & c)** cDNA taşımayan (Vector, V) veya Flag-ER α cDNA'yı taşıyan pcDNA3.1 (-) ile transfekte edilmiş MDAMB231 hücrelerinin ekstraktları (CE; 10 ug), biyotinlenmiş DNA (40 fmol) kullanılarak etiketlenmemiş ERE (etiketlenmemiş-ERE), Flag-M2 antikoru (Flag-M2) yokluğunda (-) ya da varlığında (+) EMSA'ya tabi tutuldu. ER α -ERE, protein bağlı biyotinlenmiş ERE'yi belirtir. ERE, bağlı olmayan (serbest) biyotinlenmiş ERE'yi gösterir. Sonuçlar, ER α 'nın konsensüs ERE gibi CXXC5-ERE'sine *in vitro* olarak bağlandığını göstermektedir. **c & d)** 72 saat süre ile CD-FBS içeren besi yeri ortamında büyütülen MCF7 hücreleri, 1 saat süre ile E2 ve kontrol olarak etanol ile muamele edildikten sonra hücreler fikse edilmişlerdir. Sonikatör ile DNA parçalanmasına maruz bırakıldıktan sonra ER α ve IgG antikoru ile muamele gerçekleştirilmiştir. Manyetik boncuk kullanılmasıyla ER α proteininin bağlandığı DNA sekansları çöktürülmüştür. **c)** Elde edilen DNA'lar CXXC5-ERE'sini içeren spesifik primerler kullanılarak konvensiyonel PCR (c) tabi tutulmuştur. Yüzde Girdi (% Input) çöktürülme öncesi etanol ya da E2 muamele edilmiş DNA örneği gösterir. **d)** Ayrıca, çöktürülmüş DNA RT-qPCR ile de üç biyolojik tekrar olarak analiz edilmiştir. bire ayarlanmış kontrol olarak kullanılan etanole göre E2'ye ve/veya ICI'ye yanıtta gözlemlenen kat değişimini göstermektedir. Yıldız üç biyolojik replikanın ortalama \pm SEM'idir. Yıldız, tek kuyruklu eşleştirilmemiş t testiyle testi kullanılarak elde edilen önemli farka ($P < 0.05$) işaret etmektedir. Sonuçlar, ER α 'nın E2'nin varlığında genomda CXXC5 geninin ERE'sine bağlandığını göstermektedir.

kontrol olarak ER α 'ya kompetitif olarak bağlanarak E2'nin bağlanmasını önleyen ER'nin tam antagonisti olan Imperial Chemical Industries (ICI) 182 780 (Faslodex) ile yaptığımız muamelelerde, E2-ER α kompleksinin CXXC5 gen ekspresyonunu qPCR ve protein sentezini WB yaklaşımıyla zamana bağlı olarak artırdığını bulgadık (Şekil 2).

CXXC5 gen ifadesinin E2-ER α ile düzenlenmesinde rol oynayan işlevsel ERE dizisi/dizilerini bulmak için öncelikle *in silico* ERE analizi CXXC5 gen lokusunda yakın/uzak 5' ve 3' uçlarında ERE-benzeri diziler belirledik (Şekil 3). Bu olası ERE dizilerinden CXXC5 geninin translasyon başlama kodunun (ATG) 240 nükleotid yukarısında (5') bulunan 5'-GGTCAGgaTGACA-3' dizisinin konsensus 5'-GGTCAnnnTGACC'-3 ERE dizisinden yalnızca bir nükleotid farkı olması (kırmızı fontla ile belirtilmiş A nükleotidi) bu dizinin (Şekil 3a) CXXC5 geninin E2-ER α sinyaline yanıtında rol oynayabileceğini öngördük. Bu öngörüü test etmek için, öncelikle *in vitro* bir deney olan elektroforetik kayma deneyi (EMSA) kullandık. Flag-ER α cDNA'sı içeren ya da içermeyen (boş vektör kontrol) memeli ekspresyon vektörü ile transfekte edilmiş MDA-MB-231 (ER sentezlemeyen, meme kanseri hücre hattı) hücrelerinden elde edilen protein ekstraktlarını biotinle etiketlenmiş 240ERE içeren DNA ile muamele ettik (Şekil 3b). Transfeksiyondan sonra izole ettiğimiz hücre proteinlerini, biyotin etiketli 240ERE sekansı içeren DNA ile Flag antikorunu ve/veya 200 kat fazla biyotinlenmemiş 240ERE içeren DNA varlığında ya da yokluğunda muamele ettik. Flag-ER α sentezleyen hücre ekstraktlarının 240ERE'de bir kayma azalmasına yol açtığını gözlemledik. Flag-ER α Flag etiketli ER α 'yı tanıyabilecek Flag-M2 antikorunun varlığında ise 240ERE-ER α -antikor kompleksinin 240ERE-ER α kompleksine göre kütleli olarak daha ağır olmasından ileri gelen süper kaymayı da gözlemledik. Bu, görmekte olduğumuz kaymanın ER α kaynaklı olduğunu kanıtlamaktadır. Buna ek olarak biyotinsiz 240ERE'nin rekabetçi olarak 200 kat fazla kullanılmasıyla gerçekleştirilen reaksiyonda ise gözlemlenen kaymayı kaybettik. Ortamda 250 kat fazla biyotinsiz 240ERE sekansının varlığının yarattığı rekabet sebebiyle biyotinli olanların ER α 'ya bağlanamaması ise bize gözlediğimiz kaymanın ER α 'ya özgü olduğu gibi 240ERE sekansına da özgü olduğunu göstermektedir. Bunu tersi olarak, boş vektör transfekte edilmiş hücre ekstraktlarıyla yaptığımız EMSA çalışmalarında 240ERE'ye ER α özel bir bağlanmanın görülmemesi Flag-ER α proteinin 240ERE'ye bağlanabildiğini kanıtlamaktadır.

Bu 240ERE'nin *in situ* olarak da ER α ile doğrudan etkileşen bir sekans olup olmadığının araştırılabilmesi amacıyla CHIP deneyini gerçekleştirdik (Şekil 3c&d). MCF7 hücreleri, E2'nin 72 saat süre ile uzaklaştırıldığı ortamda büyütüldükten sonra E2 ve kontrol olarak etanol ile bir



Şekil 4. ERE içeren CXXC5 gene lokusunun E2-ER α yanıtı. **a-d)** 48 saat süreyle CD-FBS içeren ortamda büyütülen ER α sentezleyen MCF7 hücreleri veya ER α sentezlemeyen MDAMB231 hücreleri, CXXC5'in ERE içeren (CXXC5-Lüs); estrojen yanıt geni olan oxytocin (OXT-Lüs)'in promotorunu içeren (OXT-Luc) veya içermeyen (Lüs-Vektör) *Firefly* lusiferaz reportör vector ile transfekte edildi. MDAMB231 bunların yanında ER α -cDNA'sını taşıyan ekspresyon vektörü ile de transfekte edildi. Bütün geçici transkripsiyonlarda transfeksiyon etkinliği, *Renilla* lusiferaz senteziyle izlendi. **a-c)** Transfeksiyondan dört saat sonra yıkanan hücreler kontrol olarak etanol (EtOH, % 0.01) 1 nM E2 ve/veya 100 nM ICI ile 24 saat boyunca muamele edildi. d) ERE sekansının E2-ER α 'ya yanıt verdiğini kanıtlamak için de, CXXC5-Lüs raportör vektörü yanında ERE sekansının mutasyonu ile elde edilen CXXC5-mutant (mutCXXC5-Lüs) raportör vektörü hücrelere geçici olarak etanol (EtOH, % 0.01) veya 1 nM E2 varlığında transfekte edildi. Deney sonrasında, hücre ekstraktları lusiferaz ölçümlerine tabi tutuldu. Üç teknik tekrarlar olarak gerçekleştirilen üç bağımsız deneyin ortalama \pm SD'si gösterilmektedir. *Firefly/Renilla* lusiferaz aktiviteleri, bir (1)'e ayarlanan Basic-Luc'un EtOH kontrolüne kıyasla kat değişimi olarak sunulmuştur. *a ve *b, sırasıyla, Basic-Luc'in E2'sinden ve ilgili etanol (EtOH) kontrolüyle karşılaştırmalı olarak tek kuyruklu eşleştirilmemiş t testiyle elde edilen sonuçlarda, Yıldız (*) istatistiksel olarak önemli olan değişimi gösterir. Sonuçlar, CXXC5 gen lokusunda bulunan ERE sekansının CXXC5 geninin E2-ER α 'ya yanıtta rol oynadığını göstermektedir.

(1) saat süre ile muamele edilmiştir. Ortama E2'nin eklenmesi ile birlikte, ER α proteini pasif

formdan aktif forma geçecek ve hedef genlerin düzenlenmesinde rol almaya başlayacaktır. Dolayısıyla aktif haldeki ER α proteini, hedef genlerin düzenleyici bölgelerinde yer alan ERE sekanslarına bağlanacaktır. ER α ve ERE ilişkilerini *in situ* olarak paraformaldehid ile fikse ettik. Fiksasyondan sonra, sonikatör kullanılarak hücre DNA'sı 200-800 nükleotid uzunluklarında parçaladık. Ardından HC-20 ER α antikoru (Santa Cruz Biotech., CA, ABD) ve negatif kontrol olarak IgG (Santa Cruz Biotech., CA, ABD) kullanarak inkübasyon ettik. Böylelikle ERE-ER α -antikor kompleksinin oluşmasını sağladık. Ardından kompleks içerisinde yer alan antikora bağlanacak ve çökeltme işlemi sırasında kullanılacak olan Protein A&G konjuge edilmiş manyetik boncuklar ile muamele gerçekleştirilmiştir. Manyetik boncukların protein A&G'nin antikora bağlanmak sureti ile DNA-protein-antikor kompleksine dahil olurlar. Sonraki aşamada manyetik ayırıcı kullanılarak, manyetik boncuklar ve onlara bağlı olan diğer moleküller ortamdaki ayrılır. Böylelikle de ER α proteininin bağlanmış olduğu DNA sekansları diğer DNA fragmanlarından uzaklaştırılmış olur.

ER α proteininin bağlanması sonucu çöktürülmüş olan DNA, 240ERE bölgesini çoğaltabilecek primerler kullanılarak konvensiyonel PCR ve RT-qPCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Değerlerin normalizasyonu için, antikor muamelesinden önce ortamdaki ayrılan ve kromatin-immün çökeltme için kullanılan kromatin miktarını gösteren DNA örneğinin (input) aynı primerler ile gerçekleştirilen RT-qPCR değerleri kullanılmıştır. Bu sayede elde edilen DNA'ların kantitatif olarak değerlendirilmesi mümkün olmuştur.

Sonuçlar, E2 muamelesine maruz bırakıldıktan sonra ER α antikoru ile çöktürülen DNA kümesi içerisinde, etanol ile muamele edilmiş olan örneklerle kıyasla istatistiksel olarak 240ERE sekansının immünçökeltmeye maruz kaldığını göstermektedir (Şekil 3c&d). Bu da, ER α proteininin *in situ* olarak genomik 240ERE bölgesine bağlanabildiğini göstermektedir. Aynı ChIP örnekleriyle yaptığımız konvensiyonel PCR ya da RT-qPCR'da (bulgu gösterilmiyor), pozitif kontrol olarak kullandığımız TFF1 geninin E2-ER α 'ya yanıt veren ERE bölgesinin, beklendiği gibi, E2'nin varlığında daha çok çökertilmesi, bulgularımızın geçerliliğini göstermektedir.

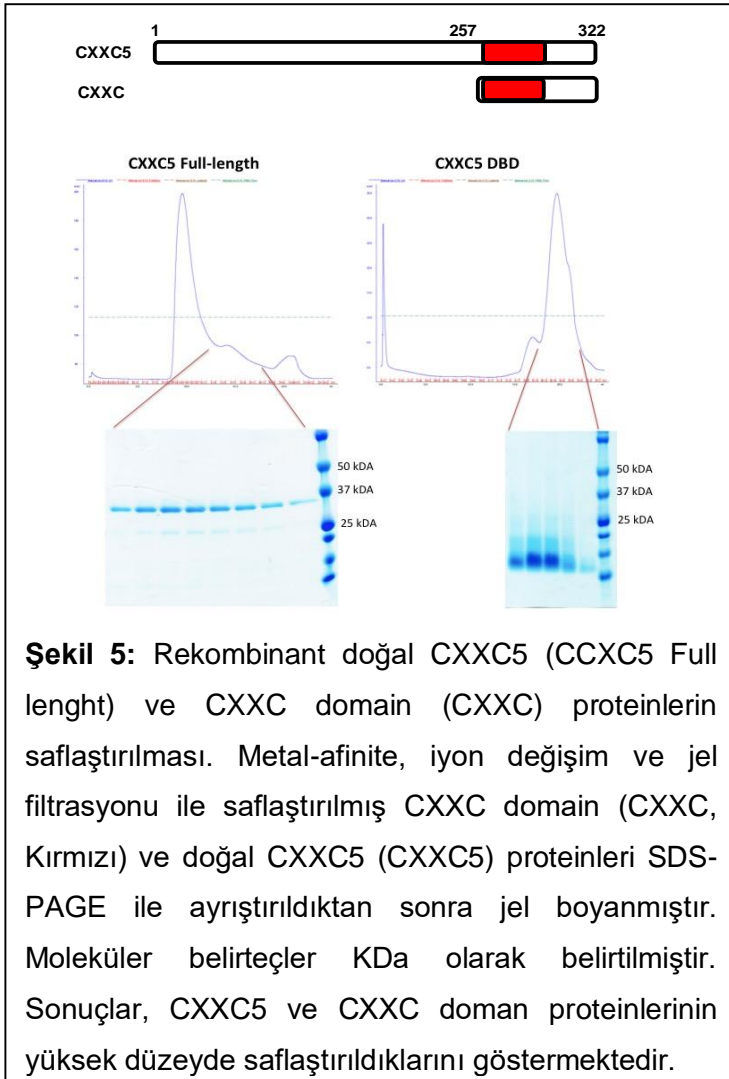
Bu bulgularımız, E2-yanıtlı olduğunu göstermiş olduğumuz CXXC5 geninin yakın promoter bölgesinde yer alan 240-ERE'nin E2 varlığında ER α 'nın bağlandığı bir sekans olup, genin E2 yanıtının oluşturulmasında görev aldığını göstermektedir. Bu da CXXC5 geninin ekspresyonunun E2 varlığında, 240ERE sekansı üzerinden düzenlendiğini teyit etmektedir.

In silico olarak tanımlamış olduğumuz bu ERE'nin (240ERE)'nin işlevsel bir ERE olup olmadığının araştırılması amacıyla DNA-protein ilişkileri üzerine çalışmalarımıza lusiferaz aktivitesi tayini çalışmaları ile devam ettik (Şekil 4). Bu amaçla, 240ERE bölgesini de içine

alacak şekilde PCR ile elde ettiğimiz CXXC5 genomik bölge DNA'sını rapörter vektörüne bulunan rapörter ezimi lusiferaz geninin 5' ucuna klonladık. Bunun yanında, bu CXXC5 240ERE'nin mutasyonunu ve böylece ER α yanıtının, bu ERE aracılığıyla düzenlendiğini gösteren rapörtör vektörleri de hazırladık. Bu çalışmalarımızda, yalnızca 240ERE'yi içeren promotör bölgesi E2-ER α 'ye yanıt verdi (Şekil 4a-d). Bu bulgularımız, 240ERE'nin CXXC5'in E2-ER α 'ya yanıtının oluşturulmasında rol oynadığını göstermektedir.

4.2 CXXC5 metile-olmamış CpG dinükleotidlere bağlanan bir protein olup E2-ER α tarafından düzenlenen hücre çoğalmasına katılır (Yayına hazırlanmaktadır).

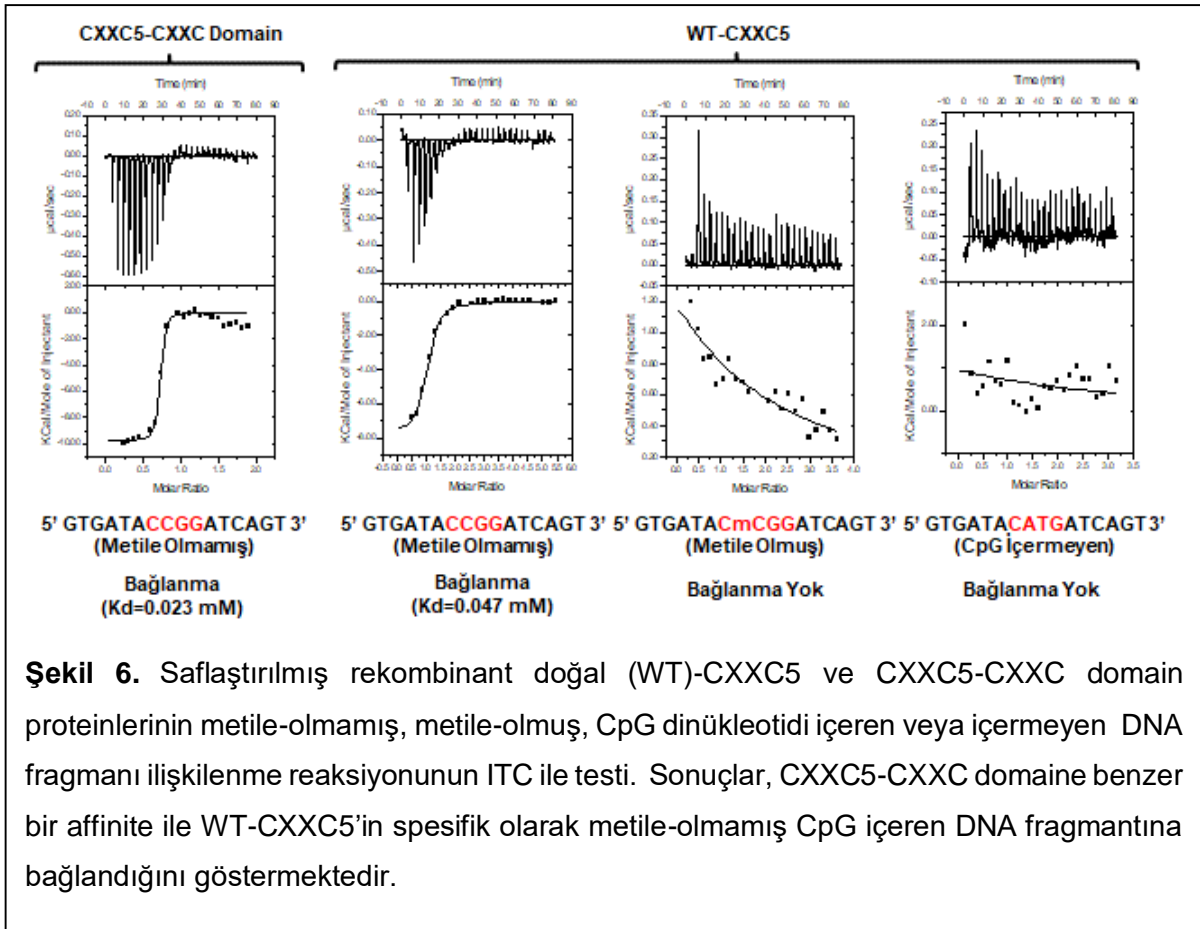
CXXC ailesi proteinlerinde yüksek ölçüde korunmuş CXXC ünitesi, sistein içeren ardışık iki CXXCXXC konsensus küme grubu ile bu grubu CXXRXC kümesinden ayıran değişken sayıdaki bağlayıcı (linker) amino-asit dizisinden oluşur. CXXC ünitesinin protein katlanması çinkonun sisteinlere bağlanması ile koordine edilir. Bu protein katlanması, bağlayıcı dizide bulunan amino-asitlerin DNA-bağlanma motifini oluşturmasını sağlar (Allen vd., 2006). CXXC5



ya da CXXC5-CXXC domainin yapısı henüz çözülmemiştir. Ancak, CXXC ailesinin bir üyesi olan TET3 (ten-eleven translocation 3) proteininin CXXC domaini ile yapılan çalışmalarda, proteinin CXXC ünitesinin metile-olmamış CpG dinükleotid dizilerine bağlanabildiği hem kristalografi ve hem de işlevsel çalışmalarla gösterilmiştir (Xu vd., 2011; Xu vd., 2012). TET3 ve CXXC5'in CXXC domainin yüksek düzeyde korunan amino-asit dizilimini temel alarak yaptığımız modellemelerle, CXXC5-CXXC ünitesinin de metile-olmamış CpG dinükleotidlerine benzer bir şekilde bağlanacağını ve bu nedenle CXXC5 proteinin metile-olmamış CpG dinükleotidlerine bağlanan bir protein olduğunu önermiştik. Bu

öngörüyü test edebilmek için, CXXC5 ve CXXC5-CXXC domain proteinlerini rekombinant protein olarak senteze edip işlevsel deneylerde kullanmaya karar verdik.

4.2.1 Rekombinant doğal (Wild-type, WT) CXXC5 ve CXXC domain proteinlerinin sentezi, saflaştırılması ve işlev belirlemesi. Bakteriyel ekspresyon sistemi kullanarak *E. coli* BL21(DE3)V2R hücrelerinde senteze ettiğimiz WT-CXXC5 ve CXXC domain proteinleri immobilize afinite kromatografisi (IMAC) ile saflaştırılmıştır. Rekombinant proteinleri kolondan ayırmak için imidazol varlığında ve TEV enzimi (the tobacco etch virus, TEV, 10 µg rekombinant protein) kullanılarak kesildi. Rekombinant proteinler daha sonra 50 mM Tris pH: 8.0 içeren bir elüsyon tamponu ile kolonlardan 250 mM imidazol pH: 8.0 ve 1 mM TCEP içeren tampon solüsyonu ile elüt edildi. Yüksek miktarda imidazolün protein karışımından uzaklaştırılması için, karışım 50 mM Tris pH: 8.0, 150 mM NaCl ve 1mM TCEP içeren tampona 16 saat boyunca diyalize tabi tutuldu. CXXC5 veya CXXC domain proteinini içeren fraksiyonlar toplandı, iyon değişim kromatografisi sonrası jel filtrasyon kromatografisi için konsantre edildi. Konsantre protein örnekleri daha sonra 20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl ve 1 mM TCEP içeren tamponda jel filtrasyon kromatografisine yüklendi. Yüksek protein miktarına karşılık gelen fraksiyonlar, %4-20 SDS-PAGE jeline yüklendi ve jel InstantBlue coomassie Expedeon, San Diego, California, ABD) boyasıyla boyandı (Şekil 5). Kromatogram ve SDS-PAGE analizi,

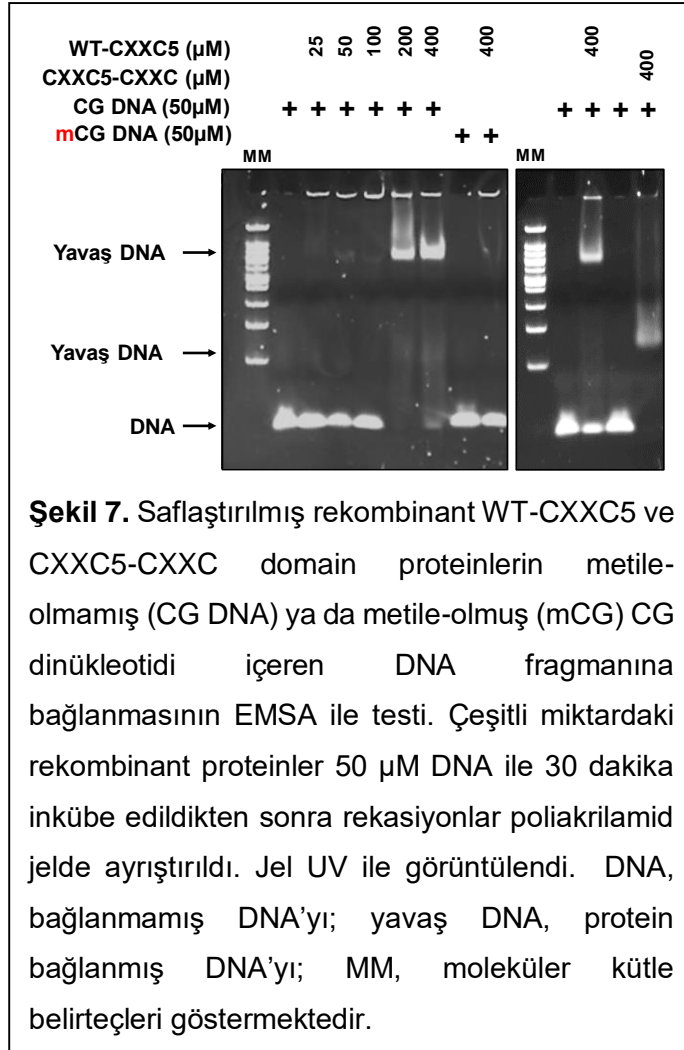


Şekil 6. Saflaştırılmış rekombinant doğal (WT)-CXXC5 ve CXXC5-CXXC domain proteinlerinin metile-olmamış, metile-olmuş, CpG dinükleotidi içeren veya içermeyen DNA fragmanı ilişkilendirme reaksiyonunun ITC ile testi. Sonuçlar, CXXC5-CXXC domaine benzer bir affinite ile WT-CXXC5'in spesifik olarak metile-olmamış CpG içeren DNA fragmantına bağlandığını göstermektedir.

CXXC5 ve CXXC5-CXXC domain proteinlerin yüksek düzeyde saflaştırıldıklarını göstermektedir.

İzotermal titrasyon kalorimetresi (ITC), protein-DNA, protein-protein gibi iki veya daha fazla molekülün etkileşiminin bağlanma afinitesi ve bağlanma stokiyometrisini nicel olarak ölçen fiziksel bir tekniktir. ITC, bir molekülün izotermal koşullar altında başka bir moleküle etkileşime (bağlama) girmesi sonucu oluşan ısı salınımına dayanır (Duff vd, 2011). İki molekülün bağlanması doygunluğa ulaştığında, ısı değişimleri sifıra yaklaşır. Saflaştırılmış WT-CXXC5 ve CXXC domain proteinlerinin DNA'ya bağlanma özelliklerini öncelikle ITC ile inceledik.

ITC deneylerimizde, DNA dizilim içine yerleştirilmiş metile-olmamış CpG (5'-GTGATACCGGATCAGT-3'), metile-olmuş CpG (5'-GTGATACmCGGATCAGT-3') veya CgG dinükleotid taşımayan (5'-GTGATACATGATCAGT-3') çift sarmal DNA fragmantları ile birlikte rekombinant WT-CXXC5 veya CXXC5-CXXC domain proteinleri kullandık (Şekil 6). ITC



sonuçları, CXXC5'in CXXC domaini metile-olmamış CpG dinükleotidlere bağlanabildiğini göstermektedir. ITC bulgularımız, CXXC domaini gibi, CXXC5'in de spesifik olarak metile-olmamış CpG dinükleotidi içeren DNA fragmanına bağlandığına işaret etmektedir.

Bu bulgularımızı teyit etmek için gerçekleştirdiğimiz EMSA deneylerinde de aynı sonuçları gözlemledik: CXXC5 veya CXXC5-CXXC domaini yalnızca metile-olmamış CpG dinükleotidi içeren DNA fragmanına bağlanmıştır (Şekil 7).

Bu sonuçlar, CXXC5'in CpG dinükleotide bağlanan bir protein olduğunu ve bu bağlanmanın proteinin CXXC domaini aracılığıyla gerçekleştiğini önermektedir.

4.2.2 ChIP-Sekanslama (ChIP-Sequencing, ChIP-Seq). CXXC5'in direkt ve/veya dolaylı transkripsiyon partneri olarak DNA ile ilişkilendiği DNA motif ya da bölgelerin belirlenmesi,

CXXC5'in genom düzeyindeki olası rolü üzerine ön bilgiler verebilir. Bu amaçla, CXXC5'in hem DNA ile ilişkilenebildiği bulgusunun endojen bir ortamda da geçerli olduğu ve hem de partner transkripsiyon üyesi olarak gen ekspresyonlarında rol oynadığı olasılığının testi için ChIP-Seq deneyleri gerçekleştirdik. CXXC5 antikoruyla immünçökeltmeye uğratılan DNA fragmanları QIAquick PCR Purification kolonları kullanarak ayrıştırdık ve Rochester Üniversitesi Genom Merkezi'ne ChIP-Seq hizmet alımı olarak ChIP-Seq analizi için gönderdik. Sonuçların analizlerini, ODTÜ Biyoinformatik ve Bilgisayar Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi ve proje danışmanımız olan Prof. Dr. Tolga Can ile birlikte yaptık. CXXC5'e yönelik olası DNA sekans dizilerinin frekans dağılımını MEME-ChIP, Gibbs gibi yazılımlarla ChIP-seq dizilerinden elde edilen sonuçlarla *de novo* CXXC5 motifleri tanımlamada kullandık.

Ancak, önceki gelişme raporlarımızda belirttiğimiz gibi, belirgin bir motif bulgusuna ulaşamadık. Bunun deneysel sorunlardan kaynaklandığını düşünmemekteyiz. Bizim (Huang vd, 2005), ve diğerlerin (Métivier vd, 2003), daha önceki çalışmalarda gösterdiği gibi, E2-ER α sinyali TFF1 (pS2) gen ekspresyonunu TFF1 proksimal promotöründe bulunan bir ERE dizisine direkt olarak bağlanarak ERE-bağımlı yolak aracılığıyla düzenler. Üç biyolojik tekrar olarak yaptığımız çalışmalarımızın her bir tekrarında, deneyi biyolojik bir tekrar olarak kabul etmeden önce deneylerimizin çalıştığını Flag-ER α ile transfekte edilmiş hücrelerde Flag antikoru ile çökeltilen kromatinde ERE içeren TFF1 (pS2) gen lokusunun varlığı ile teyit ettik.

Bu nedenle, CpG dinükleotid içeren çeşitli DNA dizilerinin ve CpG adalarının genomda yüksek düzeyde varlığı ve dağılımı, CXXC5'in direkt ve/veya dolaylı olarak DNA'ya bağlanma/ilişkilene motif analizi için yeterli olmayacağını önermektedir.

4.3 CXXC5'in E2'nin düzenlediği hücre işlevlerindeki rolü.

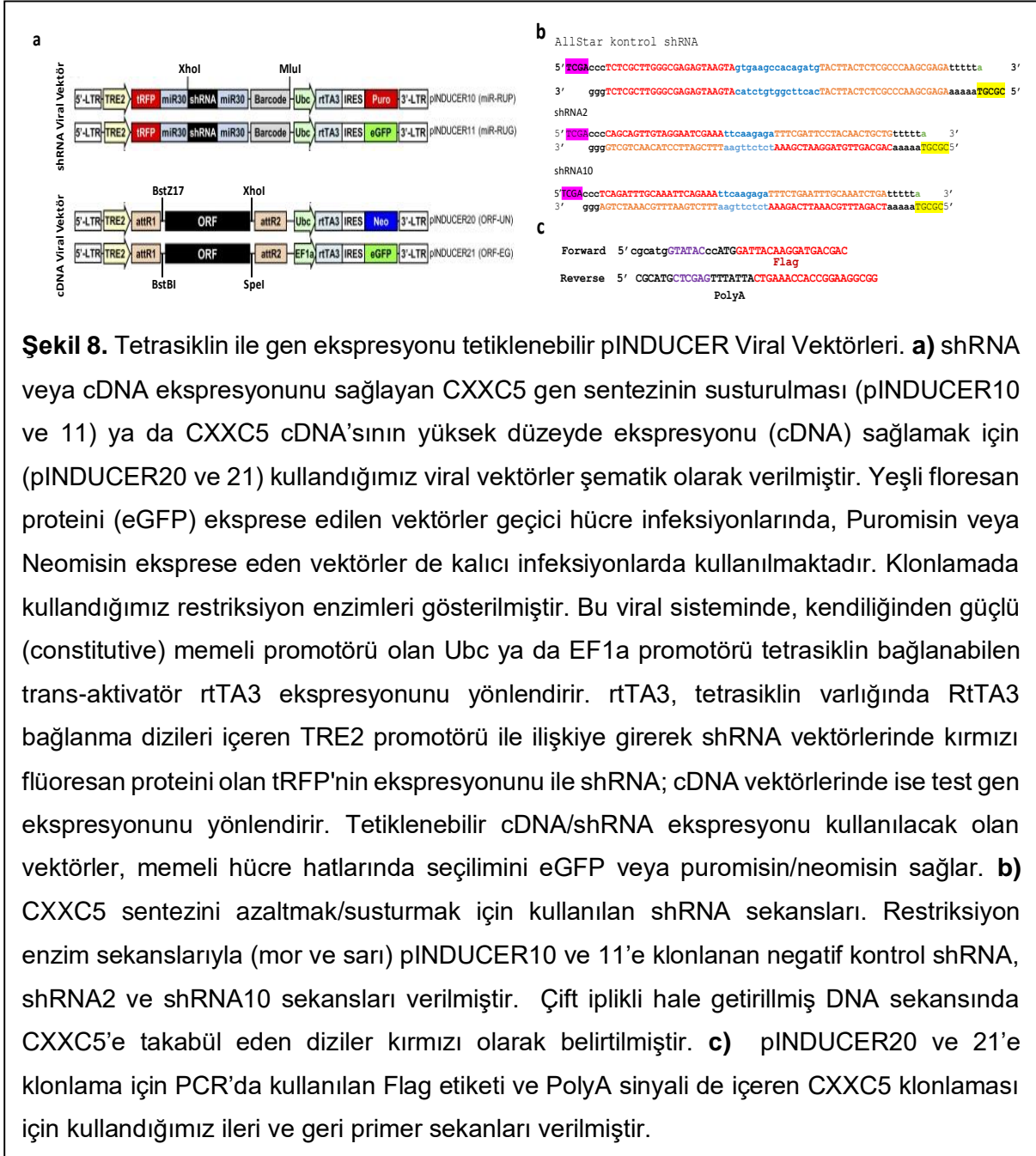
CXXC5'in E2'ye yanıtta gen ekspresyonundan hücre işlevleri üzerine olan rolünü aydınlatmak için CXXC5 gen ifadesinin MCF7 hücrelerinde azaltma/susturma çalışmaları gerçekleştirdik.

4.3.1 Lentivirüs infeksiyonları. Etkin bir transgen transferi gerçekleştirmek için, Addgene (<https://www.addgene.org/>)'den elde etmiş olduğumuz ekspresyonu tetiklenebilir vektör sistemlerinden pINDUCER Lentiviral sistemini (Meerbrey vd, 2011) hücre çalışmalarında kullandık. Bu üç vektörlü sistemde, psPAX2 (<https://www.addgene.org/12260/>) ve pMD2.G (<https://www.addgene.org/12259/>) paketleme ve zarf vektörleri olarak; pINDUCER (<https://www.addgene.org/44011/>) ise tetiklenebilir cDNA veya shRNA ekspresyonunu sağlayan taşıyıcı viral vektör olarak kullanılmaktadır (Şekil 8a).

Önceki raporlarımızda detaylı bir şekilde tanımladığımız ve yayınımızda (Yaşar vd, 2016) gösterdiğimiz gibi, CXXC5 geninin ekspresyonunu azaltmak/susturmak için özel olarak

CXXC5 proteininin MCF7 hücrelerinde sentezini etkin bir şekilde baskılayan siRNA#2 ve siRNA#10'nu şablon olarak kullanılarak shRNA senteze edildi ve pINDUCER10 ve pINDUCER11 vektörlerine klonlandı (Şekil 8b).

Benzer olarak, 5' ucunda Flag ya da HA etiketi; 3' ucunda PolyA sinyali taşıyan CXXC5 cDNA'sını uygun restriksiyon enzim sekanslarıyla PCR aracılığıyla oluşturduk ve pINDUCER20 ve 21 vektörlerine klonladık (Şekil 8c).

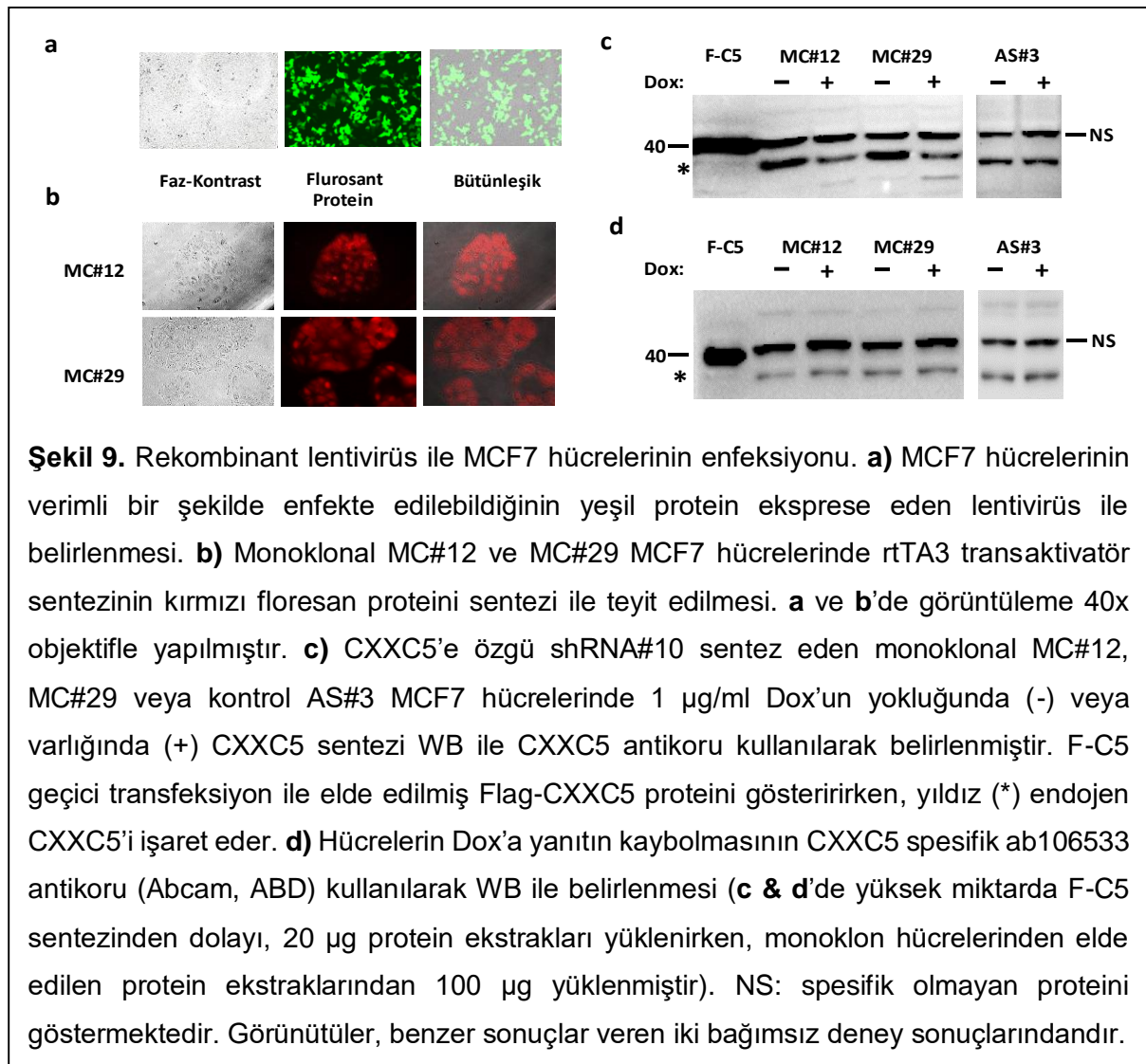


Elde edilen vektörleri daha sonra Hek293-T hücrelerine virüs partikülleri sentezi için transfekte ettik. Hek293-T hücreleri SV40 large T antikorunu kalıcı olarak eksprese etmekte, T antikorunu

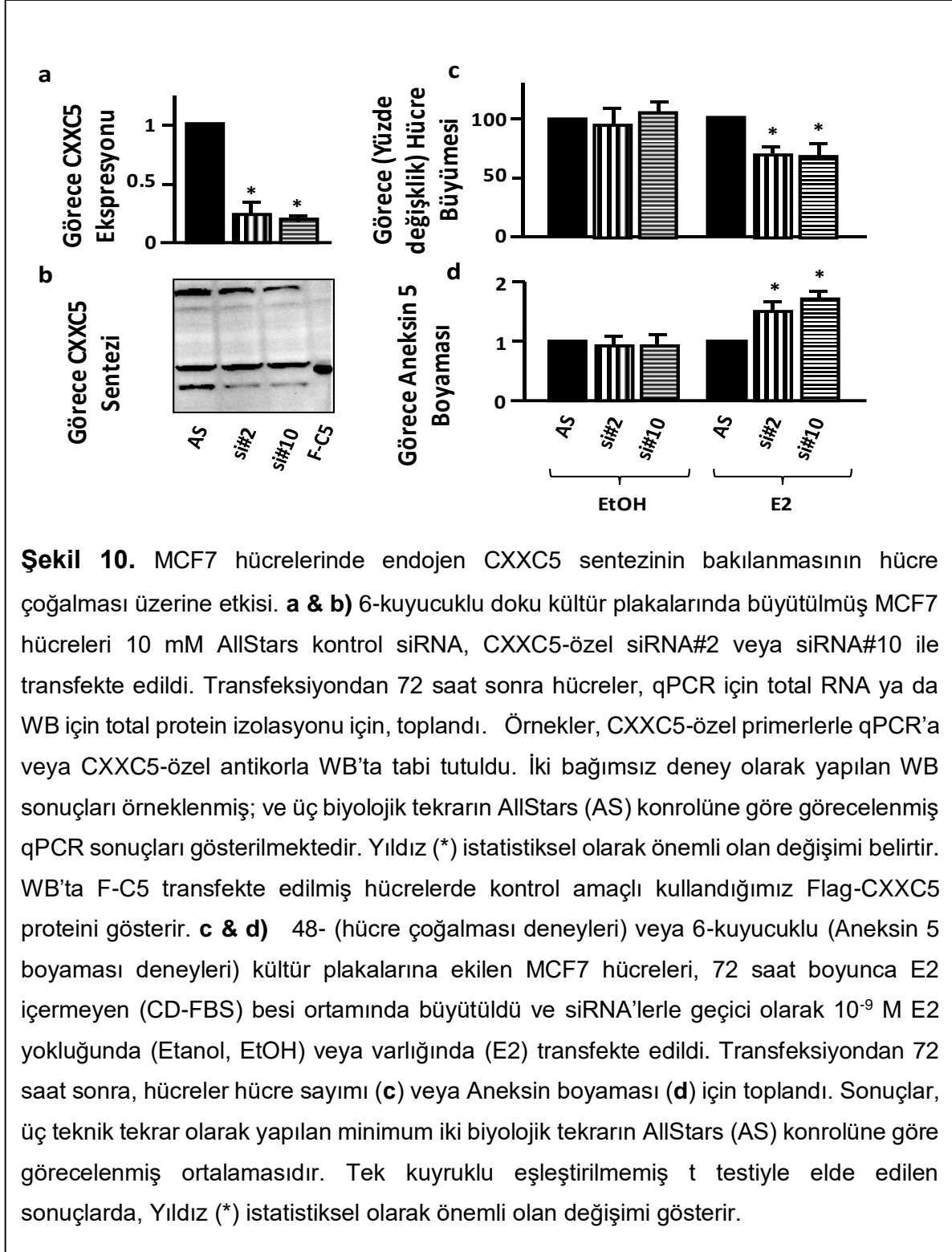
aracılığıyla da hücreye transfekte edilen viral genlerin ekspresyonunu sağlayarak yüksek düzeyde viral partikülleri üretiminde kullanılmaktadır.

Transfeksiyondan 24 ve 48 saat sonra besi ortamına salınan virüs partikülleri toplandı, filtreden geçirilerek hedef hücre hattımız olan MCF7 hücrelerinin enfeksiyonunda kullanıldı. Hücre enfeksiyonu ile birlikte tetrasiklin ile transgen ekspresyonu MCF7 hücrelerinde transgen sentezini viralpartikülleri miktarına bağlı olarak sentezleyebildiğimiz teyitini floresan mikroskopu ile sağladık (Şekil 9a). Rekombinant virüs elde edilmesiyle birlikte, enfekte edilen hücrelerde monoklon seçimi başlattık.

Enfeksiyondan 48 saat sonra, MCF7 hücreleri 5 µg/ml puromisin içeren besi ortamında büyüttük. shRNA sentezleyen monoklon hücre seçimini, seçim antibiyotigine karşı direnç gösteren klonlarda floresan mikroskopu kullanarak transaktivatör rtTA3 sentezinin olduğuna işaret eden kırmızı flüoresan protein sentezine bağlı olarak gerçekleştirdik (Şekil 9b). Bu seçimlerden sonra, iki shRNA#10 monoklon hücrelerinin (MC#12 ve MC#29) AllStars kontrol



monoklon hücreleri (AS#3) ile birlikte çeşitli konsantrasyondaki tetrasiklin analogu olan doksisisiklin (Dox) varlığında ve yokluğunda CXXC5 sentezine baktık. Bu önçalışmalardan elde ettiğimiz optimal Dox konsantrasyonunun (1 µg/ml) CXXC5 sentezi üzerine etkisini qPCR (bulgu gösterilmiyor) ve WB (Şekil 9c) yaklaşımıyla inceledik. Kullandığımız monoklonlarda, CXXC5



sentezinin Dox varlığında etkin bir şekilde baskılandığını görürük. Bu hücrelerde yaptığımız ön fenotipik deneylerde de MCF7 hücrelerin 10^{-9} M E2 ya bağlı büyümesinde etkin baskılama gördük. Bu sonuçlarımız, CXXC5'in E2-ER sinyali yolağı tarafından tetiklenen hücre büyümesinde önemli bir rol oynadığını göstermekteydi. Ancak, hücreler zamana bağlı olarak tetrasikline yanıtı kaybettiler (Şekil 9d). Bu kayıp, kullandığımız monoklonlara özgü olmayıp seçim yaptığımız bütün monoklonlarda, ve Flag-CXXC5 cDNA'si eksprese eden monoklonlarda da, görüldü. Bu da, tetiklenir ekspresyon sistemiyle CXXC5'in hücre çoğalması üzerine etkilerini detaylı bir incelememizi önledi.

4.3.2 siRNA transfeksiyonları. Lentivirüs kullanımı sonucu karşılaştığımız sorunu aşmak için, etkin bir şekilde çalıştığını gösterdiğimiz (Yaşar vd., 2016) siRNA ile geçici transfeksiyonlar gerçekleştirdik. siRNA#2 (CAGCAGTTGTAGGAATCGAAA), siRNA#10 (TCAGATTTGCAAATTCAGAAA) veya AllStars kontrol siRNA'siyle MCF7 hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan çeşitli zaman aralılarında endojen CXXC5 gen ekspresyonu ve protein sentezi sırasıyla qPCR ve CXXC5-özel ab106533 antikoru (Abcam, ABD) kullanılarak WB ile incelendi. Daha öncede gözlemlediğimiz gibi, siRNA'ler endojen CXXC5 ekspresyonunu ve protein sentezini etkin bir şekilde baskıladılar (gösterilen transfeksiyondan 72 saat sonradır, Şekil 10a & b).

4.3.3 Hücre Çoğalması ve Apoptoz Deneyleri. Bu bulgulara dayanarak, CXXC5 proteinindeki azalmanın hücre çoğalması üzerine olan etkisini hematositometrik hücre sayımı ve MTT deneyleriyle gerçekleştirdik. Bu amaç için üç gün boyunca E2'siz ortamda (10% CD-FBS içeren besiyeri) 48-kuyucuklu doku kültür plakalarında büyütülmüş MCF7 hücrelerini siRNA ile geçici olarak 10^{-9} M E2 yokluğunda (Etanol kontrol) ve varlığında transfekte ettik. Transfeksiyondan 72 saat sonra hücreler toplandı ve hematositometre ile sayıldı. Çoğalmanın E2 ile tetiklendiği MCF7 hücrelerinde hem siRNA#2 ve hem de siRNA#10 transfeksiyonlarında AllStars kontrole göre yalnızca E2'nin varlığında etkin bir şekilde hücre büyümesini baskıladı (Şekil 10c). Aynı sonuçlar MTT deneyleriyle de gözlemlendi (bulgu gösterilmiyor). Benzer olarak yapılan çalışmalarda, siRNA#2 ve siRNA#10 transfekte edilmiş hücrelerde E2'nin varlığında aneksin V boyamasının artması (Şekil 10d), CXXC5'in E2 ile tetiklenen hücre çoğalmasına katıldığını göstermektedir.

4.3.4 CXXC5'in E2-ER α sinyali tarafından düzenlenen gen ekspresyonları üzerine etkisi. Sonuçlarımız, CXXC5'in metile-olmamış CpG dinükleotid bağlanan bir protein olarak E2-ER α sinyali tarafından tetiklenen hücre çoğalmasında rol oynadığını önermektedir. CXXC5'in hücre çoğalması üzerine etkilerinin E2-ER α tarafından tetiklenen gen ekspresyonları üzerinden olup olmadığını incelemek için RNA-Sekanslaması (RNA-Seq) yaklaşımı kullandık. E2 içermeyen besiyerinde büyütülen MCF7 hücreleri, 10^{-9} M E2'nin varlığında AllStars siRNA ve CXXC5 özel

Tablo 1: CXXC5 sentezinin azaltılmasının E2 tarafından düzenlenen kimi gen ekspresyonları üzerine etkisi

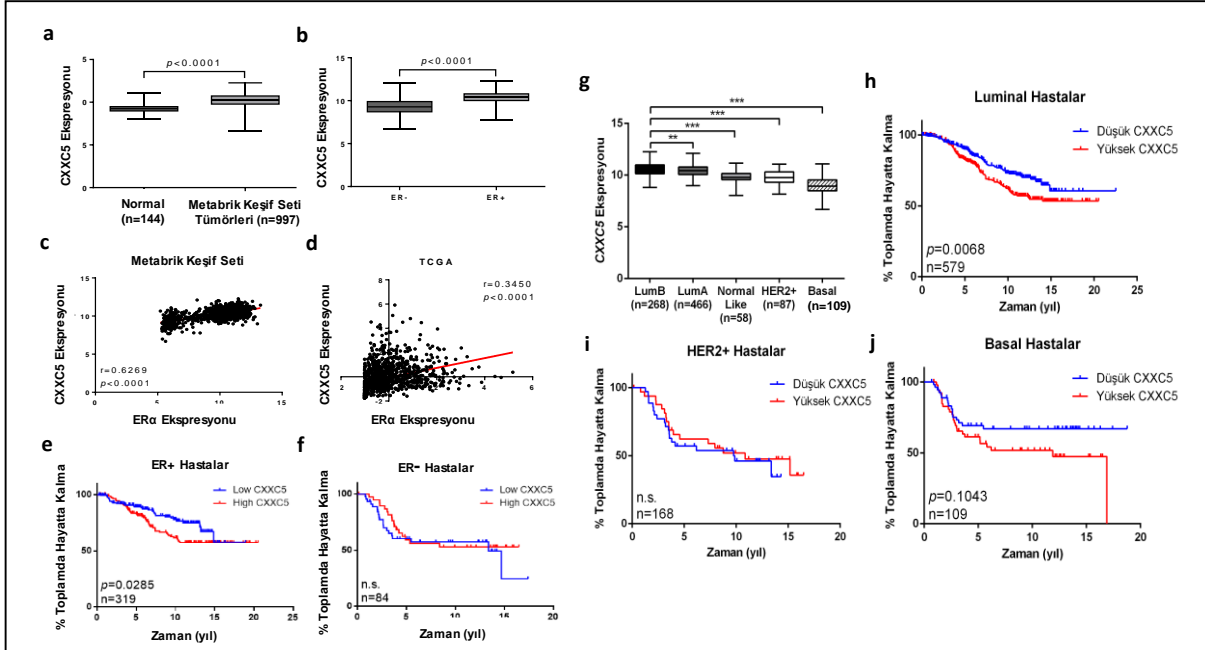
gen_id	gen	lokus	örnek_1	örnek_2	değer_1	değer_2	log2(kat değişim)	test_stat	p_değeri	q_değeri	Statiksel Önem
ENSG00000138764.13	CCNG2	chr4:77157150-77494286	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	177.013	574.599	-162.323	520.523	1,94E-02	6,70E+00	evet
ENSG00000176532.3	PRR15	chr7:29563810-29567295	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	31.942	835.006	-19.356	519.218	2,08E-02	7,06E+00	evet
ENSG00000069188.16	SDK2	chr17:73334383-73644089	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	0.0540083	0.559228	337.218	-516.985	2,34E-02	7,54E+00	evet
ENSG00000164761.8	TNFRSF11B	chr8:118923556-118952200	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	Ara.77	204.469	-264.281	514.994	2,61E-02	8,24E+00	evet
ENSG00000221866.9	PLXNA4	chr7:132123331-132648688	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	0.156805	0.914282	254.367	-512.716	2,94E-02	8,99E+00	evet
ENSG00000168306.12	ACOX2	chr3:58505135-58537319	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	0.352217	449.178	367.275	-508.956	3,59E-02	0.000107873	evet
ENSG00000141384.11	TAF4B	chr18:26225935-26391685	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	27.208	641.683	123.783	-461.633	3,91E-02	0.000980997	evet
ENSG00000165732.12	DDX21	chr10:68956127-68985073	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	374.917	78.569	106.739	-504.736	4,48E-02	0.000132469	evet
ENSG00000117479.12	SLC19A2	chr1:169463908-169486003	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	154.328	305.954	0.987312	-503.621	4,75E-02	0.000138193	evet
ENSG00000244211.3	PDZK1P1	chr1:147993861-148014956	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	0.56123	221.397	197.997	-502.609	5,01E-02	0.000141859	evet
ENSG00000125968.8	ID1	chr20:31605282-31606515	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	193.758	95.275	-102.409	50.252	5,03E-02	0.000141859	evet
ENSG00000003137.8	CYP26B1	chr2:72129237-72148038	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	0.186352	268.059	384.645	-501.899	5,19E-02	0.000144303	evet
ENSG00000237350.1	CDC42P6	chr4:22692913-22819575	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	122.792	0.177392	-611.313	493.579	7,98E-02	0.00021845	evet
ENSG00000138829.10	FBN2	chr5:128257908-129033642	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	149.421	0.491414	-160.438	493.173	8,15E-02	0.000219765	evet
ENSG00000271254.6	AC240274.1	K1270711.1:4611-29626	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	618.594	137.116	114.833	-488.271	1,05E-01	0.000278052	evet
ENSG00000135625.7	EGR4	chr2:73290928-73293705	Mcf7_AlIStar	Mcf7_CXXC5	0.235278	105.595	21.661	-481.433	1,48E-01	0.000386853	evet

ENSG000 00263887 .6	RP11- 51L5.5	chr17: 62264 704- 62297 026	Mcf7_AI IStar	Mcf7_C XXC5	0.020 5317	160.2 65	960.839	- 477.029	1,84 E-01	0.0004 75052	evet
ENSG000 00161031 .12	PGLYRP2	chr19: 15468 644- 15498 956	Mcf7_AI IStar	Mcf7_C XXC5	0.375 505	436.5 81	353.934	-47.524	2,01 E-01	0.0005 11898	evet
ENSG000 00188211 .8	NCR3LG1	chr11: 17351 725- 17377 341	Mcf7_AI IStar	Mcf7_C XXC5	270.3 77	609.4 56	117.255	- 425.683	2,07 E-01	0.0041 3236	evet
ENSG000 00111907 .20	TPD52L1	chr6:1 25119 048- 12530 2078	Mcf7_AI IStar	Mcf7_C XXC5	914.8 48	221.7 48	127.732	- 461.169	3,99 E-01	0.0009 89598	evet

siRNA#10 ile geçici olarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra, hücreler toplandı ve total RNA izolasyonu yapıldı. İki bağımsız deneyden elde edilen RNA örnekleri, University of Rochester (Rochester, New York, ABD)'da RNA-Seq işlemine tabi tutuldu. Detaylı analizlerle birlikte gen ekspresyon sonuçlarının teyidini yönelik qPCR çalışmalarımız sürmekle birlikte, sonuçlarımız CXXC5 sentezinin bastırılmasıyla E2'ye yanıtta görülen kimi gen ekspresyonlarında önemli değişiklikler olduğunu göstermektedir (Tablo 1). Örneğin, hücre çoğalmasında rol oynadığı düşünülen TPD52L1 (Tumor Protein D52 Like 1) ile RNA metabolizmasında rol oynayan DDX21 (DEXD-Box Helicase 21) gen ekspresyonu azalırken, hücre siklusunun baskılanmasında rol oynadığı düşünülen CCNG2 (Cyclin G2) artmıştır. Önemi henüz bilmemekle birlikte, bulgularımız CXXC5'in E2-ER α sinyal yollarıyla düzenlenen gen ekspresyonlarının düzenlenmesine katılarak E2 tarafından tetiklenen hücre çoğalması süreçlerinde rol oynadığını önermektedir.

4.3.5 Meme kanserinde CXXC5 ekspresyonu ve klinikopatolojik özellikler. Tümör baskılayıcı bazı genlerle birlikte CXXC5 genini de içeren lokusun miyelodisplazi sendromu (myelodysplasia syndrome, MDS) ve akut miyeloid lösemi (acute myeloid leukemia, AML) hastalarında sıklıkla delesyona uğradığı bulunmuştur (Pendino vd., 2009; Treppendahl vd., 2013). Bu gözlemlerle birlikte, CXXC5'in hem sitokin sinyali aracılığı ile düzenlenen hematopoetik kök hücrelerin miyelopoiezinde hem de retinoik asit tarafından başlatılan lösemik hücrelerin farklılaşmasında düzenleyici etkileri olduğunun gösterilmesi (Pendino vd., 2009; Treppendahl vd., 2013), CXXC5 gen ifadesinin normal ve kanser miyelodisplazisinde önemli bir rol oynadığını önermektedir. Bu öneriye tutarlı bir şekilde, CXXC5 ekspresyon seviyeleri ile akut miyeloid lösemisinin klinikopatolojik değerleri arasında bir korelasyon saptanmıştır (Pendino vd., 2009; Astori vd., 2013). Önemli olarak, CXXC5'in miyeloid leukemia da olduğu gibi normal meme dokusuna kıyasla meme kanserlerinden elde edilen dokularda da yüksek derece ekspresyona olduğu bulunmuş ve kötü prognoz belirteci olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Knappskog vd., 2011). Bu klinik bulgularla birlikte, CXXC5'in E2 tarafından

tetiklenen hücre çoğalması süreçlerine rol oynadığı yönelik bulgularımıza istinaden, CXXC5 gen ekspresyonunun meme kanseri alttıplerindeki olası önemini, Dr. Özgür Şahin (Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ankara-Türkiye) ile birlikte *in silico* meta-analizler gerçekleştirerek inceledik. Bu amaçla, Metabric (<https://www.synapse.org/#!/Synapse:syn1688369/wiki/27311>) ve TCGA (The Cancer Genome Atlas; <https://cancergenome.nih.gov/>) veri merkezlerinden elde edilen gen ekspresyon sonuçlarını kullandık. CXXC5 geninin, meme kanseri hastalarında



Şekil 11. CXXC5'in meme tümörlerinde ekspresyonu. **a&b)** Veritabanlarında bulunan kanserli ve kanser olmayan bireylerde CXXC5 ekspresyonu karşılaştırıldı. Meme tümörlerinde CXXC5 ekspresyonu artarken, ER-pozitif kanserlerde CXXC5 ekspresyonunun ER-negatif tümörlere nazaran daha yüksek düzeyde eksprese edildiği bulguları. **c&d)** Hem keşif (Discovery Set) ve hem de doğrulama (TCGA) data setlerinde CXXC5 ekspresyon seviyelerinin ERα (ESR1) ekspresyon seviyeleri ile ilişkili olduğu görüldü. **e&f)** ER-negatif ve ER-pozitif meme kanseri hastalarında CXXC5 ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. ER-pozitif hastalarda düşük CXXC5 ekspresyonunun hastanın yaşaması süresi açısından iyi prognoz belirteci olduğu bulguları. **g)** Farklı orijinli meme kanseri örneklerinde CXXC5 ekspresyonu karşılaştırması yapıldı. CXXC5 ekspresyon seviyelerinin ER-pozitif meme kanseri hastalarında prognoza etkisine bakıldı. **h, i & j)** HER2-pozitif meme kanseri (**h**) dışında düşük düzeyde CXXC5 ekspresyonunun Luminal (**i**) ve Basal (**j**) alttıpi meme kanseri hastalarında hayatta kalma süresine yönelik iyi prognoz belirteç olduğu bulguları.

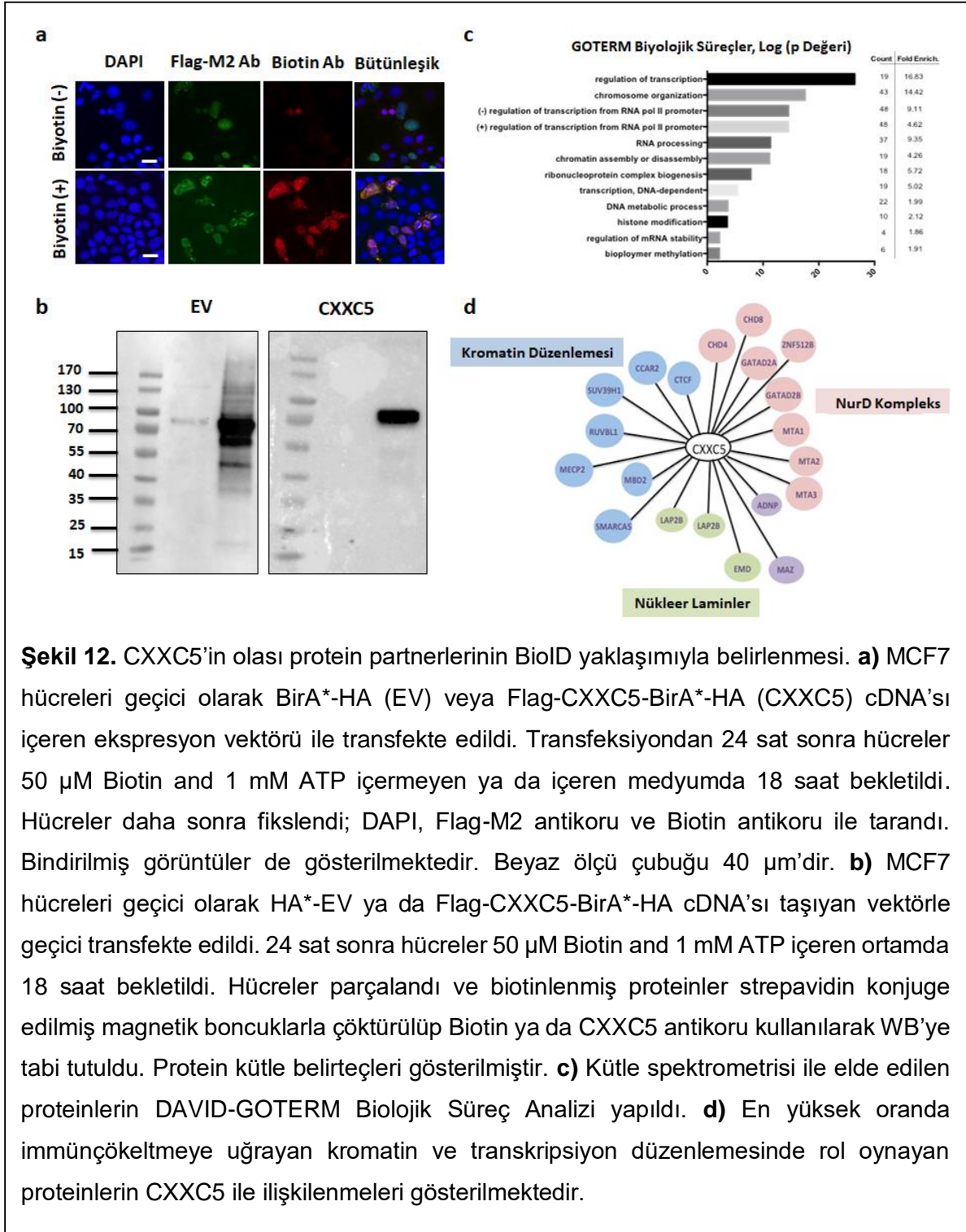
ekspresyonunun arttığını bulguladık (Şekil 11 a&b). Buna ek olarak, meme kanseri alttıpleri olan ER-negatif ve ER-pozitif hastalardan gelen örnekler karşılaştırıldığında ise, ER-pozitif olan kanser örneklerinde CXXC5 ekspresyonunun daha fazla olduğu; artmış ER α ekspresyonunun yüksek CXXC5 gen ekspresyonu ile ilişkili olduğunu bulguladık (Şekil 11 c&d). Aynı iki grupta CXXC5 ekspresyonu ile hayatta kalma oranı karşılaştırıldığında, ER-negatif hastalarda önemli bir fark gözlemlenmezken (Şekil 11 e&f), ER-pozitif hastalarda CXXC5 ekspresyonunun fazla olduğu hastaların prognozunun daha kötü olduğu bulguladık (Şekil 11e). Ayrıca farklı orijinlerden gelen meme kanseri örneklerinde, CXXC5 ekspresyonunu değişimlerine de inceledik (Şekil 11g-j). CXXC5 gen ekspresyonunun bütün kanser alttıplerinde arttığını ve en yüksek olarak Luminal B alttipinde olduğunu bulguladık. Bunların dışında, CXXC5 ekspresyonunun hayatta kalma süresine olan etkisinde, HER2-pozitif meme kanseri hastaları dışında (Şekil 11i), luminal (Şekil 11h) ve basal (Şekil 11j) meme kanseri hastalarında düşük CXXC5 ekspresyonunun iyi bir prognoz belirteci olduğunu gözlemledik.

4.4 CXXC5 proteiniyle ilişkilenen protein partnerlerinin belirlenmesi (Çalışmalarımız sürmektedir).

Proteinler işlevlerini dinamik protein etkileşim ağları içinde yerine getirirler. CXXC5 proteinin protein partnerlerinin belirlenmesinin, CXXC5 proteininin işlev mekanizmasına yönelik önemli bilgiler sağlayabileceğini düşündük. Bu nedenle, projemizin ikinci gelişme raporunda belirttiğimiz gibi, projemizde daha önce önermediğimiz ancak bulgularımız ışığında BioID, Yakınlık Bağımlı Biotin Kimlik (Proximity biotinylation assay, BioID), sistemini de kullanmaya karar verdik.

4.4.1 BioID sistemi. Bu sistem, proteinler arasında zaman-ve-alan ilişkilerini tanımlamak için kullanılmaktadır (Roux et al., 2012). BioID yöntemi, “av” proteinin genetik olarak konjuge edilmiş E. coli biyotin ligazı olan mutant BirA* enziminin av proteiniyle direkt, yakın dolaylı ve/veya alansal ilişkiye giren proteinleri kovalent olarak biyotinleyerek etiketlemesi esasına dayanmaktadır. Biotinle etiketlenmiş proteinler, streptavidin afinite ile yakalanır ve kütle spektrometresi yaklaşımıyla tanımlanır. Addgene’den elde ettiğimiz BioID sistem vektörüne [pcDNA3.1-MCS-BirA*(R118G)-HA] CXXC5 cDNA’sını klonladık. BirA* enziminin karboksil ucunda HA belirteci bulunmaktadır. BirA*-HA proteini 35 kDa’luk, Flag-CXXC5 ise 33 kDa bir protein kütlelerine sahiptir. Bu nedenle, Flag-CXXC5-BirA*-HA füzyon proteininin yaklaşık 70 kDa moleküler kütleli bir protein olarak sentezlenmesini öngördük. Flag-CXXC5-BirA*-HA füzyon proteini olarak senteze edilecek cDNA içeren ya da yalnızca BirA*-HA (Boş vektör, BV) içeren ekspresyon vektörünü MCF7 hücrelerine geçici transfeksiyonla transfekte ettik. Transfeksiyondan 36 saat sonra, protein izolasyonunu takiben Flag veya CXXC5 antikoru kullanarak WB’ler gerçekleştirdik. Boş vektör transfekte edilmiş hücrelerde beklenen

moleküler kütleli bir protein görülmezken, transfekte edilmiş hücrelerde 70 kDa bir proteinin gözlenmesi bize, Flag-CXXC5-BirA*-HA füzyon proteinini senteze edebildiğimizi belirtmektedir (Şekil 12b). Senteze edilen Flag-CXXC5-BirA*-HA proteinin hücre proteinleri etiketleme kapasitesini WB ve ICC ile test ettik (Şekil 12a). WB için, 6-kuyucuklu hücre kültür plakalarında büyütülen MCF7 hücrelerini, BirA*-HA ya da Flag-CXXC5-BirA*-HA cDNA'sını içeren ekspresyon vektörü ile geçici olarak transfekte ettik. Transfeksiyonlardan 24 saat sonra



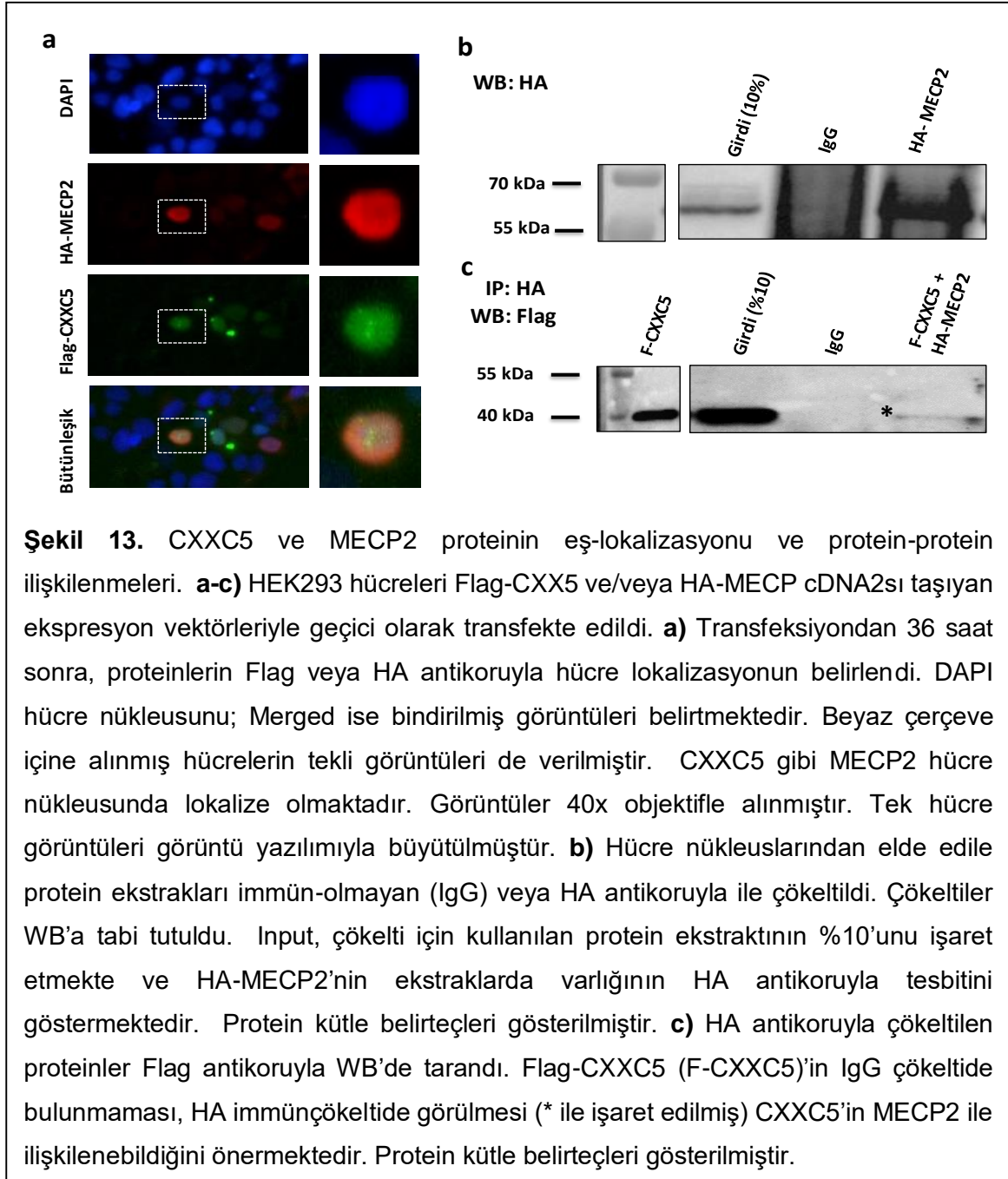
Şekil 12. CXXC5'in olası protein partnerlerinin BioID yaklaşımıyla belirlenmesi. **a)** MCF7 hücreleri geçici olarak BirA*-HA (EV) veya Flag-CXXC5-BirA*-HA (CXXC5) cDNA'sı içeren ekspresyon vektörü ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler 50 µM Biotin and 1 mM ATP içermeyen ya da içeren medyuma 18 saat bekletildi. Hücreler daha sonra fiksleildi; DAPI, Flag-M2 antikor ve Biotin antikor ile tarandı. Bindirilmiş görüntüler de gösterilmektedir. Beyaz ölçü çubuğu 40 µm'dir. **b)** MCF7 hücreleri geçici olarak HA*-EV ya da Flag-CXXC5-BirA*-HA cDNA'sı taşıyan vektörle geçici transfekte edildi. 24 saat sonra hücreler 50 µM Biotin and 1 mM ATP içeren ortamda 18 saat bekletildi. Hücreler parçalandı ve biotinlenmiş proteinler streptavidin konjuge edilmiş magnetik boncuklarla çöktürülüp Biotin ya da CXXC5 antikor kullanılarak WB'ye tabi tutuldu. Protein kütle belirteçleri gösterilmiştir. **c)** Kütle spektrometrisi ile elde edilen proteinlerin DAVID-GOTERM Biyolojik Süreç Analizi yapıldı. **d)** En yüksek oranda immünçökeltmeye uğrayan kromatin ve transkripsiyon düzenlemesinde rol oynayan proteinlerin CXXC5 ile ilişkilenmeleri gösterilmektedir.

hücreleri 50 μ M Biotin yokluğunda (Biyotin -) ya da varlığında (Biyotin +) 18 saat süreyle muamele ettik. Flag-CXXC5-BirA*-HA proteinin hücre proteinlerini biyotin ile etiketlemesini ICC ile görüntüledik (Şekil 12a). Biotin inkübasyondan sonra, hücreler toplandı ve parçalandı. Hücre ekstraktları, streptavidin manyetik boncuklarla 16 saat inkübe edildi. Boncuklara tutunan biyotinlenmiş proteinler 1x Laemmlı tamponu, 100 mM DTT ve 500 nM biyotin içeren solüsyonda ısıtılarak ayrıştırıldı. Eşit hacimde total proteinler SDS-PAGE sonrası Biotin (Abcam ab53494) ile ya da CXXC5 antikoru ile taranıp WB ile görüntülendi (Şekil 12b). Vektör kontrolü ile karşılaştırıldığında BirA* enzimine füzyon olarak sentezlenen Flag-CXXC5 proteininin varlığında biyotine eklenmiş proteinler tespit edildi.

4.4.2 Biotinlenmiş hücre proteinlerinin izolasyonu. Flag-CXXC5-BirA*-HA füzyon proteinin hücre proteinlerini biyotinle etiketleyebildiği sonuçlarımıza dayanarak, biyotin ile etiketlenmiş hücre proteinlerinin kimlik tanımlanması için geniş ölçekli (100 mm çapında hücre plakaları) geçici transfeksiyonlar gerçekleştirdik. Transfeksiyondan 24 saat sonra, hücrelere 50 μ M Biotin ve 1 mM ATP içeren besi ortamı eklendi. Hücreler toplandı ve 4.4.1'de tanımladığımız gibi muamele ettik. Yıkanan streptavidin manyetik boncukları Koç Üniversitesi Hücre Proteomiks Laboratuvarı Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (Liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS/MS) için hazırladık. Boncuklara bağlanmış proteinler trypsin (Thermo-Pierce, Massachusetts, ABD, MS Grade Trypsin Protease) ile parçalandı. Peptid pürifikasyonu ve konsantrasyonu peptid temizleme C18 StageTip (Thermo-Fisher)'leriyle yapıldı. Peptid analizi, Orbitrap LC-MS/MS kütle spektrometresi (Thermo-Fisher) ile gerçekleştirildi. Proteome Discoverer 1.4 yazılımı (Thermo-Fisher) protein kimlik belirlenmesinde kullanıldı.

4.4.3 Protein Kimlikleri. Yaptığımız kütle spektrometrisi sonucu elde ettiğimiz protein kimlikleriyle olası protein partnerlerinin *in silico* analizini sinyal ağı olarak yapılandırdık (Şekil 12c&d). Bu amaç için, Omics Integrator (OI), Forest modülü 'Prize-collecting Steiner forest' (PCSF) ve PRISM yazılımlarını Dr. Nurcan Tunçbağ (ODTÜ Enformatik Enstitüsü, Ankara, Türkiye) ile birlikte kullandık. OI ve PCSF protein-protein etkileşimleri tahmininde ve protein kompleks yapılarının kurgulanmasında yararlanılırken, PRISM protein domain ve motiflerinin kurgulanmasında kullanılmaktadır. Bulgularımızda, CXXC5 proteinin, örnek olarak, Transcriptional repressor p66-alpha & beta (GATAD2A & GATAD2B), Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 & 8 (CHD4 & CHD8), Zinc finger protein 512B (ZNF512B), Metastasis-associated protein 1 ve 3 (MTA1 & MTA3) ve Bromodomain PHD Finger Transcription Factor (BPTF) ilişkilendiğini gözlemledik (Şekil 12c&d). Bu proteinler, nükleozom yeniden şekillendirme ve deasetilaz kompleksini (the nucleosome remodeling and deacetylase, NuRD complex) oluşturan proteinlerden bir kısmıdır ve ATP-bağımlı kromatin

stabilitesi gibi süreçlerde önemli roller oynar. Benzer olarak, RuvBL1 (RuvB Like 1) birçok hücrel aktivite için gerekli olan evrimsel açıdan oldukça korunumlu AAA (+) ATPaz olarak görev yapmaktadır. RuvBL1, kromatinin yeniden modelleme süreçlerine, transkripsiyon regülasyonuna ve DNA hasar onarımına katılmaktadır. Bunların dışında, CXXC5'in olası protein partneri olarak Methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) ile ilişkilenebildiğini bulguladık. CXXC5 proteini Histone-lysine N-methyltransferase 2B (KMT2) gibi nükleosomun yeniden modelleyicisidir. Bulgularımız daha önce de CXXC5'in protein partneri olarak gösterilmiş (Tsuchiya et al., 2016), bir histon-lisin metiltransferaz enzimi olan Suppressor of Variegation



3–9 Homolog 1 (SUV39H1) ile ilişkilenebildiğini önermektedir. Sonuçlarımız ayrıca, CXXC5'in cell cycle and apoptosis regulator protein 2 (CCAR2) gibi hücre döngüsüne katılan proteinlerle de ilişkiye girebileceğini önermektedir. Bu bulgularımız, CXXC5'in bir epigenetik faktör ve transkripsiyon eş-regülatörü olarak hücre çoğalmasında önemli bir rol oynayabileceği öngörümüzü destekler görülmektedir.

4.4.4 Eş-lokalizasyon. Proteinlerin hücre içinde sentezi ve hücre içi lokalizasyonları ile birlikte protein-protein etkileşimlerini incelemeye kullanacağımız immünohistokimya yaklaşımı için, 48-kuyucuklu hücre kültürü plaklarında büyüttüğümüz transfeksiyon verimliliği yüksek olan HEK293 hücrelerini Flag-CXXC5 ve/veya, örneğin, olası protein partneri olan ve HA etiketi eklediğimiz Addgene'den elde ettiğimiz MECP2 (HA-MECP2) cDNA'si içeren ekspresyon vektörleriyle geçici olarak transfekte ettik. Transfeksiyondan 36 saat sonra hücreleri, %4 paraformaldehit içeren fosfat tamponlu salin (PBS) ile sabitleştirilip %0.4 Triton X-100 içeren PBS ile geçirgen hale getirdik. Hücreleri kullanılan antikora uygun olan 10%lik bloklama ajanı ile blokladıktan sonra monoklonal Flag (Flag) ve/veya poliklonal HA antikoru ile muamele ettik. Bunu takiben, hücreleri farklı floresanlarla konjuge edilmiş ikincil antikor ve hücre nükleusu DAPI ile muamele ettikten sonra proteinlerin hücre içi lokalizasyonu floresan mikroskobu ile inceledik (Şekil 13a). Sonuçlarımız, CXXC5 gibi MECP2'in de hücre nükleusunda lokalize olduğunu göstermektedir.

4.4.5 Eş-immünöçöktelme. Hücre nükleusunda lokalize olan CXXC5 ve MECP2'nin olası protein-protein ilişkilenmesini eş-immünöçöktelme ile inceledik. HEK293 hücrelerini HA-MECP2; Flag-CXXC5 veya HA-MECP2 ile birlikte Flag-CXXC5 cDNA içeren ekspresyon vektörü ile transfekte ettik. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerin nükleer fraksiyonu izole edilip protein ekstraksiyonu yapıldı. Transfeksiyon grupları, HA antikoru ve Protein A ve G magnetik boncuklar kullanılarak immünöçöktelmeye tabi tutuldu. İmmünöçöktelmeler, %10 SDS-PAGE jel elektroforezinde ayrıştırıldı ve Flag antikoru kullanılarak WB yapıldı (Şekil 13b&c). İmmünöçöktelme işleminin spesifik olarak HA antikoruyla bağlı olduğunu göstermek için aynı zamanda Rabbit IgG (Igg) çöktelmesiyle de test edildi. Sonuçlar, Flag-CXXC5'in (yıldız "*" ile belirtilmiştir) HA ile immünöçöktelme yapılmış ekstraktlarda Flag antikoru ile tanındığını göstermekte; hücre nükleusunda lokalize olan CXXC5 ve MECP2'nin protein-protein ilişkilenmesi gösterdiğini önermektedir.

Bulgularımızı, siRNA ile CXXC5 ve/veya MECP2 sentezi azaltılmış hücrelerde ve iki yönlü eş-immünöçöktelme yaklaşımlarıyla birlikte Bölünmüş GFP Tamamlama (Split GFP Complementation assay, spGFP; Cabantous vd, 2005) ve Yakınlık Ligasyon (Proximity Ligation Assay, PLA; Fredriksson vd, 2002) analizleriyle teyit etme çalışmalarımıza başlamış



bulunuyoruz. Bunun dışında, BioID ile belirlediğimiz diğer proteinlerin CXXC5 ile olası ilişkilenmesinin incelenmesini de sürdürmekteyiz.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

TÜBİTAK-KBAG 114Z243 projemizde amacımız, E2-ER α sinyalin direkt hedef geni olarak sentezi düzenlenen CXXC5'in E2'nin regüle ettiği hücre çoğalmasında rol oynadığı öngörümüzü sınamaktı. Bu süreç süresince elde ettiğimiz sonuçlarımız, E2-ER α 'nın ERE-bağımlı sinyal yolağıyla CXXC5 gen ifadesini ve protein sentezini düzenlediğini göstermektedir. Bununla birlikte, sonuçlarımız CXXC5'in metile-olmamış CpG dinükleotidlerine bağlanan bir protein olduğunu ve E2-ER α ile düzenlenen gen ekspresyonların düzenlemesine katılarak E2 sinyaliyle tetiklenen hücre çoğalmasına katkıda bulunduğuna işaret etmektedir.

CXXC5 ekspresyonunun nasıl gerçekleştiğine yönelik bilgiler sınırlıdır. *In silico* analiz ve deneysel bulgulara dayanarak, all-trans retinoik asit (ATRA) yanıt geni olarak tanımlanan CXXC5'in gene ekspresyonunun CXXC5 gen lokusunda transkripsiyon başlama bölgesininin 5'da bulunan bir retinoid-yanıt elementi aracılığıyla RARA (retinoc acid receptor α) tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. Benzer olarak, WT1 (Wilms tumor suppressor gene)'in CXXC5 gen ekspresyonunu gen promotöründe bulunan DNA yanıt dizileri ile doğrudan etkileşim yoluyla aktive ettiği önerilmiştir. Bu projemiz süresince çeşitli yaklaşımlarla elde ettiğimiz bulgularımız da, E2-ER α sinyalinin CXXC5 ekspresyonunu proteini kodlayan dizinin transkripsiyon başlama bölgesininin 5' bulunan bir ERE dizisine direkt olarak bağlanarak düzenleyebildiğini göstermektedir. Ökaryotik gen transkripsiyonunun düzenlenmesi, doğrudan veya dolaylı karşılıklı etkileşimler yoluyla ortak hedef genleri düzenleyen çoklu transkripsiyon faktörleri ile birlikte, kombinatoriyal niteliktedir. İlginç olarak, RARA ve WT1 gen ekspresyonlarının E2-ER α (Nott vd, 2009); ER α 'yı kodlayan ESR1 gen ekspresyonunun da WT1 (Kang vd, 2011) tarafından meme hücrelerinde düzenlendiği de bilinmektedir. Bu karşılıklı etkileşimler, CXXC5 gen ekspresyonunun sinerjistik veya antagonistik olarak meme epitel hücrelerinin çeşitli sinyal yollarına yanıtıyla düzenlenebileceğini önermektedir. Klinikopatolojik meta-veriler kullanarak yaptığımız *in silico* analizlerimizde, CXXC5 gen ekspresyon seviyesinin meme kanseri prognozunda bir belirteç olabileceği sonucuyla birlikte CXXC5 gen ekspresyonunun ER α gen ekspresyonu ile pozitif bir korelasyon gösterdiğini bulguladık. Bu bulgularımız, E2-ER α sinyal yolağının CXXC5 gen ekspresyonunda düzenlemesinde önemli bir rol oynadığını önerirken, RARA ve/veya WT1 sinyal yollarındaki olası düzensizliklerin de CXXC5 gen ekspresyondaki değişikliklere katkıda bulunacağını da düşündürmektedir. Bu bulgularımızın yol açtığı ve yeni proje oluşturulmasında kullanabileceğimizi düşündüğümüz *in silico* önçalışmalar, gerçekten de RARA gen ekspresyonunun da meta-veri analizlerinde kullanılmasının meme kanseri alttıpleri için önemli bir tanı/tedavi belirteci olabileceğini önermektedir.

İçerdiği çinko parmak-CXXC domaini (zinc finger, ZF-CXXC domain) nedeniyle kromatin-bağlanan bir protein grubunun üyesi olarak tanımlanmış olan CXXC5'in, rekombinant protein teknolojisi yaklaşımıyla gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda, karboksil-ucunda bulunan CXXC domaini aracılığıyla metile-olmamış CpG dinükleotidlerine bağlanan bir protein olduğunu bulguladık. DNA metilasyonu, kovalent histon modifikasyonları, nükleozom pozisyonlanması ve miRNA'ları içeren epigenetik mekanizmalar, gelişimsel biyolojide ve kanser gibi hastalıklarda gen ifadesinin düzenlenmesi için çok önemlidirler. Genomik DNA'nın kimyasal modifikasyonu sitozin nükleotidinin metilasyonu ile sınırlıdır ve genel olarak CpG dinükleotidlerini içermektedir. Genomda yaygın olan metile olmuş CpG dinükleotidlerine bağlanan proteinler (methyl-CpG binding proteins) heterokromatin bölgelerini tanımlar ve bu durumun sürekliliğini sağlayarak transkripsiyonu düzenler. Ancak, gen promotörlerinin büyük bir çoğunluğu, CpG adaları (CpG islands, CGI) olarak tanımlanan transkripsiyonel olarak aktif ökromatik bölgelerde bulunur (Core vd., 2008). Bu metile olmamış CGI'lara bağlanan ZF-CXXC proteinleri DNA metilasyonunu önler. Bunun yanında, ZF-CXXC proteinleri histonları post-translasyonel olarak modifiye eden proteinlerle doğrudan ya da dolaylı ilişkiye girerek gen transkripsiyonun regülasyonuna katılır.

Çalışmalar, hücre nükleusunda lokalize olan CXXC5'in BMP4 (Bone morphogenic protein 4) sinyalinde bir transkripsiyon faktörü olarak görev aldığı, CXXC motifi aracılığı ile Flk-1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, Flk-1/KDR) gen ifadesini düzenlediği ve böylece endotel hücrelerinin farklılaşması ve damar oluşumuna katıldığı bulgulanmıştır (Kim vd., 2013). Bunun yanında, CXXC5'in COX4/2 promotörüne bağlanması sonucu COX4/2 gen ifadesinin baskılandığını gösterilmiştir (Aras vd., 2013). Benzer şekilde, CXXC5'in hem sitokin sinyali aracılığı ile düzenlenen hematopoetik kök hücrelerin miyelopoiezinde hem de ATRA tarafından başlatılan lösemik hücrelerin farklılaşmasında düzenleyici etkileri olduğunu bulgulanmıştır (Pendino vd., 2009; Treppendahl vd., 2013).

Bu bulgulara koşut olarak, meme adenokarsinomasından türemiş MCF7 hücre modelinde yaptığımız çalışmalarda da, CXXC5'in E2-tarafından düzenlenen kimi gen ekspresyonlarına katılarak yalnızca E2 tarafından tetiklenen hücre çoğalmasında önemli bir rol oynadığını bulguladık. E2-ER α sinyali, E2 hedef gen ekspresyonları ve bu gen proteinlerinin sentezleri sonucu hücrelerde kalıcı fenotipik değişikliklere yol açan olaylarının temeldir. E2-ER α 'nin direkt ya da dolaylı olarak DNA'yla ilişkilmesi birincil E2 yanıt genleri denilen ve çoğunlukla nükleik asit/protein metabolizmasında rol oynayan proteinleri, transkripsiyon faktörlerini, membran sinyal proteinleri/reseptörlerini kodlayan genleri içerir. Birincil yanıt genlerinin yeni sentezlenen protein ürünleri de DNA tamiri, hücre döngüsü ve bölünmesinde rol oynayan ikincil gen ifadelerini regüle ederek E2 sinyalinin hücre çoğalmasını düzenleyen süreçlerini tetikler

(Bourdeau vd., 2008; Hah ve Kraus, 2014; Hah vd., 2011; Jagannathan ve Robinson-Rechavi, 2011; Li vd., 2008; Lin vd., 2004; Nott vd., 2009). Projemizde temel amacımız, E2-ERα tarafından ERE-bağımlı sinyal yolağıyla birincil gen ürünü olarak sentezlenen CXXC5'in E2 yanıtı gen ifadelerinin düzenlenmesine katılarak E2'nin regüle ettiği hücre çoğalması ve ölümü gibi işlevlerde önemli bir rol oynadığı öngörüsünü test etmektir. Çalışmalarımızda, CXXC5'in birincil E2 yanıtı gen ürünü olarak E2-tarafından tetiklenen hücre çoğalmasına, hücre çoğalmasında rol oynayan TPD52L1 (Tumor Protein D52 Like 1), CCNG2 (Cyclin G2) ve RPRM (P53 Dependent G2 Arrest Mediator Homolog) gibi kimi genlerin ekspresyonun düzenlenmesinde katıldığını bulguladık. Ancak, gerek bizim çalışmalarımızda ve gerekse diğer çalışmalarında, CXXC5'in gen ekspresyonlarını nasıl düzenlediğinin mekanizmasına yönelik bilgi, bulunduğumuz aşamada spekülasyon kalmaktadır. CXXC5, sinyal yollarına özel gen ekspresyonlarını gen lokusunda bulunan metile-olmamış CpG dinükleotidlerine bağlanarak direkt/dolaylı olarak transkripsiyon faktörleriyle ilişkiyi sağlayarak düzenleyebildiğini düşünmekteyiz. Bu amaçla, CXXC5'in hem DNA ile ilişkilenebildiği bulgusunun endojen bir ortamda da geçerli olduğu ve hem de partner transkripsiyon üyesi olarak gen ekspresyonlarında rol oynadığı olasılığının testi için kromatin immünçökeltme-sekans (Chromatin Immunoprecipitation-Sequence, ChIP-Seq) analizleri gerçekleştirdik. ChIP-seq dizilerinden elde edilen sonuçlarla *de novo* CXXC5 motifleri tanımlamada kullandık. Çabalarımıza rağmen, belirgin bir motif içeren gen lokus bulgusuna ulaşamadık. Nedeni açık olmamakla birlikte, CpG dinükleotid içeren çeşitli DNA dizilerinin ve CpG adalarının genomda yüksek düzeyde oluşu; CpG dinükleotidlerin bağlanan bir çok faktöründe varlığı; ve, DNA metilasyon olayların dinamik olarak düzenlenmesi, motif analizleri gerçekleştirmemizi mümkün kılmamış olabilir. Yine de, CXXC5'in siRNA yaklaşımıyla hücredeki seviyesinin azaltılmasına yanıtta E2-tarafından tetiklenen gen ekspresyon profillemelerini ChIP-Seq sonuçlarıyla birlikte incelenmek, motif analizleriyle elde ettiğimiz sonuçların yorumlanmasında önemli olabilecektir; buna yönelik çalışmalarımızı sürdürmekteyiz.

Proteinler işlevlerini dinamik protein etkileşim ağları içinde yerine getirdikleri için, protein partnerlerinin belirlenmesi CXXC5 proteininin işlev mekanizmasına yönelik önemli ek bilgiler sağlayabilir. Bu düşünceden yola çıkarak, projemizde daha önce önermediğimiz; ancak, bulgularımız ışığında proteinler arasında mekansal ve zamansal ilişkileri tanımlamak için kullanılmakta olan BioID (Roux et al., 2012) yaklaşımından yararlanmaya karar verdik. BioID bulgularımız, CXXC5 proteininin MAZ (MYC Associated Zinc Finger Protein) ve ADNP (Activity Dependent Neuroprotector Homeobox) gibi transkripsiyon faktörleriyle ilişkiye girebileceğini önermektedir. Bunların yanında, CXXC5'in nükleozomun yeniden şekillendirmesinde rol oynayan NuRD (the nucleosome remodeling and deacetylase) kompleksini oluşturan GATAD2A ve GATAD2B (Transcriptional repressor p66-alpha & beta); CHD4 ve CHD8



(Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 & 8) gibi proteinlerle birlikte kromatinin yeniden düzenlenmesinde (chromatin re-modeller) rol oynayan MECP2 (Methyl-CpG Binding Protein 2), RuvBL1 (RuvB Like 1) ve SUV39H1 (Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1) gibi proteinleri protein partneri olarak ilişkilenebileceğini bulguladık. Bu sonuçlar, CXXC5'in metile-olmamış CpG dinükelotid DNA dizilerine bağlanarak bölgesel nükleozom ve/veya kromatin modifikasyonuna neden olacak proteinlerin öbeklendiği bir merkez görevi görebileceğini; ve böylece de bir sinyal yolağına özgü transkripsiyon faktörünün DNA yanıt elemanlarına bağlanmasını artırarak/azaltarak gen ekspresyonlarını etkileyebileceğini önermektedir. CXXC5'in olası protein partnerleriyle ilişkilenesinin çeşitli *in vitro* ve *in cellula* yaklaşımlarla teyidi, bu öngörüğü test etmek için bir kaynak oluşturacaktır.

CXXC5'in etki mekanizmalarının ortaya çıkarılarak işlevlerinin E2 sinyali özelinde, ve çeşitli sinyal yolları genelinde, aydınlatılmasına özgün katkılarda bulunabilir. Bu katkılar, CXXC5 gen ekspresyonunun düzensizliklerin neden olduğu meme kanseri dahil çeşitli doku hastalıklarının yeni tanı ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine de öncülük edebilir.

Proje kapsamında elde ettiğimiz bulguların, literatüre direkt katkıda bulunmalarının yanısıra yeni işbirliklerin oluşturulmasına ve yeni projelerin geliştirilmesine bir kaynak olabildiğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR.

- Allen, M. D., Grummitt, C. G., Hilcenko, C., Min, S. Y., Tonkin, L. M., Johnson, C. M., ... Warren, A. J. 2006. "Solution structure of the nonmethyl-CpG-binding CXXC domain of the leukaemia-associated MLL histone methyltransferase" *The EMBO journal*, 25(19), 4503–12.
- Aras, S., Pak, O., Sommer, N., Finley, R., Hüttemann, M., Weissmann, N., & Grossman, L. I. 2013. "Oxygen-dependent expression of cytochrome c oxidase subunit 4-2 gene expression is mediated by transcription factors RBPJ, CXXC5 and CHCHD2" *Nucleic acids research*, 41(4), 2255–66.
- Astori, A., Fredly, H., Aloysius TA, Bullinger L, Mansat-De Mas V, de la Grange P, Bruserud Ø. 2013. "CXXC5 (retinoid-inducible nuclear factor, RINF) is a potential therapeutic target in high-risk human acute myeloid leukemia" *Oncotarget*. 2013 4(9):1438-48
- Bernatik, O., Ganji, R. S., Dijksterhuis, J. P., Konik, P., Cervenka, I., Polonio, T., ... Bryja, V. 2011. "Sequential activation and inactivation of Dishevelled in the Wnt/beta-catenin pathway by casein kinases" *The Journal of biological chemistry*, 286(12), 10396–410.
- Bourdeau, V., Deschênes, J., Laperrière, D., Aid, M., White, J. H., & Mader, S. 2008. "Mechanisms of primary and secondary estrogen target gene regulation in breast cancer cells" *Nucleic acids research*, 36(1), 76–93.
- Cabantous, S., J.D. Pedelacq, B.L. Mark, C. Naranjo, T.C. Terwilliger, and G.S. Waldo. 2005. "Recent advances in GFP folding reporter and split-GFP solubility reporter technologies. Application to improving the folding and solubility of recalcitrant proteins from *Mycobacterium tuberculosis*". *J. Struct. Funct. Genomics* 6:113-119.
- Core, L., Waterfall, J., & Lis, J. 2008. "Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters" *Science*, 322, 1845–1848.
- Duff, M. R. Jr., Grubbs, J., Howell, E. E. 2011. "Isothermal titration calorimetry for measuring macromolecule-ligand affinity" *Journal of Visual Experiment*. 2011 Sep 7;(55). pii: 2796. doi: 10.3791/2796
- Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gústafsdóttir, S. M., ... Landegren, U. 2002. "Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays" *Nature Biotechnology*, 20(5), 473–7.
- Hah, N., Danko, C. G., Core, L., Waterfall, J. J., Siepel, A., Lis, J. T., & Kraus, W. L. 2011. "A rapid, extensive, and transient transcriptional response to estrogen signaling in breast cancer cells" *Cell*, 145(4), 622–34.

- Hah, N., & Kraus, W. L. 2014. "Hormone-regulated transcriptomes: lessons learned from estrogen signaling pathways in breast cancer cells" *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 652–64.
- Hah, N., Murakami, S., Nagari, A., Danko, C. G., & Kraus, W. L. 2013. "Enhancer transcripts mark active estrogen receptor binding sites" *Genome research*, 23(8), 1210–23.
- Huang, J., Li, X., Maguire, C. a, Hilf, R., Bambara, R. a, & Muyan, M. 2005. "Binding of estrogen receptor beta to estrogen response element in situ is independent of estradiol and impaired by its amino terminus" *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19(11), 2696–712.
- Huang, J., Li, X., Yi, P., Hilf, R., Bambara, R. a, & Muyan, M. 2004. "Targeting estrogen responsive elements (EREs): design of potent transactivators for ERE-containing genes" *Molecular and cellular endocrinology*, 218(1-2), 65–78.
- Jagannathan, V., & Robinson-Rechavi, M. 2011. "Meta-analysis of estrogen response in MCF-7 distinguishes early target genes involved in signaling and cell proliferation from later target genes involved in cell cycle and DNA repair" *BMC systems biology*, 5(1), 138.
- Kang, L., Wang, L., Wang, Z. Y. 2011. "Opposite regulation of estrogen receptor- α and its variant ER- α 36 by the Wilms' tumor suppressor WT1" *Oncology letters*. 2(2):337-341
- Kim, H.-Y., Yang, D.-H., Shin, S.-W., Kim, M.-Y., Yoon, J.-H., Kim, S., ... Choi, K.-Y. 2013. "CXXC5 is a transcriptional activator of Flk-1 and mediates bone morphogenic protein-induced endothelial cell differentiation and vessel formation" *FASEB Journal*. 28(2):615-26. doi: 10.1096/fj.13-236216
- Kim, M. S., Yoon, S. K., Bollig, F., Kitagaki, J., Hur, W., Whye, N. J., ... Lee, S. B. 2010. "A novel Wilms tumor 1 (WT1) target gene negatively regulates the WNT signaling pathway" *The Journal of biological chemistry*, 285(19), 14585–93.
- Knappskog, S., Myklebust, L. M., Busch, C., Aloysius, T., Varhaug, J. E., Lønning, P. E., ... Pendino, F. 2011. "RINF (CXXC5) is overexpressed in solid tumors and is an unfavorable prognostic factor in breast cancer" *Annals of oncology*: 22(10), 2208–15.
- Kühnl, A., Valk, P.J. M., Sanders, M. A., Hills, R. K., Mills, K. I., Gale, R. E., Kaiser, M., Dillon, R., ... David Grimwade 2013. "Downregulation of the Wnt inhibitor CXXC5 predict a better prognosis in acute myeloid leukemia" 55th ASH Annual Meeting and Exposition.
- Li, X., Nott, S. L., Huang, Y., Hilf, R., Bambara, R. a, Qiu, X., ... Muyan, M. 2008. "Gene expression profiling reveals that the regulation of estrogen-responsive element-independent



genes by 17 beta-estradiol-estrogen receptor beta is uncoupled from the induction of phenotypic changes in cell models" *Journal of molecular endocrinology*, 40(5), 211–29.

Lin, C.-Y., Ström, A., Vega, V. B., Kong, S. L., Yeo, A. L., Thomsen, J. S., ... Liu, E. T. 2004. "Discovery of estrogen receptor alpha target genes and response elements in breast tumor cells" *Genome biology*, 5(9), R66.

Long, H. K., Blackledge, N. P., & Klose, R. J. 2013. "ZF-CxxC domain-containing proteins, CpG islands and the chromatin connection" *Biochemical Society transactions*, 41(3), 727–40.

Meerbrey, K. L., Hu, G., Kessler, J. D., Roarty, K., Li, M. Z., Fang, J. E... Elledge S. J. 2011. "The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo" *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108(9):3665-70. doi: 10.1073/pnas.1019736108.

Métivier, R., Penot, G., Hübner, M. R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., Gannon, F. 2003. "Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter" *Cell*. 115(6):751-63

Min, Z., Ruipeng, W., Yanyi, W., Feici, D., Fei, L. U., Dong, G. A. O., ... Hongbing, S. H. U. 2009. "The CXXC finger 5 protein is required for DNA damage-induced p53 activation" *52(2006)*, 528–538.

Muyan, M, Callahan, L. M., Huang, Y., & Lee, A. J. 2012. "The ligand-mediated nuclear mobility and interaction with estrogen-responsive elements of estrogen receptors are subtype specific" *Journal of molecular endocrinology*, 49(3), 249–66.

Nott, S. L., Huang, Y., Li, X., Fluharty, B. R., Qiu, X., Welshons, W. V, ... Muyan, M. 2009. "Genomic responses from the estrogen-responsive element-dependent signaling pathway mediated by estrogen receptor alpha are required to elicit cellular alterations" *The Journal of biological chemistry*, 284(22), 15277–88.

Pendino, F., Nguyen, E., Jonassen, I., Dysvik, B., Azouz, A., Lanotte, M., ... Lillehaug, J. R. 2009. "Functional involvement of RINF, retinoid-inducible nuclear factor (CXXC5), in normal and tumoral human myelopoiesis" *Blood*, 113(14), 3172–81.

Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., Burke B. 2012. "A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells" *Journal of Cell Biology*. 196(6):801-10. doi: 10.1083/jcb.201112098

Treppendahl, M. B., Möllgård, L., Hellström-Lindberg, E., Cloos, P., & Grønbaek, K. 2013. "Downregulation but lack of promoter hypermethylation or somatic mutations of the potential

tumor suppressor CXXC5 in MDS and AML with deletion 5q" *European journal of haematology*, 90(3), 259–60.

Tsuchiya, Y., Naito, T., Tenno, M., Maruyama M., Koseki H., Taniuchi, I., Naoe, Y. 2016. "ThPOK represses CXXC5, which induces methylation of histone H3 lysine 9 in Cd40lg promoter by association with SUV39H1: implications in repression of CD40L expression in CD8+ cytotoxic T cells". *J. Leukoc. Biol.* 100, 1–12

Wang, X., Liao, P., Fan, X., Wan, Y., Wang, Y., Li, Y., ... Mo, X. 2013. "CXXC5 Associates with Smads to Mediate TNF- Induced Apoptosis" *Current Molecular Medicine*, 13, 1–12.

Xu, C., Bian, C., Lam, R., Dong, A., & Min, J. 2011. "The structural basis for selective binding of non-methylated CpG islands by the CFP1 CXXC domain" *Nature communications*, 2, 227.

Xu, Y., Xu, C., Kato, A., Tempel, W., Abreu, J. G., Bian, C., ... Shi, Y. G. 2012. "Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development" *Cell*, 151(6), 1200–13.

Yaşar, P., Ayaz, G., & Muyan, M. 2016. "Estradiol-Estrogen Receptor α Mediates the Expression of the CXXC5 Gene through the Estrogen Response Element-Dependent Signaling Pathway". *Sci. Rep.* 6, 37808; doi: 10.1038/srep37808.

Yaşar, P., Ayaz, G., User, S.D., Güpür, G., & Muyan, M. 2017, Molecular Mechanism of Estrogen-Estrogen Receptor Signaling. *Reproductive Medicine & Biology*, 16: 4–20, doi: 10.1002/rmb2.12006

Yi, P., Driscoll, M. D., Huang, J., Bhagat, S., Hilf, R., Bambara, R. A., & Muyan, M. 2002. "The effects of estrogen-responsive element- and ligand-induced structural changes on the recruitment of cofactors and transcriptional responses by ER alpha and ER beta" *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 16(4), 674–93.

Zhang, Q., Ye, M., Wu, X., Ren, S., Zhao, M., Zhao, C., ... Huang, Q. 2000. "Cloning and Functional Analysis of cDNAs with Open Reading Frames for 300 Previously Undefined Genes Expressed in CD34 + Cloning and Functional Analysis of cDNAs with Open Reading Frames for 300 Previously Undefined Genes Expressed in CD34 + Hematopoietic Genome Research, 10, 1546–1560.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. MESUT MUYAN
Proje No:	114Z243
Proje Başlığı:	Östrojen Yanıt Geni Cxyc5'in Östrojen Tarafından Düzenlenen Hücre Çoğalmasındaki Etkisi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	TOLGA CAN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BIYOLOJİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/12/2014 - 01/12/2017
Onaylanan Bütçe:	445500.0
Harcanan Bütçe:	377819.09
Öz:	<p>Dolaşımdaki en önemli östrojen hormonu 17β-östradiyol (E2) meme fizyolojisi ve patolojisinde rol oynayan başlıca faktörlerden biridir. E2'nin meme epitel hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi bir transkripsiyon faktörü olan östrojen reseptörleri (ER), özellikle ERα, tarafından östrojen yanıt elemanı (estrogen response element, ERE)-bağımlı ve ERE-bağımsız genomik sinyal yollarıyla düzenlenir. ERE-bağımlı sinyal, E2-ERα'nın ERE'lere bağlanarak gerçekleştirdiği gen ifadelerini; ERE-bağımsız sinyal yolağı da, E2-ERα'nın DNA üzerindeki kendine özgü yanıt dizisine bağlanmış transkripsiyon faktörleriyle işlevsel bir ilişkiye girerek düzenlediği transkripsiyon süreçlerini tanımlar. E2-hedef genlerinin belirlenmesi, gen ifade mekanizmalarının tanımlanması ve protein ürünlerinin işlevlerinin belirlenmesi, meme kanserinin nasıl başladığının ve ilerlediğinin anlaşılmasıyla birlikte ek veya yeni tanı/teravi yaklaşımlarının geliştirilmesine önemli katkılarda bulunabilir.</p> <p>Önceki çalışmalarımız, E2-ERα sinyalinin CXXC5 gen ifadesini düzenlediğini önermekteydi. Öngörülen yapısal özellikleri nedeniyle, CXXC5'in metile-olmamış CpG dinükleotidlerine bağlanıp çeşitli sinyal yollarına yanıtta şekillenen gen ifadelerinin düzenlenmesine katılarak hücre işlevlerinde rol oynadığı önerilmiştir. Bu projede amacımız, E2-ERα tarafından ERE-bağımlı sinyal yolağıyla sentezlenen CXXC5'in metile-olmamış CpG dinükleotid bağlanan bir protein olarak E2 tarafından tetiklenen gen ifadelerinin yol açtığı hücre çoğalmasına katıldığı öngörüsünü test etmektir. Bu amaçla gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda, E2-ERα'nın ERE-bağımlı sinyal yolağıyla CXXC5 gen ifadesini ve protein sentezini düzenlediğini gösterdik. Bunun yanında, CXXC5'in metile-olmamış CpG dinükleotidlerine bağlanan bir protein olduğunu ve E2-ERα ile düzenlenen gen ekspresyonlarının düzenlenmesine katılarak E2 sinyaliyle tetiklenen hücre çoğalmasında önemli bir rol oynadığını bulguladık.</p> <p>Sonuçlarımızın, E2 yanıt gen ürünü olarak senteze edilen proteinlerin E2 tarafından tetiklenen hücre çoğalmasındaki rolleri ve etki mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağladığını düşünmekteyiz. Bulgularımız, meme kanserine karşı ek veya yeni tanı/teravi yöntemlerinin geliştirilmesine de yol açabilir.</p>
Anahtar Kelimeler:	meme kanseri, östrojen, östrojen reseptör, gen ekspresyonu, CXXC5, hücre çoğalması
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	<ol style="list-style-type: none">1- Molecular mechanism of estrogenαestrogen receptor signaling (Makale - Diğer Hakemli Makale),2- CXXC5 is an estrogen responsive gene (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),3- Assessing putative protein partners of selected estrogen responsive gene products by a yeast-two-hybrid approach (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),4- Protein interaction approaches to assign a function for an estrogen responsive gene protein: CXXC5 (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),5- Estradiol-Estrogen Receptor α Mediates the Expression of the CXXC5 Gene through the Estrogen Response Element-Dependent Signaling Pathway (Makale - İndeksli Makale),