

**Kolon Kanserinde 15-Lipoksijenaz-1 ve Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB)`nin MTA1 İfadesini Değiştiren Karşılıklı Etkileşimi**

**Proje No: 113S063**

**Program Kodu: 1002**

**Proje Yürütücüsü:  
Doç.Dr. Sreeparna BANERJEE**

HAZİRAN 2014  
ANKARA

## Önsöz

Kolon kanseri tüm dünyada en çok ölüme sebebiyet veren kanser türlerinden bir tanesidir. Araşidonik asit iki yolla metabolize edilir: COX (Siklooksijenaz) ve LOX (Lipoksijenaz) yolları. 15-LOX-1, lipoksijenazın bir izoformudur, ve bu enzimin ifadesi, kolon kanserinde kaybedilir ve bu kayıp hücrelerin apoptozdan kaçma yeteneği ile ilişkilendirilmektedir. Metastas ile ilişkili protein-1 (MTA-1) birçok farklı tümör tiplerinde fazlaca bulunan metastatik fenotiple alakalı bir proteindir. Biz daha önceki çalışmalarımızda kolon kanser hücrelerinde yeniden ifade edilen 15-LOX-1 geninin metastatik potensiyellerini azalttığını göstermiştik. Şimdi, 15-LOX-1 ifade eden kanser hücrelerinin hücresel hareketinin engellenmesinin nedeni NF-kappaB'nin transkripsiyonel aktivitesindeki azalma yoluyla MTA-1 geninin ekspresyonunun azalması olduğu hipotezimizi gözlemledik.

113S063 nolu bu proje TÜBİTAK SBAG tarafından desteklenmiş ve Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde yürütülmüştür.

## İçindekiler

Özet .....	1
Abstract.....	2
1. Giriş.....	3
2. Genel Bilgiler.....	3
3. Gereç ve Yöntem.....	5
4. Bulgular ve Tartışma.....	5
4.1 Özgün hedef I: MTA1 ifadesinin baskılanmasının 15-LOX-1 ile transfekte edilmiş LoVo, Caco-2 ve SW620 hücre hatlarında doğrulanması.....	5
4.2 Özgün Hedef II 15-LOX-1 genini ifade eden hücrelerde MTA1 geni ifadesinin transkripsiyonel olarak nasıl düzenlendiğini araştırılması.....	7
4.2a Özgün Hedef II a Kromatin immunopresipitasyon (Chromatin Immunoprecipitation- ChIP) yöntemi ile MTA1 promotor bölgesinin incelenmesi.....	9
4.2b Özgün Hedef II b Elektroforetik Hareketlilik Kayma Analizi (EMSA) ile MTA1 promotoru NF- $\kappa$ B konsensüs sekanslarına NF- $\kappa$ B bağlanmasının incelenmesi.....	11
4.2c Özgün Hedef II c Lusiferaz tahlili yöntemi ile 15-LOX-1 ifadesi varlığında MTA1 promotor aktivitesinin incelenmesi.....	16
4.3 Özgün hedef III 15-LOX-1 ve MTA1 genlerinin ifadelerinin insan sağlıklı ve kolon kanseri dokularından oluşan cDNA panellerinde analiz edilmesi.....	19
5. Sonuç.....	22
6. Kaynaklar.....	22
TÜBİTAK Proje Özet Bilgi Formu.....	24

## Şekil Listesi

Şekil 1: 15-LOX-1 transfekte edilmiş kolon kanser hücrelerinde MTA1'in ifadesi.....	6
Şekil 2: 15-LOX-1 ifade eden HT-29 ve LoVo hücrelerinden elde edilen nükleer ve sitoplazmik fraksiyonların p65 seviyeleri.....	7
Şekil 3: İnsan MTA1 geninin promotor bölgesinde NF-κB bağlama sekansları.....	9
Şekil 4: 15-LOX-1 transfekte edilmiş HT-29 hücrelerde MTA1 promotorunda NF-κB'nin bağlanması.....	9
Şekil 5: 15-LOX-1 transfekte edilmiş LoVo hücrelerde MTA1 promotorunda NF-κB'nin bağlanması .....	10
Şekil 6: 15-LOX-1 transfekte edilmiş SW620 hücrelerde MTA1 promotorunda NF-κB'nin bağlanması.....	11
Şekil 7 Oligo 1, 2 ve 3 kullanılarak HT-29 hücrelerinde yapılan EMSA analizi.....	13
Şekil 8: Oligo 4, 5 ve 6 kullanılarak HT-29 hücrelerinde yapılan EMSA analizi.....	14
Şekil 9: HT-29 hücrelerinde Oligo 1 ve 6 kullanılarak yapılan EMSA analizi.....	15
Şekil 10: LoVo hücrelerinde Oligo 1 ve 6 kullanılarak yapılan EMSA analizi.....	16
Şekil 11: HT-29 hücrelerinde promotor RI ve RII'de NF-κB (p65) bağlama bölgelerindeki promotor aktivitesi.....	18
Şekil 12: LoVo hücrelerinde promotor RI ve RII'de NF-κB (p65) bağlama bölgelerindeki promotor aktivitesi.....	18
Şekil 13: Normal kolon dokularından ifade eden 15-LOX-1 ve MTA1 genleri için korelasyon analizi.....	20
Şekil 14: 1. derece 1 ve 2. derece kolorektal kanser dokularından ifade eden 15-LOX-1 ve MTA1 genleri için korelasyon analizi.....	20
Şekil 15: 3. derece kolorektal kanser dokularından ifade eden 15-LOX-1 ve MTA1 genleri için korelasyon analizi.....	21
Şekil 16: 3. derece (IIIA-IIIB-IIIC)1 ve 4. derece kolorektal kanser dokularından ifade eden 15-LOX-1 ve MTA1 genleri için korelasyon analizi.....	21

## Tablo Listesi

Tablo 1: ChIP tahlilinde kullanılan primer sekansları .....	9
Tablo 2: EMSA analizinde kullanılan oligo dizinleri.....	12
Tablo 3: R1 Oligo sekansı ve R2 klonlama primerleri.....	14

## Özet

Metastaz ile ilişkili protein (MTA1), nükleozom tekrar modelleme ve histon deasetilasyon (NuRD) protein kompleksinin bir üyesidir ve birçok farklı tümör tipinin metastazı için önemli olan bir proteindir. İnflamatuar eikosoit yolağının bir üyesi olan 15-lipoksijenaz-1 (15-LOX-1) kolorektal kanserinde (CRC) tümör karşıtı bir role sahiptir. Son dönemlerde ALOX15'in NuRD kompleksi tarafından baskılandığı gösterilmiştir. Daha önce 15-LOX-1'in kolon kanser hücrelerindeki ektopik ifadesinin metastazik potansiyelinin azalmasına yol açtığını bildirmiştik. Bu çalışmada hipotezimiz MTA1'in bu olayla ilişkisinin nükleer faktör kappa B (NF-κB)'nin transkripsiyonel aktivitesi yoluyla olduğudur ki bizim ve diğer grupların bulgularına göre 15-LOX-1 NF-κB'yi baskılayabilirken göstermemize rağmen MTA1 ise NF-κB tarafından transkripsiyonel olarak arttırılabilmektedir. HT 29 ve LoVo kolon kanser hücre hatlarına 15-LOX-1 vektörüyle transfeksiyon yaptık ve MTA1 proteinin ifadesinde ve NF-κB'nin nükleer translokasyonunda bir azalma gözlemledik. Kromatin immünopresipitasyon (ChIP), lusiferaz tahlilleri ve elektroforetik hareketlilik kayma analizi (EMSA) 15-LOX-1 ifadeli hücrelerde MTA1 geninin promotor bölgesine NF-κB bağlanmasının azaldığını göstermiştir. Ayrıca, insan kolon kanser gen ifade datasetlerinin analizi ve insan kolon tümörü örneklerinden oluşturulan cDNA panellerini kullanarak 15-LOX-1 ve MTA1'in RT-qPCR yöntemi ile amplifikasyonları 15-LOX-1 ve MTA1 ifadeleri arasında negatif bir korelasyon olduğunu göstermiştir. 15-LOX-1 ifadesi bir noktaya kadar NF-κB'nin MTA1 gen promotor bölgesine bağlanmasını azaltarak ve böylece kolon kanser hücrelerinin hareketliliğini ve metastaz potansiyelini düşürerek MTA1 ifadesini baskılayabilir.

Anahtar kelimeler: kolon kanseri, MTA1, 15-lipoksijenaz-1, NF-kappaB

## **Abstract**

Metastasis Associated Protein 1 (MTA1) is a member of the nuclear remodeling and histone deacetylase (NuRD) complex and is important for the metastasis of many different tumor types. 15-lipoxygenase-1 (15-LOX-1), a member of the inflammatory eicosanoid pathway, has an anti-tumorigenic role in colorectal cancer (CRC). ALOX15 was recently shown to be repressed by the NuRD complex. Previously we have reported that ectopic expression of 15-LOX-1 in CRC cells resulted in inhibition of their metastatic potential. Here, we have hypothesized the involvement of MTA1 in this phenomenon through the transcriptional activity of Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B); MTA1 can be transcriptionally upregulated by NF- $\kappa$ B, while we and others have shown that 15-LOX-1 can inhibit NF- $\kappa$ B. We transfected HT-29 and LoVo CRC cell lines with a 15-LOX-1 vector and observed a decrease in MTA1 protein expression and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. Chromatin immunoprecipitation (ChIP), luciferase assays and electrophoretic mobility shift assays (EMSA) showed reduced recruitment of NF- $\kappa$ B onto the MTA1 promoter in 15-LOX-1 expressing cells. Moreover, analyses of human CRC gene expression datasets as well as amplification of ALOX15 and MTA1 by RT-qPCR in a human CRC cDNA array indicated a negative correlation between the expressions of MTA1 and 15-LOX-1. 15-LOX-1 expression may inhibit MTA1 expression at least partly through the reduced recruitment of NF- $\kappa$ B onto the MTA1 promoter; thereby reducing the motility and metastatic potential of CRC cells.

Key words: colon cancer, MTA1, 15-lipoxygenase-1, NF-kappaB

## 1. Giriş

Karsinogenez ve kanser ilerleyişi süreçleriyle ilişkisi bulunan proteinlerin ortaya çıkarılması, sürekli gelişmekte olan bir alandır. Bir proteinin kanser ilerleyişi sürecinde bir belirteç olarak değerlendirilebilmesi için en az iki ölçütü karşılaması gerekir: ilk olarak protein, kanser hücrelerinde normal hücrelere göre anormal ölçülerde (fazla veya az ifade) ifade edilmeli ve ikinci olarak, kansinogenez veya kanser ilerleyişinde protein işlevinin altında yatan moleküler mekanizmalar belirlenmiş olmalıdır. Son yıllarda kanser biyologlarının oldukça ilgisini çeken, bu protein adaylarından biri de metastaz ile ilişkili protein (MTA1)'dir. Bu çalışmada, kolon kanseri hücre hatlarında MTA1'i regüle eden potansiyel sinyal yolları incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Genel Bilgiler

MTA1 geni diferansiyel cDNA kütüphanesi tarama metodu kullanılarak belirlenmiş ve az metastatik hücre hatlarına göre, yüksek düzeyde metastatik olan sıçan meme adenokarsinomlarında yüksek miktarda ifade edildiği gözlenmiştir (Toh vd, 1994, 1995). MTA1, NuRD (nükleozom tekrar modelleme ve histon deasetilasyon) adı verilen bir protein kompleksi ile ilişkili olan bir protein ailesine (MTA1, MTA2, ve MTA3) aittir. NuRD kompleksi, histon deasetilasyonu (transkripsiyonu baskılar) ve kromatin yeniden modellemesi aracılığı ile transkripsiyonel düzenleyici işlevi görür (Toh ve Nicolson, 2009). MTA1 ifadesinin, yakın zamanda inflamatuvar ve anti-apoptotik bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) tarafından artırıldığı gösterilmiştir (Pakala vd. 2010). İnsan küçük hücreli dışı akciğer karsinoma ve hepatoma hücrelerinde p53 proteininin, p53 ile indüklenen apoptozu engelleyen MTA1/HDAC1 kompleksi tarafından deasetile edildiği gösterilmiştir (Moon vd. 2007). MTA1'in hipoksik koşullarda ifade edildiği ve bir anjiyogenez düzenleyicisi olan hipoksi indüklü faktör alfa (HIF $\alpha$ )'yı deasetilleme yoluyla sabitleştirilmiş edebildiği gösterilmiştir (Moon vd. 2006). MTA1'in de parçası olduğu NuRD kompleksinin, östrojen reseptör alfa (ER $\alpha$ )'yı hipoasetile ederek, bu genin transkripsiyonel aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir. Bu durum, meme kanseri hücrelerini daha agresif bir fenotipe dönüştürmüştür (Mazumdar vd. 2001). Kolorektal kanserde tümör baskılayıcı özelliği bulunan 15-lipoksijenaz-1'in de NuRD kompleksi tarafından baskılandığı bilinmektedir (Zuo vd. 2009). MTA1 ifadesinin kanser metastazı ile ilişkili olduğu bir dizi hücre tabanlı ve fare-modelli çalışmada görülmüştür (Manavathi ve Kumar, 2007). Metastaz, kansere bağlı hastalık ve ölümlerin başlıca sebebidir ve neoplastik hücrelerin birincil tümörden kopması, kan ve lenf sistemine sızmaları, uzak

bölgelerde adezyonları, yeni damar oluşumunun tetiklenmesi ve metastatik bölgelerde büyüme fazlarını içeren kompleks bir süreçtir (Nicolson, 1988).

Birincil tümörlerden izole edilen mRNA'lar ile yapılan RT-PCR deneyleri, bu genin, eşlenik normal hücrelere göre tümörlerde daha fazla miktarda ifade edildiğini (Giannini ve Cavallini, 2005) ve MTA1 ifadesinin yüksek lenf düğümü metastazı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Toh vd. 1997). Bunlara ek olarak, Toh vd. tarafından, MTA1 mRNA'sındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte Duke sınıflamasına göre daha ileri kanser evreleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Toh vd. 1997).

15-lipoksijenaz-1 (15-LOX-1) araşidonik asiti pek çok biyoaktif lipide dönüştüren inflamatuvar eikosanoit yolağının bir üyesidir. 15-LOX-1 ifadesi kolorektal kanser dokularında yapılan immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre azalan ya da tamamen kaybolan, tümör baskılayıcı bir enzimdir (Shureiqi vd. 1999; Yuri vd. 2007). Laboratuvarımızda yaptığımız çalışmalar göstermiştir ki; 15-LOX-1 ifadesi kolorektal kanser hücre hatlarında (HCT-116 ve HT-29) hücre proliferasyonunu ve metastatik özellikleri azaltırken ve apoptozu artırmaktadır. 15-LOX-1 ifade eden hücrelerdeki metastaz azalışının en azından bir kısmı tümör oluşumunda büyük rol oynayan ve aynı zamanda NuRD kompleksinin bir elemanı olan MTA1'in inhibe edilmesine bağlıdır (Çimen vd. 2009).

15-LOX-1 ifadesi ise kolon kanserinde promotor hipermetilasyonu veya MTA1'in de içinde bulunduğu baskılayıcı nükleozom yeniden modelleme ve histon deasetilaz (NuRD) kompleksi tarafından baskılanmaktadır.

Diğer çalışmalar MTA1'in NF-κB tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenen inflamatuvar bir gen olduğunu ortaya koymuştur (Pakala vd. 2010). MTA1 ifadesinin ise inflamatuvar ve anti-apoptotik bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B (NF-κB, p50 ve p65) tarafından artırıldığı gösterilmiştir (Pakala vd. 2010; Zuo vd. 2009). Öte yandan, laboratuvarımızda yapılmış olan çalışmalar göstermiştir ki, 15-LOX-1 geninin HCT-116 ve HT-29 hücrelerinde aşırı ifadesi, IκBα yıkımını inhibe ederek p65 ve p50'nin nükleer translokasyonunu, DNA'ya bağlanmalarını azaltmakta, dolayısı ile de düşük transkripsiyonel NF-κB aktivitesine sebep olmaktadır (Çimen vd. 2011).

Tüm bu hususlar dikkate alındığında 15-LOX-1 ve MTA1 proteinleri arasında muhtemel bir geri-besleme mekanizması olduğunu ve NF-κB geninin de bu ilişkide önemli bir role sahip olduğunu düşünmüş ve kolon kanseri hücre hatlarını kullanarak 15-LOX-1'i ifade



eden hücrelerdeki MTA1 ifadesindeki azalışın 15-LOX-1'in NF-κB'yi inhibe etmesi sonucu gerçekleştiği hipotezini test etmeyi hedeflemiştik.

### 3. Gereç ve Yöntem

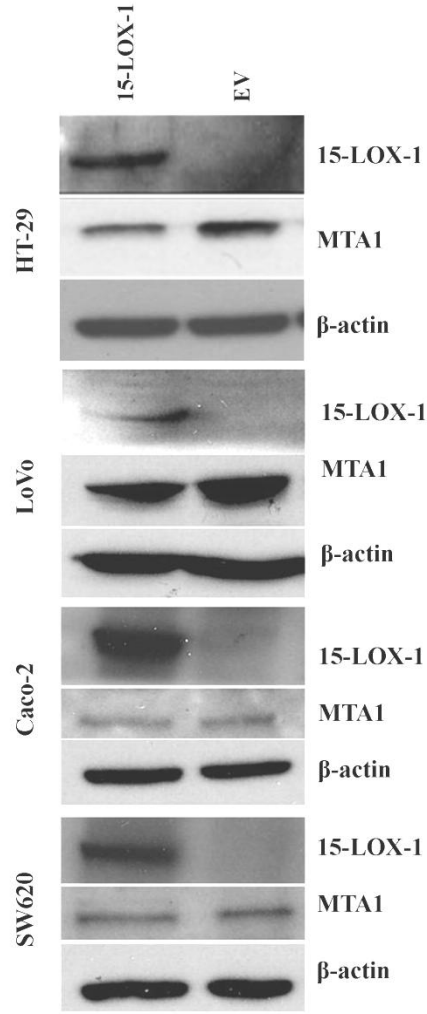
Geçtiğimiz bir yıllık dönemde çalışmalarımızı çalışma planımıza uygun olarak gerçekleştirmiş bulunmaktayız. Bu bağlamda, öncelikle farklı kolon kanseri hücre hatlarında 15-LOX-1 ifadesinin MTA1 ifadesinde farklılığa sebep olup olmadığını araştırmış (**Özgün hedef I**); bunu takiben, MTA1 promotor bölgesinde yaptığımız kromatin immünopresipitasyon (ChIP), Elektroforetik hareketlilik kayma analizi (EMSA) ve lusiferaz tahlilleri ile, 15-LOX-1 ifadesi varlığında NF-κB bağlanması ve aktivasyonunun azalıp azalmadığını araştırmış (**Özgün hedef II**); son olarak da normal kolon dokusu ve insan kolon tümörü örneklerinden oluşturulan cDNA panellerini kullanılarak 15-LOX-1 ve MTA1 ifadeleri arasında negatif bir korelasyon olup olmadığını belirlemiş (**Özgün hedef III**); bulunmaktayız. Elde ettiğimiz bulgular ise aşağıda detaylı bir biçimde açıklanmaktadır.

### 4. Bulgular ve Tartışma

#### **4.1 Özgün hedef I: MTA1 ifadesinin baskılanmasının 15-LOX-1 ile transfekte edilmiş LoVo, Caco-2 ve SW620 hücre hatlarında doğrulanması**

##### MTA1 ifadesinin değerlendirilmesi

Hücreler 15-LOX-1-pcDNA3.1 ve pcDNA3.1 boş vektörleri ile transfekte edilmiş (Çimen vd. 2011) ve bu hücrelerden elde edilen lizatlar 15-LOX-1 ve MTA1 proteinleri için western blot analizine tabi tutulmuştur. Şekil 1' de görüldüğü gibi 15-LOX-1 ifadesi HT-29 ve LoVo hücrelerinde MTA1'i baskılanırken, SW620 ve Caco-2 hücrelerinde MTA1 seviyelerinde bir değişikliğe yol açmamaktadır. İlginçtir ki MTA1 ifadesinin aşırı olduğunu tespit ettiğimiz hücre hatlarında 15-LOX-1 ifadesi MTA1 ifadesini baskılamakta ancak MTA1 ifadesi normal düzeyde olan SW620 ve Caco-2 hücrelerinde 15-LOX-1 ifadesi bir değişikliğe yol açmamaktadır.

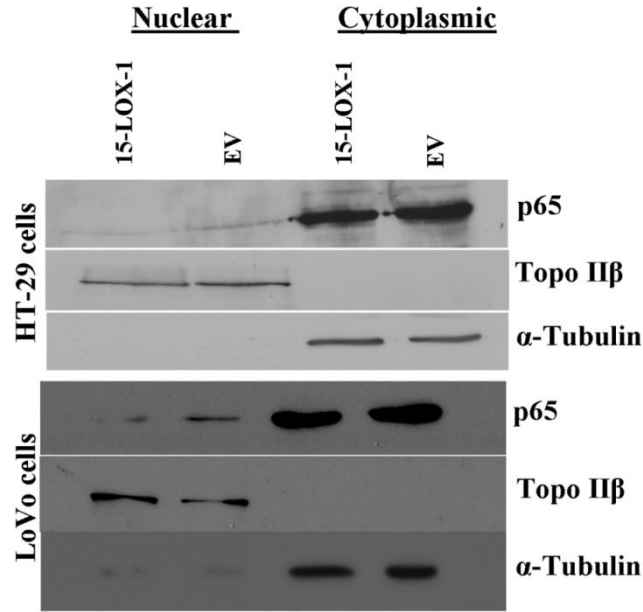


**Şekil 1: 15-LOX-1 transfekte edilmiş kolon kanser hücrelerinde MTA1'in ifadesi.**

15-LOX-1 ya da boş vektörle transfekte edilmiş HT-29, LoVo, Caco-2, SW620 hücrelerinde 15-LOX-1 (75 kDa) ve MTA-1 proteinleri (80 kDa) western blot analizi. Eşit protein yüklenmesi kalibratör β-actin (43 kDa) proteini ile doğrulanmıştır.

p65 ifadesinin değerlendirilmesi

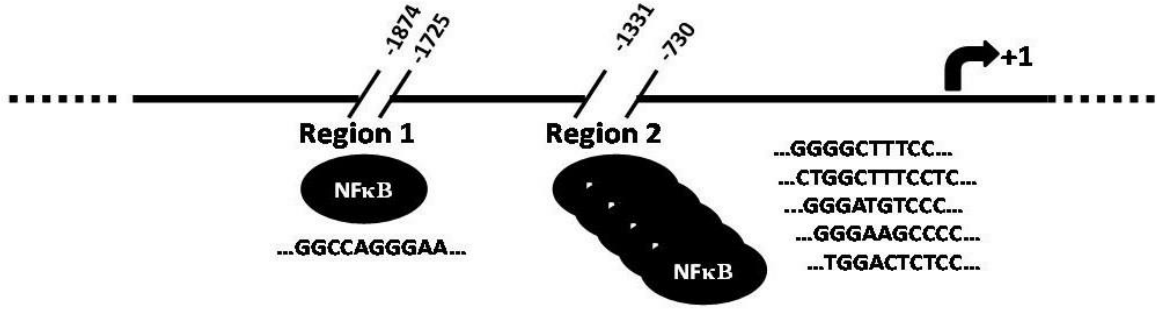
15-LOX-1 ifade eden HT-29 ve LoVo hücreleri ile boş vektörle transfekte edilmiş kontrol hücreleri p65 translokasyonunu incelemek için western blot analizine tabi tutulmuştur. Şekil 2' de görüldüğü üzere 15-LOX-1 ifadesi iki hücre hattında da p65'in nükleer translokasyonunu ve de sitoplazmik miktarlarını azaltmıştır.



**Şekil 2: 15-LOX-1 ifade eden HT-29 ve LoVo hücrelerinden elde edilen nükleer ve sitoplazmik fraksiyonların p65 seviyeleri.**  
Eşit protein yüklenmesi kalibratör Topo IIβ ve α-Tubulin proteinleri ile doğrulanmıştır.

#### **4.2 Özgün Hedef II 15-LOX-1 genini ifade eden hücrelerde MTA1 geni ifadesinin transkripsiyonel olarak nasıl düzenlendiğinin araştırılması**

Yukarıda belirtildiği üzere, NF-κB geninin transkripsiyonel aktivitesinin, 15-LOX-1 ifade eden hücrelerde azaldığını ve NF-κB geninin MTA1 geni ifadesini artırdığını göz önünde bulundurarak; MTA1 ifadesindeki azalışın, MTA1 geninin promotor bölgesine daha az NF-κB bağlanması ile ilgili olduğunu düşünmekteyiz. Literatürde insan MTA1 genin promotor bölgesindeki NF-κB bağlanma sekanslarına dair bir bilgi henüz olmadığından, olası bağlanma bölgelerini kendimiz belirlemek amacıyla MTA1 promotor sekansının yaklaşık 2000 bazlık bölgesini AliBaba 2.1 transkripsiyon faktörü bulma programı ile incelemiş bulunmaktayız. Elde edilen sonuçlar, incelediğimiz bölgede olası 6 adet ayrı NF-κB bağlanma sekansı olduğunu göstermiş. Bu sekansların biri diğer beş tanesinden yaklaşık 600 bp daha uzakta bulunmaktadır. Sekansların her biri Şekil 3'te gösterilmektedir.



**Şekil 3: İnsan MTA1 geninin promotor bölgesinde NF-κB bağlama sekansları.**

Alibaba 2.1 transkripsiyon faktörü bulma programı ile MTA1 promotor bölgesinde (chr14: 105884100-105886185) tespit edilen NF-κB (p65) bağlanma sekansları.

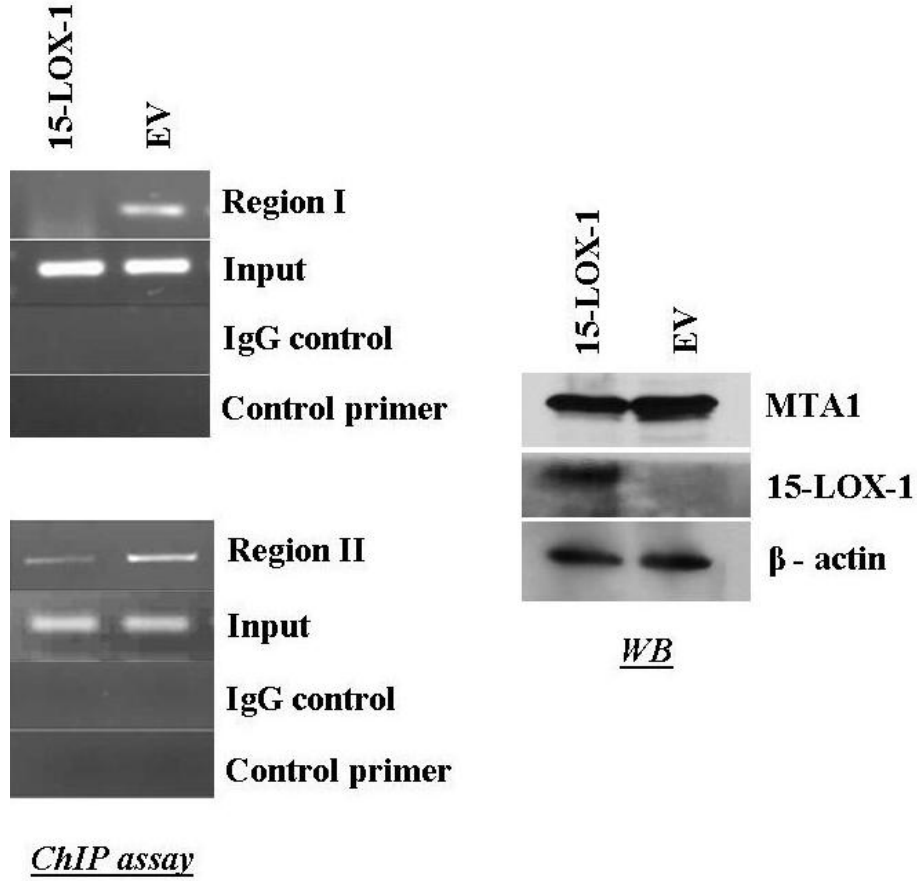
#### **4.2a Özgün Hedef II a Kromatin immunopresipitasyon (Chromatin Immunoprecipitation- ChIP) yöntemi ile MTA1 promotor bölgesinin incelenmesi:**

MTA1 geni promotor bölgesine NF-κB bağlanma miktarlarını belirlemek amacıyla ChIP deneyleri yapılmıştır. ChIP deneyleri için bu olası NF-κB bağlanma bölgelerini kapsayacak Bölge 1 ve Bölge 2 olarak çoğaltacak şekilde 2 adet primer çifti tasarlanmıştır. Bölge I (Region 1) 1 adet bağlanma sekansını, Bölge II (Region 2) ise 5 birbirine yakın olan 5 adet bağlanma sekansını çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır. Başka bir gen bölgesinden tasarlanan bir primer çifti de PCR reaksiyonlarında negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Tablo 1).

Primer	Sekans
MTA1proR1F_ChIP	5'GGACAGCCTTGACTGTCTCC 3'
MTA1proR1R_ChIP	5'ACACCACTGGGACACATCCT 3'
MTA1proR2F_ChIP	5'TCTCTCCCCAGAGACAGCAC 3'
MTA1proR2R_ChIP	5'CACCTGTCAGGATGCCTTC 3'
controlprimerF_ChIP	5'ATGGTTGCCACTGGGGATCT 3'
controlprimerR_ChIP	5'TGCCAAAGCCTAGGGGAAGA 3'

**Tablo 1: ChIP tahlilinde kullanılan primer sekansları**

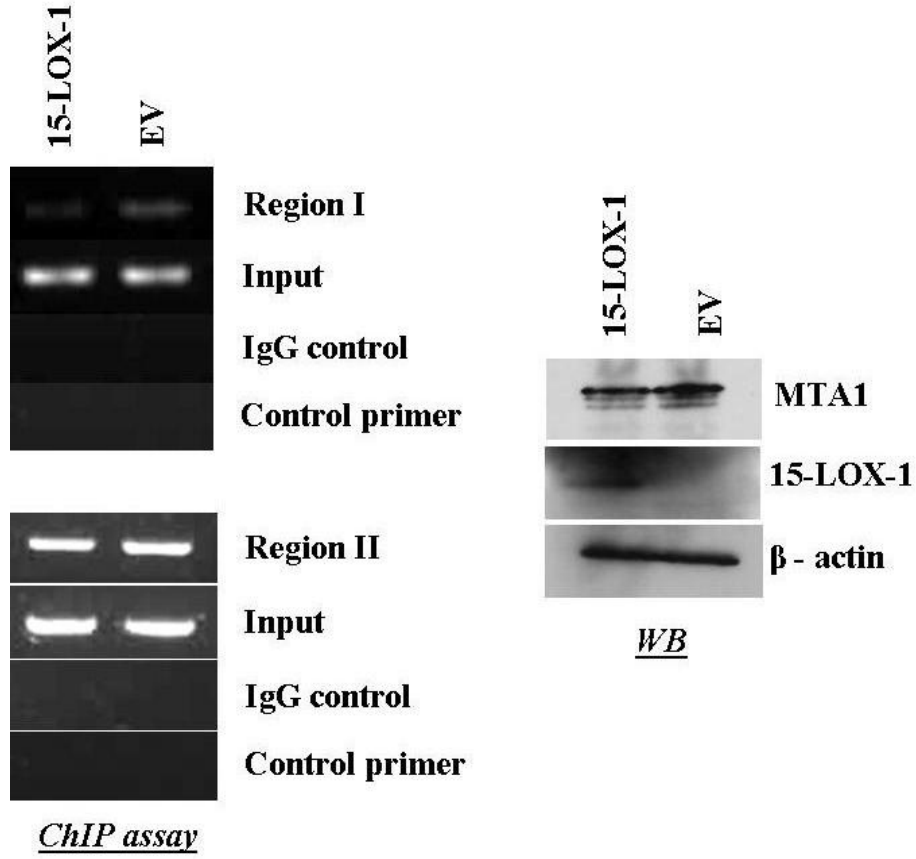
15-LOX-1 genin transfekte edilmiş HT-29 hücrelerinde yapılan ChIP deneyleri göstermiştir ki NF-κB her iki bölgeye de bağlanmaktadır ve bu bağlanma 15-LOX-1 ifadesi ile ters orantılı olarak azalmaktadır (Şekil 4).



**Şekil 4: 15-LOX-1 transfekte edilmiş HT-29 hücrelerde MTA1 promotorunda NF-κB'nin bağlanması**

15-LOX-1 ya da boş vektörü ile transfekte edilmiş HT-29 hücrelerinde MTA1 promotorunda Bölge I ve II'ye p65 bağlanması ChIP tahlili ile gösterilmektedir. 15-LOX-1 ifade edildiğinde MTA1 promotorunda hem Bölge I hem de Bölge II'ye p65'in bağlanmasında bir azalma gözlemlenmiştir. ChIP örneklerinde 15-LOX-1 ifadesi olup olmadığı Western blot yöntemi ile doğrulanmıştır.

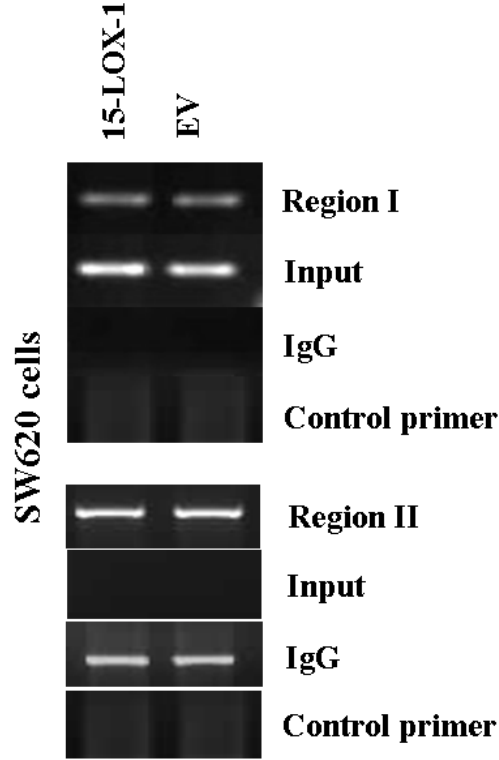
15-LOX-1 genin transfekte edilmiş LoVo hücrelerinde yapılan ChIP deneylerine (Şekil 5) göre 15-LOX-1 ifadesi, Bölgeye I'e bağlanmayı azaltırken; Bölge II' de bağlanma miktarlarını kayde değer bir biçimde etkilememektedir.



**Şekil 5: 15-LOX-1 transfekte edilmiş LoVo hücrelerde MTA1 promotorunda NF- $\kappa$ B'nin bağlanması**

15-LOX-1 ya da boş vektörü ile transfekte edilmiş LoVo hücrelerinde MTA1 promotorunda Bölge I ve II'ye p65 bağlanması ChIP tahlili ile gösterilmektedir. 15-LOX-1 ifadesi p65'in MTA1 promotorunda Bölge I'e bağlanmasında azalmaya sebep olmuştur. ChIP örneklerinde 15-LOX-1 ifadesi olup olmadığı Western blot yöntemi ile doğrulanmıştır.

Öte yandan Şekil 6'de de görüldüğü gibi, 15-LOX-1 ifadesinin MTA1 ifadesini azaltmadığı SW620 hücrelerinde 15-LOX-1 ifadesi bağlanma miktarlarını da değiştirmemektedir (Şekil 6).



**Şekil 6: 15-LOX-1 transfecte edilmiş SW620 hücrelerde MTA1 promotorunda NF-κB'nin bağlanması**

15-LOX-1 ya da boş vektörü ile transfecte edilmiş SW620 hücrelerinde MTA1 promotorunda Bölge I ve II'ye p65 bağlanması ChIP tahlili ile gösterilmektedir. 15-LOX-1 ifade edildiğinde, MTA1 promotorunda iki bölgeye de p65 bağlanmasında bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu sonuç 15-LOX-1 ifade edilen hücrelerdeki MTA1 ifadesinde bir değişiklik olmamasını desteklemektedir.

#### **4.2b Özgün Hedef II b Elektroforetik Hareketlilik Kayma Analizi (EMSA) ile MTA1 promotoru NF-κB konsensüs sekanslarına NF-κB bağlanmasının incelenmesi**

NF-κB 'nin yukarıda belirlenen MTA1 promotor bölgelerine bağlanıp bağlanmadığının bir kez daha doğrulanması için Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) tahlili uygulanmıştır. Bu amaçla, öncelikle 15-LOX-1 ve boş vektörle transfekte edilmiş hücrelerden elde edilen nükleer proteinler eşit miktarlarda alınarak daha önceden biyotin ile işaretlediğimiz oligolar ile bağlanma reaksiyonlarına sokulmuştur. Oligo sekansları Tablo 2'de verilmektedir.

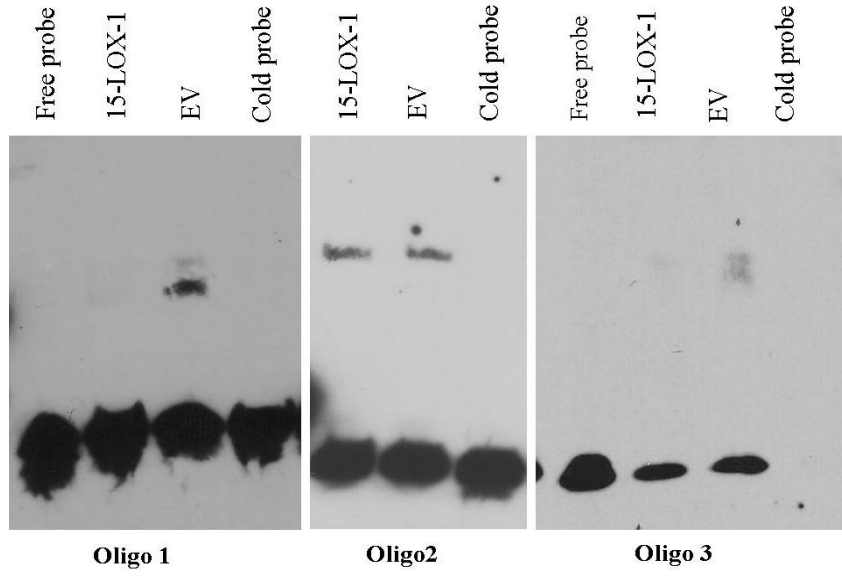
<b>Oligo</b>	<b>Sekans</b>
Oligo1F	5' GGCCAGGGAAGGCCAGGGAAGGCCAGGGAA 3'
Oligo1R	5' TTCCCTGGCCTTCCCTGGCCTTCCCTGGCC 3'
Oligo2F	5' GGGGCTTTCCGGGGCTTTCCGGGGCTTTCC 3'
Oligo2R	5' GGAAAGCCCCGGAAAGCCCCGGAAAGCCCC 3'
Oligo3F	5' CTGGCTTTCCTCCTGGCTTTCCTCCTGGCTTTCCTC 3'
Oligo3R	5' GAGGAAAGCCAGGAGGAAAGCCAGGAGGAAAGCCAG 3'
Oligo4F	5' GGGATGTCCC GGGATGTCCC GGGATGTCCC 3'
Oligo4R	5' GGGACATCCC GGGACATCCC GGGACATCCC 3'
Oligo5F	5' GGGAAGCCCC GGGAAGCCCC GGGAAGCCCC 3'
Oligo5R	5' GGGGCTTCCC GGGGCTTCCC GGGGCTTCCC 3'
Oligo6F	5' TGGACTCTCC TGGACTCTCC TGGACTCTCC 3'
Oligo6R	5' GGAGAGTCCA GGAGAGTCCA GGAGAGTCCA 3'
Mutated_Oligo1F	5' GGCCAATTCA GGCCAATTCA GGCCAATTCA 3'
Mutated_Oligo1R	5' TGAATTGGCCTGAATTGGCCTGAATTGGCC 3'
Mutated_Oligo6F	5' TAATCTCAACTAATCTCAACTAATCTCAAC 3'
Mutated_Oligo6R	5' GTTGAGATTAGTTGAGATTAGTTGAGATTA 3'

**Tablo 2: EMSA analizinde kullanılan oligo dizinleri**

Oligo 1 ChIP analizinde incelenen Bölge I'de bulunan sekans iken Oligo 2,3,4,5 ve 6 yine ChIP analizlerindeki Bölge II'de ki bağlanma sekanslarına karşılık gelmektedir.

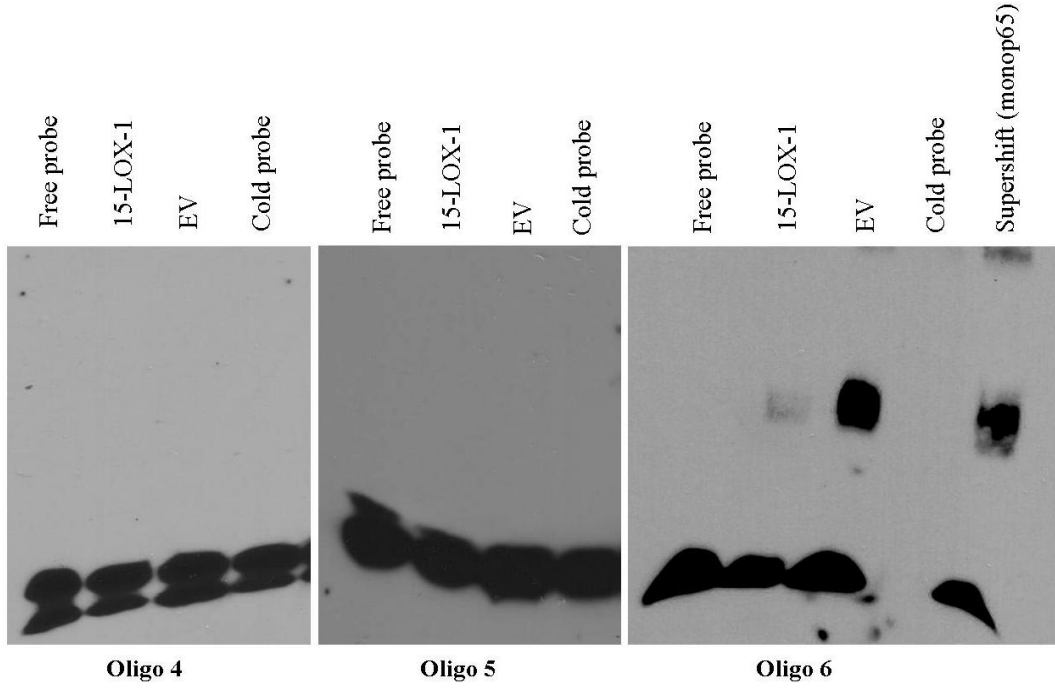


Oligo 1, 2, 3 ve 6'nın boş vektörle transfekte edilmiş hücrelerden elde edilen nükleer proteinlere bağlanarak kompleks oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 7 ve 8). En kuvvetli bağlanma oligo 1 ve 6' da görülmüştür. Öte yandan 15-LOX-1 ile transfekte edilmiş hücrelerden elde edilen nükleer proteinler oligolarla inkübe edildiğinde kompleks oluşumunun azaldığı ya da kaybolduğu görülmüştür.



**Şekil 7 Oligo 1, 2 ve 3 kullanılarak HT-29 hücrelerinde yapılan EMSA analizi.**

15-LOX-1 ifade eden hücrelerde boş vektörle transfekte edilmiş hücrelere göre, oligo 1 ve 3'e daha az NF-κB (p65) bağlanması görülürken, oligo 2'de bağlanma miktarlarının değişmediği tespit edilmiştir.



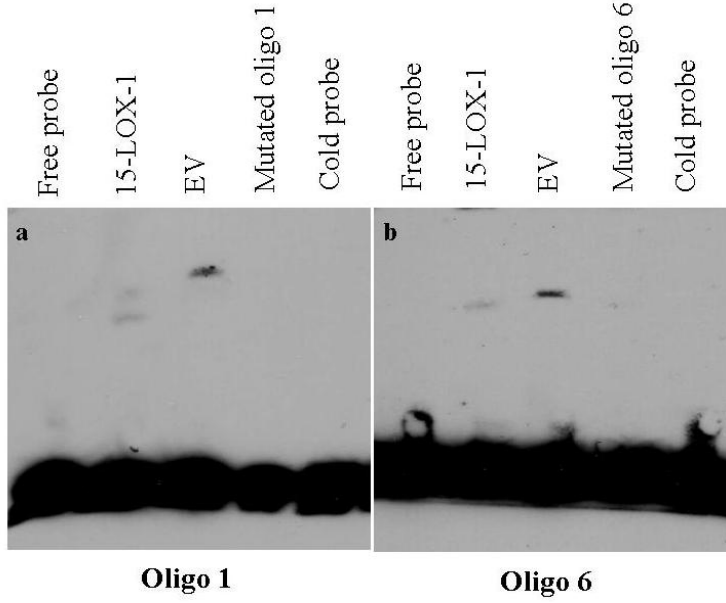
**Şekil 8: Oligo 4, 5 ve 6 kullanılarak HT-29 hücrelerinde yapılan EMSA analizi**

15-LOX-1 ifade eden hücrelerde boş vektörle transfekte edilmiş hücrelere göre, oligo 6'ya daha az NF- $\kappa$ B (p65) bağlanması görülürken, oligo 4 ve 5'de bağlanma olmadığı görülmektedir. Bağlanmaların spesifitesi 200 kat fazla konsantrasyonda ve biyotinlenmemiş oligo (cold probe) kullanılarak tespit edilmiştir. Ayrıca monoklonal p65 antikorunu kullanarak tespit edilen kompleks kaymasına (supershift) bağlı olarak gözlemlenen kompleksin p65-oligo kompleksi olduğu kesinleştirilmiştir.

Oluşan komplekslerin p65 proteinine bağlanma sonucu oluştuğunu doğrulamak için, p65 proteinine spesifik monoklonal antikorlar eşliğinde boş vektörle transfekte edilmiş hücrelerin nükleer proteinleri ile oligo sekansları bağlanma reaksiyonlarına sokulmuş ve kompleksin yukarı kayması (supershift) gözlenmiştir. Böylece deneyin spesifitesi doğrulanmıştır. Ayrıca, reaksiyonlara biyotinlenmemiş ve 200 kat fazla konsantrasyonda eklenen oligolar (cold probe) proteine bağlanmak için biyotinli oligolarla yarıştığından kompleks oluşumunun kaybına sebep olmuş ve böylece deneyin spesifitesi bir kez daha doğrulanmıştır.

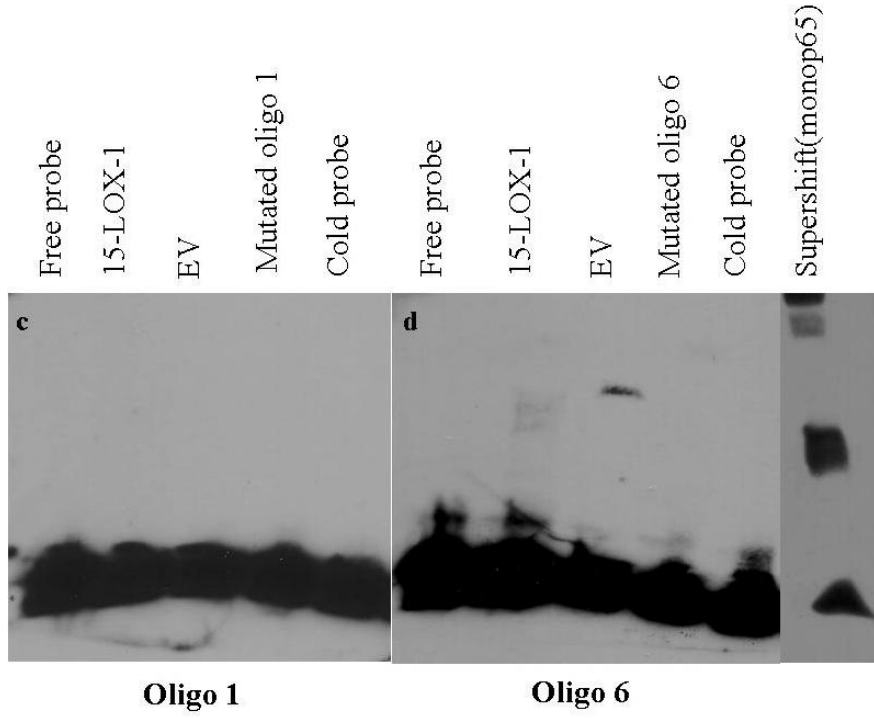
p65 proteininin Oligo 1 ve 6'ya bağlanıp kompleks oluşturması, mutasyona uğratılmış oligo 1 ve 6 bağlanma sekansları (sekanslar Şekil 8'de gösterilmektedir) da kullanılan EMSA deneyleriyle bir kez daha ve daha ileri seviyede doğrulanmıştır. Şekil 9 ve 10'de görülebildiği üzere boş vektörle transfekte edilmiş hücrelerin nükleer proteinleri ile inkübe edilen mutasyonlu oligolarda kompleks oluşumu beklendiği üzere tamamen kaybolmuştur. Öte yandan yine beklendiği üzere HT-29 hücrelerinde Oligo 1 ve 6 ile

LoVo hücrelerinde ise Oligo 6 ile yapılan EMSA deneylerinde 15-LOX-1 ifade hücrelerde p65'in bu sekanslara bağlanışının azaldığı görülmüştür. LoVo hücrelerinde CHIP deneyleri Bölge 1 için bağlanma gösterdiği halde EMSA analizlerinde oligo1 ile her hangi bir bağlanma gözlenememiştir.



**Şekil 9: HT-29 hücrelerinde Oligo 1 ve 6 kullanılarak yapılan EMSA analizi.**

15-LOX-1 ifade eden hücrelerde boş vektörle transfecte edilmiş hücelere göre, oligo 1 ve 6' ya daha az NF-κB (p65) bağlanması bir kez daha gösterilmekle beraber, deneylerde mutasyona uğratılmış oligo 1 ve 6'nın da kullanılması halinde kompleks oluşumunun ortadan kalkıyor oluşu, sekansların spesifitesinin daha ileri bir seviyede doğrulanmasını sağlamıştır.



**Şekil 10: LoVo hücrelerinde Oligo 1 ve 6 kullanılarak yapılan EMSA analizi.**

15-LOX-1 ifade eden hücrelerde boş vektörle transfecte edilmiş hücrelere göre, oligo 1 ve 6'ya daha az NF- $\kappa$ B (p65) bağlanması bir kez daha gösterilmekle beraber, deneylerde mutasyona uğratılmış oligo 1 ve 6'nın da kullanılması halinde kompleks oluşumunun ortadan kalkıyor oluşu, sekansların spesifitesinin daha ileri bir seviyede doğrulanmasını sağlamıştır.

#### **4.2c Özgün Hedef II c Lusiferaz tahlili yöntemi ile 15-LOX-1 ifadesi varlığında MTA1 promotor aktivitesinin incelenmesi**

ChIP ve EMSA deneyleri belirlediğimiz MTA1 promotor bölgelerine bağlanıp bağlanmadığı ve 15-LOX-1 ifadesi varlığında bağlanma oranlarının değişip değişmediğini kesin olarak ortaya koysa da fiziksel bağlanma, p65'in aktif olduğu anlamına gelmeyebilir. Bu yüzden incelediğimiz MTA1 promotor bölgelerinde 15-LOX-1 varlığındaki promotor aktivitesi HT-29 ve LoVo hücre hatlarında lusiferaz yöntemi ile tespit edilmiş ve bulgular aşağıda açıklanmıştır.

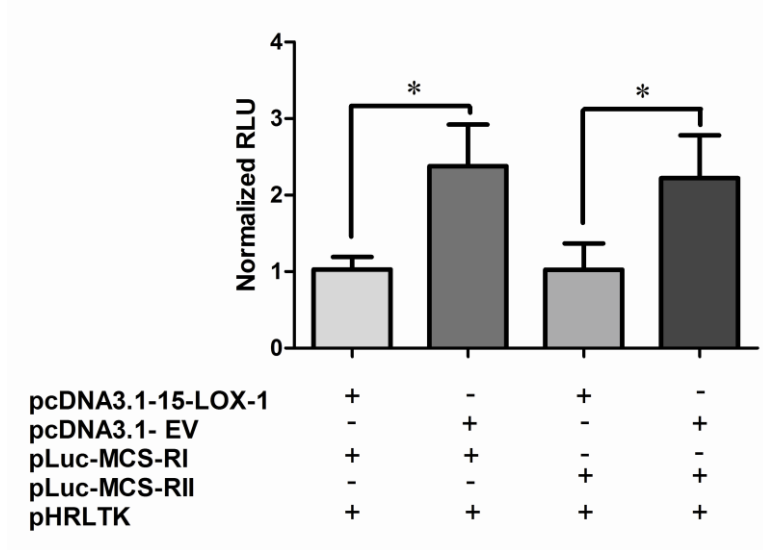
Tespit etmiş olduğumuz 6 adet NF- $\kappa$ B bağlanma sekansından bir tanesi dışında diğer beş adedi birbirine çok yakın olduğu için; diğerlerine uzak bağlanma sekansı oligo

(Region 1, R1) olarak diğer beş adedi (Region 2, R2) ise klonlama primerleri (Tablo 3) kullanılarak PCR klonlama tekniği ile pLuc-MCS lusiferaz vektörüne klonlanmıştır.

Primer	Sekans
OLigo R1F	5'CCCAAGCTTGGCCAGGGAAGGCCAGGGAAGGCCAGGGAACTC GAGCCCCC 3'
Oligo R1R	5'CCCCCCTCGAGTTCCTGGCCTTCCCTGGCCTTCCCTGGCCA AGCTTCCC 3'
Cloning primer R2F	5'CCCAAGCTTTCTCTCCCCAGAGACAGCAC 3'
Cloning primer R2R	5'CCCCCCTCGAGCACCTGTCAGGATGCCTTC 3'

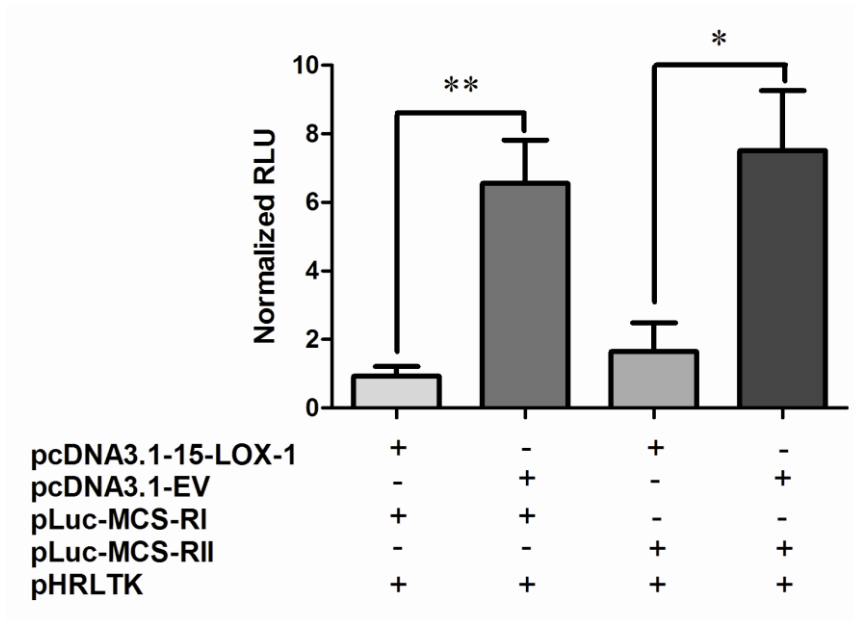
**Tablo 3: R1 Oligo sekansı ve R2 klonlama primerleri**

Hücreler öncelikle 15-LOX-1 ve boş vektörle, 24 saat sonra NF-κB bağlanma sekansı R1 ve R2 klonlanmış pLuc-MCS lusiferaz vektörleri ve kalibratör vektör olan pHRLTK renilla raportör vektörleri ile transfekte edilmiştir. Daha sonra, hücreler patlatma tamponu ile patlatılmış elde edilen ekstraler üzerine sırasıyla lusiferaz ve renilla substratları eklenerek lusiferaz ve renilla seviyerleri ölçülmüş ve aşağıdaki grafikler elde edilmiştir (Şekil 11, 12). Sonuçlar göstermektedir ki 15-LOX-1 ifade eden hücrelerde boş vektörle transfekte edilmiş hücrelere göre NF-κB (p65) bağlanmasına bağlı promotor aktivitesi her iki hücre hattında hem R1 hem de R2 promotor bölgeleri için azalmaktadır.



**Şekil 11: HT-29 hücrelerinde promotor RI ve RII'de NF-κB (p65) bağlanma bölgelerindeki promotor aktivitesi.**

15-LOX-1 ifade eden HT-29 hücrelerinde boş vektörle transfekte edilen hücelere göre belirgin derecede azalmıştır. Elde edilen data pLuc-MCS-EV (boş vektör) /pHRLTK oranlarına normalize edilmiştir. İstatistiki karşılaştırmalar paired t-test (\*p<0.05) ile yapılmıştır.



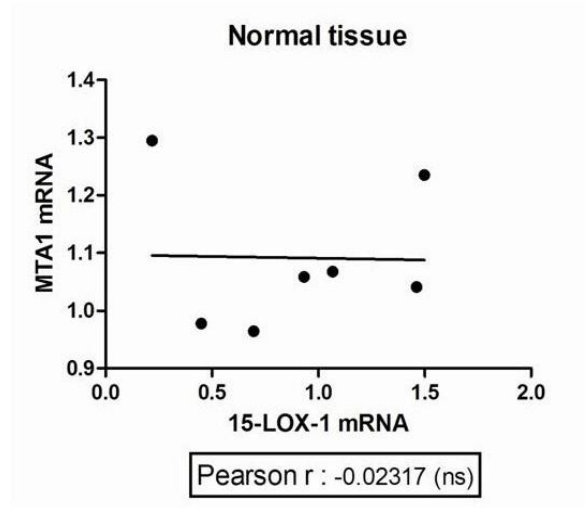
**Şekil 12: LoVo hücrelerinde promotor RI ve RII'de NF-κB (p65) bağlanma bölgelerindeki promotor aktivitesi.**

15-LOX-1 ifade eden LoVo hücrelerinde boş vektörle transfekte edilen hücelere göre belirgin derecede azalmıştır. Data pLuc-MCS-EV (boş vektör) /pHRLTK oranlarına normalize edilmiştir. İstatistiki karşılaştırmalar paired t-test (\*p<0.05 ve \*\*p<0.01) ile yapılmıştır.

### **4.3 Özgün hedef III 15-LOX-1 ve MTA1 genlerinin ifadelerinin insan sağlıklı ve kolon kanseri dokularından oluşan cDNA panellerinde analiz edilmesi**

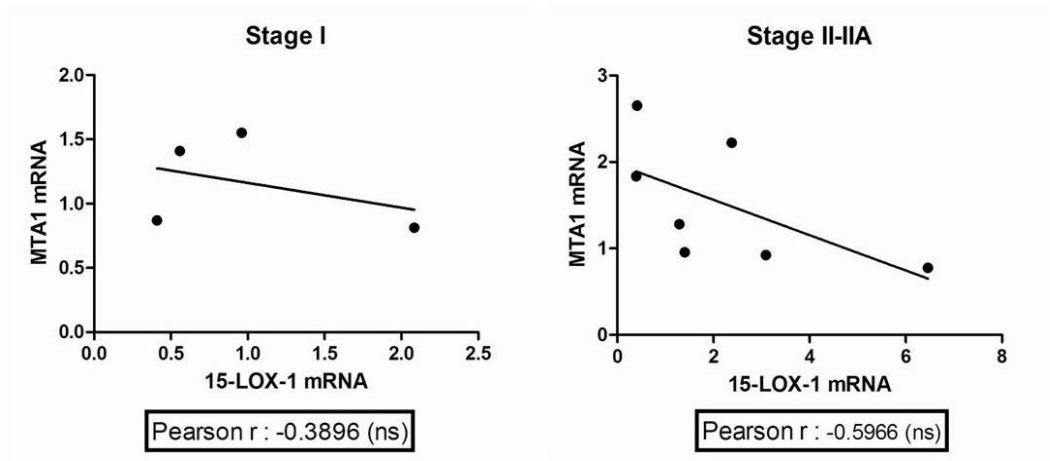
Kolorektal kanser hasta dokularında 15-LOX-1 ve MTA1 ifadeleri arasında ters korelasyon olup olmadığını anlamak için normal (sağlıklı) ve kolon kanseri dokularından elde edilmiş tek zincir cDNA'dan oluşan, 8 adet normal, 5 adet 1. derece, 8 adet 2. derece (IIA), 1 adet 2. derece (II), 1 adet 3. derece (IIIA), 6 adet 3. derece (IIIB), 3 adet 3. derece (IIIC), 6 adet 3. derece (III), 10 adet 4. derece olmak üzere  $\beta$ -aktine normalize edilmiş 48 farklı örnek içeren cDNA dizisi kiti (Human TissueScan Colon Cancer Tissue qPCR Panel IV, Origene, Rockville, MD, ABD, Katalog no: HCRT303) kullanılarak 15-LOX-1, MTA1 ve b-actin (Kalibrator gen) ifadeleri qRT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. 15-LOX-1 ve MTA1 ifade değerleri  $\beta$ -actin ifade değerlerine normalize edilip elde edilen  $\Delta\Delta C_t$  değerleri GraphPad programında korelasyon analizine tabi tutularak Pearson r değerleri hesaplanmıştır.

Şekil 13'da görüldüğü üzere normal doku örneklerinde (Pearson  $r=-0.02317$ ) 15-LOX-1 ve MTA1 gen ifadeleri arasında her hangi bir korelasyon gözlenmemiştir. Şekil 14 ve Şekil 16'da görüldüğü üzere, 1. derece (Pearson  $r=-0.3896$ ) 2. derece (II-IIA) (Pearson  $r=-0.5966$ ), 3. derece (IIIA-IIIB-IIIC) (Pearson  $r=-0.2540$ ) ve 4. derece (Pearson  $r=-0.4001$ ) hasta dokularında 15-LOX-1 ve MTA1 gen ifadeleri arasında negatif bir korelasyon mevcuttur. Ancak örnek sayıları az olduğundan bulunan korelasyonlar istatistiksel açıdan belirgin değildir. Numune sayısını artırmak için, OriGene firmasından üç daha fazla diziler satın almış ve şu anda yeni örnekleri ile qRT-PCR deneyler yürütüyoruz. Öte yandan 3. derece kolorektal kanser doku örneklerinde (Pearson  $r=0.1019$ ) her hangi bir korelasyon gözlenmemiştir (Şekil 15).



**Şekil 13: Normal kolon dokularından ifade eden 15-LOX-1 ve MTA1 genleri için korelasyon analizi.**

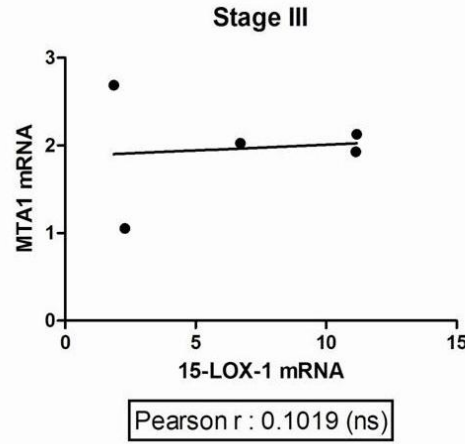
Elde edilen cDNA dizilerinde yapılan qRT-PCR analizi sonucu bulunan  $\Delta\Delta Ct$  değerlerinin korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme Pearson's coefficient (r) hesaplanmasıyla gerçekleştirilmiştir. (Pearson r = -0.02317) Normal kolon dokularında 15-LOX-1 ve MTA1 genleri arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır.



**Şekil 14: 1. derece 1 ve 2. derece kolorektal kanser dokularından ifade eden 15-LOX-1 ve MTA1 genleri için korelasyon analizi.**

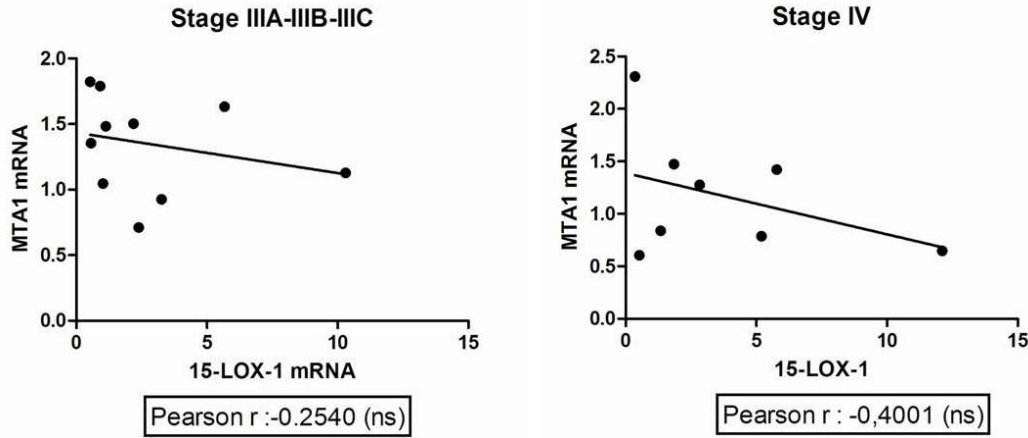
Elde edilen cDNA dizilerinde yapılan qRT-PCR analizi sonucu bulunan  $\Delta\Delta Ct$  değerlerinin korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme Pearson's coefficient (r) hesaplanmasıyla gerçekleştirilmiştir. (Pearson r = -0.3896 ve -0.5966). 1. derece ve 2. derece kolorektal kanser hastalarında 15-LOX-1 ve MTA1 genleri arasında negatif bir korelasyon bulunmaktadır.





**Şekil 15: 3. derece kolorektal kanser dokularından ifade eden 15-LOX-1 ve MTA1 genleri için korelasyon analizi.**

Elde edilen cDNA dizilerinde yapılan qRT-PCR analizi sonucu bulunan  $\Delta\Delta Ct$  değerlerinin korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme Pearson's coefficient (r) hesaplanmasıyla gerçekleştirilmiştir. (Pearson  $r = 0.1019$ ) 3. derece kolorektal kanser hastalarında 15-LOX-1 ve MTA1 genleri arasında negatif bir korelasyon bulunamamıştır.



**Şekil 16: 3. derece (IIIA-IIIB-IIIC)1 ve 4. derece kolorektal kanser dokularından ifade eden 15-LOX-1 ve MTA1 genleri için korelasyon analizi.**

Elde edilen cDNA dizilerinde yapılan qRT-PCR analizi sonucu bulunan  $\Delta\Delta Ct$  değerlerinin korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme Pearson's coefficient (r) hesaplanmasıyla gerçekleştirilmiştir. (Pearson  $r = -0.2540$  ve  $-0.4001$ ). 3. Derece (IIIA-IIIB-IIIC)1 ve 4. Derece kolorektal kanser hastalarında 15-LOX-1 ve MTA1 genleri arasında negatif bir korelasyon bulunmaktadır.

## 5. Sonuç

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar göstermektedir ki 15-LOX-1, MTA1 aşırı ifade eden kolorektal kanser hücre hatlarında MTA1 düzenlenmesine yardımcı olmaktadır. Buna ek olarak, MTA1 promotör bölgesindeki NF-κB bağlanma bölgeleri ilk defa gösterilmiş ve 15-LOX-1 varlığında p65'in bu bölgelerden en az iki tanesine daha az bağlanması sonucu HT-29 ve LoVo hücrelerinde MTA1 seviyelerinin azaldığı gösterilmiş böylece gözlenen değişikliklere mekanistik bir açıklama getirilebilmiştir. Bunların yanı sıra yaptığımız korelasyon analizi 15-LOX-1 ve MTA1 seviyelerinin normal dokularda değil, çeşitli kanser derecelerinde negatif korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. İnanıyoruz bu çalışma kolorektal kanserde MTA1 ifadesinin düzenlenmesi adına yeni stratejiler geliştirilmesi açısından literatüre önemli katkıda bulunacaktır.

## 6. Kaynaklar

- Çimen, I., Astarci, E., & Banerjee, S. 2011. "15-lipoxygenase-1 exerts its tumor suppressive role by inhibiting nuclear factor-kappa B via activation of PPAR gamma", *Journal of Cellular Biochemistry*, 112, 2490-2501,
- Çimen, I., Tuncay, S., & Banerjee, S. 2009. "15-Lipoxygenase-1 expression suppresses the invasive properties of colorectal carcinoma cell lines HCT-116 and HT-29", *Cancer Science* 100, 2283-2291.
- Giannini, R., & Cavallini, A. 2005. "Expression analysis of a subset of coregulators and three nuclear receptors in human colorectal carcinoma", *Anticancer Research* 25(6B), 4287-4292.
- Manavathi, B., & Kumar, R. 2007, "Metastasis tumor antigens, an emerging family of multifaceted master coregulators", *Journal of Biological Chemistry*, 282,1529-33.
- Mazumdar, A., Wang, R. A., Mishra, S. K., Adam, L., Bagheri-Yarmand, R., Mandal, M., Vadlamudi, R. K., & Kumar, R. 2001, "Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor", *Nature Cell Biology*, 3, 30-37.
- Moon, H. E., Cheon, H., Chun, K. H., Lee, S. K., Kim, Y. S., Jung, B. K., Park, J. A., Kim, S. H., Jeong, J. W., & Lee, M. S. 2006, "Metastasis-associated protein 1 enhances angiogenesis by stabilization of HIF-1alpha", *Oncology Reports*, 16, 929-935.
- Moon, H. E., Cheon, H., & Lee, M. S. 2007, "Metastasis-associated protein 1 inhibits p53-induced apoptosis", *Oncology Reports*, 18, 1311-1314.
- Nicolson, G. L. 1988, "Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites", *Biochim Biophys Acta*, 948, 175-224.
- Pakala, S. B., Bui-Nguyen, T. M., Reddy, S. D., Li, D. Q., Peng, S., Rayala, S. K., Behringer, R. R., & Kumar, R. 2010, "Regulation of NF-kappaB circuitry by a component of the nucleosome remodeling and deacetylase complex controls

- inflammatory response homeostasis", Journal of Biological Chemistry, 285, 23590-7.
- Shureiqi, I., Wojno, K. J., Poore, J. A., Reddy, R. G., Moussalli, M. J., Spindler, S. A., Greenson, J. K., Normolle, D., Hasan, A. A., Lawrence, T. S., & Brenner, D. E. 1999, "Decreased 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid levels and 15-lipoxygenase-1 expression in human colon cancers". Carcinogenesis, 20, 1985-1995.
- Toh, Y., & Nicolson, G. L. 2009, "The role of the MTA family and their encoded proteins in human cancers: molecular functions and clinical implications". Clinical and Experimental Metastasis, 26, 215-227.
- Toh, Y., Oki, E., Oda, S., Tokunaga, E., Ohno, S., Maehara, Y., Nicolson, G. L., & Sugimachi, K. 1997, "Overexpression of the MTA1 gene in gastrointestinal carcinomas: correlation with invasion and metastasis". International Journal of Cancer, 74, 459-463.
- Toh, Y., Pencil, S. D., & Nicolson, G. L. 1994, "A novel candidate metastasis-associated gene, mta1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines: cDNA cloning, expression, and protein analyses", Journal of Biological Chemistry, 269, 22958-22963.
- Toh, Y., Pencil, S. D., & Nicolson, G. L. 1995, "Analysis of the complete sequence of the novel metastasis-associated candidate gene, MTA1, differentially expressed in mammary adenocarcinoma and breast cancer cell lines". Gene, 159, 97-104.
- Yuri, M., Sasahira, T., Nakai, K., Ishimaru, S., Ohmori, H., & Kuniyasu, H. 2007, "Reversal of expression of 15-lipoxygenase-1 to cyclooxygenase-2 is associated with development of colonic cancer". Histopathology, 51, 520-527.
- Zuo, X., Morris, J. S., Broaddus, R., & Shureiqi, I. 2009, "15-LOX-1 transcription suppression through the NuRD complex in colon cancer cells", Oncogene, 28, 1496-1505.

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN ADI SOYADI	İMZASI	TARİH

**NOT:** Raporun tüm sayfaları proje yürütücüsü tarafından paraflanacak, sadece son sayfa imzalanacaktır.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> 113S063
<b>Proje Başlığı:</b> Kolon Kanserinde 15-Lipoksijenaz-1 ve Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB)'nin MTA1 İfadesini Değiştiren Karşılıklı Etkileşimi
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Doç. Dr Sreeparna Banerjee
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, Ankara
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b>
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 1.06.2013-1.06.2014
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> MTA1, NF-kB ve 15-LOX-1 arasındaki varolan etkileşimi inceledik. Kolon kanser hücrelerindeki 15-LOX-1 ifadesinin NF-kB'nin hücre çekirdeğine olan translokasyonunu baskıladığını ve böylece MTA1 promotoruna NF-kB p65'in bağlanmasını azalttığını gösterdik. Bu olay hücrelerdeki MTA1 ifadesinde azalmaya sebep olmuştur. Bu ilişki kolon kanser hücrelerindeki 15-LOX-1 ifadesinin antimetastazik özelliğiyle bağlantılı bir mekanizma olabilir.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> 15-LOX-1, MTA1, NF-kB, promoter bağlantısı
<b><a href="#">Fikri Ürün Bildirim Formu</a> Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> <b>Gerekli Değil</b> <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> <b>Kongre sunumları:</b> 1. Banerjee S. 15-Lipoksijenaz-1(15-LOX-1) ve Metastasis Associated Protein 1 (MTA1) arasındaki mekanistik ilişkinin insan kolorektal kanser hücre hatlarında incelenmesi. TÜBA-GEBİP Yıllık Toplantısı 29 Kasım - 01 Aralık 2013 Konya (sözlü sunum) 2. Banerjee S and Tunçay Çağatay, S. Investigation of a mechanistic link between 15-Lipoxygenase-1 (15-LOX-1) and Metastasis Associated Protein 1 (MTA1) in human colorectal carcinoma cell lines. 13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases. San Juan, Puerto Rico, November 3 - 6, 2013 (sözlü sunum) 3. Çağatay Tunçay S, Banerjee, S Investigation of a mechanistic link between 15-Lipoxygenase-1 (15-LOX-1) and Metastasis Associated Protein 1 (MTA1) in human colorectal carcinoma cell lines. 17th ECCO / 38th ESMO / 32nd ESTRO European Cancer Congress on Reinforcing Multidisciplinarity, Amsterdam, Netherlands, Sep 27-OCT 01, 2013 European Journal of Cancer Volume: 49 Supplement: 2 Pages: S136-S136 Meeting Abstract: 636
<b>Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşıdığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.</b>