



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**LZTR1'İN HEP3B HEPATOSELÜLER
KARSİNOM HÜCRE HATTINDAKİ
TRANSKRİPSİYONEL ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Soner KARABULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ

TRABZON-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

26.07.2024

Soner KARABULUT

İthaf

Yüksek lisans tezimi, hatırlayamayacağım kadar küçük bir yaştayken, vefat eden sevgili annem Sevim KARABULUT'a ve annemin yokluğunu aratmayan manevi annem Makbule KARABULUT'a ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, çalışmalarım boyunca her aşamada destek olan, sorun yaşadığım her noktada titiz ve anlayışlı yaklaşımıyla bana rehberlik eden, akademik yolculuğumun başında ilgisi, sabrı ve teşviki ile gelişmemi ve ilerlememi sağlayan, bu süreçte maddi ve manevi desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ'a bana kattığı her şey için minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bir çok konuda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, özellikle CRISPR çalışmaları konusunda desteğini esirgemeyen, nazik ve sabırlı yaklaşımıyla beni yönlendiren değerli hocam Doç. Dr. Tuba DİNÇER'e ve öğrencisi Dr. Ümit UZUN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisansım süresince akademik olarak tecrübelerini aktarıp desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Figen CELEP EYÜBOĞLU'na, bölümümüz hocalarından Prof. Dr. Ersan KALAY ve Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullanmış olduğum hücre hatlarını benimle paylaşan Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK hocama ve RNA dizileme analizlerini yaparak desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Vahap ELDEM hocama teşekkür ederim.

Yüksek lisansım boyunca maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşlarım Elif İlkur ŞAHİN'e, Arş. Gör. Büşra ÖZÇAY'a, Arş. Gör. Dr. Şeniz ERDEM'e, Öğr. Gör. Merve HÜNER YİĞİT'e, Arş. Gör. Dr. Ertuğrul YİĞİT'e ve Arş. Gör. Dr. Mehmet ERDEM'e çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni her konuda destekleyen, güç veren ve üzerimde en büyük emeğe sahip olan annem Makbule KARABULUT'a, ablalarıma ve kız kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmayı Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ tarafından yürütülen 2022-A08-28002 No'lu proje ile destekleyen ve burs imkanı sunan TÜSEB'e teşekkür ederim. Ayrıca, Dr. Öğr. Üyesi Gökhan YILDIZ tarafından yürütülen 119S356 No'lu TÜBİTAK, 2019-TA-01-2358 No'lu TÜSEB ve TSA-2023-10539 No'lu KTÜ-BAP13 projeleriyle burs imkanı sunan TÜBİTAK'a, TÜSEB'e ve KTÜ-BAP birimimize teşekkür ederim.

Soner KARABULUT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. LZTR1 Literatürü	3
2.1.1. LZTR1 Geni ve Yabanıl Tip LZTR1 Proteini	3
2.1.2. LZTR1 Genindeki Germ Hattı Mutasyonlarının İlişkilendirildiği Hastalıklar	4
2.1.3. LZTR1'in İlişkilendirildiği Kanseri Tipleri	6
2.1.4. Hepatoselüler Karsinom ve LZTR1	9
2.2. CRISPR/Cas9 Sistemi	11
3. GEREÇ ve YÖNTEM	13
3.1. Gereç	13
3.1.1. Kimyasallar	13
3.1.2. DNA ve Protein Markırları	14
3.1.3. Antikorlar	15
3.1.3.1. Primer Antikorlar	15
3.1.3.2. Sekonder Antikorlar	15
3.1.4. Besiyeri ve Antibiyotikler	15
3.1.5. Kitler ve Enzimler	16
3.1.6. Sarf Malzemeler	16
3.1.7. Cihazlar	17
3.1.8. Bakteri Suşları	19
3.1.9. Kullanılan Vektörler	19

3.1.10. Kullanılan Hücre Hatları	19
3.1.11. Besiyerleri, Solüsyonlar ve Tamponlar	19
3.1.11.1. Bakteri İçin Kullanılan Besiyerleri	19
3.1.11.2. Agaroze Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler	20
3.1.11.3. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Western Blotlama Solüsyonları	20
3.1.11.4. Memeli Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar	24
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Hücre Kültürü	25
3.2.1.1. Kullanılan Hücreler	25
3.2.1.2. Hücre Kültür Şartları	25
3.2.1.3. Hücre Çözme	25
3.2.1.4. Hücre Pasajlama	26
3.2.1.5. Hücre Dondurma	26
3.2.2. pSpCas9n(BB)-2A-Puro (pX462) Ekspresyon Plazmidlerinin Hazırlanması	26
3.2.2.1. LZTR1 sgRNA Kodlayan Nükleotit Dizilerinin Belirlenmesi, Oligomerize Edilmesi ve Oligomerlerin pX462 Vektörüne Aktarılması	26
3.2.2.2. Klonlanan gRNA'ların pX462 Vektörünün İçerisinde Olduğunun Sanger Dizileme Yöntemiyle Kontrol Edilmesi	30
3.2.2.3. gRNA Kodlayan Dizileri İçeren pX462 Plazmid DNA'larının Çoğaltılması ve Endotoksinsiz Plazmid İzolasyonu Protokolü	32
3.2.3. Hep3B Hücrelerini 72 Saat'te Öldüren Puromisin Dozunun Belirlenmesi	33
3.2.4. Hep3B Hücrelerine, gRNA'ları İçeren pX462 Vektörlerinin Transfekte Edilmesi	34
3.2.5. Hep3B Scrambled ve Hep3B LZTR1 CRISPR Tek Kolonilerinin Seçilip, Toplanması	35
3.2.6. Hep3B SC ve Hep3B LSKO Kolonilerinde WB Yöntemiyle LZTR1 Protein Seviyelerinin İncelenmesi	35
3.2.6.1. RIPA ile Protein İzolasyonu ve BCA Tahlili	35
3.2.6.2. Yürütme ve Yığılma Jelinin Hazırlanması	36
3.2.6.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi	37
3.2.6.4. Nitroselüloz Membrana Transfer İşlemi ve Görüntüleme	37
3.2.7. SC ve LSKO Kolonilerine Ait Hücrelerden gDNA İzolasyonu ve Indel Analizleri	39
3.2.7.1. SC ve LSKO Kolonilerine Ait Hücrelerden gDNA İzolasyonu	39

3.2.7.2. SC ve LSKO Kolonilerine Ait Hücrelerden İzole Edilen gDNA’lardan CRISPR Hedef Bölgesinin Çoğaltılması	40
3.2.7.3. LSKO Kolonilerine Ait Ürünlerin Agaroz Jele Yüklenip, Agaroz Jelden Saflaştırılması	40
3.2.7.4. LSKO Kolonilerine Ait Agaroz Jel Ürünlerinin pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlanması	41
3.2.8. Hep3B SC-12 ve Hep3B LSKO-104 Kolonilerinden Total RNA İzolasyonu	42
3.2.9. RNA Dizileme	43
3.2.10. RNA Dizileme Sonuçlarının Biyoenformatik Analizi	44
3.2.11. RNA Dizileme Sonuçlarına Göre mRNA Seviyeleri Değişen Genlerin qRT-PCR ile Doğrulanması	45
3.2.11.1. Hep3B SC-12 ve Hep3B LSKO-104 Hücrelerinden İzole Edilen Total RNA’lardan cDNA Sentezi	45
3.2.11.2. Hep3B SC-12 ve Hep3B LSKO-104 Hücrelerinden İzole Edilen cDNA’ların Kullanılarak qRT-PCR yapılması	45
3.2.12. İstatistiksel Analizler ve Grafik Çizimi	47
4. BULGULAR	49
4.1. Ön Çalışma Bulguları	49
4.2. LZTR1 Nakavt ve Kontrol Hep3B Hücre Klonlarının Hazırlanması	51
4.2.1. Plazmid DNA’ların Hazırlanması ve Kolonilerin Elde Edilmesi	51
4.2.2. LZTR1 Geninin Nakavt Edildiği Klonların Seçilmesi ve Bu Klonlarda INDEL Analizlerinin Gerçekleştirilmesi	51
4.3. RNA Örneklerinin Hazırlanması ve RNA Dizilemelerinin Gerçekleştirilmesi	69
4.4. Transkriptomik Veri Analizleri	71
4.4.1. LZTR1’in İfade Farklılığına Neden Olduğu Genlerin Belirlenmesi	71
4.4.2. Gen Seti Zenginleşme Analizleri	80
4.5. Biyoenformatik Analizlerle Ekspresyon Farklılığı Gösterdiği Belirlenen Genlerden Seçilenlerin qRT-PCR Yöntemiyle Doğrulanması	85
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	87
6. KAYNAKLAR	108
ÖZGEÇMİŞ	124

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. PX462 vektörüne aktarılan sgRNA'ları kodlayan oligonükleotit dizileri	27
Tablo 2. Oligomerizasyon reaksiyon içeriği ve reaksiyon koşulları	28
Tablo 3. BbsI ile kesim reaksiyonunun içeriği	28
Tablo 4. pX462 vektörüne ligasyon reaksiyonunun içeriği	29
Tablo 5. Sanger dizileme PCR içeriği ve PCR koşulları	31
Tablo 6. Kullanılan primerlerin listesi	31
Tablo 7. Farklı dozlarda puromisin içeren karışımların içerikleri	33
Tablo 8. Transfeksiyon koşulları	34
Tablo 9. %7.5'lik ve %10'luk ayırma jellerinin içerikleri	36
Tablo 10. %4'lük yükleme jelinin içeriği	36
Tablo 11. WB deneylerinde kullanılan antikorların listesi ve dilüsyonları	38
Tablo 12. gDNA ile PCR içeriği ve ısı döngüsü koşulları	40
Tablo 13. pJET1.2/blunt vektörüne klonlama yapılırken hazırlanan ilk reaksiyon içeriği	42
Tablo 14. Koloni PCR içeriği ve ısı döngüsü koşulları	42
Tablo 15. cDNA sentezi reaksiyonunun içeriği ve ısı döngüsü koşulları	45
Tablo 16. qRT-PCR içeriği ve ısı döngüsü koşulları	46
Tablo 17. qRT-PCR deneylerinde kullanılan primerlerin listesi	46
Tablo 18. Seçilen LSKO klonlarının alellerindeki değişimler	60
Tablo 19. RNA dizilemesi yapılan örneklerin RIN değerleri	70
Tablo 20. RNA dizileme verilerinin genomu hizalanma ve Q30 kalite oranları	70
Tablo 21. RNA dizileme verilerine göre SC-12 hücrelerine kıyasla LSKO-104 hücrelerinde ekspresyon düzeyleri 1.5 kat ve üzerinde artan ve azalan genlerin listesi	75
Tablo 22. İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde zenginleşen ilk on GO gen setinin listesi	81
Tablo 23. İstatistiksel olarak anlamlı zenginleşen diğer MSigDB gen setlerinin listesi	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa	
Şekil 1.	TCGA HCC kohortundaki hastalarda <i>LZTR1</i> geninde belirlenen somatik mutasyonlar ve HCC hücre hatlarındaki LZTR1 protein düzeyleri	50
Şekil 2.	Hep3B hücrelerinde <i>LZTR1</i> 'in nakavt edilmesi için genomda hedeflenen bölge ve pX462 vektörüne aktarılan gRNA'ları kodlayan DNA dizilerinin Sanger DNA dizileme kromatogramları	53
Şekil 3.	LSKO1-40 arası Hep3B hücrelerindeki LZTR1 protein düzeyleri	54
Şekil 4.	LSKO41-80 arası Hep3B hücrelerindeki LZTR1 protein düzeyleri	55
Şekil 5.	LSKO81-107 arası Hep3B hücrelerindeki LZTR1 protein düzeyleri	56
Şekil 6.	SC1-22 arası Hep3B hücrelerindeki LZTR1 protein düzeyleri	57
Şekil 7.	WB sonuçlarına göre seçilen sekiz Hep3B kolonisinden PCR yöntemiyle amplifiye edilen ve <i>LZTR1</i> 'in 1. ekzonunu içeren PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucu	58
Şekil 8.	LSKO-34 klonunda <i>LZTR1</i> 'in 1. ekzonunun DNA sekansları ve mRNA ve protein düzeyindeki etkilerinin şematik gösterimi	61
Şekil 9.	LSKO-35 klonunda <i>LZTR1</i> 'in 1. ekzonunun DNA sekansları ve mRNA ve protein düzeyindeki etkilerinin şematik gösterimi	62
Şekil 10.	LSKO-98 klonunda <i>LZTR1</i> 'in 1. ekzonunun DNA sekansları ve mRNA ve protein düzeyindeki etkilerinin şematik gösterimi	63
Şekil 11.	LSKO-104 klonunda <i>LZTR1</i> 'in 1. ekzonunun DNA sekansları ve mRNA ve protein düzeyindeki etkilerinin şematik gösterimi	64
Şekil 12.	Hep3B hücreleri ile seçilen SC ve LSKO Hep3B klonlarıyla yapılan WB deneyleri ve analizleri	67
Şekil 13.	Öne çıkan SC ve LSKO Hep3B klonlarıyla yapılan WB deneyleri ve analizleri	68
Şekil 14.	SC12 ve LSKO-104 Hep3B hücrelerinden izole edilen total RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi sonucu	69
Şekil 15.	Ham RNA dizileme verilerinin ortalama sekans kalite skorları sonucu	71
Şekil 16.	LSKO-104 örneklerinde LZTR1 mRNA'sında 23 nükleotitik delesyonun bulunduğunu ortaya koyan BAM görüntüleri	73

Şekil 17.	SC-12 ve LSKO-104 Hep3B hücrelerinin RNA dizileme analizleriyle gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren genlerin ısı haritası	80
Şekil 18.	GSEA verilerine göre LSKO-104 örneklerine kıyasla SC-12 örneklerinde zenginleşen ilk on GO teriminin sonuçları	83
Şekil 19.	GSEA verilerine göre LSKO-104 örneklerine kıyasla SC-12 örneklerinde GO gen setleri dışına zenginleşen diğer gen setlerinin sonuçları	84
Şekil 20.	RNA dizileme sonuçlarına göre seçilen yedi genin SC-12 ve LSKO-104 hücrelerindeki göreceli ifade düzeylerini gösteren qRT-PCR sonuçları	86
Şekil 21.	Validasyon için seçilen yedi genin RNA dizileme ve qRT-PCR sonuçlarının uyumunu gösteren korelasyon grafiği	86

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AA	Amino asit
AKT	AKT serine/threonine kinase
AML	Akut miyeloid lösemi
AMOTL1	Angiomotin like 1
APS	Amonyum persülfat
ARID1A	AT-Rich interaction domain 1A
ARID2	AT-Rich interaction domain 2
ATRX	ATRX chromatin remodeler
BMP7	Bone morphogenetic protein 7
Bp	Baz çifti
BSA	Bovine serum albumin
Cas9	CRISPR-associated endonuclease 9
Cas9n	CRISPR-associated endonuclease 9 nickase
CBL	Cbl Proto-Oncogene
CCLE	The cancer cell line encyclopedia
CDH11	Cadherin 11
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
Myb	MYB proto-oncogene, transcription factor
CUL3	Cullin 3
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CT	Cycle threshold
CTNNB1	Catenin beta 1
delins	Delesyon-insersiyon
dk.	Dakika
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMT	Epitel-mezenkimal dönüşüm
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
FBN2	Fibrillin 2

FBS	Fetal bovine serum
FDR	False discovery rate
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
gDNA	Genomik DNA
GNET	Gastrointestinal nöroektodermal tümör
GO	Gene ontology
GOBP	Gene ontology biological process
GOMF	Gene ontology molecular function
gRNA	Kılavuz RNA
GSEA	Gen seti zenginleşme analizleri
GSK3α	Glycogen synthase kinase 3 alpha
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3 beta
GUCY1A1	Guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha 1
H3K9me	Histon H3 proteininin lizin 9 metilasyonu
H3K27me	Histon H3 proteininin lizin 27 metilasyonu
HA	Hemaglutinin
HCC	Hepatoselüler karsinom
HDR	Homology-directed repair
HGVS	Human genome variation society
HOXB3	Homeobox B3
HOXB5	Homeobox B5
HOXB6	Homeobox B6
HPA	Human protein atlas
HRAS	HRas proto-oncogene, GTPase
HRP	Horseradish peroxidase
KLF5	KLF transcription factor 5
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase
LATS 1/2	Large tumor suppressor kinase 1/2
LncRNA	Uzun kodlamayan RNA
LZTR1	Leucine zipper like post translational regulator 1
MEF2C	Myocyte enhancer factor 2C
MEK 1/2	Mitogen-Activated protein kinase kinase 1/2
MRAS	Muscle RAS oncogene homolog

mRNA	Mesajcı RNA
MSigDB	Molecular signatures database
MST 1	Macrophage stimulating 1
MST2	Mammalian STE20-like protein kinase 2
mTOR	Mechanistic target of rapamycin kinase
NEAA	Esansiyel olmayan amino asitler
NES	Nestin
NES	Normalize zenginleşme skoru
NF1	Neurofibromin 1
NF2	NF2, moesin-ezrin-radixin like (MERLIN) tumor suppressor
NHEJ	Non-homologous end joining
NIHF	Non-immune hydrops fetalis
NRAS	NRAS proto-oncogene, GTPase
NS	Noonan sendromu
n.s.	Spesifik olmayan
OMIM	Online mendelian inheritance in man
PAM	Protospacer adjacent motif
PBS	Phosphate-buffered saline
PBX1	PBX homeobox 1
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDAC	Pankreatik duktal adenokarsinom
Pen./Strep.	Penisilin/Streptomisin
Phred Skoru	Phil's read editör skoru
PNK	Polinükleotit kinaz
PPP1CB	Protein phosphatase 1 catalytic subunit beta
PRC2	Polycomb repressive complex 2
PTPN11	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11
Q30	Kalite skoru 30
qPCR	Quantitative PCR
RAS/MAPK	RAS/mitojen activated protein kinase
RAF	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
RELN	Reelin
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonükleik asit

RNF217	Ring finger protein 217
RPMI	Roswell park memorial institute
RRAS2	RAS related 2
SALL1	Spalt like transcription factor 1
SDS	Sodyum dodesil sulfat
SDS-PAGE	SDS Poliakrilamit Jel Elektroforezi
ShRNA	Small hairpin RNA
SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1
SHOC2	SHOC2 leucine rich repeat scaffold protein
SOS 1	SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1
SOS2	SOS Ras/Rho guanine nucleotide exchange factor 2
SOX2	SRY-Box transcription factor 2
SPRED2	Sprouty related EVH1 domain containing 2
SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
SUZ12	SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit
SWNTS1	Schwannomatoz tip 1
SWNTS2	Schwannomatoz tip 2
TALEN	Transcription activator-like effector nucleases
TAZ	Tafazzin, phospholipid-lysophospholipid transacylase
TBS-T	Tris-buffered saline tween 20
TCGA	The cancer genome atlas
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TGF- β	Transforming growth factor beta
TP53	Tumor protein P53
TRAF4	TNF receptor associated factor 4
TRIB2	Tribbles pseudokinase 2
UTR	Proteine çevrilmeyen bölge
VIM	Vimentin
WB	Western blot
WLS	Wnt ligand secretion mediator
WNT7B	Wnt family member 7B
WT	Yabanıl tip
YAP1	Yes1 associated transcriptional regulator

ZSCAN30	Zinc finger and SCAN domain containing 30
ZBTB12	Zinc finger and BTB domain containing 12
ZFN	Zinc finger nucleases

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
M_A	Moleküler ağırlık
Mg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
μm	Mikrometre
N	Normal
ng	Nanogram
°C	Santigrad derece

Formüller

dH₂O	Distile su
NaCl	Sodyum klorür
HCl	Hidroklorik asit
NaOH	Sodyum hidroksit

ÖZET

LZTR1'in Hep3B Hepatoselüler Karsinom Hücre Hattındaki Transkripsiyonel Etkilerinin Araştırılması

Karaciğer kanseri, dünyada en sık teşhis edilen kanser tipleri arasında yedinci, kansere bağlı ölüm nedenleri arasında üçüncü sıradadır. Primer karaciğer kanserlerinin, %85'ini hepatoselüler karsinom (HCC) oluşturmaktadır. Leucine zipper like post translational regulator 1 (*LZTR1*) geni tarafından kodlanan LZTR1 proteini, hücre içinde kanonik RAS ve kanonik olmayan RIT1 proteinlerini poliubikitinleyerek RAS/ mitogen activated protein kinase (RAS/MAPK) sinyalinin azalmasında rol oynar. *LZTR1*'in HCC'de sıklıkla mutasyona uğradığı ve tümör baskılayıcı olduğu tespit edilmiştir. *LZTR1*'in nakavt edilmesinin HCC hücrelerinde neden olduğu transkripsiyonel değişiklikler araştırılmamıştır. Bu tez çalışmasında, Hep3B hücre hattında *LZTR1*'in nakavt edilmesinin ekspresyonel değişiklikler üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda CRISPR/Cas9 yöntemiyle *LZTR1* geninin nakavt edilmesi, *LZTR1* nakavt ve kontrol hücrelerin RNA örnekleriyle karşılaştırmalı transkriptomik analizler yaparak Hep3B hücrelerinde *LZTR1* geninin yol açtığı ekspresyon değişikliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda, CRISPR/Cas9 yöntemi kullanılarak *LZTR1*'in nakavt edildiği ve edilmediği Hep3B kolonileri hazırlandı. LZTR1 protein seviyeleri western blotlama yöntemiyle ve genomik DNA dizileri Sanger yöntemiyle analiz edilerek, *LZTR1* nakavtı doğrulanmıştır. RNA dizileme analizlerinin sonucunda, *LZTR1*'in nakavt edilmesi 20'si LncRNA olmak üzere 117 genin ifadesini >1.5 kat ($p<0.05$) değiştirdiğini ortaya koymuştur. Gen seti zenginleşme analizleri (GSEA), LZTR1 ifade edildiğinde gelişim ve farklılaşma, transkripsiyon düzenleme ve hücre sinyal iletimi biyolojik süreçleriyle ilişkili Gene Ontology (GO) terimlerinin zenginleştiğini ortaya çıkardı. qRT-PCR yöntemiyle yaptığımız validasyon deneylerinin sonuçları, RNA dizileme sonuçlarıyla uyumlu olarak (R^2 : 0.96) cadherin 11 (*CDH11*), tribbles pseudokinase 2 (*TRIB2*) ve KLF transcription factor 5 (*KLF5*) gen ekspresyonlarının *LZTR1* nakavt hücrelerde arttığını, vimentin (*VIM*), angiomotin like 1 (*AMOTL1*), bone morphogenetic protein 7 (*BMP7*) ve reelin (*RELN*) gen ekspresyonlarının ise azaldığını gösterdi. Bu tez çalışmasının sonucunda LZTR1'in HCC'deki transkripsiyonel düzenleyici işlevlerinin aydınlatılmasına katkı sağlayacak veriler elde edilmiş olup, bu bulguların LZTR1'in HCC'deki rolünün daha iyi anlaşılmasına fayda sağlayabileceği öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: CRISPR/Cas9, HCC, Hep3B, LZTR1, RNA dizileme

ABSTRACT

Investigation of the Transcriptional Effects of LZTR1 in the Hep3B Hepatocellular Carcinoma Cell Line

Liver cancer is the seventh most frequently diagnosed cancer type in the world and the third leading cause of cancer-related deaths. Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 85% of primary liver cancers. The LZTR1 protein, encoded by the leucine zipper-like post-translational regulator 1 (*LZTR1*) gene, plays a role in the reduction of RAS/mitogen-activated protein kinase (RAS/MAPK) signaling by polyubiquitinating canonical RAS and non-canonical-RIT1 proteins in the cell. LZTR1 is frequently mutated in HCC and has been found to be a tumor suppressor. Transcriptional changes induced by *LZTR1* knockdown in HCC cells have not been investigated. In this thesis, we aimed to investigate the effects of *LZTR1* knockout on expression changes in the Hep3B cell line. For this purpose, the *LZTR1* gene was knocked out by the CRISPR/Cas9 method. Comparative transcriptomic analysis of RNA samples of *LZTR1* knockout and control cells aimed to determine the expression changes caused by the *LZTR1* gene in Hep3B cells. For this purpose, Hep3B colonies with and without *LZTR1* knockout were prepared using the CRISPR/Cas9 method. LZTR1 protein levels were analyzed using western blotting, and genomic DNA sequences were analyzed using the Sanger method to confirm *LZTR1* knockout. RNA sequencing analyses revealed that knockout of LZTR1 altered the expression of 117 genes, including 20 lncRNAs, by >1.5-fold ($p < 0.05$). Gene set enrichment analyses (GSEA) revealed that Gene Ontology (GO) terms associated with the biological processes of development and differentiation, transcription regulation, and cell signaling were enriched when the *LZTR1* gene was expressed. Our validation experiments using qRT-PCR showed that the gene expressions of cadherin 11 (*CDH11*), tribbles pseudokinase 2 (*TRIB2*), and KLF transcription factor 5 (*KLF5*) were increased in *LZTR1* knockout cells. Conversely, the gene expressions of vimentin (*VIM*), angiomin-like 1 (*AMOTL1*), bone morphogenetic protein 7 (*BMP7*), and reelin (*RELN*) were found to be decreased. These findings are in line with the RNA sequencing results ($R^2 = 0.96$). As a result of this thesis study, data that will contribute to the elucidation of the transcriptional regulatory functions of LZTR1 in HCC were obtained and it is predicted that these findings may contribute to a better understanding of the role of LZTR1 in HCC.

Keywords: CRISPR/Cas9, HCC, Hep3B, LZTR1, RNA sequencing

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Karaciğer kanseri, dünyada her yıl tanısı koyulan yaklaşık 906.000 yeni vaka ile en sık teşhis edilen kanser tipleri arasında yedinci sırada olup, yıllık yaklaşık 830.000 vefat ile sırasıyla akciğer ve kolorektal kanserlerin ardından dünyada kansere bağlı ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Primer karaciğer kanserlerinin farklı tipleri bulunmakta olup, karaciğer kanserlerinin %85'ini hepatoselüler karsinom (HCC) oluşturmaktadır (1). Şimdiye kadar yapılan araştırmalarla HCC'ye yol açan risk faktörleri belirlenmiş, HCC'de sık görülen kromozom anomalileri, mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler tanımlanmış, sıklıkla deregüle olan hücre sinyal yolları ve metabolik süreçler tespit edilmiş ve moleküler hedefli kemoterapötik ilaçlar geliştirilmiştir (2). Öte yandan, bilimsel araştırmalarla elde edilen bu kazanımlara rağmen HCC, kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaya devam etmektedir. Bu sorunun üstesinden gelinebilmesi için devam eden bilimsel çalışmalar arasında HCC'de rol oynayan önemli moleküllerin belirlenmesine ve bu moleküllerin fonksiyonlarının aydınlatılmasına yönelik temel bilim araştırmaları yeni keşiflere temel teşkil etmeleri nedeniyle önemli bir yer tutmaktadır.

The Cancer Genome Atlas (TCGA) konsorsiyumu, 2017 yılında *Cell* dergisinde yayımladıkları çalışmalarında TCGA kohortunda çoklu omik veri analizleri yapılan HCC hastaları arasında *LZTR1* geninin sıklıkla mutasyona uğradığını ve bu genden kodlanan proteinin HCC'deki işlevlerinin bilinmediğini rapor etmiştir (3). *LZTR1* proteininin işlevlerine ilişkin ilk kapsamlı veriler ise 2018 yılının sonunda ve 2019 yılında *Science* dergisinde yayımlanan üç makale ile yayımlanmış olup bu çalışmalarda *LZTR1* proteininin kanonik RAS proteinlerinin ve kanonik olmayan bir RAS protein ailesi üyesi olan RIT1 proteininin poliubikitinlenerek proteazomal parçalanmaya yönlendirilmesinde rol oynayarak hücre içi RAS/mitojen activated protein kinase (RAS/MAPK) sinyalini baskılayıcı işlev gösterdiği belirlenmiştir (4-6). Bu yayınların ardından *LZTR1* üzerinde yapılan çalışmalar hız kazanmış olup, günümüzde *LZTR1*'in HCC dahil birçok farklı kanser tipinde tümör baskılayıcı rolü bulunduğu bilinmektedir. Öte yandan, *LZTR1*'in post-translasyonel modifikasyon sürecindeki işlevlerini ortaya koyan makalelerden daha önce *LZTR1* proteininin hücre içinde sitoplazmaya ek olarak çekirdeğe de lokalize olabildiği ve transkripsiyonel düzenleyici proteinler olan lōsin fermuar proteinlerine kısmen benzediği rapor edilmiştir (7, 8). Ancak *LZTR1*'in transkripsiyonel düzenleyici işlevi hakkında

bilgimiz bulunmamaktadır.

Bu bilgiler göz önünde bulundurularak “HCC hücrelerinin gen ekspresyonunun düzenlenmesinde LZTR1’in fonksiyonel etkileri vardır” hipotezi oluşturulmuştur.

Bu tez çalışması ile, LZTR1’i ifade eden Hep3B hücre hattında *LZTR1* genini nakavt edip karşılaştırmalı analizler yaparak LZTR1’in HCC hücrelerindeki transkripsiyonel etkilerinin aydınlatılmasına yönelik bilgiler elde edilmesi planlanmıştır.

Bu doğrultuda tez çalışmasının amacı, kontrol Hep3B ve CRISPR/Cas9 yöntemiyle *LZTR1* geninin nakavt edildiği Hep3B hücrelerinin RNA örnekleriyle karşılaştırmalı transkriptomik analizler yaparak Hep3B hücrelerinde *LZTR1* geninin protein kodlayan genlerde yol açtığı ekspresyon değişikliklerinin belirlenmesidir. Bu amaca ulaşmak için tez kapsamında belirlenen hedefler;

1. CRISPR/Cas9 genom düzenleme yöntemiyle *LZTR1* geninin nakavt edildiği Hep3B hücre klonunun hazırlanması,
2. RNA örneklerinin hazırlanması ve RNA dizilemelerinin gerçekleştirilmesi,
3. Transkriptomik veri analizlerinin gerçekleştirilmesi ve
4. Biyoenformatik analizlerle ekspresyon farklılığı gösterdiği belirlenen genlerden seçilenlerin qRT-PCR yöntemiyle doğrulanmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. LZTR1 Literatürü

2.1.1. *LZTR1* Geni ve Yabancı Tip LZTR1 Proteini

LZTR1 geni, kromozom 22q11 bölgesinde lokalize olup 21 ekzona sahiptir. LZTR1'in referans diziler veri tabanında (RefSeq) tanımlı bir adet transkripti ve bundan çevrilen bir adet protein izoformu bulunmakta ve LZTR1 proteini 840 amino asitten oluşmaktadır (9). LZTR1 proteininin amino asit dizisinin lösin fermuar protein ailesi üyelerine gösterdiği kısmi homoloji nedeniyle *LZTR1* geni tanımlandığında ilk olarak bu proteinin bir transkripsiyon düzenleyici olduğu düşünülmüş ve bu nedenle gene "Leucine Zipper Like Transcription Regulator 1" (*LZTR1*) adı verilmiştir (7). Ardından LZTR1 proteininin fonksiyonu hakkında yapılan çalışmalardan ilkinde LZTR1'in hücre içinde, nükleus dışında sitoplazmada ve kısmen Golgi kompleksiyle kolokelize olduğu gösterilmiştir (8). LZTR1 hakkında daha sonradan yapılan fonksiyonel çalışmalarda ise LZTR1'in transkripsiyonel düzenleyici rolü araştırılmamış olup, LZTR1'in post-translasyonel düzenleyici işlevlerini ortaya koyan bulgular elde edilmiştir. LZTR1 proteini hakkında elde edilen fonksiyonel verilerin LZTR1'in post-translasyonel düzenleyici işleve sahip olduğunu göstermesi nedeniyle LZTR1'in adı yakın zamanda "Leucine Zipper Like Post Translational Regulator 1" (*LZTR1*) olarak değiştirilmiştir (10).

95 kDa ağırlığında olan LZTR1 proteininin üzerinde, protein-protein etkileşiminde işlev gösterdikleri bilinen altı adet Kelch, iki adet BTB ve iki adet BACK domaini bulunmaktadır. Bu nedenle LZTR1, BTB ve Kelch protein domainlerine bir arada sahip olan proteinlerin oluşturduğu BTB-Kelch protein ailesinin bir üyesidir. Bu ailedeki proteinlerin genel olarak çeşitli ubiquitin ligazlarla ve substratlarla etkileştikleri ve ubiquitin ligazların substrat proteinlere ubiquitin post-translasyonel modifikasyonu eklemesinde adaptör görevi gördükleri bilinmektedir (11). Nitekim LZTR1 proteinin de CUL3 isimli bir E3 ubiquitin ligaz ile doğrudan etkileştiği gösterilmiştir (12). Daha sonra yapılan çalışmalarla LZTR1 ile CUL3 proteinlerinin etkileşimlerinin fonksiyonu daha iyi aydınlatılmıştır. Buna göre, LZTR1 proteininin bir yandan BTB domaini aracılığıyla CUL3 proteiniyle etkileşirken bir yandan da Kelch domainleri aracılığıyla kanonik RAS proteinleri (HRAS, KRAS ve NRAS) ve yine RAS protein ailesi üyesi olan RIT1 proteiniyle etkileştiği ve LZTR1'in adaptör görevi sayesinde CUL3 ubiquitin ligazın RAS ve RIT1 proteinlerine ubiquitin modifikasyonları eklendiği ve bu yolla RAS ve RIT1 proteinlerinin proteazomal parçalanmaya yönlendirildiği

belirlenmiştir (4-6, 13, 14). LZTR1 proteininin BACK domaininin işlevi hakkında ise proteinin homodimerizasyonu ve yarılanma ömrü üzerinde etkisinin olduğu bilgileri bulunmaktadır (6, 12, 13). CUL3, RAS ve RIT1 proteinlerine ek olarak LZTR1 proteininin yine RAS/MAPK sinyal yolağının önemli bileşenlerinden olan RAF1, SHOC2 ve PPP1CB proteinleriyle de etkileştiği belirlenmiş olmakla birlikte bu etkileşimlerin LZTR1 proteininin hangi domainleri aracılığıyla gerçekleştiği aydınlatılmamıştır (15). Kanonik RAS proteinlerindeki mutasyonlar kanser tiplerinin yaklaşık üçte birinde görülen önemli sürücü mutasyonlardır. Ayrıca, RAS proteinlerindeki mutasyonlar dışındaki nedenlerle RAS/MAPK sinyal yolağının aşırı aktivitesinin de karsinogenezi artıran önemli bir faktör olduğu da bilinmektedir (16). Bu nedenlerle yabancıl tip (WT) LZTR1 proteini hakkındaki bilgiler dikkate alındığında, LZTR1 proteininin hem doğrudan RAS proteinleriyle etkileşip proteazomal parçalanma yoluyla hücre içindeki RAS proteinlerinin miktarını azaltma işlevine hem de RAS/MAPK yolağındaki diğer başka proteinlerle de etkileşme fonksiyonuna sahip olması nedenleriyle LZTR1, hücre içindeki RAS/MAPK sinyalini azaltacak yönde düzenleyen potansiyel bir tümör baskılayıcı olarak dikkat çekmektedir.

2.1.2. LZTR1 Genindeki Germ Hattı Mutasyonlarının İlişkilendirildiği Hastalıklar

LZTR1 genindeki çeşitli germ hattı mutasyonlarının Non-immune hydrops fetalis (NIHF) (OMIM: 236750) isimli fetal ve erken yenidoğan dönemde görülen ölümcül bir patolojiye (17), otozomal resesif kalıtmımlı Noonan sendromu (NS) tip 2'ye (OMIM: 605275), otozomal dominant kalıtmımlı NS tip 10'a (OMIM: 616564) (18, 19) ve Schwannomatoz tip 2 (SWNTS2) yatkınlığına (OMIM: 615670) (20, 21) neden olduğu bilinmektedir.

NIHF, prenatal dönemde, bağışıklık yanıtı dışındaki nedenlerle yumuşak dokularda ve/veya vücut boşluklarında aşırı sıvı birikimiyle karakterize ölümcül bir nadir hastalıktır. NIHF'nin görülme sıklığı 1/1 500-1/3 000 olup mortalite oranı %50-98'dir (22). Yüzden fazla tek gen mutasyonu NIHF'nin genetik etiyolojisiyle ilişkilendirilmiş olup, bu genlerden biri de *LZTR1*'dir (17, 23). NIHF'nin moleküler etiyopatogenezi henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte RAS/MAPK sinyal yolağındaki sorunların fetal dönemde NIHF gelişiminde rol oynayan başlıca nedenler arasında olduğunu belirten bir çalışma bulunmaktadır (24).

NS, 1/1 000-1/2 500 yenidoğanda bir görülen ve genetik olarak heterojen bir nadir hastalıktır (19, 25). NS'nin karakteristik bulguları arasında; geniş spektrumlu konjenital kalp defektleri (pulmoner kapak darlığı, hipertrofik kardiyomiyopati, atriyal septal defektler),

kanama sorunları, kısa boy ve dismorfik yüz görünümü (geniş alın, üçgen yüz, yüksek damak, pitozis, hipertelorizm, aşağı doğru sarkan palbebral fisürler, düşük yerleşimli arkaya dönük kulak) yer almaktadır. Ayrıca hastaların bir kısmında; iskelet anomalileri, hafif mental retardasyon, yeleli boyun, hematolojik anormallikler nedeni ile kanamaya meyil ve kriptorşidizm nispeten sıklıkla görülen bulgulara da rastlanmaktadır (25, 26). NS'nin etiyojisini tanımlamaya yönelik çalışmalarla NS'nin 14 farklı tipi ve NS'ye benzer fenotipe sahip iki farklı hastalık tipi tanımlanmış olup NS tiplerinin *PTPN11 (SHP2)*, *LZTR1*, *KRAS*, *SOS1*, *RAF1*, *NRAS*, *BRAF*, *RIT1*, *SOS2*, *MRAS*, *RRAS2*, *MAPK1 (ERK2)*, *SPRED2*, *SHOC2* ve *PPP1CB* genlerindeki mutasyonlarla ortaya çıktığı belirlenmiştir (27, 28). Ayrıca literatürde *MAP2K1 (MEK1)* (29, 30), *MAP2K2 (MEK2)* (30-32), *HRAS* (30) ve *CBL* (33) genleri üzerindeki nadir varyasyonların da NS ile ilişkili olabileceği rapor edilmiş olup, bu genler OMIM veri tabanında NS ile ilişkilendirilmemiştir. NS ile ilişkilendirilen genlerin hepsinin RAS/MAPK sinyal yolağında görevli proteinleri kodladıkları belirlenmiştir. Bu nedenle NS, Rasopatiler adı verilen ve RAS/MAPK sinyal yolağındaki proteinleri kodlayan genlerdeki germ hattı mutasyonları neticesinde ortaya çıkan hastalık grubundandır (27). NS'nin iki farklı tipinin *LZTR1* genindeki mutasyonlarla ortaya çıkıyor olması *LZTR1*'in RAS/MAPK sinyal yolağındaki önemine işaret etmektedir. *LZTR1*'in NS etiopatogenezindeki rolüne ilişkin yürütülen fonksiyonel çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu konuyla ilgili olarak Sewduth vd.'nin (34) bir çalışması bulunmaktadır. Bu çalışmada, *LZTR1* mutasyonu nedeniyle ortaya çıkan NS hastalarındaki kanama sorunlarının mekanizması araştırılmış olup, tüm vücutta veya koşullu olarak sadece vasküler hücrelerde *Lztr1*'in nakavt edildiği fareler incelenerek *Lztr1* kaybının anormal vasküler sızıntılara ve kardiyovasküler işlev bozukluklarına yol açtığı gözlenmiştir (34).

LZTR1 genindeki germ hattı mutasyonların ilişkilendirildiği hastalıklardan bir diğeri olan SWNTS, sinir aksonlarını çevrelemek üzere farklılaşmış schwann hücrelerinden köken alan ve schwannoma olarak adlandırılan iyi huylu tümörlerin gelişimi ile karakterize erişkin başlangıçlı bir tümör yatkınlık sendromudur (35). Schwannomatozun etiyojisinde, 22q11.2-q12.2 kromozom lokusunda 8.7 Mb'lık bir bölgeye yerleşik olan *SMARCB1* ve *NF2* (Schwannomatoz 1; SWNTS1) (OMIM: 162091) ile *LZTR1* (Schwannomatoz 2; SWNTS2) (OMIM: 615670) genlerindeki mutasyonlar rol oynamaktadır (20, 21). *LZTR1*'e bağlı SWNTS2 otozomal dominant kalıtım gösterirken, tümör oluşumunun heterozigotluk kaybına bağlı olarak geliştiği de farklı hasta serilerinde yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (20, 21, 35). SWNTS1 ile ilişkili *NF2* geni tarafından kodlanan Merlin proteini, RAS sinyal

yolağının RAS/RAF/MEK/ERK (36-38), PI3K/AKT (39) ve mTORC1 (40) gibi farklı kademelerinde sinyal baskılayıcı olarak görev alan bir proteindir. SWNTS etiyojisi ile ilişkili diğeri bir gen olan *SMARCB1*'in kodladığı protein, kromatin düzenleme komplekslerinden SWI/SNF kompleksi üyesi olduğı bilinmektedir ve AKT sinyal yolağı üzerinde etkili olabileceğini gösteren veriler mevcuttur (41). LZTR1 proteininin RAS/MAPK yolağında RAS proteinlerinin parçalanmasında doğrudan fonksiyonu olarak sinyalin baskılanmasında rolü olan bir proteindir. *SMARCB1*, *NF2* ve *LZTR1* genlerindeki germ hattında meydana gelen ve tek alleli etkileyen mutasyonlar schwannom gelişimine yatkınlık sağlarken ilerleyen yaşlarda schwann hücrelerinde bu üç genden birinde heterozigotluk kaybına neden olan somatik mutasyonlar neticesinde schwannoma isimli kanser tipi ortaya çıkmaktadır. Bu bilgiler, LZTR1'in bir tümör baskılayıcı olduğunu desteklemektedir.

Son olarak, yakın zamanda, LZTR1'in idrar kesesinin karnın orta hattında açık bir şekilde oluşmasıyla karakterize konjenital bir ürogenital malformasyon olan mesane ekstrofisinin genetik etiyojisinde de yer alıyor olabileceğini ortaya koyan çalışmalar yayımlanmış olmakla birlikte bu konuyla ilgili fonksiyonel çalışma verileri bulunmamaktadır (42-46).

2.1.3. LZTR1'in İlişkilendirildiğı Kanser Tipleri

LZTR1 genindeki somatik mutasyonların ilişkilendirildiğı kanser tiplerinden biri glioblastoma multiformedir (GBM). GBM, beyin kanserlerinin en malignant tipi olup birçok farklı gen ve yolak GBM ile ilişkilendirildiğinden GBM'nin etiopatolojisi karmaşıktır ve yeterince anlaşılamamıştır. GBM'de deregüle olduğı bilinen yolaklardan bir tanesi RAS sinyal yolağıdır (47, 48). *LZTR1* geninin GBM ile ilişkisi ilk kez Frattini vd. (12) yayınında belirlenmiştir. Bu çalışmada, GBM hastalarının ekzom dizileme ve DNA kopya sayısı verilerini inceleyerek GBM hastalarının %4.4'ünde *LZTR1* geninde homozigot yanlış anlamlı mutasyonların bulunduğı ve %22.4'ünde *LZTR1* geninin içinde yer aldığı kromozom 22q11 bölgesinin homozigot delesyona uğradığı belirlenmiştir. *LZTR1* geninde tanımlanan mutasyonlar üzerinde fonksiyonel çalışmalar yaparak LZTR1 proteininin CUL3 E3 protein ligazla etkileştiğinin ve GBM ilişkili bazı mutasyonların bu etkileşimi bozduğunun ilk kez bu yayında gösterilmiş olması nedeniyle Frattini vd.'nin yayını LZTR1 literatüründe önemli bir yer tutmaktadır (12).

LZTR1 proteininin farklı kanser tiplerindeki rollerine ilişkin literatürdeki bir diğer veri akut myeloid lösemiye (AML) yönelik çalışmalardan elde edilmiştir. AML, hematopoietik projenitör hücrelerin farklılaşmasındaki kusurlar ve ardından çoğalmalarıyla ortaya çıkan ve çok hızlı bir şekilde ilerleyen bir hematolojik kanser tipidir. AML tedavisinde kemoteropatik ajan olarak Sorafenib kullanılabilmekte ve AML hastalarında Sorafenib'e karşı direnç gelişebilmektedir. Damnersawad vd. yaptıkları çalışmada, bir AML hücre hattında CRISPR/Cas9 yöntemiyle tarama yaparak *LZTR1* geninin nakavt edilmesinin RAS/MAPK ve mTOR yollarının aşırı aktifleşmesine ve hücrelerin Sorafenib muamelesine olan duyarlılığının azalmasına neden olduğunu belirlemişlerdir (49). Chen vd. de hematopoietik kök hücrelerde LZTR1'in kalıcı olarak susturulmasının RIT1 proteininin parçalanmadan kaçmasına neden olduğunu ve RIT1 protein düzeyindeki artış sebebiyle lösemi geliştiğini belirleyerek LZTR1'in lösemi gelişimi hususundaki tümör baskılayıcı rolünü destekleyen bulgular elde etmiştir (50).

LZTR1 proteininin pankreas kanseri hücrelerinde de RAS proteinlerinin proteazomal parçalanmasını sağladığı belirlenmiştir. Bu çalışmada ek olarak, LZTR1 proteininin fonksiyonunun GSK3 α ve GSK3 β kinazları tarafından yönetildiği de belirlenmiştir (51). GSK proteinlerinin HCC, kolanjiyokarsinom, meme kanseri, prostat kanseri ve melanoma gibi çeşitli kanser tiplerinde deregüle olduğu bilinen önemli proteinler arasındadır (52). Bu nedenle bu çalışmanın bulguları LZTR1 proteininin moleküler fonksiyonlarının ve farklı biyolojik süreçlerdeki ilişkilerinin aydınlatılmasına katkı sağlaması nedeniyle ayrıca önem taşımaktadır.

LZTR1'in akciğer adenokarsinomunda da tümör baskılayıcı işleve sahip olduğu belirlenmiştir. Abe vd. (53) yaptıkları çalışmayla, akciğer adenokarsinom hücrelerinde LZTR1 eksikliğinin hücre proliferasyonunu, invazyonu, ksenograft tümör büyümesini ve metastazı artırdığı belirlemişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada, LZTR1 eksikliğinin kollajen salımını artırarak akciğer metastazını ve metastatik tümör çevresinde hücre dışı matriks birikimini artırdığı ve bu durumun metastatik hücrelerin göçünü kolaylaştırdığı da belirlenmiştir (53). Bu çalışmanın verileri, LZTR1'in kanser hücrelerinin metastazını engelleyici rolüne işaret etmesi bakımından dikkat çekicidir.

LZTR1 proteininin tümör baskılayıcı rolünü ortaya koyan çalışmaların aksine akrall melanomada LZTR1 proteininin fonksiyonunun araştırıldığı bir çalışmada LZTR1'in bir onkogen ve tedavi hedefi olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, melanoma hücre hatlarında

LZTR1 geni small hairpin RNA (shRNA) kullanılarak susturulduğunda hücre hatlarında apoptotik hücre ölümünün arttığı, ama normal insan melanosit hücrelerinde *LZTR1* ektopik olarak ifade ettirildiğinde ise tutunmadan büyüme, sferoid oluşumu ve MAPK ile SRC aktivitelerinin artması gibi çeşitli metastatik özelliklerin arttığı belirlenmiştir (54). Bu çalışmanın verileri, *LZTR1* proteininin tüm kanser tipleri için tümör baskılayıcı olmadığını ve *LZTR1*'in hücre içindeki diğer proteinlerin varlığına ve fonksiyonlarına bağlı olarak (İng. context-dependent) farklı işlevler gösterebildiğini ortaya koyması bakımından ayrıca önem taşımaktadır.

Bahsi geçen çalışmalara ek olarak, literatürde kanser hastalarının doku örnekleriyle yapılan yeni nesil dizileme çalışmalarının verilerine dayanarak *LZTR1*'in hastalıkla ilişkili aday gen olabileceği yorumlarının yapıldığı çeşitli vaka çalışmaları da bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, lenf nodülüne metastaz yapan bir ungual melanom (tırnağın altında veya çevresinde oluşan melanom tipi) hastasının tümör dokusundan alınan örneklerle ekzom dizileme ve analizi yaparak belirlenen varyasyonlar içinde *LZTR1* ve *KIT* genlerinde tespit edilen varyasyonların hastada ungual melanom gelişimiyle ilişkili olabileceği rapor edilmiş olup, bu yorumu destekleyecek fonksiyonel veriler sunulmamıştır (55). Başka bir vaka takdimi çalışmasında, malign gastrointestinal nöroektodermal tümör (GNET) isimli nadir ve agresif bir tümör tanısı koyulan bir hastada *LZTR1* genindeki bir germ hattı mutasyonunun GNET ile ilişkili olabileceğinden bahsedilmiş olup, bu yoruma ilişkin ilave kanıtlar sunulmamıştır (56). Diğer bir vaka raporunda, hipofiz makroadenomundan kaynaklanan hipofiz rabdomyosarkoma tanılı bir bireyin tümör doku numunesiyle ekzom dizileme çalışması yapılmış ve hastada *TP53*, *ATRX*, *LZTR1* ve *NFI* genlerinde varyasyonlar belirlendiği rapor edilmiştir (57).

LZTR1 literatüründe *LZTR1*'in prostat kanserinde de önemli olabileceğine dair iki adet yayın bulunmaktadır. Yapılan ilk çalışmada Song vd. prostat kanserinin biyokimyasal tekrarını tahmin etmek için ubikuitin ilişkili aralarında *LZTR1*'in de bulunduğu altı adet geni biyobelirteç olarak belirlemiştir (58). Diğer çalışmada ise Zhang vd. androjen eksikliği tedavisinden önce ve sonra lokal olarak nüksetmiş hastalardan aldıkları örneklerle tüm ekzom dizilime analizleri yaparak aralarında *LZTR1*'in de bulunduğu altı genin kastrasyona dirençli prostat kanseri gelişimine katkı sağlıyor olabileceğini belirlemiştir (59).

2.1.4. Hepatoselüler Karsinom ve LZTR1

Karaciğer kanseri, dünyada her yıl tanısı koyulan yaklaşık 906 000 yeni vaka ile en sık teşhis edilen kanser tipleri arasında yedinci sırada olup, yıllık yaklaşık 830 000 vefat ile sırasıyla akciğer ve kolorektal kanserlerin ardından dünyada kansere bağlı ölüm nedenleri arasında üçüncü sıradadır. Primer karaciğer kanserlerinin farkı tipleri bulunuyor olup, karaciğer kanserlerinin %85'ini HCC oluşturmaktadır. HCC oluşumuna neden olan başlıca risk faktörleri hepatit B veya C virüsü, aflatoksinle kontamine yiyecekler, aşırı alkol tüketimi, obezite, tip iki diyabet ve sigara tüketimidir (1). Sağlıklı karaciğerde HCC gelişmesi birkaç basamakta gerçekleşmekte ve bu sürece hepatoselüler karsinogenez adı verilmektedir. Buna göre, ilk basamakta hepatit virüsü enfeksiyonu veya aşırı alkol tüketimi gibi risk faktörleri sağlıklı karaciğerde hasara yol açmakta ve oluşan hasarın giderilmesi için hepatositlerin proliferasyonu artmakta ve fibroz mekanizmaları devreye girmektedir. Bu durumun uzun süre devam etmesi, hepatositlerde telomer kısalmasına neden olmakta ve hasar devam ettikçe hepatositlerin telomerlerinin daha da kısalması senesensi tetikleyerek hücre döngüsünün durmasına yol açmaktadır. Bu durum, kliniğe karaciğer sirozu olarak yansımaktadır. Siroz aşamasında hasarın devam etmesi durumunda telomerase enzimini aktive edebilen hepatositin ortaya çıkması halinde senesens bariyeri yıkılır ve bu hücreler sırasıyla hiperplastik nodül, displastik nodül ve erken aşama HCC şeklinde ilerler. Erken aşamadaki HCC hücrelerinin başlıca karakteristik özellikleri epitel hücre özelliklerini hala büyük oranda koruyor olmalarıdır. Bu nedenle erken aşamadaki HCC “iyi diferansiye HCC” veya “epitel benzeri HCC” olarak da adlandırılmaktadır. Bu aşamadaki HCC hücrelerinde ayrıca sıklıkla kromozom kararlılığının korunduğu, WNT/ β -catenin ve IL6-JAK-STAT yolunun bozulduğu ve hücrelerin ileri aşamadakilere kıyasla daha az agresif veya invazif oldukları belirlenmiştir. Erken aşamadaki HCC'nin ilerlemesiyle ileri evre HCC ortaya çıkmaktadır. İleri evredeki HCC hücrelerinin epitel hücre özelliklerini kaybetmiş olmaları nedeniyle bu aşamadaki HCC hücreleri ayrıca “kötü diferansiye HCC” veya “mezenkimal benzeri HCC” olarak da adlandırılmaktadır. İleri evredeki HCC hücrelerinde sıklıkla kromozomal kararsızlık, *TERT* promotöründe ve p53 geninde mutasyon, hücre döngüsü, RAS/MAPK, AKT/mTOR, WNT/ β -catenin ve MET sinyal yollarında bozulma, aşırı agresif ve invazif olma ve ilaç tedavisine yüksek direnç gösterme farklılıkları görülmektedir (2, 60). HCC'nin sistemik tedavisinde kullanılmak üzere günümüzde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış sekiz ilaç bulunmaktadır (61). İlk hatta kullanılan ilaçlar, 2017 yılına kadar HCC tedavisinde onaylı tek ilaç olan Sorafenib ve Lenvatinib olup

bu ilaçlara direnç gelişmekte ve hasta saę kalımı en fazla 13 ay uzatılabilmektedir. Bu nedenle ikinci hat tedavide kullanılmakta olan Regorafenib, Cabozantinib ve Ramucirumab gibi ilaçlar da hasta saę kalımını en çok 10 ay uzatabilmektedir (62). Mevcut sistemik ilaç tedavi yöntemlerinin HCC hastalarının saę kalımına katkısının sınırlı olması nedeniyle yeni tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. HCC gelişiminde rol oynayan sürücü mutasyonların ve etkiledikleri proteinlerin hücre sinyal yollarındaki ve gen ifadelerinin düzenlenmesindeki fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacak bilimsel araştırmalar HCC tedavisinde yaşanan sorunların aşıłmasına önemli katkılar sağlama potansiyeli taşımaktadır.

Günümüzde çok sayıda kanser hastasının numunelerinin tüm genom dizileme, ekzom dizileme, mesajcı RNA (mRNA) dizileme, kopya sayısı değişikliği, mikro RNA (miRNA) dizileme, metabolomik ve proteomik verilerinin elde edilip ham veya işlenmiş verilerin bilimsel araştırma amacıyla kullanılmak üzere paylaşıldığı çeşitli veri tabanları bulunmaktadır. Farklı kanser tipi sayısının, hasta örneği sayısının ve veri tipi sayısının fazla olması ve erişim ve kullanım kolaylığı gibi çeşitli nedenlerle bu veri tabanlarından önde geleni TCGA veri tabanı ve ilişkili internet siteleridir (63). TCGA Ağı'nın 2017 yılında yayımlanan çalışmasında TCGA veri tabanındaki HCC hastalarına ait çoklu omik veriler analiz edilerek elde edilen bulgular paylaşılmıştır. Bu çalışmada, 363 HCC hastasının ekzom dizileme yöntemiyle elde edilen somatik mutasyon verileri analiz edilerek hastalarda en sık mutasyon görülen genler belirlenmiştir. Bu listede *TP53* (%31), *CTNNB1* (%27), *ARID1A* (%7), *AXIN1* (%8) ve *ARID2* (%5) gibi HCC gelişiminde rol oynadığı daha önceden bilinen sürücü genlerde TCGA veri tabanındaki hastalarda da yüksek oranda mutasyon görüldüğü belirlenmiş olmakla birlikte daha önceden HCC ile ilişkilendirilmemiş olan bazı genler de mutasyon sıklığı yüksek olan aday sürücü genler olarak nitelendirilmiştir. Bu çalışmada belirlenen aday sürücü genlerden birisi *LZTR1*'dir. TCGA HCC kohortunda ekzom dizileme verileri analiz edilen 363 hastanın 10'unda (%3) *LZTR1* geninde somatik mutasyonlar belirlenmiş olup bu oranın somatik mutasyonları daha önceden HCC ile ilişkilendirilmiş önemli genler arasında yer aldığı bilinen *KRAS* (%1), *NRAS* (%1) ve *CDKN2A* (%2) gibi genlerin mutasyon sıklığından daha yüksek olması dikkat çekmektedir (3).

LZTR1'in HCC'deki fonksiyonlarını araştırıldığı daha yakın tarihli bir çalışmada ise Yi vd., HCC hastalarına ait transkriptom verilerini analiz edilerek LL22NC03-N14H11.1 isimli uzun protein kodlamayan RNA'nın (LncRNA'nın) HCC hastalarında ve incelenen

HCC hücre hatlarında ifadesinin yüksek olduğunu, c-Myb isimli bir transkripsiyon düzenleyici proteini *LZTR1*'in promotörüne yönlendirerek c-Myb'in *LZTR1* gen ifadesini baskılamasını sağladığını, LL22NC03-N14H11.1 ve LZTR1 RNA düzeylerinin zıt yönde korelasyon gösterdiğini, Hep3B, SNU449, HUH-7 ve SKHep1 isimli HCC hücrelerinde LZTR1 düzeyleri incelenerek bu hücre hatlarında en yüksek *LZTR1* gen ifadesinin Hep3B hücre hattında olduğunu, HCC hücrelerinde LZTR1 protein düzeyinin azalmasının RAS/MAPK sinyal yolağının aşırı aktif hale gelmesine ve mitokondriyel fizyonun hızlanmasına neden olduğunu belirlemiştir (64).

LZTR1'in HCC'deki rolüne ilişkin literatürde az sayıda çalışma bulunmakla birlikte, LZTR1'in HCC hastalarındaki somatik mutasyon yüzdesinin yüksek olması ve LZTR1'in çeşitli kanser hastalıklarında ve nadir hastalıklarda RAS/MAPK yolağının aktivitesini düzenlediğinin belirlenmiş olması LZTR1'in HCC'de önemli roller oynuyor olabileceğine işaret etmektedir. Öte yandan, transkripsiyonel düzenleyici işlevlere sahip oldukları bilinen lösin fermuar proteinlerine içeren amino asit dizilimi benzerliği taşıdığı bildirilmiş olan LZTR1 proteininin transkripsiyonel düzenleyici işlevine ilişkin çalışmaların yapılmamış olmasının LZTR1'in işlevlerinin aydınlatılması önünde literatürde dikkat çekici bir eksiklik olduğu değerlendirilmektedir.

2.2. CRISPR/Cas9 Sistemi

Bakterilerde adaptif bir bağışıklık sistemi oluşturan Sınıf 2, Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrar (CRISPR) sistemleri, genom mühendisliği için modifiye edilmiştir. CRISPR'dan önce, çinko parmak nükleazları (ZFN) veya transkripsiyon-aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN) gibi genom mühendisliği yaklaşımları, bilim insanlarının her genomik hedef için yeni bir nükleaz çifti tasarlamasını ve üretmesini gerektiriyordu. Karşılaştırmalı basitliği ve uyarlanabilirliği nedeniyle CRISPR hızla en çok tercih edilen genom düzenleme uygulaması haline gelmiştir (65, 66).

CRISPR sistemleri iki bileşen içerir. Bunlar, kılavuz RNA (gRNA veya sgRNA) ve CRISPR-ilişkili endonükleaz (Cas proteini)'dir. gRNA, Cas enziminin bağlanması için gerekli bir iskele dizisinden ve değiştirilecek genomik hedefi tanımlayan yaklaşık 20 nükleotit uzunluğunda kısa bir sentetik RNA'dır. CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak genler nakavt edilirken gRNA'ların yanı sıra Protospacer Adjacent Motif (PAM) de önemlidir. PAM dizileri hedef bölgenin bitişiğindedir ve Cas9'un bağlanması için bağlanma sinyali görevi görür. CRISPR/Cas9 sisteminin çalışmasıyla hedef DNA bölgesinde çift zincir kırığı

oluşur. Oluşan kırık iki farklı DNA tamir sistemi ile tamir edilebilir. Bunlar hata ihtimalinin yüksek olduğu homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ve hata ihtimalinin çok düşük olduğu homoloji yönlendirmeli tamir (HDR) sistemleridir. DNA’da oluşan çift zincir kırıkları HDR ile doğru bir şekilde tamir edilir. Ama NHEJ sistemi ile tamir edilirken farklı sonuçlar oluşabilir. Bu sistem ile çift zincir kırıkları, sorunsuz bir şekilde tamir edilebilir, delesyon oluşabilir, insersiyon oluşabilir veya hem delesyon hem de insersiyon (INDEL) oluşabilir (65, 66).

CRISPR çalışmalarında hedef spesifikliğini arttırmak için Cas9’un D10A mutanlığı olan Cas9 nikaz (Cas9n) geliştirilmiştir. Cas9n hedef DNA bölgesinde çift zincir kırığı yerine tek zincir kırığı oluşturur. Bu yüzden DNA’da çift zincir kırığı oluşturabilmek için hedef bölgenin zıt zincirlerine bağlanan iki adet gRNA kullanılır (65, 66).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasallar

Agar	Merck, 1.016.130.500
Akrilamid/Bisakrilamid solüsyonu	Bio-Rad, 1610146
Amonyum persülfat (APS)	Sigma, A9164
Ampisilin	Sigma, A9518-5G
Baktotripton	Condalab, 1612
Beta merkaptotanol	Merck, 8.057440.0250
Bromofenol mavisi	Merck, 1.08122.005
Deoksinükleotit trifosfatlar (dNTPs)	Promega, U1420
Di-potasyum fosfat	Sigma, 1551128
Di-sodyum hidrojen fosfat	Merck, M1065801000
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific, R0861
EDTA disodyum dihidrat	AppliChem, A2937.0500
Etidyum bromid	Sigma, E-7637
Etil alkol	CHEMLAB, CL00.0505.5000
Fenil metil sülfonil florid (PMSF)	Sigma, 1741932998611
Glasiyel asetik asit	Merck, 1.00056.2500
Gliserol	Santa Cruz Biotechnology, sc-29095
HEPES	Sigma, H0887
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 1.00314.2500
İzopropanol	AppliChem, A3928,0500PE
Kalsiyum klorür	Merck, 910TA654681
NP-40	Sigma, 74385
Orange G	Sigma, O-1625

Oligonükleotit primerler	Macrogen
Ponceau S	Sigma, 78376-10G-F
Proteaz inhibitor kokteyl tableti	Sigma, S8830
Proteinaz K	Promega, V3021
SeaKem® LE Agaroz	Lonza, 50004L
Sefadex® G-50	Sigma, S5897-25G
Sodyum deoksikolat	Santa Cruz Biotechnology, Sc-28067
Sodyum fosfat dibazik	Sigma, NIST200B
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck, 822050
Sodyum florür	Sigma, S7920
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, 1.06462
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, 1.01540.0500
Sodyum ortovanadat	Sigma, S6508
Sodyum pirofosfat	Sigma, 446061347236111
Sodyum karbonat	Merck, 106392
TEMED	AppliChem, A1148.0100
Tris-Baz	AppliChem, A2264.1000
Tris-HCl	Merck, 1.01547.0.100
Triton X-100	Sigma, 9002-93-1
Tween 20	J. T. Baker, 73-74
Yeast extract	Merck, VM445253 22

3.1.2. DNA ve Protein Markırları

100 bp DNA ladder	Thermo Fisher Scientific, SM0321
GeneRuler 1 kb DNA ladder	Thermo Fisher Scientific, SM0311
Prestained Protein Ladder	Abcam, ab116027

3.1.3. Antikorlar

3.1.3.1. Primer Antikorlar

Anti-LZTR1	Novus Biologicals, NBP1-77121
Anti-panRAS	Abcam, ab52939
Anti-RIT1	Abcam, ab53720
Anti-MEK 1/2	Cell Signaling Technology, 4694S
Anti-p-MEK 1/2 (S217/221)	Cell Signaling Technology, 9154S
Anti-ERK 1/2	Santa Cruz Biotechnology, sc-514302
Anti-p-ERK 1/2 (T202/Y204)	Thermo Fisher Scientific, MA5-36265
GAPDH	Cell Signaling Technology, 2118S
Anti-Alfa-Tubulin	Cell Signaling Technology, 3873S

3.1.3.2. Sekonder Antikorlar

Anti-fare- horseradish peroxidase (HRP)	Bio-Rad, 170-5047
Anti-tavşan-HRP	Bio-Rad, 170-5045

3.1.4. Besiyeri ve Antibiyotikler

DMEM (4.5 g/L Glukoz)	Thermo Fisher Scientific, 41966-029
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, 10500-064
L-Glutamin	Biological Industries, 03-020-1B
Esansiyel olmayan amino asitler (NEAA)	Thermo Fisher Scientific, 11140-050
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific, 31985-070
Penicillin/Streptomycin (Pen./Strep.)	Thermo Fisher Scientific, 1514022
Puromisin	Thermo Fisher Scientific, A11138-03
RPMI-1640	Thermo Fisher Scientific, 31870-025
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific, 25200-05

3.1.5. Kitler ve Enzimler

BbsI (BpiI) (10 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific, ER1011
BCA protein konsantrasyonu belirleme kiti	Thermo Fisher Scientific, 23227
BlasTaq™ 2X qPCR Master Mix	Abm, G891
Cycle Sequencing Kit	NimaGen, BRD3-100
Clarity™ Western ECL Substrat	Bio-Rad, 170-5060
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, K1231
Endo-free Plasmid DNA Mini Kit I	Omega Bio-tek, D6948-01
Plasmid DNA Mini Kit I	Omega Bio-tek, D6943-01
FuGENE	Promega, E2313
Go Taq G2 Flexi DNA Polimeraz	Promega, M7805
HiPure Gel Pure DNA Mini Kit	Magen, D211102
Hi-T4™ DNA Ligaz	New England Biolabs, M2622
iScript™ cDNA Sentez Kiti	Bio-Rad, 1708890
Mycoplasma Detection Kit	Abm, G238
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel, 740955.50
NucleoSpin® Tissue	Macherey-Nagel, 740952.50
T4 Polinükleotit Kinaz (PNK)	New England Biolabs, M0201S

3.1.6. Sarf Malzemeler

Falkon tüpler (15 ve 50 mL)	Isolab, Almanya
Kültür flaskı (25 ve 75 cm ²)	Corning, ABD
Mikrosantrifüj tüpler (1.5 mL)	Eppendorf, Almanya
Nitroselüloz membran (0.45 μ m)	Bio-Rad, 1620115
Mikropipet uçları	Axygene, ABD
Serolojik pipetler (5, 10 ve 25 mL)	SPL, Güney Kore
Steril plastik pastör pipeti	Isolab, Almanya

Whatman kâğıdı 3MM	GE Healthcare, 3030-917
6 kuyulu plaka	Sarsted, 83.3920
12 kuyulu plaka	Sarsted, 83.3921
24 kuyulu plaka	Sarsted, 83.3922
96 kuyulu plaka	Thermo Fisher Scientific, 130188
60 mm petri kabı	Sarsted, 83.3901
100 mm petri kabı	Sarsted, 83.3902

3.1.7. Cihazlar

Accuri C6 Flow Sitometri	Becton Dickinson (BD), ABD
Bulaşık makinesi	Bosch, Almanya
Buzdolabı (+4°C)	Bosch, Almanya
Buz makinesi	Hoshaizaki, Japonya
ChemiDoc™ MP görüntüleme sistemi	Bio-Rad, ABD
CO ₂ 'li etüv	Heraeus, Almanya
Çalkalayıcı inkübatör	GFL, Almanya
Derin dondurucu (-20°C)	Bosch, Almanya
Dikey elektroforez ve immünoblot sistemi	Bio-Rad, ABD
Distile su cihazı	GFL, Almanya
Doğru akım güç kaynağı (300 Volt)	Bio-Rad, ABD
Floresan mikroskop	Nikon E80, Japonya
Genetik analizör cihazı	ABI 3130, ABD
Hassas terazi	AHAUS, ABD
Inverted mikroskop	Nikon, Japonya
Isı döngüsü cihazı	Gene Amp 9700, ABD
Isı döngüsü cihazı	Techne TC512, İngiltere
Jel görüntüleme sistemi	Gel Logic 2000, Kodak

Sınıf II steril kabinler	Metisafe, Türkiye
Manyetik karıştırıcı	IKA, ABD
Merdaneli karıştırıcı	Stuart, İngiltere
Mikrodalga fırın	Arçelik MD554, Türkiye
Mikrosantrifüj	Hettich, Almanya
Mikrosantrifüj	Thermo Fisher Scientific, ABD
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, ABD
Orbital karıştırıcı	Nüve SL 350, Türkiye
Otoklav	Tutnauer 3150 ELV, İtalya
Pastör fırını	Memmert, Almanya
pH metre	Hanna, Portekiz
qPCR cihazı – LightCycler 480 II	Roche, İsviçre
Sıcak su banyosu	Stuart, İngiltere
Sıvı azot tankı	Thermo Fisher Scientific, ABD
Soğutmalı yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5804R, Almanya
Sonikatör VCX500	Sonics-Vibracell, ABD
Spektrofotometre	Eppendorf, Almanya
Termomikser	Eppendorf, Almanya
Vakum pompası	Isolab, Fransa
Vorteks	IKA, ABD
Yatay elektroforez düzeneği	HU13, İngiltere
Yüksek devirli santrifüj	Eppendorf 5810, Almanya
Zaman ve hız ayarlı rotator	Stuart, İngiltere
-80°C derin dondurucu	Thermo Fisher Scientific, ABD

3.1.8. Bakteri Suşları

Tüm vektörlerin çoğaltılmasında *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α bakteri suşu kullanıldı.

DH5α Genotipi

F- recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1.

3.1.9. Kullanılan Vektörler

Cas9n ekspresyon vektörü olarak pSpCas9n(BB)-2A-Puro (pX462) V2.0 (Addgene, 62987) kullanılmıştır. INDEL analizlerinde CloneJET kitinin (Thermo Fisher Scientific, K1232) pJET1.2/blunt vektörü kullanılmıştır.

3.1.10. Kullanılan Hücre Hatları

Çalışmada kullanılan, HepG2 hücresi bölümümüzdeki hücre hattı bankasından temin edilirken; HUH7, Hep3B, PLC, Focus, SKHep1, SNU449 ve SNU398 hücre hatları İzmir Tınaztepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK'ten temin edilmiştir. HEK293 Flp-In hücreleri (Thermo Fisher Scientific, R75007) satın alınıp kullanılmıştır. HEK293 Flp-In LZTR1 V773M ve I821T hücreleri, 119S356 numaralı TÜBİTAK 3501 projesiyle hazırlanmıştır.

3.1.11. Besiyerleri, Solüsyonlar ve Tamponlar

3.1.11.1. Bakteri İçin Kullanılan Besiyerleri

Luria Bertani Besiyeri

Luria Bertani (LB) besiyeri hazırlanırken, 5 g tripton (Bacto), 2.5 g maya özütü (Bacto) ve 5 g NaCl 400 mL dH₂O içerisinde çözüldü. Karışımın pH'ı, 3N sodyum hidroksit ile 7.2'ye ayarlandı ve hacim 500 mL'ye tamamlandı. Besiyeri, 1.2 atmosfer basınçta, 121°C'de 20 dk. otoklavlanarak steril edildi.

Luria Bertani Agar Besiyeri

Luria Bertani Agar (LBA) besiyeri, LB sıvı besiyerine %1.5 oranında agar eklenerek hazırlandı. LB agar besiyeri 1.2 atmosfer basınçta, 121°C'de 20 dk. otoklavlanarak steril edildi. LBA besiyeri oda sıcaklığında saklanıp kullanılacağı zaman önce mikrodalga fırının defrost ayarında ısıtıldıktan sonra sıcaklığının 50-55°C'ye düşmesi için oda sıcaklığında

bekletilip kullanıldı. Çoğaltılacak vektörün antibiyotik seçilimine göre besiyerine 100 µg/mL ampicilin eklendikten sonra 60 mm çapında petri kaplarına 9'ar mL olacak şekilde dağıtıldı.

3.1.11.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

50X Tris-Asetat-EDTA Tamponu

Tris-Asetat-EDTA (TAE) tampon hazırlanırken ilk olarak 242 g Tris baz (MA: 121.14 g/mol) 500 mL dH₂O içerisinde çözüldü. Ardından, çözelti üzerine 57.1 mL %100 glasiyel asetik asit ve 100 mL 0.5 M EDTA çözeltisi (pH: 8.0) eklendi. Sonrasında karışımın pH'ı sodyum hidroksit ile 8.5'e ayarlandı ve çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Çalışma solüsyonu dH₂O ile 1:50 oranında seyreltilerek hazırlandı. Stok ve çalışma solusyonları oda sıcaklığında saklandı.

Etidyum Bromür Solüsyonu

Toz haldeki etidyum bromürden deiyonize distile su ile konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde solüsyon hazırlandı. Işıktan korumak için koyu renkli bir şişede karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

10X Orange DNA Yükleme Tamponu

20 g sükroz 40 mL dH₂O içerisinde çözüldü. Ardından 100 mg Orange G ilave edilerek dH₂O ile 50 mL'ye tamamlandı.

3.1.11.3. SDS Poliakrilamit Jel Elektroforezi ve Western Blotlama Solüsyonları

Ayırma Jeli Tamponu, 1.5 M (pH: 8.8)

36.33 g Tris baz (MA: 121.14 g/mol) 180 mL çift distile suda çözüldü. 12 N HCl solüsyonu ile pH 8.8'e ayarlanarak son hacim çift distile su ile 200 mL'ye tamamlandı ve 0.2 µm por çaplı filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklandı.

Yükleme Jel Tamponu, 0.5 M Tris-HCl (pH: 6.8)

6.057 g Tris baz (MA: 121.14 g/mol) 90 mL distile suda çözülerek 12 N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı. Sonrasında toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı ve 0.2 µm filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklandı.

%10 SDS

10 g SDS (M_A : 288.37 g/mol) 100 mL distile su içerisinde çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

10X Tris Glisin Tamponu

30.3 g Tris baz (M_A : 121.14 g/mol) ve 144 g glisin (M_A : 75.07 g/mol) 1 L çift distile su içerisinde çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu (1 X)

890 mL çift distile su üzerine 10X Tris-Glisin tamponundan 100 mL alınarak üzerine 10 mL %10'luk SDS (son konsantrasyon %0.01) eklenerek son hacim 1 litreye tamamlandı.

%10 APS

1 g APS (M_A : 228.18 g/mol) 10 mL çift distile suda çözüldü. Alikotlanıp, -20°C'de saklandı.

5X SDS-PAGE Yükleme Tamponu

Son konsantrasyonları 0.25 M Tris-HCl (pH: 6.8), %50 gliserol, %10 SDS, %0.01 bromofenol mavisi olacak şekilde solüsyon 10 mL hacimde hazırlandı ve -20°C'de saklandı. Kullanılmadan önce final konsantrasyon 0.5 M olacak şekilde DTT ilave edildi.

% 40 Akrilamid\Bisakrilamid

29:1 oranında %40 Akrilamid\Bisakrilamid solüsyonu kullanıldı (Bio-Rad, 1610146) ve 4°C'de muhafaza edildi.

SDS-PAGE Transfer Tamponu

Sırası ile 800 mL distile su üzerine 100 mL 10X Tris glisin tamponu ve son olarak 100 mL metanol eklenerek son hacim 1 L olacak şekilde hazırlandı.

Ponceau S

0.2 g Ponceau S tartılıp 250 mL'lik cam şişeye koyuldu. Üzerine bir miktar çift distile su eklenerek çözünmesi sağlandı. Son olarak, 10 mL asetik asit eklendi ve çift distile su ile 200 mL'ye tamamlandı.

%20 Tween 20

20 mL stok Tween 20, 80 mL distile su ile çözüldü ve homojen hale gelen %20 Tween 20 solüsyonu oda sıcaklığında saklandı.

10X TBS Stoğu

24 g Tris-HCl (M_A : 157.60 g/mol), 5.6 g Tris-base (M_A : 121.14 g/mol), 88 g NaCl (M_A : 58.44 g/mol), 800 mL distile su içerisinde çözdürüldükten sonra 12N HCl ile pH 7.6'ya ayarlandı. Distile su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı.

1X TBS-Tween 20

450 mL distile su ile 10X TBS'den 50 mL alınarak 1X TBS hazırlandı. Son konsantrasyon %0.05 olacak şekilde %20'lik Tween 20 solüsyonundan 1,250 μ L eklendi ve hazırlanan 1X TBS-Tween 20 (TBS-T) oda sıcaklığında saklandı.

1 M-Tris HCl (pH: 7.4)

24.22 g Tris baz 180 mL distile su ile çözüldü, pH'ı 12 N HCl ile 7.4'e ayarlandıktan sonra hacim distile su ile 200 mL'ye tamamlandı. Solüsyon otoklavlanarak oda sıcaklığında saklandı.

5 M NaCl Çözeltisi

73.05 g NaCl (M_A : 58.44 g/mol) tartılarak 250 mL deiyonize su içinde çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.

0.5 M EDTA Çözeltisi

37.2 g EDTA tartılarak deiyonize su içinde çözüldü. NaOH ile pH 8.0'a ayarlandı ve hacim 200 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

% 20 Triton X-100

20 mL Triton X-100 deterjanı 80 mL deiyonize su içinde çözüldü. Triton X 100'ün iyice çözünebilmesi için 37°C'de 5-10 dk bekletildi. Oda sıcaklığında saklandı.

%10 NP-40

Bir şişeye 10 mL NP-40 ve 90 mL distile su eklendi. Karıştırılarak homojen bir karışım oluşması sağlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

%10 Sodyum Deoksikolat

10 g Sodyum deoksikolat (M_A : 414.55 g/mol) 100 mL distile su içerisinde çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

Proteaz İnhibitörleri

10X Proteaz Karışım Solüsyonu

1 adet proteaz karışım (PI) tableti 10 mL çift distile su içinde çözülerek 10 kat yoğun (10X) karışım hazırlandı. Alikotlanarak -20°C 'de saklandı.

100X PMSF (100 mM)

0.174 g PMSF (M_A : 174.19 g/mol) 10 mL etanol ile çözüldü. Solüsyon alikotlanarak -20°C 'de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde kullanıldı.

Fosfataz İnhibitörleri

100X Sodyum Ortovanadat (200 mM)

3.68 g Sodyum Ortovanadat (M_A : 183.91 g/mol) 90 mL çift distile su ile çözüldü. Sarı renkli solüsyon renksiz olana kadar kaynatıldı. Oda sıcaklığına gelene kadar soğuduktan sonra 1 N NaOH'ı ile pH 10.0'a ayarlandı ve 100 mL'e tamamlandı. Solüsyon alikotlanarak -20°C 'de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde kullanıldı.

50X Sodyum Florür (1M)

4.2 g sodyum florür (M_A : 41.99 g/mol) 100 mL çift distile su ile çözülerek 1 M olarak hazırlandı. Solüsyon alikotlanarak -20°C 'de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde 50 kez seyreltilerek kullanıldı.

20X Sodyum Pirofosfat (100 mM)

4.44 g pirofosfat (M_A : 444.06 g/mol) 100 mL çift distile su ile çözülerek hazırlandı. Solüsyon alikotlanarak -20°C 'de saklandı. Çalışma konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde kullanıldı.

Radio-Immunoprecipitation Assay Hücre Patlatma Tamponu

50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM sodyum klorür, %1 NP-40, %0.5 Sodyum deoksikolat, 1 mM EDTA, %0.1 SDS, 5 mM sodyum pirofosfat, 1x PI karışımı, 20 mM sodyum florür, 2 mM sodyum ortovanadat ve 1 mM PMSF çift distile su içerisinde hazırlandı. Hazırlanan radio-immunoprecipitation assay (RIPA) tamponu, patlatma öncesi

buzda bekletilerek soğutulup kullanıldı.

3.1.11.4. Memeli Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar

%10 FBS ve %1 Pen./Strep. içeren DMEM Besiyeri

89 mL DMEM besiyerine 10 mL FBS ve %1 Pen./Strep. eklenerek hazırlandı. Besiyeri +4°C’de saklandı.

%10 FBS, %1 Pen./Strep. ve %1 MEM-NEAA içeren DMEM Besiyeri

88 mL DMEM besiyerine 10 mL FBS, %1 Pen./Strep. ve %1 MEM-NEAA eklenerek hazırlandı. Besiyeri +4°C’de saklandı.

%10 FBS, %1 Pen./Strep. ve %1 L-Glutamin içeren RPMI-1640 Besiyeri

88 mL RPMI-1640 besiyerine 10 mL FBS, %1 Pen./Strep. ve %1 L-Glutamin eklenerek hazırlandı. Besiyeri +4°C’de saklandı.

10X PBS Stoğu

1.37 M sodyum klorür (M_A :58.44 g/mol), 26.8 Mm potasyum klorür (M_A : 74.56 g/mol), 0.1 M sodyum fosfat dibazik (M_A : 141.96 g/mol), 17.6 mM monobazik potasyum fosfat (M_A : 136.09 g/mol) 800 mL distile su ile hazırlandı. Solüsyonun pH’ı 1 N HCl ile 7.4’e ayarlandı. Distile su ile son hacim 1 L’ye tamamlandı ve 1.2 atmosfer basınçta, 121°C’de 20 dk. otoklavda steril edildi.

1X PBS Tamponu (1 L)

900 mL çift distile su üzerine 10X PBS tamponundan 100 mL eklenerek son hacim 1 L’ye tamamlandı. 1.2 atmosfer basınçta, 121°C’de 20 dk. otoklavda steril edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Kullanılan Hücreler

Tez çalışmalarına başlamadan önce yedi adet hepatoselüler karsinoma (HCC) hücre hattında LZTR1 protein seviyeleri WB yöntemi ile belirlenmiştir. Bunlar; HepG2, HUH7, Hep3B, PLC, SKHep1, SNU449 ve SNU398 hücreleridir. WB deneylerinde LZTR1 protein bantının belirlenmesi için pozitif kontrol örneği olarak, 119S356 numaralı TÜBİTAK 3501 projesi kapsamında hazırlanmış olan FLAG ve Hemaglutinin (HA) etiketli LZTR1 proteinini kalıcı olarak ifade eden insan embriyonik böbrek 293 (HEK293) Flp-In FLAGHA-LZTR1 V773M (Mutant 1) ve I821T (Mutant 2) hücre hattı kullanılmıştır.

3.2.1.2. Hücre Kültür Şartları

Tez çalışmasında kullanılan HepG2, HUH7, Hep3B, PLC, SKHep1 hücre hatları %1 Pen./Strep., %1 MEM-NEAA ve %10 FBS içeren yüksek glukozlu DMEM (4.5 g/L glukoz) besiyerinde çoğaltılırken, SNU449 ve SNU398 hücre hatları %1 Pen./Strep., %1 L-Glutamin ve %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyerinde yetiştirildi. HEK293 Flp-In LZTR1 V773M (Mutant 1) ve I821T (Mutant 2) hücreleri %1 Pen./Strep. ve %10 FBS içeren yüksek glukozlu DMEM (4.5 g/L Glukoz) besiyerinde çoğaltıldı. Tüm hücreler, 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültürde tutuldu.

3.2.1.3. Hücre Çözme

Sıvı azot tankından alınan hücreler 37°C sıcaklığındaki su banyosunda çözüldü. Çözme işlemi sırasında tüp içerisinde bir miktar buz bırakıldı. Hücreler, içerisinde 3 mL %10 FBS içeren besiyeri olan 15 mL’lik tüpe aktarıldı. Ardından hücreler 120 x g’de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj yapıp süpernatantlar uzaklaştırıldı. Pelletler, %20 FBS içeren uygun besiyeri ile süspanse edildi. Hücre süspansiyonu kültür kabına aktarıldı. Kültür kabı zeminden kaldırılmadan, her yöne sallanarak hücrelerin homojen bir biçimde tabana dağılmaları sağlandı. Kültür kabı 37°C’lik CO₂’li (%5) inkübatöre bırakıldı. Yaklaşık 16 saat sonra kirli besiyer uzaklaştırıldı. %10 FBS içeren besiyer eklenerek kültüre devam edildi.

3.2.1.4. Hücre Pasajlama

Hücrelerin doluluk oranı %85-90 olunca hücreler pasajlandı. Kültür kabındaki kirli besiyeri uzaklaştırıldı. Bir kere 1X PBS ile yıkandı. 1X tripsin/EDTA eklenerek, 37°C'deki inkübatörde 5 dk. inkübe edildi. %10 FBS içeren besiyer eklenerek tripsin inhibe edildi. Pipetaj yapılarak hücre süspansiyonu 15 mL'lik tüpe aktarıldı. Kültür kabına %10 FBS içeren besiyer eklendi. Hücre süspansiyonunun 1/10'u kültür kabına aktarıldı. Kültür kabı zeminden kaldırılmadan her yöne sallanarak hücrelerin homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Kültür kabı 37°C'lik CO₂'li (%5) inkübatöre bırakıldı.

Hücrelerde mikoplazma kontaminasyonunun olup olmadığı, mikoplazma belirleme kiti kullanılarak test edildi.

3.2.1.5. Hücre Dondurma

Hücrelerin kirli besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile 1-2 kere yıkandı. Yıkama sonrası hücrelerin üzerine 1X tripsin/EDTA eklenerek inkübatöre kaldırıldı. Hücreler 5 dk. inkübatörde bekletildi. Süre sonunda %10 FBS içeren besiyeri eklendi. Hücreler pipetaj yapılarak, steril 15 mL'lik falkon tüpe aktarıldı ve 120 x g'de 5 dk. santrifüj edildi. Besiyeri uzaklaştırılarak pellet üzerine 1X PBS eklenerek hücreler süspanse edildi ve tekrar 120 x g'de 5 dk. santrifüj edildi. Pelletin üzerine daha önceden hazırlanmış ve soğutulmuş, %20 FBS içeren uygun besiyerinden 900 µL eklendi. Ardından hücreler vidalı dondurma tüpüne aktarıldı ve 15 dk. buz içinde bekletildi. Süre sonunda tüplere 100 µL DMSO eklendikten sonra pipetaj yapılarak karıştırıldı ve tüpler buz içinde 15 dk. daha bekletildi. Süre sonunda tüpler -20°C'de 1 saat bekletildi. 1 saat sonra tüpler -80°C dondurucuya kaldırıldı. Ertesi gün, hücreleri uzun süre saklayabilmek için -80°C'de bekleyen hücreler sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.2.2. pSpCas9n(BB)-2A-Puro (pX462) Ekspresyon Plazmidlerinin Hazırlanması

3.2.2.1. LZTR1 sgRNA Kodlayan Nükleotit Dizilerinin Belirlenmesi, Oligomerize Edilmesi ve Oligomerlerin pX462 Vektörüne Aktarılması

Hep3B hücre hattında *LZTR1* geninin CRISPR/Cas9 yöntemiyle nakavt edilmesi için hedef DNA ipliğindeki PAM dizilerini tanıyarak aynı iplikte PAM dizisinin yanından kesim yapan Cas9 D10A nickase mutantını (Cas9n) ifade eden ve aynı zamanda guide RNA (gRNA) oligomerlerinin klonlanarak ifade ettirilebildiği pX462 vektörü kullanıldı (65). Cas9n enziminin insan *LZTR1* geninin 1. ekzonuna yüksek doğrulukla hedeflenmesi için

kullanılacak sgRNA dizileri Benchling biyoenformatik aracı kullanılarak belirlendi (67). Belirlenen LZTR1-sgRNA'larına karşılık gelen DNA dizileri ve zıt yönlü tamamlayıcı karşılıkları uçlarında BbsI restriksiyon enzimi tanıma dizileri bulunacak şekilde sipariş edilip kullanıldı (Tablo 1). Cas9n enzimini insan genomuna yönlendirmediği için negatif kontrol gRNA olarak kullanıma uygun olduğu bilinen scrambled kontrol (SC) gRNA (68) kodlayan oligonükleotit dizilerini (Tablo 1) daha önceden 118Z124 kodlu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında pX462 vektörüne klonladığımızdan kontrol plazmidi yeniden hazırlanmayıp transforme edilip çoğaltılarak kullanıldı.

Tabo 1. pX462 vektörüne aktarılan sgRNA'ları kodlayan oligonükleotit dizileri.

Sıra	Oligonükleotit DNA adı	Oligonükleotit dizisi (5'-3')	Kullanım amacı
1	LZTR1 sgRNA-1 F	CACCGCCGCCCTGCGACGAGTTCGT	Cas9n enziminin <i>LZTR1</i> geninin 5'-3' yönündeki DNA ipliğine yönlendirilmesi
2	LZTR1 sgRNA-1 R	AAACACGAACTCGTCGCAGGGCGGC	
3	LZTR1 sgRNA-2 F	CACCGCAGCGATGCACTGTTTCGAA	Cas9n enziminin <i>LZTR1</i> geninin 3'-5' yönündeki DNA ipliğine yönlendirilmesi
4	LZTR1 sgRNA-2 R	AAACTTCGAAACAGTGCATCGCTGC	
5	Scrambled sgRNA_F	CACCGTATTACTGATATTGGTGGG	Negatif kontrol gRNA dizileri
6	Scrambled sgRNA_R	AAACCCCAACCAATATCAGTAATAC	

Tek iplikli halde sipariş edilen birbirlerine tamamlayıcı LZTR1 sgRNA-1 (Tablo 1) ve LZTR1 sgRNA-2 (Tablo 1) oligonükleotit çiftleri T4 PNK kullanılarak oligomerize edildi. Reaksiyon içeriği ve reaksiyon koşulları Tablo 2'de sunulmuştur (Tablo 2).

Tablo 2. Oligomerizasyon reaksiyon içeriği ve reaksiyon koşulları.

Reaksiyon İçeriği	Miktar (μL)
T4 PNK reaksiyon tamponu (10X)	1
İleri sgRNA (10 pmol/μL)	1
Geri sgRNA (10 pmol/μL)	1
T4 PNK enzimi	1
dH ₂ O	6
Toplam	10
Sıcaklık (°C)	Süre
37	30 dk.
95	5 dk.
25	5 dk.

BbSI restriksiyon enzimi tanıma dizileri bulunan oligonükleotitlerin pX462 vektörüne aktarılabilmesi için pX462 vektörü BbSI enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. BbSI ile kesim reaksiyonunun içeriği Tablo 3'te sunulmuştur (Tablo 3). Kesim 37°C'de 16 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi.

Tablo 3. BbsI ile kesim reaksiyonunun içeriği.

Kesim Reaksiyonu İçeriği	Miktar (μL)
Cas9n pX462 (0.4 μg/μL)	5.8
10X G Buffer	5
BbsI (Bpil)(10 U/μL)	2.5
dH ₂ O	36.7
Toplam	50

Süre sonunda, kesilen plazmid DNA'lar DNA temizleme kitinin 'PCR ürününden veya enzim reaksiyonundan saf DNA elde etme' protokolüne uyularak temizlendi.

Magen DNA temizleme kitinin “PCR Ürününden veya Enzim Reaksiyonundan Saf DNA Elde Etme” Protokolü

Reaksiyon hacminin iki katı Tampon GDP eklenip iyice karıştırıldı. Kolon 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Karışım kolona aktarıldı. Oda sıcaklığında 12.000 x g'de bir dk. santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Kolona 650 μL Tampon DW2 eklendi. 12.000 x g'de bir dk. santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Kolona tekrardan 650 μL Tampon DW2 eklendi. 12.000 x g'de bir dk. santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Kolonu kurutmak için 12.000 x g'de 1 dk. santrifüjlendi. Kolonu temiz bir 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Kolon membranının merkezine 25-50 μL elüsyon tamponu veya dH₂O eklendi. Oda sıcaklığında iki dk. bekletilip, 12.000 x g'de 1 dk. santrifüj yapıldı. 2 μL'si %0,8'lik agoroz jelde

yürütülüp, görüntülenerek kontrol edildi. Konsantrasyonları ve kalite değerleri Nanodrop 2000 ile belirlenip kaydedildi.

Tablo 4. pX462 vektörüne ligasyon reaksiyonunun içeriği.

Ligasyon ürünlerinden 5 µL alınarak 50 µL kompetan *E. coli DH5α* bakterilerine ‘*E. coli DH5α* Transformasyon Protokolüne’ uyularak transforme edilip, ampisilin (100 µg/mL) içeren agarlı LB besiyerinde bakteri kültürü yapıldı.

Transformasyon için önceden Inoue metoduyla süper kompetan hale getirilmiş *E.coli DH5α* bakteri suşu -80°C’den çıkarılarak buza alındı. Transformasyon için ligasyon ürününün 5 µL’si 50 µL *E. coli DH5α* kompetan bakteri içeren 1,5 mL’lik tüpe eklendi. Karışım 30 dk. buz içinde tutuldu ve her 10 dk.’da bir parmakla hafifçe vurularak karıştırıldı. İnkübasyon sonunda bakteriler 2 dk. 42°C’de ısı şokuna maruz bırakıldı. Ardından 2 dk. buzda bekletildi. Tüpler steril kabine alınarak üzerine 800 µL LB besiyeri eklendi. Tüpler 1 saat süreyle 37°C’deki çalkalamalı etüvde 220 rpm’de inkübe edildi. Süre sonunda hücre süspansiyonu 15 000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi ve hücre pelleti 800 µL LB ile yıkandı. İkinci santrifüjden sonra hücre pelletine 50 µL besiyeri eklendi ve hücreler 100 µg/mL ampicilin içeren LB-Agar petrilere yayılarak ekildi. Petriler 37°C’lik inkübatörde 16 saat inkübe edildi.

Çoğalan bakteriler toplanarak miniprep kiti ile plazmid DNA'lar izole edildi. İzolasyon kitin protokolüne uyularak yapıldı.

Plazmid DNA Mini Kit I ile Plazmid DNA İzolasyonu Protokolü

Hazırlanan bakteri kültürlerinin tamamı, 10 000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi ve son santrifüjden sonra süpernatant tamamen uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 270 µL Solüsyon I/RNaz A (10 mg/µL) eklendi ve vorteks işlemi ile pellet tamamen süspanse hale getirilerek parçalanması sağlandı. Karışıma Solüsyon II'den 270 µL eklenerek, tüpler 5-6 kez alt-üst edildi ve berrak bir lizat oluşumu sağlandı. Lizatlar 4-5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu aşamada DNA'nın kırılmasını önlemek için şiddetli alt-üst etmeye ve inkübasyon süresini aşmamaya dikkat edildi. Süre sonunda lizatlara 370 µL Solüsyon III eklendi ve beklemeden 5-6 kez alt-üst edilerek beyaz topaklar şeklinde presipitat oluşması sağlandı. Örnekler 14 000 x g'de 10 dk. santrifüj edildi. 2 mL'lik DNA kolonlarına 120 µL 3M NaOH solüsyonu eklenerek 14 000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanın tamamı dengelenen kolonlara aktararak 14 000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Kolon üzerine 500 µL HBC solüsyonu eklendi. Kolonlar 14 000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Filtrat atıldı ve 700 µL DNA Wash solüsyonu kolonlara eklenerek 14 000 x g'de 30 saniye (sn.) santrifüj edildi. Filtrat atıldı ve 700 µL DNA Wash solüsyonu kolonlara eklenerek 14 000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Kolonlar, alkol kalıntılarını uzaklaştırmak için 14 000 x g'de 3 dk. santrifüj edildi. Kolonlar temiz 1.5 mL'lik tüplere transfer edilerek üzerlerine 70 µL elüsyon solüsyonu eklendi ve 2 dk. inkübe edildi. Sonrasında tüpler 14 000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Elde edilen plazmidlerden 2'şer µL alınıp %0.6'lık agaroz jelde 80 V'ta 60 dk. yürütülerek kontrol edildi. Örneklerin konsantrasyonları ve kalite değerleri Nanodrop 2000 cihazı ile belirlenip kaydedildi.

3.2.2.2. Klonlanan gRNA'ların pX462 Vektörünün İçerisinde Olduğunun Sanger Dizileme Yöntemiyle Kontrol Edilmesi

Dizileme reaksiyonlarının içeriği ve PCR şartları Tablo 5'te sunulmuştur (Tablo 5). Hazırlanan pX462 plazmid DNA'larındaki gRNA kodlayan dizilerin varlığı, hazırlanan plazmidler ve pX462 sekanslama primeri F (Tablo 6) ile Sanger dizileme yapıldı.

Tablo 5. Sanger dizileme PCR içeriği ve PCR koşulları.

Reaksiyon İçeriği	Miktar (µL)	
BigDye Buffer (5X)	1.5	
F ya da R (10 pmol/µL)	0.32	
Vektör DNA (0,3 µg/µL)	2.5	
BigDye	1	
dH ₂ O	4.68	
Toplam	10	
PCR Döngüleri	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç denatürasyonu	96	2 dk.
Denatürasyon	96	15 sn.
Bağlanma	50	15 sn.
Sentez	60	2 dk.
Bekleme	10	beklet

25X

Sekanslama PCR'larıyla elde edilen ürünler Sephadex G-50 kaplı kolonlardan geçirilerek temizlendi. Temizlenen örnekler, Genetik Analizör cihazı (ABI 3130) ile dizilendiler. DNA dizileme verileri, SnapGene Viewer v7.2 programı ile görüntülendi.

Tablo 6. Kullanılan primerlerin listesi.

Sıra	Primer adı	Primer dizisi 5'-3'	Kullanım amacı
1	pX462 sekanslama primeri F	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC	pX462 içindeki oligomerlerin Sanger yöntemi ile dizilenmesi
2	LZTR1 Ekzon 1 F1	GTAGGCTTGTCGGAAGAG	LZTR1 CRISPR/Cas9n hedef bölgesinin amplifikasyonu ve dizilenmesi için kullanılan birinci primer çifti
3	LZTR1 Ekzon 1 R1	CTGTACAGCACCATCCACC	
4	LZTR1 Ekzon 1 F2	CGCCAGTACATAGCCTGAAACG	LZTR1 CRISPR/Cas9n hedef bölgesinin amplifikasyonu ve dizilenmesi için kullanılan ikinci primer çifti
5	LZTR1 Ekzon 1 R2	TCCTCAGGACCCCATGAAGC	
6	pJET1.2 sekanslama primeri F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	pJET1.2 vektörüne klonlanan PCR ürünlerinin dizilenmesi
7	pJET1.2 sekanslama primeri R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	

3.2.2.3. gRNA Kodlayan Dizileri İçeren pX462 Plazmid DNA'larının Çoğaltılması ve Endotoksinsiz Plazmid İzolasyonu Protokolü

gRNA'ları kodlayan DNA dizilerini içeren pX462 plazmidleri "*E.coli DH5α* Transformasyon Protokolüne" uygun olarak *E. coli DH5α* kompetan hücrelerine transforme edilip, ampisinli LB agarlara yayıldı. Ardından hücreler 37°C'lik etüvde 16 saat inkübe edildi. Transformasyon petrilerinde çoğalan kolonilerden ikişer adet koloni seçilerek 5 mL ampisinli LB sıvı besiyerine inoküle edilip, 37°C'lik çalkalayıcı inkübatörde 16 saat inkübasyona bırakıldı. Endotoksinsiz plazmid izolasyonu protokolüne uyularak izolasyon yapıldı.

Endotoksinsiz Plazmid DNA İzolasyonu Protoklü

Memeli hücrelerine transfekte edilecek ekspresyon plazmidlerinin izolasyonu Endo-free Plazmid DNA Mini Kit kullanılarak aşağıdaki şekilde oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Kit içerisinde bulunan N3 solüsyonu izolasyon öncesinde buza alındı.

İnkübasyon sonunda bakteri kültürünün tamamı, 10 000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi ve son santrifüjden sonra süpernatant tamamen uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 270 µL Solüsyon I/RNase A eklenerek vorteks yardımı ile pelletin tamamen süspanse hale getirilerek parçalanması sağlandı. Tüplere solüsyon II'den 270 µL eklenerek tüpler 4-5 kez nazikçe alt-üst edildi ve berrak bir lizat oluşması sağlandı. Lizatlar 4-5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu aşamada DNA'nın kırılmasını önlemek için şiddetli alt-üst etmemeye ve inkübasyon süresini aşmamaya dikkat edildi. Süre sonunda lizatlara N3 Solüsyonundan 140 µL eklendi. Örnekler bekletilmeden beş-altı kez alt üst edilerek beyaz presipitatların oluşumu sağlandı. Sonrasında tüpler 14 000 x g'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatantlar yeni bir ependorf tüpe alındı ve hacmi ölçüldü. 2 mL'lik DNA kolonlarına 120 µL 3M NaOH solüsyonu eklendi ve 14 000 x g'de 1 dk. santrifüj edilerek kolonların dengelenmesi sağlandı. Hacmi ölçülen süpernatant üzerine 1:1 oranda ETR Binding Solüsyonu eklendi ve tüp on kere alt-üst edilerek homojen bir karışım elde edildi. Elde edilen sıvı karışımdan 700 µL alınarak kolonlara transfer edildi ve 14 000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı kısım atıldı. Bu işlem tüm sıvı karışım kolondan geçirilene kadar tekrarlandı. Kolona 500 µL ETR Wash solüsyonu eklenerek 14 000 x g'de oda sıcaklığında 1 dk. santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atıldı. Kolonlara 500 µL HBC solüsyonu eklenerek 14 000 x g'de oda sıcaklığında 1 dk. santrifüj edildi. Filtre edilen kısım atıldı ve 700 µL DNA Wash solüsyonu kolonlara eklenerek 14 000 x g'de oda sıcaklığında 30 sn. santrifüj edildi.

Toplama tüpündeki sıvı atıldı. Kolonlara 700 µL DNA Wash solusyonu kolonlara eklenerek 14 000 x g'de oda sıcaklığında 1 dk. santrifüj edildi. Kolonlardaki alkolü uzaklaştırmak için 14 000 x g'de 3 dk. santrifüj edildi. Kolonlar temiz 1.5 mL'lik tüplere transfer edilerek üzerlerine endotoksin içermeyen elüsyon solusyonundan 80 µL eklendi ve 2 dk. inkübe edildi. Kolonlar 14 000 x g'de oda sıcaklığında 1 dk. santrifüj edildi. Elde edilen plazmidlerden 2 µL'si %0.6'lık agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Plazmid DNA'ların konsantrasyon ve kalite değerleri Nanodrop 2 000 cihazı ile ölçülerek kayıt edildi.

3.2.3. Hep3B Hücrelerini 72 Saatte Öldüren Puromisin Dozunun Belirlenmesi

gRNA'ların aktarıldığı pX462 vektörü puromisin direnç geni içermektedir. gRNA'ları içeren vektörler Hep3B hücrelerine trasfekte edildiğinde, transfeksiyondan sonra puromisin antibiyotiği içeren besiyerinde plazmid DNA'nın girmediği Hep3B hücrelerinin ölerek başarıyla transfekte edilen hücrelerin seçilmesi yaklaşımı uygulandı. Puromisine karşı direnç geni eksprese eden Hep3B hücrelerinin seçilimi için 72 saatte Hep3B hücrelerinin tamamını öldüren puromisin dozunu belirlemek için 12 kuyulu plakanın 8 kuyusuna 6×10^5 Hep3B hücresi ekildi. Yaklaşık 22 saat sonra hücreler mikroskopta incelendi. Hücrelerin doluluk oranının %90 civarında olduğu görülünce puromisin dozları hazırlandı. Puromisinin stok konsantrasyonu 10 mg/mL olup 1 mL hacimde, 1 mg/mL'lik puromisin çalışma solusyonu hazırlandı. Seyreltme işlemi tam DMEM ile yapıldı. Ardından, kirli besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler bir kere 1X PBS ile yıkandı. İlk kuyuya puromisin içermeyen 1 mL tam DMEM eklendi. Diğer kuyulara puromisin içeren besiyeriler aktarıldı. Başlangıçta ve 72. saatte inverted mikroskobun kamerası ile hücrelerin fotoğrafları çekildi.

Tablo 7. Farklı dozlarda puromisin içeren karışımların içerikleri.

No	Puromisin dozu (µg)	Besiyer (mL) + 1 mg/mL'den alınacak puromisin miktarı (µL)
1	0	1 mL
2	0.5	1 mL + 0.5
3	0.75	1 mL + 0.75
4	1	1 mL + 1
5	1.25	1 mL + 1.25
6	1.50	1 mL + 1.50
7	2	1 mL + 2

3.2.4. Hep3B Hücrelerine, gRNA'ları İçeren pX462 Vektörlerinin Transfekte Edilmesi

Hep3B hücrelerine, gRNA'ları içeren pX462 vektörlerinin transfeksiyonu için FuGENE transfeksiyon ajanı kullanıldı. Transfeksiyon için ilk olarak iki adet 60 mm'lik petri kabına 3.7×10^6 Hep3B hücresi ekildi. Son hacim 4.5 mL'ye tamamlandı ve Pen./Strep. içermeyen besiyeri kullanıldı. Yaklaşık 22 saat sonra 60 mm'lik petrillerdeki Hep3B hücrelerinin durumları mikroskopta incelendi. Hücreler %90 dolulukta olduğunda transfeksiyon yapıldı. Transfeksiyondan 30 dk. önce FuGENE, Opti-MEM ve plazmid DNA'lar oda sıcaklığına alınarak, sıcaklıklarının oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. LZTR1 gRNA-1 ve gRNA-2 ekspresyon plazmidlerinden 1.25 µg transfekte edilirken, negatif kontrol (Scrambled) gRNA'yı ifade eden plazmid DNA'dan 2.5 µg transfekte edildi.

TABLO 8. Transfeksiyon koşulları.

1. Tüp	4.6 µL Oligo-1 + 4.9 µL Oligo-2 Vektörleri	240.5 µL Opti-MEM
2. Tüp	7.5 µL FuGENE	242.5 µL Opti-MEM
3. Tüp	7.3 µL Negatif Kontrol Oligo Vektörü	242.7 µL Opti-MEM
4. Tüp	7.5 µL FuGENE	242.5 µL Opti-MEM

Dört adet 1.5 mL'lik tüpte Tablo 8'de sunulan karışımlar hazırlandı. FuGENE – Opti-MEM karışımları oda sıcaklığında en fazla 5 dk. bekletildi. Süre sonunda ikinci tüp, birinci tüpe ve dördüncü tüp, üçüncü tüpe aktarılarak pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 20 dk. bekletildiler. Süre sonunda 60 mm'lik petrilere damla damla olacak şekilde aktarıldılar. Petriler inkübatöre kaldırıldı.

24 saat sonra 60 mm'lik petrillerdeki hücrelerin durumları mikroskopta incelendikten sonra negatif kontrol petrisindeki hücreler iki adet 10 cm petriye, CRISPR petrisindeki hücreler sekiz adet petriye farklı dilüsyonlarda pasajlandı. Pasajdan önce petrilerin tabanı cetvel ve kırmızı asetat kalemi yardımı ile eşit bölmelere ayrılarak çizildi ve numaralar verildi. Petrilerin altı çizildikten sonra kabin içerisinde ultraviyole ışına tabi tutuldu.

İki adet 60 mm'lik petrideki kirli besiyer uzaklaştırıldı, bir kez 1X PBS ile yıkandı ve üzerlerine 1 mL 1X tripsin/EDTA eklenip 5 dk. inkübatörde bekletildi. Ardından, petrilere 4'er mL tam DMEM eklendi ve pipetaj yapıp hücreler 15 mL'lik tüpe aktarıldılar. 1. ve 2. 10 cm petriye negatif kontrol (scrambled) hücrelerinden 2'şer mL akatarıldı ve tam DMEM besiyeri ile son hacim 9.5 mL'ye tamamlandı. 3. ve 4. 10 cm petriye LZTR1 CRISPR hücrelerinden 10 kat, 5. ve 6.'ya 20 kat, 7. ve 8.'ye 40 kat, 9. ve 10.'ya 80 kat

seyreltilerek ekildiler. Son hacim tam DMEM ile 9.5 mL'ye tamamlandıktan sonra hücreler inkübatöre kaldırıldılar. 12 saat sonra puromisin (1.75 µg/mL) antibiyotiği eklendi. 72 saat sonra petrilere incelendi. Hücrelerin çoğunun ölmüş olduğu ancak dipte tutunan hücrelerin bulunduğu görüldü. Ardından, petrilereki puromisin içeren kirli besiyeriler uzaklaştırılıp iki kere 1X PBS ile yıkandı. Son olarak, petrilere 10'ar mL puromisin içermeyen tam DMEM aktarıldı ve hücreler inkübatöre kaldırıldı.

3.2.5. Hep3B Scrambled ve Hep3B LZTR1 CRISPR Tek Kolonilerinin Seçilip, Toplanması

Hep3B scrambled ve Hep3B LZTR1 CRISPR kolonileri toplanılabilecek büyüklüğe ulaşınca tabandaki kareler ve sayılar yardımı ile kolonilerin yerleri belirlenip not edildi. Kirli besiyer uzaklaştırıldıktan sonra iki kere 1X PBS ile yıkandı. Yerleri belirlenmiş olan koloniler iç kısımda kalacak şekilde, otoklavlanmış 1000'lik ve 200'lük pipet uçlarının kafası kolonilerin olduğu yerlere dikkatlice yerleştirildi. 1000'lik pipet ucunun kafasının kullanıldığı kolonilere 150 µL 1X tripsin/EDTA, 200'lük pipet ucunun kafasının kullanıldığı kolonilere 75 µL 1X tripsin/EDTA eklendi. Petrinin kapağı kapatılarak dikkatlice, sarsmadan inkübatöre bırakıldı ve 5 dk. inkübe edildi. 24 kuyulu plakalara 500'er µL tam DMEM eklendi. 1000'lik pipet ucu kullanılan kolonilere 150 µL FBS, 200'lük pipet ucunun kullanıldığı kolonilere 75 µL FBS eklenerek tripsin inhibe edildi. Dikkatlice pipetaj yapılarak LZTR1 CRISPR hücre süspansiyonları 24 kuyulu plakalara aktarıldı. Scrambled hücre süspansiyonları 12 kuyulu plakalara aktarıldı. 24 kuyulu ve 12 kuyulu plakalardaki kolonilere isimler verildi. Scrambled yani negatif kontrol kolonilerine 'SC' adı verilip numaralandırılırken LZTR1 CRISPR kolonilerine 'LSKO' adı verilerek numaralandırıldı. Bu şekilde toplamada 22 adet SC kolonisi ve 120 adet LSKO kolonisi seçildi. Doluluk oranları %90-95 civarı olan koloniler tripsinlenerek toplandı. Bir kısmı ile pasaja devam edilirken geriye kalan hücreler WB deneyleri için kullanıldı.

3.2.6. Hep3B SC ve Hep3B LSKO Kolonilerinde WB Yöntemiyle LZTR1 Protein Seviyelerinin İncelenmesi

3.2.6.1. RIPA ile Protein İzolasyonu ve BCA Tahlili

Total protein izolasyonunda hücre pelletleri RIPA lizis tamponu ile buz üzerinde 30 dk. inkübe edilerek patlatıldı. Ardından buz üzerinde sonikasyon yapıp örnekler +4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatantlar yeni tüplere aktarılıp protein lizatı olarak kullanıldı.

Hazırlanan proteinlerin konsantrasyonlarını belirlemek için BCA yöntemine dayalı protein konsantrasyonu belirleme kiti kullanıldı. Buna göre, üçer replika olacak şekilde 96 kuyulu mikrolaka kuyularına seri bovine serum albumin (BSA) dilüsyonu örnekleri ile hazırlanan protein lizatlarından 10'ar μL yüklenip üzerine BCA solüsyonundan 200'er μL eklendi. Mikrolaka 37°C 'de 30 dk. bekletildikten sonra 562 nm 'de ölçüm yapıldı. Elde edilen değerler hesaplanarak örneklerdeki protein konsantrasyonları belirlendi. WB deneylerinde, örneklerden 20 μg protein içeren hacimler alınıp üzerine 5X protein yükleme tamponu 1X olacak şekilde eklenip -20°C 'ye kaldırıldılar.

3.2.6.2. Yürütme ve Yığma Jelinin Hazırlanması

Tez çalışmaları kapsamında %7.5'lik ve %10'luk jeller kullanıldı. Kalın ve ince ayırma camları %70'lik etil alkol ile daha sonra distile su ile yıkandıktan sonra peçete ile kurulandı. Camlar jel standına yerleştirildi. Çalışılan proteinin ağırlığına göre Tablo-9'a göre yürütme jeli uygun yüzdede hazırlandı ve camların arasına aktarıldı. Üst kısmın düzleşmesi için dikkatlice distile su eklendi. Polimerize olması için 40-45 dk. beklendi. Süre sonunda su döküldü. %4'lük yükleme jeli Tablo 10'a göre hazırlandı. Yükleme jelinin üzerine aktarıldı ve 10 veya 15 kuyulu kuyulu tarak yerleştirildi. Polimerize olması için 35-40 dk. beklendi. Süre sonunda jel ıslak peçete ve streç ile sarılarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı.

Tablo 9. %7.5'lik ve %10'luk ayırma jellerinin içerikleri.

İçerik	%7.5(1 mm)	%10 (1 mm)
ddH ₂ O	2.73 mL	2.43 mL
%40 Akrilamid Mix	0.94 mL	1.25 mL
1.5M Tris-HCl (pH: 8.8)	1.25 mL	1.25 mL
%10 SDS	50 μL	50 μL
%10 APS	50 μL	50 μL
TEMED	5 μL	5 μL
Toplam	5 mL	5 mL

Tablo 10. %4'lük yükleme jelinin içeriği.

İçerik	1X (1 mm)
ddH ₂ O	3.15 mL
%40 Akrilamid Mix	0.5 mL
0.5M Tris-HCl (pH: 6.8)	1.25 mL
%10 SDS	50 μL
%10 APS	50 μL
TEMED	3 μL
Toplam	5 mL

3.2.6.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi

Yükleme tamponu ile karıştırılıp -20°C'ye kaldırılan protein örnekleri buza alındı. Örnekler eriyince 99°C'de 5-6 dk. kaynatıldı. Kaynatılan örnekler oda sıcaklığında 13 000 rpm'de santrifüj edildi. +4°C'deki jel alındı. Tarağı dikkatlice çıkarıldı. Kuyular distile su ile yıkanarak temizlendi. Jel, yüklemme aparatına yerleştirildikten sonra tank içerisine yerleştirildi. Tankın içi temiz yürütme tamponu ile doldurulduktan sonra ilk kuyuda protein markır olmak üzere örneklerden 30'ar µL yüklendi. Jel 75 Volt'da 15 dk., jelin yüzdesine ve o anki çalışmaya göre 100 Volt'da 90-120 dk. arasında yürütüldü.

3.2.6.4. Nitroselüloz Membrana Transfer İşlemi ve Görüntüleme

Jel yürütme tankından alındı ve distile su ile yıkanarak yürütme solüsyonu uzaklaştırıldı. Spatula yardımı ile camlar birbirinden ayrıldı. Jel kalın camda bırakıldı. Yüklemme jeli spatula ile kesilerek atıldı. Blotlama işlemi için iki adet altta, iki adet üstte olmak üzere, dört adet Watmann kağıdı, bir adet nitroselüloz memebran ve iki adet sünger yatak 1X transfer tamponu içinde 5-6 dk. tutularak dengelendi. Blotlama kasetinin siyah yüzeyine bir adet sünger yatak yerleştirildi. Islak Whatmann kağıtlardan ikisi, süngerin üzerine dikkatli bir şekilde bırakıldı. Whatmann kağıtlarının üzerine jel bırakıldı. Jelin üzerine nitroselüloz membran ve iki adet whatmann kağıdı bırakıldı. Son olarak whatmann kağıtlarını üzerine sünger bırakıldı ve kaset dikkatlice kapatıldı. Kaset tank içerisindeki aparata yerleştirildi. Transfer, 100 Voltta 1 saat 15 dk'da yapıldı. Transfer sonrası membran ponceau S ile boyanarak protein bantlarının geçici olarak ortaya çıkması sağlandı. Bu sayede membranda herhangi bir sorun olup olmadığı control edildi. Membran 1X TBS-T ile iki kere beş dk. yıkandı. %5'lik yağsız süt tozu (NFDM) ile oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Tablo 11'de sunulduğu üzere, kullanılan primer antikora özgü optimize edilen içerikteki solüsyonlar ve uygulama koşulları kullanılarak primer antikor muameleleri gerçekleştirildi (Tablo 11). Ardından membranlar üç kez 1xTBS-T ile yıkanıp HRP konjuge uygun sekonder antikor ile oda sıcaklığında bir saat çalkalayarak muamele edildikten sonra tekrar üç kez 1xTBS-T ve bir kez 1xTBS ile yıkandı. Membranlar HRP substratı ile muamele edildikten sonra ChemiDoc MP kemiluminesan görüntüleme ve dokümantasyon sistemi ve Image Lab v4.1 yazılımı (Bio-Rad) ile kayıt altına alındı ve analiz edildi.

Membranlar üç kere 5 dk. 1x TBS-T ile yıkandı. Eşit yüklemeyi kontrol etmek için membran primer Alfa Tubulin antikorı ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Membranlar üç kere 5 dk. 1xTBS-T ile yıkandı. HRP konjuge uygun sekonder antikor ile oda sıcaklığında

bir saat çalkalayarak muamele edildikten sonra tekrar üç kez 1xTBS-T ve bir kez 1xTBS ile yıkandı. Membranlar HRP substratı ile muamele edildikten sonra görüntülendi ve görüntüler kaydedildi.

Tablo 11. WB deneylerinde kullanılan antikorların listesi ve dilüsyonları.

Sıra	Hedef, moleküler ağırlık	Antikor	Dilüsyon
1	LZTR1, 95 kDa	Anti-LZTR1 tavşan poliklonal antikor (Novus Biologicals, katalog No: NBP1-77121)	%5 yağsız süt tozu içeren 1xTBS tamponu içinde 1:1.000
2	Pan Ras (HRAS, NRAS ve KRAS), 21 kDa	Anti-Ras (EP1125Y) tavşan monoklonal antikor (Abcam, katalog No: ab52939)	%5 yağsız süt tozu içeren 1xTBS-T tamponu içinde 1:5.000
3	RIT1, 27 kDa	Anti-RIT1 antikor, tavşan poliklonal (Abcam, katalog No: ab53720)	%5 yağsız süt tozu içeren 1xTBS-T tamponu içinde 1:1.000
4	MEK1/2, 45 kDa	Anti-MEK1/2 (L38C12) fare monoklonal antikor (Cell Signaling Technology, katalog No: 4694S)	%5 yağsız süt tozu içeren 1xTBS-T tamponu içinde 1:2.000
5	p-MEK1/2 (S217/221), 45 kDa	Anti-phospho-MEK1/2 (Ser217/221) (41G9) tavşan monoklonal antikor (Cell Signaling Technology, katalog No: 9154S)	%5 BSA içeren 1xTBS-T tamponu içinde 1:2.000
6	ERK1/2, 44/42 kDa	Anti-ERK1/2 (C-9) fare monoklonal antikor (Santa Cruz Biotechnology, katalog No: sc-514302)	%5 yağsız süt tozu içeren 1xTBS-T tamponu içinde 1: 2.500
7	p-ERK1/2 (T202/Y204), 44/42 kDa	Anti-phospho-ERK1/ERK2 (Thr202, Tyr204) (HL173) rekombinant tavşan monoklonal antikor (Thermo Fisher Scientific, katalog No: MA5-36265)	%5 BSA içeren 1xTBS-T tamponu içinde 1:2.500
8	Alfa Tubulin, 55 kDa	Anti-Alfa Tubulin fare monoklonal antikor (Cell Signaling Technology, katalog No: 3873S)	%5 yağsız süt tozu içeren 1xTBS-T tamponu içinde 1:2.500

Tablo 11. (Devam)

9	GAPDH, 37 kDa	Anti-GAPDH tavşan monoklonal antikor (Cell Signaling Technology, katalog No: 2118S)	%5 yağsız süt tozu içeren 1xTBS-T tamponu içinde 1:5.000
10	Fare IgG (HRP konjuge)	Immun-Star keçi anti-fare HRP konjuge antikor (Bio-Rad katalog No: 1705047)	%5 yağsız süt tozu içeren 1xTBS-T tamponu içinde 1:5.000
11	Tavşan IgG (HRP konjuge)	Immun-Star keçi anti-tavşan HRP konjuge antikor (Bio-Rad, katalog No: 1705046)	%5 yağsız süt tozu içeren 1xTBS-T tamponu içinde 1:5.000

3.2.7. SC ve LSKO Kolonilerine Ait Hücrelerden gDNA İzolasyonu ve Indel Analizleri

3.2.7.1. SC ve LSKO Kolonilerine Ait Hücrelerden gDNA İzolasyonu

gDNA izolasyonu ‘NucleoSpin® Tissue kiti kullanılarak yapıldı. Bunun için ilk olarak, 12 kuyulu plakadan toplanıp -80°C’ye kaldırılan hücre pelletleri -80°C’den alınarak oda sıcaklığında çözüldü. Ardından pelletlere 200 µL Tampon T1 eklendi ve hücre pelletleri süspanse edilerek yeni 2 mL’lik tüplere aktarıldı. Üzerlerine 25 µL Proteinaz K çözeltisi eklendi. Tüplerin ağzı parafilmlemlendi ve tüpler 56°C de 1 400 rpm de 90 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler vortekslendi ve tüplere 200 µL Tampon B3 eklenip, üç sn. vortekslendi. Örnekler 70°C’de 10 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 13.000 x g de 5 dk. santrifüj yapıldı. Süpernatantlar yeni 1.5 mL’lik tüplere aktarıldı. Süpernatantın üzerine 210 µL absolut etanol eklenip kuvvetlice vortekslendi. Kolonlar 2 mL’lik toplama tüplerine yerleştirildi ve kolonlara aktarıldı. Ardından, tüpler 11 000 x g’de 1 dk. santrifüj edildi. Toplama tüpleri atıldı ve kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirildi. Sonrasında, yıkama işlemlerine başlandı. Kolonlara 500 µL Tampon BW eklendi ve 11 000 x g’de 1 dk. santrifüj yapıldı. Süpernatantlar atıldı ve kolonlar tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonlara 600 µL Tampon B5 eklenip 11 000 x g’de 1 dk. santrifüj yapıldı. Süpernatantlar atıldı ve kolonlar tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. Ardından kolonlar 11 000 x g’de 2 dk. santrifüj edildi. Bunun ardından, elüsyon tamponunu 56°C’de ısıtıldı. Kolonların kapağı açık olacak şekilde örnekler 56°C de 10-15 dk. bekletilerek alkolün tamamen uzaklaşması sağlandı. Kolonlar 1.5 mL’lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildikten sonra üzerlerine 60 µL Buffer BE eklendi. Örnekler 5 dk. boyunca 56°C’lik ısıtıcıda inkübe edildi. 11 000 x g’de 1 dk. santrifüj yapıldı. %0,6 lık agaroz jel hazırlandı ve gDNA’ların 2’şer µL’si jelde yürütülerek

gDNA'ların durumuna bakıldı. Nanodrop 2 000 cihazıyla örneklerin yoğunlukları ölçüldükten sonra örnekler -20°C'de saklandı.

3.2.7.2. SC ve LSKO Kolonilerine Ait Hücrelerden İzole Edilen gDNA'lardan CRISPR Hedef Bölgesinin Çoğaltılması

SC-10, SC-12, SC-16, SC-22 ve LSKO-34, LSKO-35, LSKO-98, LSKO-104 kolonilerine ait gDNA'lar ve Tablo-2'deki primer çiftleri (Tablo 2 sıra 2, 3, 4, 5) kullanılarak CRISPR hedef bölgesi PCR ile çoğaltıldı. PCR içeriği ve ısı döngüsü koşulları Tablo 12'de sunulmuştur.

Tablo 12. gDNA ile PCR içeriği ve ısı döngüsü koşulları.

Go Taq PCR İçeriği	Miktar (µL)	
5X Buffer	5	
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	
dNTP	0.6	
Pr F (10 pmol/ µL)	0.6	
Pr R (10 pmol/ µL)	0.6	
Go Taq Polimeraz	0.1	
gDNA (350 ng/µL)	1.3	
dH ₂ O	15.3	
Toplam	25	
PCR Koşulları	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç denatürasyonu	94	6 dk.
Denatürasyon	94	30 sn.
Bağlanma	58 ya da 62	40 sn.
Sentez	72	30 sn.
Son sentez	72	6 dk.
Bekleme	10	beklet

PCR örneklerinin 2'şer µL'si %2'lik jele yüklenip, 100 V'ta 60. dk'da görüntü alındı. Elektroforez sonucunda tek bant görülen örnekler Magen kitinin, 'PCR ürününden veya enzim reaksiyonundan saf DNA elde etme' protokolüne uyularak temizlenirken LSKO kolonilerine ait örnekler agaroz jele yüklenip yürütüldükten sonra kesilip, Magen kitinin 'Agaroz jelden DNA saflaştırma' protokolüne uyularak agaroz jelden temizlendi.

3.2.7.3. LSKO Kolonilerine Ait Ürünlerin Agaroz Jele Yüklenip, Agaroz Jelden Saflaştırılması

Agaroz jelde yürütülen PCR ürünlerinin jelden temizlenmesinde UV altında belirlenen PCR ürünleri ilk olarak bir bistüri ile agaroz jelden kesildi. Ardından, kesilen örnekler temiz bir 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve tartılarak jel diliminin ağırlığı belirlendi. Sonrasında, tüplere, 1:2 oranında GDP tamponu eklendi ve örnekler 10-15 dk.

boyunca 50-55°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sırasında tüp her 2-3 dk'da bir vorteksleni veya alt-üst edildi. Ardından, kolonlar 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi. 700 µL ürün kolona aktarılıp, oda sıcaklığında 12 000 x g'de 1 dk. santrifüjlendi. Süpernatant döküldü ve kolon toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 300 µL GDP tamponu eklendi ve 1 dk. inkübe edildi. Örnekler 12 000 x g'de 1 dk. santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında süpernatantlar atıldı ve kolonlar toplama tüplerine yerleştirildi. Ardından, kolonlara 650 µL Tampon DW2 eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk. 12 000 x g'de santrifüjlendi. Süpernatantlar atıldı ve kolonlar toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonlara 650 µL tampon DW2 eklendi. 12 000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve toplama tüpleri yeniden kullanıldı. Kolonun matrisini kurutmak için boş kolon oda sıcaklığında 2 dk. 12 000 x g'de santrifüj edildi. Kolon temiz bir 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Doğrudan kolon membranının merkezine 25-50 µL Elüsyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk. bekletildi. Oda sıcaklığında 12 000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Örneklerden 2'şer µL %2'lik agaroz jele yüklenip 100 V'ta 60 dk. yürütülerek görüntü alındı. 100 bp plus DNA markırı kullanılarak dizileme için kalıp miktarları belirlendi. Nanodrop 2 000 cihazı ile örneklerin yoğunlukları ölçüldükten sonra örnekler -20°C'de saklandı.

3.2.7.4. LSKO Kolonilerine Ait Agaroz Jel Ürünlerinin pJET1.2/blunt Vektörüne Klonlanması

LSKO-34, LSKO-35, ve LSKO-98 kolonilerine ait jelden temizlenen PCR ürünlerinin heterozigot veya homoozigot varyasyonlara sahip olup olmadıklarının belirlenmesi için temizlenen PCR ürünleri pJET1.2/blunt vektörüne aktarılıp, *E. coli* DH5α kompetan hücrelerine transforme edildikten sonra elde edilen plazmid DNA'lar Sanger DNA dizileme yöntemiyle sekanslandı. Bu amaçla, pJET1.2/blunt vektörüne klonlama yapılırken hazırlanan ilk reaksiyon içeriği Tablo 13'te sunulmuştur. Bu doğrultuda hazırlanan örnekler 3-5 sn. vortekslenip, spin edildikten sonra tüpler 70°C'de 5 dk. bekletildi. Ardından, tüplere 0.5 µL T4 DNA Ligaz ve 0.5 µL pJET1.2/blunt (25 ng) vektöründen eklendi. Tüpler 5 sn. Vorteksin ardından spin edildi. Sonra tüpler oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Süre sonunda 5'er µL örnek *E. coli* DH5α kompetan hücrelerine transforme edildi, ampisilinli LB agaraya yayıldı ve 37°C'lik etüvde kültürde çoğaltıldı.

16 saat sonra çoğalan koloniler ile koloni PCR yapıldı. Primer olarak pJET-F ve pJET-R primer çifti kullanıldı. PCR tüplerine 10'ar µL dH₂O eklendi. Petride çoğalan koloniler deiyonize suya aktarılıp, PCR için kalıp olarak kullanıldı. PCR içeriği ve ısı

döngüsü koşulları Tablo 14’te sunulmuştur (Tablo 14). PCR ürünleri Magen kitinin, ‘PCR ürününden veya enzim reaksiyonundan saf DNA elde etme’ protokolüne uyularak temizlendi. Temizlenen ürünler Sanger yöntemi ile dizilendi. DNA dizileme verileri, SnapGene Viewer v7.2 programı ile görüntülendi ve hg38 insan referans dizileri ile karşılaştırılarak incelendi. Dizilenen LSKO kolonilerindeki DNA varyasyonları ve varyasyonların transkript ve protein düzeylerindeki etkileri Human Genome Variation Society (HGVS) kurallarına uygun olarak düzenlendi (69).

Tablo 13. pJET1.2/blunt vektörüne klonlama yapılırken hazırlanan ilk reaksiyon içeriği.

Reaksiyon İçeriği	Miktar (µL)
2X Reaksiyon Buffer	5
PCR Ürünü (30 ng/µL)	2.5
Blunting Enzim	0.5
dH ₂ O	1
Toplam	9

Tablo 14. Koloni PCR içeriği ve ısı döngüsü koşulları.

Go Taq PCR İçeriği	Miktar (µL)	
5X Buffer	5	
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	
dNTP	0.6	
Pr F (10 pmol/ µL)	0.6	
Pr R (10 pmol/ µL)	0.6	
Go Taq Polimeraz	0.1	
Hücre süspansiyonu	10	
dH ₂ O	6.6	
Toplam	25	
PCR Koşulları	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç denatürasyonu	95	5 dk.
Denatürasyon	95	30 sn.
Bağlanma	60	30 sn.
Sentez	72	1 dk.
Son sentez	72	6 dk.
Bekleme	10	beklet

3.2.8. Hep3B SC-12 ve Hep3B LSKO-104 Kolonilerinden Total RNA İzolasyonu

Hep3B SC-12 ve Hep3B LSKO-104 hücrelerinden, NucleoSpin® RNA kiti kullanılarak total RNA izole edildi. İzolasyon için her iki hücreden üç farklı pasajda hücreler toplanıp -80°C'ye kaldırıldı.

İzolasyonlarda dörder milyon hücre kullanıldı. Hücreler izolasyondan önce -80°C'den alınıp pelletlerin çözülmesi sağlandı. Hücrelerin parçalanması için 350 µL RA1

tamponu ve 3.5 µL betamerkaptoetanol eklendi. Tüpler yüksek hızda, pelletler tamamen çözülene kadar vortekslendi. İçeride hücre pelleti kalmamasına dikkat edildi. Vizkoziteyi azaltmak için insülin iğnesi kullanılarak beş kez al-ver yapıldı. Mor halkalı kolonlar 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Son al-verden sonra lizatlar insülin iğnesi yardımıyla mor halkalı kolonlara aktarıldı. 11 000 x g'de oda sıcaklığında 1dk. santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası mor halkalı kolonlar atıldı. Toplama tüplerinin içinde bulunan lizatın içerisine 350 µL %70 etil alkol ilave edilip, 1 000'lik mikro pipet ile on kere al-ver yapılarak homojen bir karışım oluşturuldu. Lizatlar açık mavi halkalı kolonlara aktarıldı. 11 000 x g de 1dk. santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası toplama tüpü atıldı. Kolon yeni 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonlara 350 µL MDB tamponu eklendi ve 11 000 x g'de 1 dk. santrifüj yapıldı. DNA'ları parçalamak için 90 uL Reaksiyon Tamponuna, 10 µL sulandırılmış rDNaz eklendi. Kolonun tam ortasına enzim karışımından 95 µL ilave edildikere, 30°C'de 17 dk. bekletildi. Süre sonunda kolonlara 200 µL RAW2 tamponun ilave edildi. 11 000 x g'de 1dk. santrifüj yapıldı. Toplama tüpleri atıldı. Kolonlar yeni 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi. 600 µL RA3 tamponundan eklendi. 11 000 x g'de 1dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Ardından örneklerin üzerine 250 µL RA3 tamponu eklendi. Kolonun membranının tamamen kuruması için 11 000 x g'de 2 dk. santrifüj yapıldı. Kolonlar kit içeriğinde bulunan RNaz-free tüplere aktarıldı. Her bir kolona 60 µL RNaz içermeyen su eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk. bekledikten sonra 11 000 x g'de 1 dk. santrifüj yapıldı. Örnekler buz içerisine alındı. RNA örneklerinin 2'şer µL'si %0.6'lık agaroz jelde yürütölüp, görüntölendi. Yoğunlukları Nanodrop 2 000 cihazı ile ölçölldü. Hazırlanan RNA örneklerinden cDNA sentezi için 100 ng/µL'lik dilölsonlar hazırlandı. RNA dizileme işlemleri için 40 µL'de 300 ng/µL RNA olacak şekilde örnekler hazırlanıp -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.9. RNA Dizileme

Uygun konsantrasyon ve hacimde hazırlanıp -80°C'ye bırakılan altı adet örnek (SC-12_1, SC-12_2, SC-12_3 ve LSKO-104_1, LSKO-104_2, LSKO-104_3) RNA dizileme için hizmet veren firmaya kuru buz içinde gönderildi.

Gönderilen RNA örneklerinin dizileme için uygun olup olmadıkları RNA Screen Tape analizi ile Bioanalyzer sisteminde (Agilent) incelendi. Tüm RNA örneklerinin RNA integrity number (RIN) değeriinin >7,0 olduğu belirlendikten sonra RNA dizilemeleri gerçekleştirildi. Kütüphane hazırlığı Illumina Stranded Total RNA Preparation with Ribo-Zero Plus kiti (Illumina) kullanılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan RNA kütüphanesi Illumina

NovaSeq 6 000 platformunda iki yönde 150 bp uzunluğunda örnek başına en az 60 milyon okuma ile dizilendi.

3.2.10. RNA Dizileme Sonuçlarının Biyoenformatik Analizi

Ham dizileme verileri (“fastq” dosyaları) tarafımıza iletdikten sonra FASTQC v0.12.1 (70) ve MultiQC v1.6 (71) yazılımları kullanılarak ham RNA dizileme verilerinin kalite kontrol analizleri gerçekleştirildi. Dizilenen örneklerin analizler için yeterli kalitede olduklarına işaret eden Q30 kalite değerlerinin >%90 olduğu görüldükten sonra transkriptomik veri analizlerine geçildi. Bu kapsamda ilk olarak, ham okumalar filtrelenerek analize hazır hale getirildi. Filtreleme işlemleri Trimmomatic v0.39.2 (72) ve fastp v0.23.4 (73) yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, filtreleme kapsamında sırasıyla adaptör dizilerinin kaldırılması, düşük kaliteli okumaların filtrelenmesi Phil’s read editör skoru (<Q20, Phred skoru), baz uzunluğu 50 baz çiftinin altındaki okumaların kaldırılması ve okumaların ilk beş bazında görülen düşük kaliteli dizilerin uzaklaştırılması (filtreleme parametresi: -q 30 -u 20 --cut_front --cut_tail --cut_right) basamakları gerçekleştirildi. Filtreleme neticesinde elde edilen yüksek kaliteli RNA dizileme okumaları Ensembl veri tabanında (74) bulunan en güncel referans insan genomuna GRCh38.p14 (GCA_000001405.29/hg38) genom anotasyon dosyası (“gtf”) ve Hisat2 v2.2.1 (75) yazılımı kullanılarak referans genoma hizalandı. Hizalama sonucu elde edilen “.bam” formatındaki diziler Integrative Genomics Viewer (IGV) v2.17.2 programı ile görüntülendi. Ardından referans genoma hizalanan diziler featureCounts v2.0.6 (76) yazılımı ile işlenerek ham gen bolluk (İng. raw counts) verisi elde edildi. Ardından, SC-12 kodlu kontrol hücreler ile LSKO-14 kodlu *LZTR1* nakavt Hep3B hücrelerine ait üç tekrarlı veriler iki farklı deney grubu olarak ele alınarak deney grupları arasındaki gen ve transkript düzeyindeki ifade farklılıkları DeSeq2 v1.42.1 (77) yazılımı ile elde edildi. İki grup arasında gen ifadesi kat artış değeri $|\log_2FC| > 1.5$ ve düzeltilmiş p değeri < 0.05 olanlar istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon değişimi gösteren genler olarak listelendi. Ekspresyon farklılığı gösteren genler için ayrıca DEBrowser v1.30.2 (78) R paketi kullanılarak ısı haritası hazırlandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı zenginleşme farklılığı gösteren biyolojik süreçler Gen Seti Zenginleşme Analizi (GSEA) v4.3.3 programı kullanılarak belirlendi. Analizlerde girdi olarak DeSeq2 ile normalize edilmiş istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı gösteren genlerin listesi ve güncel Molecular Signatures Database (MSigDB) v2023.2 gen setleri kullanıldı. GSEA’nın önerdiği şekilde elde edilen sonuçlarda normalize zenginleşme skoru (NES) yüksek olan ve yanlış bulma oranı (FDR) < 0.25 olan sonuçlar istatistiksel olarak

anlamli olarak değerlendirilerek sunuldu. GSEA kapsamında ayrıca belirlenen biyolojik süreç kategorileri içinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç veren gen setlerinde zenginleşen ortak genler GSEA programının Leading Edge Analysis modülü ile belirlenerek sunuldu.

3.2.11. RNA Dizileme Sonuçlarına Göre mRNA Seviyeleri Değişen Genlerin qRT-PCR ile Doğrulanması

RNA dizileme analizleri neticesinde LKSO-104 ve SC-12 hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı gösterdiği belirlenen yedi genin ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemiyle kontrol edildi. Bu doğrultuda ilk olarak Primer3 aracı kullanılarak Tablo 17’de sunulan primerler tasarlanıp sipariş edildi (79).

3.2.11.1. Hep3B SC-12 ve Hep3B LSKO-104 Hücrelerinden İzole Edilen Total RNA’lardan cDNA Sentezi

RNA örnekleri olarak, SC-12 ve LSKO-104 hücrelerinden üç farklı zamanda izole edilen RNA dizileme analizlerine gönderilen total RNA örneklerinden kullanılmayıp -80°C’de saklanan örneklerden SC-12 ve LSKO-104 hücreleri için hazırlanan iki ayrı havuz örnekleri kullanıldı. Total RNA örneklerinden cDNA çevrimi iScript cDNA sentez kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon içeriği ve ısı koşulları Tablo 15’te sunulmuştur.

Tablo 15. cDNA sentezi reaksiyonunun içeriği ve ısı döngüsü koşulları.

Reaksiyon İçeriği	Miktar (µL)
5X iScript Reaksiyon Miks	4
iScript Reverse Transkriptaz	1
Total RNA (100 ng/µL)	5
dH ₂ O	10
Toplam	20
Sıcaklık (°C)	Süre
25	5 dk.
46	20 dk.
95	1 dk.

3.2.11.2. Hep3B SC-12 ve Hep3B LSKO-104 Hücrelerinden İzole Edilen cDNA’ların Kullanılarak qRT-PCR yapılması

cDNA örneklerinin hazırlanmasının ardından Lightcycler 480 II cihazı ve Lightcycler 480 yazılımı v1.5.0 (Roche) kullanılarak üç tekrarlı qRT-PCR deneyleri gerçekleştirildi. qRT-PCR’da cDNA’lar kullanılırken on kat dH₂O ile seyreltilip kullanılmıştır. qRT-PCR’a ait reaksiyon içeriği ve qRT-PCR termal koşulları Tablo 16’da

sunulmuştur. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır (Tablo 17).

Tablo 16. qRT-PCR içeriği ve ısı döngüsü koşulları.

Reaksiyon İçeriği	Miktar (µL)		
cDNA	3		
Pr F (10 pmol/µL)	0.3		
Pr R (10 pmol/µL)	0.3		
2X SYBR	5		
dH ₂ O	1.6		
Toplam	10		
qRT-PCR Koşulları	Sıcaklık (°C)	Süre	
Başlangıç denatürasyonu	95	3 dk.	} 45x
Denatürasyon	95	15 sn.	
Bağlanma- Sentez	58	1 dk.	
Erime Eğrisi	95	4 sn.	
	60	1 dk.	

Tablo 17. qRT-PCR deneylerinde kullanılan primerlerin listesi.

Sıra	Primer Adı	Primer Dizisi 5'-3'	Kullanım Amacı
1	AMOTL1_qRT-PCR_F	TCTGGGAGGCATGAAACATCTG	AMOTL1 mRNA seviyesinin qRT-PCR ile belirlenmesi
2	AMOTL1_qRT-PCR_R	TGGGGAGTGGAAGTTACAAAGAG	
3	BMP7_qRT-PCR_F	TATGTCAGCTTCCGAGACCTG	BMP7 mRNA seviyesinin qRT-PCR ile belirlenmesi
4	BMP7_qRT-PCR_R	GCGTTCATGTAGGAGTTCAGAG	
5	CDH11_qRT-PCR_F	ATCTACGGTTATGAAGGCAGGG	CDH11 mRNA seviyesinin qRT-PCR ile belirlenmesi
6	CDH11_qRT-PCR_R	TAAAACGAGGTCCCCAGTTCTG	
7	KLF5_qRT-PCR_F	GAATTTAACCCACCTCCATCC	KLF5 mRNA seviyesinin qRT-PCR ile belirlenmesi
8	KLF5_qRT-PCR_R	CTGACAGGTTGGATGTTTTGTG	
9	RELN_qRT-PCR_F	GGACAAGACTCACAATGCTCTC	RELN mRNA seviyesinin qRT-PCR ile belirlenmesi
10	RELN_qRT-PCR_R	ATTACGGAATGAAGGTCACCAC	
11	TRIB2_qRT-PCR_F	CCCGAGACTCCGAAGTTGTC	TRIB2 mRNA seviyesinin qRT-PCR ile belirlenmesi

Tablo 17. (Devam)

12	TRIB2_qRT-PCR_R	CAAACACCTTGCACACCAGC	
13	VIM_qRT-PCR_F	GGAGAAATTGCAGGAGGAGATG	VIM mRNA seviyesinin qRT-PCR ile belirlenmesi
14	VIM_qRT-PCR_R	TTGCGTTCAAGGTCAAGACG	
15	GAPDH_qRT-PCR_F	CATGTTCGTCATGGGTGTGAAC	Housekeeping GAPDH mRNA seviyesinin qRT-PCR ile belirlenmesi
16	GAPDH_qRT-PCR_R	GACTGTGGTCATGAGTCCTTCC	

3.2.12. İstatistiksel Analizler ve Grafik Çizimi

İstatistik analizleri ve grafik çizimleri GraphPad v9 ve Microsoft Excel 360 programları kullanılarak yapıldı. Hep3B hücrelerine CRISPR/Cas9n yönteminin uygulanmasıyla elde edilen LSKO ve SC kodlu kolonilerdeki LZTR1 protein düzeylerinin belirlendiği koloni tarama WB deneylerinde her membranda LZTR1, anti-LZTR1 antikoruyla yaklaşık 90 kDa ağırlığında belirlenen spesifik olmayan bant (n.s.) ve Alfa Tubulin bant hacimleri Image Lab v4.1 yazılımı (Bio-Rad) ile kantite edildi. Elde edilen değerler Alfa Tubulin bant değerine bölünerek normalize edildi ve Hep3B hücrelerinin normalize değerlerine kıyasla göreceli kat değişim değerleri belirlendi. Elde edilen verilerle her membran için sütun grafikleri çizilerek WB membran görüntüleriyle birlikte sunuldu. Koloni tarama WB deneyleri bir kez tekrarlandığı için istatistiksel analiz yapılmadı.

CRISPR kolonilerinin taranmasıyla seçilen SC-10, SC-12, SC-16, SC-22, LSKO-34, LSKO-35, LSKO-98 ve LSKO-104 hücrelerinden ve kontrol olarak kullanılan Hep3B hücrelerinden izole edilen total protein lizatlarıyla üç kez tekrarlanan ve LZTR1, pan-RAS, RIT1 ve Alfa Tubulin protein düzeylerinin belirlendiği WB deneylerinde her deney tekrarındaki sonuçlarda protein bant kantitasyon değerleri belirlenip Alfa Tubulin bant değerlerine bölünerek normalize edildikten sonra elde edilen veriler Hep3B hücrelerinin değerlerine bölündü. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi iki yönlü ANOVA yöntemi ile gerçekleştirildi ve çoklu karşılaştırma verileri Dunnett yöntemiyle düzeltildi. Sonuçlarla sütun grafiği hazırlanarak WB deney görüntüsüyle birlikte sunuldu.

WB deneyleri sonunda öne çıkan SC-12, SC-16, LSKO-35, LSKO-98 ve LSKO-104 hücrelerindeki LZTR1, pan-RAS, RIT1, p-MEK1/2, MEK1/2, p-ERK1/2, ERK1/2 ve Alfa Tubulin protein düzeylerinin belirlendiği üç kez tekrarlanan WB deneylerinde elde edilen

WB görüntülerindeki bant kantitasyon değerleri belirlendikten sonra Alfa Tubulin bantlarının değerlerine bölünerek normalize edildi. Normalize protein seviyelerinin ortalamaları ve standart sapma değerleri hesaplandıktan sonra sütun grafiği çizildi. Ardından, SC-12 örneğinin protein seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren protein değerleri belirlenerek anlamlı değişim gösteren sonuçlar grafikte işaretlendi. İstatistik analizleri, iki yönlü ANOVA yöntemi ile gerçekleştirildikten sonra çoklu karşılaştırma verileri Dunnett yöntemiyle düzeltildi. Seçilen WB deney görüntüleri sütun grafiği ile birlikte sunuldu.

qRT-PCR deneylerinin veri analizleri, üç tekrarlı olarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen cycle threshold (CT) değerleri $2^{-(\text{delta-deltaCT})}$ yöntemiyle hesaplanarak gerçekleştirildi (80). Hesaplamalarda GAPDH genine ait CT değerleri normalizasyon için kullanıldı ve SC-12 örneğine kıyasla gen ifade değişimleri belirlendi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinde iki yönlü ANOVA yöntemi kullanıldı ve çoklu karşılaştırma verileri Sidak yöntemiyle düzeltildikten sonra tüm sonuçlar sütun grafiği halinde sunuldu.

QRT-PCR deneyleri ile ifade düzeyleri belirlenen genlerin SC-12 ve LSKO-104 örneklerindeki ekspresyon düzeylerindeki değişimler ile aynı örneklerin RNA dizileme sonuçlarının birbirleriyle uyumluluğu korelasyon grafiği ile analiz edildi. Bunun için, qRT-PCR ile belirlenen kat değişim değerlerinin iki tabanında logaritması alınarak RNA dizileme verileriyle kıyaslanabilir hale getirildi. Ardından, yedi gen için “x” ekseninde RNA dizileme kat değişim değeri ve “y” ekseninde qRT-PCR kat değişim değeri olacak şekilde dağılım grafiği çizilip doğrunun denklemi ve eğimi (R^2 değeri) belirlendi. R^2 değerinin >7.0 (korele) olduğunu ortaya koyan grafik düzenlenerek sunuldu.

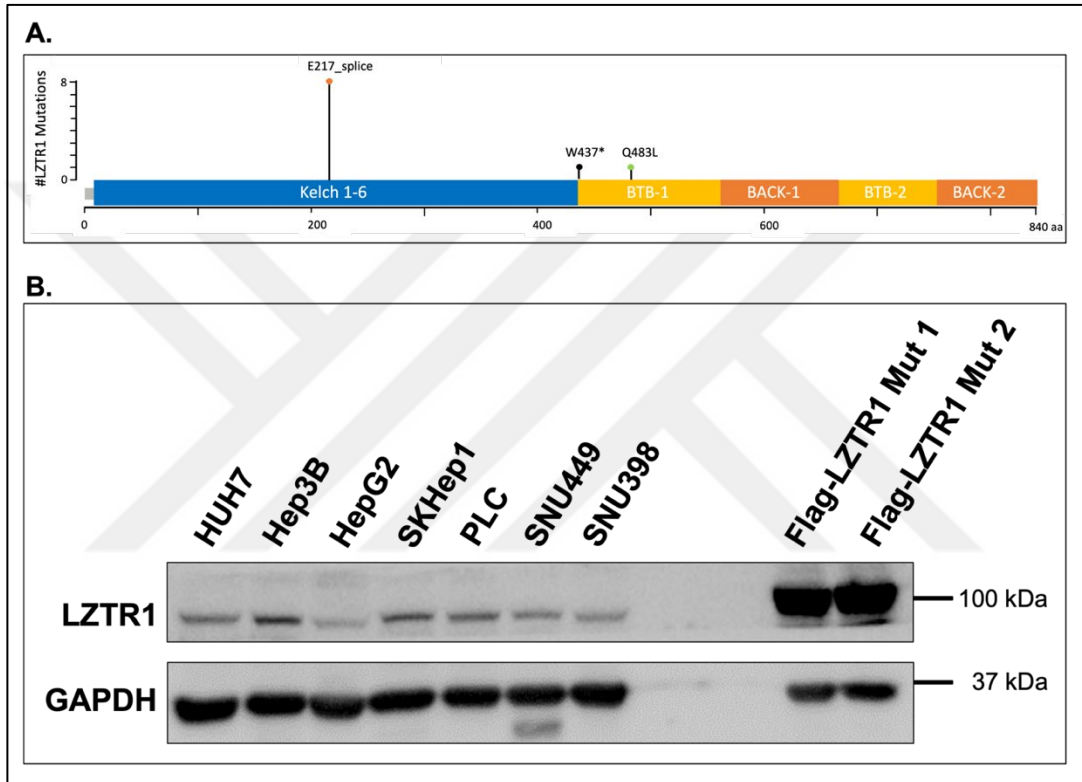
4. BULGULAR

4.1. Ön Çalışma Bulguları

LZTR1 proteini, lösün fermuar transkripsiyon düzenleyicisi proteinlerle amino asit dizisi benzerliği göstermektedir (7). Buna ek olarak, LZTR1'in nükleusa lokalize olduğu deneylerle doğrulanmış, İnsan Protein Atlası (HPA) veri tabanında rapor edilmiştir (81). Öte yandan, tez önerisini sunduğumuz dönemde, LZTR1'in HCC hücrelerinde veya başka bir hücre tipinde hangi genlerin ekspresyonları üzerinde etkisinin bulunduğu araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

TCGA Ağı'nın 2017 yılında yayımlanan çalışmasında TCGA veri tabanında ekzom dizileme verileri bulunan 363 HCC hastasının 10'unda (%3) *LZTR1* geninde somatik mutasyonlar bulunduğu belirlenmiştir (3). İncelenen HCC hastalarında *LZTR1*'de tespit edilen mutasyon oranı, somatik mutasyonları daha önceden HCC ile ilişkilendirilmiş ve önemli sürücü genler arasında yer aldığı bilinen *KRAS* (%1), *NRAS* (%1) ve *CDKN2A* (%2) gibi genlerin mutasyon sıklığından daha yüksektir. Bu durum, *LZTR1* geni üzerinde durmamıza yol açmıştır. Bu nedenle TCGA veri tabanının cBioPortal arayüzünü kullanarak yayında belirtilen *LZTR1* mutasyonlarını inceledik (82). Söz konusu yayında, 840 amino asitlik LZTR1 proteinini kodlayan *LZTR1* geninde 10 hastada belirlenen mutasyonlar arasında sekiz hastada (%80) proteinin Kelch domainine denk gelen ekzon 7-intron 7 kırılma bölgesinde 37 nükleotitik homozigot bir delesyon (p.E217_splice), diğer iki hastadan birinde BTB-1 domainin başından itibaren erken sonlanmaya neden olan bir homozigot non-sense mutasyon (p.W437*) ve son hastada ise bir homozigot yanlış anlamlı (missense) amino asit değişimi (p.Q483L) belirlendiğini gördük (Şekil 1A). Bu bulgular, HCC hastalarında *LZTR1* geninde belirlenen mutasyonların %90'ının proteinin erken sonlanmasına neden olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum bize, LZTR1 proteininin hücredeki kaybının HCC hastalarında HCC gelişimine katkı sağlıyor olabileceğini ve LZTR1'in HCC gelişiminde bir tümör baskılayıcı gen olabileceğini düşündürmüştür. Bunun yanı sıra, laboratuvarımızda bulunan yedi farklı HCC hücre hattındaki LZTR1 protein düzeylerini WB yöntemi ile inceledik ve incelediğimiz HCC hücre hatları arasında LZTR1 protein düzeyinin Hep3B hücrelerinde daha yüksek olduğunu belirledik (Şekil 1B). Bunun ardından, The Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) veri tabanında Hep3B hücre hattına ait ekzom dizileme verilerini inceleyerek *LZTR1* geninin Hep3B hücre hattında WT olduğunu gördük. (83). Buna göre, elde ettiğimiz ön çalışma verilerine ve literatürdeki

bilgilere dayanarak bu tez ile, WT LZTR1 proteinini incelediğimiz diğer HCC hücre hatlarına kıyasla yüksek düzeyde ifade eden Hep3B hücrelerinde CRISPR/Cas9 yöntemiyle *LZTR1* geninin nakavt edilmesi ve ardından LZTR1 ifade eden ve etmeyen Hep3B hücrelerinde transkriptomik veri analizlerinin gerçekleştirilmesi yaklaşımını kullanarak LZTR1'in Hep3B hücrelerinde ifade düzeylerini etkilediği genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.



Şekil 1. TCGA HCC kohortundaki hastalarda *LZTR1* geninde belirlenen somatik mutasyonlar ve HCC hücre hatlarındaki LZTR1 protein düzeyleri. **A.** Ekzom dizilemesi yapılan 363 HCC hastasının sekizinde *LZTR1* geninde Kelch domaininden itibaren delesyona ve kırpılmanın bozulmasına neden olan bir mutasyon (E217_splice), birinde BTB-1 domainin başından itibaren sonlanmaya neden olan W437* mutasyonu ve bir hastada yanlış anlamlı amino asit değişimi (Q438L) belirlenmiştir. Şekil, cBioPortal aracı kullanılarak ve Frattini vd. yayınında belirtilen LZTR1 protein domainleri dikkate alınarak hazırlanmıştır (12, 82). **B.** Yedi farklı HCC hücre hattındaki LZTR1 protein düzeyleri WB yöntemiyle belirlendi. Son iki kuyudaki örnekler Flag ve HA etiketi ve linker dizi ile birlikte transfekte edilen NIH3T3 ve NS ilişkili LZTR1 mutant proteinlerini kalıcı olarak ifade eden HEK293 Flp-In hücrelerinden hazırlanan protein lizatları olup, doğru bantı belirlemek için pozitif kontrol örnekleri olarak kullanılmıştır. Etiketsiz LZTR1 95 kDa olup, son iki kuyudaki etiketli LZTR1 proteinleri 5 kDa daha ağırdır (100 kDa). Protein yüklemesinin kontrolü anti-GAPDH antikorunu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2. *LZTR1* Nakavt ve Kontrol Hep3B Hücre Klonlarının Hazırlanması

Tezin birinci hedefi olan “CRISPR/Cas9 genom düzenleme yöntemiyle *LZTR1* geninin nakavt edildiği Hep3B hücre klonunun hazırlanması” doğrultusunda, CRISPR/Cas9 genom düzenleme yöntemi kullanılarak Hep3B hücre hattında *LZTR1* geninin nakavt edildiği hücre klonunun ve insan genomunu hedeflemeyen scrambled (SC) sgRNA dizisinin (Tablo 1) (68) kullanılarak *LZTR1* geninin nakavt edilmediği negatif kontrol Hep3B klonunun hazırlanması amaçlanmıştır.

4.2.1. Plazmid DNA’ların Hazırlanması ve Kolonilerin Elde Edilmesi

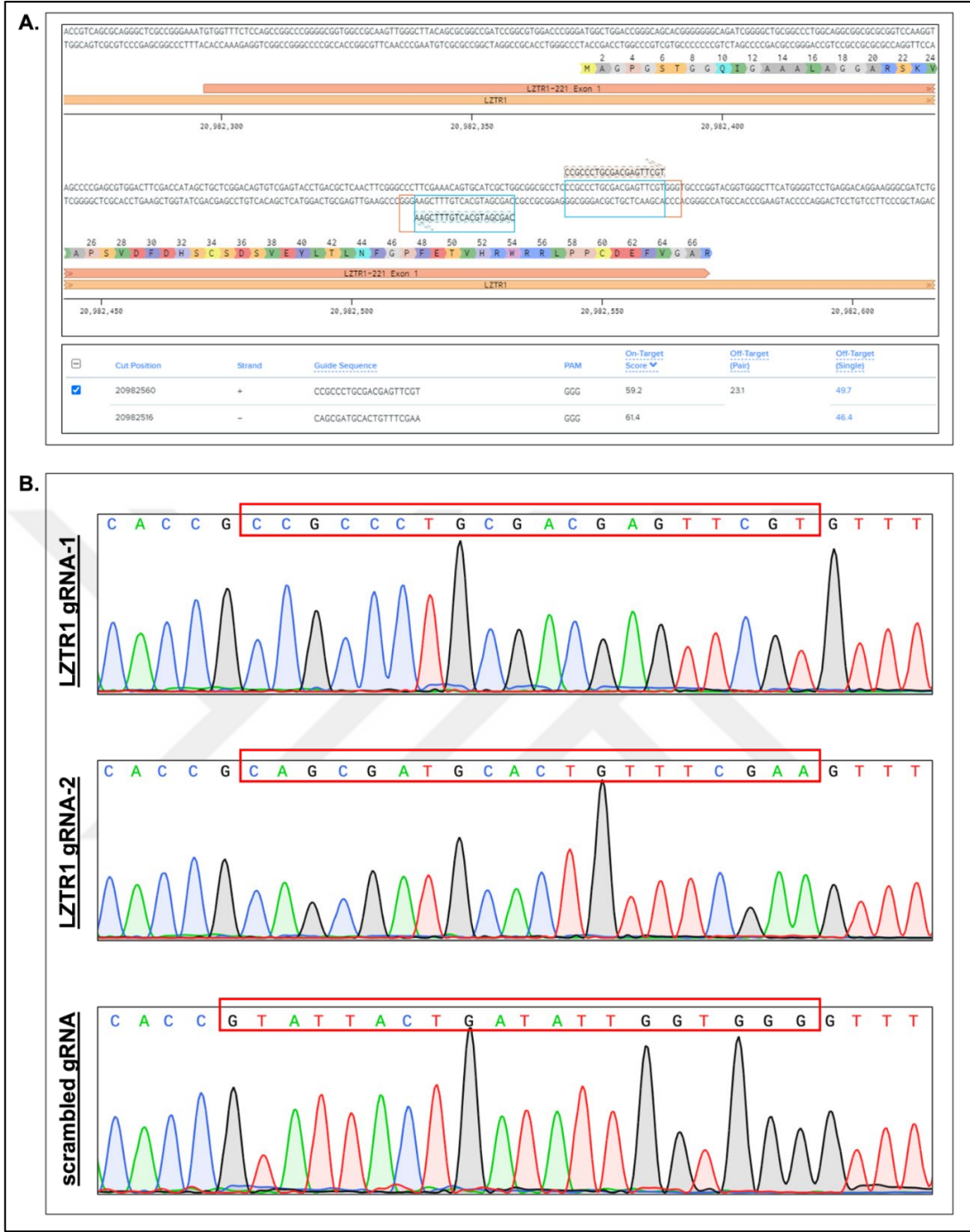
Tezin birinci hedef kapsamında CRISPR/Cas9 genom düzenleme yöntemini uygulayarak Hep3B hücrelerinde *LZTR1* geninin nakavt edildiği ve edilmediği (kontrol) hücre kolonileri oluşturulmuştur. Bu doğrultuda ilk olarak Benchling biyoenformatik aracı kullanılarak (67) Cas9n enzimini insan genomunda *LZTR1* geninin 1. ekzonunda iki allelini ayrı ayrı hedefleyecek sgRNA dizileri belirlendi (Şekil 2A). Bunun ardından, *LZTR1* sgRNA’larının cDNA dizilerini pX462 vektörüne aktarılabilmemiz için uçlarına BbSI restriksiyon enzimi tanıma dizileri olacak şekilde sipariş edildi (Tablo 1). Akabinde, *LZTR1* gRNA dizileri pX462 vektörüne aktarılıp elde edilen plazmid DNA’lar içinde hedeflediğimiz şekilde *LZTR1* gRNA’ları kodlayan DNA dizilerini içeren plazmid DNA’ları içerenler Sanger DNA dizileme yöntemiyle belirlendi. Buna ek olarak, daha önceden hazırladığımız, scrambled gRNA dizisini içeren plazmid DNA’nın doğruluğu da yine Sanger DNA dizileme yöntemiyle incelenerek istenen diziyi içerdiği görüldü (Şekil 2B). Ardından, hazırlanan plazmid DNA’lar Hep3B hücrelerine transfekte edildi ve ayrı koloniler halinde kültür ortamında çoğaltıldı. Bu işlemler sonunda *LZTR1* geninin nakavt edildiği düşünülen toplam 107 koloni (LSKO kolonileri) ve scrambled gRNA kullanıldığı için *LZTR1*’in nakavt edilmediği düşünülen toplam 22 koloni (SC kolonileri) elde edildi.

4.2.2. *LZTR1* Geninin Nakavt Edildiği Klonların Seçilmesi ve Bu Klonlarda INDEL Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

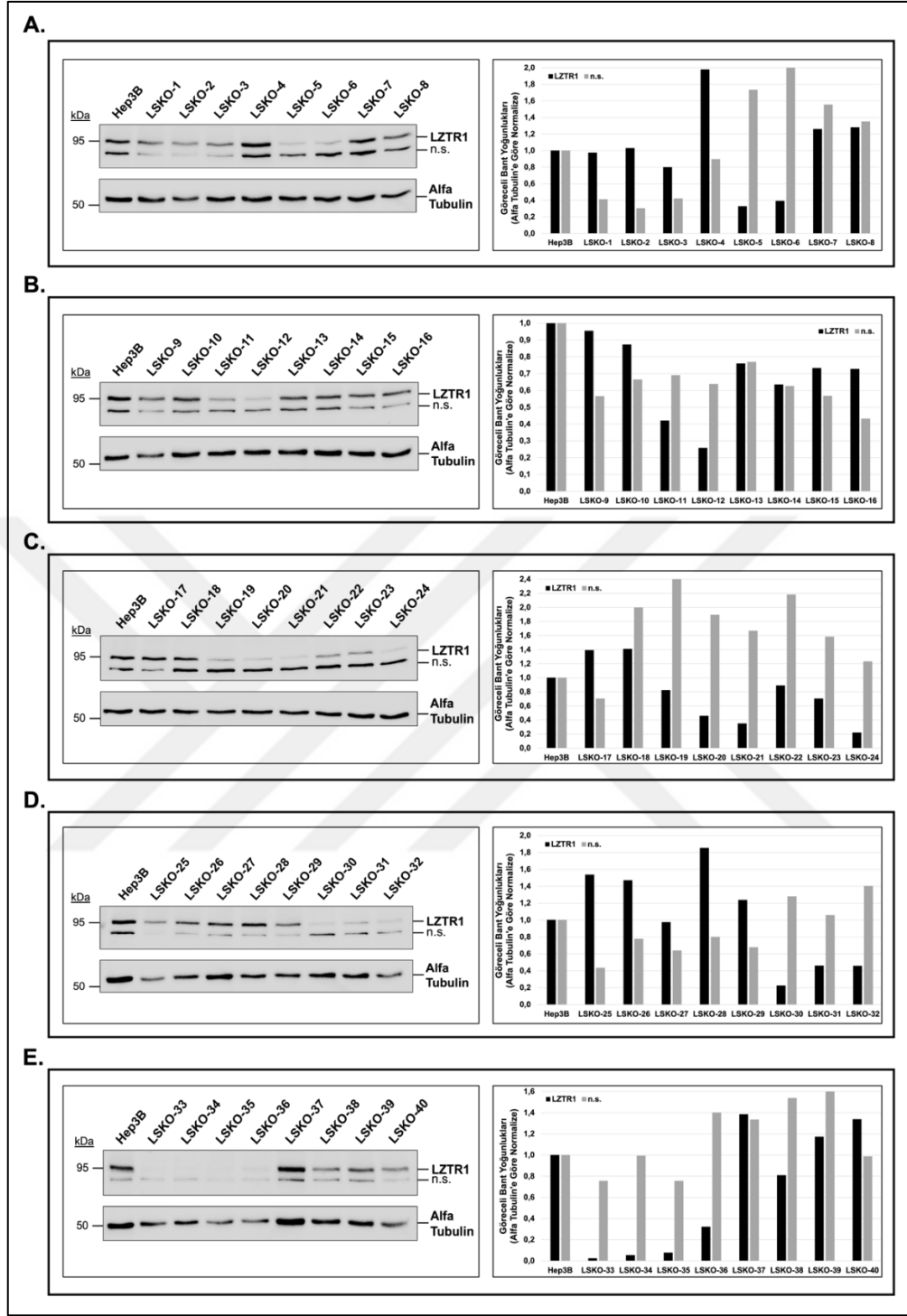
Birinci hedef kapsamında elde edilen kolonilerde, WB ve Sanger DNA dizileme analizleri yaparak *LZTR1*’in nakavt edildiği koloniler ve edilmediği kontrol kolonileri belirlendi. Bu doğrultuda ilk olarak, 107 adet Hep3B LSKO kolonisinden ve 22 adet SC kolonisinden total protein izolasyonu yapıp anti-*LZTR1* ve anti-Alfa Tubulin primer antikorları ile *LZTR1* protein düzeyleri belirlendi. WB deneyleri sonucunda 95 kDa ağırlığındaki *LZTR1* protein düzeylerinin Hep3B hücrelerine kıyasla en çok azaldığı LSKO-

34, 35, 98 ve 104 isimli koloniler ve Hep3B hücrelerinin LZTR1 protein seviyesine yakın olan SC-10, 12, 16 ve 22 isimli koloniler tez çalışmalarının devamında kullanılmak üzere seçildi (Şekil 3-6).

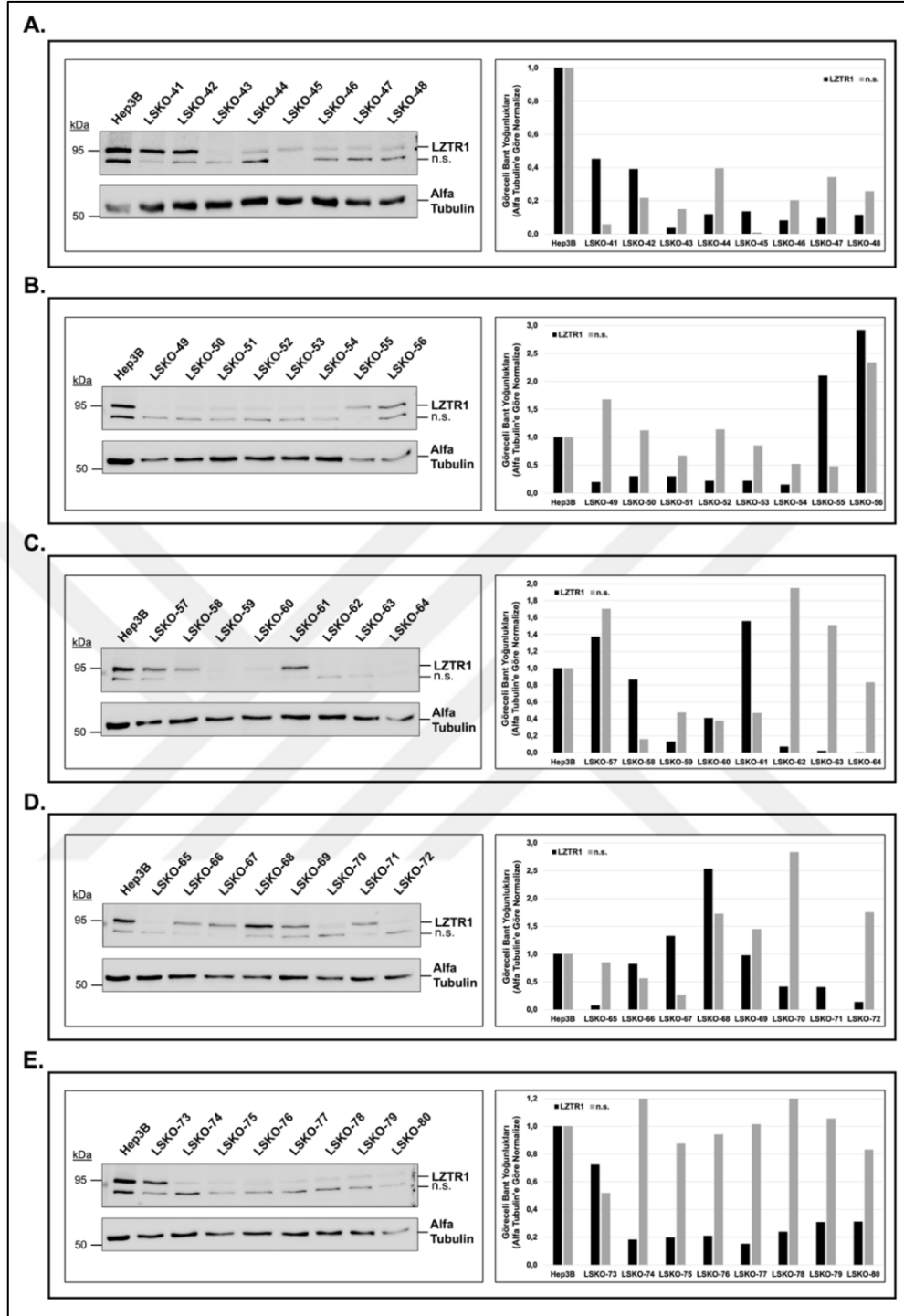
Tüm kolonilerin WB yöntemiyle taranıp çalışmaya devam edilecek kolonilerin belirlenmesinin ardından, WB deneyleri sonucunda seçilen Hep3B kolonilerinde *LZTR1* geninde CRISPR/Cas9 yöntemiyle düzenlenmesi hedeflenen 1. ekzondaki genomik DNA dizileri belirlenmeye çalışıldı. Bunun için ilk olarak seçilen sekiz koloniden gDNA'lar izole edilip *LZTR1*'in 1. ekzonu amplifiye edildi. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yöntemiyle gözlenmesi neticesinde seçilen SC kodlu kolonilerin hepsinde hedeflenen ampikon uzunluğundaki ürünlerin elde edildiği görüldü. LSKO kolonileri arasında ise LSKO-34 ve LSKO-35 örneklerinde hedeflenenden biraz daha kısa ürün elde edildiği, LSKO-98 hücrelerinden hedeflenen üründen yaklaşık 50 bp daha kısa ve tek bant ürün elde edildiği görüldü. LSKO-104 hücrelerinden ise biri yaklaşık 150 bp uzunluğunda olan iki ayrı bant amplifiye edildiği görüldü (Şekil 7).



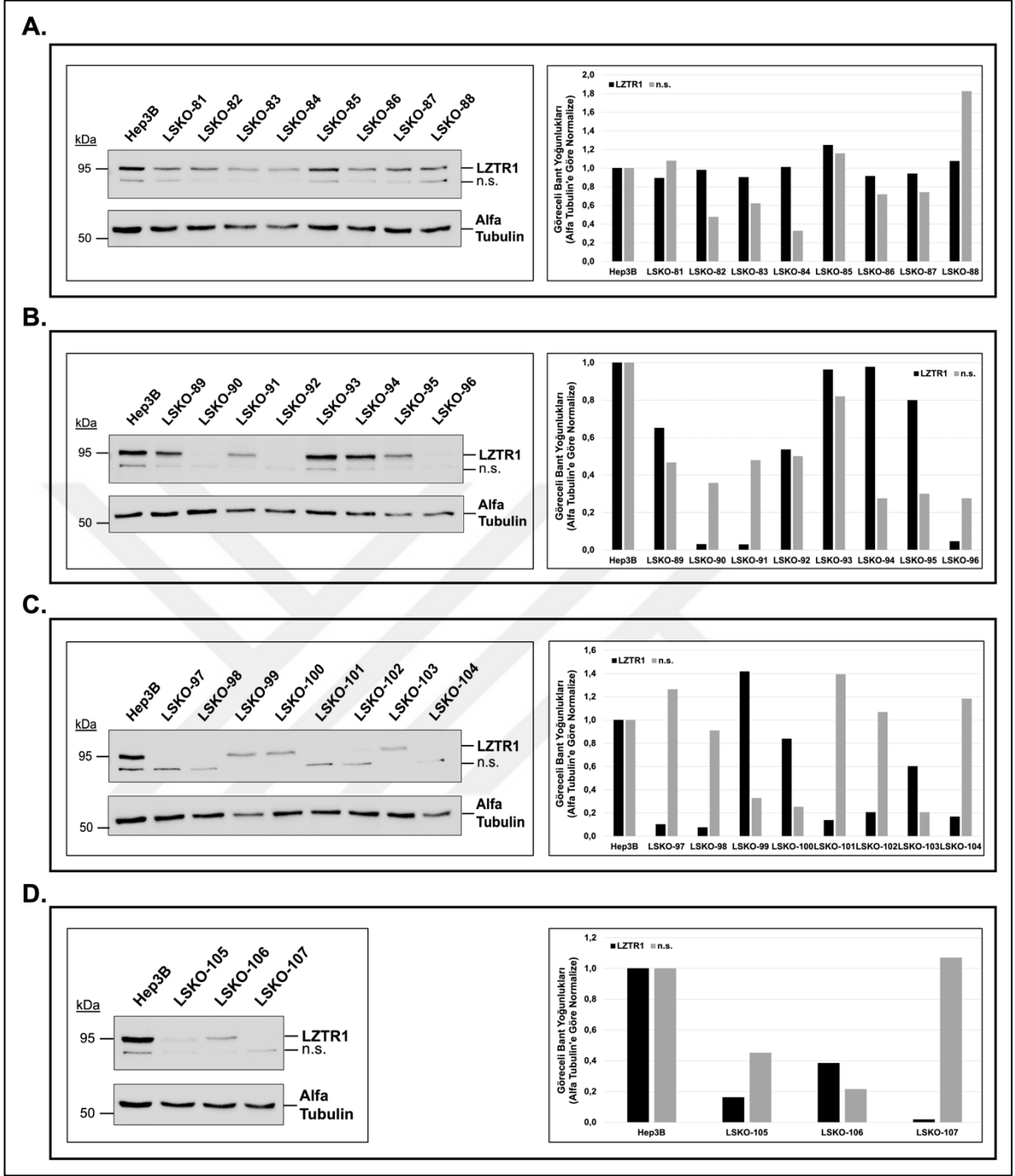
Şekil 2. Hep3B hücrelerinde *LZTR1*'in nakavt edilmesi için genomda hedeflenen bölge ve pX462 vektörüne aktarılan gRNA'ları kodlayan DNA dizilerinin Sanger DNA dizileme kromatogramları. **A.** Benchling aracı kullanılarak, insan genomunda *LZTR1* geninin 1. ekzonunda iki DNA ipliğinde gRNA'lar aracılığıyla hedeflenen DNA dizileri (mavi çerçeveler) ve bitişindeki PAM dizileri (kırmızı çerçeveler). **B.** Moleküler klonlama yöntemiyle pX462 vektörüne aktarılması işlemi sonucunda seçilen plazmid DNA'lardan planlandığı şekilde gRNA kodlayan DNA dizilerini içerdiğini gösteren Sanger DNA dizileme sonuçları. Kırmızı çerçeveler vektöre yerleştirilen dizileri göstermektedir.



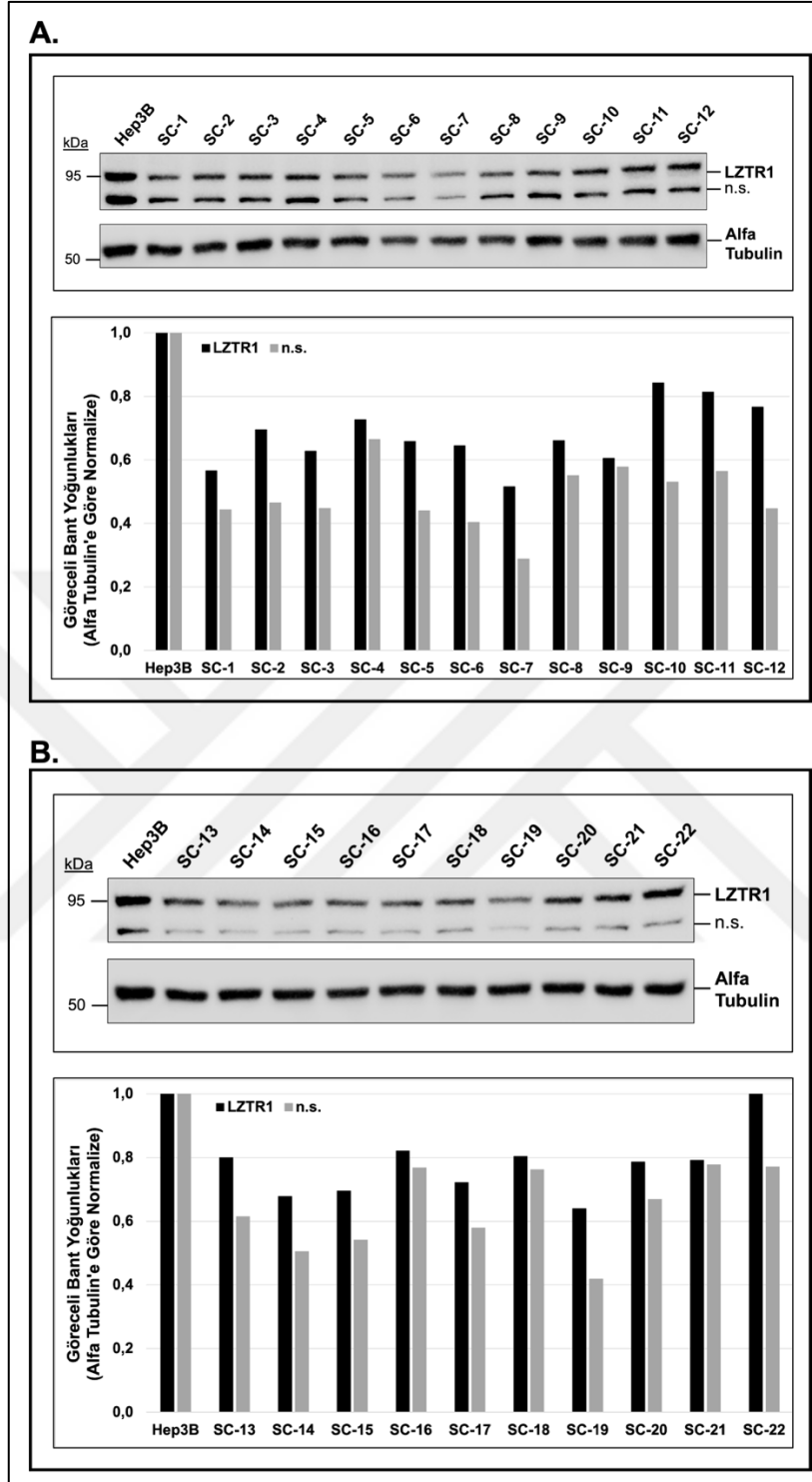
Şekil 3. LSKO1-40 arası Hep3B hücrelerindeki LZTR1 protein düzeyleri. **A.** LSKO1-8, **B.** LSKO9-16, **C.** LSKO17-24, **D.** LSKO25-32 ve **E.** LSKO33-40 kolonilerinden izole edilen total protein lizatlarındaki LZTR1 ve Alfa Tubulin protein düzeyleri WB yöntemiyle belirlenmiştir. Alfa Tubulin bant yoğunluk değerlerine göre normalize edilen LZTR1 protein düzeylerinin Hep3B hücrelerindeki normalize LZTR1 protein düzeylerine kıyasla değişimleri sütun grafiklerinde gösterilmiştir. n.s.: Kullanılan anti-LZTR1 antikoru ile yaklaşık 90 kDa ağırlığında belirlenen spesifik olmayan bant.



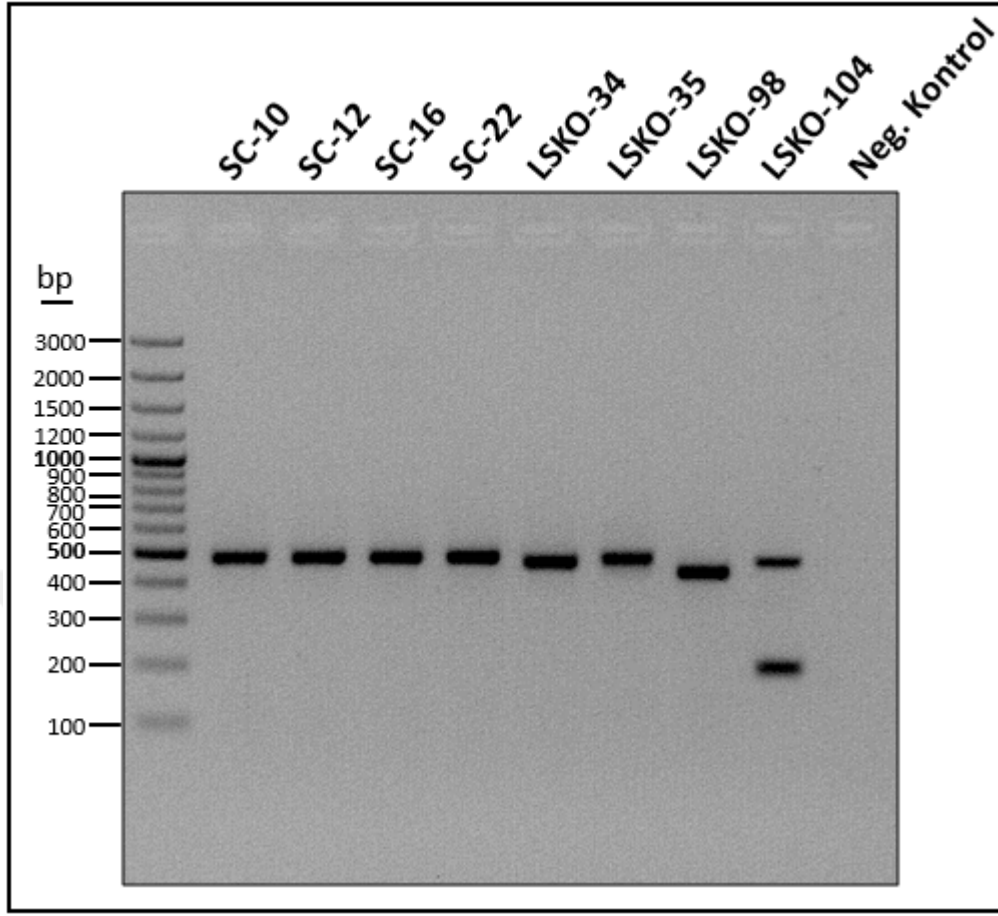
Şekil 4. LSKO41-80 arası Hep3B hücrelerindeki LZTR1 protein düzeyleri. **A.** LSKO41-48, **B.** LSKO49-56, **C.** LSKO57-64, **D.** LSKO65-72 ve **E.** LSKO73-80 kolonilerinden izole edilen total protein lizatlarındaki LZTR1 ve Alfa Tubulin protein düzeyleri WB yöntemiyle belirlenmiştir. Alfa Tubulin bant yoğunluk değerlerine göre normalize edilen LZTR1 protein düzeylerinin Hep3B hücrelerindeki normalize LZTR1 protein düzeylerine kıyasla değişimleri sütun grafiklerinde gösterilmiştir. n.s: Kullanılan anti-LZTR1 antikoru ile yaklaşık 90 kDa ağırlığında belirlenen spesifik olmayan bant.



Şekil 5. LSKO81-107 arası Hep3B hücrelerindeki LZTR1 protein düzeyleri. **A.** LSKO81-88, **B.** LSKO89-96, **C.** LSKO97-104 ve **D.** LSKO105-107 kolonilerinden izole edilen total protein lizatlarındaki LZTR1 ve Alfa Tubulin protein düzeyleri WB yöntemiyle belirlenmiştir. Alfa Tubulin bant yoğunluk değerlerine göre normalize edilen LZTR1 protein düzeylerinin Hep3B hücrelerindeki normalize LZTR1 protein düzeylerine kıyasla değişimleri sütun grafiklerinde gösterilmiştir. n.s.: Kullanılan anti-LZTR1 antikoru ile yaklaşık 90 kDa ağırlığında belirlenen spesifik olmayan bant.



Şekil 6. SC1-22 arası Hep3B hücrelerindeki LZTR1 protein düzeyleri. **A.** SC1-12 ve **B.** SC13-22 kolonilerinden izole edilen total protein lizatlarındaki LZTR1 ve Alfa Tubulin protein düzeyleri WB yöntemiyle belirlenmiştir. Alfa Tubulin bant yoğunluklarına göre normalize edilen LZTR1 protein düzeylerinin Hep3B hücrelerindeki normalize LZTR1 protein düzeylerine kıyasla değişimleri sütun grafiklerinde gösterilmiştir. n.s: Kullanılan anti-LZTR1 antikoru ile yaklaşık 90 kDa ağırlığında belirlenen spesifik olmayan bant.



Şekil 7. WB sonuçlarına göre seçilen sekiz Hep3B kolonisinden PCR yöntemiyle amplifiye edilen ve *LZTR1*'in 1. ekzonunu içeren PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonucu. *LZTR1*'in 1. ekzonunun WT olması durumunda 486 baz çifti (bp) uzunluğunda bir ürünün amplifiye olması beklenmektedir. Neg. Kontrol: Negatif kontrol (su).

Uyguladığımız CRISPR/Cas9n yönteminin *LZTR1* geninin karşılıklı iki ipliğinde ayrı genomik değişiklikler yapmasını hedeflediğimiz için agaroz jel elektroforezi sonrasında tek bant görülen LSKO-34, LSKO-35 ve LSKO-98 kolonilerine ait jelde yürütülen PCR ürünleri kesilip allel bazında dizileme yapmak üzere ayrıldı, temizlendi ve pJET vektörüne klonlandı. pJET vektörüne aktararak elde edilen plazmid DNA'lar DH5α bakterilerine transforme edilip elde edilen koloniler dizilendi. Bu yolla, LSKO-34 ve LSKO-35 için dörder adet, LSKO-98 için ise sekiz adet plazmid DNA dizilendi. SC kolonilerinden (tek bant olduğu ve WT olması beklendiği için) ve LSKO-104 hücrelerinden (iki bant belirlendiği için (Şekil 7)) elde edilen PCR ürünleri ise jelden kesilip temizlendikten sonra pJET vektörüne aktarılmadan doğrudan dizilendi. Sanger DNA dizilemelerinin sonucunda incelenen tüm SC kolonilerininin gDNA dizilerinin WT olduğu görüldü. İncelenen LSKO

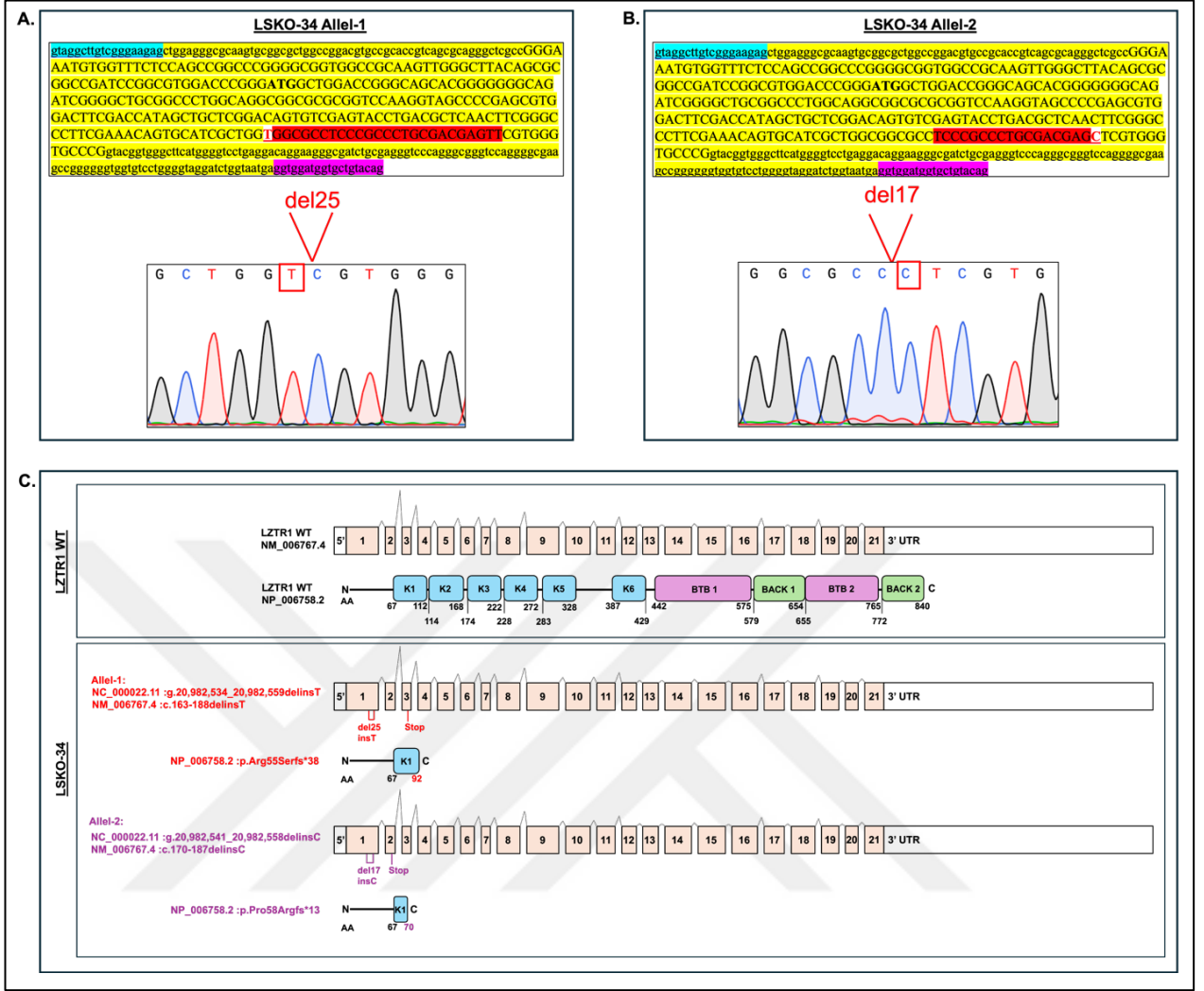
örnekleri arasından sadece LSKO-98 hücrelerinde *LZTR1* geninde homozigot varyasyon bulunduğu, LSKO-34, 35 ve 104 hücrelerinde ise heterozigot varyasyonlar bulunduğu belirlendi (Tablo 18).

Buna göre LSKO-34 hücrelerinde *LZTR1* geninin 1. ekzonunda DNA ipliklerinin birinde 25 nükleotidin delesyona uğrayıp Timin (T) nükleotidinin insersiyonunun gerçekleştiğı ve bu durumun *LZTR1* cDNA'sında c.163-188delinsT varyasyonuna neden olarak çerçeve kaymasına sebebiyet verdiğı ve *LZTR1*'in 3. ekzonunda erken sonlanmaya yol açarak 92 amino asitlik kısa bir proteinin çevrilmesine neden olduğı belirlendi (Şekil 8A ve C, Tablo 18). LSKO-34 hücrelerinde *LZTR1* geninin 1. ekzonuna karşılık gelen diğ er DNA ipliğ inde ise 17 nükleotidin delesyona uğrayıp Sitozin (C) nükleotidinin insersiyonunun gerçekleştiğı ve bu durumun *LZTR1* cDNA'sında c.170-187delinsC varyasyonuna neden olarak çerçeve kaymasına sebebiyet verdiğı ve *LZTR1*'in 2. ekzonunda erken sonlanmaya yol açarak 70 amino asitlik kısa bir proteinin çevrilmesine neden olduğı belirlendi (Şekil 8B ve C, Tablo 18). LSKO-35 hücrelerinde *LZTR1* geninin 1. ekzonunda DNA ipliklerinin birinde beş nükleotit delesyona uğramasıyla ve bu durumun *LZTR1* cDNA'sında c.172-176delCCGCC varyasyonuna neden olup çerçeve kaymasına sebebiyet vermesi sonucunda *LZTR1*'in 2. ekzonunda erken sonlanmaya yol açarak 75 amino asitlik kısa bir proteinin çevrilmesine neden olduğı belirlendi (Şekil 9A ve C, Tablo 18). LSKO-35 hücrelerinde *LZTR1* geninin 1. ekzonuna karşılık gelen diğ er DNA ipliğ inde ise 17 nükleotidin delesyona uğradığı ve bu durumun *LZTR1* cDNA'sında c.179-195del17 varyasyonuna neden olup çerçeve kaymasına sebebiyet vererek *LZTR1*'in 2. ekzonunda erken sonlanmaya yol açması nedeniyle 71 amino asitlik kısa bir proteinin çevrilmesine sebep olduğı belirlendi (Şekil 9B ve C, Tablo 18). LSKO-98 hücrelerinde 56 nükleotidin delesyona uğradığı ve iki nükleotidlik bir insersiyonun gerçekleştiğı homozigot varyasyonunun olduğı ve bu durumun *LZTR1* cDNA'sında c.132_189delinsAC varyasyonuna neden olarak çerçeve kaymasına sebebiyet vermesi sonucu *LZTR1*'in 2. ekzonunda erken sonlanmaya yol açarak 57 amino asitlik kısa bir proteinin çevrilmesine neden olduğı belirlendi (Şekil 10, Tablo 18). Son olarak, LSKO-104 hücrelerinde *LZTR1* geninin 1. ekzonunda DNA ipliklerinin birinde 23 nükleotidin delesyona uğradığı ve bu durumun *LZTR1* cDNA'sında c.154_176del23 varyasyonuna neden olup çerçeve kaymasına sebebiyet vererek *LZTR1*'in 2. ekzonunda erken sonlanmaya yol açması nedeniyle 68 amino asitlik kısa bir proteinin çevrilmesine neden olduğı belirlendi (Şekil 11A ve C, Tablo 18). LSKO-104 hücrelerinde *LZTR1* geninin 1. ekzonuna karşılık gelen diğ er

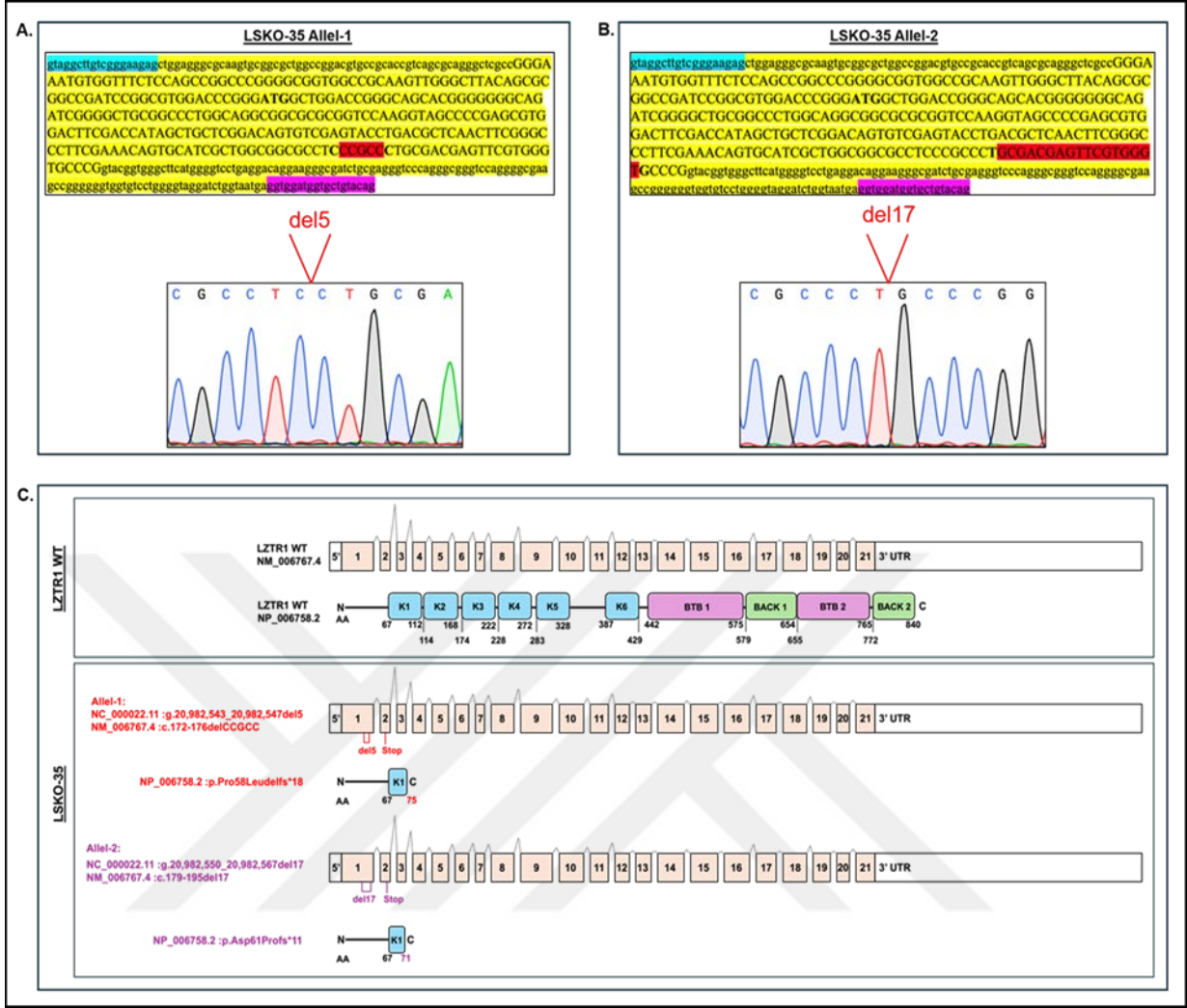
DNA ipliğinde ise transkripsiyon başlama bölgesini de içeren 299 nükleotidin delesyona uğrayıp dört nükleotidlik insersiyonun gerçekleştiği ve bu durumun transkripsiyonun başlamamasına neden olarak bu allelden mRNA üretilmemesine ve bu nedenle protein çevrilmemesine yol açacağı tahmin edildi (Şekil 11B ve C, Tablo 18).

Tablo 18. Seçilen LSKO klonlarının alellerindeki değişimler.

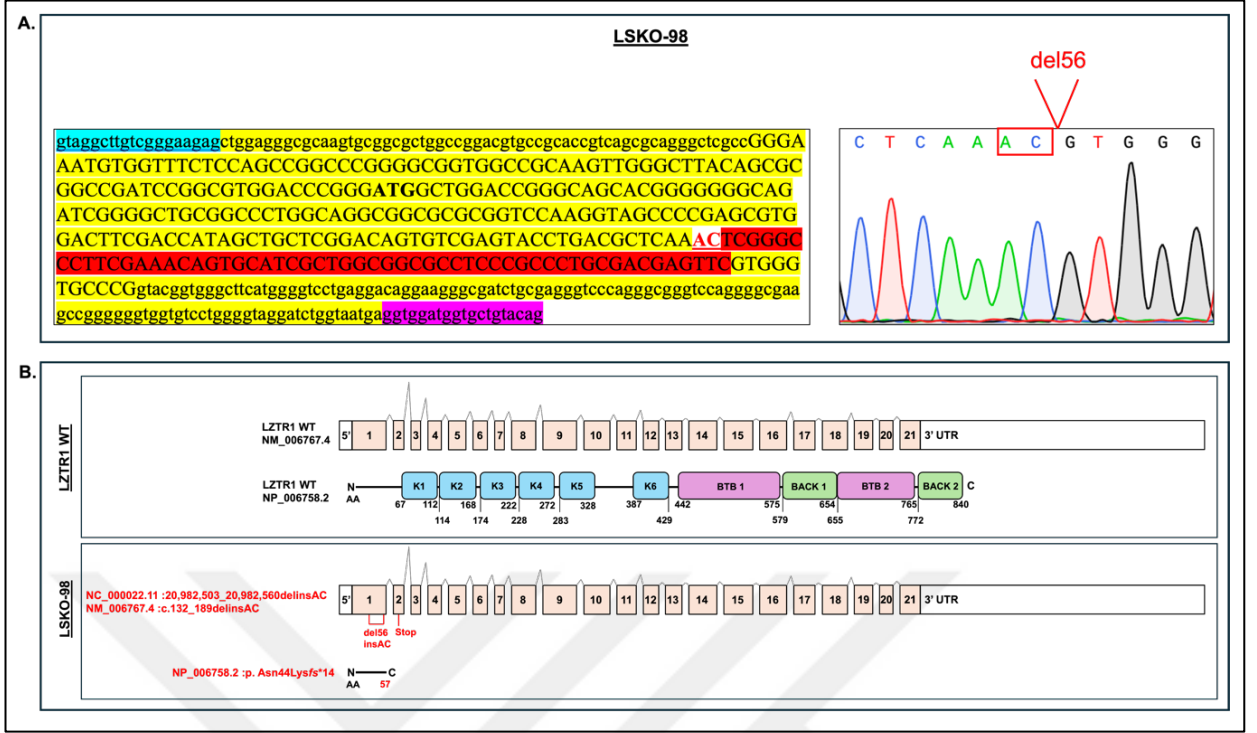
Koloni ismi	Alel no	DNA	Protein
LSKO-34	1. Alel	c.163-188delinsT	p.Arg55Serfs*38
	2. Alel	c.170-187delinsC	p.Pro58Argfs*13
LSKO-35	1. Alel	c.172-176delCCGCC	p.Pro58Leudef*18
	2. Alel	c.179-195del17	p.Asp61Profs*11
LSKO-98	1. Alel	c.132_189delinsAC	p.Asn44Lysfs*14
	2. Alel	c.132_189delinsAC	p.Asn44Lysfs*14
LSKO-104	1. Alel	c.154_176del23	p.His51Leufs*18
	2. Alel	c.0	p.0



Şekil 8. LSKO-34 klonunda *LZTR1*'in 1. ekzonunun DNA sekansları ve mRNA ve protein düzeyindeki etkilerinin şematik gösterimi. **A.** ve **B.** LSKO-34 hücrelerinden PCR yöntemiyle amplifiye edilen *LZTR1*'in 1. ekzonunu içeren DNA dizisi pJET vektörüne klonlandıktan sonra genin iki ipliğini içeren plazmid DNA'lar Sanger DNA dizileme yöntemiyle dizilene analiz edilerek iki iplikte farklı varyasyonların bulunduğu belirlendi. **C.** WT LZTR1 referans gDNA, mRNA ve protein dizilerine göre LSKO-34 hücrelerindeki varyasyonların şematik gösterimi. Üzeri mavi ve pembe renkli diziler sırasıyla forward ve reverse primerlerin bağlandığı dizileri, üzeri kırmızı renkli diziler delesyon belirlenen dizileri, kırmızı renkli diziler nükleotit değişimini göstermektedir. 3' UTR: 3' proteine çevrilmeyen bölge (UTR), 5': 5' UTR, N: Amino uç, C: Karboksi uç, AA: Amino asit, K: Kelch domaini, BTB: BTB domaini, BACK: BACK domaini, Stop: Sonlanma kodonunun olduğu yer.



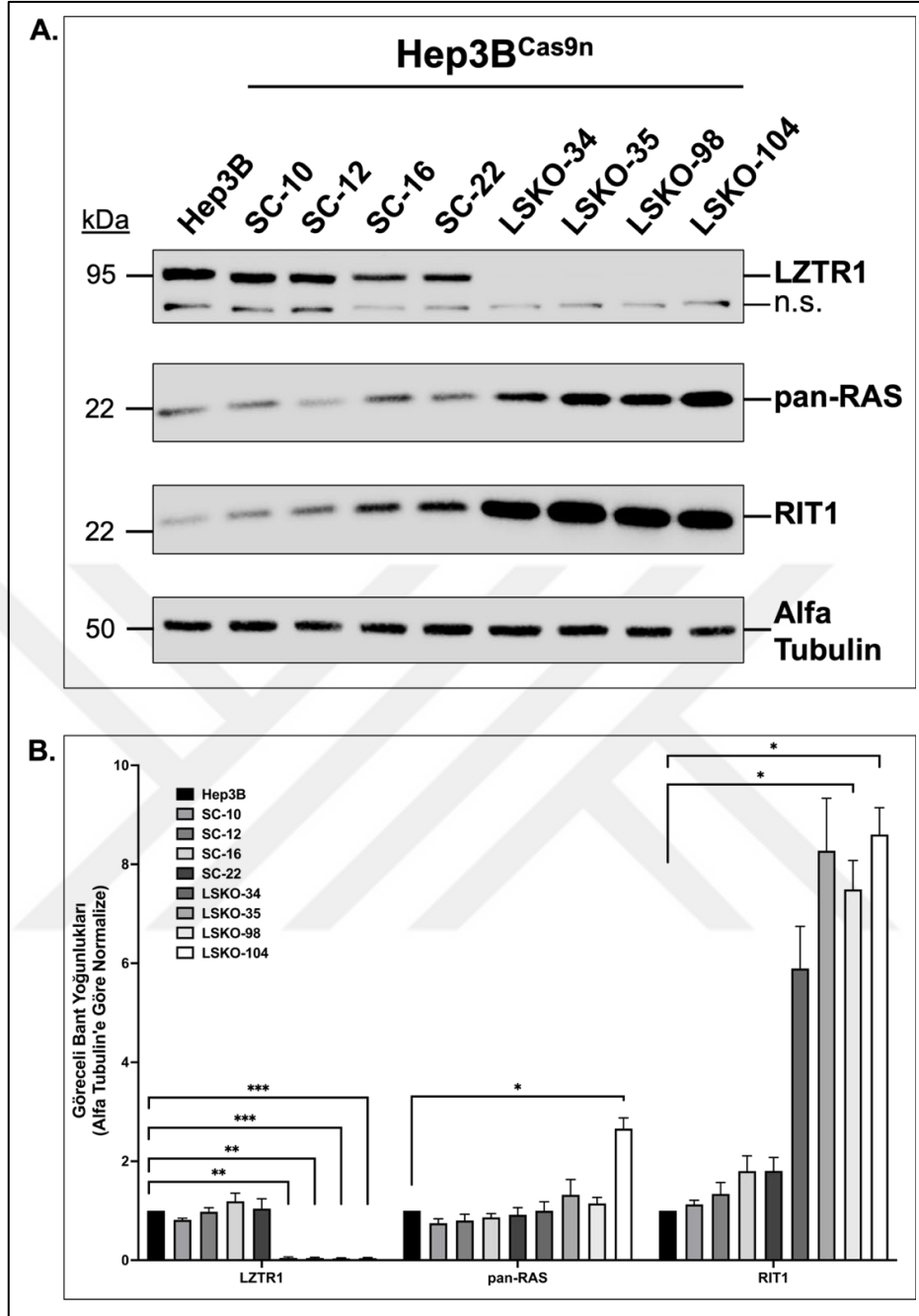
Şekil 9. LSKO-35 klonunda *LZTR1*'in 1. ekzonunun DNA sekansları ve mRNA ve protein düzeyindeki etkilerinin şematik gösterimi. **A.** ve **B.** LSKO-35 hücrelerinden PCR yöntemiyle amplifiye edilen *LZTR1*'in 1. ekzonunu içeren DNA dizisi pJET vektörüne klonlandıktan sonra genin iki ipliğini içeren plazmid DNA'lar Sanger DNA dizileme yöntemiyle dizilenip analiz edilerek iki iplikte farklı varyasyonların bulunduğu belirlendi. **C.** WT *LZTR1* referans gDNA, mRNA ve protein dizilerine göre LSKO-35 hücrelerindeki varyasyonların şematik gösterimi. Üzeri mavi ve pembe renkli diziler sırasıyla forward ve reverse primerlerin bağlandığı dizileri, üzeri kırmızı renkli diziler delesyon belirlenen dizileri göstermektedir. 3' UTR: 3' proteine çevrilmeyen bölge (UTR), 5': 5' UTR, N: Amino uç, C: Karboksi uç, AA: Amino asit, K: Kelch domaini, BTB: BTB domaini, BACK: BACK domaini, Stop: Sonlanma kodonunun olduğu yer.



Şekil 10. LSKO-98 klonunda *LZTR1*'in 1. ekzonunun DNA sekansları ve mRNA ve protein düzeyindeki etkilerinin şematik gösterimi. **A.** LSKO-98 hücrelerinden PCR yöntemiyle amplifiye edilen *LZTR1*'in 1. ekzonunu içeren DNA dizisi pJET vektörüne klonlandıktan sonra genin iki ipliğini içeren plazmid DNA'lar Sanger DNA dizileme yöntemiyle dizilip analiz edilerek homozigot bir varyasyonun bulunduğu belirlendi. **B.** WT *LZTR1* referans gDNA, mRNA ve protein dizilerine göre LSKO-98 hücrelerindeki varyasyonların şematik gösterimi. Üzeri mavi ve pembe renkli diziler sırasıyla forward ve reverse primerlerin bağlandığı dizileri, üzeri kırmızı renkli diziler delesyon belirlenen dizileri, kırmızı renkli diziler nükleotit değişimini göstermektedir. 3' UTR: 3' proteine çevrilmeyen bölge (UTR), 5': 5' UTR, N: Amino uç, C: Karboksi uç, AA: Amino asit, K: Kelch domaini, BTB: BTB domaini, BACK: BACK domaini, Stop: Sonlanma kodonunun olduğu yer.

Tezin devamında yapılacak RNA dizileme çalışmalarında birer adet negatif kontrol (SC) ve LZTR1 nakavt (LSKO) Hep3B hücresine ihtiyaç duyuluyor olmasına rağmen koloni tarama WB deneyleri ve DNA dizi analizleri neticesinde dört adet SC ve LSKO kolonisinin kullanılabilir durumda olması nedeniyle öne çıkan birer adet koloniyi belirleyebilmek için ilave deneyler yapıldı. LZTR1 proteininin CUL3 proteini tarafından kanonik RAS proteinlerinin ve RIT1 proteinin poliubikitinasyonuna aracılık ederek hücre içindeki kanonik RAS ve RIT1 protein düzeylerinin azalmasına yol açtığı bilinmektedir (4-6, 13, 14). Bu nedenle, öne çıkan Hep3B CRISPR kolonileri arasında LZTR1 proteininin varlığının ve yokluğunun fonksiyonel etkisini en iyi yansıtan Hep3B hücrelerini belirlemek amacıyla, anti-LZTR1 antikoruna ek olarak, anti-pan-RAS (kanonik RAS proteinlerini tanıyan antikor) ve anti-RIT1 antikorlarını kullanarak öne çıkan sekiz koloniden izole edilen total protein lizatlarında LZTR1, kanonik RAS ve RIT1 proteinlerinin düzeyleri WB deneyleriyle incelendi. WB deneyleri neticesinde LZTR1 protein düzeylerinin SC kolonileri arasında SC-12 ve SC-16 hücrelerinde Hep3B hücrelerine daha yakın düzeyde oldukları, incelenen LSKO kolonilerinin ise hepsinde 95 kDa ağırlığındaki LZTR1 proteininin düzeylerinin Hep3B hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi (Şekil 12). Buna ek olarak, kanonik RAS proteinlerinin seviyesinin tüm SC kolonilerinde Hep3B hücrelerinin düzeyine yakın olduğu ve LSKO kolonilerinde daha fazla olduğu görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı tek artışın LSKO-104 örneklerinde olduğu belirlendi. Buna ek olarak, RIT1 protein düzeylerinin SC-10 ve SC-12 hücrelerinde Hep3B hücrelerine daha yakın düzeyde olup, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, SC-16 ve SC-22 hücre örneklerinde arttığı belirlendi. Son olarak, RIT1 protein seviyelerinin Hep3B hücrelerine kıyasla dört LSKO kolonisinde de arttığı ancak ortalama değerlere göre en yüksek RIT1 seviyesinin LSKO-104 hücrelerinde olduğu ve ardından sırasıyla LSKO-35, LSKO-98 ve LSKO-34 hücrelerinin yer aldığı görüldü. Bu deney sonucunda SC kolonileri arasında SC-12 ve SC-16 hücreleri; LSKO kolonileri arasında ise başta LSKO-104 olmak üzere LSKO-35 ve LSKO-98 öne çıkan hücreler olarak belirlendi (Şekil 12). Bunun ardından, tez çalışmalarının devamında kullanılacak bir tane SC ve bir tane de LSKO hücresini belirleyebilmek için Hep3B hücrelerini deneye dahil etmeden, belirlenen beş hücreden yine bağımsız üç tekrar halinde izole edilen protein lizatlarıyla LZTR1, pan-RAS ve RIT1 protein düzeylerine ek olarak RAS/MAPK yolağının alt akımında yolağın aktivitesinin belirteçleri olan p-MEK1/2 ve p-ERK1/2 protein düzeyleri WB yöntemiyle incelendi. Bu deneyde hem Hep3B hücrelerini deneye dahil etmeyerek hem de proteinlerin

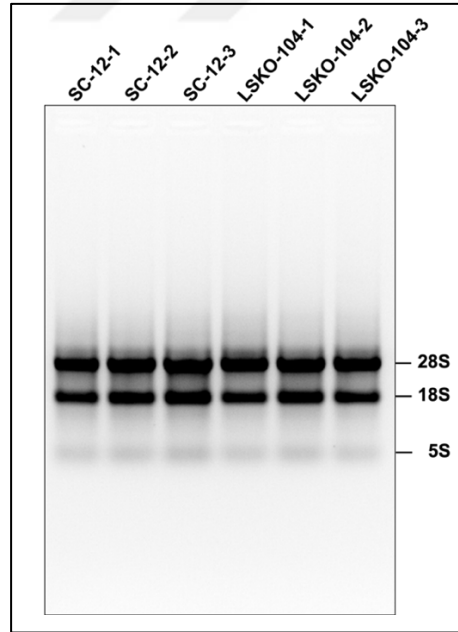
seviyelerini herhangi bir örneğin değerlerine kıyaslamayarak incelediğimiz proteinlerin ortalama bant kalınlık değerleri üzerinden analizler yaparak daha katı bir eleme yapılması planlandı. Bu doğrultuda yapılan deneyler neticesinde ortalama p-MEK1/2 ve p-ERK1/2 protein düzeylerinin daha az ve LZTR1 protein seviyesinin daha yüksek olması dikkate alınarak tez çalışmalarının devamında kullanılacak kontrol hücre örneği olarak SC-12 hücrelerinin kullanılmasına karar verildi (Şekil 13). Ardından, tüm protein bant değerlerinin SC-12 hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı değişim bulunup bulunmadığı analiz edildi. Elde ettiğimiz veriler, LZTR1'in nakavt edildiği Hep3B hücrelerin hepsinde SC-12'ye kıyasla LZTR1 protein düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldığı ve en az LZTR1 protein miktarının LSKO-104 hücrelerinde olduğunu ortaya koydu. Buna ek olarak, LSKO kodlu hücreler arasında SC-12 hücresine kıyasla kanonik RAS protein düzeylerinde ve p-MEK1/2 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı tek artışın LSKO-104 hücrelerinin örneklerinde olduğu belirlendi. Buna ilaveten, RIT1 ve p-ERK1/2 protein düzeylerinin ise tüm LSKO hücrelerinde SC-12'ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı görüldü (Şekil 13). Sonuç olarak, birinci hedef doğrultusunda yapılan deneyler sonucunda tez çalışmalarının devamında gerçekleştirilmesi planlanan RNA dizileme analizlerinde kullanılmak üzere kontrol hücresi olarak SC-12 hücrelerinin LZTR1'in nakavt edildiği Hep3B hücreleri olarak ise LSKO-104 hücrelerinin kullanılmasına karar verildi.



Şekil 12. Hep3B hücreleri ile seçilen SC ve LSKO Hep3B kolonileriyle yapılan WB deneyleri ve analizleri. **A.** CRISPR/Cas9n yönteminin uygulanmadığı Hep3B hücreleri ile önceki WB deneyleri sonucunda seçilen negatif kontrol (SC) ve *LZTR1* nakavt (LSKO) kolonilerindeki LZTR1, pan-RAS, RIT1 ve Alfa Tubulin protein düzeyleri WB yöntemiyle belirlendi. WB deneyleri üç farklı zamanda izole edilen örneklerle üç kez tekrarlanmış olup, şekilde bir deneyin sonuçları sunulmuştur. **B.** Her deneyde Alfa Tubulin protein düzeylerine göre normalize edilen LZTR1, pan-RAS ve RIT1 protein bant yoğunluklarının Hep3B hücrelerine kıyasla ortalama değişimlerini gösteren sütun grafiği. İstatistiksel analizlerde iki yönlü ANOVA yöntemi kullanılmış olup, çoklu karşılaştırma verileri Dunnett yöntemiyle düzeltilmiştir. *: düzeltilmiş p değeri<0.05; **: düzeltilmiş p değeri<0.005; ***: düzeltilmiş p değeri<0.001; n.s: spesifik olmayan protein bantı.

4.3. RNA Örneklerinin Hazırlanması ve RNA Dizilemelerinin Gerçekleştirilmesi

Tezin ikinci hedefi, *LZTR1* geninin nakavt edildiği belirlenen Hep3B hücrelerinden (LSKO-104) ve kontrol Hep3B hücrelerinden (SC-12) üçer bağımsız tekrar halinde total RNA örneklerinin izole edilmesi, RNA örneklerinin RNA dizileme hizmetinin alınacağı firmaya gönderilmesi, RNA dizilemelerinin gerçekleştirilerek tarafımıza ham dizileme verilerinin iletilmesi ve dizileme verilerinin biyoenformatik analizler için kullanılabilir kalitede olup olmadığının analiz edilmesini içermektedir. Bu doğrultuda ilk olarak SC-12 ve LSKO-104 hücrelerinden total RNA izolasyonları gerçekleştirilip izole edilen örnekler agaroz jel elektroforezi yöntemiyle kontrol edildi (Şekil 14). Ardından, RNA dizilemelerini gerçekleştirecek olan firmanın örnek kabul şartlarına uygun miktarlarda total RNA örnekleri alikotlanarak gönderildi. Firma, teslim aldığı örneklerin RNA dizilemesi için uygun olup olmadığını kontrol edebilmek için örneklerin RIN değerlerini belirledi. RNA dizileme için en az 7.0 ve en çok 10.0 arasında olması beklenen RIN değerlerinin gönderdiğimiz örneklerde 9.6 ile 9.9 arasında olduğunu tespit edilmesi sonrasında RNA dizilemeleri gerçekleştirildi (Tablo 19).



Şekil 14. SC-12 ve LSKO-104 Hep3B hücrelerinden izole edilen total RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi sonucu.

Tablo 19. RNA dizilemesi yapılan örneklerin RIN değerleri. RIN: RNA integrity number

Sıra	Örnek	RIN değeri
1	SC-12_1	9.6
2	SC-12_2	9.7
3	SC-12_3	9.6
4	LSKO-104_1	9.9
5	LSKO-104_2	9.8
6	LSKO-104_3	9.8

RNA dizilemeler gerçekleştirilip ham RNA dizileme verileri (“fastq” dosyaları) tarafımıza gönderildikten sonra ham verilerin biyoenformatik analizler için yeterli kalite düzeyinde olup olmadıkları analiz edildi. Kalite kontrol analizleri, dizilenen altı örneğin genomu hizalanan okuma sayılarının 105 milyon ile 277 milyon arasında olduğunu, referans genomu hizalama oranlarının %99.03 ile %99.78 arasında olduğunu (en az %90 olması istenmiştir) ve Q30 kalite oranlarının %91.83 ile %93.43 aralığında değiştiğini (en az %90 olması istenmiştir) (Tablo 20) ve ortalama sekans kalite skorlarının (Phred skorlarının) 36 olduğunu (en az 28 olması beklenir) ortaya koydu (Şekil 15). Sonuç olarak, ikinci hedefimiz kapsamında yapılan çalışmalarla tezin bir sonraki hedefinde kullanılmaya uygun kalitede RNA dizileme verileri elde edildi.

Tablo 20. RNA dizileme verilerinin genomu hizalanma ve Q30 kalite oranları.

Sıra	Örnek	Toplam Okuma Sayısı	Genom Hizalanan Okuma Sayısı	Hizalama Oranı	Q30 Kalite Oranı
1	SC-12_1	274 921 354	274 065 753	%99.69	%92.11
2	SC-12_2	171 520 260	171 064 734	%99.73	%92.97
3	SC-12_3	204 966 786	204 393 756	%99.72	%93.43
4	LSKO-104_1	138 955 234	138 647 811	%99.78	%92.91
5	LSKO-104_2	106 643 832	105 609 414	%99.03	%92.82
6	LSKO-104_3	277 744 208	277 001 392	%99.73	%91.83



Şekil 15. Ham RNA dizileme verilerinin ortalama sekans kalite skorları sonucu. FastQC analizi sonucunda tüm fastq dosyalarındaki okumalar kaliteli okumaya karşılık gelen yeşil bölgede (≥ 28 Phred skoru) yer almaktadır.

4.4. Transkriptomik Veri Analizleri

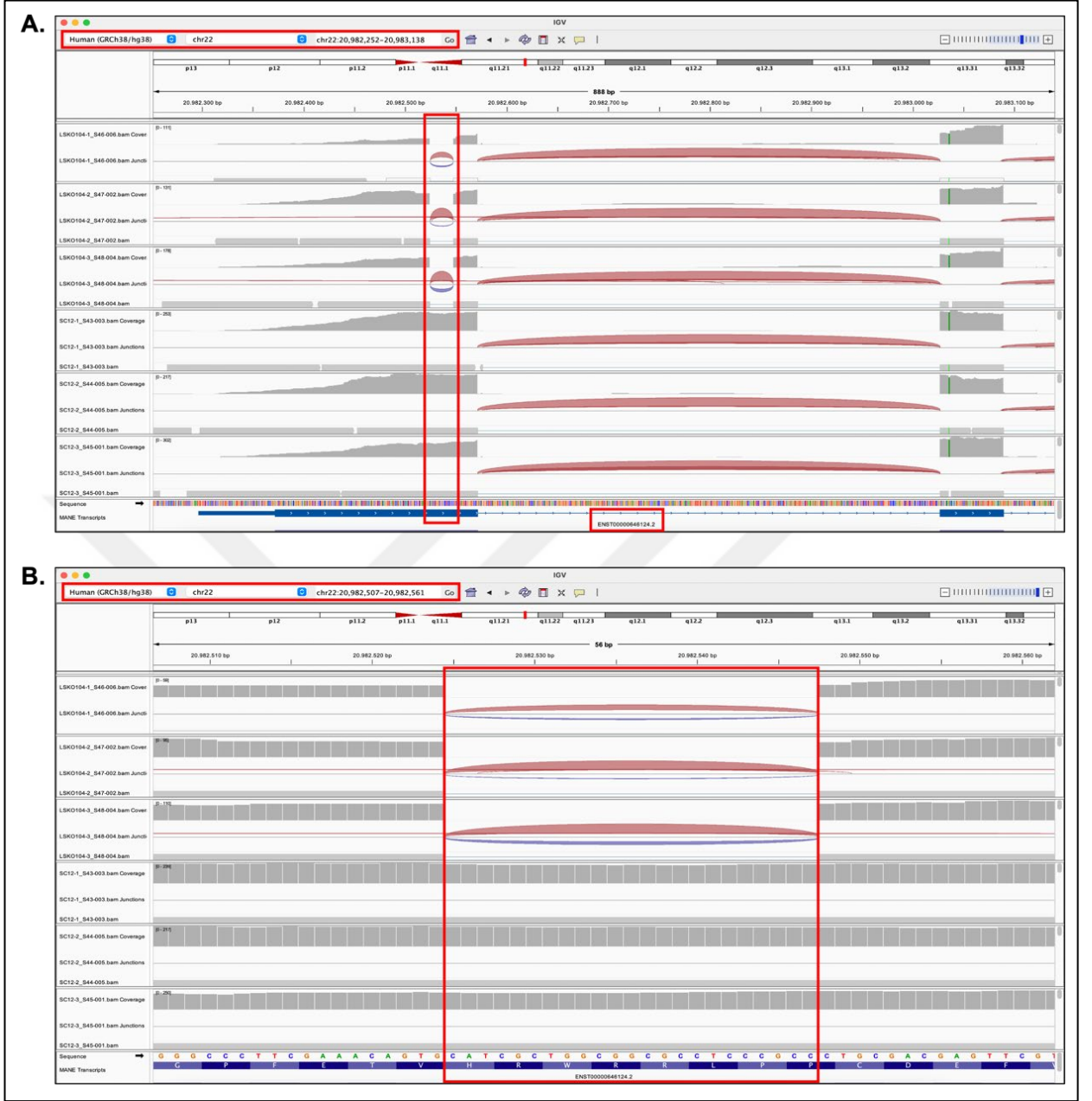
Tezin üçüncü hedefi ile, ham RNA dizileme verileri (fastq dosyaları) elde edildikten sonra *LZTR1* geninin nakavt edilmesiyle Hep3B hücrelerinde ekspresyonları değişen genlerin listesi ve GSEA yöntemiyle *LZTR1* varlığının ve yokluğunun Hep3B hücrelerinde etkilediği biyolojik süreçlere ilişkin verilerin elde edilmesi planlanmıştır.

4.4.1. *LZTR1*'in İfade Farklılığına Neden Olduğu Genlerin Belirlenmesi

Tezin üçüncü hedefi kapsamında ilk olarak SC-12 (kontrol) ve LSKO-104 (*LZTR1* nakavt) Hep3B hücrelerinin RNA dizileme verileri analiz edilerek başta protein kodlayan genler olmak üzere *LZTR1* varlığının ve yokluğunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ekspresyon farklılığına yol açan genlerin listesi belirlenmiştir. Bu doğrultuda, RNA dizileme verilerinin referans genomla hizalanmasıyla elde edilen ".bam" dosyaları incelenerek örneklerdeki *LZTR1* mRNA okumaları incelendi. BAM sonuçları, LSKO-104 hücrelerinin genomik DNA'larını Sanger DNA dizileme yöntemiyle dizileyerek elde ettiğimiz verilerle uyumlu bir şekilde (Şekil 11) LSKO-104 hücrelerinin bir allelinde belirlediğimiz ve protein

çevrimi sırasında çerçeve kaymasıyla erken sonlanmaya neden olan (NP_006758.2:His51Leufs*18) 23 nükleotidlik delesyona (NM_006767.4:c.154_176del23) sahip mRNA'nın okunduğunu ortaya koydu. SC-12 hücrelerinde ise LZTR1 mRNA dizilerinin WT olduğu görüldü (Şekil 16).

LSKO-104 ve SC-12 hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı gösteren genlerin listesi belirlenmiştir. Bu analizler neticesinde, 20'si LncRNA olmak üzere toplam 117 genin ifadesinin $p < 0.05$ ve > 1.5 kat; 113'ünün ise $p < 0.05$ ve > 2 kat değiştiği belirlendi. 1.5 Kat ve üzeri ifade farklılığı gösteren 117 genden 54'ünün ifadesinin Hep3B hücrelerinde *LZTR1* nakavt edildiğinde artıp, 63'ünün *LZTR1* sessizleştğinde azaldığı görüldü (Tablo 21). Son olarak, istatistiksel olarak anlamlı ifade değişimi olduğu belirlenen genlerin ekspresyon verilerinin ısı haritası şekli hazırlandı (Şekil 17).



Şekil 16. LSKO-104 örneklerinde LZTR1 mRNA'sında 23 nükleotitlik delesyonun bulunduğunu ortaya koyan BAM görüntüleri. **A.** Yukarıdan aşağıya doğru ilk üç sırada yer alan LSKO-104 hücrelerine ait RNA dizileme sonuçlarında LZTR1'in 1. ekzonundaki delesyon nedeniyle LZTR1 mRNA'sında delesyon bulunup, alttaki üç sırada yer alan SC-12 örneklerinde WT durumda olan bölge kırmızı renkli çerçeve ile işaretlenmiştir. **B.** LSKO-104 örneklerinde delesyona uğrayan bölgedeki nükleotitlerin okunabileceği şekilde yakınlaştırılan BAM görüntüsü.

Tablo 21. RNA dizileme verilerine göre SC-12 hücrelerine kıyasla LSKO-104 hücrelerinde ekspresyon düzeyleri 1.5 kat ve üzerinde artan ve azalan genlerin listesi. baseMean: Ortalama normalize sayım değeri; log2FC: Log2 tabanında kat değişim; lfcSE: Log2 tabanında kat değişimin standart hata değeri; p adj: Düzeltilmiş p değeri

Sıra	Ensembl ID	Gen Sembolü	Gen Adı	Base Mean	log2FC	lfcSE	p adj.
1	ENSG00000261520	DLGAP1-AS5	DLGAP1 Antisense RNA 5 (LncRNA)	190.61	9.53	1.25	1.11E-10
2	ENSG00000227158	ENSG00000227158	ligand of numb-protein X 1, E3 ubiquitin protein ligase pseudogene (Pseudogene)	484.19	8.77	0.77	6.53E-26
3	ENSG00000263878	DLGAP1-AS4	DLGAP1 Antisense RNA 4 (LncRNA)	31.02	8.72	1.59	4.16E-05
4	ENSG00000250933	GAPDHP66	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Pseudogene 66	29.80	8.64	1.32	1.34E-07
5	ENSG00000263724	DLGAP1-AS3	DLGAP1 Antisense RNA 3 (LncRNA)	52.81	8.52	1.36	7.03E-07
6	ENSG00000170579	DLGAP1	DLG Associated Protein 1	918.36	7.76	0.54	5.02E-42
7	ENSG00000266513	ENSG00000266513	Novel Transcript, Overlapping DLGAP1 (LncRNA)	7.06	6.52	1.56	0.0114
8	ENSG00000270818	ENSG00000270818	Regulator Of Chromosome Condensation 2 (RCC2) Pseudogene (Pseudogene)	5.33	6.15	1.54	0.0230
9	ENSG00000181072	CHRM2	Cholinergic Receptor Muscarinic 2	4.58	5.95	1.55	0.0370
10	ENSG00000234111	LINC02433	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 2433 (LncRNA)	163.49	5.37	0.71	1.78E-10
11	ENSG00000200521	Y_RNA	RNA, Ro60-Associated Y3	21.72	5.35	1.15	0.0019
12	ENSG00000286133	ENSG00000286133	ENSG00000286133 (Novel Transcript) (LncRNA)	407.70	4.81	0.47	1.21E-20
13	ENSG00000266401	LOC105371967	Uncharacterized LOC105371967 (LncRNA)	39.65	4.65	0.97	0.0010
14	ENSG00000249275	ENSG00000249275	ENSG00000249275 (Novel Transcript) (LncRNA)	103.73	4.56	0.64	2.99E-09
15	ENSG00000279703	ENSG00000279703	ENSG00000279703 (TEC) is an Uncategorized gene	59.09	4.51	1.02	0.0050
16	ENSG00000184349	EFNA5	Ephrin A5	13.51	4.32	1.09	0.0240

Tablo 21. (Devam)

17	ENSG00000249627	ENSG00000249627	ATP-Binding Cassette, Sub-Family B (MDR/TAP), Member 4 (ABCB4) Pseudogene (Pseudogene)	52.45	4.26	1.11	0.0383
18	ENSG00000140937	CDH11	Cadherin 11	522.13	3.64	0.35	3.90E-21
19	ENSG00000145864	GABRB2	Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Beta2	611.91	3.50	0.78	0.0036
20	ENSG00000124429	POF1B	POF1B Actin Binding Protein	256.12	3.46	0.72	0.0010
21	ENSG00000078898	BPIFB2	BPI Fold Containing Family B Member 2	249.81	3.44	0.62	3.11E-05
22	ENSG00000183114	CNNM1	Cyclin And CBS Domain Divalent Metal Cation Transport Mediator 1	169.12	3.37	0.72	0.0018
23	ENSG00000135917	SLC19A3	Solute Carrier Family 19 Member 3	558.74	3.31	0.42	1.90E-11
24	ENSG00000080573	COL5A3	Collagen Type V Alpha 3 Chain	53.17	3.30	0.85	0.0314
25	ENSG00000174640	SLCO2A1	Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 2A1	267.59	3.20	0.57	2.47E-05
26	ENSG00000189350	TOGARAM2	TOG Array Regulator Of Axonemal Microtubules 2	19.10	3.15	0.78	0.0204
27	ENSG00000225371	CICP8	Capicua Transcriptional Repressor Pseudogene 8	30.68	3.10	0.78	0.0224
28	ENSG00000254656	RTL1	Retrotransposon Gag Like 1	142.43	2.96	0.70	0.0095
29	ENSG00000255353	ASS1P13	Argininosuccinate Synthetase 1 Pseudogene 13	43.31	2.90	0.71	0.0178
30	ENSG00000144481	TRPM8	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 8	379.55	2.70	0.61	0.0050
31	ENSG00000166589	CDH16	Cadherin 16	474.18	2.69	0.66	0.0188
32	ENSG00000261761	LINC02616	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 2616 (LncRNA)	1367.98	2.67	0.63	0.0089
33	ENSG00000179104	TMTC2	Transmembrane O-Mannosyltransferase Targeting Cadherins 2	323.68	2.64	0.49	6.24E-05
34	ENSG00000188064	WNT7B	Wnt Family Member 7B	125.04	2.63	0.63	0.0136

Tablo 21. (Devam)

35	ENSG00000287416	ENSG00000287416	ENSG00000287416 (Novel Transcript) (LncRNA)	162.86	2.53	0.58	0.0055
36	ENSG00000168077	SCARA3	Scavenger Receptor Class A Member 3	435.98	2.47	0.57	0.0063
37	ENSG00000236437	LINC02151	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 2151 (LncRNA)	93.55	2.44	0.42	1.21E-05
38	ENSG00000258474	LINC02313	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 2313 (LncRNA)	25.64	2.43	0.57	0.0091
39	ENSG00000278945	ENSG00000278945 (TEC)	ENSG00000278945 (TEC) is an Uncategorized gene	57.04	2.36	0.43	4.24E-05
40	ENSG00000169851	PCDH7	Protocadherin 7	229.77	2.31	0.35	1.18E-07
41	ENSG00000071575	TRIB2	Tribbles Pseudokinase 2	245.74	2.28	0.46	0.0005
42	ENSG00000204264	PSMB8	Proteasome 20S Subunit Beta 8	107.06	2.25	0.48	0.0017
43	ENSG00000197408	CYP2B6	Cytochrome P450 Family 2 Subfamily B Member 6	125.61	2.23	0.37	2.31E-06
44	ENSG00000174749	FAM241A	Family With Sequence Similarity 241 Member A	400.61	2.17	0.39	2.98E-05
45	ENSG00000029534	ANK1	Ankyrin 1	1024.41	2.17	0.54	0.0189
46	ENSG00000171310	CHST11	Carbohydrate Sulfotransferase 11	386.31	2.09	0.44	0.0014
47	ENSG00000163993	S100P	S100 Calcium Binding Protein P	92.98	2.08	0.47	0.0041
48	ENSG00000095303	PTGS1	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1	295.03	2.08	0.52	0.0199
49	ENSG00000181449	SOX2	SRY-Box Transcription Factor 2	1832.22	1.97	0.48	0.0161
50	ENSG00000181019	NQO1	NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1	1689.72	1.88	0.35	6.24E-05
51	ENSG00000286271	ENSG00000286271	Novel Transcript, Antisense To SEPP1 (LncRNA)	79.28	1.60	0.42	0.0383
52	ENSG00000119946	FAM43B	Family With Sequence Similarity 43 Member B	1021.98	1.56	0.33	0.0018
53	ENSG00000184486	POU3F2	POU Class 3 Homeobox 2	151.85	1.52	0.37	0.0159
54	ENSG00000102554	KLF5	KLF Transcription Factor 5	1745.97	1.52	0.35	0.0082

Tablo 21. (Devam)

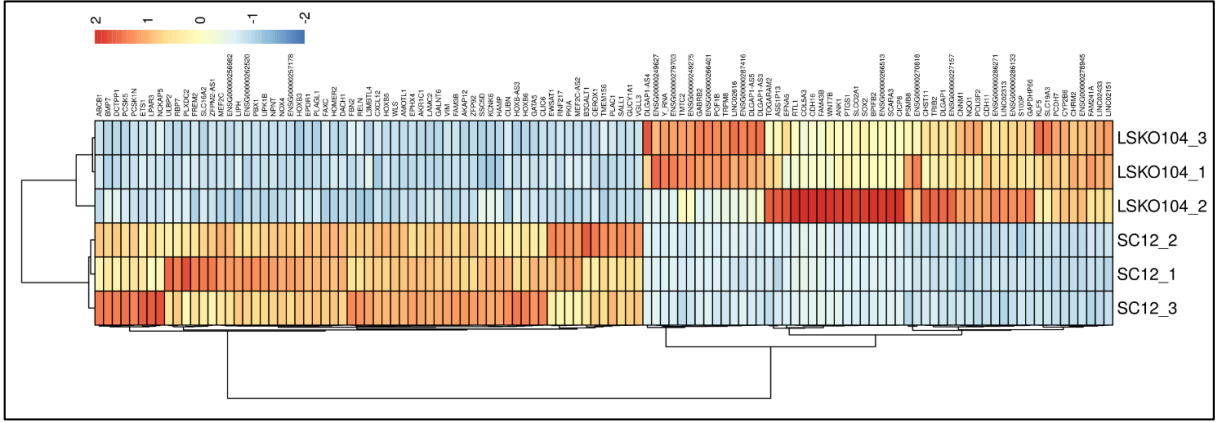
55	ENSG00000102109	PCSK1N	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1 Inhibitor	31.46	-8.16	1.31	9.02E-07
56	ENSG00000103449	SALL1	Spalt Like Transcription Factor 1	21.66	-7.62	1.33	1.21E-05
57	ENSG00000159212	CLIC6	Chloride Intracellular Channel 6	11.96	-6.77	1.38	0.0007
58	ENSG00000171517	LPAR3	Lysophosphatidic Acid Receptor 3	11.73	-6.74	1.44	0.0017
59	ENSG00000256982	ENSG00000256982	ENSG00000256982 (Novel Transcript) (LncRNA)	9.22	-6.39	1.40	0.0027
60	ENSG00000164116	GUCY1A1	Guanylate Cyclase 1 Soluble Subunit Alpha 1	21.17	-5.93	1.15	0.0002
61	ENSG00000257178	ENSG00000257178	ENSG00000257178 (Novel Transcript, Sense Intronic To HOXB3) is an Uncategorized gene	6.06	-5.78	1.46	0.0257
62	ENSG00000086991	NOX4	NADPH Oxidase 4	15.79	-5.51	1.17	0.0016
63	ENSG00000212766	EWSAT1	Ewing Sarcoma Associated Transcript 1 (LncRNA)	12.48	-4.97	1.21	0.0159
64	ENSG00000251003	ZFPM2-AS1	ZFPM2 Antisense RNA 1 (LncRNA)	24.02	-4.95	1.00	0.0005
65	ENSG00000026025	VIM	Vimentin	580.21	-4.66	0.76	1.54E-06
66	ENSG00000260807	CEROX1	Cytoplasmic Endogenous Regulator Of Oxidative Phosphorylation 1 (LncRNA)	14.22	-4.14	1.01	0.0159
67	ENSG00000262521	ENSG00000262521	ENSG00000262521 (Novel Transcript) (LncRNA)	21.38	-4.00	0.85	0.0016
68	ENSG00000166025	AMOTL1	Angiomotin Like 1	837.29	-3.97	0.38	3.90E-21
69	ENSG00000134954	ETS1	ETS Proto-Oncogene 1, Transcription Factor	34.21	-3.95	0.79	00005
70	ENSG00000245864	MEF2C-AS2	MEF2C Antisense RNA 2 (LncRNA)	21.53	-3.89	0.82	0.0015
71	ENSG00000168743	NPNT	Nephronectin	222.22	-3.82	0.56	1.75E-08
72	ENSG00000146373	RNF217	Ring Finger Protein 217	125.07	-3.60	0.57	5.92E-07

Tablo 21. (Devam)

73	ENSG00000139629	GALNT6	Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 6	264.89	-3.59	0.50	3.04E-09
74	ENSG00000130700	GATA5	GATA Binding Protein 5	128.85	-3.57	0.68	0.0001
75	ENSG00000138829	FBN2	Fibrillin 2	30.38	-3.56	0.89	0.0224
76	ENSG00000176771	NCKAP5	NCK Associated Protein 5	18.24	-3.49	0.90	0.0311
77	ENSG00000108511	HOXB6	Homeobox B6	66.19	-3.34	0.64	0.0002
78	ENSG00000116729	WLS	Wnt Ligand Secretion Mediator	471.26	-3.32	0.40	1.04E-12
79	ENSG00000085563	ABCB1	ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1	155.78	-3.24	0.54	3.05E-06
80	ENSG00000172031	EPHX4	Epoxide Hydrolase 4	13.36	-3.14	0.80	0.0258
81	ENSG00000189420	ZFP92	ZFP92 Zinc Finger Protein	56.61	-2.89	0.48	3.27E-06
82	ENSG00000131015	ULBP2	UL16 Binding Protein 2	42.09	-2.86	0.62	0.0025
83	ENSG00000276644	DACH1	Dachshund Family Transcription Factor 1	302.39	-2.82	0.43	1.18E-07
84	ENSG00000233101	HOXB-AS3	HOXB Cluster Antisense RNA 3 (LncRNA)	39.69	-2.82	0.69	0.0181
85	ENSG00000101144	BMP7	Bone Morphogenetic Protein 7	458.19	-2.78	0.66	0.0095
86	ENSG00000114638	UPK1B	Uroplakin 1B	381.12	-2.70	0.44	1.23E-06
87	ENSG00000120594	PLXDC2	Plexin Domain Containing 2	39.29	-2.68	0.65	0.0131
88	ENSG00000120093	HOXB3	Homeobox B3	54.10	-2.68	0.57	0.0016
89	ENSG00000170965	PLAC1	Placenta Enriched 1	18.62	-2.56	0.67	0.0370
90	ENSG00000081189	MEF2C	Myocyte Enhancer Factor 2C	475.61	-2.55	0.45	1.78E-05
91	ENSG00000146267	FAXC	Failed Axon Connections Homolog, Metaxin Like GST Domain Containing	149.01	-2.52	0.49	0.0002
92	ENSG00000179954	SSC5D	Scavenger Receptor Cysteine Rich Family Member With 5 Domains	380.71	-2.52	0.66	0.0385
93	ENSG00000171033	PKIA	CAMP-Dependent Protein Kinase Inhibitor Alpha	279.72	-2.46	0.54	0.0030
94	ENSG00000099337	KCNK6	Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 6	40.62	-2.44	0.64	0.0385

Tablo 21. (Devam)

95	ENSG00000206538	VGLL3	Vestigial Like Family Member 3	136.99	-2.42	0.42	1.23E-05
96	ENSG00000107611	CUBN	Cubilin	39.20	-2.35	0.59	0.0258
97	ENSG00000187134	AKR1C1	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C1	4188.73	-2.34	0.33	2.32E-09
98	ENSG00000120075	HOXB5	Homeobox B5	45.02	-2.34	0.49	0.0012
99	ENSG00000162444	RBP7	Retinol Binding Protein 7	36.42	-2.27	0.54	0.0118
100	ENSG00000121895	TMEM156	Transmembrane Protein 156	43.96	-2.20	0.55	0.0234
101	ENSG00000189056	RELN	Reelin	767.63	-2.10	0.48	0.0051
102	ENSG00000150893	FREM2	FRAS1 Related Extracellular Matrix 2	145.26	-2.10	0.48	0.0050
103	ENSG00000099139	PCSK5	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 5	122.33	-2.06	0.45	0.0025
104	ENSG00000147100	SLC16A2	Solute Carrier Family 16 Member 2	180.67	-2.06	0.44	0.0017
105	ENSG00000179958	DCTPP1	DCTP Pyrophosphatase 1	176.96	-1.97	0.48	0.0136
106	ENSG00000185630	PBX1	PBX Homeobox 1	910.69	-1.89	0.34	3.98E-05
107	ENSG00000183844	FAM3B	FAM3 Metabolism Regulating Signaling Molecule B	126.83	-1.85	0.38	0.0010
108	ENSG00000103942	HOMER2	Homer Scaffold Protein 2	611.97	-1.84	0.37	0.0004
109	ENSG00000107562	CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12	135.79	-1.83	0.42	0.0070
110	ENSG00000058085	LAMC2	Laminin Subunit Gamma 2	299.92	-1.81	0.34	0.0001
111	ENSG00000172318	B3GALT1	Beta-1,3-Galactosyltransferase 1	89.97	-1.78	0.47	0.0397
112	ENSG00000163898	LIPH	Lipase H	289.23	-1.68	0.42	0.0201
113	ENSG00000105697	HAMP	Hepcidin Antimicrobial Peptide	191.83	-1.65	0.42	0.0283
114	ENSG00000154655	L3MBTL4	L3MBTL Histone Methyl-Lysine Binding Protein 4	252.59	-1.65	0.42	0.0311
115	ENSG00000131016	AKAP12	A-Kinase Anchoring Protein 12	1812.08	-1.63	0.33	0.0005
116	ENSG00000118495	PLAGL1	PLAG1 Like Zinc Finger 1	825.27	-1.52	0.34	0.0046
117	ENSG00000086289	EPDR1	Ependymin Related 1	596.15	-1.48	0.32	3.69E-06



Şekil 17. SC-12 ve LSKO-104 Hep3B hücrelerinin RNA dizileme analizleriyle gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren genlerin ısı haritası.

4.4.2. Gen Seti Zenginleşme Analizleri

Tezin üçüncü hedefi kapsamında son olarak GSEA yazılımı ve ctnn veri tabanındaki gen seti listeleri kullanılarak LZTR1 varlığının ve yokluğunun Hep3B hücrelerinde etkilediği biyolojik süreçlere ilişkin biyoenformatik verilerin elde edilmesi planlanmıştır. Bu doğrultuda yapılan analizler neticesinde SC-12 ve LSKO-104 örnekleri arasında normalize zenginleşme değeri (NES) en yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı FDR değerine ($FDR < 0,25$) sahip gen setleri belirlendi. Zenginleşen GO gen setleri arasında NES değeri bakımında ilk on sırada yer alan gen setleri Tablo 22’de sunulmuştur. Tablo 22’de sunulan GO gen setleri, ilişkili oldukları mekanizmalar dikkate alınarak “Gelişim ve farklılaşma”, “Transkripsiyon düzenleme” ve “Hücre sinyal iletimi” isimli biyolojik süreç grupları halinde kategorize edilerek sunulmuştur. Buna göre, WT LZTR1 ifade eden SC-12 hücrelerinde *LZTR1*’in nakavt edildiği LSKO-104 hücrelerine kıyasla “Gelişim ve farklılaşma” biyolojik süreciyle ilişkili olarak “GOBP (gene ontology biological process) ANIMAL ORGAN MORPHOGENESIS”, “GOBP EPITHELIUM DEVELOPMENT” ve “GOBP EPITHELIAL CELL DIFFERENTIATION” isimli üç gen setinin, “Transkripsiyon düzenleme” biyolojik süreciyle ilişkili olarak “GOMF (gene ontology molecular function) DNA BINDING TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVITY”, “GOMF TRANSCRIPTION REGULATOR ACTIVITY”, “GOMF CIS REGULATORY REGION SEQUENCE SPECIFIC DNA BINDING” ve “GOMF SEQUENCE SPECIFIC DNA BINDING” isimli dört gen setinin ve son olarak, “Hücre sinyal iletimi” biyolojik süreciyle ilişkili olarak “GOBP CELL CELL SIGNALING BY WNT”, “GOBP REGULATION OF INTRACELLULAR SIGNAL TRANSDUCTION” ve “GOBP POSITIVE REGULATION

OF SIGNALING” isimli üç gen setinin istatistiksel olarak anlamlı olarak zenginleştiği belirlendi (Tablo 22). GO GSEA verilerinin zenginleşme grafikleri, ısı haritaları ve gruplanan biyolojik süreçlerdeki genlerin ortak olma durumlarını gösteren sonuçlar Şekil 18’de sunulmuştur.

Tablo 22. İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde zenginleşen ilk on GO gen setinin listesi.
GOBP: Gene Ontology biological process alt grubu; GOMF: Gene Ontology molecular function alt grubu; NES: Normalize zenginleşme skoru; FDR: False Discovery Rate.

Sıra	Zenginleştiği grup	Biyolojik süreç (BP)	GSEA gen seti	NES	FDR	p değeri	Genler
1	Kontrol	Gelişim ve farklılaşma	GOBP ANIMAL ORGAN MORPHOGENESIS	2.17	0.032	0.0001	<i>SALL1, WLS, NPNT, HOXB5, MEF2C, GATA5, HOXB6, PBX1, HOXB3, FBN2, BMP7, WNT7B, CHST11</i>
2	Kontrol	Transkripsiyon düzenleme	GOMF DNA BINDING TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVITY	1.97	0.161	0.0030	<i>SALL1, ZFP92, DACH1, HOXB5, MEF2C, GATA5, HOXB6, PBX1, HOXB3, PLAGL1, ETS1, SOX2, KLF5, POU3F2</i>
3	Kontrol	Transkripsiyon düzenleme	GOMF TRANSCRIPTION REGULATOR ACTIVITY	1.95	0.131	0.0015	<i>SALL1, ZFP92, DACH1, HOXB5, MEF2C, GATA5, HOXB6, PBX1, HOXB3, PLAGL1, ETS1, SOX2, KLF5, POU3F2</i>
4	Kontrol	Transkripsiyon düzenleme	GOMF CIS REGULATORY REGION SEQUENCE SPECIFIC DNA BINDING	1.94	0.111	0.0001	<i>SALL1, ZFP92, DACH1, HOXB5, MEF2C, GATA5, HOXB6, PBX1, HOXB3, PLAGL1, ETS1, SOX2, KLF5, POU3F2</i>
5	Kontrol	Gelişim ve farklılaşma	GOBP EPITHELIUM DEVELOPMENT	1.94	0.098	0.0014	<i>SALL1, VIM, NPNT, UPK1B, AKR1C1, HOXB5, MEF2C, GATA5, PBX1, FREM2, BMP7, WNT7B, POF1B, KLF5, POU3F2</i>
6	Kontrol	Transkripsiyon düzenleme	GOMF SEQUENCE SPECIFIC DNA BINDING	1.94	0.082	0.0015	<i>SALL1, ZFP92, DACH1, HOXB5, MEF2C, GATA5, HOXB6, PBX1, HOXB3, PLAGL1, ETS1, SOX2, KLF5, POU3F2</i>
7	Kontrol	Hücre sinyal iletimi	GOBP CELL CELL SIGNALING BY WNT	1.90	0.103	0.0001	<i>SALL1, AMOTL1, WLS, WNT7B, SOX2</i>
8	Kontrol	Gelişim ve farklılaşma	GOBP EPITHELIAL CELL DIFFERENTIATION	1.86	0.141	0.0116	<i>SALL1, VIM, UPK1B, AKR1C1, HOXB5, MEF2C, GATA5, BMP7, WNT7B, POF1B, KLF5, POU3F2</i>

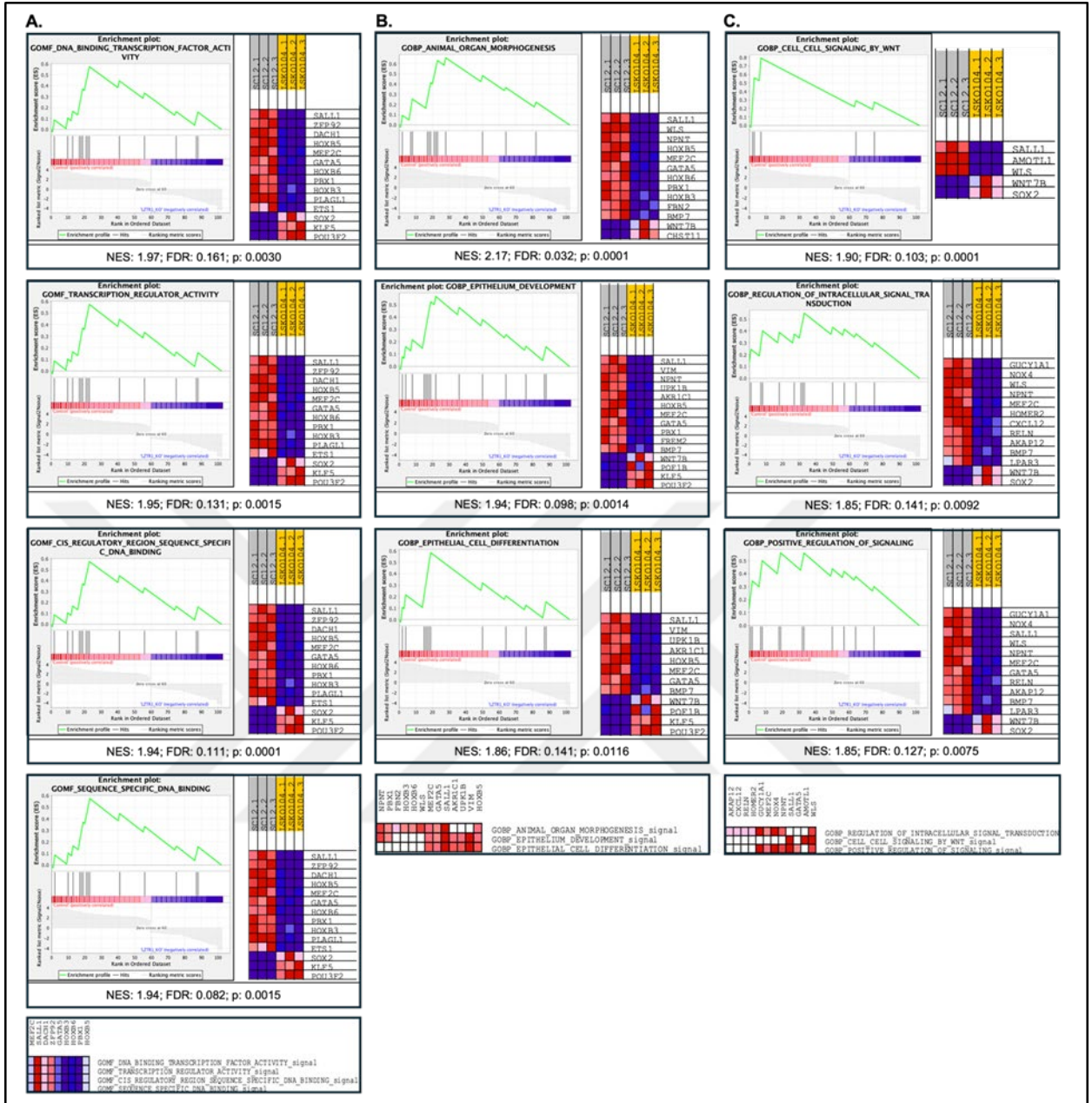
Tablo 22. (Devam)

9	Kontrol	Hücre sinyal iletimi	GOBP REGULATION OF INTRACELLULAR SIGNAL TRANSDUCTION	1.85	0.141	0.0092	<i>GUCY1A1, NOX4, WLS, NPNT, MEF2C, HOMER2, CXCL12, RELN, AKAP12, BMP7, LPAR3, WTTB, SOX2</i>
10	Kontrol	Hücre sinyal iletimi	GOBP POSITIVE REGULATION OF SIGNALING	1.85	0.127	0.0075	<i>GUCY1A1, NOX4, SALL1, WLS, NPNT, MEF2C, GATA5, RELN, AKAP12, BMP7, LPAR3, WNT7B, SOX2</i>

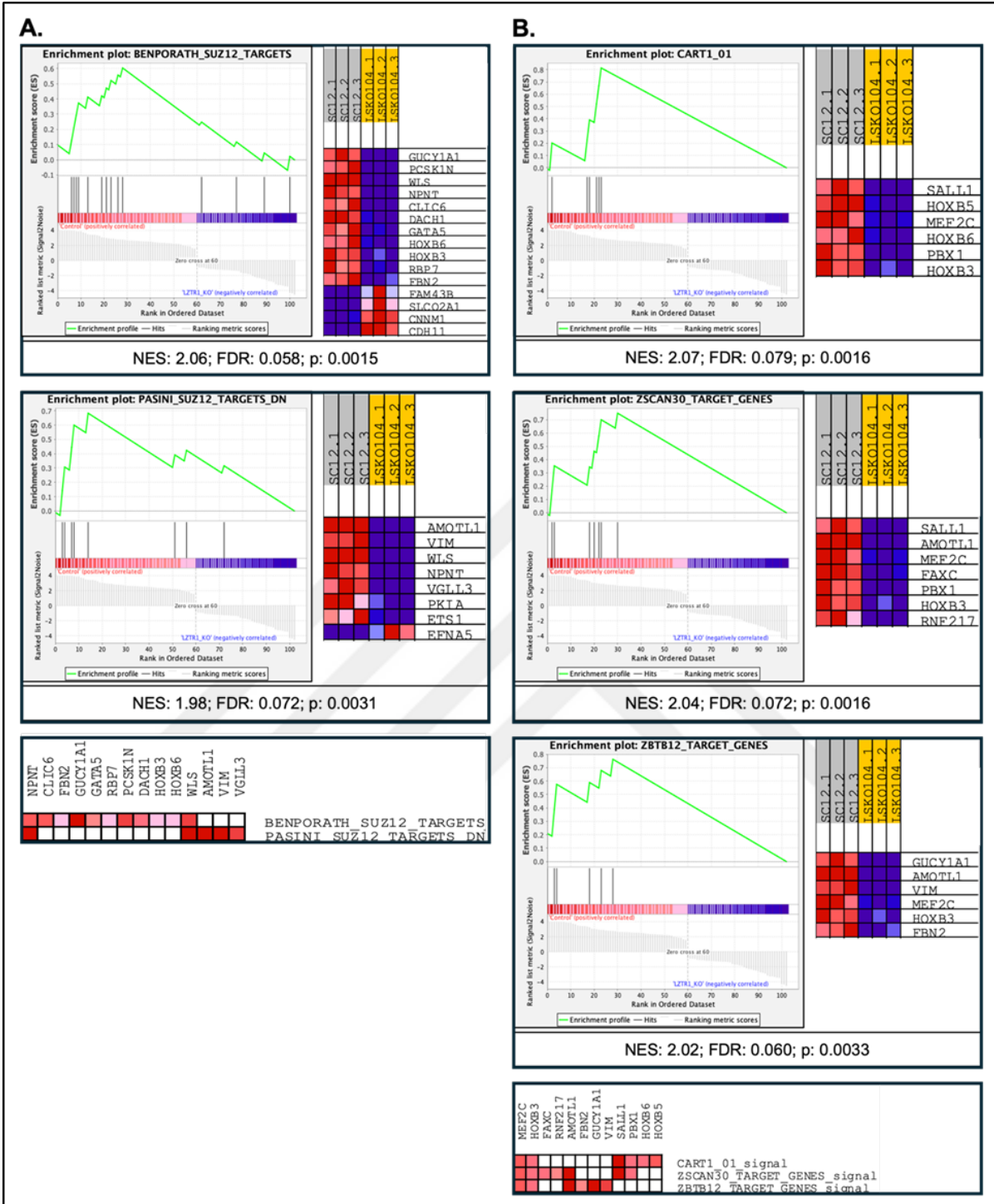
GSEA analizleri ile ayrıca, MSigDB veri tabanının “C2 curated gene sets” isimli literatürdeki yayınların verilerine dayalı olarak hazırlanan gen setleri koleksiyonu arasında “BENPORATH SUZ12 TARGETS” ve “PASINI SUZ12 TARGETS DN” gen setlerinin ve “C3 regulatory target gene sets” isimli transkripsiyon faktörlerinin ve miRNA’ların düzenlediği hedef genlerin listelerini içeren koleksiyon arasında yer alan “CART1 01”, “ZSCAN30 TARGET GENES” ve “ZBTB12 TARGET GENES” gen setlerinin SC-12 hücrelerinde LSKO-104 hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde zenginleştiğini ortaya çıkardı (Tablo 23 ve Şekil 19).

Tablo 23. İstatistiksel olarak anlamlı zenginleşen diğer MSigDB gen setlerinin listesi.
MSigDB: Molecular Signatures Database; NES: Normalize zenginleşme skoru; FDR: False Discovery Rate

Sıra	MSigDB koleksiyonu	GSEA gen seti	NES	FDR	p değeri	Genler
1	C2 curated gene sets	BENPORATH SUZ12 TARGETS	2.06	0.058	0.0015	<i>GUCY1A1, PCSK1N, WLS, NPNT, CLIC6, DACHI, GATA5, HOXB6, HOXB3, RBP7, FBN2, FAM43B, SLC02A1, CNNM1, CDH11</i>
2	C2 curated gene sets	PASINI SUZ12 TARGETS DN	1.98	0.072	0.0031	<i>AMOTL1, VIM, WLS, NPNT, VGLL3, PKIA, ETS1, EFNA5</i>
3	C3 regulatory target gene sets	CART1 01	2.07	0.079	0.0016	<i>SALL1, HOXB5, MEF2C, HOXB6, PBX1, HOXB3</i>
4	C3 regulatory target gene sets	ZSCAN30 TARGET GENES	2.04	0.072	0.0016	<i>SALL1, AMOTL1, MEF2C, FAXC, PBX1, HOXB3, RNF217</i>
5	C3 regulatory target gene sets	ZBTB12 TARGET GENES	2.02	0.060	0.0033	<i>GUCY1A1, AMOTL1, VIM, MEF2C, HOXB3, FBN2</i>



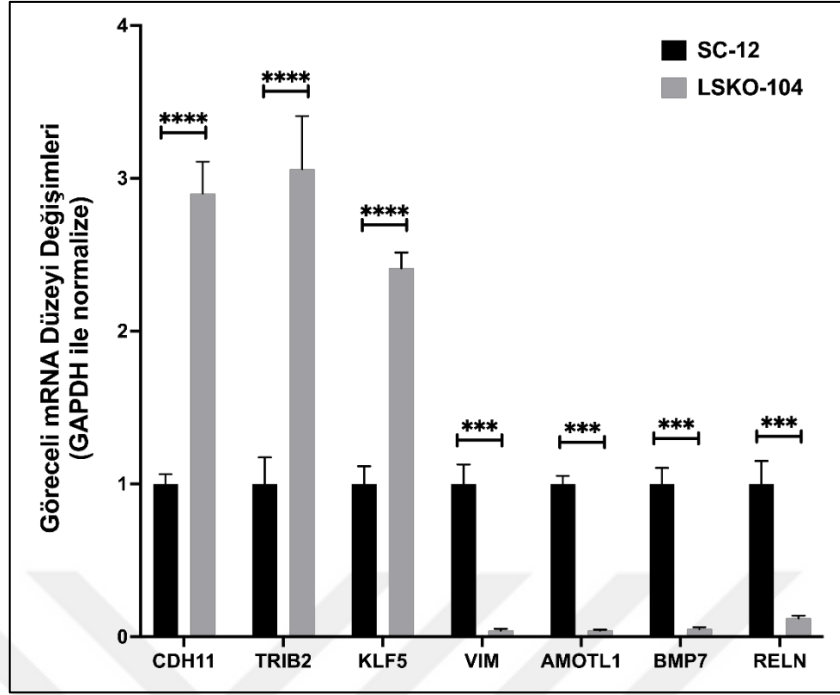
Şekil 18. GSEA verilerine göre LSKO-104 örneklerine kıyasla SC-12 örneklerinde zenginleşen ilk on GO teriminin sonuçları. **A.** Transkripsiyon düzenleme, **B.** Gelişim ve farklılaşma ve **C.** Hücre sinyal iletimi isimli biyolojik süreç gruplarının zenginleşme grafikleri (enrichment plot), gen ekspresyon düzeylerini gösteren ısı haritaları ve Leading Edge analizi sonuçları. NES: Normalized enrichment score; FDR: False Discovery Rate; p: Nominal p değeri



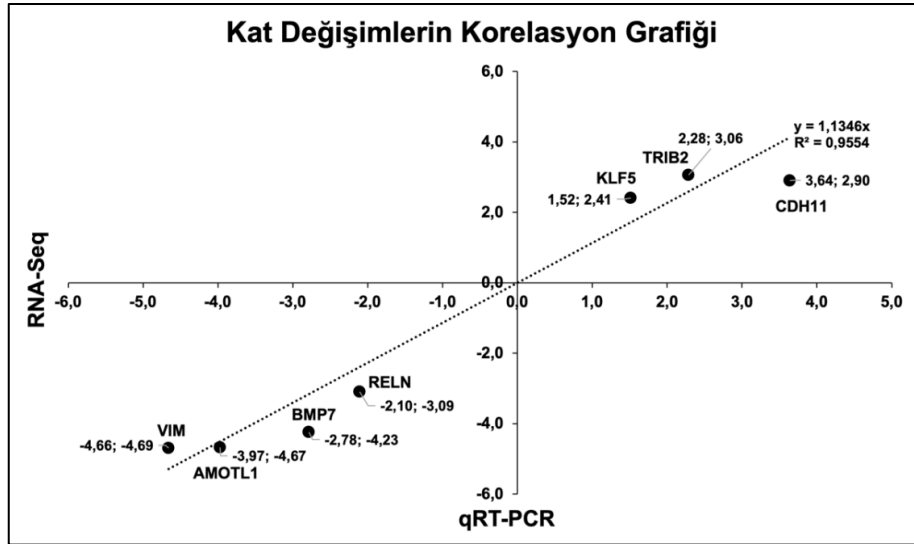
Şekil 19. SC-12 ve LSKO-104 örnekleri arasında zenginleşme farklılığı gösteren diğer gen setlerinin sonuçları. MSigDB veri tabanının **A.** C2 curated gene sets, **B.** C3 regulatory target gene sets kategorilerinde yer alan ve istatistiksel olarak anlamlı zenginleşen gen setlerinin zenginleşme grafikleri (enrichment plot), gen ekspresyon düzeylerini gösteren ısı haritaları ve Leading Edge analizi sonuçları. NES: Normalized enrichment score; FDR: False Discovery Rate; p: Nominal p değeri.

4.5. Biyoenformatik Analizlerle Ekspresyon Farklılığı Gösterdiği Belirlenen Genlerden Seçilenlerin qRT-PCR Yöntemiyle Doğrulanması

Tezin dördüncü hedefi ile RNA dizileme analizleri sonuçlarına göre gen ifade seviyesinde belirgin farklılık görülen en az iki genin ifade düzeylerinin qRT-PCR yöntemiyle belirlenmesi ve RNA dizileme sonuçları ile qRT-PCR sonuçlarının birbirleriyle uyumluluğunun incelenmesi planlanmıştır. Bu doğrultuda, RNA dizileme sonuçları incelenerek SC-12 ve LSKO-104 örnekleri arasında en çok ekspresyon farklılığı gösteren genler arasında yer alan yedi genin ifade düzeyleri qRT-PCR yöntemiyle analiz edildi. Bu genler, RNA dizileme analizlerinde SC-12 hücrelerine kıyasla LSKO-104 hücrelerinde ekspresyonları artan *CDH11*, *TRIB2* ve *KLF5* genleri ile SC-12 hücrelerine göre LSKO-104 hücrelerinde ifadeleri azalan *VIM*, *AMOTL1*, *BMP7* ve *RELN* genleridir (Tablo 17). Bu genlere özgü tasarladığımız primerler kullanılarak yaptığımız qRT-PCR deneylerinin sonuçları, incelenen genlerin ekspresyon düzeylerinin RNA dizileme bulgularımız ile aynı yönde ve istatistiksel olarak anlamlı olarak değiştiğini ve RNA dizileme sonuçları ile qRT-PCR sonuçlarının birbirleriyle korele olduğunu (R^2 : 0,96) göstermiştir (Şekil 20 ve 21).



Şekil 20. RNA dizileme sonuçlarına göre seçilen yedi genin SC-12 ve LSKO-104 hücrelerindeki göreceli ifade düzeylerini gösteren qRT-PCR sonuçları. İncelenen genlerin ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemiyle belirlenmiş olup SC-12 örneklerine göre değişimleri sütun grafiği ile gösterilmiştir. Üç tekrar halinde gerçekleştirilen deneylerin sonuçlarının istatistiksel analizleri iki yönlü ANOVA yöntemi ile gerçekleştirilmiş olup, çoklu karşılaştırma verileri Sidak yöntemiyle düzeltilmiştir. ***: düzeltilmiş p değeri<0.001; ****: düzeltilmiş p değeri<0.0001.



Şekil 21. Validasyon için seçilen yedi genin ifadelerinin RNA dizileme ve qRT-PCR yöntemleriyle elde edilen sonuçlarının uyumunu gösteren korelasyon grafiği.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser alanında uzun yıllardır süregelen bilimsel araştırmalarla çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde önemli gelişmeler sağlanmış olmasına rağmen HCC'nin tedavisinde istenen seviyede başarı sağlanamamış olup, günümüzde HCC kansere bağlı ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır (1). Bu nedenle moleküler hedefli sistemik HCC tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için HCC etiyopatogenezinde rol oynayan önemli moleküllerin tanımlanmasına ve bu moleküllerin fonksiyonlarının belirlenmesine yönelik bilimsel araştırmalar büyük önem taşımaktadır. Buna ek olarak, son yıllarda yeni nesil dizileme, biyoenformatik ve genom düzenleme yöntemleri gibi teknolojilerde yaşanan gelişmelerin bilimsel araştırmalara sağladığı yeni imkanlar kanser alanında ihtiyaç duyulan bilgilerin elde edilmesini hızlandırmıştır. HCC etiyopatogenezinde önemli roller oynayan moleküllerden biri olabileceği düşünülen LZTR1'in bilimsel literatüründeki verilerin ve tez kapsamında yaptığımız çalışmaların bu durumunun örneklerinden biri olduğu değerlendirilmektedir.

TCGA veri tabanında çoklu omik verileri bulunan HCC hastalarının veri analizlerinin *Cell* dergisinde yayınlandığı 2017 yılındaki çalışmada ilk kez *LZTR1*'in HCC hastalarında mutasyon sıklığı yüksek olan genler arasında yer aldığı yayımlanmıştır (3). Tez çalışmaları öncesinde yaptığımız ön çalışmada, bahsi geçen yayında HCC hastalarında belirlenen somatik *LZTR1* geni mutasyonların %90'ının proteinin erken sonlanmasına neden olduğunu belirledik (Şekil 1A). Bu veriye dayanarak HCC hastalarında fonksiyonel LZTR1 proteininin kaybının kanser hücrelerine avantaj sağlıyor olabileceğini ve LZTR1'in HCC'de bir tümör baskılayıcı işleve sahip olabileceğini düşündük. Ardından, LZTR1'in HCC hücrelerindeki kaybının fonksiyonel etkilerini inceleyebilmemiz için uygun bir HCC hücre hattı belirlemeye çalıştık. Bu doğrultuda, laboratuvarımızda bulunan yedi farklı HCC hücre hattında LZTR1 protein düzeylerini WB yöntemiyle belirlemeye çalıştık. WB sonuçlarımız bize LZTR1'in incelediğimiz yedi HCC hücre hattında ifade olduğunu ve LZTR1 protein seviyesinin Hep3B hücre hattında daha yüksek olduğunu gösterdi (Şekil 1B). LZTR1'in HCC'deki rollerinin araştırıldığı Yi vd.'nin yayınında da bizim WB deneyinde üzerinde çalıştığımız hücre hatları arasında yer alan Hep3B, SNU449 ve HUH7 hücreleri arasında LZTR1 mRNA düzeyinin Hep3B hücrelerinde en yüksek olduğu belirlenmiş olduğundan ön çalışma bulgularımız literatürdeki verilerle uyumludur (64). Ayrıca Hep3B hücre hattının ekzom dizilemesi daha önceden yapılmış olup, *LZTR1* geninin WT olduğu belirlenmiştir

(83). Bu verileri göz önünde bulundurarak WT LZTR1'i ifade eden Hep3B hücrelerinde *LZTR1* geninin CRISPR/Cas9 yöntemiyle nakavt edildiği hücreler hazırlayıp karşılaştırmalı analizler yaparak LZTR1'in HCC hücrelerindeki fonksiyonel rolleri hakkında bilgiler elde etmemizi sağlayacak hücre örneklerini hazırlamayı planladık. Buna ek olarak, LZTR1'in RAS/MAPK yolağında kanonik RAS ve RIT1 proteinlerinin poliubikitinlenmelerine aracılık ettiği ve bu durumun RAS ve RIT1 proteinlerinin proteazomal parçalanmalarına yol açarak hücre içindeki kanonik RAS ve RIT1 proteinlerinin seviyelerinin ve aktif RAS/MAPK sinyalinin azalmasına neden olduğu ve LZTR1'in HCC hücrelerinde de RAS/MAPK sinyalinin azalmasına yol açtığı görüldüğü belirlenmiştir (4-6, 64). Öte yandan, transkripsiyonel düzenleyici oldukları bilinen lösin fermuar proteinlerine amino asit benzerliği gösterdiği ve hücre içinde çekirdeğe lokalize olabildiği bilinen LZTR1'in transkripsiyonel etkileri hakkında literatürde bilgi bulunmamaktadır (7). Bu nedenle, tez kapsamında *LZTR1*'in nakavt edildiği Hep3B hücreleri hazırlandıktan sonra LZTR1'in az bilinen transkripsiyonel etkilerine ilişkin fonksiyonel veriler elde edilmesi hedeflenerek LZTR1'i ifade eden ve etmeyen Hep3B hücreleri arasındaki genom çapında gen ifade farklılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tezin birinci hedefi CRISPR/Cas9 genom düzenleme yöntemiyle *LZTR1* geninin nakavt edildiği Hep3B hücre klonunun hazırlanmasıdır. Birinci hedef doğrultusunda Hep3B hücrelerinde *LZTR1* geninin CRISPR/Cas9 yöntemiyle nakavt edilmesinde kullanılacak plazmitlerin hazırlanması, sgRNA-1 ve sgRNA-2'yi içeren pX462 vektörlerini birlikte ve kontrol sgRNA'nın tek başına Hep3B hücrelerine transfekte edilmesi ve 72 saat süreyle sgRNA'ların yönlendirdiği Cas9n'in aracılığıyla LZTR1'in hedeflenen bölgesinde INDEL'lerin olduğu tek hücreden büyüyen hücre kolonilerinin elde edilmesi ve kültür ortamında çoğaltılmasıdır.

Tezin birinci hedefinin tamamlanması amacıyla ilk olarak *LZTR1*'in 1. ekzonunu ayrı ayrı hedefleyen sgRNA dizilerini kodlayan DNA sekansları belirlenip sipariş edilmiştir. Ardından, sgRNA'lar karşılık gelen tamamlayıcı oligonükleotitler oligomerize edilerek hazırlandı ve Sanger DNA dizileme yöntemiyle doğrulanan plazmid DNA'ları sonraki deney aşamalarında kullanıldı (Tablo 1, Tablo 6 ve Şekil 2). Akabinde, hazırlanan plazmid DNA'lar Hep3B hücrelerine transfekte edilip puromisin antibiyotiği varlığında seçilerek LZTR1 sgRNA dizileriyle Cas9n yönteminin uygulandığı 107 adet, anlamsız (scrambled) gRNA dizileriyle (negatif kontrol) Cas9n uygulanan 22 adet Hep3B kolonisi elde edilip

çoğaltıldı. Elde edilen Hep3B kolonilerinden total protein lizatları hazırlanıp WB yöntemiyle hücre lizatlarındaki LZTR1 protein seviyeleri belirlendi. Toplamda 129 farklı Hep3B hücresinin örnekleriyle WB deneyleri yapılmış olup tüm örneklerin SDS-PAGE jellerine birlikte yüklenerek analiz edilmesi mümkün olmadığından farklı deneylerdeki verileri kıyaslanabilir hale getirmek için tüm jellerde CRISPR/Cas9n uygulanmayan Hep3B hücrelerine ait protein lizatları kullanılmıştır. Ayrıca yine sonuçların birbirleriyle kıyaslanabilmesi için tüm deneylerde yüklenen protein miktarları anti-Alfa Tubulin antikoru kullanılarak belirlenmiş ve Alfa Tubulin protein bant yoğunluk değerleriyle normalize edilip Hep3B hücrelerindeki bant yoğunluk değerlerine kıyaslanarak sütun grafikleri hazırlanmıştır (Şekil 3-6). Hep3B Cas9n kolonilerindeki LZTR1 protein düzeylerinin taranması çalışmalarında uyguladığımız bir diğer yaklaşım, kullandığımız anti-LZTR1 antikorunun tanıdığı yaklaşık 90 kDa ağırlığındaki spesifik olmayan protein bandının (n.s.) göz ardı edilmeyip WB deneylerinde dikkate alınmış olmasıdır. Ön çalışma kapsamında yaptığımız ve pozitif kontrol LZTR1 proteinlerinin de dahil olduğu WB sonuçları kullandığımız primer antikorun 95 kDa'da tanıdığı proteinin LZTR1 olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 1B). Buna ek olarak, *LZTR1* geninden ifade edilen RefSeq veri tabanında tanımlanmış olan bir adet mRNA ve ondan çevrilen 95 kDa ağırlığında bir adet protein bulunmaktadır (84). Öte yandan, yakın zamanda geliştirilmiş olan CRISPR/Cas9 yönteminin hedef dışı (off-target) DNA dizilerini de düzenleyebildiği bilinmekte ve bu nedenle tezde kullandığımız Cas9n enzimi gibi düşük off-target aktivitesi olan yeni enzimler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu nedenle, kullandığımız primer antikorun hazırladığımız Hep3B kolonilerinden elde edilen proteinler arasında LZTR1 dışında başka bir proteini tanıyarak bant vermiş olmasını bir avantaja çevirerek LZTR1 protein seviyelerinden sonraki ikinci bir kriter olarak taradığımız kolonilerde spesifik olmayan protein miktarında en az değişikliğin görüldüğü kolonileri belirlemek için analizlerimizde kullandık (Şekil 3-6). WB deneyleriyle elde ettiğimiz Hep3B'ye kıyasla normalize protein değerlerine göre incelediğimiz 107 adet LSKO kolonisinden 77'sinde LZTR1 seviyesinin 1,0'dan az ($<1,0$) olup, geriye kalan 30 LSKO kolonisinde LZTR1 protein seviyesinin 1,0 ve üzeri ($\geq 1,0$) olması nedeniyle uygun olmadığı belirlendi. İlk etapta öne çıkan 77 LSKO kolonisinde hedef dışı protein olarak dikkate aldığımız ve Hep3B'ye kıyasla değişmemesini istediğimiz spesifik olmayan bant kalınlığındaki değişimler de dikkate alındığında LSKO kolonileri arasında LSKO-34, LSKO-35, LSKO-98 ve LSKO-104 kodlu kolonileri LZTR1'in nakavt edildiği öne çıkan Hep3B kolonileri olarak belirledik. Benzer bir yaklaşımla SC kodlu *LZTR1*'in nakavt

edilmediği kolonileri incelediğimizde ise WB taramalarını yaptığımız 22 adet SC kolonisi arasından dokuz kolonide normalize LZTR1 protein seviyelerinin Hep3B hücrelerine kıyasla $0.8 \leq LZTR1 \leq 1.0$ olması nedeniyle öne çıktığını belirledik. İkinci aşamada öne çıkan dokuz kolonide Hep3B'ye kıyasla değişmemesini beklediğimiz spesifik olmayan protein bantlarının seviyeleri dikkate aldığımızda SC-10, SC-12, SC-16 ve SC-22 kodlu negatif kontrol Hep3B kolonileri öne çıkan koloniler oldu (Şekil 3-6). WB yöntemiyle Hep3B kolonilerinde protein düzeylerinin taranması çalışmalarını toplamda 129 farklı koloninin protein lizatlarıyla, karşılaştırmalı analizler yaparak ve kültürde yaşamaya devam eden hücreleri daha büyük mikropklara pasajlamadan önce yaptığımızdan koloni tarama deneyleri bir kez tekrarlanmıştır. Öte yandan, deneyler sırasında tüm jellerde Hep3B örneklerini kullanmış olmamız ve Alfa Tubulin protein seviyesine göre normalize edilen verileri kullanmamız nedeniyle deney tekrar sayısının azlığının sorun oluşturmadığını değerlendiriyoruz.

Birinci hedefin tamamlanabilmesi için Hep3B hücre klonlarından en az birinde *LZTR1* geninin nakavt edildiğinin protein düzeyinde belirlenmesi ve aynı klonda *LZTR1*'in nakavt edilmesini sağlayan genomik değişikliğin belirlenmesi gerektiğinden bir sonraki aşamada, WB taramaları ve veri analizleri ile öne çıkan dört SC kolonisinde ve dört LSKO kolonisinde CRISPR/Cas9n yöntemiyle hedeflediğimiz *LZTR1* geninin 1. ekzonunun gDNA dizileri belirlendi. Sanger DNA dizileme analizleri seçilen dört SC kolonisinde (SC-10, SC-12, SC-16 ve SC-22) *LZTR1* geninin 1. ekzonunun WT olduğunu, dört LSKO kolonisinde ise LSKO-98 hücrelerinde homozigot ve diğer kolonilerde (LSKO-34, LSKO-35 ve LSKO-104) biallelik heterozigot varyasyonlar bulunduğunu ortaya koydu (Şekil 7-11). LSKO kolonilerinde Sanger DNA dizileme analizleriyle belirlediğimiz DNA varyasyonlarının protein seviyesindeki etkilerini incelediğimizde LSKO-34 hücrelerinin bir DNA ipliğinden kodlanan mRNA'nın WT LZTR1'de 46 amino asit içeren 1. Kelch domaininin (K1) 25 amino asitlik kısmına çevrilebilecek, diğer allelinden ise K1'in üç amino asitlik kısmına çevrilebilecek sırasıyla 92 ve 70 amino asitlik proteinleri kodladığı (Şekil 8), LSKO-35 hücrelerinin bir DNA ipliğinden kodlanan mRNA'nın K1'in sekiz amino asitlik kısmına çevrilebilecek, diğer allelinden ise K1'in dört amino asitlik kısmına çevrilebilecek sırasıyla 75 ve 71 amino asitlik proteinleri kodladığı (Şekil 9), LSKO-98 hücrelerindeki homozigot varyasyon nedeniyle ifade edilen mRNA'nın K1 domainini de içermeyen 57 amino asitlik bir proteine çevrilebileceği (Şekil 10), son olarak LSKO-104 hücrelerinin bir DNA ipliğinden kodlanan mRNA'nın K1 domaine ait amino asitleri içermeyen 68

amino asitlik bir proteini kodladığı ve diğer allelinde ise transkripsiyon başlama bölgesinin de silinmiş olması nedeniyle transkript üretilmeyeceği tahmin edildi (Şekil 11). Sanger DNA dizilemeleri ve veri analizleri neticesinde öne çıkan sekiz Hep3B kolonisindeki varyasyonlar başarıyla belirlenmiş olmakla birlikte, mevcut verilerin tez çalışmalarının devamında kullanmak üzere ilk etapta seçilen sekiz hücrenin de uygun olduğunu ortaya koyması nedeniyle ihtiyaç duyulan birer adet SC ve LSKO kolonisini belirlemek üzere ilave deneyler yapıldı. WT LZTR1 proteininin hücre içindeki kanonik RAS ve RIT1 proteinlerinin seviyelerinin azalmasına neden olduğu literatürde yer alan diğer çalışmalarla daha önceden gösterilmiş olduğundan SC ve LSKO kolonilerindeki kanonik RAS, RIT1 ve LZTR1 protein düzeyleri aracılığıyla Hep3B hücrelerinin elenmesi yaklaşımı uygulandı. Bu doğrultuda ilk olarak, seçilen sekiz hücre hattında üç farklı zamanda protein izole ederek üç tekrar halinde WB deneyleri yaparak LZTR1, pan-RAS ve RIT1 proteinlerinin düzeyleri belirlendi. WB deneylerinde belirlenen protein bant değerleri Alfa Tubulin değerleriyle normalize edilip Hep3B hücrelerine kıyasla hedef proteinlerin seviyelerindeki değişimler belirlendi (Şekil 12). WB deneyleri neticesinde LZTR1 protein düzeylerinin SC kolonileri arasında SC-12 ve SC-16 hücrelerinde Hep3B hücrelerine daha yakın düzeyde oldukları ve kanonik RAS ve RIT1 protein düzeylerinin SC kodlu hücrelerde Hep3B hücrelerine kıyasla anlamlı bir değişim göstermediği belirlendi. Deneyler sonucunda elde edilen veriler ayrıca, Hep3B hücrelerine kıyasla kanonik RAS protein düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı tek artışın LSKO-104 hücrelerinde olduğunu, buna ek olarak RIT1 protein düzeyindeki en yüksek artışın da yine LSKO-104 hücrelerinde olduğunu ve LSKO-104 hücrelerinde LZTR1 protein ifadesinin kaybolduğu görülmüş olup, bu veriler LSKO-104 hücrelerinin *LZTR1*'in nakavt edildiği hücreler arasında fonksiyonel olarak en etkin hücreler olduğunu ortaya koydu (Şekil 12). LSKO-34, LSKO-35 ve LSKO-98 hücrelerinde ise Hep3B hücrelerine kıyasla kanonik RAS proteinlerinin anlamlı bir artış göstermediği ancak RIT1 protein düzeylerinin Hep3B hücrelerine kıyasla sırasıyla LSKO-35, LSKO-98 ve LSKO-34 hücrelerinde arttığı belirlendi. *LZTR1*'in nakavt edildiği hücrelerin tamamında RIT1 protein düzeylerinin Hep3B hücrelerine kıyasla anlamlı ve yaklaşık dokuz kata kadar artmasına rağmen kanonik RAS proteinlerinin sadece LSKO-104 hücrelerinde anlamlı düzeyde ancak 2.5 kat civarında olmasının Hep3B hücrelerinde *LZTR1*'in RIT1 protein düzeyini belirlemede daha etkin bir role sahip olduğuna, Kelch domainindeki amino asit dizilerinin tamamını içermesi bile *LZTR1*'in amino ucundaki amino asit dizilerine kısmen sahip olan LZTR1 proteinlerinin RAS ve RIT1 protein düzeylerinin belirlenmesinde henüz tanımlanmamış işlevlere sahip

olabileceğine ve LSKO-104 hücrelerinin en belirgin fonksiyonel etkiyi göstermesinde bu hücrelerin bir allelinden hiç protein üretilmiyor olmasının rolünün olabileceğine işaret ettiği değerlendirilmektedir. WB deneyinin sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde ise tezin devamında kullanılacak hücrelere bu deneyin sonuçlarına göre karar vermeyip öne çıkan hücreleri belirleyerek ilave deneyler yapılması ve yeni yapılacak deneylerin sonuçları da göz önünde bulundurularak nihai karara varılması yaklaşımı uygulandı. Bu doğrultuda incelenen sekiz kolonideki LZTR1, pan-RAS ve RIT1 protein düzeylerindeki değişimler değerlendirilerek SC kolonileri arasında SC-12 ve SC-16 hücreleri; LSKO kolonileri arasında ise başta LSKO-104 olmak üzere kanonik RAS ve RIT1 protein düzeyleri üzerinde en belirgin fonksiyonel etkiler LSKO-104, LSKO-35 ve LSKO-98 hücrelerinde görüldü (Şekil 12). Bu deneylerin akabinde, tezin devamında çalışmaya devam etmek üzere seçilmesi gereken birer SC ve LSKO klonuna kesin olarak karar verilememiş olduğundan ilave fonksiyonel eleme deneyleri yapıldı. Bu deneylerde, RAS/MAPK sinyal yolağında RAS ve RIT1 proteinleri aktifleştğinde fosforillenerek aktif duruma geçtikleri bilinen ve RAS/MAPK yolağının hücre içindeki aktivitesinin göstergeleri olarak sıklıkla incelenen p-MEK1/2 ve p-ERK1/2 proteinlerinin *LZTR1*'in nakavt edildiği ve edilmediği Hep3B hücrelerindeki seviyeleri de incelendi. Bu deneylere, kanonik RAS ve RIT1 düzeylerine göre seçilen beş hücre (SC-12, SC-16 LSKO-35, LSKO-98 ve LSKO-104) dahil edildi. Hep3B hücreleri deneye dahil edilmeyerek CRISPR/Cas9n uygulanan hücrelerin kendi içinde değerlendirilmesi yaklaşımı uygulandı. Üç farklı zamandaki hücre pelletlerinden hazırlanan protein lizatlarıyla üç tekrar halinde yapılan WB deneylerde ortalama normalize protein seviyeleri belirlendi ancak bir önceki eleme deneyinden farklı olarak ortalama protein seviyeleri herhangi bir hücrenin protein seviyeleriyle kıyaslanmayarak daha katı bir eleme stratejisi uygulandı. Tüm hücrelerdeki ortalama protein düzeylerine baktığımızda SC-12 hücrelerinde LZTR1 protein seviyesinin SC-16 hücrelerine göre daha yüksek ancak p-MEK1/2 ve p-ERK1/2 protein düzeylerinin SC-12 hücrelerinde daha az olduğu görüldü. Bu bulgular, deneyde ele alınan SC kodlu Hep3B hücreleri arasında SC-12 hücrelerinin daha uygun olduğu sonucuna varmamıza yol açtı (Şekil 13). Bunun ardından, deneyde ele aldığımız LSKO hücreleri arasında öne çıkan koloniyi belirleyebilmemiz için kontrol hücresi olarak belirlediğimiz SC-12 hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı protein düzeyi değişimi gösteren hücrelerin bulunup bulunmadığı analiz edildi. İstatistiksel veri analizleri neticesinde anlamlı değişim gösteren hücrelerin sonuçları sütun grafiğinde belirtildi (Şekil 13). Buna göre, deneyler sonucunda üç LSKO hücresinde de LZTR1 protein

düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldığını ancak en düşük LZTR1 protein düzeyinin LSKO-104 hücrelerinde olduğu görüldü. Buna ek olarak, LSKO kodlu hücreler arasında pan-RAS ve p-MEK1/2 seviyelerindeki istatistiksel olarak anlamlı tek artışın, en yüksek RIT1 protein seviyesinin ve diğer LSKO hücreleriyle benzer seviyede olmsa da p-ERK1/2 protein düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artışın LSKO-104 hücrelerinde olması nedeniyle incelediğimiz LSKO hücreleri arasında LZTR1 kaybının fonksiyonel etkilerin en efektif şekilde görülebildiği hücrelerin LSKO-104 hücreleri olduğunu ortaya koydu (Şekil 13). LSKO-35 ve LSKO-98 hücrelerinde ise LZTR1 kaybının pan-RAS ve RIT1 protein düzeylerinde artışa yol açmasına rağmen bu hücrelerde sadece RIT1 seviyesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Bu durumun, yaptığımız bir önceki deney sonucunda ileri sürdüğümüz Hep3B hücrelerinde LZTR1'in kanonik RAS proteinlerinden daha çok RIT1 protein seviyeleri üzerinde fonksiyonel etki gösteriyor olabileceği yönündeki düşüncemizi desteklediği değerlendirilmektedir (Şekil 12 ve 13). Bununla birlikte, bir önceki deneyde protein düzeylerindeki değişimler Hep3B hücrelerine kıyasla hesaplanırken yaptığımız ikinci fonksiyonel analiz deneylerinde Hep3B hücrelerinin kullanılmamış ve göreceli kat değişimleri üzerinden değerlendirme yapılmamış olması nedeniyle iki deneydeki kat değişim değerlerinin birbirleriyle birebir olarak karşılaştırılmaması gerektiği de dikkate alınmalıdır. Sonuç olarak, İP1.2 kapsamında yaptığımız çalışmalarla dört farklı negatif kontrol ve dört farklı *LZTR1* nakavt Hep3B hücresinde gDNA dizilemeleri yaparak seçilen SC kodlu klonların hepsinin WT olduğu, LSKO kodlu kolonilerinde LZTR1 protein seviyesinin azalmasına yol açacak varyasyonlar belirlenmiş ve iki aşamada ele alarak yaptığımız protein düzeyindeki fonksiyonel RAS/MAPK yolak analizleriyle SC-12 ve LSKO-104 Hep3B hücreleri tez çalışmalarının devamında kullanılacak kontrol ve *LZTR1* nakavt Hep3B hücreleri olarak seçilmiştir.

Tezin birinci hedefi, CRISPR/Cas9n yöntemi kullanılarak *LZTR1* geninin en az bir Hep3B hücre klonunda nakavt edildiğinin western blotlama yöntemiyle protein düzeyinde belirlenmesi ve *LZTR1*'in nakavt olmasına neden olan DNA düzeyindeki değişikliğin Sanger DNA dizileme yöntemi kullanılarak belirlenmesiyle başarılı bir şekilde tamamlanmıştır.

Tezin ikinci hedefinde ilk olarak SC-12 ve LSKO-104 hücreleri kültürde çoğaltılarak üç farklı pasajdan total RNA örnekleri izole edilip, agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 14). RNA dizileme analizi yapılacak örnekleri farklı pasajlardaki hücrelerden izole etmeyi tercih etmemizin nedeni, analizler neticesinde LZTR1'in farklı pasajlarda dahi tutarlı

olarak istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon değişikliğine yol açtığı genleri belirlemek istememizdir. RNA örnekleri üçer replika halinde hazırlandıktan sonra dizileme hizmetini veren firma RNA örneklerimizin kalitesini RIN analizi yöntemiyle incelemiş ve izole ettiğimiz örneklerin en yüksek RIN değeri olan 10.0'a yakın (9.6-9.9 arası) yani oldukça yüksek kalitede olduğunu bildirdikten sonra RNA dizileme çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Tablo 19). RNA dizilemeleri gerçekleştirildikten sonra teslim aldığımız ham dizileme verileri kalitelerini kontrol edildi ve her örnek için en az %90 düzeyinde olmasını istediğimiz Q30 kalite oranlarının %91.83 ile %93.43 aralığında değiştiği, yine en az %90 düzeyinde olmasını beklediğimiz referans genoma hizalama oranlarının %99.03 ile %99.78 arasında olduğu görülmüş ve en az 28 değerinde olmasını beklediğimiz ortalama sekans kalite skorlarının (Phred skorlarının) 36 olduğu görülmüştür (Tablo 20 ve Şekil 15). Bu verilerin, RNA dizileme verilerimizin ortalamanın üstünde kalitede olduğuna işaret ettiği değerlendirilmektedir.

Tezin ikinci hedefi, RNA dizilemeyi yapacak olan firmanın dizileme için kabul ettiği konsantrasyon, kalite ve miktar kriterlerine uyan RNA örneklerinin hazırlanarak kuru buz içinde firmaya gönderilmesi ve dizilenen RNA örneklerinin Q30 değerinin >%90 olarak birleşmesi ile başarılı bir şekilde tamamlanmıştır.

Tez kapsamında üçüncü hedef ile, ikinci hedefin sonunda elde edilen ham RNA dizileme verileriyle transkriptomik veri analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda ilk olarak, RNA dizileme verilerinin referans genoma hizalanmasıyla elde edilen “.bam” dosyaları incelenerek örneklerdeki LZTR1 mRNA okumaları incelendi. LZTR1 transkriptlerine ait hizalama sonuçları, LSKO-104 hücrelerinin gDNA'larını Sanger DNA dizileme yöntemiyle sekanslayarak elde ettiğimiz verilerle uyumlu bir şekilde (Şekil 11) LSKO-104 hücrelerinde *LZTR1*'in 1. ekzonunda genin bir allelinde belirlediğimiz ve protein çevrimi sırasında çerçeve kaymasıyla erken sonlanmaya neden olan (NP_006758.2:His51Leufs*18) 23 nükleotidlik delesyona (NM_006767.4:c.154_176del23) sahip mRNA'nın okunduğunu ortaya koydu. LSKO-104 hücrelerinin gDNA'sında *LZTR1*'e ait diğer DNA ipliğinde ise genin transkripsiyon başlama bölgesinin de delesyona uğraması nedeniyle mRNA üretilmeyeceğine ilişkin tahminimizle uyumlu olarak (NC_000022.11:g.20,982,251_20,982,549delinsACTG, NM_006767.4:c.0, NP_006758.2:p.0) LSKO-104 hücrelerinde başka bir transkript okuması gerçekleşmediği belirlendi. Bunun dışında LSKO-104 hücrelerinden üretilen LZTR1 mRNA'sında referans diziye

kıyasla başka herhangi bir değişim bulunmadığı da görüldü. SC-12 hücrelerinde ise LZTR1 mRNA dizilerinin WT olduğu görüldü (Şekil 16). Bu bulgular, Sanger dizileme ve protein analizlerimizin RNA dizileme verilerimizle uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır (Şekil 11 ve 16).

LSKO-104 ve SC-12 hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı gösteren genlerin listesi belirlenmiştir. Bu analizler neticesinde, 20'si LncRNA olmak üzere toplam 117 genin ifadesinin $p < 0.05$ ve > 1.5 kat; 113'ünün ise $p < 0.05$ ve > 2 kat değiştii belirlendi. Bu nedenle, tez önerisinde, $p < 0.05$ ve > 2 kat değişim gösteren genlerin sunulmasının hedeflendiği belirtilmiş olmakla birlikte > 1.5 kat ve > 2 kat değişen genler listesi arasında sadece dört gen farkı bulunuyor olması nedeniyle bu dört genin de dışlanmayarak değerlendirme kapsamında tutulup sunulması yaklaşımı uygulanmıştır. Buna göre, iki grup arasında 1.5 kat ve üzeri ifade farklılığı gösterdiğini belirlediğimiz toplam 117 genden 54'ünün ifadesinin Hep3B hücrelerinde *LZTR1* nakavt edildiğinde artıp, 63'ünün *LZTR1* sessizleştiiğinde azaldığı görüldü (Tablo 21, Şekil 17). SC-12 ve LSKO-104 hücreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı gösteren genler arasında LZTR1'in bulunmadığı görülmüştür. Bunun nedeninin bam verilerinin ortaya koyduğu üzere LSKO-104 hücrelerinde protein senteziyle 68 amino asitlik erken sonlanan ve muhtemelen proteasomal parçalanmaya yönelen bir protein çevrilse bile transkript olarak sadece 23 nükleotitlik delesyona sahip olan mRNA'nın kodlanması olduğu değerlendirilmektedir (Şekil 5C, 11, 12, 13, 16). Bu nedenle, RNA dizi analizlerimiz neticesinde LZTR1 mRNA seviyelerinin SC-12 ve LSKO-104 arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim göstermemesinin LSKO-104 hücrelerinde LZTR1 protein seviyesinin sonlandığını ortaya koyan WB deneylerimizle uyumsuzluk yaratmadığı değerlendirilmektedir. Bu veri ayrıca *LZTR1*'in başarılı bir şekilde nakavt edildiği Hep3B hücrelerinin taranması sırasında hazırlanan kolonilerdeki mRNA düzeylerinin değil protein düzeylerinin analiz edilmesi yaklaşımımızın bizi doğru sonuca daha kısa yoldan ulaştıran uygun bir strateji olduğuna işaret ettiği de değerlendirilmektedir.

Yi vd. yaptıkları çalışmada Hep3B hücrelerinde LL22NC03-N14H11.1 isimli lncRNA'nın (hg19 referans dizilerine göre sembolü LL22NC03-N14H11.1 olan ENSG00000272872 numaralı genden kodlanan ENST00000608286.1 kodlu transkriptin (LL22NC03-N14H11.1'in) bilgileri güncel referans dizilerini içeren hg38 verisyonunda değiştirilerek genin adı sadece ENSG00000272872 olarak, bu genden kodlanan transkriptin

adı ise ENST00000608286.1 şeklinde geçmektedir) ifade olduğu ve bu lncRNA'nın c-Myb isimli bir proteinin *LZTR1*'in promotörüne lokalize olarak Hep3B hücrelerinde *LZTR1* gen ifadesini baskıladığı gösterilmiştir (64). LSKO-104 ve SC-12 hücreleri arasında en çok değişen genler arasında Yi vd.'nin (64) belirttiği lncRNA veya c-Myb bulunmamaktadır (Tablo 21). Bu durumun, Yi vd.'nin (64) belirlediği gibi Hep3B hücrelerinde LL22NC03-N14H11.1 isimli lncRNA *LZTR1* gen ifadesini kontrol ediyor olsa da LZTR1 proteininin varlığının bu lncRNA'nın gen ifadesi üzerinde bir etkisinin olmadığına yani tek yönlü bir düzenlemenin söz konusu olabileceğine işaret ettiği değerlendirilmektedir.

GSEA çalışmaları neticesinde tez kapsamında planlanan istatistiksel kriterlere uyan on GO gen setinin verileri sunulmuştur (Tablo 22 ve Şekil 18). GSEA GO verilerinin değerlendirilmesinde kolaylık sağlanması amacıyla zenginleşen GO gen setleri hakkında GO ve MSigDB veri tabanlarındaki bilgiler dikkate alınarak gen setleri “Gelişim ve farklılaşma”, “Transkripsiyon düzenleme” ve “Hücre sinyal iletimi” isimli üç farklı biyolojik süreç başlığı altında sınıflandırılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı zenginleşme skoruna sahip olan GO gen setleri incelendiğinde, ilk olarak tüm gen setlerinin SC-12 örneklerinde zenginleştiği dikkati çekmektedir. Bu durum, listede yer alan gen setlerinin ve ilişkili oldukları biyolojik süreçlerin Hep3B hücrelerinde fonksiyonel LZTR1 proteini varken zenginleştiğine yani Hep3B hücrelerinde LZTR1 kaybının listelenen gen setlerinin ilişkili oldukları biyolojik süreçlerin aktivitelerinin azalmasına işaret ettiği değerlendirilmektedir. Listedeki on gen seti arasında birinci sırada yer alan “GOBP ANIMAL ORGAN MORPHOGENESIS” gen setinin, beşinci sırada yer alan “GOBP EPITHELIUM DEVELOPMENT” ve sekizinci sırada yer alan “GOBP EPITHELIAL CELL DIFFERENTIATION” gen setlerinin epitel hücre ve organ gelişimi ile ilgili gen setleri olması oldukça dikkat çekicidir. Çünkü *LZTR1* geninde tanımlanmış olan çeşitli germ hattı mutasyonlarının fetal dönemde ortaya çıkan ve canlı doğumla bağdaşmayan NIHF'nin etiyolojisinde yer aldığı bilinmekte ve ayrıca bazı *LZTR1* mutasyonlarının konjenital gelişim kusurları ile karakterize NS tip 2 ve tip 10 hastalıklarına neden olduğu bilinmektedir (17-19). Öte yandan, LZTR1'in bahsi geçen hastalıkların etiyopatogenezinde gen ifadelerinde değişikliğe yol açtığı genlerin olup olmadığı ve varsa hangileri olduğu bilinmemektedir. Yaptığımız analizlerle fetal dönemdeki bir hücreden değil bir HCC hücre hattından transkriptomik verileri elde edilmiş olsa da LZTR1'in Hep3B hücrelerinde zenginleşme farklılığına yol açtığı gen setleri arasında gelişim ve farklılaşma süreciyle ilişkili gen setlerinin bulunuyor olmasının LZTR1'in insan gelişiminde rol oynayan önemli bir

transkripsiyonel düzenleyici olabileceğine işaret ettiği değerlendirilmektedir. Bu nedenle, doğrudan HCC ile ilişkili çıkarımlarda bulunmaya katkısı sınırlı olsa da “Gelişim ve farklılaşma” biyolojik süreci ile ilgili gen setlerinde yer alan genlerin *LZTR1* genindeki mutasyonlar ile ortaya çıkan NIHF ve NS hastalıklarının etiyopatogenezlerinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar kapsamında dikkate alınmaya değer nitelikte olduğu değerlendirilmektedir (Tablo 22 ve Şekil 18).

GSEA ile GO gen setleri arasında zenginleştiğini belirlediğimiz ve “Transkripsiyon düzenleme” biyoloji süreci altında grupladığımız gen setleri “GOMF DNA BINDING TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVITY”, “GOMF TRANSCRIPTION REGULATOR ACTIVITY”, “GOMF CIS REGULATORY REGION SEQUENCE SPECIFIC DNA BINDING” ve “GOMF SEQUENCE SPECIFIC DNA BINDING” olmuştur. Söz konusu gen setlerinin SC-12 örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı zenginleşmesi *LZTR1*’in spesifik DNA dizilerine bağlanarak transkripsiyonu düzenledikleri bilinen proteinleri kodlayan listedeki genlerin ifadelerinin artmasına yol açtığına işaret etmektedir. Söz konusu gen setlerinde gelişim biyolojisinde önemli roller oynadıkları bilinen homobox (HOX) transkripsiyon faktörlerinden *HOXB3*, *HOXB5*, *HOXB6* ve *PBX1*’in bulunuyor olması *LZTR1*’in bu üç HOX ailesi transkripsiyon faktörünün ifadelerinin artmasına neden olarak insan gelişim sürecinde önemli roller oynuyor olabileceğine işaret eden bir diğer bulgu olduğu değerlendirilmektedir (Tablo 22 ve Şekil 18A). Bunun dışında dikkatimizi çeken bir diğer sonuç *LZTR1* varlığında iyi bilinen bir kök hücre biyobelirteci transkripsiyon faktörü olan SRY-Box Transcription Factor 2’nin (*SOX2*’nin) zenginleşen gen setlerinde yer alıyor olmasıdır. *SOX2*’nin yer aldığı zenginleşen gen setlerinin sonuçları ve *SOX2* gen ifadesi sonuçları *SOX2* transkript miktarının *LZTR1*’in nakavt edildiği LSKO-104 hücrelerinde daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır (Tablo 21 ve Şekil 18A). Bu veri *LZTR1* varlığında *SOX2* gen ifadesinin azaldığını ortaya koymakta ve hem *LZTR1*’in gelişim sırasında kök hücreler özelliklerini baskılayıcı etkilerinin olabileceğine hem de kanser hücrelerinde *LZTR1* varlığının *SOX2* gen ifadesini baskılayarak tümör baskılayıcı rol oynuyor olabileceğine işaret etmektedir. Bu hususla ilgili olarak literatürde Frattini vd.’nin (12) *LZTR1*’in GBM’de sıklıkla mutasyona uğrayan genlerden biri olduğunu belirledikleri çalışmada kanser kök hücre özellikleri taşıyan *in vitro* glioma kürelerinde ektopik olarak *LZTR1* ifadesini artırdıklarında kök hücre belirteçlerinden CD133, NES ve *SOX2* protein düzeylerinin azaldığını ortaya koyan bir çalışma bulunmaktadır (12). Hep3B hücrelerinde *LZTR1* varlığında *SOX2* gen ifadesinin azaldığını ortaya koyan verilerimizin Frattini vd.’nin

LZTR1'in SOX2 protein düzeyi üzerinde etkisine ilişkin bulgularını desteklediğini ve Frattini vd.'nin (12) SOX2 protein düzeyinde belirledikleri azalmanın LZTR1'in SOX2 gen ifadesini azaltan etkisinden kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenlerle verilerimizin LZTR1'in kanser kök hücre özelliklerini baskılayan önemli bir tümör baskılayıcı olabileceğine işaret ettiği değerlendirilmektedir.

SC-12 hücrelerinde LSKO-104 örneklerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı zenginleşen son biyolojik süreç olan "Hücre sinyal iletimi" başlığı altında listede sırasıyla yedinci, dokuzuncu ve onuncu sıralarda yer alan "GOBP CELL CELL SIGNALING BY WNT", "GOBP REGULATION OF INTRACELLULAR SIGNAL TRANSDUCTION" ve "GOBP POSITIVE REGULATION OF SIGNALING" gen setleri bulunmaktadır (Tablo 21 ve Şekil 18C). LZTR1'in RAS/MAPK sinyal yolağında yer almasına rağmen hücre sinyal iletimi ile ilgili olarak zenginleşen gen setleri arasında RAS/MAPK sinyal yolağı ile ilişkili bir gen setinin bulunmuyor olması dikkati çekmektedir. Bu durumun, literatürde yer alan ve LZTR1'in kanonik RAS ve RIT1 proteinlerinin poliubikitin post-translasyonel modifikasyonuna uğramasında rol oynadığını ortaya koyan çalışmaların bulgularıyla çelişmediğini ve ilave bir bilgi sağlayarak LZTR1'in RAS/MAPK yolağının bileşenlerinin gen ifadesi üzerinde fonksiyonel etkisinin olmadığına işaret ederek önemli bir veri sağladığı değerlendirilmektedir (Tablo 21 ve 21). "Hücre sinyal iletimi" biyolojik sürecinde yer alan gen setleri incelendiğinde ilk olarak yedinci sırada yer alan "GOBP CELL CELL SIGNALING BY WNT" en seti dikkati çekmektedir. WNT/ β -catenin sinyal yolağı, HCC hastalarında sıklıkla deregüle olan sinyal yolaklarından biridir (2). Elde ettiğimiz veriler, LZTR1'in bu gen setinde yer alan genlerin ifadelerini kontrol ederek HCC hücrelerinin WNT sinyal yolağı aracılığıyla birbirleriyle haberleşmesinde rol oynuyor olabileceğine işaret ediyor olup, bu durum LZTR1'in sadece RAS/MAPK sinyal yolağında değil aynı zamanda HCC'de önemli olduğu bilinen bir diğer yolak olan WNT sinyal yolağında da işlevlerinin olabileceğine işaret ederek LZTR1'in önemini artırmaktadır. Öte yandan, verilerimiz Hep3B hücrelerinde LZTR1 varlığında bu gen setinden yer alan genlerden *SALL1*, *AMOTL1* ve *WLS* ekspresyonunu arttırırken, *WNT7B* ve *SOX2* gen ifadesinin LZTR1 yokluğunda artış gösterdiğini ortaya koyarak LZTR1'in bu yolağındaki işlevlerinin aydınlatılabilmesi için titiz ve detaylı çalışmalar yapılması gerektiğine de işaret etmektedir (Şekil 18C). SC-12 hücrelerinde ekspresyonunun arttığını belirlediğimiz *SALL1*'in glioma hücrelerinde ifadesinin artmasının WNT/ β -catenin sinyal yolağı aktivitesini düzenleyerek hücre çoğalmasını ve göçünü baskıladığı bilinmektedir (85). *SALL1*'in ifade düzeyinin

LZTR1 nakavt edildiğinde Hep3B hücrelerinde azalıyor olmasının HCC hücrelerinde bir tümör baskılayıcı olarak işlev gösteren *LZTR1*'in WNT/ β -catenin yolağının aktivitesini düzenleyerek bu fonksiyonu yerine getiriyor olabileceğini düşündürmektedir. Gen listesinde yer alan bir diğer gen olan *WNT7B*, WNT/ β -catenin yolağını aktifleştiren ligandlardan birini kodluyor olup, HCC hücrelerinde *WNT7B* ile aktifleşen WNT/ β -catenin yolağının HCC hücrelerinin Sorafenib'e direnç geliştirmelerine neden olduğu bilinmektedir (86). Hep3B hücrelerinde *LZTR1* varlığında *WNT7B* ifade düzeyinin az olup, *LZTR1* nakavt edildiğinde *WNT7B* ekspresyonunun arttığını ortaya koyan verilerimizin *LZTR1*'in WNT sinyal yolağını baskılayarak HCC hücrelerinde ilaç muamelesine hassasiyet sağlıyor olabileceğine işaret ederek *LZTR1*'in WNT/ β -catenin yolağındaki ve HCC'deki önemini artıran bir diğer ilgi çekici bulgu olduğu değerlendirilmektedir (Tablo 21, Tablo 22 ve Şekil 18C). “Hücre sinyal iletimi” biyolojik sürecinde zenginleşen diğer iki gen seti olan “GOBP REGULATION OF INTRACELLULAR SIGNAL TRANSDUCTION” ve “GOBP POSITIVE REGULATION OF SIGNALING” gen setleri ise *LZTR1*'in spesifik bir sinyal yolağı ile ilişkili olduğuna dair doğrudan bilgi sunmayan ancak *LZTR1*'in hücre içi sinyal iletim süreçlerinde rol oynayan çeşitli proteinlerin ifadesi üzerinde de fonksiyonel etkileri olduğuna işaret etmesi bakımından dikkat çekicidir (Tablo 21, ve Şekil 18C).

GSEA analizleri ile ayrıca, MSigDB veri tabanının “C2 curated gene sets” isimli literatürdeki yayınların verilerine dayalı olarak hazırlanan gen setleri koleksiyonu arasında “BENPORATH SUZ12 TARGETS” ve “PASINI SUZ12 TARGETS DN” gen setlerinin ve “C3 regulatory target gene sets” isimli transkripsiyon faktörlerinin ve miRNA'ların düzenlediği hedef genlerin listelerini içeren koleksiyon arasında yer alan “CART1 01”, “ZSCAN30 TARGET GENES” ve “ZBTB12 TARGET GENES” gen setlerinin SC-12 hücrelerinde LSKO-104 hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde zenginleştiğini ortaya çıkarmıştır (Tablo 23 ve Şekil 19). SUZ12 proteini bir çinko parmak transkripsiyon düzenleyicisi olup, Histon H3 proteininin lizin 9 metilasyonu (H3K9me) ve lizin 27 metilasyonu (H3K27me) post-translasyonel modifikasyonlarını katalize eden polycomb baskılayıcı kompleksi 2'nin (PRC2) bir bileşeni olarak hedef genlerin epigenetik düzenlenmeyle sessizleştirilmesinde rol oynamaktadır (87-89). GSEA sonuçlarımız, *LZTR1*'in SUZ12'yi içeren PRC2 kompleksi tarafından epigenetik olarak ekspresyonları baskılandığı bilinen genlerin ifadelerinin düzenlenmesinde rol oynuyor olabileceğine işaret etmektedir. Öte yandan, *LZTR1* varlığında veya yokluğunda Hep3B hücrelerinde ifadeleri değişen genler listemizde SUZ12'nin veya PRC2 kompleksinin üyelerinin bulunmuyor

olması nedeniyle LZTR1'in SUZ12 hedeflerinin ekspresyonlarını hangi mekanizmayla düzenliyor olabileceği hakkında bir değerlendirme yapmamızı kısıtlamaktadır. Bu nedenle, GSEA verilerimizin MSigDB veri tabanının C2 kodlu listesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde zenginleşen iki gen setinin de SUZ12 hedef genleri listesinde olması LZTR1'in SUZ12'nin yer aldığı PRC2 kompleksinin aktivitesi üzerinde önemli bir işleve sahip olabileceğini düşündürmekle beraber bu düşüncüyü destekleyici ilave bulgularımızın olmaması nedeniyle ilave çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulduğu değerlendirilmektedir (Tablo 21, Tablo 23 ve Şekil 19A).

GSEA çalışmalarıyla elde ettiğimiz son bulgumuz “C3 regulatory target gene sets” isimli transkripsiyon faktörlerinin ve miRNA'ların düzenlediği hedef genlerin listelerini içeren koleksiyon arasında yer alan “CART1 01”, “ZSCAN30 TARGET GENES” ve “ZBTB12 TARGET GENES” gen setlerinin SC-12 hücrelerinde LSKO-104 hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde zenginleştiğidir (Tablo 23 ve Şekil 19B). “CART1 01” gen seti transkripsiyon başlama bölgesinin -2kb, +2kb bölgesinde güncel sembolü *TRAF4* olan *CART1* transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma motifi olan “NNNTAATTNNCATTANCN” dizisine sahip olan genleri içermektedir. TRAF4, Tümör Necrosis Factor (TNF) ailesine üye bir transkripsiyon faktörü olup *TRAF4*'ün ekspresyonunun HCC hücrelerinde arttığı ve TRAF4'ün HCC hücrelerinin göçünü ve invazyonunu artırdığı bilinmektedir (90). GSEA sonuçlarımız, transkripsiyon başlama bölgesinin yakınlarında TRAF4'ün bağlanma motifi bulunan genlerden altısının (*SALL1*, *HOXB5*, *MEF2C*, *HOXB6*, *PBX1* ve *HOXB3*) gen ifadelerinin *LZTR1* nakavt edildiğinde azaldığını ortaya koymaktadır (Tablo 23 ve Şekil 19B). Bu durum, Hep3B hücrelerinde LZTR1'in TRAF4'ün indüklediği genlerden bazılarının ifadelerinin baskılanmasını sağlayarak tümör basılayıcı rol oynuyor olabileceğini düşündürmektedir. LZTR1'in transkripsiyonel düzenleyici ve tümör baskılayıcı rollerinin daha iyi anlaşılabilmesi yönünde önem taşıdığını düşündüğümüz bu verinin yeni araştırmalara ve önemli bilgiler elde edilmesine katkı sağlayabilecek nitelikte olduğu değerlendirilmektedir.

“C3 regulatory target gene sets” gen setleri arasında anlamlı zenginleşen diğer gen seti “ZSCAN30 TARGET GENES” olmuştur (Tablo 23 ve Şekil 19B). Bu gen setinde, transkripsiyon başlama bölgesinin -1 000 ile +100 baz çifti mesafesinde Zinc Finger And SCAN Domain Containing 30 (ZSCAN30) transkripsiyon faktörünün bağlanma motifi bulunan genler yer almaktadır. Pubmed'de ZSCAN30'un fonksiyonu hakkında yapılmış bir

çalışma bulunamamıştır. Bu nedenle ZSCAN30 üzerinden bir değerlendirme yapılamamıştır. Öte yandan, “ZSCAN30 TARGET GENES” gen setinde zenginleşen genler GO verilerine göre zenginleşen GSEA sonuçlarında da yer alan *SALL1*, *AMOTL1*, *MEF2C*, *FAXC*, *PBX1*, *HOXB3* ve *RNF217* genleri olduğundan GO verilerine göre anlamlı zenginleşen biyolojik süreçlerde ifadeleri değişen bu genlerin ekspresyonlarının ZSCAN30 tarafından düzenleniyor olabileceğine işaret ederek ilave bilgi sağlaması bakımında önem taşıdığı değerlendirilmektedir (Tablo 22, Tablo 23, Şekil 18 ve Şekil 19).

GSEA ile zenginleştiğini belirlediğimiz son gen seti “ZBTB12 TARGET GENES” gen setidir (Tablo 23 ve Şekil 19B). Bu gen setinde, transkripsiyon başlama bölgesinin -1 000 ile +100 baz çifti mesafesinde Zinc Finger And BTB Domain Containing 12 (ZBTB12) transkripsiyon faktörünün bağlanma motifi bulunan genler yer almaktadır. ZBTB12 hakkında literatürde az sayıda çalışma bulunuyor olup bu çalışmalarda özetle ZBTB12’nin insan pluripotent kök hücrelerinde dediferansiyasyonu baskılayan bir bariyer rolünü olduğu, *ZBTB12* gen ifadesinin kolorektal kanser hastalarında arttığını ve bunun kolorektal kanser prognozunun takibinde bir biyobelirteç olabileceği ve son olarak gastrik kanser mikroçevresinde bulunan fibroblastlarda *ZBTB12* ekspresyonunun yüksek olduğu belirlenmiştir (91-93). ZBTB12 hakkında literatürde yer alan bilgiler ZBTB12 ile LZTR1 arasındaki olası fonksiyonel ilişkinin açıklanabilmesi için yeterli düzeyde olmasa da LZTR1 varlığında veya yokluğunda GO gen setlerinde zenginleşme farklılığına yol açan *GUCY1A1*, *AMOTL1*, *VIM*, *MEF2C*, *HOXB3* ve *FBN2* genlerinin ifadelerinin ZBTB12 transkripsiyon faktörü ile düzenleniyor olabileceğine işaret etmesi nedeniyle önem taşıdığı değerlendirilmektedir (Tablo 22, Tablo 23, Şekil 18 ve Şekil 19).

Tezin üçüncü hedefi, kontrol Hep3B ve *LZTR1* geninin nakavt edildiği Hep3B hücrelerinin normalize verileri arasında ekspresyon düzeyleri düzeltilmiş p değeri <0.05 olan ve >2 kat artan ve azalan genlerin listesinin belirlenmesi, kontrol ve LZTR1 nakavt edilen Hep3B hücreleri arasında normalize zenginleşme skoru (NES) en yüksek olan ve p değeri <0.05 veya FDR değeri <0.25 olan beş gen setinin belirlenmesi ile başarılı bir şekilde tamamlanmıştır.

Tez kapsamında dördüncü hedefimiz, RNA dizileme verilerinin biyoenformatik analizleri neticesinde Hep3B hücrelerinde LZTR1’in varlığı veya yokluğu durumunda ekspresyon farklılığı gösterdiği belirlenen en az iki farklı gen transkriptine ait ekspresyon verilerinin qRT-PCR yöntemiyle doğrulanmasıdır. Bu kapsamda, RNA dizileme

analizlerinde SC-12 hücrelerine kıyasla LSKO-104 hücrelerinde ekspresyonları artan *CDH11*, *TRIB2* ve *KLF5* genleri ile SC-12 hücrelerine göre LSKO-104 hücrelerinde ifadeleri azalan *VIM*, *AMOTL1*, *BMP7* ve *RELN* genlerinin (Tablo 21) ifadeleri qRT-PCR yöntemiyle belirlenmiş ve incelenen genlerin ekspresyon düzeylerinin RNA dizileme bulgularımız ile aynı yönde ve istatistiksel olarak anlamlı olarak değiştiği ve ayrıca RNA dizileme sonuçları ile qRT-PCR sonuçlarının birbirleriyle korele olduğu (R^2 : 0.96) göstermiştir (Şekil 20 ve 21). Validasyon deneyleri kapsamında ekspresyon değişimleri valide edilmeye çalışılan genler seçilirken RNA dizileme sonuçlarına göre yüksek ifade değişikliği gösteren, ortalama normalize sayım değeri (baseMean) yani mRNA miktarı yüksek olan ve literatürdeki verileri LZTR1'in ve LZTR1'in HCC'deki fonksiyonlarının daha iyi anlaşılabilmesi yolunda önemli olabileceğini düşündüğümüz genler seçilmeye çalışılmıştır (Tablo 21). Bu yaklaşımla üzerinde çalıştığımız ilk gen olan Cadherin 11 (*CDH11*) geninin ifadesi RNA dizileme analizlerimize göre *LZTR1* nakavt edildiğinde 3.64 kat (Log2 tabanında) artmakta, qRT-PCR sonuçlarımızda ise yine *LZTR1*'in nakavt edildiği LSKO-104 hücrelerinde artmaktadır (Log2 tabanında 2.90 kat) (Tablo 21, Şekil 20 ve Şekil 21). Cadherin 11, kalsiyuma bağımlı hücre-hücre adezyon molekülleri olan Cadherin proteinlerindendir. Cadherin 11, Cadherin protein ailesinin Cadherin proteinlerine özgü hücre adezyonunu tanıma dizisini içermeyen atipik (tip II) alt grubundandır (94). Literatürde Cadherin 11 proteininin HCC'deki rolüne ilişkin bilgi sunan bir çalışma bulunmamaktadır. Cadherin 11 hakkında diğer kanser tiplerinde yapılan çalışmalar epitel hücre tipli kanserler ilerlediğinde görülen epitel-mezenkimal dönüşüm (EMT) sürecinde prostat ve meme kanseri hücrelerinin E-cadherin (*CDH1*) ekspresyonunu sınırlayıp Cadherin 11 ekspresyonunu artırdığını ortaya koymaktadır (95, 96). Buna ilaveten, meme kanseri hücrelerinde *CDH11* ifadesi arttığında Cadherin 11'in β -catenin proteininin sitoplazmada stabilize edip çekirdeğe lokalize olmasına yardımcı olarak WNT/ β -catenin sinyal yolağını artırıcı rolünü olduğu belirlenmiştir (97, 98). Bunlara ek olarak, *CDH11* ekspresyonunun azalmasının pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) tümör mikroçevresini etkileyerek anti-tümör bağışıklık yanıtının ve sağkalımın artmasına yol açtığı belirlenmiştir (99), *CDH11* ifadesinin artması gastrik kanser hücrelerinin metastaz yapma kapasitesinin bir belirteci olduğu belirlenmiştir (100), *CDH11*'in doku fibrozu sürecinin yönetilmesinde rol oynadığı belirlenmiştir (101). *CDH11* hakkında bilimsel literatürdeki bilgiler ve elde ettiğimiz sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde Hep3B hücrelerinde *LZTR1* nakavt edildiğinde *CDH11* ekspresyonunun artıyor olması nedeniyle *LZTR1*'in Hep3B hücrelerinde *CDH11* gen

ifadesini sınırlandırarak Hep3B hücrelerinde WNT/ β -catenin yolağını ve metastatik özellikleri baskılayan bir bariyer işlevi sergileyerek tümör baskılayıcı rol oynuyor olabileceği değerlendirilmektedir.

LZTR1 varlığında veya yokluğunda ifadesi anlamlı değişim gösteren genler arasında EMT süreciyle ilişkili olduğu bilinen proteinlerden bir diğeri olan Vimentin (*VIM*) de bulunmaktadır. RNA dizileme verilerimiz Hep3B hücrelerinde LZTR1 nakavt edildiğinde *VIM* ekspresyonunun 4.66 kat azaldığını, qRT-PCR sonuçlarımız ise 4.69 kat azaldığını ortaya koymaktadır (Tablo 21, Şekil 20 ve Şekil 21). *VIM* geni, mezenkimal hücrelerde ifade edilen ve sitoplazmada lokalize olan bir sınıf-III ara filaman proteinini kodlamaktadır (102). Vimentin, HCC dahil birçok kanser tipinde EMT sürecinde ifadesi arttığı bilinen, kötü prognoz belirteci ve kanser tedavisi için hedeflenen önemli bir hedef moleküldür (103). RNA dizileme analizi ve qRT-PCR deney sonuçlarımızın Hep3B hücrelerinde *LZTR1* nakavt edildiği zaman Vimentin ekspresyonunun azaldığını ortaya koyuyor olması *LZTR1*'in HCC'de tümör baskılayıcı rolüne ilişkin diğer verilerimiz ve literatürdeki bilgiler ile uyumsuzluğa neden olduğu şeklinde yorumlanabilir. Öte yandan literatürde Vimentin'in kanserin kötü prognozundaki işlevlerine dair veriler dışında Vimentin'in sağlıklı ve tümör hücreleri için avantaj sağladığını ortaya koyan çalışmalar da yer almaktadır. Vimentin'in iki farklı rolünün temelinde Vimentin proteininin lokalize olabildiği yerlerin değişkenlik gösterebilmesi yatmaktadır. Vimentin, mezenkimal hücrelerin sitoplazmasına lokalize olarak dayanıklılık kazandırmasına ek olarak, hücre yüzeyinde de lokalize olabilmekte veya hücre dışına salgılanabilmektedir. Hücre dışına salgılanan Vimentin'in viral partiküllere bağlanarak viral enfeksiyonunu engelleyici rolünün olduğu ve kanser hücreleri tarafından hücre dışına salgılandığında Vimentin'in hücre göçü, invazyon ve anjiyogenez süreçlerini artırıcı bilinen işlevlerinin aksine etki gösterebildiği ve Vimentin'in fonksiyonunun hücre tipine göre ve içeriğe bağımlı (İng. context-dependent) olarak değişiklik gösterebildiği belirlenmiştir (104). Sonuç olarak, RNA dizileme ve qRT-PCR verilerimiz Hep3B hücrelerinde *LZTR1* sessizleştğinde Vimentin ekspresyonunun azaldığını ortaya koymakta ancak *LZTR1*'in Hep3B hücrelerindeki Vimentin ekspresyonu üzerindeki belirgin etkisinin HCC lehine mi yoksa aleyhine mi etkilerinin olduğunun ilave çalışmalar neticesinde belirlenebileceği değerlendirilmektedir.

Üzerinde çalıştığımız Hep3B hücrelerinde Tribbles Pseudokinase 2 (*TRIB2*) gen ifadesi hakkında elde ettiğimiz sonuçlar RNA dizileme verilerimizin Hep3B hücrelerinde

LZTR1 nakavt edildiğinde *TRIB2* ekspresyonunun 2.28 kat arttığını, qRT-PCR sonuçlarımız ise 3.06 kat arttığını ortaya koymaktadır (Tablo 21, Şekil 20 ve Şekil 21). *TRIB2* hakkındaki literatür verileri *TRIB2* proteininin MEK ve AKT proteinleriyle etkileşerek RAS sinyal yolağının aktivitesini düzenleyebildiğini ve *TRIB2*'nin HCC dahil çok sayıda kanser tipinde onkogen olduğunu ortaya koymaktadır (105). HCC hücreleri özelinde *TRIB2*'nin Hippo sinyal yolağının bir bileşeni ve onkogen olan Yes1 associated transcriptional regulator protein (YAP1) ile etkileştiği, YAP1'i stabilize ederek YAP1'in çekirdeğe lokalizasyonunu artmasına neden olduğu belirlenmiştir (106). *TRIB2* hakkında literatürdeki bilgiler ve verilerimiz birlikte değerlendirildiğinde *LZTR1*'in Hep3B hücrelerinde *TRIB2* gen ifadesini sınırlandırarak onkogenin RAS ve Hippo sinyal yolağı aktivitelerini baskılıyor olabileceği değerlendirilmektedir. Bu durumun, *LZTR1*'in *TRIB2* ekspresyonu üzerindeki etkisinin *LZTR1*'in HCC hücrelerinde Hippo sinyal yolağında rol oynuyor olabileceğine işaret etmesi bakımından ayrıca önem taşıdığı değerlendirilmektedir.

LZTR1'in Hippo sinyal yolağında görev alıyor olabileceğine işaret eden bir diğer veri *LZTR1*'in *AMOTL1* ekspresyonu üzerindeki etkisini ortaya koyan bulgulardır. RNA dizileme verilerimiz Hep3B hücrelerinde *LZTR1* nakavt edildiğinde Angiomotin Like 1 (*AMOTL1*) ekspresyonunun 3.97 kat azaldığını, qRT-PCR sonuçlarımız ise 4.67 kat düştüğünü ortaya koymaktadır (Tablo 21, Şekil 20 ve Şekil 21). *AMOTL1* proteini, epitel tipli hücrelerin sıkı bağlantılarında yer alabilen bir periferik membran proteinidir. *AMOTL1*'in ayrıca hippo sinyal yolağında görev alarak tümör baskılayıcı işlev gösterebildiği de belirlenmiştir. Hippo sinyal yolağı inaktif olduğunda yolağın efektör proteinleri olan YAP1 ve TAZ proteinleri sitoplazmadan çekirdeğe geçerek onkogenik işlevlere sahip genlerin ifadelerinin artmasına yol açmaktadırlar. Hippo yolağının üst akımında yer alan proteinler aktifleştğinde ise kısaca MST1/2-LATS1/2-YAP1/TAZ şeklinde ilerleyen sinyal kaskadı YAP1/TAZ proteinlerinin fosforillenerek sitoplazmada kalmalarına onkogenin transkripsiyon düzenleyici işlevlerini gerçekleştirememelerine neden olmaktadır. *AMOTL1*'in sıkı bağlantılarda YAP1/TAZ proteinleriyle etkileşip YAP1/TAZ proteinlerini sitoplazmada stabilize ederek veya adheren bağlantılarda LATS1/2 ile etkileşip LATS1/2'i aktifleştirerek tümör baskılayıcı rol oynayabildiği belirlenmiştir (107). Öte yandan *AMOTL1*'in glioma ve gatrik kanser hücrelerinde bu bilgilerin aksine YAP1 protein aktivitesini artırdığı ve onkogenik etki gösterdiği de belirlenmiştir (108, 109). *AMOTL1*'in ayrıca meme kanseri hücrelerinde c-Src proteinini aktive ederek, servikal kanser hücrelerinde ise kanser hücrelerinin metastaz kapasitelerini artırarak onkogen roller oynadığı

da belirlenmiştir (110). Bu bilgiler, AMOTL1'in tümör baskılayıcı veya onkogen aktivitelerinin hücre tipine göre değişkenlik gösterebileceğine işaret ediyor olup HCC özelinde AMOTL1'in işlevinin aydınlatılabilmesi için ilave çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Deney sonuçlarımızın Hep3B hücrelerinde *LZTR1* nakavt edildiğinde *AMOTL1* ekspresyonunun azaldığını ortaya koyması ve literatürdeki mevcut verilerin LZTR1'in HCC'de bir tümör baskılayıcı olduğuna işaret ediyor olması birlikte dikkate alındığında AMOTL1'in HCC'de tümör baskılayıcı işleve sahip olabileceği ve LZTR1'in *AMOTL1* gen ifadesini kontrol ederek Hippo sinyal yolağında fonksiyonel etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan, bu olasılığın doğruluğunun ilave çalışmalarla incelenmesi gerekmektedir.

Hep3B hücrelerinde *LZTR1* sessizleştirilmesi sonucunda ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştiğini belirlediğimiz bir diğer gen KLF Transcription Factor 5 (*KLF5*) olmuştur. RNA dizileme verilerimizin Hep3B hücrelerinde *LZTR1* nakavt edildiğinde *KLF5* ekspresyonunun 1.52 kat arttığını, qRT-PCR sonuçlarımız ise 2.41 kat arttığını ortaya koymaktadır (Tablo 21, Şekil 20 ve Şekil 21). *KLF5* hakkında literatürde yer alan çalışmalar *KLF5*'in meme kanseri hücrelerinin EMT düzeylerini artırarak karaciğere metastaz yapmalarını artırdığını ve prostat kanseri hücrelerinde belirlenen *KLF5* post-translasyonel modifikasyonların prostat kanseri hastalarında metastatik lezyonların artışıyla ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (111-113). Buna ek olarak literatürde, *KLF5*'in HCC hücrelerinin çoğalmasını ve metastazını artırdığını belirleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır (114-120). Öte yandan, bilimsel literatürde *KLF5* ile LZTR1 arasında bir ilişki bulunduğuna dair bir veri bulunmuyor olup elde ettiğimiz verilerin Hep3B hücrelerinde LZTR1'in HCC'de onkogen işlevlere sahip olduğu bilinen önemli bir protein olan *KLF5*'in ekspresyonunu baskılayarak tümör baskılayıcı rol oynuyor olabileceğine işaret etmesi nedeniyle önem taşıdığı değerlendirilmektedir.

Hep3B hücrelerinde LZTR1 varlığına bağlı olarak ekspresyon düzeyinin değiştiğini belirlediğimiz bir diğer gen Bone Morphogenetic Protein 7 (*BMP7*) olmuştur. RNA dizileme sonuçlarımız BMP7 ekspresyonunun LZTR1 nakavt edildiğinde Hep3B hücrelerinde 2.78 kat, qRT-PCR bulgularımız ise 4.23 kat azaldığını göstermektedir (Tablo 21, Şekil 20 ve Şekil 21). BMP7, transforming growth factor beta (TGF- β) süper ailesi proteinlerinin hücre dışına salgılanan bir ligandını kodlamaktadır (121). BMP7'nin HCC hücre hatlarında Smad/MAPK yolağını aktifleştirerek HCC hücrelerinin çoğalmalarının ve göç etme

düzeylerini artırdığı ve HCC hasta dokularında BMP7 mRNA ve protein düzeylerinin yüksek olup bu durumun kötü prognozla ilişkili olduğu belirlenmiştir (122-124). Öte yandan, literatürde BMP-7 mRNA ve protein düzeylerinin HCC hastalarında azaldığını ve HCC tümör seviyesi ilerledikçe BMP7 ekspresyonunun düştüğünü ortaya koyan ve HCC hasta dokularında *BMP7* mRNA düzeyinin azaldığı ve HCC hücrelerinde *BMP7* gen ifadesinin azaltılmasının (knock down) HCC hücrelerinin göç etme, invazyon ve EMT düzeylerinin artmasına yol açtığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (125, 126). Bu durum, BMP7'nin HCC'deki rolleriyle ilişkili birbirleriyle çelişen veriler bulunduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle Hep3B hücrelerinde *LZTR1*'in *BMP7* gen ifadesinin artmasıyla ilişkili olduğunu ortaya koyan bulguların hem *LZTR1*'in ve BMP7'nin HCC'deki fonksiyonlarının daha iyi aydınlatılmasına katkı sağlama hem de *LZTR1*'in HCC hücrelerinde TGF- β yolağında da görev alıp almadığının açığa çıkarılmasına katkı sağlama potansiyeli taşıyan önemli sonuçlar olduğuna işaret ettiği değerlendirilmektedir.

Hep3B hücrelerinde *LZTR1* varlığına bağlı olarak ekspresyon düzeyinin değiştiğini belirlediğimiz ve qRT-PCR yöntemiyle doğruladığımız son gen Reelin (*RELN*) olmuştur. RNA dizileme sonuçlarımız *RELN* ekspresyonunun *LZTR1* nakavt edildiğinde Hep3B hücrelerinde 2.10 kat, qRT-PCR bulgularımız ise 3.09 kat azaldığını göstermektedir (Tablo 21, Şekil 20 ve Şekil 21). HCC hücrelerinde TGF- β 'nin *RELN* gen ifadesini baskıladığını ve bu durumun HCC hücrelerinin göç etme düzeylerini artırdığı belirlenmiştir (127). Buna ek olarak, *RELN* ekspresyonunun Sorafenib'e dirençli Huh-7 ve HepG2 hücre hatlarında azaldığını ve HCC hastalarında *RELN* gen ifadesinin azalmasının hastalığın nüks etmesiyle ilişkili olduğunu belirten çalışmalar da bulunmaktadır (128, 129). *RELN* hakkındaki literatür verileri ve Hep3B hücrelerinde *LZTR1* nakavt edildiğinde *RELN* ekspresyonunun azaldığını gösteren bulgularımız birlikte değerlendirildiğinde *LZTR1*'in Hep3B hücrelerinde *RELN* ifadesini artırıcı işleviyle TGF- β sinyal yolağının aktivitesini düzenleyerek *RELN* ekspresyonu üzerinden tümör baskılayıcı fonksiyon sergiliyor olabileceği değerlendirilmektedir. Ancak bu düşüncenin doğru olup olmadığının ilave çalışmalarla ortaya çıkarılması gerekmektedir.

Tezin dördüncü hedefi, Hep3B hücrelerinde *LZTR1*'in varlığı veya yokluğu durumunda ekspresyon farklılığı gösterdiği belirlenen en az iki farklı gen transkriptine ait ekspresyon verilerinin qRT-PCR yöntemiyle doğrulanması ve qRT-PCR ve RNA dizileme analiz sonuçlarının uyumlu çıkması ile başarılı bir şekilde tamamlanmıştır.

Sonuç olarak, HCC hücre hattı olan Hep3B hücrelerinde *LZTR1* geninin nakavt edilmesiyle 117 genin ekspresyonu anlamlı şekilde değişti. Bu veriler, LZTR1'in gelişim ve farklılaşma, transkripsiyon düzenleme ve hücre sinyal iletimine ilişkin önemli biyolojik süreçlerde rolü alabileceğini ve LZTR1'in HCC'de transkripsiyonel düzenleyici olabileceğini göstermektedir.



6. KAYNAKLAR

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021). May. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71(3): 209-249. 10.3322/caac.21660.
2. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, Lencioni R, Koike K, Zucman-Rossi J, Finn RS (2021). Jan 21. Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers* 7(1). ARTN 610.1038/s41572-020-00240-3.
3. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address wbe, Cancer Genome Atlas Research N (2017). Jun 15. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell* 169(7): 1327-1341 e1323. 10.1016/j.cell.2017.05.046.
4. Bigenzahn JW, Collie GM, Kartnig F, Pieraks M, Vladimer GI, Heinez LX, Sedlyarov V, Schischlik F, Fauster A, Rebsamen M, Parapatics K, Blumen VA, Muller AC, Winter GE, Kralovics R, Brunlinelkamp TR, Mlodzik M, Superti-Furga G (2018). Dec 7. LZTR1 is a regulator of RAS ubiquitination and signaling. *Science* 362(6419): 1171-1177. 10.1126/science.aap8210.
5. Castel P, Cheng A, Cuevas-Navarro A, Everman DB, Papageorge AG, Simanshu DK, Tankka A, Galeas J, Urisman A, McCormick F (2019). Mar 15. RIT1 oncoproteins escape LZTR1-mediated proteolysis. *Science* 363(6432): 1226-1229. 10.1126/science.aav1444.
6. Steklov M, Pandolfi S, Baietti MF, Batiuk A, Carai P, Najm P, Zhang M, Jang H, Renzi F, Cai Y, Abbasi Asbagh L, Pastor T, De Troyer M, Simicek M, Radaelli E, Brems H, Legius E, Tavernier J, Gevaert K, Impens F, Messiaen L, Nussinov R, Heymans S, Eyckerman S, Sablina AA (2018). Dec 7. Mutations in LZTR1 drive human disease by dysregulating RAS ubiquitination. *Science* 362(6419): 1177-1182. 10.1126/science.aap7607.
7. Kurahashi H, Akagi K, Inazawa J, Ohta T, Niikawa N, Kayatani F, Sano T, Okada S, Nishisho I (1995). Apr. Isolation and Characterization of a Novel Gene Deleted in Digeorge-Syndrome. *Human Molecular Genetics* 4(4): 541-549. DOI 10.1093/hmg/4.4.541.
8. Nacak TG, Leptien K, Fellner D, Augustin HG, Kroll J (2006). Feb 24. The BTB-kelch protein LZTR-1 is a novel Golgi protein that is degraded upon induction of

- apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 281(8): 5065-5071. 10.1074/jbc.M509073200.
9. National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene (2024) [online]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8216>. [Accessed 30 Mayıs 2024].
 10. Hugo Gene Nomenclature Committee (HGNC) (2024) [online]. Available from: https://www.genenames.org/data/gene-symbol-report/#!/hgnc_id/HGNC:6742. [Accessed 30 Mayıs 2024].
 11. Canning P, Cooper CDO, Krojer T, Murray JW, Pike ACW, Chaikuad A, Keates T, Thangaratnarajah C, Hojzan V, Marsden BD, Gileadi O, Knapp S, von Delft F, Bullock AN (2013). Mar 15. Structural Basis for Cul3 Protein Assembly with the BTB-Kelch Family of E3 Ubiquitin Ligases. *Journal of Biological Chemistry* 288(11): 7803-7814. 10.1074/jbc.M112.437996.
 12. Frattini V, Trifonov V, Chan JM, Castano A, Lia M, Abate F, Keir ST, Ji AX, Zoppoli P, Niola F, Danussi C, Dolgalev I, Porra P, Pellegatta S, Heguy A, Gupta G, Pisapia DJ, Canoll P, Bruce JN, McLendon RE, Yan H, Aldape K, Finocchiaro G, Mikkelsen T, Prive GG, Bigner DD, Lasorella A, Rabadan R, Iavarone A (2013). Oct. The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma. *Nature Genetics* 45(10): 1141-U1270. 10.1038/ng.2734.
 13. Abe T, Umeki I, Kanno SI, Inoue SI, Niihori T, Aoki Y (2020). Mar. LZTR1 facilitates polyubiquitination and degradation of RAS-GTPases. *Cell Death Differ* 27(3): 1023-1035. 10.1038/s41418-019-0395-5.
 14. Motta M, Fidan M, Bellacchio E, Pantaleoni F, Schneider-Heieck K, Coppola S, Borck G, Salviati L, Zenker M, Cirstea IC, Tartaglia M (2019). Mar 15. Dominant Noonan syndrome-causing LZTR1 mutations specifically affect the Kelch domain substrate-recognition surface and enhance RAS-MAPK signaling. *Hum Mol Genet* 28(6): 1007-1022. 10.1093/hmg/ddy412.
 15. Umeki I, Niihori T, Abe T, Kanno SI, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Nagasaki K, Yoshida M, Ohashi H, Inoue SI, Matsubara Y, Fujiwara I, Kure S, Aoki Y (2019). Jan. Delineation of LZTR1 mutation-positive patients with Noonan syndrome and identification of LZTR1 binding to RAF1-PPP1CB complexes. *Hum Genet* 138(1): 21-35. 10.1007/s00439-018-1951-7.
 16. Uprety D, Adjei AA (2020). Sep. KRAS: From undruggable to a druggable Cancer

- Target. *Cancer Treat Rev* 89: 102070. 10.1016/j.ctrv.2020.102070.
17. Shamseldin HE, Kurdi W, Almusafri F, Alnemer M, Alkaff A, Babay Z, Alhashem A, Tulbah M, Alsahan N, Khan R, Sallout B, Al Mardawi E, Seidahmed MZ, Meriki N, Alsaber Y, Qari A, Khalifa O, Eyaid W, Rahbeeni Z, Kurdi A, Hashem M, Alshidi T, Al-Obeid E, Abdulwahab F, Ibrahim N, Ewida N, El-Akouri K, Al Mulla M, Ben-Omran T, Pergande M, Cirak S, Al Tala S, Shaheen R, Fageih E, Alkuraya FS (2018). Apr. Molecular autopsy in maternal-fetal medicine. *Genetics in Medicine* 20(4): 420-427. 10.1038/gim.2017.111.
 18. Johnston JJ, van der Smagt JJ, Rosenfeld JA, Pagnamenta AT, Alswaid A, Baker EH, Blair E, Borck G, Brinkmann J, Craigen W, Dung VC, Emrick L, Everman DB, van Gassen KL, Gulsuner S, Harr MH, Jain M, Kuechler A, Leppig KA, McDonald-McGinn DM, Can NTB, Peleg A, Roeder ER, Rogers RC, Sagi-Dain L, Sapp JC, Schaffer AA, Schanze D, Stewart H, Taylor JC, Verbeek NE, Walkiewicz MA, Zackai EH, Zweier C, Zenker M, Lee B, Biesecker LG, Network MUD (2018). Oct. Autosomal recessive Noonan syndrome associated with biallelic LZTR1 variants. *Genetics in Medicine* 20(10): 1175-1185. 10.1038/gim.2017.249.
 19. Yamamoto GL, Agueni M, Gos M, Hung C, Pilch J, Fahiminiya S, Abramowicz A, Cristian I, Buscarilli M, Naslavsky MS, Malaquias AC, Zatz M, Bodamer O, Majewski J, Jorge AA, Pereira AC, Kim CA, Passos-Bueno MR, Bertola DR (2015). Jun. Rare variants in SOS2 and LZTR1 are associated with Noonan syndrome. *J Med Genet* 52(6): 413-421. 10.1136/jmedgenet-2015-103018.
 20. Kehrer-Sawatzki H, Farschtschi S, Mautner VF, Cooper DN (2017). Feb. The molecular pathogenesis of schwannomatosis, a paradigm for the co-involvement of multiple tumour suppressor genes in tumorigenesis. *Human Genetics* 136(2): 129-148. 10.1007/s00439-016-1753-8.
 21. Piotrowski A, Xie J, Liu YF, Poplawski AB, Gomes AR, Madanecki P, Fu C, Crowley MR, Crossman DK, Armstrong L, Babovic-Vuksanovic D, Bergner A, Blakeley JO, Blumenthal AL, Daniels MS, Feit H, Gardner K, Hurst S, Kobelka C, Lee C, Nagy R, Rauen KA, Slopis JM, Suwannarat P, Westman JA, Zanko A, Korf BR, Messiaen LM (2014). Feb. Germline loss-of-function mutations in LZTR1 predispose to an inherited disorder of multiple schwannomas. *Nat Genet* 46(2): 182-187. 10.1038/ng.2855.
 22. Society for Maternal-Fetal M, Norton ME, Chauhan SP, Dashe JS (2015). Feb.

- Society for maternal-fetal medicine (SMFM) clinical guideline #7: nonimmune hydrops fetalis. *Am J Obstet Gynecol* 212(2): 127-139. 10.1016/j.ajog.2014.12.018.
23. Mardy AH, Chetty SP, Norton ME, Sparks TN (2019). A system-based approach to the genetic etiologies of non-immune hydrops fetalis. *Prenatal diagnosis* 39(9): 732-750.
 24. Sparks TN, Lianoglou BR, Adami RR, Pluym ID, Holliman K, Duffy J, Downum SL, Patel S, Faubel A, Boe NM, Field NT, Murphy A, Laurent LC, Jolley J, Uy C, Slavotinek AM, Devine P, Hodoglugil U, Van Ziffle J, Sanders SJ, MacKenzie TC, Norton ME, University of California Fetal-Maternal C, University of California SFCfM-FPM (2020). Oct 29. Exome Sequencing for Prenatal Diagnosis in Nonimmune Hydrops Fetalis. *N Engl J Med* 383(18): 1746-1756. 10.1056/NEJMoa2023643.
 25. Roberts AE, Allanson JE, Tartaglia M, Gelb BD (2013). Jan 26. Noonan syndrome. *Lancet* 381(9863): 333-342. 10.1016/S0140-6736(12)61023-X.
 26. Rauen KA (2013). The RASopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 14: 355-369. 10.1146/annurev-genom-091212-153523.
 27. Tartaglia M, Aoki Y, Gelb BD (2022). Dec. The molecular genetics of RASopathies: An update on novel disease genes and new disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 190(4): 425-439. 10.1002/ajmg.c.32012.
 28. Tidyman WE, Rauen KA (2016). Expansion of the RASopathies. *Current genetic medicine reports* 4: 57-64.
 29. Croonen EA, Nillesen WM, Stuurman KE, Oudesluijs G, van de Laar IM, Martens L, Ockeloen C, Mathijssen IB, Schepens M, Ruitkamp-Versteeg M, Scheffer H, Faas BH, van der Burgt I, Yntema HG (2013). Sep. Prenatal diagnostic testing of the Noonan syndrome genes in fetuses with abnormal ultrasound findings. *Eur J Hum Genet* 21(9): 936-942. 10.1038/ejhg.2012.285.
 30. Leach NT, Mathews DRW, Rosenblum LS, Zhou Z, Zhu H, Heim RA (2019). Feb. Comparative assessment of gene-specific variant distribution in prenatal and postnatal cohorts tested for Noonan syndrome and related conditions. *Genetics in Medicine* 21(2): 417-425. 10.1038/s41436-018-0062-0.
 31. Croonen EA, Nillesen W, Schrandt C, Jongmans M, Scheffer H, Noordam C, Draaisma JM, van der Burgt I, Yntema HG (2013). Jun. Noonan syndrome: comparing mutation-positive with mutation-negative dutch patients. *Mol Syndromol*

- 4(5): 227-234. 10.1159/000350686.
32. van Trier DC, van Nierop J, Draaisma JMT, van der Burgt I, Kunst H, Croonen EA, Admiraal RJC (2015). Jun. External ear anomalies and hearing impairment in Noonan Syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 79(6): 874-878. 10.1016/j.ijporl.2015.03.021.
 33. Tafazoli A, Eshraghi P, Pantaleoni F, Vakili R, Moghaddassian M, Ghahraman M, Muto V, Paolacci S, Golyan FF, Abbaszadegan MR (2018). Mar. Novel mutations and their genotype-phenotype correlations in patients with Noonan syndrome, using next-generation sequencing. *Advances in Medical Sciences* 63(1): 87-93. 10.1016/j.advms.2017.07.001.
 34. Sewduth RN, Pandolfi S, Steklov M, Sheryazdanova A, Zhao P, Criem N, Baietti MF, Lechat B, Quarck R, Impens F, Sablina AA (2020). May 8. The Noonan Syndrome Gene *Lztr1* Controls Cardiovascular Function by Regulating Vesicular Trafficking. *Circ Res* 126(10): 1379-1393. 10.1161/CIRCRESAHA.119.315730.
 35. Evans DG, Bowers NL, Tobi S, Hartley C, Wallace AJ, King AT, Lloyd SKW, Rutherford SA, Hammerbeck-Ward C, Pathmanaban ON, Freeman SR, Ealing J, Kellett M, Laitt R, Thomas O, Halliday D, Ferner R, Taylor A, Duff C, Harkness EF, Smith MJ (2018). Nov. Schwannomatosis: a genetic and epidemiological study. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 89(11): 1215-1219. 10.1136/jnnp-2018-318538.
 36. Ammoun S, Flaiz C, Ristic N, Schuldt J, Hanemann CO (2008). Jul 1. Dissecting and targeting the growth factor-dependent and growth factor-independent extracellular signal-regulated kinase pathway in human schwannoma. *Cancer Res* 68(13): 5236-5245. 10.1158/0008-5472.CAN-07-5849.
 37. Chadee DN, Xu DZ, Hung G, Andalibi A, Lim DJ, Luo ZJ, Gutmann DH, Kyriakis JM (2006). Mar 21. Mixed-lineage kinase 3 regulates B-Raf through maintenance of the B-Raf/Raf-1 complex and inhibition by the NF2 tumor suppressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(12): 4463-4468. 10.1073/pnas.0510651103.
 38. Morrison H, Sperka T, Manent J, Giovannini M, Ponta H, Herrlich P (2007). Jan 15. Merlin/neurofibromatosis type 2 suppresses growth by inhibiting the activation of Ras and Rac. *Cancer Res* 67(2): 520-527. 10.1158/0008-5472.CAN-06-1608.
 39. Rong R, Tang XL, Gutmann DH, Ye KQ (2004). Dec 28. Neurofibromatosis 2 (NF2)

- tumor suppressor merlin inhibits phosphatidylinositol 3-kinase through binding to PIKE-L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(52): 18200-18205. DOI 10.1073/pnas.0405971102.
40. James MF, Han S, Polizzano C, Plotkin SR, Manning BD, Stemmer-Rachamimov AO, Gusella JF, Ramesh V (2009). Aug. NF2/Merlin Is a Novel Negative Regulator of mTOR Complex 1, and Activation of mTORC1 Is Associated with Meningioma and Schwannoma Growth. *Molecular and Cellular Biology* 29(15): 4250-4261. 10.1128/Mcb.01581-08.
 41. Darr J, Klochendler A, Isaac S, Eden A (2014). Jun 5. Loss of IGFBP7 expression and persistent AKT activation contribute to SMARCB1/Snf5-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 33(23): 3024-3032. 10.1038/onc.2013.261.
 42. Draaken M, Baudisch F, Timmermann B, Kuhl H, Kerick M, Proske J, Wittler L, Pennimpede T, Ebert AK, Rosch W, Stein R, Bartels E, von Lowtzow C, Boemers TM, Herms S, Gearhart JP, Lakshmanan Y, Kockum CC, Holmdahl G, Lackgren G, Nordenskjold A, Boyadjiev SA, Herrmann BG, Nothen MM, Ludwig M, Reutter H (2014). Jun. Classic bladder exstrophy: Frequent 22q11.21 duplications and definition of a 414 kb phenocritical region. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 100(6): 512-517. 10.1002/bdra.23249.
 43. Lundin J, Markljung E, Baranowska Korberg I, Hofmeister W, Cao J, Nilsson D, Holmdahl G, Barker G, Anderberg M, Vukojevic V, Lindstrand A, Nordenskjold A (2019). Jun. Further support linking the 22q11.2 microduplication to an increased risk of bladder exstrophy and highlighting LZTR1 as a candidate gene. *Mol Genet Genomic Med* 7(6): e666. 10.1002/mgg3.666.
 44. Pitsava G, Feldkamp ML, Pankratz N, Lane J, Kay DM, Conway KM, Shaw GM, Reefhuis J, Jenkins MM, Almli LM, Olshan AF, Pangilinan F, Brody LC, Sicko RJ, Hobbs CA, Bamshad M, McGoldrick D, Nickerson DA, Finnell RH, Mullikin J, Romitti PA, Mills JL, University of Washington Center for Mendelian Genomics NCSP, the National Birth Defects Prevention S (2021). Oct. Exome sequencing of child-parent trios with bladder exstrophy: Findings in 26 children. *Am J Med Genet A* 185(10): 3028-3041. 10.1002/ajmg.a.62439.
 45. Nordenskjold A, Arkani S, Pettersson M, Winberg J, Cao J, Fossum M, Anderberg M, Barker G, Holmdahl G, Lundin J (2023). Feb. Copy number variants suggest different molecular pathways for the pathogenesis of bladder exstrophy. *Am J Med*

- Genet A 191(2): 378-390. 10.1002/ajmg.a.63031.
46. Kollges R, Stegmann J, Schneider S, Waffenschmidt L, Fazaal J, Breuer K, Hilger AC, Dworschak GC, Mingardo E, Rosch W, Hofmann A, Neissner C, Ebert AK, Stein R, Younsi N, Hirsch-Koch K, Schmiedeke E, Zwink N, Jenetzky E, Thiele H, Ludwig KU, Reutter H (2023). Jul 13. Exome Survey and Candidate Gene Re-Sequencing Identifies Novel Exstrophy Candidate Genes and Implicates LZTR1 in Disease Formation. *Biomolecules* 13(7). 10.3390/biom13071117.
 47. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A (2015). Jun. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* 129(6): 829-848. 10.1007/s00401-015-1432-1.
 48. Khabibov M, Garifullin A, Boumber Y, Khaddour K, Fernandez M, Khamitov F, Khalikova L, Kuznetsova N, Kit O, Kharin L (2022). Jun. Signaling pathways and therapeutic approaches in glioblastoma multiforme (Review). *International Journal of Oncology* 60(6). ARTN 6910.3892/ijo.2022.5359.
 49. Damernsawad A, Bottomly D, Kurtz SE, Eide CA, McWeeney SK, Tyner JW, Nechiporuk T (2022). Jan 1. Genome-wide CRISPR screen identifies regulators of MAPK and MTOR pathways mediating sorafenib resistance in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 107(1): 77-85. 10.3324/haematol.2020.257964.
 50. Chen S, Vedula RS, Cuevas-Navarro A, Lu B, Hogg SJ, Wang E, Benbarche S, Knorr K, Kim WJ, Stanley RF, Cho H, Erickson C, Singer M, Cui D, Tittley S, Durham BH, Pavletich TS, Fiala E, Walsh MF, Inoue D, Monette S, Taylor J, Rosen N, McCormick F, Lindsley RC, Castel P, Abdel-Wahab O (2022). Oct 5. Impaired Proteolysis of Noncanonical RAS Proteins Drives Clonal Hematopoietic Transformation. *Cancer Discov* 12(10): 2434-2453. 10.1158/2159-8290.CD-21-1631.
 51. Palanivel C, Chaudhary N, Seshacharyulu P, Cox JL, Yan Y, Batra SK, Ouellette MM (2022). Mar. The GSK3 kinase and LZTR1 protein regulate the stability of Ras family proteins and the proliferation of pancreatic cancer cells. *Neoplasia* 25: 28-40. 10.1016/j.neo.2022.01.002.
 52. Mancinelli R, Carpino G, Petrungaro S, Mammola CL, Tomaipitinea L, Filippini A, Facchiano A, Ziparo E, Giampietri C (2017). Multifaceted Roles of GSK-3 in Cancer and Autophagy-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 4629495. 10.1155/2017/4629495.

53. Abe T, Kanno SI, Niihori T, Terao M, Takada S, Aoki Y (2023). Aug 25. LZTR1 deficiency exerts high metastatic potential by enhancing sensitivity to EMT induction and controlling KLHL12-mediated collagen secretion. *Cell Death Dis* 14(8): 556. 10.1038/s41419-023-06072-9.
54. Farshidfar F, Rhrissorakrai K, Levovitz C, Peng C, Knight J, Bacchiocchi A, Su J, Yin MZ, Sznol M, Ariyan S, Clune J, Olino K, Parida L, Nikolaus J, Zhang ML, Zhao S, Wang Y, Huang G, Wan MJ, Li XA, Cao J, Yan Q, Chen X, Newman AM, Halaban R (2022). Feb 23. Integrative molecular and clinical profiling of acral melanoma links focal amplification of 22q11.21 to metastasis. *Nature Communications* 13(1). ARTN 89810.1038/s41467-022-28566-4.
55. Oiso N, Sakai K, Narita T, Yanagihara S, Nishio K, Kawada A (2018). Lymph node metastatic melanoma from ungual melanoma: Identification of somatic mutations in KIT and LZTR 1. *The Journal of Dermatology* 45(1): e5-e6.
56. Allanson BM, Weber MA, Jakkett LA, Chan C, Lau L, Ziegler DS, Warby M, Mayoh C, Cowley MJ, Tucker KM, Long GV, Maher A, Anazodo A, Scolyer RA (2018). Oct. Oral malignant gastrointestinal neuroectodermal tumour with junctional component mimicking mucosal melanoma. *Pathology* 50(6): 648-653. 10.1016/j.pathol.2018.07.002.
57. Lu JC, Chen L (2021). Sep 29. Molecular Profile of a Pituitary Rhabdomyosarcoma Arising From a Pituitary Macroadenoma: A Case Report. *Frontiers in Endocrinology* 12. ARTN 75236110.3389/fendo.2021.752361.
58. Song G, Zhang Y, Li H, Liu Z, Song W, Li R, Wei C, Wang T, Liu J, Liu X (2021). Identification of a Ubiquitin Related Genes Signature for Predicting Prognosis of Prostate Cancer. *Front Genet* 12: 778503. 10.3389/fgene.2021.778503.
59. Zhang W, Wang T, Wang Y, Zhu F, Shi H, Zhang J, Wang Z, Qu M, Zhang H, Wang T, Qian Y, Yang J, Gao X, Li J (2022). Feb. Intratumor heterogeneity and clonal evolution revealed in castration-resistant prostate cancer by longitudinal genomic analysis. *Transl Oncol* 16: 101311. 10.1016/j.tranon.2021.101311.
60. Farazi PA, DePinho RA (2006). Sep. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 6(9): 674-687. 10.1038/nrc1934.
61. Desai A, Prasad V (2021). Feb. Drug Approvals in Hepatocellular Carcinoma-Filling the Nonexistent Gap? *Jama Oncology* 7(2): 173-174. 10.1001/jamaoncol.2020.4811.
62. Villanueva A (2019). Apr 11. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med* 380(15):

- 1450-1462. 10.1056/NEJMra1713263.
63. Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KRM, Ozenberger BA, Ellrott K, Shmulevich I, Sander C, Stuart JM, Network CGAR (2013). Oct. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature Genetics* 45(10): 1113-1120. 10.1038/ng.2764.
 64. Yi T, Luo H, Qin F, Jiang Q, He S, Wang T, Su J, Song S, Qin X, Qin Y (2020). LncRNA LL22NC03-N14H11. 1 promoted hepatocellular carcinoma progression through activating MAPK pathway to induce mitochondrial fission. *Cell death & disease* 11(10): 832.
 65. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013). Nov. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8(11): 2281-2308. 10.1038/nprot.2013.143.
 66. Addgene: CRISPR Guide (2024) [online]. Available from: <https://www.addgene.org/guides/crispr/>. [Accessed 01 Haziran 2024].
 67. CRISPR gRNA Design Tool - Benchling (2023) [online]. Available from: <https://www.benchling.com/crispr>. [Accessed 02 Mart 2023].
 68. Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, Smith I, Tothova Z, Wilen C, Orchard R, Virgin HW, Listgarten J, Root DE (2016). Feb. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology* 34(2): 184-191. 10.1038/nbt.3437.
 69. den Dunnen JT, Dagleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE (2016). Jun. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* 37(6): 564-569. 10.1002/humu.22981.
 70. Brown J, Pirrung M, McCue LA (2017). Oct 1. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics* 33(19): 3137-3139. 10.1093/bioinformatics/btx373.
 71. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Kaller M (2016). Oct 1. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32(19): 3047-3048. 10.1093/bioinformatics/btw354.
 72. Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014). Aug 1. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114-2120. 10.1093/bioinformatics/btu170.

73. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018). Sep 1. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34(17): i884-i890. 10.1093/bioinformatics/bty560.
74. Ensembl veri tabanı (2024) [online]. Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index [Accessed 30 Mayıs 2024].
75. Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT, Salzberg SL (2016). Sep. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc* 11(9): 1650-1667. 10.1038/nprot.2016.095.
76. Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014). Apr 1. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30(7): 923-930. 10.1093/bioinformatics/btt656.
77. Love MI, Huber W, Anders S (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15(12). ARTN 55010.1186/s13059-014-0550-8.
78. Kucukural A, Yukselen O, Ozata DM, Moore MJ, Garber M (2019). Jan 5. DEBrowser: interactive differential expression analysis and visualization tool for count data. *BMC Genomics* 20(1): 6. 10.1186/s12864-018-5362-x.
79. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012). Aug. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40(15): e115. 10.1093/nar/gks596.
80. Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Dec. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-408. 10.1006/meth.2001.1262.
81. The Human Protein Atlas (2024) [online]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000099949-LZTR1> [Accessed 30 Mayıs 2024].
82. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N (2012). May. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2(5): 401-404. 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.
83. The Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) (2024) [online]. Available from: https://depmap.org/portal/cell_line/ACH-000625?tab=overview.
84. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciufu S, Haddad D, McVeigh R, Rajput B,

- Robbertse B, Smith-White B, Ako-Adjei D, Astashyn A, Badretdin A, Bao Y, Blinkova O, Brover V, Chetvernin V, Choi J, Cox E, Ermolaeva O, Farrell CM, Goldfarb T, Gupta T, Haft D, Hatcher E, Hlavina W, Joardar VS, Kodali VK, Li W, Maglott D, Masterson P, McGarvey KM, Murphy MR, O'Neill K, Pujar S, Rangwala SH, Rausch D, Riddick LD, Schoch C, Shkeda A, Storz SS, Sun H, Thibaud-Nissen F, Tolstoy I, Tully RE, Vatsan AR, Wallin C, Webb D, Wu W, Landrum MJ, Kimchi A, Tatusova T, DiCuccio M, Kitts P, Murphy TD, Pruitt KD (2016). Jan 4. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res* 44(D1): D733-745. 10.1093/nar/gkv1189.
85. Chi D, Zhang W, Jia Y, Cong D, Hu S (2019). May 1. Spalt-Like Transcription Factor 1 (SALL1) Gene Expression Inhibits Cell Proliferation and Cell Migration of Human Glioma Cells Through the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway. *Med Sci Monit Basic Res* 25: 128-138. 10.12659/MSMBR.915067.
 86. Liu LJ, Lv Z, Xue X, Xing ZY, Zhu F (2022). Nov 24. Canonical WNT Signaling Activated by WNT7B Contributes to L-HBs-Mediated Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma by Inhibiting Mitophagy. *Cancers (Basel)* 14(23). 10.3390/cancers14235781.
 87. Kirmizis A, Bartley SM, Kuzmichev A, Margueron R, Reinberg D, Green R, Farnham PJ (2004). Jul 1. Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev* 18(13): 1592-1605. 10.1101/gad.1200204.
 88. Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2002). Nov 15. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* 16(22): 2893-2905. 10.1101/gad.1035902.
 89. Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzerini Denchi E, Helin K (2004). Oct 13. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J* 23(20): 4061-4071. 10.1038/sj.emboj.7600402.
 90. Liu K, Wu X, Zang X, Huang Z, Lin Z, Tan W, Wu X, Hu W, Li B, Zhang L (2017). Sep 21. TRAF4 Regulates Migration, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition via PI3K/AKT Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Oncol Res* 25(8): 1329-1340. 10.3727/096504017X14876227286564.
 91. Han D, Liu G, Oh Y, Oh S, Yang S, Mandjikian L, Rani N, Almeida MC, Kosik KS,

- Jang J (2023). Feb 9. ZBTB12 is a molecular barrier to dedifferentiation in human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 14(1): 632. 10.1038/s41467-023-36178-9.
92. Asadnia A, Nazari E, Goshayeshi L, Zafari N, Moetamani-Ahmadi M, Goshayeshi L, Azari H, Pourali G, Khalili-Tanha G, Abbaszadegan MR, Khojasteh-Leylakoochi F, Bazyari M, Kahaei MS, Ghorbani E, Khazaei M, Hassanian SM, Gataa IS, Kiani MA, Peters GJ, Ferns GA, Batra J, Lam AK, Giovannetti E, Avan A (2023). Aug 28. The Prognostic Value of ASPHD1 and ZBTB12 in Colorectal Cancer: A Machine Learning-Based Integrated Bioinformatics Approach. *Cancers (Basel)* 15(17). 10.3390/cancers15174300.
 93. Liu H, Luo S, Sha X, Chen Z, Yang D (2023). Sep 1. Astragaloside IV inhibits pathological functions of gastric cancer-associated fibroblasts through regulation of the HOXA6/ZBTB12 axis. *Acta Pharm* 73(3): 423-439. 10.2478/acph-2023-0033.
 94. Zhang G, Wang X, Zhang Q (2023). Dec. Cdh11: Roles in different diseases and potential value in disease diagnosis and treatment. *Biochem Biophys Rep* 36: 101576. 10.1016/j.bbrep.2023.101576.
 95. Huang CF, Lira C, Chu K, Bilen MA, Lee YC, Ye X, Kim SM, Ortiz A, Wu FL, Logothetis CJ, Yu-Lee LY, Lin SH (2010). Jun 1. Cadherin-11 increases migration and invasion of prostate cancer cells and enhances their interaction with osteoblasts. *Cancer Res* 70(11): 4580-4589. 10.1158/0008-5472.CAN-09-3016.
 96. Pohlodek K, Tan YY, Singer CF, Gschwantler-Kaulich D (2016). Dec. Cadherin-11 expression is upregulated in invasive human breast cancer. *Oncol Lett* 12(6): 4393-4398. 10.3892/ol.2016.5236.
 97. Liu Y, Lei P, Samuel RZ, Kashyap AM, Groth T, Bshara W, Neelamegham S, Andreadis ST (2023). Oct. Cadherin-11 increases tumor cell proliferation and metastatic potential via Wnt pathway activation. *Mol Oncol* 17(10): 2056-2073. 10.1002/1878-0261.13507.
 98. Satriyo PB, Bamodu OA, Chen JH, Aryandono T, Haryana SM, Yeh CT, Chao TY (2019). Jan 27. Cadherin 11 Inhibition Downregulates beta-catenin, Deactivates the Canonical WNT Signalling Pathway and Suppresses the Cancer Stem Cell-Like Phenotype of Triple Negative Breast Cancer. *J Clin Med* 8(2). 10.3390/jcm8020148.
 99. Sebastian A, Martin KA, Peran I, Hum NR, Leon NF, Amiri B, Wilson SP, Coleman MA, Wheeler EK, Byers SW, Loots GG (2023). Loss of Cadherin-11 in pancreatic ductal adenocarcinoma alters tumor-immune microenvironment. *Front Oncol* 13:

1286861. 10.3389/fonc.2023.1286861.
100. Mita H, Katoh H, Komura D, Kakiuchi M, Abe H, Rokutan H, Yagi K, Nomura S, Ushiku T, Seto Y, Ishikawa S (2023). Feb. Aberrant Cadherin11 expression predicts distant metastasis of gastric cancer. *Pathol Res Pract* 242: 154294. 10.1016/j.prp.2022.154294.
 101. Chavula T, To S, Agarwal SK (2023). Cadherin-11 and Its Role in Tissue Fibrosis. *Cells Tissues Organs* 212(4): 293-303. 10.1159/000525359.
 102. Alieva IB, Shakhov AS, Dayal AA, Churkina AS, Parfenteva OI, Minin AA (2024). Apr. Unique Role of Vimentin in the Intermediate Filament Proteins Family. *Biochemistry (Mosc)* 89(4): 726-736. 10.1134/S0006297924040114.
 103. Tabatabaee A, Nafari B, Farhang A, Hariri A, Khosravi A, Zarrabi A, Mirian M (2024). Mar. Targeting vimentin: a multifaceted approach to combatting cancer metastasis and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 43(1): 363-377. 10.1007/s10555-023-10154-7.
 104. Thalla DG, Lautenschlager F (2023). Dec. Extracellular vimentin: Battle between the devil and the angel. *Curr Opin Cell Biol* 85: 102265. 10.1016/j.ceb.2023.102265.
 105. Richmond L, Keeshan K (2020). Oct. Pseudokinases: a tribble-edged sword. *FEBS J* 287(19): 4170-4182. 10.1111/febs.15096.
 106. Xiang D, Zhu X, Zhang Y, Zou J, Li J, Kong L, Zhang H (2021). May. Tribbles homolog 2 promotes hepatic fibrosis and hepatocarcinogenesis through phosphatase 1A-Mediated stabilization of yes-associated protein. *Liver Int* 41(5): 1131-1147. 10.1111/liv.14782.
 107. Wang Y, Yu FX (2024). May 17. Angiomotin family proteins in the Hippo signaling pathway. *Bioessays*: e2400076. 10.1002/bies.202400076.
 108. Xu G, Seng Z, Zhang M, Qu J (2021). Dec. Angiomotin-like 1 plays a tumor-promoting role in glioma by enhancing the activation of YAP1 signaling. *Environ Toxicol* 36(12): 2500-2511. 10.1002/tox.23363.
 109. Zhou Y, Zhang J, Li H, Huang T, Wong CC, Wu F, Wu M, Weng N, Liu L, Cheng ASL, Yu J, Wong N, Lo KW, Tang PMK, Kang W, To KF (2020). May. AMOTL1 enhances YAP1 stability and promotes YAP1-driven gastric oncogenesis. *Oncogene* 39(22): 4375-4389. 10.1038/s41388-020-1293-5.
 110. Wang H, Ye M, Jin X (2024). Jun. Role of angiomotin family members in human diseases (Review). *Exp Ther Med* 27(6): 258. 10.3892/etm.2024.12546.

111. Lee IS, Zhu Z, Lee J, Park JO, Wu X, Ong T, Li SM, Wang X, Chao J, Goel A (2022). Jan 3. A liquid biopsy signature predicts treatment response to fluoropyrimidine plus platinum therapy in patients with metastatic or unresectable gastric cancer: implications for precision oncology. *Mol Cancer* 21(1): 9. 10.1186/s12943-021-01483-8.
112. Liu P, Wang Z, Ou X, Wu P, Zhang Y, Wu S, Xiao X, Li Y, Ye F, Tang H (2022). Oct 12. The FUS/circEZH2/KLF5/ feedback loop contributes to CXCR4-induced liver metastasis of breast cancer by enhancing epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cancer* 21(1): 198. 10.1186/s12943-022-01653-2.
113. Zhang B, Li Y, Wu Q, Xie L, Barwick B, Fu C, Li X, Wu D, Xia S, Chen J, Qian WP, Yang L, Osunkoya AO, Boise L, Vertino PM, Zhao Y, Li M, Chen HR, Kowalski J, Kucuk O, Zhou W, Dong JT (2021). Mar 17. Acetylation of KLF5 maintains EMT and tumorigenicity to cause chemoresistant bone metastasis in prostate cancer. *Nat Commun* 12(1): 1714. 10.1038/s41467-021-21976-w.
114. Gao W, Lu YX, Wang F, Sun J, Bian JX, Wu HY (2019). Sep. miRNA-217 inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by regulating KLF5. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23(18): 7874-7883. 10.26355/eurrev_201909_18997.
115. Wang J, Chu Y, Xu M, Zhang X, Zhou Y, Xu M (2019). Feb. miR-21 promotes cell migration and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting KLF5. *Oncol Lett* 17(2): 2221-2227. 10.3892/ol.2018.9843.
116. Zhou Y, Li Y, Xu S, Lu J, Zhu Z, Chen S, Tan Y, He P, Xu J, Proud CG, Xie J, Shen K (2020). Mar 1. Eukaryotic elongation factor 2 kinase promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma via PI3K/Akt and STAT3. *Int J Cancer* 146(5): 1383-1395. 10.1002/ijc.32560.
117. An T, Dong T, Zhou H, Chen Y, Zhang J, Zhang Y, Li Z, Yang X (2019). Jan 1. The transcription factor Kruppel-like factor 5 promotes cell growth and metastasis via activating PI3K/AKT/Snail signaling in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 508(1): 159-168. 10.1016/j.bbrc.2018.11.084.
118. Pang J, Li Z, Wang G, Li N, Gao Y, Wang S (2019). Feb. miR-214-5p targets KLF5 and suppresses proliferation of human hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biochem* 120(2): 1850-1859. 10.1002/jcb.27498.
119. Liang H, Sun H, Yang J, Yi C (2018). Jun. miR-145-5p reduces proliferation and migration of hepatocellular carcinoma by targeting KLF5. *Mol Med Rep* 17(6):

- 8332-8338. 10.3892/mmr.2018.8880.
120. Maehara O, Sato F, Natsuizaka M, Asano A, Kubota Y, Itoh J, Tsunematsu S, Terashita K, Tsukuda Y, Nakai M, Sho T, Suda G, Morikawa K, Ogawa K, Chuma M, Nakagawa K, Ohnishi S, Komatsu Y, Whelan KA, Nakagawa H, Takeda H, Sakamoto N (2015). A pivotal role of Kruppel-like factor 5 in regulation of cancer stem-like cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 16(10): 1453-1461. 10.1080/15384047.2015.1070992.
 121. Zhou W, Yan K, Xi Q (2023). Dec 5. BMP signaling in cancer stemness and differentiation. *Cell Regen* 12(1): 37. 10.1186/s13619-023-00181-8.
 122. Bai Y, Cui G, Sun X, Wei M, Liu Y, Guo J, Yang Y (2024). Jun 3. ANGPTL4 Stabilizes Bone Morphogenetic Protein 7 Through Deubiquitination and Promotes HCC Proliferation via the SMAD/MAPK Pathway. *DNA Cell Biol*. 10.1089/dna.2024.0022.
 123. Wei S, Sun Y, Wang L, Zhang T, Hu W, Bao W, Mao L, Chen J, Li H, Wen Y, Chen Z (2021). Aug. Hyperoside suppresses BMP-7-dependent PI3K/AKT pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Ann Transl Med* 9(15): 1233. 10.21037/atm-21-2980.
 124. Li W, Cai HX, Ge XM, Li K, Xu WD, Shi WH (2013). Apr. Prognostic significance of BMP7 as an oncogene in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 34(2): 669-674. 10.1007/s13277-012-0594-x.
 125. Wang L, Ding Q, Zhao L, Pan Y, Song Z, Qin Y, Yan X (2018). Aug. Decreased BMP-7 and p-Smad1/5/8 expression, and increased levels of gremlin in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 16(2): 2113-2118. 10.3892/ol.2018.8918.
 126. Ji X, Jin S, Qu X, Li K, Wang H, He H, Guo F, Dong L (2015). Oct 26. Lysine-specific demethylase 5C promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through inhibition BMP7 expression. *BMC Cancer* 15: 801. 10.1186/s12885-015-1798-4.
 127. Luo Y, Huang K, Zheng J, Zhang J, Zhang L (2019). Mar 10. TGF-beta1 promotes cell migration in hepatocellular carcinoma by suppressing reelin expression. *Gene* 688: 19-25. 10.1016/j.gene.2018.11.033.
 128. Wang S, Liu D, Wei H, Hua Y, Shi G, Qiao J (2022). Feb. The hsa_circRNA_102049 mediates the sorafenib sensitivity of hepatocellular carcinoma cells by regulating Reelin gene expression. *Bioengineered* 13(2): 2272-2284. 10.1080/21655979.2021.2024332.

129. Okamura Y, Nomoto S, Kanda M, Hayashi M, Nishikawa Y, Fujii T, Sugimoto H, Takeda S, Nakao A (2011). Feb. Reduced expression of reelin (RELN) gene is associated with high recurrence rate of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 18(2): 572-579. 10.1245/s10434-010-1273-z.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Soner KARABULUT
Uyruğu :
Doğum Tarihi :
Telefon (İş) : -
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üni. Tıbbi Biyoloji ABD	-
Lisans	Karadeniz Teknik Üni. Biyoloji	2020
Lise	Güzelcan Kardeşler Lisesi	2015

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Proteomiks, Kanser Biyolojisi, Moleküler Biyoloji, Hücre Biyolojisi

YAYINLAR

1. **KARABULUT, S., & UZUNER, S. Ç.** (2020). A Preliminary Study: The Selective Effect of Bee Venom on Inhibition of Cell Migration in Metastatic Breast Cancer Cells Over Normal Cells in Comparison with Cisplatin. Journal of Apitherapy and Nature, 3(2), 87-98.

BİLDİRİLER

1. **Karabulut S., Yıldız G.** Noonan Sendromuyla İlişkili Homozigot LZTR1 p.I821T Amino Asit Değişiminin HEK293 Hücrelerinde Hidrojen Peroksit İle Apoptoz Tetiklenmesine Direnç Sağlayıcı Etkisi Ve Mekanizması. (Sözlü sunum, Türkçe) 25. Ulusal Biyoloji Kongresi. 13-15 Temmuz 2023. İzmir, TÜRKİYE.

2. **Karabulut S.**, Yıldız G. LZTR1 ve NUA2 proteinlerinin etkileşimi ve mitokondriyal apoptoz yolağı üzerindeki etkileri. (*Sözlü sunum, Türkçe*) (*Sözel bildiri dalında birincilik ödülü*) 18. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 26-29 Ekim 2023. Ankara, TÜRKİYE.

Ödüller

1. **Karabulut S.**, Yıldız G. LZTR1 ve NUA2 proteinlerinin etkileşimi ve mitokondriyal apoptoz yolağı üzerindeki etkileri. (*Sözlü sunum, Türkçe*) (*Sözel bildiri dalında birincilik ödülü*) 18. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. 26-29 Ekim 2023. Ankara, TÜRKİYE.

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

2022- Halen Biyoloji Derneğı

2023 – Halen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneğı

Kurslar

Deney Hayvanları Kullanımı Kursu, Karadeniz Teknik Üniversitesi, 2020.

