

Mesane gen regülasyonunda etkili süper-enhancer'ların belirlenmesi

Identification of the super-enhancers involved in bladder gene regulation

Serap ERKEK¹

ÖZET

Amaç: Gen ekspresyonunun düzgün bir şekilde gerçekleşmesinde hızlandırıcı (enhancer) adı verilen genomik bölgeler, transkripsiyon faktörlerini genlerin promotor bölgeleri ile bir araya getirir. Enhancer bölgeleri genomda histon H3 lizin 27 asetilasyon (H3K27ac) sinyaline sahip olmalarıyla tanımlanabilmektedir. Süper-enhancer'lar genomda yüksek H3K27ac sinyaline sahip birkaç enhancer bölgesinin kümelenmesiyle oluşan regülatör bölgelerdir. Süper-enhancer'ların hücre-spesifik gen ekspresyon profillerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, Roadmap Epigenom konsorsiyum kapsamında oluşturulan mesane dokusu H3K27ac kromatin immünopresipitasyon dizileme (ChIP-seq) verisinin analiz edilerek mesane dokusunu regüle eden süper-enhancer'ların tanımlanması ve bağlantılı oldukları genlerin ortaya çıkarılmasıdır.

Yöntem: Mesane H3K27ac ChIP-seq verisine Roadmap Epigenom veritabanından erişilmiştir. Veri Homer ChIP-seq analiz platformunda analiz edilmiştir. Süper-enhancer'lar Homer platformunda 'zirve bulma' fonksiyonunu (findPeaks) 'super' modunda kullanılarak belirlenmiştir. Belirlenen süper-enhancer'ların genlerle ilişkilendirilmesi Homer 'zirve bölge anlamlandırma'

ABSTRACT

Objective: Enhancer elements in the genome take a role in establishment of proper gene expression patterns via bringing transcription factors together with the promoter regions of the genes. Acetylation of lysine K27 on histone H3 (H3K27ac) marks the enhancer regions in the genome. Super-enhancers are regulatory regions which have unusual high signal of H3K27ac and consist of several enhancer elements. Super-enhancers play a critical role in setting of correct cell-type specific gene expression programs. The aim of this study is to identify the super-enhancers characterizing normal bladder and associate these super-enhancers with the genes via analyzing bladder H3K27ac chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) data generated within Roadmap Epigenomics Project.

Methods: Bladder H3K27ac ChIP-seq data was downloaded from Roadmap Epigenomics server. The data was analyzed on Homer ChIP-seq analysis platform. Super-enhancers were called using 'findPeaks' function of the platform in 'super' mode. The identified super-enhancers were associated with the genes using 'annotatePeaks' function of Homer

¹İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir



İletişim / Corresponding Author : Serap ERKEK

İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Dokuz Eylül Üni. Sağlık Yerleşkesi Balçova, İzmir - Türkiye

Tel : +90 546 845 23 57

E-posta / E-mail : serap.erkek@ibg.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 10.10.2018

Kabul Tarihi / Accepted : 17.04.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.81904

Erkek S. Mesane gen regülasyonunda etkili süper-enhancer'ların belirlenmesi.
Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 41-50

fonksiyonu (annotatePeaks) kullanılarak yapılmıştır. H3K27ac sinyalinin ve süper-enhancer bölgelerinin görsel olarak sunumu için UCSC GenomeBrowser altyapısından faydalanılmıştır. Süper-enhancer bağlantılı genlerin etkileşim ağlarını ve rol oynadıkları sinyal yollarını bulmak için STRING protein etkileşim veritabanı kullanılmıştır.

Bulgular: Mesane dokusunda 602 süper-enhancer belirlenmiştir. İlk en yüksek 100 H3K27ac sinyal değerine sahip olan süper-enhancer'lar aralarında *TBX3*, *RARA*, *RXRA*, *RASSF1*, *DAB2IP*'nin olduğu genlerle ilişkilendirilmiştir. Süper-enhancer-regüle olan (süper-enhancer'ın gen transkripsiyon başlangıç nokatasına uzaklığı max 10 kilobaz) genlerin (n=386) organ gelişimi, epitel hücre farklılaşması, retinoik asit metabolizmasında görev aldıkları belirlenmiştir. Aynı zamanda mesane süper-enhancer'ları ile ilişkili olan genlerin istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde (yanlış bulgu oranı = $1.49e-07$) transkripsiyon faktör görevini yapan protein grubunda yer aldığı ve etkileşim ağı oluşturdukları belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışmayla mesane dokusunu regüle eden süper-enhancer regülatör bölgeler ortaya çıkarılmıştır. İlişkili genlerin normal mesane yapısının korunmasındaki rolleri ve söz konusu genlerin mesane kanser mekanizmalarıyla bağlantıları göz önünde bulundurularak, elde edilen sonuçların mesane biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağladığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Transkripsiyon, mesane, histon, hızlandırıcı (enhancer)

platform. The visualization of H3K27ac ChIP-seq signal and identified super-enhancers was performed using UCSC GenomeBrowser. The protein-protein interaction networks of super-enhancer regulated genes and the pathways involved were determined using STRING protein interaction database.

Results: 602 super-enhancers was identified in bladder tissue. Among the genes which were associated with super-enhancers having the top 100 highest H3K27ac signal were *TBX3*, *RARA*, *RXRA*, *RASSF1*, *DAB2IP*. Super-enhancer regulated (max distance of the super-enhancer to transcriptional start site of gene is 10 kb) genes (n=386) were identified to be involved in organ development, epithelial cell differentiation, and retinoic acid metabolism. In addition, it was determined that transcription factors were significantly (False Discovery Rate (FDR) = $1.49e-07$) enriched among the genes regulated by super-enhancers and those genes had a significant protein-protein interaction.

Conclusion: With this study, the super-enhancers regulating normal bladder were determined. Given the fact that associated genes are involved in the maintenance of normal bladder homeostasis and the misregulation same set of genes take a role in bladder cancer, it is estimated that the results obtained with this study will largely contribute to a better understanding of bladder biology.

Key Words: Transcription, bladder, histone, enhancer

GİRİŞ

Transkripsiyonel regülasyon doğru gen ifade profillerinin oluşması ve hücrel farklılaşma ve büyümenin gerektiği şekilde olması için çok önemlidir. Gen ifadesi için genlerin promotor bölgesine bağlanan transkripsiyon faktörleri birincil olarak gerekli olmasına rağmen, sadece promotor bölgesi regülasyonu genlerin yeterli miktarda

ifade olması için yeterli değildir (1). Bu bağlamda, promotor bölgesi ile transkripsiyon için etkin diğer faktörleri bir araya getiren ve 'enhancer' olarak tanımlanan genomik bölgeler belirlenmiştir. İlk enhancer yaklaşık 35 yıl önce SV40 DNA'sında bir bölgenin Hela hücrelerinde β -globin ifadesini ciddi oranda artırmasıyla tanımlanmıştır (2). Bu çalışmayı

takiben farklı hücrelerde genlerin ifadesini regüle eden birçok enhancer belirlenmiştir. Enhancer genomik bölgeleri gen regülasyonu için önemli transkripsiyon faktör bağlanma alanlarına sahiptir (3). Fenotip/hastalık bağlantılı mutasyonların enhancer bölgelerinde bulunması da enhancer fonksiyonunun transkripsiyonel regülasyon için çok önemli olduğuna işaret etmektedir (1).

Geçtiğimiz son 20 yıldan günümüze uygulanmakta olan yeni nesil dizileme teknikleri genomda DNA düzeyinde meydana gelen değişiklikleri, gen ifade profillerini ve kromatin konfigürasyonunu yüksek çözünürlükte belirleme şansı yaratmıştır (4). Kromatin, DNA'nın histon proteinleri etrafına sarmalanmasıyla meydana gelen yapıdır ve histon proteinlerinin uç kısımlarında meydana gelen kimyasal değişiklikler genom regülasyonu için farklı mekanizmaların ortaya çıkmasına yön verir. Ortaya çıkan kromatin konfigürasyonu genotipin fenotipe yön verme şekli olarak tanımlanan epigenetik kontrol sistemini oluşturur (5). Kromatin izolasyonunu takiben belirli histon işaretlerine karşı antikolar kullanılarak gerçekleştirilen immüno-presipitasyon ve takiben yeni nesil dizileme (ChIP-seq), çeşitli hücrelerde ve doku türlerinde genomda histon işaretlerinin lokalize olduğu bölgeleri belirlemek için kullanılmıştır (6). Bu kapsamda özellikle 'DNA bölgelerinin ansiklopedisi' (The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE)) (7) ve 'Epigenomik Yol Haritası' (Roadmap Epigenomics) (8) gibi uluslararası konsorsiyumlar tarafından gerçekleştirilen çalışmalar ChIP-seq metodunu kullanarak 100'den fazla doku türü ve hücre hattının epigenetik haritasını çıkarmıştır. Bu anlamda histon H3 üzerindeki lizin 27'nin asetilasyonu (H3K27ac), genomda aktif enhancer bölgelerini tanımlamak için yaygın olarak kullanılmıştır (7, 9, 10).

Enhancer bölgelerinin özellikle H3K27ac ChIP-seq yöntemiyle tanımlanmasından sonra enhancer'ların fonksiyonlarını ve etkilerini sınıflandırmak için çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir (1). Enhancer'ların sınıflandırılmasıyla göze çarpan en önemli gruplardan

biri süper-enhancer'lardır. Süper-enhancer H3K27ac sinyalinin ve transkripsiyon faktör motiflerinin çok yoğun olarak bulunduğu birkaç alt enhancer bölgesinin kümelenmesiyle bir araya gelen regülatör bölge olarak tanımlanmaktadır (11). Süper-enhancer'ların fonksiyonu ile ilgili en önemli özelliklerden biri her hücre/doku türü için belirlenen süper-enhancer'ların hücre kökeni-spesifik transkripsiyon faktörlerin bağlanma bölgelerini barındırmalarıdır (3). Örneğin embriyonik kök hücrelerde belirlenen süper-enhancer'lar pluripotent hücreleri regüle eden transkripsiyon faktörleriyle ilişkilendirilmiştir. Yine çeşitli kanser türleri için belirlenen süper-enhancer'ların onkojenlerin regülasyonu ile bağlantıları gösterilmiştir (9, 10, 12).

Günümüze kadar embriyonik kök hücrelerde ve kanser hücre hatlarında rol oynayan süper-enhancer'lar tanımlanmışken sağlıklı dokularda süper-enhancer tanımları büyük ölçüde yapılmamıştır. Bu çalışmanın amacı mesane dokusunu regüle eden süper-enhancer'ları tanımlamaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mesane H3K27ac ChIP-seq verisinin temini

Roadmap Epigenomics konsorsiyum çalışması (8) ile oluşturulan mesane H3K27ac ChIP-seq verisi bed formatında 'http://www.genboree.org/EdaccData/Current-Release/sample-experiment/Bladder/Histone_H3K27ac/' (01.09.18) adresinden temin edilmiştir.

Süper-enhancer'ların belirlenmesi

Mesane süper-enhancer'ları tanımlamak için Homer ChIP-seq analiz platformu (13) kullanılmıştır. İlk olarak platformla birlikte sağlanan 'makeTagDirectory' programı kullanılarak mesane H3K27ac ChIP-seq verisi süper-enhancer tanımlamada kullanılmak için hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan veri yine Homer platformuyla sağlanan 'findPeaks' algoritmasıyla (parametreler: - style super - L 1)

kullanılarak mesane dokusundaki süper-enhancer'lar belirlenmiştir. Bütün enhancer'lar (H3K27ac zirve bölgeleri) arasında süper-enhancer'ları grafiksel olarak göstermek amacıyla, bütün zirve bölgeleri 'findPeaks' algoritmasında 'style super -superSlope -1000 -L 1' parametreleri kullanılarak bulunmuştur.

Süper-enhancer grafiğinin çizimi

'findPeaks' algoritması ile ortaya çıkarılan zirve bölgelerinin sinyal değerleri R programlama dili (<https://www.r-project.org/> (10.09.18)) kullanılarak sıralamaya konulmuş ve 'plot' fonksiyonu ile grafik çizilmiştir. Grafik üzerinde 'süper-enhancer' kategorisinde olan zirve bölgeleri 'kırmızı' olarak işaretlenmiştir.

Örnek H3K27ac sinyalinin gösterimi

Mesane H3K27ac verisi wig formatında 'http://www.genboree.org/EdaccData/Current-Release/sample-experiment/Bladder/Histone_H3K27ac/' (01.09.18) adresinden temin edilmiştir. Wig formatındaki H3K27ac verisi ve süper-enhancer koordinatlarını gösteren 'bed' dosyası UCSC GenomeBrowser'a (14) yüklenmiş ve örnek grafikler ortaya çıkarılmıştır.

Süper-enhancer bağlantılı genler

Süper-enhancer'ların regüle ettikleri genleri belirlemek amacıyla Homer platformunda sağlanan 'annotatePeaks.pl' programı kullanılmıştır. Program kullanımı sonrasında ortaya her süper-enhancer'ın en yakın olduğu transkripsiyon başlangıç koordinatı (TBN), ve TBN'nin ilişkili olduğu geni gösteren bir tablo çıkmaktadır. Bu çalışmada, TBN bölgesi süper-enhancer'lara ± 10 kilobaz uzaklığında olan genler (n= 386), sinyal yolağı ve protein-protein etkileşim analizlerinde kullanılmıştır.

Protein etkileşim ve sinyal yolak analizi

Süper-enhancer-regüle genlerin etkileşim ağlarını ortaya çıkarmak amacıyla STRING protein etkileşim veritabanında (<https://string-db.org/> (18.09.18)) (15) 'Multiple proteins' opsiyonu kullanılmıştır. Ağ

haritasını çıkarmak için aşağıdaki parametreler kullanılmıştır.

Etkileşim kaynağı: Literatür bilgisi, deneysel veri, veritabanı bilgisi, ko-ekspresyon, yakınlık/çevre (neighborhood), gen füzyon, birlikte-gerçekleşme (co-occurrence).

Minimum etkileşim puanı: 0,7 (yüksek güvenilirlikle)

Etkileşim ağ kümelenmesi: kmeans kümelenmesi, küme sayısı = 10.

Etkileşim ağ haritası ortaya çıkarılırken, bağlantısız nodlar çıkarılmıştır.

İstatistiksel analizler

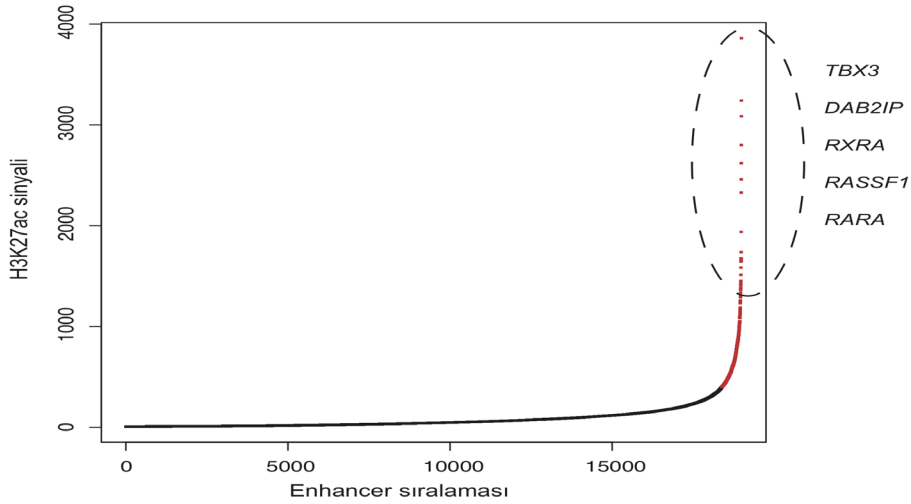
Süper-enhancer'ların belirlenmesi için kullanılan Homer platformuyla sağlanan 'findPeaks' algoritmasında Poisson dağılışa uygunluk testi uygulanmış olup yanlış bulgu oranının (False Discovery Rate, FDR) 0,001'den küçük olması esas alınmıştır. STRING veritabanı ile gerçekleştirilen sinyal yolak analizinde Hipergeometric test uygulanmış olup, p değerleri Benjamini and Hochberg metoduyla multiple testing için düzeltilip FDR değerleri hesaplanmıştır. Bu analizde FDR değerinin 0,05'den küçük olması esas alınmıştır.

BULGULAR

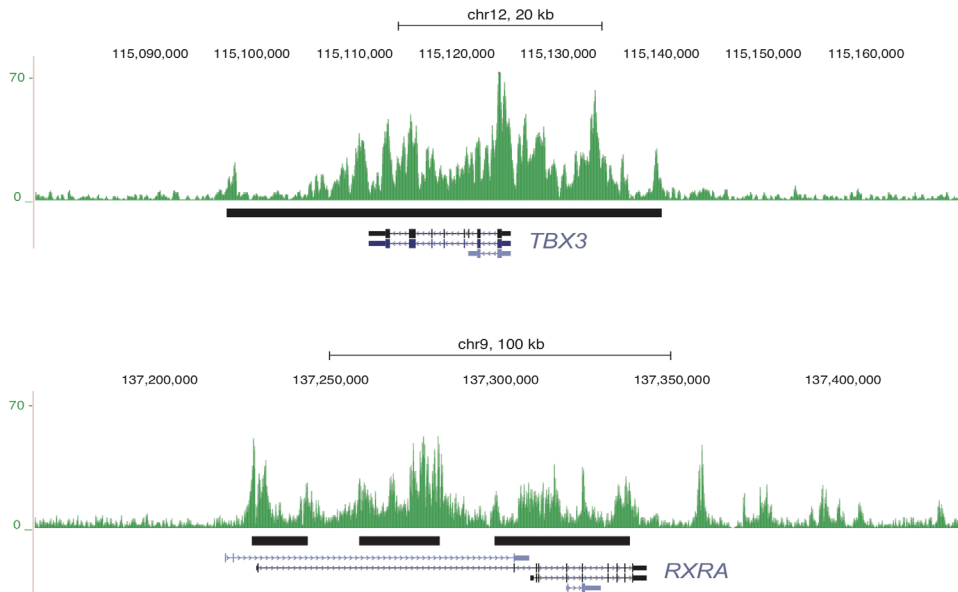
Mesane dokusunda süper-enhancer'lar

Roadmap Epigenom projesinde oluşturulan H3K27ac CHIP-seq verisi kullanılarak H3K27ac-zirve bölgelerinin belirlenmesini takiben mesane dokusunu regüle eden 602 süper-enhancer bulunmuştur (Şekil 1). Şekil 1'de verilen grafiğe göre en yüksek 100 H3K27ac sinyal değerine sahip süper-enhancer'lar ile ilişkilendirilen genler arasında *TBX3*, *RARA*, *RXRA*, *RASSF1*, *DAB2IP* genleri belirlenmiştir. Bu genlerden bazıları için örnek H3K27ac sinyal durumunun gösterimi de Şekil 2'de sunulmuştur.

HPV DNA pozitif bulunan örneklerin içinde 73 (% 32,3) hastada tek başına HPV tip 16 saptanırken 37

Şekil 1. Mesane süper-enhancer'ları*

*Şekil mesane dokusu için bulunan bütün H3K27ac zirve bölgelerinin (enhancer) H3K27ac sinyaline göre sıralanmasını göstermektedir. Homer algoritmasıyla 'süper-enhancer' olarak kalifiye olan enhancer'lar kırmızı olarak gösterilmiştir. İlk 100 en yüksek H3K27ac sinyal değerine sahip süper-enhancer'lar ile ilişkilendirilmiş genlerden bazıları grafiğin yanında gösterilmiştir.

Şekil 1. Mesane süper-enhancer'ları

* Şekil *TBX3* (yukarı panel) ve *RXRA* (aşağı panel) genleri etrafındaki H3K27ac sinyalini (yeşil renk) göstermektedir. H3K27ac sinyalinin altındaki siyah dikdörtgen kutular ise belirlenen süper-enhancer'ların yerini göstermektedir. Şekil, veri UCSC GenomeBrowser websayfasına yüklenerek oluşturulmuştur.

Şekil 2. Süper-enhancer'lar için örnek H3K27ac sinyal dağılımları

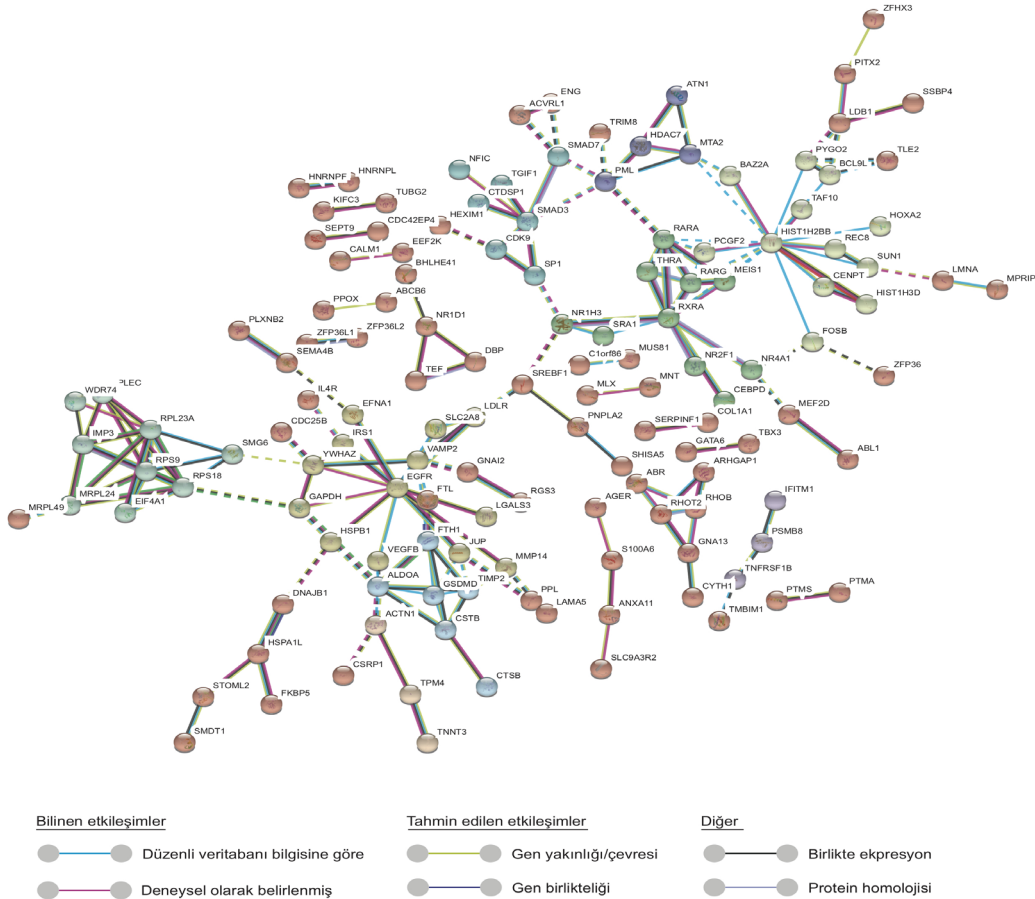
(%16,3) hastada multipl tipler ve 116 (%51,3) hastada da diğer tipler bulunmuştur (Tablo 1). Multipl HPV DNA saptanan hastaların tümünde yüksek riskli HPV DNA tiplerinin en az birinin de yer aldığı görülmüştür.

Süper-enhancer regüle genler

Bulunan süper-enhancer'lar genlerin transkripsiyon başlangıç noktalarına (TBN) yakınlık durumlarına göre filtrelendiğinde, genlerin TBN'lerine maksimum 10 kilobaz uzaklığında olan 386 gen bulunmuştur. Bu genler için protein-protein etkileşim haritası çıkarıldığında, etkileşimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (STRING veritabanının

rapor ettiği protein-protein etkileşim hipergeometrik test p-value: 2,59e-06) (Şekil 3).

Bu genlerin birçoğunun transkripsiyon faktör sınıfında olduğu (n=62, Gen Ontoloji terimi 'GO:0003700' zenginleşme yanlış pozitiflik oranı (False Discovery Rate (FDR))= 1,49e-07) bulunmuştur (Tablo 1). Söz konusu transkripsiyon faktörlerinin renal sistem gelişmesi (örneğin *SMAD7* (16), *ID3* (17)), retinoid asit metabolizması (örneğin *RARA* (18), *RXRA* (19)), epitel hücre farklılaşması (örneğin *PITX2* (20), *GATA6* (21)) gibi sinyal yollarında görev aldığı belirlenmiştir (FDR < 0,05).



* Şekil STRING protein veritabanı kullanılarak ortaya çıkarılan mesane dokusunda süper-enhancer'lar ile ilişkilendirilmiş genlerin etkileşim ağı haritasını göstermektedir. Etkileşimde kullanılan çizgilerin renklerine ilişkin açıklama şeklin altındaki gösterdede sunulmuştur. Katı çizgiler proteinler arasındaki doğrudan etkileşimleri temsil ederken kesik çizgiler proteinler arasındaki dolaylı etkileşimleri göstermektedir.

Şekil 3. Süper-enhancer ile ilişkilendirilen genlerin protein-protein etkileşim ağı

Tablo 1. Mesane Süper-enhancer'ları ile ilişkilendirilmiş transkripsiyon faktörleri

| | | | | |
|---------|-------|-------|---------|---------|
| AKNA | FOSB | NFIC | SP1 | ZFP36L2 |
| ARID3A | GATA6 | NR1D1 | SREBF1 | ZNF580 |
| ARID5B | GLIS2 | NR1H3 | SSBP4 | |
| ATO8 | HOXA2 | NR2F1 | TBX2 | |
| BCL3 | ID1 | NR2F2 | TBX3 | |
| BCL6 | ID3 | NR4A1 | TEAD3 | |
| BCL6B | KLF13 | PCGF2 | TEF | |
| BHLHE41 | KLF16 | PITX2 | TGIF1 | |
| CEBPD | KLF6 | RAI1 | THRA | |
| CENPT | KLF9 | RARA | VEZF1 | |
| CIC | MEF2D | RARG | ZBTB38 | |
| CREB3L4 | MEIS1 | RXRA | ZBTB7A | |
| CSRNP1 | MLX | SMAD3 | ZC3H4 | |
| DBP | MNT | SMAD7 | ZFH3 | |
| ELF4 | MTA2 | SOX13 | ZFP36L1 | |

TARTIŞMA

Bu çalışmada Roadmap Epigenom konsorsiyum çalışması (8) kapsamında oluşturulan H3K27ac ChIP-seq verisi kullanılarak, mesane dokusunun regülasyonunda etmen süper-enhancer'lar belirlenmiştir. Belirlenen süper-enhancer sayısı (n=602), daha önceki çalışmalarda bulunan süper-enhancer sayıları ile aynı aralıktadır (multipl miyelom hücreleri: n=308 (22), atipik teratoid rhabdoid tümör: n=894 (9), medulloblastom alt grupları: n=600-1100 (10)).

Mesanedeki en yüksek H3K27ac sinyaline sahip süper-enhancer'lar ile ilişkilendirilen genler mesane gelişimi ve mesane kanser bağlantılarının anlaşılması açısından önemli bilgiler taşımaktadır. *TBX3*, omurgalılarda organ gelişiminde rol oynayan transkripsiyon faktörlerinden biridir (23) ve *TBX3*'ün gen ekspresyonu yetişkin mesane ürotelyumunda gösterilmiştir (24). *TBX3*'ün metile olup eksprese olmadığı mesane kanseri tümörlerinde progresyon

olmadan sağkalımın istatistiksel olarak çok daha az olduğu gösterilmiştir (25). *RARA* ve *RXRA* genlerinin de mesanede süper-enhancer bağlantılı olduğunun bulunması önemlidir. Retinoik asit, retinoik asit reseptör (*RARA*) ve retinoik asit reseptör X dimer yapısına bağlanarak retinoik asit-cevap bölgesine sahip genleri regüle etmektedir (26). Retinoik asit sinyal mekanizmalarının normal mesane epitel dokusunun kararlı-halde (steady-state) korunması için gerekli olduğu gösterilmiştir (27). Retinoik asit sinyal mekanizmalarında meydana gelen bozukluklar mesane kanser gelişiminin ortaya çıkmasıyla da ilişkilendirilmiştir (28). Ölümsüzleştirilmiş ürotelyum hücre hatlarında *RARA* geninde mutasyon olduğu saptanmıştır (29). Diğer bir çalışmada; *RARB* transkript seviyelerinin mesane kanserinde azaldığı gösterilmiştir (30). Başka bir çalışmada ise dört farklı mesane kanseri hücre hattının retinoid türevleriyle ve interferon ile muamele edilmesinin, mesane kanser hücre hatlarındaki proliferasyonu yavaşlattığını göstermiştir (31). *RASSF1* Ras efektör

grup ailesine ait olup birçok kanserde genomik delesyon ya da yanlış regülasyon sonucu yeteri kadar ifade olamayan bir tümör baskılayıcı bir gendir (32). *RASSF1* gen ekspresyonundaki azalmanın normal mesaneden tümörejenik mesaneye geçişte önemli bir prognostik faktör olduğu (33) ve mesane kanserinde *RASSF1* promotor bölge metilasyonunun mesane kanserinin derecelendirilmesi ve gidişatı açısından belirleyici olduğu gösterilmiştir (34). Bu anlamda, bu çalışmada *RASSF1* geninin süper-enhancer regülasyonu ile ilişkilendirilmesi mesane dokusunun normal yapısının korunmasında *RASSF1* geninin rolüne işaret etmektedir. RAS GTP-ase aktive eden protein ailesine ait olan *DAB2IP* geninin de mesane kanserinde az eksprese olması prognostik bir faktör olarak görülmektedir. *DAB2IP* gen ifade seviyesinin düşük olması mesane kanserinde yüksek patolojik evre ve derecesiyle korelasyon göstermektedir (35). Ayrıca, *DAB2IP* gen ekspresyonunun kaybolması daha kötü nüksüz sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir (36). Bu bilgiler doğrultusunda *DAB2IP* geninin de süper-enhancer bağlantılı regülasyonu, bu genin normal mesane gen ifade ağ regülasyonunda çok önemli olduğunu göstermektedir.

Daha önceden yapılan çalışmalarda, süper-enhancer-regüle olan genlerin büyük oranda transkripsiyon faktörlerden oluştuğu belirlenmiştir.

Örneğin, embryonik kök hücre için belirlenen süper-enhancer'lar embryonik kök hücre kimliğini belirleyen pluripotent özellik belirleyici transkripsiyon faktörleri (*Oct4*, *Nanog*, *Sox2*) ile ilişkilendirilmiştir (11). Ayrıca, pediatrik beyin tümörlerinin alt gruplarını karakterize eden süper-enhancer'ların da onkogenik özellik taşıyan transkripsiyon faktörlerinin (örneğin *MYC*, *OTX2*, *GLI2*) ekspresyonunu regüle ettiği gösterilmiştir (9, 10). Bu çalışmada, süper-enhancer ile ilişkilendirilen genlerin istatistiksel olarak anlamlı büyük oranda transkripsiyon faktörlerden oluşması, belirlenen transkripsiyon faktörlerin epitel hücre farklılaşması, organ gelişimi, retinoik asit metabolizmasındaki rolleri (16-21) ve söz konusu genler için istatistiksel olarak anlamlı etkileşimlerin bulunması mesane dokusunda da temel regülasyon ağlarının ortaya çıkmasında süper-enhancer'ların rolüne işaret etmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmayla belirlenen mesane süper-enhancer'ları, mesane dokusunu düzenleyen temel regülatör bölgeleri tanımlamış, ilişkili oldukları genlerin ve etkileşim ağlarını belirlemiştir. Elde edilen sonuçların normal mesane biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına mesane kanserine yol açan moleküler mekanizmaların keşfedilmesine ve deneylerin tasarlanmasına yön vereceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Niederriter AR, Varshney A, Parker SC, Martin DM. Super Enhancers in Cancers, Complex Disease, and Developmental Disorders. *Genes (Basel)*. 2015;6(4):1183-200.
2. Banerji J, Rusconi S, Schaffner W. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 1981;27(2 Pt 1):299-308.
3. Pott S, Lieb JD. What are super-enhancers? *Nat Genet*. 2015;47(1):8-12.
4. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, 2017;550(7676):345-53.
5. Morange M. The relations between genetics and epigenetics: a historical point of view. *Ann N Y Acad Sci*, 2002;981:50-60.
6. Milne TA, Zhao K, Hess JL. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) for analysis of histone modifications and chromatin-associated proteins. *Methods Mol Biol*, 2009;538:409-23.
7. Consortium EP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57-74.
8. Roadmap Epigenomics C, Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*, 2015;518(7539):317-30.
9. Johann PD, Erkek S, Zapatka M, Kerl K, Buchhalter I, Hovestadt V, et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumors are comprised of three epigenetic subgroups with distinct enhancer landscapes. *cancer cell*, 2016;29(3):379-93.
10. Lin CY, Erkek S, Tong Y, Yin L, Federation AJ, Zapatka M, et al. Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins. *Nature*, 2016;530(7588):57-62.
11. Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, et al. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*, 2013;153(2):307-19.
12. Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-Andre V, Sigova AA, et al. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell*, 2013;155(4):934-47.
13. Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, et al. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell*, 2010;38(4):576-89.
14. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*, 2002;12(6):996-1006.
15. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*, 2015;43(Database issue):D447-52.
16. Lan HY, Chung AC. TGF- β /Smad signaling in kidney disease. *Semin Nephrol*, 2012; 32(3):236-43.
17. Nackiewicz D, Dey P, Szczerba B, Mohammad S, Kaplan JL, McNamara CA, Deshmukh US, Bagavant H. Inhibitor of differentiation 3, a transcription factor, regulates hyperlipidemia-associated kidney disease. *Nephron Exp Nephrol*, 2014; 126(3):141-7.
18. Mendelsohn C, Batourina E, Fung S, Gilbert T, Dodd J. Stromal cells mediate retinoid-dependent functions essential for renal development. *Development*, 1999;126(6):1139-48.
19. Thiagarajan RD, Georgas KM, Rumballe BA, Lesieur E, Chiu HS, Taylor D, et al. Identification of anchor genes during kidney development defines ontological relationships, molecular subcompartments and regulatory pathways. *PLoS One*, 2011;6(2):e17286.

20. Sharp T, Wang J, Li X, Cao H, Gao S, Moreno M, et al. A pituitary homeobox 2 (Pitx2):microRNA-200a-3p:beta-catenin pathway converts mesenchymal cells to amelogenin-expressing dental epithelial cells. *J Biol Chem*, 2014;289(39):27327-41.
21. Keijzer R, van Tuyl M, Meijers C, Post M, Tibboel D, Grosveld F, et al. The transcription factor GATA6 is essential for branching morphogenesis and epithelial cell differentiation during fetal pulmonary development. *Development*, 2001;128(4):503-11.
22. Loven J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, et al. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*, 2013;153(2):320-34.
23. Kispert A. T-box genes in the kidney and urinary tract. *Curr Top Dev Biol*, 2017;122:245-78.
24. Ito A, Asamoto M, Hokaiwado N, Takahashi S, Shirai T. Tbx3 expression is related to apoptosis and cell proliferation in rat bladder both hyperplastic epithelial cells and carcinoma cells. *Cancer Lett.*,2005;219(1):105-12.
25. Beukers W, Kandimalla R, Masius RG, Vermeij M, Kranse R, van Leenders GJ, et al. Stratification based on methylation of TBX2 and TBX3 into three molecular grades predicts progression in patients with pTa-bladder cancer. *Mod Pathol*, 2015;28(4):515-22.
26. Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res*, 2002;43(11):1773-808.
27. Wang C, Ross WT, Mysorekar IU. Urothelial generation and regeneration in development, injury, and cancer. *Dev Dyn*, 2017;246(4):336-43.
28. DeGraff DJ, Cates JM, Mauney JR, Clark PE, Matusik RJ, Adam RM. When urothelial differentiation pathways go wrong: implications for bladder cancer development and progression. *Urol Oncol*, 2013;31(6):802-11.
29. Hurst RE, Waliszewski P, Waliszewska M, Bonner RB, Benbrook DM, Dar A, et al. Complexity, retinoid-responsive gene networks, and bladder carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 1999;462:449-67.
30. Zou C, Liebert M, Zou C, Grossman HB, Lotan R. Identification of effective retinoids for inhibiting growth and inducing apoptosis in bladder cancer cells. *J Urol*, 2001;165(3):986-92.
31. Zou C, Ramakumar S, Qian L, Zou C, Zang R, Wang J, et al. Effect of retinoic acid and interferon alpha-2a on transitional cell carcinoma of bladder. *J Urol*. 2005;173(1):247-51.
32. Allen NP, Donniger H, Vos MD, Eckfeld K, Hesson L, Gordon L, et al. RASSF6 is a novel member of the RASSF family of tumor suppressors. *Oncogene*, 2007;26(42):6203-11.
33. Ha YS, Jeong P, Kim JS, Kwon WA, Kim IY, Yun SJ, et al. Tumorigenic and prognostic significance of RASSF1A expression in low-grade (WHO grade 1 and grade 2) nonmuscle-invasive bladder cancer. *Urology*, 2012;79(6):1411 e1-6.
34. Gao T, Wang S, He B, Pan Y, Song G, Gu L, et al. The association of RAS association domain family Protein1A (RASSF1A) methylation states and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2012;7(11):e48300.
35. Shen YJ, Kong ZL, Wan FN, Wang HK, Bian XJ, Gan HL, et al. Downregulation of DAB2IP results in cell proliferation and invasion and contributes to unfavorable outcomes in bladder cancer. *Cancer Sci*, 2014;105(6):704-12.
36. Jou YC, Tsai YS, Chen SY, Hsieh HY, Tsai HT, Tzai TS. Loss of DAB2IP expression in human urothelial carcinoma is associated with poorer recurrence-free survival. *Virchows Arch*, 2016;468(6):733-40.