

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Hepatokarsinogenez Sürecinde CULLIN2 Gen
Ekspresyonu ve Aktivasyonunun Rolünün
Hepatoselüler Karsinom Hücre Dizilerinde
İncelenmesi**

BURÇİN BARAN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970091

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Hepatokarsinogenez Sürecinde CULLIN2 Gen
Ekspresyonu ve Aktivasyonunun Rolünün
Hepatoselüler Karsinom Hücre Dizilerinde
İncelenmesi**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

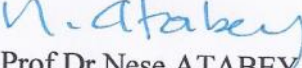
BURÇİN BARAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Neşe Atabey

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2012.KB.SAG.084 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970091

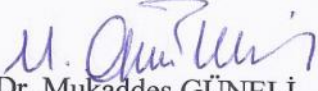
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans programı
2010970091 numaralı öğrencisi Burçin Baran '**Hepatokarsinogenez Sürecinde
CULLIN2 Gen Ekspresyonu ve Aktivasyonunun Rolünün Hepatoselüler
Karsinom Hücre Dizilerinde İncelenmesi**' konulu Yüksek Lisans tezini
14.08.2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. Neşe ATABEY

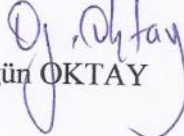
BAŞKAN


Prof. Dr. Meral SAKIZLI

ÜYE


Prof. Dr. Mukaddes GÜNELİ
GÜMÜŞTEKİN

ÜYE


Prof. Dr. Gülgün OKTAY

ÜYE


Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN
YAZICIOĞLU

ÜYE

Doç. Dr. Sefa KIZILDAĞ
YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Nergis Murat
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ	vi
ŞEKİL DİZİNİ	vii
KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR	xiii
ÖZET	14
ABSTRACT	16
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	18
2.GENEL BİLGİLER.....	20
2.1 Hepatosellüler Karsinoma	20
2.2 HCC Oluşumu	21
2.3 HCC Oluşumunda Rol Alan Sinyal Yolakları.....	24
2.4 HIF1 ve Hepatokarsinogenez	33
2.5 Ubikutin E3 Ligazlar	36
2.6 CULLIN E3 Ligazlar.....	39
2.7 Ub E3 Ligazların Aktivasyonu.....	40
2.8 Cullin2 E3 Ligaz ve Rolü	42
3.0 GEREÇ ve YÖNTEM	46
3.1 Araştırmanın Tipi	46
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı	46
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	46
3.4 Çalışma Materyali	46
3.5 Araştırmanın Değişkenleri	46
3.6 Veri Toplama Araçları.....	46
3.7 Araştırma Planı.....	59
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi.....	60

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları	60
3.10 Etik Kurul Onayı	60
4.0 BULGULAR	61
4.1 HCC Hücrelerinde CUL2 Ekspresyonu	61
4.2 Heparin ve HGF'ye Bağlı CUL2 Gen Ekspresyonunun Değişimi	63
4.3 Heparin Uygulamasının Doza Bağlı Olarak CUL2 Ekspresyonuna Etkisi	65
4.4 Heparin Uygulamasının Zamana Bağlı Olarak CUL2 Ekspresyonuna Etkisi	67
4.5 HGF Uygulamasının Zamana Bağlı Olarak CUL2 Ekspresyonuna Etkisi	68
4.6 H ₂ O ₂ 'nin CUL2 Ekspresyonuna Etkisi	69
4.7 CoCl ₂ Uygulamasının SK-Hep1 Hücre Dizisinde Hücre Canlılığına Etkisi	70
4.8 CoCl ₂ Uygulamasının HuH7 Hücre Dizisinde Hücre Canlılığına Etkisi	74
4.9 CoCl ₂ Uygulamasının Farklı HCC Hücre Dizilerinde CUL2 Ekspresyonuna Etkisi	78
4.10 CoCl ₂ Uygulamasının CUL2 Transkripsiyonuna Etkisi	84
5.0 TARTIŞMA	86
6.0 SONUÇ ve ÖNERİLER	90
REFERANSLAR	92

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Cullin2 Primerleri.....	51
Tablo 2. CUL2 RT-PCR’da Reaksiyon Koşulları	51
Tablo 3 CUL2 PCR Reaksiyonu.....	52
Tablo 4 GADPH Primerleri	52
Tablo 5 GADPH RT-PCR Reaksiyon Koşulları.....	52
Tablo 6 GADPH PCR Reaksiyonu	53
Tablo 7 BSA Standard Eğri için Kontrollerin Hazırlanması Tablosu	54
Tablo 8 %8lik SDS-PAGE Jelin Hazırlanışı	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Hepatosellüler Kanseri Gelişimi	20
Şekil 2 Hepatik Sinuzoidlerin Yapısı	22
Şekil 3 Karaciğer Hasarının Evreleri	23
Şekil 4 Siroz Sonucunda Karaciğerin Yeniden Modellenmesi Sırasında Meydana Gelen Değişiklikler	24
Şekil 5 İnaktif ve Aktif Wnt/ β -catenin Yolaklarının Şematize Gösterimi	25
Şekil 6 Fibrojeniz Gözlenen ve Gözlenmeyen HCC'deki Sinyal Yolakları Arasındaki Farklılıklar ..	26
Şekil 7 IGFR Sinyal Yolağı	27
Şekil 8 TGF- β Sinyal Yolağı ve Diğer Yolaklarla İlişkisi	28
Şekil 9 c-Met reseptörü ve Domainleri	29
Şekil 10 c-Met reseptörü Aktivasyonu ve Alt Sinyal Yolakları.....	30
Şekil 11 c-Met reseptörü ve Yüzeydeki Diğer Reseptörlerle Etkileşimi	32
Şekil 12 HIF1- α 'nın Regülasyonu	34
Şekil 13 HIF1'in Kanseri Gelişimi Üzerine Etkisi.....	36
Şekil 14 Ubikutin-Proteazom Yolağı	37
Şekil 15 Ubikutin E3 Ligazların İşleyişleri: HECT Tipi E3 Ligazlar(I), RING Tipi E3 Ligazlar(II), RING Tipinden Olan Cullin E3 Ligazlar(III)	39
Şekil 16 Cullin E3 Ligazlar	39
Şekil 17 Cullinlerdeki Neddilenme Bölgeleri ve Korunmuş Kısımdaki Nedd8'in Bağlandığı Lizin Aminoasiti	41
Şekil 18 Neddilenme Cullin'i İki Şekilde Aktifleştirir. Birinci Cullin'de Konformasyonel Değişiklikleri Uyararak(A), İkincisi CAND1 İnhibitör Proteinini Uzaklaştırarak(B)	42
Şekil 19 CUL2 Proteinini.....	43
Şekil 20 HIF1 α 'nın Cul-2 E3 Ligaz Tarafından Yıkıma Gönderilmesi	43
Şekil 21 Hemositometre ve Hücre Sayım Alanı	48

Şekil 22 Western Blotun Jel Elektroforez Aşamasının Şematize Gösterimi.....	56
Şekil 23 Western Blotta Transfer Kasetinin Hazırlanışı	57
Şekil 24 Western Blot Transfer Aşamasının Şematize Gösterimi	57
Şekil 25 MTT Yöntemi	58
Şekil 26 HCC Hücrelerinde Bazal Düzeyde CUL2 Ekspresyonu.....	61
Şekil 27 HGF ve Heparine Bağlı CUL2 Gen Ekspresyonu Değişimi.....	63
Şekil 28 Heparin Doza Bağlı CUL2 Üzerine Etkisi.....	65
Şekil 29 Heparinin Zamana Bağlı CUL2 Ekspresyonuna Etkisi	67
Şekil 30 HGF'nin Zamana Bağlı CUL2 Ekspresyonuna Etkisi	68
Şekil 31 H ₂ O ₂ 'nin Doza Bağlı CUL2 Ekspresyonuna Etkisi	69
Şekil 32 Farklı Dozlarda CoCl ₂ Uygulamasının SK-Hep1 Hücreleri Canlılığı Üzerine Etkisi.....	70
Şekil 33 Farklı Dozlarda CoCl ₂ Uygulamasının HuH7 Hücreleri canlılığı üzerine Etkisi	74
Şekil 34 Cobalt uygulamasının HuH7 Hücrelerinde CUL2 ekspresyonuna Etkisi	78
Şekil 35 Cobalt uygulamasının SK-Hep1 Hücrelerinde CUL2 ekspresyonuna Etkisi.....	80
Şekil 36 Cobalt uygulamasının PLC-PRF5 Hücrelerinde CUL2 ekspresyonuna Etkisi	81
Şekil 37 Cobalt uygulamasının SNU 182 Hücrelerinde CUL2 ekspresyonuna Etkisi.....	83
Şekil 38 CoCl ₂ 'nin SK-Hep1 Hücrelerinde CUL2 Transkripsiyonuna Etkisi.....	85

KISALTMALAR

AP: Anterior-Posterior

APC: Adenomatöz Polipoz Koli

ATF-2: Aktivatör transkripsiyon faktör 2

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated

ATR: Ataxia Telangiectasia And Rad3 Related

BCA: Bi-sinkronik Asit (Bi-cincronic acid)

Bcl2: B Hücresi Lenfoma2 (B cell lymphoma 2)

BclX: Bcl2 Benzeri Protein 1 (Bcl-2 like protein 1)

BMP: Kemik Morfojenik Proteini (Bone Morphogenic Protein)

BSA: Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin)

cAMP: Siklik adenzin monofosfat (Cyclic Adenosine Monophosphate1)

CAND1: Cullin Associated and Neddylation Dissociated

CK1: Kazein Kinaz 1 (Casein Kinase 1)

CRK: v-sarkoma virüsü CT10 onkogen homologu

CoCl₂: Cobalt chloride

CSK: c-SRC Tirozin Kinaz

CUL: Cullin

CUL2: Cullin2

DS: Dermatan Sülfat

ECM: Ekstrasellüler Matriks Elemanları (Extra cellular matrix)

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü (Epithelial Growth Factor)

EGR1: Early Growth Response Element 1

EMT: Epitelyal Mesenşimal Dönüşüm (Epithelial mesenchymal transition)

FAK: Fokal Adhezyon Kinazı (Focal Adhesion Kinase)

FKH: ForkHead Domain

Fz: Frizzled

Gab1: Grb2 Bağlı Bağlayıcı Protein 1 (Grb2 Binding Protein 1)

GADPH: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

GAG: Glikozaminoglikan (Glycoaminoglycan)

Grb2: Büyüme Faktörü Reseptör Bağlı Protein 2 (Growth-factor Reseptor Binding Protein 2)

GSK3 β : Glikojen Sentaz Kinaz (Glycogen Synthase Kinase)

HBV: Hepatit B virüsü

HCC: Hepatosellüler Karsinoma (Hepatocellular carcinoma)

HCV: Hepatit C Virüsü

HECT: Homologous to E6AP Carboxy Terminus

HIF1: Hipoksi ile Uyarılabilir Faktör 1 (Hypoxia inducible factor 1)

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü (Hepatocyte Growth Factor)

HPV: İnsan Papilloma Virüsü

HSP90 α : Heat Shock Protein 90 α

HSPG: Heparan Sülfat Proteoglikanlar (Heparan Sulfate Proteoglycan)

I κ B: İnhibitör Kappa B

IGF: İnsulin benzeri büyüme faktörü (Insulin Like Growth Factor)

IKK: Inhibitor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells, Kinase Epsilon

IR5: İnsulin Reseptör Substratı 5

MAPK: Mitojen ile Aktifleşen Kinaz (Mitogen Activated Kinase)

MMP: Matriks Metalloproteaz (Matr $\times$ Metalloproteinase)

NaCl: Sodyum Klorid (Sodium Chloride)

NaF: Sodyum Florid (Sodium Floride)

Na₃VO₄: Sodyum Orto-vanadat (Sodium Ortho-vanadate)

NF- κ B: B-hücrelerinin Kappa Hafif Polipeptid Gen Arttırıcı Nükleer Faktör

PAK4: p21 Proteini (Cdc42/Rac)-Etkinleşen Kinaz 4

PAR2: Proteazla aktive olan reseptör 2

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffered Saline)

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

PDK1: Piruvat Dehidrogenaz Kinaz 1

PI3K: Fosfatidil İnoзитol-3 Kinaz (Phosphatidylinositide 3-kinases)

PKA: Protein Kinaz A

PKB: Protein Kinaz B

PKC: Protein Kinaz C

RING: Really Interesting New Gene

SHC: Src Homoloji Domaini İçeren Transforme Edici Protein1 (Src Homology 2 Domain Containing Transforming Protein 1)

SHP2: SH domaini içeren Protein Tirozin Kinaz 2

SOS: Son Of Sevenless Homolog

STAT 3/5: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Başlatıcı Protein 3/5

TAE: Tris Acetate Buffer

TGF- β : Transforme Edici Büyüme Faktörü β (Transforming Growth Factor β)

TNF- α : Tümör Nekroz Faktörü (Tumor Necrosis Factor α)

UB: Ubikütün (Ubiquitin)

U-Box: UFD2 homology

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)

vHL: von Hippel Lindau

ZIF-1: Zinc Induced Facilitator Protein 1

TEŞEKKÜR

Hayatta hiçbir şeyden korkmayın yalnız; her şeyi anlamaya çalışın.

Marie Curie

En başta destekleri ve yol göstericiliği için Danışman Hocam Sayın *Prof.Dr. Neşe Atabey* 'e,

Yardımları için Sayın *Doç.Dr. Esra Erdal* 'a, aynı labı paylaştığım ve deneylerde desteklerini benden esirgemeyen arkadaşlarım Ayşim Güneş, Evin Özen, Peyda Korhan, Erkan Kahraman, Sanem Tercan Avcı, Eren Şahin, İmge Kunter, Emine Kandemiş, Soheil Akbari, Zeynep Karagonlar'a,

Yüksek lisans döneminde birlikte tatlı, acı günleri birlikte paylaştığımız arkadaşlarıma ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ailesine,

Sadece yüksek lisansta değil, tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Aileme,

Ve burada adını sayamadığım beni bu süreçte destekleyen herkese teşekkürlerimi bir borç bilirim. Bu tezimi bu dönemde aramızdan ayrılan babama ithaf ediyorum.

Hepatokarsinogenez Sürecinde CULLIN2 Gen Ekspresyonu ve Aktivasyonunun Rolünün Hepatoselüler Karsinom Hücre Dizilerinde İncelenmesi

Burçin Baran. Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Inciraltı-İzmir, Türkiye, burcinbrn@yahoo.com

ÖZET

Hepatoselüler karsinoma (HCC) sirotik zeminde gelişir. Sirozun tetiklediği fibrojeniz süreci hipoksik bir çevrenin oluşmasına neden olur. Bu hipoksik ortamda Hipoksise İndüklenen Faktör (HIF1) birikir. HIF1 glukoz metabolizması, sağ kalım, invazyon, anjiyogenez, metastaz ile ilişkili pek çok genin ekspresyonunu başlatır. HCC’lerde HIF1 birikimi kötü prognozla ilişkilidir.

HIF1 iki altbirimden oluşur: α ve β . Hücrede β alt birimi devamlı stabil durumdayken, α altbiriminin stabilitesi hücredeki oksijen konsantrasyonuna bağlıdır. Cullin 2 (CUL2) E3 ligazlar bu α alt birimini parçalanmasında görev yaparlar. Bu sayede hücrede HIF1 birikimini önlerler.

Çalışmamızda önce HCC hücre dizilerinde CUL2 ekspresyon düzeyleri incelendi ve incelediğimiz 12 hücre dizisinin tamamında farklı düzeylerde bazal ve aktif (neddile) CUL2 ekspresyonu olduğu saptandı. Daha sonra HIF1 birikimini artırdığı bilinen bir kimyasal olan Kobalt klorid (CoCl_2) uygulamasının HCC hücre dizilerinde CUL2 ekspresyonuna etkisi araştırıldı. . RT-PCR ve Western blot (WB) tekniği kullanarak yaptığımız çalışmamızda SK-Hep 1 ve HuH7 HCC hücre hatlarında CoCl_2 ’nin zamana ve doza bağlı olarak CUL2 ekspresyonunu artırdığını belirlendi. CoCl_2 ’ün hücre sağkalımını nasıl etkilediğini belirlemek için MTT yöntemini kullanıldı.

CUL2 ekspresyonu artışının hangi mekanizma ile gerçekleştiğini belirlemek için HIF1 düzeyinin regülasyonunda ve hepatokarsinogenez sürecinde rol oynadığı bilinen Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) /c-Met yolağının rolünü araştırdık. Bu yolağı seçmemizde daha önceki mikroyarray çalışmalarımızda HGF reseptörü olarak bilinen c-Met aktive edildiğinde ekspresyonu değişen aday genlerden birinin CUL2 olması da rol oynadı. HGF veya Heparin aracılıklı c-Met aktivasyonunun CUL2 ekspresyonunu üzerindeki etkisini RT-PCR ve WB yöntemleri ile incelendi. RT-PCR ile Heparin ve HGF’nin tek başına CUL2 transkripsiyonunu arttırırken, birlikte CUL2 transkripsiyonunu baskıladığı belirlendi. WB tekniği kullanılan

Çalışmada Heparinin doz ve zamana bağlı olarak CUL2, HGF'nin de zamana bağlı olarak CUL2 ekspresyonunu arttırdığı saptandı.

Sonuç olarak literatürde ilk kez HIF1 artışının, HGF, heparinin CUL2 ekspresyonunu düzenlediği belirlenmiştir. Bu da CUL2'nin hepatokarsinogenez sürecinde önemli rol oynayan bir protein olduğu düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: CUL2, HIF1, CoCl₂, heparin, HGF, HCC

Regulation of Cullin2 Ubiquitin Ligase Expression by HGF/c-Met Signaling Pathway

Burçin Baran. Dokuz Eylül University, Medical Faculty, Medical Biology and Genetics Department, Inciralti-Izmir, Turkey, burcinbrn@yahoo.com

AIM

Hepatocellular carcinoma is developing in cirrhotic ground. Cirrhosis induces fibrogenesis which leads to formation of a hypoxic environment. In these hypoxic environment HIF1 accumulates. HIF1 activates the expression of many genes related with glucose metabolism, cell survival, invasion, metastasis and angiogenesis. In HCC HIF1 accumulation is related with poor prognosis.

HIF1 is composed of two subunits: α and β . While β subunit is constantly stable in cell, α subunit stability is dependent on oxygen concentration. CUL2 E3 ligases participates in degradation of HIF1 α subunit so prevents HIF1 accumulation in cell.

In our study we showed that Cobalt chloride (CoCl_2) is used to mimic hypoxic environment. CoCl_2 is known to induce HIF1 in HCC cells. In our study we used RT-PCR and western blot techniques. In our study we showed that CoCl_2 induces CUL2 expression in dose and time dependent manner.

In addition we used CoCl_2 to induce cell death in HCC cell lines. We used MTT technique to study CoCl_2 effect on SK-Hep1 and HuH7 cell viability on time and dose dependent manner. We showed that CoCl_2 induces apoptosis at high doses in HCC cell lines.

In hepatocarcinogenesis HGF/c-Met pathway is highly activated. HGF/c-Met pathway contributes cell survival, motility, invasion and angiogenesis. HGF or Heparin activates c-met pathway. We studied HGF or Heparin effect on CUL2 expression in HCC cell lines with RT-PCR and western blot techniques. In our study we showed that while Heparin or HGF induces CUL2 transcription separately, they suppress CUL2 transcription together. Furthermore we showed that HGF or Heparin induces CUL2 protein expression in dose and time dependent manner

To sum up HIF1, Heparin and HGF contributes hepatocarcinogenesis. In our study we showed that HIF1, Heparin, and HGF increase CUL2 expression. It can be concluded that CUL2 can have an essential role in hepatocarcinogenesis.

Key words: CUL2, HIF1, hypoxia, Heparin, HGF, HCC

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hepatosellüler karsinoma (HCC) karaciğerdeki hepatosit hücrelerinden köken alan en yaygın primer karaciğer tümörüdür. 2000 yılında dünya çapında 564 000 kişiye HCC tanısı konulmuştur. Hepatosellüler karsinoma dünyada en yaygın kanserler arasında altıncı sıradadır ve üçüncü en ölümcül kanser türüdür^[1]. HCC özellikle Çin, Hong Kong, Tayvan, Kore ve Japonya gibi Uzak Doğu ülkelerinde ve Afrika ülkeleri Güney Afrika ve Mozambik'te oldukça yaygındır. Bu ülkelerde HCC görülme oranı her 100 000 kişide 100'dür. Bu oran Avrupa ülkelerinde ve Kuzey Amerika'da her 100 000 kişide 5 kişi oranına düşmektedir^[2]. Hepatosellüler karsinomada tedavi tümörün cerrahi müdahale ile tamamen alınması durumunda mümkündür ancak vakaların çok azında (%10-20) bu mümkün olmaktadır ve cerrahiyle alınan tümörün yeniden oluşma ve metastaz yapabilme olasılığı da vardır. Tümörün tamamının alınamaması durumunda ise hastaların yaşama süresi üç ile altı ay arasında değişmektedir. Tedavi için erken tanı önemlidir. İleri evre (4.evre) hastaları için etkin bir tedavi yöntemi mevcut değildir^[3,4].

Hepatokarsinogenez sürecinde aktivasyonu artan ve tümörleşme sürecine katkıda bulunan yolaklardan biri de HGF/c-Met yolağıdır. HGF/c-met yolağı HCC'de motilite, invazyon, sağkalım ve anjiyogenez ile ilişkilidir^[5]. Heparin ve heparan sülfatların HGF/c-Met yolağının aktivasyonunu etkilediği gösterilmiştir^[6]. Heparin ve heparin sülfatlar HGF/c-Met aracılıklı invazyon ve metastazı baskılamaktadır^[7].

Daha önceki çalışmalarımızda HGF ve heparin varlığında gerçekleşen gen ekspresyon değişimlerini incelemek için SK-Hep1 hücre dizisinde mikrodizin analizi yapılmıştır. Bu çalışmada mikrodizin çalışmalarında HGF ve heparin varlığında CUL2 ekspresyonunun arttığı görülmüştür.

CULLIN2 E3 ligazlar Cullin2 proteini, Rbx1, ElonginB/C ve vHL proteininden meydana gelir. Cullin2 E3 ligazlar çeşitli proteinlerin parçalanmasında görev alırlar. En bilinen hedef proteini HIF1 α 'dır. HIF1 β alt biriminin hücrede ekspresyonu sabittir. Buna karşın HIF1 α 'nın ekspresyonu düzeyi hücrenin oksijen düzeyine göre değişmektedir. Normoksik koşullarda parçalanmış HIF1 α , hipoksik koşullarda ise birikir^[8]. Biriken HIF1 α altbirimi, β alt birimiyle birleşir. Ortamda biriken HIF1 nukleusa transloke olarak hipoksiye yanıt elementi(HRE) içeren genlerin ekspresyonunu tetiklemektedir^[9].

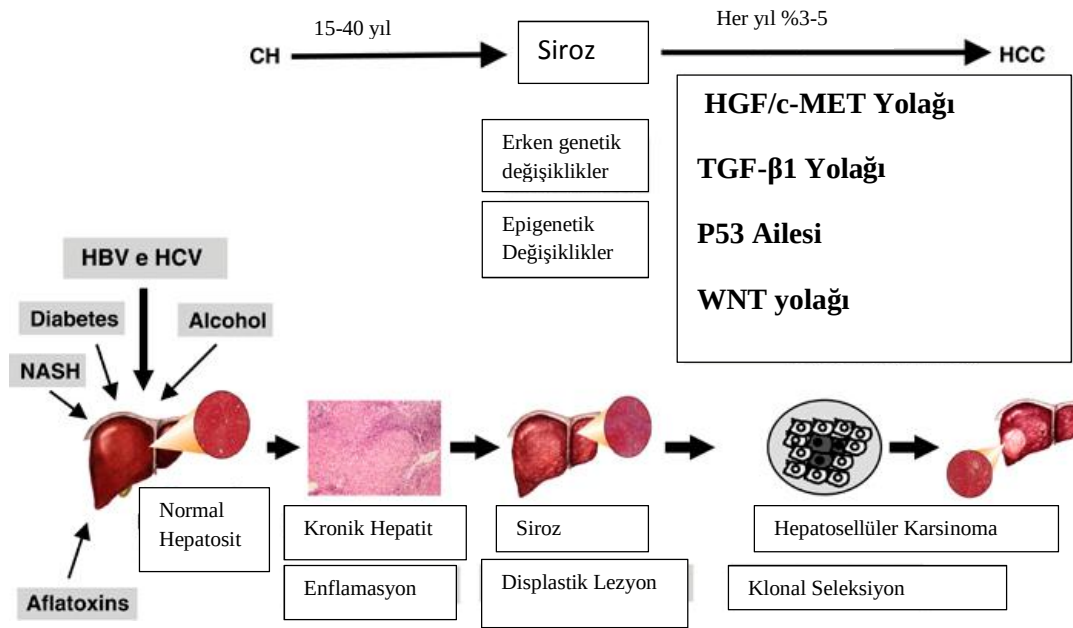
Hepatosellüler karsinogenez sürecinde ortamda fibrogenez artışı ve karaciğer yeniden modellenmesi sonucunda hipoksik bir ortam meydana gelir. Oluşan hipoksik ortamda ise HIF1 birikimi gerçekleşir. HIF1 birikimi hem fibrogenez sürecini daha da tetikler hem de diğer invazif ve metastatik süreçleri tetikler^[10]. CUL2'nin fonksiyonu ortamda HIF1 birikiminin önlenmesi açısından önemlidir.

Şu ana kadar hepatokarsinogenez sürecinde CUL2 nin rolünü ve CUL2 regülasyonun nasıl sağlandığını inceleyen herhangi bir çalışma yoktur. Çalışmamızda ilk olarak HCC hücre dizilerinde CUL2 ekspresyonunun/aktivasyonunun rolü incelenmiştir. Daha sonra CUL2 ekspresyonunun/aktivasyonunun düzenlenmesinde HGF, Heparin ve oksidatif stres ile uyarılan c-Met aktivasyonunun rolü incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hepatosellüler Karsinoma

Hastalığın patogenezinin pek çok süreçte katkıda bulunmaktadır. Hastalık çoğunlukla (%80) sirotik zeminde gelişmektedir. Karaciğerde oluşan enflamasyon, nekroz, fibrozis ve devam eden proliferasyon gibi süreçler de HCC gelişimine katkıda bulunmaktadır (Şekil 1). HCC'nin nedenleri arasında aşırı alkol tüketimi, Hepatit B Virus (HBV) ve Hepatit C Virus (HCV) enfeksiyonları, aflatoksine maruziyet, hemotokromatozis sayılabilir^[11].



Şekil 1. Hepatosellüler Kanseri Gelişimi ^[12]

Alkol kullanımının HCC riskini artırdığı epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Aşırı alkol tüketimi kronik karaciğer hasarına yol açarak siroz oluşumuna bu HCC oluşumuna yol açar^[13]. Özellikle HCV enfeksiyonu olan hastalarda alkol kullanımı HCC oluşma riskini iki katına çıkarmaktadır. Karaciğer detoksifikasyonda görev yapan bir organdır. Alkole bağlı kronik karaciğer hasarı geliştiğinde monosit hücreleri ortamda Tümör nekroz faktör α (TNF- α) gibi proenflamatuar sitokinleri, büyüme faktörleri ve ya reaktif oksidan türleri salınımına sebep olabilirler. Oluşan kronik enflamasyon sonucu hücrelerde kromozomal kayıplar görülebilir ve çeşitli genlerin metilasyon seviyeleri etkilenebilir. Lipid peroksidasyonu artması sonucunda karaciğerde yağlanma ve siroz görülmektedir^[14].

HBV enfeksiyonlarında ise HBV DNA virüsü hücrelere entegre olarak HBx proteinini üretmektedir. HBx pek çok şekilde hepatokarsinogenez sürecine katkıda bulunur. HBx proteini hücrede p53 gibi hücre döngüsünü durduran proteinlerle etkileşerek hem hücre

proliferasyonunu devam ettirirken hem de UV-hasarını algılayıp DNA'ya bağlanan proteinler("Ataxia Telangiectasia Mutated" (ATM) ve "Ataxia Telangiectasia And Rad3 Related" (ATR) bağlanıp işlevlerini engelleyerek hücrede DNA mutasyonlarının artmasını sağlar. Sinyal yollarıyla etkileşerek hücredeki pek çok onkogenin aktivasyonunu sağlar. Siklik adenosin monofosfat (c-AMP), Aktivatör transkripsiyon faktör 2 (ATF-2), B-hücrelerinin Kappa Hafif Polipeptid Gen Arttırıcı Nükleer Faktör (NF-κB) gibi bazal transkripsiyon faktörleri ve protein kinaz C (PKC), Janus Kinaz/STAT, "Inhibitor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells, Kinase Epsilon" (IKK) gibi pek çok kinazı aktive eder ve ekspresyonunu artırır. Ayrıca HBx metastatik ve invazif süreçlere de katkıda bulunur^[15]. Karaciğer hücrelerinin morfolojik olarak farklılaşması ve karaciğer hücrelerinde integrin, matriks metalloproteinazlar ve E-kadherin ile etkileşerek sitoskeletin yeniden yapılandırılması ve hücrelerin daha invazif bir karaktere bürünmesini sağlar. HBX c-Myc aracılıklı olarak Ras/Raf/MEK/ERK yolağını aktive eder. Buna ilaveten HBX c-Myc aracılıklı olarak "Heat shock protein 90 α" (HSP90 α) ekspresyonunu artırarak HCC hücrelerinin daha invaziv olmasına katkıda bulunur. Yine HBx hücrede (Hipoksi indüklenen faktör) HIF1 aktive ederek HIF1 ile ilgili pek çok sürecin de aktivasyonunda rol alır^[16].

HCV enfeksiyonlarında ise bir RNA virüsü olan HCV hücre genomuna entegre olmaz ancak HCV proteini olan HCV çekirdek proteini, ve yapısal olmayan HCV proteinleri olan NS3, NS4B, NS5A hücrede çeşitli yollarla etkileşerek karsinogenez sürecine katkıda bulunurlar. NS3, NS4B ve NS5A'nın hücre kültüründe transformasyona neden oldukları gösterilmiştir. HCV çekirdek proteini p53, p73 ve pRB proteinlerine bağlanarak onları inaktive eder. HCV çekirdek proteini ve NS5A proteini hücrede β-catenin ve Wnt sinyal yolağını aktive eder. Buna ilaveten HCV hücrede endoplazmik retikulum stres ve oksidatif stres tetikler ve bu da STAT-3, NF-κB ekspresyonu ve diğer hücre içi sinyal yollarını aktive ederek hücre büyümesine ve farklılaşmasına katkıda bulunur^[12].

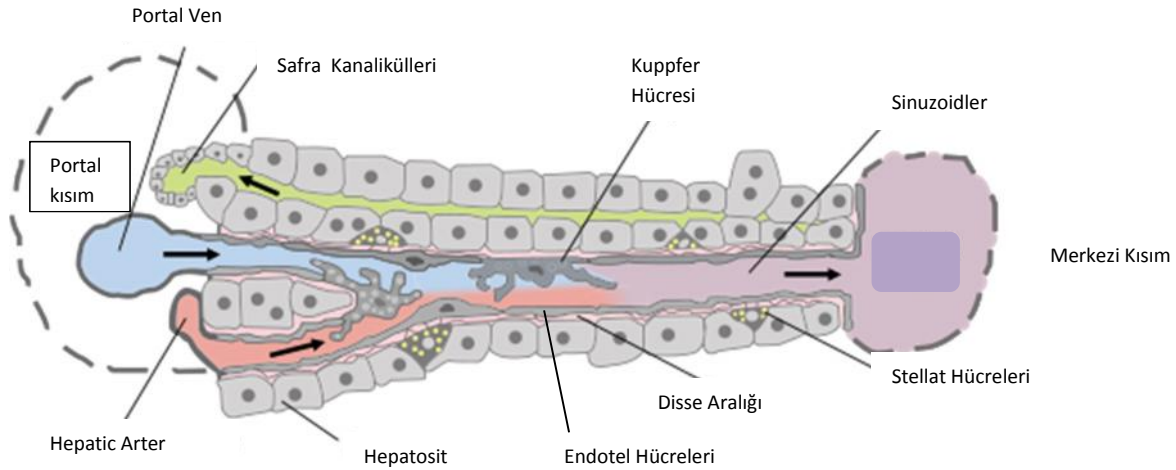
Aflatoksin B1'e maruziyet HCC riskini arttırmaktadır. Aflatoksin B1'in, karaciğerdeki P450 enzimi tarafından metabolize edilmesi sonucunda ortaya oldukça reaktif epoksit bileşeni ortaya çıkarır. Bu bileşen DNA'da mutasyonlara(Guanin Timin transversyonlarına) sebep olarak TP53 geninde mutasyona sebep olur^[17].

2.2 HCC oluşumu

Hepatositler, Kupffer hücreleri, Hepatik stellat hücreler ve endotel hücreleri karaciğer dokusunu oluşturan başlıca hücrelerdir. Bunlara ek olarak epitel hücreler, kas hücreleri, sinir

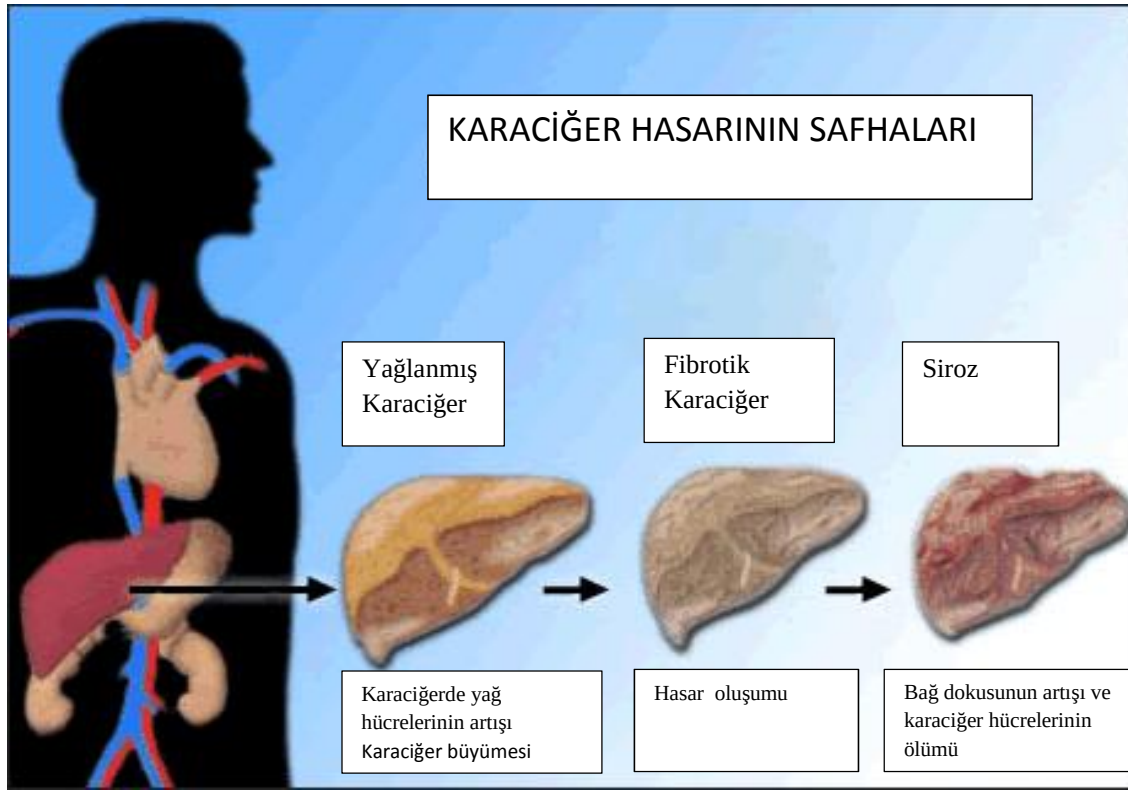
hücreleri ve inflamatuvar hücreler, fibroblastlar ve fibrinojen, laminin, kollajen, fibronektin, vitronektin gibi ekstrasellüler matriks elemanları(ECM) da karaciğer dokusu içinde yer alır. Karaciğer dokusu bunlara ilaveten birçok proteolitik enzimleri (matriks metalloproteazları, serin proteazları) ve birçok büyüme faktörünü de hepatosit büyüme faktörü(HGF), epidermal büyüme faktörü(EGF) içerir^[18].

Yapısal olarak incelendiğinde karaciğer 4 adet lobüllerden oluşur. Her bir lobülün çevresinde portal aralık olarak adlandırılan arter, ven, safra kanalı ve lenfatiklerin yer aldığı kısım bulunur. Hepatositler bir ve ya iki nükleuslu hücrelerdir. Lobül içerisinde periferden merkeze doğru kordonları oluştururlar. Bu kordonlar arasında ise karaciğer sinuzoidleri bulunur. Sinuzoidler tek sıra halinde endotel ve Kupffer hücrelerinde oluşmuş yapılardır. Kupffer hücreleri karaciğerin makrofajlarıdır ve sabit halde bulunurlar. Hücre kordonları ve hepatositler arasında Disse boşluğu vardır. Bu Disse boşluğunda sessiz durumda bulunan Hepatik stellat hücreleri vardır (Şekil 2) ^[19].



Şekil 2. Hepatik Sinuzoidlerin Yapısı^[20]

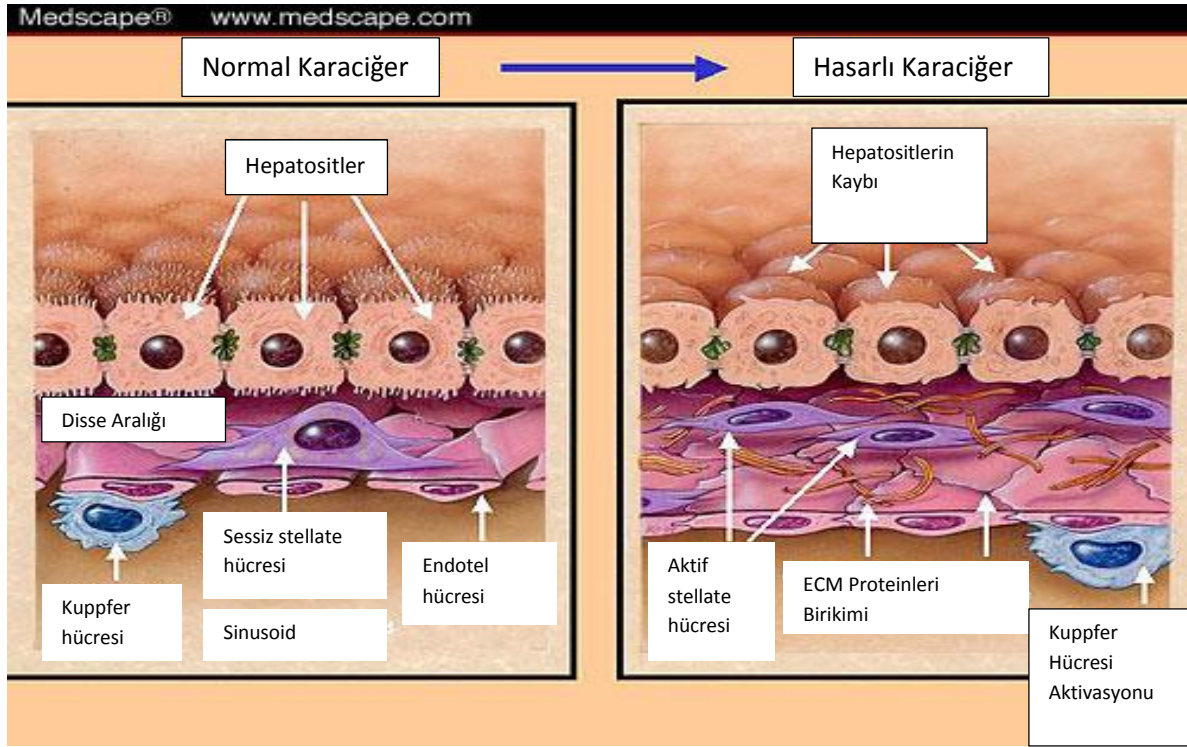
Karaciğerde oluşan hasar sonrasında normalde sessiz durumda olan hepatik stellat hücreleri aktifleşerek ECM elemanları salgılayan miyofibroblast hücrelerine dönüşürler bu da karaciğerde fibrogenezi başlatır ve süreç genelde sirozla sonuçlanır (Şekil 3) ^[21].



Şekil 3. Karaciğer hasarının evreleri [22]

Normal koşullarda karaciğerde hasar oluşsa bile hepatositlerin rejenerasyon kapasitesi sayesinde onarılabilir. Fibrojeniz süreci karaciğerde yukarıda sayılan nedenden herhangi biri nedeniyle hasar meydana geldiği zaman, hasarının onarılamaması ile fibrojeniz ve fibrolitik dengeyi bozulması sonucunda karaciğerde aşırı derecede fibroz artışı meydana gelir. Bu durumda karaciğer sinuzoidlerinin yapıları değişerek kapiller sinuzoidlere benzerler. Disse aralığında kollajen, fibronektin gibi ECM proteinleri birikmeye başlar. Bu proteinlerin birikmesi sonucunda hepatositlere yeterli besin ve oksijen gidemez ve nekroz oluşumu başlar. Aynı zamanda hepatositlerle etkileşen ECM reseptörleri integrinler de hepatositlerin fonksiyonunu bozarlar. Bundan sonra süreç geri dönüşümsüz ve prognozu kötüleşen bir süreçtir. Hepatositler ölmeye başlarken, karaciğerde ECM proteinlerinin oranı oldukça artar. Hepatositlerin ölmesiyle birlikte bu hücrelerle yakın temas halinde bulunan stellat hücreleri aktifleşir. Stellat hücreleri miyofibroblastlara dönüşürler ve ortama ECM proteinleri, sitokinler, büyüme faktörleri salarlar. Bu süreçte Kuppfer hücreleri de rol oynar. Kuppfer hücreleri de diğer makrofajlar gibi hem savunmada hem de doku hasarı ve ya yaralanmalarında tamir görevi üstlenmektedir. Kuppfer hücreleri de ortama sitokin ve büyüme faktörleri salarak hem mezenşimal hücreleri (fibroblastları) aktifleştirirler hem de stellat hücrelerin aktivasyonuna katkıda bulunurlar. Bütün bu süreçler sonucunda karaciğer

mikroçevresi değişir. Siroz oluşumu ve daha ilerleyen saflarda HCC oluşumu gözlenir^[23] (Şekil 4)



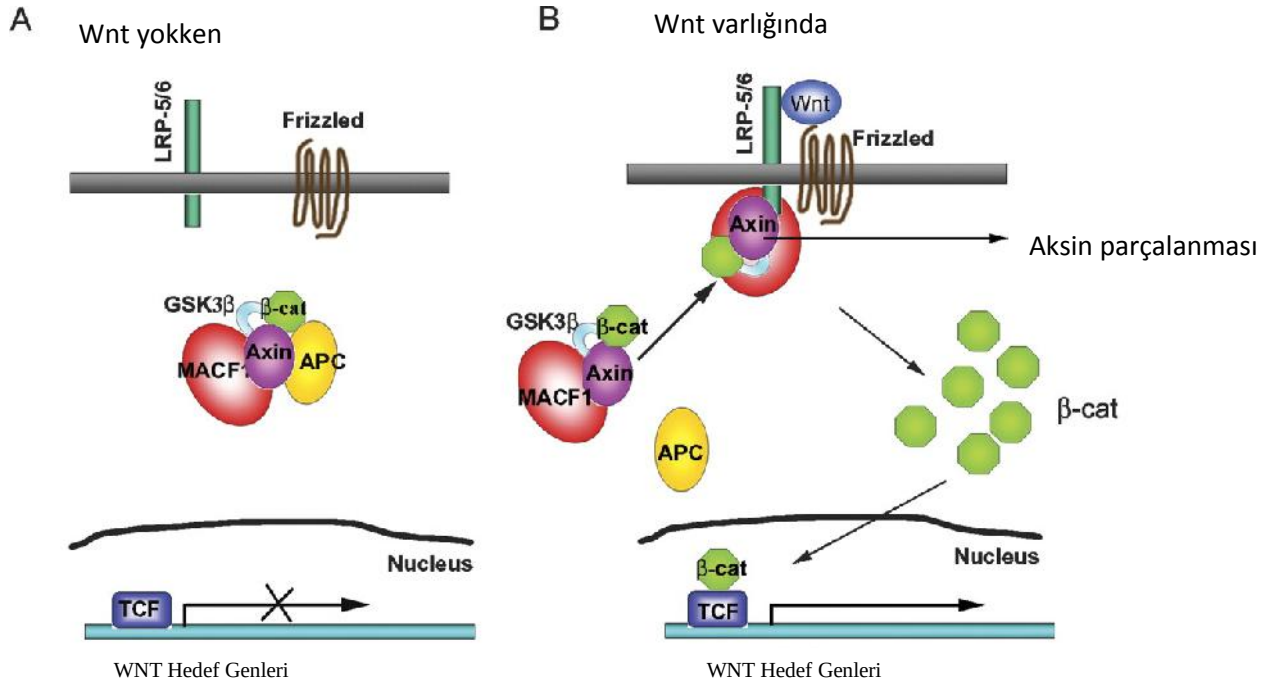
Şekil 4. Siroz Sonucunda Karaciğerin Yeniden Modellenmesi Sırasında Meydana Gelen Değişiklikler^[24]

2.3 HCC Oluşumunda Rol Alan Sinyal Yolakları

2.3.1 Wnt/ β -Katenin Sinyal Yolağı

Wnt yolağı hücrede proliferasyonu, farklılaşmayı tetikleyen bir yolaktır. Karaciğerin de kendi kendini yenilemesi sırasında Wnt yolağı görev yapar. Wnt/ β -katenin yolağı erişkin karaciğerde inaktif olmasına rağmen gelişmekte olan karaciğerde hepatoblast proliferasyonunu, sağ kalımını ve farklılaşmasını sağlar.

Normal erişkin hücrelerde Wnt/ β -katenin yolağı inaktiftir, bu durum Wnt ve β -katenin proteinin hızlıca parçalanması ile sağlanır. β -katenin, Kazein Kinaz 1(CK1) ve Glikojen Sentaz Kinaz(GSK3 β) tarafından serin/treonin kısmından fosforile edilir. adenomatöz polipoz koli (APC) ve Aksin proteinleri de bu komplekste yer alır. Oluşan bu kompleks proteazomlar tarafından parçalanır (Şekil 5.A).



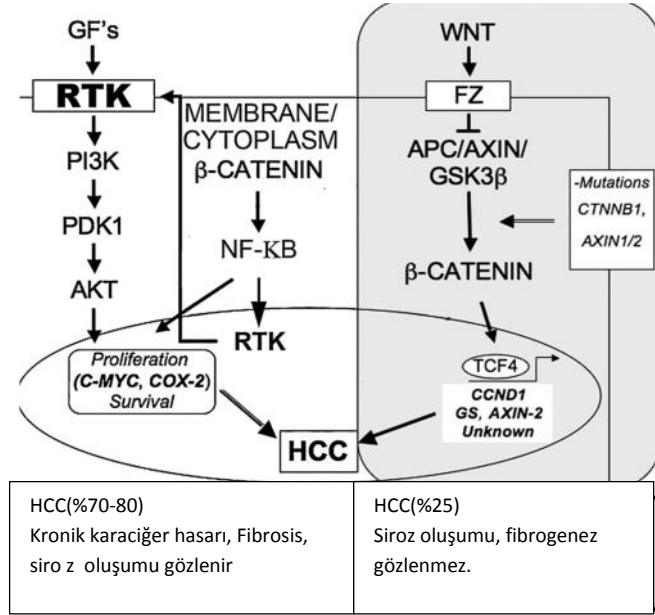
Şekil 5. İnaktif ve aktif Wnt/β-catenin Yolaklarının Şematize Gösterimi ^[25]

Bir glikoprotein olan Wnt'in reseptörü Frizzled (Fz) bağlanmasıyla LRP5/6 birlikte bir kompleks oluştururlar. Dishwelled proteini de Fz reseptörüne bağlanır. Aksin proteinini LRP5/6'ya bağlanarak ve GSK3β proteinini fosforilleyerek onları inaktifleştirir. Bu durumda parçalanmaktan kurtulan β-katenin birikerek nükleus geçer ve burada TCF/LEF ailesi transkripsiyon faktörlerinin ko-aktivatörü olarak görev yapar ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (Şekil 5.B). β-kateninin hedef genleri arasında hücre proliferasyonu ile ilgili c-Myc, siklin D başlıca sayılabilir, buna ilaveten anjiyogenezle ilgili Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), Matriks Metalloproteaz (MMP) gibi pek çok genin ekspresyonunu artırır ^[26].

HCC tümörlerinin %62-70'inde β-kateninin fazlaca eksprese olduğu belirlenmiştir. β-katenindeki ekspresyon artışı başlıca β-katenin, APC ve ya Aksin'de meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. HCC'de β-katenin geninde CTNNB1 mutasyon oranı %25'dir ve HCV enfeksiyonu ile bu mutasyon arasında korrelasyon olduğu görülmüştür. Bunun dışında Aksin genindeki mutasyonlar ve Fz reseptörünün fazla ekspresyonu da HCC gelişimine yol açan diğer mutasyonlardır ^[27].

HCC gelişiminde β-kateninin etkisi üzerine olan bir diğer hipotez de β-kateninin fibrojenizden bağımsız bir şekilde HCC gelişimine neden olduğudur. β-katenin geninde

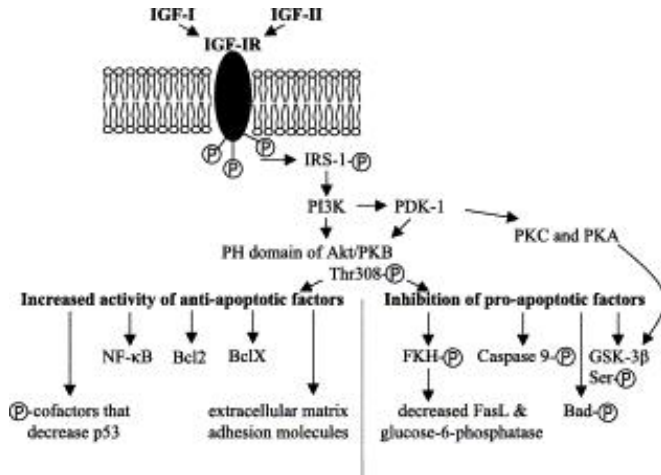
mutasyon olan tümörlerde daha az damarlanma, daha az fibrojeniz ve siroz oluşumu gözlenmektedir(Şekil 6)^[28].



Şekil 6. Fibrojeniz Gözlenen ve Gözlenmeyen HCC'deki Sinyal Yolakları Arasındaki Farklılıklar^[29]

2.3.2 İnsulin benzeri büyüme faktörü (IGF) sinyal yolağı

IGF sinyal yolağı embriyogenez sürecinde, hücre döngüsü regülasyonu ve hücre proliferasyonu üzerinde etkilidir. IGF sinyal yolağı IGF-I ve IGF-II sinyal proteinlerinden, IGF adaptör proteinleri(IGFBP1-6) ve IGF reseptörlerinden oluşur(IGF-1R, IGF-II/M6PR, ve IGF-2R). Bunlar alt sinyal yolaklarındaki proteinlerin ekspresyonunu başlatır (Şekil 7). Alt sinyal yolağındaki İnsulin Reseptör Substratı 5 (IR5), Fosfatidil İnozin-3 Kinaz (PI3K) aracılıklı olarak protein kinaz B(PKB) aktifleştirir. Bu yolak da NF-κB, B Hücresi Lenfoma2(Bcl2), Bcl Benzeri Protein 1(BclX) gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırarak sağ kalımı sağlar. Aynı zamanda PI3K, Piruvat Dehidrogenaz Kinaz 1 (PDK-1) aracılıklı Protein Kinaz C(PKC) ve Protein Kinaz A(PKA)'nın ekspresyonunu artırır. Bu da pro-apoptotik faktörler ForkHead Domain (FKH), Kaspaz 9, GSK3β'yı fosforilleyerek onları inhibe eder^[29].



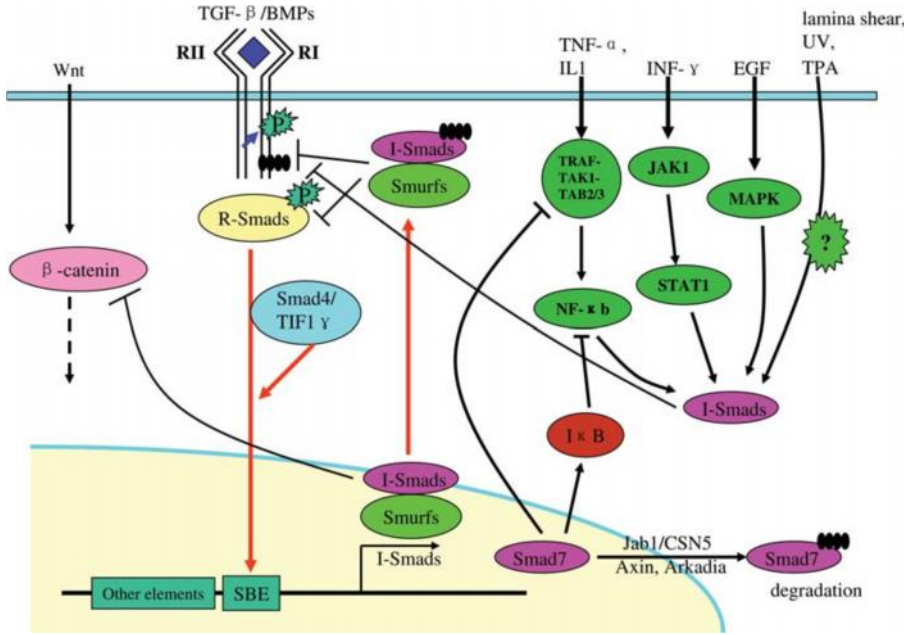
Şekil 7. IGF-IR Sinyal Yoluğu [30]

IGF, Büyüme Faktörü Reseptör Bağlı Protein 2(Grb2) aracılıklı Mitojen ile Aktifleşen Kinaz (MAPK) sinyal yolağını tetikleyerek p27, c-Myc, c-Fos, siklin B ve VEGF artışına sebep olur. HCC vakalarının %16-40'ında IGF-II overekspresyonu gözlenmektedir. HBV'nin SP1 aracılıklı IGF-II ekspresyonunu arttırdığı ve yine HCV'nin de SP1 ve Early Growth Response Element 1 (EGR1) aracılıklı IGF-II ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. İlginç bir şekilde IGF-IIR ekspresyonu ile IGF-II miktarı ters orantılıdır. Neoplastik lezyonlarda ve HCC'de IGF2R miktarında azalış gözlenirken, IGF-II miktarında ise artma meydana gelmektedir [29].

2.3.3 Transforme Edici Büyüme Faktörü β (TGF- β) Sinyal Yoluğu

TGF- β hücre homeostazı, hücre diferensiyasyonu, proliferasyonu, migrasyonu ve apoptozunda rol oynayan bir proteindir. TGF- β ailesi 30'dan fazla üyeyi barındırır. Bunlar arasında TGF- β 'lar, Kemik Morfojenik Proteini(BMP), aktivin ve nodal proteinleri sayılabilir. En temel yolak şöyledir: TGF- β tip I ve tip II transmembran serin/threonin reseptörüne bağlanır. Bu reseptörler de Smad proteinleri aracılıklı olarak alt sinyal yolaklarını tetiklerler (Şekil 8). Smad proteinleri aktivatör Smadlar, düzenleyici Smadlar ve inhibitör Smadlar olmak üzere üç grupta incelenir. TGF- β sinyal yolağının tümörleşme sürecinde hem pozitif hem de negatif etkisi vardır. Yani TGF- β yoluğu bir yandan tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonu başlatırken bir yandan da tümör gelişimi ve invazyon ile ilgili genlerin ekspresyonunu başlatır. Smadlar aracılıklı yolakta aktivatör Smadlar TNF α , EGF gibi çeşitli sitokinleri indüklerken, inhibe edici Smadlar ise bu aktive edici Smadların aktivitelerini düzenlerler. Aynı zamanda Smadlar TGF- β 'nın diğer yolaklarla etkileşimini de sağlarlar. Mesela TGF- β , transmembran reseptörlere bağlandıktan RSmad ve Smad4 aracılığıyla p15,p21 gibi genlerin ekspresyonunu başlatır. Smad 7, TGF- β sinyal yolağını baskılar,

ortamdaki β -katenin birikimini önleyerek Wnt yolağıyla ilişki kurmasını engeller. Yine Smad7 ortamdaki İnhibitör Kappa B (I κ B) ekspresyonunu arttırarak NF- κ B ekspresyonunu baskılar^[31].



Şekil 8. TGF- β Sinyal Yolağı ve Diğer Yolaklarla İlişkisi ^[25]

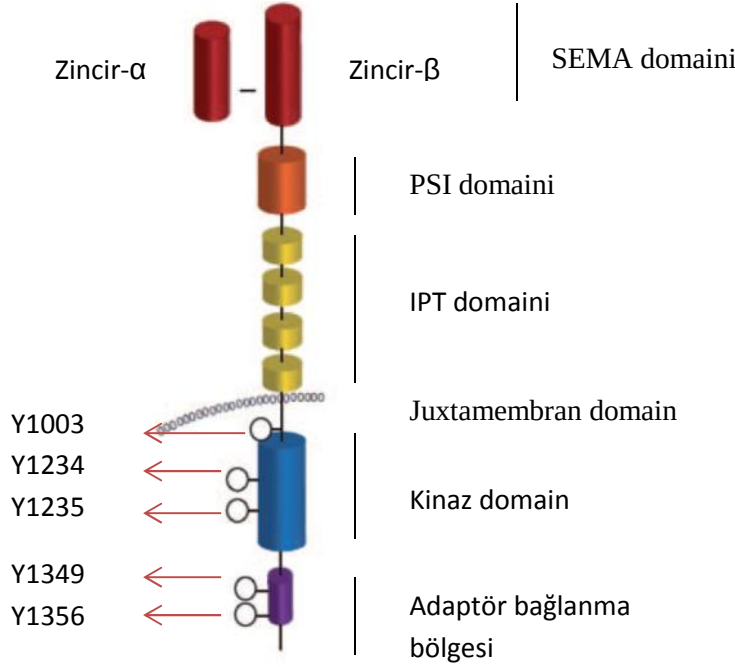
HCC’de TGF- β sinyal yolağında adaptör protein ELF’ de mutasyonlar saptanmıştır. ELF, Smad3/4’ün lokalizasyonunda görev yapan adaptör proteindir. Farelerde yapılan çalışmalarda *elf*^{+/-} mutant farelerin spontan bir şekilde HCC geliştirdiği gözlenmiştir. Buradan ELF’nin bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev yaptığı ve TGF- β yolağında önemli bir düzenleyici olduğu sonucuna varılmıştır. HCC vakalarının %40’nda TGF- β ekspresyon seviyesinde artış görülmüştür. TGF- β ekspresyonundaki artış HCC’de kötü prognozla ilişkilidir. Buna karşın bazı HCC hücre hatlarında TGF- β aracılıklı antiproliferatif etki de gösterilmiştir ^[32].

2.3.4 HGF/c-Met Yolağı

HGF/c-Met yolağı gelişim sırasında hepatosit sağkalımını sağlar^[33]. HGF ve c-Metleri knock-out yapılmış farelerde karaciğerin gelişmediği ve bu farelerin öldüğü belirlenmiştir^[34]. Buna ilaveten karaciğer hasarı sonrasında yine hepatositlerin sağkalımının sağlanmasında, rejenerasyonda görev yapar, karaciğerin onarımını sağlar^[35].

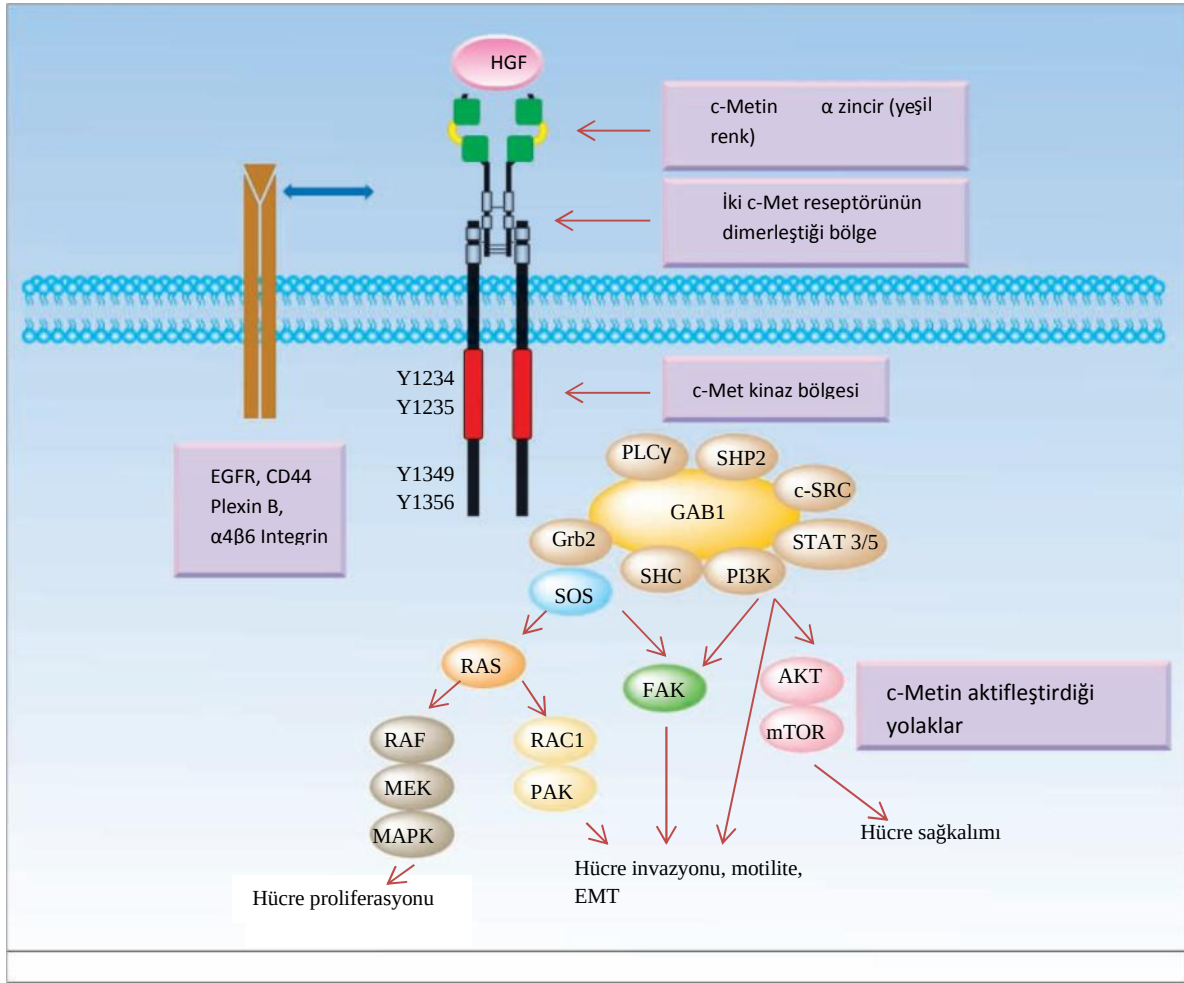
HGF reseptörü olan c-Met tirozin kinaz ailesindedir. c-Met disülfid bağ ile bağlı heterodimer yapıdaki α ve β zincirlerinden oluşmuştur (Şekil 9). Ekstrasellüler domaininde α

zinciri, β zincirine amino kısmından bağlanarak ligand bağlanma kısmını oluşturur. Transmembran ve jukstamembran bölgesi c-Cbl ve kinaz bağlanma domainini içerirler, bu kısımlar hücre içi sinyal yolları açısından önemlidir^[36].



Şekil 9. c-Met reseptörü ve Domainleri^[36]

c-Met reseptörünün ligandı HGF 90 kDa büyüklüğünde plazminojen serin proteaz ailesindendir. HGF, mezenşimal hücrelerden tek zincirli inaktif bir peptid olarak sentezlenir. Proteaz enzimler tarafından kesilir. Kesim sonucunda oluşan α ve β zincirlerinin disülfid bağıyla biraraya gelmesi sonucunda aktifleşir. HGF'nin α zinciri c-Met reseptörüyle etkileşim için bağlanma bölgesini içerirken, β zinciri c-Met reseptörünün aktivasyonunu sağlanması için gereklidir. HGF'nin c-Met reseptörüne bağlanmasıyla c-Met reseptörleri biraraya gelerek homodimer bir yapı meydana getirirler. Kinaz aktivitesi sonucunda birbirlerini katalitik bölgedeki Y1234 ve Y1235 tirozinlerinden fosforillerler. Bu fosforilasyonların devamında karboksi ucunda bulunan Y1349 ve Y1356 tirozinleri de fosforillenerek intrasellüler adaptör proteinleri için bağlanma bölgeleri oluştururlar (Şekil 10)^[36,37].



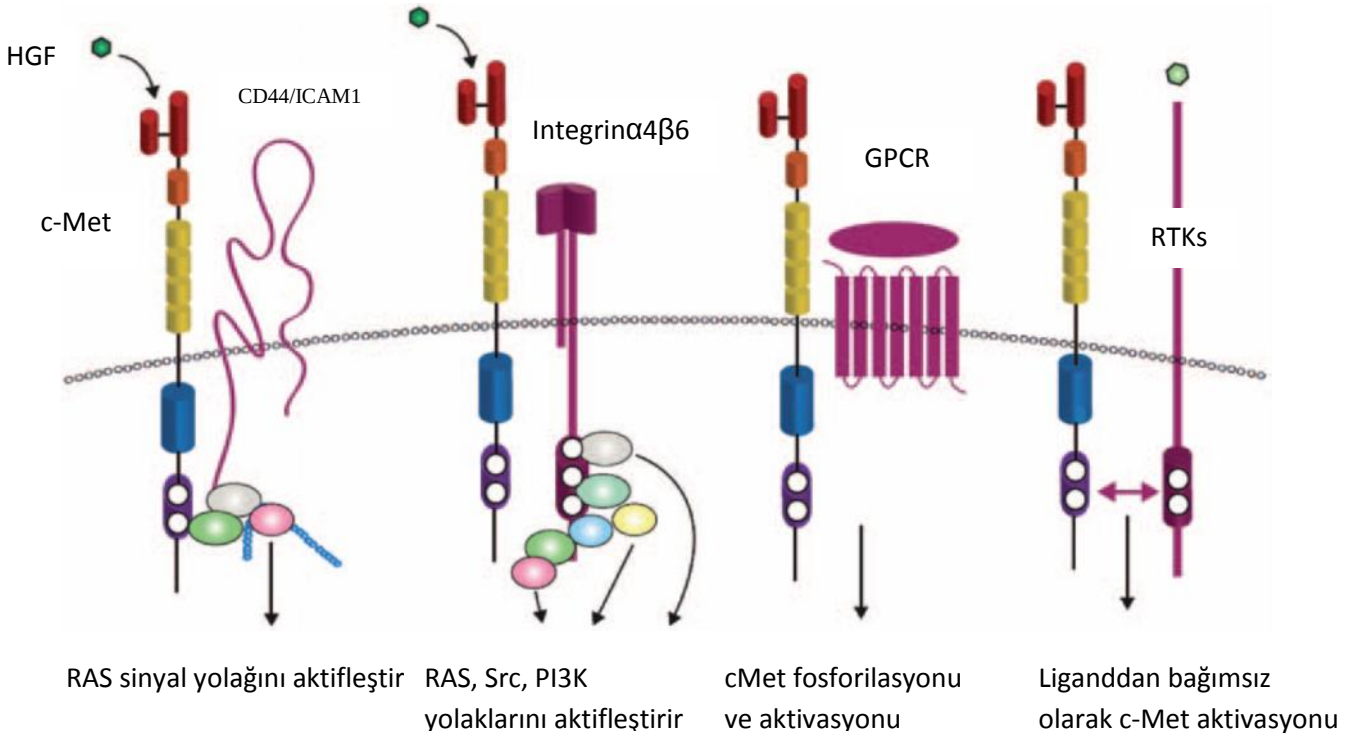
Şekil 10. c-Met reseptörü aktivasyonu ve alt sinyal yolları^[37]

Bu bölgelerden fosforillenmesi sonrasında bu bölgeye Grb2, Src Homoloji Domaini İçeren Transform Edici Protein1 (SHC), Grb2 Bağlı Bağlayıcı Protein 1(Gab1) adaptör proteinleri bağlanır. Gab1 proteini Met reseptörüne bağlandıktan sonra birçok sinyal molekülünü kendisine bağlayıp fosforile ederek onların alt yolağında bulunan birçok yolağı aktive eder. Gab1'a Grb2, PI3 kinaz, Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Başlatıcı Protein 3/5(STAT3/5), SH domaini içeren Protein Tirozin Kinaz 2 (SHP2), PLCγ, c-SRC Tirozin Kinaz(CSK) gibi proteinler bağlanır. Bu adaptör proteinler de alt sinyal yollarındaki efektör proteinleri aktive ederler. Grb2, Ras proteini aracılığıyla RAF, MEK ve MAPK yolağını aktive ederek hücre proliferasyonu, motilite ve hücre döngüsünde ilerleyişle ilgili pek çok proteinin ekspresyonunu başlatır. SHP2 aracılığıyla GAB1 da MAPK fosforilasyon süresini uzatır. PI3-K'nin p-85 altbiriği direkt c-Met reseptörüne bağlanarak ve ya GAB1 aracılığıyla fosforillenir. Fosforillenen PI3K, AKT yolağını aktive ederek, hücre sağ kalımını sağlar. STAT3 direkt c-Met reseptörüne bağlanarak ve ya GAB1 aracılığıyla fosforillenerek tübulojeniz ve invazyonda rol oynar. SRC aracılığıyla fosforillenen Fokal Adhezyon Kinazı

(FAK) hücre migrasyonu ve yüzeyden bağımsız “*anchorage independent*” büyümeyi sağlar. Gab1, v-sarkoma virüsü CT10 onkogen homologu (Crk) proteinini fosforilleyerek Rap1 ve Ras ilişkili Protein(Rac) sinyal yolağını aktiveleştirir, bu da aktin iskeletinin yeniden yapılanmasının ve hücre migrasyonunun ve invazyonunun önünü açar. Yine Gab1’in aktive ettiği p21 Proteinini (Cdc42/Rac)-Etkinleşen Kinaz 4 (Pak4) hücre invazyonunu tetikler^[36-38].

c-Met’in negatif regülasyonu ise jukstamembran bölgesinde yer alan Y1003 rezidüsü ve buraya bağlanan c-CBL aracılıklı olmaktadır. Yine protein tirozin fosfatazlar da c-Met üzerinde bulunan fosforilleri uzaklaştırarak c-Met’in inaktivasyonuna katkıda bulunmaktadırlar. PLCγ’nın c-Met’e bağlanması sonucunda fosforillenen PKC cMet’in inaktivasyonunda rol oynar^[36-38].

c-Met hücre yüzeyindeki diğer reseptörlerle de etkileşip birbirlerinin transaktivasyonuna neden olabilirler (Şekil 11). Hiyalüronon reseptörünün v6 splice variantı CD44 ekstrasellüler matriks molekülleri ile hücre iskelet elemanlarını birbirine bağlayan bir transmembran proteindir. CD44, c-Met reseptörü ile Grb2 aracılıklı etkileşerek “*Son Of Sevenless Homolog*” (SOS) proteinini aracılıklı olarak RAS/ERK sinyal yolağını aktiveleştirir. c-Met’in, integrin $\alpha 4\beta 6$ ile etkileşimi adaptör proteinlerin bağlanması için ekstra zemin oluşturur ve bu durum adaptör proteinler aracılıklı PI3K, RAS, SRC sinyal yolaklarını tetikler. c-Met bir tirozin kinaz reseptörü olduğu için diğer tirozin kinaz reseptörleriyle etkileşebilir. Bu etkileşimin sonucunda iki tarafta birbirini fosforilleyerek aktivasyonları başlatabilir. c-Met’in diğer bir tirozin kinaz reseptörü olan EGFR’la iki şekilde etkileştiği düşünülmektedir. Yine c-Met reseptörünün G-protein aracılıklı reseptörlerle de etkileştiği ve bunun sonucunda c-Met fosforilasyonun gerçekleştiği gösterilmiştir. Semaforin sinyal molekülleri ve onların reseptörleri pleksinler, Rac ve Rho aktivitesini düzenleyerek hücre iskelet elemanlarının modellenmesinde görev alırlar. Birçok tirozin kinaz reseptörü pleksin ailesiyle ilişkilidir. c-Met ile Pleksin B reseptörlerinin ekstrasellüler domainleri birbiriyle oldukça benzerlik gösterir. Bu domainlerin birbirleriyle olan benzerlikleri sonucu reseptörler birbirleriyle etkileşebilirler hatta HGF olmadığında bile etkileşim olabilir. Pleksin B fosforilasyonu ile c-Met fosforilasyonu bir çok hücre hattında birbiriyle korrelasyon gösterir. Hatta PleksinB1’in ligand bağlanması sonucu aktive olması c-Met’i de aktive eder ve bu Rac yolağını harekete geçirerek hücre invazyonunu sağlar^[36-38].



Şekil 11. c-Met reseptörü ve Yüzeydeki Diğer Reseptörlerle Etkileşimi ^[36]

HGF/c-Met yolağındaki bozuklukların HCC'yi de içeren meme, serviks, kolorektal, pankreas, over, mesane kanseri gibi pek çok solid tümörde ve hematolojik kanserlerin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle HCC'ye karşı geliştirilen tedavi yöntemleri arasında HGF/c-Met yolağına karşı geliştirilen ilaçlar da yer almaktadır. Bu amaçla anti-HGF ve ya anti-cMet antikoru veya multi-hedefli tirozin kinaz inhibitörleri geliştirilmektedir ^[36-38].

Karsinogenez sürecinde rol oynayan HGF/c-Met sinyal yolağının bozuklukları:

- HGF/c-Met yolağının otokrin döngü oluşturarak sürekli aktivasyonu
- HGF ve ya c-Metin aşırı ekspresyonu- Bu 7q kromozom kazanımları ve büyüme faktörleri sonucu transkripsiyon artışından kaynaklanabilir.
- c-Met reseptörü üzerinde kinaz bölgesinde oluşan aktive edici mutasyonlarıdır.
- Ligand bağımsız c-Met aktivasyonudur.

Ligand bağımsız c-met aktivasyonuna Heparan ve heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG), dermatan sülfatların(DS) ligand oligomerizasyonu aracılığı etki olduğu düşünülmektedir. HS'lar karbohidratların glikozaminoglikan(GAG) zincirlerinden oluşan linear, sülfat yapıda negatif yüklü proteinlerdir.

HS'lar kemokin, büyüme faktörü, morfojenlere bağlanarak onları proteolize karşı korur. Proteaz reseptörü gibi davranarak proteazların ve proteaz inhibitörlerinin aktivitesini etkiler. İntegrinler ve diğer hücre adhezyon proteinleri ile etkileşerek hücre-ekstrasellüler matriks bağlantısını, hücre-hücre bağlantısını sağlar. Buna ilaveten hücre dışındaki HS'lar endositotik reseptör gibi davranarak bağlanmış olan ligandların parçalanmasında görev yaparlar. Bu özellikle karaciğerde lipoprotein mekanizmasında önemlidir. Bunun dışında pek çok tirozin kinaz tipi büyüme reseptörüne karşı ko-reseptör gibi davranarak bu tirozin kinaz reseptörlerinin aktivitesini değiştirmektedir. HSler yine glikoaminoglikan ailesinin bir üyesi olan heparinlerle yapısal olarak benzemektedir. Heparin mast hücreleri içerisinde salgı granülleri olarak depolanır ve doku incinmesi sırasında hedef dokuya salınır ^[39].

Heparinin HGF'nin reseptörü gibi davranıp HGF/c-Met aracılığı biyolojik yanıtları azalttığını veya bunun tam tersine HGF/c-Met yolağının tetiklediği motilite ve invazyonu artırdığı gösterilmiştir^[40]. HCC hücre hatlarıyla yaptığımız çalışmalarda Heparinin tümör mikroçevresinde HGF varlığında c-Met aktivasyonunu baskılayarak EGR1 aracılığı olarak motilite ve invazyonu azalttığı belirlenmiştir ^[41]. Verilerimiz ortamda HGF bulunmadığında heparinin c-Met aktivasyonuna ve c-Met aracılığı motilite, invazyon artışına neden olduğunu gösterdi. Bu çift yönlü etkinin mekanizmasını incelemek amacıyla gerçekleştirdiğimiz mikrodizin çalışmasında ekspresyonu değişen genlerden birinin Cullin 2 olduğu belirlendi.

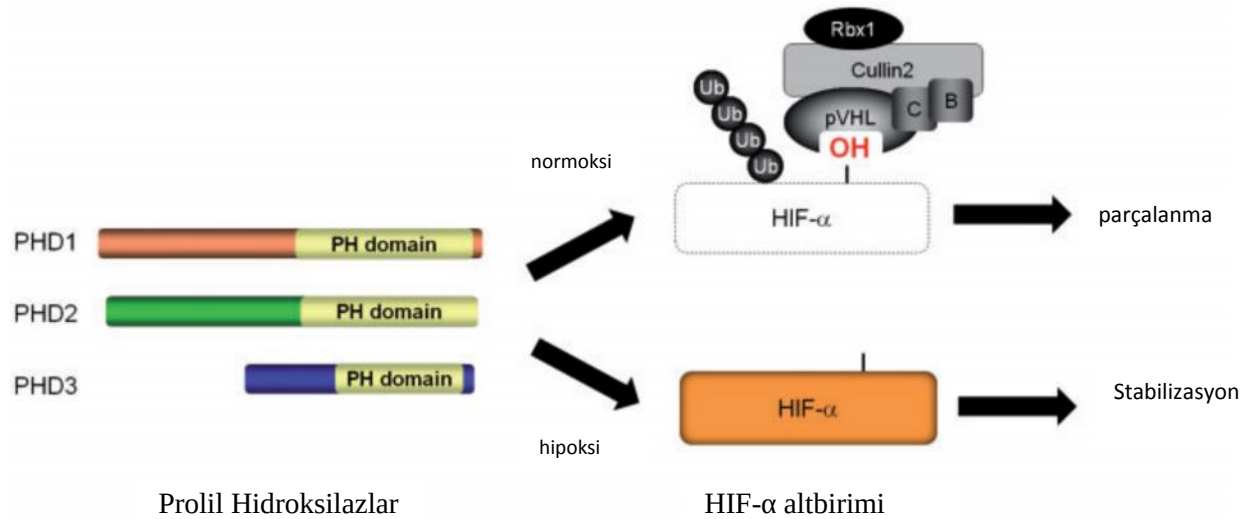
2.4 HIF1 ve Hepatokarsinogenez

Karaciğerde hasar sonucunda tetiklenen remodellenme ve bunun sonucunda oluşan hipoksinin hepatokarsinogenez sürecine önemli katkıları vardır. Hipoksi sonucunda ortamda biriken HIF1 α pek çok genin ekspresyonunu başlatarak bu sürece katkıda bulunur. Yapılan çalışmalarda HCC'de HIF1 α ekspresyonundaki artışın kötü prognoz ve tümör rekurrensi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur^[42]. HIF1, VEGF büyüme faktörünün ekspresyonunu da başlatarak anjiyogenezi tetikler. HCC bilinen en damarlı solid tümörlerden biridir. Yine HIF1 c-MET reseptörünün promotör kısmına bağlanarak c-Met ekspresyonunu tetikler^[43]. Bunun dışında HIF1, IGF, PI3K/AKT, ERK/MAPK, TGF- α gibi çeşitli büyüme faktörleri ve bunların yollarını da aktiveleştirerek hepatokarsinogenez sürecine katkıda bulunur. İlginç bir

şekilde bu büyüme faktörleri de otokrin döngü oluşturarak HIF1'nin ekspresyonunu artırır. c-Met'in HCC hücrelerinde HIF1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir^[44].

HIF-1 α ve β alt birimlerinden oluşan “*helix-loop-helix*” domainini içeren bir transkripsiyon faktörüdür. HIF1 β hücrede devamlı eksprese olan ve ARNT domain içeren bir proteindir. HIF-1 α alt biriminin stabilitesi hücredeki oksijen düzeyine göre değişmektedir^[45]. Hipoksik koşullarda stabil olan bu proteinin, oksijen olan ortamdaki yarılanma ömrü beş dakikadan azdır. HIF-1 α 'nın iki transaktivasyon domaini vardır: Bunlar NH2 transaktivasyon domani NTAD ve COOH transaktivasyon domaini CTAD 'dır. Oksijene bağımlı parçalanma domaini (ODDD) NTAD kısmında yer alır.

Prolil Hidroksilaz Domain(PHD) enzimleri ortamdaki oksijen varlığına duyarlı enzimlerdir. Memelilerde üç tip PHD enzimi tanımlanmıştır: PHD1, PHD2, PHD3. Normoksik koşullarda PHD'ler özellikle PHD2 HIF1- α proteinini ODDD domaininde bulunan iki prolin rezidüsünden hidroksiller. Hidroksillenen HIF1- α proteini von Hippel Lindau(vHL) proteini tarafından tanınarak Cullin2 E3 ligaz kompleksi tarafından proteazomal parçalanmaya gönderilir (Şekil 12). İlginç bir şekilde hipoksik koşullarda da HIF1- α 'nın PHD ekspresyonunu artırarak bir düzenleyici “*feedback*” mekanizmasını tetiklediği gösterilmiştir [46,47].



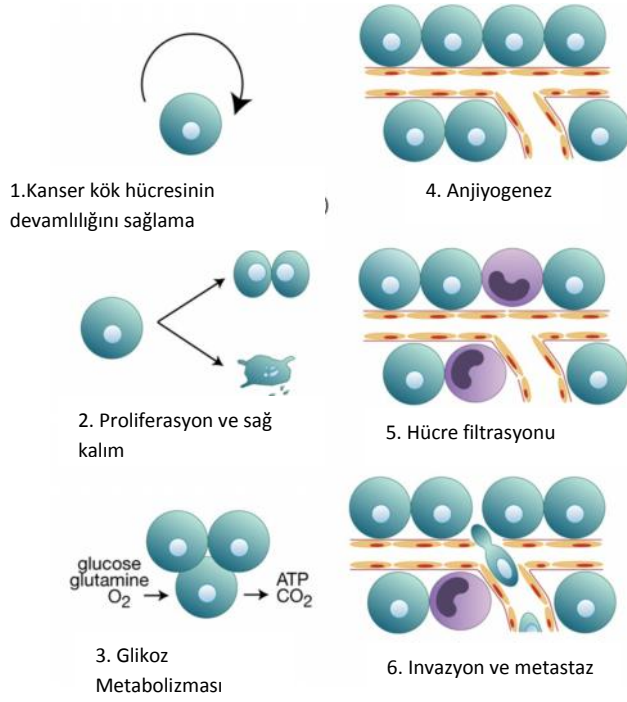
Şekil 12: HIF1- α 'nın Regülasyonu^[48]

Hipoksik koşullarda ise oksijen varlığının az olmasına paralel olarak HIF1 α alt birimi hidroksillenemez. Yine hipoksik koşullarda ortamda bulunan Siah 1-2 E3 ubiquitin ligaz proteinleri de PHD'leri parçalayarak bu sürece katkıda bulunurlar. Stabilitesi artan HIF1 α proteini nükleusa transloke olur ve burada HIF1 β alt birimiyle dimer oluşturur ve CBP/p300

gibi transkripsiyonel koaktivatörlerle etkileşir. HIF1 karsinogenez sürecine katkıda bulunan pek çok genin ekspresyonunu başlatır(Şekil 2.4). Bu genler arasında hücre sağ kalımı, hücre proliferasyonu, glikoz metabolizması, anjiyogenez, pH regülasyonu, invazyon ile ilgili genler sayılabilir^[46, 49].

HIF1'in Kansерleşme Sürecine Etkisi Temel Olarak 6 başlıkta incelenebilir (Şekil 13):

1. Glukoz metabolizması: HIF1 hücrenin enerji metabolizmasını yeniden programlar. Hücre temel enerji metabolizmasını oksidatif solunumdan glikolize yani anaerobik solunuma doğru yönlendirir. Bunu glikoz taşıyıcılar, glikolitik enzimlerin aktivasyonunu başlatır. Yine NADH'ı serbest bırakan LDHA 'nın ekspresyonunu artırır ve ROS artışını inhibe eder.
2. Hücre sağkalımı: Hücrede Myc, PI3K gibi genlerin aktivasyonunu başlatarak hücre sağkalımını sağlar.
3. Hücre invazyonu ve metastazı: HIF1 epitelyal mesenşimal dönüşüm (EMT) sürecinde rol alan genlerin ekspresyonunu başlatır. Hücrede E-kadherin ekspresyonunu baskımlarken invazyon ve metastazla ilgili "*Basic Loop-Helix-Loop Transcription Factor1*" (Twist), Snail ve Lizil Oksidaz (Lox) gibi proteinlerin ekspresyonunu artırır.
4. Anjiyogenez: Hücrede anjiyogenez sürecini başlatan VEGF, Platelet Kökenli Büyüme Faktörü(PDGF) genlerinin ekspresyonunu indükler.
5. Kansер Kök Hücrelerinin Devamlılığını Sağlar: Hücrede farklılaşmamış hücrelerin bu durumda kalmalarına yardımcı olur ve bu süreçle ilgili Notch, Myc, Wnt yolaqlarını aktivasyonuna ve devamlılığını sağlar. Tümör hücrelerinde Oct4, Wnt ekspresyonunu indükler.
6. Hücre infiltrasyonu: Anjiyogenez sırasında hücrelerin migrasyonunda rol alan Kemokin (C-X-C motifi) Reseptör 4 (CXCR4), Stromal Hücre Türevli Faktör 1 (SDF1) genlerinin ekspresyonunu başlatır^[46,49].



Şekil 13. HIF1'in Kanser Gelişimi Üzerine Etkisi^[46]

HIF1 kanserleşme sürecinde kritik rol alan bir proteindir. Bu açıdan HIF1'in regülasyonu önemlidir. HIF1'in parçalanmasında Cul2 ubikutin E3 ligazlar görev yapmaktadır^[48].

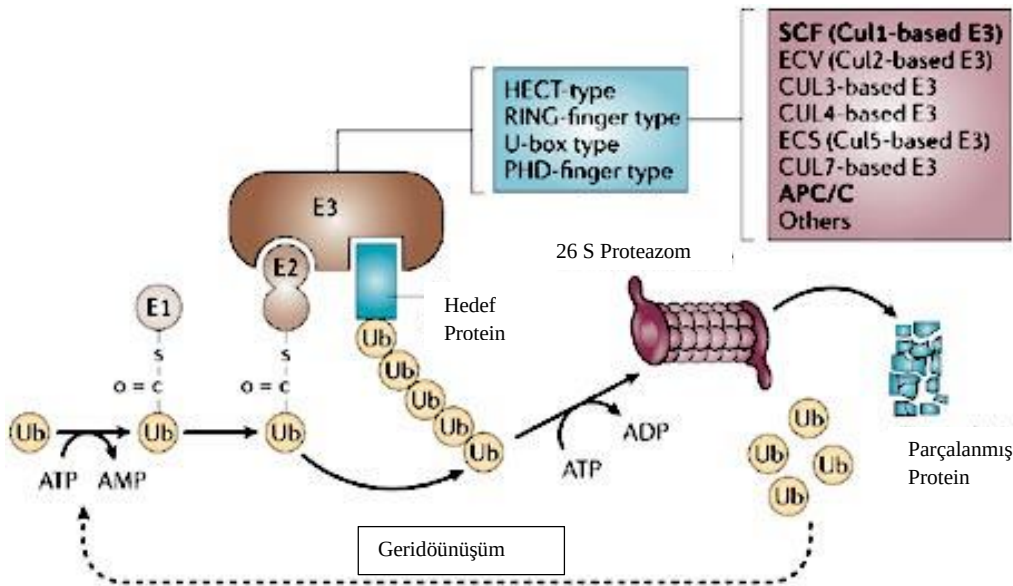
2.5 Ubikütün E3 Ligazlar

Ubikütün proteozom sistemi protein parçalanmasını düzenleyen en temel yolaktır. Hücre döngüsü, hücre içi taşımada, hücre içi sinyal yollarında, transkripsiyon ve translasyon, DNA tamir mekanizmalarında iş gören bir mekanizmadır^[50].

Ubikütün(Ub) 76 aminoasitten meydana gelen ve bütün ökaryotlarda korunmuş bir proteindir. Hedef proteindeki lizin rezidisüne karboksi ucundaki glisin rezidüsü aracılığıyla monomer ve ya polimer olarak bağlanır. Ubikütinasyon üç basamaktan oluşur ve bu üç basamak E1, E2 ve E3 olarak adlandırılan üç farklı enzim tarafından gerçekleştirilir (Şekil 14)^[50].

1. E1 Ub aktive edici enzim ATP harcararak Ub proteinini tiyoester bağı aracılığıyla kendine bağlar.

2. E2 Ub konjuge edici enzim: Ub'yi E1 ligazdan E3 ligaza aktarır. E2 enzimleri, E1 enzimlerine göre daha çeşitlidir. E2 ubikutin konjuge edici enzimler aynı zamanda ne tip Ub zinciri oluşacağını da belirlerler. Ub proteininde 7 farklı lizin vardır ve poliubikuitin zincirleri bu lizinlerden herhangi birine bağlanarak oluşturulabilir. Bilinen zincirler K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 lizinlerine bağlanan poli- Ub zincirleridir. Oluşan zincir tipi ubikutin fonksiyonunu da belirler. K48 rezidüsüne bağlanan en az 4 ubikutin proteini hücresel proteinleri 26S proteozom sistemi tarafından parçalanmaya gönderir. Buna karşın K63 rezidüsüne bağlanan mono ve ya poli- Ub hücre içi sinyalleşmede rol alır mesela DNA tamiri, hücre içi sinyal iletimi gibi.
3. E3 Ub ligazlar: Ub'nin bağlanacağı spesifik hedef proteinini belirleyen kısımdır. E3 ligazlar bu nedenle çok çeşitlidir. E3 ubikutin ligazlar ubikutin hedef proteine aktarılmasını sağlarlar. Ub bağlanan hedef protein ise 26 S proteazom sistemi tarafından parçalanmaya gönderilir. Bugün bilinen E3 ligazlar dört gruba ayrılmaktadır: “Homologous to E6AP Carboxy Terminus” (HECT), “Really Interesting New Gene” (RING), “UFD2 homology” (U-box), “PHD-finger type” proteinleridir. Veri analizlerine göre HECT ve U-box, PHD ailesi sayıca RING ailesinden daha azdır^[50-52].



Şekil 14. Ubikutin-Proteazom Yolağı ^[53]

a. HECT Tipi E3 Ligazlar

Bu tip E3 ligazlar C terminal bölgesinde korunmuş yaklaşık 350 aminoasit uzunluğunda bir HECT domaine sahiplerdir. HECT E3 ligazlar intrinsik katalitik aktiviteye sahiptir. HECT E3 ligazlar ubiquitinle etkileşerek bunu substrata aktarır. (Şekil 15.a). Bilinen HECT E3 ligazlara örnek olarak İnsan Papilloma Virüsü(HPV) ile etkileşen E6-AP, Huwe1, Itch, Smurf1 ve Smurf2 sayılabilir^[54].

b. U-box Tipi E3 Ligazlar

E2 enzimlerinin bağlandığı U-box domainini içeren E3 ligazlardır. En bilinen U-box proteinleri UFD2a ve CHIP' tir, bunlar hücrede şaperonlarla etkileşerek hücre içerisindeki hasarlı proteinlerin parçalanmasında görev alırlar^[55].

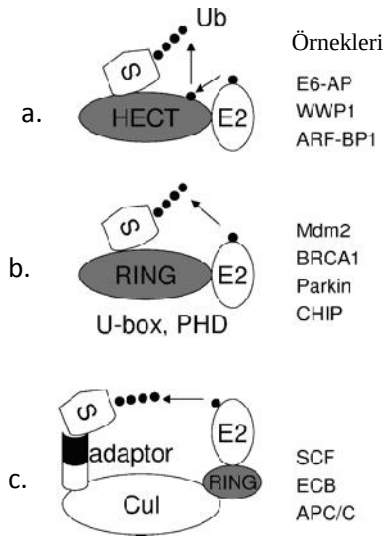
c. PHD Tipi E3 Ligazlar

Bitki homeodomaini(PHD) içeren E3 ligazlardır. PHD domainleri yapısal olarak RING tipi domainlere benzerler. Merkezi bölgede çinko atomu içerirler. PHD E3 ligazlar daha çok nükleusta bulunurlar ve kromozomal proteinler (örn. histonlar) ve transkripsiyonel proteinlerin regülasyonlarını düzenlerler^[56]. PHD tipi E3 ligazlara örnek olarak Herpes virusün MIR1/2 proteinleri örnek verilebilir, bu proteinler konak hücredeki MHC sınıf 1 proteinlerini ubiquitinleyerek proteazomal parçalanmaya gönderirler^[57].

d. RING Tipi E3 Ligazlar

RING domaini içeren E3 ligazlardır. RING domain sistin ve histidin motiflerinden ve onların çapraz olarak tuttuğu iki çinko atomundan meydana gelir. RING domaini E2 enzimiyle etkileşimi sağlar. Ancak HECT E3 ligazlardan farklı olarak Ub'le bağ kurmaz, E2 enzimiyle hedef proteini yaklaştırarak Ub'nin E2'den direkt hedef proteine aktarılmasını sağlar(Şekil 15.b) ^[58].

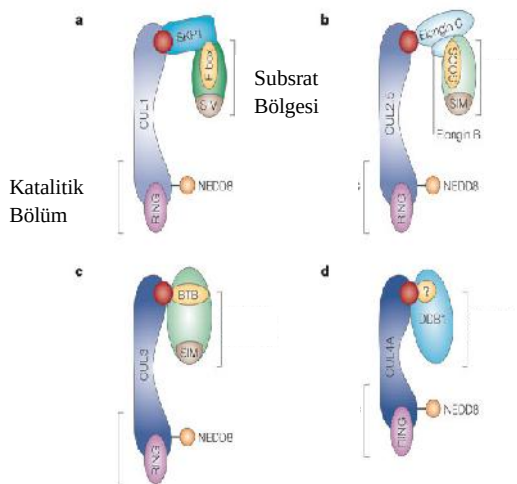
RING E3 ligazlar büyük bir ailedir. RING ligazlar yapısal olarak tekil ve ya çoğul alt birimlerden meydana gelmişlerdir. Dimerik yapı da oluşturabilirler. E3 Bu grubun üyeleri arasında Cullin ailesi (Şekil 15.c), Anafaz Tetikleyici Kompleks (APC), CBL ailesi, MDM2, BRCA1 sayılabilir ^[58].



Şekil 15. Ubikutin E3 ligazların işleyişleri: HECT tipi E3 ligazlar(I), RING tipi E3 ligazlar(II), RING tipinden olan Cullin E3 ligazlar(III)^[59]

2.6 CULLIN E3 LİGAZLAR

Cullin ailesi proteinleri bütün ökaryotlarda (*İnsan*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *bitkiler...*) tanımlanmıştır. Cullin ailesinin CUL1, CUL2, CUL3, CUL4A, CUL4B, CUL5(VACM-1), CUL6, CUL7, CUL8, Parc olmak üzere toplam 10 üyesi vardır(Şekil 16). Çoğu Cullin ubikütin bağımlı proteolizde görev alır. Bu sistemde Ub ile işaretlenmiş protein 26S proteazom tarafından tanınır ,parçalanır. Bu hedefteki proteinlerin Ub ile işaretlenmesini E3 Ub ligazlar katalizlerler. E3 Ub ligazlar hedefteki proteinle E2 Ub konjuge edici enzimi yakınlaştırarak ubikütünin hedef proteine transfer edilmesini sağlar^[60,61].



Şekil 16. Cullin E3 ligazlar^[60]

Genel olarak Cullin E3 ligazları incelerseniz: Cullin proteinlerinin ortada ve iskelet görevi yaptığını görürüz. Yine bu Cullin ligazlar RING domain içeren Rbx1(Roc1 ve ya Hrt1) proteinine sahiptir ve bu kısım E2 enziminin bağlanmasını sağlar. Adaptör proteinler ve hedef proteini tanıyan proteinler ise Cullin çeşitlerine göre farklılık göstermektedir. CUL1 E3 ligazı, CUL1, Skp1, F-box ve Rbx1 proteininden oluşur. Skp1 adaptör proteindir. F-box hedef proteine bağlanmayı, RING domain içeren Rbx1 proteini de E2 ligazın bağlanmasını sağlar. CUL3 E3 ligazı ise CUL3 proteini, Rbx proteini, BTB proteininden oluşur, adaptör protein içermez. CUL4 E3 ligazlar ise CUL4 proteini, Rbx1, adaptör protein DDB1, DDB1 da WD tekrarları içeren SRS proteinlerine bağlanır^[61].

CUL5 E3 ligaz da CUL2'ye benzer ve Elongin B/C içerir ancak Rbx1 yerine Rbx2 içerirken vHL yerine de SOCS box proteini içerirler.

Cullin E3 ligazlar monomer yapıda ve dimer halinde görülebilirler. CUL2 ve CUL5 daha çok monomer yapıda görülürken, CUL1, CUL3, CUL4 daha çok dimer ve ya multimer yapıda görünürler^[61].

2.7 Ub E3 Ligazların Aktivasyonu

NEDD8 proteini kovalent bağla Cullin proteindeki lizin rezidüsüne bağlanır. Bu reaksiyona neddilenme denir. Neddilenme basamaklı bir süreçten oluşur. İlk aşamada NEDD8 C terminalindeki Glisin rezidüsü aracılığıyla olarak E1 aktive edici enzim APP-BP1/Uba3'e bağlanır. Daha sonra Ubc12, E2 konjuge edici enzime aktarılır. Cullin lizin rezidüsü ve NEDD8'in C terminalindeki Glisin rezidüsü arasında izopeptid bağı oluşumuyla sonuçlanır. Mutasyon çalışmaları sonucunda neddilenme bölgesinin korunmuş IVRIMKMR sekansını içerdiği görülmüştür (Şekil 17) ^[62].

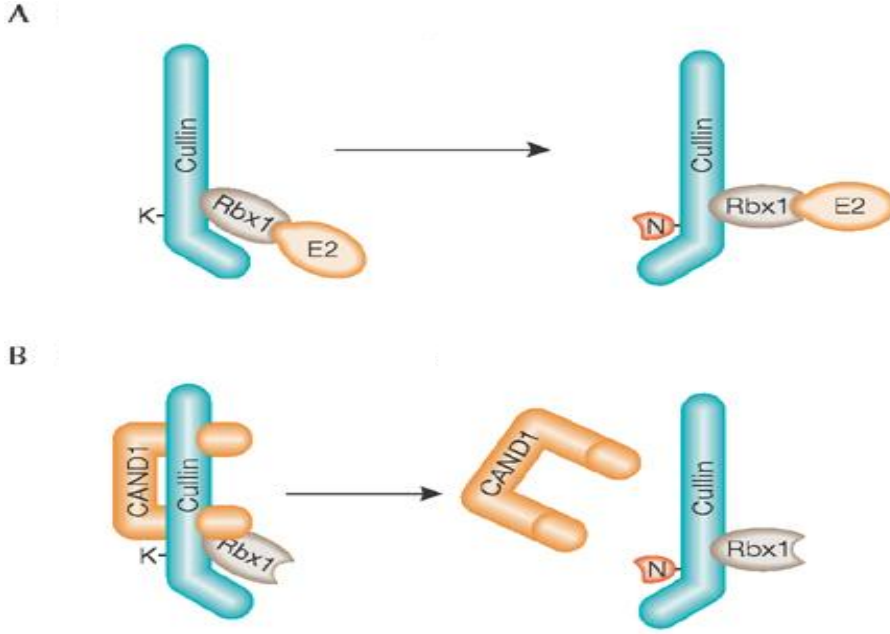
<u>Cullins</u>	<u>Neddylation site</u>	<u>AA #</u>
hCUL1	EEDRKLLIQAAIVRIMKMR--KVLKHQQLLGEV	734
hCUL2	DEDRKMYLQAAIVRIMKAR--KVLRHQIALIQEV	703
hCUL3	DDDRKHEIEAAIVRIMKSR--KKMQHIVLVAEV	726
hCUL4A	FQDRQYQIDAAIVRIMKMR--KTLGHILLVSEL	619
hCUL4B	FQDRQYQIDAAIVRIMKMR--KTLSHILLVSEV	873
hCUL5	VQLRILRTQEAI IQIMKMR--KKISNAQLQTEL	738
hCUL7	LEKRRILLNCLIVRILKAHGDEGLHIDQLVCLV	1592
scCUL8	SQWTQELLKACITRSVKSE--RNGLDYDHLFET	805
Parc	LEQKRILLSCILLVRILKAHGEGKLHIDQLVCLV	1897



Şekil 17. Cullinlerdeki Neddilenme Bölgeleri ve Korunmuş Kısımdaki Nedd8'in Bağlandığı Lizin Aminoasiti ^[62]

Neddilenme proteinleri 3 boyutlu yapısını değiştirerek onların biyokimyasal özelliklerini etkiler. Neddilenmenin Cullin üzerindeki etkileri şunlardır:

NEDD8 bağlanması konformasyonel değişiklikleri uyarır. Neddile olmayan durumda Cullinin C terminal kısmı lup oluşturarak E2 enziminin Rbx bölgesine bağlanmasını engeller. Neddilenme sonucunda C terminal kısmı modifiye olur ve Rbx bölgesine E2 enziminin bağlanmasına olanak sağlar. Buna ilaveten neddilenme Cullin inhibitörü “*Cullin Associated and Neddylation Dissociated*” (CAND1)’i uzaklaştırır. CAND1 120kDa büyüklüğünde çoklu HEAT tekrarlarından oluşmuş bir proteindir. CAND1 proteinin N kısmı Cullinin C terminaline, CAND1’in C kısmı da Cullinin N terminaline bağlanarak Cullin’i sarar ve diğer proteinlerin bağlanmasını engelleyerek Cullin’i inaktifleştirir. Neddilenme sonucunda CAND1 Cullin’e bağlanamaz ve Cullin aktifleşir (Şekil 18) ^[63].

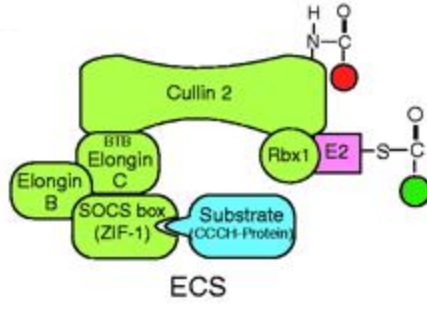


Şekil 18. Neddillenme Cullin'i iki şekilde aktifleştirir. Birinci Cullin'de konformasyonel değişiklikleri uyarak(A), ikincisi CAND1 inhibitör proteinini uzaklaştırarak(B)^[63]

Protein neddillenmesi geridönüşümlü bir olaydır ve geridönüşüm dnedillenme olarak adlandırılır. NEDD8 isopeptidazlar aracılığıyla NEDD8 proteini Cullin'den uzaklaştırılır. En iyi bilinen NEDD8 isopeptidazı CSN5'tir. CSN5, COP9'un altbirimidir. CSN5, JAMM ailesine ait bir metalloproteinazdır. Denedillenme Cullin aktivitesinin doğru bir şekilde regüle edilmesi için gerekli bir reaksiyondur^[64].

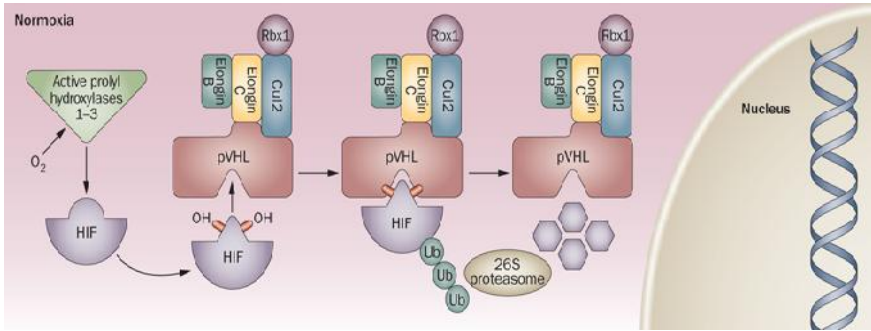
2.8 CULLIN2 E3 Ligaz ve Rolü

CUL2 745 aminoasitten oluşan bir proteindir. CUL2 geni 10.kromozomun 10p11.21 kolunda bulunur^[65]. Cul2, Rbx, ElonginB/C, vHL proteini ile biraraya gelerek CUL2 E3 ligazı oluşturur. Bu ligazın ana iskeletini CUL2 oluşturmaktadır. CUL2 proteinine C ucundan Roc1/Rbx1 proteini bağlanır. C ucu neddilendikten sonra bu kısma E2 enzimi bağlanır. CUL2 proteininin N ucundan ise adaptör Elongin B/C proteini bağlanır. Adaptör proteinlere de hedef proteini tanıyan SOCS box proteinlerine bağlanır. Bu proteinler arasında vHL ve ya "Zinc Induced Facilitator Protein 1" (ZIF-1) sayılabilir(Şekil 19)^[66,67].



Şekil 19. CUL2 Proteinini ^[68]

CUL2 E3 ligazın en iyi bilinen hedef proteini HIF-1 α 'dır. Normoksik koşullarda HIF α proteini Prolil Hidroksilazlar (PHD) tarafından hidroksillenir, hidroksillenen HIF1 α da vHL proteini tarafından tanınır. CUL2 E3 ligazlar HIF1- α 'nın ubikütinasyonuna neden olur ve HIF1- α 'yı proteazomal parçalanmaya gönderir(Şekil 20). Burada vHL proteini HIF1- α 'nın tanınması açısından önemlidir, CUL2 proteini ise HIF1'in parçalanmasında görev yapan CUL2 E3 ligazların ana iskeletidir. CUL2 E3 ligazlar HIF1- α ile Ub'ni taşıyan E2 ligazları yakınlaştırmak HIF1- α 'nın ubikütinlenip 26S proteazom sistemi tarafından parçalanmasını sağlar^[69,70].



Şekil 20: HIF1 α 'nın Cul-2 E3 Ligaz tarafından yıkıma gönderilmesi ^[70]

Hipoksik koşullarda ise PHD'ler çalışmaz bu durumda sitoplazmada biriken HIF1- α nükleusa geçerek HIF1- β ile etkileşir ve HRE domain içeren proteinlerin ekspresyonunu başlatır^[68].

Bunların dışında CUL2 hücre döngüsünün devamlılığını sağlar, *C.elegans*'larda yapılan çalışmalarda CUL2 proteini susturulmuş hücrelerin, hücre döngüsünde ilerleyemedikleri S fazında kaldıkları gözlenmiştir. Bunun CUL2'nin CKI-1 kinazı aracılığıyla yaptığı gösterilmiştir^[69]. CUL2'nin eksikliği erken embriyoda mayoz II anafazını erteler, ve bunun sonucunda mayoz II'den çıkışı geciktirdiği görülmüştür. Buna karşın CUL2

ekspresyonu eksikliğinin mayoz I üzerinde etkisi yoktur^[70]. *cul2(-)* ve *zyg-11(-)* mutantlarının mayoz II aynı etkiye yol açtığı görülmüş, bunun üzerine CUL2 ve ZYG-11 arasında herhangi bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. ZYG-11'in CUL2 tarafından parçalandığı ancak ZYG-11 adaptör proteinin de CUL2 ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. Ancak CUL2 ekspresyonunu nasıl arttırdığı tam olarak bilinmemektedir^[71]. CUL2 yokluğunda siklin B ve C'nin arttığı gözlenmiştir. Bu siklinler daha çok mitotik çıkışta iş gören siklinlerdir, bunların mayozu nasıl etkiledikleri tam olarak bilinmemektedir^[72].

CUL2'nin azalışı *C.elegans*'ta Anterior-Posterior(AP) vücut eksenini de etkilediği gösterilmiştir. *C.elegans*'ta APC/C mutantlarına benzer şekilde *cul2(-)* ve *zyg-11(-)* mutantlarında da AP eksenin olması gerektiğinin tersi biçimde oluştuğu gözlenmiştir. Bunun *cul2(-)* ve *zyg-11(-)* mutantlarının Proteazla aktive olan reseptör 2 (PAR-2)'nin lokasyonunu değiştirerek yaptığı düşünülmektedir^[71,72].

CUL2'nin yokluğu *C.elegans*'ta AP vücut eksenini etkilediği gibi sitoplazmik polariteyi de etkiler. Yapılan çalışmalarda CUL2'nin ZIF1 aracılığıyla olarak embriyonik polaritede görev alan PIE-1, POS-1, MEX gibi proteinlerin stabilitesini etkilediği gösterilmiştir^[70,71,72].

HPV16'nın E7 proteininin aktif olan neddiye CUL2 E3 ligaz kompleksiyle etkileşime girerek retinoblastoma(RB) parçalanmasına yol açtığı gösterilmiştir. Normalde yarılanma ömrü 9 saat olan RB proteininin, HPV enfeksiyonu sonrasında yarılanma ömrü 3 saate düşer. Yapılan çalışmalarda E7 ile etkileşen CUL2 E3 ligaz kompleksinin vHL proteinini içermediği görülmüştür. E7 proteinin C terminalinde CUL2 proteinine bağlanma bölgesi içerir ve bu kısımdan bağlanır^[73].

Fibrojeniz sonucunda hem karaciğerde ECM proteinlerinin birikimi sonucunda hem de karaciğerin yeniden modellenmesinden sonra hipoksik bir ortam meydana gelmektedir. Oluşan hipoksik ortamdaki HIF proteinlerinin stabilitesini arttırmaktadır^[74]. HCC'de HIF1 ve HIF2 proteinlerinin overeksprese oldukları saptanmıştır^[75]. HCC'de HIF ekspresyonu yüksek tümörler daha invaziv ve metastatik özelliktedir, bu tümörlerde rekürrens riski yüksektir^[42,76].

HCC'de HIF1 ve VEGF ekspresyonunun fazlalığı tümörün daha metastatik ve invazif olduğunu göstermektedir^[77]. Bunun dışında HIF1 β -katenin aracılığıyla olarak HCC hücrelerinde invazyonu, metastaz artırır ve EMT'yi tetikler. HCC hücrelerinde yüksek

oranda β -katenin ve HIF1 ekspresyonu kötü prognozla ilişkilidir^[78]. Yine HCC’de HIF1, SNAIL ile etkileşerek EMT’yi tetikler^[79].

HIF1’in parçalanmasında ve inhibisyonunda en çok CUL2 E3 ligazlar görev yapmaktadırlar. Bu açıdan CUL2 E3 ligazlar HIF1 düzeyinin belirlenmesi açısından önemlidir. CUL2 ile HIF1’in vHL proteininden bağımsız olarak da etkileştikleri gösterilmiştir. vHL mutant hücre dizilerinde CUL2 ekspresyonunun siRNA ile baskılanması ile yapılan deneylerde CUL2’nin Aryl hidrokarbon nükleer translokator (ARNT) proteininin üzerinden HIF1 ekspresyonunu etkilediği görülmüştür. Yine CUL2’nin vHL’den bağımsız olarak VEGF ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir^[80]. Ancak Cullin 2 ekspresyonunun ve aktivasyonunun nasıl düzenlendiği henüz tam olarak bilinmemektedir.

Bu tez çalışması kapsamında yukarıda tanımladığımız ön veriler doğrultusunda Cullin2 E3 ligaz’ın ekspresyonunun ve aktivasyonunun düzenlenmesinde HGF c-Met yolağının rolünü inceledik.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan araştırma deneysel nitelikte bir araştırmadır. Araştırmada CUL2 geninin HCC sürecindeki rolü HCC hücre hattı kullanılarak incelenmiştir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma 2010-2013 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışmada insan veya deney hayvanları kullanılmamıştır. Araştırma 12 farklı HCC hücre hattında gerçekleştirilmiştir.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmalarda HuH7, HepG2, Hep3B, PLC-PRF5, SNU398, SNU182, SNU387, SNU449, SNU475, SK-Hep1, MV hücre hatları kullanılmıştır.

3.5. Araştırma Değişkenleri

HCC hücre dizilerine farklı doz ve sürelerde CoCl₂, Heparin, HGF ve H₂O₂ uygulaması yapılmıştır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1 Hücre Kültürü

SK-Hep1, HuH7, HepG2, Hep3B, MV hücreleri %10 Fötal bovin serum (FBS, Biological Industries, 04-127-1A), 2mM L-Glutamin (Biological Industries, 03-020-1B), 100µg/ml penisilin ve 0.1mg/ml streptomisin (Biological Industries, 03-031-1B), %1 esansiyel olmayan aminoasit (Biological Industries, 01-340-1B) içeren “*Dulbecco’s Essential Medium*” (DMEM, Biological Industries, 01-050-1A) içerisinde yetiştirildi. PLC-PRF5 hücreleri aynı koşulda fakat %20 FBS içeren ortamda yetiştirildiler. SNU449, SNU182 hücreleri ise %10 FBS, 2mM L-glutamin, 100u/ml penisilin ve 0.1mg/ml streptomisin, %1 esansiyel olmayan amino asit içeren “*Roosevelt Park Memorial Institute Medium 1640*” (RPMI-1640) (Biological Industries, 01-104-1A) içerisinde yetiştirildi. Hücre kültürü işlemleri laminar

kabinette (Thermo,1300 Series A2) gerçekleştirilirken, hücreler besi ortamları içerisinde 37°C’de ve %5 CO₂ varlığında hücre kültürü inkübatörü (Thermo, Forma 310) içerisinde yetiştirildiler. Yetiştirilen hücrelerin yoğunlukları belli aralıklarla faz-kontrast mikroskobu (Olympus, CX-41) ile kontrol edildiler. Tüm çalışmalarda %70-80 yoğunluktaki hücreler kullanıldı.

3.6.2 Hücre Pasajlanması

Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştıncaya hücre besi ortamları çekildi. Hücreler iki defa 1X Fosfat buffer salin (PBS)^[ek.1] (pH 7.4)le yıkandı. Hücreler “*Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic acid*” (EDTA) (Biological Industries, 03-052-1B) içerisinde iki ile üç dk 37°C’de bırakıldı. Faz kontrast mikroskobunda hücrelerin yüzeyden ayrıldığı belirlendikten sonra hücrelerin üzerine eklenen Trypsin-EDTA miktarının 2-3 katı kadar besi ortamı eklendi. Deneyin gerektirdiği uygun hacimdeki hücre kaplarında (Corning 430641 ve ya 430639) büyütüldüler.

3.6.3 Hücre Çözülmesi ve Dondurulması

Hücrelerin Dondurulması

Belli bir yoğunluğa ulaşmış hücreler iki defa 1X PBS (pH 7.4) ile yıkandı. Hücreler Trypsin-EDTA içerisinde 2-3 dk 37°C’de bırakıldı ve daha sonra eklenen tripsin miktarının üç katı kadar besi ortamı eklendi. Besi ortamı içerisindeki hücreler iyice pipetlendi ve 15 ml tüp (Corning, 430766) içerisine alındı. 600g’de 5dk santrifuj yapıldı ve santrifujlendikten sonra hücreler çökerek pellet oluşturdu. Dondurma ortamı %20 FBS, %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Appllichem, A3672,0100) içeren DMEM ve ya RPMI-1640 içerisinde taze olarak hazırlandı ve +4°C’de soğutuldu. Santrifuj sonrasında test tüpündeki üst sıvı faz çekilerek uzaklaştırıldı, hücre pelleti üzerinde dondurma ortamı eklendi ve pellet iyice pipetlenerek dağıtıldı. Hücre süspansiyonu daha sonra 1-1.5ml olarak hücre dondurma kaplarına (Greiner,122278) dağıtıldı, dakikada -1°C soğutan özel kutularda (Nalgene,5100-0001) -80°C derin dondurucuya (Thermo Fisher, Forma 88000) kaldırıldı ve bir gece bekletildi. Hücreler daha sonra kullanılıncaya kadar sıvı azot tankında (-196°C, Thermo) saklandı.

Hücrelerin Çözülmesi

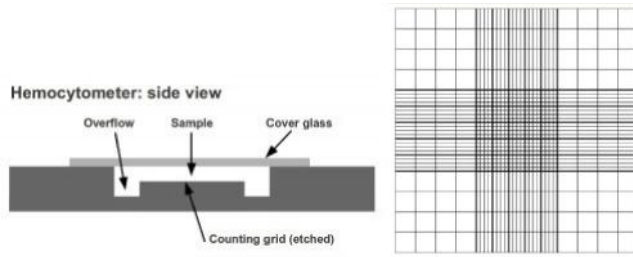
Sıvı azottan çıkarılan hücreler 37°C’de su banyosunda (Nuve, nb-5) kenarları çözülene kadar bekletildi. Çözülen hücreler, içerisinde 37°C’de ısıtılmış ortam bulunan tüplere

aktarıldı. DMSO'nun uzaklaştırılması için 600g'de 5dk santrifuj edildi. Üstteki sıvı faz çekilerek, altta kalan hücre pelleti besi ortamıyla tekrar süspanse edildi. Daha sonra hücreler hücre kültür kabına aktarıldı.

3.6.4 “Trypan Blue” Yöntemiyle Hücre Sayımı

Hücre sayısı “trypan blue” yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla hücreler iki kez 1X PBS ile yıkandıktan sonra tripsin ile muamele edilmiştir. Hücreler kalktıktan sonra besi ortamı eklenmiş ve hücreler bir test tüpünde toplanmıştır. Elde edilen hücre süspanسیونuna 2:2:1 oranında olacak şekilde “trypan blue”, PBS ve hücre süspanسیونu eklenmiş ve bu karışımdan 10 µl alınıp hemositometre (Neubauer) içerisine konulduktan sonra hücre sayımı yapılmıştır (Şekil 21).

$$\text{Hücre sayısı/ml(toplam)} = \text{sayılan hücre sayısı} / 5 \times 10^4 \times \text{dilüsyon faktörü}$$



Şekil 21: Hemositometre ve hücre sayım alanı^[81]

3.6.5 Kobalt klorit(CoCl₂) Uygulaması

CoCl₂ hipoksiyi taklit ettiği bilinen bir kimyasaldır^[82]. CoCl₂ HIF1 ile vHL arasındaki bağlantıyı engelleyerek normoksik koşullarda HIF1α'nın stabilizasyonuna yol açtığı bilinmektedir^[83].

Çalışmamızda kimyasal hipoksi oluşturmak amacıyla CoCl₂(Sigma, C8661) kullanıldı. İstenen konsantrasyon için CoCl₂ gerekli miktarlarda tartılıp distile su içerisinde çözüldü^[EK.2].

%70-80 yoğunluğa ulaşan hücreler %2 FBS içeren DMEM içinde 16 saat starvasyona bırakıldı. Doz bağımlı etkiyi incelemek için 25-400mM değişen dozlarla ve zamana bağımlı etkiyi incelemek için de 0-36 saat arası değişen sürelerle CoCl₂ ile muamele edildi.

3.6.6 Heparin Uygulaması

Heparin (Calbiochem,375093), 1mg/mL olacak şekilde 1X PBS içerisinde çözülerek kullanıldı. Hücreler uygun yoğunluğa ulaştığında %2 FBS içeren DMEM içinde 16 saat starvasyona bırakıldı. Doz bağımlı etkiyi belirlemek amacıyla kültür kaplarına 1, 10, 100µM olacak şekilde Heparin eklendi^[EK.3]. Zaman bağımlı etkiyi belirlemek için hücreler 100µM Heparinle değişik sürelerde 0, 15', 30', 1h, 2h, 6h, 12h, 24h sürelerde muamele edildi.

3.6.7 HGF Uygulaması

Uygun konfluensiye gelen hücreler %2 FBS'li ortamda 16 saat serum açlığına bırakıldıktan sonra stok konsantrasyonu 2300ng/µl olan HGF (R&D), Tris-BSA içinde sulandırıldı ve son konsantrasyonu 10ng/ml olacak şekilde kullanıldı^[EK.4]. Zaman bağımlı etkinin incelenmesi için hücreler 0, 3, 6, 12, 24h sürelerle HGF ile muamele edildi.

3.6.8 H₂O₂ Uygulaması

Uygun yoğunluğa gelen hücreler %2 FBS içerisinde 16 saat serum açlığına bırakıldı. Daha sonra bu hücrelere 24 saat 0, 125, 250, 500µg/ml dozlarda H₂O₂ uygulaması yapılmıştır.

3.6.9 RNA İzolasyonu

Hücreler 6cm²lik hücre kültür kaplarına ekilerek yetiştirildi. Uygun yoğunluğa gelen hücrelerden Trizol (TRITidyG, ApplichemA40510100) RNA izole edildi. RNA izolasyonundan önce izolasyonda kullanılacak eppendorflar ve hücre kazıyıcıları DEPCli suyun(Sigma, D5758) içerisinde 1 gün bekletilerek RNaz ve DNazlardan arındırıldı. Daha sonra malzemeler DEPC'in uzaklaştırılması için otoklavlandı. İzolasyon yapılacak yüzey ve eldivenler RNase Away (Sigma, 89931) ile temizlenerek RNA ve RNaz kontaminasyonundan arındırıldı.

RNA izolasyon basamakları

1. Hücre kültürü kapları buz üzerine alındı.
2. Besi ortamları uzaklaştırıldı ve hücreler üç defa 1X PBSle yıkandı.
3. 1 ml Trizol eklendi.
4. Hücreler kazıyıcılarla kazınarak 2 ml'lik eppendorflara aktarıldı.
5. 200µl kloroform eklendi.
6. Buz üzerinde 15 dk bekletildi.

7. 8000 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifuj edildi.
8. Üstteki RNA fazı çekilerek 1.5ml'lik eppendorflara aktarıldı.
9. RNA miktarı kadar isopropanol eklendi.
10. Bir gece boyunca -20°C'de inkube edildi.
11. Ertesi gün 12000 rpm'de 15 dk santrifuj edildi.
12. Üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldı.
13. 1ml Ethanol eklendi ve ters yüz edilerek karıştırıldı.
14. 12000 rpm'de 15 dk santrifuj yapıldı.
15. Üstteki sıvı kısım atıldı, pellet kurumaya bırakıldı.
16. 50µl DEPC'li su eklendi.
17. 60°C'de beş dakika inkube edilerek pelletin çözünmesi sağlandı. Daha sonra örnekler -80°C'de saklandı.

3.6.10 Elde edilen RNAların Konsantrasyonlarının Ölçümü

Elde edilen RNAların konsantrasyonu ve saflığı 260 nanometre(nm) ve 280 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kontrol olarak DEPC'li su kullanıldı, RNA örneklerinin picodrop (Pico100,Picodrop) ve ya nandrop (ND-1000, NanoDrop) cihazında konsantrasyon ve saflığı belirlendi.

3.6.11 cDNA Sentezi

RNA'nın optimum saflık değeri A260/A280'de 1.8 ile 2.0 var olan RNA'lardan 2µg alındı. cDNA sentez kiti (Fermentas, K1622) kullanılarak cDNA sentezlendi.

cDNA İzolasyon Basamakları

Reaksiyon PCR tüpü içerisinde ve buzun üzerinde hazırlandı.

1. 2µg olacak hacimde RNA alındı.
2. RNA hacmiyle birlikte total hacim 10µl olacak şekilde DEPC'li su eklendi.
3. 1µl OligodT primer(0,5µg/µl) ve 1µl random hekzamer(0.2µg/µl) eklendi.
4. Spin edildikten sonra yetmiş derecede 5 dk inkübe edildi. Buz üzerinde 5dk bekletildi.
5. 4µl 5X reaksiyon tamponu eklendi.
6. 1µl Ribonükleaz inhibitörü(20ug/µl) eklendi.
7. 2µl 10mM dNTP karışımı eklendi.
8. Spin edildikten sonra yirmi beş derecede 5 dk inkube edildi.

9. 1µl Revert Aid M-MuLV Revers Transkriptaz eklendi.
10. Hazırlanan karışım 10dk 25°C, 60dk 42°C, 10dk 70°C PCR makinasında(Teche, TC-512) inkübe edildi.
11. Elde edilen cDNAlar -20°C'ye kaldırıldı.

3.6.12 Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR)

Tek zincirli cDNA sentezinden elde edilen cDNAlar CUL2 genine spesifik primerler (Tablo1) kullanıldı. İnternal kontrol geni olarak da Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GADPH) (Tablo 4) kullanıldı. Her bir cDNA'dan 2µl alınıp spesifik primerler kullanılarak CUL2 için Tablo 2 ve 3'teki ve GADPH için Tablo 5 ve 6'daki optimize koşullarda PCR sentezi gerçekleştirildi.

CULLIN2 PCR

Tablo 1. Cullin2 primerleri

Forward	5'AAGCCGTGGTCATGTTGGAATACG3'
Reverse	5'TCGGAGCAGCATTCGGATAAGGAT3'

Tablo 2. CUL2 RT-PCR'da Reaksiyon Koşulları

	Son Konsantrasyon
dH ₂ O	
dNTP	0.2mM
Primer reverse	0.4 pmol/µl
Primer forward	0.4 pmol/µl
MgCl ₂	1.5 mM
10X Taq Buffer	1X
Taq enzim	1.25U
cDNA	2µl

Tablo 3. CUL2 PCR Reaksiyonu

Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
95°C	5dk	1
95°C	30sn	30
55°C	40sn	
72°C	40sn	
72°C	7 dk	1

Tablo 4. GADPH Primerleri

Forward	5'GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT 3'
Reverse	5'CAGCCTTCTCATGGTGGTGGTGAAGA 3'

Tablo 5. GADPH RT-PCR Reaksiyon Koşulları

	Son Konsantrasyon
dH ₂ O	Hacmi 20µlye tamamlayacak şekilde eklendi.
dNTP	0.4mM
Primer reverse	0.25 pmol/µl
Primer forward	0.25 pmol/µl
MgCl ₂	1.5 mM
10X Taq Buffer	1X
Taq enzim	1.25U
cDNA	2µl

Tablo 6. GADPH PCR Reaksiyonu

Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
95°C	5dk	1
95°C	40sn	28 siklus
58°C	30sn	
72°C	40sn	
72°C	7 dk	1

3.6.13 Agaroz Jel Elektroforezi

1X Tris-Asetat EDTA (TAE) ^[EK.5] buffer içerisinde %2'lik agaroz(Sea Kem LE Agarose, Lonza) içeren jel hazırlandı ve içerisine 1µg/ml Ethidium bromide (EtBr) (Sigma,E5134) konuldu. PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler 6X yükleme tamponu(Fermentas,R1151) içerisinde jele yüklendi. Jel 100V'da 50dk yürütüldü. Yürütmeden sonra jel UV ışık altında (Vilber Lourmat) görüntülendi.

3.6.14 Protein İzolasyonu

Hücreler 10cm²lik hücre kültürü kaplarında yetiştirildi. Uygun yoğunluğa ulaşan hücreler hücre kazıyıcıları ile kazındıktan sonra fosfotaz ve proteinaz inhibitörleri içeren “Radioimmunoprecipitation assay buffer” (RIPA) buffer^[EK.6] ile bu hücrelerden protein izolasyonu yapıldı.

Protein İzolasyon Basamakları

İzolasyon öncesi yıkamalarda PBS içerisine son konsantrasyonu 0,1mM olacak şekilde sodyum orthovanadate (Na₃VO₄) ve sodyum florid (NaF) fosfataz inhibitörleri konuldu. Lizis buffer olarak modifiye RIPA buffer kullanıldı. Lizis buffer içerisinde Na₃VO₄, NaF fosfataz inhibitörleri ve proteaz inhibitör kokteyli (Roche, 11836153001) bulunmaktadır.

1. Hücre petrilere buz üzerine alındı.
2. Besi ortamları çekilip, petrilere üç kez soğuk 1X PBS'le yıkandılar.
3. 1 ml PBS konulup, hücre kayıcısıyla petrideki hücreler kazındı.
4. Elde edilen süspansiyon ependorfa transfer edildi.
5. Beş dakika 5000 rpm'de +4C'de santrifuj edildi.
6. Üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldı.

7. Altta kalan pelletin iki üç katı kadar lizis buffer konuldu ve pellet pipetlenerek lizis bufferla karıştırıldı.
8. Buz üzerinde yarım saat boyunca her beş dk'da bir vorteklenerek bekletildi.
9. +4C'de 13200 rpm'de 20 dk santrifuj yapıldı.
10. Üstteki sıvı kısım alınarak soğutulmuş ependorflara kondu, -80C'ye kaldırıldı.

3.6.15 “Bicinchoninic Acid Assay” (BCA) Yöntemiyle Protein Konsantrasyon Tayini

BCA protein ölçüm kiti (Pierce,23227) kullanılarak proteinlerin konsantrasyonu ölçüldü. Method Cu^{+2} katyonunun protein tarafından Cu^{+1} 'e indirilmesi ve bunun sonucunda örneğin renk değiştirmesi üzerine kuruludur. Kolorimetrik bir yöntemdir. Proteinlerin konsantrasyonunun hesaplanmasında ve standard grafiğinin çizilmesinde Bovin Serum Albumin (BSA) proteini kullanıldı(Tablo 7).

BCA kitindeki reaktif A ile reaktif B 50:1 oranında karıştırıldı.

Tablo 7 BSA Standard Eğri için Kontrollerin Hazırlanması Tablosu

BSA konsantrasyon($2\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	BSA miktar(μl)	dH ₂ O(μl)
0	0	16
2	1	15
4	2	14
8	4	12
16	8	8
32	16	0

Her bir kuyucuğa reaktif karışımından eklendi ve 37°C'de 30 dk inkube edildi. Daha sonra 562nm'de spektrofotometrede (Thermo, Varioskan) okutuldu. Spektrometrede ölçülen OD değerlerine göre standartların konsantrasyon-absorbans grafiği çizildi. Grafiğin eğimini kullanarak örneklerin absorbanslarından örneklerin konsantrasyonlarını hesaplandı.

3.6.16 Western Blotlama: Proteinlerin Hazırlanışı

Protein örnekleri 2X ve ya 4X yükleme tamponuyla ^[EK.7] 95°C’de 5 dk kaynatıldı.

3.6.17 SDS-PAGE Jelin Hazırlanışı

Protein örneklerinin büyüklüklerine uygun %8’lik SDS-PAGE jel (Tablo 8) döküldü.

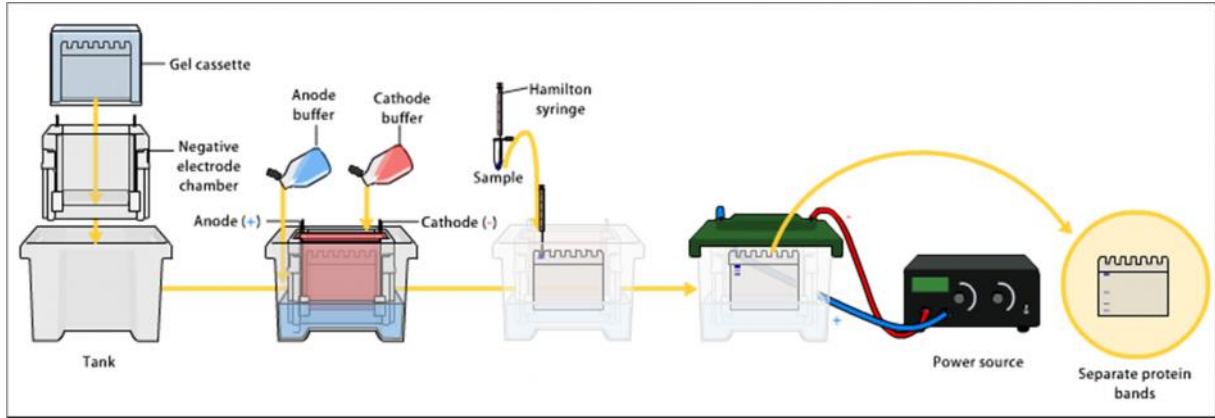
Tablo 8. %8lik SDS-PAGE Jelin Hazırlanışı

Ayırıcı Jel(%8lik ve 10ml için) ^[EK.8]	Ml
dH2O	4.6
1.5M Tris pH 8.8	2.6
%30 Akrilamid-Bisakrilamid Karışımı	2.6
%10 SDS	0.1
%10 APS	0.1
TEMED	0.01

Toplayıcı Jel (%5 ve 3ml için) ^[EK.9]	Ml
dH2O	2.1
1.0M Tris pH 6.8	0.38
%30 Akrilamid-Bisakrilamid Karışımı ^[EK.14]	0.5
%10 SDS	0.03
%10 APS	0.03
TEMED	0.003

3.6.18 Proteinlerin SDS-PAGE Gelde Yürütülmesi

Jeller donduktan sonra tankın içerisinde yürütme tamponu^[EK.10] içinde yürütüldü. Molüküler ağırlık markerı olarak önceden boyanmış 10-170 kDa markerlar ve ya 20-120 kDaluk markerlar (Fermentas, SM0671 ve ya SM0441) kullanıldı. Jel toplayıcı jeli geçene kadar 70V, 25mA’de, ayırıcı jeli geçtikten sonra ise 110V, 25mA’de yürütüldü (Şekil 23).



Şekil 23. Western blotun jel elektroforez aşamasının şematize gösterimi^[84]

3.6.19 Proteinlerin Poliakrilamid Jelden PVDF Membranlara Transferi

Jel yürüdükten sonra transfer aşamasına geçildi. Transfer için her jel başına uygun büyüklükte 1 adet PVDF membran(Millipore, Immobilon IPFL00010), 2 adet whatman kağıdı (Pierce,88600) kullanıldı. PVDF membran metanolle ıslatıldı. Transfer kaseti içerisinde anot kısmından katoda doğru sırasıyla sünger, whatman kağıdı, jel, membran, whatman kağıdı, sünger olacak şekilde kaset hazırlanmıştır(Şekil 24). Transfer aparatında transfer tamponu^[EK.11] içerisinde 3 saat 300A’de transfer işlemi gerçekleştirilmiştir(Şekil 25).



Şekil 24. Western blotta transfer kasetinin hazırlanışı: Eksi kutuptan artı kutba doğru sünger-whatman kağıdı-jel-membran-whatman kağıdı-sünger olacak şekilde hazırlanır^[85].

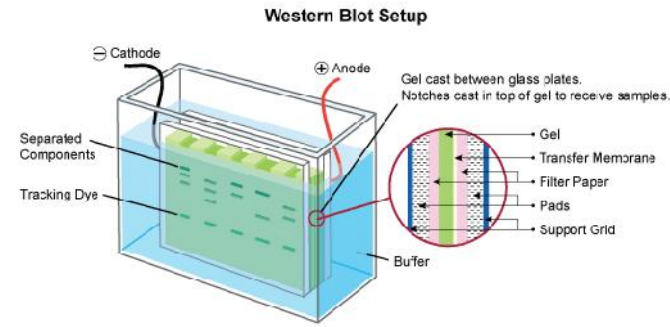


Diagram 1: Illustration of Western Blot Setup.

Şekil 25. Western blot transfer aşamasının şematize gösterimi^[86]

3.6.20 Blotlama

Transferden alınan membran optimize edilen BSA (Amresco,0903)^[EK.12] ve ya NFDM (Amresco, M203)^[EK.13] içerisinde uygun konsantrasyonda oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Cullin2 antikorlu çalışmak için membran %5 BSA, %0.1 TBST^[EK.17] içerisinde, Kalneksin için %5 NFDM, %0.1 TBS-T içerisinde oda sıcaklığında 1 saat bloklandı.

3.6.21 Primer ve Sekonder Antikorla Muamele

Bloklama solüsyonundan alınan membran optimize koşullarda primer antikorlarla muamele edildi. Cullin2(Santa Cruz, H-300, sc-10781), Kalneksin(Santa Cruz,sc-11397) antikorlarıyla çalışıldı. Membran %3 BSA, %0,1 TBST içerisinde 1:2000 CUL2^[EK.24] antikorlu ile gece boyunca +4°C’de inkube edildi.

Ertesi gün 3 defa 5-10 ml TBS-T ile yıkandı. %3 BSA, %0,1 TBST içerisinde 1:1000 HRP-konjuge anti-rabbit sekonder antikoruyla (Thermo, 1858414) 2 saat oda sıcaklığında inkube edildi. 5 defa 5-10ml TBS-T ile yıkandıktan sonra görüntüleme aşamasına geçildi.

3.6.22 Proteinlerin Membran Üzerinde Saptanması

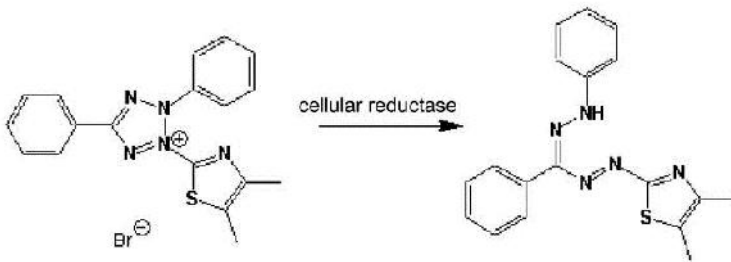
Bu amaçla kemoluminasans görüntüleme yöntemi kullanıldı (Thermo Sci Supersignal West Pico, West Dura,37071). Uygulama öncesi kit içerisindeki luminol ile peroksit tamponu 1:1 oranında karıştırıldı ve her bir membranın üzerinde 1ml olacak şekilde eklendi ve yayıldı. Görüntüleme için membranın üzerine film (Kodak,5256441) konulduktan sonra 1-30 dk beklendi. Filmler karanlık odada sırasıyla developer-fiksatif-deterjan(Kimetsan Kimya Maden)^[EK 21-22] solüsyonlarından geçirildi.

3.6.23 Membranların Yükleme Kontrolü Olarak Calnexinle Muamele Edilmesi

CUL2 antikoru çalışıldıktan sonra aynı membran üzerinde yükleme kontrolü olarak Calnexin kullanıldı. Bu amaçla daha önce çalışılmış antikorlar membrandan uzaklaştırıldı. Bunun için temizleme tamponu (strip buffer^[EK 19]) hazırlandı. Membran bu tampon ile beş defa 5-10dk boyunca inkübe edildi. Daha sonra membran PBS ile 2, TBS-T ile 2 kez yıkandıktan sonra oda sıcaklığında bir saat bloklandı. Daha sonra Calnexin antikoruyla^[EK 24] bir gece boyunca +4C’de inkübe edildi, ertesi gün TBST ile yıkandıktan sonra 2 saat oda sıcaklığında anti-tavşan sekonder antikoruyla muamele edildi. Yıkamalardan sonra kemoluminasan solüsyonlarıyla bantlar görüntülendi.

3.6.24 MTT Assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole)

Hücrelerin proliferasyonu MTT yöntemiyle spektrofotometrik olarak belirlendi. MTT yöntemi sarı renkli tetrazolium tuzunun (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) mitokondri enzimleri tarafından mor formazan kristallerine indirgenmesi üzerine kurulmuştur^[87]. MTT(Sigma, M2003) solüsyonu 5mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı^[Ek.23](Şekil 26).



Şekil 26. MTT kristalleri

Deney laminar kabinette yapılmış ve steril 96 kuyucuklu plaklar (Corning Costar, CLS3596) kullanılmıştır. Deney için HuH7 ve SK-Hep1 hücre hatları yetiştirilmiştir.

1. 96 kuyucuklu hücre kültür kabının her bir kuyucuğuna 100 µl ortam içerisinde 5000 hücre ekildi.
2. Ekilen hücreler 1 gün sonra %2 FBS içeren ortam varlığında açılığa bırakıldı.
3. On altı saat sonra hücrelere 25-400mM arası değişen dozlarla CoCl₂ uygulandı ve 1-3 gün arası inkübasyona bırakıldı.
4. Inkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 20 µl MTT solüsyonundan konuldu. Plak aliminyum folyo ile kaplandı.
5. 37°C’de inkübatör içerisinde 4 saat inkübe edildi.
6. Kuyucuklar içerisindeki solüsyon çekildi. Her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi.
7. Hücre kültür kabı 15 dk oda sıcaklığında shaker üzerinde inkübe edildi.
8. Spektrofotometrede (Varioskan, Thermo) 540nm’de okutuldu.

3.7 ARAŞTIRMA PLANI

Öngörülen çalışma süresi:1yıl

2012	Nisan	Malzeme alımı ve optimizasyon süreçleri gerçekleştirildi.
	Mayıs	
	Haziran	1. HCC hücre hatlarında Cullin2 gen ve protein ekspresyonlarındaki değişimin RT-PCR ve Western blotlama yöntemiyle belirlendi.
	Temmuz	
	Ağustos	
	Eylül	2.Heparin ve ya HGF’nin CUL2 transkripsiyonu ve ekspresyonu üzerindeki etkisi belirlendi.
	Ekim	
	Kasım	
	Aralık	
	Ocak	3. CoCl ₂ ’nin Cullin2 transkripsiyonu ve ekspresyonu üzerindeki etkisi belirlendi.
2013	Şubat	
	Mart	Verilerin toparlanması ve değerlendirilmesi
	Nisan	
	Mayıs	
	Haziran	Tez yazımı

3.8 VERİLERİN DEĞERLENDİRMESİ

MTT deneylerinde her bir grup üçerli çalışıldı ve hesaplamalarda bu üç grubun ortalaması ve standard sapması baz alınarak çalışıldı. RT-PCR ve Western deneyleri de tekrarlanarak yapıldı. Ve veriler ImageJ programı ile analiz edilerek grafikleri çizildi.

3.9 ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI

Çalışma hücre hatları kullanılarak yapılacaktır. Hücre hatları, HCC li hastalardan elde edilmiş olsalarda in vivo tümör gelişimini tam olarak temsil etmemektedir.

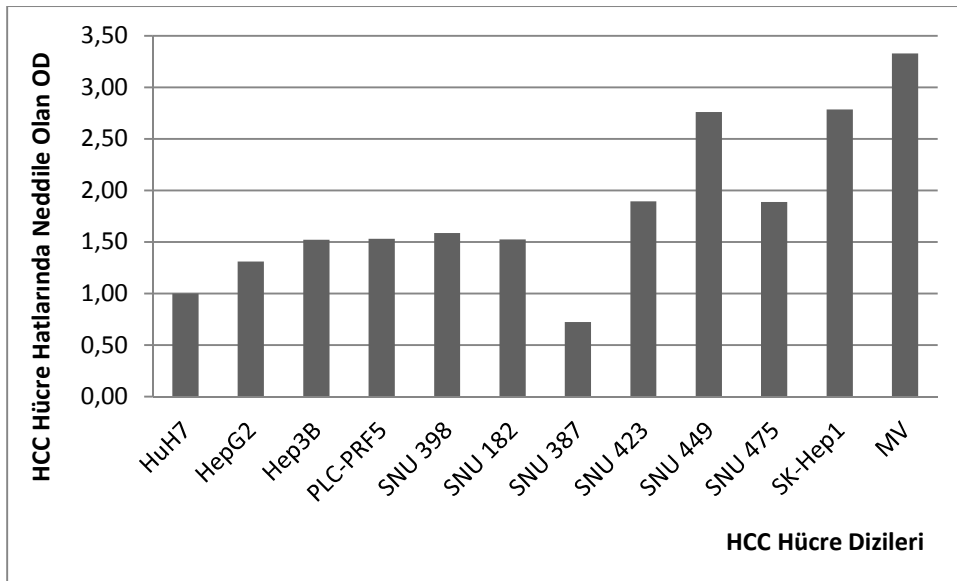
3.10 ETİK KURUL ONAYI

EK.2’de verilmiştir.

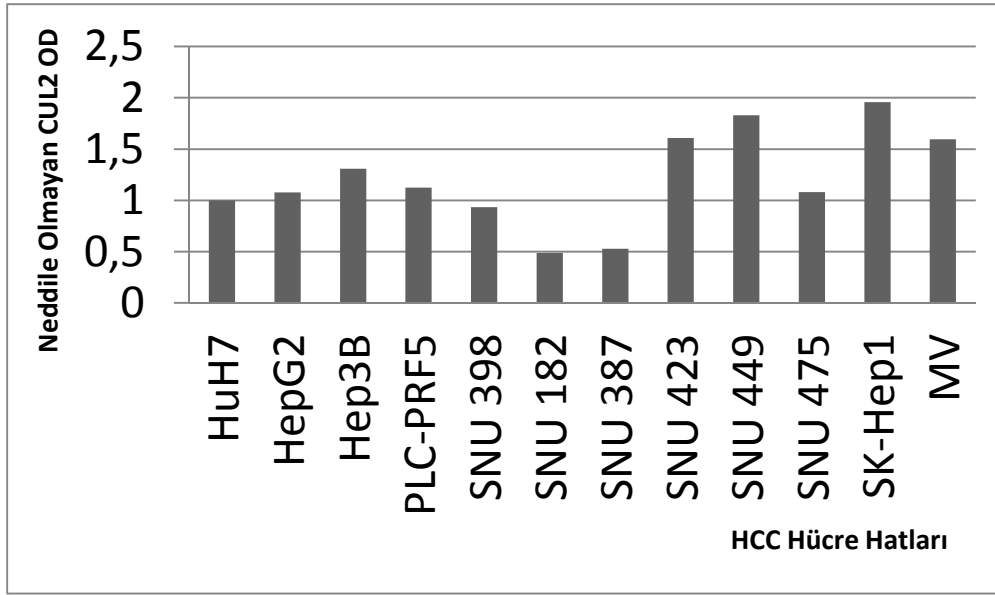
4.0 BULGULAR

4.1 HCC Hücrelerinde Cullin2 Ekspresyonu

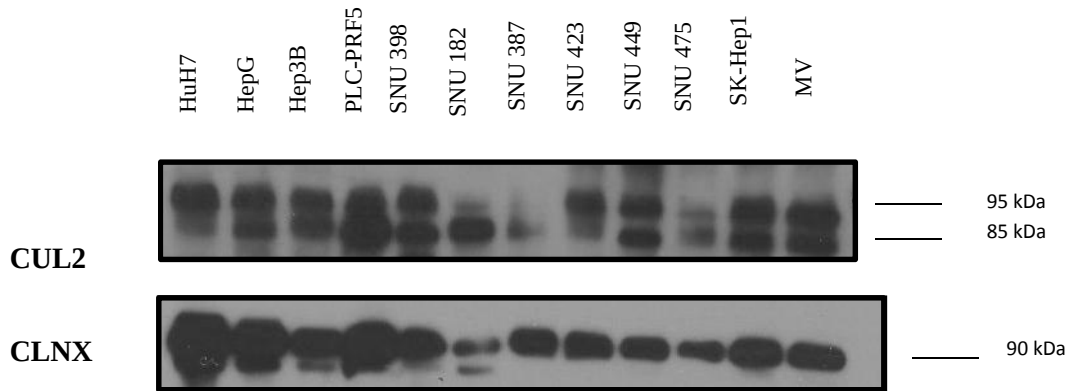
Western blot yöntemiyle HCC hücrelerinde CUL2 proteinin bazal düzeyde ekspresyonu incelendi. Bütün HCC hücre hatlarında CUL2 ekspresyonu olduğu belirlendi. Bazal CUL2 ekspresyonunun SNU 387, HuH7 hücrelerinde diğer hücrelere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 26). CUL2 nin aktif formunu gösteren neddile CUL2 miktarının daha invazif ve metastatik HCC hücre dizilerinde (SK-Hep1, SNU 449, Mahlavu, SNU 475 ve SNU 423) daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekli 26 a).



Şekil 26.a: HCC Hücrelerinde Bazal Düzeyde aktif Neddile CUL2 Ekspresyon Düzeyleri: CUL2 proteinleri OD değerleri



Şekil 26.b: HCC Hücrelerinde Bazal Düzeyde Neddile Olmayan CUL2 Ekspresyon Düzeyleri: CUL2 OD değerleri

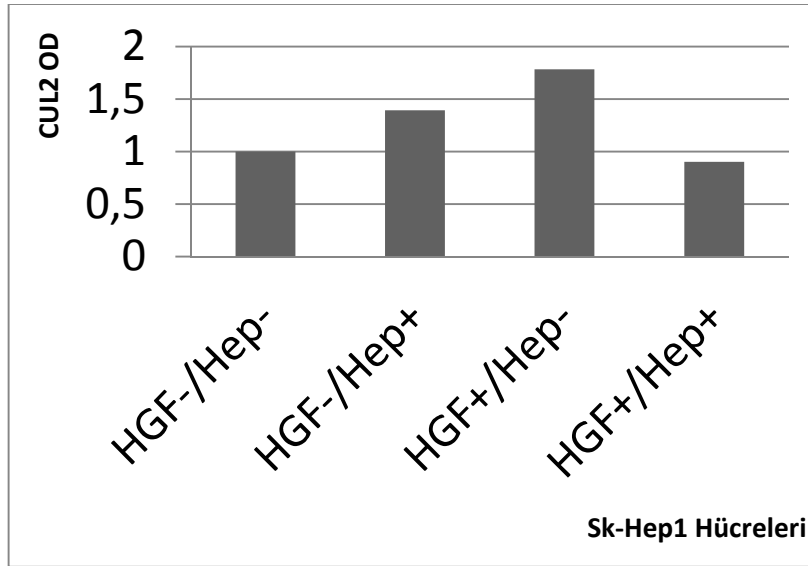


Şekil 26.c HCC Hücrelerinde Bazal Düzeyde CUL2 Ekspresyonu. CUL2 Western bantları, 95kDaluk üstteki neddile olan aktif formu gösterirken, 85kDa altta olan inaktif CUL2 proteinini göstermektedir. Protein yükleme kontrolü olarak kullanılan Kalneksin bandı 90kDa olarak gösterilmiştir.

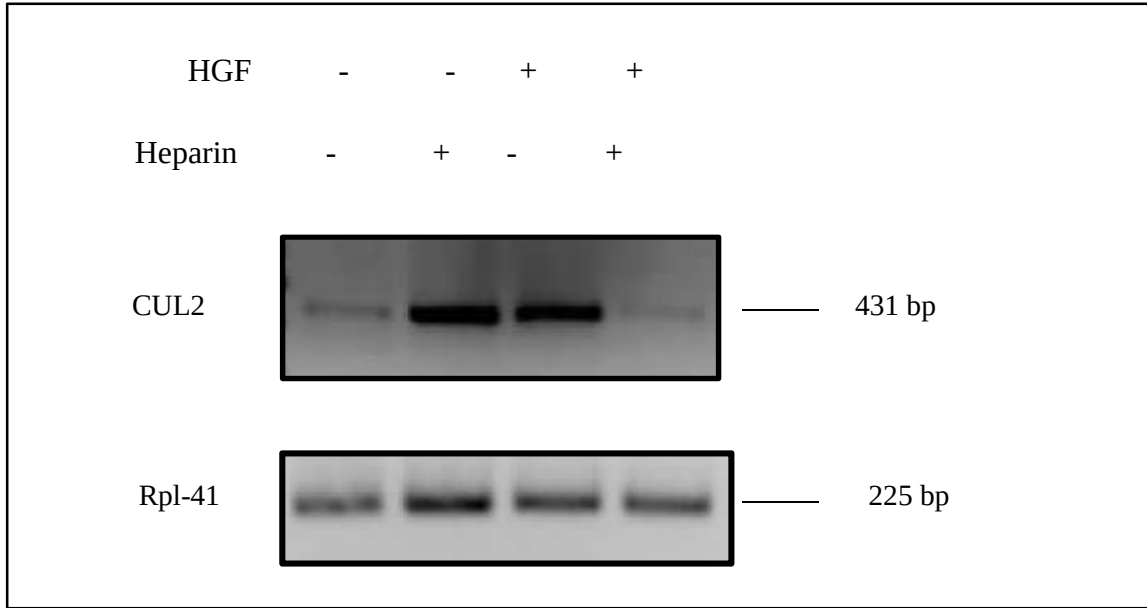
4.2 Heparin ve HGF'ye Bağlı CUL2 Gen Ekspresyonunun Değişimi

4.2.1 Mikrodizin çalışmasının RT-PCR ile doğrulanması

Daha önce yaptığımız mikrodizin çalışmalarında SK-Hep1 hücre hatında CUL2 gen ekspresyonunun tek başına Heparin varlığında HGF ve Heparinli koşula göre ve normal koşula daha yüksek olduğu belirlenmişti. RT-PCR yöntemi ile CUL2 gen ekspresyonunda HGF veya Heparin olduğunda bazal veya HGF+Heparin olan koşula göre daha yüksek olduğu doğrulandı. SK-Hep1 hücreleri 100µg/ml Heparin ve/veya 10ng HGF ile inkube edildi. HGF ve Heparinin tek başına CUL2 gen ekspresyonunu bazal düzeye göre arttırdığı, HGF ve Heparin birlikteyse CUL2 ekspresyonunun bazal düzeye indiği belirlendi(Şekil 27).



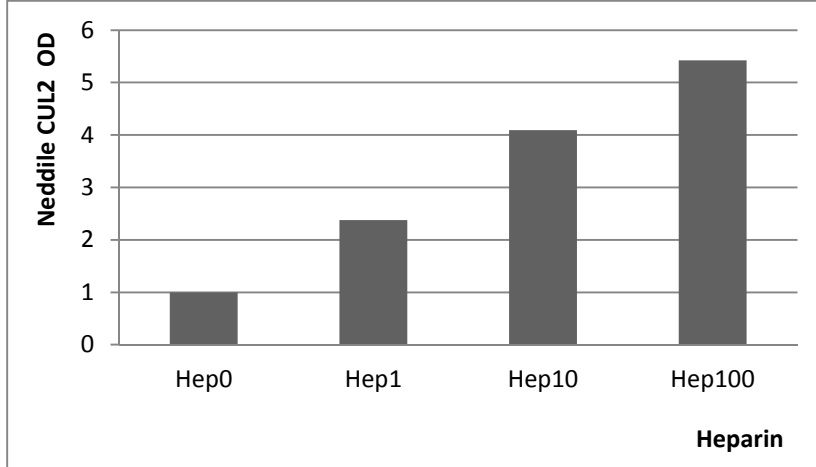
Şekil 27.a. CUL2 HGF/Heparin varlığında RT-PCR değerlerinin ImageJ ile analizi



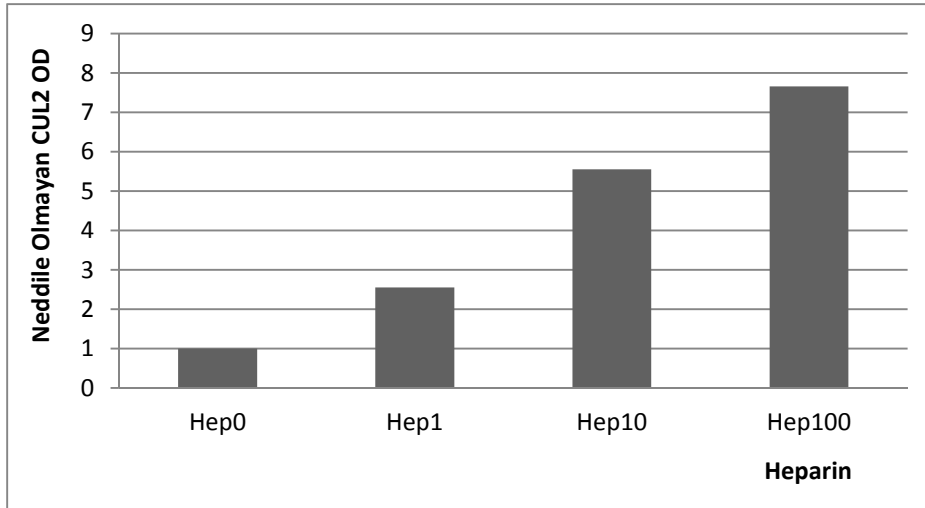
Şekil 27.b HGF ve Heparine bağlı CUL2 gen ekspresyonu değişimini agaroz jelde gösterimi
Üstte CUL2 bantları, altta yükleme kontrolü olarak kullanılan RPL-41 bantları
görölmektedir.

4.3 Heparin Uygulamasının Doza Bağlı Olarak CUL2 Ekspresyonuna Etkisi

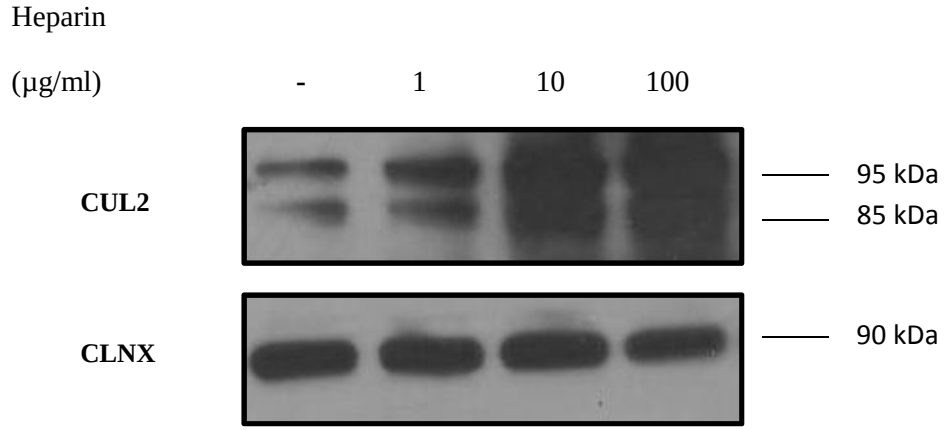
Huh7 hücre dizilerinde Heparin'in doza bağımlı olarak tek başına CUL2 ekspresyonu üzerine olan etkisi incelendi. Heparin 0, 1, 10, 100 µg/ml'lik dozlarla 24 saat süresince uygulanmıştır. Heparinin doza bağımlı olarak CUL2 ekspresyonunu 2-7 kat artırdığı, aktivasyonunu da 2-5 kat artırdığı belirlenmiştir.(Şekil 28).



Şekil 28.a. Heparin Doza Bağlı CUL2 Üzerine Etkisi. Neddile CUL2 ekspresyonunun ImageJ programı ile analizinden elde edilen grafik



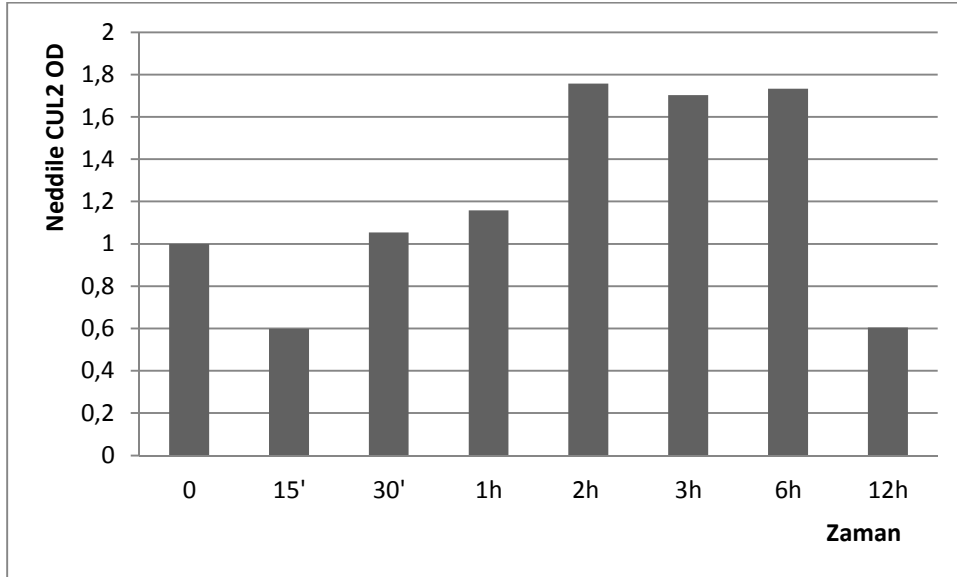
Şekil 28.b Heparin Doza Bağlı CUL2 Üzerine Etkisi. Neddile Olmayan CUL2 ekspresyonunun ImageJ programı ile analizinden elde edilen grafik



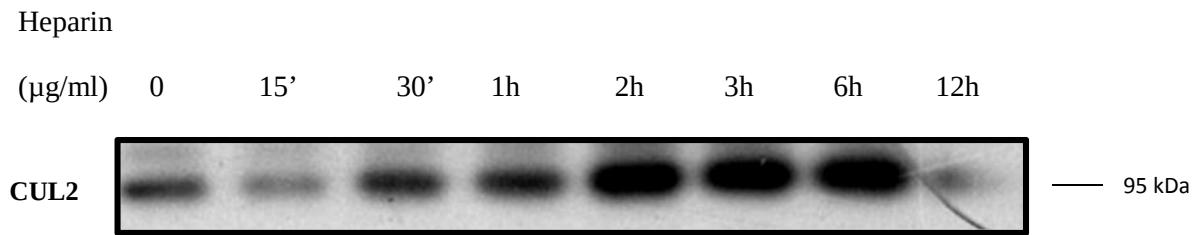
Şekil 28.c. Heparinin Doza Bağlı Olarak CUL2 Ekspresyonuna Etkisi Western blot görüntülerinde üstteki CUL2 bantları 95kDa neddile olan aktif CUL2'yi gösterir. 85kDa ise neddile olmayan inaktif CUL2'yi göstermektedir. Alttaki 90kDa'luk Kalneksin bandıdır. Kalneksin protein yükleme kontrolü olarak kullanılmaktadır.

4.4 Heparin Uygulamasının Zaman Bağı Olarak CUL2 Ekspresyonuna Etkisi

SK-Hep1 hücrelerinde uyguladığımız 100µg/ml Heparin dozunun zamana bağlı olarak CUL2 ekspresyonu üzerinde etkisi incelendi. Heparinin uygulamasının 6 saate kadar CUL2 ekspresyonunu arttığı saptanmıştır. CUL2 ekspresyonu, Heparin uygulamasından sonra 2 ila 6 saat arası maksimum ekspresyon düzeyine ulaşmaktadır (Şekil 29).



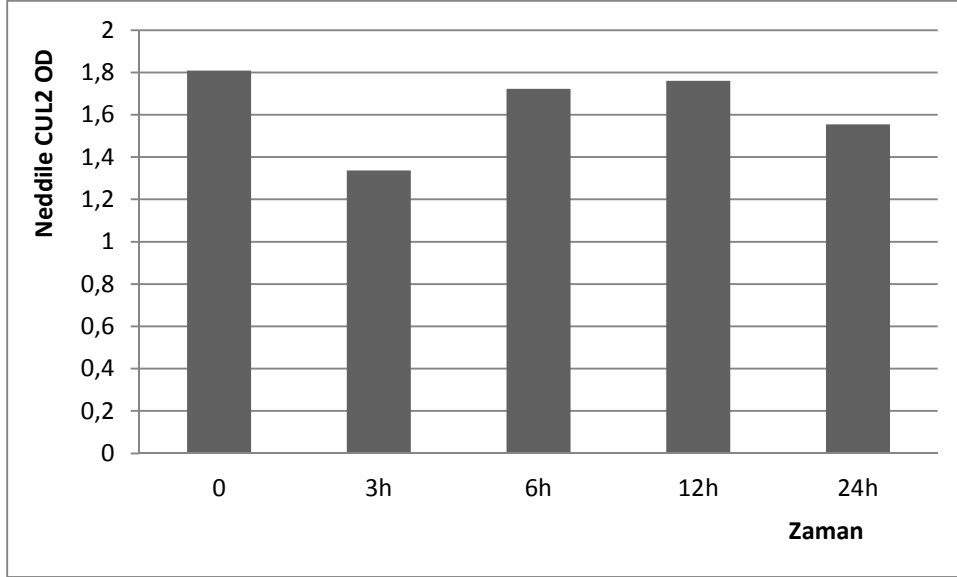
Şekil 29.a Heparinin zamana bağlı CUL2 ekspresyonuna etkisi. Western bantlarının ImageJ programı ile analizinden elde edilen grafik



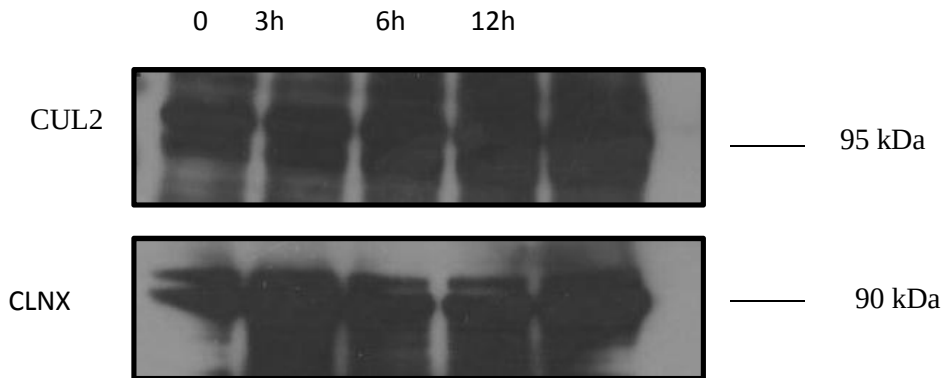
Şekil 29.b Heparinin Zamana Bağlı CUL2 ekspresyonu üzerinde etkisi CUL2 bantları 95kDa neddile olan aktif CUL2'yi gösterir.

4.5 HGF Uygulamasının Zamana Bağlı Olarak CUL2 Ekspresyonuna Etkisi

Sk-Hep1 hücrelerinde uyguladığımız 10ng HGF dozunun zamana bağlı olarak CUL2 ekspresyonu üzerinde etkisi incelendi. HGF'nin zamana bağlı olarak CUL2 ekspresyonunu değiştirmektedir. 3 ve 24.saatlerde CUL2 ekspresyonunu düşürürken, 6 ve 12.saatlerde ise artış gözlenmiştir (Şekil 30).



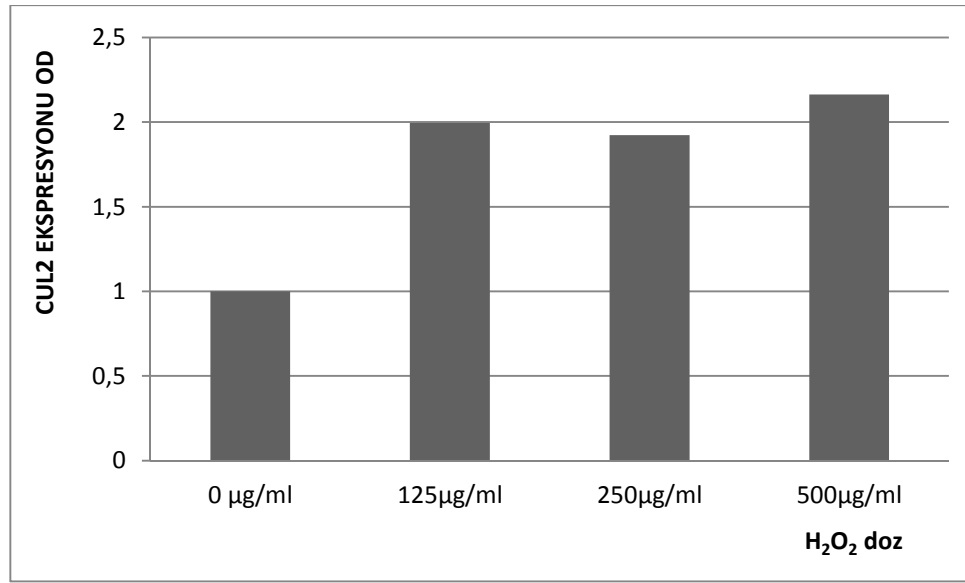
Şekil 30.a HGF'nin zamana bağlı CUL2 ekspresyonuna etkisi. Western bantlarının ImageJ programı ile analizinden elde edilen grafik



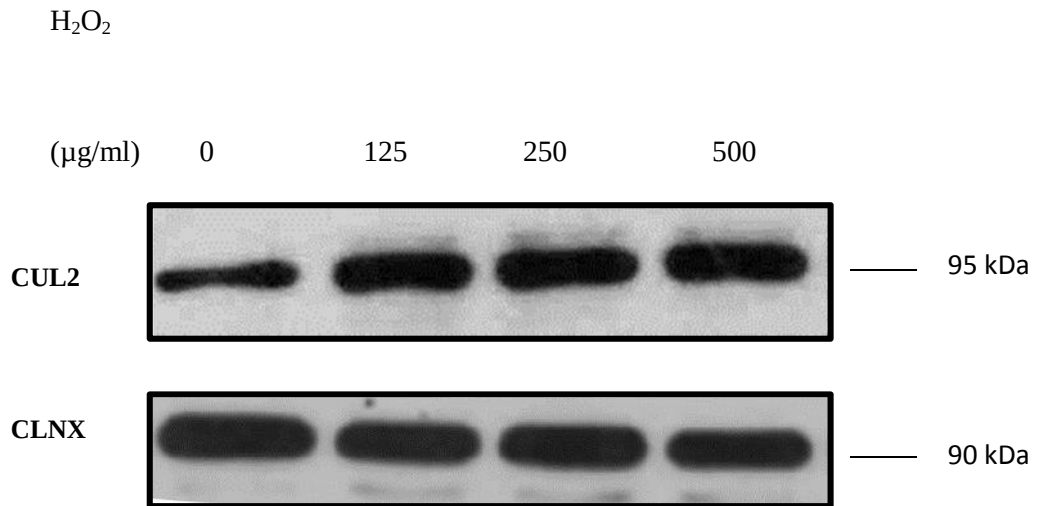
Şekil 30.b: HGF uygulamasının CUL2 ekspresyonu üzerine etkisi a. Üstte 95 kDa'luk neddile CUL2 bantları, altta ise 90 kDa'luk Kalneksin bantlarını vardır.

4.6 H₂O₂'nin CUL2 Ekspresyonuna Etkisi

Oksisatif stresi tetiklediği bilinen H₂O₂'nin SK-Hep1 hücrelerine uygulamasının H₂O₂'nin CUL2 ekspresyonu üzerine etkisi incelenmiştir. H₂O₂ uygulaması CUL2 ekspresyonunu 2 kat arttırmaktadır. Doza bağlı bir etkisi yoktur.(Şekil 31).



Şekil 31.a H₂O₂'nin Doza Bağlı CUL2 ekspresyonuna etkisi. Western görüntülerinin ImageJ programı ile analizi ile elde edilen grafik.

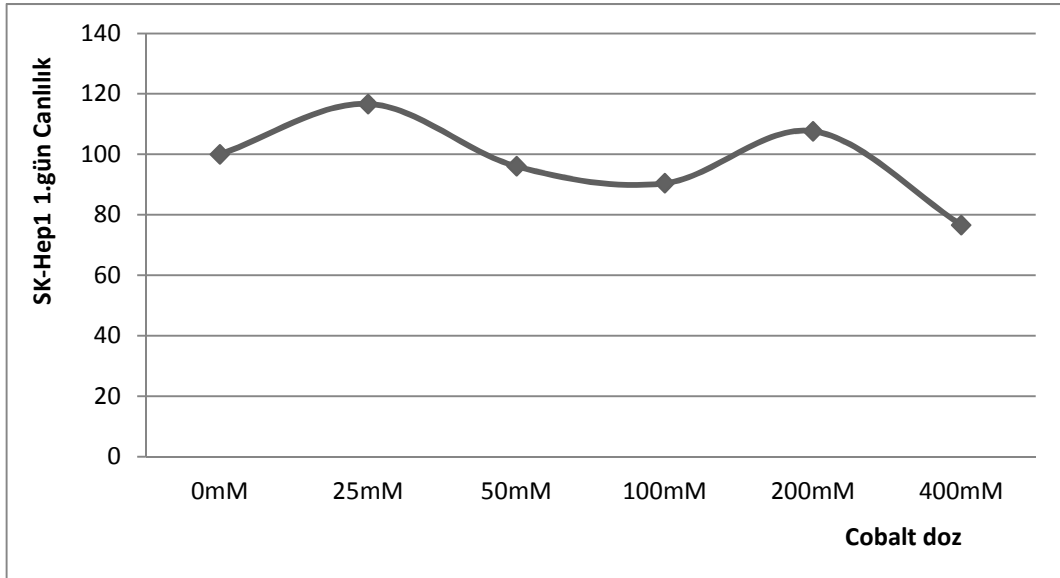
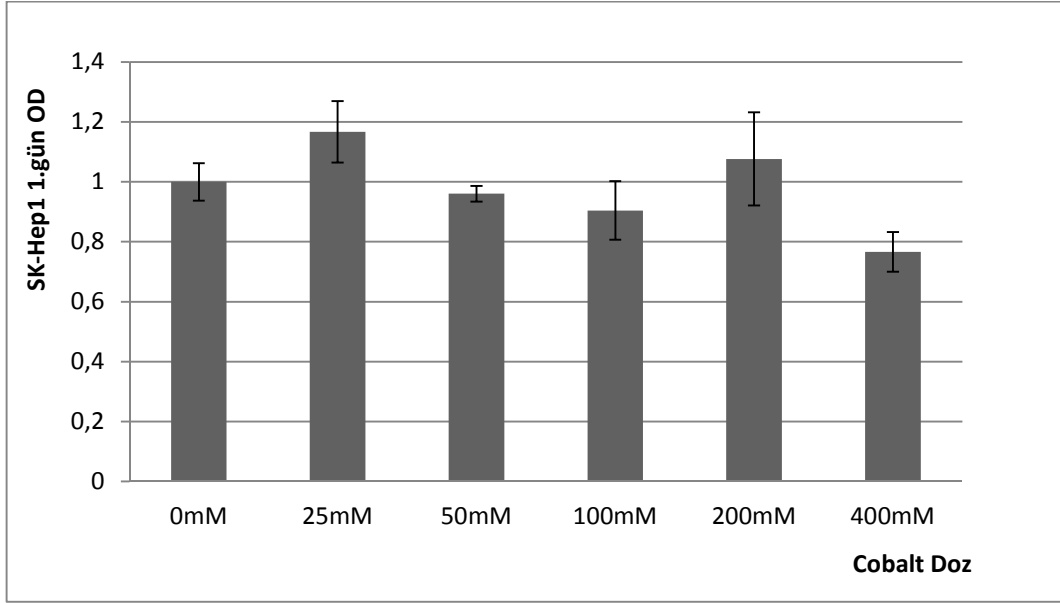


Şekil 31.b H₂O₂ uygulamasının doza bağlı CUL2 ekspresyonu üzerine etkisi a. Üstte 95kDa'luk neddiile olan aktif CUL2 bantları vardır. Altta ise yükleme kontrolü olarak 90kDa'lık kalneksin bantları vardır.

4.7 CoCl₂ Uygulamasının SK-Hep1 Hücre Dizisinde Hücre Canlılığına Etkisi

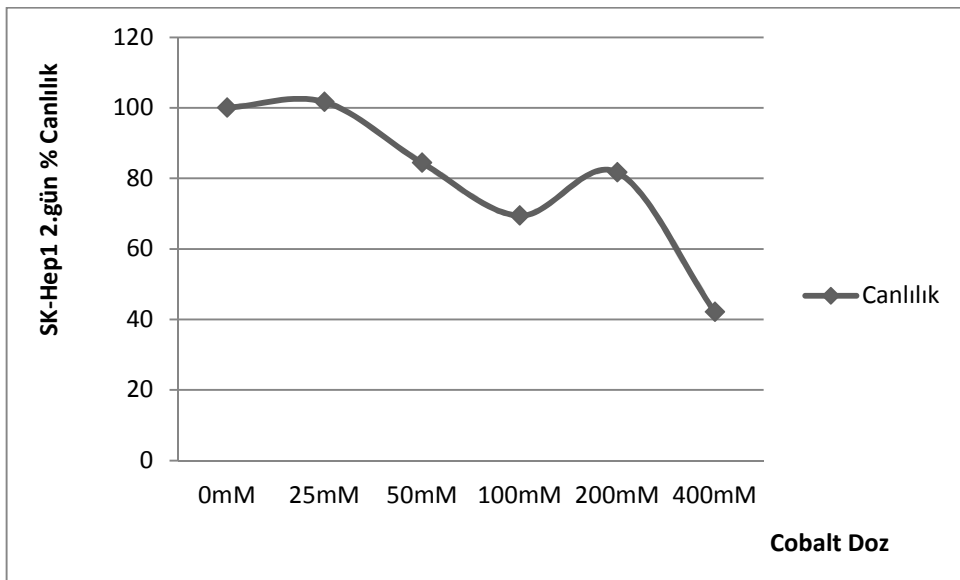
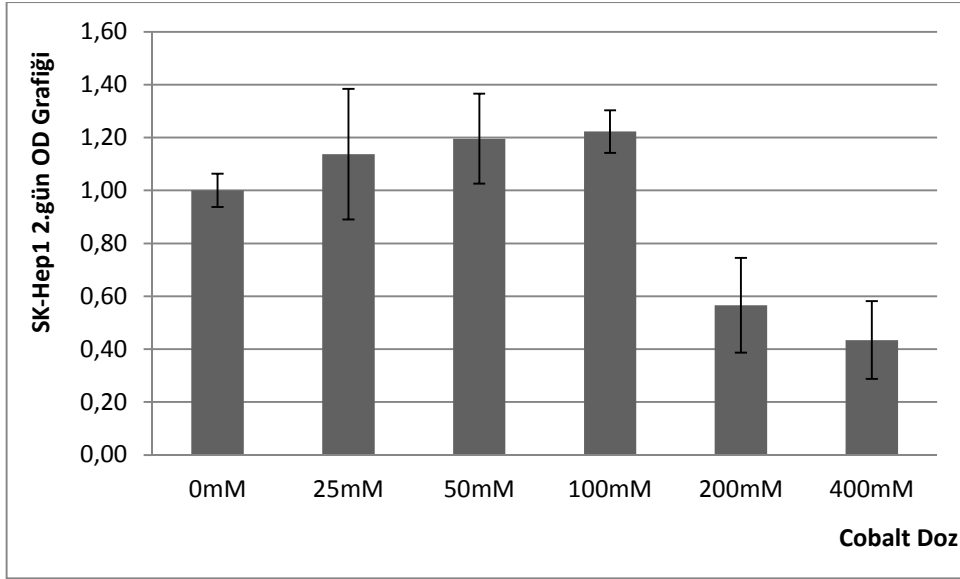
SK-Hep1 hücrelerinde farklı dozlarda (0, 25, 50, 100, 200, 400µg/ml) ve farklı sürelerde (1, 2 ve 3 gün) CoCl₂ uygulamasının MTT yöntemiyle hücre canlılığı üzerine olan etkisi ölçülmüştür (Şekil 33 (a,b,c)). CoCl₂ doza bağımlı olarak ve zamana bağlı olarak SK-Hep1 hücrelerinde sağkalım azalmıştır. Yine de SK-Hep1, HuH7 hücreleri ile karşılaştırıldığında (Şekil 34) CoCl₂ aracılıklı hücre ölümüne daha dayanıklı bir hücre hattıdır. SK-Hep1 hücrelerinde canlılık 400µg/ml doz ile 2.günden itibaren etkilenmeye başlamıştır. İkinci günde 400µg/ml doz ile SK-Hep1 hücrelerinde canlılık %50 oranında azalmıştır, üçüncü günde bu oran değişmemiştir.

Doz	Absorbans
0mM	0,877
25mM	1,023
50mM	0,842
100mM	0,793
200mM	0,944
400mM	0,672
DMEM	0,066



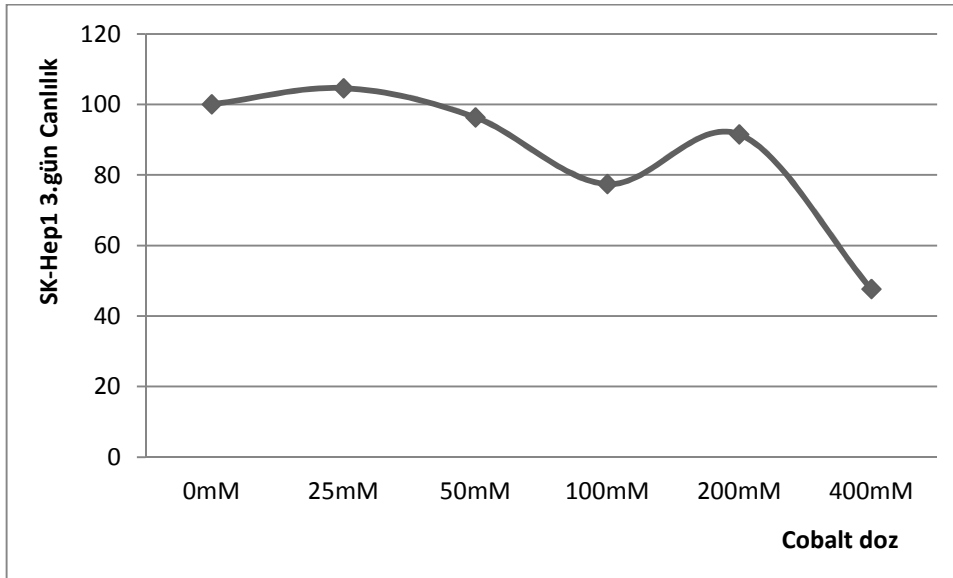
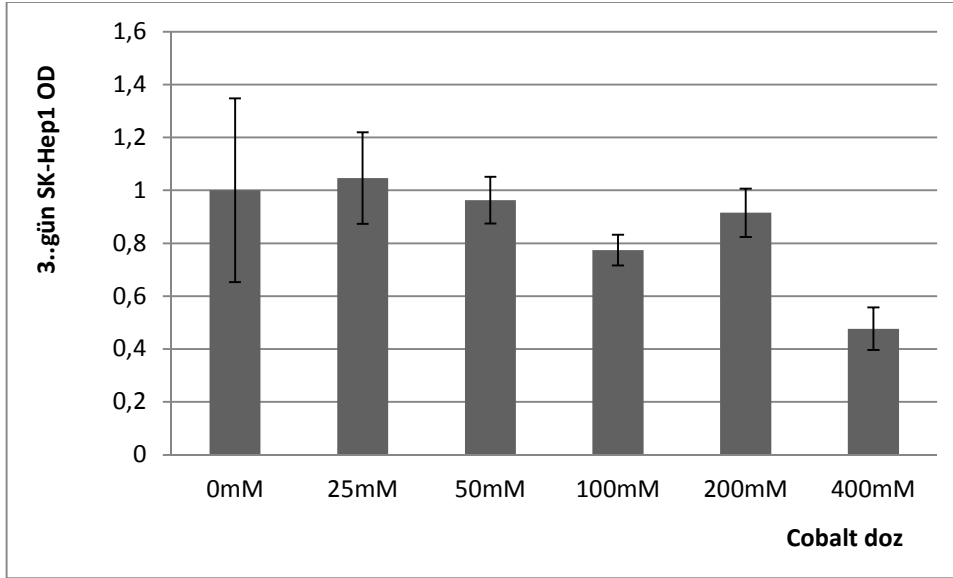
Şekil 33.a: Farklı dozlarda CoCl₂ uygulamasının SK-Hep1 hücreleri canlılığı üzerine etkisi
1.gün a) Absorbans değerleri b) Hücre Canlılık Grafiği

Doz	Absorbans
0mM	1,589
25mM	1,615
50mM	1,341
100mM	1,103
200mM	1,298
400mM	0,669



Şekil 33.b: Farklı dozlarda CoCl₂ uygulamasının SK-Hep1 hücreleri canlılığı üzerine etkisi
2.gün a) Absorbans değerleri b) Hücre Canlılık Grafiği

Doz	Absorbans
0mM	0,978
25mM	1,023
50mM	0,942
100mM	0,757
200mM	0,895
400mM	0,466

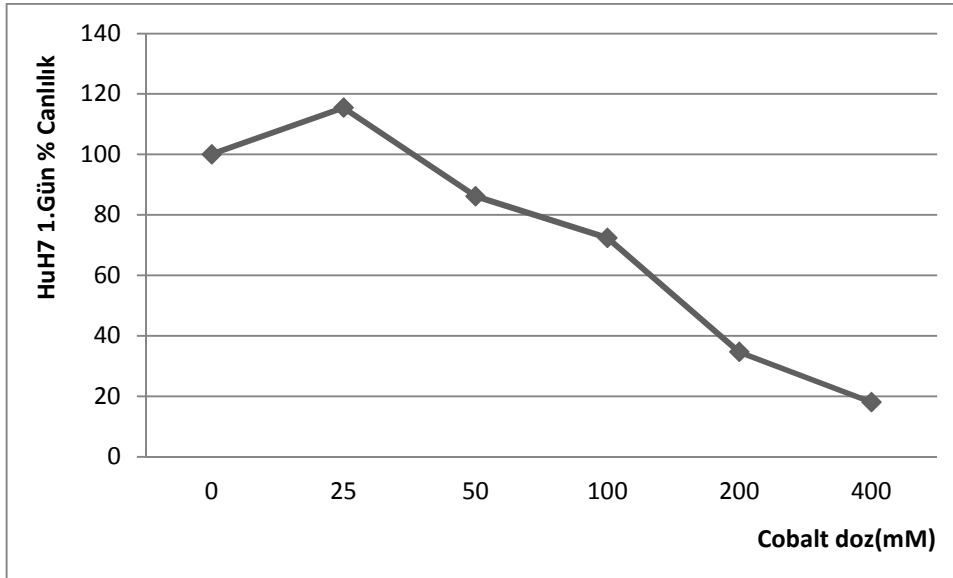
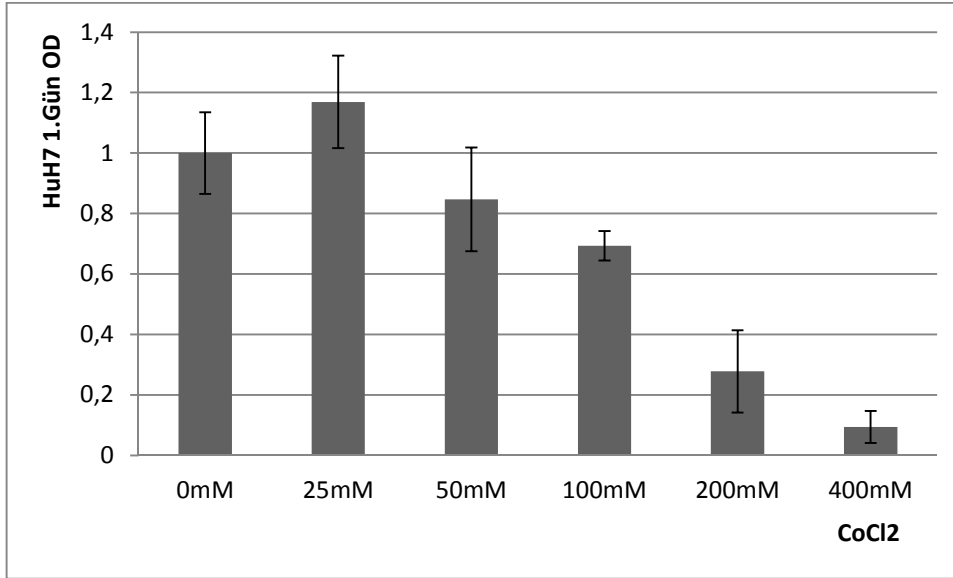


Şekil 33.c: Farklı dozlarda CoCl₂ uygulamasının SK-Hep1 hücreleri canlılığı üzerine etkisi
3.gün a) Absorbans değerleri b) Hücre Canlılık Grafiği

4.8 CoCl₂ Uygulamasının HuH7 Hücre Dizisinde Hücre Canlılığına Etkisi

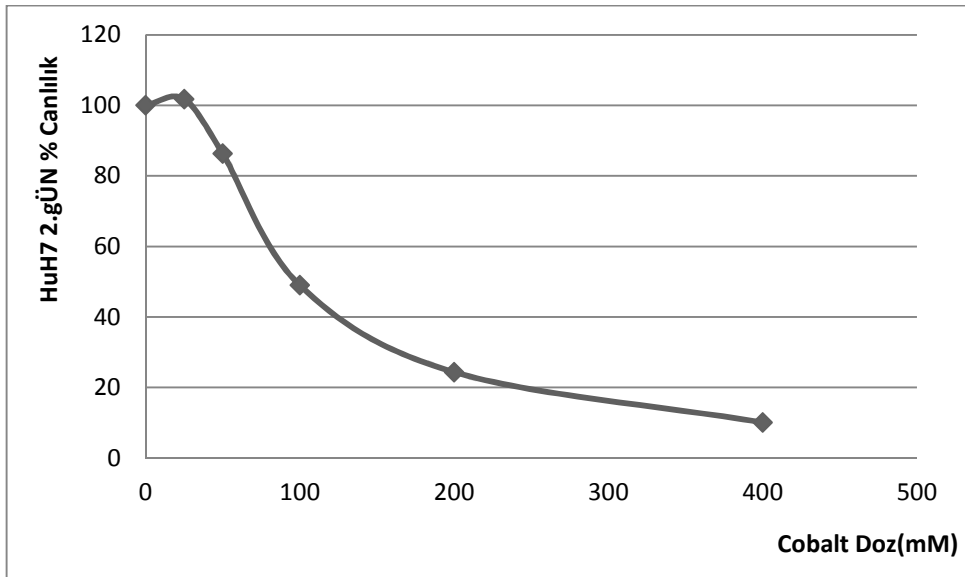
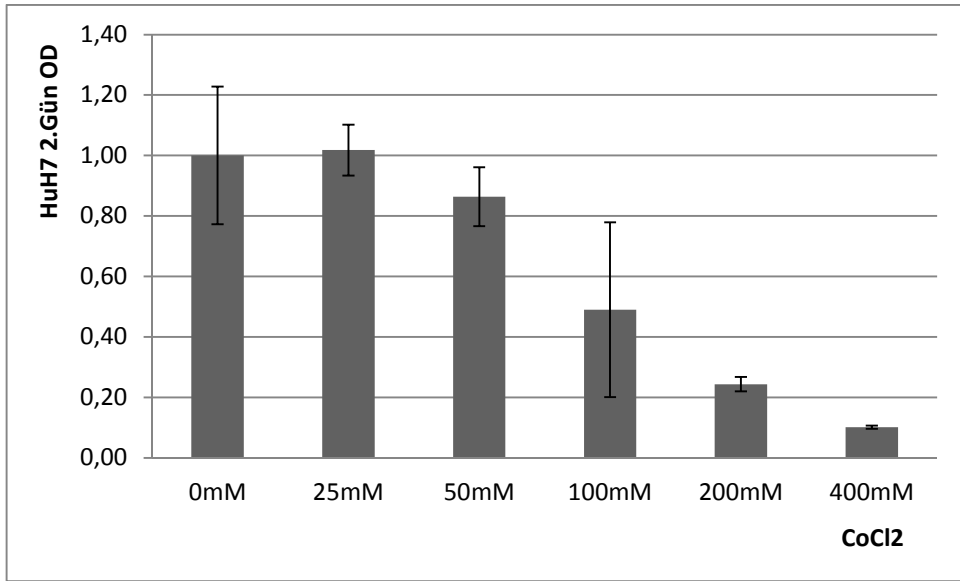
HuH7 hücrelerinde farklı dozlarda (0, 25, 50, 100, 200, 400µg/ml) ve farklı sürelerde (1, 2 ve 3 gün) kobalt klorür uygulamasının MTT yöntemiyle hücre canlılığı üzerine olan etkisi ölçülmüştür(Şekil 4.3(a,b,c)). CoCl₂ doza bağımlı olarak ve zamana bağlı olarak HuH7 hücrelerinde sağkalım azalmıştır. Etki özellikle 100µg/ml dozlardan itibaren görülmeye başlanmıştır. 100µg/ml'lik doz 1.günden itibaren sağkalımı %50 oranında azaltmıştır.

Doz	Absorbans
0	0,652
25	0,762
50	0,552
100	0,452
200	0,181
400	0,061



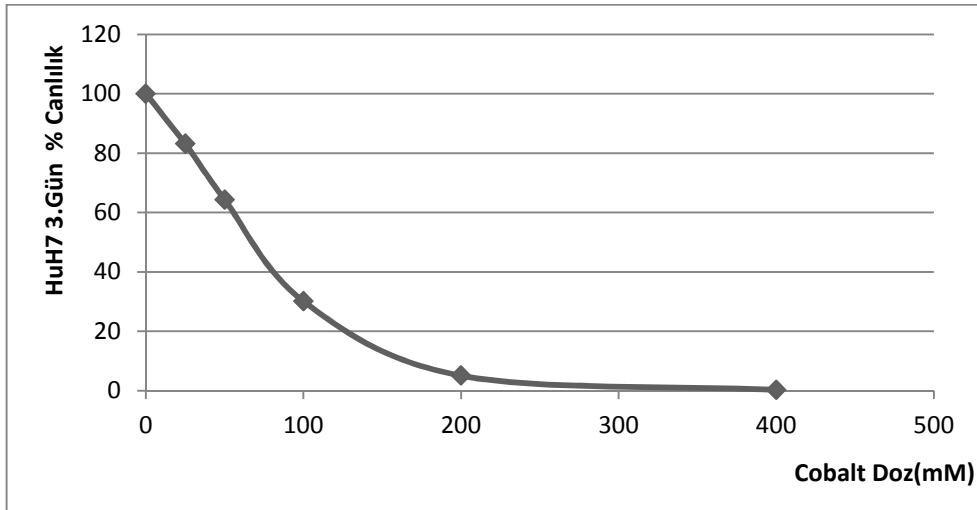
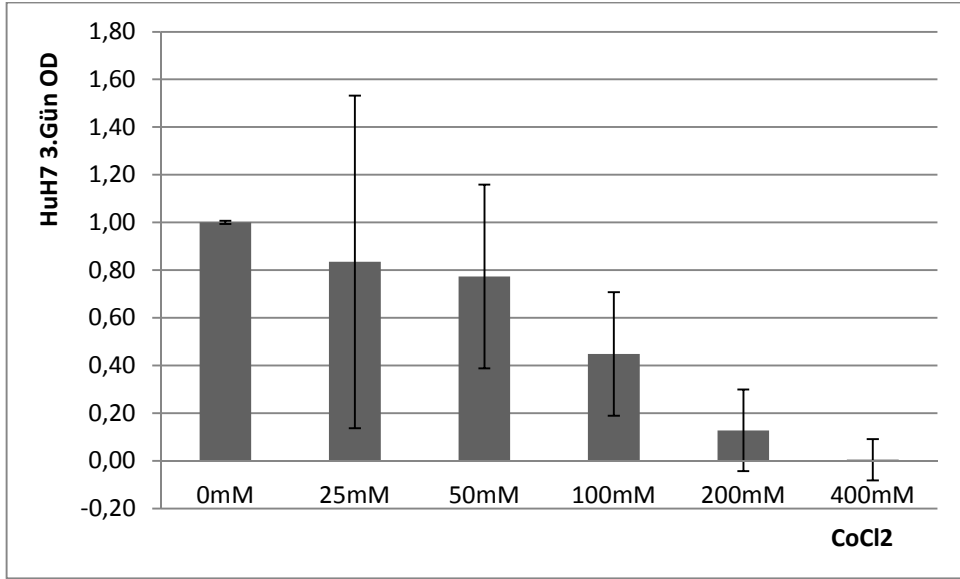
Şekil 34.a: Farklı dozlarda CoCl₂ uygulamasının HuH7 hücreleri canlılığı üzerine etkisi 1.gün
a) Absorbans değerleri b) Hücre Canlılık Grafiği

Doz	Absorbans
0	1,01
25	1,028
50	0,872
100	0,495
200	0,246
400	0,102
DMEM	0,063



Şekil 34.b: Farklı dozlarda CoCl₂ uygulamasının HuH7 hücreleri canlılığı üzerine etkisi 2.gün
a) Absorbans değerleri b) Hücre Canlılık Grafiği

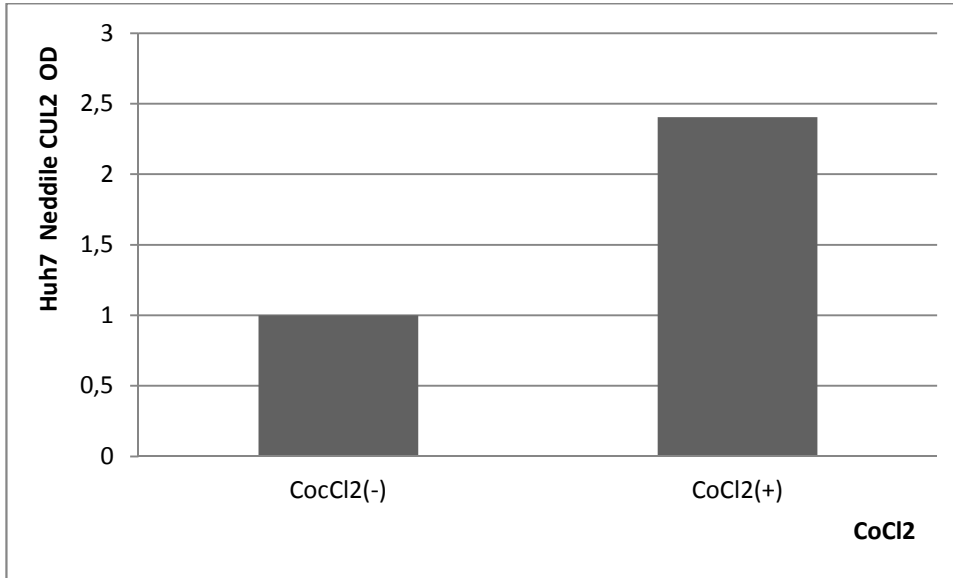
Doz	Absorba
0	1,286
25	1,058
50	0,98
100	0,568
200	0,162
400	0,006
DMEM	0,065



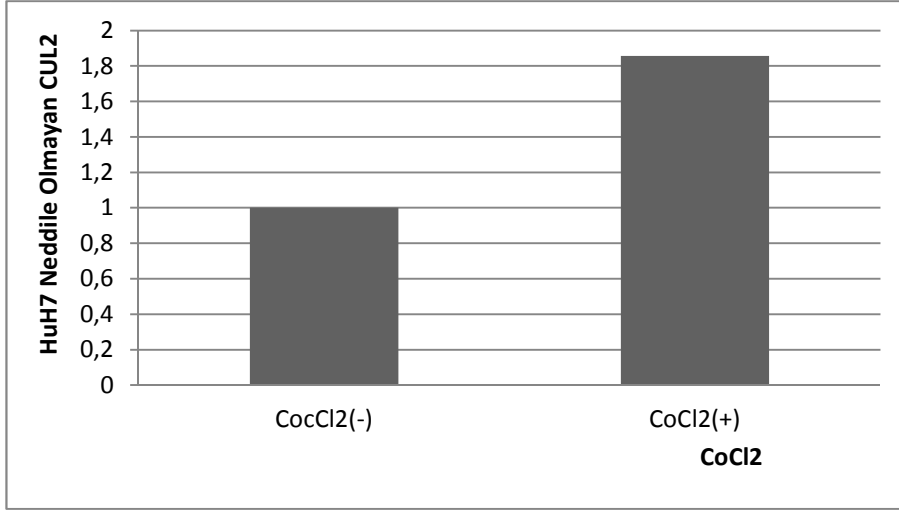
Şekil 34.c: Farklı dozlarda CoCl₂ uygulamasının HuH7 hücreleri canlılığı üzerine etkisi 3.gün
a) Absorbans değerleri b) Hücre Canlılık Grafiği

4.9 CoCl₂ Uygulamasının Farklı HCC Hücre Dizilerinde CUL2 Ekspresyonuna Etkisi

CoCl₂ uygulamasının CUL2 ekspresyonuna olan etkisi HuH7, SK-Hep1, PLC-PRF5, SNU182 hücre hatlarında incelenmiştir. 24 saatlik ve 100µg/ml CoCl₂ uygulamasının bu hücre hatlarında CUL2 ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir(Şekil 35-38) CoCl₂ uygulaması HuH7 hücrelerinde CUL2 ekspresyonunu 2,02 kat, SK-Hep1 hücrelerinde 1,64 kat, PLC-PRF5 hücrelerinde 1,23 kat, SNU182 hücrelerinde 2,52 kat arttırmıştır. Yani CoCl₂ SNU182 ve HuH7 hücrelerinde CUL2 ekspresyonunu daha çok arttırmıştır. Bazal düzeyde CUL2 ekspresyonu yüksek olan SK-Hep1 ve PLC-PRF5 hücrelerinde ise CUL2 ekspresyonunu daha az arttırmıştır.



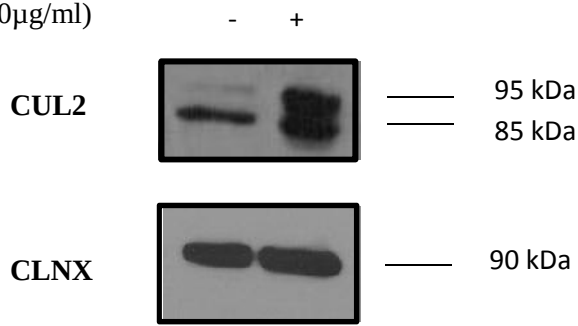
Şekil 35.a Cobalt uygulamasının HuH7 Hücrelerinde CUL2 ekspresyonu üzerine etkisi. Neddile olan aktif CUL2 bandının ImageJ pogramı ile elde edilen grafik



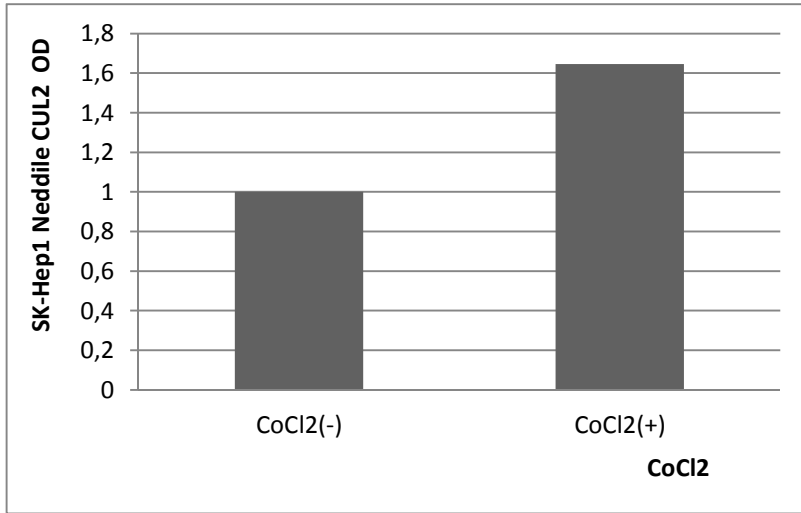
Şekil 35.b Cobalt uygulamasının HuH7 Hücrelerinde CUL2 ekspresyonu üzerine etkisi. Neddile olmayan inaktif CUL2 bandının ImageJ pogramı ile elde edilen grafik

A. Huh7

CoCl₂(100µg/ml)

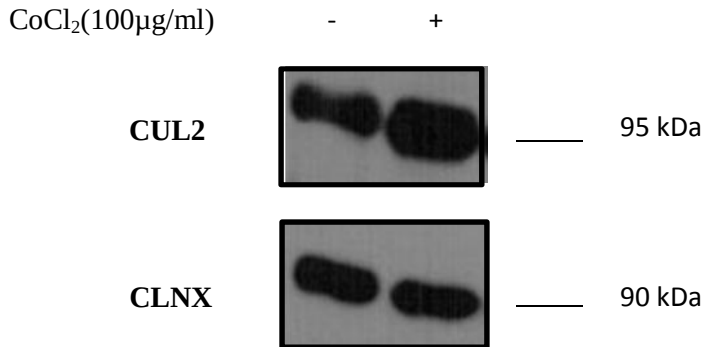


Şekil 35.c CoCl₂'nin Huh7 Hücrelerinde CUL2 Ekspresyonuna Etkisi. Westen blot görüntülerinde üstte CUL2 bantları 95kDa neddile olan aktif CUL2'yi gösterir. 85kDa ise neddile olmayan inaktif CUL2'yi göstermektedir. Alttaki 90kDa'luk kalneksin bandıdır. Calnexin protein yükleme kontrolü olarak kullanılmaktadır.

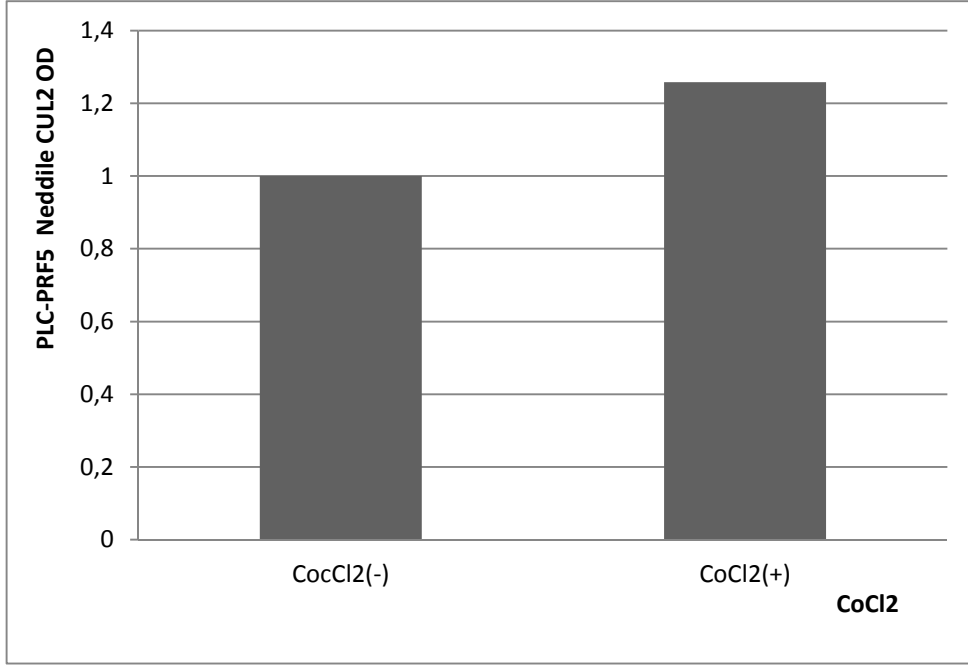


Şekil 36.a CoCl₂'nin SK-Hep1 Hücrelerinde CUL2 Ekspresyonuna Etkisi. Neddile olan aktif CUL2 bandının ImageJ pogramı ile elde edilen grafik.

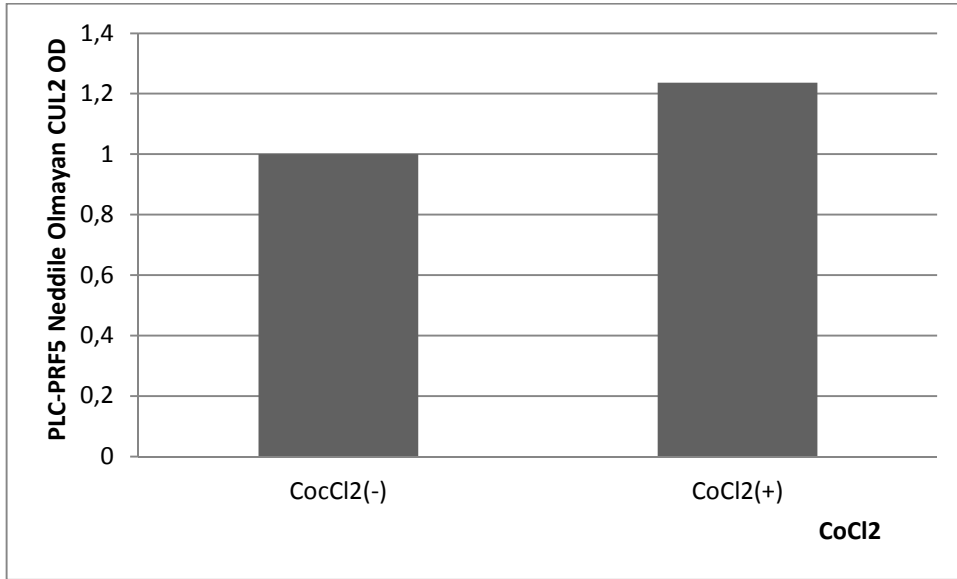
B. Sk-Hep1



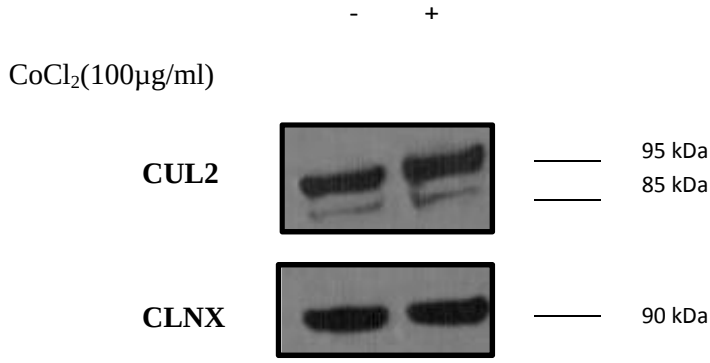
Şekil 36.b CoCl₂'nin Sk-Hep1 Hücrelerinde CUL2 Ekspresyonuna Etkisi. Western blot görüntülerinde üstteki 95kDa'lık CUL2 bantları neddile olan aktif CUL2'yi gösterir. Altteki 90kDa'luk Kalneksin bandıdır. Kalneksin protein yükleme kontrolü olarak kullanılmaktadır.



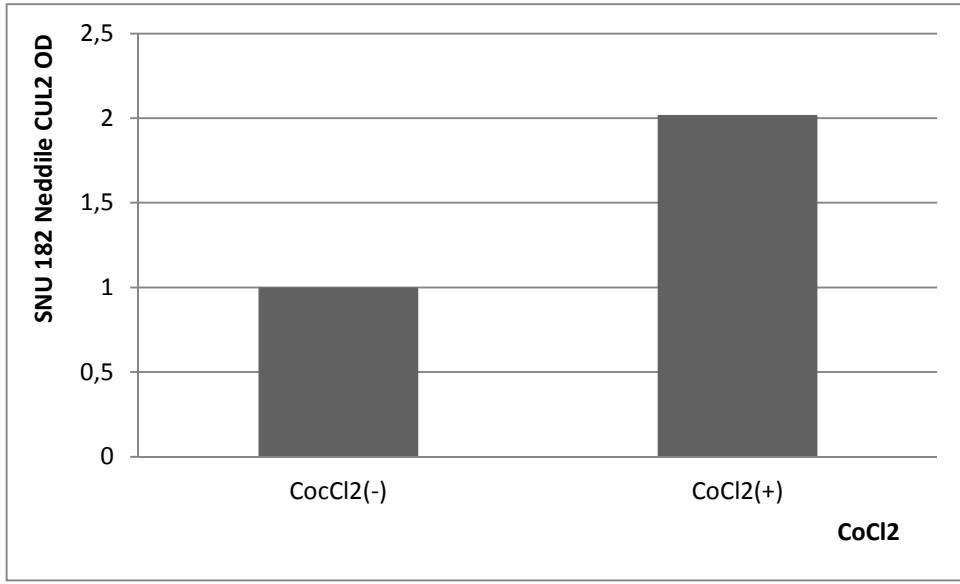
Şekil 37.a CoCl₂'nin PLC-PRF5 Hücrelerinde CUL2 Ekspresyonuna Etkisi. Neddile olan aktif CUL2 bandının ImageJ pogramı ile elde edilen grafik.



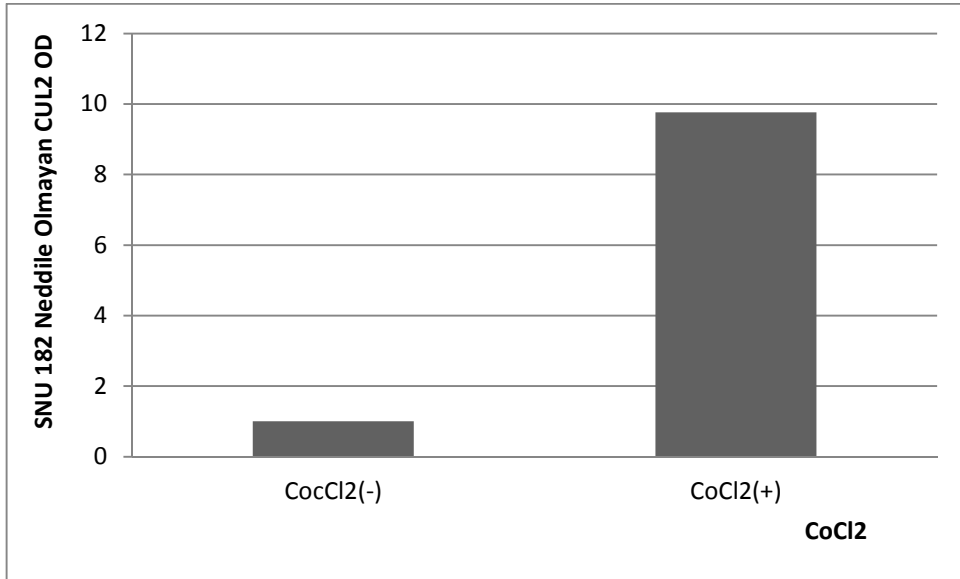
Şekil 37.b CoCl₂'nin PLC-PRF5 Hücrelerinde CUL2 Ekspresyonuna Etkisi. Neddile olmayan aktif CUL2 bandının ImageJ pogramı ile elde edilen grafik.



Şekil 37.c CoCl₂'nin PLC-PRF5 Hücrelerinde CUL2 Ekspresyonuna Etkisi. Western blot görüntülerinde üstte CUL2 bantları 95kDa neddile olan aktif CUL2'yi gösterir. 85kDa ise neddile olmayan inaktif CUL2'yi göstermektedir. Alttaki 90kDa'luk Kalneksin bandıdır. Kalneksin protein yükleme kontrolü olarak kullanılmaktadır.

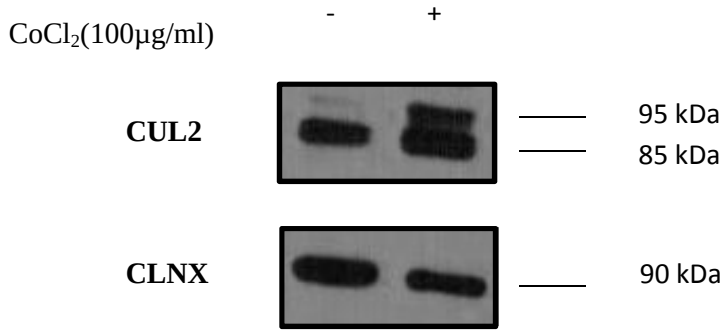


Şekil 38.a CoCl₂'nin SNU 182 Hücrelerinde CUL2 Ekspresyonuna Etkisi. Neddile olan aktif CUL2 bandının ImageJ pogramı ile elde edilen grafik.



Şekil 38.b CoCl₂'nin SNU 182 Hücrelerinde CUL2 Ekspresyonuna Etkisi. Neddile olmayan inaktif CUL2 bandının ImageJ pogramı ile elde edilen grafiği.

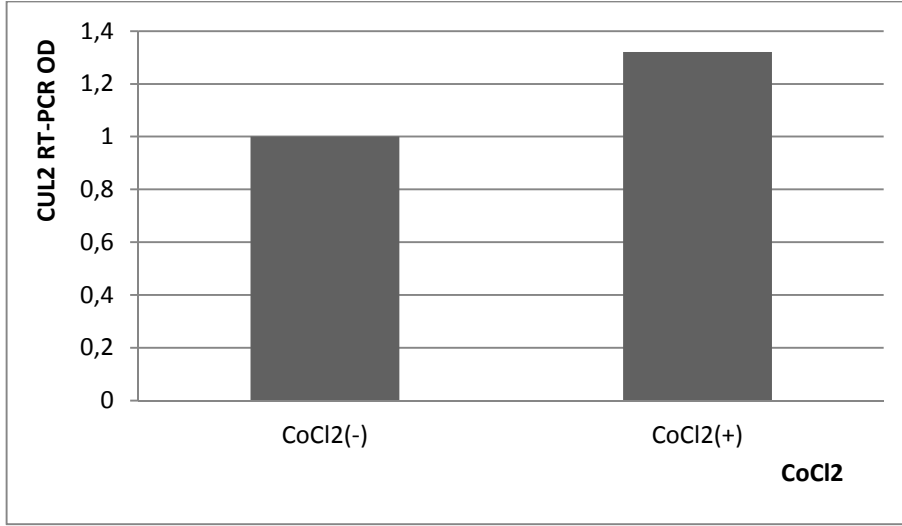
SNU 182



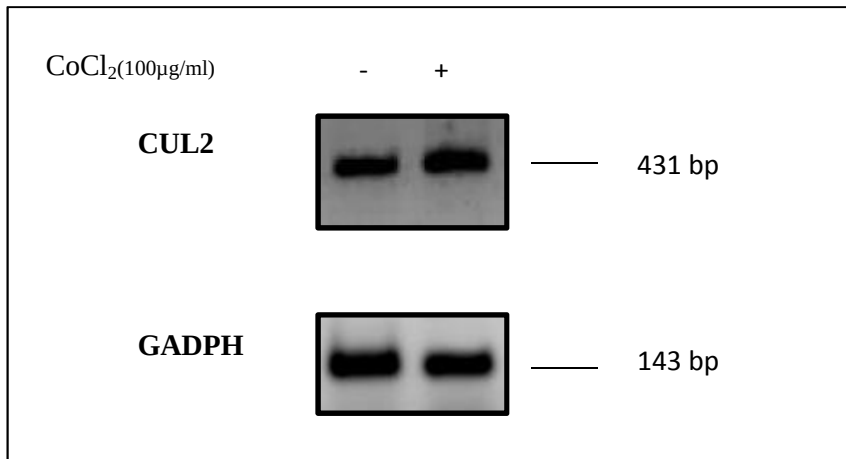
Şekil 38.c CoCl₂ uygulamasının SNU182 Hücrelerinde CUL2 ekspresyonuna etkisi. Western blot görüntülerinde üstte CUL2 bantları 95kDa neddile olan aktif CUL2'yi gösterir. 85kDa ise neddile olmayan inaktif CUL2'yi göstermektedir. Alttaki 90kDa'luk Kalneksin bandıdır. Kalneksin protein yükleme kontrolü olarak kullanılmaktadır.

4.10 CoCl₂ Uygulamasının CUL2 Transkripsiyonuna Etkisi

24 saat ve 100µg/ml dozda uygulanan CoCl₂'nin Sk-Hep1 hücre hattında CUL2 gen ekspresyonuna olan etkisi RT-PCR yöntemiyle incelendi. 1.günün sonunda CoCl₂ varlığında CUL2 ekspresyonu 1,32 kat artmıştır(Şekil 39).



Şekil 39.a CoCl₂'nin SK-Hep1 Hücrelerinde CUL2 Transkripsiyonuna Etkisi. CUL2 bandının ImageJ pogramı ile analizinden elde edilen grafiği.



Şekil 39.b CoCl₂ uygulamasının CUL2 transkripsiyonuna etksi. Agaroze jel görüntülerinde üstte CUL2 bandı, altta ise yükleme kontrolü olarak kullanılan GADPH bandı vardır.

5.0 TARTIŞMA

HCC Dünya’da en yaygın üçüncü malign kanser türüdür. Hepatosellüler karsinoma hepatositlerden köken alan bir tümördür ve nedenleri arasında aşırı alkol tüketimi, HBV ve HCV enfeksiyonları, aflatoksine maruziyet sayılabilir^[1,11]. Bütün bu nedenler karaciğerde hasara sebep olur ve bu hasar sonucunda aktifleşen miyofibroblast hücreleri karaciğer fibrogenezini tetikler ve süreç sirozla devam eder. Fibroenez sırasında karaciğerde kollajen miktarı oldukça artar. Fibroenez sonucunda karaciğerdeki kapiller damarlar yok olur ve hipoksik bir ortam oluşur. Oluşan hipoksik ortam hepatositlerin ölümüne yol açar. Ayrıca tümör oluşumuna ve ilerleyişine katkıda bulunur^[21,24].

HIF1, hipoksik koşullarda ekspresyonu artan bir genidir. HIF1 α ve β olarak adlandırılan iki alt birimden oluşmuştur. HIF1 β alt biriminin hücrede stabil durumda iken, HIF1 α alt biriminin stabilitesi ise ortamdaki oksijen miktarına göre değişmektedir. Oksijen varlığında HIF1 α alt birimi PHD’ler tarafından hidroksillenirler^[88]. CUL2 E3 ligaz sistemi hidroksillenmiş HIF1 α ’yı tanıyarak onu proteazomal parçalanmaya gönderir. Oksijen olmadığı zaman ise hidroksillenmez ve bu durumda parçalanmaktan kurtulan HIF1 α , nükleusa giderek burada HIF1 β altbirimi ile etkileşerek HRE genlerinin ekspresyonunu başlatır^[88]. HIF1 hücrenin hipoksik koşullara adaptasyonunu, özellikle hücrenin sağ kalmasını sağlayan önemli bir genidir ve kanserleşme sürecine de önemli katkıları vardır^[40]. Glukoz metabolizmasını aktifleştirerek hücrenin oksijenli solunumda glikolize geçmesini tetikler. Kanser hücreleri bilindiği gibi enerji üretimi için oksijenli solunum yerine glikolizi tercih etmektedirler (Warburg etkisi). Bunun ne gibi avantajlar sağladığı hala tartışılmakla birlikte, öncelikle bu sayede tümörün hipoksik ortama uyum sağladığı, yine pre-metastatik lezyonlarda hücrenin sağ kalım şansını arttırdığı, ayrıca laktik asit üretimi sonucunda mikroçevredeki asiditeyi artırarak diğer hücrelere zarar verdiği ve ekstrasellüler matriksin parçalanmasını arttırarak invazyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir^[89]. HIF1 bunun dışında tümörde over-eksprese halde bulunan c-Myc veya SIRT, gibi genler ile etkileşerek VEGF, PDGF, heksokinaz gibi genlerin ekspresyonunu başlatır^[90]. Böylece tümöre hem metabolik yönden avantaj kazandırırken, hem de tümörün mikroçevreye adaptasyonunu sağlar. VEGF, PDGF anjiyogenez sürecini başlatan bir proteindir. Anjiyogenez süreci tümörü daha invazif ve metastatik bir hale getirir. Anjiyogenez sonucunda tümör içerisine uzanan kapiller yapı sonucunda hem tümöre besin gider hem de tümör hücrelerindeki atıkların uzaklaşması için bir yol oluşmuş olur. Yine anjiyogenez tümör metastazına da katkıda bulunur. Kan dolaşımına katılan tümör hücreleri vücuttaki başka bir bölgeye tutunarak orada

çoğalmaya başlarlar ve metastaz yapabilirler^[91]. HIF1 aynı zamanda metastaz sırasında özellikle tümör hücrelerinin yeni dokuya yerleşimi sırasında görev yapan CXCR4, SDF1 gibi genlerin de ekspresyonunu artırır^[92]. Bunun dışında HIF1 tümör hücrelerinde E-kadherin ekspresyonunu baskılar ve hücre-hücre bağlarını kırarak tümör hücresinin daha hareketli bir yapı kazanmasına yardımcı olur^[93]. Aynı zamanda Twist, Snail, Lox gibi mezenşimal karakter genlerinin ekspresyonunu artırarak EMT'ye katkıda bulunur^[94]. HIF1, HCC'lerde Wnt yolağı ile etkileşerek EMT sürecinde katkıda bulunur^[95]. EMT tümörün malign bir karakter kazanmasına yol açar, EMT sonucunda daha invazif bir hale gelen hücreler vücudun diğer kısımlarına metastaz yapma yeteneğine kavuşurlar^[96]. Buna ilaveten HIF1 hücre sağkalımında da görev yapar. İlginç bir şekilde HIF1 hücrenin apoptoza gönderilmesinde de rol oynar^[97]. Hipoksinin HCC hücrelerinde daha çok sağ kalımı destekleyici yönde rolü olduğu görülmüştür. Hipoksi HCC tümör oluşumuna katkıda bulunan bir süreçtir^[98]. HCC hücrelerinde HIF1'in myeloid hücre faktörü-1'in ekspresyonunu artırarak apoptozu engellediği gösterilmiştir^[99]. Yine HCC'de HIF1'in ekspresyonunu tetiklediği VEGF de Bax/Bcl-2 oranını azaltarak apoptozun engellenmesine sebep olur^[100].

Yukarıda da bahsedildiği gibi HIF1 gerek tümör oluşumu sırasında gerekse tümör ilerleyişi sırasında pek çok genin ekspresyonunu tetiklemekte ve bu süreçlere katkıda bulunmaktadır. Bu açıdan HIF1 kanser tedavisinde önemli hedef proteinlerden biridir. Kinaz inhibitörü Sorafenib ile yapılan çalışmalarda HIF1 ekspresyonunu baskılanması, tümörde damar oluşumlarını azaltmış, tümör büyümesini yavaşlatmıştır^[101]. Tümörlerde HIF1 birikiminin engellenmesi ve ya HIF1 inhibisyonu tedavi açısından önemlidir.

HIF1'in parçalanmasında CUL2 E3 ligazlar görev yapar. CUL2, Elongin B/C, Rbx, SOCS box proteinleriyle etkileşerek CUL2 E3 ligazı meydana getirir. CUL2 E3 ligazlar hücrede devamlı aktif değildirler. Lizin bölgelerinden neddenlenerek konformasyonel değişikliğe uğrarlar ve bunun sonucunda E2 Ubikutin ligaz bağlanabilir. CUL2 E3 ligazlar RING ligaz ailesinin bir üyesidir ve hedef proteinle E2 Ubikutin ligazı yakınlaştırarak ubikutinin E2 ligazdan hedef proteine aktarılmasını sağlarlar^[58,61]. CUL2 ligazlar farklı SOCS box proteinleriyle etkileşebilirler ve etkileştikleri SOCS box proteinlere göre hedef proteinleri farklılık gösterir. HIF1 proteinini tanıyan SOCS box proteini vHL'dir^[102]. vHL bir tümör baskılayıcı protein olarak kabul edilmektedir. vHL'in mutant ve ya aşırı-metile olduğu hücrelerde aşırı damarlanma gözlenmektedir. vHL mutasyonuna sahip olan kişilerin renal karsinoma, hemangioblastomalara ve feokromatom gibi aşırı damarlanmaların olduğu, malign ve ya benin tümörlere yakalanma riski daha yüksek olduğu bildirilmiştir^[103]. Çünkü vHL

mutasyonları sonucunda ortamda HIF1'in birikmektedir. Hepatik stelat hücrelerde yapılan çalışmaların sonuçları da bu yöndedir, hipoksi varlığında biriken HIF1, VEGF ekspresyonunu a zamana bağlı arttırmaktadır. Ortamda bulunan vHL ve E3 ligazlar sayesinde HIF1 birikimi önlenmektedir^[104]. Yani CUL2 E3 ligazın HIF1'ı parçalaması, ortamda HIF1 birikimini önleyerek HIF1 aracılıklı tümörleşme sürecini baskılamaktadır. HIF1'in tümörleşme sürecindeki pek çok genin ekspresyonunu tetiklediği düşünülürse ortamda HIF1 birikimini önlemek hem tümörleşme sürecini baskılar hem de tedavi sürecini olumlu yönde etkiler.

HIF1 ekspresyonu *in vitro* ve *in vivo* koşullarda hipoksik koşullara ilaveten divalen katyonlardan oluşan metal (Cobalt,nikel..vb), demir şelatörleri (desferrioksamin (DFO)), mersalyl gibi ajanların uygulanmasıyla da indüklenmektedir^[105]. CoCl₂, HIF1 ile vHL etkileşimini bloklayarak ortamdaki HIF1'in miktarının artmasını sağlar ^[106]. HCC'de yapılan CoCl₂ uygulamasının HIF1 stabilizasyonunu arttırdığı için hem invazif süreçlere de katkıda bulunduğu hem de apoptozu baskıladığı gösterilmiştir^[107,108]. Çalışmamızda CoCl₂'nin çeşitli HCC hücre hatlarında CUL2 ekspresyonunu arttırdığını gösterdik. Cullin2 E3 ligazlar HIF1'in parçalanmasından rol üstlenirler. Literatürde CoCl₂'ün Cul2 ekspresyonunu nasıl etkilediğine ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız CoCl₂'nin hem zamana bağlı hem de doza bağlı olarak CUL2 protein ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. CoCl₂'ün HIF1 aracılıklı sağkalım, ant-,apoptotik süreçlere katkıda bulunduğu gibi, pek çok hücrede apoptoz ve nekrozu tetiklediği gösterilmiştir ^[109]. Literatürde CoCl₂'ün karaciğer mitokondrisinde oksidatif stresi indükleyerek primer hepatosit hücrelerinde intrinsik apoptoz yolağını tetiklediği gösterilmiştir^[110]. CoCl₂ hücre ölümünü tetikleyen etkisini de HIF1 artışı üzerinden yaptığı düşünülmektedir^[111]. CoCl₂'ün normal hepatosit hücreleri ve fibroblast gibi hücrelerde belli bir dozdan itibaren toksik etki yaptığı gösterilmiştir^[110,111]. CoCl₂'ün bu etkisi taklit ettiği hipoksik koşullara benzemektedir, hipoksik koşullarda da belli süre bırakılan hücrelerin proliferasyonu azalmaktadır^[112].

Çalışmamızda CoCl₂'ün HCC hücreleri üzerindeki HuH7 ve Sk-HEP1 HCC hücre hatları kullanılarak incelendi. Bu hücre hatları 1-3 gün arası değişen sürelerde ve 25-400mM değişen dozlarda CoCl₂'e maruz bırakıldı. 100mM CoCl₂ uygulamasının HuH7 hücre hattında 1.günden itibaren hücre canlılığı %50 oranında azaltmıştır. 1.günde 200mM ve 400mM dozlarda ise hücre ölümü daha fazla olup, hücre sağkalım oranı sırasıyla %30 ve %20'dir. SK-Hep1 hücre hattında ise 400mM lık CoCl₂ dozuna kadar canlılık daha az etkilenmektedir. SK-Hep1 hücre hattında hücre canlılığı ancak 2.günde ve 400mM'lık dozda %50 oranında

azalmıştır, 3.günde ise bu oran %40'lara inmiştir. Diğer dozların SK-Hep1 hücre hattında hücre canlılığı üzerinde etkisi oldukça azdır. SK-Hep1 hücre hattı endotelial orijinli invazif bir HCC hücre hattıdır^[113]. Buna karşın Huh7 iyi diferansiye olmuş bir hepatositlerden meydana gelen, daha az invazif bir hücre hattıdır ve epitelyal karakterdedir^[114]. Hücrelerde CUL2 ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde bu hücrelerdeki bazal CUL2 ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında SK-HEP1 hücre hattında bazal CUL2 ekspresyon düzeyleri arasında minimum bir farklılık olduğu, ancak nedile CUL2 nin SK-HEP1 hücresinde daha yüksek olduğu görülmektedir. HuH7 hücrelerinde ise yine nedile CUL2 ekspresyonu nedile olmayandan daha yüksektir. HuH7 ve SK-Hep1 hücrelerini karşılaştırdığımız zaman SK-Hep1 hücrelerinde hem nedile olan hem de nedile olmayan CUL2 ekspresyonu HuH7'ye göre daha yüksektir.

CoCl2 uyarımının HuH7 hücresinde CUL2 nin nedile formunun 2.4 kat artırırken, SK-HEP1 hücre hattında ise 1.6 kat artırdığı yani daha az artırdığı belirlenmiştir. Bu durum SK-HEP1 hücre hattında hipoksik uyarım sonucunda CUL2 aktif formunun yeterince yüksek olmamasına bağlı HIF1 birikimi ve HIF1 aracılıklı hücre sağ kalımının sağlanması ile açıklanabilir.

Bu iki hücre hattı ile gerçekleştirdiğimiz önceki çalışmalarımızda SK-Hep1, HuH7 hücrelerinde hücre sağkalımı, motilite ve invazyonunu düzenleyen HGF/c-Met yolağında da önemli farklılıklar olduğunu göstermişti^[115]. Nedile CUL2 ekspresyonu yüksek olan HCC hücre dizilerinde HGF reseptörü olan c-Met ekspresyonunun ve bazal c-Met aktivasyonunun nedile CUL2 ekspresyonu düşük olan HCC hücrelerine göre daha yüksek olduğunu dikkati çekmektedir. Bu da CUL2 ekspresyonu ve aktivasyonunda HGF/c-Met yolağının rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu düşüncüyü destekleyen bir veri de daha önceki mikroarray çalışmalarımızdan kaynaklanmaktadır. Mikroarray çalışmalarımız HGF veya Heparin ile c-Met aktivasyonu olan koşullarda CUL2 ekspresyonunun değiştiğini göstermektedir. Bu mikroarray sonucunun doğrulanması amacı ile yapılan RT_PCR çalışmaları HGF ve Heparin uygulamasının CUL2 transkripsiyonunun artırdığını, HGF ve Heparin bir arada iken CUL 2 transkripsiyonunun baskılandığını göstermiştir. Daha sonra gerçekleştirdiğimiz çalışmalar HGF ve Heparin'in CUL2 protein ekspresyonunu da doz ve zaman bağımlı olarak artırdığını göstermiştir. Heparin ve heparan sülfatlar glikozamin ailesinin bir üyesidirler. Heparan sülfatlar reseptör gibi davranarak bağlanan ligandları parçalamaya gönderir hem de ko-reseptör gibi davranarak reseptörün aktivitesini azaltır^[39]. Daha önceki çalışmalarımız HCC'de heparinin c-Met aktivasyonunu artırdığını

göstermişti^[116]. Bu durum CUL2 ekspresyonunun düzenlenmesinde c-Met aktivasyonunu rolünü desteklemektedir. Ancak HGF veya heparinin CUL2 ekspresyonunu hangi mekanizma ile etkilediği bilinmemektedir. HGF ve ya Heparinin HCC hücrelerinde oksidatif stresi arttırarak veya HIF1 düzeyini etkileyerek CUL2 ekspresyonunu tetikliyor olabilir.

Çalışmamızda ayrıca HCC hücrelerinde oksidatif stresi tetiklediği bilinen H₂O₂'nin CUL2 ekspresyonunu arttırdığı literatürde ilk kez gösterilmiştir. H₂O₂'de hücrede oksidatif stresi artıran bir ajandır. H₂O₂'in de CoCl₂ dekine benzer olarak doza bağlı olarak CUL2 ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Literatürde oksidatif stresin hepatositlerde HIF1'i arttırdığı gösterilmiştir^[117]. H₂O₂'de HIF1 aracılıklı olarak CUL2 ekspresyonunu etkiliyor olabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda mikrodizin verilerini doğruluyan biçimde HGF ve Heparinin tek başına CUL2 transkripsiyonunu arttırırken birlikte CUL2 transkripsiyonunu baskıladığı belirlenmiştir. Literatürde ilk kez tüm HCC hücrelerinde CUL2 ekspresyonunun olduğu belirlenmiştir. Hipoksiyi tetikleyen bir ajan olan CoCl₂'nin HCC hücrelerinde CUL2 transkripsiyonu ve ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir. Yine oksidatif stres yol açan H₂O₂'nin CUL2 ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. HGF ve Heparinin tek başına HCC hücrelerinde doz bağımlı olarak CUL2 ekspresyonunun arttırdığı gösterilmiştir. Bütün bu ajanların CUL2 ekspresyonunu hangi yollar aracılığıyla yaptığının araştırılması ve CUL2' nin hepatokarsinogenez sürecindeki rolünün belirlenmesine yönelik için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamız kapsamında;

1. 12 adet HCC hücre hatlarında CUL2 ekspresyonuna bakıldı. Western blot tekniği kullanılarak yapılan çalışmada bakılan bütün HCC hücre hatlarında CUL2 ekspresyonu olduğu saptandı. CUL2 ekspresyonu daha fazla olan hücre hatları Hep3B, PLC-PRF5, Sk-Hep1 iken daha az olan hücre hatları SNU387, SNU475'tir.
2. Farklı dozlar ve zamana bağlı olarak CoCl_2 'ün Sk-hep1 ve Huh7 hücrelerinde sağ kalımına olan etkisi incelendi. MTT tekniği kullanılarak yapılan çalışmada Sk-Hep1'in daha yüksek dozda CoCl_2 'ye dirençli olduğu, Huh7'de ise daha düşük dozlarda sağ kalımın azaldığı belirlendi.
3. CoCl_2 uygulamasından sonra Sk-hep1 hücrelerinde CUL2 gen ekspresyonun arttığı RT-PCR yöntemiyle saptandı.
4. CoCl_2 varlığında CUL2 ekspresyonun arttığı saptandı. Bu çalışmada western blot yöntemi kullanıldı. Huh7, Sk-Hep1, PLC-PRF5, SNU182 hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda CoCl_2 varlığında CUL2 ekspresyonunda artış saptandı.
5. Heparin varlığında CUL2 ekspresyonunda hem doza bağlı hem de zamana bağlı artış görüldü. Western blot yöntemi kullanıldı. Çalışmada 6 saate kadar heparinin CUL2 protein ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. Doza bağlı olarak da 1,10,100mM doz heparin kullanıldığına CUL2 ekspresyonu doza bağlı artmıştır.
6. HGF varlığında CUL2 ekspresyonu zamana bağlı olarak artmıştır. Western blot yöntemi kullanılan çalışmada HGF 24 saate kadar uygulanmış ve zamana bağlı CUL2 ekspresyonunda artış görülmüştür.
7. CoCl_2 gibi hipoksiyi indükleyen bir başka ajan H_2O_2 varlığında da CUL2 ekspresyonu doza bağlı olarak artmıştır. Western blot yöntemi kullanılmıştır. Belli bir doza kadar H_2O_2 CUL2 ekspresyonunu arttırmıştır.
8. Bütün bu ajanların hangi yolaklar aracılığıyla CUL2 ekspresyonunu arttırdığı belirlenmesine yönelik ek deneyler ihtiyaç vardır.

REFERANSLAR

1. emedicine.medscape.com/article/197319/overview, Hepatocellular Carcinoma Medscape References, Axelrod D, Giebel J, 19.06.2013
2. Chuang SC, La Vecchia C, Boffetta P. Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. *Cancer Letters* 2009, 286: 9-14
3. Paradis V. Histopathology of hepatocellular carcinoma recent results. *Cancer Res.* 2013,190: 21-32
4. YAZICI O, Bahar K. Hepatosellüler karsinomda yeni tanı ve tedavi yöntemleri. *Güncel Gastroenteroloji*, 2008, 12: 47-52
5. Venepalli NK, Goff L. Targeting HGF/c-met axis in hepatocellular carcinoma. *Int J of Hepatology*. 2013, Article ID 341636, 11 pages
6. Naka D, Ishii T, Shimomura T. Heparin modulates the receptor-binding and mitogenic activity of hepatocyte growth factor on hepatocytes. *Exp Cell Res.* 1993, 209(2):317-24.
7. Lai JP, Chien J, Strome SE, Staub J ve ark. HSulf-1 modulates HGF-mediated tumor cell invasion and signalling in head and neck squamous carcinoma. *Oncogene*. 2004, 19;23(7):1439-47.
8. Kaelin W, Ivan M. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2001, 11(1): 27-34
9. Kubis HP, Hanke N, Scheibe RJ, Gros G. Accumulation and nuclear import of HIF1 alpha during high and low oxygen concentration in skeletal muscle cells in primary culture. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005, 1745: 187 – 195
10. Moon JO, Welch TP, Gonzales FJ, Copple BL. Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible-factor-1 α -deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009, 296(3): 582-92
11. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and screening. *Semin Liver Dis.* 2005;25(2):143-54.
12. Levrero, M. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 2006, 25(27): 3834–47
13. Donato F, Tagger A, Gellati U ve ark. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and Hepatitis virus infections in men and women. *Am. J. Of Epidemiology* 2002,155(4): 323-31.

14. Morgan TR, Mandayam S, Jamal M. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004,127(5): 87-96
15. Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J of Clin. Laboratory and Clinical Medicine* 2006,147(2): 58-66
16. Li W, Miao X, Qi Z ve ark. Hepatitis B virüs X protein upregulates HSP90alpha expression via activation of c-Myc in human hepatocellular carcinoma cell line, HepG2. *Virology Journal* 2010, 7: 45
17. Villar S, Ortiz-Cuaran S, Abedi-Ardekani B, Gouas D ve ark. Aflatoxin induced TP53 R249S mutation in hepatocellular carcinoma in Thailand: Association with tumors developing in the absence of liver cirrhosis. *Plos One* 2012,7(6): e37707
18. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/liver/anatomy.html>, Architecture liver and biliary tracts, Bowen R, 25.06.2013
19. http://www.turkjpath.org/pdf/pdf_PB_249.pdf, Karaciğerin Histolojisi, Fehmi Aksoy, 25.06.2013
20. <http://www.mananatome.com/basic-anatomy/sinusoids>, Sinusoids, 25.06.2013
21. Li D, Friedman S. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for the therapy. *J of Gastroenterology and Hepatology* 1999, 14: 618-33
22. http://www.hivandhepatitis.com/2009icr/ddw/docs/060909_c.html, Does HIV-HCV coinfection increase the risk of liver disease progression and worsen clinical outcomes, Highleyman L, 25.06.2013
23. Valkova M. Hepatic fibrogenesis. *Bratisl Lek Listy* 2002, 103 (2): 76-85
24. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000, 275: 2247-50
25. Chen HJ, Min CM, Lin CS. The role of microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1) in Wnt signaling pathway. *Genes & Dev.* 2006, 20:1933-45
26. Monga S. Role of Wnt/ β -catenin signaling in liver metabolism and cancer. *Int. J. of Biochemistry & Cell Biology* 2011, 43(7):1021-9
27. Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2012,4(5):1837-51
28. Nejak-Bowen KN, Monga S. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting good from the bad. *Seminars in Cancer Biology* 2011, 21(1):44-58

29. Kitisin K, Pishvaian M, Johnson L, Mishra L. Liver stem cells and molecular signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Gastrointestinal Cancer Research* 2007, 4(2):512-21
30. Vincent AM, Feldman EL. Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth hormone & IGF research* 2002, 12(4): 193-7
31. Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF- β signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin* 2009, 41(4): 263–272
32. Mishra L, Marshall B. Adaptor proteins and ubiquitinators in TGF-beta signaling. *Cytokine & growth factor reviews* 2006, 17(1-2):75-87
33. Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*. 1995 23;373(6516): 702-5.
34. Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K *ve ark*. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl. Acad Sci USA*. 2004, 101(13): 4477-82
35. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods*. 1983, 16;65(1-2):55-63
36. Organ S, Tsao M. An overview of the c-Met signaling pathway. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2011, 3(1): 7-19
37. Eder JP, Vande Woude GF, Boerner S, LoRusso PM. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. *Clinical cancer research*. 2009,15(7):2207-14
38. Knudsen BS, Vande Woude. GF Showering c-Met dependent cancers with drugs. *Current Opinion in Genetics and Development*. 2008, 18(1):87-96
39. Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011, 3:a004952
40. Rubin JS, Day RM, Breckenridge D, Atabey N *ve ark*. Dissociation of Heparan Sulfate and receptor binding domains of hepatocyte growth factor reveals that heparan sulfate c-Met interaction facilitates signaling. *J. Biol. Chem*. 2001, 276:32977-32983.
41. Ozen E, Gozukızıl A, Erdal E, Atabey N *ve ark*. Heparin inhibits Hepatocyte Growth Factor induced motility and invasion of hepatocellular carcinoma cells through early growth response protein 1. *Plos One* 2012, 7(8):e42712
42. Simon F, Bockhorn M, Praha C, Baba HA. Deregulation of HIF1-alpha and hypoxia regulated pathways in hepatocellular carcinoma and corresponding non-malignant

- liver tissue-influence of a modulated host stroma on the prognosis of HCC. *Langenbecks Arch Surg* 2010,395:395–405
43. Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Tahara M *et al*. Up-regulation of c-Met protooncogene product expression through hypoxia-inducible factor 1 is involved in trophoblast invasion under low oxygen tension. *Endocrinology* 2005,146(11):4682–4689
 44. Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA. Hepatocyte growth factor signaling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis* 2001, 22 (9):1363-1371.
 45. Semenza GL. Hypoxia inducible factor 1: master regulator of O₂ hemostasis. *Current Opinion in Genetics & Development* 1998, 8: 588-594
 46. Majmundar A, Wong W, Simon M. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell*. 2010, 40(2):294-309
 47. Pugh WC, Ratcliffe PJ. The von Hippel–Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 2003, 13(1):83-9
 48. Nakayama K. Cellular signal transduction of the hypoxia response. *J Biol Chem*. 2009, 146 (6): 757-765
 49. Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death and Differentiation*. 2008, 15: 678–685
 50. Dikic I and Robertson M. Ubiquitin ligases and beyond. *BMC Biology* 2012, 10: 22.
 51. Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*. 2004, 1965: 55-72
 52. De Bie P, Ciechanover A. Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Cell Death and Differentiation*. 2011, 18: 1393–1402
 53. Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell cycle control and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006, 6:369-81
 54. Bernassola F, Karin M, Ciechanover A, Melino G. The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell*. 2008, 14(1):10-21
 55. Hatakeyama S, Matsumoto M, Yada M, Nakayama KI. Interaction of U-box-type ubiquitin-protein ligases (E3s) with molecular chaperones. *Genes to Cells*. 2004, 9: 533–548

56. Bienz M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. Trends in Biochemical Sciences. 2006, 31(1): 35-40
57. Coscoy L, Ganem D. PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruses make the connection. Trends in Cell Biology 2003, 13(1): 7-12
58. Deshaies RJ, Joazeiro AP. RING domain E3 ubiquitin ligases. Annual review of biochemistry. 2009, 78: 399-434
59. Chen C, Seth AK, Aplin AE. Genetic and expression aberrations of E3 ubiquitin ligases in human breast cancer. Molecular cancer research. 2006, 4(10):695-707
60. Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ligases. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2005, 6: 9-20
61. Bosu DR, Kipreos T. Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. Cell Division. 2008,3:7
62. Pan Z, Kentsis A, Dias DC, Yamoah K ve ark. Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. Oncogene 2004, 23(11): 1985-97
63. Rabut G, Peter M. Function and regulation of protein neddylation. Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. EMBO Reports 2008, 9(10): 969-76
64. Stratmann JW, Gusmaroli G. Many jobs for one good cop- the COP9 signalosome guards development and defense. Plant Science 2012, 185–186: 50–64
65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=8453>, Cullin2, 26.06.2012
66. Megumi Y, Miyauchi Y, Sakurai H, Nobeyama H ve ark.. Multiple roles of Rbx1 in the VBC-Cul2 ubiquitin ligase complex. Genes to Cells. 2005, 10: 679-91
67. Mahrouf N, Redwine WB, Florens L, Swanson SK ve ark. Characterization of Cullin-box sequences that direct recruitment of Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules to Elongin BC- based ubiquitin ligases. J Biol Chem. 2008, 283(12): 8005-13
68. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. Physiology 2004,19:176-182
69. Feng H, Zhong W, Punkosdy G, Gu S ve ark. CUL-2 is required for the G1 to S phase transition and mitotic chromosome condensation in *Caenorhabditis elegans*. Nature Cell Biology. 1999(1): 486-92
70. Bowerman B, Kurz T. Degrade to create: developmental requirements for ubiquitin-mediated proteolysis during early *C. elegans* embryogenesis. Development. 2006, 133(5): 773-84

71. Liu J, Vasudevan S, Kipreos ET. CUL-2 and ZYG-11 promote meiotic anaphase II and the proper placement of the anterior-posterior axis in *C.elegans*. *Development*. 2004, 131:3513-25
72. Sonnevile R, Gönczy P. Zyg-11 and cul-2 regulate progression through meiosis II and polarity establishment in *C.elegans*. *Development* 2004, 131: 3527-3543
73. Huh KW, Zhou X, Hayakawa H, Cho JY. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virology*. 2007,81(18):9737-47
74. Nath B, Szabo G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver disease. *Hepatology*. 2012, 55(2):622-33
75. Zheng SS, Chen XH, Yin X, Zhang BH. Prognostic Significance of HIF1- α Expression in Hepatocellular carcinoma: a meta analysis. *PLoS One*. 2013, 14;8(6):e65753
76. Dai CX, Gao Q, Qui SJ, Ju MJ *et al*. Hypoxia- inducible factor-1 α , in association with inflammation, angiogenesis and MYC is a critical prognostic factor in patients with HCC after surgery. *BMC Cancer*. 2009,1(9):418
77. Nakamura K, Zen Y, Sato Y, Kozaka K, Matsui O *et al*. Vascular endothelial growth factor, its receptor Flk-1, and hypoxia inducible factor 1 α are involved in malignant transformation in dysplastic nodules of the liver. *Hum Pathol*. 2007, 38(10): 1532-46
78. Nejak-Bowen KN, Monga SP. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *Seminars in Cancer Biology* 2011,21(1): 44-58
79. Zhang L, Huang G, Li X, Zhang Y. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAI1 by hypoxia inducible factor-1 α in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2013 13: 108.
80. Meada Y, Suzuki T, Pan X, Chen G. CUL2 is required for the activity of hypoxia-inducible factor and vasculogenesis. *J Biol Chem*. 2008, 283(23): 16084-92
81. <http://www.microbehunter.com/2010/06/27/the-hemocytometer-counting-chamber/>, The hemocytometer (counting chamber), 29.06.2013
82. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia inducible factor-1 and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann N Y Acad Sci*. 2002, 973:443-7.

83. Yuan Y, Hillard G, Ferguson T, Milhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem* 2003;278(18): 15911-6
84. http://en.wikipedia.org/wiki/File:SDSPAGE_Electrophoresis.png, SDS-PAGE, 29.06.2013
85. <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=13045>, 29.06.2013
86. http://worlderlenmeyer.blogspot.com/2011_11_01_archive.html, 29.06.2013
87. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods*. 1983, 16;65(1-2): 55-63
88. Ke Q, Costa M. Hypoxia inducible factor: HIF1. *Mol Pharmacol* 2006;70: 1469–1480
89. Gatenby R, Gillies R. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Rev Cancer*. 2004, 4(11): 891-9
90. Podar K, Anderson KC. A therapeutic role for targeting c-Myc/Hif-1 dependent signaling pathways. *Cell Cycle*. 2010, 9(9): 1722-8
91. Nishida N, Yano H, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*. 2006, 2(3): 213-9
92. Ishikawa T, Nakashiro K, Klosek SK, Goda H. Hypoxia enhances CXCR4 expression by activating HIF-1 in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2009, 21(3): 707-12
93. Esteban MA, Tran M G.B, Harten S K, Hill P. Regulation of E-cadherin expression by vHL and hypoxia inducible factor. *Cancer Res* 2006; 66 (7): 3567-3575
94. Yang MH, Wu KJ. *TWIST* activation by hypoxia inducible factor-1(HIF-1) implications in metastasis and development. *Cell Cycle*. 2008, 7(14): 2090-6
95. Zhang Q, Bai Xi, Chen W, Ma T *ve ark*. Wnt/ β - catenin signaling enhances hypoxia induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif1 α signaling. *Carcinogenesis* 2013, 34(5): 962-73
96. Kalluri R, Weinberg R. The basics epithelial- mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6): 1420–8
97. Bacon AL, Harris AL. Hypoxia inducible factor and hypoxic cell death in tumor physiology. *Ann Med*. 2004;36(7): 530-9.
98. Gwak GY, Yoon JH, Kim KM, Lee HS *ve ark*. Hypoxia stimulates proliferation of human hepatoma cells through the induction of hexokinase II expression. *J of Hepatology*. 2005, 42(3): 358-64

99. Piret JP, Minet E, Cosse JP et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 9336-44
100. Baek JH, Jang JE, Kang CM et al. Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. *Oncogene* 2000; 19: 4621-31.
101. Liu L, Ho RLK, Chen G, Lai P. Sorafenib inhibits hypoxia-inducible factor-1 α synthesis: implications for antiangiogenic activity in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012, 15(18): 5662-71
102. Kamura T, Maenaka K, Kotoshiba S, Matsumoto M. VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev.* 2004 15;18(24):3055-65
103. Bader HL, Hsu T. Systemic VHL gene functions and the VHL disease. *FEBS Letters* 2012, 586:1562–1569
104. Wang YQ, Luk JM, Ikeda K, Man K ve ark. Regulatory role of vHL/HIF-1 α in hypoxia-induced VEGF production in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, 30;317(2):358-62.
105. Agani A, Semenza G. Mersalyl is a novel inducer of vascular endothelial growth factor gene expression and hypoxia-inducible factor 1 activity. *Molecular Pharmacology* 1998, 54: 749-54
106. Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., Millhorn, D.E. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von-Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α . *J of Bio. Chemistry.* 2003,278(18): 15911-6
107. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;973:443-7.
108. Zhang L, Huang G, Li X, Zhang Y ve ark. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAI1 by hypoxia-inducible factor -1 α in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2013, 9(13):108.
109. Garoui EM, Fetoui H, Ayadi Maknib F, Boudawara T ve ark. Cobalt chloride induces hepatotoxicity in adult rats and their suckling pups. *Experimental and toxicologic pathology.* 2011, 63(1-2):9-15

110. Battaglia V, Compagnone A, Bandino A, Bragadin M ve ark. Cobalt induces oxidative stress in isolated liver mitochondria responsible for permeability transition and intrinsic apoptosis in hepatocyte primary cultures. The Int. J of Biochemistry & cell biology. 2009, 41(3): 586-94
111. Vengellur A, LaPres JJ. The role of hypoxia inducible factor 1 α in cobalt chloride induced cell death in Mouse embryonic fibroblasts. Toxicol. Sci. 2004, 82(2): 638-46.
112. Box AH, Demetrick DJ. Cell cycle kinase inhibitor expression and hypoxia-induced cell cycle arrest in human cancer cell lines. Carcinogenesis 2004; 25: 2325-35.
113. Heffelfinger SC, Hawkins HH, Barrish J, Taylor L. Sk-Hep1: a human cell line of endothelial origin. In Vitro Cell Dev Biol. 1992, 28(2):136-42
114. Vecchi C, Montosi G, Pietrangelo A. Huh-7: a human "hemochromatotic" cell line. Hepatology. 2010;51(2):654-9
115. Bozkaya G, Korhan P, Çokaklı M, Erdal E ve ark. Cooperative interaction of MUC1 with the HGF/c-Met pathway during hepatocarcinogenesis. Molecular Cancer 2012, 11: 64
116. Ayşim Gözükızıll. Hepatoselüler Karsinom Gelişiminde Tioredoksin Etkileşimli Protein (TXNIP)'in Rolü. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 2010, İzmir
117. Lopez –Lazaro M. HIF-1 hypoxia-inducible factor or dysoxia-inducible factor? The FASEB journal 2006, 20(7):828-32

EK 1

1. PBS(Phosphate buffered saline)

8g NaCL

0,2g KCL

1.44g Na₂HPO₄

0.24g KH₂PO₄

Alınarak 800ml dH₂O içerisinde çözüldü. pH 7,4ayarlandı ve kalan hacim 1L'ye tamamlandı.

2. Kobalt klorür(CoCl₂) Stok Solüsyonu

0,2379g CoCl₂ alınıp 10 ml dH₂O içinde çözüldüğünde 0,1M konsantrasyonda CoCl₂ çözeltisi elde edildi. Bu çözelti alınıp ortam ve ya dH₂O ile dilute edilerek diğer konsantrasyondaki CoCl₂ çözeltileri de hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler +4°C'de saklandı.

3. Heparin Stok Solüsyonu

1mg, 10mg, 100mg heparin tartılarak 1ml PBS içerisinde çözüldü. 26mm çaplı filtrelerden (Corning, 431219) geçirildikten sonra, stok steril polypropilen tüplerde +4 °C'de saklandı.

4. TRIS-BSA

0.5M Tris, 1.5M NaCL, %2 BSA eklendi. pH 7.4'e ayarlandı. Ve hazırlanan solüsyon +4C'de saklandı. Stok HGF de Tris-BSA içerisinde dilute edildi. Ve silikonize tüp içerisinde uzun süre saklanacaksa -80°C 'de , kısa süreli kullanım içinse -20°C'de saklandı.

5. 50X TAE buffer

242g Tris

57.1ml Asetik asit

100ml EDTA eklenir ve son hacim 1L olacak şekilde dH₂O eklenir.

1X TAE buffer için suyun içerisinde 1:50 dilute edildi.

6. Lizis Buffer(RIPA)

50mM Tris-CL(pH 7.4)

150mM NaCL

1mM EDTA(pH:8)

%1 NP-40

7. 2X Yükleme Tamponu

12% SDS 1.2g

40% Gliserol 4.0 ml

0.2 M tris-HCl pH7 2.0 ml of 1 M Stok

0.004% BromoFenol mavisi 0.4 mg

8. 1.5 M Tris-CL

18,165g Tris 100ml dH₂O içerisinde çözündü, pH 8.8'e ayarlandı.

9. 1M Tris-CL

Tris bazından 12.11g tarıldı. 100 ml dH₂O içerisinde çözüldü, pH 6.8'e ayarlandı.

10. Yürütme Tamponu

3.025g Tris

14.4 g Glisin

10 ml %10 SDS alınarak dH₂O ile 1L'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

11. Transfer Tamponu

14,4g Glisin

3.025g Tris

2ml %10 SDS alınarak dH₂O ile 800ml'ye tamamlandı. Daha sonra 200ml metanol eklendi.

12. %5 BSA

0.5 g BSA tartılıp, TBS ve TBS-T karışımı içerisinde çözölmüştür.

13. %5 NFDM

0.5 g süt tozu tartılıp, TBS ve TBS-T karışımı içerisinde çözönmüştür.

14. %30 Akrilamid-Bisakrilamid

29g akrilamid, 1g bisakrilamid tartıldı ve 100ml dH₂O'nun içerisinde çözöldü. Hazırlanan solüsyon karanlık ortamda ve +4C'de saklandı.

15. 10X TBS

40g NaCL

1g KCL

15g Tris tartıldı, 500ml dH₂O içinde çözöldü. pH 7.4'e ayarlandı.

16. 1X TBS

100ml 10X TBS alınarak 900ml dH₂O eklendi, pH 7.2-7.4 arasına ayarlandı.

17. 1X TBS-T

500ml 1XTBS içërisine 2.5ml Tween-20 konuldu.

18. 10X Sodyum Azid

1g Sodyum azid, 50ml dH₂O içërisinde çözöldü.

19. Strip Buffer

0,75g Glisin

0,05g SDS

0,5ml Tween-20 50ml dH₂O içërisinde çözöünür. pH 2,2'ye ayarlanır.

20. 6X Yükleme Tamponu

10mM Tris-HCL(ph7.6)

%0.003 bromofenol mavi

%0.003 ksilen siyanol FF

%60 Gliserol

60mM EDTA dH₂O içerisinde çözöldü.

21. Developer

250ml developer solüsyonuyla 750ml dH₂O karıştırdı.

22. Fiksatif

250ml fiksatif A, 25ml fiksatif B ve 725ml dH₂O eklenip karıştırdı.

23. MTT Assay

5mg/ml konsantrasyonda MTT tuzu ortam ve ya PBS içerisinde çözöndü.

24. Kullanılan Primer Antikor ve Solüsyonları

Primer Antikor	Primer Antikor Dilusyonu	Sekonder Antikor	Sekonder Antikor Dilusyonu
Cullin2(Santa Cruz,H-300, sc-10781)	1:2000 ,%3 BSA, %0.01 TBS-T içinde	Anti-Rabbit (Pierce, 1858414)	1:1000 ,%3 BSA, %0.01 TBS-T içinde
Calnexin(Santa Cruz,sc-11397)	1:5000, %3 NFDM, %0.01 TBS-T içinde	Anti-Rabbit (Pierce, 1858414)	1:1000 ,%3 BSA, %0.01 TBS-T içinde

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/14-07	Tarih: 12.04.2012
	Prof.Dr.Neşe ATABEY'in sorumlusu olduğu "Hepatokarsinogenez Sürecinde CULLIN2 Gen Ekspresyonu ve Aktivasyonunun Rolünün Hepatosellüler Karsinom Hücre Dizilerinde İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	Besti
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Açıkgoz
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	Malkoç
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	N. Sarioğlu
Prof.Dr.Adnan MENDERES	Plastik Cerrahi	DEU Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Adnan Menderes
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Ece Böber
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Hüseyin Baskın
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	M. Güneli
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Ayşe Özkütük
Doç.Dr.İşıl TEKME	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	İhsan Çelikdemir

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

EK.3 ARAŞTIRMACI ÖZGEÇMİŞİ

Burçin Baran

TC Kimlik No	33268156240
Doğum Yılı	1988
Adres	Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yeni Dekanlık Binası K:3 Oda: 3051 Balçova-İzmir
Telefon	(232)412622
Cep Tlf	05054409063
e-posta	burcinbrn@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Yüksek Lisans	2010-devam ediyor
Türkiye	Yeditepe Üniversitesi	Mühendislik Fakültesi	Genetik ve Biyomühendislik	Lisans	2010-2005

POSTER

1.	“Regulation of Cullin2 Ubiquitin Ligase Expression by HGF/c-Met SignalingPathway” poster presentation in FEBS Protein Quality Control and Ubiquitin Systems in Health and Disease Meeting, 14-16 November 2012
----	--

KATILDIĞI KONGRELER

1.	14-16 November 2012, FEBS Protein Quality Control and Ubiquitin Systems in Health and Disease Meeting,
2.	26-30 October 2011 12.National Medical Biology Meeting, Antalya
3.	26-29 January 2011,Cell Signalomics,Luxemburg

4.	October 2010,Bioinformatics Roadshow-İzmir by EMBL-EBI, Dokuz Eylül University
5.	10-16 Ocak 2010, Winter School on Frontiers in Nanomedicine and Nanobiotechnology,and Workshop on Current Trends in Molecular Nanosciences, Bilkent University,Ankara
6.	28-30 Ağustos 2008, II.İTÜ National Molecular Biology and Genetics Student Meeting, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul
7.	2-3 Kasım 2007, Gene Therapy Symposium, Yeditepe Üniversitesi, İstanbul