

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KANSER GELİŞİMİNDE SİTOKROM P450 1A1,
HEPATİT B X VE NÜKLEAR FAKTÖR KAPPA B ETKİLEŞİMLERİNİN
ROLÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Tuğba KOÇ**

Ana Bilim Dalı: BİYOLOJİ

Prof. Dr. Alaattin ŞEN

EYLÜL 2013

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAY FORMU

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 101461022 nolu öğrencisi Tuğba KOÇ tarafından hazırlanan "Hepatoselüler Kanser Gelişiminde Sitokrom P450 1A1 (CYP1A1), Hepatit BX (HBX) ve Nükleer Faktör Kappa B Etkileşimlerinin Rolü" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Alaattin ŞEN (PAÜ)
(Jüri Başkanı)



Jüri Üyesi : Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN (PAÜ)



Jüri Üyesi : Doç. Dr. Gürkan SEMİZ (PAÜ)




Jüri Üyesi: Yard. Doç. Dr. Yavuz DODURGA (PAÜ)




Jüri Üyesi: Yard. Doç. Dr. Hatice ARDAĞ AKDOĞAN (PAÜ)



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
06/11/2013. tarih ve 34/16..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Nuri KOLSUZ

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

İmza : 

Öğrenci Adı Soyadı : Tuğba KOÇ

ÖNSÖZ

Hepatosellüler Kanser Gelişiminde Sitokrom P450 1A1, Hepatit B X ve Nüclear Faktör Kappa B Etkileşimlerinin Rolü çalışması Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji Araştırma Laboratuvarında ve Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.B.D. Laboratuvarında yapılarak yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışma konusunun belirlenmesinde ve tez çalışması süresince benden yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, laboratuvarının tüm imkânlarını sonuna kadar açan, deneyim olarak yetişmemde çok büyük emeği olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN'e şükranlarımı sunarım.

Tez çalışması süresince benden yardımlarını, desteğini, bilgilerini ve güler yüzünü esirgemeyen, laboratuvarının tüm imkanlarını sonuna kadar açan, deneyim olarak yetişmemde çok büyük emeği olan değerli hocalarım Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN'a ve Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN'a şükranlarımı sunarım.

Tezimin düzenlenmesi ve değerlendirilmesi aşamasındaki yardımlarından ve katkılarından dolayı değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a, Doç. Dr. Gürkan SEMİZ'e ve Yrd. Doç. Dr. Hatice ARDAĞ AKDOĞAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışması süresince yardımlarını, desteğini ve bilgilerini esirgemeyen, her zaman her konuda beni destekleyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Yavuz DODURGA'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda ve günlük hayatımda desteğini ve bilgilerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve beni her konuda destekleyen değerli hocam Dr. Aslı SEMİZ'e teşekkür ederim.

Bu çalışmanın maddi desteği için Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (2011FBE053) ve TÜBİTAK'a (111T612) teşekkür ederim.

Ayrıca eğitimim süresince yardımlarını eksik etmeyen tüm bölüm hocalarıma, laboratuvar çalışma arkadaşlarıma ve her zaman yanımda olan ve beni bu günlere özveriyle getiren aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Eylül 2013

Tuğba KOÇ

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
SUMMARY.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.2. Çalışmanın Amacı.....	10
2. MATERYAL VE METOD	11
2.1. Materyal.....	11
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	11
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	11
2.1.3. Hücre Kültürü.....	11
2.2. Metotlar.....	13
2.2.1. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 ve pCMV6-AC-GFP-RelA Vektörünün <i>E.coli</i> <i>DH5α</i> Hüresine Transformasyonu.....	13
2.2.2. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 ve pCMV6-AC-GFP-RELA Vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX Hücrelerine Geçici Transfeksiyonu...14	14
2.2.3. HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX Hücrelerine Geçici Transfeksiyon ile aktarılan CYP1A1 Geninin siRNA Metodu ile Baskılanması.....	14
2.2.4. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezinin Yapılması.....	15
2.2.5. CYP1A1 ve RelA Genlerinin mRNA Düzeyinde İfadelerinin RT-PZR Analizi ile Belirlenmesi.....	16
2.2.6. CYP1A1 ve RELA Ekspresyonlarının Hücre Canlılığına Etkilerinin Tayin Edilmesi.....	17
2.2.7. Hücrelerde Etoksiresorufin O-Dealkilaz (EROD) Aktivite Tayini.....	18
2.2.8. Transfeksiyon sonrası Hücrelerdeki CYP1A1 Varlığının Protein Düzeyinde İfadesinin Western Blot ile Kontrolü.....	19
2.2.9. CYP1A1, HBX ve RELA Protein Etkileşimlerinin İmmün Çöktürme Yöntemiyle Tayin Edilmesi.....	21
3.BULGULAR	24
3.1. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 ve pCMV6-AC-GFP-RelA Vektörünün <i>E.coli</i> <i>DH5α</i> Hüresine Transformasyonunun Belirlenmesi.....	24
3.2. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 Vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX Hücrelerine Geçici Transfeksiyonunun Verimliliğinin Belirlenmesi.....	24
3.3. RNA'ların Belirlenmesi.....	26
3.4. CYP1A1 ve RELA Vektörlerinin HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX Hücrelerine Geçici Transfeksiyonunun Sonrasında CYP1A1 ve RELA Varlığının PZR ile Kontrolü.....	27
3.5. CYP1A1 Ekspresyonunun Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi.....	30
3.6. İlgili Hücrelerde Alkoksiresorufin O-Dealkilaz (EROD) Aktivite Tayini...34	34

3.7. Transfeksiyon Sonrası Hücrelerdeki Protein Profillerinin SDS-PAGE Analizi ile Belirlenmesi.....	35
3.8. Transfeksiyon Sonrası Hücrelerde CYP1A1 Geninin Protein Düzeyinde İfadesinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi.....	36
3.9. CYP1A1 ve HBX Protein-Protein Etkileşimlerinin İmmün Çöktürme Yöntemi ile Belirlenmesi.....	37
4. TARTIŞMA.....	39
5. SONUÇ.....	46
6. KAYNAKLAR.....	47

KISALTMALAR

BCA	: Bişinşonik Asit
BHT	: Bütilhidroksitoluen
BSA	: Sığır Serum Albumin
cccCDNA	: kovalent kapalı dairesel deoksiribonükleik asit
CO₂	: Karbondioksit
CYP450	: Sitokrom P450
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ε-ACA	: ε-aminokaproik asit
ECL	: Gelişmiş Kemilüminesans
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu
EROD	: Etoksirezorufin O-deetilaz
GAPDH	: Gliseraldehit 3 fosfat dehidogenaz
HBX	: Hepatit B X
HBV	: Hepatit B Virüsü
HepG2	: İnsan Karaciğer Hücre Hattı
HRP	: Horseradish peroksidaz
KPi	: Potasyum fosfat
LHB	:Büyük Yüzey hepatit b proteini
MAPK	: Mitojen aktivasyon protein kinaz
MgCl₂	: Magnezyum klorür
MHB	: Orta yüzey hepatit B proteini
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-KB	: Nüklear Faktör Kappa B
PAH	: Poliaromatik Hidrokarbon
PBS	: Fosfat Tampon Tuzu
pCMV6-AC-GFP	: Sitomegalo virüs 6-Ampisilin Yeşil Floresan Protein
PMSF	: Fenilmetan sülfonil florid
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ras	: rat sarkoma
rcDNA	: geniş dairesel deoksiribonükleik asit
REL A	: Retikuloendotelyosis viral Oncojen Homolog A
RNA	: Ribonükleik asit
SAPK/JNK	: Stres aktivasyon protein kinaz/NH ₂ -terminal Jun Kinaz
SHB	: Küçük yüzey proteini
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
TEMED	: N',N',N'-Tetrametil-etilen-diamin
XTT	: 2,3-Bis-2-Metoksi-4-Nitro-5-Sulfofenik-2H-Tetrazolyum-5-Karboksinalide
WST	: (2-2-Metoksi-4-Nitrofenil-3-4-nitrofenil-5-2,4-Disulfofenill-2H-Tetrazolyum)

TABLO LİSTESİ

Tablolar

Tablo 2. 1. Seçilen CYP450 genleri için tanımlanan primer dizileri	16
Tablo 2. 2. EROD aktivite ölçüm karışımının içeriği.....	18
Tablo 2. 3. SDS-PAGE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları	19

ŞEKİL LİSTESİ

Şekiller

- Şekil 3. 1. CYP1A1 ve RelA plazmid DNA'larının agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi.24
- Şekil 3. 2. HepG2-HBX hüresine Lipofectamin ltx plus solusyonu kullanılarak aktarılan pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün ve HepG2-HBX hüresinin floresan mikroskoptaki görüntüsü.25
- Şekil 3. 3. HepG2-pcDNA3 hüresine Lipofectamin ltx plus solusyonu kullanılarak aktarılan pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün ve HepG2-pcDNA3 hüresinin floresan mikroskoptaki görüntüsü.25
- Şekil 3. 4. HepG2-HBX hüresine, Lipofectamin ltx plus solusyonu kullanılarak aktarılan pCMV6-AC-GFP-RELA vektörünün ve HepG2-HBX hüresinin floresan mikroskoptaki görüntüsü.....26
- Şekil 3. 5. HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-CYP1A1, HepG2-HBX ve HepG2-HBX-CYP1A1 RNA'larının görüntüsü.....27
- Şekil 3. 6. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBX hücrelerine geçici transfeksiyonu ile aktarılan CYP1A1 RNA ifadesinin RT-PZR ile belirlenmesi.....28
- Şekil 3. 7. HepG2-HBX-CYP1A1-siRNA CYP1A1 hüresinin mRNA ifadesinin RT-PZR ile belirlenmesi.29
- Şekil 3. 8. pCMV6-AC-GFP-RELA vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBX hücrelerine geçici transfeksiyonu ile aktarılan CYP1A1 RNA ifadesinin RT-PZR ile belirlenmesi.29
- Şekil 3. 9. HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-CYP1A1 hücre canlılığının XTT metodu ile belirlenmesi31
- Şekil 3. 10. HepG2-HBX ve HepG2-HBX-CYP1A1 hücre canlılığının XTT metodu ile belirlenmesi.31
- Şekil 3. 11. HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-CYP1A1 hücre canlılıklarının WST metodu ile belirlenmesi.....31
- Şekil 3. 12. HepG2-pcDNA3-CYP1A1 ve HepG2-pcDNA3-siRNACYP1A1 hücre canlılıklarının WST metodu ile belirlenmesi.32
- Şekil 3. 13. HepG2-HBX ve HepG2-HBX-CYP1A1 hücre canlılığının WST metodu ile belirlenmesi.32
- Şekil 3. 14. HepG2-HBX-CYP1A1 ve HepG2-HBX-siRNACYP1A1 hücre canlılığının WST metodu ile belirlenmesi.....33
- Şekil 3. 15. RELA ekspresyonunun HepG2-HBX hücre canlılığına etkisinin WST metodu ile belirlenmesi.34
- Şekil 3. 16. HepG2-HBX, HepG2-HBX-CYP1A1 ve HepG2-HBX-siRNA-CYP1A1 hücrelerinde EROD aktivitesinin belirlenmesi.....35
- Şekil 3. 17. HepG2-HBX, HepG2-HBX-CYP1A1, HepG2-HBX-CYP1A1-siRNA protein profillerinin SDS-PAGE analizi ile belirlenmesi. 36

Şekil 3. 18. HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-CYP1A1, HepG2-HBX-CYP1A1 hücrelerinin protein düzeyinde ifadelerinin Western blot yöntemiyle belirlenmesi.	37
Şekil 3. 19. İmmun çöktürme yapılan HepG2-HBX, HepG2-HBX-CYP1A1 hücre lizatlarının, protein profillerinin SDS-PAGE yöntemiyle belirlenmesi.	38
Şekil 3. 20. HepG2-pcDNA3-HBX, HepG2-pcDNA3-HBX-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 ve HepG2-pcDNA3-HBX-siRNA-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücrelerinin, hücre canlılığının WST metodu ile belirlenmesi.	43
Şekil 3. 21. RELA gen ifadesinin HepG2-HBX hücresinde WST metodu ile belirlenmesi.	45

ÖZET

HEPATOSELLÜLER KANSER GELİŞİMİNDE SİTOKROM P450 1A1, HEPATİT B X VE NÜKLEAR FAKTÖR KAPPA B ETKİLEŞİMLERİNİN ROLÜ

Bu çalışmada, Hepatit B X (HBX), Sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) ve Nükleer Faktör kappa B (NF- κ B) proteinlerinin Hepatit B Virüs aracılı insan karaciğer kanser hücre hattında (HepG2) protein-protein etkileşim potansiyelinin moleküler yaklaşımlar ile aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla HepG2 hücrelerine CYP1A1 ve NF- κ B (ReLA) genlerinin geçici transfeksiyonu yapılmıştır. Transfeksiyondan sonra HBX, CYP1A1 ve ReLA genlerinin HepG2 hücrelerinde mRNA düzeyinde ifadelerinin saptanması Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi ile belirlenmiştir ve CYP1A1 aktivitesi tayin edilmiştir. CYP1A1 ve ReLA genlerinin hücre yaşamı üzerine etkileri araştırılmıştır. CYP1A1 geninin protein düzeyinde ifadesi Westren Blot yöntemi ile saptanmıştır. CYP1A1, HBX proteinlerinin protein-protein etkileşimleri İmmün Çöktürme analizi ile tayin edilmiştir. Deneyler sonucunda HepG2 hücrelerine aktarılan CYP1A1 ve ReLA genlerinin transfeksiyon verimliliğinin %20-%40 olduğu tespit edilmiştir. CYP1A1 ve ReLA genlerinin mRNA düzeyinde ifadelerinin ve CYP1A1 enzim aktivitesinin olduğu belirlenmiştir. CYP1A1 ve ReLA genlerinin HepG2 hücrelerine toksik etki göstermediği saptanmıştır. Yapılan Western Blot çalışmalarında CYP1A1'in protein düzeyinde ifadesinin insan karaciğer kanser hücrelerinde az miktarda olduğu belirlenmiştir. İmmün çöktürme çalışması HepG2 hücrelerinde CYP1A1 ve HBX'in protein-protein etkileşimlerinin olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak, HBX geni aktarılmış insan karaciğer kanser hücresinde HBX geni ile CYP1A1 geninin protein düzeyinde protein-protein etkileşimlerinin olmadığı tespit edilmiştir. Bu durumun da, HBV mekanizmasında CYP1A1 geninin rol oynamadığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hepatoselüler karsinom, Hepatit B X protein, Sitokrom P450 1A1, Nükleer Faktör Kappa B

SUMMARY

THE ROLE OF INTERACTIONS OF CYP1A1, NF- κ B AND HEPATITIS BX IN THE DEVELOPMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA

In this study, the potential interactions among Hepatitis BX (HBX), Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) proteins in Hepatitis B virus mediated human liver cancer cell line (HepG2) were studied using molecular approaches. For this purpose, CYP1A1 and NF- κ B (RelA) genes were transiently transfected into HepG2 cells. After transfection, HBX, CYP1A1 and RelA levels were detected by measuring the related mRNA expressions using Reverse Transcriptase Polymerase Change Reaction (RT-PCR). In addition, CYP1A1 protein level was also determined by measuring CYP1A-directed EROD activity and western blot using specific antibodies against human CYP1A1. Similarly, RelA expressions were investigated by western blotting. Furthermore, the effect of CYP1A1 and RelA expressions on the survival of HepG2 cells were monitored using cytotoxicity assays. Finally, the protein-protein interactions between CYP1A1 and HBX was determined by co-immunoprecipitation analysis. The transfection efficiency of CYP1A1 and RelA genes in HepG2 cells were observed between 20%-40%. The level mRNA expression of CYP1A1 and RelA genes and EROD activity further confirmed the low level of transfection efficiencies. CYP1A1 and RelA did not show any toxic effects on the survival of the HepG2 cells. Western blot studies demonstrated the low level expression of CYP1A1 protein in these cells. Co-immunoprecipitation analysis clearly depicted that there is no protein-protein interaction between CYP1A1 and HBX in the HepG2 cells. Therefore, HBX CYP1A1 proteins do not interact with each other in HBX transfected human liver cancer cells. Consequently CYP1A1 gene may not play a role in the mechanism of HBV.

Key words: Hepatitis B X protein, Cytochrome P450 1A1, Nuclear Factor Kappa B

1. GİRİŞ

Hepatit B Virüsü (HBV) hepatotropik, zarflı, kısmen çift sarmallı DNA virüsü olup kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinom oluşumunda rol oynayan en önemli etiyolojik faktörlerden biridir [1]. Hepatoselüler karsinom primer karaciğer hücrelerinden köken alan malign tümördür. Tüm dünyada hepatoselüler karsinomun görülme sıklığı coğrafi bölgeden bölgeye değişiklik göstermekle birlikte, HBV enfeksiyonunun endemik olduğu bölgeler olan Asya, Afrika ve Uzak Doğu hastalığın en çok görüldüğü yerlerdir. Güney Amerika, Batı Avrupa ve Avustralya gibi yerlerde görüme sıklığı daha düşüktür [2]. Avrupada her yıl bir milyon insan kronik HBV ile enfekte olmaktadır. ABD de her yıl 140.000-320.000 insanda akut HBV enfeksiyonunun gerçekleştiği bulunmuştur. Bu enfeksiyonların büyük bir bölümü kronik hastalığa neden olmadan kendiliğinden iyileşmektedir. Tüm dünyada yılda ortalama bir milyondan fazla yeni vaka tanı almaktadır. Bunların sağ kalım oranları 5 yıl için %3 den azdır. Bazı araştırmalara göre, her yıl bir buçuk milyondan fazla insan bu hastalık nedeniyle ölmektedir [3]. Kronik HBV taşıyıcılarında hepatoselüler karsinom gelişme riski, enfeksiyonu olmayan insanlara göre yaklaşık 100 kat daha fazladır ve bugüne kadar bilinen en yüksek viral etken kanser oluşum riski ilişkisidir [2].

Kronik karaciğer hastalığı olan kişilerin %15-%25'inde ölüm sebebi HBV ile ilişkili karaciğer hastalıklarıdır. HBV vücuda girip karaciğere yerleştiğinde kendisi direkt olarak karaciğerde hasar oluşturmaz. Vücudun virüse karşı oluşturduğu immün yanıt sonucunda karaciğer hücreleri zarar görür. Virüs karaciğer hücresinde çoğaldıkça daha fazla immün yanıt oluşur ve bu da daha fazla karaciğer hücresinin zarar görmesi demektir. Zamanla zarar gören hücrelerin yerinde bağ dokusu oluşmaya başlar ve karaciğerde yaygın bağ dokusunun oluşumu sonucu karaciğer sirozudur. Kanda yüksek oranda virüs bulunan hastalarda karaciğer hasarı daha ciddi boyutlardadır.

Kronik Hepatit B Virüsünün doğal seyri, HBV'nün genotipleri ve coğrafi bölgeleri arasında farklılık göstermesine rağmen dört aşamaya ayrılır. Bunlar; yüksek

HBV DNA'sı ile immün tolerans, HBV DNA'sı ile azalan immün sistem ile karaciğer iltaplanması ve fibröz, viral DNA ile belirlenemeyen şekilde serumda HB antijenlerinin azalması ve mutasyonların oluşması ile etkinleştirme aşamasının gerçekleştirilmesidir [4].

HBV'nin hepatokarsinogenez oluşumundaki moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır [5, 6]. Günümüzde kabul edilen model sistem, viral enfeksiyon süresince HBV DNA'sının belirli parçalarının konakçı hepatosit DNA'sına entegre olması ve bunun sonucunda konakçı hepatosit DNA'sında çeşitli değişiklikler ve hasarlar meydana getirmesidir. Bu değişikliklerin özellikle hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol oynayan pek çok gen üzerinden olduğu düşünülmektedir. Viral-konakçı DNA entegrasyonunun özel bir yerde lokalize olduğu gösterilmemiştir ve bu olay değişik veya rastgele bölgelerde olabilir [7]. Hepatositler, HBV'ü ile enfekte olan hücrelerdir. Bu hücreler, hücre yüzey reseptörü gibi hepatosite özgü hücre içi faktörler ile kontrol edilir [8]. HBV'nün hücre yüzey reseptörü bilinmemektedir ve HBV'nün hepatositlere girdiği mekanizma açık değildir. Fakat HBV'nün hepatositlere klatrin bağımlı endositoz yoluyla hepatositlere girdiği son zamanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. viral genomun konakçı hücreye girmesinden sonra kovalent olarak kapalı dairesel DNA'lar (cccDNA) oluşur. cccDNA, pre- genomik DNA da dahil olmak üzere viral mRNA transkripsiyonu için bir modeldir. Viral transkript daha sonra çeşitli proteinler oluşturmak için çevrilir. Pre- genomik RNA viral kapsidler halinde paketlenir ve ters transkriptaz tarafından transkribe edilir. Viral genomun ikinci tamamlayıcı DNA'sı farklı uzunluklarda tamamlanır. Viral yüzey proteinleri Endoplazmik Retikulumda hücrelerden salgılanır [9].

Konakçı genomuna HBV'ün entegrasyonu, kronik HBV ile enfekte olmuş hastaların hepatositlerinde gözlenmiştir. Entegre olan HBV DNA'sı, kansere duyarlı bölgelerde, kırılğan bölgelerde, telomeraz geni ve siklin A tarafından algılanır [10].

HBV'ü, hepadnaviridae ailesine ait olup sadece insanları enfekte eder. Hepadnavirüsler, ördek, balıkçıl, kazlar, kuşlar ve bazı memeliler ile insanlara bulaşır [7]. Hepadnavirüsler kısmen çift sarmallı geniş dairesel DNA 'dan (rcDNA) oluşur ve benzer virion yapılarına sahiptir. Bu bölge doğrudan tekrarlanan 2 dizi içerir. Bunlar Doğrudan Tekrar 1 (DR1) ve Doğrudan Tekrar 2 (DR2)'dir.

Bunlar, 10-12 nükleotidlik dizilerdir. Bu diziler viral replikasyon için gereklidir ve konak hücre içine DNA etkileşiminin habercisi olabilir [11].

HBV'nün genomik organizasyonu karmaşıktır. Çünkü çok küçük genom için birden fazla proteine ihtiyaç vardır. HBV genomu tamamen kodlama olduğundan, tüm düzenleyici sinyaller, arttırıcılar, transkripsiyonel başlama bölgeleri ve poliadenilasyon sinyalleri de dahil olmak üzere tüm düzenleyici sinyaller kodlama bölgeleri içinde gömülürler. HBV gen ekspresyonu, viral promotorlar üzerindeki koaktivatörler ve transkripsiyon faktörleri ile düzenlenir.

Bu virüs, zarflı ve çift sarmallı DNA virüsüdür. Viral genom, yaklaşık 3200 nükleotidden oluşur [4]. Zarflı virüs olmasına rağmen ısı, dondurma, düşük pH'a ve çözmeye dayanıklıdır [12].

HBV genomu, çekirdek proteini ve DNA polimeraz ile paketlenir. Virüs bir hepatosit içine reseptör aracılığı ile girer. Virüs DNA'sı konakçı genoma entegre olur. DNA replikasyonu burada gerçekleşir. Virüs partikülleri sitoplazmada toplandıktan sonra hepatosit tarafından serbest bırakılır [5]. HBV'ü, bir DNA virüsü olmasına rağmen reverse transkriptaz enzimi kodlar ve bu sayede RNA aracısı üzerinden kendisini eşler.

HBV genomu, uzun sarmalı üzerinde Yüzey (S), Kor (C), X ve Polimeraz (P) olarak adlandırılan, dört değişik protein kodlayan nükleik asit dizisine "açık okuma çerçevesi" (ORF) sahiptir [7, 5]. S geni, sırasıyla büyük, orta ve küçük yüzey proteinleri olan Büyük Hepatit B (LHB), Orta Hepatit B (MHB) ve Küçük Hepatit B (SHB) proteinlerini kodlar. C geni, çekirdek ve HB antijenlerini kodlar. P geni, ters transkriptaz ve RNaz faaliyetleri olan bir viral polimerazı ve HBV DNA sentezi için gerekli olan çok fonksiyonlu proteinleri kodlar. C ve P genleri DNA replikasyonu ve zarf proteinleri için gereklidir. HBV X geni, HBV genomundaki en küçük gen bölgesidir. HBX geni, 154 aminoasitlik polipeptit içerir ve 17 kDa'luk HB X olarak adlandırılan proteini kodlar [3]. Ayrıca X geni, bazı direkt olmayan etkiler ile viral ve bazı hücrel genlerin transkripsiyonunu arttırabilme özelliğine sahiptir (13). HBX proteininin ve HB antijeninin doğal enfeksiyon boyunca ifadesi çok açık olmamaktadır [5]. HBX, hücre tipine ve şartlarına uygun olarak farklı işlevleri uygulayan çok işlevli bir proteindir. Bu işlevler, HBV patogeneğinde çeşitli hücrel proteinlerle HBX'in etkileşim halinde olmasıdır.

HBX'in karşılaştırmalı analizleri sonucunda sarmal yapısında aminoterminal, karboksiterminal ve bobin-bobin motifi dahil olmak üzere son derece korunmuş alanlar ortaya çıkmıştır. Aminoasit 69 ve aminoasit 110-139 arasındaki fonksiyonel alanlar HBX in transaktivasyonu için kritik bölgelerdir. Özellikle HBX'in amino terminaldeki ilk 50 aminoasit transaktivasyonu düzenlemeye izin veren negatif düzenleyici etki alanıdır. HBX in hücre içindeki lokalizasyonu tartışılmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğu HBX in sitoplazmada olduğunu göstermiştir [14]. Fakat bazı çalışmalar da HBX in çekirdekte olduğunu göstermiştir [15]. Çekirdekte HBX düşük seviyede ifade edilmesine rağmen sitoplazmada protein düzeyinin yüksek olması ve aşırı ifade edilmesi sitoplazmada lokalize olduğunu göstermiştir [17]. Sitoplazmada lokalize olan HBX, farklı sitoplazmik sinyal yollarını etkiler. Bu yollar; stres aktivasyon protein kinaz/NH2-terminal-Jun Kinaz (SAPK/JNK), ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK), protein kinaz B (PKB), Ras-Raf Mitojen Aktivasyon protein kinaz (Ras-Raf-MAPK), Janus Kinaz/STAT ve adezyon kinaz (FAK) yollarıdır [16].

Çekirdekte de düşük seviyede ifade edilen HBX, bazı transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasına neden olur. Bu transkripsiyon faktörleri, NF-kB kompleksleri, AP1/2, ATF2/cAMP cevap element bağlanma proteini, bazal transkripsiyon faktörü TATA kutusu bağlanma proteini, RNA polimeraz alt üyesi RPB5, Transkripsiyon Faktörü II B ve Transkripsiyon Faktörü II H kompleksleri, p53 ve CREB proteinleridir [17].

HBV aracılı hepatokarsinogenez için çeşitli mekanizmalar vardır. Kromozomlara entegre olan HBV DNA'sının, HBX protein benzeri faktörler tarafından hepatositlerdeki büyümesi kontrol edilir. HBV'ü DNA dizilerini ekleyerek hücre genlerinin transkripsiyonunu etkinleştirir. Hücre ölümü, hepatosit yenilenmesi ve fibrozis ile kronik inflamasyona neden olur [5].

HBV gen ifadesi, viral promotorlar üzerindeki koaktivatörler ve transkripsiyon faktörleri ile düzenlenir. HNF1, HNF4, CREB, PPAR ve FXR gibi HBV aracılı transkripsiyon faktörlerinin karaciğer metabolizmasının kontrolünde önemli rol oynadığı görülmüştür. Transkripsiyonel transaktivatör fonksiyonu ile HBV gen ekspresyonunu ve replikasyonunu destekleyen HB X proteininin hepatokarsinogenez oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir [17]. Ayrıca Hepatit B X gen bölgesi, konakçı DNA'sına en çok uyumlu olan HBV DNA parçasıdır. Bu entegrasyonlar pek

çok farklı bölgelerden olabilir ve sonucunda enfekte karaciğer ve karaciğer tümör dokusunda çoğunlukla X bölgesine ait mRNA oluşumuna yol açar [20, 21, 22]. Çeşitli araştırmalar HBX protein pozitifliğinin, hastalığın ağırlığı ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir [23]. HB X proteini yüksek miktarda eksprese edilen HB X transgenik hayvan modellerinde de hepatoselüler karsinom oluşumu gözlenmiştir [21, 24]. Hepatoselüler karsinom olgularından izole edilen HBV X genine ait DNA bölgesi, in vitro şartlarda karaciğer hücre dizinine transfekte edildiği durumlarda da, bu hücrelerde transformasyon gözlenmiştir [24]. Bu birbirinden bağımsız olarak yapılmış araştırmalar HB X proteininin hepatoselüler karsinom oluşumunda önemli bir rolü olduğunu ve bu katkının HB X proteininin transkripsiyonel trans-aktivatör fonksiyonuna bağlı olarak gerçekleşebileceğini düşündürmektedir [25, 26]. HBX viral enfeksiyon için gerekli olan ve viral karsinogenezde potansiyeli olan bir kofaktördür [27, 28]. HBX, doğrudan DNA'ya bağlanmamasına rağmen çeşitli modellerle hareket eden bir trans-aktivatör olarak kabul edilir. Bir model, HBX'in sitoplazmada ve çekirdekte çeşitli sinyal yolları ile etkileşim halinde olmasıdır. HBX'in transkripsiyonel süreçlerde DNA'ya doğrudan bağlanmaması ile ilgili bir diğer model; HBX'in transaktivasyonu için, HBX, proteozom alt üniteleri olan PSMA7 ve PSMC1 ile etkileşim halinde olmasıdır [29].

Çeşitli çalışmalar, HBX aktivasyonunun inflamasyon, kanser gelişimi ve viral replikasyon ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Çok çeşitli sinyal yollarının ve transkripsiyon faktörlerinin HBX tarafından aktive olduğu bilinmektedir. Bunlara örnek olarak Ras, Raf, Map Kinaz (MAPK), Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B), aktive edici protein (AP-1) verilebilir. Bunlardan en önemlisi Nükleer Faktör kapp B (NF- κ B)' dir [29].

Nükleer faktör kapp B (NF- κ B) tüm hücre tiplerinde bulunan, immün sistem ve inflamatuvar yanıtta, hücresel strese, oksidatif strese görev alan dimerik bir transkripsiyon faktörüdür. Bu transkripsiyon faktörü 300 aminoasitlik Rel Homoloji Domain içerir. Rel Homoloji Domain, İnhibitör Kappa B ($I\kappa$ B) ile arttırıcıların bağlanmasını, dimerizasyonu ve etkileşimleri kontrol eder. Sınıf I ve Sınıf II olmak üzere 2 çeşit NF- κ B vardır. NF- κ B1 ve NF- κ B2 Sınıf I NF- κ B'ye aittir. RelA, RelB ve RelC, sınıf II NF- κ B'ye ait transkripsiyon faktörüdür [30].

NF- κ B proteinleri, İnhibitör kapp B ($I\kappa$ B) proteinleri ile düzenlenir. NF- κ B geni sitoplazmada normalde inaktif haldedir. Hücre zararlı maddeye maruz

kaldığında bu gen aktif hale gelir. Hücre çeşitli uyarılara maruz kaldığında hücreye sinyal gelir. Sinyaller reseptöre bağlanır. Daha sonra İnhibitör kappa Kinaz enzimi, İnhibitör kappa B α 'nın RelA/p50 kompleksinden ayrılmasını sağlar. RelA/p50 kompleksi sitoplazmadan çekirdeğe geçer. Burada koaktivatör ve RNA polimeraz ile birlikte hedef gene bağlanır. Böylece NF- κ B geni uyarılır [30, 31].

Son zamanlarda, hepatosellüler karsinomun ilerlemesinde NF- κ B/p65 gibi transkripsiyon faktörlerinin önemli rol oynadığı bulunmuştur [31]. NF- κ B, T Hücre Lösemi Tip1, Herpes Virüsü, Epstein Barr Virüsü, Hepatit B ve Hepatit C Virüsü gibi insan onkojenik virüsleri ile de düzenlenir. Bu virüslerin spesifik onkoproteinleri, NF- κ B'nin farklı bölgelerine bağlanır ve sonunda NF- κ B aktivasyonuna neden olur. Bu virüsler arasında Hepatit B Virüsü, NF- κ B'nin düzenlenmesinde önemli role sahiptir [31]. HBX tarafından NF- κ B'nin düzenlenmesi ile yapılan aktivasyon, hücre büyümesi ve kanser gelişim genlerini düzenler [32, 33].

İlaç metabolizmasında rol alan enzimler, biyotransformasyonda ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol oynamaktadır. Bu enzimler, Faz I, Faz II ve Faz III enzimleri olarak ayrılırlar. Faz I enzimlerinden olan Sitokrom P450'ler, böbrek, akciğer, kalp gibi ekstra hepatik dokularda değişik oranlarda bulunurlar [34].

Sitokrom P450 terimi; bakterilerde, mantarlarda, böceklerde, bitkilerde, balıkta, memelilerde ve primatlarda, katalizlediği reaksiyonların çeşitliliği ve substrat olarak kullandığı birçok bileşiğin yapısından dolayı, genel oksijenazlar (oksijen-kullanan enzim) olarak kabul edilen, hem protein ailesini ifade etmektedir. Sitokrom P450 proteinleri yüzlerce gen içeren bir gen süper ailesi tarafından kodlanmaktadır. Bu enzimlerin substratlarını, endojen olarak sentezlenen bileşikler; kolesterol, steroid hormonlar, yağ asitleri; eksojen bileşikler; ilaçlar, yiyecek katkı maddeleri, içilen sigara bileşenleri, pestisidler ve endüstride kullanılan, vücuda yeme, solunum ya da deri yoluyla alınan kimyasallar oluşturmaktadır. Bütün türlerde mevcuttur. Endojen ve eksojen bileşiklere fonksiyonel grup ekleyerek veya açığa çıkararak reaksiyonları katalizler. Endoplazmik retikulumda lokalize olmuştur. Birincil olarak karaciğerde bulunurlar. Ayrıca mitokondriyal zar da bulunurlar. Na₂S₂O₄ ile indirgenmiş şeklinin CO ile oluşturduğu kompleksin 450 nm'de ışığı absorbladığı için sitokrom P450 denilmiştir [35, 36].

Sitokrom P450 sistemi ilaç alanında geniş bir yere sahiptir. İnaktivasyon veya aktivasyonlar; teropatik ilaçların hücrede istenmeyen, hücre hasarları, hücre ölümü

ya da mutasyona neden olan kimyasallara dönüştürülmesi; steroid hormon üretimi; yağ asitlerinin, prostoglandinlerin lökotrienlerin ve retinoidlerin metabolizması; ve ilaç-ilaç ve ters etkileşimi sonucunda meydana gelen enzim inhibisyonu ya da indüksiyonu ile ilgilenmektedir. Sitokrom P450 proteinleri, tromboksan, prostasiklin ile allen oksid sentezi ve nitrik oksid sentezinde rol oynayan sistein tiolat-bağlı hem proteindir [37, 38, 39].

Sitokrom P450 tarafından katalizlenen genel reaksiyon şu şekildedir:



Sitokrom P450 (CYP) enzim aileleri, aminoasit dizilimlerine göre sınıflandırılır ve alt ailelere ayrılırlar. İnsanda bulunan CYP1, CYP2 ve CYP3 enzim aileleri hepatic ve ekstra hepatic ilaç metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Diğer CYP aileleri, araşidonik asit, steroidler, D vitamini ve retinoik asit gibi endojen maddelerin metabolizmasında önemli rol oynarlar.

Sitokrom P450 1 ailesi enzimleri (CYP1A1, CYP1A2 ve CYP1B1), poliaromatik hidrokarbonları, poliklorlanmış bifenilleri ve arilaminleri içeren çevresel kirletici maddelerin hidrolize edilmesinde önemli role sahiptirler. En fazla sitokrom P450 çalışması sitokrom P4501A üzerindedir. İnsandaki CYP1A alt ailesi 3 üyeden oluşur (CYP1A1, CYP1A2 ve CYP1B1). CYP1A1 genellikle ekstrahepatik dokularda görülürken, CYP1A2 genelde karaciğerde görülür. CYP1A1'in indüklenmesine; akciğer ve plasenta gibi ekstrahepatik dokularda sigara kullanımı ve polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) maruziyeti neden olur [40]. CYP1A1, çeşitli organik kimyasalların oksidasyonunu katalizleyerek onları daha hidrofilik veya Faz II enzimleri tarafından ileri konjügasyonlara uğratılabilecek formlara dönüştürüp vücuttan atılımını sağlayan sitokrom P450 bağımlı karışık fonksiyonlu oksidazların alt ailesidir. Sitokrom P450 bağımlı karışık fonksiyonlu oksidazlar ayrıca yabancı kimyasalların reaktif ara ürünlere aktivasyonundan da sorumludur. Özellikle CYP1A1 izozimi, poliklorlubifenil (PCB), PAH ve dioksin gibi kimyasalların reaktif ara ürünlere dönüşümlerini katalize eder. PAH'ların bir üyesi olan, petrol ürünlerinde ve endüstriyel atıklarda bulunan benzo(a) piren, mutajenik ve karsinojenik forma CYP1A1 tarafından katalize edilerek dönüşür [41, 42]. Sitokrom P4501A1 proteini karsinojenlerin aktivasyonu ve metabolizmasındaki rolleri çevresel kirlilik için biyomarkör olarak kullanılma potansiyelleri nedeni ile oldukça geniş bir şekilde çalışılmıştır [43, 44].

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), dioksin, gibi bazı ksenobiyotiklerin metabolizmasından bu enzim sorumludur. Bu ksenobiyotikler tarafından Aril Hidrokarbon Reseptörleri (AhR) aracılığı ile CYP1A1 gen ekspresyonu uyarılır. AhR sitoplazmada Hsp90 şaperonlarıyla kompleks halinde bulunur. Bazı ksenobiyotikler sonucunda AhR/Hsp90 kompleksi ayrılır. Ligand ile birlikte AhR nucleusa geçer. Çekirdekte Ksenobiyotik Response Elementte (XRE) bulunan sekansa bağlanır. Böylece CYP1A1 gen ekspresyonu uyarılır.

CYP1A1 gen ekspresyonunun uyarılmasıyla hücre içindeki konsantrasyonu artan CYP1A1 enziminin bazı ksenobiyotik metabolizması sonucu ara metabolitler oluşur. Bu ara metabolitler karsinojenik maddelerdir. Bundan dolayı bazı ksenobiyotikler tarafından bir hücrenin karsinogenez sürecinin başlatılmasında CYP1A1 gen ekspresyonunun uyarılması önemli mekanizmalardan biridir.

Hücrenin kanser formasyonu ile CYP1A1 enziminin uyarılması arasındaki ilişki iki şekilde açıklanır. Birincisi; besin ve diğer yollarla organizmaya alınan bazı ksenobiyotiklerin CYP1A1 enzimini uyarması sonucunda bu enzim tarafından katalizlenen reaksiyonlar artacak ve oluşan zararlı ara metabolitler Glutatyon-S-Transferaz gibi Faz II enzimleri tarafından yeterince zararsız metabolitlere dönüştürülemez. Hücre içinde biriken bu zararlı maddeler DNA, RNA ve protein yapısında değişikliklere neden olabilir. Bu değişiklikler hücrenin karsinojenik forma dönüşmesine neden olur [45]. İkincisi; CYP1A1 gen ekspresyonunun uyarılmasıyla başlayan katalitik reaksiyonlar sonucu reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur. ROS, DNA, RNA ve protein oksidasyonuna neden olur. Bu durum hücrenin karsinojenik forma dönüşmesini tetikleyebilir [46].

İnflamatuar uyarılar ve enfeksiyonlar tarafından konak savunma yanıtlarının aktivasyonu ile hepatik Sitokrom P450 genlerinin baskılanması yaklaşık 30 yıldan beri bilinmektedir. İlaç-ilaç etkileşimi ve ilaç toksisitesi için sitokinler ve sitokrom P450 genlerinin transkripsiyonel düzenlenmesi arasındaki etkileşimler önemlidir.

İnflamatuar sitokinlerin, NF-kB'nin uyarılmasını arttırdığı bilinmektedir. Bu nedenle birçok araştırmada, inflammatuar sitokinler tarafından CYP1A1 transkripsiyonunun baskılandığı bulunmuştur. Örneğin, Lipopolisakkarit (LPS) ve Tümör Nekrozis Faktör (TNF) konsantrasyonlarına bağlı olarak fare karaciğer hücresinde (Hepa1c1c7) CYP1A1 gen ifadesinin baskılandığı gözlenmiştir. Bu inflammatuar sitokinlerin NF-kB'yi uyardığı da bilinmektedir. Araştırmalar bununla

ilgili iki mekanizma öne sürerler. Bu mekanizmalardan birincisi; NF- κ B ve AHR yolu arasındaki karşılıklı baskılanmadır. İkicisi; N-F- κ B aktivasyonunun CYP1A1'in promotör bölgesinde histon asetilasyonunu engellemesidir. Bunlara ek olarak, Merkezi Sinir Sistemi (MSS) inflamasyonu boyunca NF- κ B'nin hepatik CYP1A1 gen ifadesini düzenlediği gösterilmiştir [47].

Ayrıca NF- κ B'nin hücre içi Sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) aktivitesini ve gen ekspresyonunu da düzenlediği gösterilmiştir. CYP1A1 gen ekspresyonu Aril Hidrokarbon reseptörleri (AHR) aracılığı ile düzenlenir. AHR düzenleyici genlerin baskılanmasında NF- κ B'nin önemli rol oynadığı düşünülmektedir. AHR sinyal yolu üzerinde NF- κ B'nin baskılayıcı etkisi için birçok önerilen mekanizma vardır. Bu mekanizmalardan biri; AHR ve NF- κ B'nin bileşeni RelA arasında bir inaktif kompleksin oluşumu AHR'nin translokasyonu engeller bu da CYP1A1 gen ekspresyonunu baskılar. Başka bir mekanizma ise; Aril Hidrokarbon Nükleer Translokator (ARNT) ile heterodimer oluşturan AHR'nin, AHR baskılayıcı ile rekabet halinde olmasıdır. Bu mekanizma, NF- κ B'nin AHR baskılayıcı aktivasyonunu uyararak CYP1A1 transkripsiyonunu baskılar. Bu nedenle, önerilen mekanizma, AHR/ARNT kompleksi ve RelA arasındaki rekabettir [47].

Literatürde Hepatit B varlığındaki hepatosellüler kanser gelişiminde HBX ve CYP1A1 ile ilgili bir araştırma yapılmamıştır. Bu nedenle basılmış veri bulunamamıştır. Ancak; akciğer kanseri, kolorektal kanser ve meme kanseri gibi karsinogenik oluşumlarda CYP1 izoformalarının önemli rol oynadığı gösterilmiştir [48, 49, 50].

Hücre içi CYP1A1 ve HBX gen ifadesininin NF- κ B tarafından düzenlendiği pek çok çalışmada gösterilmiştir. Ancak Hepatit B varlığındaki hepatosellüler kanser gelişiminde HBX, CYP1A1 ve NF- κ B ile ilgili araştırma yapılmamıştır. Tamamlamış olduğumuz tezimizde, HBV aracılı insan karaciğer kanser hücre hattında (HepG2) Hepatit B X proteininin xenobiyotik metabolizmasında rol oynayan CYP1A1 ile olan protein-protein etkileşiminin olup olmadığı araştırılmıştır

1.2. Çalışmanın Amacı

Hücre içi CYP1A1 enzim aktivitesinin ve gen ekspresyonunun NF-kB tarafından düzenlendiği birçok araştırmada gösterilmiştir. Ancak, Hepatit B varlığındaki hepatosellüler kanser gelişiminde CYP1A1 ve HBX etkileşimleri ile ilgili bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Hepatit B virüs varlığında gelişen karaciğer olgularının kansere olan yatkınlıklarının açıklanmasında, CYP1A1 geninin uyarılma mekanizmasının aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

Amacımız, Hepatit B X proteininin xenobiyotik metabolizmasında rol oynayan CYP1A1 geni üzerine etkilerinin insan karaciğer hücre dizisinde (HepG2) aydınlatılmasıdır. Ayrıca Hepatit B X proteininin, CYP1A1 proteini ve NF kappa B transkript düzeylerine olan etkisi tespit edilerek olası transkripsiyonel veya translasyonel mekanizmaları hakkında da bilgi edinilecektir.

2.MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Deneysel çalışmalarımız sırasında; Sigma 3K30 yüksek hızlı soğutmalı santrifüj (12156 rotor, PO Box 1713, D-37507, Germany), Cary Eclipse (Varian Ltd., 28 Manor Road, Walton-on-Thames, Surrey KT12 2Qf, England), Shimadzu UV-1600A spektrofotometre, Metler Toledo MP 220 pH metre, Nüve ST 402 su banyosu, Vortex mixer VM-20, Hirayama Hiclave HVE-50 otoklav, Scaltec analitik terazi, Rotofix 32 Hettich soğutmalı santrifüj, BioRad Yatay Gel Elektroforezi, Thermo Scientific Nanodrop 1000 spektrofotometre, Nuare Biological Safety Cabinets Class II Laminar Flow, Nuare DHD Auotoflow CO2 Air Jacketed İnkübatör, Nexcellom Hücre Sayıcı, Nuaire -85 °C Ultralow Freezer, Human Power Scholar-UV saf su sistemi kullanılmıştır.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörü (RG205760), pCMV6-AC-GFP-RELA vektörü (RG226840), CYP1A1 siRNA (SR301093), Turbofectin 8.0 solusyonu (TF81001) Origene firmasından temin edildi. Lipofectamin LTX&Plus solusyonu (15338-100) İnvitrogen'den elde edildi. Trizol (15553), kloroform (C2432), 2-propanol (19516), agaroz (A5093) Sigma'dan, WST solusyonu (AR1159) Boster'dan temin edildi. XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (20-300-1000) Biological Industries'den temin edildi. İmmün çöktürme kiti (26149) ve antikor temizleme kiti (44600) Pierce'dan, E.coli DH5α competent hücre (9057) Takara'dan, PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, K2100-11), İnvitrogen'den elde edildi.

2.1.3. Hücre Kültürü

HBX, CYP1A1 ve NF kappa B (RELA) interaksiyonun belirlenmesi amacıyla HepG2 hücreleri 37°C'de %5 CO2 içeren CO2 inkübatöründe inkübe edildi. Kültür için % 10 Yeni Doğan Sığır Serum (FBS), % 1 penisilin/streptomisin, % 5 L-Glutamin ve %10 yeni doğan sığır serumu içeren Minimum Esensiyel Besi Ortamı (MEM) kullanıldı.

Deneyleerde hazırlanan ve kullanılan hücre dizinleri:

- HepG2-pcDNA3
- HepG2-HBX
- HepG2-CYP1A1
- HepG2-pcDNA3-CYP1A1
- HepG2-HBX-CYP1A1

Hücre Dizinlerinin Büyümesi için Kullanılan Besiyeri Detayları:

- Earle's Minimum Esensiyal Besi Ortamı (EMEM) L-Glutamine (01-025-1A, Biological Industries)
- %10 FBS (Yeni Doğan Sığır Serumı) (04-121-1B, Biological Industries)
- 0.1mM Aminoasit solusyonu (01-340-1B, Biological Industries)
- 2mM Glutamin (03-020-1B, Biological Industries)
- 1mM Sodyum Piruvat (03-042-1B, Biological Industries)
- 100U/0.1mg Penisilin/Streptomisin (03-031-1C, Biological Industries)

Tip II kollajen (Kollajen R solusyonu 47254.01, Serva) ile kaplanmış hücre kültür kaplarına yapışarak çoğalan bu hücreler, uygun besi ortamında, 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda üretildi.

2.2. Metotlar

2.2.1. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 ve pCMV6-AC-GFP-RelA Vektörünün *E.coli DH5α* Hücrelerine Transformasyonu

pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 ve pCMV6-AC-GFP-RELA plazmidlerinin transfeksiyon deneylerinde, kullanılacak miktarda elde edilmesi amacı ile *E.coli DH5α* hücresi kullanılarak transformasyon yapıldı.

E.coli DH5α hücreleri buz üzerinde çözüldü ve 15ml'lik falcona konuldu. Üzerine vektör eklendi. Buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi. Hemen buza konulup 1 dakika buz üzerinde bekletildi. Üzerine 1 ml S.O.C. besi ortamı eklendi. 200 rpm, 37°C'de çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. 100µl alınarak petriye ekim yapıldı.

Transformasyondan sonra PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit kullanılarak, Luria Broth (LB) besi ortamı içerisinde çoğaltılmış olan *E.coli* ve yanı sıra ilgili plazmid izole edildi. Transformasyon kolonilerden 5ml LB besi ortamı inoküle edildi. Bütün gece inkübe edilen kültür 8000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan supernatant pelletten uzaklaştırıldı. 15ml'lik falconda üzerine 250µl RNase A içeren resuspansiyon tamponu eklendi. Karıştırılarak homojen hale getirildi. Üzerine 250µl parçalanma tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 4 dakika inkübe edildi. 350µl çöktürme tamponu konuldu. 12.000xg de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan supernatant alınarak dönüş sütununa konuldu. Dönüş sütunu santrifüj edildi. Yıkama solusyonu ile sütun yıkandı. Santrifüj edildi. Dönüş sütununa elüsyon tamponu eklendi. Alta geçen kısım toplandı. Elde edilen plazmid DNA'lar, %1'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

CYP1A1 ve RELA DNA'ları çoğaltıldıktan sonra geçici transfeksiyon için kullanıldı.

2.2.2. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 ve pCMV6-AC-GFP-RELA Vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX Hücrelerine Geçici Transfeksiyonu

pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 ve pCMV6-AC-GFP-RELA vektörlerinin, HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBX hücrelerine geçici transfeksiyonu Lipofectamin LTX&Plus solusyonu kullanılarak yapıldı. HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX hücreleri, Tip II kollajenle kaplanmış 6 kuyucuklu hücre kaplarına (ikili kontrolü olarak) transfeksiyondan 24 saat önce ekildi. Hücreler hücre sayma cihazında sayıldı. Bir eppendorfa, 400µl PBS (Fosfat tampon tuzu), 100µl hücre, 1µl tripan mavisi konuldu. Daha sonra bu karışımdan 20µl alınarak hücre sayma lamına konuldu ve hücre sayıcı cihazında hücreler sayıldı. Her bir kuyucuk için 2×10^5 hücre ekildi. 24 saat sonra, 500µl serumsuz besi ortamı, 2,5µg CYP1A1 veya RELA DNA'sı, 2,5µl plus solusyonu, 10µl Lipofectamin LTX solusyonu konularak 25 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve her bir kuyucuğa transfeksiyon yapıldı. Hücreler 24 saat % 5'lik 37°C 'de CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Transfeksiyon verimi, yeşil floresan proteini içeren vektör kullanımı nedeniyle floresan mikroskop ile 24. saatte takip edildi. Bu sürenin sonunda hücreler, 6 kuyucuklu hücre kaplarında her bir kuyucuğa 500µl Trizol solüsyonu konularak toplandı. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve protein analizleri için kullanıldı.

2.2.3. HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX Hücrelerine Geçici Transfeksiyon ile aktarılan CYP1A1 Geninin siRNA Metodu ile Baskılanması

HepG2 ve HepG2-HBX hücreleri kollajenle kaplanmış 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına, her bir kuyucukta 2×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat %5'lik 37°C 'de CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Daha sonra bu hücelere CYP1A1 vektörünün geçici transfeksiyonu Lipofectamin LTX&Plus solusyonu kullanılarak yapıldı. Hücreler 24 saat %5lik CO_2 inkübatöründe inkübe edildi.

HepG2-CYP1A1 ve HepG2-HBX-CYP1A1 hücreleri, CYP1A1-siRNA kullanılarak CYP1A1 geni baskılandı. siRNA uygulaması Turbofectin 8 solusyonu kullanılarak yapıldı.

24 saat sonra her bir kuyucuktaki hücre için, bir eppendorfa 100µl serumsuz besi ortamı, 1µg siRNA, 3µl Turbofectin 8 solusyonu eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra her bir kuyucuğa bu karışımdan 104 µl eklendi. Hücreler 24 saat 37C'de %5'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hücreler, 500µl Trizol ile toplanarak RT-PZR ve western blot analizleri için kullanıldı

2.2.4. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezinin Yapılması

HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX hücrelerinde, CYP1A1 ve RelA genlerinin etkilerini saptamak için mRNA düzeyleri Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi ile kantite edildi. Bu amaçla, Total RNA izolasyonu, Trizol solüsyonu kullanılarak üretici firmanın önerdiği kendi laboratuvar koşullarımız için optimize ettiğimiz prosedür uygulanarak gerçekleştirildi.

Hücreler, 500µl Trizol solusyonu ile eppendorflara toplandı. Üzerine 100µl kloroform solusyonu eklendi ve oda sıcaklığında 15 saniye karıştırıldı. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip, 15 dakika 4°C'de 15000 rpm'de santrifüj edildi. RNA içeren supernatanat yeni eppendorflara alınıp 250µl saf isopropanol eklendi ve 24 saat -20°C'de inkübe edildi. 24 saat sonra 15000 rpm'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi ve supernatant kısmı atıldı. Pellet kısmına 500µl soğuk %70'lik etanol eklenip 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Pellet oda sıcaklığında kurutuldu ve üzerine temiz su eklendi.

Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları nanodropta ölçüldü. 1 µl RNA örneğinden Nanodrop cihazına konuldu. Cihazda ng/µl cinsinden RNA konsantrasyonu ölçüldü. cDNA sentezi sırasında 2µg RNA kullanılması sağlandı.

İzole edilen RNA kalitesi %1'lik agoroz jel elektroforezinde 18S ve 28S bantlarının durumuna göre belirlenmiştir.

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi, Fermentas First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre sentezlendi. cDNA sentezi için 2µg total RNA, 1µl oligo (dT) primeri karıştırıldı ve son hacim RNaz içermeyen su ile tamamlandı. Karışım 65°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra üzerine 4µl 5x reaksiyon buffer, 2µl dNTP karışımı, 1µl RNaz inhibitörü, 1µl RevertAid M-Mul Reverse Transkriptaz enzimi eklenerek 42°C'de 60 dakika inkübe edildi. Bu süre

sonunda, enzim inhibe edilmek üzere 70°C’de 5 dakika inkübe edildi. Sentezlenen cDNA’lar RT-PCR analizinde kullanılmak üzere -20°C’de bekletildi.

2.2.5. CYP1A1 ve RelA Genlerinin mRNA Düzeyinde İfadelerinin RT-PZR Analizi ile Belirlenmesi

Öncelikle pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörüne klonlanmış olan CYP1A1 gen bölgesi, dizi analizi ile teyit edilmek üzere tarafımızdan primerler tasarlandı, ilgili polimeraz zincir reaksiyonları yapıldı ve ürünler dizi analizine gönderildi. Bu primerlerin nükleotid dizileri Tablo 2.2.1’de gösterildi.

CYP1A1 ve RELA genlerinin, HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX hücrelerinde mRNA düzeyinde gen ekspresyonlarını saptamak için, GenBank/EMBL veri bankaları taranarak seçilen genler için uygun primer dizileri saptandı. Bu primerlerin nükleotid dizileri Tablo 2.2.1’de gösterildi. RT-PZR, RT-PZR-TC-4000 Sıcaklık Döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon PZR Ana Karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon tüpüne 25 ml PZR Ana Karışımı, 3µl spesifik primer, 2µl cDNA, 20µl su eklendi. Daha sonra reaksiyon karışımı 94°C’de 15 dakika denatürasyona tabi tutuldu. Çoğaltma işlemi 95°C’de 1 dakika, 52°C’de 1 dakika, 72°C’de 1 dakika olmak üzere toplam 28 döngü ile gerçekleştirildi. Her bandın densitometrik analizi için iç standart gen olan Gliseraldehit 3 fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) densitometrik analizi ile nasıl değiştiği belirlendi.

Tablo 2. 1. Seçilen CYP450 genleri için tanımlanan primer dizileri

<u>Primer Adı*</u>	<u>Primer Dizisi(5'→3')</u>
CYP1A1F	AAGTCAGCTGGGTTTCCAGA
CYP1A1R	TCTGGAAACCCAGCTGACTT
RELAF	AGCAGCGTGGGGACTACGAC
RELAR	AGGCTGGGGTCTGCGTAGGG

* Primer adı CYP ve NF- κ B (RELA) izoformunu tanımlamakta F(forward) R(reverse) primerleri simgelemektedir.

pCMV6-AC-GFP vektörüne klonlanmış olan CYP1A1 dizisi teyit edilmek üzere tarafımızdan primerler tasarlanmış ve ilgili polimeraz zincir reaksiyonları yapıldı.

Daha sonra ilgili ürünler, Agaroz Jel Elektroföresi ile görüntüledi. % 2'lik Agaroz jel dökülerek, RT-PZR ürünleri görüntüledi.

2.2.6. CYP1A1 ve RELA Ekspresyonlarının Hücre Canlılığına Etkilerinin Tayin Edilmesi

HepG2, HepG2-HBX, HepG2-CYP1A1, HepG2-HBX-CYP1A1 hücreleri, Tip II kollajen ile kaplanmış 96 kuyucuklu hücre kaplarına 1×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler ilgili vektör transfeksiyonu sonrasında büyüme faktörleri varlığında (EMEM+%10 FBS) ve büyüme faktörleri yokluğunda (EMEM) olmak üzere 2 farklı besi ortamında üretildi. İlgili vektör transfeksiyonu sonrasında hücre canlılığı XTT solusyonu ile araştırıldı. İlgili firmanın prosedürlerine göre XTT (2,3-Bis-2-Metoksi-4-Nitro-5-Sufofenil-2H-Tetrazolyum-5-Karboksinilid) uygulandı. Her bir kuyucuğa 50µl XTT eklendi. Hücrelere 1-2-3-4-5. günlerde aktive edilmiş XTT solusyonu aynı saatte eklendi ve hücreler 4 saat 37°C'de % 5'lik CO₂ inkübatöründe bekletildi. Reaksiyon sonucunda oluşan renk reaksiyonu 450nm'de 96 plakalı ELISA okuyucuda tespit edildi.

Ayrıca sonuçlar WST-1 solusyonu kullanılarak tekrarlanmıştır. WST (2-2-Metoksi-4-Nitrofenil-3-4-nitrofenil-5-2,4-Disulfofenil-2H-Tetrazolyum) metodu ilgili firmanın prosedürüne göre uygulandı. 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına her bir kuyucukta, 1×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelere, 24 saat sonra pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 ve pCMV6-AC-GFP-RELA vektörlerinin geçici transfeksiyonu Lipofectamin LTX&Plus solusyonu kullanılarak yapıldı. Her bir kuyucuk için, 20µl serumsuz besi ortamı, 0.1µg DNA, 0.1µl plus solusyonu konularak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra, 0.5µl LTX solusyonu konuldu ve oda sıcaklığında 25 dakika bekletildi. Geçici transfeksiyon yapılan hücreler 24 saat 37C'de %5'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. 24 saat sonra her bir kuyucuğa 10µl WST solusyonu eklendi. Reaksiyon sonucunda oluşan renk reaksiyonu 15, 30, 45, 60, 90, 120. dakikalarda 450 ve 630nm'de 96 plakalı Mikro Plaka okuyucuda tespit edildi.

2.2.7. Hücrelerde Etoksiresorufin O-Dealkilaz (EROD) Aktivite Tayini

HepG2-pcDNA3, HepG2-HBX, HepG2-pcDNA3-CYP1A1, HepG2-HBX-CYP1A1 hücre homojenatlarında EROD aktiviteleri Burke ve Mayer (1974) metodu ile Arınç ve Şen tarafından optimize edilen şartlar kullanılarak tespit edildi. Bu aktivite tayinlerinde substrat olarak 7-etoksiresorufin kullanıldı.

Hücreler 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekildi. Her bir kuyucukta 2×10^5 olacak şekilde hücre ekildi. Hücrelere CYP1A1 geninin geçici transfeksiyonu yapıldı ve 24 saat 37°C 'de %5'lik CO_2 inküböründe inkübe edildi. Daha sonra hücreler 300 μl parçalama tamponu (100mM pH 7,8 KPi buffer, %0,2 Triton X-100, 2mM EDTA, 100mM PMSF, 100mM ϵ -ACA) ile toplandı.

Tablo 2.2'de substrat için reaksiyon karışımında olması gereken son konsantrasyonlar verildi. Buna göre tipik reaksiyon ortamı 100mM potasyum fosfat tamponu pH 7,80, 100mM NaCl, 1,2 mg BSA, 100 μg hücresel protein verilen konsantrasyonlarda substrat ve 0,1M NADPH içermektedir.

Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 2.2'de belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, florometre küvetinde reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon Cary Eclipse (Varian) Florometre'de 2 dakika boyunca takip edildi. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak resorufinin bilinen miktarı eklendi ve floresanstaki artış kaydedildi. Enzim aktiviteleri, resorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplandı.

Tablo 2. 2. EROD aktivite ölçüm karışımının içeriği.

Stok Çözeltiler	Son Konsantrasyon
KPi tamponu pH 7,8	100mM
NaCl	100mM
BSA	1,2 mg
Mikrozomal protein 1 mg/ml	100-200 μg
<u>Substrat:</u> 7-Etoksiresorufin	1,5 μM
NADPH	0,50mM

2.2.8. Transfeksiyon sonrası Hücrelerdeki CYP1A1 Varlığının Protein Düzeyinde İfadesinin Western Blot ile Kontrolü

CYP1A1 vektör transfeksiyonundan 48 saat sonrasında HepG2, HepG2-HBX, HepG2-CYP1A1, HepG2-HBX-CYP1A1 hücre dizinlerinden protein izolasyonu yapıldı. Hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 10 dakika RİPA solüsyonu (50mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, %5 sodyum deoksikolat, %1 SDS, proteaz inhibitörleri (1mM fenil-metansulfo floride (PMSF), 10 mg/ml leupeptin, 20 mg/ml aprotinin) ile buz üzerinde bekletildi. 10.000 rpm ve 4°C’de santrifüj sonrasında hücre debrisı çöktürüldü ve total protein elde edildi.

Protein miktar tayini, Bişişonik asit (BCA) metodu ile belirlendi. Hücresel proteinler, 1/200, 1/400 ve 1/800 oranında seyreltildi. Üzerlerine, 100µl BCA solüsyonu eklendi ve 15 dakika 60°C’de inkübe edilerek renk reaksiyonunun oluşması beklendi. Daha sonra 562 nm’de Mikro Plaka Okuyucuda okundu.

Hücresel proteinler Laemli (1970)’de belirtildiği gibi dikey elektroforez tekniği uygulanarak SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAJE) ile ayrıştırıldı ve protein profilleri elde edildi.

Poliakrilamit jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde %8,5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapıldı. Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 2.3’de belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlandı.

Tablo 2. 3. SDS-PAGE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları.

Stok Çözeltiler	Ayrıştırıcı Jel	Sıkıştırıcı Jel
Jel Çözeltisi (ml)	2,85	0,75
Distile Su (ml)	4,5	2,5
Ayrıştırıcı Jel Tamponu (ml)	2,5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu (ml)	-	1,25
%10 SDS (ml)	0,15	0,1
%10 APS (ml)	0,05	0,025
TEMED (ml)	0,0065	0,005

Poliakrilamit slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile Hoefer Cooled Dual Gel Electrophoresis System (Model SE600/SE660) elektroforez sistemi kullanılarak

gerçekleştirildi. Elektroforetik ayırıştırma sistemi Consort EV265 güç kaynağına bağlandı. Yol gösterici boya tabana ulaşacağı zaman (ayırıştırıcı jelin başlangıcından yaklaşık 6-7cm) güç kaynağı kapatıldı. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alınıp ve jel sandviçten çıkarılarak oda sıcaklığında 60 dakika süreyle %50 metanol ve %12 glacial asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak hem boyandı ve hem de sabitlendi. Uygun bir süre bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edildi (bu süre zarfında solüsyon birkaç kez değiştirildi). Sonuç olarak, jel fotoğraflanmış ve %7'lik asetik asit çözeltisi içinde saklandı.

Aynı koşullar altında yürütülen diğer bir jel ise boyama işlemine tabi tutulmadan Western Blot analizi [Khyse-Anderson (1984) ile Tovey ve Baldo (1987) [133, 134] tarafından tanımlandığı gibi] için elektroforezi takiben transfer tamponu (25mM Tris, 192mM glisin ve %10 metanol) içersinde 10 dakika süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Elektroforetik transfer Panther Semidry Electroblotter Model HEP-3 kullanılarak ıslak transfer yöntemi uygulanarak yapıldı. Panther Semidry Electroblotter'ın platinyum tabanına önceden nemlendirilmiş Whatman1 filtre kağıdı yerleştirilip ve olası kalabilecek hava kabarcıklarını gidermek amacıyla bir deney tüpü üzerinde yuvarlandı. Whatman1 üzerine dikkatlice yerleştirilen jelin üzerine nitroselüloz membran da dikkatlice yerleştirildi. Daha sonra membran üzerine önceden ıslatılmış başka bir Whatman1 konarak sandviç tamamlandı. Hava kabarcıklarının tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için membranı kendi pozisyonunda sabit tutarken bir deney tüpü nazikçe üzerinde yuvarlandı ve sandviç etrafına taşan fazla transfer tamponları temizlenerek alan kurulandı. Sandviç hazırlandıktan sonra üst aparat dikkatlice yerleştirildi ve sistemin vidaları sıkıldı. Elektroforetik transfer sistemi Thermo EC1000-90 model güç kaynağına bağlandı ve voltaj ve maksimum akım limiti 10 V ve 400 mA'e ayarlanmıştır ve 1 saat süresince proteinler elektroforetik olarak transfer edildi. Süre sonunda güç kaynağı kapatılmış ve sistemin vidaları açıldı. Sonuç olarak üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, "Blot", elde edildi. Transfer tamamlandıktan sonra transferin ne derecede gerçekleştiğini tespit etmek için jel yukarıda tanımlandığı gibi boyandı. Blot, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir tepsinin içine yerleştirildi. 1 saat süreyle bloke çözeltisi (TBST içinde yağsız %5'lik süt tozu) ile çalkalayıcıda inkübe edildi. Süre sonunda blot önce

bloke çözeltisi içinde hazırlanan primer antikorlar ve daha sonra işaretleyici enzim-horseradish peroksidaz (anti-mouse IgG-HRP konjugatı) ile bağlı olan ikincil antikorlarla inkübe edildi. Daha sonra blot TBST solüsyonunda her biri 5 dakika olmak üzere 3 defa yıkandı. Yıkama işleminin bitmesiyle membran fare antikorlarına karşı spesifik olarak fare üzerinde geliştirilmiş, 1:10000 oranında HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor (anti-mouse sekonder antikor) bulunduran %5 kurusütlü TBST çözeltisi içerisinde tekrar işaretlendi. İşaretleme oda sıcaklığında 1 saat yapıldıktan sonra, ECL çözeltisi kullanılarak kemilüminesans reaksiyonu başlatıldı ve spesifik protein bantları kemilüminesansa duyarlı film kullanılarak belirlendi.

2.2.9. CYP1A1, HBX ve RELA Protein Etkileşimlerinin İmmün Çöktürme Yöntemiyle Tayin Edilmesi

HepG2-pcDNA3-HBX-pCMV6AC-GFP-CYP1A1 hücrelerinde CYP1A1 ve HBX proteinleri arasındaki etkileşimi belirlemek amacıyla immün çöktürme deneyi yapıldı. Bu, hücrelerdeki protein-protein ilişkilerinin analizinde kullanılan antijen antikor etkileşim prensibiyle çalışan bir yöntemdir.

İmmün çöktürme deneyi, Pierce İmmün Çöktürme Kiti (26149, Pierce) ve Antikor Temizleme Kiti (44600, Pierce) kullanılarak yapılmıştır. Antikor olarak CYP1A1 (ab111868, Abcam) antikoru kullanıldı.

Antikor, öncelikle tuzlardan arındırma dönüş sütunu kullanılarak tuzlardan ve yabancı maddelerden arındırıldı. Dönüş sütunu saklama solüsyonundan kurtarmak için 1500xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Sütunda bulunan reçine yatağı üzerine 300µl Melon jel saflaştırma tamponu eklendi. 1500xg de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen kısım döküldü. Daha sonra dönüş sütunu yeni santrifüj tüpüne alındı. Dönüş sütunundaki reçine yatağının üzerine 60µg antikor uygulandı. Daha sonra dönüş sütunu 1500xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen antikor ependorfta toplandı. Columna 20µl Melon Jel saflaştırma tamponundan konuldu. Alta geçen kısım toplandı. Elimizde 50µl antikor örneğimiz oldu. Böylece antikorumuz, tuzlardan ve yabancı maddelerden arındırıldı. Tuzlardan arındırdığımız, CYP1A1 antikoru Antikor Temizleme Kiti kullanılarak BSA (Sığır Serum Albumin), jelatinden, yabancı maddelerden ve inhibitörlerden temizlendi. Kitin içinde bulunan dönüş sütununa 250µl saflaştırma destek tamponundan konuldu. Dönüş sütunu 1500xg'de 1

1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen kısım atıldı. Daha sonra dönüş sütununa Melon Jel saflaştırma tamponundan 150µl eklendi. Tuzlardan arındırılmış antikör örneklerimiz, dönüş sütununa konuldu. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonra, dönüş sütunundaki saf antikörü toplamak için 2000xg de 1 dakika santrifüj edildi. Eppendorfa toplanan antikörler 4°C’de saklandı.

Temizlenen saf CYP1A1 antikörü, immün çöktürme için antikör immobilizasyonu yani antikörü reçineye bağlama işlemi yapıldı. Dönüş sütunu ilk önce santrifüj tüpüne yerleştirildi. Amino Bağlama reçineden 50µl dönüş sütununa konuldu. 1500xg de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen kısım atıldı. Dönüş sütunundaki reçine 200µl 1x coupling solusyonu ile yıkandı. 1500xg de santrifüj edildi. Alta geçen kısım atıldı. Pamuk öze ile dönüş sütununun alt ve üst kısmında sıvı kalmaması için fazla sıvı alındı. Dönüş sütununa, 150µl 1x coupling solusyonu ve 50µl temizlenmiş saf antikör konuldu. Daha sonra, dönüş sütununun üzerine 3µl sodyum siyanoborohidrid solusyonundan eklendi. Dönüş sütununun başlığı takılarak 180 dakika oda sıcaklığında karıştırıcıda inkübe edildi. Bu süre sonunda dönüş sütunu, yeni santrifüj tüpüne alınarak 1500xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj tüpüne geçen kısım 4°C’de saklandı. Sonra, dönüş sütununa 200µl 1x bağlanma solusyonundan konuldu. 1500xg de 1 dakika santrifüj edildi. Dönüş sütununa 200µl yıkama tamponundan eklendi. 1500xg de 1 dakika santrifüj edildi. Üzerine 3µl sodyum siyanoborohidrid solusyonundan eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Dönüş sütunu 1500xg de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen kısım atıldı. Dönüş sütunu içindeki reçine, 200µl bağlama tamponu ile yıkandı. Reçineye daha sonra, 200µl yıkama solusyonu konularak 4°C’de dönüş sütunu saklandı. Böylece CYP1A1 antikörü reçineye, immün çöktürme için bağlandı.

HepG2-HBX hücrelerinde, CYP1A1, HBX protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesi için, bu hücreye pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün geçici transfeksiyonu Materyal Metod 2.2.2.’deki prosedür kullanılarak yapıldı.

Hücre lizatları, kontrol agaroz reçine tamponu kullanılarak temizlendi. 0.5mg lizat için, dönüş sütununa 60µl kontrol agaroz reçine tamponundan konuldu. Daha sonra dönüş sütunu, 1500xg de 1 dakika santrifüj edildi. Reçine içeren dönüş sütununa, lizattan 1µg eklendi. 60 dakika oda sıcaklığında karıştırıcıda karıştırıldı. Bu süre sonunda dönüş sütunu, 1500xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen

kısım, inhibitörlerden ve yabancı maddelerden arındırılmış temiz lizattır. Temiz lizat, diğer immün çöktürme deneyleri için kullanıldı.

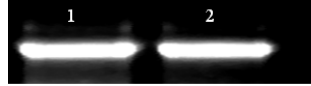
Antikoru bağladığımız dönüş sütunundaki reçinenin üzerine, hazırlanmış olduğumuz temiz lizat (protein karışımı) eklendi. 24 saat 4°C’de karıştırıcıda inkübe edildi. Dönüş sütunu yeni toplama tüpüne alındı. 1500xg de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen kısım, reçineye bağlanmayan proteinlerdir. Bu kısım, diğer analizler için toplandı. Daha sonra dönüş sütunu, 200µl immün çöktürme parçalama yıkama tamponu ile yıkandı. Elusyon işlemi için, dönüş sütununa 50µl elusyon tamponu eklendi. 1500xg de 1 dakika santrifüj edildi ve alta geçen kısım toplandı, diğer analizler için kullanıldı.

Hücrel proteinler, Laemli (1970)’de belirtildiği gibi dikey elektroforez tekniği uygulanarak SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforez (SDS-PAGE) ile ayrıştırılmış ve protein profilleri elde edildi. Daha sonra SDS-PAGE ve Western blot analizi Materyal Metod 2.2.7’deki prosedür uygulanarak proteinler arasındaki etkileşimler belirlendi.

3.BULGULAR

3.1. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 ve pCMV6-AC-GFP-RelA Vektörünün *E.coli DH5α* Hücrelerine Transformasyonunun Belirlenmesi

E.coli DH5α hücrelerine aktararak çoğaltılan pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 ve pCMV6-AC-GFP-RelA plazmid DNA'ları %1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir.

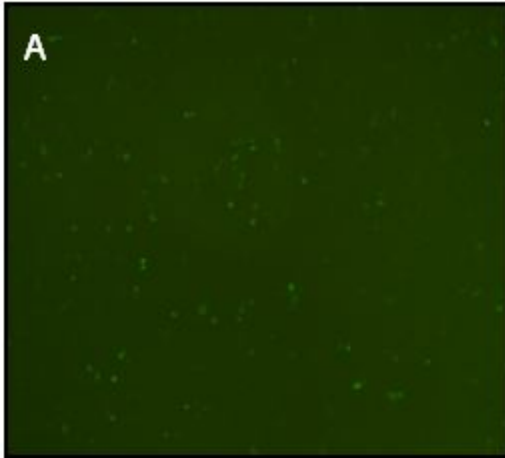


1. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 plazmid DNA
2. pCMV6-AC-GFP-RelA plazmid DNA

Şekil 3. 1. CYP1A1 ve RelA plazmid DNA'larının agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi.

3.2. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 Vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX Hücrelerine Geçici Transfeksiyonunun Verimliliğinin Belirlenmesi

HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBX hücrelerine pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün ve pCMV6-AC-GFP-RELA geçici transfeksiyonu Lipofectamin LTX&Plus solusyonu kullanılarak yapılmıştır. Bu hücrelerin floresan mikroskoptaki görüntüsü Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de gösterildi.



HepG2 -HBX -CYP1A1 hücresi

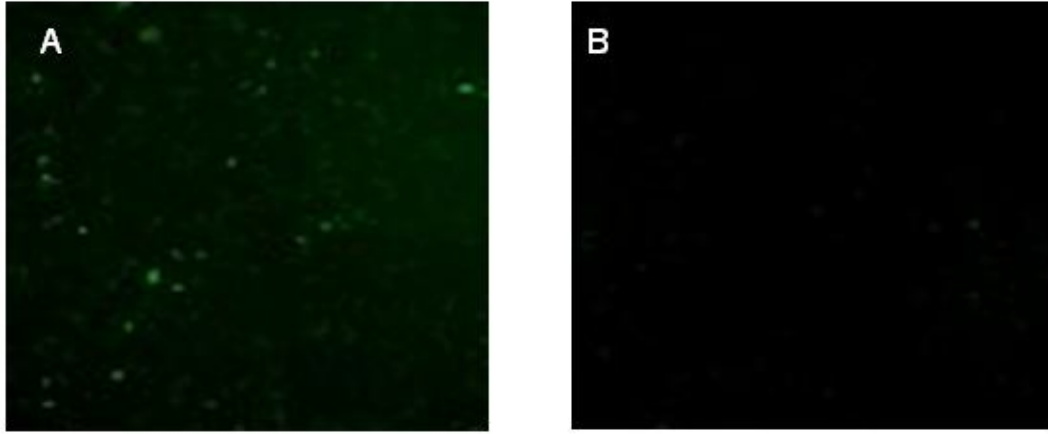


HepG2-HBX kontrol hücresi

Şekil 3. 2. HepG2-HBX hüresine Lipofectamin ltx plus solusyonu kullanılarak aktarılan pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün ve HepG2-HBX hüresinin floresan mikroskoptaki görüntüsü.

A: HepG2-HBX hücresi 6 kuyucuklu hücre kaplarına ekildi. 24 saat sonra 500µl serumsuz besi ortamı, 2,5µl plus solusyonu, 10µl ltx solusyonu, 3µg CYP1A1 plazmid DNA'sı konularak geçici transfeksiyon yapılmıştır. 24 saat, 37°C'de %5'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

B: HepG2-HBX hüresine CYP1A1 geçici transfeksiyonu yapılmamıştır. Bu hücre kontrol amaçlı kullanılmıştır. 24 saat, 37°C'de %5'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.



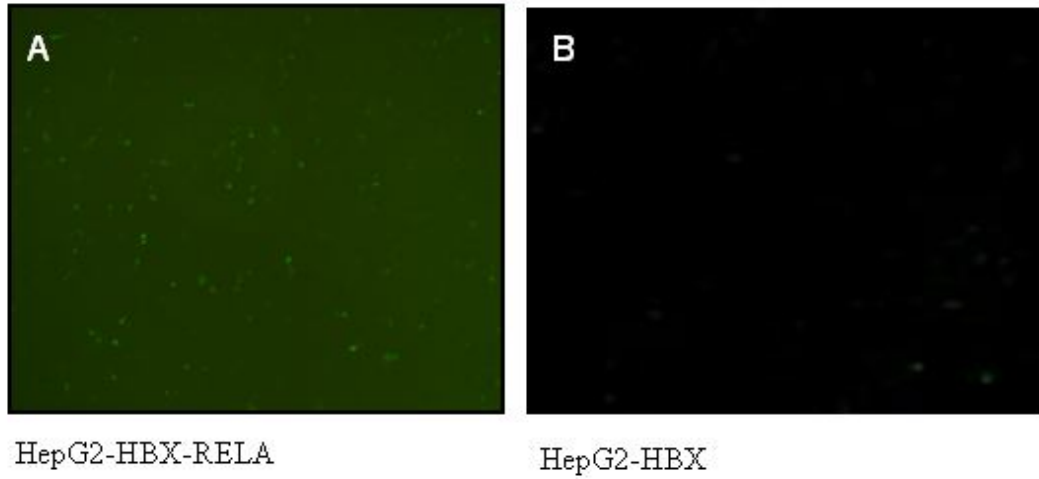
HepG2 -CYP1A1 hücresi

HepG2 hücresi

Şekil 3. 3. HepG2-pcDNA3 hüresine Lipofectamin ltx plus solusyonu kullanılarak aktarılan pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün ve HepG2-pcDNA3 hüresinin floresan mikroskoptaki görüntüsü.

A: HepG2-pcDNA3 hücresi 6 kuyucuklu plate ekilmiştir. 24 saat sonra 500µl serumsuz besi yeri, 2,5µl plus solusyonu, 10µl ltx solusyonu, 3µg pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 plazmid DNA'sı konularak geçici transfeksiyon yapılmıştır. 24 saat, 37°C'de %5'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

B: HepG2-pcDNA3 hüresine pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 geçici transfeksiyonu yapılmamıştır. Bu hücre kontrol amaçlı kullanılmıştır. 24 saat, 37°C'de %5'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.



Şekil 3. 4. HepG2-HBX hücrelerine, Lipofectamin ltx plus solusyonu kullanılarak aktarılan pCMV6-AC-GFP-RELA vektörünün ve HepG2-HBX hücrelerinin floresan mikroskoptaki görüntüsü

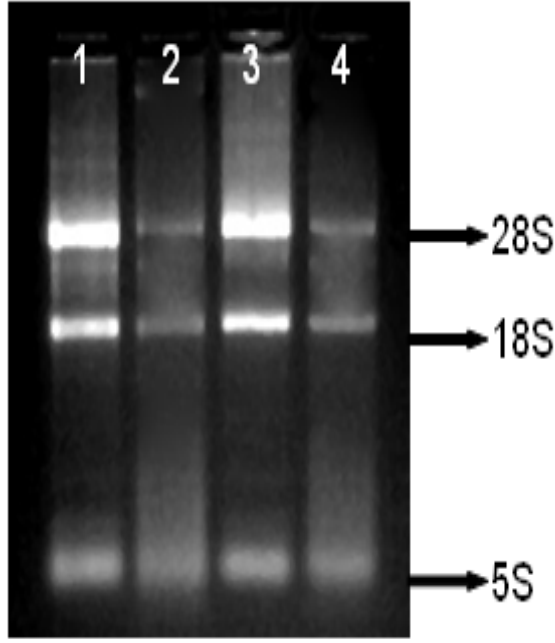
A: HepG2-pcDNA3-HBX hücresi 6 kuyucuklu plate ekilmiştir. 24 saat sonra 500µl serumsuz besi yeri, 2,5µl plus solusyonu, 10µl ltx solusyonu, 3µg pCMV6-AC-GFP-RELA plazmid DNA'sı konularak geçici transfeksiyon yapılmıştır. 24 saat, 37°C'de %5'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

B: HepG2-pcDNA3 hücresine pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 geçici transfeksiyonu yapılmamıştır. Bu hücre kontrol amaçlı kullanılmıştır. 24 saat, 37°C %5'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

Bu sonuçlar bize, HepG2-pcDNA3-HBX hücrelerine aktarılan CYP1A1 geninin transfeksiyon verimliliğinin %20-%30 olduğunu gösterdi.

3.3. RNA'ların Belirlenmesi

HepG2-pcDNA3, HeG2-pcDNA3-CYP1A1, HepG2-HBX ve HepG2-HBX-CYP1A1 hücrelerinin total RNA izolasyonu Trizol ile yapılarak %1'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.



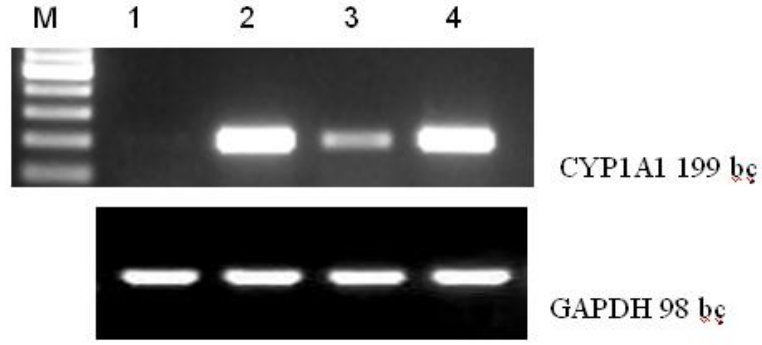
1. HepG2-pcDNA3 RNA
2. HepG2-pcDNA3-CYP1A1 RNA
3. HepG2-HBX RNA
4. HepG2-HBX-CYP1A1 RNA

Şekil 3. 5. HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-CYP1A1, HepG2-HBX ve HepG2-HBX-CYP1A1 RNA'larının görüntüsü.

3.4. CYP1A1 ve RELA Vektörlerinin HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX Hücrelerine Geçici Transfeksiyonunun Sonrasında CYP1A1 ve RELA Varlığının PZR ile Kontrolü

pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX hücrelerine geçici (transient) transfeksiyonu ile aktarılan CYP1A1 ve kontrol GAPDH RNA ifadesi semikantitatif RT-PZR ile belirlendi. CYP1A1 ekspresyon düzeyinin floresan mikroskop ile yapılmış olan takiple uyumlu olduğu gözlemlendi. Transfekte edilen hücreler 24 saat sonra Trizol ile toplandı. RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra cDNA sentezi yapılarak PZR analizi yapıldı.

pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX hücrelerine geçici transfeksiyonu ile aktarılan CYP1A1 ifadesinin ve GAPDH ifadesinin RT-PZR ile belirlenmesi Şekil 3.6'da gösterildi.

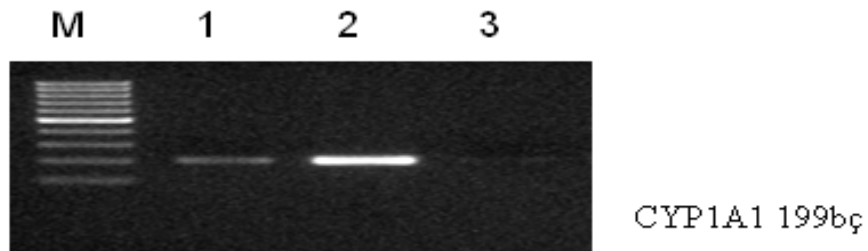


1. HepG2
2. HepG2-CYP1A1
3. HepG2-HBX
4. HepG2-HBX-CYP1A1

Şekil 3. 6. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBX hücrelerine geçici transfeksiyonu ile aktarılan CYP1A1 RNA ifadesinin RT-PZR ile belirlenmesi

HepG2-pcDNA3, HepG2-HBX, HepG2-pcDNA3-CYP1A1, HepG2-HBX-CYP1A1 hücre dizinleri kullanılarak yapılan yarı kantitatif PZR reaksiyonunda, Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) gen ifadesi kontrol gen ifadesi olarak kullanıldı. Kontrol gen ifadesine göre, geçici transfeksiyon ile aktarılan CYP1A1 ifadesinin hücrelerde arttığı gösterildi.

Gen susturma metodu kullanılarak baskılanan CYP1A1 geninin, HepG2-HBX-CYP1A1-siRNA CYP1A1 hücrelerinin mRNA ekspresyonlarında değişiklik olup olmadığını anlamak için RT-PZR analizi yapılmıştır. Bu RT-PZR sonuçları Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



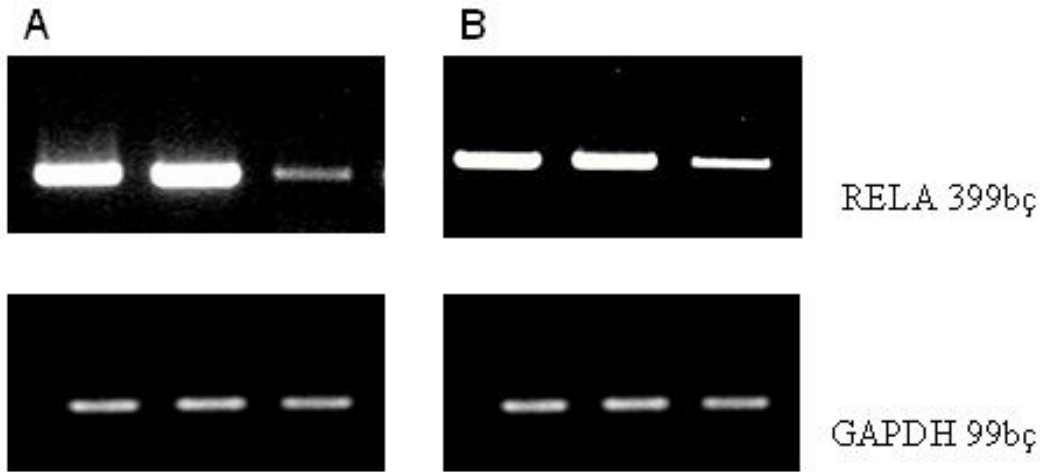
M. Marker

1. HepG2-HBX hücresi
2. HepG2-HBX-CYP1A1
3. HepG2-HBX-CYP1A1-siRNA

Şekil 3. 7. HepG2-HBX-CYP1A1-siRNA CYP1A1 hücresinin mRNA ifadesinin RT-PZR ile belirlenmesi.

Yapılan RT-PZR deneylerinde HepG2-HBX-CYP1A1 hücrelerine, siRNA uygulanarak baskılanan CYP1A1 geninin, mRNA ekspresyonunun azaldığı tespit edildi. HepG2-HBX-siRNA-CYP1A1 hücrelerinde CYP1A1 ekspresyonunun bazal miktarda olduğu gözlemlendi.

Geçici transfeksiyon ile HepG2 ve HepG2-HBX hücrelerine aktarılan RELA geninin mRNA düzeyinde ekspresyonuna bakmak için RT-PZR analizi yapıldı. Bu sonuçlar Şekil 3.8'de gösterilmiştir.



A.

1. HepG2-RELA hücresi
2. HepG2-RELA hücresi
3. HepG2 hücresi

B.

1. HepG2-HBX-RELA hücresi
2. HepG2-HBX-RELA hücresi
3. HepG2-HBX hücresi

Şekil 3. 8. pCMV6-AC-GFP-RELA vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBX hücrelerine geçici transfeksiyonu ile aktarılan CYP1A1 RNA ifadesinin RT-PZR ile belirlenmesi.

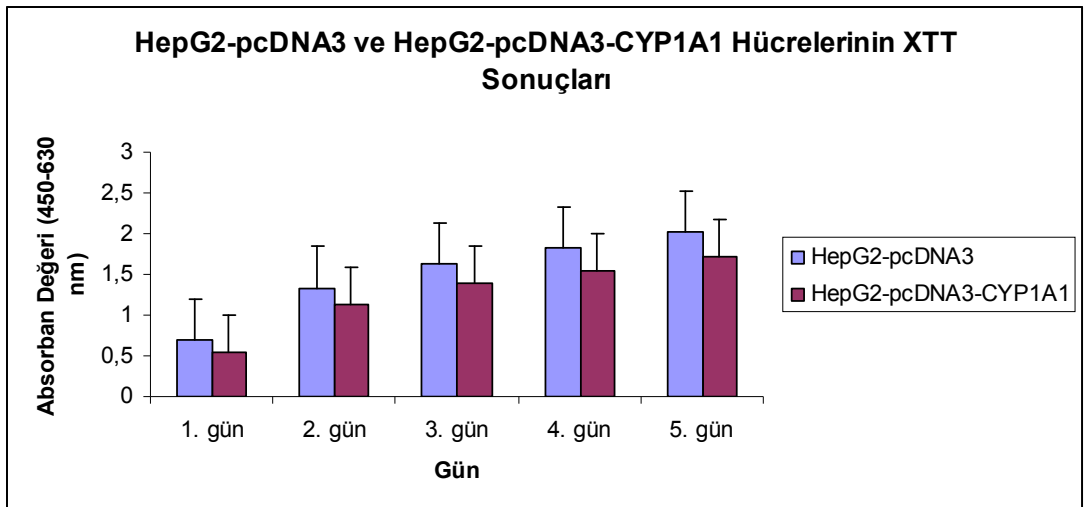
HepG2-pcDNA3 hücre dizinindeki RELA mRNA ekspresyonu farklı PZR koşullarına göre değişiklik göstermekle birlikte bazal miktarda ifade edildiği düşünülmektedir (Şekil 3.8. A ve Şekil 3.68. B).

HepG2-pcDNA3-RELA hücre dizininde, transfeksiyon sonrasında NF- κ B (RELA/p65) ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir.

HepG2-pcDNA3-HBX hücre dizinindeki RELA mRNA ekspresyonu farklı PCR koşullarına göre değişiklik göstermekle birlikte bazal miktarda ifade edildiği gözlemlendi. Bu hücre dizininde, transfeksiyon sonrasında RELA mRNA'sının belirgin şekilde arttığı tespit edildi.

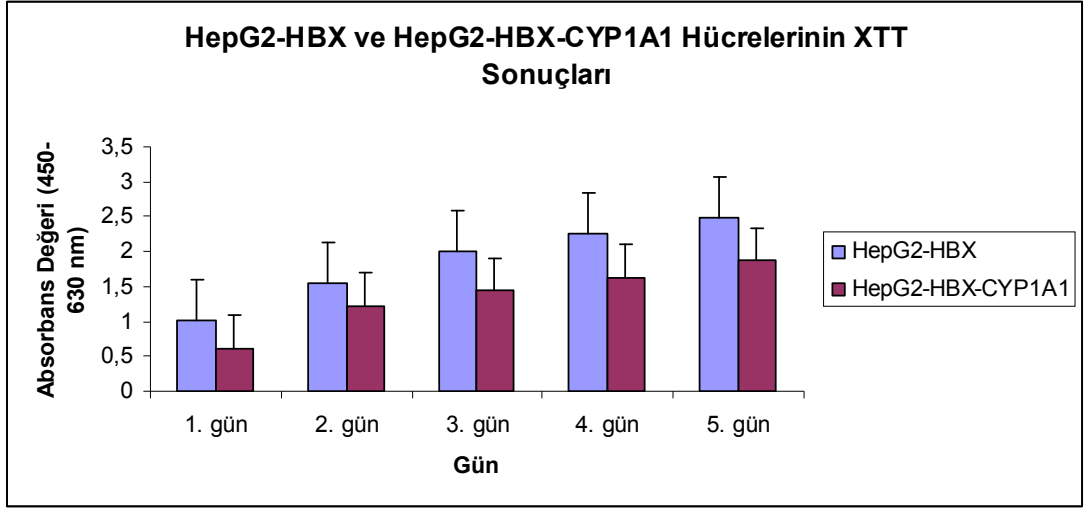
3.5. CYP1A1 Ekspresyonunun Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi

HepG2-pcDNA3, HepG2-HBX, HepG2-pcDNA3-CYP1A1, HepG2-HBX-CYP1A1, HepG2-pcDNA3-siRNA-CYP1A1 ve HepG2-HBX-CYP1A1-siRNA CYP1A1 hücreleri kullanılarak hücre canlılığı deneyleri yapılmıştır. Hücre canlılığı deneyleri XTT ve WST metodları kullanılarak yapılmıştır. Bu deney sonuçları bize, CYP1A1 ekspresyonunun hücrelerin yaşamı ile bağdaştığını ve hücrelere toksik etki göstermediğini göstermiştir. CYP1A1 ifadesi varlığında ve CYP1A1 ifadesinin siRNA ile baskılanmasında, büyüme faktörleri varlığında ve yokluğunda ilgili hücre dizinleri arasında proliferasyon (hücre canlılığı) bakımından anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir.



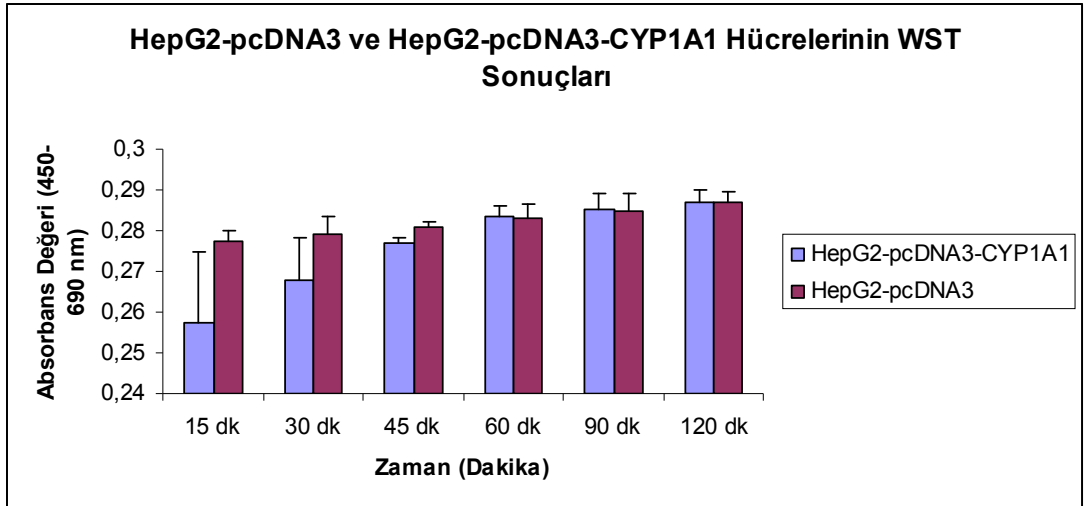
Şekil 3. 9. HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-CYP1A1 hücre canlılığının XTT metodu ile belirlenmesi

Yapılan XTT deneylerinde, HepG2-pcDNA3 hücrelerinin canlılığı 1. günden 5. güne kadar artmıştır. Herhangi bir madde uygulanmadığı için hücrelerin canlılığının arttığı belirlenmiştir.

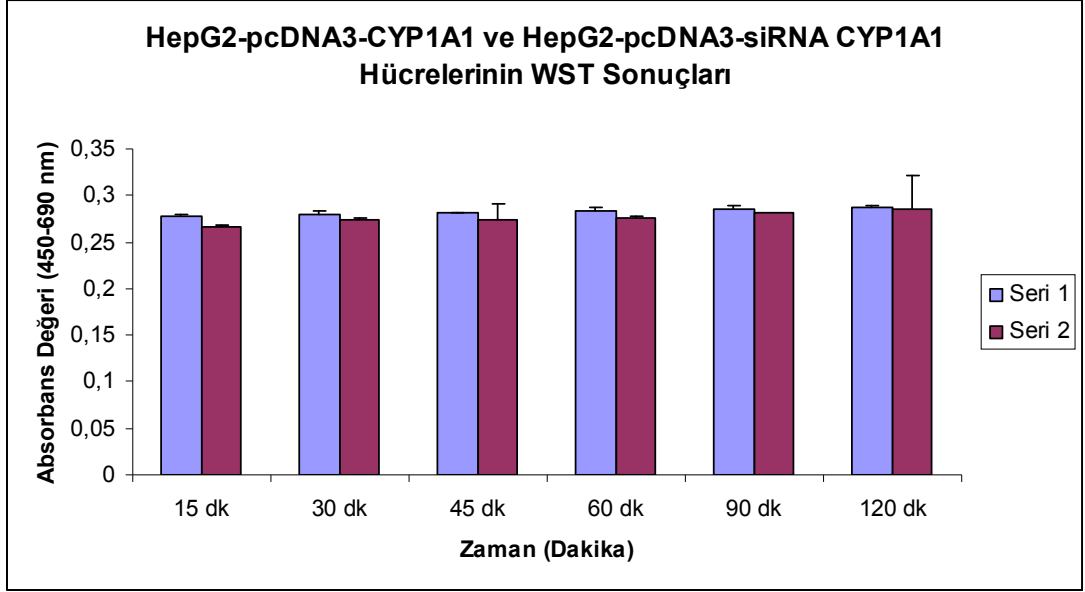


Şekil 3. 10. HepG2-HBX ve HepG2-HBX-CYP1A1 hücre canlılığının XTT metodu ile belirlenmesi.

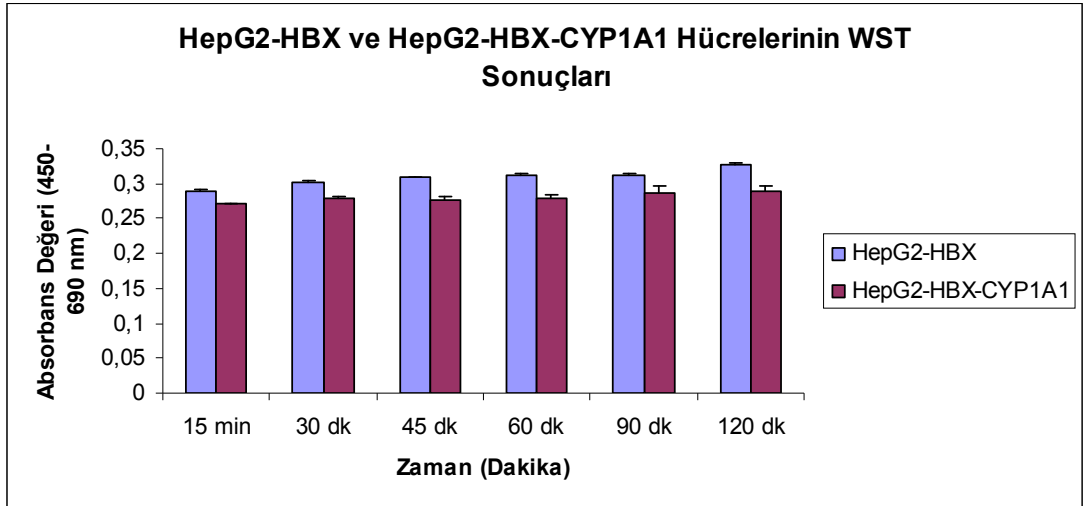
HepG2-pcDNA3-HBX hücrelerinin canlılığının 1. ve 5. günler arası yapılan XTT deneylerinde arttığı tespit edildi.



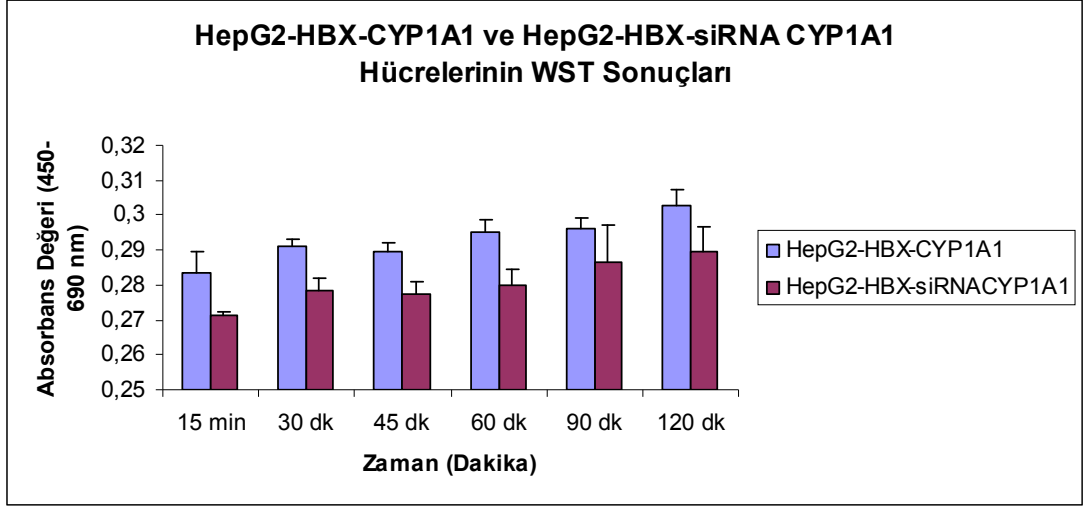
Şekil 3. 11. HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-CYP1A1 hücre canlılıklarının WST metodu ile belirlenmesi



Şekil 3. 12. HepG2-pcDNA3-CYP1A1 ve HepG2-pcDNA3-siRNACYP1A1 hücre canlılıklarının WST metodu ile belirlenmesi.



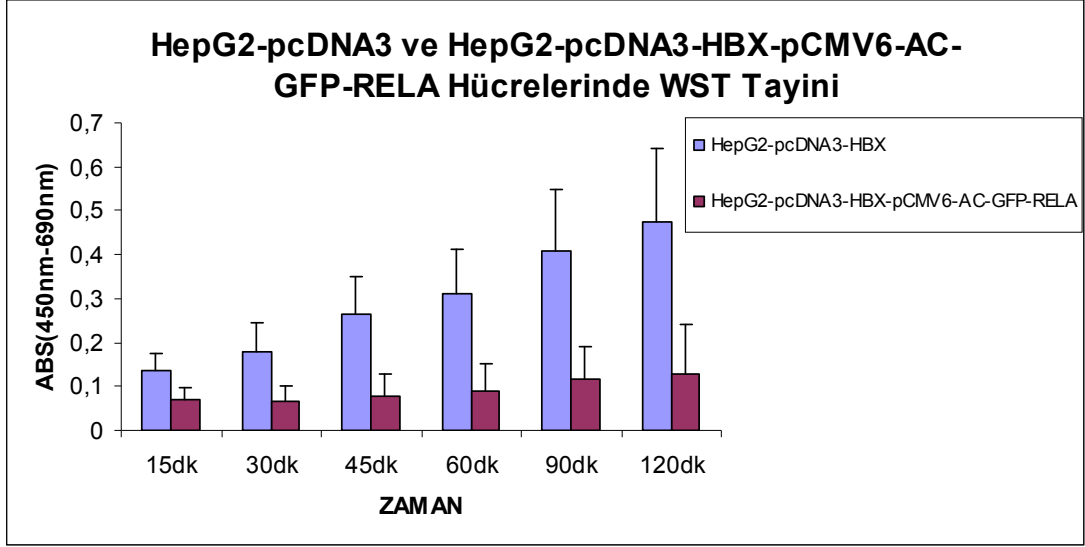
Şekil 3. 13. HepG2-HBX ve HepG2-HBX-CYP1A1 hücre canlılığının WST metodu ile belirlenmesi.



Şekil 3. 14. HepG2-HBX-CYP1A1 ve HepG2-HBX-siRNA CYP1A1 hücre canlılığının WST metodu ile belirlenmesi.

Geçici transfeksiyon ile HepG2-HBX hücresine aktarılan pCMV6-AC-GFP-RELA vektörünün hücre canlılığına etkisi de WST metodu yapılarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar şekil 3.16 ve şekil 3.17’de gösterilmiştir.

Yapılan WST sonuçlarında, HepG2-pcDNA3-HBX hücre canlılığının zamana bağlı olarak arttığı belirlenmiştir.



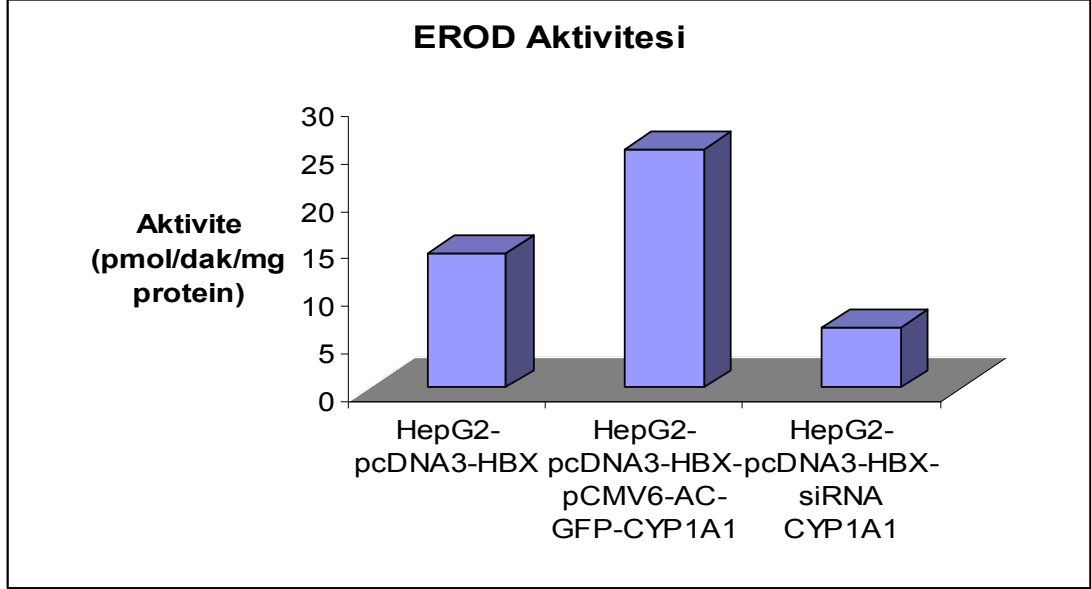
Şekil 3. 15. RELA ekspresyonunun HepG2-HBX hücre canlılığına etkisinin WST metodu ile belirlenmesi.

3.6. İlgili Hücrelerde Alkoksiresorufin O-Dealkilaz (EROD) Aktivite Tayini

Sitokrom P4501A1 (CYP1A1) aktivitesini tayin ve takip etmek için kullanılan en özgün ve hassas metod EROD (7-EtoksiRezorufin O-Deetilaz) aktivitesidir (12). HepG2-pcDNA3, HepG2-HBX, HepG2-pcDNA3-CYP1A1 ve HepG2-HBX-CYP1A1 hücre homojenatlarında EROD aktivite tayini Burke ve Mayer metodu ile Arınç ve Şen (1994) tarafından optimize edilen şartlar kullanılarak tespit edildi.

CYP1A1 geni içeren plazmidler ile geçici transfekte edilen HepG2-HBX hücrelerinde mRNA düzeylerinde artış gözlemlendi. Bu artış EROD aktivite tayininde de gösterilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.16'da gösterildi.

Ayrıca, HepG2-HBX-CYP1A1 hücresi, siRNA metodu ile baskılandı. Baskılanan bu hücrelerde de, CYP1A1 aktivitesine bakıldı. Bu aktivite sonuçları Şekil 3.16'de gösterildi.

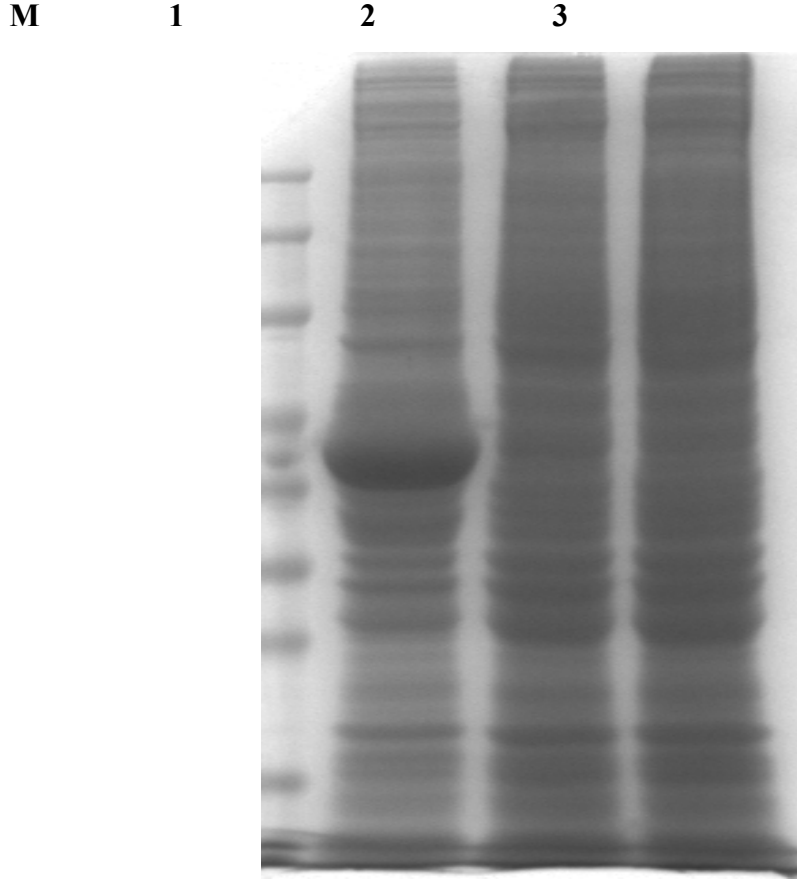


Şekil 3. 16. HepG2-HBX, HepG2-HBX-CYP1A1 ve HepG2-HBX-siRNA-CYP1A1 hücrelerinde EROD aktivitesinin belirlenmesi.

EROD aktivite sonuçları bize, HepG2-HBX-CYP1A1 hücrelerinde CYP1A1 enzim aktivitesinin HepG2-HBX ve HepG2-HBX-siRNA-CYP1A1 hücrelerine göre arttığını gösterdi.

3.7. Transfeksiyon Sonrası Hücrelerdeki Protein Profillerinin SDS-PAGE Analizi ile Belirlenmesi

Hücrelerdeki proteinlerin varlığı SDS-PAGE analizi yapılarak tespit edilmiştir. HepG2-HBX, HepG2-HBX-CYP1A1 ve HepG2-HBX-CYP1A1-siRNA hücrel proteinleri, moleküler ağırlıklarına göre SDS-PAGE analizi yapılarak görüntülenmiştir. Bu sonuçlar Şekil 3.17'de gösterilmiştir.



M. Marker

1. HepG2-HBX

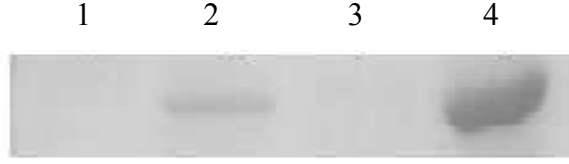
2. HepG2-HBX-CYP1A1

3. HepG2-HBX-CYP1A1-siRNA

Şekil 3. 17. HepG2-HBX, HepG2-HBX-CYP1A1, HepG2-HBX-CYP1A1-siRNA protein profillerinin SDS-PAGE analizi ile belirlenmesi.

3.8. Transfeksiyon Sonrası Hücrelerde CYP1A1 Geninin Protein Düzeyinde İfadesinin Western Blot Yöntemi ile Belirlenmesi

İlgili hücrelerde CYP1A1 geninin protein düzeyinde ifade edilmesi western blot analizi ile teyit edildi. Bu sonuçlar, Şekil 3.18’de gösterildi.



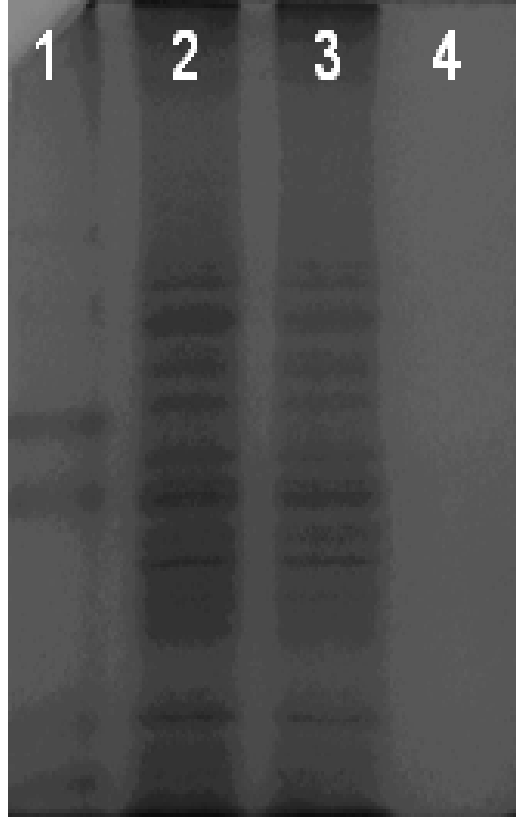
1. HepG2-pcDNA3
2. HepG2-pcDNA3-CYP1A1
3. HepG2-HBX
4. HepG2-HBX-CYP1A1

Şekil 3. 18. HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-CYP1A1, HepG2-HBX-CYP1A1 hücrelerinin protein düzeyinde ifadelerinin Western blot yöntemiyle belirlenmesi.

Yapılan western blot sonuçları bize, HepG2-pcDNA3-CYP1A1 ve HepG2-HBX-CYP1A1 hücrelerinde, protein düzeyinde CYP1A1 ifadesinin olduğunu gösterdi.

3.9. CYP1A1 ve HBX Protein-Protein Etkileşimlerinin İmmün Çöktürme Yöntemi ile Belirlenmesi

CYP1A1 ve HBX proteinleri arasındaki etkileşimlerin olup olmadığını belirlemek amacıyla immün çöktürme deneyleri yapıldı. Deney sonuçları şekil 3.19'da gösterildi.



1. Marker
2. HepG2-HBX-CYP1A1: temiz hücre lizatı
3. HepG2-HBX-CYP1A1: immün çöktürmede reçineye bağlanmayan proteinler (reçineye CYP1A1 antikoru bağlanmış).
4. HepG2-HBX-CYP1A1: İmmün çöktürmede elue olan proteinler (reçineye CYP1A1 antikoru ve CYP1A1 proteini bağlanmış).

Şekil 3. 19. İmmün çöktürme yapılan HepG2-HBX, HepG2-HBX-CYP1A1 hücre lizatlarının, protein profillerinin SDS-PAGE yöntemiyle belirlenmesi.

Bu sonuçlar bize, HepG2-HBX-CYP1A1'in temiz hücre lizatında ve reçineye bağlanmayan proteinlerin SDS-PAGE analizi ile protein profillerini gösterdi. Ancak, immün çöktürme deneylerinde, CYP1A1 antikoru ile reçineye bağlanan HepG2-pcDNA3-HBX-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücre lizatında SDS-PAGE analizlerinde protein profilleri tespit edilemedi.

4. TARTIŞMA

Hepatit B Virüsü (HBV), tüm dünyada yaklaşık 350 milyon insanda kronik karaciğer enfeksiyonlarına neden olan hepatit virüsünün en yaygın türlerinden biridir. Kronik Hepatit B siroza, karaciğer yetmezliğine ve hepatoselüler karsinoma neden olur [1, 51].

HBV, hepadnaviridae ailesinin bir parçasıdır. Bu virüs genomu, zarflı ve 3200 nükleotidlik kısmen çift zincirli DNA'dan oluşur. Genom, bir çekirdek proteini ve DNA polimeraz ile paketlenir. HBV genomu, uzun sarmalı üzerinde Yüzey (S), Kor (C), Polimeraz (P) ve X olarak adlandırılan, dört değişik protein kodlayan nükleik asit dizisine sahiptir [53].

Hepatit B X (HBX) geni HBV genomundaki en küçük gen bölgesidir. Bu gen, 17 kDa'luk HBX olarak adlandırılan proteini kodlar ve 154 aminoasitlik polipeptit içerir [54].

Hepatoselüler kanser gelişimi ile HBV ilişkisi bilinmesine rağmen moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. HBV ile hepatoselüler kanser gelişiminde 3 faktör vardır. Bunlardan birincisi, konakçı hücrenin genomuna viral DNA'nın girmesidir. İkincisi, kronik HBV enfeksiyonu için konağın bağışıklık

yanıtına bağlı inflamasyondur. Üçüncüsü, HBX gibi sinyal iletim yollarını düzenleyen proteinlerdir [55].

HBX hücrel transkripsiyonu, DNA onarımını, apoptozisi ve protein yıkım yollarını düzenler. Bu işlevler, hepatoselüler karsinom ile ilişkilidir. HBV ile ilişkili hepatoselüler kanser gelişiminde HBX doğrudan etkilidir. Bunlar transjenik hayvan modellerinde gösterilmiştir [55, 56].

HBV tarafından kodlanan bir onkoprotein olan HBX birden fazla mekanizmalarla HCC gelişiminde rol oynar [53]. İlginç olarak, yapılan son çalışmalar, HBV ile ilişkili HCC'ya HBX'in de-nova DNA metil transferaz 3A (DNMT3A) ile etkileşerek katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bu da DNA metilasyonu ve HBX arasında bağlantı olabileceğini düşündürmektedir [57].

HBX proteini, birçok viral ve konakçı hücrede transaktivatör olarak önemli rol oynar. Böylece HBX'in hepatoselüler karsinomun gelişiminde önemli olduğu düşünülmektedir [54]. Birçok çalışma, HBX'in Nuclear Faktör Kappa B (NF-kB) sinyal yolağı, JAK-STAT sinyal yolağı, C-jun N-Terminal kinaz yolağı, ve protein C kinaz yolakları dahil olmak üzere birçok sitoplazmik proteinler ile etkileşim halinde olduğunu göstermiştir [58]. HBX, özellikle RNA polimeraz II'nin alt ünitesi olan RPB5, Transkripsiyon faktör IIB, TATA bağlanma proteini gibi çekirdek proteinleri ile de etkileşim halindedir [33]. Bu yollara ek olarak WNT/B katenin sinyal yolağının da HBX varlığında değiştii bulunmuştur. İnsan hepatoselüler karsinomlu hastaların %50-70'inde B-Katenin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir [59, 60, 61].

Yapılan çalışmalarda HBX'in ısı şoku proteinleri ile de etkileşim halinde olduğu bulunmuştur. Isı şoku proteinleri ile HBX proteini arasındaki etkileşim hücre ölümüne neden olur ve HBV replikasyonunu inhibe eder. Ancak konakçı faktörler ve HBV patolojisinde HBX'in rolü belirsizdir. Bu nedenle HBX ve konakçı faktörleri arasındaki ilişki kütle spektroskopisi ile araştırılmıştır [62].

HBX ile etkileşim halinde olan yollardan en önemlisi Nuclear Faktör Kappa B (NF-kB)'dir. Nükleer faktör kappa B (NF-kB) tüm hücre tiplerinde bulunan, immün sistem ve inflamatuvar yanıtta, hücrel streste, oksidatif streste görev alan dimerik bir transkripsiyon faktörüdür. NF-kB, İnhibitör Kappa B (IkB) tarafından düzenlenir. Bu transkripsiyon faktörü, akciğer kanseri, meme kanseri ve pankreas kanserinde aşırı ifade edilir [63]. Bir çalışmada da, NF-kB'nin HBV ile ilişkili karaciğer kanserinde HBX geni ile etkileşim halinde olduğu bulunmuştur [64]. HBX

ve NF-kB arasındaki mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Çeşitli hücre tiplerinde Ras sinyal yolu üzerinden NF-kB'nin HBX fonksiyonları gösterilmiştir. Bazı çalışmalar, fokal yapışma kinaz (FAK) veya Ras'ın dominant negatif mutantlarında NF-kB'nin HBX aktivasyonunu baskıladığını göstermiştir [65]. Diğer yapılan bazı çalışmalar da, Ras ve Raf'ın negatif mutantlarında NF-kB'nin HeLa hücrelerinde HBX aktivasyonunu inhibe etmediğini göstermiştir [66].

Bazı çalışmalar sonucunda, HBX'in İnhibitör Kappa B (IkB)'nin bozulmasını uyararak NF-kB'nin aktive olduğu ileri sürülmüştür. Ancak bu bozulmanın nasıl olduğu henüz belli değildir. Bunun aksine bazı çalışmalarda, HeLa hücrelerinde IkB fosforilasyonu yokluğunda, IkB ve HBX etkileşiminde proteozomal bozulma belirlenmiştir.

HBX düzenlenmesinin NF-kB aktivasyonu, çeşitli deneysel sistemlerde apoptozisin HBX modülasyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Örneğin, NIH 3T3 hücrelerinde yapılan çalışmalarda apoptozisin HBX modülasyonu sırasında NF-kB'nin rolünü incelemek için IkB-Süper Baskılayıcı (IkB-SR) kullanılmıştır. IkB-SR, fosforile edilemez bir IkB şeklidir. Yapısal olarak NF-kB'ye bağlı kalır ve NF-kB aktivasyonunu bloke eder (22). HBX'in tek başına apoptozisi aktive etmediği gözlenmiştir. IkB-SR ve HBX etkileşiminde apoptoziste bir artış olduğu belirlenmiştir [67, 68].

Sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) geni, hücre içinde detoksifikasyonda rol almaktadır. Bu genin ekspresyonunun uyarılması hücre için zararlı etki oluşturma potansiyelindedir. Uyarılma sonucunda, bir takım ara metabolitler oluşur. Bu ara metabolitlerin çoğu karsinogenez aşamalarında etkili olan maddelerdir. Bu nedenle ksenobiyotikler tarafından bir hücrenin karsinogenez sürecinin başlatılmasında, CYP1A1 geninin ekspresyonunun arttırılması önemli mekanizmalardan birini oluşturmaktadır. CYP1A1 geni Aril Hidrokarbon Reseptörleri (AHR) aracılığı ile düzenlenir [50].

NF-kB'nin, hücre içi CYP1A1 etkileşimi ve HBX geni ile etkileşimi gösterilmiştir. Ancak Hepatit B varlığındaki hepatoselüler kanser gelişiminde HBX ve CYP1A1 ile ilgili bir araştırma yapılmamıştır. Sunmuş olduğumuz tezimizdeki amacımız, HBX proteininin ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan CYP1A1 üzerine etkilerini araştırmaktır. Hepatit B virüs varlığında gelişen karaciğer kanseri

olgularının kansere olan yatkınlıklarının açıklanmasında, CYP1A1 geninin uyarılma mekanizmasının aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

CYP1A1 aktivitesini tayin ve takip etmek için kullanılan en özgün ve hassas metod EROD (7-Etoksiresorufin O Deetilaz) aktivitesidir. Bu enzimin artışı hücrelerde bu enzimin substratı olan çeşitli toksik ajanların etkilerini arttırarak değişik patofizyolojik durumlara neden olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Ancak son zamanlarda özellikle CYP1A1'in protein-protein etkileşimleri ile çeşitli yolları uyararak yine gen ifadelerini de değiştirebildiği de bildirilmektedir [50]. Bu çalışmada Hepatit B virüsünün hepatokarsinogenez oluşumundaki moleküler mekanizmasında HBX proteini ile CYP1A1 proteininin etkileşiminin olup olmadığı araştırılmıştır.

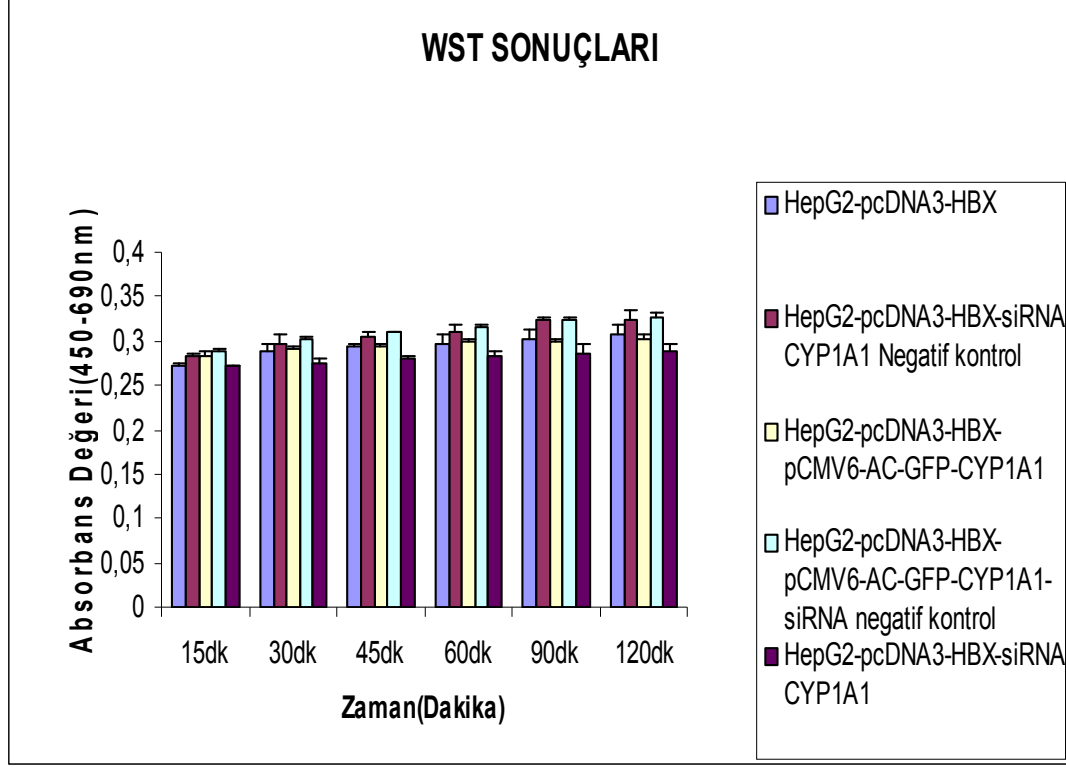
Elde edilen sonuçlarda, HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX hücrelerine geçici transfekte edilen CYP1A1 geninin transfeksiyon verimliliğine, floresan mikroskopta bakılarak %20 ve %40 olduğu belirlenmiştir. HepG2-pcDNA3-CYP1A1 ve HepG2-HBX-CYP1A1 hücre dizinlerinde, transfeksiyon sonrasında CYP1A1 mRNA'sının belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. Bu da, hücrelere geçici transfeksiyon ile aktardığımız CYP1A1 geninin, bu hücrelerde mRNA düzeyinde ifadesinin gerçekleştiğini göstermiştir.

Ayrıca HepG2-HBX-CYP1A1 hücresinde siRNA metodu uygulanarak yapılan deneylerde, CYP1A1 gen ifadesinin mRNA düzeyinde azaldığı tespit edildi. CYP1A1 geninin siRNA ile baskılanmasından sonra HBV aracılı karaciğer kanser hücresinde ifadesinin azaldığı belirlendi. Bu sonuçlar, PZR analizleri, EROD aktivite tayinleri ve hücre canlılığı testleri ile teyit edildi. CYP1A1 baskılanmasından sonra bu hücrelerde yapılan hücre canlılığı deneylerinde, HepG2-HBX-CYP1A1 hücrelerine göre canlılığın azaldığı tespit edildi. Bunun da siRNA ile CYP1A1 geninin baskılanmasından dolayı olduğu düşünülmüştür.

HepG2-siRNA-CYP1A1 hücrelerinde yapılan EROD aktivite tayini sonuçlarında ise, HepG2-HBX-CYP1A1 hücresine göre bu hücrelerde CYP1A1 aktivitesinin düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar bize, CYP1A1 geninin siRNA metodu ile baskılandığını gösterdi.

Yapılan hücre canlılığı deneylerinde de, CYP1A1 gen ekspresyonunun hücrelerin canlılığı ile bağdaştığı saptanmıştır. Zamana bağlı olarak yapılan hücre canlılığı deneylerinde, HepG2-HBX ve HepG2-HBX-CYP1A1 hücrelerinin canlılığı

zamana bağılı olarak artmıştır ve hücreler arasında anlamlı bir artış farklı gözlenmemiştir. Bu sonuçlar bize CYP1A1 geninin HepG2 hücrelerine zararlı etki etmediğini göstermiştir. Sonuçlar, Şekil 3.20 'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 20. HepG2-pcDNA3-HBX, HepG2-pcDNA3-HBX-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 ve HepG2-pcDNA3-HBX-siRNA-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücrelerinin, hücre canlılığının WST metodu ile belirlenmesi.

HepG2 ve HepG2-HBX hücrelerinde CYP1A1 enzim aktivitesi, EROD metodu ile ölçülmüştür. EROD sonuçlarında HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX-CYP1A1 hücrelerindeki CYP1A1 aktivitesi, HepG2 ve HepG2-HBX hücrelerindeki CYP1A1 aktivitelerine göre artış gösterdiği belirlenmiştir. HepG2-CYP1A1 ve HepG2-HBX-CYP1A1 hücrelerindeki nispeten yüksek olan EROD aktiviteleri CYP1A1 ve HBX proteinleri arasında bir etkileşim olduğunu teyit etmemektedir. Bunun nedeni yeterli düzeyde protein ürününün olmaması olabilir. Buna ek olarak geçici transfeksiyon ile olası etkileşimin gerçekleşmemesi de bir neden olabilir.

CYP1A1 geninin protein düzeyinde ifadesi, western blot analizi ile belirlendi. Yapılan western blot sonuçları bize, HepG2-pcDNA3-CYP1A1 ve HepG2-HBX-CYP1A1 hücrelerinde protein düzeyinde CYP1A1 gen ifadesinin olduğunu ve CYP1A1 geninin HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX hücrelerine geçici transfekte

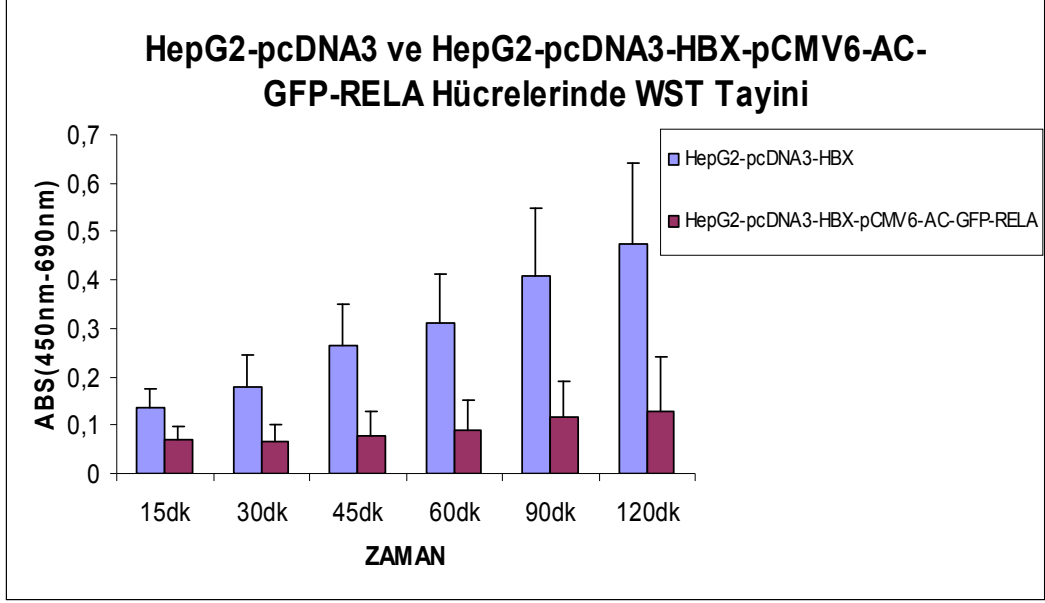
edildiğini gösterdi. HepG2-pcDNA3 ve HepG2-HBX hücrelerinde, protein düzeyinde CYP1A1 ifadesi çok az yani bazal miktarda olduğu tespit edildi.

Hücrelerde artan bir toksisite tespit edilmemiş olması, EROD düzeyinin düşük olması ve CYP1A1 protein düzeyinin neredeyse tayin edilemeyecek düzeyde olması Hepatit B bazlı hepatokarsinogenez oluşumunun moleküler mekanizmasında HBX proteini ile CYP1A1 arasında bir etkileşim olmadığını doğrular niteliktedir.

Kesin sonuçlara ulaşmak için ve daha kapsamlı çıkarım yapmak için immün çöktürme deneyleri yapılmıştır. CYP1A1 ve HBX proteinleri arasında etkileşim olup olmadığına bakmak için immün çöktürme deneyleri yapılmıştır. İmmün çöktürme deneylerinde, protein profilleri SDS-PAGE analizi ile tayin edilmiştir. Bu sonuçlar bize, CYP1A1 antikoru ile reçineye bağlanan HepG2-HBX-CYP1A1'in hücre lizatında protein profilleri tespit edilemediğini gösterdi. İmmün çöktürme deneylerinden sonra, protein düzeyinde ifadeyi teyit etmek amacıyla yapılan western blot analizlerinde, protein bantları çıkmadığı için CYP1A1'in protein düzeyinde ifadesinin olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar bize, HBV aracılı insan karaciğer kanseri hücresinde (HepG2) CYP1A1 ve HBX proteinleri arasında, protein-protein etkileşimlerinin olmadığını göstermiştir.

Ayrıca HepG2-HBX hücrelerine RELA geni aktararak yapılan deneylerde, NF- κ B RELA geninin mRNA düzeyinde ekspresyonunun artışı PZR analizleri ile belirlenmiştir. Bu sonuçlar bize RELA geninin HepG2-HBX hücresine aktarıldığını ve transfeksiyon verimliliğinin %15 ve %30 olduğunu göstermiştir. Yapılan hücre canlılığı (WST) sonuçlarında, NF- κ B (RELA) geninin HepG2-HBX hücresine zararlı etki etmediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar Şekil 3.21'de gösterilmiştir.

Elde edilen PZR analizi sonuçlarına göre, HBV aracılı insan karaciğer kanser hücresinde RELA geninin mRNA düzeyinde ifade edildiği belirlenmiştir.



Şekil 3. 21. RELA gen ifadesinin HepG2-HBX hücresinde WST metodu ile belirlenmesi.

Hücre canlılığı (WST) sonuçlarında, RelA geninin HepG2-HBX hücrelerinin canlılığına zararlı etki göstermemiştir ve hücrelerin canlılığı ile bağdaştığı gözlenmiştir.

RelA geninin, HBV aracılı hepatoselüler karsinomda ifade edildiği ve bu hücrelerde zararlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak yapılan çalışmada Hepatit B virüsünün karaciğer kanseri oluşumundaki moleküler mekanizmasında HBX ve CYP1A1 proteinleri arasında etkileşimlerin olup olmadığı saptanmaya çalışıldı. CYP1A1'in, HBX geni üzerine etkileri ilk kez rapor edildi.

Hücrelerde artan bir toksisite tespit edilmemiş olması, EROD düzeyinin düşük olması ve CYP1A1 protein düzeyinin neredeyse tayin edilemeyecek düzeyde olması Hepatit B bazlı hepatokarsinogenez oluşumunun moleküler mekanizmasında HBX proteini ile CYP1A1 arasında bir etkileşim olmadığını doğrular niteliktedir. Kesin sonuçlara ulaşmak için yapılan immun çöktürme deneyleri de bu bulguları destekledi. Elde edilen bulgular HBV aracılı insan karaciğer kanser hücre hattında (HepG2), CYP1A1 ve HBX proteini arasında protein-protein etkileşimlerinin olmadığını gösterdi.

KAYNAKLAR

- [1] **Beasley R.P., Hwang L.Y.**, Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: *Viral Hepatitis and Liver Disease* (1984). GN Vyas, JL Dienstag, and JH Hoofnagle, Eds. Grune & Stratton, Inc., New York. pp. 209-224.
- [2] **Chenn C.J., Yu M.W., Liaw Y.F.**, Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma (1997). *Journal Gastroenterol Hepatol*, 12, 294-308.
- [3] **Feitelson M.A., Zhu M., Duan L.X., London W.T.**, Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma (1993). *Oncogene*, 8, 1109-1117.
- [4] **Fertelson M.A., Lega L., Duan L.X., Clayton M.**, Characteristics of woodchuck hepatitis X antigen in the livers and sera from chronically infected animals (1993). *J Hepatol*, 17, S24-S34.
- [5] **Anzola M.**, Hepatocellular Carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis (2003). *Journal of Viral Hepatitis*, 11, 383-393.
- [6] **Arbuthnot P., Kew M.**, Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma (2001). *Int J Exp Pathol*, 82, 77-100.
- [7] **Caselmann W.H.**, Transactivation of cellular gene expression by hepatitis B viral proteins: a possible molecular mechanism of hepatocarcinogenesis (1995), *J Hepatol*, 22, 34-37.
- [8] **Qadri K., Maguire H.F., Siddiqui A.**, Hepatitis B virus trans-activator protein X interacts with the TATA-binding protein, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 1003-1007, (1995). **Seeger, C.; Mason, W.S.** Hepatitis B virus biology (2000). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 51–68.

- [9] **GC Shin, SH Ahn, HS Choi, KH Lim, DY Choi, KP Kim, KH Kim,** Hepatocystin/80KH Inhibits replication of hepatitis B virus through interaction with HBX protein in hepatoma cell (2013). *Biochim Biophys Acta.* 1569-1581
- [10] **Ganem D, Prince AM:** Hepatitis B virus infection – natural history and clinical consequences (2004). *New England Journal of Medicine,* 350:1118-1129
- [11] **Dejean A, Sonigo P, Wain-Hobson S,** Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11 base pair direct repeat (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* Vol.81, 53-50 53-54.
- [12] **Natoli G., Avantaggiati M.L., Chirillo P., Costanzo A., Artini M., Balsano C., Levrero M.,** Induction of the DNA binding activity of c-Jun/c-Fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator Px (1994). *Mol Cell Biol,* 14, 989-998.
- [13] **Feitelson, M.A.; Lee, J.** Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis (2007). *Canc. Lett.,* 252, 157–170.
- [14] **Doria M, Klein N, Lucito R.,** The Hepatitis B Virus HBX proteins is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors (1995). *EMBO Journal;* 14: 4747-4757.
- [15] **Haviv I., Vaizel D., Shaul Y.,** The X protein of hepatitis B virus coactivates potent activation domains (1995). *Mol Cell Biol,* 15, 1079-1085.
- [16] **Seto E, Mitchell PJ, Yen TS:** Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature* (1990), 344:72–4
- [17] **Qadri I, Fatima K, Abde LHH.** Hepatitis B virus X protein impedes the DNA repair via its association with transcription factor, TFIID (2011). *BMC Microbiol;*11:48
- [18] **Henkler F., Koshy R.,** Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis (1996). *J Viral Hepat,* 3, 109-121
- [19] **Maguire H.F., Hoeffler J.P., Siddiqui A.** HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions (1991). *Science,* 252, 842-844.
- [20] **Heidelberger C.** Current trends in chemical carcinogenesis (1973). *Fed Proc.* 32(12):2154-61).
- [21] **Koike K., Moriya K., Iino S., Yotsuyanagi H., Endo Y., Miyamura T., Kurokawa K.,** Highlevel expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice (1994). *Hepatology,* 19, 810-819.
- [22] **Rawat S, Clippinger Amy, Bouchard M.,,** Modulation of Apoptotic Signaling by the Hepatitis B Virus X Protein (2012). *Viruses.* 2945-2972.
- [23] **Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, De Marzio E, Will H.,** Full length and truncated versions of the Hepatitis B virus X Proteins transactivate the cmyc protooncogene at the transcription level (1991). *Biochem Biophys Res Commun.* 985-92.
- [24] **Chieochansin T., Chutimitkul S., Payungporn S., Theamboonlers A.,** Rapid detection of lamivudine resistant hepatitis B virus mutations by PCR based methods (2006). *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* Vol. 210.

- [25] **Benn J., Schneider R.J.**, Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls (1995). *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 11215-11219.
- [26] **Cheong J.H., Yi M., Lin Y., Murakami S.**, Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation (1995). *EMBO J*, 14, 142-150
- [27] **Beasley R.P.**, Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* (1988). 61, 1942-1956.
- [28] **Paterlini P., Poussin K., Kew M., Franco D., Brechot C.**, Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma (1995). *Hepatology*, 21, 313-321.
- [29] **Haviv I., Vaizel D., Shaul Y.**, pX, the HBV-encoded coactivator, interacts with components of the transcription machinery and stimulates transcription in a TAF-independent manner (1996). *EMBO J*, 15, 3413-3420.
- [30] **Tank X, Liu D, Shishodia S, Ozburn N, Behrens C et.all.**, Nuclear Faktor Kappa B is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions (2006). *Cancer*. 107, 2637-2646.
- [31] **Su Fei and J. Schneider Robert.**, Hepatitis B Virus HBX protein activates transcription factor NF- κ B by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of Rel-Related proteins (1996). *Journal of Virology*. 4558-4566.
- [32] **Chirillo P, Falco M, Puri P.L, Artini M, et.all.**, Hepatitis B Virus X activates NF- κ B dependent transcription through a Raf independent pathway (1996). *J. Virol*. 70, 641-646.
- [33] **Hong A, Han DD, Wright CJ, Burch T, Piper J, et al.** The interaction between hepatitis B virus X protein and AIB1 oncogene is required for the activation of NF κ B signal transduction (2012). *Biochem Biophys Res Commun* 423: 6–12
- [34] **Abdula D, Goralski K. B, Del Busto Cano E.G, Renton K. W.**, The signal transduction pathways involved in hepatic cytochrome P450 regulation in the rat during a lipopolisaccharide induced model of central nervous system inflammation. *During Metab. Dispos* (2005). 1521-31.
- [35] **Barouki R, Morel Y.**, Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications (2001). *Biochem Pharmacol.*, 61(5):511-6.
- [36] **Arinç E. and Philpot R.M.** Preparation And Properties Of Partialiy Purified Pulmonary Cytochrome P-450 From Rabbits (1976). *J. Biol. Chem.*, 251:3213-3220.
- [37] **Conney AH, Burns JJ.** Metabolic interactions among environmental chemicals and drugs (1972). *Science* 178(61):576-86.
- [38] **Klotz U., Ammon, E.** Clinical and toxicological consequences of the inductive potential of ethanol (1998). *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 54, 7-12
- [39] **Lieber C.S.**, Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): The first 30 years 1968-1998)- A Review. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 23, 991-1007, (1999).

- [40] **Burke M., and Mayer, R.** Ethoxyresorufin: directfluometric assay of a microsomal Odealkylation which is preferentially inducible by 3-methylchloranthrene (1974). *Drug Metab Dispos* 2:583–588.
- [41] **Gelboin HV.** Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes (1980). *Physiol Rev.* 60(4):1107-66.
- [42] **Hahn ME, Stegeman JJ.** Regulation of cytochrome P4501A1 in teleosts: sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the marine fish *Stenotomus chrysops* (1994). *Toxicol Appl Pharmacol.* 127(2):187-98.
- [43] **Ma Q, Lu AY:** CYP1A1 induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies (2007). *Drug Metab Dispos;* 35: 1009-1016.
- [44] **Oleksiak M. F., Wu, S., Parker, Qu, W., Cox, R., Zeldin, D. C., and Stegeman, J. J.** Identification and regulation of a new vertebrate cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ps, and functional characterization of CYP2P3, a conserved arachidonic acid epoxygenase/19-hydroxylase (2002). *Arch. Biochem. Biophys.*, 411(2): 223-234.
- [45] **Mclemore T.L., Adelberg, S., Liu, M.C., McMahon, N.A., Yu, S.J., Hubbard, W.C., Czerwinski, M., Wood, T.G., Storeng, R., Lubet, R.A., et al.** Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas (1990). *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1333-1339.
- [46] **Marchand A, Barouki R, Garlatti M** Regulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity (2004). *Mol Pharmacol.* 65(4):1029-37.
- [47] **Zordoky Beshay NM., El-Kadi Ayman O.S.** Role of NF-Kb in the Regulation of Cytochrome P450 Enzymes (2009). *Current Drug Metabolism* 10, 164-178.
- [48] **Sivaraman L., Leatham, M.P., Yee, J., Wilkens, L.R., Lau, A.F., Le Marchand, L.** CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer (1994). *Cancer Res.* 54:3692-3695.
- [49] **Porter T. D., and Coon M. J.** Cytochrome P450, Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms (1991). *J. Biol. Chem.*, 266(2 1):13469-13472.
- [50] **Whitlock JP Jr, Okino ST, Dong L, Ko HP, Clarke-Katzenberg R, Ma Q, Li H** Cytochromes P450 5: induction of cytochrome P4501A1: a model

for analyzing mammalian gene transcription (1996). *ReviewFASEB J.* 10(8): 809-818.

- [51] **Fertelson M.A., Duan L.X.**, Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma (1997). *The American Journal of Pathology*, 150, 1141-1157.
- [52] **Henkler F, Hoare J, Waseem N, Goldin RD, McGarvey MJ, Koshy R, King IA:** Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein (2001). *J Gen Virol*, 82:871–82
- [53] **Sun W, Zhong F, Zhi L, Zhou G, He F.** Systematic-omics analysis of HBV-associated liver diseases (2009). *Cancer Lett*;286:89–95
- [54] **Diamantis I.D., McGandy C.E., Chen T.J., Liaw Y.F., Gudat F., Bianchi L.**, Hepatitis B X gene expression in hepatocellular carcinoma (1992). *J Hepatol*, 15, 400-403.
- [55] **C.M. Kim, K. Koike, I. Saito, T. Miyamura, G. Jay,** HBX gene of Hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. (1991). *Nature* 351 317–320.
- [56] **C. H. Yang and M. Cho.,** Hepatitis B Virus gene differentially modulates cell cycle progression and apoptotic protein expression in hepatocyte versus hepatoma cell lines (2012). *Journal of Viral Hepatitis*.
- [57] **D.L. Zheng, L. Zhang, N. Cheng, X. Xu, Q. Deng, X.M. Teng, K.S. Wang, X. Zhang, J. Huang, Z.G. Han,** Epigenetic modification induced by hepatitis virus X protein via interaction with de nova DNA methyltransferase DNMT3A. *Journal of Hepatology* 50 (2009) 377–387
- [58] **Elmore L.W., Hancock A.R., Chang S.F., Wang X.W., Chang S., Callahan C.P., Geller D.A., Will H., Harris C.C.** Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis (1997). *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 14707-14712.
- [59] **Benn J., Schneider R.J.,** HBV X protein activates ras-GTP complex formation and establishes a ras, raf, MAP kinase signaling cascade (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10350-10354
- [60] **Gottlob K., Fulco M., Levrero M., Graessmann A.,** The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity (1998). *J Biol Chem*, 273, 33347-33353).
- [61] **Suzuki T, Yano H, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M:** Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: a possible participation of betacatenin in the dedifferentiation process. *J Gastroenterol Hepatol* 2002, 17:994–1000
- [62] **Luber B., Arnold N., Sturzl M., Hohne M., Schirmacher P., Lauer U., Wienberg J., Hofschneider P.H., Kekule A.S.,** Hepatoma-derived integrated HBV DNA causes multi-stage transformation in vitro (1996). *Oncogene*, 12, 1597-1608.

- [63] **A. Hong, D.D. Han, C.J. Wright, T. Burch, J. Piper, C. Osioy, C. Gao, S. Chiang, T. Magill, K. Dick, T.F. Booth, X. Li, R. He,** The interaction between hepatitis B virus X protein and AIB1 oncogene is required for the activation of NF κ B signal transduction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423 (2012) 6–12.
- [64] **Kim SY, Kim JC, Kim JK, Kim HJ, Lee HM, et al.** Hepatitis B virus X protein enhances NF κ B activity through cooperating with VBP1 (2008). *BMB Rep* 41: 158–163
- [65] **Lucito R., Schneider R.J.,** Hepatitis B virus protein activates transcription factor NF- κ B without a requirement for protein kinase C (1992). *J Virol*, 66, 983-991.
- [66] **C. Seeger, WS. Mason,** Hepatitis B Virus Biology (2000). *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 51-68.
- [67] **Didonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S, Karin M.,** Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation (1996). *Mol. Cell Biol.* 16, 1295-1304.
- [68] **Maeda S, Kamata H, Luo L, Leffert H, Karin M.,** IKK Beta couples hepatocyte death to cytokine driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis (2005). *Cell.* 121, 977-990.
- [69] **Gish RG, Locarnini S.** Genotyping and genomic sequencing in clinical practice. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 761-795.
- [70] **Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M:** Role of human cytochrome P450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects (1998). *Chem Res Toxicol* 4: 168-179.
- [71] **Hohne M., Schaefer S., Seifer M., Feitelson M.A., Paul D., Gerlich W.H.,** Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA (1990). *EMBO J*, 9, 1137-1145.
- [72] **Jefcoate C.R., Liehr, J.G., Santen, R.J., Sutter, T.R., Yager, J.D., Yue, W., Santner, S.J., Katayama K., Hayashi N., Sasaki Y., Kasahara A., Ueda K., Fusamoto H., Sato N., Chisaka O., Matsubara K., Kamada T.,** Detection of hepatitis B virus X gene protein and antibody in type B chronic liver disease (1989). *Gastroenterology*, 97, 990-998.
- [73] **Kim H., Lee H., Yun Y.,** X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells (1998). *J Biol Chem*, 273, 381-385.
- [74] **Lee T.H., Elledge S.J., Butel J.S.,** Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein (1995). *J Virol*, 69, 1107-1114.
- [75] **Lee Y.H., Yun Y.,** HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling (1998). *J Biol Chem*, 273, 25510-25515.
- [76] **Lian Z., Pan J., Liu J., Zhu M., Arbuthnot P., Kew M.C., Feitelson M.A.,** The translation initiation factor, SUI1, may be a target of hepatitis B x antigen in hepatocarcinogenesis (1999). *Oncogene*, 18, 1677-1687.
- [77] **Lucifora, S. Arzberger, D. Durantel, L. Belloni, M. Strubin, M. Levrero, F. Zoulim, O. Hantz, U. Protzer,** Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection (2001), *J. Hepatol.* 55 996-1003.
- [78] **Matsubara K., Tokino T.,** Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis (1990). *Mol Biol Med*, 7, 243-260.
- [79] **Sen R, Baltimore D.,** Multiple nuclear factors interacts with the immunoglobulin enhancer sequences (1986). *Cell.* 46: 705-16.

- [80] **Sun B.S., Zhu X., Clayton M.M., Pan J., Feitelson M.A.**, Identification and preliminary characterization of a protein involved in cellular senescence which binds to hepatitis B virus X antigen (1998). *Hepatology*, 27, 228-239.
- [81] **Sung WK, Lu Y, Lee CW, Zhang D, Ronaghi M, Lee CG.** Deregulated direct targets of the hepatitis B virus (HBV) protein, HBx, identified through chromatin immunoprecipitation and expression microarray profiling (2009). *J Biol Chem*;284:21941–54.
- [82] **S.Y. Sohn, S.B. Kim, J. Kim, B.Y. Ahn**, Negative regulation of hepatitis B virus replication by cellular Hsp40/DnaJ proteins through destabilization of viral core and X proteins (2006), *J. Gen. Virol.* 87 1883–1891.
- [83] **Tanaka Y, Kanai F, Ichimura T, Tateishi K, Asaoka Y, Guleng B, et al.** The hepatitis B virus X protein enhances AP-1 activation through interaction with Jab1 (2006). *Oncogene*;25:633–42.
- [84] **Tekmal, R., Demers, L., Pauley, R., Naftolin, F., Mor, G., Berstein, L.** Tissuespecific synthesis and oxidative metabolism of estrogens (2000). *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*95-112
- [85] **Ueda H., Ullrich S.J., Gangemi J.D., Kappel C.A., Ngo L., Feitelson M.A., Jay G.**, Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer (1995). *Nat Genet*, 9, 41-47.
- [86] **Ustaçelebi Ş, Ergünay K.** Hepatit B virusunun moleküler virolojisi. Ed: Tabak F, Balık İ, Tekeli E. Viral Hepatit 2007. 1. baskı. İstanbul: Ohan Matbaası, 2007: 96-107.
- [87] **Wang W., London W.T., Feitelson M.A.**, Hepatitis B x antigen in hepatitis B virus carrier patients with liver cancer (1991). *Cancer Res*, 51, 4971-4977.
- [88] **Wang W., London W.T., Lega L., Feitelson M.A.**, Hepatitis B x antigen in liver from carrier patients with chronic hepatitis and cirrhosis (1991). *Hepatology*, 14, 29-37.
- [89] **Y.J. Tan.**, Hepatitis B virus infection and the risk of hepatocellular carcinoma (2011). *World J. Gastroenterol.* 4853-4857.
- [90] **Yun C, Um HR, Jin YH, Wang JH, Lee MO, et al.** NF-kappaB activation by hepatitis B virus X (HBx) protein shifts the cellular fate toward survival (2002). *Cancer Lett* 184: 97–104.
- [91] **Zhang Z, Torii N, Furusaka A, Malayaman N, Hu Z, Liang TJ.** Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex (2000). *J Biol Chem*;275:15157–65

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tuğba KOÇ
Doğum Tarihi: : 01.02.1987
Yazışma Adresi : Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü 20070 Denizli, Türkiye
Tel : 0555 670 0457
E-mail : tugbakoc20@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Yüksek Lisans (2011-2013) :Biyoloji Anabilim Dalı, Pamukkale Üniversitesi
Lisans (2006-2010) :Biyoloji Bölümü, Pamukkale Üniversitesi

Lisans Bitirme Tezi ve Tez Danışmanı

“Tavşan Karaciğer Mikrozomlarında HMG-CoA Redüktaz Aktivitesi Tayini’ Bitirme Tezi” Prof.Dr. Alaattin ŞEN,PAÜ, Denizli, 2010

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı

“Hepatit B X Proteinin Ksenobiyotik Metabolizmasında Rol Oynayan CYP1A1 Üzerine Etkilerinin Araştırılması’ Yüksek Lisans Tezi” Prof. Dr. Alaattin ŞEN, Fen Bilimleri Enstitüsü, PAÜ, Denizli, 2011-2012.

Yayınlar

Yavuz Dodurga, Gulsah Gundogdu, **Tugba Koc**, G. Nilufer Yonguc, Vural Kucukatay, N. Lale Satiroglu-Tufan. Expressions of URG4/URGCP, Cyclin D1, Bcl-2, and Bax Genes In Retinoic Acid Treated SHSY5Y Human Neuroblastoma Cells. 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Temmuz 14-18, 2012.

Özeti Basılanlar (Ulusal ve Uluslar Arası)

1. Gürbüz H., **Koç, T.**, Ozgün O., Arslan Ş., ve **Şen, A.** (2010) Yakıotu (*Epilobium hirsutum*) ve Ökseotu (*Viscum album*)’ndan Elde Edilen Ekstreler ile Ellajik Asit ve Sınnamik Asitin Muhtemel HMG-KoA İnhibitör Etkileri; 20. Ulusal Biyoloji Kongresi 21-25 Haziran, Denizli, syf: 234

2. **Koç T**, Gürbüz H, Ozgün O., Arslan Ş., ve Şen, A. (2010) Tavşan Karaciğer Mikrozomlarında Yakıotu (*Epilobium hirsutum*) ve Ökseotu (*Viscum album*)'ndan Elde Edilen Ekstreler ile Ellajik Asit ve Sınnamik Asitin Muhtemel HMG-KoA İnhibitör Etkileri; 17. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Ankara.
3. Travel Grants (Federation of European Neuroscience Society Travel Grants-FENS), Yavuz Dodurga, Gulsah Gundogdu, **Tugba Koc**, G. Nilufer Yonguc, Vural Kucukatay, N. Lale Satiroglu-Tufan. Expressions of URG4/URGCP, Cyclin D1, Bcl-2, and Bax Genes In Retinoic Acid Treated SHSY5Y Human Neuroblastoma Cells. 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, July 14-18,
4. Yavuz Dodurga, Gulsah Gundogdu, Volkan Tekin, **Tugba Koc**, N. Lale Satiroglu-Tufan, Gülseren Bağcı, Vural Kucukatay. Sülfıt Molekülünün SHSY5Y Nöroblastom Hücrelerinde URG4/URGCP, CCND1 ve Bcl-2 Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi, 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 28 Nisan-1 Mayıs 2013, İzmir
5. Yavuz Dodurga, Gulsah Gundogdu, Volkan Tekin, **Tugba Koc**, N. Lale Satiroglu-Tufan, Gülseren Bağcı, Vural Kucukatay. Valproik Asit SHSY5Y Nöroblastom Kanser Hücrelerinin Çoğalmasını URG4/URGCP Ve CCND1 Üzerinden İnhibe Eder, 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 28 Nisan-1 Mayıs 2013, İzmir
6. **Poster Bildiri Ödülü (Birincilik)** Yavuz Dodurga, Gulsah Gundogdu, Volkan Tekin, **Tugba Koc**, N. Lale Satiroglu-Tufan, Gülseren Bağcı, Vural Kucukatay. Valproik Asit SHSY5Y Nöroblastom Kanser Hücrelerinin Çoğalmasını URG4/URGCP Ve CCND1 Üzerinden İnhibe Eder, 11. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 28 Nisan-1 Mayıs 2013, İzmir