

TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELÜLER KARSİNOM GELİŞİMİNDE
TİYOREDOKSİN ETKİLEŞİMLİ PROTEİN
(TXNIP)'İN ROLÜ**

AYŞİM GÖZÜKIZIL

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2010

DEU.HSI. MSc-2007970128

TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELÜLER KARSİNOM GELİŞİMİNDE
TİYOREDOKSİN ETKİLEŞİMLİ PROTEİN
(TXNIP)'İN ROLÜ**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

AYŞİM GÖZÜKIZIL

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Neşe Atabey

DEU.HSI. MSc-2007970128

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Prof Dr. Neşe Atabey'in danışmanı olduğu Ayşim Gözükızıl tarafından gerçekleştirilen "Hepatoselüler Karsinom Gelişiminde Tiyoredoksin Etkileşimli Protein (TXNIP)'in Rolü" isimli bu tez 11.06.2010 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Neşe ATABEY
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Meral Sakızlı
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Gülgün Oktay
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof Dr. Funda Yılmaz
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Esra Erdal
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi.....	6
Şekil Listesi.....	7
Kısaltmalar.....	9
Teşekkür.....	11
ÖZET.....	12
ABSTRACT.....	14
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	16
2. GENEL BİLGİLER.....	18
2.1 Hepatoselüler karsinom.....	18
2.2 Karaciğerde hepatokarsinogenez sürecinde oksidatif stresin rolü.....	21
2.3 Oksidatif stres ve Tiyoredoksin etkileşimli protein (TXNIP).....	25
2.4 TXNIP'in genel özellikleri.....	27
2.5 TXNIP'in kanser sürecindeki rolü.....	32
2.6 HGF/cMET sinyal ileti yolağı ve oksidatif stres sürecindeki rolü.....	33
2.7 Heparin ve oksidatif stresteeki rolü.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1 Hücre kültürü.....	41
3.2 Hücre sayımı ve canlılık testi.....	41
3.3 Heparin uygulaması.....	42
3.4 HGF uygulaması.....	42
3.5 Hipoksi uygulaması.....	42
3.6 Glukoz Uygulaması.....	42
3.7 Gen transkripsiyonlarındaki Değişimin RT-PCR ile incelenmesi.....	43
3.7.1 Total RNA izolasyonu:.....	43
3.7.2 RNA miktarının Ölçümü:.....	44
3.7.3. cDNA sentezi.....	44
3.7.4. cDNA Kalıplarından Spesifik Primerler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	45
3.7.5 RT-PCR ile elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ve görüntülenmesi.....	46
3.8 Gen ekspresyonlarındaki değişimin incelenmesi: "Western blot".....	47
3.8.1 Total protein izolasyonu:.....	47
3.8.2 Protein Miktarlarının Belirlenmesi:.....	48
3.8.3 Proteinlerin SDS-PAGE polikrilamid jelde yürütülmesi.....	48
3.8.4 Poliakrilamid Jelde Yürütülen Proteinlerin PVDF Membranlara Transferi ve membranın bloklanması.....	49
3.8.4.1. Proteinlerin membrana transferi:.....	49
3.8.4.2. Blotlama:.....	50

3.8.4.3 Primer ve sekonder Antikorlar:.....	50
3.8.4.4 Proteinlerin membran üzerinde saptanması	50
3.8.4.5 Commasie Mavisi Boyaması	51
3.9 TXNIP transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi	51
3.9.1 Lusiferaz reporter assay.....	51
3.9.1.1 Transformasyon:	51
3.9.1.2 Miniprep plazmid DNA izolasyonu:	52
3.9.1.3 Restriksiyon enzim kesimi:	53
3.9.1.4 Maksiprep plazmid DNA izolasyonu	53
3.9.1.5 Transfeksiyon:.....	54
3.9.1.6 Lusiferaz ölçümü:.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. Mikrodizin ile tanımlanan TXNIP transkripsiyon değişiminin RT-PCR ile doğrulanması.....	56
4.2 Heparin veya HGF uygulamasının TXNIP ekspresyonuna etkisi.....	56
4.2.1 Heparin uygulamasının TXNIP ekspresyonuna etkisi.....	56
4.2.1.1 Heparin dozunun etkisi TXNIP ekspresyonuna etkisi.....	57
4.2.1.2. Heparin uygulamasından sonra geçen sürenin TXNIP transkripsiyonuna etkisi	58
4.2.2 HGF uygulamasının TXNIP transkripsiyonuna etkisi.....	58
4.2.2.1-HGF' nin farklı dozlarının TXNIP transkripsiyonuna etkisi	58
4.2.2.2 HGF uygulamasından sonra geçen sürenin TXNIP transkripsiyonuna etkisi.....	59
4.3. Heparin ve HGF nin bir arada uygulanmasının TXNIP ekspresyonuna etkisi	59
4.4 cMet aktivasyonunun veya inhibisyonunun TXNIP ekspresyonuna etkisi.....	61
4.5 cMET' in altındaki sinyal moleküllerinin TXNIP ile olan ilişkisi	62
4.5 Heparinin bazal ve HGF tarafından uyarılan cMet fosforilasyonuna etkisi	63
4.6 Farklı HCC Hücre dizilerinde TXNIP ekspresyon düzeylerinin incelenmesi	72
5. TARTIŞMA.....	74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	81
KAYNAKLAR	83
Ek 1	94
Ek 2.	99

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. cDNA sentezinde kullanılan malzemeler ve konsantrasyonları.....	45
Tablo 2. RT-PCR’da kullanılan spesifik primerler.....	45
Tablo 3. RT-PCR‘ da kullanılan primerler ve optimum çalışma koşulları.....	46
Tablo 4. Poliakrilamid jel içeriği.....	48
Tablo 5. HCC hücre dizileri ve diferansiyasyon durumlarını tayin eden belirteçler.....	73
Tablo 6. PBS içeriği.....	94
Tablo 7. cDNA sentezi reaksiyon tamponu içeriği.....	94
Tablo 8. Tris-Asetat EDTA içeriği.....	95
Tablo 9. Western blottingde kullanılan antikorlar.....	95
Tablo 10. Comassie mavisi boyama ve boya uzaklaştırıcı solüsyon içerikleri.....	96
Tablo 11. Miniprep plazmid DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonlar ve içerikleri..	98

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Hepatoselüler karsinom gelişiminde rol oynayan etiyolojik faktörler.....	19
Şekil 2. HCC’de histopatolojik gelişim ve moleküler değişiklikler.....	20
Şekil 3. HS5A protein aracılıklı oksidatif stresin tetiklenmesi.....	21
Şekil 4. HCV enfeksiyonu ve oksidatif stres arasındaki ilişki.....	22
Şekil 5. Normal süreçte kan glukozunun kontrolü.....	23
Şekil 6. Hepatosit hasarı.....	24
Şekil 7. TXNIP’in karaciğer yağlanmasıdaki rolü.....	26
Şekil 8. TXNIP’in 1. kromozom üzerindeki yerleşimi.....	28
Şekil 9. TXNIP’in yer aldığı biyolojik süreçler.....	28
Şekil 10. Tiyoredoksin ve hücrel redoks dengesinin kontrolü.....	29
Şekil 11. TXNIP ile apoptoz arasındaki ilişki.....	29
Şekil 12. TXNIP’in glukoz metabolizması üzerine olan etkisi.....	30
Şekil 13.A. TXNIP promotöründe yerleşim gösteren iki E-kutusu karbohidrat yanıt elemanı.....	30
B. Karbonhidrat yanıt elemanı birçok canlı türünde korunmuştur.	
Şekil 14. Glukoz uyarımına bağlı olarak ChREBP ve MIX kompleksi TXNIP’in promotöründeki ChoRE’ye bağlanmakta, histon asetil transferaz aktivitesi ile TXNIP ifadesi artmaktadır.....	31
Şekil 15. MET tirozin kinaz.....	34
Şekil 16. HGF/SF yapısal görünümü.....	35
Şekil 17. HGF/SF’nin alt sinyal molekülleri ile etkileşimi.....	35
Şekil 18. ROS’ların hücre sağ kalım ve ölüm yanıtlarını düzenleyen sinyal ileti yolları üzerine olan etkisi.....	36
Şekil 19. A) HSPG’ların ligandı aktif konformasyonda tutuyor. Ligand reseptör bağlanması ile gerçekleşen biyolojik yanıtı sağlıyor. B) Hücre içerisine alınan ligandın katabolik yolla yıkımına aracılık ediyor.....	37
Şekil 20. Öncül heparan disakkaridinden olgun HS yapısının oluşması.....	38
Şekil 21. Oksidatif stres artışına bağlı olarak gelişen biyolojik süreçler ve Heparinin etkisi.....	40
Şekil 22. Hemositometrik olarak hücre sayımı.....	41
Şekil 23. Gen transkripsiyonlarındaki Değişimin RT-PCR ile incelenmesi.....	43
Şekil 24. Gen ekspresyonlarındaki değişimin incelenmesi: ‘Western blot’.....	47
Şekil 25. Membran, Jel ve Watmann kağıtlarından oluşan sandviç.....	49
Şekil 26. TXNIP promotörünün farklı uzunluklardaki yabanıl ve mutant formları.....	51
Şekil 27. pGL3 lusiferaz reporter vektörü.....	53
Şekil 28. Heparin ve HGF uygulamasının TXNIP transkripsiyonuna olan etkisi.....	56

Şekil 29. Farklı heparin dozlarının TXNIP transkripsiyonuna etkisi.....	57
Şekil 30. Farklı heparin dozlarının TXNIP ekspresyonuna etkisi.....	57
Şekil 31. Heparin uyarımından sonra geçen sürenin TXNIP transkripsiyonuna olan etkisi.....	58
Şekil 32. Doz bağımlı HGF uygulamasının TXNIP transkripsiyonu üzerine olan etkisi.....	58
Şekil 33. HGF uygulamasından sonra geçen sürenin TXNIP transkripsiyonuna etkisi.....	59
Şekil 34. Heparin ile HGF nin birlikte kullanımının TXNIP transkripsiyonuna etkisi.....	59
Şekil 35. Heparin ve HGF nin birlikte uygulanmasının TXNIP ekspresyonuna etkisi.....	60
Şekil 36. cMet yolağının HGF tarafından aktivasyonunun veya cMet inhibitörü Su11274 tarafından baskılanmasının TXNIP ekspresyonuna etkisi.....	61
Şekil 37. cMET inhibisyonunun alt sinyal molekül elemanları üzerine olan etkisi.....	62
Şekil 38. Doz bağımlı heparin uygulamasının cMet fosforilasyonu üzerine olan etkisi.....	63
Şekil 39. Heparinin cMET'in alt sinyal molekülleri üzerine olan etkisi.....	64
Şekil 40. Heparin ve HGF'nin birlikte olması durumunda TXNIP ve alt sinyal moleküllerinin değişimi.....	65
Şekil 41. Glukoz uyarımının ChoRE aracılıklı TXNIP transkripsiyonel aktivitesi üzerine olan etkisi.....	66
Şekil 42. Heparin uyarımının ChoRE aracılıklı TXNIP transkripsiyonel aktivitesi üzerine olan etkisi.....	67
Şekil 43. Heparinin TXNIP ve alt sinyal molekülleri üzerine olan etkisi	68
Şekil 44. Heparinin TXNIP transkripsiyonel aktivitesi üzerine olan etkisi	69
Şekil 45. HGF'nin TXNIP ve alt sinyal molekülleri üzerine olan etkisi	70
Şekil 46. HGF ve Heparin birlikte iken TXNIP ekspresyonundaki değişim.....	71
Şekil 47. HCC hücre dizilerinde TXNIP'in mRNA düzeyi.....	72
Şekil 48. HCC hücre dizilerinde TXNIP'in protein düzeyi.....	73
Şekil 49. Doz ve zaman bağımlı glukoz uyarımının TXNIP transkripsiyonuna olan etkisi.....	99
Şekil 50. Glukoz uyarımına bağlı olarak HIF1 α , VEGF, cMET, GLUT-2 transkripsiyonlarındaki değişim.....	100
Şekil 51. Zamana bağımlı hipoksik stres koşullarının TXNIP transkripsiyonuna olan etkisi.....	101
Şekil 52. Hipoksik stres uygulamasının GLUT2, HIF1 α , cMet, VEGF transkripsiyonlarına olan etkisi.....	101
Şekil 53. Doz bağımlı heparin uygulamasının GLUT2, HIF1 α , cMet, VEGF transkripsiyonlarına olan etkisi.....	102

KISALTMALAR

- AFP:** Alfa Fetoprotein (Alpha-feto protein)
- AP-1:** Aktivatör protein-1 (activator protein-1)
- ASK-1:** Apoptosis signal-regulating kinase 1
- BSA:** Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin)
- BCA:** Bi-sinkronik Asit (Bi-cincronic acid)
- CDK:** Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin Dependent Kinase)
- ChoRE:** Karbohidrat yanıt elemanı (Carbohydrate response element)
- ERK:** Ekstrasellüler Olarak Düzenlenen Kinaz (Extracellular Regulated Kinase)
- FAK:** Fokal Adezyon Kinaz (Focal Adhesion Kinase)
- FBS:** Fötal Sığır Serumumu (Fetal Bovine Serum)
- FoxO1:** Forkhead box O1
- Grb2:**Büyüme Faktörü Reseptörü Bağlı Protein 2 (Growth-factor Reseptor Binding Protein 2)
- Gab1:** Grb2 ile ilişkili Bağlanma Proteini 1 (Grb2-associated binding protein 1)
- GLUT-2:** Glucose transporter-2
- HCC:** Hepatoselüler karsinom (Hepatocellular carcinoma)
- HBV:** Hepatit B virüsü
- HCV:** Hepatit C virüsü
- HGF/SF:** Hepatosit Büyüme Faktörü/Saçılım Faktörü (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor)
- HIF1 α :** Hipoksi ile uyarılabilir faktör 1 (Hypoxia inducible factor 1)
- IGF:** İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü (Insulin Like Growth Factor)
- JNK:** c-Jun N-terminal kinase
- MAPK:** Mitojen Aktive Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase)
- MMP:** Matris Metalloproteinaz (Matrix-Metalloproteinase)
- M-MuLV:** Moloney Murine Leukemia Virus
- NaF:** Sodyum Florid (Sodium Floride)
- NaCl:** Sodyum Klorid (Sodium Chloride)
- PBS:** Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffered Saline)
- PCR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
- PI3K:** Fosfatidil-inositol 3 Kinaz (Phosphatidyl-inositol 3 kinase)

ROS: Reaktif oksijen türü (Reactive oxygen species)
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat (Sodium Dodesyl Sulphate)
TGF: Transforme-edici Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)
TNF: Tümör Nekrozis Faktörü (Tumour Necrosis Factor)
TSG: Tümör baskılayıcı gen (Tumor supressor gene)
Na₃VO₄: Sodyum Orto-vanadat (Sodium Ortho-vanadate)
PMSF: Fenil-metil-sülfonil (Phenyl-methyl-sulphonyl)
PVDF: Poliviniliden Diflorid (Poly-vinylidene floride)
TERT: Telomerase Reverse Transcriptase
TG: Trigliserit (Triglyceride)
TRX: Tiyoredoksin (Thioredoxin)
TXNIP: Tiyoredoksin etkileşimli protein (Thioredoxin interacting protein)
VEGF: Vaskular Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
VLDL: Very low density lipoprotein (Çok düşük yoğunluklu lipoprotein)

TEŞEKKÜR

Yaşamak şakaya gelmez,
Büyük bir ciddiyetle yaşayacaksın
Bir sincap gibi mesela,
Yani, yaşamanın dışında ve ötesinde hiçbir şey beklemeden,
Yani bütün işin gücün yaşamak olacak

Yaşamayı ciddiye alacaksın,
Yani o derecede, öylesine ki,
Mesela, kolların bağlı arkadan, sırtın duvarda,
Yahut kocaman gözlüklerin,
Beyaz gömleğinle bir laboratuvarında
İnsanlar için ölebileceksin,
Hem de yüzünü bile görmediğin insanlar için,
Hem de hiç kimse seni buna zorlamamışken,
Hem de en güzel en gerçek şeyin
Yaşamak olduğunu bildiğin halde.

Yani, öylesine ciddiye alacaksın ki yaşamayı,
Yetmişinde bile, mesela, zeytin dikeceksin,
Hem de öyle çocuklara falan kalır diye değil,
Ölmekten korktuğun halde ölüme inanmadığın için,
Yaşamak yanı ağır bastığında..

Bu dünya soğuyacak,
Yıldızların arasında bir yıldız,
Hem de en ufaklarından,
Mavi kadifede bir yıldız zerresi yani,
Yani bu koskocaman dünyamız.
Şimdiden çekilecek acısı bunun,
duyulacak mahzunluğu şimdiden.
Böylesine sevilecek bu dünya
"Yaşadım" diyebilmen için...
1948-Nazım Hikmet Ran

Bu şiirin her bir satırı gibi benimde güçlü kalmayı ve bilimsel düşünmeyi öğrenmemde büyük emeği olan başta danışmanlarım Prof Dr. Neşe Atabey ve Doç Dr. Esra Erdal'a laboratuvarındaki dostluk, sevgi ve bilimsel paylaşımları için Peyda Korhan, İmge Kunter, Emine Çelik, Sanem Tercan Avcı, Soheil Akbari, Evin Özen ve Aslı Toylu'ya, maddi, manevi destekleri için aileme,

Ve tüm varlığı ile var olmamı sağlayan Baran Günküt'a teşekkürü bir borç biliyorum.

Hepatoselüler karsinom gelişiminde Tiyoredoksin etkileşimli protein (TXNIP)'in rolü

Ayşim Gözükızıl, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Inciraltı-İzmir, Türkiye, a.gkizil@hotmail.com

ÖZET

Hepatoselüler karsinom sirotik karaciğer zemininde gelişmektedir. Süreçte oksidatif stresin sebep olduğu hepatosit hasarı, kronik inflamasyon ve hücre ölümü önemlidir. Bir çok büyüme faktörü ve sinyal ileti yolağı ise stres ortamına yanıt olarak aktive olmakta ve hücrelerin daha hareketli, daha invazif karakter kazanmasını sağlamaktadır.

Hepatositlerin büyüme, çoğalma ve farklılaşmasında önemli rol oynayan HGF/cMET sinyal ileti yolağı aktive olan yolaklardan bir tanesidir. Oksidatif stres hasarına karşı koruyucu rolü de tanımlanmıştır. HGF/cMET aktivasyonunda heparinin önemli olabileceği düşünülmektedir. Heparin çok sayıda sülfat grupları içeren, karbohidrat yapıda ve negatif yüklü bir glikozaminoglikandır. Oksidatif stresin baskılanmasında ve karaciğer fibrozunun önlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Heparinin HGF tarafından uyarılan biyolojik yanıtlar üzerindeki etkisini tanımlamaya yönelik daha önceki çalışmalarımızda hücre proliferasyonunun, hareketliliğinin ve invazyonunun baskılandığı belirlendi. Bu biyolojik yanıtların düzenlenmesinde rol alan genlerin anlaşılabilmesi için yapılan mikrodizin çalışmasında, hücresel oksidatif stresin düzenleyicisi TXNIP aday olarak belirlendi.

Çalışmamızda HGF ve/veya heparin uyarımının TXNIP ekspresyonuna etkisinin hangi mekanizma ile gerçekleştiği araştırılmıştır. TXNIP ekspresyonunun, cMET sinyal yolağı tarafından düzenlenmesi ve heparin arasındaki ilişki literatürde daha önce hiç tanımlanmayan bir veridir. Tek başına HGF uyarımı ile TXNIP ekspresyonu cMET fosforilasyonuna benzer şekilde artmakta, cMET reseptörüne spesifik bir inhibitör kullanıldığında ise baskılanmaktadır. cMET'in inhibe olması ile alt yönde bulunan ve hücre sağ kalımı ile ilişkilendirilen, p42, 44 MAPK sinyal ileti molekülleri de baskılanmaktadır. Bu sonuçlar, HGF/cMET yolağının aktive olmasının, TXNIP ekspresyonundaki artışın sağlanmasında önemli olduğunu göstermiştir.

Heparin tarafından da TXNIP ekspresyonu artmaktadır. Heparin tarafından cMET fosforilasyonunun ve p42,44 MAPK fosforilasyonların arttığının gösterilmesi, heparin aracılıklı TXNIP ekspresyonu artışının cMET aktivasyonu ile uyarılan p42, 44 MAPK yolağı üzerinden düzenlendiğini düşündürmüştür. Heparin ve HGF birlikte iken ise TXNIP

ekspresyonu, cMET, p42, 44 MAPK fosforilasyonu baskılanmaktadır. Önceki verilerimizde elde ettiğimiz hücre proliferasyonunun, invazyonunun, ve hareketliliğinin baskılanması bu sebeple olabilir.

Ek olarak TXNIP ekspresyonunun mezenşimal fenotip gösteren HCC hücre dizilerinde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu hücre tiplerinin oksidatif strese dirençli olduğu bilinmektedir.

Tüm verilerimiz bir arada değerlendirildiğinde TXNIP ekspresyonundaki artışın, HCC hücrelerinin oksidatif strese direnç kazanmasında ve invazyon yeteneklerinin artmasında önemli olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler; TXNIP, Glukoz, Heparin, HGF, HCC

The role of Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) in Hepatocellular carcinoma development.

Aysim Gozukizil, Dokuz Eylul University, School of Medicine, Dept. Of Medical biology and Genetics, Inciralti-Izmir, Turkey, a.gkizil@hotmail.com

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma is a liver tumour of increasing incidence that usually arises in cirrhotic liver. Oxidative stress-induced hepatocyte injury triggers chronic inflammation and hepatocyte apoptosis. Recent evidence suggests that common stress-activated signaling pathways responsible for the induction of cell motility and invasion.

HGF/c-Met signaling is a pathway that is activated in hepatocarcinogenesis. It is known that Heparan Sulphate Proteoglycans (HSPGs) work as a co-receptor for HGF/SF and this interaction is important for signaling. Heparin is a member of the glycosaminoglycan family of carbohydrates, a highly-sulfated and has the highest negative charge density of any known biological molecule. Administration of heparin can be useful for the treatment and prevention of hepatic fibrosis and oxidative stress.

We previously showed that heparin inhibits HGF induced cell proliferation, cell invasion and cell motility and further microarray analysis was performed to determine molecular mechanism behind heparin induced HGF-SF/c-Met signaling in HCC. TXNIP was the one of the genes, regulator of oxidative stress, was downregulated by heparin and HGF-SF induction.

The aim of our study was understanding of the regulation mechanism of HGF and heparin induced TXNIP expression. The relation between heparin induced cmet signalling and TXNIP is described as first time in our study. We showed that TXNIP expression is upregulated with HGF induction, a specific inhibitor to cMET receptor reversed this effect. Downstream signal transduction proteins such as p42, 44 MAPK which are regulated by cMET, was inhibited in the same pattern with TXNIP. Heparin induction also increased TXNIP expression. The mechanism underlying heparin induction is the increase of cMET phosphorylation. Also p42, 44 MAPK phosphorylation was increased via heparin induction. Our data let us to conclude that HGF/cMET signal pathway activation has critical role in controlling TXNIP expression, and this activation increase TXNIP expression via p42, 44 MAPK.

We founded that TXNIP expression was higher in cells having mesenchymal like phenotype than cells having epithelial like phenotype. It is known that damages causing by oxidative stress is also high in mesenchymal like cells.

In conclusion oxidative stress may result in activation of TXNIP and signal transduction pathways like p42,44 MAPK, which is important for oxidative stress resistancy and cell survival.

Key words, TXNIP, Glucose, Heparin, HGF, HCC

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatoselüler karsinom (HCC) dünyadaki 5. en sık görülen kanser olup, kanser ile ilişkili ölümlerde ise 2. sırada gelmektedir¹. Hepatokarsinogenez sürecinin tetiklenmesinde oksidatif stres ve insülin direncinin sebep olduğu kronik karaciğer hasarı ve siroz kritik öneme sahiptir². Antioksidan sistemdeki yetersizlik ile birlikte proteinlerin yüksek glukozdan kaynaklanan glikolizasyonu, serbest radikal miktarını arttırmakta ve hepatosit hasarı oluşturmaktadır³. Oksidatif strese bağlı olarak hepatik stellat hücreleri aktive olmakta hepatosit ölümü ve rejenerasyonu tekrarlayan döngüler halinde kronik karaciğer hasarına sebep olmaktadır⁴. Birçok büyüme faktörü ve sinyal ileti yolağı hepatokarsinogenez sürecinde gelişen stres ortamına yanıt olarak aktive olmaktadır. Sonuç olarak hücrelerin daha hareketli, daha invazif bir karakter kazanmasını sağlamaktadır⁵. Ancak hepatokarsinogenez sürecinde oksidatif stresin gelişiminden sorumlu aday genler ile moleküler mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar yetersizdir.

HGF/SF-cMet sinyal ileti yolağı hepatokarsinogenez sürecinde aktive olan yollardan bir tanesidir. Hepatosit büyüme, çoğalma ve farklılaşmasında önemli rolü olan Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF/SF) ve tirozin kinaz aktivitesine sahip, reseptörü (c-Met) sinyal yolağının aşırı aktivasyonu tümör hücrelerindeki invazif, metastatik karakterlerle ilişkilendirilmektedir⁶. Aynı zamanda HGF/cMet aktivasyonunun oksidatif stres hasarına karşı koruyucu etkisi de bilinmektedir⁷.

HGF/cMet yolağının aktivasyonunda heparan sülfat proteoglikanların ve heparinin önemli olabileceği düşünülmektedir⁸. Bazı çalışmalarda heparinin, cMET'e bağlanarak sinyal ileti yolağını aktive edebildiği veya HGF ile birlikte bulduklarında HGF'ye bağlanarak cMet ile etkileşimini engellediği tanımlanmıştır⁹. Heparin çok sayıda sülfat grupları içeren, karbohidrat yapıda ve negatif yüklü bir glikozaminoglikandır¹⁰. Uzun yıllarca antikoagulan özelliği sebebi ile kanser tedavisinde kullanılmıştır¹¹. Son yıllarda heparinin oksidatif strese karşı koruyucu rolü olduğu ve inflamasyon belirteçlerinin baskılanmasında rolü olduğu belirlenmiştir¹². Kanser modelinde de metastaz ve proliferasyon baskılayıcı özelliği tanımlanmıştır¹³. Ancak heparinin yer aldığı biyolojik süreçler ve HGF/cMET yolağı ile ilişkisi tanımlanmamıştır. Farklı hücre tiplerinde HGF'nin varyantlarından biri olan NK1'in heparin yokluğunda cMET'e bağlanamadığı, bağlandığı durumda hücre proliferasyonunun ile hücre hareketliliğinin arttırdığı belirlenmiştir¹⁴. Ancak bu etkinin hangi moleküler mekanizma ile gerçekleştiği henüz bilinmemektedir. HGF ve heparinin karaciğer rejenerasyonu ve

karaciğer fonksiyonlarındaki önemi düşünüldüğünde, hepatokarsinogenez sürecindeki etkilerinin belirlenmesi ve bu etkilerin hangi mekanizma ile gerçekleştiğinin belirlenmesi özellikle önemlidir. Bu konuya açıklık getirmek için daha önceki çalışmalarımızda HCC hücre dizilerinde HGF ve Heparinin etkileri incelendi. Ayrıca HGF ve heparin varlığında gerçekleşen gen ekspresyon değişimlerini incelemek için bir HCC hücre dizisi olan SKHep1 de mikrodizin analizi yapıldı. Bu çalışmada mikrodizin verilerine göre heparin ve HGF'nin birlikte bulunduğu koşulda sadece heparin bulunan koşula göre azaldığı belirlenen Tiyoredoksin etkileşimli protein (TXNIP) in heparin ve HGF/cMet aracılıklı sinyal iletimindeki rolü incelendi.

TXNIP serum starvasyonu, radyasyon, ısı şoku gibi stres koşulları altında uyarılmaktadır. Birçok çalışmada tümör baskılayıcı bir gen (TSG) olarak tanımlanan TXNIP'in majör rolü antioksidan Tiyoredoksin'e aktif katalitik bölgesinden bağlanarak etkisini inhibe etmesidir. Dolayısı ile TXNIP ekspresyonundaki artış hücreleri oksidatif strese duyarlı hale getirmekte ve apoptotik yanıtın oluşmasına sebep olmaktadır¹⁵. Literatürde HCC gelişiminde TXNIP'in rolünü inceleyen bir adet çalışma mevcuttur. TXNIP ekspresyonu olmayan hayvanda HCC gelişiminin arttığını gösteren bu çalışmada TXNIP'in HCC gelişiminde rol oynayan bir TSG olabileceğine yönelik veriler elde edilmiştir¹⁶. Buna ek olarak son yıllardaki bazı çalışmalar farklı kanser modellerinde TXNIP ekspresyonunun hipoksik alanlarda ve çevresinde arttığını, göstermiştir. Bu nedenle TXNIP ekspresyonunun HIF1 α tarafından düzenlendiği düşünülmüştür.¹⁷

Bu çalışmada mikrodizin ile belirlenen TXNIP ekspresyonundaki baskılanmanın RT-PCR ile doğrulanması ve HGF ve/veya heparin uyarımının TXNIP ekspresyonuna etkisinin hangi sinyal ileti molekülleri aracılığı ile gerçekleştiği ve HCC gelişimindeki rolünün belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hepatoselüler karsinom

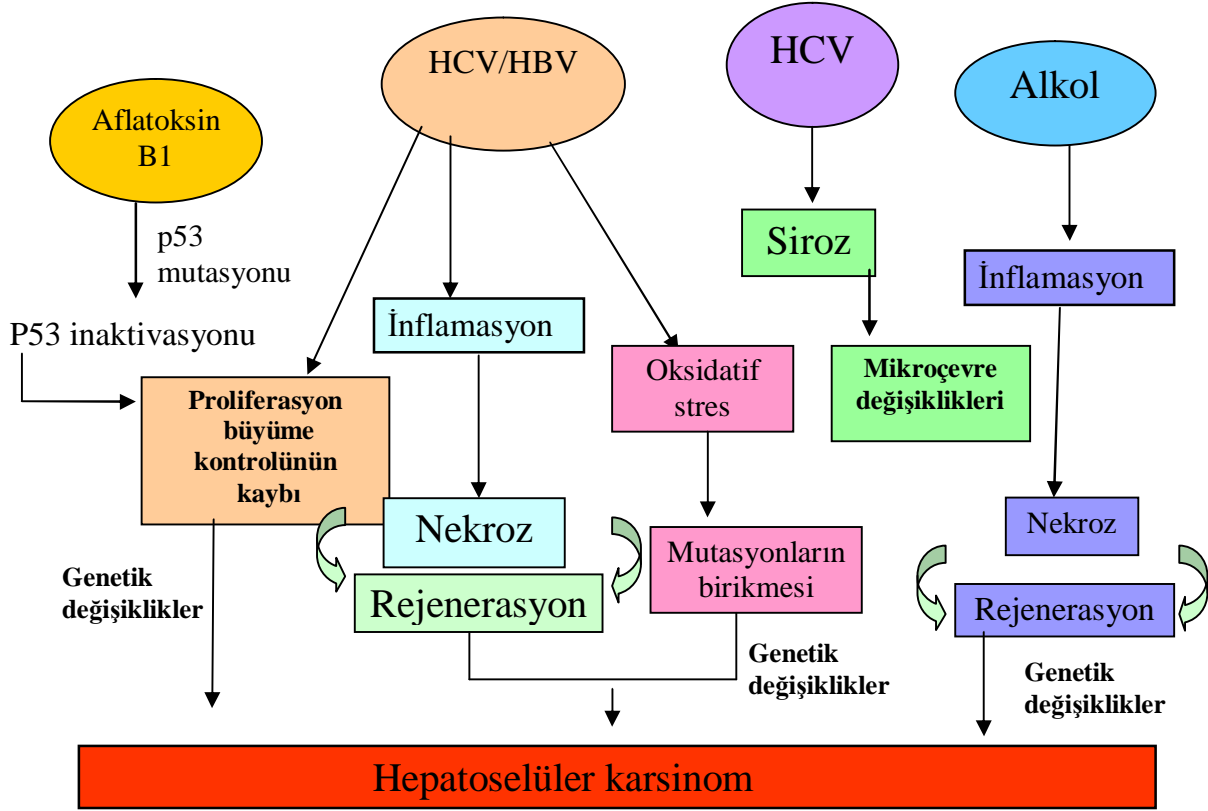
Amerikan kanser birliğinin raporlarına göre, her yıl yaklaşık 700 bin yeni karaciğer kanseri olgusu tanımlanmaktadır. Hepatoselüler karsinom (HCC) Pankreatik duktal adenokarsinom'dan sonra ikinci ölümcül kanser türü olup genellikle viral hepatit (HBV ve HCV) kaynaklı gelişmektedir. Ayrıca aflatoksin bulaşı olan gıdaların tüketilmesi, siroz, karaciğer lipid ve glukoz metabolizmasının bozulması, aşırı alkol tüketimi gibi risk faktörleri de HCC gelişiminde rol oynamaktadır¹⁸.

Viral kaynaklı HCC gelişiminde hepatit B ve hepatit C virüsleri rol oynamaktadır. HBV, hepadeniviridae sınıfına ait çift zincirli bir virüstür ve protein x (Hbx) gibi yaşam döngüsü için elzem olan birçok proteini kodlar¹⁹. HBV'nin konakçı genomuna entegre olması, MAPK1, TERT gibi kanser ile ilişkili genlerin mikroleksyonuna sebep olur. Aynı zamanda SRC tirozin kinaz, Ras, Raf, ERK, JNK gibi genlerin ekspresyon düzeyleri değişir. Hbx tarafından, c-fos ve c-jun gibi onkogenlerin promotörleri aktive edilmektedir²⁰. HBV'nin konak içerisine girmesi ile T-hücre aktivitesi başlatılmaktadır. Enflamasyonu takiben hepatosit nekrozu ve rejenerasyonu süreçleri döngüsel şekilde devam etmekte ve nihayetinde kronik karaciğer hasarı oluşmaktadır. Ayrıca virüsün konak endoplazmik retikulum ile etkileşimi oksidatif stresin artışı ile sonuçlanmakta, hepatik stellat hücreleri aktive olmaktadır. Apoptoz, büyüme, proliferasyon ve hücre sağ kalımı gibi biyolojik olaylar arasındaki denge bozulurken, TGFβ1 sinyal yolunun aktivasyonu ile fibrotik bir zemin hazırlanmaktadır²¹. Hbx'in p53 proteinine bağlanması ile hücre proliferasyonu ve sağ kalımı arttırılmaktadır²².

HCV ise flaviviridae ailesine ait tek iplikli bir RNA virüsüdür, konak genomuna entegre olmamaktadır. HBV'den daha yüksek olasılıkla karaciğer hasarı ve siroz gelişimine katkıda bulunan HCV'nin çekirdek proteinleri de p53 ile etkileşmekte, ayrıca hepatik steatoz gelişiminde rol oynamaktadır. Bununla birlikte Ras, Raf, MAPK, ERK, JNK gibi genler ile etkileşime girmekte ve ekspresyon düzeylerini değiştirmektedir²³.

HCC gelişimi için diğer bir risk faktörü kronik olarak alkol tüketilmesidir. Alkole bağlı karaciğer hasarı geliştiğinde, monosit hücrelerinin aktivasyonu TNFα gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin salınımına sebep olmaktadır. Ayrıca lipid peroksidasyonu artmakta, karaciğerde yağlanma ve siroz gelişmektedir²⁴.

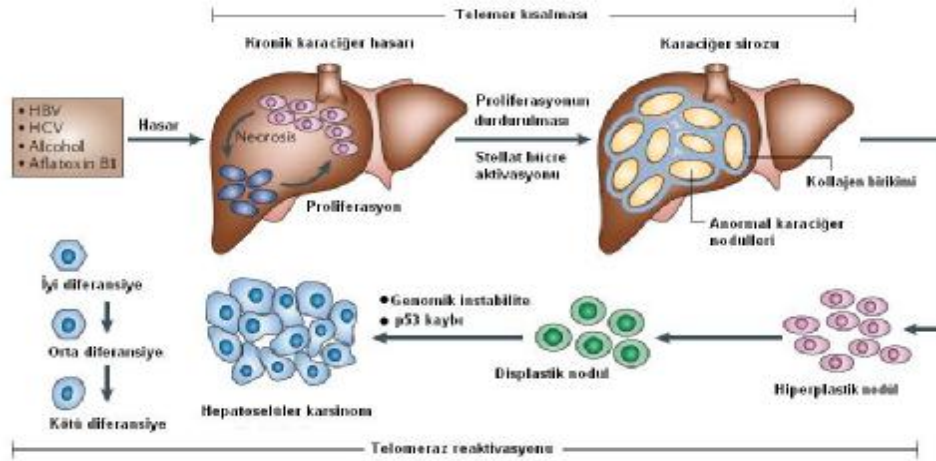
Aflatoksin B1'e maruz kalma durumunda da p53 mutasyonları ve HRAS gibi onkogenik genlerin aktive olmaktadır. Bütün bu değişiklikler sonucunda ortaya çıkan hepatosit hasarı, nekrozu, inflamasyon ve rejenerasyon döngüleri sonrasında kronik karaciğer hastalığı gelişimine sebep olur. Karaciğerde oluşan bu hasar, sitolojik olarak anormal pre-malign diplastik nodüllerin oluşumuna önderlik eder (Şekil1).



Şekil 1. Hepatoselüler karsinom gelişiminde rol oynayan etiyolojik faktörler

HCC üzerinde yapılan moleküler çalışmalar, hücrel onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve Wnt/ β -katenin, p53, pRB, Ras, MAPK, JAK, STAT, PI3K/Akt, HGF/cMET gibi sinyal ileti yollarındaki bozuklukların önemli olduğunu göstermiştir. Örneğin HCV, HBV ve aflatoksinB1 aracılıklı p53 geninin kaybı genomik instabilite ile sonuçlanmaktadır. HCC'de p53 geni dışında Rb, APC ve p16^{INK4a} gibi tümör baskılayıcı genlerin ekspresyon düzeyleri azalmıştır. Örneğin p16^{INK4a} hipermetile olup kapandığı bildirilen genlerden bir tanesidir²⁵. E-kaderin gibi epitelyal fenotip için belirteç olan genlerinde promotör bölgelerinde metile alanlar gözlenmiştir. cMet proto-onkogeni ise intrahepatik metastaz ve invazyon ile ilişkilendirilmektedir^{25,26}.

Histolojik açıdan değerlendirildiğinde ise HCC’de gözlenen neoplastik evrim çok basamaklı bir süreçtir. Tekrarlanan hepatosit hasarı, hepatositlerin kontrolsüz proliferasyonu ve rejenerasyon döngüleri kronik karaciğer hasarı oluşumuna ve siroz gelişimine önderlik eder. Siroz, oksidatif stres aracılıklı kollajen birikimi sonucu olarak gelişir ve fibrotik alanlardan oluşan anormal karaciğer nodülleri ile karakterizedir. Ayrıca telomer kısalması da gerçekleşir. Böyle bir ortamda rejenerasyon sürecine giren hepatositlerin, sitolojik olarak normal görünen hiperplastik nodülleri HCC gelişiminde ilk basamağı teşkil eder. Bu nodüller daha sonra sitolojik olarak normal olmayan pre-neoplastik nodüllere dönüşür. Hücre içerisinde ise glikojen ve lipid birikimine bağlı olarak metabolik bir takım değişimler olur²⁷. Kontrolsüz proliferasyon alan hepatositler enerji ve glukoz metabolizmasında hasara sebep olarak hipoksik alanlar oluşturur. Mitokondri ise bu hücrelerin gereksinimi olan ATP’nin karşılanmasında yetersiz kalır. Damarlanmanın az olduğu bölgelerde besin ve oksijen sıkıntısı yaşanmaktadır. Böyle bir ortamda hücreler çeşitli adaptasyonlar geçirir. Glikolitik yollar aktive olur ve hücre sağ kalımı gerçekleştirilir²⁸. Sonuç olarak iyi diferansiyeden kötü diferansiye hücre tipine kadar heterojen bir hücre topluluğu oluşmaktadır (Şekil 2).



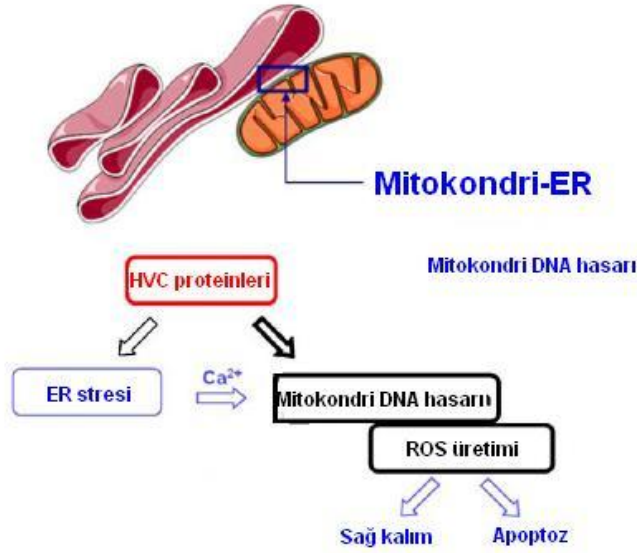
Şekil 2. HCC’de histopatolojik ve moleküler değişiklikler²⁷

HCC gelişiminde bu değişikliklere ek olarak metabolik bozukluklar da gelişmektedir. Karaciğer insülin ve glukoz metabolizmasının majör düzenleyicisidir ve oluşacak bozukluklar, insülin direnci ve serbest radikal hasarına sebebiyet vermektedir²⁹. Hepatositler apoptotik yanıt oluşturmakta ve rejenerasyon süreci başlatılmaktadır. Glikolitik yolların aktivasyonu ile glukoz tüketimi artar.

Sonuç olarak hepatokarsinogenez sürecinde damarlanmanın iyi olduğu bölgelere uzak olan tümör hücreleri çevre hücrelerden metabolizma olarak farklıdır. Hücrelerin kontrolsüz büyümelerine bağlı olarak gelişen serbest radikal hasarı, glikolize geçiş ve glukoz tüketimindeki artış, hücrelerin sağ kalım için bir takım adaptasyonlar geçirmelerini gerektirmektedir³⁰.

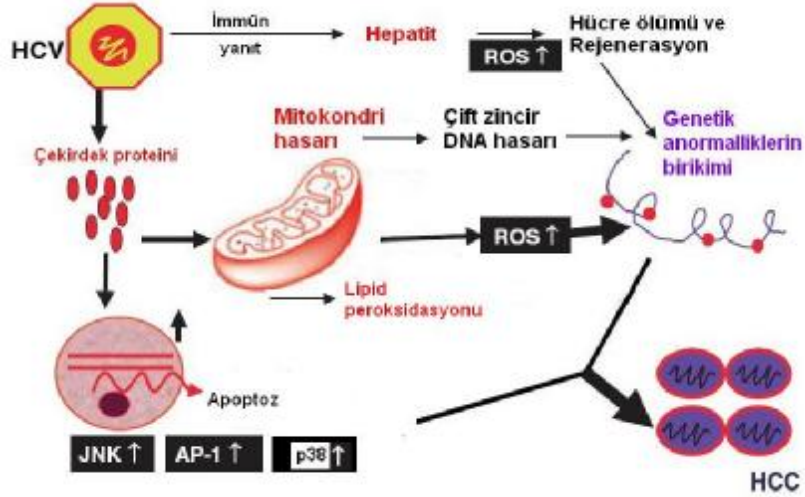
2.2 Karaciğerde hepatokarsinogenez sürecinde oksidatif stresin rolü

Oksidatif stres gen ekspresyonlarını değiştirmesi, hücre proliferasyonunu sağlaması ve DNA mutasyon sıklığını arttırarak genomik instabiliteye sebep olması gibi pro-tümörijenik etkileri dolayısı ile kanser gelişiminin önemli bir basamağıdır. Çoğu HCC'nin sirotik zemininde geliştiği düşünülürse, hasar oluşumunda, oksidatif stres aracılıklı kronik inflamasyon ve hücre ölümü önemli yer tutmaktadır³¹. HBV ve HCV enfeksiyonu, aşırı alkol tüketimi, obezite, diyabet gibi metabolizma bozuklukları, karaciğer hasarı oksidatif stres gelişimine sebep olmakta ve kronik inflamasyonu tetiklemektedir. HCV'nin kodladığı HS5A ve çekirdek proteini, endoplazmik retikulumdan salınan kalsiyumun mitokondriye geçişini sağlayarak hücresel redoks dengesini bozmakta ve oksidatif stresi arttırmaktadır³².



Şekil 3. HS5A protein aracılıklı oksidatif stresin tetiklenmesi³²

HS5A ve çekirdek proteini ekprese eden hücrelerde yanıt olarak JNK, p38, AP-1 gibi apoptoz tetikleyici sinyal ileti molekülleri aktive olmaktadır. Ayrıca endoplazmik retikulum stresi tetiklenmekte sitokin üretimi artmaktadır. Sonuç olarak mitokondride lipid peroksidasyonu artmakta, çift zincir DNA kırıkları oluşmaktadır³³(Şekil 4).

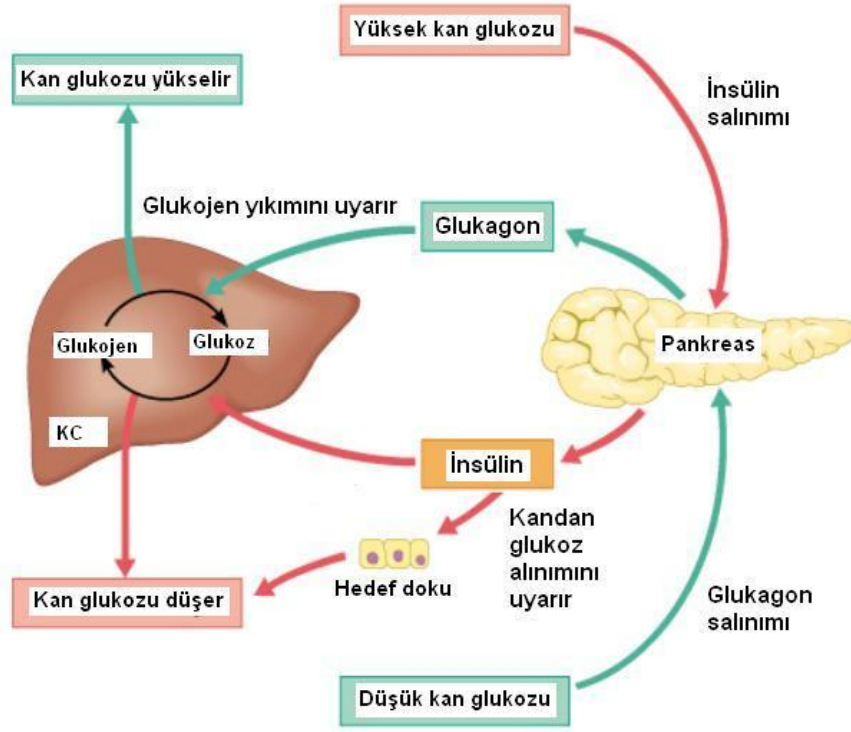


Şekil 4. HCV enfeksiyonu ve oksidatif stres arasındaki ilişki³³

HBV'nin kodladığı Hbx proteininde mitokondri ile etkileşerek STAT3 ve NfκB gibi transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Nukleusa göç eden bu transkripsiyon faktörleri ise ilgili genlerin aktivasyonun sağlayarak oksidatif stresi arttırmaktadır³⁴. Kronik olarak alkol tüketimi de oksidatif stresi tetiklemekte ve yağ asitlerinin salınımını artırarak steatoz gelişimini sağlamaktadır³⁵.

Normal süreçte sağlıklı hücrelerde artan oksidatif stres antioksidan moleküller tarafından nötralize edilmektedir. Ancak karsinogenez sürecinde reaktif oksijen türleri ile antioksidanlar arasındaki denge bozulmuştur. ROS'lar hücre içerisinde birikmektedir.

Glukoz metabolizması bozukluklarında oksidatif stres gelişimi için önemlidir. Karaciğerde gelişen normal süreçte glukoz konsantrasyonundaki artış, insüline yanıt ve GLUT-2 gibi glukoz transporterlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır, sonuçta glukoz hücre içerisine alınır³⁶(Şekil 5).

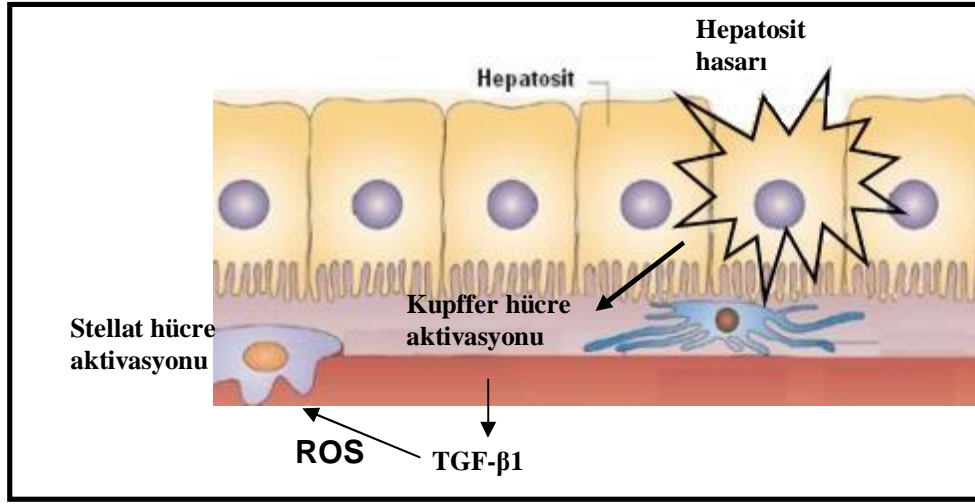


Şekil 5. Normal süreçte kan glukozunun düzenlenmesi³⁵

Ayrıca, endojen glukoz üretimi baskılanır, glukozun fazlası yağ molekülüne dönüştürülür, VLDL olarak dışarı salınır ve adipoz dokuda trigliserit (TG) olarak depolanır. Açlıkta veya glikoz kullanılmadığında yağ dokusunda bulunan TG' ler serbest yağ asitlerine yıkılırlar ve seruma geçerek karaciğere ulaşır, burada enerji için kullanılmak üzere keton cisimlerine dönüştürülürler³⁷. Ancak karaciğerde oksidatif stres aracılıklı insülin direnci oluşması durumunda glukoz alımı yapılamadığından endojen glukoz üretimi baskılanamaz. Karaciğer hücresine diyetle alınan veya yağ dokusundan hidrolize olarak karaciğere ulaşan serbest yağ asitleri ile birlikte de-novo sentezlenen serbest yağ asidlerinin fazlalığı yağlanmaya neden olur. İnsülin direnci ile artan serbest yağ asitleri ve oksidatif stres, hepatositlerde nekroz ve enflamasyonla sonuçlanmakta, serbest yağ asitlerinin okside olması ile serbest radikal oluşumu artmaktadır³⁸.

Hepatik fibroz, kollajen 1 ve 4 gibi hücre dışı matriks bileşenlerinin birikimi ile karakterize, viral hepatit, etanol, demire maruz kalma gibi sebeplerle ortaya çıkan bir yaralanma sürecidir. İnflamasyon süreci ise monisit ve makrofajlardan hepatik stellat hücre

davranışını tayin eden TNF α gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını ifade etmektedir. Ayrıca TGF β 1 yolu olarak bilinen karaciğerin Kupffer hücreleri oksidatif stres aracılıklı apoptotik yanıtı başlatır, fibroz ve inflamasyon sürecine katkıda bulunur. Hepatosit hasarına bağlı olarak, hepatik stellat hücreleri aktive olmakta, retinoid içeren yağ damlacıkları yerini hücre miyofibroblastlara ve fibroblastlara bırakmaktadır. Hücreler proliferere olmakta, daha motil bir fenotip kazanmaktadır. Ayrıca stellat hücreleri mezenşimal hücre belirteci olan vimentin ekprese etmektedir. Kontrol edilemeyen fibroz kaçınılmaz olarak geri dönüşümsüz siroza yönelmektedir³⁹. (Şekil 6).



Şekil 6. Hepatosit hasarı (Prodencio M. Et. All Nature Reviews Microbiology 4, 849-856’ den modifiye edilmiştir.)

Oksidatif strese bağlı olarak gelişen karaciğer hasarı, MAPK ailesinden olan JNK, ERK1/2 ve p38 sinyal ileti moleküllerinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Stresin arttığı dönemlerde ise JNK/c-Jun, p38 MAPK sinyal ileti molekülü apoptotik yanıtı uyarırken, geç dönemde ERK1/2 MAPK sinyal ileti yolağı aktive olarak hücreleri korumaktadır. Bununla birlikte, hücre sağ kalımının artırılmasında ERK1/2 moleküllerinin JNK/c-Jun inhibisyonu yaptığı da bildirilmiştir⁴⁰.

Sonuç olarak HBV, HCV enfeksiyonu, kronik alkol tüketimi, glukoz ve lipid metabolizmasındaki bozukluklar, oksidatif stresi tetiklemektedir. Ayrıca oksidatif strese yanıt olarak hücre sağ kalımının nasıl sağlandığı ayrı bir sorudur. Ancak hepatokarsinogenez sürecinde oksidatif stresin gelişiminden sorumlu aday genler ve moleküler mekanizmaları tam bilinmemektedir. Ayrıca bu aday genlerin oksidatif stres tarafından düzenlendiği düşünülen

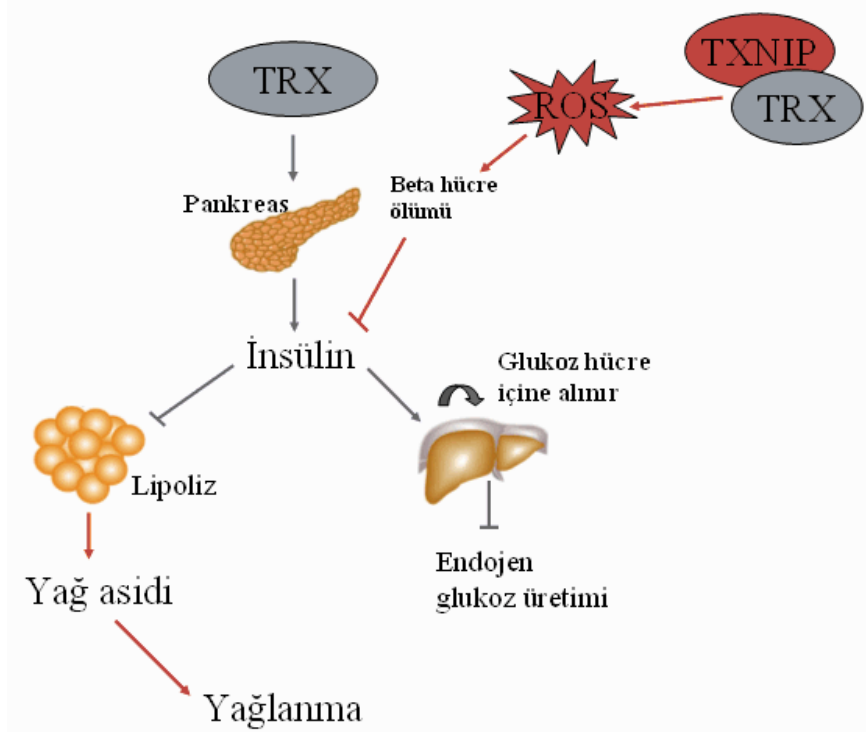
apoptoz ve diferansiyasyon gibi biyolojik süreçlerdeki rolünü tanımlayan çalışmalar yetersizdir.

2.3 Oksidatif stres ve Tiyoredoksin etkileşimli protein (TXNIP)

Karaciğer, hepatik glukoz alımı ve sekresyonunu kontrol ederek glukoz dengesinin sağlanmasında önemli rol üstlenmektedir. Örneğin açlık süresince karaciğer, kan glukoz düzeyinin yükseltilmesi için glukoneogenez ve glukogenoliziz gibi süreçleri başlatır. Kontrol primer olarak glukagon ve insülin, ayrıca Foxo1 gibi transkripsiyon faktörleri ve ko-aktivatörler ile sağlanmaktadır⁴¹. Normal süreçte glukoz konsantrasyonundaki artış, insüline yanıt glukoz transporterlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır ve glukoz hücre içerisine alınır. Ayrıca birçok genin ekspresyonunda da ani bir değişim gerçekleşir.

Genlerin promotor analizleri, artan glukozla yanıtta karbonhidrat yanıt elemanlarını (ChoRE) işaret etmektedir⁴². Mikrodizin çalışmaları yüksek glukoz ile ekspresyonu en çok artan genlerden bir tanesinin tiyoredoksin etkileşimli protein (TXNIP) olduğunu göstermiştir. Promotor bölgesinde ChoRE içeren TXNIP'in major rolü, antioksidan tiyoredoksin'e aktif katalitik bölgesinden bağlanarak, disülfit redüktaz aktivitesini inhibe etmesidir^{43,44}. TXNIP hücrel glukoz dengesinin sağlanmasında rol oynamaktadır⁴⁵. Karaciğerde ise rolünü tanımlayan yayınlar yetersizdir.

Oksidatif stres, ısı şoku, serum starvasyonu gibi stres koşulları altında uyarılan TXNIP, glukozun hücre içerisine alınmasını engellemektedir. Artan glukozla yanıt olarak glukotoksisite ile birlikte pankresin beta hücrelerinde ölüm gelişir⁴⁶. Aynı zamanda lipogenik genlerde aktive olur. Örneğin yağ dokusunda insülinin direnci, depo trigliseritlerin hidrolize olmasına, kan plazmasında serbest yağ asitleri olarak miktarlarının artmasına sebep olurken, glukoz metabolizmasının majör düzenleyicisi karaciğerde ise de-novo lipogenez ve hepatositlerden düşük yoğunluklu lipoprotein salınımının azalması ile birlikte yağlanmaya kadar varan bir etkiyi ifade etmektedir⁴⁷. İnsülin direncini takiben oksidatif stres gelişmektedir⁴⁸. DNA hasarı yaratma özelliklerine ek olarak oksidatif stres bir çok sinyal yolağının aktivasyonunu sağlamaktadır⁴⁹. Oksidatif stresin artması insülin reseptörünün (IRS1-IRS2) serinlerinden fosforillenmesini ve aktivitesinin baskılanmasını başlatır⁵⁰. Böylece insülinin baskıladığı trigliserit hidrolizinden sorumlu olan lipaz enzimi aktive olur. Serbest yağ asidi miktarı artar ve yağlanma gelişir^{51,52}.



Şekil 7. TXNIP'in karaciğer yağlanmasındaki rolü.

Perrone ve arkadaşları hiperglisemiye bağlı olarak artan TXNIP'in aşırı eksprese olduğu endotel hücrelerinde inflamatuvar genlerin promotörlerinde H3K9 asetilasyonunun arttığı gösterilmiştir⁵³. Karaciğer kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile kemokin ve sitokinlerin salınımı artmakta, lenfositler hasar gören karaciğere sızmaktadır⁵⁴. Sürecin bu şekilde devam etmesi TXNIP'in başlattığı glukotoksiste ve oksidatif stresin artmasından kaynaklandığı önemli bir noktadır. Ayrıca hipotetik olarak TXNIP, hepatik stellat hücrelerinin aktivasyonundan da sorumlu olabilir. TXNIP'in aşırı aktivasyonu p38 MAPK sinyal ileti yolağını aktive etmekte, hücrelerin apoptoz yanıtı geliştirmelerine sebep olmaktadır.

Hepatik steatoz benign bir durumdan, lipotoksiste ile uyarılan ve alkole bağımlı olmayan steatohepatit (NASH) olarak bilinen steatohepatit sürecine geçiş yapabilmektedir. İnsülin direnci ile artan serbest yağ asitleri ve oksidatif stres, hepatositlerde nekroz ve enflamasyonla sonuçlanmakta, serbest yağ asitlerinin okside olması ile serbest radikal oluşumu artmaktadır⁵⁵. Hiperglisemi ve oksidatif stres ile artan önemli bir sitokin olan TNF- α , hepatik stellat hücrelerinin aktivasyonu, hücre proliferasyonu ve tip 1, tip 4 kollajen, laminin, bağlayıcı doku büyüme faktörü ve fibronektin gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinin

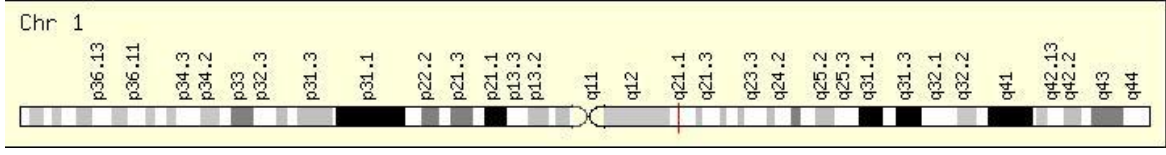
sentezini arttırmakta ve karaciğerde fibroz sürecini tetiklemektedir⁵⁶. Karaciğer komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stresin antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır. Bu noktada TXNIP, antioksidan tiyoredoksinine aktif katalitik bölgesinden bağlanarak oksidatif stresi artırıyor olabilir.

Fibroz sürecinin tekiklenmesini takiben siroz gelişmekte, süreçte insülin direnci ile hepatik glukoz alınımındaki azalma etkili olmaktadır⁵⁷. Aynı zamanda karaciğer hasarı, insülin salınımının bozulması ve artan glukoz düzeyleri hepatokarsinogenez sürecini tetiklemektedir⁵⁸. Artan reaktif oksijen türleri, DNA, protein ve lipidleri oksidize ederek hasar oluşturmaktadır⁵⁹. Böylece onkogenik mutasyonların birikmekte, çok basamaklı karsinogenez sürecinin başlamaktadır. Örneğin oksidatif stres artışı p53 kaybı, telomer kısalması ve kromozomal instabilite için önemli bir bağlantıdır. Normalde DNA hasar onarım enzimleri bu noktada devreye girmektedir. Ancak serbest radikallerin aşırı üretimi DNA hasar onarım genlerinde mutasyonlar yaratmaktadır⁵⁹.

Oksidatif stres hasarına karşı HGF/cMET, PI3K/Akt, Erk1/2 MAPK sinyal iletim yollarının aktivasyonu ile hücrelerin sağ kalımının sağlandığı, bu sinyal yollarının TXNIP'in düzenlenmesinde de rolü olabileceği öngörülebilir.

2.4 TXNIP'in genel özellikleri

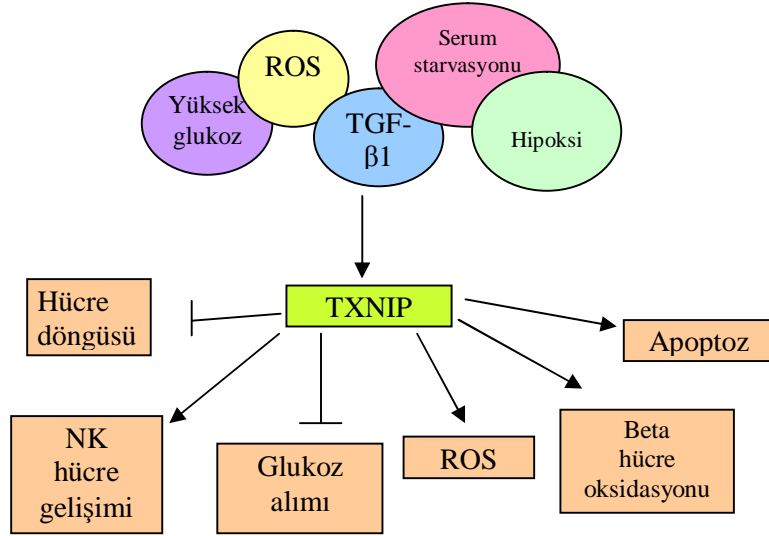
TXNIP geni, Tiyoredoksin etkileşimli protein olarak bilinmektedir. Tiyoredoksin etkileşimli protein (TXNIP), ilk kez 1994 yılında HL-60 hücrelerinde 1,25 Dihidroksivitamin D3 ile ekspresyonu artan bir gen olarak tanımlanmıştır⁶⁰. 1995 yılında fare modellerinde sürdürülen çalışmalar karaciğer kanser gelişimindeki rolünü tanımlayan yeni açılımlar sağlamıştır⁶¹. 1999 yılında antioksidan bir molekül olan Tiyoredoksin ile etkileşime girdiği ve hücrel oksidatif stresin artışından sorumlu olduğu tanımlanmıştır⁶². 2001 ve 2002 yılında fare kromozomundaki yerleşimini belirleyen çalışmalar ise, kromozom 3 üzerinde hiperlipidemi ile ilişkili bir bölgeyi tanımlamaktadır. Fare modellerinde hiperlipidemi fenotipinden sorumlu gen olarak tanımlanmıştır^{63,64}. Daha sonraki çalışmalar TXNIP'in glukoz ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol aldığını göstermiştir. Özellikle metabolik rahatsızlıklardan diyebette sıkça yayın yapılmaktadır. EST01027, VDUP, HHCPA78, THIF, TBP-2 olarak da adlandırılmaktadır. İnsan kromozomunun 1q21.1 bölgesinde yerleşim göstermektedir(Şekil 8).



Şekil 8. TXNIP'in 1. kromozom üzerindeki yerleşimi

TXNIP sekiz ekzonu olan bir gen dir ve tanımlanmış farklı molekül ağırlıklarındaki üçü protein kodlayan, altı transkript varyantı bulunmaktadır⁶⁵.

Tiyoredoksin etkileşimli protein hücresel redoks dengesinin sağlanmasında rol oynamaktadır. Serum starvasyonu, ısı şoku, H₂O₂, yüksek glukoz gibi stres koşulları altında uyarılmaktadır. TXNIP geninde oluşabilecek bir mutasyon, lipid metabolizmasını, glukoz metabolizmasını ve NADH/NAD⁺ oranlarını etkilemektedir⁶⁶(Şekil 9).

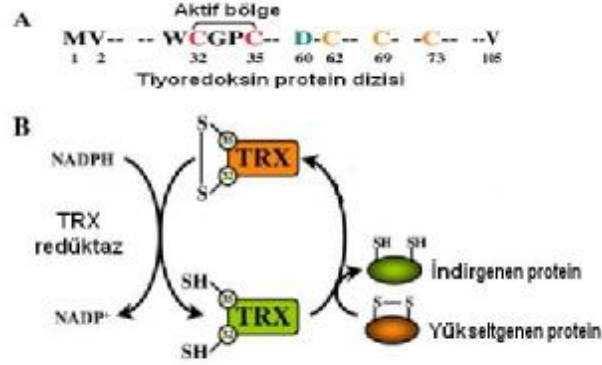


Şekil 9. TXNIP'in yer aldığı biyolojik süreçler.

Ekspresyon düzeyi dokular arasında farklılıklar göstermektedir. TXNIP'in kodladığı 50kD moleküler ağırlığındaki proteinin hücre içi yerleşimi ve fonksiyonu hakkında kesin bir bilgi olmamakla birlikte, immünohistokimya ve konfokal mikroskopi çalışmaları sitoplazma, mitokondri ve nükleusta yerleşiminin olduğunu göstermiştir⁶⁷.

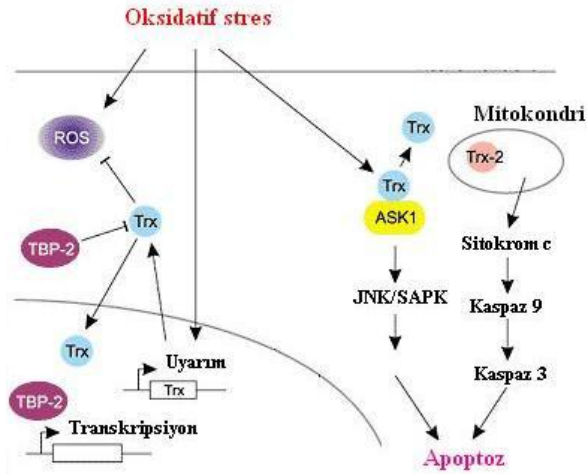
TXNIP'in majör rolü Tiyoredoksin'e aktif katalitik bölgesinden bağlanmasıdır. Tiyoredoksin 105 aminoasit içeren 12kD büyüklüğünde antioksidan bir proteindir. Aktif

katalitik bölgesindeki sistein rezidülerinde, ditiyol/disülfid değişimleri ile hücresel redoks dengesinin sağlanmasında görevlidir. İndirgenmiş tiyoredoksin aktif bölgesinde ditiyol (-SH-SH), yükseltgenmiş tiyoredoksin ise disülfid bağları (-S-S) içerir. İndirgenen Tiyoredoksin hedef proteinin disülfid bağına bir H⁺ transfer ederek indirgenmesini sağlarken kendisi yükseltgenir. Tiyoredoksin redüktaz enzimi yükseltgenen tiyoredoksinin tekrar indirgenmesini sağlar⁶⁸(Şekil 10).



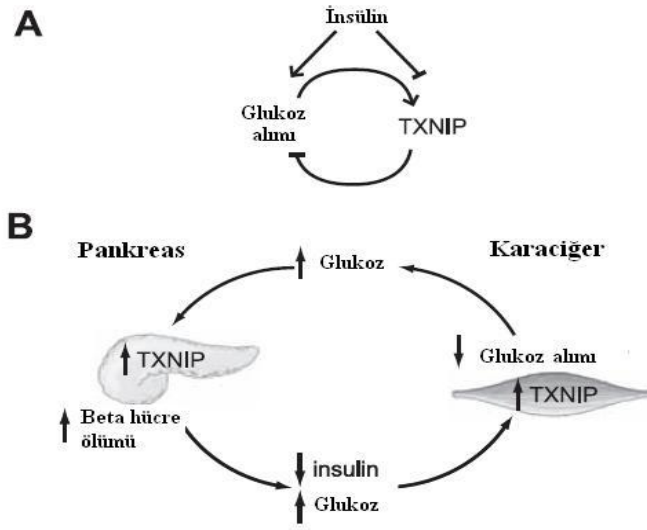
Şekil 10. Tiyoredoksin ve hücresel redoks dengesinin kontrolü⁶⁸.

Tiyoredoksin bu mekanizmayı kullanarak ASK1, PTEN gibi alt sinyal iletim molekülleri ile etkileşmektedir. TXNIP'in ekspresyonunun arttığı durumlarda tiyoredoksinin baskılandığı hücrelerin oksidatif strese daha duyarlı olduğu ve JNK/SAPK sinyal ileti yolağı aracılıklı olarak apoptoza yönlendiği bildirilmiştir⁶⁹(Şekil 11)



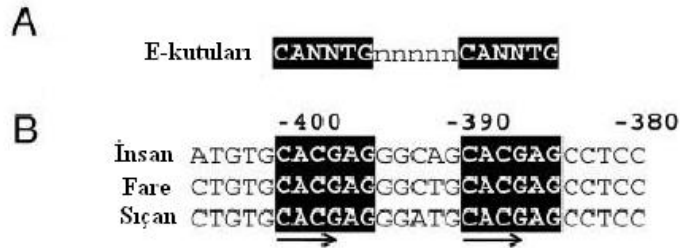
Şekil 11. TXNIP ile apoptoz arasındaki ilişki⁶⁹

TXNIP, lipid metabolizması, glukoz metabolizması üzerinde etkilidir ve diyabetiklerde aşırı-eksprese olduğu tanımlanmıştır⁷⁰. Diyabete bağlı olarak hiperglisemi gelişmektedir. Pankreatik beta hücre ölümünde hiperglisemi ile tetiklenen glukotoksisitenin önemi bildirilmiştir. Tiyoredoksin etkileşimli proteinin süreçteki rolü ise, insüline yanıt olarak hücre içerisine glukoz alınımını engellemesi ve glukotoksisite oluşumuna yol açması ile açıklanmaktadır. Minn ve arkadaşlarının⁷¹ yaptığı çalışma hiperglisemi ile uyarılan TXNIP'in, glukoz toksisitesi ve beta hücre ölümü arasında kritik bir bağlantı olduğunu göstermektedir (Şekil 12).



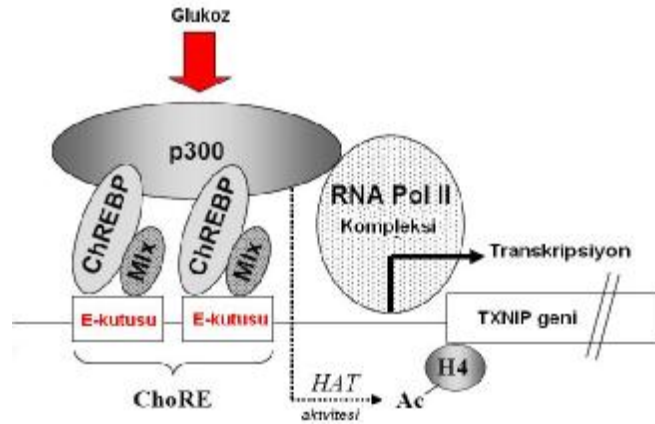
Şekil 12. TXNIP'in glukoz metabolizmasındaki rolü⁷¹

Yapılan çalışmalar TXNIP ekspresyonunun artmasında promotor bölgesindeki karbonhidrat yanıt elemanının önemli olabileceğini göstermiştir (Şekil 13).



Şekil 13. A. TXNIP promotorunda yerleşim gösteren iki E-kutusu karbonhidrat yanıt elemanı B. Karbonhidrat yanıt elemanı birçok canlı türünde korunmuştur⁷¹.

Beta hücre ölümü için TXNIP'in kritik olduğu bilgisinden sonra glukoz uyarımına bağlı olarak artan TXNIP transkripsiyonunun mekanizması anlaşılabilmesi için yapılan çalışmalarda karbohidrat yanıt elemanına bağlanan protein (ChREBP) tanımlanmıştır. CHREBP'in karaciğerde glikolitik ve lipogenik genlerin aktivasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yüksek glukozla bağlı olarak ChREBP'in nukleusa göçü ve ChoRE'ye bağlanması üç kat artarken, polimeraz II aktivitesi iki kat artmaktadır. ChREBP heterodimerik bir protein olup Mix karbohidrat yanıt elemanına bağlanma partneridir. Birliktelikleri molekülün tabilizasyonu sağlamaktadır. ChREBP'in H4 ve H3 için histon asetil transferaz olan p300 ile etkileştiği bilinmektedir. Dolayısı ile ChREBP p300 aracılıklı olarak H4 asetilasyonunu aktive etmekte, polimeraz II'nin yardımı ile TXNIP transkripsiyonunu arttırmaktadır⁷² (Şekil 14).



Şekil 14. Glukoz uyarımına bağlı olarak ChREBP ve MIX kompleksi TXNIP'in promotorundaki ChoRE'ye bağlanmakta, histon asetil transferaz aktivitesi ile TXNIP ifadesi artmaktadır⁷².

TXNIP'in aşırı ekprese olması, hücre döngüsünün G1 aşamasında durdurulmasına sebep olur. Bu konuda Han S ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, TXNIP'in hücre döngüsü ile ilişkili moleküller üzerinde transkripsiyonel represör gibi davrandığı gösterilmiştir. Ayrıca promiyelotik lösemi çinko parmak (PLZF), Fanconi anemi çinko parmak motifi (FAZF) ve histon deasetilazlar (HDAC) ile etkileşerek hücre döngüsünde rol alan moleküllerden bir tanesi olan siklinA'nın promotor aktivitesini baskılar⁷³. Jeon H. Ve arkadaşlarının yaptığı farklı bir çalışmada ise TXNIP ekspresyonu olmayan fibroblast hücrelerinde proliferasyonun arttığı gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin p27 siklin bağımlı kinaz inhibitörü ekspresyonunun düşük olduğu gözlenmiştir. JAB1'in p27 siklin bağımlı kinaz inhibitörü ile etkileştiği ve

stabilizasyonunu değiştirdiği bilinmektedir. TXNIP ise JAB1 molekülü ile etkileşmekte, dolayısı ile p27^{kip1}'in nukleustan sitoplâzmaya göçü engellenmekte ve stabilizasyonunu sağlanmaktadır. Sonuç olarak hücre döngüsü G1 basamağında durmaktadır⁷⁴.

2.5 TXNIP'in kanser sürecindeki rolü

Tümör gelişimi, hücresele onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonların birikmesi ile karakterizedir^{75,76}. Farede 3. kromozomun 1q21 bölgesinde yerleşim gösteren TXNIP geni, insan tümörlerinde yüksek sıklıkla genomik instabilite gösteren bir bölgede yer almaktadır⁷⁷.

Karsinogenez boyunca ekspresyonu değişen genler, proliferasyon, apoptoz ve diferensiyasyon gibi birçok biyolojik yanıtı etkilerler. TXNIP'e bu bakış açısı ile bakıldığında, meme, akciğer ve kolon gibi birçok tümör dokusunda ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir^{78,74}. TXNIP ekspresyonundaki azalma DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu gibi epigenetik mekanizmalara bağlanmaktadır⁷⁹. Örneğin Khokan D. ve arkadaşlarının⁸⁰ yaptığı bir çalışmada, renal kanser modelinde, TXNIP'in protein düzeyinde ekspresyonunun, promotör bölgesindeki CpG adacıklarının hipermetile olması sebebi ile azaldığı gösterilmiştir.

HCC sürecinde ise, fare modellerinde yapılan deneyler ile, TXNIP yolukluğunda HCC belirteçleri olan α -fetoprotein ve p53 düzeylerinin arttığı ve tümör gelişiminin tetiklendiği gösterilmiştir⁸¹. Ayrıca TXNIP tümör ve metastaz baskılayıcı bir gen olarak bilinmektedir. Bu bilgi bir çok araştırıcı tarafından TXNIP'in hücre döngüsünü direkt olarak etkilemesi ile desteklenmektedir. Mekanizma, tümör gelişimi için TXNIP'in yokluğu durumunda, proliferasyonu uyaran diğer moleküllerin aktive olmasına dayandırılmaktadır.

TXNIP'in HCC gelişimindeki rolünü ve fonksiyonel mekanizmasını anlamaya yönelik çalışmalar sınırlı sayıdadır. Yamaguchi F. ve arkadaşlarının⁸² yaptığı bir çalışma, HCC hücre dizilerinden iyi diferansiye Huh7 hücreleri yüksek glukozu maruz bırakıldığında hücre döngüsünün G1 aşamasında durdurulduğu bildirilmiştir. Proliferasyon inhibisyonu gözlenen hücrelerin ilginç bir şekilde apoptozu yönlenmediği de gösterilmektedir. Francesca T. ve arkadaşlarının⁸³ yaptığı farklı bir çalışmada ise meme kanseri hücre dizisi olan MDA-MB-231'de yüksek glukozun TXNIP ekspresyonunu arttırdığı, buna bağlı olarak oksidatif stresin arttığı ve hücrelerin apoptotik yanıt geliştirdiği gösterilmiştir. Ancak tümör bölgesinde artan stres ortamına yanıt olarak hücrelerin sağ kalımlarını hangi mekanizma ile sağladıkları farklı

yayınlarında tartışılmış ve henüz anlaşılammıştır. Hücre sağ kalımının sağlanmasında HGF/cMET ve PI3K/Akt gibi sinyal ileti yolaklarının önemi bildirilmiştir. Bu veri TXNIP aracılıklı oksidatif stres hasarının apoptoz, diferansiasyon ve hücre döngüsü üzerinde farklı yanıtlara sebep olabileceğini düşündürmektedir.

Bu görüşü destekleyen ilk çalışma 2006 yılında Jan S. ve arkadaşları⁸⁵ tarafından yapılmıştır. Çalışmada, tümör hücrelerinin kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinen hipoksik alanlarında ve çevresinde TXNIP ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Daha sonra 2008 yılında Baker A. ve arkadaşlarının⁸⁶ yaptığı bir çalışmada, hipoksik stres ile ekspresyonu artan TXNIP'in HIF1 α aracılıklı olarak düzenlenebileceği gösterilmiştir.

Hepatokarsinogenez sürecinde reaktif oksijen türlerinin üretimi artmıştır. Yang ve arkadaşları, ROS'leri ve matriks metalloproteinazlar (MMPs) arasındaki ilişkiyi tanımlamıştır. Hepatokarsinogenez sürecinde yüksek glukozaya bağlı olarak oksidatif hasar gelişmesi durumunda MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonu artmaktadır. Diğer taraftan bu çalışma ile uyumlu olarak Lam ve arkadaşları fare modelinde serbest radikal türlerinin hücre motilite ve invazyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Hepatoselüler karsinom gelişiminde TXNIP'in rolü ile ilgili kısıtlı yayın bulunmaktadır ve mekanizması henüz anlaşılammıştır.

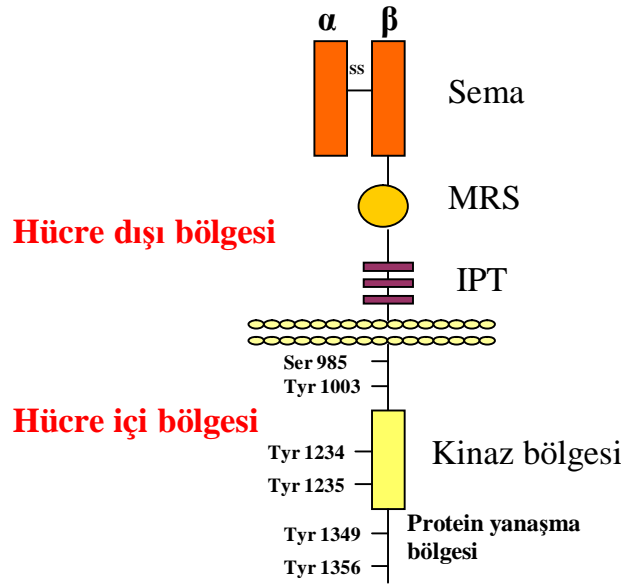
2.6 HGF/cMET sinyal ileti yolağı ve oksidatif stres sürecindeki rolü

1980'li yılların başında onkogen olarak tanımlanan cMET'in ilk önce tirozin kinaz domeynin, dimerizasyon domeyni ile birleşmesinden oluşan formu tanımlanmıştır. Daha sonra cMET protoonkogeninin tirozin kinaz reseptörü kodladığı tanımlanmıştır⁸⁷. Kanser gelişiminde rol alabileceği fikri ise farklı araştırmacılar tarafından motilite, invazyon ve proliferasyon gibi biyolojik süreçleri etkileyen bir salgı proteini olması üzerine önem kazanmıştır. cMET reseptörüne bağlanan ligandın ise bu biyolojik yanıtları uyaracak yüksek afiniteli bir molekül olduğu düşünülmüş, motilite faktörü (SF: Scattering Factor) ve mitojenik bir büyüme faktörü (HGF: Hepatocyte growth factor) olmak üzere aday iki molekül tanımlanmıştır⁸⁸. Daha sonraki çalışmalar bu iki molekülün aynı olduğunu göstermiştir. Ve cMET reseptörüne bağlanan ligand HGF/SF olarak adlandırılmıştır^{89,90}.

MET tirozin kinaz, tek zincirli öncül bir molekülün proteolitik kesimi sonucunda disülfid bağı ile bağlı olgun heterodimer yapısını kazanmaktadır. Heterodimer yapı, membranı bir kez geçen beta zinciri ve ekstraselüler alfa zincirinden oluşmaktadır. Hücre

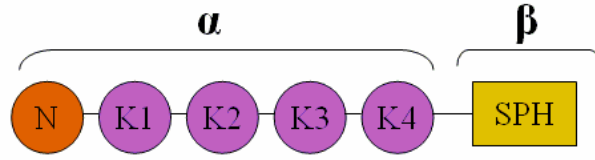
dışındaki kısım 500 aminoasit içeren ve düşük afiniteli ligand bağlanması için önemli olan sema bölgesini içermektedir. Aynı zamanda sisteinden zengin MET ile ilişkili bölge (MRS domain), immunglobulin benzeri bölge (IPT domain) ve bir protein-protein etkileşim bölgesi içermektedir. İntraselüler kısımda ise, Jukstamembran bölgeyi takip eden bir katalitik bölge ve C-terminal düzenleyici bölge bulunmaktadır.

MET tirozin kinaz içerdiği serin rezidüleri fosforile olduğunda reseptör kinaz aktivitesi baskılanmaktadır. 1003. tirozine ise CBL proto-onkogeni bağlanmakta ve Met degradasyonu ile sonuçlanmaktadır. Jukstamembran bölgesi iki tirozin içermektedir (Tyr 1234, 1235) ve enzim aktivitesinin kontrolünden sorumludur. Son olarak C terminal kuyruğuda iki tirozin (Tyr 1349, 1356) içermektedir. Bu bölge forforillendiği zaman fonksiyonel bir yavaşma bölgesi şekillenmekte ve hücre içi adaptör moleküllerin reseptör ile etkileşimi sağlanmaktadır ⁹¹(Şekil 15).



Şekil 15. MET tirozin kinaz

HGF/SF, plazminojen ailesine dâhildir. Öncelikle tek zincirli inaktif formda neredeyse her dokunun hücre dışı matrisinde bulunmaktadır. uPA, trombin gibi enzimler yardımı ile proteolitik olarak kesilerek aktif forma dönüşmektedir ⁹². Bir saç tokası yapısını takiben molekül içi disülfid bağları ile stabilizasyonu sağlanan dört tane kringle bölgesini ve plazminojene benzer bir şekilde serin proteaz yapısına sahiptir ⁹³(Şekil 16).



N: Amino terminal bölgesi

K1-K4: Kringle bölgeleri

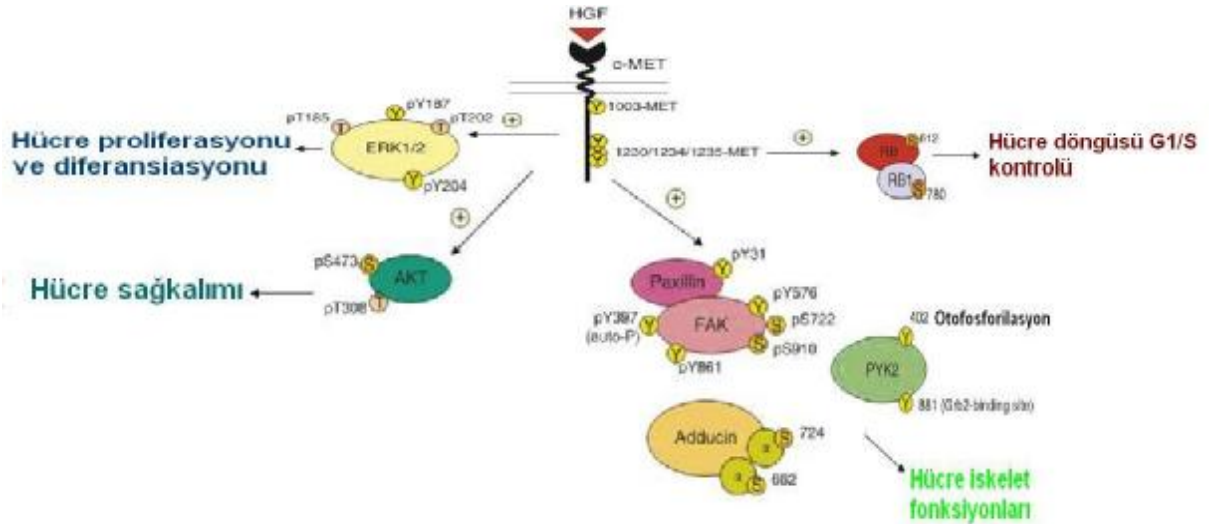
SPH: Serin proteinaz homoloji bölgesi

α ve β : Proteolitik kesimden sonra oluşan alt-birimler

Şekil 16. HGF/SF yapısal görünümü

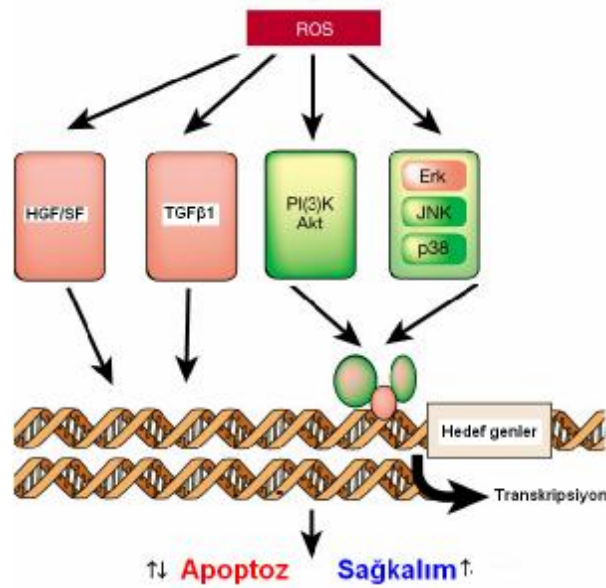
728 amino asitlik tam-uzunluklu HGF proteinine ilaveten, çeşitli alternatif mRNA splaylarından oluşan iki HGF izoformu daha bulunur. Her iki izoform da N-terminal domainini ve 1. kringle domaini içerdiği halde, izoformların biri NK1'de diğeri ise NK2'de sonlanır. Her iki izoform da c-Met'e bağlanabildiği halde aktive ettikleri sinyal yolları ve oluşan biyolojik yanıtlar farklı olmaktadır^{92,94}.

Aktif cMET'in çoklu yanaşma bölgesine (Multi-docking site) yanaşan alt yöndeki sinyal ileti molekülleri arasında Gab1, PI3K, Stat3, Src kinaz bulunmaktadır. Gab1 HGF tarafından uyarılan hücresel yanıtların düzenlenmesinde ana moleküldür. Hücresel proliferasyon ve diferansiasyonun düzenlenmesinde mitojen ile aktive olan sinyal ileti yolağı (MAPK) MET aktivasyonu ile sağlanmaktadır (Şekil 17).



Şekil 17. HGF/SF'nin alt sinyal ileti molekülleri ile etkileşimi (Patrick M. Et. All'British Journal of Cancer, 2007'den modifiye edilmiştir.)

Kronik karaciğer hasarına bağlı olarak oksidatif stres artmaktadır. Bu durumda hepatositlerin stellat hücreleri aktive olmakta ve fibroz gelişmektedir. Ayrıca hepatositlerin bir kısmı TGFβ1 aracılıklı apoptotik yanıt gösterirken diğer bir kısmı rejenerasyon sürecine girmekte, hücre sağ kalımı ve proliferasyonunu uyarıcı büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri aktive olmaktadır⁹⁵. Hücresel oksidatif stresin HGF/SF salınımını uyardığı tanımlanmıştır. Ayrıca aynı çalışmada reaktif oksijen türlerinin hücre motilite ve invazyonunu arttırdığı tanımlanmaktadır⁹⁶. Matriks metalloproteinazları ve hücre adezyon molekülleride ROS ile uyarılmaktadır. HGF/cMET sinyal ileti yolağı aracılıklı aktive olan PI3K/Akt ve Erk1/2 MAPK sinyal ileti yolakları ROS ile artmakta, hücreleri oksidatif stres hasarına karşı korumaktadır. Li H. ve arkadaşlarının⁹⁷ yaptığı bir çalışmada, yüksek glukozu bağı olarak oksidatif stresin arttığı gösterilmiş ve HGF muamelesi ile hasarın geri döndürüldüğü bildirilmiştir (Şekil 18).



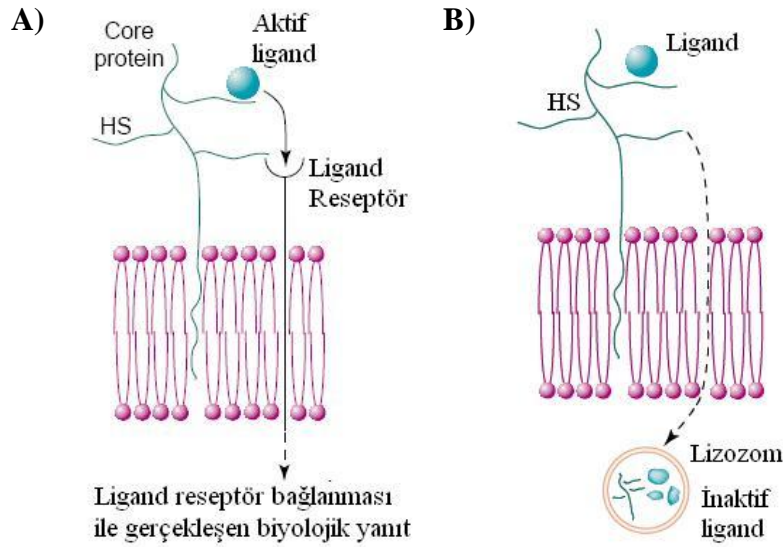
Şekil 18. ROS'ların hücre sağ kalımı ve apoptozu üzerine olan etki mekanizmaları⁹⁷

2.7 Heparin ve oksidatif stresteki rolü

Proteoglikanlar, bir kor proteinine bağlı glukozaminoglikan (GAG) zincirlerinden oluşan, lineer, sulfat yapıda, negatif yüklü proteinlerdir. Hiyaluronik asidin dahil olduğu sulfat yapıda olmayan GAG'lar, kondroitin sulfat (CS), dermatan sulfat (DS), keratan sulfat

(KS), heparan sülfat (HS) ve heparinin dahil olduğu sülfat yapıda olan GAG'lar grubu olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar⁹⁸.

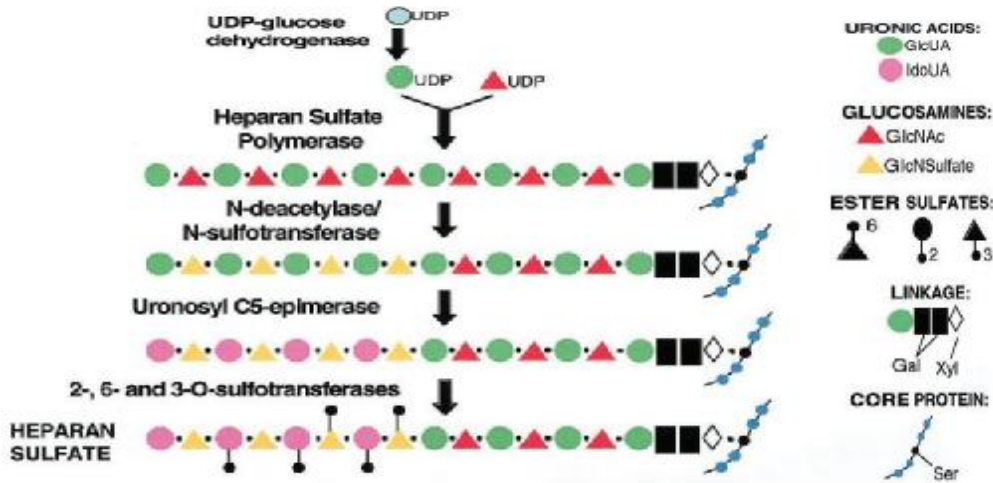
Heparan sülfat bütün hayvan türlerinde bulunan lineer bir polisakkarittir. İki veya üç HS zinciri şeklinde proteoglikan yapısında hücre yüzeyine veya hücre dışı matris çok yakın olarak bulunur. Proteoglikanlar, bir kor proteinine bağlı glukozaminoglikan (GAG) zincirlerinden oluşan, lineer, sülfat yapıda, negatif yüklü proteinlerdir⁹⁹. Bu yapıda iken birçok protein liganda bağlanır ve gelişim, anjiyogenez, kan koagülasyonu ve tümör metastazı gibi biyolojik süreçleri kontrol eder¹⁰⁰. Glipikan ve transmembran sindekan iki majör hücre membran heparan sülfat proteoglikandır¹⁰¹. Hücre dışı matrisde özellikle de bazal membranda perlekan, agrin ve kollajen XVIII çekirdek proteinleri bulunmaktadır¹⁰². Hücre yüzeyinde bulunan HSPG'lar büyüme faktörü ve kemokin sinyal iletimini, koagulan faktör aktivitesi gibi süreçlerin düzenlenmesinde rol alır. Hücre dışı matrisde bulunan HSPG'lar ligandın aktif formda tutulmasını sağlayarak biyolojik yanıtın gerçekleştirilmesini sağlarlar (Şekil 19-A). Aynı zamanda hücre içine alınan ligandın katabolik yollarla yıkımında HSPG'lar üzerinden olabilmektedir¹⁰³ (Şekil 19-B).



Şekil 19. A) HSPG'ların ligandı aktif konformasyonda tutuyor. Ligand reseptör bağlanması ile gerçekleşen biyolojik yanıtı sağlıyor. B) Hücre içine alınan ligandın katabolik yolla yıkımına aracılık ediyor¹⁰³.

Heparan sülfat karbohidratların glukozaminoglikan ailesinin bir üyesi olup heparin ile yapısal olarak benzemektedir. Her ikisi de değişken sülfat grupları ve tekrarlayan disakkarit ünitelerinden oluşur. Heparan sülfat yapısında en genel tekrarlayan disakkarit ünitesi glukuronik asit bağlı N-asetilglukozamindir. Heparin ile karşılaştırıldığında, heparinin yapısında iduronik asit ve N sülfoglukozamin barındırmaktadır¹⁰⁴. Bir çok farklı hücre tipi HS zincirlerini üretebilmektedir. Süreçte rol alan enzimler glukoziltransferaz, sulfotransferaz ve epimerazdır. Heparin sentezinde de benzer süreç gözlenmektedir¹⁰⁵.

HSPG'lar çekirdek proteinine yakın bölgede bir çok HS zinciri içerir. Öncül HS, heparan adı verilen α -bağlı N-asetil(GlcA) veya N-sülfoglukozamin(GlcNSO₃⁻) tekrar zincirlerinden oluşmaktadır. Keratan sülfat dışındaki birçok disakkarit tekrar zincirleri amino şeker ve uronik asit içerir. Biyosentez için, her basamağın ürünü bir sonraki basamak için substrat görevi görür. HS bağlanıçta, direkt olarak bir çekirdek proteini üzerinde sentezlenmektedir. Protein-glukozaminoglikan bağı ise GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser tetrasakkaridinin oluşması ile sağlanır. Sülfat yapıda olmayan bu öncül heparan molekülü çeşitli enzimlerin yardımı ile olgun HS proteoglikan yapısını alır. N-deasetilaz enzimi, ilk olarak GlcNAc rezidülerindeki N-asetil yapının deasetilasyonu ve sülfat gruplarının ekler. Sonraki basamaklar ise, GlcNSO₃⁻'nin yakınında bulunan GlcA'nın L-Iduronik aside ve L-Iduronik asidin ise protein tanınması için elzem olan N-sülfat yapısını kazanması ile devam eder. Uronik asidin 2-O pozisyonu ve glukozaminin 6-O ve 3-O pozisyonları sıklıkla modifikasyona uğrayan bölgelerdir¹⁰⁶ (Şekil 20).



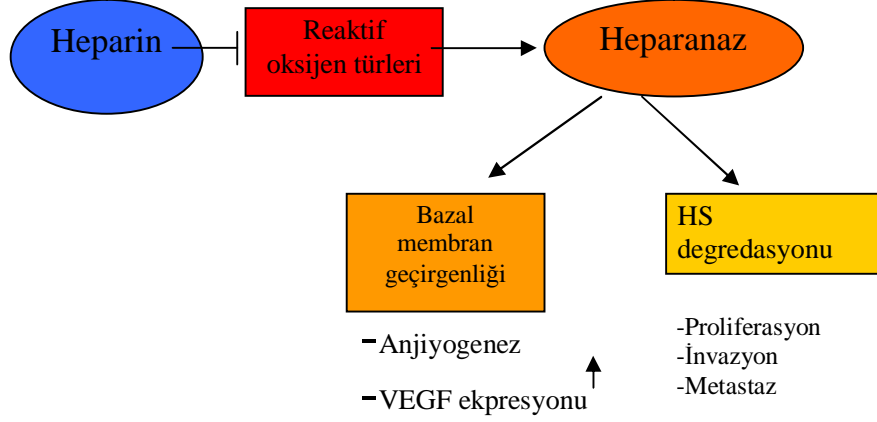
Şekil 20. Öncül heparan disakkaridinden olgun HS yapısının oluşması¹⁰⁶

Hücre kültürü ve biyokimyasal alandaki konu ile ilgili ilk çalışmalar, HSPG'ların büyüme faktörlerine ko-reseptörler gibi rol aldıklarını göstermiştir. Hücre dışı matrisinde veya hücre yüzeyinde bulunan, net pozitif yük taşıyan ve korunmuş aminoasit dizisi içeren bir çok molekül, HS zincirleri ile elektrostatik etkileşim kurabilir.

Heparin, yüksek düzeyde sülfat grupları içeren, antikoagulan özellik gösteren ve bilinen en negatif yüklü moleküldür. Glukozaminoglikan ailesinin bir üyesi olan heparin, değişken sülfat grupları ve tekrarlayan disakkarit zincirlerinden oluşur¹⁰⁷. Mast hücreleri içerisinde salgı granülleri olarak depolanır ve doku incinmesi sırasında hedef dokuya salınır. Heparan sülfat proteoglikanlar ile ilgili yapılan çalışmalarda heparin kullanılmaktadır. Özellikle büyüme faktörlerine bağlanabilmesi nedeni ile kanser gelişiminde son derece önemli bir rol oynamaktadır. Heparin büyüme faktörlerinin reseptörlerine sunulmasını sağlayarak, büyüme faktörlerinin oluşturduğu yanıtın artmasına yol açabilmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, düşük molekül ağırlıklı heparin(LMWH)'in peroksidatif hasara karşı eritrosit membranını koruduğu yönündedir¹⁰⁸. Sela S. Ve arkadaşlarının¹⁰⁹ yaptığı bir çalışmada renal hastalığa sahip kişilerde oksidatif stres geliştiği, lipid peroksidasyonunun arttığı, antioksidan sistemin ise çalışmadığı kaydedilmiştir. Heparin varlığında ve yokluğunda hücrel reaktif oksijen düzeyi incelenmiştir. Sonuçta Heparinin oksidatif stresi baskıladığı gösterilmiştir. Weigert ve arkadaşlarının¹¹⁰ yaptığı çalışmada ise böbrek mezengial hücrelerinde yüksek glukozaya bağlı olarak gelişen oksidatif stresin ve TGFβ1 gen ekspresyonunun heparin ile engellendiği yönündedir.

Heparanazlar, kanser sürecinde proliferasyon, metastaz ve invazyon gibi biyolojik süreçler için önemlidir. Heparanazlar, bazal membranda bariyer görevi gören heparan sülfat (HS)'ların degradasyonunda rol oynayan endoglukuronidazlardır. Aynı zamanda heparan sülfatlar Heparinin bağlanabildiği büyüme faktörleri için bir depo görevi görürler. HS'ların heparanazlar tarafından degradasyonu bu büyüme faktörlerinin ortama salınmasına sebep olur. Yapılan çalışmalar oksidatif stresin HS'ları degrade edebildiğini göstermiştir. Endotel hücreleri kullanılarak yüksek glukoz tarafından uyarılan bazal membran geçirgenliğinin ve glukozaminoglikan'lar üzerindeki etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada, yüksek glukozun bazal membranda azaldığı gösterilmiştir. Dolayısı ile yüksek glukoz düzeylerinin uyardığı oksidatif stres hasarı heparan sülfat proteoglikan degradasyonuna sebep olabilmektedir. Heparin varlığında GAG'ların degradasyondan korunduğu ve sentezlerinin arttırıldığı gösterilmiştir (Şekil 21)



Şekil 21. Oksidatif stres artışına bağlı olarak gelişen biyolojik süreçler ve Heparinin etkisi.

Bu bilgiler ışığında heparin ve HGF/cMET sinyal ileti yolağı arasındaki ilişki tam bilinmemektedir. TXNIP'in oksidatif stresi arttırdığı bilinmektedir. Hüresel stres ortamında apoptoz yanıtının uyarılmasına ek olarak HGF/cMET sinyal ileti yolağı gibi yolaklar aktive olmakta hücre ROS hasarına karşı korunmaktadır. Bu mekazinmada heparinin rolü ise hiç tanımlanmamış bir veridir. Çalışmamız kapsamında HCC hücre dizilerinde bu mekanizmanın anlaşılması amaçlandı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hücre kültürü

Çalışmada kullanılan hepatoselüler karsinoma hücre hatları (SNU-475, Huh7, HepG2, Hep3B, Mahlavu, SK-Hep1, SNU-398, SNU-449, PLC/PRF-5) Bilkent Üniversitesinden Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından sağlanmıştır. SNU-398, SNU-449, SNU-182, SNU-423, SNU-387 ve SNU-475 hücre hatları, %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom, S0125), 2 mM L-glutamin (Biological Industries, 03-020-1C), 100 u/ml penisilin (Biological Industries, 03-031-1C) ve 0,1 mg/ml streptomisin (Biological Industries, 03-031-1C) içeren RPMI-1640 (Biological Industries, 01-104-1A) içerisinde, diğer hücre hatları ise aynı miktarlarda FBS, L-Glutamine, penisilin ve streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biological Industries, 01-050-1A) içerisinde kültüre edilmiştir.

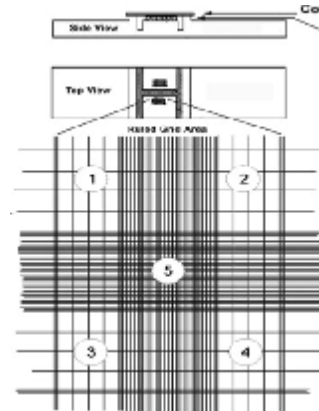
Hücrelerle ilgili tüm işlemler laminer kabinet (Aura Vertical S.D.4, C5681) içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin inkübasyonu ise 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde (Heal Force, HF90) yapılmıştır. Hücreler %70 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi yapılmıştır ve hücreleri kaldırmak için Tripsin/EDTA (%0.05/%0.02, Biological industries, 03-051-5B) solüsyonu kullanılmıştır.

3.2 Hücre sayımı ve canlılık testi

Kültürde üretilen hücrelerin ortamları uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile iki kere yıkandılar. 1X Tripsin-EDTA solüsyonu ile hücreler kaldırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonundan 50µl alınarak tripan mavisi (Biological industries, 03-102-1B) ile karıştırıldı ve hücreler Neubauer lamında 10 farklı alanda hemositometrik olarak sayıldı ve yaklaşık hücre sayısı bulundu. (Şekil 22) 50µl hücre süspansiyonu + 100µl 1X PBS + 100µl tripan mavisi

Hücre sayısı,

$$\frac{\text{Toplam hücre}}{10} * \text{dilüsyon faktörü} * 10^4 = \text{Hücre/mL}$$



10µl

Şekil 22. Hemositometrik olarak hücre sayımı

3.3 Heparin uygulaması

Heparin (Calbiochem katalog no: 375093.) stok solusyonu, 1mg/mL olacak şekilde 1X PBS içerisinde çözülerek kullanıldı. Hücrelerin ortamları uzaklaştırıldı. İki kere PBS (1X) ile yıkanan hücreler %2 FBS'li ortamda 16 saat serum açıklığına bırakıldıktan sonra 1, 10, 100, 1000µg/mL heparin dozları ile uyarım yapıldı. Heparin, 5', 15', 60', 120', 4h, 8h, 16h, 24h sürelerde uygulandı.

3.4 HGF uygulaması

HGF Dr. Donald P.Bottaro' dan (NIH, NCI, Bethesda, MD) sağlandı. Hücrelerin ortamları uzaklaştırıldı. İki kere PBS (1X) ile yıkanan hücreler %2 FBS'li ortamda 16 saat serum açıklığına bırakıldıktan sonra stok konsantrasyonu 2300ng/µl olan HGF'den, 5ng, 10ng, 20ng ve 40ng/ml konsantrasyonlarında Tris-BSA içinde sulandırılarak, 5', 15', 60', 120', 4h, 8h, 16h, 24h sürelerle uyarım yapıldı.

3.5 Hipoksi uygulaması

Anaerob ortam sağlamak için demir iyonları, sitrik asit, sodyum bikarbonat içeren hipoksi poşetleri kullanıldı (Anaerocult® A (Merck 1.13829). Kimyasal bileşimin konulduğu özel kâğıda, ilave edilen suyun tam olarak difüzyonuna, atmosferik oksijenin kimyasal olarak bağlanmasına ve CO₂ çıkmasına olanak sağlayan sistemde oksijen azalırken, CO₂ miktarı artar. Hipoksi uygulaması öncesinde hücreler hücre kültürü kaplarına 50.000 hücre/ml olacak şekilde ekildi. Hücreler %70 yoğunluğa ulaştıkları zaman önceden 4ml distile su ile ıslatılmış olan hipoksi poşetleri içerisine yerleştirildi, poşetlerin ağızları sealer (MtM Impulse Sealer) ile yapıştırıldı ve 2h, 4h, 6h, 8h, 16h, 24h boyunca hipoksik strese maruz bırakıldı. Hipoksi sonrası yeniden oksijenlenme ise hücrelerin 24 saat hipoksik strese maruz kalmalarını takiben 30', 60' ve 120' olarak uygulanmıştır.

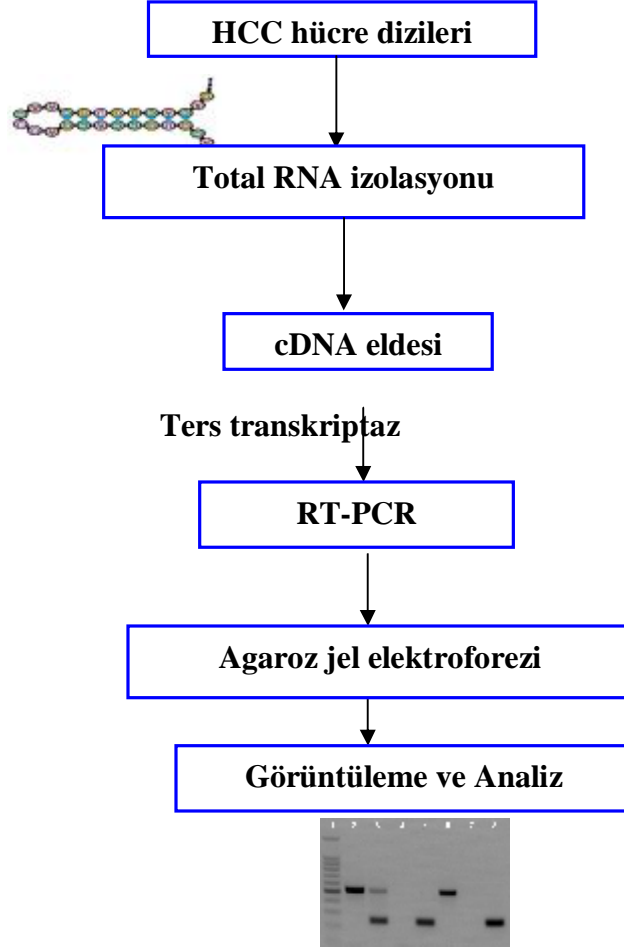
3.6 Glukoz Uygulaması

Doz ve zaman bağımlı glukozun TXNIP ve hedef genlerin transkripsiyonlarına olan etkisini inceleyebilmek amacıyla hücrelere doz ve zaman bağımlı glukoz uyarımı yapılmıştır. Hücreler 50.000 hücre/ml olacak şekilde hücre kültürü kaplarına ekilmiştir. Hücreler %70 yoğunluğa ulaştıkları zaman 1X steril PBS ile iki defa yıkanarak, hiç glukoz içermeyen %2 FBS içeren ortamda serum ve glukoz açıklığına bırakıldılar. Daha sonra 30', 60', 2h, 4h, 6h, 12h, 24h sürelerde 5mM (1000mg/mL glukoz içeren DMEM, Biological Industries, 01-050-

1A) ve 22,5mM (4500mg/mL glukoz içeren DMEM, Sigma, D5671) ile glukoz uyarımı yapılmıştır.

3.7 Gen transkripsiyonlarındaki Değişimin RT-PCR ile incelenmesi

HCC hücre dizilerinde gen transkripsiyonu analizi RT-PCR ile, aşağıdaki basamaklarda gerçekleştirildi (Şekil 23).



Şekil 23. Gen transkripsiyonlarındaki Değişimin RT-PCR ile incelenmesi

3.7.1 Total RNA izolasyonu:

Total RNA izolasyonu Guanidinyum Tiyosiyanat-Fenol-Kloroform Yöntemi ile gerçekleştirildi. Bunun için tripsin ile kaldırılan hücreler trypan blue ile boyandıktan sonra hemositometrik olarak sayılarak 200,000hücre/ mL olacak şekilde 60mm'lik hücre kültürü kaplarına ekildiler. (Greiner CellStar, 633 171) %70 yoğunlukta olduklarında hücrelerden aşağıdaki basamakları izleyerek total RNA izolasyonları yapıldı. RNA izolasyonu öncesinde kullanılan tüm endorflar ve hücre kazıyıcıları %0,1 DEPC (Applichem, 0881) ile muamele edilmiş distile su içerisinde 24 saat bekletildikten sonra otoklavlanarak DEPC'den arındırıldı.

1. Hücreler buz üzerine alındı ve ortamları çekilerek soğuk 1X PBS ile 3 kez yıkandı.
2. Hücrelerin üzerine uygun miktarda (1mL) Trizol kimyasalı (RNAtidy G, Applichem, A2867-0200) eklendi ve bir hücre kazıyıcı (Costar Cell scraper, 3010) ile hücreler kazındı.
3. Soğuk ependorflar içine alınan hücre solüsyonu üzerine 200µL kloroform (Sigma, C-2432) eklendi ve buz üzerinde bekletildi, organik ve sulu fazın ayrışması için 12,000 rpm' de santrifüj edildi. (Eppendorf Centrifuge, 5415R).
4. RNA'ları içeren sulu faz yeni bir tüpe alındıktan sonra RNA'ların presipitasyonu için eşit hacimde izopropanol (Applichem, A3928) eklendi ve -20 °C'de bir gece inkübe edildi.
5. Presipite olan RNA'lar 12,000 rpm de 15 dk. santrifüjlenerek çöktürüldü, %75'lik DEPC ile muamele edilmiş distile suyla (Research genetics, 1-800-533-4363) hazırlanan etanol (Applichem, A3678) ile 2 kez yıkama yapıldı ve son yıkamadan sonra çöktürülen RNA pelleti etanolün uzaklaşması için kurumaya bırakıldı.
6. Kuruyan RNA pelleti 50 µl RNaz'dan arındırılmış pH'ı 8'e ayarlanmış dH2O içerisinde çözüldü. Bu RNA'ların bir kısmı spektrofotometrik ölçüm için kullanıldı. Geri kalanı ise cDNA sentezi için kullanıldı.

3.7.2 RNA miktarının Ölçümü:

RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayinleri 260nm ve 280nm'deki absorbansları Picodrop (Picodrop, Picopet01) ile spektrofotometrik olarak saptandı.

RNA konsantrasyonların belirlenmesi için

$A^{260} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 40 = 1\text{ml'deki RNA miktarı (g)}$ formülü kullanıldı(A).

A^{260}/A^{280} oranından faydalanarak RNA saflık değerleri elde edildi. En iyi sonuç için RNA'ların saflıkları 1.6-1.8 arasında olmasına dikkat edildi. Protein veya DNA bulaşı olan RNA'lar saflaştırıldı.

3.7.3. cDNA sentezi

Hücre dizilerinden total RNA izole edilip konsantrasyonları ve kalitesi belirlendikten sonra son konsantrasyonu 2 µg olacak şekilde RNA ile TabloX de listelenen malzemeler kullanılarak cDNA sentezlendi. (MBI Fermentas marka K1622). Bu amaçla total RNA, random primer, Oligo(dT) primer ve DEPC ile muamele edilmiş distile su içerisinde hazırlandıktan sonra 70 °C'de 5 dk. inkübe edildi. Daha sonra karışıma reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü ve dNTP eklendi, 37 °C'de 5 dk. inkübe edildi. En son "M-MuLV Reverse Transcriptase" eklendi ve 42 °C'de 60 dk. inkübe edilerek ilk-zincir cDNA sentezi

bir termal döngüleyici (Techne TC-312) içerisinde yapıldı. Tüpler 70 °C'de 10 dk. inkübasyon ile reaksiyon sonlandırıldı.

Tablo1. cDNA sentezinde kullanılan malzemeler ve konsantrasyonları

Malzeme Adı	Stok konsantrasyonu	Son konsantrasyonu
Ribolock RNase	200 U/ µL	0,2 U/ µL
Ters transkriptaz	200 U/µL	0,2 U/ µL
5X reaksiyon tamponu	5X	1X
dNTP karışımı	10mM	0.5 mM
Oligo(dT) primer	0.5 µg/ µL	0.2 µg/ µL
Random hekzamer primer	0.2 µg/ µL	0.2 µg/ µL
Kontrol RNA	0.05 µg/ µL	1 µg/ µL
DEPC ile muamele edilmiş distile su		

3.7.4. cDNA Kalıplarından Spesifik Primerler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İlk-zincir cDNA sentezlendikten sonra bu cDNA'lar (her bir cDNA reaksiyonundan 2 µl) kalıp olarak kullanılarak ilgilenilen gene spesifik primerler aracılığıyla PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Primerler gen bankasında yer alan diziler üzerindeki korunmuş bölgelere özgü olacak ve ekson kesişim bölgelerini tanıyacak şekilde "IDT" programı (www.idtdna.com) ile tasarlandı. İnternal kontrol olarak da karaciğere spesifik bir housekeeping gen olan RPL41 genine spesifik primerler kullanıldı¹¹⁸. Çalışmada kullanılan primer dizileri aşağıdaki gibidir (Tablo 2).

Tablo 2. RT-PCR'da kullanılan spesifik primerler

	Entrez ID	İleri 5'-3'	Geri 5'-3'	
TXNIP	10628	TCTATCCTGGGCTGCAACATCCTT	TTGGGCTCTCCAATCGGTGATCTT	256bp
RPL41	6171	AACCGCTAGCTTGTTGCACT	TCCAGAATGTACAGGTCCA	225bp
cMet	4233	CAGCCACACTGAACAAAGGGTG	CTACCCTACCAATAACTCAACCAAA	582bp
GLUT2	6514	TGCAGTTTGGCTACAACATCGGAG	GCCAGCAGGTTTCATCATCAGCATT	238bp
HIF1α	3091	TTTTACTATCCCCAGATTC	ATTCATCAGTGGTGGCAGTG	417bp
VEGF	7422	CGAAACCATGAACCTTCTGC	TGGTGATGTTGGACTCCTCA	317bp

Tabloda gösterilen genlere spesifik primerler kullanılarak, her bir gen için ayrı ayrı MgCl₂, primerlerin bağlanma sıcaklığı (annealing), primer konsantrasyonları için optimizasyon yapılmıştır. Optimizasyonlar sonrası belirlenen koşullar tablo 3 de verilmiştir.

Tablo 3. RT-PCR' da kullanılan primerler ve optimum çalışma koşulları

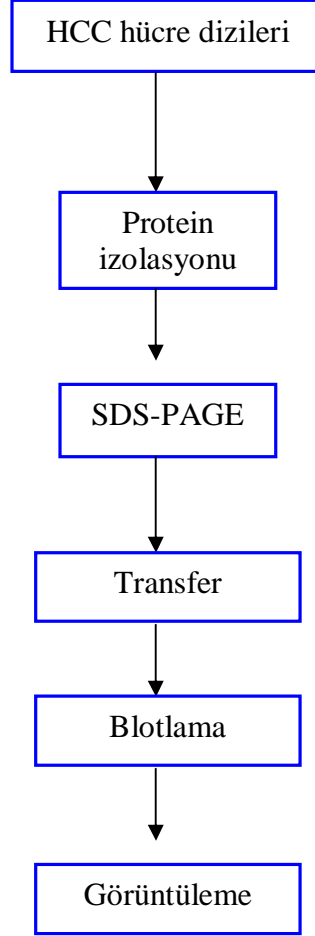
	TXNIP	RPL41	HIF1α	VEGF	GLUT2	cMet
dNTP	0.2mM	0.2mM	0.2mM	0.2mM	0.2mM	0.2mM
MgCL₂	1mM	1.5mM	1.5mM	1.5mM	1.5mM	1.5mM
Primer	1pmol/ μ L	1pmol/ μ L	0.5pmol/ μ L	0.5pmol/ μ L	0.1pmol/ μ L	1pmol/ μ L
Taq polimeraz	1.25U	1.25U	1.25U	1.25U	1.25U	1.25U
İlk denatürasyon	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C
Denatürasyon	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C
Bağlanma	56 °C	55 °C	50 °C	50 °C	60 °C	°C
Uzama	72°C,30sn	72°C,30sn	72°C,40sn	72°C,40sn	72°C,40sn	72°C,40sn
Döngü sayısı	30	28	30	30	30	30
Son uzama	72°C,10dk	72°C,5dk	72°C,7dk	72°C,7dk	72°C,10dk	72°C,7dk

3.7.5 RT-PCR ile elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ve görüntülenmesi

Belirtilen deney koşullarında elde edilen ürünlerin yürütülmesi ve görüntülenmesi için 40 ml TAE tamponu içerisinde hazırlanan %2'lik agaroz (Applichem, 5510UB) jel kullanıldı. Jel içerisine 0,2 μ g etidyum bromür (Sigma, E-8751)'de eklendi. PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünlerin herbirinden 10'ar μ l alınarak 2 μ l 6X yükleme tamponu (Fermentas, R1151) ile karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklendi. Bantlar açılana kadar (30-60 dk) 90 V'luk gerilim uygulanarak örnekler TAE ile dolu elektroforez tankında (Thermo) yürütüldü. Daha sonra amplifiye edilmiş olan DNA'lar transillüminatör (Stratagene, Eagle Eye II) ile UV ışığı altında incelendi. Elde edilen görüntü "Image J" programı kullanılarak dansitometrik olarak değerlendirildi.

3.8 Gen ekspresyonlarındaki değişimin incelenmesi: ‘‘Western blot’’

Hedef genlerin ekspresyonu düzeyleri Western blotting yöntemi ile aşağıdaki basamaklarda gerçekleştirildi (Şekil 24).



Şekil 24. Gen ekspresyonlarındaki değişimin incelenmesi: ‘‘Western blot’’

3.8.1 Total protein izolasyonu: 100mm’lik hücre kültür kabına Tripan mavisi ile sayılarak ekilen hücreler %70 yoğunluğa ulaştığında, %2 FBS içeren standart ortam içerisinde 16 saat serum açlığına maruz bırakıldı. HGF, heparin, glukoz gibi uyarımlar ile optimum doz ve sürelerde inkübasyon sonrasında, buz üzerine alınan hücrelerin ortamları uzaklaştırıldı ve soğuk PBS ile 2-3 kez yıkandı. 1 ml PBS içerisine hücre kazıyıcı (Costar Cell Scraper, 3010) ile kazındı ve 1.5 ml’lik tüpler içerisine alındı. Hücreleri çöktürmek için 1,500 g’de 5 dk santrifüjasyon yapıldı (Eppendorf Centrifuge, 5415R). Süpernatandaki PBS atıldıktan sonra hücre pelleti hacminin üç katı kadar lizis tamponu (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, %1 NP-40, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1

mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄) eklenerek tüpler buz üstünde protein ekstraksiyonu için 3-4 dakikada bir vorteksenerek 20-30 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda tüpler hücre debrislerinin uzaklaştırılması için 15,000 g'de 30 dk santrifüj edildi. Proteinleri içeren süpernatant yeni bir tüpe alındı ve protein miktarının belirlenmesi aşamasına geçildi.

3.8.2 Protein Miktarlarının Belirlenmesi:

Protein miktarlarının belirlenmesi için Pierce marka "BCA protein assay kit" (Pierce, 23225) kullanıldı. Standart eğrinin çizilebilmesi için 0, 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 µg BSA (Pierce, 23209) ve elde edilen hücre lizatları kitin kullanım yönergesi doğrultusunda kit bileşenleri ile hazırlanan 100µL reagen ile 1,5mL ependorfların içerisinde birleştirildi. İndirgenme tepkimesinin oluşması için 42 °C'de 5 dk inkübe edildi. Daha sonra protein konsantrasyonuyla birlikte artan BCA/bakır kompleksi 562 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sığır serum albumini (BSA) konsantrasyonlarına bağlı olarak çıkan ölçümler standart grafiğin çizilmesinde kullanıldı ve örneklerin bu standart grafiğe göre ne kadar protein içerdiği hesaplandı.

3.8.3 Proteinlerin SDS-PAGE poliakrilamid jelde yürütülmesi

TXNIP, için %10'lik, c-Met için ise %8'lik ayrıştırıcı(resolving) poliakrilamid jeller kullanıldı. İstifleyici (Stacking) olarak da %5'lik jel kullanıldı (Tablo 4).

Tablo 4. Poliakrilamid jel içeriği

	%8'lik jel (10mL)	%10'luk jel (10mL)	%5'lik jel (5mL)
dH ₂ O	4,6	4,0	3,4
%30'luk akrilamid	2,7	3,3	0,83
1.5 M Tris-Cl, pH 8.8	2,5	2,5	0,63*
%10 SDS	0,1	0,1	0,05
%10 amonyum persulfat	0,1	0,1	0,05
TEMED	0,006	0,004	0,005

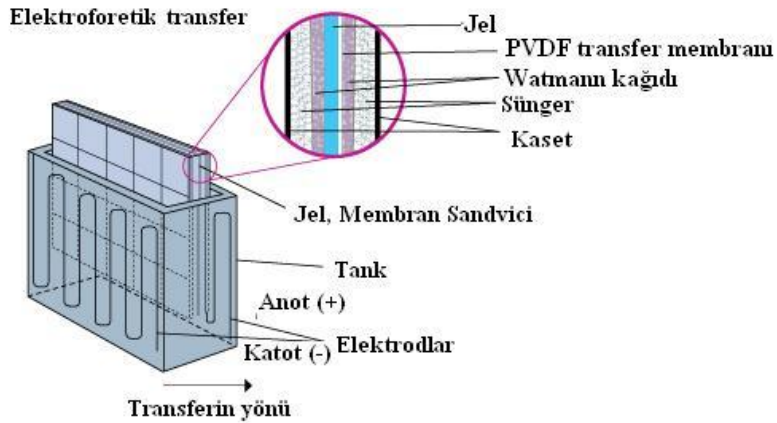
*%5'lik jel için 1 M Tris-Cl, pH 6.8 kullanılmıştır.

Her bir protein için optimize edilem miktarda total protein alındı ve bu proteinlerin denaturasyonu için %20 oranında β -merkaptoetanol (Sigma, M-7154)içeren 4X yükleme tamponu (Applichem, A3484) ile eşit hacimde karıştırılarak 95 °C'lik su banyosunda 7dk. inkübe edildi. Kaynatılan protein örnekleri yükleme işlemine geçilene kadar oda sıcaklığında bekletildi. Elektroforez tankının (BioRad) içerisine Tris-Glisin elektroforez tamponu ("running buffer", 25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0.1 SDS) eklendi ve jeller uygun olarak yerleştirildikten sonra örnekler ince uçlu pipet uçları ile yüklendi. Aynı zamanda protein göçünü izleyebilecek nitelikteki belirteçlerden (protein marker) (MBI Fermentas, SM0441 ve SM0671) 4'er μ l yüklendi ve 70 V'luk gerilim uygulanarak paketleyici jeli geçmesi sağlandı, daha sonra proteinler ayırıştırıcı jelde 110 V'luk gerilim ile belirteçlerin bantları açılana kadar yürütüldü.

3.8.4 Poliakrilamid Jelde Yürütülen Proteinlerin PVDF Membranlara Transferi ve membranın bloklanması

3.8.4.1. Proteinlerin membrana transferi:

Elektroforez işlemi bittikten sonra jeller cam aparatlardan çıkartılarak taze hazırlanan Tris-Glisin transfer tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0.02 SDS, %20 metanol) içerisine alındı. PVDF membran (Millipore, IPVH15150) 40sn metanol içerisnde bekletilerek porlarının açılması sağlandı ve daha sonra transfer tamponu içerisine alındı. Bu tampon içerisnde bir kaset içerisine sırasıyla sünger, "Whatmann" kağıdı, jel, PVDF membran, "Whatmann" kağıdı ve sünger olacak şekilde yerleştirildi. (Şekil 25).



Şekil 25. Membran, Jel ve Watmann kağıtlarından oluşan sandviç

Kaset kapatıldıktan sonra transfer tankının içerisine yerleştirildi.. 300 mA'lik akımda 3 saat transferde tutuldu ve daha sonra proteinlerin jelden üzerine geçtiği membran çıkartıldı. Transfer sonrasında jeller "Comassie mavisi" ile boyandı.

3.8.4.2. Blotlama:

Transferden alınan membran kullanılan antikor için uygun bloklama solüsyonu içerisine alınarak optimize edilen sürelerde +4°C'de veya oda sıcaklığında bloklamaya bırakıldı.

3.8.4.3 Primer ve sekonder Antikorlar:

Bloklama solüsyonundan alınan membranlar optimize edilen dilüsyonlarda primer antikor ile muamele edildi. Anti-TXNIP () , Anti-pAkt, Anti-Akt, nAnti-pMet, Anti-Met, Anti-pFOXO1, Anti-PTEN, Anti-p42p44 antikorları kullandı. Bloklayıcı ajan olarak her antikora uygun %0,1- 0,5 lik Tris-tamponlu-tuz solusyonu-Tween20 (TBS-T=Tris-Buffered Saline Tween-20) içinde hazırlanmış %5-10 yağsız süt tozu (NFMP) kullanıldı. Primer antikor dilüsyonları antikora uygun olarak optimize edilen konsantrasyonda %3 NFMP veya %3 sığır serum albumini (BSA) içeren %0,5 TBS-T ile yapıldı ve inkübasyonlar +4°C de gece boyu olacak şekilde gerçekleştirildi. Sekonder antikor olarak Pierce firmasının Anti-fare (1858415) veya anti-tavşan (1858414) antikorları kullanıldı. Antikorlar %3 NFMP, %0,5 TBS-T ile 1:1000-1:5000 oranında sulandırılarak +4 C, gece boyunca uygulandı. Kullanılan antikorlar, dilüsyonlar ve antikorların hazırlandığı solüsyonlar ekte sunulmuştur.

3.8.4.4 Proteinlerin membran üzerinde saptanması:

Sekonder antikordan alınıp, yıkama işlemi tamamlanan membranların, görüntülenmesi için sekonder antikorlara bağlı olan peroksidaz enzimlerinin substratını parçalaması esasına dayanan ve sonuçta modifiye substrattan oluşan kimyasal ışımının film üzerinde saptanması temeline dayanan kemoluminisans (Pierce-RPN2108) görüntüleme yöntemi kullanıldı. Üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlanan karışım membran üstüne, membranı kaplayacak miktarda yayılarak 2-3 dk bekletildi. Membranlar ışık geçirmeyen bir kaset içine alındıktan sonra üzerlerine kemilüminesansa duyarlı filmler (Kodak, 5256441) koyulup uygun sürelerde beklenerek protein bantları görüntülendi. Filmlerin banyosunda

ticari olarak satın alınan sırası ile geliştirici ve sabitleyici solüsyonlarında 1'er dakika bekletilerek protein bantları görüntülendi. Görüntüleme işlemi karanlık odada yapıldı.

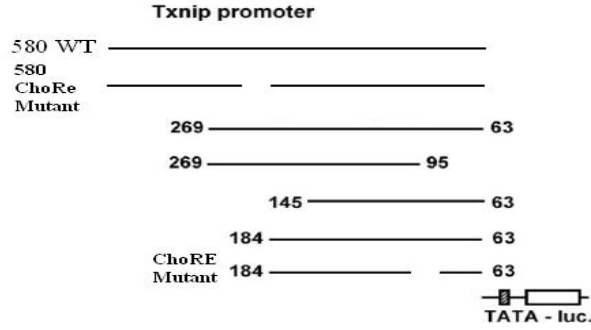
3.8.4.5 Commasie Mavisi Boyaması

Transfer işlemi ile poliakrilamid jelden PVDF membrana aktarıldıktan sonra, jel comassie mavisi boyama solüsyonuna aktarılır. Solüsyon içerisinde bir gece sallamalı karıştırıcıda bekletilen jel, daha sonra boya-uzaklaştırıcı (de-staining) solüsyonuna alınarak zemindeki boyanın fazlası giderildi.

3.9 TXNIP transkripsiyonel aktivitesinin belirlenmesi

3.9.1 Lusiferaz reporter assay:

Çalışmamızda TXNIP'in transkripsiyonel aktivitesinin belirlenebilmesi için kullanılan vektörler Dr. Yan Luo (IMCB, Singapore)'dan sağlanmıştır (Şekil 26). Vektörler kompetan E-coli DH5 α (Invitrogen) hücresine aktarılmıştır.



Şekil 26. TXNIP promotörünün farklı uzunluklardaki yabancıl ve mutant formları

Transformasyon sonrası, vektör agarlı LB ortama ekildi.

3.9.1.1 Transformasyon:

Kompetan hücre E-coli DH5 α 'dan 100 μ l alınarak ependorfa aktarıldı. Kompetan hücrelerin üzerine 200ng plazmid eklendi. 30 dakika buz üzerinde bekletilen plazmid ve kompetan hücre karışımı, 42°C'lik su banyosunda 45 saniye bekletildi. Daha sonra 2 dakika buz üzerinde bekletilen karışımın üzerine 1M MgCl $_2$ 'den 50 μ l içeren 900 μ l SOB ortamı eklendi. 37°C'ye ayarlanan bakteri inkübatörü içerisinde 160rpm'de 1 saat inkübe edildi. Ampisilin içeren ve içermeyen Luria Broth (LB) veya Luria Bertani Broth sıvı ortamlarına ekim yapıldı. 37°C'ye ayarlanan bakteri inkübatöründe gece boyunca bırakıldı. Ampisilin içeren ortamda üreyen ve tek tek düşmüş kolonilerden bir koloni seçilerek 5ml LB ortamına

ekildi. Bakteri inkübatöründe 37°C ve 160rpm'de gece boyu inkübe edildiler. Ampisilinli LB ortamında çoğalan vektör içeren E-coli DH5 α hücrelerinin 1,5ml'si Miniprep plazmid DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Restriksiyon enzim kesiminden sonra, maksiprep plazmid DNA izolasyonu için 250ml ampisilin içeren LB ortamına ekim yapılmış, 37°C'ye ayarlanan bakteri inkübatöründe gece boyunca bırakılmıştır. Kullanılan ortamlar ve hazırlanışları tablo ek'de gösterilmiştir.

3.9.1.2 Miniprep plazmid DNA izolasyonu:

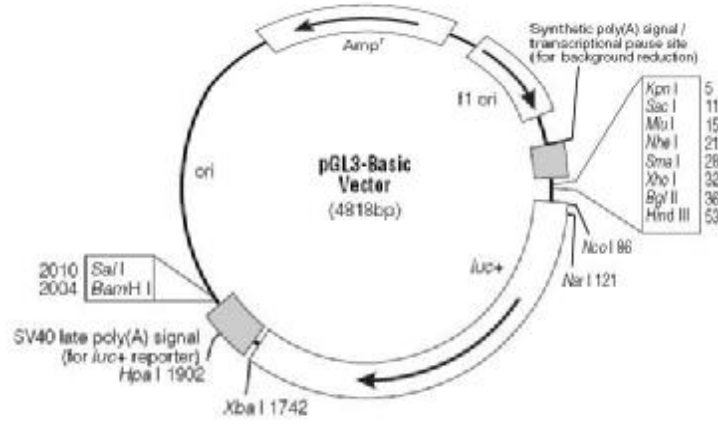
Uygulama basamakları,

1. 37°C'lik bakteri inkübatöründe 160rpm'de ve ampisilin içeren LB ortamında bırakılan bakteri kültüründen 1,5ml alınarak ependorfa aktarıldı.
2. Önceden +4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüj içerisinde 2500rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldı.
3. 100 μ l ALS-1 solüsyonu içerisinde resüspanse edilen pellet, kuvvetlice vortekslendi.
4. Taze hazırlanan ALS-2 solüsyonu ependorfa eklendi. Tüp 5 kere alt üst edildi.
5. 150 μ l önceden soğutulmuş ALS-3 solüsyonu ependorfa eklendi ve 5dk buz üzerinde inkübe edildi.
6. Tüpler +4°C ve 13000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.
7. Süpernatant üzerine eşit hacimli olacak şekilde Fenol-Kloroform-Izoamil alkol eklendi. Vortekslenen tüpler 13000rpm ve +4°C'de 5dk santrifüj edilerek üstteki şeffaf faz yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı.
8. %70 Etanol'den süpernatantın iki kat hacminde olacak şekilde eklendi kuvvetlice vortekslenen tüpler, 5' oda sıcaklığında inkübe edildi.
9. Tüpler +4°C ve 13000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
10. Pelletin üzerine %70 Etanol'den 1ml eklendi. Tüpler +4°C ve 13000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atılarak pellet kurumaya bırakıldı.
11. Pellet 50 μ l Tris-EDTA (pH 8,0) solüsyonu içerisinde çözüldükten sonra 260 ve 280nm'de saflık ve konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır.
12. Elde edilen plazmid DNA'larının restriksiyon enzim kesimleri yapılmıştır.

Miniprep plazmid DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar ve içerikleri ek'de gösterilmiştir.

3.9.1.3 Restriksiyon enzim kesimi:

1. Çalışmada kullanılan pGL3 vektörü 4818 baz çifti uzunluğundadır (Şekil 27). Restriksiyon enzim kesimi için 1µg plazmid DNA sı ve XbaI enzimi (Fermentas, Fast digest) kullanılarak 37°C de 1 saatlik inkübasyon ile tek bölgeden kesildi. Enzim aktivitesini sonlandırmak için tüpler 60°C’de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Örnekler %0,8’lik agaroz jelde 100V’ta 1,5 saat yürütülerek görüntülendiler.



Şekil 27. pGL3 lusiferaz reporter vektörü

3.9.1.4 Maksiprep plazmid DNA izolasyonu

Bir gece önceden 100µg/ml ampisilin içeren 250ml LB ortamında sallamalı bakteri inkübatöründe 37°C’de ve 160rpm’de inkübe edilen bakteri hücreleri 250ml’lik tüpe aktarıldı. Maksiprep plazmid DNA izolasyonu için ‘‘Invitrogen Hipure Plasmid DNA Purification Kit (K2100–02)’’ kullanıldı.

1. **Hücrelerin toplanması:** 250ml’lik tüpe aktarılan bakteri hücreleri 4000g’de 15dk santrifüj edildi ve ortam tamamen uzaklaştırıldı.
2. Tüpe 10ml Resüspanسیون tamponu eklendi ve hücre pelleti homojen bir hale gelene kadar resüspanse edildi.
3. Hücre süspanسیونu 50ml santrifüj tüpüne aktarıldı.
4. **Lizis:** Hücrelerin üzerine 10ml Lizis tamponu eklendi. Tüp 5 kere ters düz edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
5. 10ml presipitasyon tamponu eklendi. Tüp alt üst edilerek karıştırıldı.
6. 9000g’de 30 dakika santrifüj edildi.

7. DNA'nın bağlanması: Süpernatant daha önceden denge tamponu ile muamele edilmiş kolona aktarıldı. Hiçbir güç uygulanmadan karışımın kolondan yer çekimi yardımı ile geçmesi beklendi.
8. **Yıkama:** Kolona 60ml yıkama tamponu eklendi. Hiçbir güç uygulanmadan karışımın kolondan yer çekimi yardımı ile geçmesi beklendi. Toplama kabı atıldı.
9. **Elüsyon:** Kolon steril bir toplama kabına yerleştirildi. 15ml elüsyon tamponu kolona eklendi. Hiçbir güç uygulanmadan karışımın kolondan yer çekimi yardımı ile geçmesi beklendi. DNA yer çekimi ile kolondan toplama kabına indi. Kolon atıldı.
10. Tüpe 10,5ml izopropanol eklendi. Ters düz edilerek iyice karıştırıldı.
11. Önceden +4°C'ye ayarlanan soğutmalı santrifüj ile 9000g'de 1 saat santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
12. **Yıkama:** Tüpler 5ml %70 Etanol'de resüspanse edilir. +4°C'de ve 9000g'de 30 dakika santrifüj edildi. Dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet kurutuldu.
13. Kurutulan DNA pelleti 500µl TE tamponu içerisinde resüspanse edildi.
14. Elde edilen plazmid DNA'ları 260 ve 280nm'de saflık ve konsantrasyon ölçümü yapıldı. Örnekler -20°C'de saklandı.
15. Restriksiyon enzim kesimi yapıldı.

3.9.1.5 Transfeksiyon:

SK-Hep1 hücreleri 3×10^4 hücre/well ekim yapıldı. Hücreler ertesi gün pGL3-luc-580WT, pGL3-luc-580ChoReA mutant, pGL3-luc-TATA ve normalizasyonun yapılabilmesi için Renillia (pRLTK) ile transfekte edildi.

Transfeksiyon için;

1. Transfeksiyon ortamının hazırlanması, Transfeksiyon için 12 kuyulu hücre kültürü kaplarına, bir kuyu için 50 µl Optimem, 1 µg DNA olacak şekilde hazırlandı. Üzerlerine 2 µl Fugene (Roche, 04709705001), transfeksiyon reagenti eklendi. Vortekslenerek 15 dakika inkübe edildi.

2. 1 gün önce ekilmiş hücrelerin ortamı uzaklaştırılmadan oluşturulan transfeksiyon ortamından 50 µl her bir kuyuya eklendi.
3. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerin ortamı tamamen uzaklaştırıldı. PBS ile bir kere yıkanan hücrelerin üzerine hiç glukoz içermeyen %2 FBS'li ortam eklendi. 16 saat glukoz ve serum açlığında kalan hücrelere 22,5mM Glukoz ve 10 µg Heparin uyarımı yapıldı.

3.9.1.6 Lusiferaz ölçümü:

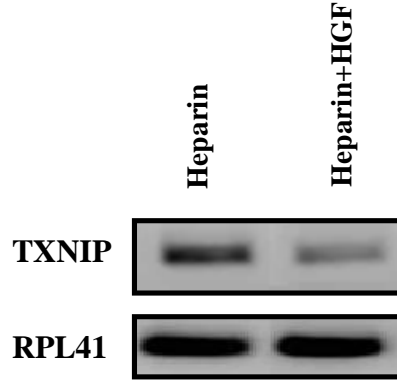
1. Belirtilen süre sonunda hücrelerin ortamları tamamen uzaklaştırıldı. 1X PBS ile iki kere yıkama yapıldı.
2. Hücrelerin üzerine 150µl lizis tamponundan eklendi ve 15 dakika sallamalı karıştırıcıda hücrelerin parçalanması sağlandı ve 1,5ml'lik ependorflara aktarıldı.
3. Ayrı tüplere 50µl lusiferaz assay tamponu (LARI) eklendi üzerine hücre lizatından 20 µl eklendi ve 5 saniye süre ile luminometrik ölçüm yapıldı.
4. Ependorflara 50 µl "Stop Glo" solüsyonundan eklenerek lusiferaz aktivitesi sonlandırıldı ve Renillia aktivitesinin başlaması sağlandı. 5 saniye süre ile luminometrik ölçüm yapıldı.
5. Renillia ölçümleri ile transfeksiyon etkinliği, BSA protein ölçümü ile de protein miktarı normalizasyonu yapıldı.

- Bu çalışma Etik Kurul'un 05 Şubat 2009 tarih ve 08/03/2009 no.lu toplantısında; 36/2009 Protokol numarası ile etik açıdan uygun görülmüştür.

4. BULGULAR

4.1. Mikrodizin ile tanımlanan TXNIP transkripsiyon değişiminin RT-PCR ile doğrulanması

Daha önce gerçekleştirdiğimiz mikrodizin analizlerinde, SK-Hep1 hücre dizisinde, heparin ve HGF'nin birlikte olduğu koşulda, sadece heparin olan koşula göre TXNIP ifadesinde iki kat azalma olduğu saptanmıştır. Mikrodizin verilerinin doğrulanması amacı ile SK-Hep1 hücre dizisinde, heparinin tek başına ve HGF ile birlikte uygulanmasının TXNIP transkripsiyonunu nasıl etkilediği incelenmiştir. Şekil 28 de görüldüğü gibi Heparinin tek başına olduğu koşullara göre HGF ile birlikte olduğu koşullarda TXNIP transkripsiyonu baskılanmaktadır. Bu sonuç mikrodizin verilerini doğrulamaktadır.



Şekil 28. Heparin ve HGF uygulamasının TXNIP transkripsiyonuna olan etkisi

4.2 Heparin veya HGF uygulamasının TXNIP ekspresyonuna etkisi

SK-Hep1 hücre dizisinde mikrodizin verilerinin doğrulanması sonrasında Heparin ve HGF uygulamasının TXNIP ekspresyonu üzerine olan etkileri sırasıyla doz ve zaman bağımlı olarak incelendi.

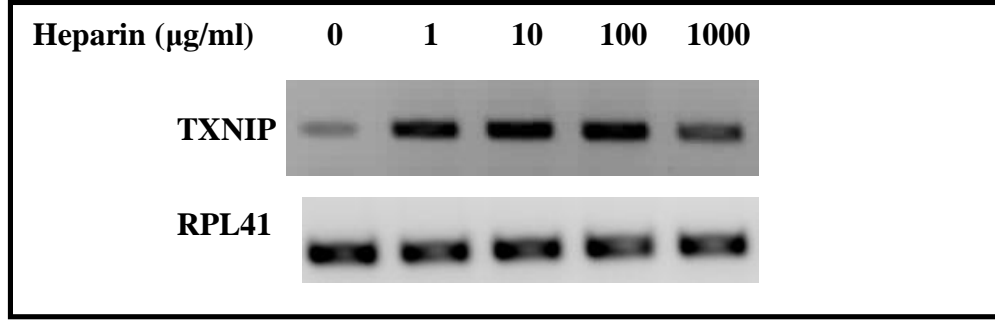
4.2.1 Heparin uygulamasının TXNIP ekspresyonuna etkisi

Heparinin farklı dozlarının TXNIP transkripsiyonu üzerindeki etkisini inceleyebilmek için SK-Hep1 hücrelerine 1, 10, 100, 1000µg/ml heparin uyarımı yapıldı. Ayrıca heparin uyarımından sonra geçen sürenin TXNIP transkripsiyonuna olan etkisinin anlaşılabilmesi için 0, 15dk, 30dk, 2h, 4h, 8h, 16h, 24h sürelerle heparin uyarımı yapıldı.

4.2.1.1 Heparin dozunun etkisi TXNIP ekspresyonuna etkisi

a-Transkripsiyon düzeyinde

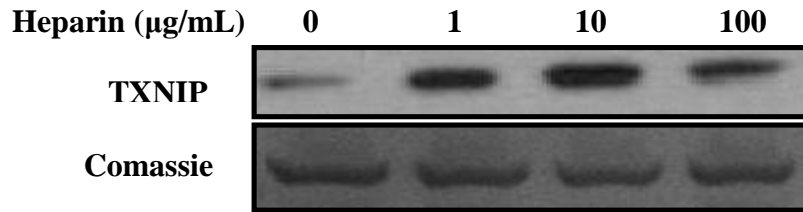
Tek başına heparin uygulaması yapıldığında, TXNIP transkripsiyonu heparin dozuna bağımlı olarak artmaktadır. Artış 1µg/ml ile başlamakta 10 ve 100 µg/ml olan koşullarda en yüksek düzeye ulaşmakta 1000 µg/ml koşulunda heparinin diğer dozlarına kıyasla azalmaktadır (Şekil 29).



Şekil 29. Farklı heparin dozlarının TXNIP transkripsiyonuna etkisi

b. Protein düzeyinde

Transkripsiyon düzeyinde Heparin uyarımı ile artan TXNIP ekspresyonunun, protein düzeyindeki değişimi western blot yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 30)

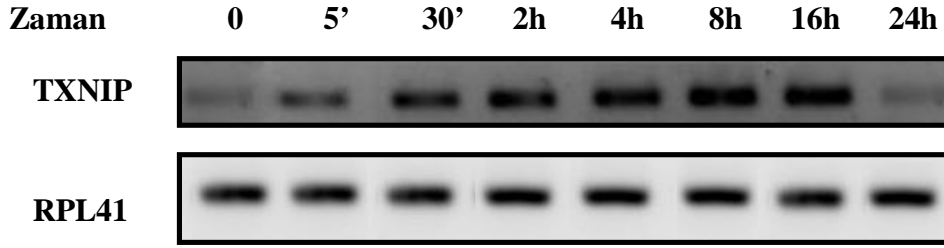


Şekil 30. Farklı heparin dozlarının TXNIP ekspresyonuna etkisi

Şekilde görüldüğü gibi Heparin doz bağımlı olarak TXNIP'in protein düzeyindeki ekspresyonunu arttırmaktadır. Artış transkripsiyon düzeyine benzer bir şekilde, 1µg heparin dozu ile başlamaktadır. 10µg'da ise TXNIP ekspresyonu en yüksek düzeye ulaşmakta, 100µg'dan sonra ise diğer heparin dozlarına kıyasla düşmeye başlamaktadır.

4.2.1.2. Heparin uygulamasından sonra geçen sürenin *TXNIP* transkripsiyonuna etkisi

SK-Hep1 hücre dizisinde heparin uyarımından sonra geçen sürenin *TXNIP* transkripsiyonuna olan etkisini inceleyebilmek için 10 μ g heparin dozu kullanılmıştır. Şekilde görüldüğü gibi heparin uyarımı zamana bağlı olarak *TXNIP* transkripsiyonunu arttırmaktadır. Artış 5. dakika ile başlamakta, 16. saate kadar artarak sürmektedir. 24. saatte ise bazal düzeye gerilemektedir (Şekil 31).



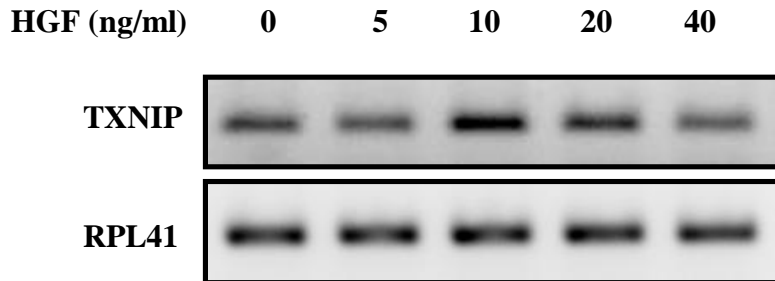
Şekil 31. Heparin uyarımından sonra geçen sürenin *TXNIP* transkripsiyonuna olan etkisi

4.2.2 HGF uygulamasının *TXNIP* transkripsiyonuna etkisi

HGF'nin farklı dozlarının *TXNIP* transkripsiyonu üzerindeki etkisini inceleyebilmek için SK-Hep1 hücrelerine 5, 10, 20, 40 ng/ μ l HGF uyarımı yapıldı. Ayrıca HGF uyarımından sonra geçen sürenin *TXNIP* transkripsiyonuna olan etkisinin anlaşılabilmesi için 0, 15dk, 60dk, 2h, 4h, 8h, 16h, 24h HGF uyarımı yapıldı.

4.2.2.1-HGF'nin farklı dozlarının *TXNIP* transkripsiyonuna etkisi

SK-Hep1 hücre dizisinde doz bağımlı HGF uyarımının *TXNIP* transkripsiyonuna olan etkisinin anlaşılabilmesi için 5, 10, 20 ve 40ng HGF dozları kullanılmıştır (Şekil 32).

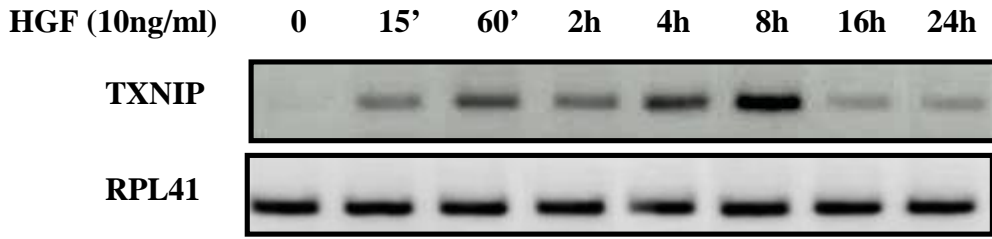


Şekil 32. Doz bağımlı HGF uygulamasının *TXNIP* transkripsiyonu üzerine olan etkisi

TXNIP transkripsiyonu 5ng HGF dozu ile etkilenmemektedir. HGF'nin 10ng ve 20ng dozları ile artmaya başlamakta, 40ng dozu ise bazal koşula kıyasla azaldığı gözlenmiştir.

4.2.2.2 HGF uygulamasından sonra geçen sürenin TXNIP transkripsiyonuna etkisi

HGF'nin 10ng/ml dozu ile tek başına uygulandığında, TXNIP transkripsiyonunun, HGF uyarımından sonraki 15. dakikadan itibaren artmaya başladığı ve artışın 8. saate kadar artarak sürdüğü, 16. saatten sonra azalmaya başladığı belirlenmiştir (Şekil 33).

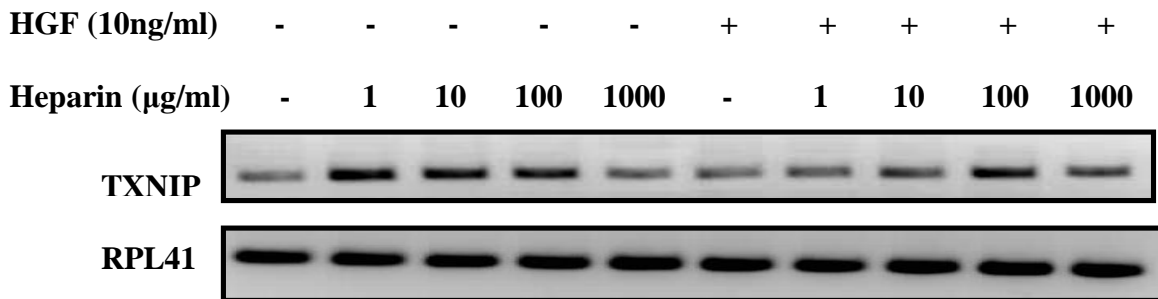


Şekil 33. HGF uygulamasından sonra geçen sürenin TXNIP transkripsiyonuna etkisi.

4.3. Heparin ve HGF nin bir arada uygulanmasının TXNIP ekspresyonuna etkisi

Mikrodizin verilerinde elde edilen yanıtta olduğu gibi Heparin ve HGF'nin birlikte bulunması durumunda, heparin tarafından artırılan TXNIP ifadesi hem transkript olarak hem protein düzeyinde baskılanmaktadır (Şekil 34).

a. Transkripsiyon düzeyinde



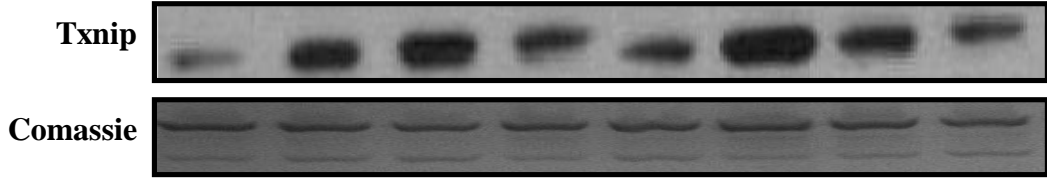
Şekil 34. Heparin ile HGF nin birlikte kullanımının TXNIP transkripsiyonuna etkisi.

Şekilde görüldüğü gibi, tek başına heparinin, 1 ve 10 µg/ml dozları uygulandığında TXNIP transkripsiyonunda üç katlık bir artış olmaktadır. 100µg heparin dozunda ise TXNIP transkripsiyonu azalmakta, 1000µg/mL dozunda ise bazale yakın bir düzeye gerilemektedir.

HGF uyarımı da TXNIP transkripsiyonunu yaklaşık 2 kat arttırmaktadır. Ancak heparin ve HGF birlikte bulunduğu, Heparin tarafından uyarılan doz bağımlı olarak TXNIP transkripsiyonu baskılanmaktadır (Şekil 35).

b. Protein düzeyinde

HGF(10ng/ml)	-	-	-	-	+	+	+	+
Heparin(ug/ml)	-	1	10	100	-	1	10	100

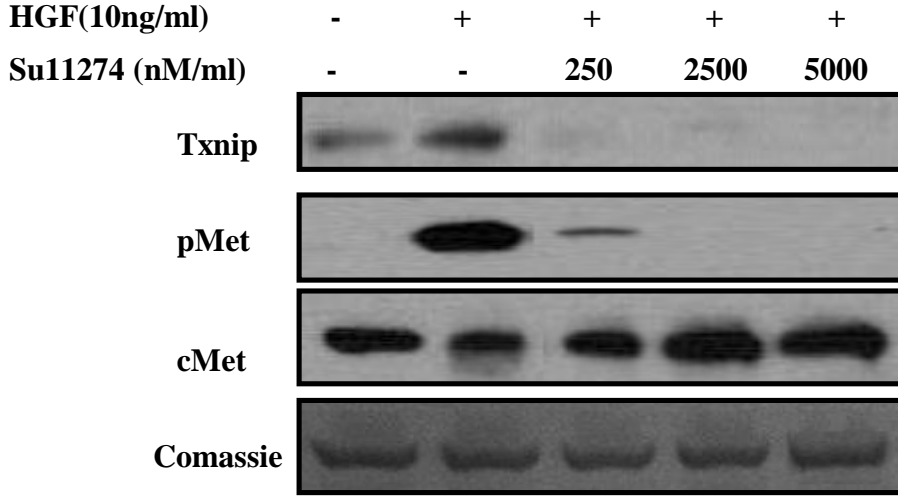


Şekil 35. Heparin ve HGF nin birlikte uygulanmasının TXNIP ekspresyonuna etkisi

Tek başına Heparin veya HGF uygulaması TXNIP ekspresyonunu arttırmaktadır. Heparin ve HGF bir arada iken Heparin tarafından uyarılan TXNIP ekspresyonu 10 ng/ml lik heparin uygulamasını takiben doz bağımlı olarak azalmaktadır.

4.4 cMet aktivasyonunun veya inhibisyonunun TXNIP ekspresyonuna etkisi

Heparin ve HGF tarafından uyarılan TXNIP ekspresyonu artışının cMet aracılıklı olup olmadığını anlamak amacıyla yolağının HGF ile aktive edildiği veya cMet inhibitörü ile baskılandığı koşullarda TXNIP ekspresyonundaki değişim incelenmiştir (Şekil 36).

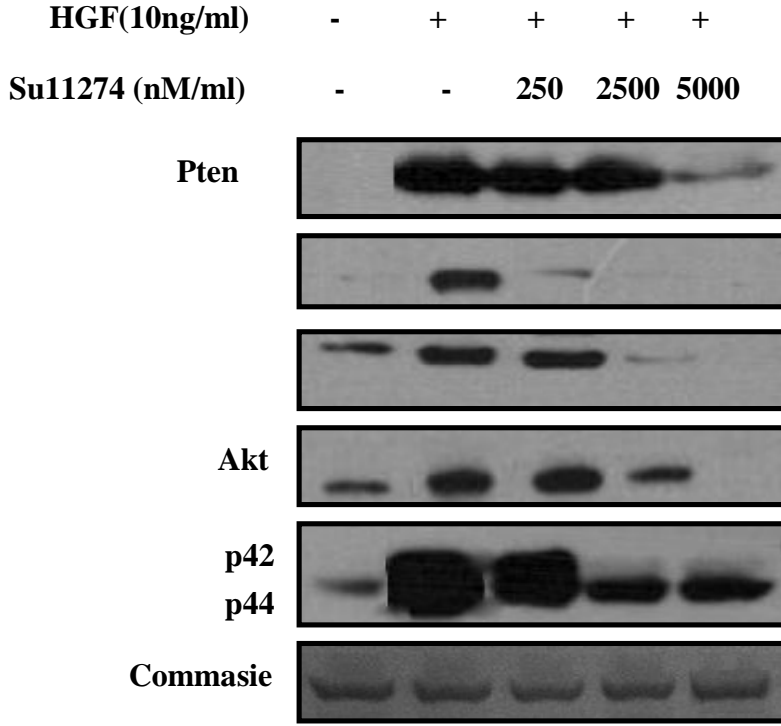


Şekil 36. cMet yolağının HGF tarafından aktivasyonunun veya cMet inhibitörü Su11274 tarafından baskılanmasının TXNIP ekspresyonuna etkisi

HGF uyarımı ile cMet yolağı aktive edildiğinde cMet fosforilasyonundaki artışa paralel olarak, TXNIP ekspresyonunun arttığı, cMet aktivasyonunu spesifik olarak inhibe eden bir molekül olan Su11274 ile cMet fosforilasyonunun bloklandığı koşullarda ise TXNIP ekspresyonunun baskılandığı görülmektedir. Ayrıca HGF uyarımına bağlı olarak cMet ekspresyonunun baskılandığı, cMet aktivasyonu Su11274 ile baskılandığında ise cMet ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir.

4.5 cMET'in altındaki sinyal moleküllerinin TXNIP ile olan ilişkisi

cMet aktivasyonu ile TXNIP ekspresyonunu artmakta, inhibisyonu ile baskılanmaktadır. Bu artışın / baskılanmanın hangi mekanizma ile olduğunu belirlemek amacıyla ekspresyonu HGF/cMET sinyal ileti yolağı ile düzenlenen PTEN, AKT, FoxO1, p42, p44 MAPK gibi alt sinyal molekülü elemanları incelendi (Şekil 37).

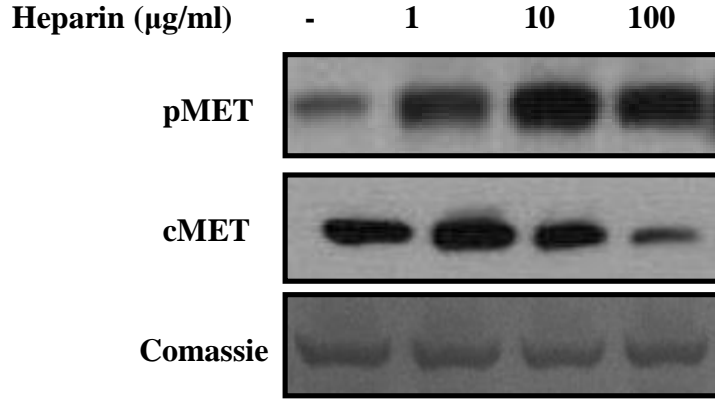


Şekil 37. cMET inhibisyonunun alt sinyal molekül elemanları üzerine olan etkisi

HGF uyarımına bağlı cMet aktivasyonu ile paralel olarak Pten, pAkt ve p42, p44 Mapk miktarlarının arttığı, bu veri ile uyumlu bir şekilde FoxO1 nun inaktive edici fosforilasyonunun da arttığı belirlenmiştir. cMET'e spesifik bir inhibitör kullanıldığında ise Pten, Akt ve p42, p44 Mapk kinaz aktivasyonu ve FoxO1 inaktivasyonu baskılanmaktadır. Bu veriler Heparin ve HGF aracılıklı TXNIP ekspresyon değişimlerinde cMet reseptörünün aktivasyonunun önemli olduğunu, TXNIP ekspresyonunun cMet in aktivasyonu sonrasında Akt ve MAPK aracılıklı olarak düzenlendiğini göstermektedir.

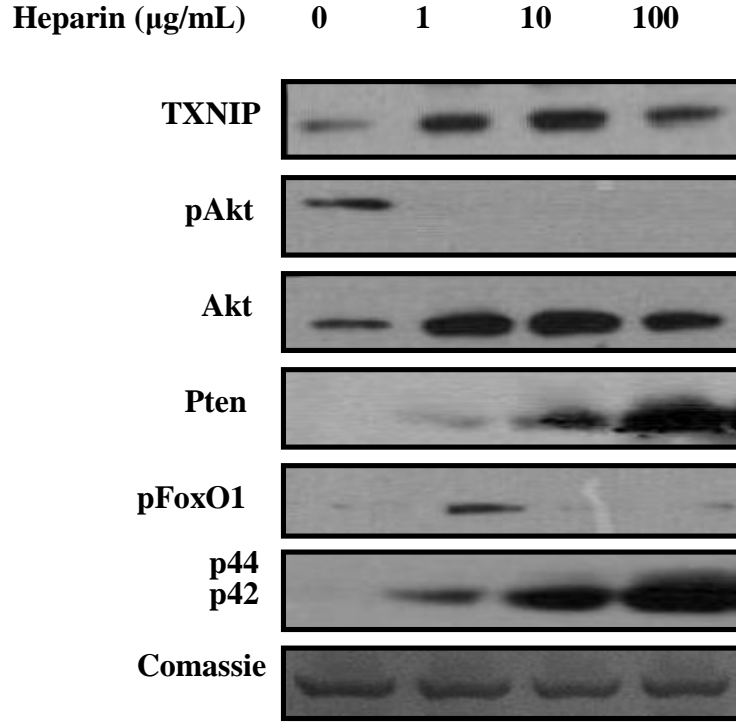
4.6 Heparinin bazal ve HGF tarafından uyarılan cMet fosforilasyonuna etkisi

Bu veriler doğrultusunda TXNIP ekspresyonundaki artışın heparin aracılıklı cMet uyarımı ile gerçekleşip gerçekleşmediği hipotezi test edildiğinde, heparinin tek başına 1 ve 100µg/mL uyarımına bağlı olarak cMet aktivasyonunun arttığı gözlenmiştir. (Şekil 38).



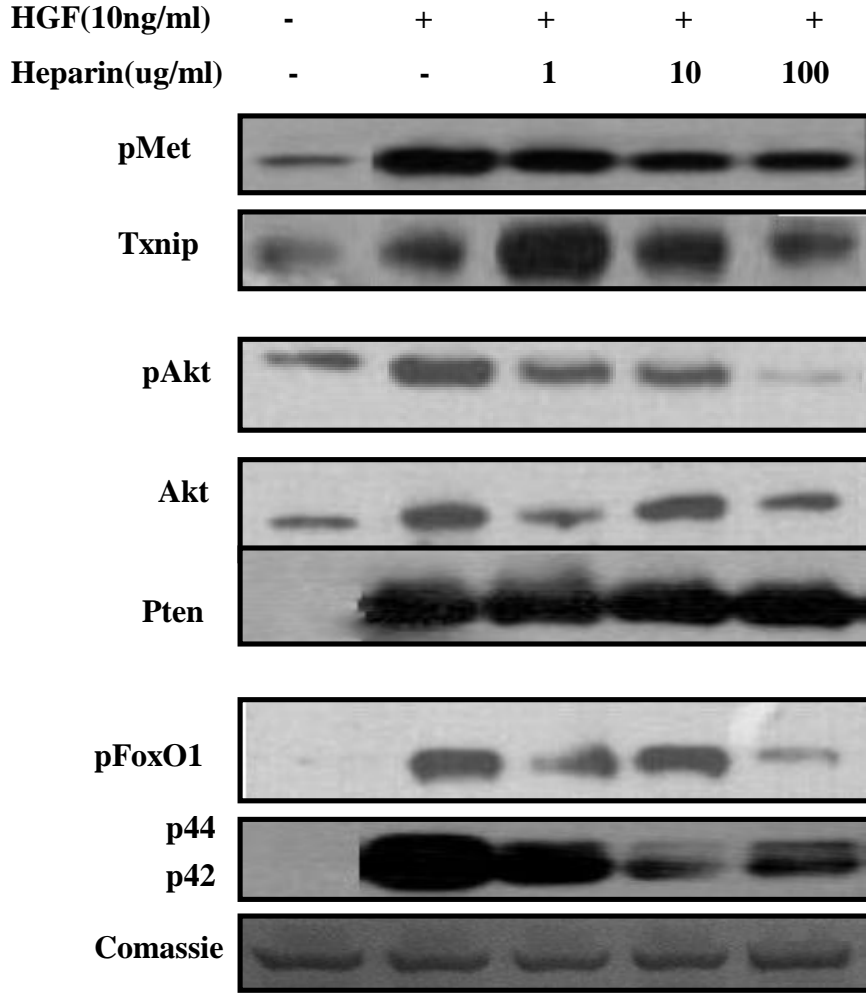
Şekil 38. Doz bağımlı heparin uygulamasının cMet fosforilasyonu üzerine olan etkisi

Heparinin cMet in aşağı yöndeki hedef molekülleri olan Akt, Map kinaz aktivasyonuna etkisi değerlendirildiğinde heparinin bazal Akt fosforilasyonunu baskıladığı, buna karşın p42, p44 MAPK kinaz yolağını aktive ettiği belirlendi (Şekil 39). Bu veri Heparinin tek başına olduğu koşullarda ve HGF ile birlikte olduğu koşullarda TXNIP ekspresyonunu farklı mekanizmalar ile etkilediğini düşündürmektedir. Heparin tek başına iken p42, 44 MAPK ve Akt sinyal ileti yolağı üzerinden düzenleniyor olabilir.



Şekil 39. Heparinin cMET'in alt sinyal molekülleri üzerine olan etkisi

Bu doğrultuda Heparinin HGF tarafından uyarılan TXNIP ekspresyon artışını baskıladığı da göz önüne alınarak, HGF uyarımı varlığında cMet fosforilasyonunun ve Akt, PTEN, p42, 44 MAPK gibi yolağının alt yönünde yer alan moleküllerin heparinden nasıl etkilendikleri incelendi (Şekil 40).



Şekil 40. Heparin ve HGF'nin birlikte olması durumunda TXNIP ve alt sinyal moleküllerinin değişimi

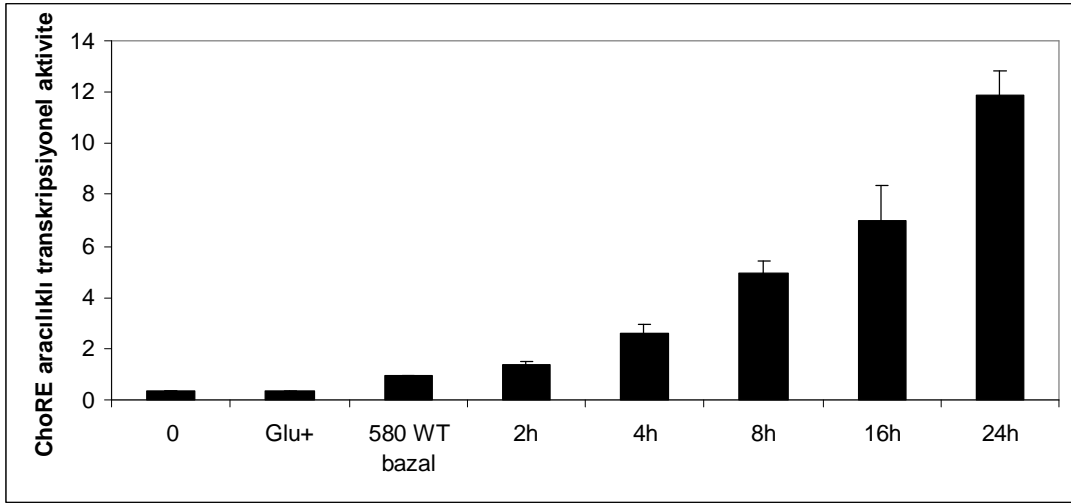
Sonuçlarımız Heparin varlığında HGF tarafından uyarılan cMet fosforilasyonunun ve aşağı yöndeki sinyal ileti molekülleri olan Akt ve MAP kinazın aktive edici ve FoxO1 in inhibe edici fosforilasyonunun azaldığını göstermektedir. Bu veriler doğrultusunda Heparinin HGF varlığında ve yokluğunda TXNIP ekspresyonuna etkisinin farklı olduğunu düşündürmektedir. Önerdiğimiz mekanizmalar ise şekil 41, 42 ve 43'de gösterilmiştir.

4.6 Heparin ve Glukoz uygulamasının TXNIP transkripsiyonel aktivitesi üzerine olan etkisi

Heparin uygulamasına bağı olarak TXNIP ekspresyonundaki artışın TXNIP promotör bölgesinde bulunan ChoRE aracılıklı olup olmadığını anlaşılabilmesi için TXNIP-ChoRE-Lusiferaz deneyi yapıldı. SK-Hep hücre dizisine ChoRE içeren vektör transfekte edildi, 22,5mM Glukoz ve 10µg Heparin uyarımı yapıldı. Deney sistemi içerisinde glukoz uyarımına bağı olarak elde edilen sonuç pozitif kontrol olarak değerlendirildi (Şekil 41). 10µg Heparin uyarımı TXNIP'in ChoRE aracılıklı transkripsiyonel aktivitesinde 2,5 katlık bir artışa sebep oldu. (Şekil 41).

a. Glukoz uyarımına bağı olarak

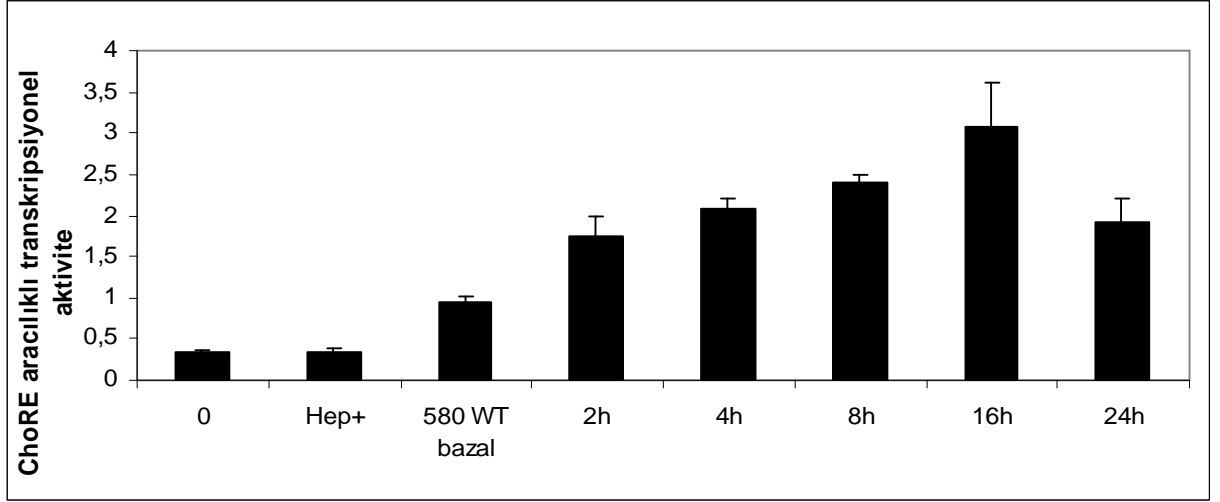
Glukoz uyarımı zamana bağı olarak TXNIP'in ChoRE aracılıklı transkripsiyonel aktivitesini arttırmaktadır. Artış 2. saatte başlamakta ve 24. saate kadar sürmektedir.



Şekil 41. Glukoz uyarımının ChoRE aracılıklı TXNIP transkripsiyonel aktivitesi üzerine olan etkisi

b. Heparin uyarımına bağı olarak

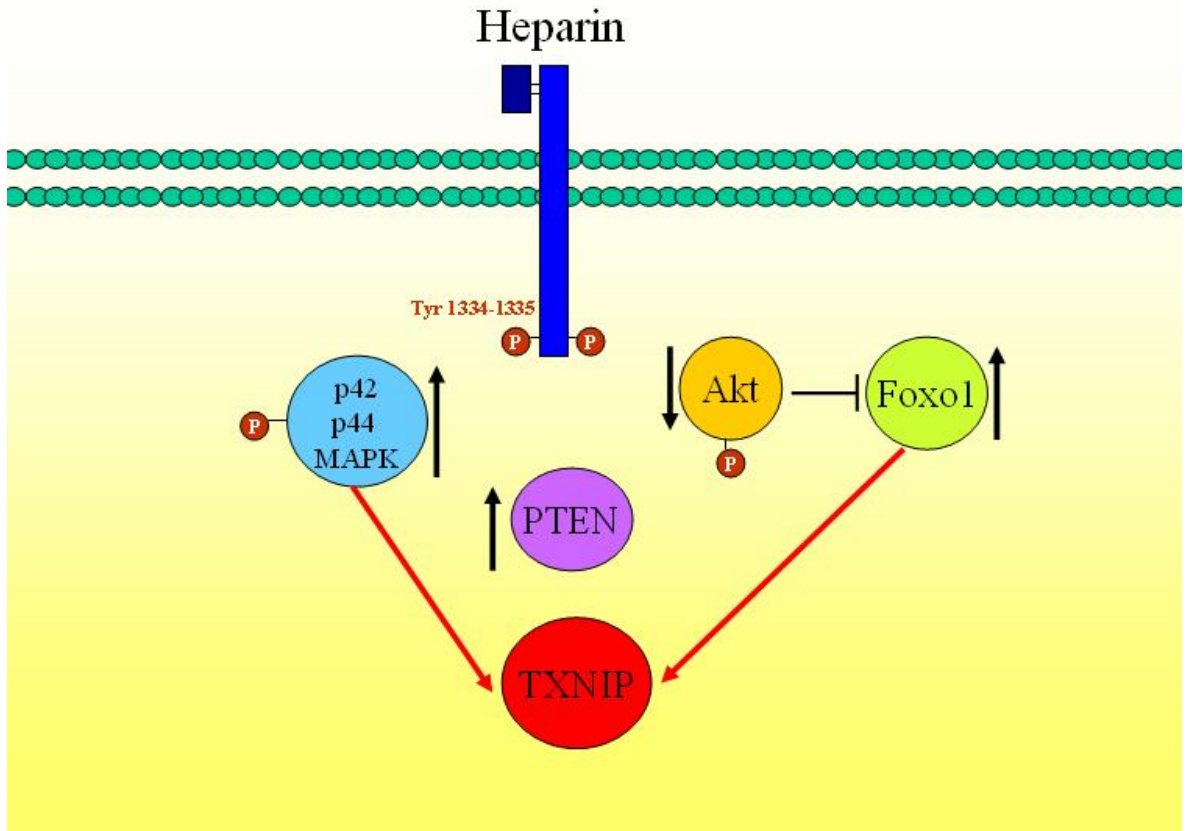
Glukoz uyarımı zamana bağı olarak TXNIP'in ChoRE aracılıklı transkripsiyonel aktivitesini arttırmaktadır. Şekil 42'de gözleendiğı gibi artışın 2. saatte başladığı ve 16. saate kadar sürdüğü, 24. saatte ise azalmaya başladığı gözlenmektedir (Şekil 42).



Şekil 42. Heparin uyarımının ChoRE aracılıklı TXNIP transkripsiyonel aktivitesi üzerine olan etkisi

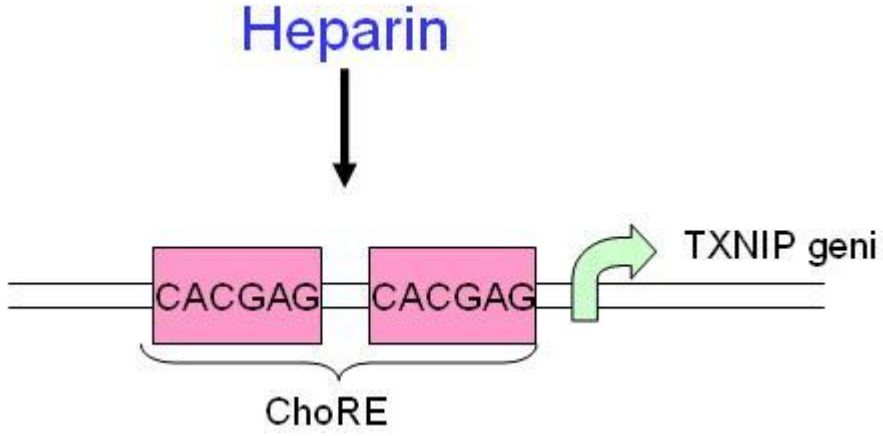
A. Heparin tek başına iken,

Heparin uygulaması cMET'in pTyr1334-1335'in fosforilasyonunu sağlamaktadır. Bununla uyumlu olarak p42, p44 MAPK sinyal ileti moleküllerinin fosforilasyonunun da artmaktadır. Buna karşın Akt fosforilasyonunun ve FOXO1'in inhibe edici fosforilasyonunun baskılanması, sadece heparin olduğu durumda TXNIP ekspresyonundaki artışın MAPK ve Akt sinyal ileti yolağı üzerinden olduğunu düşündürmektedir (Şekil 43).



Şekil 43. Heparinin TXNIP ve alt sinyal molekülleri üzerine olan etkisi

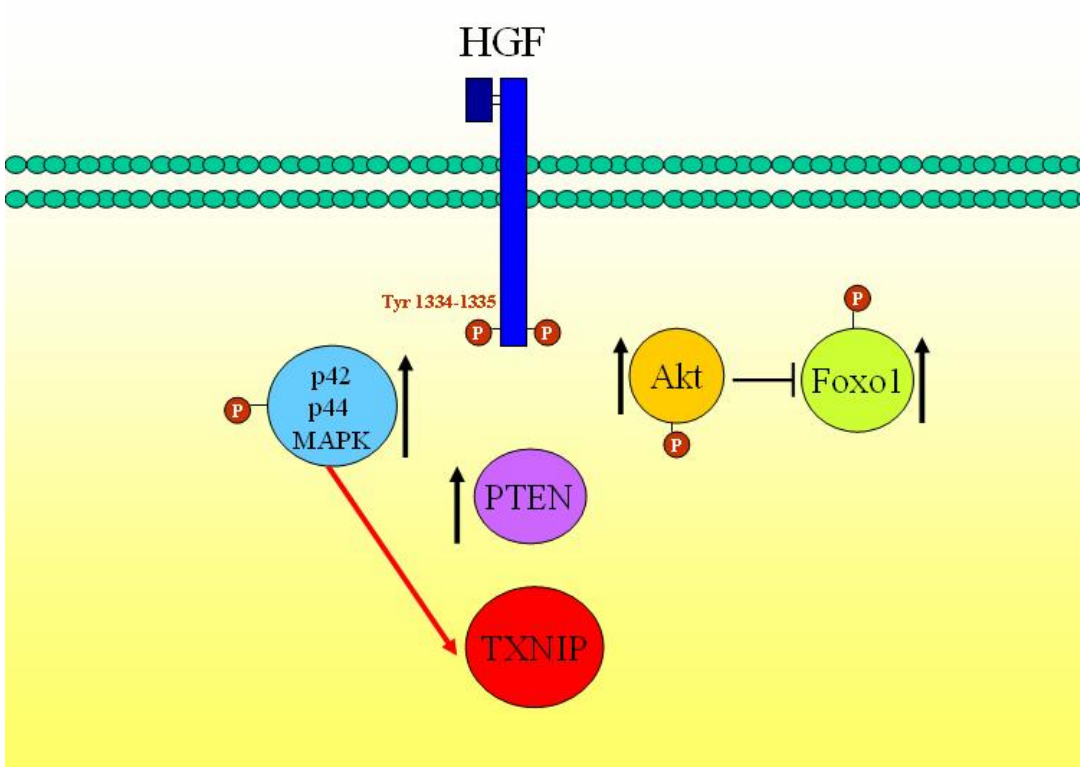
Heparin uyarımına bağlı olarak TXNIP ekspresyonundaki artışın açıklanabileceği diğer bir mekanizma ise, TXNIP'in promotor bölgesinde bulunan ChoRE'ye bağlanabileceğidir. (Şekil 44). Heparin uyarımı karbohidrat yanıt elemanı varlığında TXNIP transkripsiyonel aktivitesini arttırmaktadır. Dolayısı ile heparin tarafından TXNIP ekspresyonundaki artış ChoRE aracılıklı olabilir (Şekil 44).



Şekil 44. Heparinin TXNIP transkripsiyonel aktivitesi üzerine olan etkisi

B. HGF tek başına iken,

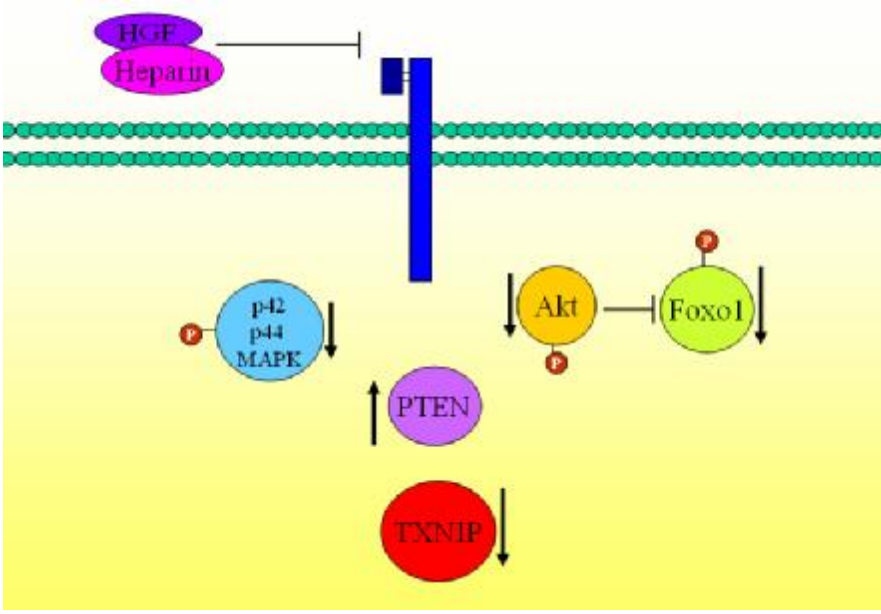
HGF uyarımına bağlı olarak cMet fosforilasyonu beşinci dakikadan başlayarak uyarılmakta, cMet aktivasyonuna paralel olarak Akt sinyal ileti yolağı ve p42 ,p44 MAPK sinyal ileti yolağının aktive olmaktadır. Ayrıca FoxO1'in inhibe edici fosforilasyonu da artmaktadır. Buna bağlı olarak TXNIP ekspresyonu MAPK aracılıklı olarak artmaktadır (Şekil 44).



Şekil 45. HGF'nin TXNIP ve alt sinyal molekülleri üzerine olan etkisi

C. Heparin ve HGF birlikte iken,

Ortamda Heparin ve HGF birlikte bulunduğunda ise, heparin HGF'nin reseptörüne bağlanmasını engelleyerek, cMet aktivasyonu engelliyor olabilir. Dolayısıyla Akt, MAPK aktivasyonu ve FOXO1'in inhibe edici fosforilasyonu baskılanıyor olabilir. Sonuç olarak TXNIP ekspresyonunun baskılanması da cMet, Akt ve MAPK aktivasyonunun gerçekleşmemesinden kaynaklanıyor olabilir (Şekil 43).



Şekil 46. HGF ve Heparin birlikte iken TXNIP ekspresyonundaki değişim

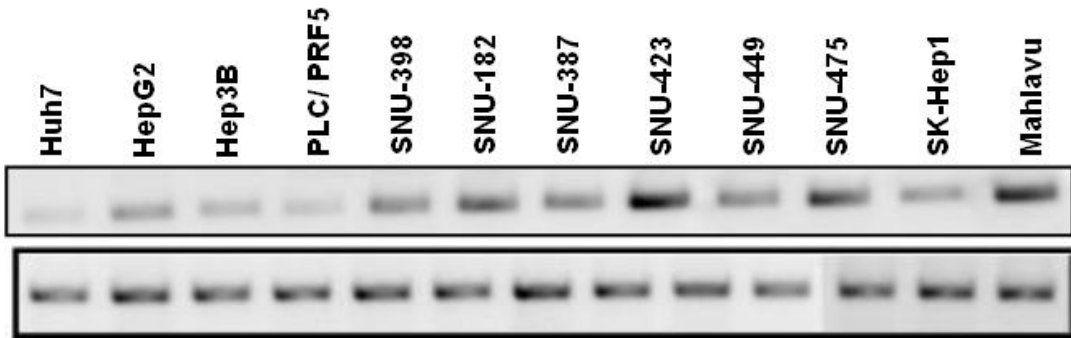
4.6 Farklı HCC Hücre dizilerinde TXNIP ekspresyon düzeylerinin incelenmesi

TXNIP transkripsiyonundaki bu değişimlerin HCC gelişimindeki rolünün belirlenmesi amacı ile SNU-475, SNU-182, SNU-423, SNU-387, Huh-7, HepG2, Hep3B, Mahlavu, SK-Hep1, SNU-398, SNU-449 ve PLC/PRF-5 HCC hücre dizilerinde TXNIP ekspresyonu incelenmiştir.

TXNIP ifadesi hücrelerin diferansiyasyon durumuna göre bir seçim göstermiştir. Şekil 43’de görüldüğü gibi TXNIP mRNA düzeyi Huh7, PLC/RF5, Hep3B gibi epitelyal fenotip gösteren hücrelerde, SNU-423, SNU-475 ve Mahlavu gibi mezenşimal fenotip sergileyen hücre dizilerine kıyasla daha düşük düzeydedir (Şekil 44).

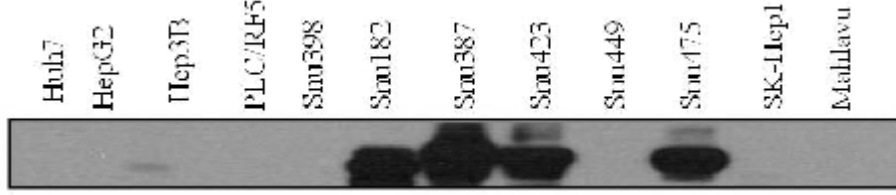
HCC hücre dizilerinde TXNIP ifadesi western blot yöntemi ile incelendiğinde epitelyal fenotip gösteren Huh7, Hep3B, PLC/RF5, Snu398 gibi hücre dizilerinde hemen hiç TXNIP proteini saptanmazken, SNU-182, SNU-387, Snu423, SNU-475 gibi mezenşimal fenotip gösteren hücre dizilerinde TXNIP protein düzeyinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 45). Daha önceki çalışmalarımızda elde edilen HCC’ye spesifik diferansiyasyon belirteçleri ile karşılaştırıldığında, fetal hepatosit belirteci olan AFP ve epitelyal belirteçler olan HNF4a HNF1a, E-kaderin ekspresyonlarının genelde yüksek olduğu, hücre dizilerinde TXNIP ekspresyonu düşük, Vimentin, Twist1, Snail gibi mezenşimal belirteçlerin ekspresyonlarının yüksek olduğu hücre dizilerinde TXNIP ifadesinde yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 11)

a. Transkripsiyon düzeyinde



Şekil 47. HCC hücre dizilerinde TXNIP’in mRNA düzeyi

b. Protein düzeyinde



Şekil 48. HCC hücre dizilerinde TXNIP'in protein düzeyi

Tablo 5. HCC hücre dizileri ve diferansiyasyon durumlarını tayin eden belirteçler¹¹⁹.

Hücre dizileri	Diferansiyasyon durumu	TXNIP ekspresyonu	HNF1a	E-Kaderin	Vimentin	Snail
Huh7	İyi	Yok	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
HepG2	İyi	Yok	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
Hep3B	İyi	Yok	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
PLC/PRF5	İyi	Yok	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
SNU-398	İyi	Yok	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek
SNU-182	Kötü	Var	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek
Snu-387	Kötü	Var	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek
SNU-423	Kötü	Var	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek
SNU-449	Kötü	Yok	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek
SNU-475	Kötü	Var	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek
SK-Hep1	Kötü	Az	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek
Mahlavu	Kötü	Az	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek

5. TARTIŞMA

Hepatoselüler karsinom gelişiminde, HCV, HBV enfeksiyonu, aşırı alkol tüketimi, diyabet ve karaciğer yağlanması gibi metabolik bozukluklar temelinde ortaya çıkan kronik karaciğer hasarı önemlidir^{1,29}. Risk faktörlerine maruz kalma durumunda gelişen net sonuç insülin direnci ve oksidatif stresin tetiklenmesidir². Bu durumda karaciğerde serbest radikal artışına bağlı sirotik bir zemin oluşmaktadır. Hepatositler hasar görmekte, nekroz ile rejenerasyonun tekrarlayan döngüleri arasında inflamatuvar yanıtlar gelişmektedir. Karaciğer Kupffer hücrelerinin aktivasyonu ile kemokin ve sitokinlerin salınımı artmakta, lenfositler hasar gören karaciğere sızmaktadır. Hepatik stellat hücrelerinin aktivasyonu ile kollajen gibi hücre dışı matris elemanlarının sentezi artmakta ve fibroz süreci gelişmektedir³¹. Serbest radikal hasarına bağlı olarak ortaya çıkan mitokondri hasarı, kontrolsüz proliferasyon olan hücrelere yeterli besin ve enerji sağlanamamasına yol açmaktadır. Hücrelerin bir kısmı p38 MAPK, JNK/SAPK gibi sinyal yollarının aktive olması ile apoptotik yanıt geliştirmekte, bir kısmı sağ kalımın sağlanması için HGF/cMET, PI3k-Akt, MAPK ve gibi sinyal ileti yollarını aktive etmeye çalışmaktadır³⁰. Ancak birbirine tam karşıt olan bu iki biyolojik yanıtın düzenlenmesinde rol oynayan moleküller ve mekanizma tam olarak anlaşılabilmiştir.

Heparin ve aynı ailede yer alan heparan sülfatlar benzer yapısal üniteleri içeren glikozaminoglikandır¹⁰⁴. Heparin mast hücrelerinden üretilen bir antikoagülandır, heparan sülfatla (HS) ise hemen tüm hücreler tarafından üretilirler^{103,104}. Heparinin ana yapısal üniteleri HS'ların protein bağlama dizilerine benzer. Heparin ve HS lar antitrombin ve doku plazminojen aktivatörlerinin yanı sıra, FGF, HGF gibi büyüme faktörlerine ve reseptörlerine, laminin, kollajen, fibronektin gibi ECM glikoproteinlerine bağlanarak bu moleküllerin oluşturdukları biyolojik yanıtların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır^{9,11}. Son yıllarda hücrelerde oksidatif strese karşı oluşturulan yanıtların düzenlenmesinde de rol oynadıkları tanımlanmıştır^{108,109,110}. Heparin, HGF varyantı olan NK1'a bağlanır ve ortamda heparin bulunması durumunda NK1 tarafından oluşturulan yanıtın artmasına sebep olur¹⁴. Heparinin c-Met reseptör tirozin kinazın sema bölgesine, HGF'nin ise N bölgesine bağlandığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır⁸. Ancak bu fiziksel birlikteliğin HGF/SF-c-Met sinyal yolağının aktivasyonunda nasıl bir rol aldığı tanımlanamamıştır. Heparin ve HS ların HGF/SF sinyal yolağına etkisi hücre tipine göre değişiklik göstermektedir. MDCK, keratinosit, myeloblast ve gastrik karsinoma hücre dizilerinde heparin uygulamasının cMet yolağını aktive ettiği ve

cMet aracılıklı biyolojik yanıtlar için önemli olduğu gösterilmiştir. Ancak HCC hücrelerinde genelde apoptozu tetiklediği düşünülmektedir.

Daha önce yaptığımız çalışmalarda ortama heparin eklendiğinde HCC hücrelerinin HGF tarafından uyarılan hücre adhezyonu, proliferasyonu ve motilitesinin baskılandığını gözledik. HCC hücrelerinde HGF tarafından uyarılan biyolojik yanıtların heparinden nasıl etkilendiğini inceleyebilmek için, SK-Hep1 HCC hücre dizisinde Heparin ve Heparin+HGF koşullarından elde edilen RNA'lar ile mikrodizin çalışması yapıldı ve ekspresyonu anlamlı düzeyde değişen genlerin biyoinformatik analizi sonrasında hücre metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar görev oynayan TXNIP'in HGF/heparin aracılıklı biyolojik yanıtların düzenlenmesinde rolü incelendi.

TXNIP baskın olarak sitoplazma ve mitokondride lokalizedir. Serum starvasyonu, yüksek glukoz ve oksidatif strese bağlı olarak ekspresyonu artmakta, apoptoz ve hücre döngüsü gibi yanıtların düzenlenmesinde rol almaktadır.

Mikrodizin çalışmasındaki veriye paralel olarak RT-PCR ile TXNIP'in, Heparin+HGF olan koşulda sadece heparin olan koşula kıyasla azaldığı doğrulandı (Şekil 28). HGF ve Heparinin birlikte ve ayrı ayrı TXNIP ekspresyonu üzerine olan etkisi incelendiğinde ise, Heparinin 1µg lık dozdan başlayarak TXNIP ekspresyonunda artışa neden olduğu saptandı . Benzer bir şekilde HGF uyarımının da TXNIP ekspresyonunu artırdığı, buna karşın HGF ve Heparin birlikte iken heparin tarafından uyarılan TXNIP ekspresyonunun baskılandığı belirlendi

Literatürde TXNIP ekspresyonunun, HGF veya Heparin uyarımına bağlı olarak değiştiği daha önce tanımlanmamıştır. Chen ve arkadaşlarının¹¹² 2008 yılında yayınladığı bir çalışmada retinal pigment hücrelerine oksidatif stresi uyarıcı bir lipid olan seramid muamelesi yapıldığında TXNIP ekspresyonunun arttığı ve oluşan apoptotik yanıtın HGF/cMET sinyal yolağı aracılıklı olarak kısmen geri döndürülebileceğinden bahsedilmiştir. Çalışmada bu mekanizmanın hücre içerisindeki antioksidan sistemin tetiklenmesi ile olduğu düşünülmektedir. Ancak çalışma HGF'nin TXNIP'i nasıl etkilediği açıklamamaktadır.

Heparinin TXNIP ekspresyonunu hangi mekanizma ile artırdığı hakkında ise birkaç hipotez kurulabilir. Bunlardan ilki heparinin cMET e bağlanarak HGF/cMet yolağını aktifliyor olabileceğidir. . Bu hipotezin test edilebilmesi amacı ile önce Heparinin cMET yolağını aktive edip etmediği heparinin cMet fosforilasyonunu aktive edip etmediği test edilerek incelendi. Bu deney sonunda heparinin doz bağımlı olarak cMet fosforilasyonunu artırdığını

saptadığımızda, bunun tam tersi bir yaklaşımın sonuçlarının ne olacağını inceledik. Bunun için cMet aktivasyonunu spesifik olarak inhibe eden bir inhibitör kullanarak cMet aktivasyonunu blokladık. cMet aktivasyonu bloklandığında cMET fosforilasyonu ile uyumlu bir şekilde baskılandığını saptadık. Bu veri TXNIP ekspresyonunun düzenlenmesinde HGF/cMET sinyal ileti yolağının önemli olduğu hipotezimizi destekledi.

cMet aktivasyonu ile TXNIP ekspresyonunu arttığını, inhibisyonu ile baskılandığını gözlemledikten sonra bu artışın / baskılanmanın hangi mekanizma ile olduğunu belirlemek amacıyla PTEN, AKT, FoxO1, p42, p44 MAPK gibi alt sinyal molekülü elemanları incelendi. HGF/cMET sinyal ileti yolağı baskılandığında Akt fosforilasyonu, FoxO1'in inhibe edici fosforilasyonunun baskılandığı gözlenmiştir. Dolayısı ile TXNIP ekspresyonunun PI3K/Akt ve p42, 44 MAPK sinyal ileti yolağı üzerinden olabileceği düşünülmüştür. Aoki ve arkadaşlarının¹¹³ yaptığı çalışma, Akt'ın aktif formunun FoxO1'i inhibe ettiği yönündedir. Elde ettiğimiz veri literatür bilgisi ile tamamen uyumludur. cMET inhibisyonuna bağlı olarak Akt fosforilasyonu ve FoxO1'in ise inhibe edici fosforilasyonu azalmıştır. Ancak, literatürde bir transkripsiyon faktörü olan ve p38 MAPK sinyal ileti yolağı tarafından regüle edilen FoxO1'in TXNIP promotörüne bağlandığı ve aktivasyonunu sağladığı tanımlanmıştır¹¹⁴. Çalışmamızda elde ettiğimiz veri, cMET inhibisyonu ile Akt fosforilasyonu ve FoxO1'in inhibe formunun azalmasına rağmen TXNIP ekspresyonunun artmadığını göstermiştir. Dolayısı ile bu elde ettiğimiz veri literatür bilgisine terstir ve TXNIP ekspresyonunun PI3K/Akt sinyal ileti yolağı üzerinden değil de başka bir mekanizma tarafından düzenlendiğini düşündürmektedir.

HGF/cMET yolağının alt yönünde olan diğer bir sinyal yolağında p42, 44 MAPK yolağıdır. Elde ettiğimiz verilerde cMET inhibisyonuna bağlı olarak p42, p44 MAPK fosforilasyonları da TXNIP'e benzer şekilde azalmaktadır. Bu veriler TXNIP ekspresyonunun düzenlenmesinde cMET aktivasyonu aracılıklı p42,44 yolağının etkili olduğunu düşündürmektedir. Zeigler ve arkadaşlarının¹¹⁵ yaptığı çalışmada, HGF tarafından uyarılan keratinosit hücrelerinde ERK1/2 ekspresyonunun arttığı ve hücrelerin daha hareketli ve invazif bir karakter kazandığı bildirilmiştir. Motilite ve invazyonun, MMP-9 ekspresyonu artışı ile olduğu söylenmekte ve ERK1/2 ve JNK ekspresyonunun bu süreçte önemli olduğu bildirilmektedir. Epitelyal-mezenşimal dönüşüm sürecinde de cMET tarafından uyarılan ERK1/2 MAPK ekspresyonunun artışı önemlidir. Literatür bilgisine göre TXNIP hücrel oksidatif stresi arttırmaktadır ve apoptotik yanıtın gelişmesini sağlamaktadır. Ek çalışmamız

kapsamında, SK-Hep1 hücre dizisine yüksek glukoz ve hipoksi ile hipoksi sonrası reoksijenizasyon muamelesi yapılmıştır. Ancak 24 saatlik süreçte kültürdeki hücrelerin morfolojik olarak apoptoza girdiğini gösteren herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. SK-Hep1 hücre dizisi epitelyal fenotip için belirteç olan E-kaderini hiç ekprese etmemekte, mezenşimal fenotip belirteci olan Vimentin'i ise yüksek düzeyde ekprese etmektedir, bazal motilite ve invazyon oranı yüksek olan bir hücre dizisidir. Dolayısı ile bu elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, TXNIP ekspresyonunun artışı apoptotik yanıtı uyarıyor ise p42, p44 MAPK sinyal yolağı aracılıklı olarak hücrelerin dirençli, ve invazif bir fenotipe sahip olmasını sağlıyor olabilir. Bu hipotezi test etmek için HCC hücre dizilerinde TXNIP ekspresyon düzeyleri ile fenotipleri arasında bir ilişki olup olmadığını western blot yöntemi ile inceledik. Epitelyal fenotip gösteren, bazal motilite ve invazyon oranı düşük Huh7, Hep3B, PLC/RF5, Snu398 gibi hücre dizilerinde hemen hiç TXNIP proteini saptanmazken, SNU-182, SNU-387, Snu423, SNU-475 gibi mezenşimal fenotip gösteren, bazal motilite ve invazyon oranı yüksek hücre dizilerinde TXNIP protein düzeyinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu veri hipotezimizi desteklemektedir. TXNIP in hepatokarsinogenez sürecindeki rolünü saptamaya yönelik çalışmalarımızın HCC li ve sirozlu hastalardaki TXNIP ekspresyon düzeyişi değişimlerinin normal karaciğer dokusu ve birbirleri ile karşılaştırılmasına yönelik IHC analizleri ile devam etmesi planlanmıştır.

Elde edilen veriler doğrultusunda heparin tarafından uyarılan TXNIP ekspresyonundaki artışın, heparin aracılıklı HGF/cMET sinyal ileti yolağı aktivasyonu ile gerçekleştiğini, heparin uygulamasının cMET fosforilasyonunu arttırdığını göstermiştir. Sakata ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya¹¹¹ göre heparin cMET ve HGF/SF arasındaki ilişkinin sağlanması için gerekli değildir, ancak ortamda bulunduğu cMET'in reseptör dimerizasyonu sağlanmakta ve mitojenik potansiyelini arttırmaktadır. Elde ettiğimiz veri bu çalışmayı destekler niteliktedir. Heparinin cMET'in alt yönündeki sinyal ileti molekülleri üzerine olan etkisinin anlaşılabilmesi için yaptığımız çalışmada ise, Akt fosforilasyonunun ve FoxO1'in inhibe edici fosforilasyonunun azaldığı gözlenirken, p42, p44 fosforilasyonu ve PTEN ekspresyonu TXNIP ekspresyonuna benzer bir şekilde artmıştır. Heparinin TXNIP ekspresyonu üzerine etkisi için önerilen hipotezimiz,

1. Heparin uygulaması cMET'in pTyr1334-1335'in fosforilasyonunu sağlamaktadır.
2. Bununla uyumlu olarak p42, p44 MAPK sinyal ileti moleküllerinin fosforilasyonu artmaktadır,

3. Buna karşın Akt fosforilasyonunun ve FOXO1'in inhibe edici fosforilasyonu baskılanmaktadır. FoxO1'in aktive formu artmaktadır.

Dolayısı ile sadece heparin olduğu durumda TXNIP ekspresyonunu cMet aracılığı, MAPK aracılığı ve Akt aracılığı olarak artırmaktadır.

HGF uyarımı ise 10ng dozunda TXNIP transkripsiyonunu arttırmaktadır. Artış 8. saate kadar sürmektedir. HGF uyarımına bağlı olarak cMet fosforilasyonu beşinci dakikadan başlayarak uyarılmakta, cMet aktivasyonuna paralel olarak Akt sinyal ileti yolağı ve p42, p44 MAPK sinyal ileti yolağının aktive olmaktadır. Ayrıca FoxO1'in inhibe edici fosforilasyonu da artmaktadır. Buna bağlı olarak TXNIP ekspresyonu MAPK aracılığı olarak artmaktadır. HGF'nin TXNIP ekspresyonu üzerine etkisi için önerilen hipotezimiz,

1. HGF uygulaması cMET'in
2. Bununla uyumlu olarak Akt fosforilasyonu ve FoxO'in inhibe edici fosforilasyonu artmaktadır.
3. Ayrıca p42,44 MAPK fosforilasyonu artmaktadır.

Dolayısı ile sadece HGF olduğu durumda TXNIP ekspresyonunu cMet aracılığı, MAPK aracılığı olarak artırmaktadır.

Tümör bölgesinde ve çevresinde genel olarak bir stres durumu hakimdir³⁰. Li ve arkadaşlarının⁷ yaptığı çalışmada HGF'nin oksidatif strese karşı koruyucu rol oynadığı tanımlanmıştır. Eğer süreç böyle ise HGF/cMET sinyal ileti yolağının aktivasyonunun, TXNIP aracılığı artan oksidatif stres hasarına karşı hücrelerin sağ kalımı üzerinde önemli olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda TXNIP hücre içerisine glukoz alınımını engellemekte, hücrelerin besin ve enerji ihtiyacını kısıtlamaktadır. Perdomo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HGF'nin ise glukoz transporterlerinin ekspresyonlarını arttırdığı ve glukozun hücre içerisine alınmasını sağladığını göstermişlerdir. Tüm bu literatür bilgisi hipotezimizi desteklemektedir. Bununla birlikte HIF1 α aktivasyonu da cMET üzerinden olduğunda, hücreler oksidatif strese karşı daha dirençli bir karakter kazanmaktadır. HCC'de TXNIP'in ekspresyonunun olması HGF/cMET sinyal ileti yolağının hepatokarsinogenez sürecindeki rolünü düzenliyor olabilir.

Heparin ve HGF bir arada iken ise, Heparinin ve HGF'nin tek başına uyardığı TXNIP ekspresyonu doz bağımlı olarak azalmaktadır. Literatürde heparin ve HGF birlikteliğinin TXNIP ekspresyonu üzerine etkisi hiç bilinmemektedir. Ancak Gherardi ve arkadaşları, Heparinin HGF üzerindeki N, K1 bölgelerine bağlandığını göstermişlerdir. Heparin ve HGF birlikte bulunduğu Heparin HGF'ye bağlanıyor ve bu sebeple HGF'nin cMET'e bağlanarak sinyal ileti yolağının aktive etmesini engelleniyor olabilir. Bu durumda cMet aktivasyonunun gerçekleşmemesine bağlı olarak TXNIP ekspresyonu azalıyor olabilir. Bu hipotezi test etmek için yaptığımız çalışmada heparinin HGF aracılıklı cMet fosforilasyonunu blokladığı, ayrıca Akt fosforilasyonu, FoxO1'in inhibe edici fosforilasyonu ve p42, 44 MAPK fosforilasyonunu da azalttığı belirlenmiştir. Akt ve MAPK yolağı aktivasyonunun hücre sağ kalımı, hücre proliferasyonu ve hücre adezyonu ve motilitesi üzerine etkisi düşünüldüğünde daha önceki çalışmalarımızda belirlediğimiz heparin ile uyarılan hücre proliferasyonu, adezyonu ve motilitesindeki baskılanma cMet in aktive edici fosforilasyonunun baskılanması ile açıklanabilir. Literatür verileri ile HGF aracılıklı MAPK Akt aktivasyonu tanımlanmıştır. Mao Ye ve arkadaşlarının¹¹⁶ yaptığı çalışma, HGF'nin cMET reseptörüne bağlanması ile reseptör dimerizasyonu sağlandığı ve çoklu yavaşma bölgelerine alt sinyal ileti molekül elemanlarının bağlandığını göstermiştir. Bununla birlikte Erk1/2 ve PI3K/Akt alt sinyal ileti moleküllerinin aktivasyonuna bağlı olarak metastaz ve invazyonunun arttığı gösterilmiştir.

Bu aşamaya kadarki çalışmalarımız HCC hücrelerinde heparin ve HGF uyarımının TXNIP ekspresyonunu artırdığını, birlikte bulunmaları halinde ise TXNIP ekspresyonunun baskılandığını ve bunun HGF/cMet sinyal ileti yolağı aracılıklı düzenlendiğini gösterdi. Bilindiği gibi TXNIP ekspresyonunun düzenlenmesinde TXNIP promotorundaki ChoRE çok önemlidir. Çalışmamızın bir sonraki basamağında ise Heparin aracılıklı TXNIP artışında TXNIP promotorunda bulunan ChoRE'nin önemli olup olmadığını inceledik. Gugliucci ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada heparinin iyonik etkileşimlerle düşük densiteli lipoprotein (LDL)'e bağlandığı, ortamda yüksek glukoz var olduğunda ise bu bağlanmanın etkilendiği gösterilmiştir¹²¹. Finotti ve arkadaşlarının¹²² yaptığı bir çalışmada insan serum albumin proteinin yüksek glukoz tarafından okside edebildiğini göstermiştir. İlginç bir şekilde heparinin bu etkiyi tersine çevirdiği gösterilmiştir.

Literatür verileri ve heparinin yüksek düzeyde karbohidrat yapı içermesi, glukoz ile aynı ChoRE'ye bağlanabileceğini düşündürmektedir. Heparin tarafından uyarılan TXNIP ekspresyonundaki artışın ChoRE aracılıklı olup olmadığının anlaşılabilmesi için Yan Luo ve arkadaşlarının¹¹⁷ yaptığı çalışmada kullanılan TXNIP promotorunu ve karbohidrat yanıt elemanını içeren lusiferaz vektörleri sağlandı. Glukoz varlığında TXNIP ekspresyonunun bu karbohidrat yanıt elemanı aracılıklı arttığı araştırmacıların çalışmasında tanımlanmıştır. Zamana bağımlı glukoz uyarımı yapıldığında TXNIP'in transkripsiyonel aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Caenazzo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada glukoz uyarımına bağlı olarak artan MMP-9, MMP-2 ve tip4 kollajen ekspresyonlarının heparin tarafından geri döndürülebileceği gösterilmiştir¹²⁰. Heparinin glukoz varlığında ekspresyonu artan Glut2, HIF1a, VEGF gibi genlerin ekspresyonunu artırıyor olduğunu gösteren verilerimiz Heparin ile glukozun aynı ChoRE'ye bağlanıyor olabileceği hipotezimizi desteklemektedir (Bkz destekleyici veriler). Heparin uyarımına bağlı olarak ChoRE aracılıklı yanıtları incelediğimizde, SK-Hep1 hücre dizisinde 10µg heparin dozunun TXNIP transkripsiyonunun arttığını gözledik. Elde ettiğimiz veri literatür bilgilerini desteklemiş, yeni bir açılım sağlamıştır.

Eğer glukoz ile heparin aynı ChoRE'ye bağlanıyorsa, bu veri yüksek glukoz varlığına ve oksidatif strese bağlı karaciğer hasarının, invazif ve metastatik süreçlerin önlenmesinde heparin kullanımının mümkün olabileceği anlamına gelecektir. Bu konuda yapılacak ileri araştırmalar sonrasında, heparin kullanımı ile HCC progresyonunun bloklanması mümkün olabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız kapsamında,

1. Mikrodizin ile tanımlanan TXNIP transkripsiyon değişimi, RT PCR ile doğrulandı. Mikrodizin sonucunda azalan gen ürünü olarak saptanan TXNIP'in ekspresyonunun heparin ve HGF birlikte olan koşulda, tek başına heparin olan koşula göre azaldığı belirlendi.
2. Heparin ve HGF'nin TXNIP ekspresyonu üzerine olan etkisi RT-PCR ve Western blotting yöntemi ile incelendi. Heparin ve HGF uyarımının doz ve zaman bağımlı olarak TXNIP ekspresyonunun arttırdığı gözlemlendi.
3. Bu artışın HGF/cMET sinyal ileti yolağı aracılıklı olup olmadığını test etmek amacıyla
 - a. cMET reseptörüne yönelik spesifik bir inhibitör kullanıldığında, cMet aktivasyonunun ve alt yöndeki hedefleri olan PTEN, Akt, p42,44 MAPK, FoxO1'in inhibe edici fosforilasyonunun baskılanmasına paralel olarak TXNIP ekspresyonunun baskılandığı,
 - b. Heparin uygulamasının doz bağımlı olarak cMET fosforilasyonunu ve arttırdığı cMET aracılıklı p42/44 MAPK fosforilasyonunun arttığı, Akt fosforilasyonunun ise baskılandığını belirlendi.
4. Heparinin HGF aracılıklı cMet fosforilasyonunu blokladığı, ayrıca Akt fosforilasyonu, FoxO1'in inhibe edici fosforilasyonu ve p42, 44 MAPK fosforilasyonunu da azalttığı belirlenmiştir.
5. Heparinin TXNIP ekspresyonunu arttırması, TXNIP'in promotor bölgesindeki ChoRE aracılıklı olabileceği gözlenmiştir.
6. TXNIP ekspresyonunun HCC hücre dizilerindeki ekspresyonu incelendiğinde çalışmamızda kullanılan mezenşimal fenotip gösteren, daha invazif fenotipteki HCC hücre dizilerinde TXNIP ekspresyonunun, epitelyal fenotipteki daha az hareketli ve invazif hücrelere göre çok daha yüksek olduğu saptanmıştır.
7. Bu veriler doğrultusunda
 - a. Heparin'in cMet aracılıklı uyarılan p42,44 MAPK sinyal ileti yolağının uyarılması ile,

- b. HGF nin ise p42,44 MAPK ve Akt sinyal ileti yolağının aktivasyonu ile TXNIP ekspresyonunu artırdığı
- c. Heparin ve HGF nin birlikte uygulaması halinde TXNIP ekspresyonundaki baskılamanın cMet aktivasyonunun inhibisyonu yolu ile oluştuğu belirlendi. Bu sonuç heparinin düşük afinite ile cMET'e veya yüksek afinite ile HGF bağlandığını, Heparin veya HGF tek başına iken her iki molekül de cMet' e bağlanarak reseptör aktivasyonu yapabildiğini, buna karşın birlikte olduklarında heparinin HGF ye bağlanması nedeniyle cMet aktivasyonunun bloklandığını düşündürmektedir. Dolayısıyla daha önceki çalışmalarımızda elde ettiğimiz, heparinin HGF tarafından uyarılan hücre motilitesi, invazyonu üzerindeki inhibitör rolünün bu mekanizma ile ortaya çıkması mümkündür.
- d. TXNIP'in majör rolünün oksidatif stresi arttırmak olduğu düşünüldüğünde, TXNIP'in epitelyal fenotip gösteren hücre dizilerinde eksprese edilmemesi, buna karşın mezenşimal fenotip gösteren hücre dizilerinde ise yüksek düzeyde eksprese edildiyi olması, TXNIP aktivasyonunun HCC hücrelerinin oksidatif strese direnç kazanmasında ve invazyon yeteneklerinin artmasında önemli olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Korangy Et. Al. (2010). " Immune Responses in Hepatocellular Carcinoma" Dig Dis;28:150–154
2. Jarvinen Et. Al. (2005). " Fat in the liver and insulin resistance" Annals of Medicine; 37: 347–356
3. Wen Y. Et. Al. (2002) " Relationship of glycation, antioxidant status and oxidativestress to vascular endothelial damage in diabetes" Diabetes, obesity and metabolism, 4, 305-308.
4. Breuhahn K. , Longerich T., Schirmacher P. Et. Al. (2006) "Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma." Oncogene, 2006;26:3787-800
5. Sugimoto R. Et. Al.(2005). " High glucose stimulates hepatic stellate cells to proliferate and to produce collagen through free radical production and activation of mitogen-activated protein kinase" Liver International: 25: 1018–1026
6. Jiang W. Martin T. Et. Al. (2005). " Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies." Critical Reviews in Oncology/Hematology 53, 35–69
7. Li H. Jiang T. (2006). " HGF Protects Rat Mesangial Cells from High-Glucose-Mediated Oxidative Stress" Am J Nephrol;26:519–530
8. Naka D, Ishii T, Shimomura T (1993) " Heparin modulates the receptor-binding and mitogenic activity of hepatocyte growth factor on hepatocytes." Exp Cell Res. Dec;209(2):317-24.
9. Kemp L.E., Mulloy B, Gherardi H Et. Al. (2006) " Signalling by HGF/SF and Met: the role of heparan sulphate co-receptors" Biochemical Society Transactions, Volume 34, part 3.
10. Mulloy B. Forster M. (2000) " Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate." Glycobiology, 2000, Vol. 10, No. 11 1147-1156
11. Gandhi N. Ricardo L. (2008) " The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins" Chem Biol Drug Des; 72: 455–482.
12. Deepa P. Varalakshmi P. (2003) " Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity" Chemico-Biological Interactions 146, 201–210

13. Teoh M., Matthew P. Et Al.(2009) “ Overexpression of Extracellular Superoxide Dismutase Attenuates Heparanase Expression and Inhibits Breast Carcinoma Cell Growth and Invasion “ *Cancer Res*; 69: (15).
14. Rubin, J. S., Day, R. M., Breckenridge, D., Atabey N., Et Al., (2001) “Dissociation of Heparan Sulfate and Receptor Binding Domains of Hepatocyte Growth Factor Reveals That Heparan Sulfate-c-Met Interaction Facilitates Signaling.” *J. Biol. Chem*; 276: 32977-32983.
15. Chung J. Jeon J. Et Al. (2006) “ Vitamin D3 upregulated protein 1 (VDUP1) is a regulator for redox signaling and stress-mediated diseases” *Journal of Dermatology*; 33: 662–669.
16. SS Sheth1, JS Bodnar, A Ghazalpour, CK Thippavong, S Tsutsumi, Et al. (2006) “Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice.” *Oncogene* 25, 3528–3536.
17. Baker A. Et. Al. (2008) “Identification of Thioredoxin-Interacting protein 1 as a Hypoxia-Inducible Factor 1 α -Induced Gene in Pancreatic cancer.” *Pancreas*, Volume 36, Number 2.
18. Gianluigi G. Et. Al. (2006) “Novel Concepts in Hepatocellular Carcinoma: From Molecular Research to Clinical Practice.” *J Clin Gastroenterol*, Volume 40, Number 9.
19. W. L Tsai Et. Al. (2010) “Viral Hepatocarcinogenesis” *Oncogene* 29, 2309–2324
20. Gurtsevich V. Et Al. (2007) “ Human Oncogenic Viruses: Hepatitis B and Hepatitis C Viruses and Their Role in Hepatocarcinogenesis” ISSN 0006-2979, *Biochemistry*.
21. Sandrine P. (1998) “ Hepatitis B x Protein Inhibits p53-dependent DNA Repair in Primary Mouse Hepatocytes” *Vol. 273, No. 50, Issue of December 11, pp. 33327–33332.*
22. Stalnikovitz Et. Al. (2003) “Liver fibrosis and inflammation. A review” 159 *Annals of Hepatology* 2003; 2(4): October-December: 159-163
23. David R. Et. Al. (2009) “Tumor Suppressors, Chromosomal Instability, and Hepatitis C Virus–Associated Liver Cancer” *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 4:399-415.
24. Jose C. Et. Al. (2003) “ Alcohol-induced liver disease: when fat and oxidative stress meet” *Annals of Hepatology* 2(2): 69-75
25. bu da 25 Moradpour D., Blum H., E. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17:477-483, 2005.

26. Cha C., DeMatteo R., P., Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 19-1:25-37, 2005.
27. Farazi P. (2006) "Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment" *Nature*, September, Volume 6.
28. Daskalow K. (2009) "Distinct temporospatial expression patterns of glycolysis-related proteins in human hepatocellular carcinoma" *Histochem Cell Biol* (2009) 132:21–31
29. Fan J. (2009) "Prevention of hepatocellular carcinoma in nonviral-related liver diseases" *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24, 712–719.
30. Denko N. (2008) "Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour" *Nature*, September, Volume 8.
31. Sakurai T. (2008) "Hepatocyte Necrosis Induced by Oxidative Stress and IL-1 α Release Mediate Carcinogen-Induced Compensatory Proliferation and Liver Tumorigenesis" *Cancer Cell* 14, 156–165.
32. Wang T. (2006) "Causes and consequences of mitochondrial reactive oxygen species generation in hepatitis C" *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21, S34–S37.
33. Piccoli C. (2006) "Mitochondrial dysfunction in hepatitis C virus infection" *Biochimica et Biophysica Acta* 1757, 1429–1437
34. Koike K. (2006) "Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22.
35. Weickert M. Pfeiffer A. (2006) "Signalling mechanisms linking hepatic glucose and lipid metabolism." *Diabetologia* 49: 1732–1741
36. Leclercq A. Morais A. (2007) "Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences" *Journal of Hepatology* 47, 142–156
37. Agius L. (2008) "Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism." *Biochem. J.* 414, 1–18
38. Roden M. Bernroider E. (2003) "Hepatic glucose metabolism in humans—its role in health and disease" *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 17, No. 3, pp. 365–383.
39. Leclercq A. Morais A. (2007) "Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences" *Journal of Hepatology* 47, 142–156

40. Lecube A. Hernandez C. (2009) " Glucose abnormalities in non-alcoholic fatty liver disease and chronic hepatitis C virus infection: the role of iron overload" *Diabetes Metab Res Rev*; 25: 403–410.
41. Barthel A. Schmoll D. Unterman T. Et Al. (2005) " FoxO proteins in insulin action and metabolism" *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* Vol.16 No.4
42. Muoio D. (2007) "TXNIP Links Redox Circuitry to Glucose Control"
43. Ahsan M. Kaimul , Hajime Nakamura , Hiroshi Masutani , Junji Yodoi. et al. (2007) 'Thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cancer and metabolic syndrome' *Free Radical Biology & Medicine* 43 861–868
44. Nishiyama A. Matsui M. (1999) "Identification of Thioredoxin-binding Protein-2/Vitamin D3 Up-regulated Protein 1 as a Negative Regulator of Thioredoxin Function and Expression." *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 274, No. 31, Issue of July 30, pp. 21645–21650.
45. William A. Chutkow, Parth Patwari, Jun Yoshioka, and Richard T. Lee Et al. (2008) Thioredoxin-interacting protein (Txnip) Is a Critical Regulator of Hepatic Glucose Production. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 283, NO. 4, pp. 2397–2406
46. Junqin Chen, Geetu Saxena, Imran N. Mungrue Et al. (2008) Thioredoxin-Interacting Protein A Critical Link Between Glucose Toxicity and Cell Apoptosis. *Diabetes* 57: 938–944
47. Jee S. Kim H. (2005) "Obesity, Insulin resistance and Cancer risk." *Medical Journal*, Vol 46, No 4, pp 449-455.
48. Ha H. Lee H. Et Al. (2003) "Reactive Oxygen Species and Matrix Remodeling in Diabetic Kidney" *J Am Soc Nephrol* 14: S246–S249.
49. Jin-Shui Pan, Mei-Zhu Hong, Jian-Lin Ren Et al. (2009) Reactive oxygen species: A double-edged sword in oncogenesis. *World J Gastroenterol*; 15(14): 1702-1707
50. Michiko Sugita; Hiroki Sugita; Masao Kaneki Et al. (2004) Increased Insulin Receptor Substrate 1 Serine Phosphorylation and Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-Terminal Kinase Activation Associated With Vascular Insulin Resistance in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*;44:484.

51. Li FP, Zhang SQ, Wang F, Et al. (2009) Insulin resistance and islet beta cell function in type 2 diabetes mellitus and non alcoholic fatty liver disease. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*.;48(11):940-3.
52. Wei Wei, Qiuju Liu, Yi Tan, Lucheng Liu, Xiaokun Li Et al. (2009) Oxidative stress, Diabetes and Diabetic Complications. *Hemoglobin*, 33(5):370–377
53. Lorena P., Takhellambram S., Ken-ichi H. Et al. (2009) Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) Induces Inflammation Through Chromatin Modification in Retinal Capillary Endothelial Cells Under Diabetic Conditions. Published online in Wiley InterScience, DOI: 10.1002/jcp.21852
54. Li FP, Zhang SQ, Wang F, Et al. (2009) Insulin resistance and islet beta cell function in type 2 diabetes mellitus and non alcoholic fatty liver disease. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*.;48(11):940-3.
55. Jin-Shui Pan, Mei-Zhu Hong, Jian-Lin Ren Et al. (2009) Reactive oxygen species: A double-edged sword in oncogenesis. *World J Gastroenterol*; 15(14): 1702-1707
56. Yoko N., Mitsuo T., Taizo Y. Et al. (2007) High Glucose Activates Rat Pancreatic Stellate Cells Through Protein Kinase C and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Pancreas & Volume 34, Number 3.*
57. Diego G., Joel Omar J. Et al. (2009) Liver cirrhosis and diabetes: Risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World J Gastroenterol*; 15(3): 280-288
58. Kerstin S. Et al. (2009) Hepatocellular Carcinoma –Epidemiological Trends and Risk Factors. *Dig Dis*;27:80–92
59. Duck H Et al. (2002) Oxidative Stress, DNA Damage, and Breast Cancer. *AACN Clinical Issues*, Volume 13, Number 4, pp. 540-549
60. Kai-Shun Chen, Hector F. DeLuca Et. al. (1994) “Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3” Volume 1219, Issue 1, 13 September 1994, Pages 26-32
61. Maronpot RR, Fox T., Malarkey DE Et.al. (1995) “Mutation of β -catenin is an early event in chemically induced mouse hepatocellular carcinogenesis” *Oncogene* 18, 4726 \pm 4733
62. Akira N, Matsui M, Iwata S. Et. al. (1999) “Identification of Thioredoxin-binding protein-2/ Vitamin D3 upregulated Protein 1 as a negative regulator of Thioredoxin

- Function and Expression'' The journal of biological chemistry, Vol 274, No. 31, 21645-21650
63. P Pajukanta, J S Bodnar, R Sallinen Et. al (2001) ''Fine mapping of Hyplip1 and the human homolog, a potential locus for FCHL.'' *Mamm Genome* 12 (2001), pp. 238–245. (2001)
 64. Bodnar JS, Chatterjee A, Castellani LW, et al. (2002). "Positional cloning of the combined hyperlipidemia gene Hyplip1.". *Nat. Genet.* 30 (1): 110–6. doi:10.1038/ng811. PMID 11753387
 65. Entrez gene
 66. Eunsung J, Seung H, Joo Y, Et al. (2000) '' Vitamin D3 Up-Regulated Protein 1 Mediates Oxidative Stress Via Suppressing the Thioredoxin Function1'' *The Journal of Immunology*, 2000, 164: 6287–6295.
 67. Geetu S, Junqin C, Anath S. Et al. (2009) ''Intracellular shuttling and mitochondrial function of Thioredoxin-interacting protein'' *JBC Papers in Press*. Published on December 3, 2009 as Manuscript M109.034421
 68. Petwarl P. Higgins L. Et. Al. (2006). '' The Interaction of Thioredoxin with Txnip, EVIDENCE FOR FORMATION OF A MIXED DISULFIDE BY DISULFIDE EXCHANGE'' *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 281, NO. 31, pp. 21884–21891.
 69. Yoshida T. Takamura H. Et. Al. (2005) '' The Involvement of Thioredoxin and Thioredoxin Binding Protein-2 on Cellular Proliferation and Aging Process'' *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1055: 1–12
 70. Parikh H, Carlsson E, Chutkow WA, Johansson LE, Storgaard H, et al. (2007) TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. *PloS Med* 4(5): e158
 71. Alexandra H. Minn, Christian Hafele, and Anath Shalev et al. (2006) Thioredoxin-Interacting Protein Is Stimulated by Glucose through a Carbohydrate Response Element and Induces Beta Cell Apoptosis. *Endocrinology* 146(5):2397–2405
 72. Hyunjoo C, Geetu S, Junqin C, Anath S. Et al. (2009) '' Glucose-Stimulated Expression Of Txnip Is Mediated By CHREBP, P300 and Histone H4 Acetylation In Pancreatic Beta Cells'' 10.1074/jbc.M109.010504
 73. Han, Seung Hyun; Jeon Jun Ho, Et. Al. (2003). "VDUP1 upregulated by TGF-beta1 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor cell growth by blocking cell-cycle progression". *Oncogene*, 22 (26): 4035–46.

74. Jeon JH, Lee KN, Hwang CY, Et. Al. (2005) "Tumor suppressor VDUP1 increases p27(kip1) stability by inhibiting JAB1." *Cancer Res*; 65(11): 4485–4489.
75. Corn PG, El-Deiry WS.Et. al. (2002) Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *Bioessays*, 24(1): 83–90.
76. Ross DT, Scherf U, Eisen MB Et al., (2000) Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*; 24(3): 227–235.
77. Ludwig DL, Kotanides H, Le T, Et. Al. (2001) "Cloning, genetic characterization, and chromosomal mapping of the mouse VDUP1 gene." *Gene*; 269(1–2): 103–112.
78. Butler LM, Zhou X, Xu WS et al., (2002) "The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin." *Proc Natl Acad Sci U SA*; 99(18): 11700–11705.
79. Ahsan MK, Masutani H, Yamaguchi Y Et al.(2005), "Loss of interleukin-2-dependency in HTLV-I-infected T cells on gene silencing of thioredoxin-binding protein-2." *Oncogene*.
80. Khokon K Dutta1, Yumiko Nishinaka Et. Al.(2005) "Two distinct mechanisms for loss of thioredoxin-binding protein-2 in oxidative stress-induced renal carcinogenesis." *Laboratory Investigation* 85, 798–807
81. SS Sheth1 Et al. (2006) "Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice." *Oncogene* 25, 3528–3536
82. Yamaguchi F. (2008) " Rare sugar D-allose induces specific up-regulation of TXNIP and subsequent G1 cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells by stabilization of p27^{kip1}. *International journal of oncology*, 32:377-385.
83. Francesco T. Et. Al. (2007) "Hyperglycemia regulates thioredoxin-ROS activity through induction of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) in metastatic breast cancer-derived cells MDA-MB-231" *BMC Cancer*, 7:96
84. Baker A. (2008) "Identification of Thioredoxin-Interacting protein 1 as a Hypoxia-Inducible Factor 1 α -Induced Gene in Pancreatic cancer." *Pancreas*, Volume 36, Number 2.
85. Jan S. Meur N. Et. Al.(2006) " Characterization of the expression of the hypoxia-induced genes neuritin, TXNIP and IGFBP3 in cancer." *Febs Letters*, Volume 580, Issue 14, Pages 3395-3400

86. Baker A. (2008) "Identification of Thioredoxin-Interacting protein 1 as a Hypoxia-Inducible Factor 1 α -Induced Gene in Pancreatic cancer." *Pancreas*, Volume 36, Number 2.
87. Nakamura T, Et Al. (1989) "Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor." *Nature*;342:440–3.
88. Naldini L Et Al. (1991). "Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor." *Embo J*10:2867–2878.
89. Nakamura T. Et. Al. (1986). "Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures." *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6489–6493.
90. Gerrardi E, Stoker M. Et. Al. (1990) "Hepatocyte and scatter factor." *Nature* 1990;346:228.
91. Benvenuti S. Et Al. (2007) " The MET Receptor Tyrosine Kinase in Invasion and Metastasis" *J. Cell. Physiol.* 213: 316–325.
92. Zanetti A Et. Al. (1998) "Expression of Met protein and urokinase-type plasminogen activator receptor (uPA-R) in papillary carcinoma of the thyroid". *J Pathol* 186:287–291.
93. Christensen JG. Et. Al. (2004). "c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention." *Cancer Letters*, 225-1;1-26
94. Benvenuti S. Et Al. (2007) " The MET Receptor Tyrosine Kinase in Invasion and Metastasis" *J. Cell. Physiol.* 213: 316–325.
95. Daveau M. (2003) " Hepatocyte Growth Factor, Transforming Growth Factor α , and Their Receptors as Combined Markers of Prognosis in Hepatocellular Carcinoma" *Molecular Carcinogenesis* 36:130–141
96. Miura Y. Et Al. (2003) "Potentiation of invasive activity of hepatoma cells by reactive oxygen species is mediated by autocrine/paracrine loop of hepatocyte growth factor." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305, 160–165
97. Li H. (2006) "HGF Protects Rat Mesangial Cells from High-Glucose-Mediated Oxidative Stress" *Am J Nephrol*;26:519–530
98. Safran C. Carson F. Et Al. (2009) " Multifunctionality of extracellular and cell surface heparan sulfate proteoglycans" *Cell. Mol. Life Sci.* (2009) 66:3421–3434

99. Gallagher, J.T., Lyon, M. (2000). "Molecular structure of Heparan Sulfate and interactions with growth factors and morphogens". in Iozzo, M, V.. Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions. Marcel Dekker Inc. New York, New York. pp. 27–59.
100. Lozzo, R. V. (1998). "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function". *Annu. Rev. Biochem.* 67: 609–652.
101. Andres, J. L. et al. (1992). "Binding of two growth factor families to separate domains of the proteoglycan betaglycan". *J. Biol. Chem.* 267 (9): 5927–5930. PMID 1556106.
102. Jackson, D. G. et al. (1995). "Proteoglycan forms of lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the V-3 exon". *J. Cell. Biol* 128 (4): 673–685. doi:10.1083/jcb.128.4.673. PMID 7532175
103. Belting M. (2003) “ Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier” *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.28 No.3.
104. Gallagher, J. T. Walker, A. (1985). "Molecular distinctions between Heparan Sulphate and Heparin: Analysis of sulphation patterns indicates Heparan Sulphate and Heparin are separate families of N-sulphated polysaccharides". *Biochem. J.* 230 (3): 665–674. PMID 2933029.
105. Lindahl, U. et al. (1998). "Regulated diversity of Heparan Sulfate". *J. Biol. Chem.* 273 (39): 24979–24982. PMID 9737951.
106. Bernfield M. Gotte M. (1999) “ Functions Of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans.” *Annu. Rev. Biochem.* 68:729–777
107. Bentolila, A. et al.(2008) "Synthesis and heparin-like biological activity of amino acid-based polymers" Wiley InterScience, 03-10.
108. Deepa P. Varalakshmi P. (2003). “Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin induced cardiac and hepatic toxicity.” *Chemico-Biological Interactions.* 146,201-210.
109. Sela S. Swirski S. Shapiro G. Et Al. (2001) “Oxidative stres during hemodialysis: Effect of Heparin.” *Kidney International*, Vol 59, Suppl. 78, pp. S-159-S-163.
110. Weigert C. Brodbeck K. Et. Al. (2001). “Low molecular weight heparin prevents high glucose and phorbol ester-induced TGFβ1 gene activation.” *Kidney International*, Vol 60, Suppl. pp. S-935-S-960.

111. Sakata H. Stahl S. (1997) " Heparin Binding and Oligomerization of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Isoforms" Vol. 272, No. 14, Issue of April 4, pp. 9457–9463.
112. Chen C. Lin C. Et. Al. (2008) " Ceramide induces p38 MAPK and JNK activation through a mechanism involving a thioredoxin-interacting protein-mediated pathway" BLOOD, 15, VOLUME 111, NUMBER 8
113. Aoki M. Jiang H. Et Al. (2004). " Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins" pnas.0405454101
114. Li X. Rong Y. (2009) " Up-regulation of thioredoxin interacting protein (Txnip) by p38 MAPK and FOXO1 contributes to the impaired thioredoxin activity and increased ROS in glucose-treated endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun.;381(4):660-5. Epub 2009 Feb 28.
115. Zeigler M. Chi Y. (1999) " Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes" Journal of Cellular Physiology, Volume 180 Issue 2, Pages 271 – 284
116. Ye M. Hu D. (2008) " Involvement of PI3K/Akt Signaling Pathway in Hepatocyte Growth Factor-Induced Migration of Uveal Melanoma Cells" Investigative Ophthalmology and Visual Science;49:497-504.
117. Fa Z. Luo Y. Et Al. (2009) " Tandem ChoRE and CCAAT Motifs and Associated Factors Regulate Txnip Expression in Response to Glucose or Adenosine-Containing Molecules" PLoS ONE 4(12): e8397.
118. Waxman S. Wurmbach E. Et Al. (2007) " De-regulation of common housekeeping genes in hepatocellular carcinoma" BMC Genomics 2007, 8:243
119. Yuzgullu H. Benhaj K. Et Al. (2009) Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells" Molecular Cancer, 8:90
120. Caenozzo C. Garbia S. (1997) " Effect of glucose and heparin on mesangial α 1(IV)COLL and MMP-2/TIMP-2 mRNA expression" Nephrol Dial Transplant 12: 443–448

- 121.** Gugliucchi C. Stahl C. Et Al. (1993) ‘‘ Glycation and oxidation of human low density lipoproteins reduces heparin binding and modifies charge’’ Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 53: 2, 125 — 132
- 122.** Finotti P. Pagetta A. Et Al ‘‘ The oxidative mechanism of heparin interferes with radical production by glucose and reduces the degree of glycooxidative modifications on human serum albumin’’ Eur. J. Biochem. 268, 2193±2200 (2001)

Ek 1

1. PBS (Phosphate buffered saline)

Tablo 6. PBS içeriği

Kimyasallar	Konsantrasyon (mmol/L)	Miktar (g/L)
NaCl	137	8,00
KCL	2,7	0,20
Na ₂ HPO ₄	10	1,44
K ₂ HPO ₄	1,76	0,74

Kimyasallar tartıldıktan sonra 800ml distile su içerisinde çözüldü. Ph'ı 7,4'e ayarlandıktan sonra 1 litreye tamamlandı.

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

3. Tris-BSA:

0.5 M Tris-bazı

1.5 M NaCl

%2 BSA eklenerek hazırlandı. pH 7,3'e ayarlanarak +4oC de saklandı.

4.cDNA sentezi reaksiyon tamponu:

Tablo 7. cDNA sentezi reaksiyon tamponu içeriği

5X reaksiyon tamponu*	5 µl
10mM dNTP	2,5 µl
Ribolock RNase inhibitörü	1,25 µl
Reverse transkriptaz	1,5 µl

*Reaksiyon tamponu 25µl'lik bir reaksiyon için hesaplanmıştır. Tabloda belirtilen içerikte hazırlandı ve her bir örneğin üzerine 10,25 µl eklendi.

5. Tris-asetat EDTA (TAE)

50X stok solüsyonu hazırlandı.

Tablo 8. Tris-Asetat EDTA içeriği

Kimyasal	Miktar
Tris-Base	242 g
Asetik asit	57,1 ml
EDTA (0,5M, pH 8)	100 ml

Kimyasallar tartıldıktan sonra 1000 ml distile su içerisinde çözüldü. Agaroz jel elektroforezi uygulamalarında son konsantrasyonu 1X olacak şekilde seyreltildi.

6. 6X yükleme tamponu:

10mM Tris-HCL (pH 7,6)

%0,003 bromofenol mavisi

%0,003 ksilen siyanol FF

%60 Gliserol

60mM EDTA

7. Kullanılan primer antikolar ve solüsyonları:

Tablo 9. Western blottingde kullanılan antikolar

Primer Antikor	Primer Antikor Dilüsyonu	Sekonder antikor	Sekonder Antikor Dilüsyonu
Anti-TXNIP (MBL, K-0202-3)	1:1000	Anti Mouse (Pierce, 1858413)	1:2000
Anti-pAkt (Cell signalling, 4051)	1:1000	Anti Mouse (Pierce, 1858413)	1:3500
Anti-Akt (Cell signalling, 9272)	1:2000	Anti Rabbit (Pierce, 1858415)	1:3500
Anti-pMet (Cell signalling, 3129)	1:500	Anti Rabbit (Pierce, 1858415)	1:1000
Anti-Met (Santa Cruz, 161)	1:2000	Anti Rabbit (Pierce, 1858415)	1:1000
Anti-pFOXO1 (Cell)	1:1000	Anti Rabbit (Pierce)	1:1000

signalling 9461)		1858415)	
Anti-PTEN (Cell signalling, 4347)	1:1000	Anti Rabbit (Pierce, 1858415)	1:3500
Anti-p42, p44 (Cell signalling 9101)	1:1000	Anti Rabbit (Pierce, 1858415)	1:5000
Erk 1/2 (Santa Cruz, 93)	1:1000	Anti Rabbit (Pierce, 1848515)	1:5000

8. Comassie mavisi boyama ve boya uzaklaştırıcı solüsyonları:

Tablo 10. Comassie mavisi boyama ve boya uzaklaştırıcı solüsyon içerikleri

Boyama (Stain) solüsyonu	%0,5 Comassie Brilliant Blue-R250 %40 Metanol (Merck, 106007) %10 Asetik asit (Merck, 100056)
Boya uzaklaştırıcı (de-stain) solüsyon	%40 Metanol (Merck, 106007) %10 Asetik asit (Merck, 100056)

9. LB (Luria broth, Luria bertani broth):

5g Maya ekstraktı (Oxoid, L-21)

10g NaCl (Applichem, 2942)

10g Tripton (Applichem, 1553)

Kimyasallar tartılarak 800ml distile su içerisinde çözüldü. pH 7,2-7,4 arasında ayarlandı.

121°C'de 15 dk otoklavlandı.

10. Ampisilinli LB:

5g Maya ekstraktı (Oxoid, L-21)

10g NaCl (Applichem, 2942)

10g Tripton (Applichem, 1553)

100 µg/ml Ampisilin (Applichem, 0839)

Kimyasallar tartılarak 800ml distile su içerisinde çözüldü. pH 7,2-7,4 arasında ayarlandı.

121°C'de 15 dk otoklavlandı. Sıcaklık 45°C'nin altına düştüğünde ampisilin eklendi.

11. Agarlı LB:

5g Maya ekstraktı

10g NaCl

10g Tripton

15g Agar (Oxoid, L-11)

Kimyasallar tartılarak 800ml distile su içerisinde çözüldü. pH 7,2-7,4 arasında ayarlandı.

121°C'de 15dk otoklavlandı. Bakteri kültür kaplarına 15ml döküldü.

12. Ampisilin içeren agarlı LB

5g Maya ekstraktı

10g NaCl

10g Tripton

15g Agar (Oxoid, L-11)

100 µg/ml Ampisilin (Applichem, 0839)

Kimyasallar tartılarak 800ml distile su . içerisinde çözüldü. pH 7,2-7,4 arasında ayarlandı. 121°C'de 15dk otoklavlandı. Sıcaklık 45°C'nin altına düştüğünde ampisilin eklendi. Bakteri kültür kaplarına 15ml döküldü.

13. Süper optimal broth (SOB):

5g NaCl

20g Tripton

5g Maya ekstraktı

1M KCl'den 2,5ml

(Applichem, 2939)

Kimyasallar tartılarak 800ml distile su içerisinde çözüldü. pH 7,2-7,4 arasında ayarlandı.

121°C'de 15dk otoklavlandı. Kullanımdan önce 1M MgCl₂ solüsyonundan 1litreye 10ml olacak şekilde eklenerek kullanıldı.

14. Miniprep plazmid DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonlar ve içerikleri

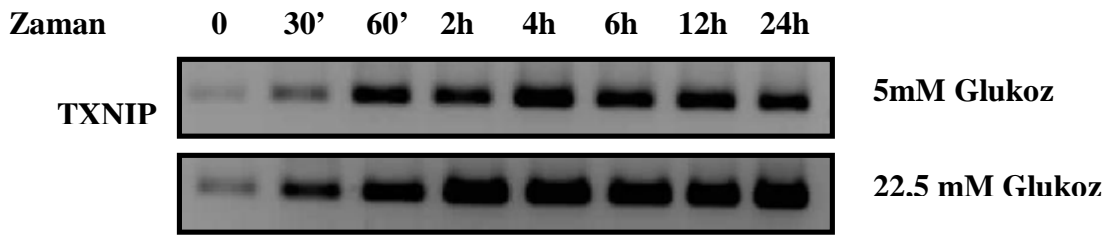
Tablo 11. Miniprep plazmid DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonlar ve içerikleri

Solüsyonun adı	Solüsyonun içeriği
ALS-1	- 50 mM Glukoz - 25 mM Tris-HCl - 10 mM
ALS-2	-0.2 N NaOH -%1 SDS
ALS-3	100ml ALS-3 için, -60 ml 5M Potasyum Asetat -11.5 ml Asetik Asit -28.5ml Distile Su

Ek 2. Destekleyici veriler

1. Doz ve zaman bağımlı Glukoz uyarımının TXNIP transkripsiyonuna olan etkisi

Glukozun farklı dozlarının TXNIP transkripsiyonu üzerindeki etkisini inceleyebilmek için SK-Hep1 hücrelerine 5mM ve 22,5mM glukoz uyarımı yapıldı. Ayrıca glukoz uyarımından sonra geçen sürenin TXNIP transkripsiyonuna olan etkisinin anlaşılabilmesi için 0, 30dk, 60dk, 2h, 4h, 6h, 12h, 24h sürelerle glukoz uyarımı yapıldı (Şekil 46).

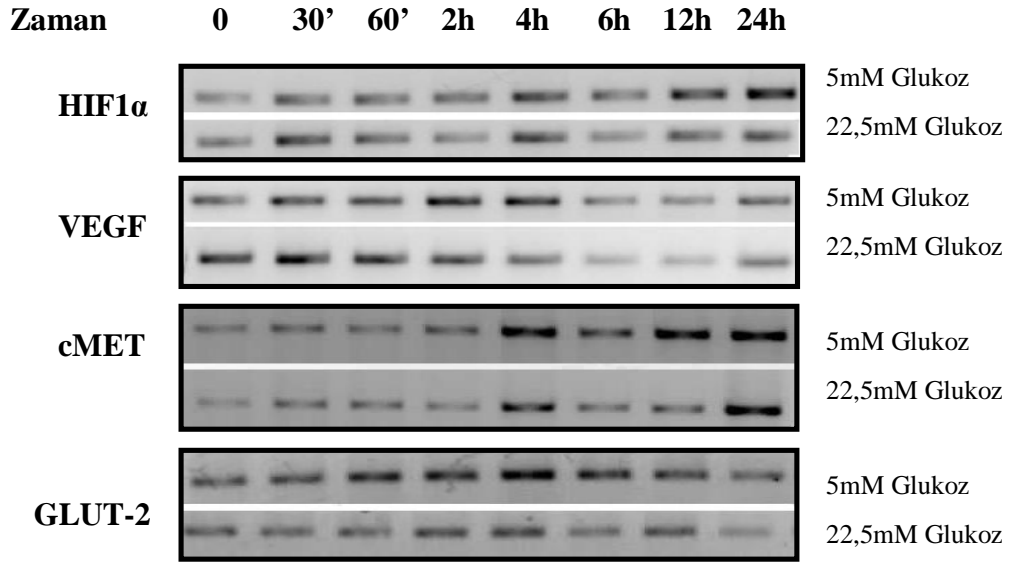


Şekil 49. Doz ve zaman bağımlı glukoz uyarımının TXNIP transkripsiyonuna olan etkisi

Şekilde görüldüğü gibi her iki dozda da artış 30. dakikadan itibaren başlamata ve 24. saate kadar devam etmektedir. Ayrıca 22,5 mM glukoz konsantrasyonu ile 5mM glukoz konsantrasyonu kıyaslandığında TXNIP transkripsiyonunun 22,5mM glukoz konsantrasyonunda daha fazla olduğu görülmektedir.

2.Doç ve zaman bağımlı Glukoz uyarımının GLUT2, HIF1 α , cMet, VEGF transkripsiyonlarına olan etkisi

TXNIP transkripsiyonunun artışıını uyarın koşullarda, karaciğer kanserinde arttığı bilinen GLUT2, HIF1 α , cMet, VEGF sinyal ileti moleküllerinin nasıl etkilendiğini araştırmak amacı ile doz ve zaman bağımlı glukoz uyarımı yapılmıştır (şekil 47).

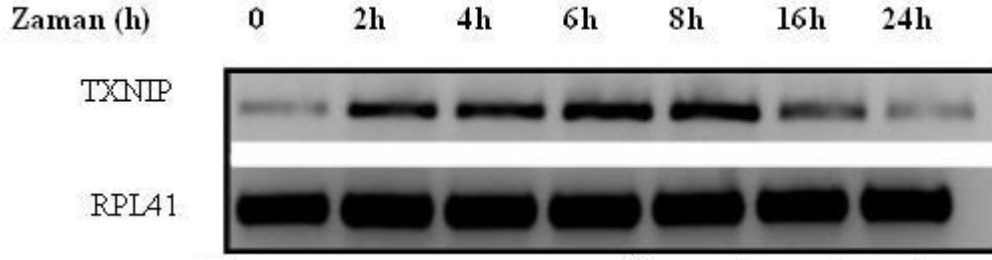


şekil 50. Glukoz uyarımına bağlı olarak HIF1 α , VEGF, cMET, GLUT-2 transkripsiyonlarındaki değişim

Doz ve zaman bağımlı glukoz uyarımına bağlı olarak TXNIP transkripsiyonuna benzer bir şekilde artmaktadır.

3.Hipoksik stres uygulamasının TXNIP transkripsiyonu üzerine olan etkisi

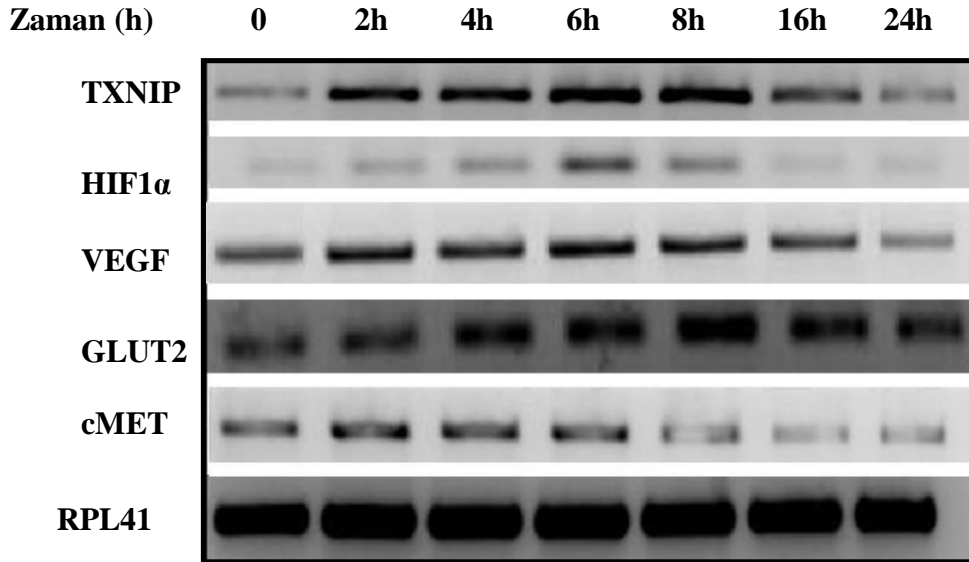
SK-Hep1 hücre dizilerine zamana bağımlı hipoksik stres uygulanmıştır. Hipoksi uyarımı ile TXNIP transkripsiyonu artmaktadır. Artış 2. saatten itibaren başlamakta, 6 ile 8. saat arasında maksimum düzeye ulaşmakta 16. saatten sonra ise bazal düzeye gerilemektedir (Şekil 48).



Şekil 51. Zamana bağımlı hipoksik stres koşullarının TXNIP transkripsiyonuna olan etkisi

4.Hipoksik stres uygulamasının GLUT2, HIF1 α , cMet, VEGF transkripsiyonlarına olan etkisi

SK-Hep1 hücrelerinde hipoksik stres ve yüksek glukoz TXNIP transkripsiyonunu arttırmaktadır. Aynı koşullarda mikroçevreyi temsil eden HIF1 α , VEGF, GLUT2 gibi hedef genlerin transkripsiyonlarındaki değişim incelenmiştir (Şekil 49).

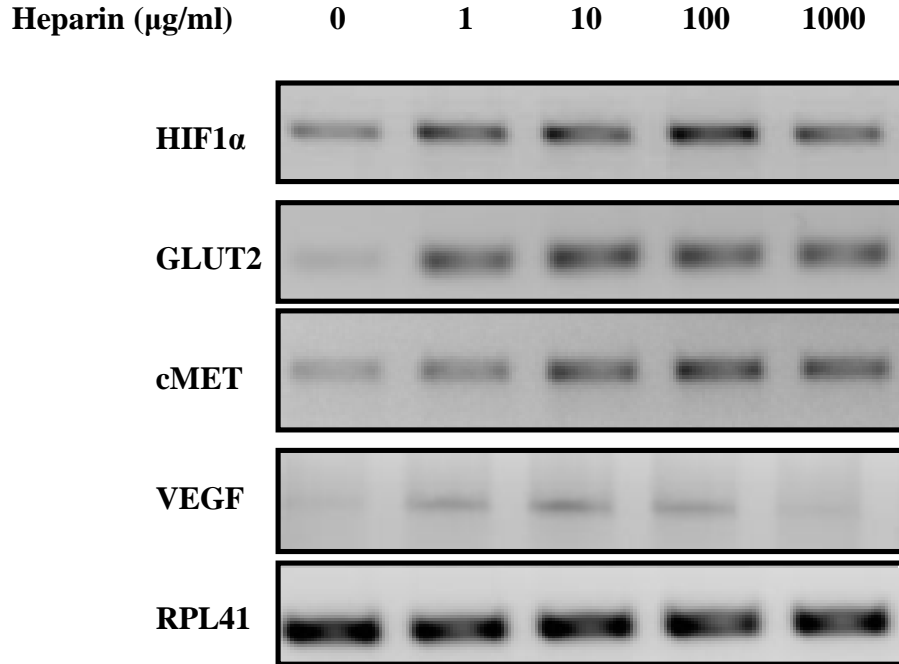


Şekil 52. Hipoksik stres uygulamasının GLUT2, HIF1 α , cMet, VEGF transkripsiyonlarına olan etkisi

Hipoksik stres uygulandığında TXNIP transkripsiyonuna benzer bir şekilde GLUT2, HIF1 α , cMet, VEGF transkripsiyonları artmıştır.

5.Heparin uygulamasının GLUT2, HIF1 α , cMet, VEGF transkripsiyonlarına olan etkisi

Heparinin farklı dozlarının GLUT2, HIF1 α , cMet, transkripsiyonlarına olan etkisini inceleyebilmek için SK-Hep1 hücrelerine 1, 10, 100, 1000 μ g/ml heparin uyarımı yapıldı. Ayrıca heparin uyarımından sonra geçen sürenin TXNIP transkripsiyonuna olan etkisinin anlaşılabilmesi için 0, 15dk, 30dk, 2h, 4h, 8h, 16h, 24h sürelerle heparin uyarımı yapıldı (şekil 50).



şekil 53. Doz bağımlı heparin uygulamasının GLUT2, HIF1 α , cMet, VEGF transkripsiyonlarına olan etkisi

Doz bağımlı heparin uygulaması TXNIP'e benzer şekilde GLUT2, HIF1 α , cMet, VEGF transkripsiyonlarını arttırmaktadır.

