

TC.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# **HİSTON MODİFİKASYONLARININ HÜCRE PROLİFERASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ**

**SANEM TERCAN AVCI**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İZMİR-2010**  
DEU.HSI. MSc-2007970124

TC.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# **HİSTON MODİFİKASYONLARININ HÜCRE PROLİFERASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SANEM TERCAN AVCI**

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Esra ERDAL

DEU.HSI. MSc-2007970124

Bu tez 2009.KB.SAG.070 kodlu DEÜ/BAP desteği almaktadır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Doç.Dr. Esra ERDAL'ın danışman olduğu Sanem TERCAN AVCI tarafından gerçekleştirilen "Histon modifikasyonlarının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri" isimli bu tez 04.08.2010 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı/başarısız bulunmuştur.

**Jüri Başkanı**

Doç. Dr. Esra Erdal

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Jüri Üyesi**

Prof Dr. Funda Yılmaz

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı

**Jüri Üyesi**

Prof. Dr. Neşe ATABEY

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

## İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ .....	iv
ŞEKİL LİSTESİ .....	v
KISALTMALAR .....	vi
TEŞEKKÜR .....	viii
ÖZET .....	1
ABSTRACT .....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	3
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1 Hepatosellüler Karsinoma .....	4
2.1.1 Hepatosellüler Karsinomanın Patogenezi ve Moleküler Mekanizmaları.....	5
2.2 Kromatin Modifikasyonları ve Transkripsiyonel Etkileri.....	9
2.2.1 DNA Metilasyonu .....	9
2.2.1.1 DNA Metilasyonu ve Kanser .....	10
2.2.2 Histon Modifikasyonları.....	11
2.2.2.1 Asetilasyon/ Deasetilasyon .....	12
2.2.2.2 Fosforilasyon.....	13
2.2.2.3 Metilasyon.....	14
2.2.2.3.1 Lizin Metilasyonları / Demetilasyonları .....	14
2.2.2.3.2 Arginin Metilasyonları.....	16
2.2.2.4 Deiminasyon .....	16
2.2.3 Histon Kod Hipotezi.....	17

2.2.4 Polycomb Grup Proteinlerin Epigenetik Rolü ve Moleküler Biyolojisi .....	18
2.2.4.1 Polycomb Grup Proteinlerin Transkripsiyonun Susturulmasındaki Rolü .....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	25
3.1 HCC Hücre Dizileri .....	25
3.2 Hücre Kültürü .....	25
3.3 Hücre dizilerinde Histon Modifikasyonlarının “Western Blot” Yöntemi ile Gösterilmesi	26
3.3.1 Protein İzolasyonu .....	27
3.3.1.1 Histon Proteinlerinin İzolasyonu .....	27
3.3.1.2 Sonikasyon Yöntemi ile Total Protein İzolasyonu .....	27
3.3.2 Protein Miktarının BCA Yöntemiyle Belirlenmesi .....	28
3.3.3 Proteinlerinin “SDS-PAGE” Görüntülenmesi .....	28
3.3.4 Proteinlerin Membrana Transferi .....	29
3.3.5 “Coomassie Blue” Boyaması .....	30
3.3.6 İmmünoiblotlama .....	30
3.3.7 Proteinlerin Membran Üzerinde Deteksiyonu .....	31
3.4 Hücre Hatlarında EZH2 ve JMJD3 Ekspresyonunun RNA Düzeyinde Belirlenmesi .....	32
3.4.1 Hücre Hattından Total RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini .....	32
3.4.2 Total RNA’lardan cDNA Sentezlenmesi .....	32
3.4.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	32
3.4.4 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi .....	34
3.5 İmmunoboyama .....	35
3.5.1. İmmunositokimya .....	35

3.5.2 İmmunofloresan Boyama.....	36
4. BULGULAR .....	37
4.1 Lityum HuH7 hücre hattında proliferasyonu inhibe eder ve genom düzeyinde histone modifiye eden enzimlerin anlamlı şekilde transkript seviyelerinde değişikliklere neden olur. ....	37
4.2 HuH7 Hücre Hattında Lityum Etkisinde JMJD3 ve EZH2 Ekspresyonunun Transkript ve Protein Düzeyinde Araştırılması .....	37
4.2.1 Lityum Etkisinde EZH2 ve JMJD3 Ekspresyonunun Transkript Düzeyinde Araştırılması .....	38
4.2.2 Lityum Etkisinde EZH2 Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Araştırılması .....	38
4.3 Lityum Etkisinde Oluşan Histon Modifikasyonlarının Araştırılması.....	39
4.4 HuH7 Hücrelerinde Lityum Etkisinde H3K27me3 Düzeyindeki Değişimin Doğrulanması .....	42
4.5 Lityum Etkisi ile EZH2'ın Fosforillenmiş Formundaki Değişiminin Belirlenmesi .....	44
5. TARTIŞMA .....	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR.....	51

## **TABLO LİSTESİ**

Tablo 2.1: Polycomb Repressive Kompleks (PRC2) bileşenleri ve fonksiyonları.....	20
Tablo 3.1: SDS-PAGE ayırlama ve istifleme jel bileşenleri.....	29
Tablo 3.2: İmmunoblotlamada kullanılan primer antikorlar, marka ve dilüsyonları.....	31
Tablo 3.3: PCR için kullanılan primerlerin 5'-3' yönünde ileri ve geri dizileri.....	33
Tablo 3.4: PCR reaksiyon profilleri.....	34
Tablo 4.1: Lityum etkisinde anlamlı değişime uğradığı gösterilen histon modifiye eden enzimler.....	37

## **ŞEKİL LİSTESİ**

Şekil 2.1: Hepatokarsinogenezin çok basamaklı gelişimi .....	5
Şekil 2.2: Tümör gelişiminde epigenetikdeğişiklikler.....	11
Şekil 2.3: Asetilasyonun regülasyonu. ....	13
Şekil 2.4: Fosforilasyonun regülasyonu.....	13
Şekil 2.5: Metilasyonun regülasyonu.....	14
Şekil 2.6: Ubikütinasyon bölgeleri .....	17
Şekil 2.7: PRC2 kompozisyonu ve EZH2 domainlerinin organizasyonu.....	21
Şekil 2.8: PcG-aracılı gen susturma mekanizması.....	23
Şekil 2.9: Epigenetik susturma mekanizmasının işbirliği.....	24
Şekil 4.1: Lityumun mRNA düzeyinde EZH2 üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.2: Lityumun protein düzeyinde EZH2 üzerine etkisi.....	39
Şekil 4.3: H3K9me3 modifikasyon değişimi.....	40
Şekil 4.4: H3K36me1 modifikasyon değişimi.....	41
Şekil 4.5: H3K27me3 modifikasyon değişimi.....	41
Şekil 4.6: H3K4me3 modifikasyon değişimi.....	42
Şekil 4.7: İmmünohistokimya.....	43
Şekil 4.8: İmmunofloresan boyama.....	45



## **KISALTMALAR**

FBXL10: F-box and leucine-rich repeat protein 10

MLL: Myeloid/lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia

JMJD2C: jumonji domain containing 2C

EZH2: Enhancer of Zeste Homolog 2

HCC: Hepatoselüler Karsinom

HGF: Hepatosit büyüme faktörü

MAPK: Mitojen aktive edici protein kinaz

SAPK-2: stres ile aktive olan protein kinaz 2

ERK1/2: Hücre dışı sinyal regüle edici kinaz protein homologları 1 ve 2

COX2: siklooksijenaz 2

HAT: Histon deasetilaz  
DLC: karaciğer kanseri delete 1 geni

HDAC: histon deasetilaz

HMT: histon metil transferaz

PTM: post-translasyonel modifikasyonlar

DNMT: DNA metil transferaz

HOX: homeodomain genleri

H3K27me3: histon 3 lizin 27 trimetilasyonu

H3K4me3: histon 3 lizin 4 trimetilasyonu

H3K36me1: histon 3 lizin 36 metilasyonu

H3K9me3: histon3 lizin9 trimetilasyonu

H3S10p: histon 3 serin 10 fosforilasyonu

HBV: Hepatit B virüsü (HCV: Hepatit C virüsü)

CDK: Siklin bağımlı kinazların

JNK1/2/3: c-jun N-terminal kinaz homologu

Jak/STAT: Janus kinase/signal-transducer and activator of transcription protein

SOCS: Suppressor of Cytokine Signaling

APC: Adenomatous polyposis coli

PcG: Polycomb G protein

TrxG: Trithorax group proteinler

PRC1/2: Polycomb Repressive Complex 1/ 2

PCR: polimeraz zincir reaksiyonu

SDS-PAGE: sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

## **TEŞEKKÜR**

Hocalarım Esra Erdal ve Neşe Atabey başta olmak üzere tüm grup arkadaşlarıma öğrettikleri, kattıkları, paylaştıkları herşey için teşekkür ederim.

Annecim, babacım ve eşim.. Yürekten desteğiniz ve en az benim kadar gösterdiğiniz çaba olmasaydı, başaramazdım. Oğlum.. Enerjin, yaşama sevincin, büyüme ve öğrenme hızın, merakların ve yeni keşiflerin bu yoğun dönemde en büyük motivasyonumdu. İyi ki varsınız..

## “Histon Modifikasyonlarının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri”

Sanem TERCAN AVCI, DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD İnciraltı/İZMİR

[sanemtercan@gmail.com](mailto:sanemtercan@gmail.com)

### **ÖZET**

Normal karaciğer hücresinin viral yada kimyasal ajanlarla karşılaşması tekrarlayan nekroz/proliferasyon döngüleri ve buna bağlı telomer kısalmasını tetikler. Buda karaciğerde mikroçevre değişiklikleri, kök hücre ve/veya satelit hücrelerin aktivasyonu, sonrasında kontrolsüz hücre bölünmesine ve apoptoza direnç kazanımına bağlı siroz, displastik nodül ve hepatosellular karsinoma (HCC) gelişmesini sağlar. Hepatokarsinogenez sürecinde birçok genin promotor metilasyonu yoluyla susturulduğu gösterilmiş olsa da histon kodu değişikliklerinin rolü henüz bilinmemektedir.

Bu çalışmada temel olarak, HCC hücre hatlarından HuH7’da lityum aracılıklı proliferasyon inhibisyonu sonucunda, transkripsiyonel aktivasyon ve/veya baskılama sağladığı literatürde bilinen başlıca histon metilasyon profillerindeki değişim incelenmektedir. Buna göre, lityuma bağlı olarak hücrelerde G1 arresti gözlemlenmiş ve beraberinde H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 ve H3K36me1 modifikasyonlarında artış bulunmuştur. Ayrıca H3K27me3 modifikasyonundan sorumlu EZH2 metil transferazının transkript ve protein düzeyinde gözlemlenen azalışa rağmen beklenmedik şekilde sorumlu olduğu modifikasyonda tespit edilen artış bize lityumun başka bir mekanizma ile etki ettiğini düşündürmüştür. Lityumun literatürde bilinen kadarı ile GSK3β ve Akt gibi kinazların inhibitörü olması bize bu kinazların EZH2’yi fosforilleyerek inhibe edebileceği hipotezini kurdurmuştur. Bu hipotezi test etmek için yapılan deneylerde lityum etkisine bağlı olarak 2 ve 6. saatlerde EZH2’nin fosforile formunun miktarca azaldığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak, HCC hücre hatlarında yapılan analizler bize H3K27me3 modifikasyonu başta olmak üzere histon modifikasyon profillerindeki değişimlerin hücre proliferasyonunda etkili olabileceğini göstermiştir. Bu da HCC tedavisinde histon kodunun potansiyel rolüne bağlı yeni ufukların açılmasına neden olabilmesi açısından önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** HCC, histon modifikasyonları, EZH2

## **“Effects of Histone Modifications on Cell Proliferation”**

**Sanem TERCAN AVCI, DEU School of Medicine, Department of Medical Biology  
Inciralti/IZMIR**

**sanemtercan@gmail.com**

### **ABSTRACT**

Exposure of normal liver cell with a viral or chemical agent triggers telomere shortening associated with repetitive necrosis/proliferation rotation. It causes changes in microenvironment of liver, activation of stem cells and/or satellite cells, after that, activation of cirrhosis, displastic nodule and hepatocellular carcinoma (HCC) depending on the aberrant cell division and resistance to apoptosis. It was demonstrated that during hepatocarcinogenesis most of genes silenced by methylation on their promoter, even though the roles of histone code alterations have not been known yet.

In this study, it was basically investigated changes of histone methylation patterns, known as helper on the activation and/or silencing transcription in literature, under the effect of lithium treatment in a HCC cell line, HuH7. Accordingly, it was observed that G1 arrest occurred in cells treated with lithium and it was detected upregulation of H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 and H3K36me1 modifications. Furthermore, in contrast to EZH2 methyl transferase that catalyses trimethylation of H3 on Lys27 downregulate on transcriptional and protein level, unexpectedly H3K27me3 the modification of which this enzyme responsible for is increases. This result makes us thinking lithium affects by a different mechanism. It was known that from the literature knowledge lithium is inhibits kinases like GSK3B and Akt, hypotesized us that kinases inhibits EZH2 by phosphorylation. To test this hypothesis, we demonstrated that according to lithium affect phophorylated EZH2 decreases on 2. and 6. hours.

As a conclusion, these analyses showed us the alterations of histone modification patterns, especially H3K27me3 modification, might affect cell proliferation on HCC cell line. This is important to offer new opportunities for addressing the potential role of histone code in HCC treatment.

**Key Words:** HCC, histon modifications, EZH2

## **1. GİRİŞ ve AMAC**

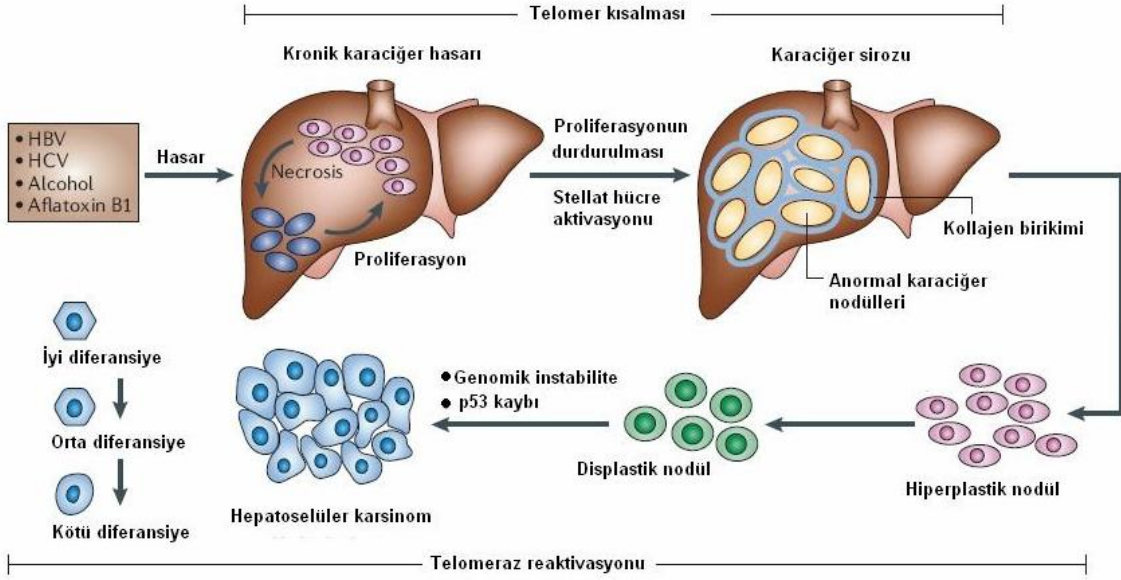
Önceki çalışmalarımızda bir hepatoselular karsinoma hücre hattı olan HuH7 hücrelerinde in vitro koşullarda lityumun proliferasyonu G1 evresinde durdurduğu gösterilmiştir (1). Daha sonra aynı koşullarda çoğalmaları durdurulmuş hücrelerde ve kontrol hücrelerinde yapılan mikroarray çalışmasında (G. Karakulah, yayınlanmamış veri), lityuma bağlı hücrelerde 1807 genin istatistiksel anlamlı düzeyde değiştiği tanımlanmıştır. Yine aynı çalışmada, lityum uygulamasının kontrole göre, histone modifikasyonlarına yol açan, FBXL10, JMJD2C, JMJD3, MLL, MLL4, MLL5, EZH2 gibi histon metil transferaz ve demetilaz genlerinin transkripsiyonunda anlamlı düzeyde değişime neden olduğu bulunmuştur. Literatürde son yıllarda nükleosomun temel yapısını oluşturan histon kor proteinlerinin başlıca metillenme ve asetillenme aracılıklı modifikasyonları sonucunda bu kora sarılı genlerin transkripsiyonel aktivitelerinin değiştiği ve bunun özellikle gelişim ve yaşlanma süreci gibi çok sayıda genin senkronize şekilde çalıştığı durumlarda çok önemli rolü olduğu gösterilmeye başlanmıştır (2-6). Mikroarray çalışmamızda anlamlı değişim gösteren gen sayısındaki bu fazlalık, bize buradaki hücre döngüsünün durdurulması olayında da kontrol edici genel bir mekanizmanın olabileceğini düşündürdü. Yine, *C.Elegans* modelinde lityumun histonların modifiye formlarını değiştirerek yaşam süresini kısalttığının gösterilmesi bize HCC (Hepatoselüler Karsinom) modelinde de lityumun histone kodunu değiştirerek hücre proliferasyonunu etkileyebileceği hipotezimizi kuvvetlendirmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, HuH7 hücrelerinde, lityum bağımlı proliferasyonun durdurulması esnasında kontrol hücrelere karşı oluşan histone H3 kuyruğu metillenme ve farklılıklarına bakılması amaçlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Hepatosellüler Karsinoma**

Karaciğer omurgalılarda ve diğer bazı hayvanlarda bulunan yaşamsal bir organdır ve metabolizma açısından önemli role sahiptir. Detoksifikasyon, protein sentezi, sindirim için gerekli biyokimyasalların üretilmesi, glikojen depolanması, kırmızı kan hücrelerinin parçalanması, plazma proteini sentezi ve hormon üretimi birkaçı olmak üzere birçok fonksiyona sahiptir. Sindirim için ve yağların emülsifikasyonu için gerekli olan alkalın bileşeni olan safrayı üretir (7).

Primer karaciğer kanseri kanser ölümleri içinde dördüncü sırada (her yıl 600.000'den fazla ölüm tahmin edilmektedir), insan malign tümörleri içinde de üçüncü sırada yer almaktadır (8,9). Karaciğer kanserinin ölümcül olmasının nedeni, varolan antikanser ajanlara karşı dirençli olması ve hastalığın saptanması için biobelirteç bulunmamasıdır. Bu da başlangıç aşamasında cerrahi rezeksiyonu ve kemoterapötik ilaçların kullanımını kısıtlandırmaktadır (10). Primer karaciğer kanserinin iki türü vardır; hepatoma ve kolanjiokarsinoma. Hepatoma, esas fonksiyonel karaciğer hücresi olan hepatositlerin kanseridir. Kolanjiokarsinoma, safra kanallarından orijinlenir. Hepatoblastoma (HB), en yaygın pediatrik karaciğer malign tümörüdür. Tüm pediatrik kanserlerin yaklaşık 1%'ini oluşturur (11). Karaciğer anjiyosarkoma, karaciğerde bulunan kandamarı hücrelerinden gelişen oldukça nadir görülen primer karaciğer kanseri tipidir. Hepatosellüler karsinoma (HCC), dünyada Asya ve Afrikada Sahara çölü'nün güney kısmında prevalansı yüksek en yaygın (tüm vakaların 83%'ü) malign karaciğer tümörüdür (12). Son çalışmalar, ABD'nin yanı sıra, Avrupa ve Japonya gibi diğer bölgelerde de HCC insidansının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir (13, 14). HCC, etiyojisi çoğu vakada tanımlanabilen birkaç kanser türünden biridir. Hepatokarsinogenez hemen her zaman, çoğu hepatositin öldüğü, karaciğerin ve bağdokunun enflamasyonlu hücreler tarafından ele geçirildiği, kronik hepatitis veya siroz zemininde gelişir (15). HCC gelişimi çok basamaklı ve yavaş bir süreçtir. HCC'ye neden olan ardışık olayları sırasıyla, inflamasyona neden olan kronik karaciğer hasarı, hücre ölümü, siroz ve rejenerasyon, DNA hasarı, displazi ve HCC olarak özetlemek mümkündür (Şekil 2.1) (10, 16).



**Şekil 2.1:** Hepatokarsinogenezin çok basamaklı gelişimi (10).

### 2.1.1 Hepatosellüler Karsinomun Patogenezi ve Moleküler Mekanizmaları

HCC tüm dünya popülasyonunun her parçasını etkilemekle beraber çeşitli ülkelerde HCC insidansı bakımından belirgin farklılıkların olması, etnik köken ile beraber spesifik etyolojik faktörleri yansıtır. HCC ile ilişkili en belirgin faktörler, kronik hepatit B ve C viral enfeksiyonu, kronik alkol tüketimi, aflotoksin-B1 kontamine gıdalar ve sirozu indükleyen koşullardır (Şekil 2.1) (17). Düşük frekansa sahip olsalar da diğer etyolojik faktörler de HCC'ye neden olmaktadır; belli metabolik hastalıklar, diyabet, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanma bozukluğu. Cinsiyet de HCC riskini ve davranışını etkiler, olguların büyük kısmını erkekler oluşturmaktadır (18).

Hepatokarsinogenez sürecine öncülük eden mekanizmalar hakkında çok fazla bilinmeyen bulunmaktadır. Temel olarak, viral ve/veya hepatotoksik ajana maruz kalınması sonucu karaciğer dokusunda aniden meydana gelen değişimler, tümör oluşumu ile sonlanan sinyal yolağı ve gen ekspresyonu değişimlerine neden olur. HCC'nin moleküler analizi ile bazı onkogen ve tümör supresör genlerin deregülasyonu ile sonuçlanan birçok genetik ve epigenetik farklılıklar gösterilmiştir. Bu değişimlere uğrayan moleküller içinde TP53, B-katenin, ErbB reseptör ailesi elemanları, pRb, MAPK yolağı, MET ve ligandı hepatosit büyüme faktörü (HGF), p16(INK4a), E-kaderin ve siklooksijenaz 2 (COX2) yer almaktadır (10).



### *p53 tümör süpresörü*

Tüm insan tümörlerinin yaklaşık yarısında TP53 tümör supresör geni farklı lokasyonlarda tanımlanan tek nokta mutasyonları ile inaktive edilmiştir (19). HCC'li hastalarda yapılan analizlerde, p53 geninin 249. ve 250. kodonlardaki nokta mutasyonları yoluyla inaktivasyonunun, aflatoxin B1 aracılıklı olduğu bildirilmiştir (20, 21). Yine, HBV veya HCV'nin neden olduğu düşünülen HCC'li hastalarda yapılan analizler sonucu ilerlemiş malignansilerde 43%, yeniden oluşan nodüllere 7% oranla p53 mutasyonu frekansı daha yüksektir (22). Oksidatif stresin siroz gelişimindeki rolü açıktır ve neden olduğu p53 mutasyonları yoluyla karaciğer kanseri oluşturma riskinin en az 200 kat arttığı bildirilmiştir (23).

### *pRB yolağı*

Retinoblastoma protein, pRB1, kanser gelişimine karşı en önemli hücresel bariyerdir. E2F transkripsiyon faktör ailesi proteinlerini baskılama yolu ile hücre döngüsünü kontrol eder. Siklin bağımlı kinazların (CDK) aktivitesi, pRb fosforilasyonunun başlaması ve G1/S hücre döngüsü geçişi ile ilişkilidir (24). pRb üzerinde 16'dan fazla CDK fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgelerden uygun CDK'lar spesifik olarak pRB'yi fosforiller (25). Her iki Rb1 allelinin mutasyonel inaktivasyonu pediatrik kanser olan retinoblastomanın oluşum nedenidir. Ek olarak insan papilloma virusu gibi çeşitli viruslerin kodladığı proteinlerinin Rb ve p53 proteinlerine bağlanarak inhibe ettikleri ve bu yolla başta serviks olmak üzere çeşitli kanser oluşum mekanizmalarında önemli role sahip oldukları bilinmektedir.

p16(INK4a), p21<sup>(WAF1/CIP1)</sup>, ve p27<sup>Kip1</sup> gibi CDK inhibitörlerinden birinde veya birkaçında herhangi bir ekspresyon hatası veya değişikliğinin kanser gelişimi sürecine etkisi HCC olgularının yaklaşık 90%'ında gözlenmektedir (26). Hepatokarsinogenezin erken döneminde ve hastalığın ilerlemesinde ağırlıklı olarak p16(INK4a) inaktivedir. HCC'lerde p53 mutasyonu ile ilişkili olarak azalan p21<sup>(WAF1/CIP1)</sup> ekspresyonu da hepatokarsinogenez sürecine katkıda bulunur.

### *MAPK (Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz) Yolağı*

Hücre içi MAPK ailesi 5 tane alt grup içerir. Hücre dışı sinyal regüle edici kinaz protein homologları 1 ve 2 (ERK1/2), büyük MAPK-1 (BMK-1/ERK5), c-jun N-terminal kinaz homologu (JNK1/2/3), stres ile aktive olan protein kinaz 2 (SAPK-2) homologları  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\delta$  (p38 $\alpha$ / $\beta$ / $\delta$ ) ve p38• olarak da bilinen ERK6. MAPK'lar hücre sağkalımı, farklılaşması, adezyonu ve proliferasyonu gibi farklı hücresel proseslerde bulunurlar (27). HBV, HCV ve hepatit E virüs proteinleri sinyal yolağının farklı basamaklarını hedefleyerek MAPK sinyalizasyonunu değiştirir (28). Örneğin, HCV E2 proteini HuH7 insan hepatoma hücrelerinde MAPK yolağını aktive eder ve hücreleri çoğalmaya yönlendirir (29).

### *Ras Yolağı*

İnsan Ras proteinleri, H-Ras, N-Ras, K-ras4A ve K-ras4b, küçük GTP bağlayan proteinlerdir. Hücre büyümesi, diferansiyasyonu ve apoptoza etki ederler (30). HCC'de metil nitrozamin, bleomisin gibi çeşitli kimyasalların neden olduğu H-ras'ın 13. kodonunda, N-ras'ın 12. ve K-ras'ın 61. kodonunda tek nokta mutasyonu gözlenmiş olmasına rağmen Ras mutasyonları insan HCC'lerinde düşük sıklıkta gözlemlenmiştir (31-34). Ras bir serin/treonin kinaz olan, Raf-1 ile etkileşir. Böylece Ras aktive olur ve proliferasyon ve apoptozu regüle eden sinyal yolağı, MEK1 ve MEK2 MAPK'ların da aktivasyonu ile ilerler (35). HCC'de dahil olmak üzere birçok solid tümörlerde ve hücre hatlarında Ras'ın aktivasyonu ve p21 gibi Ras yolağı proteinlerinin ekspresyonu bildirilmiştir (36).

### *JAK/STAT Yolağı*

Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü olan STAT'lar, çeşitli sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörleri tarafından aktive edilen transkripsiyon faktörlerinden oluşur JAK'lar tarafından tirozin fosforilasyonu yolu ile aktive olurlar. Aktive STAT, sitokin sinyalini baskılayan, SOCS, genlerinin transkripsiyonunu uyarır. SOCS proteinleri yolağı inhibe etmek için fosforile JAK'lara ve reseptörlerine bağlanır. Böylece sitokin ile aktive olan hücrelerin aşırı aktivasyonunu önler (37). Yoshikawa ve arkadaşlarının ilk kez gösterdiği, sonradan diğer çalışmalarda da tanımlandığı gibi JAK ile bağlanarak sitokin sinyalizasyonunu inhibe eden SOCS-1 promotorunun HCC hücre hatları ve dokularında metile olduğu ve bu yolla SOCS-1 ekspresyonunun kaybolmasının sirozdan HCC'ye geçište çok önemli olduğu

bulunmuştur (38, 39).

### *Wnt/B-katenin Yolağı*

Wnt sinyal yolağı ilk olarak sirke sineğinde tanımlanmış ve evrim süresince korunmuştur. Homeostazis, hücre proliferasyonu, farklılaşması, hareketliliği ve apoptoziste yer almaktadır (40). HCC'nin de dahil olduğu kolon, meme, prostat gibi birçok kanser türünde aktive durumdadır (41). Çoğu olguda tümör supresör gen olan APC (adenomatous polyposis coli) inaktivasyonu, veya bir protoonkogen olan B-katenin mutasyonu ve Wnt sinyalizasyonunun aktivasyonu gözlenmektedir. HBV/HCV enfeksiyonu ve alkole bağlı karaciğer sirozundan kaynaklanan HCC'lerde bu yolak aktivedir (42, 43). Frizzled 7 aşırı ekspresyonu ve B-katenin defosforilasyonu sıklıkla HCC'lerde gözlenir (43). Bu nedenle Wnt yolağının inaktivasyonu potansiyel bir kanser tedavisi yaklaşımıdır.

B-katenin mutasyonları, fosforilasyonu ve bu fosforilasyonun ardından yıkımını önlemesine rağmen, Wnt/B-katenin sinyal yolağı aktivasyonunu tetikler. Mutant protein normalde çekirdekte birikir ve varlığı HCC insidansını azaltır. Ayrıca B-katenin mutasyonları HCV'ye ve aflotoksine daha çok maruz kalan HCC hastalarında oldukça yüksektir (44) Wnt yolağının negatif regülatörü olan Axin 1 ve Axin 2 mutasyonları da HCC'de gözlenmektedir (45).

### ***2.1.2 Hepatosellüler Karsinomadaki Epigenetik Düzenlemeler***

Hepatokarsinogenez sürecinde rolü olan genetik değişiklikler sayıca diğer kanser türlerinde tanımlanandan çok daha az olmasına rağmen, anormal metilasyon paternleri çokca bildirilmiştir (46, 47). Yine metiyonince eksik diyet verilen farelerde spontan HCC gözlenmesi epigenetik regülasyonun bu modelde daha önemli olduğunu düşündürmektedir (48). Çeşitli çalışmalarda HCC dokularında özellikle kromozom 16 da artan DNA metilasyonlarına rastlanmıştır (49, 50). Yine birçok çalışmada HCC'de özellikle p16 genindeki hipermetilasyon ve bu yolla inaktivasyon tanımlanmıştır (51, 52). Ek olarak, normal karaciğer, siroz ve HCC dokuları ile yapılan analizlerde, HCC'li dokularda diğerlerine göre, ABL, CAV, EPO, GATA3, LKB1, NEP, NFL, NIS ve p27KIP1 genler unmetile olurken ABO, AR, CSPG2, cyclin a1, DBCCR1, GALR2, IRF7, MGMT, MT1A, MYOD1, OCT6, p57KIP2, p73, WT1 gibi genlerin hipermetile olduğu gösterilmiştir (53). Bu genlere ek olarak diğer çalışmalarda, E-kaderin, COX2, apoptoz ilişkili speck-like protein(ASC),

karaciğer kanseri delete 1 geni (DLC) hipermetilasyona uğramaktadır (54-56) . Sonuç olarak, hepatokarsinogenez ile ilgili anahtar genlerin epigenetik olarak sessizleştirilmesinin anti-onkolojik ajanların yeni bir sınıfının geliştirilmesi için yeni bir yön sağlayacağı söylenmektedir (10).

## **2.2 Kromatin Modifikasyonları ve Transkripsiyonel Etkileri**

Epigenetik, DNA dizisinin kendisi tarafından kodlanmayan gen ekspresyonundaki kalıtsal değişikliklerin çalışılmasıdır. Kromatin yapısındaki alternatifleri oluşturan epigenetik regülasyonlar, öncelikle histon kuyruklarında meydana gelen post-translasyonel modifikasyonlar (PTM), histon varyantlarının nukleozomlara eklenmesi ve DNA metilasyonlarıdır (57).

Modifikasyonların çoğu, kromatin konformasyonunu ve düzenleyici proteinlerin DNA dizisine erişimini modüle ederek, gen ekspresyonunu regüle eder. Bu modifikasyonlar çoğu zaman kromatin konformasyon dinamiklerinin regülasyonu ile ilgili proteinler için bağlanma bölgeleri sağlar. En basit düzeyde, ulaşılabilir açık kromatin ipliği transkripsiyona eğilimlidir. Transkripsiyonel olarak aktif ökromatin, histon hiperasetilasyonu ve H3K4 metilasyonu ile ilişkilidir (58). Belirli bir kromatin bölgesinin sıkışması ile ilgili modifikasyon taşıyan alanlar, transkripsiyona karşı bariyerler oluşturur. Bu alanlar transkripsiyonun sınırlandırıldığı heterokromatin bölgeleridir. Susturulmuş gen bölgelerinin ekspresyonları, hipoasetilasyon ile ilişkilidir ve H3K9Me1 ve H3K27Me2/3 epigenetik modifikasyonlarını taşırlar (59)

### **2.2.1 DNA Metilasyonu**

DNA'nın metillenmesi omurgalılarda transkripsiyonun kontrolünde kromatin yapısı ile ilişkili genel bir mekanizmadır. Omurgalı DNA'sındaki sitozin birimleri 5-karbon pozisyonuna metil gruplarının takılmasıyla modifiye edilebilir. DNA zincirinde G'lerden önce yer alan C'lerden (CpG dinükleotidler) spesifik olarak metillenir. Bu metillenme promotorların çevresinde yüksek sıklıkta CpG dinükleotidi içeren genlerin transkripsiyonel aktivitelerinin azaltılması ile ilişkilidir. Metillenen DNA'ya bağlanan represörler, histon deasetilazlar ile kompleks oluşturarak çalışır ve DNA metillenmesini, histon asetilasyonu ve nukleozom yapısındaki değişimlerle ilişkilendirir. DNA metillenmesi temel olarak gelişim sürecinde gen inaktivasyonunun sürekliliğinde ve korunmasında katkı sağlar. Örneğin, inaktif

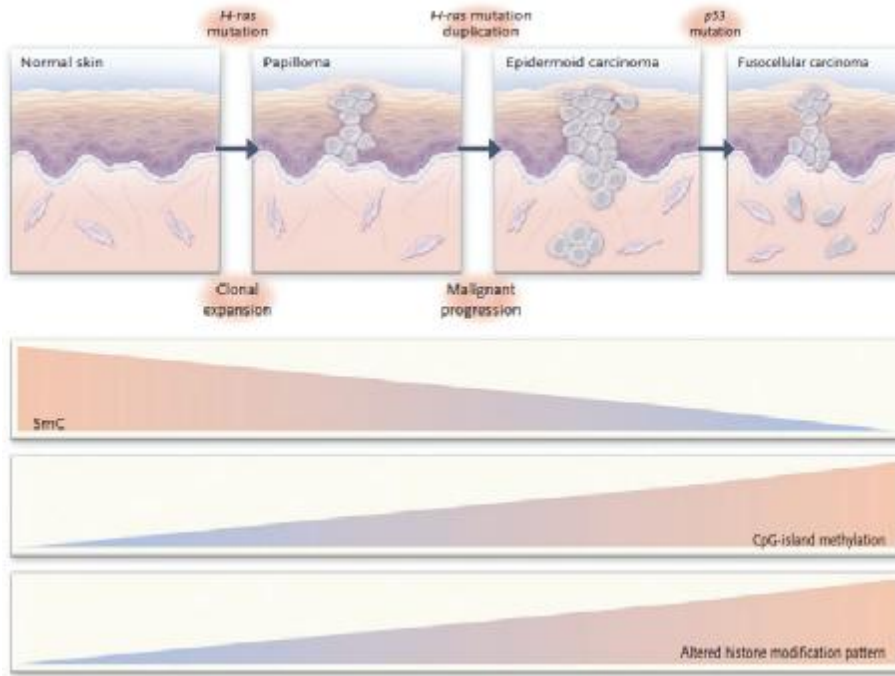
X kromozomu üzerindeki genler, DNA metillenmesinden sorumlu enzimleri inaktif genlere hedefleyen X<sub>ist</sub> RNA'sı ve H3K9 metillenmesiyle transkripsiyonun baskılanmasını takiben metillenirler (60).

DNA metiltransferaz enzim ailesi, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT1 enzimlerinden oluşur. Memeli genomunda bulunan CpG dinükleotidlerin 5'sitozininden DNMT3A ve DNMT3B ile metillenirler. DNA metilasyonu DNMT1 tarafından hemimetile DNA'nın substrat olarak kullanılması ile sürdürülür. Metil grupları, gen susturucu proteinler için bağlanma bölgelerini oluştururlar. Genellikle DNA metilasyonu, artmış kromatin kondenzasyonu ve gen susturulması ile ilişkilidir (61-63).

DNA metilasyon paternini değiştirerek hastalıklara neden olan farklı durumlar vardır. Metilasyon paternindeki değişiklikler imprintlenen genlerin hatalı regulasyonuna neden olma yolu ile büyümeyi etkilerler ve doğuştan gelen birçok hastalıktan sorumludur. DNA metilasyon paterni değişikliklerine ek olarak DNMT kaybı da hastalıklara neden olmaktadır. HCC'de p16(INK4a) kaybı, gen bölgesinde meydana gelen delesyonlar ve mutasyonlar yanında genellikle aşırı promotor metilasyonu nedeniyledir.

### ***2.2.1.1 DNA Metilasyonu ve Kanser***

Normal hücrelerde CpG dinükleotidleri, bazı aktif genlerin yukarı bölgesindeki CpG adalarının hipometilasyonu istisna olmak üzere, genellikle metiledir. Tersine, kanser hücreleri global bir hipometilasyon ve CpG adalarında hipermetilasyon sergilemektedir (62) (Şekil 2.2). DNA metilasyon patern değişikliği sıklıkla uygun olmayan gen susturulması ile sonuçlanır. Global DNA hipometilasyonu (demetilasyonu) c-JUN, c-MYC ve c-H-Ras gibi protoonkogenlerin aktivasyonu ve genomik instabilite ile ilişkilidir. Tümör supresör genlerin promotor bölgelerinde bulunan CpG adalarının hipermetilasyonu transkripsiyonal susturma ve genomik instabilite ile ilişkilidir.



**Şekil 2.2:** Tümör gelişiminde epigenetik değişiklikler (model: deri tümörü) (63)

HCC'de anormal CpG adası hipermetilasyonuna giren gen sayısının arttığı bulunması, kendiliğinden metilasyonunun karaciğer malign transformasyonu altında yatan önemli bir mekanizma olduğu fikrini öne sürmüştür. Epigenetik olarak susturulan genler hücre döngüsü, apoptoz, DNA onarımı ve hücre adezyonu gibi karsinogenez sürecinin önemli moleküler yollarında yer almaktadır (63). HCC'de sıklıkla metile olan genler APC, GSTP1, RASSF1A, p16, COX-2, CCND2, SPINT2, RUNX3, CFTR, HINT1, RIZ1 VE E-kaderin'dir (47). RASSF1A ve CCND2 metilasyonu kombinasyonu HCC olan ve HCC olmayan dokular ve doğru tedavi edilen erken tespit edilen HCC'ler kıyaslandığında 89-95% duyarlılık, 91-100% spesifiklik, 89-97% doğruluk göstermektedir (64). miRNA1 örneğinde olduğu gibi miRNA'ların da DNA metilasyonun ile susturulduğu ve hepatoselüler karsinogenez sürecinde rol aldığı gösterilmiştir (65). Tip30 promotorunun metilasyonu HCC'de kötü prognoz ile ilişkilidir (66).

### 2.2.2 Histon Modifikasyonları

Nukleozom içinde yer alan her histon çekirdeği, histon kuyruğu denilen, bazik aminoasitlerden oluşan, 25-30 rezidü uzunluğunda yüksek oranda dinamik amino terminal ucuna sahiptir. Histon-histon etkileşimine aracılık ederler ve çekirdek yapıdan dışarı doğru uzanırlar. H2A diğerlerinden farklı olarak nukleozom yapıdan dışarı uzanan yaklaşık 37

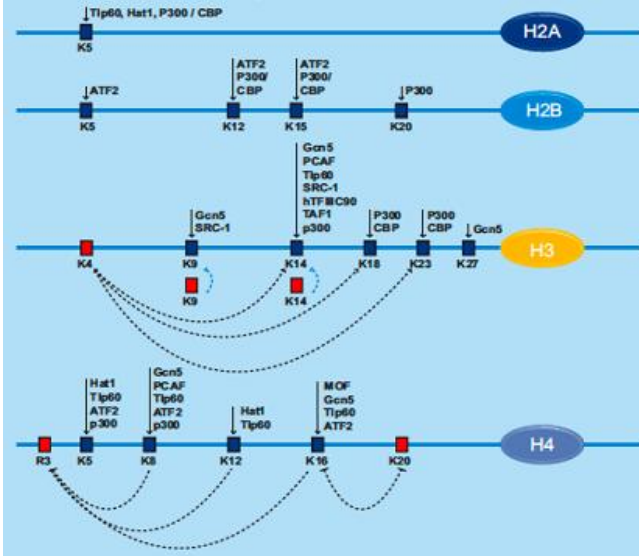
aminoasit uzunluğunda karboksi-ucu bölgesine de sahiptir (67). Histon kuyrukları, nukleozom yapısının stabilitesine herhangi bir katkıda bulunmuyor. Ama nukleozomal dizinin daha düzenli hale katlanmasının kontrolünde esansiyel rol oynuyor. İn vitro olarak histon kuyrukları uzaklaştırılan nukleozomal diziler 10nm ipliği oluşturan yapıya kondanse olamamışlardır. Yüksek oranda bazik yapıya sahip histon kuyrukları DNA'nın bağlanma kısımlarıdır. Nükleozomlar arası histon-histon etkileşimlerinde de esansiyel rolleri vardır.

Histonlar çok sayıda post translasyonel modifikasyonlara hedef olurlar. Bu modifikasyonlar:

### ***2.2.2.1 Asetilasyon/ Deasetilasyon***

Spesifik biyolojik işlevler sırasında Lys9, Lys14 gibi seçilen lizin residuları asetillenir. HAT (Histon Asetil Transferaz)'lar tarafından gerçekleştirilir. Sürekli denge HDAC (Histon Deasetilaz)'lar ve HAT'ların düzenlediği aktivite ile kurulur. İki çeşit HAT enzimi vardır; A HAT'lar, histon asetilasyonunda, genlerin transkripsiyonuna ve kromatin katlanmasının regülasyonunda görevlidir. B HAT'lar, yeni replike olan kromatine histonlar katılmadan hemen önce sitoplazmada, özellikle H4 Lys 5 ve 12, histon asetilasyonunu katalizleyen sitoplazmik proteinlerdir. Dizi benzerliğine göre HAT'lar farklı ailelere ait olabilirler. Farklı histon substrat bağlanma ve katalizleme mekanizması gösterirler. GNAT, PCAF, GCN5L, MYST, p300/CBP bu ailelerden birkaçıdır (68).

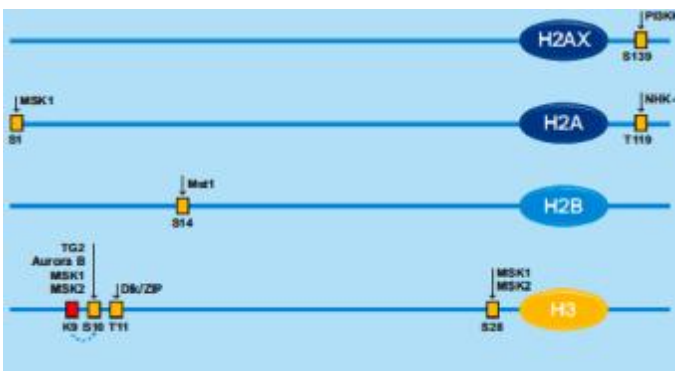
İnsan HDAC'ları maya HDAC'ları ile primer homolojiye sahip üç sınıfa ayrılır; HDAC I, II ve III. *Sınıf I HDAC'lar* (HDAC-1, -2, -3, -8, -11) maya yRPD3 ile homoloji gösterir. *Sınıf II HDAC'lar* maya yHDA1 ile homologdur. Sekans homoloji ve domain organizasyonuna göre iki altsınıfa ayrılır; IIa (HDAC-4, -5, -7, -9) ve splay varyantı MITR ve IIb (HDAC-6, -10). *Sınıf III HDAC'lar* maya ySIR2 homologudur. Sınıf I ve II proteinleri ile hiçbir homoloji taşımaz (68).



**Şekil 2.3:** Asetilasyonun regülasyonu. Mavi kareler asetilasyon bölgeleri. Kırmızı kareler metilasyon bölgeleri (69).

### 2.2.2.2 Fosforilasyon

Kinazlar gen ekspresyonunu değiştirerek, sinyal transdüksiyonunu hücre yüzeyinden, sitoplazmaya ve çekirdeğe doğru regüle ederler. H3S10 mayadan insana kadar transkripsiyon açısından oldukça önemli bir fosforilasyon bölgesidir. NfκB'nin regüle ettiği genlerin ve c-fos, c-jun gibi erken yanıt genlerinin aktivasyonunun, H3S10 modifikasyonunun, işlevi olduğu gösterilmiştir. Bu fosforilasyon ile birlikte kromatinde fosfor bağlayan protein 14-3-3 ortaya çıkar (68, 70).

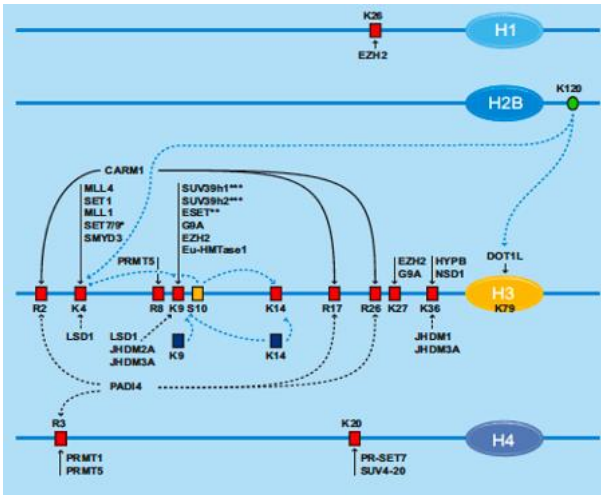


**Şekil 2.4:** Fosforilasyonun regülasyonu. Sarı kareler fosforilasyon bölgeleri, kırmızı kareler metilasyon bölgeleri (69).



### 2.2.2.3 Metilasyon

Diğer modifikasyonlardan daha kompleks bir histon kovalent modifikasyonudur. Lizin ve Arginin bölgelerinde meydana gelir. Histonunda bulunan modifikasyon bölgesinin pozisyonuna göre transkripsiyonel ekspresyonu pozitif veya negatif etkileyebilir. Lizinler, mono- (me1), di- (me2) veya tri- metile (me3) olabilirler. Argininler mono- (me1) veya di- (me2) metiledirler. Metile nukleozomların kombinasyonel potansiyeli, transkripsiyon gibi kompleks ve dinamik proseslerin regülasyonuna olanak verir (58, 71, 72).



**Şekil 2.5:** Metilasyonun regülasyonu. Sarı kareler fosforilasyon bölgeleri, kırmızı kareler metilasyon bölgeleri, mavi kareler asetilasyon bölgeleri (69).

#### 2.2.2.3.1 Lizin Metilasyonları / Demetilasyonları

Lizin metiltransferazlar, asetiltransferazlara göre çok daha özgündür. Genellikle bir histondaki tek bir lizini modifiye eder. Transkripsiyonun aktivasyonu veya baskılanması şeklinde etki ederler. Birçok histon metiltransferaz enzimi ve modifiye ettikleri bölge tanımlanmıştır. Bu enzimlerin hepsi, Dot I hariç, katalitik SET domaini içerir (68).

Metilasyon bölgelerinden 6 tanesi günümüze kadar iyi aydınlatılmıştır. Beş tanesi H3 (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36 ve H3K79) üzerinde, biri H4 (H4K20) üzerindedir. H3K4, H3K36 ve H3K79 modifikasyonları transkripsiyonun aktivasyonu ile ilişkilidir. H3K79me ve H4K20me DNA onarımında yer almaktadır. Spesifik protein bağlayıcılar bu altı spesifik modifikasyonları tanırlar. Bu proteinler üç farklı metile lizini tanıyan domainlerden birini içerirler. Bunlar kromo, tudor veya PHD tekrar domainleridir.

### ***H3K4 Metilasyonu***

H3K4 metilasyonu ökromatin ile ve özgün olarak aktif genler ile ilişkilidir. H3K4me3 modifikasyonu mayalarda transkripsiyonun aktivasyonu sırasında genlerin 5' ucunda gözlenmiştir. Transkripsiyonel mekanizmanın üç bileşenin bu işaretlemeden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Birincisi, karboksi terminal domaininde (CTD) Ser-5 bölgesinden fosforillenen RNA pol II, H3K4 metilasyonundan sorumlu Set1 enzimini promotor etrafına toplar. İkinci olarak PAF kompleksi, H3K4me3 modifikasyonunu düzenler. RNA metabolizmasının farklı basamaklarını regüle eden kompleks Set1 ile de etkileşim halindedir. H3K4me3 yapılanmasında önemli olan üçüncü bileşen, H2B K123 ubikütinasyonudur.

H3K4 metilasyonu, CHD1, NURF gibi spesifik faktörlerin aktif gen bölgesine toplanmasına neden olur. Set1/MLL/ALL1/HRX proteinleri HOX geni promotorunda toplanır. Diğer bir enzim olan SMYD3 transkripsiyonel aktivasyonu ve proliferasyonun baskılanmasını regüle eder. D.melanogaster ile yapılan ilk genetik analizler, gelişim sürecinde Trx-G enzimlerinin H3K4 metilasyonundaki fonksiyonel rolünü tanımlamıştır. Sineklerden memelilere kadar Trx-G proteinleri homeodomain genlerinin (HOX) epigenetik aktivasyonunu sürdürürken PcG'ler de HOX'ları sessizleştirmektedir. Bu iki karşıt etki embriyogenez sürecinde proliferasyon ve diferansiyasyonu kontrol etmektedir (68).

### ***H3K9 Metilasyonu***

H3K9 metilasyonunu katalizleyen SUV39H1 enzimi ilk tanımlanan HKMT'dir. SUV39H1 ve SUV39H2 drozofila su(var)3-9 enzimi memeli homologudur. HP1 proteinleri (HP1a, HP1b, HP1g) metile-H3K9'a bağlanırlar ve heterokromatin oluşumu gen susturulması için çok önemlidirler. Metastatik meme kanserlerinde, melanoma ve diğer metastatik tümörlerde azalmış HP1a ve HP1b ekspresyonu gözlenmektedir. Biyokimyasal olarak SUV39H1 ve HP1 pRb ile etkileşir ve pRb hedef genlerin susturulmasına neden olur. İnsan kanserlerinde enzimin mutasyonu veya kaybı rapor edilmemiştir. RIZ1/PRDM2 diğer bir Set domain içeren H3K9 metil transferaz ailesidir. pRb'ye bağlanan bir protein olarak tanımlanmıştır. Promotor hipermetilasyonu yoluyla RIZ1 mutasyona uğrar ve susturulur. Enzimin bu şekilde inaktivasyonunun karaciğer, kolon, meme ve gastrik kanserler gibi birçok kanserde gözlenmesi tümör supresör rolü olabileceğini ileri sürmektedir (68).

### ***H3K27 Metilasyonu***

H3K27 metilasyonu hücrede üç farklı yerde meydana gelen baskılayıcı bir modifikasyondur: 1- ökromatik gen bölgesinde, 2- perisentromerik heterokromatinde, 3- memelilerde inaktif X kromozomunda.

H3K27 metilasyonu PcG (polycomb group) proteinlerin alt sınıfı PRC2 tarafından katalizlenir. Katalitik alt birim Set domaini içeren EZH2'dir. Modifikasyonun hücre bölünmesi sırasında devam ettirilmesi normal embriyogenez ve hücre kimliği açısından esansiyeldir. EZH2 tarafından baskılanma mekanizması, H3K27 modifikasyonun gerçekleşmesi ve bu bölgeye polycomb proteinlerin toplanmasını içerir. Meme ve prostat gibi birçok kanser dokusunda EZH2'nin aşırı ekspresyonu bulunmuştur (73).

### ***H3K36 Metilasyonu***

Bu modifikasyon aktif genlerin kodlanan bölgelerinde oldukça fazla sayıdadır. Set 2 enzimi H3K36 metilasyonundan sorumludur. Ser-2 bölgesinden fosforillenen RNA pol II'ye bağlanır. Set2'nin aktif genlerde toplanması PAF kompleksi bileşenlerini gerektirir. H2B monoubikütinasyonu H3K36 metilasyonu için negatif, baskılayıcı role sahiptir (72).

#### ***2.2.2.3.2 Arginin Metilasyonları***

PRMT (protein arginin metiltransferaz) enzimleri H4R3, H3R2, H3R17 ve H3R26 metilasyonlarını katalizler. Bu modifikasyonların, durum bağımlı olarak transkripsiyonu pozitif ya da negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir (68) Spesifik transkripsiyon faktörler (p53, NR, YY1, NFKB) bu enzimleri, transkripsiyonu aktive etmeleri amacıyla özgün promotörlere toplarlar. Örneğin: PRMT5 enzimi, H3R8 ve H4R3 metilasyonunu katalizler ve MYC tarafından regüle edilen genleri de içeren birçok geni baskılar (74,75).

#### ***2.2.2.4 Deiminasyon***

H3 ve H4'te bulunan argininler PADI4 enzimi ile sitruline dönüştürülür. Sitrulin argininlerin metilasyonunu engeller (68). Mono-metile argininlerin (di-metileler değil) deiminasyona uğradığı in vivo çalışmalarda gösterilmiş (76). H3 ve H4'de sitrulin varlığı, arginin metilasyonu yoksunluğu ile koreledir. Östrojen tarafından regüle edilen promotor bölgelerin analizinde, aktive transkripsiyon bölgesinde arginin metilasyonu ile örtüşmektedir.

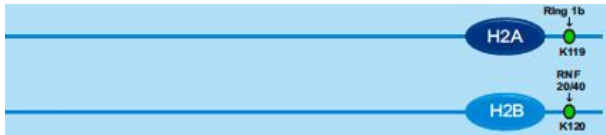
### 2.2.2.5 Ubikutinasyon/ Deubikutinasyon ve Sumoilasyon

Ubikutin ve SUMO diğer modifikasyonlardan biraz farklı modifikasyonlardır. Asetilasyon, fosforilasyon ve metilasyon küçük kimyasal grupların eklenmesi ile oluşur. Ub ve SUMO büyük polipeptitlerdir. Histonun boyutunu yaklaşık 2/3 kat artırır. Ub ve SUMO dizi olarak (18%) ve üç boyutlu yapı olarak benzerdir. Yükleri farklıdır.

Histonlar mono-ubikutinlendiği ilk gösterilen proteinlerdir. Spesifik bölgelerin negatif veya pozitif aktivasyonunu katalizleyebilir. H2B'nin Rad6/Bre1 enzimi tarafından mono-ubikutinasyonu transkripsiyonu aktive eder ve H3K4 metilasyonuna öncülük eder. Diğer taraftan H2A K119 Ub1 modifikasyonu Bmi/Ring1A polycomb grup proteini tarafından katalizlenir ve transkripsiyonu baskılar (68).

H2B K123 deubikutinasyonu hem gen aktivasyonu hem de heterokromatik sessizleştirme ile ilgilidir. Ubp8 ve Ubp10 proteazları ile modifikasyon katalizlenir. Ubp8 SAGA histon asetilasyon kompleksinin altbirimidir (68).

Sumoilasyon, aktive edici histon post-translayonel modifikasyonlarını önlemek için genellikle negatif etkir. Aktif post-translayonel modifikasyonlar iki mekanizma ile inhibe edilir. Birincisi, SUMO-histon direk lizin bölgesini bloklar. İkinci olarak, sumoilasyona uğraya histonlar histon deasetilazları kromatine toparlar.



Şekil 2.6: Ubikutinasyon bölgeleri (69).

### 2.2.3 Histon Kod Hipotezi

Histon kodu olarak adlandırılan histon amino-ucu modifikasyonlarının kombinasyonel tabiatı, genetik kodun bilgi potansiyelini oldukça genişletmektedir (4, 5, 71). Histon kuyruklarında meydana gelen modifikasyonlar ve bu modifikasyonların kombinasyonları genlerin transkripsiyonel durumunu belirleyen bir kod yapısı (histon kodu) oluşturur. Bu hipoteze uygun olarak “bir ya da birden fazla histon kuyruğunun tümleşik ya da seri olarak çeşitli histon modifikasyonları genin fonksiyonlarını belirler.” (77).

Kromatin tüm DNA aracılı proseslerde fizyolojik kalıp görevi görür. Histon modifikasyonları da, bu kromatin ipliklerinin yapı ve fonksiyonunu farklı modifikasyonların farklı fonksiyonel sonuçlar sağlaması ile kontrol ediyor. Bölge spesifik modifikasyon kombinasyonları belli biyolojik fonksiyonlar ile ilişkilidir. Örneğin; H4K8 asetilasyonu, H3K14 asetilasyonu ve H3S10 fosforilasyonunun kombinasyonu transkripsiyonun aktive olması ile ilişkilidir. Diğer taraftan, yüksek ökaryotlarda H3K9me3 ile H3 veya H4'ün asetillenmediği durumda transkripsiyon baskılanır (78).

Kısmi histon modifikasyon paternleri global kromatin dinamikleri ile ilişkilidir. Örneğin; H4'ün K4 ve K12'den diasetilasyonu S fazında histon birikiminden sorumludur. H2A S1 ve T119 fosforilasyonu ile H3 T3, S10 ve S28 fosforilasyonu kondanse olan mitotik kromatin belirteçidir (78).

Tüm bu gözlemler histon kod'u fikrini; yani belli histon modifikasyonlarının kombinasyonlarının her zaman aynı biyolojik ifadeyi etkilediği fikrini oluşturmuştur. Bariz istisnalar da mevcuttur. Örneğin, genel inhibitör olan H3K9 metilasyonu bazı durumlarda aktif olarak transkribe olan genlerle ilgili olabilir ve histon asetilasyonu transkripsiyon uyarıcısıyken, inhibitör gibi davranabilir.

Histon kodu, çalışılan gene ve hücrenin durumuna bağlı olarak hücrenel faktörler tarafından farklı yorumlanabilir. PTM hatalarının, özellikle kanser gibi birçok hastalıkla ilgisi olduğu gösterilmiştir (79).

#### ***2.2.4 Polycomb Grup Proteinlerin Epigenetik Rolü ve Moleküler Biyolojisi***

Polycomb group (PcGs) proteinleri makromoleküler kompleks oluştururlar. Bu kompleks, epigenetik gen susturulması ve bir çok gelişim yolağının regülasyonunda kritik fonksiyona sahiptir (80). Bunun aksine Trithorax group (trxG) proteinler gen ekspresyonunu pozitif yönde etkileyecek epigenetik modifikasyonlara aracılık ederler. Genel olarak, trxG proteinleri PcG proteinlerin aktivitesine fonksiyonel olarak karşıt şekilde görev yaparlar (81,82).

Embriyonik kök hücrelerde kromatinin bivalent epigenetik modifikasyonu hücrelerin pluripotensileri ile bağlantılıdır. Farklılaşma sırasında aktive olması gereken genleri

sessizleştirerek hazır bekletilmesinde fonksiyon gösteriyor olabilirler. Bu patern agresif kanserlerde ve kök hücrelerde anormal tekrarlanır (83, 84).

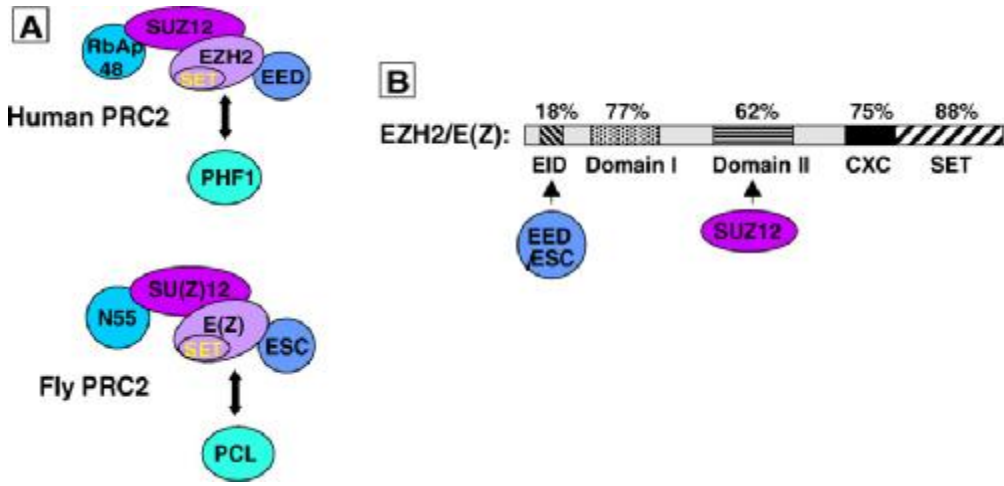
PcG yolağının anormal regüle edildiği kök hücre benzeri gen ekspresyonu paterni konvansiyonel tedaviye karşı dirençli 13 farklı kanser tipinde ortaktır (84). Kök hücrenin kendi kendini yenilemesinden ve karakterinden sorumlu yolaklar ile kanserde anormal regüle edilen yolaklar aynıdır (85). Retinoblastoma proteini ile Wnt, Notch ve Hedgehog sinyal yolakları kök hücre ve çeşitli tip kanser hücresinin kendi kendini yenileme mekanizmasının önemli bir parçasıdır. Kanserde, bu regülatör yolakları kontrol eden veya bu yolaklara dahil olan birçok genin PcG birikiminden veya susturulmasından etkilenmesi veya direk PcG hedefi olduğunun gösterilmesi ile kanser oluşumunda ve prognozunda epigenetik modifikasyonların önemi gösterilmiştir (86).

Polycomb grup ailesinin iki farklı yesi vardır; Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) ve Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) (68, 73). PRC1 ve PRC2 kompleks alt birimleri ile fonksiyonları Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1:** Polycomb Repressive Kompleks (PRC2) bileşenleri ve fonksiyonları (73).

<b>PRC2 Bileşenleri</b>	<b>Fonksiyonu</b>
EZH1	H3K27me modifikasyonundan sorumlu SET domaini içerir. Zayıf H3K27me3 aktivitesine sahiptir.
EZH2	H3K27me2/3 modifikasyonundan sorumlu SET domaini içerir. DNMT'ler için bağlanma bölgeleri oluşturur. Overekspresyonu onkojeniktir. Tümörlerde aşırı ekspresyonu, zayıf iyileşme ile ilişkilidir.
Suz12	EED ile birlikte SET domain aktivitesi için gereklidir. RNA'ya bağlanan çinko parmak yapısındadır.
EED	Dört izotipi ile PRC2, PRC3, PRC4 komplekslerini tanımlar. Metilasyon aktivitesi izotipe bağlı olarak değişir.
RbAp46/48	Histon şaperon molekülüdür. PRC'nin kromatin ile etkileşimini kuvvetlendirir.
<b>PRC1 Bileşenleri</b>	<b>Fonksiyonu</b>
Pc	PRC1 kompleksinin H3K27Me3 kromatin modifikasyon bölgesine bağlanan kromodomain kısmı. CBX7 polycomb homoloğu ile yerdeğiştirmesi, mk4a/Arf lokusunun ekspresyonunu inhibe ederek, hücre yaşam süresini uzatmaktadır.
dRING1A veya 1B	H2A K119Ub oluşumundan sorumlu E3 ubikutin transferazdır.
BMI1	RING1 ubikütinasyon aktivitesi için gereklidir. aşırı ekspresyonu onkogeniktir. mk4a/Arf lokusunun ekspresyonunu inhibe eder. DNMT'ler ile etkileşerek DNA metilasyonuna olanak sağlar. Tümörlerde aşırı ekspresyonu her zaman olmamakla beraber kötü prognozla ilişkilidir. Potansiyel kök hücre markerıdır.
Mel-18	PRC1 kompleksinde BMI1 ile yerdeğiştirebilir. Fosforile hali RING1 ubikütinasyon aktivitesini indükler. Rapor edilen hem tümör supresor hem de onkogenik aktivitesi vardır.
Nspc1	PRC1 içinde BMI1 ve ya Mel-18 ile yerdeğiştirebilir. EZH2 ve H2A K119ub ile birlikte DNMT'ler için bağlanma faktörü olarak davranır.

EZH2 ( Enhancer of Zeste Homolog 2), gelişim sürecinde homeobox genleri üzerindeki temel düzenleyici rolü nedeni ile ilk aydınlatılan polycomb proteinidir. EZH2 proteini PRC2 alt birimidir ve diğer alt birimler EED ve Suz12 proteinleridir (Şekil2.7). PRC2 çoğalan hücreler tarafından eksprese edilir ve H3K27 trimetilasyonu ile hedef genin susturulmasından sorumludur. Metiltransferaz aktivitesinden sorumlu katalitik alt birimi COOH-ucunda bulunan SET domainidir (73).



**Şekil 2.7:** PRC2 kompozisyonu ve EZH2 domainlerinin organizasyonu. A) İnsan PRC2 kompleksinin 4 altbirimi; EZH2, EED, SUZ12 ve RbAp48 ve bunlara karşılık gelen sinek homologları; E(Z), ESC, SU(Z)12 and NURF55. EZH2/E(Z) SET domaini içeren katalitik altbirimdir. PHF1/PCL, PRC2 ile etkileşerek hedeflenmesini ve aktivitesini artıran bir diğer polycomb proteinidir. (B) EZH2/E(Z)'nin 5 fonksiyonel domaini insan ve sinek arasındaki % benzerlikleri ile gösterilmiştir. SET domaini histon metiltransferaz aktif bölgesidir ve CXC domaini de aktiviteye katkıda bulunur. Güçlü metiltransferaz aktivitesi EZH2 altbiriminin EED/ESC ve SUZ12 ile biraraya gelmesini gerektirmektedir ve bu katalitik olmayan altbirimler için gereken bağlanma bölgeleri gösterilmiştir (88).



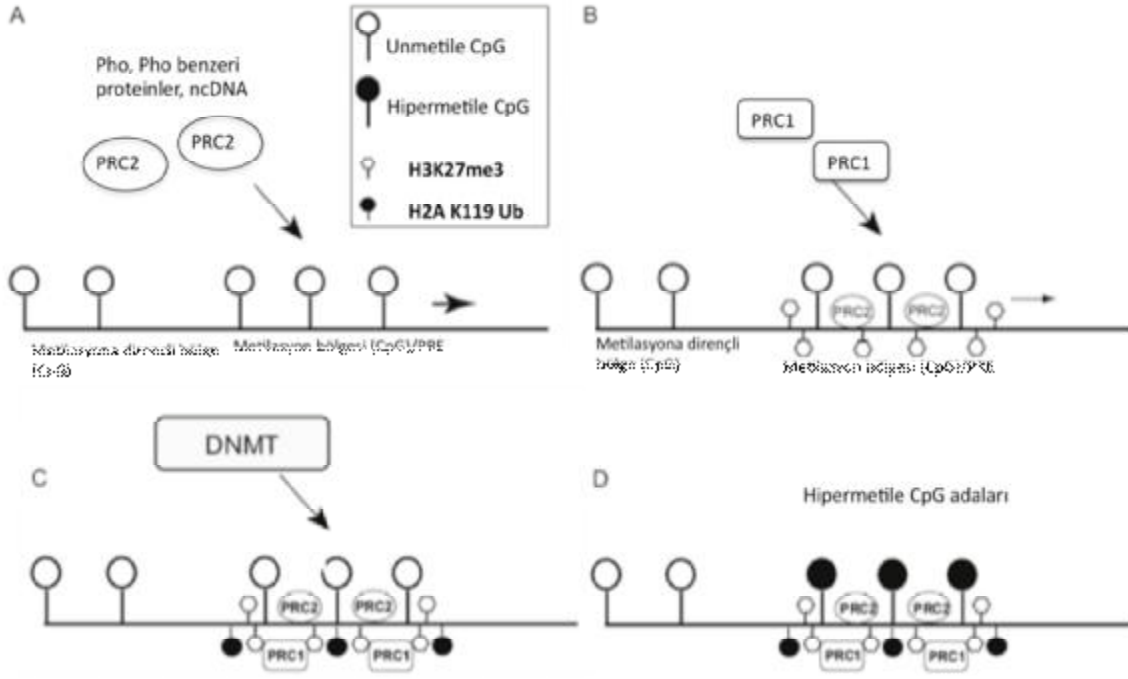
#### ***2.2.4.1 Polycomb Grup Proteinlerin Transkripsiyonun Susturulmasındaki Rolü***

PcG proteinler ve antagonisti olan trxG proteinlerin DNA'nın regulator genler ile ilişkili spesifik bölgelerine birikerek histonları post translasyonel modifikasyona yönlendirmektedirler. İlk kez Drosophilada tanımlanan PcG proteinler, homebox genlerin HOX alt grubunun susturulmasında aracıdır. HOX genleri metazoan organizmalarda segment benzerliğinden sorumludur. Bu gen grubu türlerin gelişimi için esansiyeldir ve birçok kanser türünde HOX proteinlerinin anormal ekspresyonu karakteristiktir HOX gen ekspresyon paterni epigenetik regülasyon ile sürdürülmektedir (89).

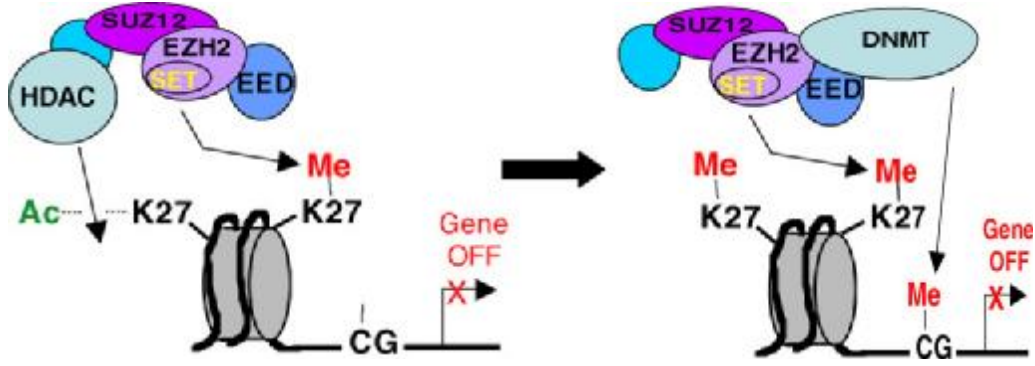
Drosophilada HOX bölgesi içinde PcG ve trxG bağlanan DNA dizisi aydınlatılmıştır. Pho ve Pho benzeri proteinler gibi DNA'ya bağlanan proteinler ve DspI, SP1/KLF, Zeste, GAGA faktörü, Pipsqueak, ve Grainyhead gibi DNA ilişkili moleküller PRE/TRE sekansına bağlanır ve PcG, trxG komplekslerinin buraya toplanmasını başlatır. Gen represyonu PcG-aracılı H3K27me3 ile aktivasyonu ise trxG-aracılı H3K4me3 ile karakterizedir (90).

İnsanlarda durum daha komplekstir. Sadece Pho ve Pho benzeri proteinler insanlar ve sinekler arasında korunmuştur . Bununla beraber memeli genomunda yüksek oranda korunan ncDNA dizisi elemanları da PcG susturmasında rol oynamaktadır. Bu ncDNA dizi elemanları H3K27me3 ile işaretli bölgelerde yaygındır ve embriyonik kök hücrelerde PcG'ler bu bölgelere bağlanır (91).

İnsanlarda, DNA'ya bağlanan faktörler Pho ve Pho benzeri proteinler PcG'leri HOX hedef genine çeker ve PRC2 kompleksinin PRE bölgesinde toplanmasını yönlendirir (92) (Şekil 2.8A).



**Şekil 2.8:** PcG-aracılı gen susturma mekanizması. A) Hox lokusunda Pho ve Pho benzeri proteinler DNA'ya bağlanan proteinler PcG yanıt elemanı (PRE) DNA sekansına bağlanırlar. PRC2'leri direk aktif gen bölgesine (ok yönü) toplarlar. Aynı lokus, metilasyon alanı olan CpG adalarını da içerir ve bunlar da PRC2 bağlanma bölgesidir. HOTAIR ve Kcnq1ot1 gibi uzun kodlamayan RNA (ncRNA)'lar, kromatin ve epigenetik mekanizmanın arayüzü gibi davranır, PRC2'lerin birikmesine rehberlik eder. B) PRC2, H3K27me2/3 epigenetik modifikasyonundan sorumlu SET domaini içermektedir. DNA bölgesine PRC2'ler toparlanınca bölgede bu modifikasyonlar oluşur ve PRC1'lerin kromodomaini tarafından bağlanabileceği işaretleri olutururlar. PRC2 varlığı gen ekspresyonunun azalmasıyla (ok yönü) ilişkili olmasıyla beraber, tam sessizleştirme için PRC1 ve PRC2 birlikte bağlanması gerekmektedir. C) PRC1, RING1 altbirimi H2A histon varyantının Lys119 aminoasitinin ubikitinasyonundan (H2A K119ub) sorumludur. PRC1 ve PRC2 varlığı gen ekspresyonunu susturur. D) BMI1 ve EZH2, DNMT'ler ile etkileşir ve CpG adalarında DNA metilasyonu için alan oluşturur. Promotor CpG adalarının metilasyonu gen sessizleştirilmesini kuvvetlendirir ve sessizleştirilmenin daha kalıcı olmasını sağlar (73).



**Şekil 2.9:** Epigenetik susturma mekanizmasının işbirliği. “Ac” asetilasyonu , “Me” metilasyonu ifade etmektedir.

Epigenetik susturma mekanizması, PRC2 kompleksinin hedef genleri H3K27 metilasyonu ile susturulmasıyla başlar. Eğer K27 önceden asetile ise bu bölgenin metilasyonu için ilk önce PRC2 ile etkileştiği bilinen histon deasetilaz (HDAC) tarafından deasetilasyon gerekmektedir. PRC2 aynı zamanda, hedef genlerin DNA’sında CpG’leri metilleyecek olan ve kromatinin sürekli sessiz duruma gelmesine sebep olan, DNA metiltransferazları (DNMT) toparlar. Bu kromatin modifikasyonları hedef gen başına birçok nukleozom ve CpG elemanını kapsar. Basitleştirmek için tek bir nukleozom ve yukarı taraf regülatör bölgede tek bir CpG bölgesi gösterilmiştir (Şekil 2.9) (88).

### **3. GEREK VE YÖNTEM**

#### **3.1 HCC Hücre Dizileri**

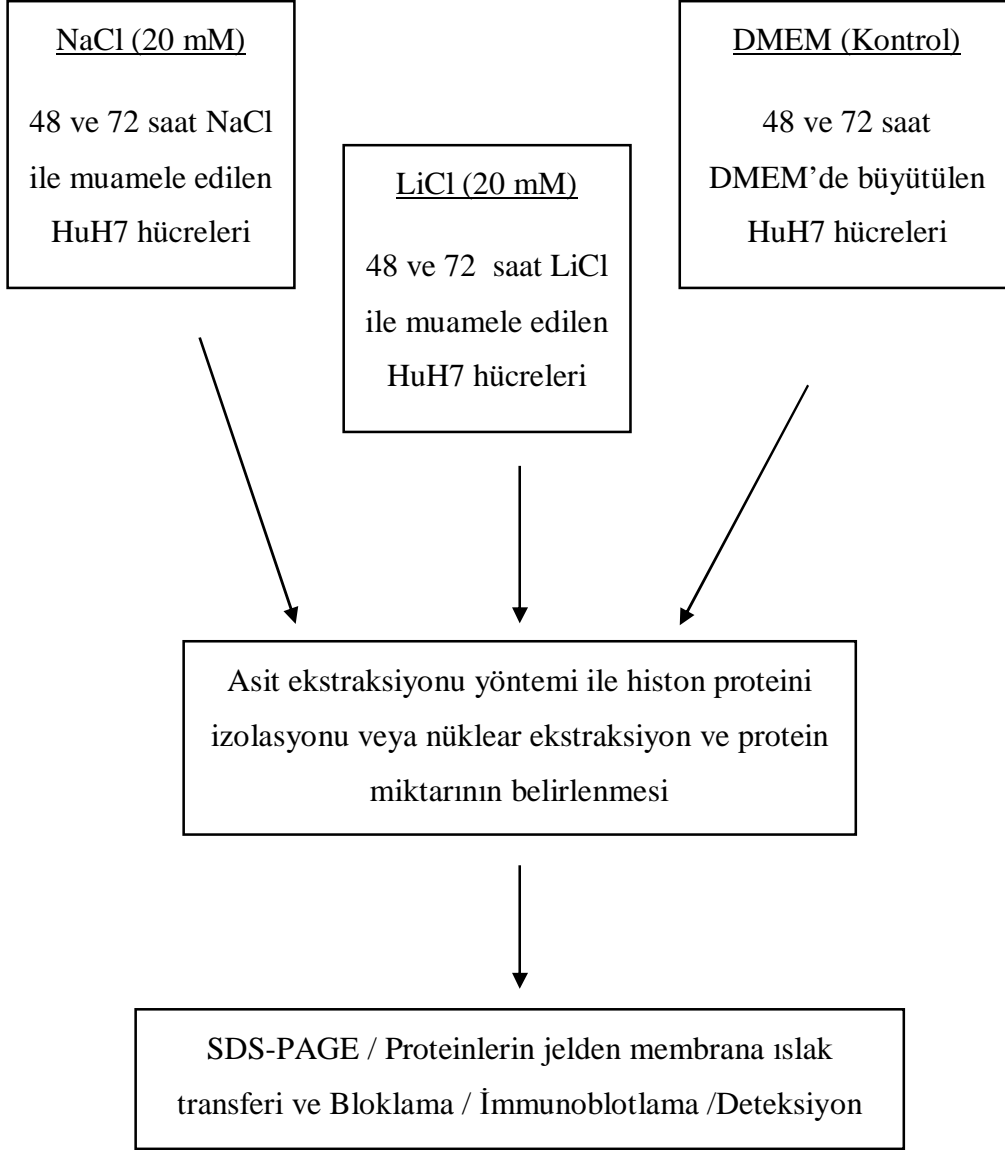
Projede kullanılan HCC hücre dizisi HuH7 Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından temin edilmiştir.

#### **3.2 Hücre Kültürü**

HCC hücre dizileri, normal koşullarda %10 FCS (Fetal Calf Serum) (Biochrom, S0125), 2mM L-Glutamin (Biological Industries, 03-020-1C), 100u/ml penisilin, 0,1mg/ml streptomisin (Biological Industries, 03-031-1C) ve % 1 esansiyel olmayan aminoasit karışımı içeren RPMI-1640 (Biological Industries, 01-104-1A) ya da DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biological Industries, 01-050-1A) besin ortamlarında üretilmişlerdir. Hücre kültürü işlemleri biogüvenlik 2 düzeyinde laminar kabinet (Thermo Scientific Cabinet / MSC1.2) içerisinde yapılırken, hücreler 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde (Thermo Scientific Incubator / Forma Stericycle CO<sub>2</sub>) uygun zaman aralığında kültüre edildi. Hücreler büyüme hızlarına ve başlangıç yoğunluklarına göre değişmekle birlikte 3 ila 5 günlük aralıklarla bir alt kültüre edildi. Hücreler yaklaşık 80% yoğunluğa ulaştığı zaman kültür kaplarındaki ortam çekilip, 2 defa steril PBS (pH 7.4) ile yıkandı. Ardından PBS uzaklaştırılıp kültür kabına 1 ml Tripsin-EDTA (Biological Ind., 03-054-1B) solüsyonu konularak inkübatörde hücreler tutundukları yüzeyden ayrılana kadar 1-2 dakika bekletildi. Tripsinizasyonu durdurmak üzere hücrelere FCS içeren ortam konularak pipetlendi ve bu işlemin sonunda istenilen miktarda hücre önceden içlerine ortam eklenen yeni kültür kaplarına ekildi.

Hücre kültürü çalışmalarında, hücre çoğalmasını takip amacı ile ters bakışlı faz kontrast ışık mikroskobundan (Olympus CKX41) yararlanılmıştır.

### 3.3 Hücre dizilerinde Histon Modifikasyonlarının “Western Blot” Yöntemi ile Gösterilmesi



### **3.3.1 Protein İzolasyonu**

#### **3.3.1.1 Histon Proteinlerinin İzolasyonu**

HuH7 hücre hattı  $1 \times 10^6$  hücre/ 145 mm olacak şekilde hücre kültür kaplarına ekildi. Yaklaşık 12 saat sonra kültür ortamları; 20mM LiCl eklenen 10% FBS'li DMEM hücre kültürü ortamı, tuz kontrolü olarak 20mM NaCl eklenen 10% FBS'li DMEM ve sadece 10% FBS'li DMEM ile değiştirildi. 48 saat ve 72 saat inkübasyonlar sonunda hücreler buza alındı. Soğuk PBS ile yıkandıktan sonra buz üzerinde kazındı. 3000rpm'de 10 dk  $4^{\circ}$  C'de santrifüjlendikten sonra hücre pelleti 2 kez 5mM sodium bütirat içeren soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra hücre pelleti 0.5% Triton X-100, 2mM PMSF, 0.02% NaN<sub>3</sub> içeren Triton Ekstraksiyon Tamponu'nda (TEB),  $1 \times 10^7$  hücre /ml olacak şekilde çözüldü ve 10 dk buz üzerinde yavaşça karıştırarak lize edildi. Lizat 2000 rpm'de, 10 dk,  $+4^{\circ}$ C' de santrifüj edildikten sonra supernatant atıldı ve pellet bir öncekinin yarısı kadar miktarda TBE ile tekrar çözüldü ve santrifüj edildi. Son olarak pellet,  $4 \times 10^7$  hücre/ml olacak şekilde 0.2 N HCl ile resuspende edildi ve bu asit ekstraksiyonu  $+4^{\circ}$ C'de, karıştırmalı olarak gecelik inkübasyona bırakıldı. Asit ekstraksiyonu tamamlanan histonlar 2000 rpm'de 10 dk,  $+4^{\circ}$ C'de santrifüj edildi, süpernetant yeni bir ependorfa alındı. 100% TCA'dan finalde 33% olacak şekilde süpernetanta eklendi. Buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sırasında tüpler dikkatlice ters-düz edilerek karıştırıldı. 16000 g'de 10dk  $+4^{\circ}$ C'de santifüjlendi. Pellet soğuk aseton ile yıkandı, 16000 g'de 5dk  $+4^{\circ}$ C'de santifüjlendi. Aseton ile yıkama adımı tekrarlandı ve sonunda elde edilen pellet 20 dk kurumaya bırakıldı. 100 ul distile su ile çözüldü (93).

#### **3.3.1.2 Sonikasyon Yöntemi ile Total Protein İzolasyonu**

HuH7 hücre hattı  $1 \times 10^6$  hücre/ 145 mm olacak şekilde hücre kültür kaplarına ekildi. Yaklaşık 12 saat sonra kültür ortamları; 20mM LiCl eklenen 10% FBS'li DMEM hücre kültürü ortamı ve 10% FBS'li DMEM ile değiştirildi. 48 saat inkübasyon sonunda hücreler buza alındı. Soğuk PBS ile yıkandıktan sonra buz üzerinde kazındı. 3000 rpm'de 10 dk  $4^{\circ}$  C'de santrifüjlendikten sonra hücre pelleti 2 kez 0.1M sodyumortovanat ve sodyumflorür içeren soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra hücre pelleti 250 mM NaCl, 0.1 % NP40, 50 mM HEPES, 5 mM EDTA, 0.5 mM DTT ve 1X proteinaz inhibitör kokteyli içeren ELB tamponu ile  $1 \times 10^6$  hücre/100µl ELB olacak şekilde çözüldü. Biyokimya AD'da bulunan Vibra Cell marka sonikasyon aleti kullanılarak 1 vuruş 10 sn sonike edildi (94). 5dk en yüksek hızda santrifüj edilerek lizat berraklaştırıldı. Süpernetant yeni bir ependorfa alınarak protein miktar

tayini yapıldı.

### **3.3.2 Protein Miktarının BCA Yöntemiyle Belirlenmesi**

Protein miktar belirlemesi için BCA Protein Assay Kit (Pierce 23225) kullanıldı. Her bir tüpte farklı miktarlarda (0, 2, 4, 5, 10, 15 ve 20 µg/mL) stok BSA (2 µg/µl) (Pierce, 23209) içeren standart solüsyonları 10 µl'ye distile su ile tamamlandıktan sonra 90 µl reaktif ile karıştırılarak (kitin kullanım yönergesi doğrultusunda) hazırlandı. Yine bunlara paralel olarak, miktarı tayin edilecek histon örneklerinin her birinden örnek tüplerine 5 µl alındı. 5 µl distile su ve 90 µl reaktif ile 100 µl'ye tamamlanarak örnek solüsyonları hazırlandı. Tüm standart ve örnek solüsyonları tepkime gerçekleşmesi için 60<sup>0</sup> C'de 15 dk inkübe edildi. Isı altında içerdikleri protein miktarlarına orantılı şekilde değişiklik gösteren reaksiyon sonunda oluşan bikromik asit-bakır komplekslerinin optik densiteleri (OD), PICODROP aleti (PICOPET01) kullanılarak 562 nm dalga boyunda kör baz alınarak ölçüldü. Bilinen BSA konsantrasyonlarına karşı okunan OD değerleri kullanılarak "Microsoft Office Excel" programı ile çizilen standart doğrusal grafikten elde edilen matematiksel formül kullanılarak diğer örneklerdeki bilinmeyen protein miktarları hesaplandı. Hesaplanan konsantrasyonlara göre 1 µg/µl veya 0.5 µg/µl olacak şekilde dH<sub>2</sub>O ile seyreltilerek alıquotlandı, etiketlendi ve -80°C soğutucuya kaldırıldı.

### **3.3.3 Proteinlerinin "SDS-PAGE" Görüntülenmesi**

BioRad mini protein elektroforez sistemi (Mini-PROTEAN Electrophoresis Cell 165 - 3301) kılavuzunda tarif edildiği şekilde hazırlandı. Sisteme uygun jel hacmi yine kılavuza göre tanımlandı. Histon proteini 13-17 kD arasında değişen moleküler ağırlığa sahip oldukları için 18% lik 1mm kalınlığında, EZH2 85 kD ve Kalneksin 90 kD moleküler ağırlığa sahip oldukları için 10% 'luk 1,5 ml kalınlığında yürütme jeli kullanıldı. İstifleme jeli olarak da 5 % ' lik jel hazırlandı. Bir falkon tüp içinde Tablo3.1'de gösterildiği şekilde 18 % 'lik ve 10 % 'luk ayırıcı jel (seperasyon jeli) içerikleri karıştırılarak hazırlandı ve iki cam arasına döküldü. Jelin üzerine kaplayacak miktarda dH<sub>2</sub>O'ya doydurulmuş saf izopropanol eklenerek jelin polimerize olması ya da başka bir deyişle katılaşması beklendi. Ayırıcı jel katılaşınca üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldı ve Tablo 3.1'de gösterildiği şekilde 5% ' lik istifleme jeli (stacking jel) hazırlandıktan sonra camlar arasına döküldü. Hemen uygun taraflar camların en üst kısmına kılavuzda gösterildiği şekilde yerleştirildi ve istifleme jelinin katılaşması beklendi. Daha sonra tarak yavaşça çıkarıldı ve kuyucuklar polimerize olmayan

akrilamidi uzaklaştırmak için elektroforez yürüme tamponu ile yıkandı.

**Tablo 3.1:** SDS-PAGE ayırılama ve istifleme jel bileşenleri.

Kullanılacak kimyasal	% 18 // 10% ayırıcı jel (10 ml)	% 5 istifleme jel (5 ml)
dH <sub>2</sub> O	1.3 ml // 4.0 ml	3.4 ml
% 30' luk akrilamid	6 ml // 3.3 ml	0.83 ml
Tris-HCl	2.5 ml (1.5 M pH 8.8)	0.63 ml (1 M pH 6.8)
% 10 SDS	0.1 ml	0.05 ml
% 10 Amonyum persülfat	0.1 ml	0.05 ml
TEMED	0.008 ml // 0.004 ml	0.005 ml

\*Amonyum persülfat solüsyonu taze hazırlanmalıdır.

Konsantrasyonları belirlenerek alikatlanan histon proteinlerinden 0.75 µg/kuyu, 1.5 µg/kuyu ve 3.0 µg/kuyu olacak şekilde 3 farklı miktarda, total lizatlar da 25 µg/kuyu ve 50 µg/kuyu olacak şekilde jele yüklenmek üzere hazırlandı. % 10 β-ME içeren 2 X yükleme tamponu (Novex Sample Buffer) ile son konsantrasyon 1 X olacak şekilde karıştırılıp, 95<sup>0</sup> C' de 5 dk kaynatıldı. 1 dk buz üzerine alındı ve örnekler oda sıcaklığına gelince, tanka yerleştirilmiş tris-glisin elektroforez yürüme tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0.1 SDS) içerisindeki jellerin kuyularına yüklendi. Bir kuyuya da proteinlerin büyüklüklerini tahmin etmek amacıyla içinde bilinen büyüklüklerde çeşitli proteinler bulunan önceden boyalı büyüklük belirteci (prestained size marker) yüklendi. Örnekler istifleyici jelin sonuna kadar 70 V'da, ayırıcı jelde ise 110 V sabit gerilimde yaklaşık 4 saat yürütüldü.

#### **3.3.4 Proteinlerin Membrana Transferi**

Yürütmenin tamamlanmasına yakın, eldiven giyilerek, mini jel boyutlarında her jel başına 1 PVDF membran ve 4 adet Whatmann kağıdı kesildi. Bu arada PVDF membran 40 saniye metanol içerisinde bekletilip tris-glisin transfer tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0.02 SDS, %30 metanol) içine alındı. Membran ve whatmanlar Tris-Glisin transfer tamponu içinde en az 10 dakika bekletildi. Yürütme tamamlandığında jel camlar arasından çıkarılıp 1-2 dakika aynı tamponda bekletildi.

Islak transfer: Transfer tamponu içinde transfer kasetinin siyah kapağı tarafına sırası ile; sünger, 2 adet whatmann kağıdı, jel, membran, 2 adet whatmann kağıdı ve tekrar sünger



aralarındaki hava kabarcıkları çıkarılarak, dikkatlice sandviç yapıldı ve kasetin kapağı kilitlendi. Transfer tankının kaset bölümünün siyah yüzeyine kasetin siyah tarafının gelmesine dikkat edilerek transfer kasetleri tanka yerleştirildi. 1 adet manyetik bar tank içine koyuldu ve buz kabı yerleştirildi, transfer tamponu ile tank dolduruldu ve tank kapağı elektrotlara dikkat edilerek takıldı. Manyetik karıştırıcı üzerinde ısının homojen yayılması sağlanarak, 300 mAmp'de 3 saat transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer kasetinin siyah tarafı (-) yüklü anot görevi yaparken, diğer taraf (+) yüklü katot görevi yapar; böylelikle SDS muamelesi ile negatif yüklü hale gelen proteinlerin jelden membrana göçü sağlanır.

### **3.3.5 “Coomassie Blue” Boyaması**

“Coomassie Brilliant Blue R-250” boyası nonspesifik olarak hemen hemen tüm proteinlere bağlanır. Proteinlerin eşit miktarda yüklenip yüklenmediğinin kontrolü için yapılan bir uygulamadır. Birbirinin katı 3 konsantrasyonda jele yüklenen histon proteini örneklerinin eşit yükleme kontrolü yapılmıştır.

Transferden sonra jel, direk boya solusyonuna alındı ve oda sıcaklığında, gece boyunca, çalkalanarak bekletildi. Bu aşamada protein bantları gözlemlenebilir. Protein bantların daha belirginleşmesi için jelin boyasının uzaklaştırılması amacıyla jel önce distile su ile yıkandı ve destain solüsyonuna alındı. Oda sıcaklığında karıştırılarak ve 1 saatlik aralıklarda solüsyon değiştirilerek yaklaşık 3 saatte jel boyasızlaştırıldı. Görüntüsü alındı ve saklanmak üzere kurutuldu.

Boyanın Hazırlanması: 0.006 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 40 % metanol ve 10 % asetik asit, 50 % distile . Çeker ocak altında, tartılan coomassie boyası su-metanol karışımında çözüldü ve asetik asit eklendi. Oda sıcaklığında saklanır ve tekrar tekrar kullanılabilir.

“Destain Solüsyonu” nun Hazırlanması: 10 % metanol, 10 % asetik asit, 80 % distile su çeker ocak altında karıştırılarak hazırlanır. Oda sıcaklığında saklanır

### **3.3.6 İmmünoblotlama**

Transfer sonrasında membran, blotlama sırasında özgül olmayan bağlanmaların engellenmesi için; % 6 yağsız süt tozu ve % 0.5 Tween-20 içeren TBS tamponu ile muamele edilerek 1 saat oda sıcaklığında, rotatorda çalkalanarak bloklama işlemi gerçekleştirildi. Bloklama aşamasından alınan membranlar uygun dilusyonlarda primer antikor ile muamele

edildi. Kullanılan antikorlar, dilüsyonlar ve antikorların hazırlandığı solüsyonlar aşağıdaki gibidir.

**Tablo 3.2:** İmmunoblotlamada kullanılan primer antikorlar, marka ve dilüsyonları.

Primer Antikor	Marka / Tür	Dilüsyon*
Anti-trimetile H3 (Lys 27)	Upstate Ups 07-449 / Rabbit- Pol	1: 1000
Anti-trimetile H3 (Lys 4)	Abcam Ab 8580 / Rabbit antiserum	1: 500
Anti-trimetile H3 (Lys 9)	Upstate Ups 07-523 / Rabbit- Pol- IgG	1: 2000
Anti-monometile H3(Lys 36)	Abcam ab9048 / Rabbit- Pol	1: 1000
Anti-EZH2	Abcam ab72840 /Rabbit-Pol	1: 500
Anti-kalneksin	Santa Cruz sc-11397 / Rabbit- Pol	1:5000

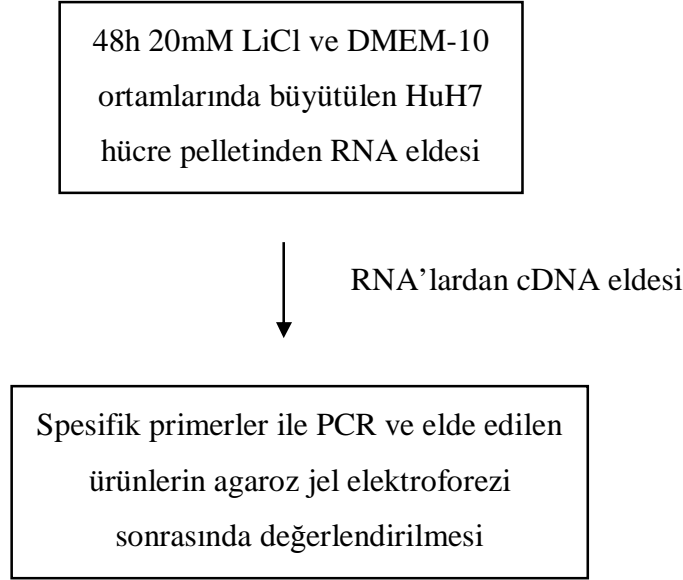
\*3 % yağsız süt tozu TBS-T (0.025%) içinde hazırlandı.

Membran primer antikor solüsyonunda 4°C'de 1 gece, yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. Primer antikor inkübasyonları bittikten sonra membranlar 5'er dakika 4 kez TBS-T ile yıkayıp bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Daha sonra sekonder antikor dilüsyonları 1:2500 olacak şekilde 3 % yağsız süt tozu TBS-T (0.025%) içinde hazırlandı. 1 saat oda ısısında yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. Primer antikor sonrasında yapılan yıkama işlemi tekrarlandı.

### **3.3.7 Proteinlerin Membran Üzerinde Deteksiyonu**

Tüm yıkamalar sonrasında deteksiyon kiti (Pierce Supersignal West Pico Chemiluminescent) kullanılarak histon proteinlerinin deteksiyonu yapıldı. Kit direktiflerine göre hazırlanan reaktif solüsyonundan membranı kaplayacak miktarda membran üstüne yayılarak 4-5 dk bekletildi. Bu sürede sekonder antikorlara bağlı olan peroksidaz enzimleri reaktifteki substratlarını parçalamakta ve sonuçta modifiye substrattan kimyasal bir ışımaya dönüşmektedir. Membranlar bir kaset içine alındıktan sonra üzerlerine kemiluminesansa duyarlı film (Kodak, 5256441) koyulup yeterli süre beklendi ve film yıkanarak protein bantları görüntüledi.

### 3.4 Hücre Hatlarında EZH2 ve JMJD3 Ekspresyonunun RNA Düzeyinde Belirlenmesi



#### 3.4.1 Hücre Hattından Total RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

Kromatografik kolon bazlı total RNA izolasyon kiti kullanıldı (Total RNA Isolation Nucleospin RNA II- MN). Kitin önerdiği şekilde işlemler sırasıyla yapıldı. Kuruyan RNA pelletleri kitin içerdiği RNaz içermeyen suda çözüldü. Örnekler çözüldükten sonra RNA'nın saflığını kontrol etmek ve konsantrasyonunu hesaplamak için pikodrop cihazında (PICOPET01) uygun pipetler kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

#### 3.4.2 Total RNA'lardan cDNA Sentezlenmesi

Hücre hatlarından total RNA izole edilip konsantrasyonları ve kalitesi belirlendikten sonra bu RNA'lardan 2 µg kullanılarak cDNA sentezlendi. cDNA sentezinde MBI Fermentas marka cDNA sentez kiti (K1622) ve bileşenleri kullanıldı. 2 µg total RNA ve 0.2 µg/ µl "random primer", RNaz'dan arındırılmış dH<sub>2</sub>O içerisinde hazırlandıktan sonra 65 °C'de 5 dk inkübe edildi. Daha sonra karışıma 5x reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü (20 u/ ul), dNTP (10 mM) ve en son "M-MuLV Reverse Transcriptase" (200 u/ ul) eklendi ve 25 °C'de 5 dk, 42 °C'de 60 dk inkübe edilerek ilk-zincir cDNA sentezi bir termal döngüleyici (Techne TC-312) içerisinde yapıldı. Tüpler 70 °C'de 5 dk. tutularak reaksiyon sonlandırıldı.

#### 3.4.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Tek iplik cDNA sentezlendikten sonra bu cDNA'lar ( her bir cDNA reaksiyonundan 2 µl) kalıp olarak kullanılarak EZH2 ve JMJD3 genine spesifik primerler aracılığıyla PCR

kuruldu. Ayrıca kontrol olarak da GAPDH genine spesifik primerler kullanıldı. Kullanılan primer dizileri aşağıdaki gibidir.

**Tablo 3.3:** PCR için kullanılan primerlerin 5’-3’ yönünde ileri ve geri dizileri.

Primer	İLERİ	GERİ
EZH2	5' AGC CTT GTG ACA GTT CGT GC 3'	5' CAG CGG CTC CAC AAG TAA GA 3'
JMJD3	5' TCT GCA GGA GGA GAA GGA GA 3'	5' TCC ACC GCT TAG CAT CAG AC 3'
GAPDH	5' GGC TGA GAA CGG GAA GCT TGT CAT 3'	5' CAG CCT TCT CAT GGT GGT GGT GAA GA 3'

Her üç gen için de farklı primer konsantrasyonları, farklı termal profiller gibi değişkenler uygulanarak optimizasyon yapıldı ve optimizasyon sonucunda aşağıdaki profillerde PCR reaksiyonları kuruldu.

**Tablo 3.4:** PCR profilleri.

	<b>EZH2</b>	<b>GAPDH</b>	<b>JMJD3</b>
<b>Primer (100 mM)</b>	0.5 ul	1.25 ul	0.5 ul
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	1.5 mM	1.5 ul	1.5 ul
<b>dNTP (10 mM)</b>	0.5 ul	0.5 ul	0.5 ul
<b>Taq pol. (5U/ul)</b>	0.31 ul	0.31 ul	0.31 ul
<b>İlk denaturasyon</b>	95°C // 5 dk	95°C // 5 dk	95°C // 5 dk
<b>Denaturasyon</b>	95°C // 40 sn	95°C // 40 sn	95°C // 40 sn
<b>Bağlanma</b>	55.2°C // 40 sn	55.2°C // 40sn	60°C // 40sn
<b>Uzama</b>	72°C // 40 sn	72°C // 40 sn	72°C // 40 sn
<b>Döngü Sayısı</b>	30	28	35
<b>Son Uzama</b>	72°C // 7 dk	72°C //7 dk	72°C //7 dk

#### ***3.4.4 PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi***

PCR ürünlerinin yürütülmesi ve analizi için örnek sayısına göre büyük jel için; 200 ml TAE tamponu içerisinde, küçük jel için; 40 ml TAE tamponu içerisinde %2'lik agaroz (BRL, 5510UB) jel döküldü. Jel içerisine 0,2 µg etidyum bromür de eklendi. PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünlerin herbirinden uygun miktarda hacim alınarak 6X yükleme tamponu ile karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklendi. Örnekler, bantlar açılana kadar (30-60 dk) 90 V'luk gerilim uygulanarak TAE ile dolu elektroforez tankında yürütüldü. Daha sonra amplifiye edilmiş olan DNA'lar DEÜ Mikrobiyoloji AD 'na ait transluminatör kullanılarak, UV ışığı altında DNA'ya interkale olan etidyum bromür aracılığı ile incelendi.

## 3.5 İmmunoboyama

### 3.5.1. İmmunositokimya

HuH7 hücreleri  $3 \times 10^4$  hücre/kuyu olmak üzere 24 kuyulu hücre kültürü kaplarında steril yuvarlak lameller üzerine ekildi. 48 saat ve 72 saat 20 mM LiCl ve tuz kontrolü olarak NaCl eklenen DMEM-10 büyüme ortamında ve sadece DMEM-10 büyüme ortamında büyütülen hücreler 1X PBS ile yavaşça çalkalanarak yıkandı. Hücreler 1X PBS (pH 7.4) içinde hazırlanan 4 % formaldehit ile oda sıcaklığında fikse edildi. Formaldehit uzaklaştırılıp, dH<sub>2</sub>O ile çalkalandı ve hücreler 1X PBS ile yavaşça çalkalanarak yıkandı. 1X PBS // 0.3 % Triton X-100 ile hazırlanan solüsyon içinde 3 kez 5'er dk yavaşça çalkalanan hücreler, geçirgen (permeabilize) hale getirildi. Tekrar, 1X PBS ile yavaşça çalkalanarak 3 dk yıkanan hücreler, 1X PBS // 10 % FBS // 0.3 % Triton X-100 ile hazırlanan solüsyon içinde 37°C'de 1 saat inkübe edilerek bloklandı. Ortam uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı.

H3K27Me3 antikoru (Upstate Ups 07-449 / Rabbit- Pol) 1:1250 oranlarda 1 X PBS / 2% FBS / 0.3 % Triton X-100 ile dilüe edildi. Hücrelere eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Ortam uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. 1 X PBS // 2% FBS // 0.3 % Triton X-100 ile 3 kez 5'er dk yavaşça çalkalanarak yıkanan hücrelere kitin içerdiği sekonder antikor eklenerek 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Negatif kontrol kuyuları için bu sürede bloklama solüsyonu kullanıldı. Ortam uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Hücreler 1 X PBS // 2% FBS // 0.3 % Triton X-100 ile 3 kez 5'er dk yavaşça çalkalanarak yıkandı.

UltraTek (Anti-Polyvalent) immunohistokimyasal antikor-enzim kiti kullanılarak. ABN125 sarı solüsyondan slayt üzerini kaplayacak kadar damlatıldı. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 3x5' PBS-T ile çalkalayıcıda yıkama yapıldı. ABL 125 kırmızı solüsyondan slayt üzerini kaplayacak kadar damlatıldı ve çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi.

Dab Kromojen (Dako Cytomation) hazırlandı. 1 ml Dab+substrat tamponu içine 1 damla Dab+kromojen eklenerek karıştırıldı. Sekonder antikor gibi hücrelerin üzerine eklendi. 30sn inkübe edildi. İnkübasyon süresi antikora göre değişmekle beraber fazla boyada tutmamaya dikkat edilmelidir. dH<sub>2</sub>O eklenerek boyama işlemi durduruldu. Sekonder antikor eklenmeyen kontrol kuyularında boyama gözlenmedi. Hücreler birkaç defa dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Hematoksilen boyası çekirdek boyaması için kullanıldı. dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Örneklerin kurumasına müsade edilmeden kuyulara 1X PBS eklendi. Lameller slaytlara kapatıldı. Alüminyum folyo ile sarılarak +4°C'de saklandı.

### 3.5.2 İmmunofloresan Boyama

HuH7 hücreleri  $3 \times 10^4$  hücre/kuyu olmak üzere 24 kuyulu hücre kültürü kaplarında steril yuvarlak lameller üzerine ekildi. 48 saat ve 72 saat 20mM LiCl / NaCl eklenen DMEM büyüme ortamında ve sadece DMEM büyüme ortamında büyütülen hücreler 1X PBS ile yavaşça çalkalanarak yıkandı. Hücreler 1X PBS (pH 7.4) içinde hazırlanan 4 % formaldehit ile oda sıcaklığında fikse edildi. Formaldehit uzaklaştırılıp, dH<sub>2</sub>O ile çalkalandı ve hücreler 1X PBS ile yavaşça çalkalanarak 3 dk yıkandı. 1X PBS / 0.3 % Triton X-100 ile hazırlanan solüsyon içinde 3 kez 5'er dk yavaşça çalkalanan hücreler, geçirgen (permeabilize) hale getirildi. Tekrar, 1 X PBS ile yavaşça çalkalanarak 3 dk yıkanan hücreler, 1X PBS // 10 % FBS // 0.3 % Triton X-100 ile hazırlanan solüsyon içinde 37° C'de 1 saat inkübe edilerek bloklandı. Ortam uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı.

Fosfo- EZH2 antikoru (Ab 84989) 1:100 oranında 1 X PBS // 2% FBS // 0.3 % Triton X-100 ile dilüe edildi. Hücrelere eklenerek 1 saat oda sıcaklığında, nemli ortamda inkübe edildi. Ortam uzaklaştırıldı ve 30 dk PBS-T ile yıkandı. Alexa 488 floresan boya bağlı sekonder antikor 1:4000 oranında 1 X PBS // 2% FBS // 0.3 % Triton X-100 içinde dilüe edildi. Hücrelere eklenerek 1 saat oda sıcaklığında ve nemli ortamda inkübe edildi. Ortam uzaklaştırıldı ve 1 saat PBS-T ile yıkandı.

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Boyama: Son konsantrasyonu 0.025% olacak şekilde dH<sub>2</sub>O içinde DAPI immunofloresan boya hazırlandı. Lamellere kapatacak kadar damlatıldıktan sonra 30 sn inkübe edildi. Sırasıyla dH<sub>2</sub>O – PBS - dH<sub>2</sub>O ile yıkama yapıldı. Lamellere “Flourescent Mounting Media” damlatılarak slaytlar kapatıldı.

#### **ETİK KURUL ONAYI:**

**Bu çalışmanın etik kurul raporu, DEÜ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU tarafından 05 Şubat 2009 tarih ve 09/03/2009 no'lu toplantısında onaylanmıştır.**

## **4. BULGULAR**

### **4.1 Lityum HuH7 hücre hattında proliferasyonu inhibe eder ve genom düzeyinde histone modifiye eden enzimlerin anlamlı şekilde transkript seviyelerinde değişikliklere neden olur.**

Erdal E. ve ark'nın 2005 yılında yayınlanan bir çalışmasında lityumun doz ve zaman bağımlı olarak HCC hücre hatlarında proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda en çok etkilenen HuH7 hücrelerinde lityum uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde genom düzeyindeki değişikliklerin belirlenmesi için mikroarray çalışması yapılmış ve burada 1807 genin transkript düzeyinde anlamlı şekilde değiştiği gösterilmiştir. Bu tez kapsamında ise, ilk olarak mikroarray verisi GSEA (Gene Set Enrichment Analysis, [www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp](http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp)) bioinformatik veri tabanı kullanılarak yeniden analiz edilmiş ve yapılan bu analizlerde histone modifiye eden enzimlerin lityum etkisinde anlamlı değişime uğradığı gösterilmiştir (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1:** Lityum etkisinde anlamlı değişime uğrayan histon modifiye eden enzimler.

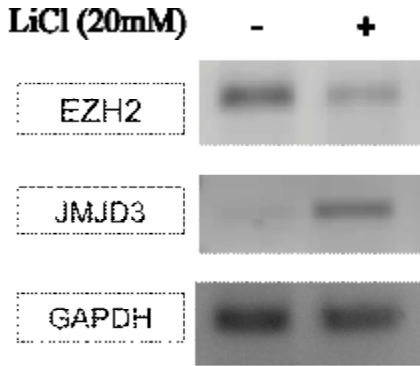
<b>Li-arrayde istatistiksel olarak anlamlı değişen histon modifikasyon enzimleri</b>	<b>Gen Sembolü</b>	<b>Katlı artışı</b>	<b>Ekspresyon</b>	<b>Enzimin yaptığı modifikasyonlar</b>	<b>Fonksiyonu</b>
<b>KDM2B (K-Demetilaz)</b>	<b>FBXL10</b>	<b>0.4</b>	<b>ê</b>	<b>H3K36me1/2</b>	<b>Transkripsiyon inaktivasyonu</b>
<b>KDM4C (K-Demetilaz)</b>	<b>JMJD2C</b>	<b>0.7</b>	<b>ê</b>	<b>H3K9/K36me2/3</b>	<b>Onkogen Kabul ediliyor</b>
<b>KMT2E (K-metiltransferaz)</b>	<b>MLL5</b>	<b>0.6</b>	<b>ê</b>	<b>H3K4</b>	<b>Transkripsiyon aktivasyonu</b>
<b>KMT6 (K-metiltransferaz)</b>	<b>EZH2</b>	<b>0.6</b>	<b>ê</b>	<b>H3K27</b>	<b>Polycomb sessizleştirme</b>
<b>KDM6B (K-Demetilaz)</b>	<b>JMJD3</b>	<b>1.5</b>	<b>é</b>	<b>H3K27me2/3</b>	<b>Transkripsiyon aktivasyonu</b>
<b>KMT2A (K-metiltransferaz)</b>	<b>MLL</b>	<b>1.5</b>	<b>é</b>	<b>H3K4</b>	<b>Transkripsiyon aktivasyonu</b>
<b>KMT2D (K-metiltransferaz)</b>	<b>MLL4</b>	<b>1.8</b>	<b>é</b>	<b>H3K4</b>	<b>Transkripsiyon aktivasyonu</b>



## 4.2 HuH7 Hücre Hattında Lityum Etkisinde JMJD3 ve EZH2 Ekspresyonunun Transkript ve Protein Düzeyinde Araştırılması

### 4.2.1 Lityum Etkisinde EZH2 ve JMJD3 Ekspresyonunun Transkript Düzeyinde Araştırılması

Mikroarray çalışmasında gösterilen EZH2 ekspresyonundaki azalma ve JMJD3 ekspresyonundaki artışın doğrulanması amacıyla yapılan bu çalışmada, 20 mM LiCl uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerden elde edilen total RNA'lar kullanılarak cDNA elde edildi. Sonrasında bu cDNA'larda özgün primerler kullanılarak EZH2 ve JMJD3 düzeyleri PCR yöntemi ile araştırıldı. PCR sonucunda lityum varlığında EZH2 ekspresyonunun azaldığı ve JMJD3 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Ek olarak eşit cDNA havuzunun kullanılmasını test etmek amacıyla GAPDH internal kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak, mikroarray sonucunda elde edilen LiCl'ün EZH2 üzerinde yarattığı ekspresyonel azalma ve JMJD3 üzerinde yarattığı ekspresyonel artış mRNA düzeyinde PCR yöntemiyle de doğrulanmıştır.

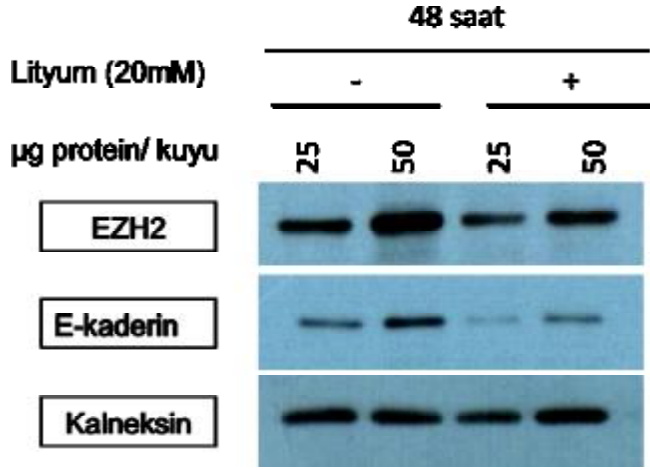


**Şekil 4.1:** Lityumun mRNA düzeyinde EZH2 ve JMJD3 üzerine etkisi.

### 4.2.2 Lityum Etkisinde EZH2 Ekspresyonunun Protein Düzeyinde Araştırılması

HuH7 hücrelerinde lityum etkisinde EZH2 enziminin protein düzeyinde nasıl etkilendiğini göstermek amacıyla yapılan bu çalışmada, öncelikle 48 saat süresince 20mM LiCl'li ortamda büyütülen HuH7 hücre hattından nukleer ekstraksiyon yöntemi ile protein izolasyonu yapıldı. EZH2 proteinine özgün olarak üretilmiş antikor kullanılarak western blotting yöntemi ile değişimine bakıldı. Ek olarak aynı koşullarda LiCl'ün etkisinin spesifikliğini göstermek için ise DMEM-10 bazal ortamında büyütülen HuH7 hücrelerinden elde edilen histon proteinleri kontrol olarak kullanıldı. Eşit yükleme kontrolü olarak

Kalnexin proteinine özgün antikor kullanılmıştır. Sonuç olarak, mikroarray sonucunda elde edilen LiCl'ün EZH2 üzerinde yarattığı ekspresyonel azalma mRNA düzeyinde PCR yöntemiyle de doğrulandığı gibi protein düzeyinde de azaldığı gösterilmiştir.

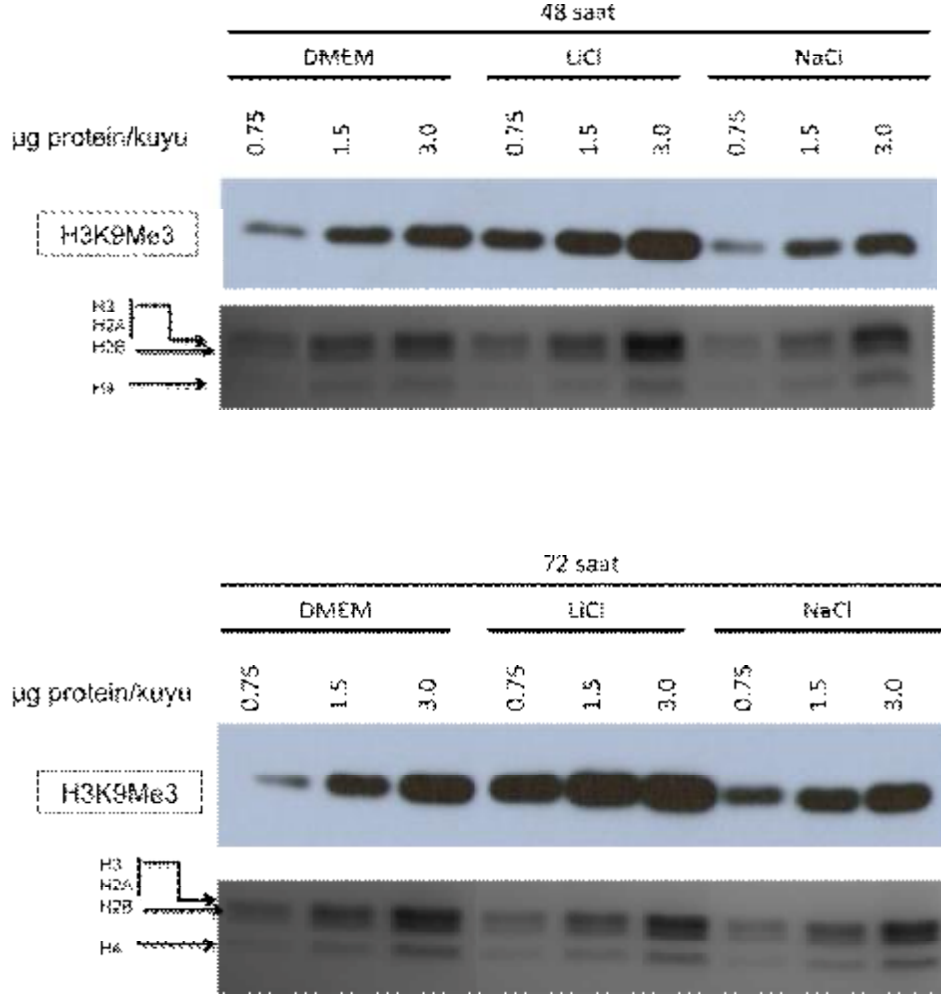


Şekil 4.2: Lityumun protein düzeyinde EZH2 üzerine etkisi.

### 4.3 Lityum Etkisinde Oluşan Histon Modifikasyonlarının Araştırılması

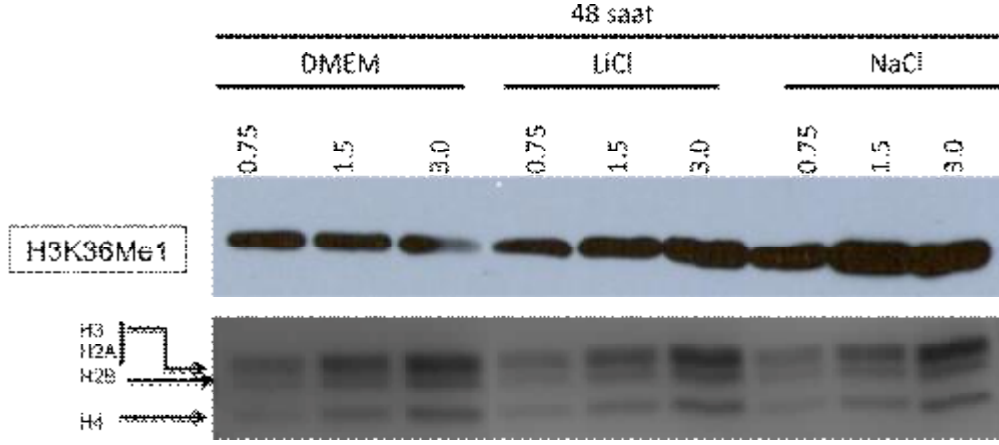
HuH 7 hücrelerinde lityum etkisinde değişimi gösterilen histon modifiye eden enzimlerin hedeflediği bilinen modifikasyonların nasıl etkilendiğini göstermek amacıyla yapılan bu çalışmada, öncelikle 48 ve 72 saat süresince 20mM LiCl'ü ortamda büyütülen HuH7 hücre hattından asit ekstraksiyon yöntemi ile histon proteinleri elde edildi ve elde edilen histon proteinlerinde anti-H3K9me3, anti-H3K4me3, anti-H3K27me3 ve anti-H3K36me1 modifikasyonlarına özgün olarak üretilmiş antikorlar kullanılarak western blotting yöntemi ile değişimlere bakıldı. Ek olarak aynı koşullarda LiCl'ün etkisinin spesifikliğini göstermek için ise 20mM NaCl ya da DMEM-10 bazal ortamında büyütülen HuH7 hücrelerinden elde edilen histon proteinleri kontrol olarak kullanıldı.

Mikroarray sonucunda lityum etkisi ile H3K9'a özgün K-demetilaz enzimi JMJD2C azalma göstermektedir. Bu deneyde, beklendiği gibi H3K9me3 modifiye histonların kontrollere göre belirgin düzeyde arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.3).



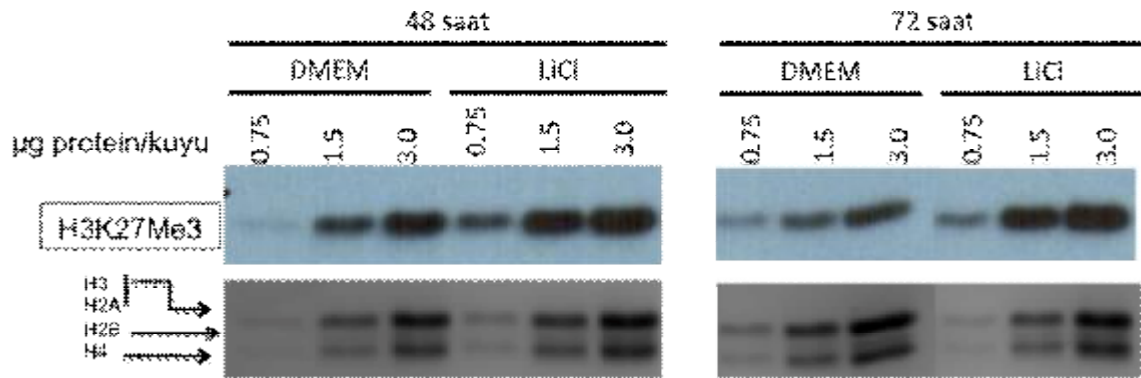
**Şekil 4.3:** 48 ve 72 saat lityum ile muamele edilen HuH7 hücrelerinden elde edilen histon proteinlerinde H3K9me3 modifikasyon değişimi.

Mikroarray sonucunda lityum etkisi ile H3K36me1'e özgün K-demetilaz enzimleri FBXL10 ve JMJD2C azalma göstermektedir. Bu deneyde, Lityum array sonucunda beklendiği gibi H3K36me1 modifiye histonların kontrollere göre belirgin düzeyde arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.4).



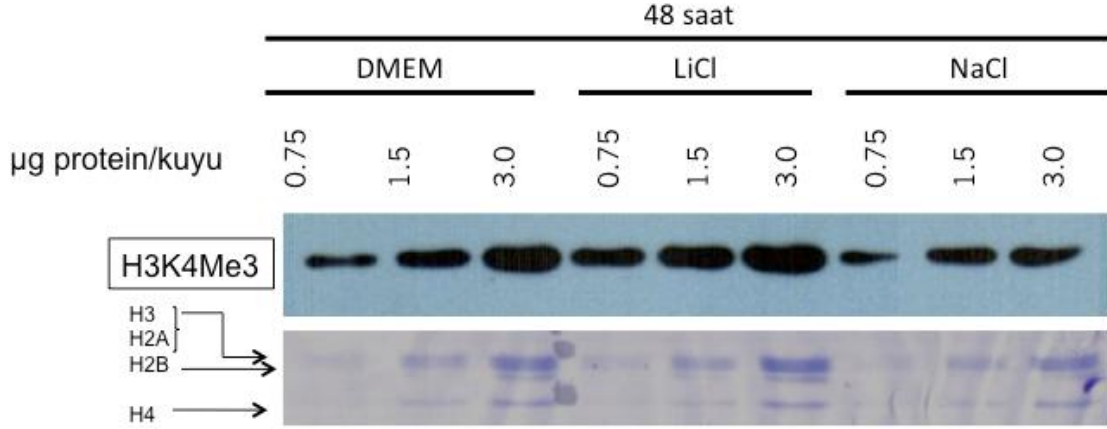
**Şekil 4.4:** 48 saat Lityum ile muamele edilen HuH7 hücrelerinden elde edilen histon proteinlerinde H3K36me1 modifikasyon değişimi.

Mikroarray sonucunda lityum etkisi ile H3K27'ye spesifik K-metiltransferaz EZH2 enzimi azalma göstermektedir. Deney sonucunda, H3K27me3 modifiye histonların kontrollere göre belirgin düzeyde arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.5). Bu, arraye göre beklenmeyen bir sonuçtur.



**Şekil 4.5:** 48 ve 72 saat lityum ile muamele edilen HuH7 hücrelerinden asit ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen histon proteinlerinde H3K27me3 modifikasyon değişimi.

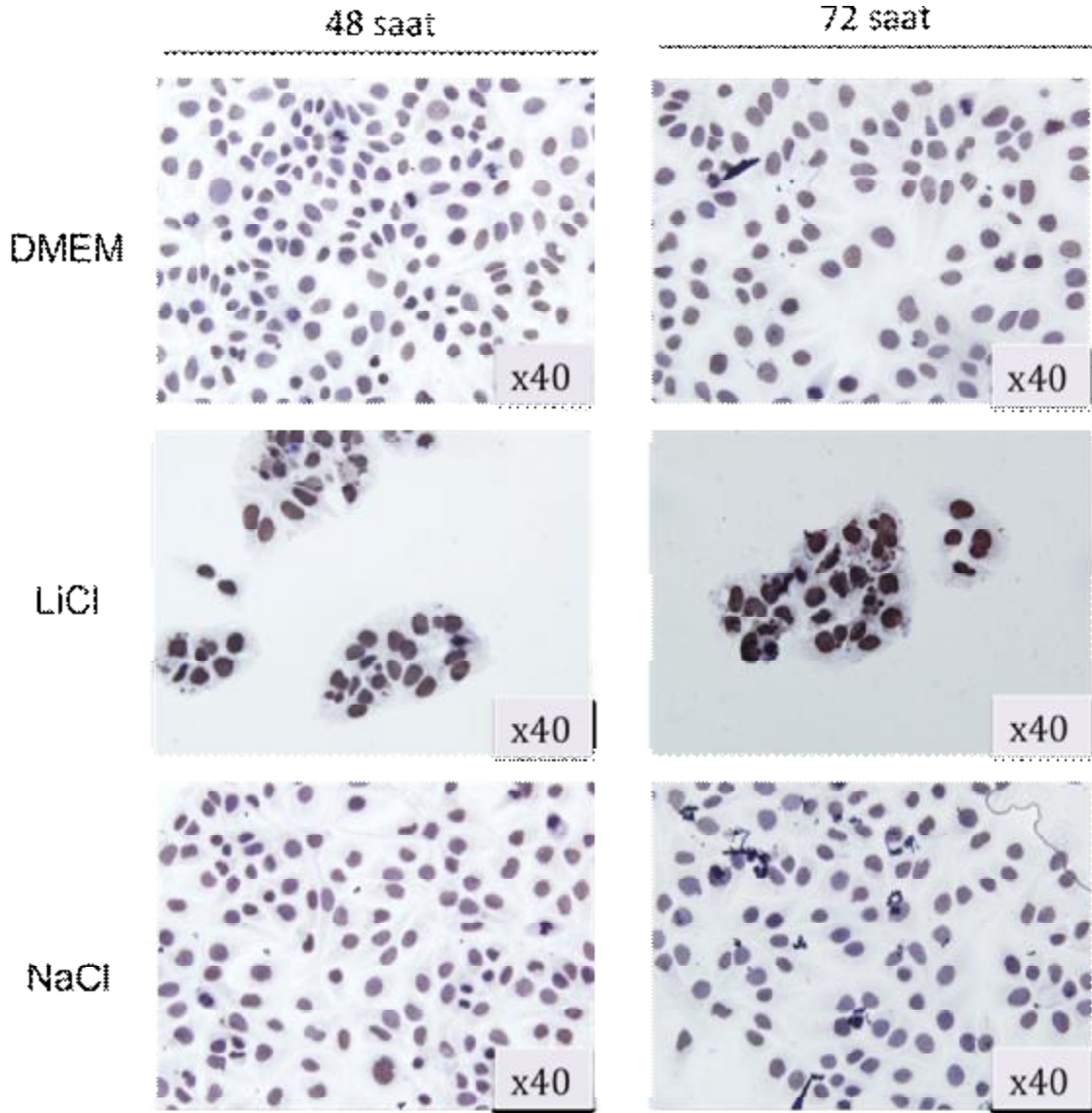
Mikroarray sonucunda lityum etkisi ile H3K4me3 K-metiltransferaz enzimlerinden olan MLL5 azalırken, MLL ve MLL4 artmaktadır. Bu deneyde, mikroarray sonucunda beklendiği gibi H3K4me3 modifiye histonların kontrollere göre belirgin düzeyde arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6:** 48 saat Lityum ile muamele edilen HuH7 hücrelerinden asit ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen histon proteinlerinde H3K4me3 modifikasyon değişimi.

#### 4.4 HuH7 Hücrelerinde Lityum Etkisinde H3K27me3 Düzeyindeki Değişimin Doğrulanması

Lityum mikroarray verisinde H3K27me3 modifikasyonundan sorumlu başlıca enzim olan EZH2'nin ekspresyonunun azalmasına karşın H3K27me3 modifikasyonunun artması bize bu modifikasyonun başka yöntemle doğrulanması gerektiğini düşündürdü. Bu kapsamda HuH7 hücreleri 48 saat ve 72 saat 20mM LiCl veya NaCl eklenen DMEM-10 bazal büyüme ortamında ve sadece DMEM-10 büyüme ortamında inkübe edildi. Anti-H3K27me3 antikorunu kullanarak immunositokimya yöntemi ile hücrelerde boyamalar yapıldı. Sonuç olarak, lityum varlığında kontrollere göre belirgin şekilde H3K27me3 modifikasyonunda artış tespit edildi.

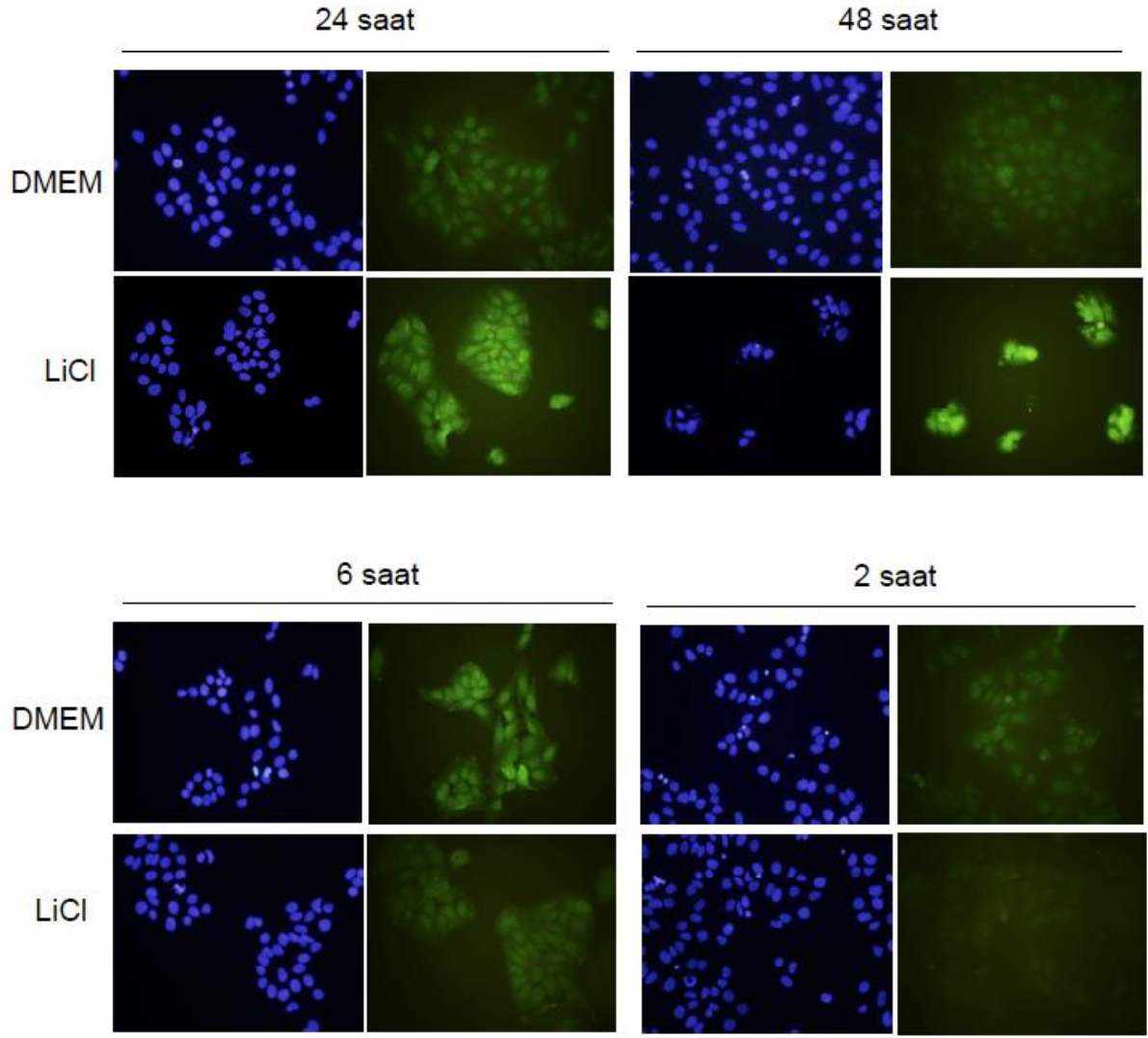


**Şekil 4.7:** HuH7 hücrelerinde H3K27me3 modifikasyonunun 48 ve 72 saat LiCl varlığında değişimi (görüntüler x40 büyütmede alınmıştır); A) 48 saat DMEM-10 bazal ortamında, B) 48 saat 20mM LiCl içeren DMEM-10, C) 48 saat 20mM NaCl içeren DMEM-10 D) 72saat DMEM-10 bazal ortamında, E) 72 saat 20mM LiCl içeren DMEM-10 büyüme ortamında F) 72 saat 20mM NaCl içeren DMEM-10 bazal ortamında kültüre edilen hücreler. Lityum etkisi ile proliferasyonu duran hücreler koyu kahverengi gözlenmektedir.

#### 4.5 Lityum Etkisi ile EZH2'nin Fosforillenmiş Formundaki Değişiminin Belirlenmesi

Lityumun hücre içinde GSK3 $\beta$  ve PI3K enzimlerini inhibe ettiği bilinmektedir. Grubumuzca yapılan bir çalışmada, HCC hücre hatlarından Mahlavu'da deneylerimizde kullandığımız dozlarda lityumun PI3K yolağını inhibe ettiği fosforile Akt (aktif form)'ın azalması yoluyla gösterilmiştir. Tai-Lung Cha ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları bir çalışmada, EZH2'nin upstream düzenleyici moleküllerinin aydınlatılması için yaptıkları deneylerin sonucunda, beklenmeyen bir şekilde fosforile-Akt'ın yani aktif halde bulunan Akt proteininin artan seviyelerinde, H3K27me3 modifikasyonunun azaldığı gösterilmektedir. Bu ters ilişki sonucunda da Akt aktivitesinin H3K27 tri metilasyonunda değişiklik yapıp yapmadığını test etmişlerdir. Sonuç olarak, EZH2'nin H3K27me3 modifikasyonundan sorumlu K-metiltransferaz aktivitesinin Akt sinyal yolağı tarafından regüle edildiğini ve Akt'ın EZH2 enzimini fosforillediği, bu fosforilasyonun enzimin H3'e olan affinitesini düşürdüğünü göstermişlerdir. EZH2'nin fosforilasyonu H3K27 trimetilasyonunu baskılamakta ve gen susturulma mekanizmasını bozmaktadır. Bu çalışma bize, lityum etkisinde EZH2'nin Polycomb sessizleştirme mekanizmasını inaktive eden fosforile formunun düşmesinin ve buna bağlı olarak bu mekanizmanın substratı olan H3K27Me3 modifikasyonunun artışına neden olabileceği hipotezini kurmamızı sağlamıştır. Bunu test etmek için, HuH7 hücreleri 2, 6, 24 ve 48 saat 20mM LiCl eklenen DMEM-10 bazal büyüme ortamında ve sadece DMEM-10 büyüme ortamında inkübe edildi. Anti-fosfo-EZH2 antikoru kullanılarak immunofloresan boyama yöntemi ile hücrelerde boyamalar yapıldı.

Deney sonucunda 2 saat ve 6 saat LiCl'lü koşullarda büyütülen hücrelerdeki fosfo-EZH2 ekspresyonunun kontrole göre azaldığı gözlemlenirken, 24 saat ve 48 saat LiCl'lü koşullarda büyütülen hücrelerdeki fosfo-EZH2 ekspresyonu kontrole göre artmaktadır (Şekil 4.7).



**Şekil 4.8:** DMEM ve LiCl'ü ortamda büyütülen HuH7 hücrelerinde fosfo-EZH2 seviyelerinin immunfloresan yöntem ile gösterilmesi.



## **5. TARTIŞMA**

Son yıllarda nükleosomun temel yapısını oluşturan histon kor proteinlerindeki modifikasyonların kombinasyonları yoluyla ortaya çıkan histon kod'larının, DNA nükleotit dizisi üzerindeki genetik kod kadar, yaşlanma, gelişim gibi biyolojik süreçlerin kontrolünde rolü olduğu gösterilmeye başlanmıştır (57, 71, 77, 78). Hepatokarsinogenez sürecinde birçok genin promotor metilasyonu yoluyla susturulduğu gösterilmiş olsa da histon kodu değişikliklerinin rolü henüz bilinmemektedir (21, 46)

Önceki çalışmalarımızda lityumun hepatoselular karsinoma hücre hatlarında doz ve zaman bağımlı olarak proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (1). Lityum, bipolar bozukluklarda çok uzun yıllardır kullanılan en temel terapötik ajan olmasına rağmen, etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar, lityumun çeşitli organizmalarda embriyonik gelişimi ve doku modelinde farklılaşma ve proliferasyonu etkilediğini göstermiştir (95). Lityumun *Xenopus*'un embriyonik gelişimi üzerine etkisini gözlemlemek için yapılan ilk deneylerde, bu ajanın GSK3b'yı inhibe ederek Wnt/B-katenin yolağının aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir. (96, 97). Wnt sinyalizasyonunun b-katenin, Axin mutasyonları ya da Wnt ligandlarını algılayan reseptörlerin artışı gibi çeşitli yollarla aktive edilmesi birçok kanser modelinde de bildirilmiştir. (98). Bu yolağın aşırı aktivasyonunda, sitoplazmik ve/veya nükleer aşırı B-katenin birikimi olur. HCC'de B-katenin, axin1 ve p53 mutasyonu B-katenin proteini birikiminin temel nedenleridir (43-45)

Lityum kullanıldığında Wnt/b-katenin sinyal yolağının aktive olması ve buna bağlı hücre proliferasyonunun artması beklenmekteyken deneylerimizde lityum uygulanan HCC hücre hatlarının tamamında inhibisyon gözlenmiştir. Bu çok beklenmedik bir sonuçun oluşum mekanizmalarını anlamak üzere sonrasında aynı koşullarda çoğalmaları durdurulmuş HuH7 hücrelerinde ve kontrole karşı yapılan mikroarray çalışmasında (G. Karakulah., yayınlanmamış veri), lityuma bağlı hücrelerde 1807 genin istatistiksel anlamlı düzeyde değiştiği tanımlanmıştır. Yine aynı çalışmada, lityum uygulamasının kontrole göre, histone modifikasyonlarına yol açan, FBXL10, JMJD2C, JMJD3, MLL, MLL4, MLL5, EZH2 gibi histon metil transferaz ve demetilaz genlerinin transkripsiyonunda anlamlı düzeyde değişime neden olduğu bulunmuştur.

Mikroarray çalışmamızda anlamlı değişim gösteren gen sayısındaki bu fazlalık, bize buradaki hücre döngüsünün durdurulması olayında da kontrol edici genel bir mekanizmanın olabileceğini düşündürdü. Yine aynı zamanlarda yayınlanan bir çalışmada, *C.Elegans* modelinde lityumun histonların modifiye formlarını değiştirerek yaşam süresini kısalttığının gösterilmesi bize HCC modelinde de lityumun histon kodunu değiştirerek hücre proliferasyonunu etkileyebileceği hipotezimizi kuvvetlendirmiştir. Bu çalışmada, *C.Elegans*'a lityum uygulanmış ve uygulama sonucunda histon demetilaz enzimi LSD1 solucan ortoloğu (T08D10.2) ekspresyonu azalmıştır. RNAi ile T08D10.2'nin miktarının azaltılmasıyla ise yaşam süresi uzamıştır. Bu sonuçlar da lityumun kromatin yapısını ve histon metilasyonunu modüle ederek sağkalımı regüle ettiği fikrini öne sürmektedir (99).

HuH7 hücrelerinde lityum etkisinde değişimi gösterilen histon demetilaz ve metiltransferazların hedeflediği bilinen modifikasyonların nasıl etkilendiğini göstermek amacıyla yapılan çalışmada, H3K9me3, H3K4Me3 ve H3K36me1 modifikasyonlarının beklendiği gibi ve mikroarray verisi ile uyumlu olarak kontrollere göre belirgin düzeyde arttığı gösterilmiştir. Bu modifikasyonlardan H3K4Me3'ün mayadan sirke sineğine kadar farklı modellerde, HOX gibi bazı genlerin transkripsiyonel aktivasyonu sağladığı ve böylelikle embriyogenezde rolü olduğu bilinmektedir. Benzer şekilde lisin 36'dan metillenmiş histon 3'ün aktif gen bölgelerinde bulunduğu gösterilmiştir. Bunun yanında H3K9Me3 ve H3K27Me3 modifikasyonlarının transkripsiyonel inhibisyonundan sorumlu olduğu tanımlanmaktadır (68, 71).

Lityum etkisinde H3K27Me3 modifikasyonundan sorumlu başlıca enzim olan EZH2 ekspresyonunun mRNA ve protein düzeyinde azalmasına karşın H3K27me3 modifikasyonunun arttığı gözlemlendi. Verinin doğrulanması için yapılan immunositokimya boyaması sonucunda da lityum varlığında kontrollere göre belirgin şekilde H3K27me3 modifikasyonunda artış tespit edildi.

Fujii S ve Ochiai A'(100) nin gastrik kanserlerde yapmış oldukları bir çalışmada EZH2 proteini ve E-kaderin proteininin ekspresyonları arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Epitelyal hücrelerde eksprese edilen bir transmembran glikoprotein olan E-kaderin kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyonundan sorumludur. Hücre-hücre adhezyonunu sağlayan bağlantıların bozulması sonucu oluşan kontakt inhibisyonun kaybı ve kontrolsüz hücre

proliferasyonu neoplastik sürecin ilk basamağıdır. Bunun yanısıra E-kaderinin normal fonksiyonunu sürdürememesi metastaz süreci için de önemlidir. EZH2'nin siRNA ile sessizleştirilmesi ile E-kaderin gen ekspresyonunun yeniden eksprese edilmeye başladığı bildirilmiştir. Bu çalışmada E-kaderin yeniden eksprese edilmesinin EZH2'nin E-kadherin promotorundaki H3K27 trimetilasyonunu katalizlemesi ile gerçekleştiği, genin promotor bölgesindeki DNA metilasyon durumundaki bir değişikliğin bulunmadığı gösterilmiştir (100). Bizim çalışmamızda lityum varlığında kontrole göre HuH7 hücrelerinde H3K27me3 modifikasyonu artarken bununla paralel bir şekilde E-kaderin ekspresyonu da azalmıştır. Buna karşın beklenmeyen şekilde EZH2 proteininin ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.2). Verilerimiz HuH7 hücre hattında Lityum tarafından uyarılan proliferasyon inhibisyonunda H3K27me3 modifikasyonu artışının önemli olduğunu, ancak bu artıştan EZH2 dışında bir mekanizmanın sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Son zamanlarda senkronize hücre kültürlerinde yapılan analizler ile, birçok kromatin modifikasyonunun hücre döngüsü ve bölünme sırasında dinamik olarak değiştiği ve farklı evrelerde farklı kromatin damgaları oluşturdukları gösterilmiştir. Valls ve arkadaşları, mitoz sırasında H3K4me<sub>2/3</sub> modifikasyonu oluşumunu analiz etmiş ve mitotik kalıtım üzerinde etkili olduğunu tanımlamışlardır. H3K4me<sub>2/3</sub> global seviyesinin interfaz ve mitoz arasında değişmediğini, buna ilaveten mitoz sırasında hedef genlerin promotor bölgelerinde modifikasyonun devam ettirildiğini göstermişlerdir (101). McManus ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada H3K9 metilasyon durumu immünofloresan yöntemle incelenmiş ve G2/mitoz geçişinde H3K9me<sub>3</sub> modifikasyonunun arttığı, H3K9me<sub>1/2</sub> modifikasyonunun değişmediği gözlenmiştir (102). İlginç olarak, mitoz sonunda interfazda H3K9me<sub>3</sub> modifikasyon seviyesi hızlıca düşmüştür. Bu da H3K9 metilasyonu için farklı hücre döngüsü dinamikleri olduğunu göstermektedir. Hücre proliferasyonu ve farklılaşması arasındaki denge G1 evresinin başında pRB/E2F transkripsiyon faktörleri ile kontrol edilir (103). Hücre döngüsü çıkışında, siklin D1 ve A2 gibi spesifik pRB/E2F hedef promotorlarında H3K9me<sub>3</sub> modifikasyonları meydana gelir, ve bu farklılaşma ile ilişkili modifikasyon Suv39H1 enzimini tarafından gerçekleşir (104). CDK inhibitörü olan Ink4a ailesi anti-mitogenik sinyallere cevap olarak G1/S geçişini regüle eder. Ink4 ekspresyonu pRB hipofosforilasyonu ve G1 arrest ile sonuçlanır. Polycomb aracılı sessizleştirme ve hücre döngüsü regülasyonu arasındaki bağlantı, senesens kontrol noktalarının kontrolü ve kanser oluşumu, PRC1 altbirimi Bmi1 defektli hayvan modelleri oluşturularak tanımlanmıştır. Jacobs ve

arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma, P16(Ink4a) ve p19(ARF)'ın PRC1 aracılı sessizleştirme için önemli hedefler olduklarını göstermektedir (105). E2F/pRb ve polycomb aracılı baskılama arasındaki ilişki, P16 (ink4a) lokusunun, PRC1 ve PRC2 enzimleri işbirliğiyle, H3K27me3 modifikasyonu ile sessizleştirildiğinin gösterilmesi ile desteklenmiştir (106, 107).

Lityumun hücre içinde GSK3 $\beta$  ve PI3K enzimlerini inhibe ettiği bilinmektedir. Grubumuzca yapılan bir çalışmada, HCC hücre hatlarından Mahlavu'da deneylerimizde kullandığımız dozlarda lityumun PI3K yolağını inhibe ettiği fosforile Akt (aktif form)'ın azalması yoluyla gösterilmiştir. Tai-Lung Cha ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları bir çalışmada, EZH2'nin upstream düzenleyici moleküllerinin aydınlatılması için yaptıkları deneylerin sonucunda, beklenmeyen bir şekilde fosforile-Akt'ın yani aktif halde bulunan Akt proteininin artan seviyelerinde, H3K27me3 modifikasyonunun azaldığı gösterilmektedir (108). Bu ters ilişki sonucunda da Akt aktivitesinin H3K27 tri metilasyonunda değişiklik yapıp yapmadığını test etmişlerdir. Sonuç olarak, EZH2'nin H3K27me3 modifikasyonundan sorumlu K-metiltransferaz aktivitesinin Akt sinyal yolağı tarafından regüle edildiğini ve Akt'ın EZH2 enzimini fosforilediği, bu fosforilasyonun enzimin H3'e olan affinitesini düşürdüğünü göstermişlerdir. EZH2'nin fosforilasyonu H3K27 trimetilasyonunu baskılamakta ve gen susturulma mekanizmasını bozmaktadır. Bu çalışma bize, lityum etkisinde EZH2'nin Polycomb sessizleştirme mekanizmasını inaktive eden fosforile formunun düşmesinin ve buna bağlı olarak bu mekanizmanın substratı olan H3K27Me3 modifikasyonunun artışına neden olabileceği hipotezini kurmamızı sağlamıştır. Bunu test etmek için yaptığımız immunfloresan boyamalar sonucunda, tüm deneyleri yaptığımız 48 ve 72 saatlik uygulamada LiCl'lü koşullarda kontrole göre fosfo-EZH2 seviyesinde artma gözlemledik. LiCl'ün etkisi doz ve zaman bağımlıdır, bu nedenle, erken saatlerde bir etkinin olup olmadığını görmek amacıyla 2 ve 6 saatlik LiCl uyguladığımız HuH7 hücrelerinde kontrollere göre fosfo-EZH2 seviyesinin belirgin şekilde düştüğünü gözlemledik. Fosfo-EZH2 seviyesinin erken saatlerde düşmesi, yani inaktif durumda olan H3'e bağlanma affinitesi düşük olan EZH2 fosfo formunun azalması, deneylerimizde gözlemlediğimiz H3K27me3 modifikasyon artışını açıklamaktadır. Sonuç olarak, bu çalışma bize histon modifikasyonlarının hepatosellular karsinoma hücre proliferasyonunun kontrolünde önemli olabileceğini göstermiştir.

## **6. SONUC VE ÖNERİLER**

Lityum HCC hücre hatlarında zaman ve doz bağımlı olarak proliferasyonu inhibe etmektedir (1). Lityum etkisi ile; EZH2 (KMT6, K-Metiltransferaz) transkript ve protein düzeyinde azalmaktadır. JMJD3 (KDM6B, K-Demetilaz) transkript düzeyinde artmaktadır. EZH2 enziminin katlızlediği H3K27me3 modifikasyonu artmaktadır. Ve buna bağılı olarak E-kaderin protein düzeyi azalmaktadır. EZH2 protein düzeyinden bağımsız olarak p-EZH2 düzeyi erken saatlerde azalmaktadır.

Yapılan çalışmalar doğrultusunda, H3K27me3 modifikasyonunun EZH2 protein seviyesinden bağımsız bir mekanizma ile kontrol edilebildiği ve bunun da hücre proliferasyonunu etkilediği sonucuna varılmıştır.

Global etkisini gözlemllediğimiz bu sessizleştirme mekanizmasının lityum etkisinde hangi moleküller ile kontrol edildiğinin incelenmesi amacı ile H3K27me3 antikorunu kullanarak CHIP (Kromatin İmmunopresipitasyon) deneyinin yapılması planlanmaktadır. Bu amaçla p21, p27 gibi epigenetik olarak düzenlendiği bilinen moleküllerin yanısıra, HCC sürecinde önemli olan ve yaptığımız mikroarray çalışması sonucunda anlamlı derecede değıştiği belirlenen p18 proteininin rolünün araştırılması planlanmaktadır.

## **KAYNAKLAR**

1. Erdal E, Ozturk N, Cagatay T, Eksioglu-Demiralp E, Ozturk M. Lithium-mediated downregulation of PKB/Akt and cyclin E with growth inhibition in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2005 Jul 20; 115(6): 903-10.
2. Sims RJ 3rd, Reinberg D. Is there a code embedded in proteins that is based on post-translational modifications? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Oct; 9(10): 815-20. Epub 2008 Sep 11. Review.
3. Moradei O, Vaisburg A, Martell RE. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: new compounds and clinical update of benzamide-type agents. *Curr Top Med Chem*. 2008;8(10): 841-58. Review.
4. Fillingham J, Greenblatt JF. A histone code for chromatin assembly. *Cell*. 2008 Jul 25; 134(2): 206-8.
5. Godde JS, Ura K. Cracking the enigmatic linker histone code. *J Biochem*. 2008 Mar; 143(3): 287-93. Epub 2008 Jan 30. Review.
6. Boussoar F, Rousseaux S, Khochbin S. A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code. *Cell Cycle*. 2008 Nov 15; 7(22): 3499-502. Epub 2008 Nov 12.
7. Trauner M, Claudel T, Fickert P, Moustafa T, Wagner M. Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. *Dig Dis*. 2010; 28(1): 220-4.
8. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*. 2001 Oct 15; 94(2): 153-6.
9. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2003 Dec 6; 362(9399): 1907-17.
10. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*. 2006 Sep; 6(9): 674-87.
11. Schnater JM, Köhler SE, Lamers WH, von Schweinitz D, Aronson DC. Where do we stand with hepatoblastoma? A review. *Cancer*. 2003 Aug 15; 98(4): 668-78.

12. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 1999 Jan-Feb; 49(1): 33-64, 1.
13. El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med.* 1999 Mar 11; 340(10): 745-50.
14. Taylor-Robinson SD, Foster GR, Arora S, Hargreaves S, Thomas HC. Increase in primary liver cancer in the UK, 1979-94. *Lancet.* 1997 Oct 18; 350(9085): 1142-3.
15. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2002 Aug; 31(4): 339-46.
16. Weihrauch M, Markwarth A, Lehnert G, Wittekind C, Wrbitzky R, Tannapfel A. Abnormalities of the ARF-p53 pathway in primary angiosarcomas of the liver. *Hum Pathol.* 2002 Sep; 33(9): 884-92.
17. Badvie S. Hepatocellular carcinoma. *Postgrad Med J.* 2000 Jan; 76(891): 4-11.
18. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening. *Semin Liver Dis.* 2005; 25(2): 143-54.
19. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 1998; 12:2973-2983).
20. Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene.* 2007 Apr 2;26(15):2166-76.
21. Aravalli RN, Steer CJ, Cressman ENK. Molecular Mechanism of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 2047-2063).
22. Minouchi, K., Kaneko, S. & Kobayashi, K. Mutation of p53 gene in regenerative nodules in cirrhotic liver. *J. Hepatol.* 37, 231–239 (2002).
23. Hussain SP, Raja K, Amstad PA, Sawyer M, Trudel LJ, Wogan GN, et al. Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:12770-12775).
24. Malumbres M, Barbacid, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:222-231.)

25. Dynlacht BD, Flores O, Lees JA, Harlow E. Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev* 1994; 8:1772-1786.)
26. Azechi H, Nishida N, Fukuda Y, Nishimura T, Minata M, Katsuma H, et al. Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology* 2001; 60:346-354.
27. Pimienta G, Pascual J. Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle* 2007; 6:2628-2632.
28. Panteva M, Korkaya H, Jameel S. Hepatitis viruses and the MAPK pathway: is this a survival strategy? *Virus Res.* 2003;92:131-140.)
29. Zhao LJ, Wang L, Ren H, Cao J, Li L, Ke JS, et al. Hepatitis C virus E2 protein promotes human hepatoma cell proliferation through the MAPK/ERK signaling pathway via cellular receptors. *Exp Cell Res* 2005; 305:23-32.
30. Satoh T, Kaziro Y. Ras in signal transduction. *Semin Cancer Biol* 1992; 3:169-177).
31. Challen C, Guo K, Collier JD, Cavanagh D, Bassendine MF. Infrequent point mutations in codons 12 and 61 of ras oncogenes in human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 1992; 14:342-346.
32. Cerutti P, Hussain P, Pourzand C, Aguilar F. Mutagenesis of the H-ras protooncogene and the p53 tumor suppressor gene. *Cancer Res* 1994; 54:1934s-1938s.
33. Watatani M, Perantoni AO, Reed CD, Enomoto T, Wenk ML, Rice JM. Infrequent activation of K-ras, H-ras, and other oncogenes in hepatocellular neoplasms initiated by methyl (acetoxymethyl) nitrosamine, a methylating agent, and promoted by phenobarbital in F344 rats. *Cancer Res* 1989; 79:1103-1109.
34. Bai F, Nakanishi Y, Takayama K, Pei XH, Inoue K, Harada T, et al. Codon 61 of K-ras gene mutation pattern in hepatocellular carcinomas induced by bleomycin and 1-nitropyrene in A/J mice. *Teratog Carcinog Mutagen* 2003:161-170.
35. Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:174-179).
36. Jagirdar J, Nonomura A, Patil J, Thor A, Paronetto F. ras oncogene p21 expression in hepatocellular carcinoma. *J Exp Pathol* 1989; 4:37-46.)



- 37.** Calvisi D, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology* 2006; 130:1117-1128.
- 38.** Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, et al. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 2001; 28:29-35.)
- 39.** Okochi O, Hibi K, Sakai M, Inoue S, Takeda S, Kaneko T, Nakao A. Methylation-mediated silencing of SOCS-1 gene in hepatocellular carcinoma derived from cirrhosis. *Clin Cancer Res.* 2003 Nov 1; 9(14):5295-8.
- 40.** Sethi JK, Vidal-Puig A. Wnt signalling and the control of cellular metabolism. *Biochem J.* 2010 Mar 15; 427(1):1-17
- 41.** Herbst A, Kolligs FT. Wnt signaling as a therapeutic target for cancer. *Methods Mol Biol* 2007; 361:63-91.
- 42.** Merle P, Kim M, Herrmann M, Gupte A, Lefranc,ois L, Califano S, et al. Oncogenic role of the frizzled-7/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 43:854-862.
- 43.** Huang H, Fujii H, Sankila A, Mahler-Araujo BM, Matsuda M, Cathomas G, et al. Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Pathol* 1999; 155:1795-1801.
- 44.** Devereux TR, Stern MC, Flake GP, Yu MC, Zhang ZQ, London SJ, et al. CTNNB1 mutations and beta-catenin protein accumulation in human hepatocellular carcinomas associated with high exposure to aflatoxin B1. *Mol Carcinog* 2001; 31:68-73.
- 45.** Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 2000; 24: 245-250.
- 46.** Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genet.* 2000; 31; 339–346.
- 47.** Lee S, Lee HJ, Kim JH, Lee HS, Jang JJ, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation along multistep hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol.* 2003 Oct; 163(4):

1371-8.

48. Ghoshal AK, Farber E. The induction of liver cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. *Carcinogenesis*. 1984 Oct; 5(10): 1367-70.
49. Kanai Y, Ushijima S, Tsuda H, Sakamoto M, Hirohashi S. Aberrant DNA methylation precedes loss of heterozygosity on chromosome 16 in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Cancer Lett*. 2000; 148: 73–80.
50. Kanai Y. Aberrant DNA methylation on chromosome 16 is an early event in hepatocarcinogenesis. *Jpn J. Cancer Res*. 1996; 87: 1210–1217 (1996).
51. Wong I H. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res*. 1999; 59: 71–73.
52. Matsuda, Y., Ichida, T., Matsuzawa, J., Sugimura, K. & Asakura, H. p16(INK4) is inactivated by extensive CpG methylation in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 116, 394–400 (1999).
53. Yu, J. *et al*. Methylation profiling of twenty four genes and the concordant methylation behaviours of nineteen genes that may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *Cell Res*. 13, 319–333 (2003).
54. Murata, H. *et al*. Promoter hypermethylation silences cyclooxygenase-2 (Cox-2) and regulates growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Lab. Invest*. 84, 1050–1059 (2004).
55. Kubo, T. *et al*. Apoptotic speck protein-like, a highly homologous protein to apoptotic speck protein in the pyrin domain, is silenced by DNA methylation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 64, 5172–5177 (2004).
56. Wong, C. M., Lee, J. M., Ching, Y. P., Jin, D. Y. & Ng, I. O. Genetic and epigenetic alterations of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 63, 7646–7651 (2003).
57. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. 2007. *Cell*. 128(4): 693-705
58. Jenuwein, T. 2006. The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J*. 273 (14): 3121-3135 ).
59. Sims, RJ., 3rd, Nishioka, K., and Reinberg, D. 2003. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet*. 19(11): 629-639.

60. Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman. *The Cell: A Molecular Approach*. Third Edition. 2003: 260-262.
61. Moss TJ, Wallrath LL. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. *Mutat Res*. 2007 May 1; 618(1-2): 163-74.
62. Lund AH, Van Lohuizen M. Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Jun; 16(3): 239-46.
63. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1148-1159.
64. Moribe T, Iizuka N, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Hamamoto Y, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Methylation of multiple genes as molecular markers for diagnosis of a small, well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2009 Jul 15; 125(2): 388-97.
65. Datta J, Kutay H, Nasser MW, Nuovo GJ, Wang B, Majumder S, Liu CG, Volinia S, Croce CM, Schmittgen TD, Ghoshal K, Jacob ST. Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res*. 2008 Jul 1; 68(13): 5049-58.
66. Lu B, Ma Y, Wu G, Tong X, Guo H, Liang A, Cong W, Liu C, Wang H, Wu M, Zhao J, Guo Y. Methylation of Tip30 promoter is associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008 Nov 15;14(22):7405-12.
67. Munshi A., Shafi G., Aliya N., Jyothy A. 2009. Histone modifications dictate specific biological readouts. *J.Genet. Genomics*. 36: 75-88
68. Allis David C., Jenuwein Thomas, Reinberg Danny. *Epigenetics*. First Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York. 2007; 191-204.
69. [http://docs.abcam.com/pdf/chromatin/regulation\\_histone\\_mods08.pdf](http://docs.abcam.com/pdf/chromatin/regulation_histone_mods08.pdf)
70. Macdonald N, Welburn JP, Noble ME, Nguyen A, Yaffe MB, Clynes D, Moggs JG, Orphanides G, Thomson S, Edmunds JW, Clayton AL, Endicott JA, Mahadevan LC. Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol Cell*. 2005 Oct 28; 20(2): 199-211.
71. Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science*. 293(5532): 1074-1080.

- 72.** Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 2001 Sep 15; 15(18): 2343-60.
- 73.** Gieni R.S., Hendzel M.J. 2009. Polycomb group protein gene silencing, non coding RNA, stem cells and cancer. *Biochem. Cell. Biol.* 87: 711-746
- 74.** Branscombe TL, Frankel A, Lee JH, Cook JR, Yang Z, Pestka S, Clarke S. PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. *J Biol Chem.* 2001 Aug 31;276(35):32971-6.
- 75.** Pal S, Yun R, Datta A, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Kumar J, Tempst P, Sif S. mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov; 23(21): 7475-87.
- 76.** Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell.* 2004 Sep 3;118(5):545-53.
- 77.** Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000; 403:41-5
- 78.** Peterson C.L., Laniel M.A. Histones and Histone Modifications. *Current Biology* Vol 14 N0 14, R546-R551.
- 79.** Somech R, Izraeli S, J Simon A. Histone deacetylase inhibitors--a new tool to treat cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004 Aug; 30(5): 461-72.
- 80.** Breiling, A., Sessa, L., and Orlando, V. 2007. Biology of polycomb and trithorax group proteins. *Int. Rev. Cytol.* 258: 83-136.
- 81.** Pietersen AM, Horlings HM, Hauptmann M, Langerød A, Ajouaou A, Cornelissen-Steijger P, Wessels LF, Jonkers J, van de Vijver MJ, van Lohuizen M. EZH2 and BMI1 inversely correlate with prognosis and TP53 mutation in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008; 10(6): R109
- 82.** Grimaud, C., Ne` gre, N., and Cavalli, G. 2006. From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Res.* 14(4): 363–375.

- 83.** Balch C, Nephew K.P, Huang TH, and Bapat SA. 2007. Epigenetic ‘‘bivalently marked’’ process of cancer stem cell-driven tumorigenesis. *Bioessays*, **29**(9): 842–845.
- 84.** Glinsky, G.V. 2008. ‘‘Stemness’’ genomics law governs clinical behavior of human cancer: implications for decision making in disease management. *J. Clin. Oncol.* **26**(17): 2846–2853.
- 85.** Valk-Lingbeek, M.E Bruggeman, S.W and van Lohuizen, M. 2004. Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell*, **118**(4): 409–418.
- 86.** Esteller, M. 2007. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum. Mol. Genet.* **16**(Spec No 1): R50–R59.
- 87.** Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 2004; 15:57–67.
- 88.** Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. 2008 *Mutat Res.* 1; 647(1-2): 21-9.
- 89.** Bunker CA, Kingston RE. Transcriptional repression by *Drosophila* and mammalian polycomb group proteins in transfected mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1994;14:1721–32.
- 90.** Muller J, Hart CM, Francis NJ, et al. Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* polycomb group repressor complex. *Cell* 2002;111:197–208.
- 91.** Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J. 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, **125**(2): 315–326.
- 92.** Wang L, Brown JL, Cao R, Zhang Y, Kassis JA, and Jones RS. 2004. Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol. Cell*, **14**(5): 637–646.
- 93.** Shechter D, Dormann HL, Allis CD, Hake SB. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc.* 2007; 2(6): 1445-57
- 94.** Visser HP, Gunster MJ, Kluin-Nelemans HC, Manders EM. The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2001 Mar;112(4):950-8.

- 95.** Kao KR, Elinson RP. The legacy of lithium effects on development. *Biol Cell* 1998; 90:585
- 96.** Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:8455–9.
- 97.** Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* 1996; 6:1664–8.
- 98.** Barker N, Clevers H. Catenins, Wnt signaling and cancer. *Bioessays* 2000; 22:961–5.
- 99.** McColl G, Killilea DW, Hubbard AE, Vantipalli MC, Melov S, Lithgow GJ. Pharmacogenetic analysis of lithium-induced delayed aging in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 2008 Jan 4; 283(1): 350-7.
- 100.** Fujii S, Ochiai A. Enhancer of zeste homolog 2 downregulates E-cadherin by mediating histone H3 methylation in gastric cancer cells. *Cancer Sci*. 2008 Apr; 99(4):738-46
- 101.** Valls E, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas. Role of histone modifications in marking and activating genes through mitosis. *J Biol Chem* 2005; 280: 42592-42600.
- 102.** McManus KJ, Biron VL, Heit R, Underhill DA, Hendzel MJ. Dynamic changes in histone H3 lysine 9 methylations: identification of a mitosis-specific function for dynamic methylation in chromosome congression and segregation. *J Biol Chem* 2006; 281: 8888-8897.
- 103.** Planas-Silva MD, Weinberg RA. The restriction point and control of cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 9: 768-772.
- 104.** Ait-Si-Ali S, Guasconi V, Fritsch L, Yahi H. A Suv39h-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *EMBO J* 2004; 23: 605-615.
- 105.** Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, Depinho RA. The oncogene and polycomb group gene *bmi1* regulates cell proliferation and senescence through the *Ink4a* locus. *Nature* 1999; 397: 164-168.
- 106.** Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* (2003); 22: 5323-5335.
- 107.** Kotake Y, Cao R, Viatour P, Sage J. pRB family proteins are required for H3K27

trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene. *Genes Dev* 2007; 21: 49-54.

**108.** Cha TL, Zhou BP, Xia W, Wu Y, Yang CC, Chen CT, Ping B, Otte AP, Hung MC. Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3. *Science*. 2005 Oct 14; 310(5746): 306-10.