

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLASH (FLICE-ASSOCIATED HUGE PROTEIN)’IN
KARACİĞER KANSERİNDEKİ GEN VE PROTEİN
İFADELERİNİN İNCELENMESİ

GÖRKEM ODABAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2014

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLASH (FLICE-ASSOCIATED HUGE
PROTEIN)’IN KARACİĞER
KANSERİNDEKİ GEN VE PROTEİN
İFADELERİNİN İNCELENMESİ**

GÖRKEM ODABAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2014



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23.06.2014 tarih ve 2014/37 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 17/07/2014 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Görkem Odabaş'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Doç. Dr. Ayten Kandilci

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Tunahan ÇAKIR

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Karaciğer kanseri, ölüme sebebiyet veren kanserler sıralamasında erkeklerde 2. kadınlarda ise 6. sırada olup öne çıkan en yaygın tipi Hepatoselüler Karsinom (HCC)'dur. HCC oluşumunu tetikleyen etmenlerin başında viral hepatitler, aflatoksin zehirlenmeleri ve aşırı alkol tüketimi gelmektedir.

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi HCC tanısının ölümcül aşamalara gelmeden konulabilmesi için tümör oluşumunda rol alan gen ve proteinlerin seviyelerindeki değişimin anlaşılması gerekmektedir. Bu sebeple genotipik ve fenotipik açıdan farklı özellikler sergileyen dokuz HCC hücre hattı ile çalışılmıştır. Bu hücre hatlarında, hem pro – apoptotik hem de hücre döngüsünü ve canlılığını destekleyici rolleri bulunan FLASH/CASP8AP2 ifadenmesi, RT-qPCR, immünfloresan ve immünhistokimya yöntemleriyle incelenmiştir. İmmünhistokimya analizleri için çoklu doku makrodizinleri kullanılmıştır.

CASP8AP2 geni tüm hücre hatlarında ifadenmekte olup bu hücreler arasında göze çarpan bir değişim gözlenmemiştir. Gen ifade düzeyleri, immünofloresanda elde edilen protein ifadenmeleri ile kıyaslandığında sonuçların tutarlı olduğu saptanmıştır. Hem sağlıklı hem de çeşitli kanser dokularında yapılan immünhistokimya analizleri sonucunda sadece sağlıklı mide dokularında FLASH protein ifadenmesine rastlanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer Kanseri, Hepatoselüler Karsinom (HCC), FLASH/CASP8AP2, Apoptoz, Histon Pre – mRNA Olgunlaşması.

SUMMARY

Liver cancer is the second leading cause of cancer deaths in men and the sixth leading cause of cancer deaths in women. Hepatocellular Carcinoma (HCC) is the most common type among the liver cancers. Viral hepatitis, aflatoxin intoxication and excessive alcohol consumption are the leading factors triggering HCC development.

As in the case for other cancer types, genes and proteins involved in tumor progression must be thoroughly investigated in order for HCC to be diagnosed before the disease reaches end-stage fatal status. For this purpose, nine different HCC cell lines exhibiting distinct genotypic and phenotypic traits are used in this study. FLASH protein encoded by *CASP8AP2* gene was shown to play roles in apoptosis, cell cycle and cellular proliferation. Thus, its expression is investigated in HCC cell lines and tissues by RT-qPCR, immunofluorescence and immunohistochemistry. Immunohistochemical analyses were performed in multiple tumor tissue arrays as well.

Although there has been *CASP8AP2* expression in all HCC cell lines, we didn't observed marked changes in expression levels. Gene expression levels were in accordance with the protein levels obtained by immunofluorescence microscopy. According to the immunohistochemistry studies performed on both various normal and cancer tissues, FLASH protein expression was only detected in healthy stomach tissue samples.

Key Words: Liver Cancer, Hepatocellular Carcinoma (HCC), FLASH/*CASP8AP2*, Apoptosis, Histone Pre – mRNA maturation.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan ve tezin her anında ilgisi ve bilgisiyle yardımcı olan tez danışmanım Prof. Dr. Tamer Yağcı'ya ve verdiği katkı ve yardımlar için Anadolu Sağlık Merkezi Patoloji Birim sorumlusu Prof. Dr. Hüseyin Baloğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansım boyunca her anlamda yanımda olan tüm arkadaşlarıma ve emeği geçen tüm öğretmenlerime ayrıca teşekkür ederim. Bugünlere gelmemi sağlayan ailem ise en büyük teşekkürü hak ediyor.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. KARACİĞER KANSERİ	3
2.1. Karaciğer Histolojisi	3
2.2. Karaciğer Kanserine Genel Bakış	3
2.3. Hepatoselüler Karsinom (HCC)	4
2.3.1 HCC’da Patogenez ve Karsinogenez	5
2.3.1.1. Viral Hepatit Kaynaklı Karaciğer Kanserinin Moleküler Patogenezi	5
2.3.1.1.1. Hepatit B Virüsü (HBV)	5
2.3.1.1.2. Hepatit C Virüsü (HCV)	6
2.3.1.2. Kalıtsal Metabolik Hastalıklar	6
2.3.2. HCC’da Genomik ve Proteomik Değişimler	7
2.3.2.1. Preneoplastik Fazdaki Genomik Değişimler	7
2.3.2.2. HCC’deki Genomik Değişimler	7
2.3.2.3. HCC Oluşumunda Anlatımları Değişen Diğer Genler	8
2.3.2.3.1. p53	8
2.3.2.3.2. Hücre Döngüsü	8
2.3.2.3.3. Apoptoz	8
2.3.2.3.4. WNT Sinyal Yolağı (APC/AXIN/β-Katenin/TCF)	8
2.3.2.3.5. Heterozigotluğun Kaybı (LOH)	9

3. FLASH (FLICE – ASSOCIATED HUGE PROTEIN) ve LİTERATÜRDEKİ YERİ	10
3.1. FLASH'ın Proapoptotik Özellikleri	10
3.2. FLASH'ın Transkripsiyonel Roller	11
3.3. FLASH'ın Nükleer Cisimcikler ile İlişkileri ve Hücre Döngüsündeki Rolü	13
3.3.1. PML Cisimcikleri ve Apoptoz	13
3.3.2. FLASH'ın Cajal Cisimcikleri, Histon Lokus Cisimcikleri ve Histon Pre – mRNA'larının Olgunlaşma Süreçlerindeki Rolü	14
3.4. Kanser ve FLASH	16
3.5. Hipoksia'da FLASH ve miRNA Kontrolü	18
4. GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
4.1. Gereçler	19
4.1.1. Kullanılan Kimyasallar	19
4.1.2. Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri	19
4.1.3. Kullanılan Kitler	19
4.1.4. Kullanılan Hücre Hatları	20
4.1.5. Kullanılan Çözeltiler	20
4.1.6. Kullanılan Antikorlar DNA Belirteçleri ve Yükleme Tamponları	22
4.1.7. İnsan Karaciğer Total RNA ve Oligonükleotidler	22
4.1.8. Kullanılan Cihazlar	22
4.2. Yöntemler	23
4.2.1. Hücre Çözme İşlemi	23
4.2.2. Hücre Kültürü ve Büyütülme Şartları	23
4.2.3. Hücre Dondurma İşlemi	23
4.2.4. Kültüre Edilen Hücrelerden RNA İzolasyonu	24
4.2.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi	24
4.2.4.1.1 DNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi	24
4.2.4.1.2. RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi	24
4.2.5. cDNA Sentezi	25
4.2.6. RT-qPCR ile Gen İfadesi Analizi	26

4.2.7. İmmünohistokimya ile HCC Doku Makrodizininde Protein İfadesi Analizi	28
4.2.8. İmmünofloresan	33
4.2.9. Oksidatif Stres İndüksiyonu	33
4.2.10. İstatistiksel Analizler	33
5. BULGULAR	34
5.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	34
5.2. RT – qPCR ile Gen İfadesi Analizi	34
5.2.1. HCC Hücre Hatları ve Normal İnsan Karaciğer Total RNA Ekstraktında CASP8AP2 İfadesinin Analizi	34
5.3. Anti – FLASH Antikoru ile İmmünofloresan	37
5.3.1. Hela ve HCC Hücre Hatlarının Anti – FLASH Antikoru ile Boyanması	37
5.3.2. Oksidatif Strese Maruz Bırakılmış Huh7 Hücre Hattında FLASH Proteininin İmmünofloresan Boyanması	42
5.4. Parafin Doku Makrodizininde İmmünohistokimya Boyamaları	44
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	46
7. ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	55
EKLER	56

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
~	: Yaklaşık
AF-1	: Activation Function – 1
AFB	: Aflatoksin B1
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
ARS2	: Arsenite Resistance Protein 2
CASP8AP2	: Caspase – 8 Associated Huge Protein
CB	: Cajal Cisimciği
c – Myc	: Hücresel Myc Proteinini
CpG	: CG Adacıkları
Da	: Dalton
DAXX	: Death Associated Protein
DCP	: Downstream Cleavage Product
DED	: Death Effector Domain
DFD	: Drophosila Deformed
DISC	: Death Inducing Signalling Complex
Dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco Modifiye Besiyeri
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNMTs	: DNA Metil Transferazlar
DRD	: DED Recruiting Domain
EDTA	: N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
Erk	: Extracellular Signal-Regulated Kinase
FADD	: Fas Associated Ded Domain
FAF – 1	: Fas-Associated Factor – 1
FARB	: FLASH – ARS2 Bağlanma Bölgesi
FBS	: Fötal Dana Serumu
FLASH	: Flice Associated Huge Protein
FLICE	: FADD – Like Interleukin 1- β Converting Enzyme

GAPDH	: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
GR	: Glukokortikoid Reseptörü
GRIP1	: Glutamate Receptor-Interacting Protein 1
HBV	: Hepatit B Virüs
HCC	: Hepatoselüler Karsinoma
HCV	: Hepatit C Virüs
HLB	: Histon Lokus Cisimciği
IGF – 2	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü – 2
I κ B	: Inhibitor of κ B
IKK α	: I κ B Kinaz Kompleksi α Altbirimi
L	: Litre
LOH	: Loss of Heterozygosity (Heterozigotluğun Kaybı)
M	: Molar
μ L	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MDB	: Membran Desalting Buffer
miR-	: Mikrorna
miRNA	: Mikrorna
MR	: Mineralokortikoid Reseptörü
MRD	: Minimal Residual Disease
MSC	: Mezenkimal Kök Hücre
NAD	: NF- κ B-Activating Domain
NIK	: NF- κ B Inducing Kinase
nM	: Nanomolar
NaCl	: Sodyum Klorür
NF– κ B	: Nükleer Faktör – κ B
NPAT	: Nükleer Protein Ataxia-Telangiectasia
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PML	: Promyelocytic Leukemia
PML – NB	: PML – Nükleer Cisimciği

p53	: Protein 53
PFA	: Paraformaldehit
RT-qPCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ras	: Rous Sarcoma Proteini
Rb	: Retinoblastoma Proteini
RPM	: Dakika Başına Dönüş
snRNP	: Küçük Nükleer Ribonükleoproteinler
SRC1	: Stereoid – Receptor Coactivator 1
TAE	: Tris – Asetikasit – EDTA
TGF- α	: Transforme-Edici Büyüme Faktörü Alfa
TGF- β	: Transforme-Edici Büyüme Faktörü Beta
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor Alfa
TRAF2	: TNF Associated Factor 2
TRAM1	: Thyroid Hormone Receptor Activator Molecule 1
Tris	: Tris (Hidroksimetil) Aminometan
T – ALL	: T – Hücre Akut Lenfoblastik Lösemi
T – LBL	: T – Hücre Lenfoblastik Lenfoma
UV – C	: Ultraviole – C

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Kronik hepatitin HCC'nin patojenezindeki önerilen rolü.	6
3.1: TNF- α indüklü NF- κ B ve Apoptoz yolağı.	11
3.2: FLASH'ın, GR indüklü transaktivasyondaki antagonist etkisi.	12
3.3: FLASH'ın A) apoptotik olan ve B) apoptotik olmayan işlevleri.	14
3.4 Histon pre-mRNA'sının 3' uç olgunlaşmasında görevli faktör ve diziler.	16
5.1: Sağlıklı insan karaciğerine göre kalibre edilmiş <i>CASP8AP2</i> ifadeleri.	35
5.2: HCC hücre hatlarındaki geometrik ortalama göre kalibre edilmiş <i>CASP8AP2</i> gen ifadeleri.	35
5.3: HeLa hücre hattında a) İzotip antikoru, b) anti – FLASH antikoru kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri.	37
5.4: Snu 182 hücre hattında a) İzotip antikoru, b) anti – FLASH antikoru kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri.	38
5.5.: Snu 398 hücre hattında a) İzotip antikoru, b) anti – FLASH antikoru kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri.	38
5.6: Snu 423 hücre hattında a) İzotip antikoru, b) anti – FLASH antikoru kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri.	39
5.7 Snu 475 hücre hattında a) İzotip antikoru, b) anti – FLASH antikoru kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri.	39
5.8: HepG2 hücre hattında a) İzotip antikoru, b) anti – FLASH antikoru kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri.	40
5.9: Hep3B hücre hattında a) İzotip antikoru, b) anti – FLASH antikoru kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri.	40
5.10: Sk-Hep1 hücre hattında a) İzotip antikoru, b) anti – FLASH antikoru kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri.	41
5.11.: PLC hücre hattında a) İzotip antikoru, b) anti – FLASH antikoru kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri.	41
5.12: HuH7 hücre hattında a) İzotip antikoru, b) anti – FLASH antikoru kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri.	42
5.13 Oksidatif stres sonucu FLASH'ın sitoplazmaya translokasyonu.	43

5.14:	Oksidatif stres sonucu FLASH'ı nükleus veya sitoplazma lokalizasyonlu gösteren hücrelerin oranı.	44
5.15:	Parafin doku makrodizinlerinde anti – FLASH antikoru kullanılarak gerçekleştirilen immünohistokimya analizi.	45

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
4.1: RNA/Primer/dNTP karışımı.	25
4.2: RT karışımı.	25
4.3: Çalışmada kullanılan ileri ve geri primerler.	26
4.4 RT-qPCR reaksiyon tablosu.	26
4.5 RT-qPCR döngü şartları.	27
4.6 Primer etkinlikleri.	27
4.7: 1. Dizinin klinikopatolojik karakteristikleri.	29
4.8: 2. Dizinin klinikopatolojik karakteristikleri.	30
5.1: HCC hücre hatlarında <i>CASP8AP2</i> ifadelerinin iki farklı kalibratör arasındaki Pearson Korelasyon analizi.	36

1. GİRİŞ

Karaciğer kanseri, dünya çapında erkeklerde en sık teşhis konulan 5. kanser türü olup kanser ölümlerinde ise 2. sıradadır. Kadınlarda ise en sık teşhis konulan kanser tiplerinde 7. sırada iken ölüme sebebiyet veren kanserler arasında 6. sıradadır [Jemal et al., 2011].

Primer karaciğer kanserleri arasında, hepatoselüler karsinom (HCC) histolojik açıdan öne çıkan en önemli alt tür olup, dünya çapında toplam karaciğer kanseri vakalarının %70 – 85’ini kapsamaktadır [Jemal et al., 2011].

Karaciğer kanserinin en önde gelen sebepleri arasında viral hepatitler, aflatoksin zehirlenmeleri ve aşırı alkol tüketimi gelmektedir [Jemal et al., 2011], [Wang et al., 2002].

Hepatoselüler karsinoma oluşumunun hem öncesinde hem de oluşum sürecinde pek çok sinyal ileti yolağında ve gen ifadesinde değişimler gözlenmektedir. Bu değişimlerden bazıları, özellikle viral hepatitler nedeniyle oluşan p53 proteinindeki anomaliler, hücre döngüsünü kontrol eden genlerin ifadelerindeki ve WNT sinyal ileti yolağındaki değişimlerdir [Nita et al. 2002], [Cha and DeMatteo, 2005].

Kanser araştırmalarında pek çok hücre hattı kullanılmakta olup bu hücre hatlarında, pek çok özelliğin yanı sıra farklılaşma oranları ve metastaz özellikleri de değişiklik gösterebilmektedir.

CASP8AP2 geni tarafından üretilen FLASH, pro-apoptotik bir protein olarak keşfedilmesine rağmen [Imai et al., 1999] hücre proliferasyonunu destekler biçimdeki diğer özelliklere de sahip bir proteindir [Choi et al., 2001], [Barcaroli et al., 2006a], [Yang et al., 2009].

Bu çalışmada, farklılaşma düzeyleri, metastaz özellikleri ve diğer bazı özellikleri (p53 gen ifadesi gibi) farklılık gösteren dokuz HCC hücre hattı kullanılmış ve bu hücre hatlarında FLASH/*CASP8AP2* ifadelенmesi hem protein hem de gen düzeyinde *in vitro* incelenmiştir. *In vivo* çalışmalar için ise pek çok farklı tipteki normal ve kanserli doku örneklerini içinde barındıran parafin doku dizinlerinde immünohistokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Hem hücre ölüm yolağında hem de hücrelerin bölünüp çoğalmaları için gerekli süreçlerde rol alabilen FLASH/CASP8AP2 geninin, bu süreçlerdeki anomaliler sonucu kanserleşmiş hücrelerdeki ifadesi merak konusudur.

Apoptotik özelliklerinin yanı sıra, NF- κ B aktivasyonu, hücre döngüsü regülasyonu, steroid hormon reseptör transaktivasyonunun modülasyonu gibi farklı görevleri bulunan FLASH'ın, kanserli hücrelerde de farklı ifadeleri gösterilmiştir. İlk bulunduğu sitoplazmik bir protein olarak gösterilse de, sonraki çalışmalarda FLASH'ın özellikle CB (Cajal Cisimcikleri), PML-NB (Promyelocytic Leukemia – Nükleer Cisimsikleri) ve HLB (Histon Locus Cisimcik)'lerde de lokalize olduğu anlaşılmıştır. Prof. Dr. Tamer Yağcı tarafından Bilkent Üniversitesinde geliştirilen 1A4 hibridoma klonu anti-FLASH monoklonal antikorunu üretmektedir. Bu çalışmada, FLASH'ın HCC hücre hatlarındaki ifadesinin hem gen hem de protein seviyesinde incelenmesi amaçlanmış ve protein ifadesinin düzeyi ve yerleşimi 1A4 monoklonal antikor ile saptanmıştır. Antikorum *in vivo* değerlendirilmesi HCC ve çoklu tümör doku dizinlerinde gerçekleştirilmiştir.

2. KARACİĞER KANSERİ

2.1. Karaciğer Histolojisi

Hepatositler 6 veya daha fazla yüzeyli, polihedral ve yaklaşık 20-30 mikron çaplı hücrelerdir. Genellikle bir veya bazen iki nukleuslu olup, soluk pembe sitoplazma boyanması gösterirler. Hepatositlerin sitoplâzmalarında ince kahverengi granüller halinde lipofüssin pigmenti ve seyrek olarak da yağ vakuolleri bulunabilmektedir.

Histolojik açıdan bakıldığında ise karaciğer, hepatosit kordonlarının meydana getirmiş oldukları lobüllerden oluşmaktadır. Karaciğer lobülleri yapısal anlamda 0,7 x 2 mm. boyutlarında, poligonal, prizmatik bir karaciğer kitlesi olarak tarif edilebilir.

Komşu hepatositler arasından, duvarı iki hepatositin plazma membranlarından oluşan safra kanalikülleri geçmektedir. Bu kanaliküller, safranın taşındığı ilk yapılardır.

Hepatositlerde, organizmanın yaşlanmasına bağlı olarak artan lipofüssin miktarı ve büyümüş nukleuslar belirgin özelliklerdendir [Aksoy, 1977].

2.2. Karaciğer Kanserine Genel Bakış

Karaciğerde görülen malignant (kötü huylu) tümörler, temelde adenokarsinomalar (metastaz özelliği olmayan) olup, en önemli iki türü hepatoselüler karsinoma ve kolanjiokarsinomadır.

Karaciğer kanserlerinin histolojik açıdan sınıflandırılması ise şu şekildedir:

- Hepatoselüler Karsinom (karaciğer hücre karsinomu)
- Hepatoselüler Karsinom – Fibrolamellar tipi (Kadınlarda daha yaygındır)
- Kolanjiokarsinom (İntra ve ekstrahepatik safra kanalı karsinomu)
- Karışık Tipli Hepatoselüler Kolanjiokarsinom
- Farklılaşmanın Görülmediği Diğer Tipler

Yine bu sınıflandırma içinde yer alan fakat erişkinlerde pek rastlanılmayan diğer bir tip ise hepatoblastomdur [Web 1, 2012].

2.3. Hepatoselüler Karsinom (HCC)

Karaciğer kanseri, dünya çapında erkeklerde en sık teşhis konulan 5. kanser türü olup kanser ölümlerinde ise 2. sıradadır. Kadınlarda ise en sık teşhis konulan kanser tiplerinde 7. sırada iken ölüme sebebiyet veren kanserler arasında 6. sıradadır.

2008'de dünya çapında yaklaşık 748.300 yeni karaciğer kanseri vakası ve 695.900 ölümü gerçekleşmiştir. Bu vaka ve ölümlerin yarısının ise Çin'de olduğu saptanmıştır.

Primer karaciğer kanserleri arasında, hepatoselüler karsinom (HCC) histolojik açıdan öne çıkan en önemli alt tür olup, dünya çapında toplam karaciğer kanseri vakalarının %70 – 85'ini kapsamaktadır.

Gelişmiş ülkelerde, toplam karaciğer kanseri nedenlerinin %23'ünü HBV (Hepatit B Virüsü) enfeksiyonu oluştururken, %20'sini ise HCV enfeksiyonu oluşturmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde ise, HBV enfeksiyonu toplam karaciğer kanseri vakalarının % 60'ını, HCV (Hepatit C Virüs) enfeksiyonu da % 33'ünü teşkil etmektedir. Ayrıca, kronik HBV enfeksiyonu ile aflatoksin B1 (AFB) arasındaki etkileşimin de karaciğer kanserini arttırdığı gözlenmiştir.

Amerika'da ve diğer pek çok düşük-risk seviyesindeki Batı ülkelerinde, alkole bağımlı sirozun ve muhtemelen obeziteyle ilişkili alkolden bağımsız karaciğer yağlanması, karaciğer kanserinin en temel nedenleri olduğu düşünülmektedir.

Obezite salgını ve enjeksiyonlu ilaç kullanıcıları arasındaki devam eden bulaşma nedeniyle artan HCV enfeksiyonlarından dolayı karaciğer kanserinin görülme sıklığı Amerika ve Orta Avrupa da dahil olmak üzere dünyanın pek çok yerinde gittikçe artmaktadır [Jemal et al., 2011].

2.3.1. HCC’da Patogenez ve Karsinogenez

2.3.1.1. Viral Hepatit Kaynaklı Karaciğer Kanserin Moleküler Patogenezi

2.3.1.1.1. Hepatit B Virüsü (HBV)

HBV, dairesel genomik DNA’ya sahiptir ve karaciğerde nekrozla seyreden akut ve kronik yangılar oluşturabilmektedir.

HBV’nin transaktif edici proteininin bileşenlerinden olan HBx’in p53’e *in vivo* ve *in vitro* bağlandığı gösterilmiştir. HBx, p53’ün indüklediği apoptozu inaktif etmekte ve hem p53’e bağımlı hem de bağımsız durumlardaki nükleotid eksizyon tamirini inhibe etmektedir [Wang et al., 2002].

Onkogenik HBx nedeniyle hücresel genlerin deregülasyonlarının, karaciğerdeki kanserleşme sürecinde hepatosit proliferasyonunu destekleyen öncül bir adım olduğu ileri sürülmüştür [Wang et al., 2002].

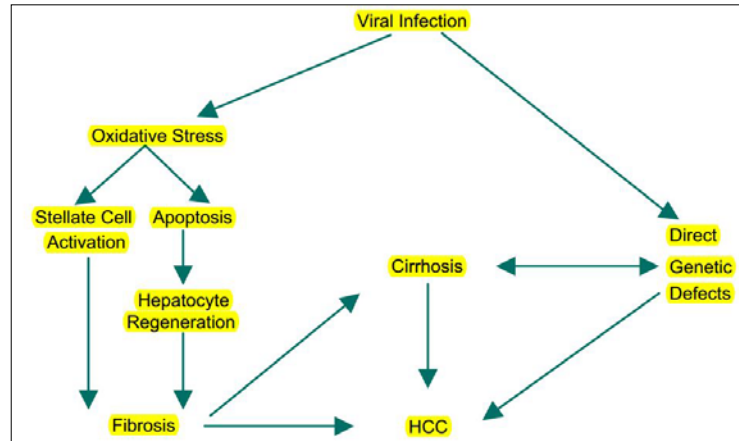
HBV kaynaklı HCC’nın farklı mekanizmalar sonucunda tetiklenebileceği düşünülmektedir. (I) Konak genomuna viral entegrasyonun sonucunda hücre döngüsü genlerindeki değişimler gerçekleşebilir; (II) kronik hepatit veya hepatik siroz hücre döngüsü genlerini somatik mutasyonlar ve/veya epigenetik değişikliklerle etkileyip hipermutajenik bir durum oluşturabilir; (III) kronik karaciğer yangısı mutasyona yatkın bir çevre oluşturabilir; (IV) Viral transaktif edici protein olan HBV X, konak genoma entegre olduktan sonra, p53 ve p21Waf1’in de aralarında bulunduğu hücre döngüsünde görevli genlerin deregülasyonuna neden olabilir [Nita et al., 2002].

HBV enfeksiyonu HCC geliştirme riskini 100 kat arttırmaktadır. X proteini, HCC hücre hatlarındaki EGFR anlatımını arttırmakta ve TGF- α ’yı da uyarmaktadır [Cha and DeMatteo, 2005].

2.3.1.1.2. Hepatit C Virüsü (HCV)

HCV, bir RNA virüsüdür ve kronik hepatit, siroz ve HCC'nin temel ajanı olarak görülmektedir. HCV'nin kor ve NS4B proteinlerinin, özellikle HCC oluşumuyla ilgili yangısal sitokinlerin üretimine ve hücresel proliferasyona katkı sağladıkları gösterilmiştir [Nita et al., 2002].

HBV ile karşılaştırıldığında, HCV, karaciğerde daha fazla yangıya ve daha sık siroz görülmesine neden olmaktadır. Sirozlu hastalar karşılaştırıldığında, HBV'lü hastaların HCC geliştirme oranları %27 iken, HCV'lü hastaların %75 dir. Kronik HCV hepatitli hastalardaki HCC nin moleküler patogenezi çok iyi bilinmese de, *in vitro* olarak ras ve diğer pek çok onkogenin promotor bölgesinin etkilendiği ve ayrıca p53 transkripsiyonunun engellendiği bildirilmiştir [Cha and DeMatteo, 2005].



Şekil 2.1: Kronik hepatitin HCC'nin patojenezindeki önerilen rolü.

2.3.1.2. Kalıtsal Metabolik Hastalıklar

HCC, hemochromatosis (hemokromatoz – aşırı demir depolanması), Wilson hastalığı (aşırı bakır depolanması), porphyria (porfiri – hem biyosentezinde görevli enzimlerden birinin aktivitesinde azalma) ve α -antitripsin eksikliği gibi belirli genetik hastalıklarda daha sık görülmektedir [Wang et al., 2002].

Hemokromatozlu hastaların yaklaşık %40 ile 60'ı HCC geliştirmektedir. Yine başka bir otozomal çekinik bir hastalık olan tirozinemide de HCC geliştirme ihtimali %40 civarındır [Cha and DeMatteo, 2005].

2.3.2. HCC’da Genomik ve Proteomik Değişimler

2.3.2.1. Preneoplastik Fazdaki Genomik Değişimler

Transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α) ve insülin – benzeri büyüme faktörü - 2 (IGF-2)’nin artan ifadeleri, hepatositlerin aşırı proliferasyon olmalarını sağlamaktadır. Bu artışın temel sebebi, karsinogenlerden dolayı zarar görmüş dokulara sızan kronik yangı hücrelerince üretilen sitokinler, viral transaktivasyon ve karaciğerin hücre kaybına karşı verdiği yenileyici yanıtlardır.

Kronik hepatit ve sirozdan muzdarip karaciğerlerin bir kısmında da DNA metiltransferazların (DNMTs) anlatımlarında artış görülmüştür.

2.3.2.2. HCC’daki Genomik Değişimler

Kronik hepatit veya sirozdan muzdarip olan karaciğerlerin sadece çok az bir kısmı sonuçta HCC oluşturmakta ve genlerde ilk olarak görülen erken epigenetik ve yapısal değişimler tek başlarına malignan fenotipteki hepatosit oluşumunda yetersiz kalmaktadırlar.

Örneğin başlangıçta c-myc geninin aşırı anlatımı promotör hipometilasyonu ile eş güdümlü ilerlese de, sonrasında gen amplifikasyonu da bu duruma katkıda bulunmaktadır. Yine, CDKN2A (diğer ismiyle p16INK4A)’nın azalan ekspresyonunun temel sebebi promotör hipermetilasyonu ile ilişkilendirilse de, heterozigotluğun kaybı (LOH: Loss of Heterozygosity), biallelik kayıp ve mutasyonlar da bu genin kaybında iş görmektedir.

Hepatokarsinogenezin oluşumunda, hepatositlerin proliferasyonlarındaki hızlanma tüm preneoplastik durumlarda gözlenebilse de, preneoplastik lezyonlardaki genomik değişimlerin rastgele olduğu ve HCC hücrelerinin farklı yolları izleyebildiği düşünülmektedir. Bu sebeple HCC’de “heterogeneity”den (genomik değişimlerin çeşitliliği) bahsedilmektedir [Thorgeirsson and Grisham, 2002].

2.3.2.3. HCC Oluşumunda Anlatımları Değişen Diğer Genler

2.3.2.3.1. p53

Karaciğer kanserinde özellikle *Aspergillus flavus* ve türevleri tarafından üretilen aflatoksinlerle yakından ilişkilendirilmektedir. Aflatoksine çok fazla maruz kalan Çin, Senegal, ve diğer Afrika ülkelerindeki HCC hastalarının %20-75'i p53 geninde spesifik bir mutasyonuna sahiptir [Nita et al., 2002], [Cha and DeMatteo, 2005].

2.3.2.3.2. Hücre Döngüsü

Siklin D1 ve p16INK4 gen ifadesindeki değişimler HCC'ların %34 ünde görülür. HCC'ların neredeyse %40'ında p21Waf1/cip1 geni düşük mRNA seviyesi göstermektedir. Rb geninin bulunduğu bölgenin, HCC hastalarının %30'unda sıklıkla kaybolduğu gözlenmiştir [Nita et al., 2002], [Cha and DeMatteo, 2005].

2.3.2.3.3. Apoptoz

Hepatositlerde apoptoz miktarındaki azalma, normal durumda ölmesi gereken hücrelerin sağkalımlarına ve böylelikle moleküler anomaliler içeren hücrelerin klonal artışa girmesine ve neoplastik değişimine sebebiyet vermektedir. Anti – apoptotik Bcl-XL geninin HCC da predominant gen olduğu gösterilmiştir. Zira Bcl-XL geni azalan hepatoblastoma hücre hatlarının kemoterapi ilaçlarına hassasiyeti artmıştır [Nita et al., 2002], [Cha and DeMatteo, 2005].

2.3.2.3.4. WNT Sinyal Yolağı (APC/AXIN/ β -Katenin/TCF)

Wnt sinyal yolağı organ oluşumu ve hücre-hücre etkileşimlerinin farklı safhalarında önemli görevler üstlenmektedir. Bu yolaktaki sinyal iletiminde β – katenini stabilize eden APC, AXIN ve GSK3 β proteinleri de görev yapmaktadır. Çalışılan 100 primer karaciğer tümöründe ve HCC türevli hücre hatlarında AXIN

geninin mutasyona uğradığı görülmüştür [Nita et al., 2002], [Cha and DeMatteo, 2005].

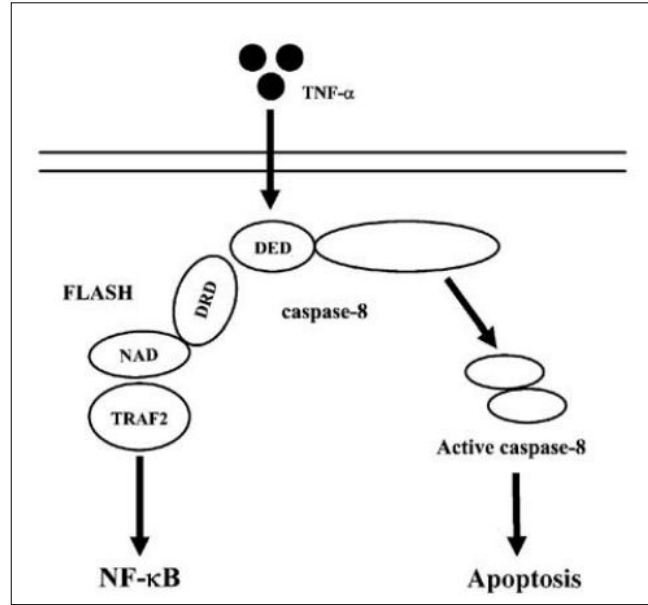
2.3.2.3.5. Heterozigotluğun Kaybı (LOH)

HCC'ların yarısında Rb'da LOH görülmüştür. Buna karşın, APC geninde LOH çok daha azdır (incelenen hastaların 29'da 5'inde). HCCda en çok görülen genetik defekt kromozom 16q'nun kaybı gibi görülmektedir. Bu bölgedeki en olası hedef 16q22 de bulunan E-kaderin genidir. Kronik hepatit veya sirozlu karaciğer dokularının %46sında ve HCC ların %67 sinde bu genin 5'CpG adalarının de novo metilasyonu gözlenmiştir [Nita et al., 2002], [Cha and DeMatteo, 2005].

3. FLASH (FLICE – ASSOCIATED HUGE PROTEIN) VE LİTERATÜRDEKİ YERİ

3.1. FLASH'ın Proapoptotik Özellikleri

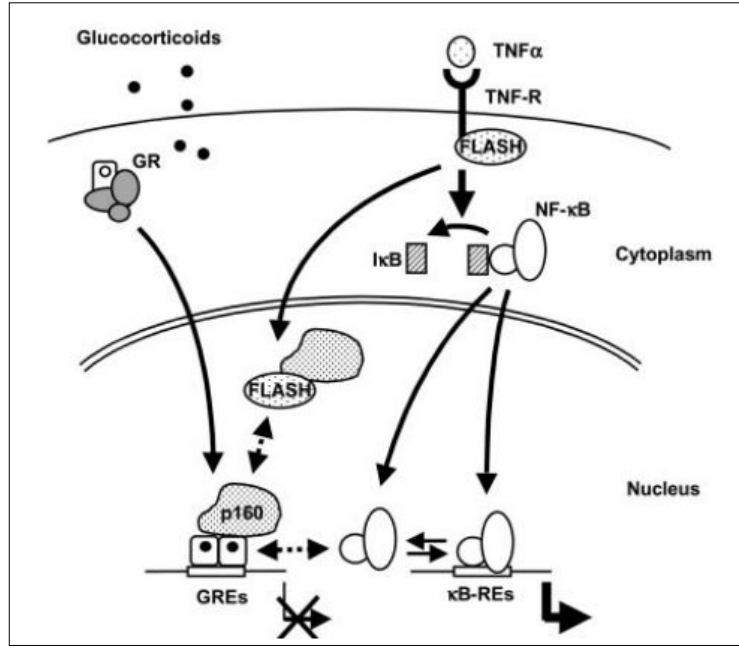
Flice (FADD-like interleukin 1- β converting enzyme) Associated Huge Protein (FLASH) ilk olarak 1999 yılında Imai ve ark. tarafından [Imai et al., 1999], fare T-hücresi kaynaklı cDNA kütüphanesinde yapılan maya-2-hibrid taraması sonucunda, Fas/FasL ekstrinsik apoptoz yolağındaki DISC (Death-inducing signalling complex)'in bir bileşeni ve apoptoz için gerekli bir protein olarak bulunmuştur. FLASH indüklü apoptozun, FADD (Fas-associated protein with death domain) ve kaspaz-8'in DED (Death-effector domain)'leri ile FLASH'ın DRD (DED-recruiting domain)'i arasındaki etkileşime bağlı olduğu ve devamında kaspaz-8 in FLASH tarafından aktive edildiği gösterilmiştir. FLASH'ın apoptozun yanı sıra ve tam aksi yönde hücre proliferasyonunu destekleyecek biçimde, NF- κ B yi aktive ettiği de gösterilmiştir [Choi et al., 2001]. Bu süreçte, TNF- α uyarımı üzerine, FLASH, NAD (NF- κ B-activating domain)'i üzerinden TRAF2 ile etkileşmekte ve devamında TRAF2-NIK-IKK α yolağı üzerinden NF- κ B aktivasyonu gerçekleşmektedir. Şekil 3.1'de gösterildiği üzere, TNF- α sinyal ileti sisteminde, hem kaspaz-8-FLASH yolağı üzerinden apoptoz, hem de TRAF2-FLASH yolağı üzerinden NF- κ B aktivasyonu sağlanabilmektedir. Bu nedenle, FLASH üzerinden kaspaz-8'in de TNF- α 'ın indüklediği NF- κ B aktivasyonunda görev alabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Bu hipotez üzerine Jun ve arkadaşları [Jun et al., 2005], kaspaz-8'in TNF- α 'nın indüklediği NF- κ B aktivasyonunu kaspaz-8/FLASH/TRAF2 üçlü kompleksi üzerinden gerçekleştirdiğini göstermişlerdir. Buna ek olarak, sadece DRD içeren ve işlevsiz olan FLASH dizisi, kaspaz – 8 ve TRAF2'i bağladığı için, TNF- α indüklü NF- κ B aktivasyonunda dominant negatif etki göstermektedir.



Şekil 3.1: TNF- α indüklü NF- κ B ve Apoptoz yolağı.

3.2. FLASH'ın Transkripsiyonel Rollerı

FLASH'ın bu sitoplazmik görevlerinin yanı sıra nükleer lokalizasyonu ve buradaki işlevleri de araştırılmıştır. Glukokortikoid reseptörlerini NF- κ B'nin baskıladığı bilinmekle beraber, NF- κ B'nin beraberinde aynı işlevi gösteren diğer partnerlerin bulunmasına yönelik yapılan bir çalışmada [Kino and Chrousos, 2003] FLASH'ın, tıpkı NF- κ B gibi, TNF- α uyarısı üzerine nükleusa göç ettiği, glukokortikoid reseptör (GR) aktivasyonu için gerekli koaktivatör alt ailelerinden p160 ile etkileşip, GR aktivasyonunu baskıladığı ve bu baskılamanın da NF- κ B'den bağımsız olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: FLASH'ın, GR indüklü transaktivasyondaki antagonist etkisi. κB – REs: κB – responsive elements (κB'nın bağlandığı DNA dizileri).

Fakat FLASH'ın p160 nükleer reseptör koaktivatörlerinden sadece TRAM1 ve GRIP1 ile etkileşebildiği ve dolayısıyla GRIP1 ve TRAM1'e bağımlı Androjen ve Progesteron Reseptör transaktivasyonunu baskılayabildiği; diğer bir p160 tip koaktivatör olan SRC1 ile etkileşmediği ve dolayısıyla SRC1'in indüklediği Estrojen Reseptör transaktivasyonunu ise baskılayamadığı sonradan aydınlatılmıştır [Kino et al., 2004]. Steroid temelli, yakından ilişkili iki nükleer reseptör olan glukokortikoid (GC) ve mineralokortikoid (MR) reseptörleri ile fare hipokampusunda benzer bir çalışma yapılmıştır [Obradović et al., 2004]. Ligand bağlanma bölgesi olarak bu iki reseptörde de bulunup, ikisi arasındaki en farklı kısım olan AF-1 (Activation function-1) domainine yönelik gerçekleştirilen maya-2-hibrid taraması sonucunda, DAXX (Death-associated protein), FAF-1(Fas-associated factor-1) ve diğer etkileşime giren proteinlerin yanı sıra FLASH da bulunmuştur. Her üç proteinin de mRNA transkriptleri rat hipokampusunda bulunmuş olup, MR ve GR transaktivasyonlarını DAXX baskılarken, FLASH arttırmış, FAF-1 ise sadece MR transaktivasyonunu desteklemiştir. Daha önceki sonuçlar da göz önüne alındığında FLASH'ın Glukokortikoid temelli transkripsiyonlar üzerindeki etkisinin hücre tipine bağımlı olabileceği öne sürülmüştür [Obradović et al., 2004].

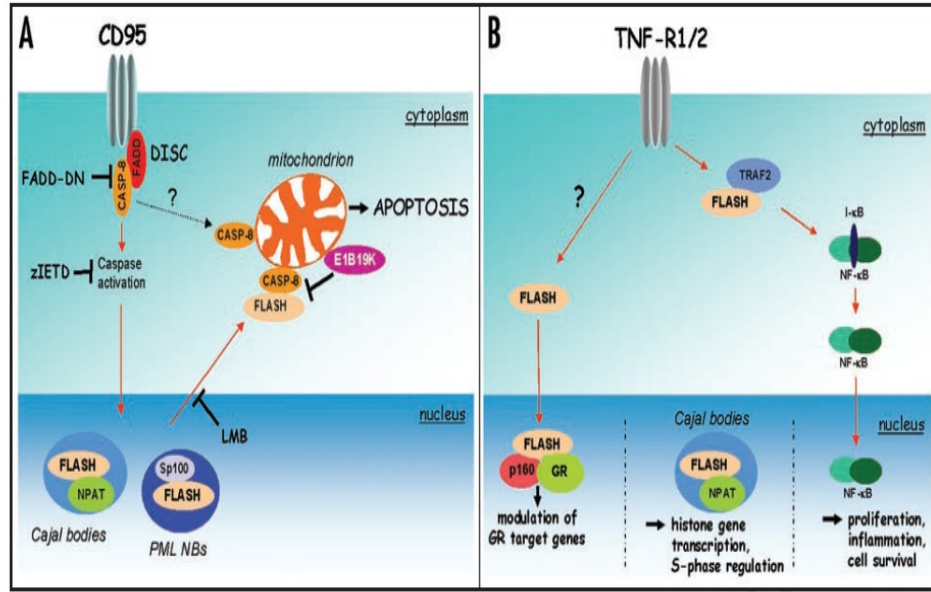
FLASH'ın yine nukleusta diğer transkripsiyon faktörleriyle olan ilişkileri de ortaya konulmuştur. *Drosophila Melanogaster* gelişiminde apoptotik etkisi olan

Drophosila Deformed (Dfd) geninin omurgalılarıdaki homoloğu olan Hoxb4 geninin downstream hedef genlerinin aydınlatılması için yapılan bir çalışmada [Morgan et al., 2004], notochordda FLASH ve Hoxb4 gen anlatımlarının benzer kalıpta olduğu, FLASH'ın Hoxb4 tarafından direk upregüle edildiği ve bu durumun protein sentezinden bağımsız olduğu gösterilmiştir. Ayrıca FLASH'ın, c-Myb transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma domaini ile etkileşerek c-Myb hedeflerinin anlatımını arttıran bir koaktivatör olduğu ve RNA polimeraz II odak bölgesine lokalize olduğu da ortaya konulmuştur [Alm-Kristiansen et al., 2008].

3.3. FLASH'ın Nükleer Cisimcikler ile İlişkileri ve Hücre Döngüsündeki Rolü

3.3.1. PML Cisimcikleri ve Apoptoz

FLASH'ın varolan apoptotik etkisinin yanında, nükleustaki lokalizasyonu bazı sorular doğurmuş ve apoptoz ile nükleer cisimcikler arasındaki etkileşimde FLASH'ın da görev alabileceği düşünülmüştür. Daha önce sadece CB (Cajal Cisimciği)'lerde bulunduğu ileri sürülse de [Barcaroli et al., 2006a], FLASH'ın, apoptotik sinyal iletimi ve DNA hasar cevabında rol alan PML (promyelocytic leukemia protein) nükleer cisimcikleri (PML-NB)'nde de lokalize olup burada Sp100 ile etkileştiği gösterilmiştir. Dahası, apoptotik CD95 sinyali üzerine, bulunduğu nükleer cisimciklerden sitoplazmaya transloke olduğu ve ileri sürülenin aksine [Imai et al., 1999], kaspaz-8 aktivasyonunu mitokondri üzerinde gerçekleştirdiği ortaya konmuştur [Milovic-Holm et al., 2007]. Aynı grubun, diğer bir yayınında ise FLASH'ın hem apoptotik, hem de apoptotik olmayan görevleri şematize edilerek gösterilmiştir (Şekil 3.3) [Krieghoff et al., 2007]. CD95 uyarımı üzerine PML cisimciklerinde bulunan FLASH, sitoplazmaya göç edip mitokondri üzerinde pro-kaspaz8'i aktive eder (Şekil 3.3a). FLASH apoptozun dışında ise, GR modülasyonu, histon transkripsiyonu ve NF-κB aktivasyonu gibi süreçlerde rol alır (Şekil 3.3b).



Şekil 3.3: FLASH'ın A) apoptotik olan ve B) apoptotik olmayan işlevleri.

3.3.2. FLASH'ın Cajal Cisimcikleri, Histon Lokus Cisimcikleri ve Histon Pre – mRNA'larının Olgunlaşma Süreçlerindeki Rolü

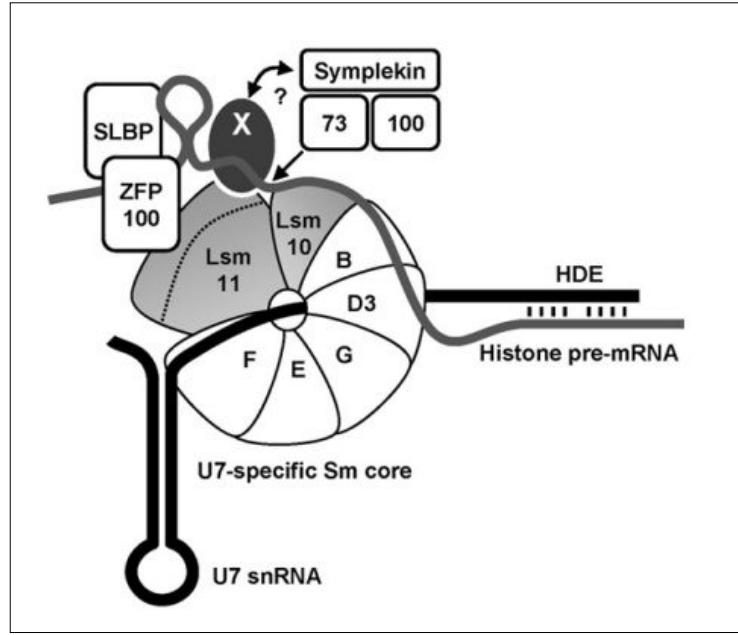
FLASH'ın, nükleer görev ve lokalizasyonlarını daha detaylı aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalarda FLASH'ın Cajal Cisimcikleri (CB)'nin içinde lokalize olup bunların yapısal bütünlükleri için gerekli olduğu ve CB'lerin temel bileşenlerinden olan ve hücre-döngüsüne bağımlı histon transkripsiyon kompleksinde de görev alan Nükleer Protein Ataxia-Telangiectasia (NPAT)/p220 ile kolokalizasyonunun olduğu bulunmuştur [Barcaroli et al., 2006a], [Barcaroli et al., 2006b]. FLASH'ın sitoplazmik bir protein olduğu düşüncesinden ziyade, daha çok nükleusta iş gördüğü ve CB'lerde NPAT ile kolokalizasyonu nedeniyle de histon transkripsiyonunda görev alabileceği düşünülmüştür. Nitekim FLASH'ın histon transkripsiyonu için gerekli olduğu, FLASH down regülasyonunun hücrelerdeki histon mRNA seviyelerinin azalmasına ve hücrelerin S fazında tutuklu kalmalarına neden olduğu gösterilmiştir [Barcaroli et al., 2006b]. 2008'de ise FLASH'ın lokalize olduğu cisimciklerin hepsinde coilin olmadığı yani Cajal Cisimciklerinin haricindeki yapılarda da FLASH'ın lokalize olduğu gösterildi. Bu yapılar Histon Lokus Cisimcikleri (HLB) olarak adlandırılmaktadır ve HLB'ler ile hücre ploidi (kromozom sayısı) arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir [Bongiorne-Borbone et al., 2008]. Bir diğer çalışmaya [Kriyama et al., 2009] göre ise, FLASH'ın S fazda ilerlemeyi sağlaması için NPAT'dan ziyade [Barcaroli et al., 2006b], arsenite karşı dayanıklılık sağlayan

ARS2 (Arsenite Resistance Protein 2) ile etkileşiminin gerekli olduğu gösterilmiştir. Bu etkileşim, FLASH'ın 914 – 926 aa'lerini kapsayan FARB (FLASH – ARS2 Binding) bölgesi ile ARS2'nin C terminalindeki ARS domaini üzerinden gerçekleşmektedir. FLASH'ın N terminal bölgesindeki coiled-coil domaini üzerinden self-asosiyasyon sağladığı ve bu yapının S fazda ilerleme için gerekli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, S fazda ilerlemenin sağlanabilmesi ve replikasyona bağımlı histon mRNA'larının oluşumu için hem FLASH'ın coiled-coil domaininin sağlam olması gerektiği hem de FLASH (FARB domaini) ve ARS2 (ARS2 domaini) arasındaki etkileşimin gerekliliği ortaya konulmuştur.

Bu veriler nedeniyle de FLASH'ın histon pre-mRNA için gerekli mekanizmanın bir parçası olabileceği önerilmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, FLASH'ın, histon pre-mRNA olgunlaşmasında görevli olan U7 snRNP (small nuclear ribonükleoprotein) kompleksindeki Sm halkasının bir parçası olan Lsm11 ile etkileştiği, histon pre-mRNA'sının 3' olgunlaşmasını tetiklediği [Yang et al., 2009], fakat histon pre-mRNA downstream kesim ürününün (DCP) daha sonraki degradasyonunda rol almadığı gösterilmiştir [Yang et al., 2011]. Şekil 3.4'de histon pre-mRNA ile U7 tip snRNP arasındaki etkileşim gösterilmiştir ve "X" olarak gösterilen proteinin FLASH olduğu bulunmuştur. Daha sonraları bu süreçte rol alan diğer protein ve faktörler de aynı grubun başka bir çalışmasında anlatılmıştır [Yang et al., 2013]. Bunlara ek olarak UV-C'ye maruz bırakılan hücrelerde HLB'lerin parçalandığı ve hücre döngüsünde duraksamaya neden olduğu belirtilmiştir. Hücre döngüsündeki bu duraksama ise FLASH'ın proteozomal yıkımı nedeniyle histon mRNA ve protein seviyelerindeki azalmaya bağlıdır [Bongiorno-Borbone et al., 2010].

Histon pre – mRNA olgunlaşma süreci memelilere ek olarak *Drosophila*'da da incelenmiştir. Bu çalışmada da önceki çalışmaları doğrular şekilde *Drosophila* histon pre - mRNA'larının olgunlaşabilmesi için FLASH ve Lsm11'in *Drosophila* homologlarının etkileşiminin gerektiği *in vivo* gösterilmiştir [Burch et al., 2011].

Fare embriyolarında yapılan çalışmada ise [De Cola et al., 2012], embriyoların 4 hücreli evresinden itibaren FLASH ve NPAT ifadenmelerinin başladığı ve aynı evrede HLB'lerin oluştuğu gösterilmiştir. Beklendiği gibi FLASH null embriyolar ise sadece morula evresine kadar yaşayabilmektedir ve bu durum histon H4/d ifadesindeki azalma ve S-fazda duraksama ile karakterizedir. Aynı çalışmada p73'ün de FLASH ile etkileşip histon sentezinde rol aldığı belirtilmiştir.



Şekil 3.4: Histon pre-mRNA'sının 3' uç olgunlaşmasında görevli faktör ve diziler. Lsm11 ve histon pre-mRNA'sının etkileşiminde görev alan ve "X" olarak gösterilen faktörün FLASH olduğu gösterilmiştir.

3.4. Kanser ve FLASH

FLASH'ın kanser ile ilişkisine yönelik olan çalışmalar da rapor edilmiştir. DNA yanlış eşleşmeyi-düzeltilme (mismatch repair) mekanizmaları hatalı olan insan kolorektal, endometrial ve gastrik kanserlerinde mikrouydu instabilitesi vardır. Bu instabilite ise tekrar eden DNA dizilerindeki geniş çaplı mutasyonlar ile karakterize edilir. Bu sebeple kolorektal karsinom MSI-H (mikrouydu instabilitesi yüksek) hücre hatlarında kodlama yapan mikrouydulardaki mutasyonlar analiz edilmiş ve örneklerin %10'undan fazlasında diğer genlerin yanı sıra *CASP8AP2* geninin mikrouydu dizisinde de mutasyon görülmüş [Park et al., 2002] fakat incelenen 103 kolorektal karsinom doku örneklerinin yalnızca ikisinde (%1,9) mutasyon saptanmıştır [Jeong et al., 2008]. Gastrik adenokarsinom dokularında aynı şekilde incelenen 184 örneğin ise sadece %0,5'inde mikrouydu mutasyonu görülmüş; immünohistokimyasal analizlerde ise, gastrik karsinomların %70'inde FLASH protein ifadesi pozitif ve sitoplazmaya yerleşik iken, normal gastrik mukoza epitelinde çok az olduğu veya hiç bulunmadığı gösterilmiştir. Bu sebeple FLASH ifadesinin gastrik kanser oluşumunda rol almış olabileceği önerilmiş [Jeong et al., 2007] ve FLASH

bütünlüğünün kanserli hücrelerde korunması gerektiği sonucuna varılmıştır [Jeong et al., 2008].

FLASH'ın temel görevi apoptozla ilişkili olduğundan, bu sonuçlar iki türlü açıklanmıştır: (I) Sadece FLASH ifadesi yüksek olan karsinom hücrelerinin seçilerek hayatta kalabildiği, bu sayede kanser hücrelerinin daha sonraki gelişim ve ilerleme safhalarında FLASH'ın indüklediği apoptoza karşı koyabildiği veya (II) FLASH'ın apoptotik özelliğine rağmen, NF- κ B aktivasyonu gibi tümör oluşumunda rol alan fonksiyonlarının da bu durumu desteklemiş olabileceği önerilmiştir [Jeong et al., 2007].

Bunun haricinde özellikle Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)'de *CASP8AP2*'nin prognostik önemi vurgulanmıştır [Flotho et al., 2006]. Diğer kan kanserleri gibi ALL'de de Minimal Residual Disease (MRD) genleri prognostik (hastalığın seyrini belirleyen) belirteçler olup hastalığın tedaviden sonra tekrar ortaya çıkma ihtimali hakkında da bilgi verir. Bu yayında, tedaviye başladıktan belirli bir süre sonra yapılan incelemelerde, kötü prognozlu (olumsuz seyir izleyen) hastalarda *CASP8AP2* gen ifadesi düşük iken, iyi prognozlu (olumlu seyir izleyen) hastalarda *CASP8AP2* gen ifadesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, *CASP8AP2*'yi düşük ifade eden hastaların erken tedaviye verdikleri cevapta yavaşlama gözlenirken, yüksek *CASP8AP2* ifadelenmesi ise tedaviden sonra event – free survival (olaysız sağkalım) oranlarındaki artış ile ilişkilendirilmiştir. Çocukluk dönemi T- hücre akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) hastalarında yapılan bir çalışmada ise [Remke et al., 2009], olumsuz MRD sergileyen hastalarda en çok delesyona maruz kalan kromozom bölgelerinden birinin 6q15 – 16.1 olduğu ve bu delesyon sonucunda en çok *CASP8AP2* mRNA düzeyinin etkilendiği gösterilmiştir. Akut lenfoblastik lösemi hastalarında *CASP8AP2* geninin epigenetik durumu da aydınlatılmıştır [Li et al., 2013] ve *CASP8AP2* geni yüksek metile olan hasta grubunun tedaviye yanıtlarının da yetersiz olduğu ortaya konmuştur. Yine pediatrik ALL'de yapılan bir çalışmada [Jiao et al., 2012], *CASP8AP2* gen ifadesi düşük olan hastalarda kemik iliğinde hastalığın yinelenme oranının yüksek olduğu ve tedavi sürecinin 33. gününde olumsuz MRD sergileyen hastalarda *CASP8AP2* ifadesinin de düşük olduğu bulunmuştur. T –hücre lenfoblastik lenfoma (T-LBL) hastaları ile yapılan bir diğer çalışmada ise [Callens et al., 2012], hastaların %18'inde *CASP8AP2* geninde monoalellik delesyona rastlanmıştır.

3.5. Hipoksia’da FLASH ve miRNA Kontrolü

Dokulara ulaşan kanın belirli bir süre de olsa kesilmesi (ischemia – iskei) hücre ve dokularda ölümcül olabilmektedir. Kanın daha sonra akışının tekrar sağlanması ise (reperfusion) daha farklı zararlara sebep olabilmektedir (reperfusion injury). Bu sebeplerden ikisi, dokulara ulaşan kan hücrelerinin oluşturduğu yangı ve oksijenden kaynaklanan oksidatif strestir. Bu zararları ortadan kaldırmak için dokularda iskemik önkoşullandırma (ischemic preconditioning) ile, aralıklarla kısa süreli kan verilip dokudaki homeostasinin eskisi gibi olması sağlanır. Mezenkimal kök hücreler ile yapılan bir çalışmada bu sistem denenmiştir [Kim et al., 2009]. Bu amaçla, kemik iliği türevli mezenkimal kök hücre (MSC)’ler iskemik önkoşullanmaya maruz bırakılıp, enfarkte kalbe (kriz geçirmiş kalp) aktarılmıştır. Bu önkoşullandırılmış hücrelerin uzun süreli anoksia koşullarına daha uzun süre dayanabildikleri, Hipoxia-Inducible Factor-1 α ’nın downstream hedeflerinden biri olan miR-210 seviyesinin paralel şekilde indüklendiği ve miR-210 hedefinin de *CASP8AP2* olduğu gösterilmiştir. Önkoşullandırılmış hücrelerde artan miR-210 ifadesi sonucu *CASP8AP2* ifadesinde ve ilgili hücrelerin apoptoza girmelerinde azalma belirlenmiştir.

FLASH’ın bu zıt rolleri göz önüne alındığında kanserdeki rolleri merak uyandırmaktadır. Bu sebeple HCC hücre hatlarında FLASH/*CASP8AP2* ifadelenmesi hem gen hem de protein düzeyinde incelenmiş, sağlıklı ve kanserli dokulardan elde edilen sonuçların da kendi içindeki tutarlılıkları araştırılmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

4.1. Gereçler

4.1.1. Kullanılan Kimyasallar

EDTA (Merck), MBG Etanol (Riedel de Haen), LE Agaroza (Lonza) ve RNase-ExitusPlus (AmpliChem) haricindeki tüm kimyasallar Fischer Scientific firmasından temin edilmiştir.

4.1.2. Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri

Hücre besiyeri olarak düşük-glikoz ve yüksek-glikoz içerikli DMEM besiyerleri (Lonza), % 10 fetal dana serumu (FBS, Lonza), % 1 Penisilin-Streptomisin (Lonza), 400 mM L-glutamin (Lonza), 1X fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS, Lonza) ve 10X Trypsin (Lonza).

4.1.3. Kullanılan Kitler

Kültüre edilip büyütülen hücrelerden total RNA izolasyonu için NucleoSpin RNAII izolasyon kiti (Macharey-Nagel) kullanılmıştır. İzole edilen total RNA'lerden tek zincirli cDNA sentezlemek için ProtoScript First Strand cDNA sentez kiti (BioLabs) kullanılmıştır. Gen ifadesi analizi için Maxima Cybergreen qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) kullanılmıştır.

Array çalışmaları için ise iki farklı Parafin Doku Makrodizin (Katalog No: Z7020059 [Dizin 1] ve T8235713-5 [Dizin 2]) (Biochain) kullanılmıştır. 1. dizinde 16 farklı HCC doku örneği ve karşılık gelen sağlıklı dokuları, 2. dizinde ise farklı tipteki kanserler ve karşılık gelen sağlıklı dokuları yer almaktadır.

4.1.4. Kullanılan Hücre Hatları

Bu çalışmada 8 hepatoma (Snu 182, Snu 398, Snu 423, Snu 475, Hep3B, SkHep1, HuH7 ve PLC/PRF/5) ve 1 hepatoblastoma hücre hattı (HepG2)'nın yanı sıra, serviks kanseri kökenli HeLa hücre hattı ve Bilkent Üniversitesinde Prof. Dr. Tamer Yağcı tarafından geliştirilen ve FLASH proteinine karşı spesifik monoklonal antikör üreten 1A4 isimli hibridoma hücreleri kültüre edilmiştir.

4.1.5. Kullanılan Çözeltiler

Nükleik asit çözeltileri;

- *Tris-EDTA (TE) Tamponu*
 - 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
 - 1mM EDTA (pH 8.0)
- *Tris – Asetik asit – EDTA (TAE)(50x)*
 - 121 g Tris bazı
 - 18,6 g EDTA
 - 28,55 ml glasiyel asetik asit

Belirli miktar ddH₂O (iki kere arıtılmış su) içinde çözülüp, pH 8,5'e ayarlandıktan sonra 500 ml'e ddH₂O ile tamamlanır.

Hücre kültürü çözeltileri;

- *Hücre Dondurma Ortamı*
 - %10 DMSO
 - %90 FBS

- *PBS (10X)*
 - 80 g NaCl
 - 2 g KCl
 - 17,8 g Na₂HPO₄·2H₂O
 - 2,4 g KH₂PO₄

Belirli miktar ddH₂O içinde çözülüp, pH 7,4'e ayarlandıktan sonra 1 L'ye ddH₂O ile tamamlanır.

İmmünofloresan çözeltileri;

- *DAPI (4', 6 – diamino – 2 – fenilindol)*

Ticari olarak satın alınan DAPI (Cell Signaling) ddH₂O ile 5 mg/ml stok haline getirilmiştir.

- *Paraformaldehit (PFA) (%4)*

8 g PFA 1X PBS içinde çözülüp pH 7,4'e ayarlandıktan sonra 200 ml'e ddH₂O ile tamamlanır. – 20°C'de saklanır.

- *Triton X – 100*

Triton X – 100 stok çözeltisi 1X PBS içinde % 0,1'e seyreltilir.

- *Bloklama Çözeltisi*

Stok FBS çözeltisi 1X PBS içerisinde % 5'e seyreltilir.

- *Sabitleme Çözeltisi*

Stok Gliserol ddH₂O ile %80'e seyreltilir.

4.1.6. Kullanılan Antikorlar DNA Belirteçleri ve Yükleme Tamponları

Anti-FLASH antikorları 1A4 hibridoma hücrelerinde üretilmiştir. Diğer antikorlar Anti-Mouse AlexaFluor Green 488 ve Mouse IgG1 izotip kontrol antikorları Cell Signaling firmasından temin edilmiştir.

Agaroz jel elektroforez için 100 – 1000 baz çifti aralığındaki (New England BioLabs) DNA boyut belirteci ve yükleme tamponu olarak da Gel Loading Dye Blue (6X) (New England BioLabs) kullanılmıştır. Nükleik asit boyanması için ise RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (Intronbio) kullanılmıştır.

4.1.7. İnsan Karaciğer Total RNA ve Oligonükleotidler

RT-qPCR deneylerinde kullanılan İnsan Karaciğer Total RNA ekstraktı Agilent Technologies'den, primerler ise Alpha DNA'dan temin edilmiştir.

4.1.8. Kullanılan Cihazlar

+4 °C Buzdolabı (Ariston), -20 °C Derin Dondurucu (Ariston), -80 °C Derin Dondurucu (Thermo, Forma -86°C ULT Freezer), Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), NanoSpec (Shamadz), Laminar Akım Kabini (Labconco, Logic), Karbondioksit İnkübatörü (Labogene, Scancell), Otoklav (Hirayama, Hiclave HVE-50), RT-qPCR (Stratagene Mx3000, Agilent), PCR Kabini (Lab Companion), Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), Santrifüj (Nüve, NF400), Soğutmalı Santrifüj (Labogene, Scanspeed 1580R), Vortex (DragonLabs, MX-S), PCR (Biorad, Mj Mini), KuroGEL Midi 13 elektroforez ünitesi (VWR), PS300B Güç kaynağı (Hoefer), Jel Görüntüleme Sistemi (BioRad, ChemiDoc XRS+), Nikon Eclipse 80i immünfloresan mikroskop, Nikon Digital Sight DS – 5Mc kamera, CH3 Patoloji Mikroskobu (Olympus) ve BenchMark – XT Autostainer (Ventana Medical Systems).

4.2. Yöntemler

4.2.1. Hücre Çözme İşlemi

Sıvı azot tankından alınan hücre hatları oda sıcaklığında eriyince, üzerine yavaşça %10 fetal dana serumu, %1 penisilin-streptomisin ve 8mM L-Glutamin ile desteklenen besiyeri eklendi ve 15 ml santrifüj tüpüne alındı. Hücreler 1500 rpm’de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı aspire edildi ve hücre pelleti besiyeri ile sulandırıldı ve 100 mm’lik kültür kabına ekim yapılarak 37°C’de %5 CO₂’li inkübatöre yerleştirildi.

4.2.2. Hücre Kültürü ve Büyütölme Şartları

Hücreler 100 mm’lik kültür kabının %80 - 90’ını kapladıklarında besiyeri aspire edildi. Hücrelerin üzerine 1X PBS eklenerek hücreler yıkandı. 1X PBS aspire edilerek 3X tripsin eklendi ve hücreler kaldırıldı. Hücreler gerekli oranlarda pasajlanarak kültüre edilmeye devam edildi. Snu 182, 398, 423 ve 475 hücre hatları RPMI1640 besiyerinde, Huh7, Hep3B, PLC/PRF/5, Sk-Hep1 ve HepG2 hücre hatları düşük – glikoz içerikli, 1A4 hibridoma ve HeLa hücre hattı ise yüksek – glikoz içerikli DMEM besiyerinde büyütüldü. Tüm besiyerlerine %10 FBS ve %1 Penisilin – Streptomisin antibiyotik karışımı eklenmiştir.

4.2.3. Hücre Dondurma İşlemi

Hücreler stok yapma amacıyla dondurularak saklandı. Hücreler 1500 rpm’de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı aspire edildi ve hücre pelletinin üzerine hücre dondurma ortamı eklendi. 2ml tüplerde hücreler önce -80°C derin dondurucuya alındı ve takip eden gün sıvı azot tankına aktarılarak uzun süreli saklanmaları gerçekleştirildi.

4.2.4. Kültüre Edilen Hücrelerden RNA İzolasyonu

Kültüre edilen hücrelerden RNA izole edilmesi, NucleoSpin RNA II izolasyon kiti (Macharey-Nagel) kullanılarak, üretici firmanın verdiği kullanma talimatına uygun bir şekilde yapıldı. Kısaca, lizis tamponu ile hücre pelleti lizis edildi. Ardından elde edilen lizat filtrelendi. Filtreden geçen sıvının üzerine RNA-bağlama solüsyonu eklendi. Bu üst sıvı kolona uygulanarak RNA'nın kolona bağlanması sağlandı. Kolondaki tuzlar MDB (Membran Desalting Buffer) eklenerek ortamdan uzaklaştırıldı. Kolondaki DNA, rDNase kullanılarak parçalandı. Kolon yıkandı ve kurutuldu. Yüksek saflıkta RNA'nın elüsyonu 40 µl dH₂O kullanılarak yapıldı.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve OD 260/280 oranı NanoSpec spektrometre cihazı ile ölçüldü. İzole edilen RNA'lar -80°C derin dondurucuda saklandı.

4.2.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi

4.2.4.1.1. DNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jeli, istenilen miktardaki toz agarozun 1X TAE tamponu içerisinde çözüldükten sonra içerisine 6 µl/100 ml olacak şekilde RedSafe (20.000X) boyasından eklenmesiyle hazırlandı. RT – qPCR örnekleri ise 6X DNA yükleme boyası ile son hali 1X olacak şekilde karıştırılıp jele yüklendi. Belirteç olarak ise 100 – 1000 baz çifti aralığında bantlar oluşturan DNA boyut markırı kullanıldı. Jelde yürütülen nükleik asitler, ChemiDoc XRS+ (BioRad) jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

4.2.4.1.2. RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen total RNA örnekleri, 65°C'de 5 dakika inkübe edilip hemen ardından 2 dakika buzda bekletildi. Ardından örnekler 6X DNA yükleme boyası ile son hali 2X olacak şekilde karıştırılıp %2'lik agaroz jelde 1X TAE tamponu kullanılarak yürütüldü. Jelde yürütülen nükleik asitler, ChemiDoc XRS+ (BioRad) jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

4.2.5. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA’lardan cDNA sentezi, ProtoScript First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak, üretici firmanın verdiği kullanma talimatına uygun bir şekilde yapıldı. Kısaca, -80°C derin dondurucudan alınan RNA’lar ile PCR tüpünde total RNA/Primer/dNTP karışımı (Tablo 4.1) hazırlandı. Bu karışım PCR cihazına yerleştirildi ve 70°C’de 5 dk ön-inkübasyon gerçekleştirildi. Ardından tüp hafifçe vortekslenip hemen buza alındı ve üzerine RT karışımı (Tablo 4.2) eklendi. Hacmi 20 µl olan cDNA sentez karışımı PCR cihazına yerleştirilip 42°C’de 60 dk sentez işlemi ve 80°C’de 5 dk enzim inaktivasyonu işlemi yapıldı.

Tablo 4.1: RNA/Primer/dNTP karışımı.

RNA / Primer / dNTP karışımı	
Total RNA (1 ug)	0,8-3,78 µl
Primer	2 µl
dNTP mix	2 µl
N.F. dH ₂ O (Nuclease – free dH ₂ O)	2,22-5,2 µl
Toplam	8 µl

Tablo 4.2: RT karışımı.

RT mix	
M – MulV Reaction Mix	10 µl
M – MulV Enzyme Mix	2 µl
Toplam	12 µl

20 µl olan PCR hacmi reaksiyon sonunda N.F. dH₂O (Nuclease – free distile su) ile 100 µl’ye tamamlandı. cDNA konsantrasyonu ve OD_{260/280} oranı NanoSpec spektrometre ile ölçüldü. Sentezlenen cDNA, -20°C derin dondurucuda saklandı.

4.2.6. RT-qPCR ile Gen İfadesi Analizi

RT – qPCR için gerekli FLASH primeri primer 3 programı ile tasarlandı, GAPDH primeri ise daha önce belirtilmiştir [Sayan et al., 2001a] (Tablo 4.3).

RT – qPCR işlemlerinde total reaksiyon hacmi 20 µl olarak hazırlandı ve 1 ul cDNA kalıp olarak kullanıldı (Tablo 4.4). FLASH ve GAPDH primerleri ile Maxima Cybergreen qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) kullanılarak kitin önerdiği döngü şartlarında (Tablo 4.5) RT-qPCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Gen ifadesindeki değişim ise, $\Delta\Delta Ct$ formülü [Pfaffl, 2001] ile *GAPDH*'a göre normalize edildikten sonra, ya geometrik ortalamaya ya da sağlıklı insan karaciğerindeki gen ifadesine göre kalibre edilerek hesaplandı.

Tablo 4.3: Çalışmada kullanılan ileri ve geri primerler.

Gen Adı	İleri Primer	Geri Primer
FLASH	5'– GCCCCTCCTGTGACTAAAGA –3'	5'– CCGGTCATCATTTCTTGTCC –3'
GAPDH	5'– GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT –3'	5'– CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA – 3'

Tablo 4.4: RT-qPCR reaksiyon tablosu.

20 µl Reaksiyon Hacmi	
2X master mix	10 µl
İleri primer (200 mM)	0,4 µl
Geri primer (200 mM)	0,4 µl
Kalıp cDNA (200 – 300 ng)	1 µl
N.F. dH ₂ O	8,2 µl
Toplam	20 µl

Tablo 4.5: RT-qPCR döngü şartları.

Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1 döngü	95	10 dakika
40 döngü	95 58 72	15 saniye 30 saniye (ölçüm) 30 saniye
Erime eğrisi	55 - 95	Her 0.1°C sıcaklık değişiminde ölçüm

Kullanılan primerlerin etkinliği (E değeri) hesaplanırken konsantrasyonu bilinen cDNA'dan 5 farklı dilüsyon hazırlandı. Bu dilüsyonlar kalıp DNA olarak kullanıldı. Yapılan qPCR sonucunda E değeri MxPro yazılımının, Ct değerlerini kullanarak oluşturduğu 5 noktalı standart eğrinin eğimi ile hesaplandı (Tablo 4.6).

$$E=10^{-1/\text{Eğim}} \quad (4.1)$$

Tablo 4.6: Primer etkinlikleri.

Primerler	Primer Etkinliği
FLASH	2,1156
GAPDH	2,1191

RT-qPCR reaksiyonları için duplike çalışılmış, denemeler 2'şer kez tekrarlanmış ve iki ayrı zamanda izole edilen cDNA'lar kullanılarak elde edilen sonuçların ortalaması alınmıştır.

$$\Delta\Delta Ct = \frac{E_{Hedef}^{\Delta Ct_{Hedef}(Ct_{Kal} - Ct_{Örn})}}{E_{Norm}^{\Delta Ct_{Norm}(Ct_{Kal} - Ct_{Örn})}} \quad (4.2)$$

- E_{Hedef} : Hedef gene spesifik primerin etkinlik değeri
- ΔCt_{Hedef} : Hedef genin kalibratördeki Ct değeri (Ct_{Kal}) ile örnekteki Ct değeri ($Ct_{Örn}$) arasındaki fark
- E_{Norm} : Normalizatör gene spesifik primerin etkinlik değeri
- ΔCt_{Norm} : Normalizatör genin kalibratördeki Ct değeri (Ct_{Kal}) ile örnekteki Ct değeri ($Ct_{Örn}$) arasındaki fark

Kalibratör olarak hedef genin (*CASP8AP2/FLASH*), ya kullanılan hücre hatlarındaki gen ifadelerinin geometrik ortalamaları ya da sağlıklı insan karaciğerindeki ifadesi kullanıldı.

$\Delta\Delta Ct$ formülünden elde edilen değerler log2 tabanında grafiğe geçirilerek gen ifadelerindeki değişim 2'nin katları şeklinde ifade edildi.

4.2.7. İmmünohistokimya ile HCC Doku Makrodizinlerinde Protein İfadesi Analizi

Biochain firmasından temin edilen doku makrodizinlerinin klinikopatolojik karakteristikleri Tablo 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.

İmmünohistokimya analizleri Anadolu Sağlık Merkezi (ASM) (Şifa – İSTANBUL) Patoloji biriminde BenchMark – XT Autostainer (Ventana Medical Technologies) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İmmünohistokimya boyaması, cihazın temin edildiği firma tarafından önerilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. Kısaca, doku makrodizinleri anti-FLASH antikor veya izotip antikorla 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İkincil antikor, substrat eklenmesi ve hematoksin ile boyama işlemleri ise sistemde optimize edilmiş standart protokol çerçevesinde gerçekleştirildi.

İmmünohistokimya ile boyanan doku makrodizinlerinin değerlendirilmesi ise, CH3 Patoloji Mikroskobunda (Olympus) ASM Patoloji birim sorumlusu Prof. Dr. Hüseyin Baloglu'nun katkılarıyla gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.7: 1. Dizinin klinikopatolojik karakteristikleri.

Konum	Cinsiyet	Yaş	Anatomik bölge	Patoloji	Evre	TNM Sınıflandırması
A1, B1	Erkek	40	Karaciğer	Hepatoselüler karsinoma (HCC)	II	T2N0M0
A2,B2	Erkek	39	Karaciğer	HCC	II	T2N0M0
A3,B3	Erkek	33	Karaciğer	HCC	III	T2N0M0
A4,B4	Erkek	47	Karaciğer	HCC	II	T2N0M0
A5,B5	Erkek	65	Karaciğer	HCC	III	T2N0M0
A6,B6	Erkek	68	Karaciğer	HCC	III	T2N0M0
A7,B7	Erkek	52	Karaciğer	HCC	I-II	T2N0M0
A8,B8	Kadın	46	Karaciğer	HCC	II-III	T2N1M0
C1	Erkek	40	Karaciğer	A1 ve B1'in tümör-dışı dokusu		
C2	Erkek	39	Karaciğer	A2 ve B2'nin tümör-dışı dokusu		
C3	Erkek	33	Karaciğer	A3 ve B3'ün tümör-dışı dokusu		
C4	Erkek	47	Karaciğer	A4 ve B4'in tümör-dışı dokusu		
C5	Erkek	65	Karaciğer	A5 ve B5'in tümör-dışı dokusu		
C6	Erkek	68	Karaciğer	A6 ve B6'nın tümör-dışı dokusu		
C7	Erkek	52	Karaciğer	A7 ve B7'in tümör-dışı dokusu		
C8	Kadın	46	Karaciğer	A8 ve B8'in tümör-dışı dokusu		
D1,E1	Kadın	52	Karaciğer	HCC	II	T1N0M0
D2, E2	Erkek	40	Karaciğer	HCC	I-II	T2N0M0
D3,E3	Erkek	41	Karaciğer	HCC	II	T2N0M0
D4,E4	Erkek	57	Karaciğer	HCC	II	T3N1M0
D5,E5	Erkek	41	Karaciğer	HCC	II	T3N0M0
D6,E6	Erkek	36	Karaciğer	HCC	II-III	T2N0M0
D7,E7	Erkek	61	Karaciğer	HCC	I-II	T2N0M0
D8,E8	Erkek	43	Karaciğer	HCC	I-II	T3N1M0
F1	Kadın	52	Karaciğer	D1 ve E1'in tümör-dışı dokusu		
F2	Erkek	40	Karaciğer	D2 ve E2'in tümör-dışı dokusu		
F3	Erkek	41	Karaciğer	D3 ve E3'in tümör-dışı dokusu		
F4	Erkek	57	Karaciğer	D4 ve E4'in tümör-dışı dokusu		
F5	Erkek	41	Karaciğer	D5 ve E5'in tümör-dışı dokusu		
F6	Erkek	36	Karaciğer	D6 ve E6'in tümör-dışı dokusu		
F7	Erkek	61	Karaciğer	D7 ve E7'in tümör-dışı dokusu		
F8	Erkek	43	Karaciğer	D8 ve E8'in tümör-dışı dokusu		

- TNM sınıflandırma: Karaciğer karsinom
- T - Primer tümör
- Tx - Primer tümör değerlendirilemedi
- T0 - Primer tümör bulgusu yok
- T1 - Damar invazyonu yapmamış soliter tümör
- T2 - Damar invazyonu yapmış soliter tümör veya 5 cm'den büyük olmayan çoklu tümör
- T3 - 5 cm'den büyük çoklu tümörler veya portal veya hepatik toplardamar içeren tümörler
- T4 - Safra kesesinden başka komşu organlara doğrudan invazyon yapmış veya

periton perforasyonuna yol açmış tümörler

- N - Bölgesel lenf düğümleri
- Nx - Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemedi
- N0 - Bölgesel lenf düğümü metastazı yok
- N1 - Bölgesel lenf düğümüne metastaz
- M - Uzak metastaz
- Mx - Uzak metastaz değerlendirilemedi
- M0 - Uzak metastaz yok
- M1 - Uzak metastaz var

Tablo 4.8: 2. Dizinin klinikopatolojik karakteristikleri.

Konum	Yaş	Cinsiyet	Organ	Patolojik Tanı	Tümör Geçmişi	Tümör Boyutu (cm)	Farklılaşma	TNM
A1	29	K	Pozitif Kontrol	İnsan normal plasentası				
A2			Negatif Kontrol	Parafin				
A3	47	E	Adrenal Tümör	Feokromositoma	1 ay	6x6	Orta	T2N0M0
A4	22	E	Adrenal	Normal				
A5	57	K	Adipoz tümör	Liposarkom	2 ay	28x18x6	Orta	T3N0M0
A6	26	E	Adipoz	Normal				
A7	36	E	Mesane tümörü	Transizyonel Hücreli Karsinom Evre II	12 ay	10x7x5	Orta	T2N0M0
A8	29	E	Mesane	Normal				
A9	68	E	Mesane tümörü	Transizyonel Hücreli Karsinom Evre III	3 gün	2x1x0,5	Orta	T2N0M0
A10	34	E	Mesane	Normal				
A11	34	K	Beyin Tümörü	Menenjiom	2 ay	6x5x5	N/A	T2N0M0
A12	73	E	Beyin	Normal				
B1	82	K	Meme Tümörü	İnvaziv Duktal Karsinoma	4 yıl	5x6	Orta	T3N1M0
B2	27	K	Meme	Normal				
B3	26	K	Meme Tümörü	Fibroadenom	2 ay	1,8x1,5x0,7	N/A	T1N0M0
B4	44	K	Meme	Normal				
B5	65	K	Kolon tümörü	Adenokarsinom	5 ay+	3x3x1,4	Orta	T2N0M0
B6	28	E	Kolon	Normal				
B7	52	K	Kolon tümörü	Adenokarsinom	1 ay+	6x4x1,5	Orta	T3N0M0
B8	64	E	Kolon	Normal				
B9	39	E	Duodenum tümörü	Adenokarsinom	20 gün	1x1x0,8	İyi	T1N0M0
B10	28	E	Duodenum tümörü	Normal				
B11	72	E	Yemek Borusu tümörü	Yassı Hücreli Karsinom	5 ay	7x5x5	Zayıf	T3N1M0
B12	20	E	Yemek Borusu	Normal				
C1	62	E	Yemek Borusu tümörü	Yassı Hücreli Karsinom	20 gün	3x2,5x1,2	Zayıf	T2N0M0
C2	83	K	Yemek Borusu	Normal				
C3	50	E	Yemek Borusu tümörü	Adenokarsinom	1 ay	3x2x1,5	Orta	T2N0M0
C4	76	K	Yemek Borusu	Normal				
C5	54	K	Fallop tüp tümörü	Adenokarsinom	1 ay	Dia 0,8	Zayıf	T1N0M0
C6	47	K	Fallop tüpü	Normal				
C7	74	E	Safra Kesesi Tümörü	Adenokarsinom	1 ay	3x2x2,5	İyi	T2N0M0
C8	24	E	Safra Kesesi	Normal				

Tablo 4.8: Devam.

C9	59	E	Böbrek Tümörü	Renal Hücreli Karsinom	1 ay	13x10x7	İyi	T4N0M0
C10	50	E	Böbrek	Normal				
C11	50	M	Böbrek Tümörü	Berrak Hücreli Karsinom	30 gün	3,5x3,5x3	Orta	T1N0M0
C12	26	M	Böbrek	Normal				
D1	47	F	Karaciğer Tümörü	Hepatoselüler karsinom	1 yıl	4x3	Orta	T2N0M0
D2	26	M	Karaciğer	Normal				
D3	60	M	Karaciğer Tümörü	Hepatoselüler Karsinom	1 yıl	3,5x3,5x3	Orta	T2N0M0
D4	30	M	Karaciğer	Normal				
D5	65	F	Akciğer Tümörü	Yassı Hücreli karsinom	3 ay+	Çap 2,5	Zayıf	T1N0M0
D6	26	M	Akciğer	Normal				
D7	66	M	Akciğer Tümörü	Yassı Hücreli karsinom	5 ay+	Çap 8	Zayıf	T4N1M1
D8	24	M	Akciğer	Normal				
D9	70	M	Akciğer Tümörü	Adenoskuamöz karsinom	N/A	Çap 4	Orta	T2N1M0
D10	21	M	Akciğer	Normal				
D11	74	F	Akciğer Tümörü	Alveoler Hücreli Karsinom	1 ay+	Çap 3,5	Orta	T2N0M0
D12	83	F	Akciğer	Normal				
E1	76	M	Akciğer Tümörü	Alveoler Hücreli Karsinom	2 hafta	Çap 0,8	İyi	T1N0M0
E2	26	M	Akciğer	Normal				
E3	68	M	Lenfoma	Lenfoma	12 ay	6x5x4	İyi	T1N0M0
E4	29	M	Lenf Düğümü	Normal				
E5	76	M	Lenfoma	B Hücreli Lenfoma	N/A	N/A	N/A	N/A
E6	61	F	Lenf Düğümü	Normal				
E7	60	F	Yumurtalık Tümörü	Adenokarsinom	1 ay	5x5x4	Zayıf	T3N3M1
E8	50	F	Yumurtalık	Normal				
E9	34	F	Yumurtalık Tümörü	Kist-Adeno karsinom	2 yıl+	12x11,5x4	Zayıf	N/A
E10	60	M	Yumurtalık	Normal				
E11	N/A	N/A	Pankreas Tümörü	Adenom karsinom	N/A	N/A	N/A	N/A
E12	66	M	Pankreas	Normal				
F1	59	M	Parotis tümörü	Plasmasitom	2 ay	6x5x4	N/A	T2N0M0
F2	25	M	Parotis	Normal				
F3	63	M	Prostat Tümörü	AdenoKarsinom, Müköz	N/A	N/A	N/A	N/A
F4	23	M	Prostat	Normal				
F5	54	E	Rektum Tümörü	Adenokarsinom, ülser	7 ay	6x4,5x1	Orta	T3N0M0
F6	23	E	Rektum	Normal				
F7	71	E	Rektum Tümörü	Adenokarsinom	20 gün	Çap 2	Orta	T2N0M0
F8	24	E	Rektum	Normal				
F9	43	E	Deri Tümörü	Melanom	N/A	N/A	N/A	N/A
F10	44	K	Deri	Normal				
F11	68	K	İnce bağırsak Tümörü	Adenokarsinom, Ülser	3 ay	3x4	İyi	T2N0M0
F12	36	E	İnce bağırsak	Normal				
G1	N/A	N/A	Yumuşak Doku Tümörü	Rhabdomyosarkom	N/A	N/A	N/A	N/A
G2	24	E	Yumuşak Doku	Normal İskelet Kası				
G3	40	E	Mide Tümörü	Adenokarsinom	2 ay	3,6x3,5x2	Orta	T2N1M0
G4	66	E	Mide	Normal				
G5	48	E	Mide Tümörü	Adenokarsinom	1 ay	6x5x2	Zayıf	T3N1M0
G6	39	K	Mide	Normal				
G7	42	K	Mide Tümörü	Adenokarsinom	15 gün	4,2x4,2x2	Orta	T2N1M0
G8	47	E	Mide	Normal				
G9	43	E	Testis Tümörü	Seminom	2 ay	2,5x1,5x1,5	N/A	T1NxM0
G10	27	E	Testis	Normal				
G11	66	K	Tonsil Tümörü	Skuamöz Hücreli Karsinom	1 yıl	N/A	İyi	TxN1M0
G12	76	E	Tonsil	Normal				

Tablo 4.8: Devam.

H1	60	E	Farenks Tümörü	Skuamöz Hücreli Karsinom	1 ay	2,9x2,5x1,2	Orta-İyi	T2N0M0
H2	26	E	Farenks	Normal				
H3	43	K	Timüs Tümörü	Timoma	10 gün	16x10x10	İyi	T3N0M0
H4	29	E	Timüs	Normal				
H5	27	K	Tiroid Tümörü	Papiller Adenokarsinom	15 yıl	1,7x1,5x1,2	Orta	T1N0M0
H6	23	E	Tiroid	Normal				
H7	58	E	Tiroid Tümörü	Adenokarsinom	6 ay	5x4,6x4	Zayıf	T3N0M0
H8	26	E	Tiroid	Normal				
H9	49	K	Uterus Tümörü	Leiomyoma	24 ay	N/A	İyi	N/A
H10	8	E	Uterus	Normal				
H11	62	K	Uterus Tümörü	Adenokarsinom	2 ay	Dia 0,1 cm	Zayıf	T1N0M0
H12	40	K	Uterus	Normal				

- N/A: Değerlendirilemedi
- T - Primer tümör
- Tx - Primer tümör değerlendirilemedi
- T0 - Primer tümör bulgusu yok
- Tis - Karsinoma in situ; epiteliçi veya lamina propria invazyonu
- T1 - Tümör submukoza'ya invaze
- T2 - Tümör muscularis propria'ya invaze
- T3 - Tümör muscularis propriadan subserosa'ya veya periton-dışı perikolik veya perirektal dokulara invaze
- T4 - Tümör doğrudan diğer dokulara invaze ve/veya peritonu perfor etmiş
- N - Bölgesel lenf düğümleri
- Nx - Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemedi
- N0 - Bölgesel lenf düğümü metastazı yok
- N1 - 1-3 bölgesel lenf düğümüne metastaz
- N2 - 4 veya daha fazla bölgesel lenf düğümüne metastaz
- M - Uzak metastaz
- Mx - Uzak metastaz değerlendirilemedi
- M0 - Uzak metastaz yok
- M1 - Uzak Metastaz var

4.2.8. İmmünofloresan

Sterilize edilmek için %100 alkole batırılıp alevden geçirilen lameller 6 – kuyulu hücre kabına yerleştirildi. Ardından her bir kuyuya $1 - 3 \times 10^5$ hücre lamellerin üzerine ekilip 2 ml besiyerinde 1 gece boyunca büyümeleri beklenmiştir. Ertesi gün, iki kere soğuk PBS ile yıkanan hücreler %4 paraformaldehit ile 5 dk. inkübe edilerek fikse edilmiştir. İki kere PBS ile yıkanan hücreler, 2 dk. %0,1 TritonX-100 ile muamele edilip geçirgenlik sağlanmıştır. Tekrar 2 kere PBS ile yıkanan hücreler bloklama için 45 dk. %5 FBS ile oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hücreler bloklamanın ardından primer antikor olarak kullanılan hibridoma süpernatantları ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Kontrol örneklerinde ise hibridoma süpernatantları yerine IgG1 izotip antikorları kullanılmıştır. 5 – 6 kere PBS ile yıkamanın ardından hücreler 45 dk boyunca uygun ikincil antikorla (AlexaFluor Green 488) muamele edilmiştir. %5 FBS içerisinde hazırlanan ikincil antikora ayrıca son hali 1:100.000 olacak şekilde DAPI (5 mg/ml) de katılmıştır. Son olarak ise 3 kere PBS ve 1 kere de ddH₂O ile yıkanan lameller, lam üzerine sabitleme çözeltisi ile yerleştirilmiştir. İkinci antikorun eklenmesinden sonraki tüm aşamalar karanlıkta gerçekleştirildi. Boyanan hücreler floresan mikroskopta (Nikon Eclipse 80i) incelenip, Nikon Digital Sight DS – 5Mc kamera ile fotoğraflandı.

4.2.9. Oksidatif Stres İndüksiyonu

Oksidatif stresin FLASH lokalizasyonuna olan etkisini incelemek için HuH7 hücreleri, 72 saat boyunca %0,1 FBS içeren besiyerinde inkübe edildiler. 72 saatin ardından 24 saat daha 100 uM H₂O₂ içeren %0,1 FBS’li besiyerinde inkübe edildiler.

4.2.10. İstatistiksel Analizler

HCC hücre hatlarından elde edilen *CASP8AP2* gen ifadeleri, hem geometrik ortalamaya göre hem de sağlıklı insan karaciğerine göre kalibre edilmişlerdir. İki farklı kalibratör ile elde edilen sonuçlar ise Pearson Korelasyon testine tabi tutulmuştur.

5. BULGULAR

5.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

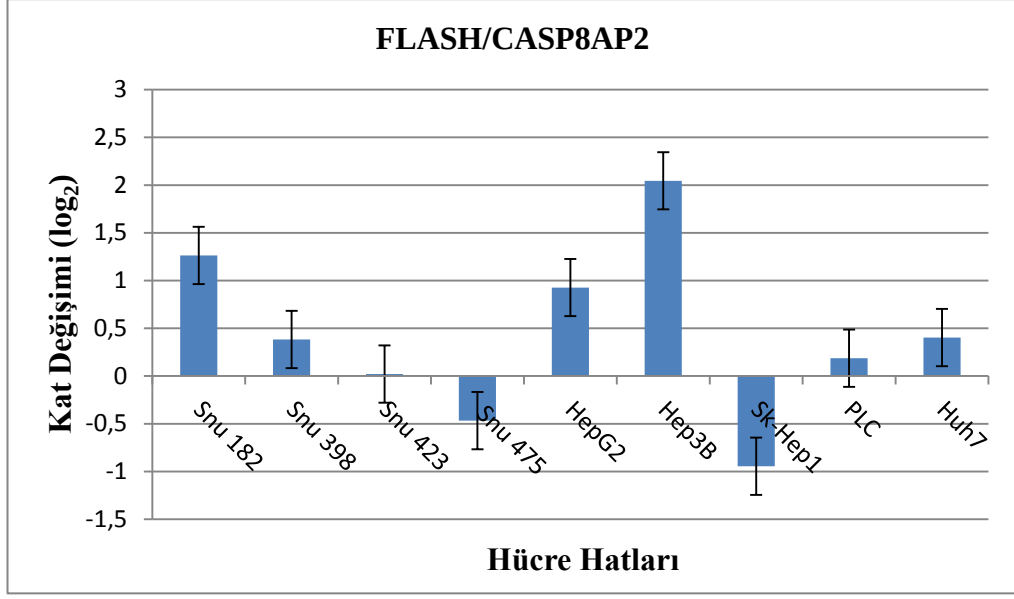
Kültüre edilip büyütülen hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA konsantrasyonu NanoSpec spektrometre cihazı ile ölçüldü. Ölçüm sonucunda OD 260/280 oranı 2,06 ve RNA konsantrasyonu 400 – 800 ng/ul olarak bulundu.

İzole edilen RNA'lerden cDNA sentezi yapıldı. Sentezlenen cDNA miktarı NanoSpec spektrometre cihazı ile ölçüldü. Ölçüm sonucunda 260/280 OD değeri 1,78 - 1,82 ve tek-zincir DNA miktarı 200 – 300 ng/ul olarak bulundu.

5.2. RT – qPCR ile Gen İfadesi Analizi

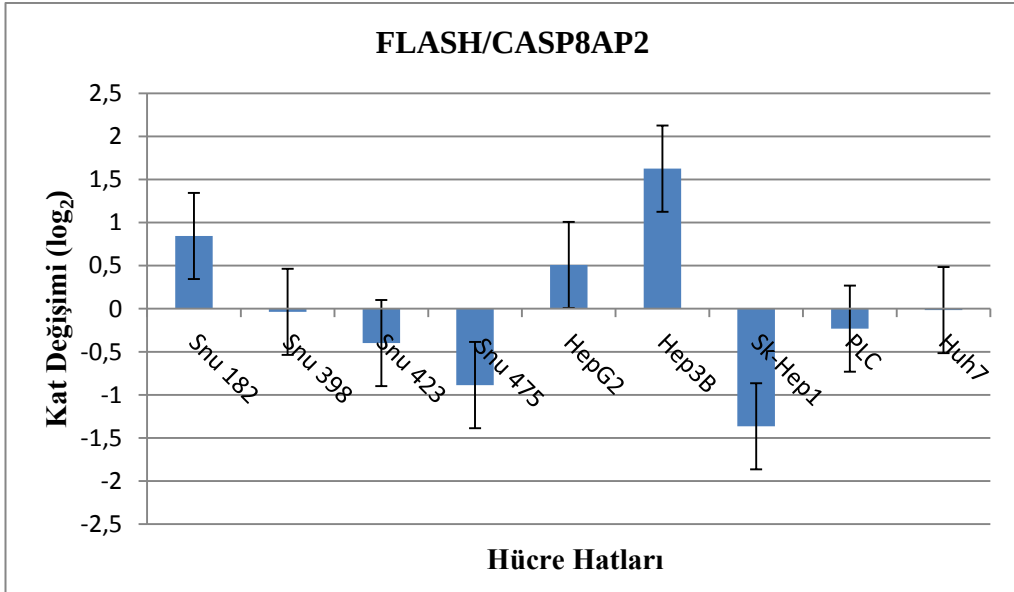
5.2.1. HCC Hücre Hatları ve Normal İnsan Karaciğer Total RNA Ekstraktında CASP8AP2 İfadesinin Analizi

Kültüre edilip büyütülen HCC hücre hatlarından ve normal insan karaciğer total RNA ekstraktından sentezlenen cDNA'lar kullanılarak RT-qPCR ile CASP8AP2 geninin ifadesi araştırıldı. Normalizatör olarak yine aynı örneklerdeki GAPDH gen ifadesi kullanıldı. Kalibratör olarak ise ya normal insan karaciğerinden elde edilen CASP8AP2 gen ifadesi (Şekil 5.1), ya da HCC hücre hatlarından elde edilen CASP8AP2 gen ifadelerinin geometrik ortalamaları (Şekil 5.2) kullanıldı. $\Delta\Delta C_t$ metoduna göre hesaplanan ve log2 tabanında ifade edilen CASP8AP2 gen anlatımındaki göreceli değişimler şekil 5.1 ve 5.2'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1: Sağlıklı insan karaciğerine göre kalibre edilmiş *CASP8AP2* gen ifadeleri.

HCC hücre hatları, hepatosit veya projenitör hücre kökenlidir. Kalibratör olarak kullanılan sağlıklı insan karaciğeri ise, karaciğer hepatositlerine ek olarak bu organdaki diğer tip hücreleri de içermekte olduğundan, elde edilen bulguları teyit etmek için *CASP8AP2* ifadelerinin HCC'deki geometrik ortalamaları da kalibratör olarak kullanılmıştır.



Şekil 5.2: HCC hücre hatlarındaki geometrik ortalama göre kalibre edilmiş *CASP8AP2* gen ifadeleri.

qPCR analizleri sonucunda (Şekil 5.1 ve 5.2), Hep3B, HepG2 ve Snu182 hücre hatlarında *CASP8AP2* ifadelenmesi artış yönünde bir eğilim gösterirken, Sk-Hep1 ve Snu 475 nispeten azalmaya yönelik bir eğilim göstermiştir. Ama temel olarak 9 farklı HCC hücre hattının tamamı düşünüldüğünde *CASP8AP2* gen ifadesinde aşırı bir değişime (over-expression veya down-regulation) rastlanılmamıştır.

Ardından, her iki kalibratöre göre elde edilen sonuçlar arasında Pearson Korelasyon analizi de gerçekleştirildi (Tablo 5.1).

Tablo 5.1: HCC hücre hatlarında *CASP8AP2* ifadelerinin iki farklı kalibratör arasındaki Pearson Korelasyon analizi. Skala, (-1) ile (+1) aralığındadır.

Hücre Hattı	Korelasyon Katsayısı
Snu 182	0,68
Snu 398	0,97
Snu 423	0,67
Snu 475	0,80
HepG2	0,50
Hep3B	0,30
Sk-Hep1	0,95
PLC	0,99
Huh7	0,27

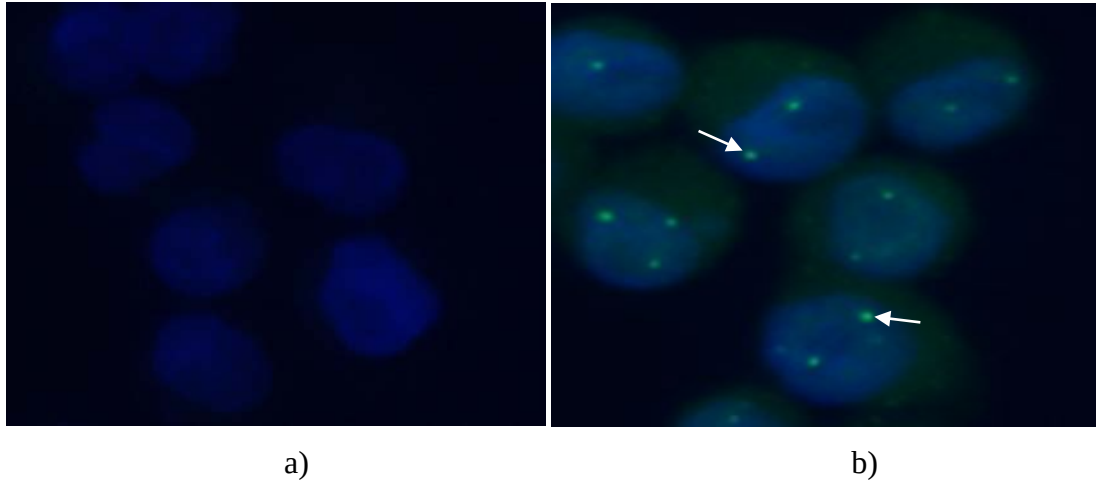
İki farklı kalibratör kullanıldığında elde edilen sonuçlara göre, Snu 398, Sk-Hep1, PLC ve Snu 475 yüksek korelasyon, Snu 182, Snu 423 ve HepG2 hücreleri orta seviye korelasyon, Hep3B ve Huh7 hücreleri ise düşük korelasyon sergilemişlerdir.

5.3. Anti – FLASH Antikoru ile İmmünofloresan

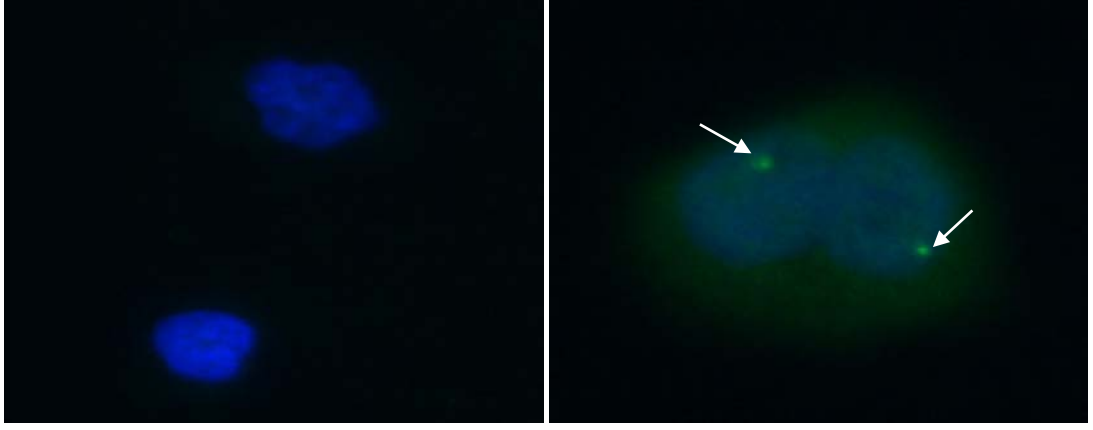
5.3.1. Hela ve HCC Hücre Hatlarının Anti – FLASH Antikoru ile Boyanması

Daha önce geliştirilen poliklonal antikorlar HeLa hücrlerinde test edildiğinden, HeLa hücre hattı, FLASH protein ifadesi için pozitif kontrol olarak kullanıldı [Barcaroli et al., 2006a]. Lamel üzerinde büyütülen HeLa hücre hattı ve diğer HCC hücre hatları anti – FLASH antikoru kullanılarak boyandı. Nükleuslar ise DAPI ile boyandı.

Hem HeLa (Şekil 5.3) hem de HCC hücre hatlarında (Şekil 5.4 – 5.12) FLASH proteininin lokalize olduğu nükleer cisimcikler görülmekle beraber nükleus ve sitoplâzmayı kapsayan diffüz bir boyanma da gözlemlendi.



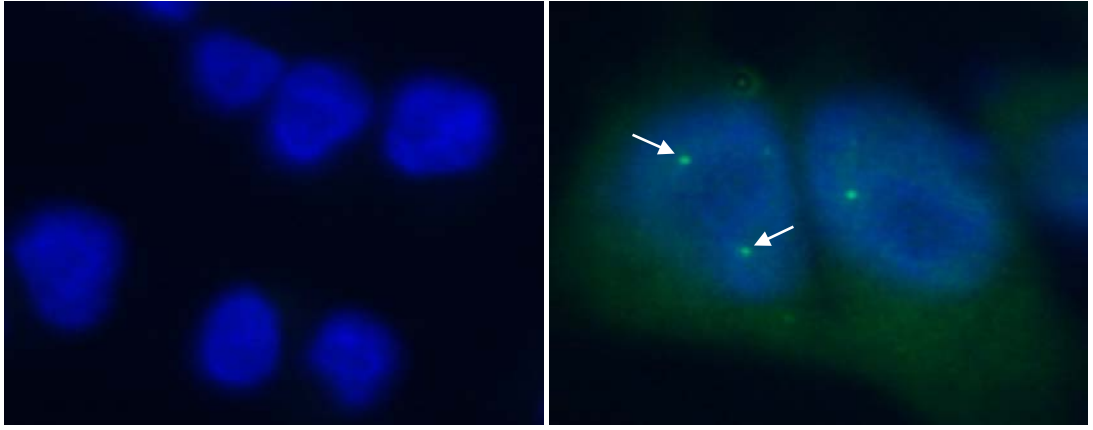
Şekil 5.3: HeLa hücre hattında a) İzotip antikoru, b) anti – FLASH antikoru kullanılarak elde edilen immünofloresan boyama görüntüleri. Nükleuslar DAPI ile boyanmıştır. Beyaz oklar, FLASH'ın lokalize olduğu cisimcikleri göstermektedir. Büyütme 400X'dir.



a)

b)

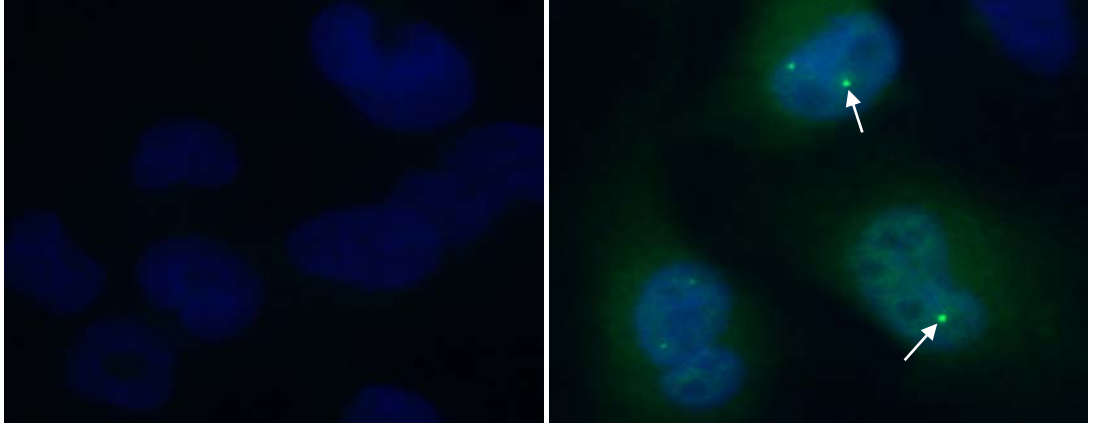
Şekil 5.4: Snu 182 hücre hattında a) İzotip antikor, b) anti – FLASH antikor kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri. Nükleuslar DAPI ile boyanmıştır. Beyaz oklar, FLASH'ın lokalize olduğu cisimcikleri göstermektedir. Büyütme 400X'dir.



a)

b)

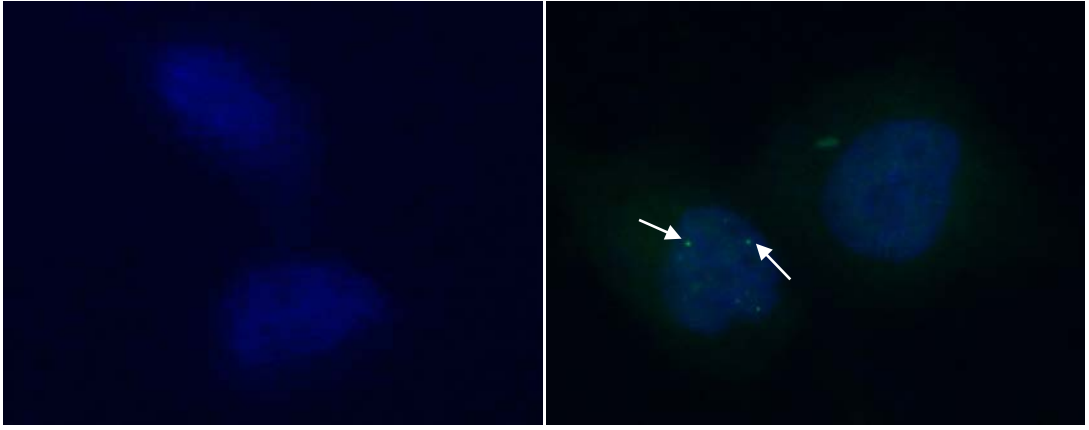
Şekil 5.5: Snu 398 hücre hattında a) İzotip antikor, b) anti – FLASH antikor kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri. Nükleuslar DAPI ile boyanmıştır. Beyaz oklar, FLASH'ın lokalize olduğu cisimcikleri göstermektedir. Büyütme 400X'dir.



a)

b)

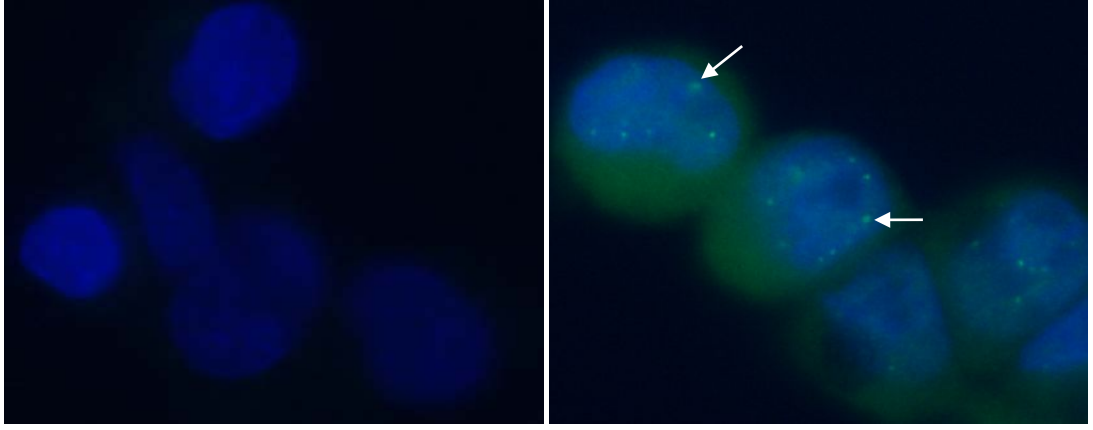
Şekil 5.6: Snu 423 hücre hattında a) İzotip antikor, b) anti – FLASH antikor kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri. Nükleuslar DAPI ile boyanmıştır. Beyaz oklar, FLASH'ın lokalize olduğu cisimcikleri göstermektedir. Büyütme 400X'dir.



a)

b)

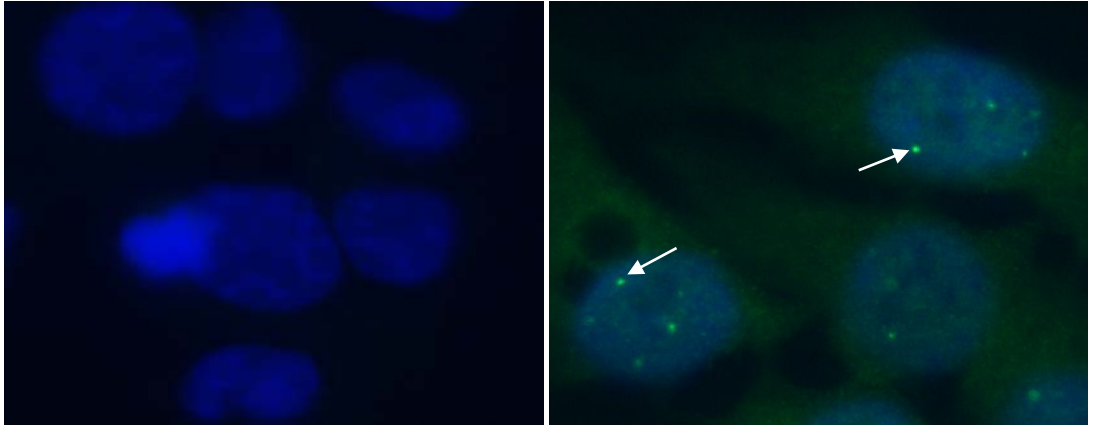
Şekil 5.7: Snu 475 hücre hattında a) İzotip antikor, b) anti – FLASH antikor kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri. Nükleuslar DAPI ile boyanmıştır. Beyaz oklar, FLASH'ın lokalize olduğu cisimcikleri göstermektedir. Büyütme 400X'dir.



a)

b)

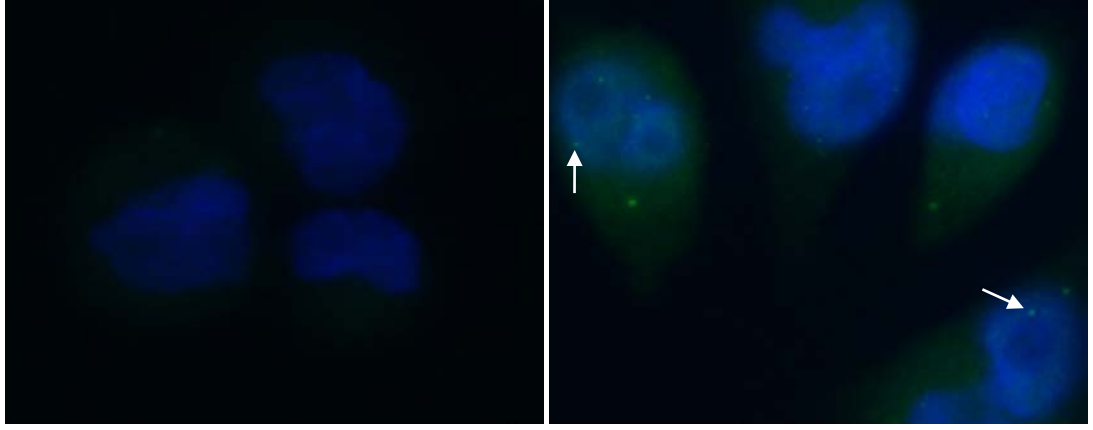
Şekil 5.8: HepG2 hücre hattında a) İzotip antikor, b) anti – FLASH antikor kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri. Nükleuslar DAPI ile boyanmıştır. Beyaz oklar, FLASH'ın lokalize olduğu cisimcikleri göstermektedir. Büyütme 400X'dir.



a)

b)

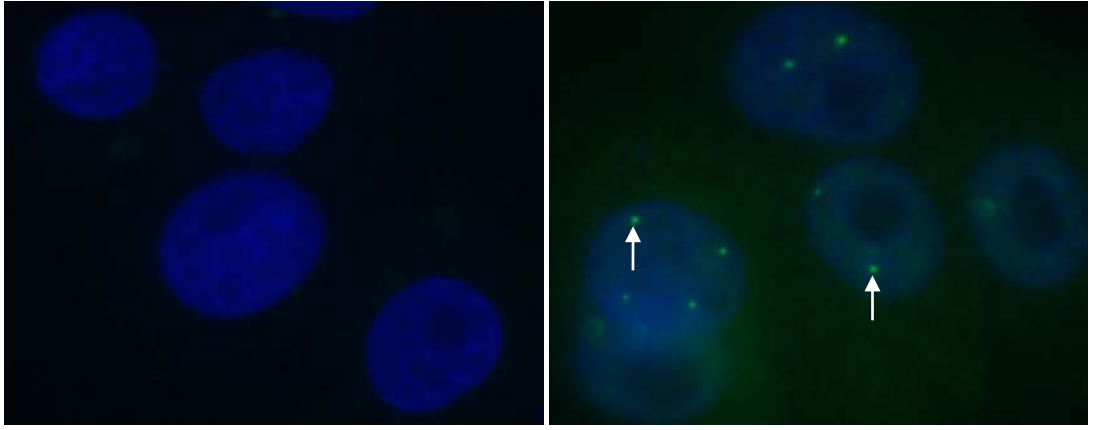
Şekil 5.9: Hep3B hücre hattında a) İzotip antikor, b) anti – FLASH antikor kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri. Nükleuslar DAPI ile boyanmıştır. Beyaz oklar, FLASH'ın lokalize olduğu cisimcikleri göstermektedir. Büyütme 400X'dir.



a)

b)

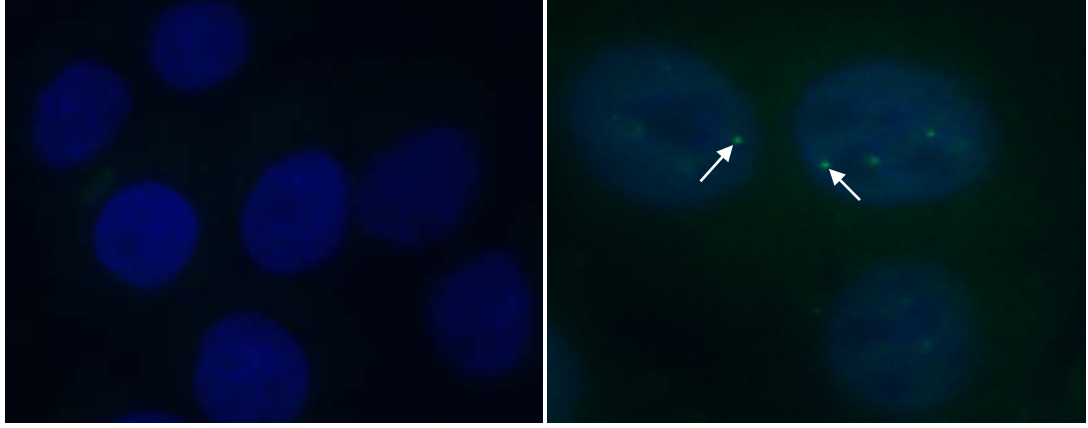
Şekil 5.10: Sk-Hep1 hücre hattında a) İzotip antikor, b) anti – FLASH antikor kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri. Nükleuslar DAPI ile boyanmıştır. Beyaz oklar, FLASH'ın lokalize olduğu cisimcikleri göstermektedir. Büyütme 400X'dir.



a)

b)

Şekil 5.11: PLC hücre hattında a) İzotip antikor, b) anti – FLASH antikor kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri. Nükleuslar DAPI ile boyanmıştır. Beyaz oklar, FLASH'ın lokalize olduğu cisimcikleri göstermektedir. Büyütme 400X'dir.



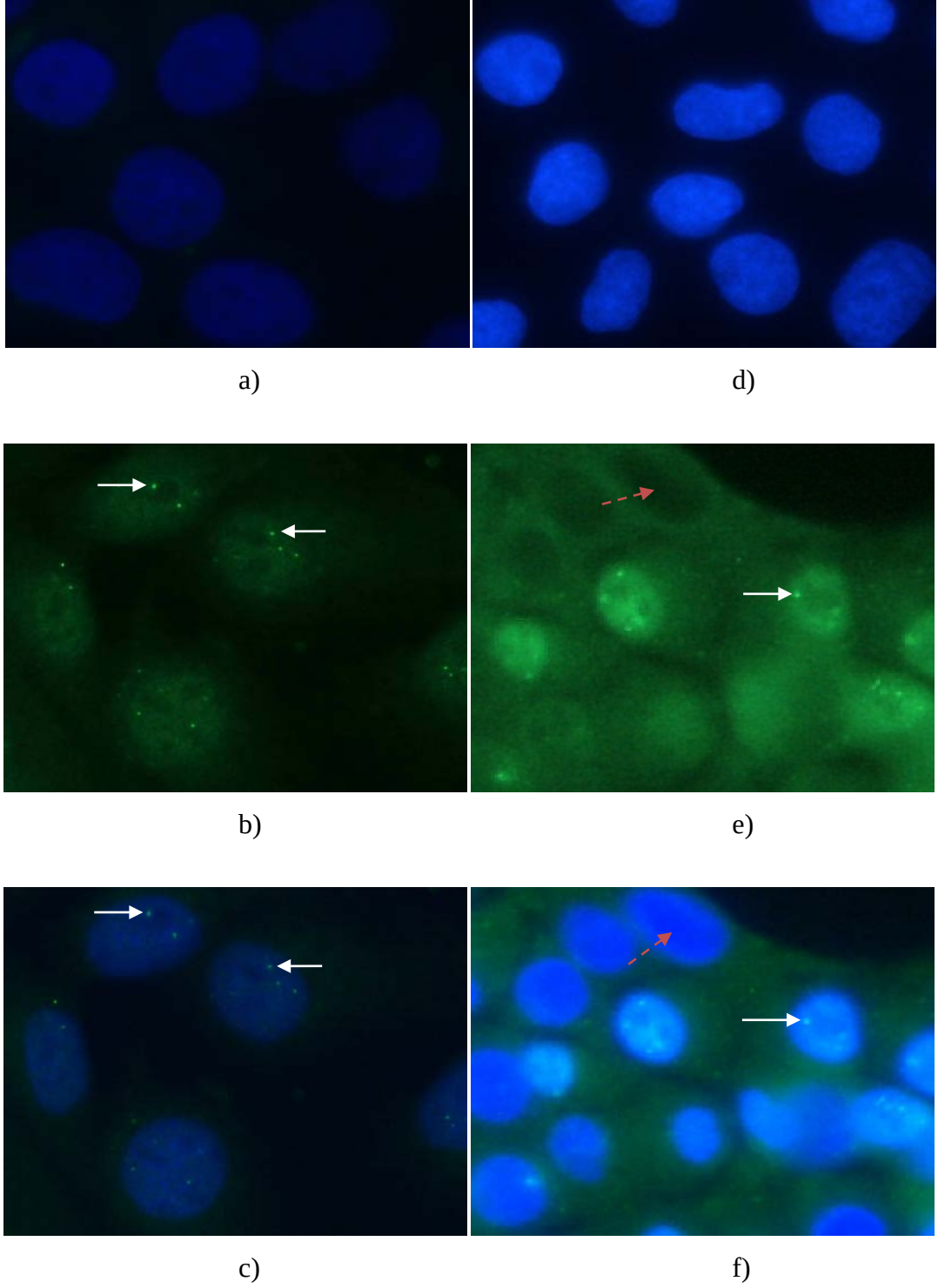
a)

b)

Şekil 5.12: Huh7 hücre hattında a) İzotip antikoru, b) anti – FLASH antikoru kullanılarak elde edilen immünfloresan boyama görüntüleri. Nükleuslar DAPI ile boyanmıştır. Beyaz oklar, FLASH'ın lokalize olduğu cisimcikleri göstermektedir. Büyütme 400X'dir.

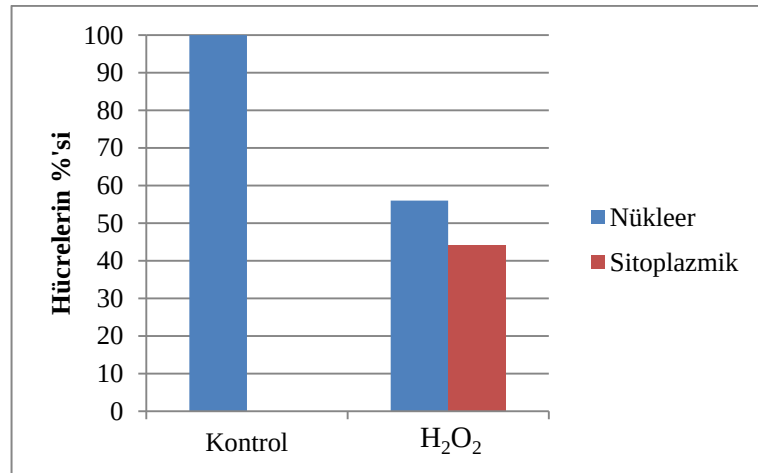
5.3.2. Oksidatif Strese Maruz Bırakılmış Huh7 Hücre Hattında FLASH Proteininin İmmünfloresan Boyanması

Huh7 hücrelerinin düşük serumlu (%0,1) ortamda 100 μ M H_2O_2 ile muamele edildiğinde oksidatif strese uğradıkları bilinmektedir [Sayan et al., 2001b]. Buna dayanarak, lamel üzerinde büyütülen HuH7 hücreleri 72 saat %0,1 FBS içeren besiyerinde inkübe edildikten sonra, 100 μ M H_2O_2 içeren ve FBS oranı %0,1 olan besiyerinde 24 saat daha inkübe edildi. İmmünfloresan boyama sonucunda oksidatif strese maruz bırakılmayanlar ile karşılaştırıldığında, nükleusta gözlenen hem spesifik FLASH noktacıklarının hem de diffüz FLASH ışımalarının kaybolduğu gözlemlendi (Şekil 5.13). Bu durum, apoptotik uyarım sonucu gerçekleşen FLASH translokasyonuna benzerlik göstermektedir [Milovic-Holm et al., 2007].



Şekil 5.13: Oksidatif stres sonucu FLASH'ın sitoplazmaya translokasyonu. Oksidatif strese maruz bırakılmadan normal serumlu ortamda büyütülen HuH7 hücre hatlarında a) izotip antikor, b), c) anti – FLASH antikor kullanılarak gerçekleştirilen immünfloresan boyama görüntüleri ile oksidatif strese maruz bırakılan HuH7 hücre hatlarında d) izotip antikor, e), f) anti – FLASH antikor kullanılarak gerçekleştirilen immünfloresan boyama görüntüleri. Beyaz oklar, FLASH'ın lokalize oldukları nükleer cisimcikleri, kırmızı kesik çizgili oklar ise oksidatif stres sonucu FLASH'ın terk ettiği nükleusları göstermektedir. Nükleuslar DAPI ile boyanmıştır. Büyütme 400X'dir.

Oksidatif stres sonucu FLASH translokasyonu gösteren hücrelerin yüzdesini belirlemek için hem normal şartlarda büyütülen hem de oksidatif strese maruz bırakılan hücreler immünfloresan yöntemiyle analiz edilmiş ve 500 hücre sayılmıştır. Normal şartlar altındaki hücrelerde herhangi bir FLASH translokasyonuna rastlanılmamıştır. Oksidatif strese baruz bırakılan hücrelerin ise %56'sında FLASH halen nükleusta lokalize iken, %44'ünde FLASH translokasyonu saptanmıştır (Şekil 5.14).

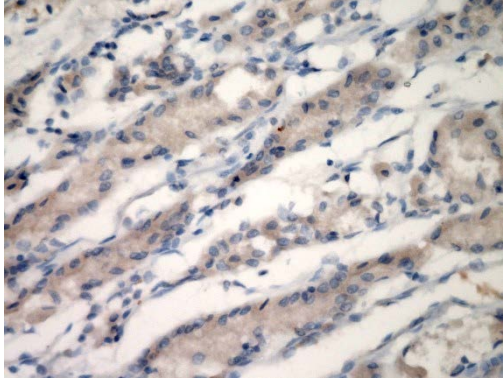


Şekil 5.14: Oksidatif stres sonucu FLASH'ı nükleus veya sitoplazma lokalizasyonlu gösteren hücrelerin oranı.

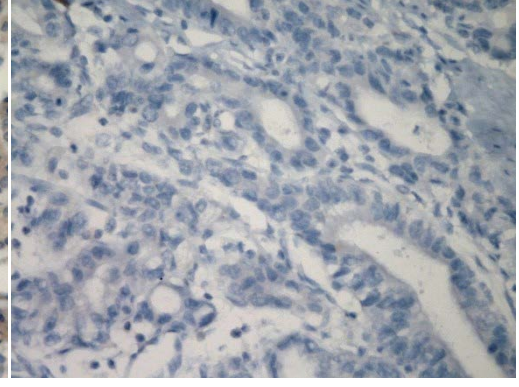
5.4. Parafin Doku Makrodizinlerinde İmmünohistokimya Boyamaları

Parafin Doku Makrodizinler kullanılarak hem HCC ile eşlenik dokular arasında hemde diğer tip kanser dokularında FLASH protein ifadesi immünohistokimya yöntemiyle incelendi. 1. panelde sağlıklı dokularıyla kıyaslanarak 16 karaciğer kanseri örneği (Katalog No: Z7020059), 2. panelde ise farklı türdeki kanserler ve ilgili sağlıklı dokuları (Katalog No: T8235713-5) incelenmiştir. Boyanmaların yaygınlıkları ve şiddetleri (+) ile (+++) skalasında değerlendirildi.

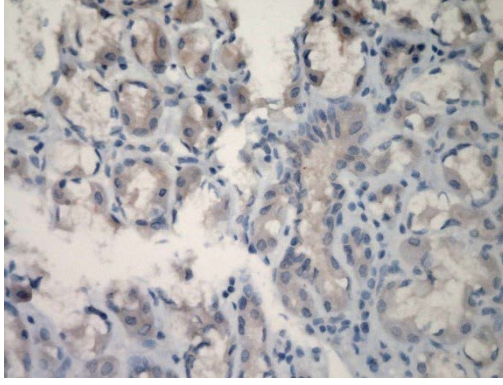
İmmünohistokimyasal analizler sonucunda sadece 2. panelde üç normal mide örneğinde (G4, G6 ve G8) FLASH boyanması gözlenmiştir (Şekil 5.15a, b ve c). Bu boyamalar mide epitelinde ve sitoplazmik olup, yaygınlıkları (++), şiddeti ise (+) düzeyindedir. Bu üç örneğin karşılık gelen kanserli örneklerinde ise FLASH boyanmasına rastlanmamıştır (Şekil 5.15d, e ve f).



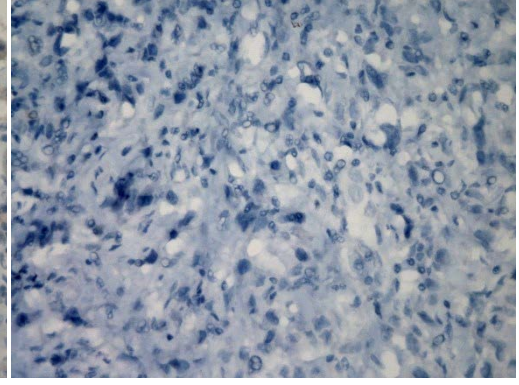
a)



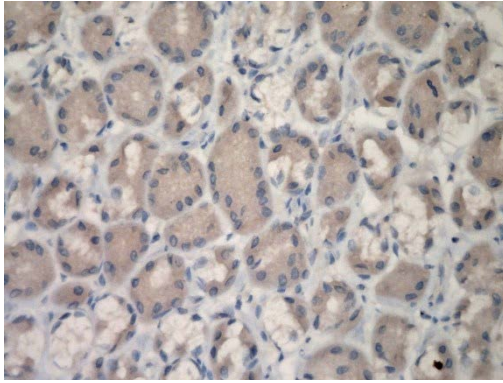
d)



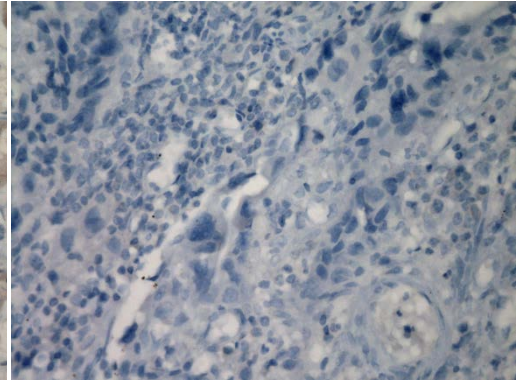
b)



e)



c)



f)

Şekil 5.15: Parafin doku makrodizinlerinde anti – FLASH antikorunu kullanılarak gerçekleştirilen immünohistokimya analizi. a), b), c) 3 farklı sağlıklı mide dokusunu; d), e), f) ise sırasıyla karşılık gelen kanserli dokuları göstermektedir. Büyütme 200X'dir.

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karaciğer kanseri kansere bağlı ölümler arasında erkeklerde 2. ve kadınlarda ise 6. sırada olup en önde gelen tipi Hepatoselüler Karsinom (HCC)'dur. Her yıl HCC teşhisi konulanların sayısında ve buna bağlı ölümlerde tıpkı diğer kanserler gibi artış gözlenmektedir. Bu sebepten ötürü HCC tanı ve teşhisinde kullanılabilecek belirteçlerin bulunması önem arz etmektedir. HCC'dan muzdarip hastalardan elde edilip kültüre edilen HCC hücre hatları hem HCC tanısına yönelik yapılan moleküler analizler, hem de kanserli hücrelerin kanserleşme süreçlerinde geçirdikleri değişimleri inceleme açısından önemli materyallerdir. HCC hücre hatlarında gen ve protein düzeyindeki değişimler incelenerek HCC hücrelerinin kanserleşme süreçleri ve sergiledikleri fizyopatolojik durumlar aydınlatılabilir ve bu süreçleri aydınlatacak belirteçler bulunabilir.

CASP8AP2 geni tarafından üretilen FLASH proteini 1999'da Imai ve ark. [Imai et al., 1999] tarafından pro-apoptotik bir protein olarak bulunmuştur. Devam eden çalışmalarda transkripsiyondaki görevlerine ek olarak [Choi et al., 2001], [Jun et al., 2005], [Kino and Chrousos, 2003], [Kino et al., 2004], [Obradović et al., 2004], [Morgan et al., 2004], [Alm-Kristiansen et al., 2008], apoptotik özelliğinin tersine, histon pre – mRNA olgunlaşması gibi hücrenin sağ kalımı için gerekli özellikleri de aydınlatılmıştır [Barcaroli et al., 2006a], [Barcaroli et al., 2006b], [Kiriyaama et al., 2009], [Milovic-Holm et al., 2007], [Krieghoff et al., 2007], [Yang et al., 2009], [Yang et al., 2011], [Bongiorno-Borbone et al., 2008], [Yang et al., 2013], [De cola et al. 2012]. FLASH'ın hücre içindeki lokalizasyonu için farklı öneriler getirilse de [Imai et al., 1999], [Kino and Chrousos, 2003], FLASH'ın nükleusta hem PML – NB'lerde [Milovic-Holm et al., 2007], [Krieghoff et al., 2007] hem de HLB'lerde [Barcaroli et al., 2006], [Bongiorno-Borbone et al., 2008], [Yang et al., 2013] lokalize olduğu keşfedilmiştir. PML – NB'lerde lokalize olan FLASH, apoptotik CD95 uyarımı üzerine sitoplazmaya göç edip mitokondri üzerinde Kaspaz-8'i aktive etmektedir. HLB'lerde bulunan FLASH ise histon pre – mRNA'larının 3' uç kesiminde görevlidir.

Farklı kanser tiplerinde hem hücre hattı hem de doku temelinde yapılan çalışmalara göre, FLASH bütünlüğünün kanserlerde korunması gerekmektedir. Fakat, kan kanseri tiplerinden ALL ve T – LBL'de yüksek *CASP8AP2* ifadesi,

hastaların iyi bir prognoz gösterebilmeleri için gerekli gibi gözükmetedir [Flotho et al., 2006], [Callens et al., 2012], [Remke et al., 2009], [Jiao et al., 2012], [Li et al., 2013]. Farklı kanser tiplerinde yapılan mutasyon analizlerine göre ise, kolorektal hücre hatlarının %10'undan fazlasında *CASP8AP2* mutasyonu görülmüş [Park et al., 2002], fakat bu durum ne kolorektal karsinom [Jeong et al., 2008] ne de gastrik karsinom dokularında [Jeong et al., 2007] doğrulanmış, hatta gastrik karsinom dokularında yüksek FLASH protein ifadesi gözlenmiştir [Jeong et al., 2007].

FLASH'ın hem apoptotik hem de tam tersi şekilde hücre döngüsünün devamı için gereken görevleri göz önüne alındığında, HCC hücre hatları ve dokularındaki durumu da merak konusudur.

Bu çalışmada 9 farklı HCC hücre hattında FLASH'ın gen ve protein ifadelenmesi incelenmiştir. Bu amaçla hücrelerdeki FLASH transkript seviyesi RT – qPCR ile, FLASH protein lokalizasyonu ise immünfloresan yöntemiyle saptanmıştır. Parafin doku makrodizinleri kullanılarak hem sağlıklı hem de kanserli pek çok farklı tipteki dokuda FLASH ifadelenmesi incelenmiştir. İmmünfloresan ve immünhistokimya analizlerinde ise, Prof. Dr. Tamer Yağcı tarafından Bilkent Üniversitesinde geliştirilen ve FLASH proteinine spesifik antikor üreten 1A4 hibridoma hücre hattı kullanılarak laboratuvarımızda üretilen antikorlar kullanılmıştır.

Yapılan RT – qPCR analizleri sonucunda farklı tipteki HCC hücre hatlarında göze çarpar bir aşırı ifadelenme veya düşük ifadelenmeye rastlanılmamıştır. Snu hücre hatları (Snu 182, 398, 423 ve 475) ve Sk-Hep1 hücre hattı az farklılaşmış ve invaziv özellikler sergilerken, diğer hücre hatlarının (HepG2, Hep3B, PLC ve Huh7) farklılaşma düzeyleri iyi olup invaziv değildir [Yuzugullu et al., 2009]. Bu sebeple 9 hücre hattı farklılaşma ve invazivlik özelliklerine göre iki gruba ayrılabilir. *CASP8AP2*, geometrik ortalamaya göre kalibre edildiğinde, Snu 398, Snu 423 ve Snu 475 hücre hatlarının *CASP8AP2* ifadelerinde azalma gözlenirken, diğer grup hücrelerden HepG2 ve Hep3B hücrelerindeki *CASP8AP2* ifadesinde artış gözlenmiştir. Fakat 9 hücre hattının hepsi göz önüne alındığında, bu hücre hatları arasında *CASP8AP2* ifadesine göre belirgin bir gruplama yapılamamaktadır.

Floresan mikroskobu ile elde edilen görüntülerde, HCC hücre hatlarında da FLASH'ın nükleer cisimciklerde lokalize olduğu gösterilmiştir. Bu nükleer cisimler, HCC hücre hatlarındaki PML – NB'leri [Milovic-Holm et al., 2007] veya HLB'leri [Bongiorne-Borbone et al., 2008] işaret edebilir. Buna ek olarak hem nükleus hem de sitoplazmada diffüz FLASH boyanması da elde edilmiştir. FLASH'ın sadece

nükleusta değil, sitoplazmada da lokalize olduğunu gösteren yayınlar da mevcuttur [Imai et al., 1999], [Kino and Chrousos, 2003].

Ek olarak, literatürde belirtilen apoptotik translokasyona benzer şekilde [Milovic-Holm et al., 2007], [Krieghoff et al., 2007] oksidatif stres sonucunda da FLASH'ın nükleustan sitoplazmaya transloke olduğu, ilk defa HCC hücre hatlarında gösterilmiştir. Normal şartlar altında hücrelerin tamamında FLASH baskın şekilde nükleusta lokalize iken, oksidatif stres sonucunda hücrelerin ~%44'ünde FLASH translokasyonu gözlenmiştir.

RT – qPCR sonuçları ve immüno floresan sonuçları kıyaslanarak gen ve protein ifadenmesi arasındaki uyum da incelenmiştir. *CASP8AP2*'yi nispeten yüksek ifade eden Hep3B ve HepG2 hücre hatlarının protein ifadeleri de nispeten fazladır. *CASP8AP2*'yi nispeten daha düşük ifade eden Snu 475 ve Sk – Hep1 hücre hatlarında ise protein ifadeleri nispeten daha azdır. Snu 182 hücre hattının haricindeki diğer hücre hatlarının gen ve protein ifadenmeleri kıyaslandığında ise büyük bir uyumsuzluk gözlenmemiştir. Snu 182 hücre hattında *CASP8AP2* gen ifadesi düşük olmamasına rağmen, immüno floresan görüntülerinde yeterli protein ifadesi gözlenmemiştir.

Daha önce kanser hücre hattı ve dokularında yapılan çalışmalarda FLASH bütünlüğünün korunması gerektiği öne sürülmüştür. Parafin doku makrodizinlerinde yapılan immünohistokimya analizleri sonucunda, pek çok farklı tipteki normal ve kanserli dokular arasından yalnızca sağlıklı mide doku örneklerinde boyanma saptanmıştır. FLASH boyamasının sadece mide dokusunda gözlenmesinin nedenlerinden biri kullanılan antikorun yeterli konsantrasyonda olmaması olabilir. İmmünohistokimya çalışmalarında hibridoma hücre süpernatantları ek bir işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır. FLASH antikorunun konsantrasyonunu arttırmak için, hibridoma süpernatantlarında antikor saflaştırılması yapıp antikorun zenginleştirilmesi sağlanabilir. Ayrıca, doku örnekleri parafine gömülü halde fikse olduklarından, antikorun, FLASH'da karşılık gelen spesifik epitopu kapanmış olabilir. Bu sebeple, *in vitro* elde edilen sonuçların *in vivo*'ya aktarılabilmesi için fresh – frozen dokularda daha konsantre antikorlar kullanılarak yeni çalışmalar yapılmalıdır.

Sağlıklı mide dokusunda elde edilen FLASH boyanması, gastrik karsinomda elde edilen yüksek FLASH boyanması sonucuyla uyuşmamaktadır [Jeong et al., 2007]. Midenin haricinde zaten hiçbir dokuda FLASH boyanması gözlenmediğinden,

yukarıda bahsedilen faktörler değiştirilip denemeler tekrarlandıktan sonra ancak kesin bir sonuca varılabilir. Farklı denemeler sonucunda yine benzer bir sonuç alınır, pro – apoptotik bir protein olan FLASH'ın mide kanseri hücrelerinde baskılanmış olabileceği sonucuna varılabilir.

Yapılan tüm analizler sonucunda, FLASH'ın transkript ve protein düzeyleri arasında göze çarpan bir uyumsuzluk olmadığı ve anti-FLASH antikorunun *in vitro*'da literatürü doğrular şekilde FLASH'ı spesifik bir şekilde nükleustaki cisimciklerde tanıyabildiği, fakat bu sonuçların *in vivo*'ya aktarılmasında güçlük yaşandığı anlaşılmıştır.

7. ÖNERİLER

Monoklonal anti-FLASH antikorı *in vitro*'da istenilen sonuçları vermiştir. *In vivo* analizlerin de istenildiği şekilde gerçekleştirilebilmesi için antikorun zenginleştirilmesi veya deney koşullarının ve kullanılan doku örneği tiplerinin değiştirilmesi yoluna gidilebilir. Doku olarak fresh-frozen tipteki dokular kullanılabilir ve dokularda saklı kalan epitopların açığa çıkması için gerçekleştirilen “antigen retrieval” işlemi de optimize edilmelidir. Antikor zenginleştirilmesi ise Protein-G afinite kolonları vasıtasıyla gerçekleştirilebilir.

KAYNAKLAR

- Aksoy F., (1977), “Karaciğerin Histolojisi”, Türk Patoloji Dergisi, 4, 153-155.
- Alm-Kristiansen A. H., Sæther T., Matre V., Gilfillan S., Dahle Ø., Gabrielsen O. S., (2008), “FLASH acts as a co-activator of the transcription factor c-Myb and localizes to active RNA polymerase II foci”, *Oncogene*, 27, 4644–4656.
- Barcaroli D., Dinsdale D., Neale M. H., Bongiorno-Borbone L., Ranalli M., Munarriz E., Sayan A. E., McWilliam J. M., Smith T. M., Fava E., Knight R. A., Melino G., De Laurenzi V., (2006a), “FLASH is an essential component of Cajal bodies”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 14802–14807.
- Barcaroli D., Bongiorno-Borbone L., Terrinoni A., Hofmann T. G., Rossi M., Knight R. A., Matera A. G., Melino G., De Laurenzi V., (2006b), “FLASH is required for histone transcription and S-phase progression”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 14808–14812.
- Bongiorno-Borbone L., De Cola A., Vernole P., Finos L., Barcaroli D., Knight R. A., Melino G., De Laurenzi V., (2008), “FLASH and NPAT positive but not Coilin positive Cajal Bodies correlate with cell ploidy”, *Cell Cycle*, 7, 2357-2367.
- Bongiorno-Borbone L., De Cola A., Barcaroli D., Knight R. A., Di Ilio C., Melino G., De Laurenzi V., (2010), “FLASH degradation in response to UV-C results in histone locus bodies disruption and cell-cycle arrest”, *Oncogene*, 29, 802–810.
- Burch B. D., Godfrey A. C., Gasdaska P. Y., Salzler H. R., Duronio R. J., Marzluff W. F., Dominski Z., (2011), “Interaction between FLASH and Lsm11 is essential for histone pre-mRNA processing *in vivo* in *Drosophila*”, *RNA*, 17, 1132-1147.
- Callens C., Baleyrier F., Lengline E., Abdelali R. B., Petit A., Villarese P., Cieslak A., Minard-Colin V., Rullier A., Moreau A., Baruchel A., Schmitt C., Asnafi V., Bertrand Y., Macintyre E., (2012), “Clinical impact of *NOTCH1* and/or *FBXW7* mutations, *FLASH* deletion, and *TCR* status in pediatric T-cell lymphoblastic lymphoma”, *The Journal of Clinical Oncology*, 30, 1966-1973.
- Cha C., DeMatteo R. P., (2005), “Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development”, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 19, 25–37.
- Choi Y. H., Kim K. B., Kim H. H., Hong G. S., Kwon Y. K., Chung C. W., Park Y. M., Shen Z. J., Kim B. J., Lee S. Y., Jung Y. K., (2001), “FLASH coordinates NF- κ B activity via TRAF2”, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 25073–25077.
- De Cola A., Bongiorno-Borbone L., Bianchi E., Barcaroli D., Carletti E., Knight R. A., Di Ilio C., Melino G., Sette C., De Laurenzi V., (2012), “FLASH is essential during early embryogenesis and cooperates with p73 to regulate histone gene transcription”, *Oncogene*, 31, 573–582.

Flotho C., Coustan-Smith E., Pei D., Iwamoto S., Song G., Cheng C., Pui C-H., Downing J. R., Campana D., (2006), “Genes contributing to minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance of CASP8AP2”, *Blood*, 108, 1050-1057.

Imai Y., Kimura T., Murakami A., Yajima N., Sakamaki K., Yonehara S., (1999), “The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis”, *Nature*, 398, 777-785.

Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E. Forman D., (2011), “Global Cancer Statistics”, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61, 69–90.

Jeong E. G., Lee S. H., Lee H. W., Soung Y. H., Yoo N. J., Lee S. H., (2007), “Immunohistochemical and mutational analysis of FLASH in gastric carcinomas”, *APMIS*, 115, 900–905.

Jeong E. G., Lee S. H., Yoo N. J., Lee S. H., (2008), “Mutational analysis of FLASH and PTPN13 genes in colorectal carcinomas”, *Pathology*, 40, 31–34.

Jiao Y., Cui L., Gao C., Li W., Zhao X., Liu S., Wua M., Deng G., Li Z., (2012), “CASP8AP2 is a promising prognostic indicator in pediatric acute lymphoblastic leukemia”, *Leukemia Research*, 36, 67– 71.

Jun J-I, Chung C-W., Lee H-J., Pyo J-O., Lee K-N., Kim N-S., Kim Y. S., Yoo H-S., Lee T-H., Kim E., Jung Y-K., (2005), “Role of FLASH in caspase-8-mediated activation of NF- κ B: Dominant-negative function of FLASH mutant in NF- κ B signaling pathway”, *Oncogene*, 24, 688–696.

Kim H. W., Haider H. K., Jiang S., Ashraf M., (2009), “Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via mir-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2”, *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 33161–33168.

Kino T., Chrousos G. P., (2003), “Tumor necrosis factor receptor- and fas-associated FLASH inhibit transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by binding to and interfering with its interaction with p160 type nuclear receptor coactivators”, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 3023–3029.

Kino T., Ichijo T., Chrousos G. P., (2004), “FLASH interacts with p160 coactivator subtypes and differentially suppresses transcriptional activity of steroid hormone receptors”, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 92, 357–363.

Kiriyama M., Kobayashi Y., Saito M., Ishikawa F., Yonehara S., (2009), “Interaction of FLASH with arsenite resistance protein 2 is involved in cell cycle progression at S phase”, *Molecular and Cellular Biology*, 29, 4729-4741.

Krieghoff E., Milovic-Holm K., Hofmann T. G., (2007), “FLASH meets nuclear bodies”, *Cell Cycle*, 6, 771-775.

Li Z-G., Jiao Y., Li W-J., Deng G-R., Cui L., Gao C., Zhao X-X., Wu M-Y., Jia H-T., (2013), “Hypermethylation of two CpG sites upstream of CASP8AP2

promoter influences gene expression and treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia”, *Leukemia Research*, 37, 1287– 1293.

Milovic-Holm K., Krieghoff E., Jensen K., Will H., Hofmann T. G., (2007), “FLASH links the CD95 signaling pathway to the cell nucleus and nuclear bodies”, *The EMBO Journal*, 26, 391–401.

Morgan R., Nalliah A., El-Kadi A. S. M., (2004), “FLASH, a component of the FAS–CAPSASE8 apoptotic pathway, is directly regulated by Hoxb4 in the notochord”, *Developmental Biology*, 265, 105–112.

Nita M. E., Alves V. A. F., Carrilho F. J, Ono-Nita S. K., De Mello E. S., Gama-Rodrigues J. J., (2002), “Molecular aspects of hepatic carcinogenesis”, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44, 39 -48.

Obradović D., Tirard M., Ne'methy Z., Hirsch O., Gronemeyer H., Almeida O. F. X., (2004), “Daxx, FLASH, and Faf-1 modulate mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated transcription in hippocampal cells—toward a basis for the opposite actions elicited by two nuclear receptors?”, *Molecular Pharmacology*, 65, 761–769.

Park J., Betel D., Gryfe R., Michalickova K., Di Nicola N., Gallinger S., Hogue C. W. V., Redston M., (2002), “Mutation profiling of mismatch repair-deficient colorectal cancers using an *in Silico* genome scan to identify coding microsatellites”, *Cancer Research*, 62, 1284-1288.

Pfaffl, M. W., (2001), “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR”, *Nucleic Acids Research*, 29, 2002-2007.

Remke M., Pfister S., Kox C., Toedt G., Becker N., Benner A., Werft W., Breit S., Liu S., Engel F., Wittmann A., Zimmermann M., Stanulla M., Schrappe M., Ludwig W-D., Bartram C. R., Radlwimmer B., Muckenthaler M. U., Lichter P., Kulozik A. E., (2009), “High-resolution genomic profiling of childhood T-ALL reveals frequent copy-number alterations affecting the TGF- and PI3K-AKT pathways and deletions at 6q15-16.1 as a genomic marker for unfavorable early treatment response”, *Blood*, 114, 1053-1062.

Sayan A. E., Sayan B. S., Findikli N., Ozturk M., (2001a), “Acquired expression of transcriptionally active p73 in hepatocellular carcinoma cells”, *Oncogene*, 20, 5111-5117.

Sayan B. S., Ince G., Sayan A. E., Ozturk M., (2001b), “NAPO as a novel marker for apoptosis”, *The Journal of Cell Biology*, 155, 719–724.

Thorgeirsson S. S., Grisham J. W., (2002), “Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma”, *Nature Genetics*, 31, 339- 346.

Wang X. W., Hussain S. P., Huo T., Wu C-G., Forguesa M, Hofseth L. J., Brechot C., Harris C. C., (2002), “Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma”, *Toxicology* 181–182, 43 –47.

Web 1, (2012), <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/adult-primary-liver/HealthProfessional>, (Eriřim Tarihi: 16/09/2012).

Yang X-C., Burch B. D., Yan Y., Marzluff W. F., Dominski Z., (2009), “FLASH, a proapoptotic protein involved in activation of caspase-8, is essential for 3' end processing of histone pre-mRNAs”, *Molecular Cell*, 36, 267–278.

Yang X-C., Sabath I., Depski J., Kaus-Drobek M., Dadlez M., Marzluff W. F., Dominski Z., (2013), “A complex containing the CPSF73 endonuclease and other polyadenylation factors associates with u7 snRNP and is recruited to histone pre-mRNA for 3'-end processing”, *Molecular and Cellular Biology*, 33, 28-37.

Yang X-C., Xu B., Sabath I., Kunduru L., Burch B. D., Marzluff W. F., Dominski Z., (2011), “FLASH is required for the endonucleolytic cleavage of histone pre-mRNAs but is dispensable for the 5' exonucleolytic degradation of the downstream cleavage product”, *Molecular and Cellular Biology*, 31, 1492-1502.

Yuzugullu H., Benhaj K., Ozturk N., Senturk S., Celik E., Toylu A., Tasdemir N., Yilmaz M., Erdal E., Akcali K. C., Atabey N., Ozturk M., (2009), “Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells”, *Molecular Cancer*, 8, 90-110.

ÖZGEÇMİŞ

Görkem Odabaş 23 Ekim 1988’de Ordu’da doğdu. 2011’de Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı. 2013 itibariyle aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başlayan Görkem Odabaş’ın yüksek lisans eğitimi yine aynı bölümde devam etmektedir.

EKLER

Ek A: Telif Hakkı Bulunan Materyaller İçin Alınan İzinler

Şekil No	Lisans Tarihi	Lisans No	Telif Sahibi
2.1	11.08.2014	3445801165702	Elsevier
3.1	11.08.2014	3445920372209	Nature Publishing Group
3.2	19.08.2014	-	American Society for Biochemistry and Molecular Biology
3.3	08.08.2014	3444210657607	Landes Bioscience
3.4	11.08.2014	3445921191283	Elsevier