

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



PROJE BAŞLIĞI

İNSAN KARACİĞER STELLAT HÜCRE HATLARINDA LX2 ENHANCER OF ZESTE
HOMOLOG 2 GENİNİN İNHİBİSYONUNUN FİBROZİS İLE OLAN İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Proje No: TDA-2017-7035

Proje Türü: Kurum Dışı

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Adı Soyadı

Prof. Dr. Gülden Başkol, Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyokimya

Araştırmacının Adı Soyadı

Prof. Dr. Munis Dünder Tıp Fakültesi/Tıbbi Genetik

Prof. Dr. Eser Kılıç, Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyokimya

Prof. Dr. Mevlüt Başkol, Tıp Fakültesi/İç Hastalıkları,

Gastroenteroloji Bilim Dalı

Ocak 2018

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu Çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri Birimi Tarafından TDA-2017-7035 kodlu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1.Giriş/ Amaç ve Kapsam	1
2. Genel Bilgiler	5
3.Gereç ve Yöntem.....	6
4. Bulgular.....	7
5.Tartışma ve Sonuç.....	10
6.Kaynaklar.....	11

ÖZET

Hepatik fibrosis, karaciğerde hasar oluşturan tekrarlayıcı veya kronik uyarılara sekonder gelişen, bağ dokusunun progresif birikimiyle sonuçlanan “yara iyileşmesi benzeri” karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Herhangi bir etkenle ortaya çıkan karaciğer hasarında (Viral veya hepatic toksinler aracılığı ile) enflamasyon süreci, fibroze ilerler. Fibrozisini iyileşme süreci, ekstra sellüler matriks (ESM) komponentlerinin yıkımı ve yeniden yapılanması ile gerçekleşir. Etken ortadan kaldırılamaz veya Hepatik stellat hücreler (HSC) kalıcı olarak aktivasyona uğrarsa, ekstrasellüler proteinlerin birikimi sonucunda progresif fibrozis meydana gelir. Aktive HSC’lerin proliferasyonu, karaciğer fibrozisinde çok önemli bir süreçtir. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), polycomb repressor kompleks 2 (PRC2)’nin katalitik bir kor proteinidir ve SET domain aktivitesine sahiptir. EZH2 içerdiği SET domaini aracılığıyla, 3 numaralı histonun 27. pozisyonunda yer alan lizin(K)’i metiller (H3K27). Bu şekilde ilgili genlerin susturulmasında görev aldığı bildirilmiştir. Epitelyal hücreler, Epitel Hücrelerinin Mezenkimal Hücrelere dönüşümü (EMT) süreci ile mezanşimal hücrelere dönüşürler. EMT, hücrelerin ve ESM’in yeniden farklı bir şekilde yapılanmasında rol oynar. ESM kompozisyonunda artış, ayrıca hücreler arası bağlantı ve etkileşimin kopmasına da neden olmaktadır. Bu durum da hücre-hücre adezyonunu ve hücre-ekstrasellüler matriks adezyonunu bozar. EMT’nin, fibrozis ve kanser oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda kanser çalışmalarında EZH2’nin ESM’nin komponenti olan Matriks metallo proteinazlar (MMP)’ler ve Tissue inhibitör of metalloproteinase (TIMP)’ler üzerine etkisi bildirilmektedir. Birçok kanser araştırılmasında EZH2 inhibisyonunun metaztazda olumlu rolü gösterilmektedir. Bununla beraber karaciğer fibrozisinde, EMT’nin regülasyonunda rol oynayan genlerin ve proteinlerin, EZH2’nin inhibisyonu aracılığı ile değişimi araştırılmamıştır.

Çalışmamızda LX-2 hücre hatlarında (bu hücre hattı karaciğer fibrozisi çalışmak içinkullanılan hattır), EZH2’nin inhibisyonunun, TGF- β , MMP2, MMP9, TIMP3, α SMA, kollajen 1 α ve kollajen 3A1 genleri üzerine (EMT genleri) olan etkisi araştırılacaktır.

Anahtar Kelimeler: EZH2, MMP, TIMP, DZNep

ABSTRACT

Hepatic fibrosis is a complex and dynamic process, forming as a result of liver damage or develops as reply to the secondary to chronic repetitive warnings and it is resulted progressive accumulation of connective tissue, and it is known to be a 'wound healing like process. Any factors, as a result of liver damage, (via hepatic toxins or viral) the process of inflammation goes to fibrosis. Healing process of fibrosis is shipped with the the destruction and reconstruction extra multi-cellularity matrix (ESM) components. When the factors cannot be eliminated or hepatic stellate cells (HSC) permanently become active, as a result of the accumulation of extracellular proteins progressive fibrosis occur. The proliferation of activated HSC, involved in liver fibrosis, is known to be very important. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), is a core of catalytic protein of polycomb repressor complex 2 (PRC2) and it has set domain activity. EZH2 containing in SET domain and using this domain it is methylated lysine (K) amino acid located in the 3. position of 27 histone (H3K27). In this way, it is shown that it is related to shuted up related genes. Epithelial cells return to Mesenchymal cells with the process of transformation (EMT). EMT, play a role in the different way of construction of cells and ESM. ESM composition increase, also breaking the connection between cells and their interaction. This case clearly imparirs the cell-cell adhesion and cell-extracellular matrix adhesion. It has been reported that EMT plays a role in the formation of cancer and fibrosis. Studies with cancer research showed that EZH2 effected on the Matrix metalloproteinases (MMP) which are acomponent of the ESM and on the tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP). Many cancers reserches showed that the inhibition of EZH2 has a positive the role in inhibition. However, in liver fibrosis, regulation of genes and protein that play a role in the EMT through the inhibition of EZH2 is not clearly investigated. In our study using LX-2 cell lines (this cell line is used to work with liver fibrosis) effect of inhibition of EZH2 will be investigated on TGF- β , MMP2, MMP9, TIMP3, α SMA, collagen 1 α and collagen 3A1 genes (EMT genes).

Keywords: EZH2, MMP, TIMP, DZNep

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Yapmayı planladığımız çalışmada, insan karaciğer stellat hücre hatlarında (LX2):

1-EZH2'nin inhibisyonunun, TGF- β , MMP2, MMP9, TIMP3, α SMA, kollajen 1 α ve kollajen 3A1 genleri üzerine olan etkisi araştırılacaktır. Bu faktörlerin ekspresyonunu, real time PCR gerçekleştirmeyi hedefledik.

GENEL BİLGİLER

Hepatik fibrosis, karaciğerde hasar oluşturan tekrarlayıcı veya kronik uyarılara sekonder gelişen, bağ dokusunun progresif birikimiyle sonuçlanan “yara iyileşmesi benzeri” karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Bu süreç içerisinde ekstrasellüler matriks (ESM) yapımında artış, skleroza dönüşme eğilimi ve bağ dokusunun dejeneratif değişimi sonucunda, birçok kronik karaciğer hastalığının son noktası olan karaciğer sirozuna kadar uzanan bir süreç görülmektedir. Fibrosis tedavi edilmediği takdirde, siroza kadar ilerleyebilir ve sonunda karaciğer yetmezliğine ve ölüme neden olabilir.

ESM, sinüzoidleri döşeyen endotel ile hepatosit hücrelerinin arasını dolduran, portal alan ve santral ven çevresinde bulunan jelatin yapısında bir destek dokusudur. ESM, kan akımı ve parankim arasındaki öncül bölgedir. Bu nedenle ESM’de oluşan değişiklikler karaciğerin yapı ve fonksiyonlarını önemli ölçüde etkiler (1-3).

Karaciğer Fibrosis Mekanizması

Hepatik stellat hücre (HSH), perisünisoidal, subendotelyal bölgede hepatositlerin üzerinde yer alan yıldızimsı uzantıları olan mezenkimal kökenli bir hücredir. Bu hücreler “A vitamini depolayan hücre, İTO hücreleri” olarak da bilinir. Fonksiyonları arasında; ESM komponentlerinin sentezi, bunların yıkımında rol alan matriks metalloproteinazların (MMP) ve inhibitörlerinin sentezi ve çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin sentezi, sinüzoid lümenin kontraksiyon ve dilatasyonu ile kan akımı ve portal basıncın düzenlenmesi, karaciğer rejenerasyonu ve yara iyileşme cevabında fibröz matriksin oluşması bulunur. Stellat hücreler herhangi bir uyarı ile aktive olmadan önce (sessiz formu), sitoplazmik yağ damlacıkları,

retinoid depoları içeren uzun sitoplazmik çıkıntılar ile sinüzoidleri saran, bazal membran tipi matriks sentezi yapan hücrelerdir .

Herhangi bir etkenle ortaya çıkan karaciğer hasarında (Viral veya hepatic toksinler aracılığı ile), enflamasyon süreci, HSH'lerin aktivasyonu sonucunda fibrozise ilerler. Fibrozisin iyileşme süreci, ESM komponentlerinin yıkımı ve yeniden yapılanması ile gerçekleşir. Etken ortadan kaldırılamaz veya HSC kalıcı olarak aktivasyona uğrarsa, ekstrasellüler proteinlerin birikimi sonucunda progresif fibrozis meydana gelir. Aktive HSH'lerin proliferasyonu, karaciğer fibrozisinde çok önemli bir süreçtir. Transforming growth factor beta (TGF β 1)'in ekspresyonunun fibrojeniz için çok güçlü bir indükleyici olduğu bilinmektedir. HSH ve kupffer hücreleri fibroziste rol oynayan esas hücrelerdir. Sirotik karaciğer normalden daha fazla ESM bileşeni içerir. ESM birikiminin esas uyarıcı HSH'dir. Karaciğer hasarını takiben HSH'ler proliferasyon olarak myofibroblastlara dönüşerek kollajen ve kollajen olmayan ESM bileşenlerini, büyüme faktörleri ve çeşitli sitokinleri sentezlerler. Disse aralığında erken dönemde kollajen tip III ve V, fibronektin, kronik süreçte ise kollajen tip I ve IV, elastin, laminin ve hyalüronik asit artar. Ayrıca dermatan sülfat, kondroitin sülfat ve heparan sülfat gibi proteoglikanlar da artar. Kollajenler arasında tip I kollajen ise en fazla artan kollajendir (4, 5).

Enhancer Zeste Homolog 2 (EZH2)

Memelilerde iki çeşit polycomb repressor kompleks (PRC) bulunur. Bunlar PRC1 ve PRC2'dir. PRC2, 4 çekirdek komponentten oluşur. Bunlar; embriyonik ektoderm development protein (EED), retinoblastoma-associated protein 46/48 (RBAP 46/48), suppressor of zeste 12 homolog (SUZ12) ve enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)'dir. EZH2, PRC2'nin katalitik bir kor proteini ve SET domain aktivitesine sahiptir. EZH2 içerdği SET domaini aracılığıyla, 3 numaralı histonun 27. pozisyonunda yer alan lizin(K)'i metiller (H3K27).

Birçok çalışma, EZH2'nin hücre proliferasyonu, invazyon, apoptosis, angiogenes ve metastaz gibi olaylarda rol oynadığını göstermiştir. PRC2'nin, (EZH2 aracılığıyla H3K27'yi trimetilasyona uğratarak) gen ekspresyonunun regülasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir. Bu metilasyon aracılığıyla, ilgili hedef genin susturulduğu bildirilmiştir.

Mezenkimal hücreler ve fibroblast benzeri hücreler, ekstrasellüler matrikste proteolitik aktivitenin artmasına yol açar. ESM'in yıkımı MMP'ler aracılığıyla olur. MMP'lerin aktiviteleri fibrojeniz ve fibroliz sürecinde değişir. Bu sürece doku inhibitor metalloproteinazlar (TIMP)'da katkıda bulunur. TIMP'ler, MMP'lerin proteolitik aktivitesini spesifik olarak inhibe ederler. MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki denge ESM'de kollagen moleküllerinin birikmesinde kritik rol oynar. Bu genlerin düzenlenmesi (çeşitli transkripsiyon faktörleri ve miRNA gibi), bu yüzden kritik öneme sahiptir.

Epitel Hücrelerinin Mezenkimal Hücrelere Dönüşümü

Epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere dönüşümü (EMT), embriyonik yaşamda görülen bir özelliktir. Bu dönüşüm sonucunda epitelyal hücreler tipik özellik ve yapılarını yitirerek migrasyon ve invazyon özelliği gösteren mezankim hücrelerine dönüşürler. EMT'nin regülasyonunda rol oynayan birçok transkripsiyon faktörü (aktivatör ve supresör olarak) bildirilmiştir. Nükleer düzenleyici olarak, Snail, slug, Twist, ZEB, NF κ B, sitoplazmik olarak, Src, GTPaz ailesi-Ras, Rho, Rac, ekstrasellüler olarak da TGF β , FGF, EGF ailesi, HGF bildirilmiştir.

Epitelyal hücreler, EMT süreci ile mezanşimal hücrelere dönüşürler. EMT, hücrelerin ve ESM'in yeniden farklı bir şekilde yapılanmasında rol oynar. ESM kompozisyonunda artış, hücreler arası bağlantı ve etkileşimin kopmasına neden olmaktadır. Bu durum da hücre-hücre adezyonunu ve hücre-ekstrasellüler matriks adezyonunu bozar. EMT'nin fibrozis oluşumunda rol oynadığı bildirilmiştir.

3-Deazaneplanocin A

3-Deazaneplanocin A (DZNep), S-adenozil homosistein hidrolaz inhibitörüdür ve metil transferaz aktivitesini inhibe ederek EZH2'nin 3 numaralı histonunun 27. pozisyonunda yer alan lizin(K)'in metilasyonunu (H3K27me3) inhibe eder.

MATERYAL METOD

RNA izolasyonu ve reverse transkriptaz (RT)–PCR analizi

Bir önceki dönem raporunda bildirildiği gibi, en son 72 saat 5 µM DZNep uyguladığımız LX2 hücre kültürümüzden ve kontrol grubumuzdan cDNA'lar elde edilmişti. Roche kiti kullanılarak Light Cyclers 480 cihazında EZH2, TGF-β, MMP2, MMP9, TIMP3, αSMA, kollajen 1α, kollajen 3A1 ve kontrol genleri (GAPDH) RT-PCR ile ölçüldü. Her bir gen için;

Probe master mix: 10 µL

Probe: 1 µL

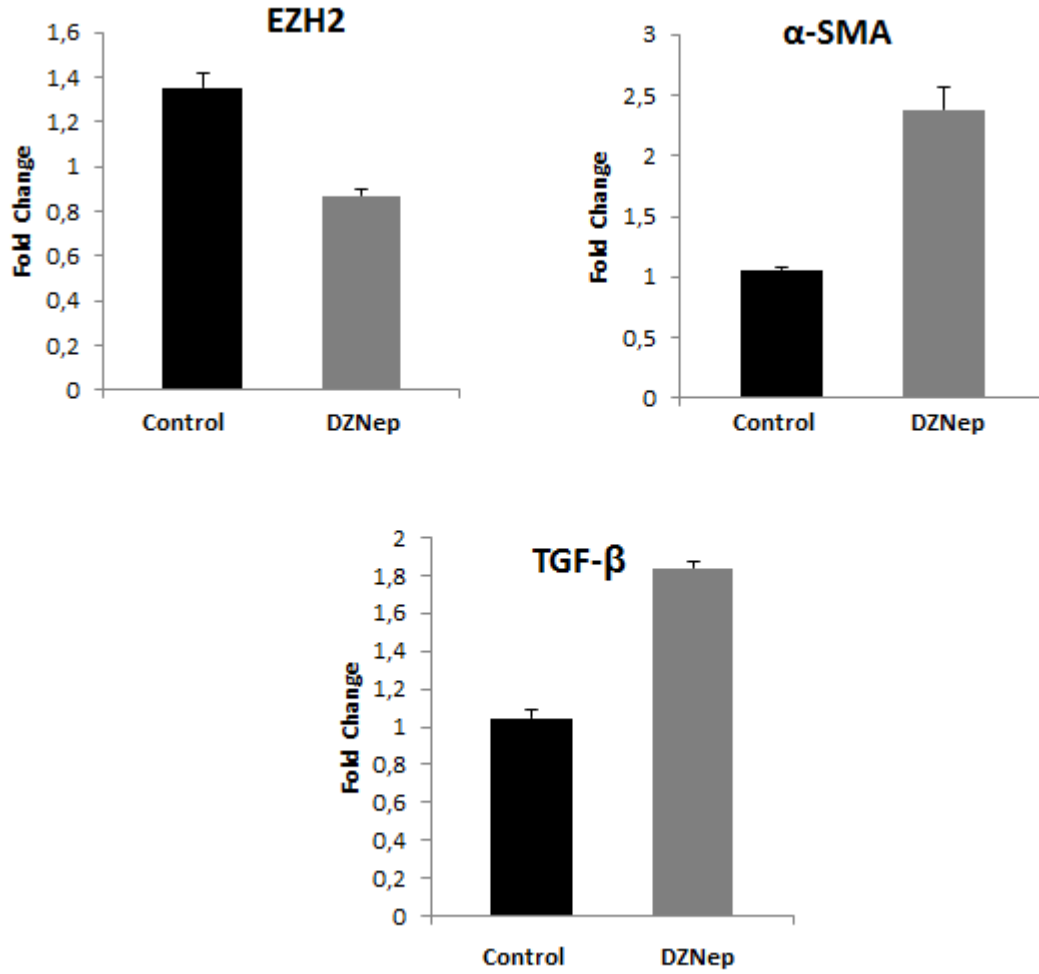
dH₂O: 4 µL

cDNA: 5 µL

Toplam: 20 µL kullanıldı. Veriler, $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel olarak student-t testi uygulandı.

BULGULAR

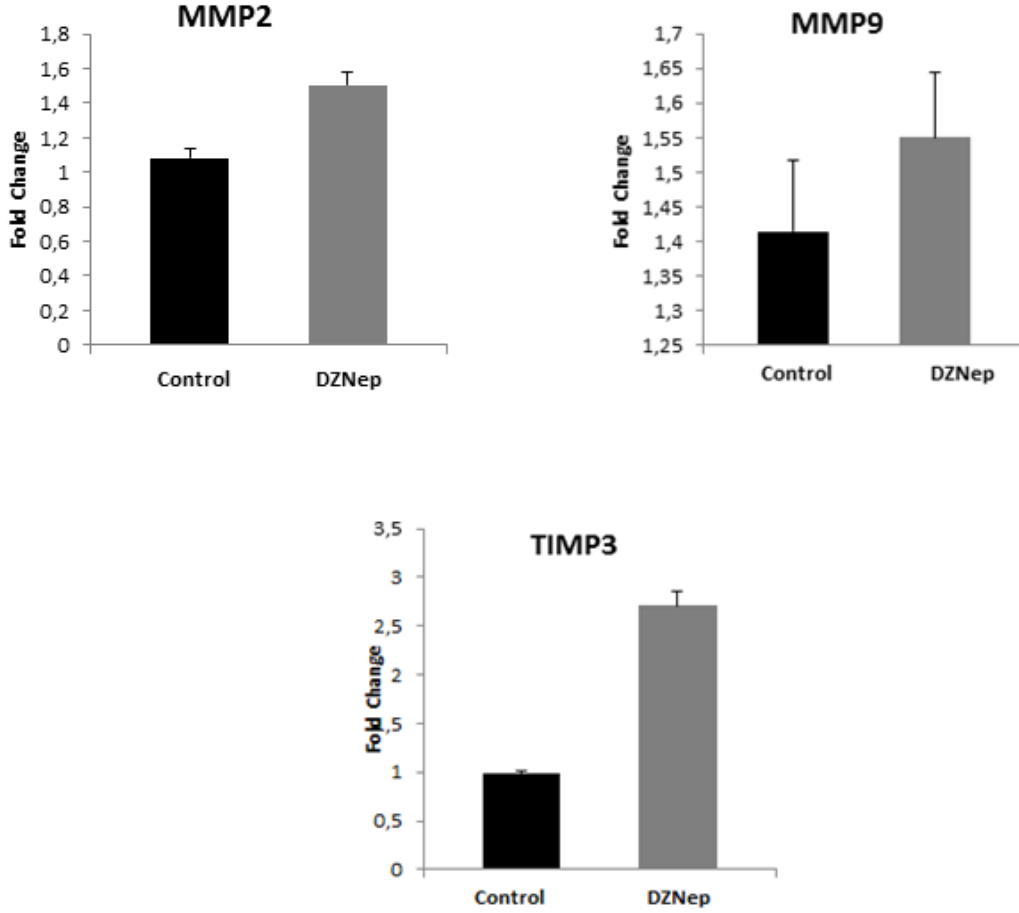
Sonuçlar aşağıda grafikte verildiği gibi çıktı.



Şekil1. DZNep ve kontrol grubunun EZH2, αSMA ve TGF-β ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması.

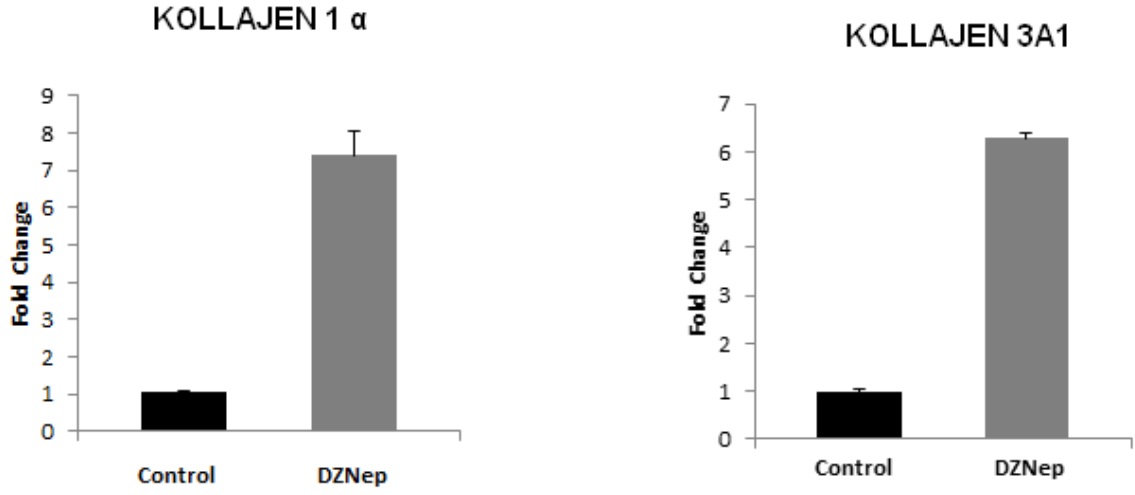
İstatistiksel olarak, EZH2 ekspresyonu, DZNep verilen grupta, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). αSMA ekspresyonu, DZNep verilen grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.006$). TGF-β ekspresyonu,

DZNep verilen grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$).



Şekil 2. DZNep ve kontrol grubunun MMP2, MMP9 ve TIMP3 ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması.

İstatistiksel olarak, MMP2 ekspresyonu, DZNep verilen grupta, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.002$). MMP9 ekspresyonu, DZNep verilen grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p<0.166$). TIMP3 ekspresyonu, DZNep verilen grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.002$).



Şekil3. DZNep ve kontrol grubunun kollajen 1α ve kollajen 3A1 ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılması.

COL1α ekspresyonu, DZNep verilen grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). COL3A1 ekspresyonu, DZNep verilen grupta, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$).

TARTIŞMA

DZNep'in LX2 hücre hatlarında koloni oluşumunu ve migrasyonu azalttığı bulunmuştur ($p<0.05$). DZNep tedavisinin, LX2 hücre hatlarında, EZH2 gen ekspresyonunu azalttığı ancak bunun yanında α SMA, TGF- β , MMP2, TIMP3, kollajen 1A α ve kollajen 3A1 genlerinin ekspresyonlarını istatistiksel olarak arttırdığı bulunmuştur ($p<0.05$). MMP9 geni için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Protein aşamasında, DZNep'in EZH2 protein düzeyini azalttığı, karaciğer fibrozis markerı olan α SMA'yı azalttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca TGF- β , MMP2 ve TIMP3 protein düzeylerinde artış, kollejen 3A1 de azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). Ancak kollajen 1 α ve MMP9 protein düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Özellikle hematologik malignitelerde FDA onayı almış bir ilaç olan DZNep'in kullanımı sırasında, antifibrotik (α -sma ve kollejen 3A1 protein düzeyini azaltmasından dolayı) olumlu etkilerinin yanısıra, karaciğer fibrozisi açısından (TGF- β ve MMP2'yi hem ekspresyon hem de protein düzeyinde artırmasından dolayı), dikkatli ve temkinli olunması gerektiğini düşünmekteyiz.

Literatür

- 1-Coward, W.R., Feghali-Bostwick, C.A., Jenkins, G., Knox, A.J., Pang, L. 2014 “A central role for G9a and EZH2 in the epigenetic silencing of cyclooxygenase-2 in idiopathic pulmonary fibrosis.” *FASEB J.* 28(7):3183-96.
- 2-Friedman, SL. 2004 “Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications.” *Nat Clin Prac Gastroenterol Hepatol* . 1:98-105.
- 3-Friedman, SL. 2010 “Evolving challenges in hepatic fibrosis.” *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 7(8):425-36.
- 4-Friedman, S L , Sheppard, D , Duffield, J S , Violette, S. 2013 “Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line.” *Sci Transl Med.* 5(167):167sr1. doi: 10.1126
- 5-Fujiwara, T., Saitoh, H., Inoue, A., Kobayashi, M., Okitsu, Y., Katsuoka, Y., Fukuhara, N., Onishi, Y., Ishizawa, K., Ichinohasama, R., Harigae, H. “3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, promotes erythroid differentiation.” *J Biol Chem.* 289(12):8121-34.