

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**İNSAN KARACİĞER HÜCRE HATTINDA (HEPG2)
TGF- β / SMAD YOLAĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
İlker GÜVEN**

**Danışman
Prof. Dr. Gülden BAŞKOL**

Yüksek Lisans Tezi

**Ekim 2016
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**İNSAN KARACİĞER HÜCRE HATTINDA (HEPG2)
TGF- β / SMAD YOLAĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
İlker GÜVEN**

**Danışman
Prof. Dr. Gülden BAŞKOL**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu Çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri Birimi
Tarafından TYL-2016-6296 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Ekim 2016
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: İlker GÜVEN

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“İnsan Karaciğer Hücre Hattında (HEPG2) TGF- β /Smad Yolağının Araştırılması” Adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

İlker GÜVEN

Danışman

Prof. Dr. Gülden BAŞKOL

Tıbbi Biyokimya AD. Başkanı

Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU

Prof. Dr. Gülden BAŞKOL danışmanlığında **İlker GÜVEN** tarafından hazırlanan **“İnsan Karaciğer Hücre Hattında (HEPG2) TGF- β /Smad yolağının Araştırılması”** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyokimya** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... /..... /2016

JÜRİ:

Danışman : Prof. Dr. Gülden BAŞKOL

.....

Üye : Prof. Dr. Eser KILIÇ

Üye :

.....

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARANDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu çalışmanın yapılmasında ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimlerini aktarıp her türlü desteğini esirgemeyen tez danışmanım çok değerli Prof. Dr. Gülden BAŞKOL'a teşekkür ederim.

Çalışmamda beni tez danışmanımla birlikte destekleyen ve her zaman yanımda olan Prof. Dr. Eser KILIÇ'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca zorluklarda ve sıkıntılarda hep bana destek olan annem Ayfer GÜVEN, babam İbrahim GÜVEN ve çok sevdiğim kardeşim Burcu Hayat GÜVEN'e sonsuz teşekkür ederim.

Tez dönemimde her gün tezimi soran, ilgilenen ve yeri geldiğinde baskı yapan benim için çok değerli Fatma GENÇER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda yardımlarından dolayı çalışma arkadaşım Merve ÖZEL'e teşekkürlerimi sunarım.

İlker GÜVEN

Kayseri, Ekim 2016

İNSAN KARACİĞER HÜCRE HATTINDA (HEPG2) TGF- β / SMAD YOLAĞININ ARAŞTIRILMASI

İlker GÜVEN

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Ekim 2016
Danışman: Prof. Dr. Gülten BAŞKOL

KISA ÖZET

Hepatosellüler karsinom, hepatositlerden köken alan ve karaciğerin en sık rastlanan primer malign tümörüdür. En sık görülen 5. kanserdir. Kanser ilişkili ölümlerde 3. sırada yer alır. Dünya genelinde yılda 250 bin ile 1 milyon arasında insanın ölümüne yol açar. Çalışmamızda hepatosellüler karsinomanın moleküler patogenezin aydınlatılmasına katkısı olması amacı ile HEPG2 hücrelerine DZNep tedavisi uygulayarak TGF- β /Smad yolağı araştırıldı. DZNep histon metilasyonunu engelleyerek EZH2 üzerinden gen ifadesinde değişikliğe sebep olmaktadır. 5 μ M DZNep, hücrelerimize 72 saat boyunca uygulandı. Trizol ile RNA'lar toplandı. Sırasıyla RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR işlemleri yapıldı. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı. RT-PCR'da TGF- β , Smad2, Smad 3, Smad 4, Smad 5, Smad 6, Smad 7 genlerinin ekspresyonlarına bakıldı. GAPDH ile normalizasyon yapıldıktan sonra, istatistiksel analiz yapıldı. Bu sonuçlara göre 72 saat DZNep uyguladığımız HEPG2 hücrelerinde, ilaç uygulamadığımız gruba göre TGF- β , Smad 2, Smad 3, Smad 4, Smad 5, Smad 6, Smad 7 ekspresyon düzeyleri (normalizasyon oranı) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p < 0.05$). Histon metilasyon inhibitörünü olan DZNep'in HEPG2 hücre hatlarında TGF- β /Smad yolağını mRNA aşamasında azalttığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: DZNep, TGF- β , Smad

HUMAN LIVER CELLS IN LINE (HEPG2), TGF- β / SMAD INVESTIGATION OF THE PATHWAY

İlker GÜVEN

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biochemistry
M. Sc. Thesis, October 2016
Supervisor: Prof. Dr. Gülten BAŞKOL**

ABSTRACT

Hepatocellular carcinomas, originate from hepatocytes and liver is the most common primary malignant tumor. It is the fifth most common cancer. It is located in cancer-related deaths in the first three. Worldwide between 250 thousand to 1 million years caused the death of people. In our study, the molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma with the aim of lightening HPG2 cells do not contribute to the treatment of TGF- β by applying DZNep/Smad pathway was investigated. 5 mm DZNep, applied our cells for 72 hours. RNA was collected using Trizol. Respectively, RNA isolation, cDNA synthesis and RT-PCR assays were performed. GAPDH was used as housekeeping gene. RT-PCR of TGF- β , Smad2, Smad 3, Smad 4, Smad 5, 6 Smadar, was looking at the expression of Smad 7 gene. After normalization with GAPDH was analyzed statistically. We aply DZNep 72 hours, according to these results in HEPG2 cells, according to the group last drug administration of TGF- β , Smad 2, Smad 3, Smad 4, Smad 5, Smad 6, Smad 7 expression levels (normalized ratio) was statistically significantly lower (p <0.05). Histone methylation inhibitor DZNep in which the HEPG2 cell line TGF- β / Smad pathway were decreased at the mRNA level.

Key Words: DzNep, TGF- β , Smad

İÇİNDEKİLER

İNSAN KARACİĞER HÜCRE HATTINDA (HEPG2) TGF- β / SMAD YOLAĞININ ARAŞTIRILMASI

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
KISA ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Transforming Growth Factor (TGF)	3
2.1.1.TGF- α	3
2.1.2.TGF- β Süperailesi.....	3
2.2. TGF- β Süperailesinin Sınıflandırılması	5
2.2.1.TGF- β Ailesi	5
2.3. TGF- β Süperailesinin Moleküler Yapısı	5
2.4.TGF- β Sinyal İletimi	7
2.5. TGF- β / Smad Sinyal İletimi	7
2.6. TGF- β Süperailesi Reseptörleri.....	8
2.7. Smad Proteinleri	10
2.8. Smad Proteinlerinin Yapısı	11

2.9. Smad Proteinlerinin Sınıflandırılması	11
2.11. Smad Proteinlerinin Nükleositoplazmik Geçisi	14
2.12. Smad Kompleksinin Çekirdekdeki Etkileşimleri	15
2.14. Real Time PCR.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Demirbaş Malzemeler Aletler	22
3.2. Sarf Malzemeler ve Kimyasal Maddeler	22
3.3. DZNep ilacının hazırlanması.....	23
3.4. Hücre Kültürü.....	23
3.4.1. Hücre Kültür Solüsyonları	23
3.5. Hücre Kültürü Protokolleri.....	26
3.5.1. Hücrelerin Çözdürülmesi.....	26
3.5.2. Hücre Sayımı	26
3.5.3. Hücrelerinin pasajlanması.....	28
3.5.4. Hücrelerinin dondurulması	29
3.6. Hücreden RNA İzolasyonu.....	29
3.7. Reverse transkriptaz PCR (RT-PCR) ile cDNA sentezi	30
3.7. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu	32
3.8. İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
ÖZGEÇMİŞ.....	54

KISALTMALAR

ALK	: Activin Reseptör-Like Kinaz
ARE	: Aktivin Responsive Element
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CDK	: Cyclin Dependent Kinase
Co-Smad	: Common-Smad
CREB	: cAMP-Response Element Binding Protein
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dPBS	: Fosfat Buffer Salin
DZNep	: 3-Deazaneplanocin A
EFG	: Epidermal Büyüme Faktörü
FBS	: Fetal Bovin Serum
GNDF	: Glial Cell Linederived Neurotrophic Factor
L3	: Loop bölgesi
LAP	: Latency Associated Peptide
LTBP	: Latent TGF- β Binding Protein
Mad	: Mother Against Decapentaplegic
MH1	: N-terminal mad homology 1
MH2	: N-terminal mad homology 2
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDP	: Pirüvat Dehidrogenaz Fosfataz
RIB	: Activin Reseptör Tip IB
RNA	: Ribonükleik Asit
R-Smad	: Reseptor-Regulated Smad
RT-PCR	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SARA	: Smad Anchor For Receptor Aktivation
SCP	: Small C-Terminal Domain Phosphatases
TAK1	: TGF-B Activating Kinase 1
TGF	: Transforming Büyüme Faktörü

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 3.1. Komplet Medyum Hazırlığı	25
Tablo 3.2. Freeze Medyum Hazırlığı.....	25
Tablo 3.3. Real-Time PCR reaksiyonu için gerekli karışım içeriği ve miktarları.....	32
Tablo 3.4. Real-Time PCR döngüleri ve ısı değerleri	32
Tablo 4.1. Araştırılan genlerin ortalama Ct değerleri.....	35
Tablo 4.2. Araştırılan genlerin Hedef Gen/Referans Gen Normalizasyon oranı.....	36
Tablo 4.3. Araştırılan genlerin istatistiksel analizi (Hedef Gen/Referans Gen Normalizasyon oranı ortalamalarının karşılaştırılması).....	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	TGF- β Süperailisinin sınıflandırılması.....	4
Şekil 2.2.	TGF- β molekülünün sentezi ve sekresyonu.....	6
Şekil 2.3.	TGF- β sinyal yolağı	7
Şekil 2.4.	TGF- β süperailisi reseptör ve ligantları.....	10
Şekil 2.5.	Smad proteinlerinin yapısı	11
Şekil 2.6.	Smad proteinlerin sınıflandırılması.....	12
Şekil 2.7.	R-Smad proteinlerinin aktivasyonu ve inhibisyonu.....	13
Şekil 2.8.	Smad proteinlerinin nükleostoplazmik geçişleri.....	15
Şekil 2.9.	Smad kompleksinin çekirdekteki etkileşimleri	17
Şekil 2.10.	TGF- β - reseptör kompleksine oluşturulan cevaplar.....	18
Şekil 2.11.	TGF- β sinyal ileti yolunun düzenlenmesi	19
Şekil 3.1.	Thoma Lamı	27
Şekil 3.2.	Örneğin uygulanışı	27
Şekil 4.1.	Smad-2 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	38
Şekil 4.2.	Smad-3 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	39
Şekil 4.3.	Smad-4 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	40
Şekil 4.4.	Smad-5 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	41
Şekil 4.5.	Smad-6 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	42
Şekil 4.6.	Smad-7 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	43
Şekil 4.7.	Smad-TGF- β geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	44

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatosellüler karsinom (HCC), karaciğerde en sık gözlenen primer malign tümör olup hepatositlerden türevlenir. Genelde sirozlu karaciğer zemininde gelişme potansiyeline sahiptir. Ölümle sonuçlanan kanser vakalarında 3. Sırada yerini alır. En sık görülen kanserler arasında 5. Sıradadır. Daha çok 50 ila 70 yaşlarında görülür. Hepatit C enfeksiyonları, hepatit B enfeksiyonları, siroz, alkolik karaciğer hastalığı gibi risk faktörleri vardır. Tanı alan hastaların ortalama yaşam süreleri ise 5 yıldır. HCC nedeniyle Dünyada yılda 250,000 ile 1 milyon arasında ölüm bildirilmiştir. HCC'nin coğrafik bölgelere göre dağılımındaki değişiklik o bölgede olası hepatit virüslere maruz kalma durumu ve çevresel faktörlere bağlıdır (1).

Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) SET domain aktivitesine sahip proteindir, EZH2' nin SET domain bölgesi, 3 numaralı histonun 27. pozisyonunda yer alan lizin(K)'i metilleme yeteneğine sahiptir. Bilindiği üzere DNA metilasyon ile ilgili hedef geni veya genleri susturarak hücrede sentezlenen mRNA içeriğini değiştirmek mümkündür. Bu mRNA içeriğinin değişimi sonucunda hücrenin proliferasyonu, invazyon, apoptosis, angiogenes ve metastaz gibi durumları sergilediği gözlenmiştir. EZH2'nin onkojenik rolü olduğu bildirilmektedir (2).

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 inhibe eder(3).

TGF- β sinyalinde yolun başlama noktası olan ligandların reseptöre bağlanması ile TGF- β /Smad yolağı başlamış olur. Bu sinyal yolağı sonucunda post transkripsiyonel modifikasyon meydana gelir ve ilgili genler ifade edilir veya susturulur. Böylece

hücrenin mRNA içeri değişmiş olur. TGF- β /Smad yolağı bilinse de EZH2 ile olan ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır(4).

Karaciğer kanser hücre hattı olan HEPG2 bizim çalışmamızda kullanılmıştır. Çalışmamızın temeli hücre kültürüne dayanmaktadır. Hücreler DZNep ilacı verilen ilaçlı grup ve ilaç verilmeyen kontrol gurubu olarak ikiye ayrılmıştır. Hücrelere ilaç uygulanmadan önce optimizasyon çalışmaları yapılarak farmoknetik değerlendirilmeler yapılmıştır. Böylece kullanılan DZNep ilacının hücrelere toksik etkisi test edilmiş oldu ve deneyde kullanılacak olan nontoksik değerler belirlenmiş oldu.

Çalışmamızda DZNep in HEPG2 hücre hattında EZH2 üzerinden TGF- β /Smad yolağı üzerindeki etkisini göstermeyi amaçladık. TGF- β , Smad2, Smad3, Smad4, Smad5, Smad6, ve Smad7 genlerinin ifadesi Real Time PCR metodu ile çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Transforming Growth Factor (TGF)

TGF, hücrelerin büyümesini sağlayan polipeptid yapılı bir büyüme faktör topluluğudur. Alfa (α) ve beta (β) olarak 2 alt grubu mevcuttur (5) .

2.1.1.TGF- α

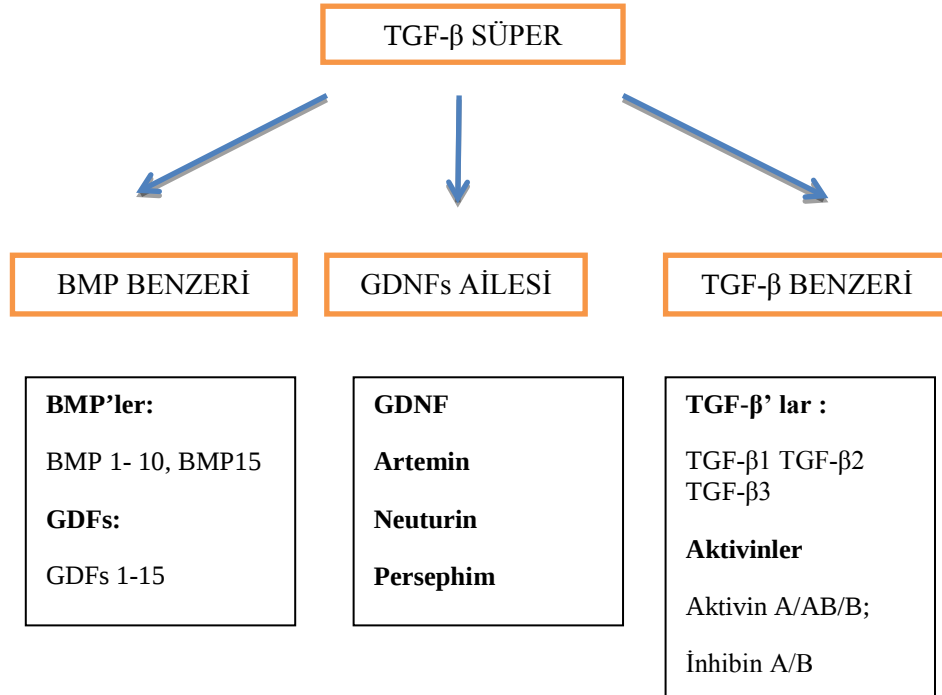
TGF- α , bazı özelleşmiş hücrelerce sentezlenir. Bu hücreler trombositler, keratinositler, bazı indüklenmiş makrofajlar ve beyin hücreleridir. Yapısında 3 tane disülfid bağı ve 50 kadar aminoasit ünitelerinin birleşmesiyle teşekküllemiş bir protein yapılı biyomoleküldür. TGF- α , epidermal büyüme faktörü (EGF) ile benzerlik gösterebilir. EGF’den nispeten daha büyük ölçüde yaklaşık %70 oranında farklılıklar sergiler. EGF’den nispeten daha otokrin işlev gören çeşidi olduğu düşünülmektedir. EGF reseptörlerine bağlanarak mezenşimal, epitelyal, endotelyal hücre büyümesini ve endotelyal hücre kemotaksisini indükleyerek biyolojik etkisini gösterir (6-7).

2.1.2.TGF- β Süperaillesi

Süperaille terimi çok sayıda alt gruba sahip biyomoleküller için kullanılan bir terimdir. TGF- β süperaillesinin biyolojik etkileri hücre siklusu kontrolü, erken gelişimin regülasyonu, farklılaşması, ekstrasellüler matriks oluşumu, hematopoiezis, anjiogenezis, kemotaksis, immün fonksiyonlar, apoptozis gibi olaylarının düzenlenmesini üstlenmiş multifonksiyonel sitokin ailesidir. (TGF- β , embriyoda gelişimi ve morfogenezisin gerçekleşmesini korurken erişkin dokularda homeostazisin gerçekleşmesine olanak verir. Temel fonksiyonu proliferasyonunu sınırlamak (sitostatik etki) ve farklılaşmayı indüklemektir. TGF- β yanıtında, hücre döngüsünün durdurulması geç G1 fazında

“restriksiyon noktasında” meydana gelir. Bunun nedeni siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörlerinin indüksiyonudur (8, 9). Ayrıca hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını indükleyen transkripsiyon faktörleri (c-myc) ihtiva ettiği gibi hücre farklılaşmasını engelleyen faktörleri de baskılamaktadır. Baskılama özelliği Smad proteinleri ve transkripsiyon faktörleri ile birlikte sağlanır (10). TGF- β sinyal yolağındaki değişiklikler, insanda çeşitli somatik ve kalıtsal hastalıklar özellikle de kanserle ilişkilidir. TGF- β , Smad’lar ve bunların kofaktörleri ile birlikte hücrelerde, tümör baskılayıcı ve hücre metabolizmasını düzenleyici etki gösterir bunun yanı sıra kanserde tümör gelişimini indükleyici rol oynaması insan sağlığı açısından önemlidir (10-15).

TGF- β süperailisinin omurgalılarda, 50 den fazla üyesi bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; TGF- β , Aktivin, İnhibin, BMP, Glia Hücre Kaynaklı nörotrofik faktör (Glial cell linederived neurotrophic factor-GDNF), Müllerian İnhibe Edici Madde (Mullerian inhibiting substance MIS) gibi sıralanabilir (16-19) (Şekil 2.1.). TGF- β süperailisi içinde ilk tanımlanan üye, normal sıçan böbrek hücrelerinden izole edilen, TGF- β ailesinin TGF- β 1 izoformu olmuştur. Bu moleküllerin ortak yapısal özelliği sistin ünitelerini içermesidir (20).



Şekil 2.1. TGF- β Süperailisinin sınıflandırılması

2.2. TGF- β Süperailisinin Sınıflandırılması

2.2.1.TGF- β Ailesi

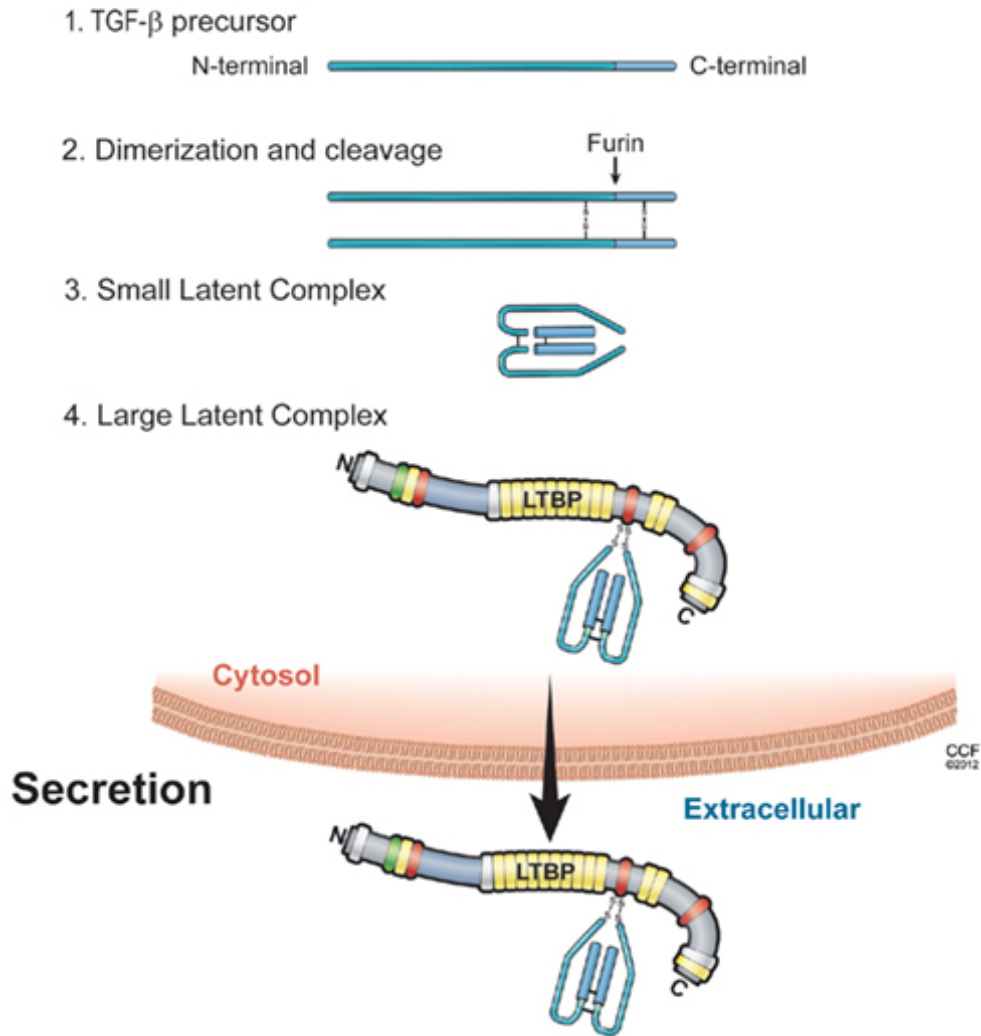
TGF- β molekülünün TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 memeli dokusundan, TGF- β 4, ve TGF- β 5 ise tavuk ve *Xenopus* larda eksprese edilmiş 5 izoformu izole edilmiştir. TGF- β ailesi hücre proliferasyonu, farklılaşması, ekstrasellüler matriks bileşenlerinin oluşumu, hücre göçü, immünsüpresyon ve hücre ölümü regülasyonu gibi birçok fonksiyonun aktörüdür. TGF- β ailesi, mezenşim, bağ dokusu, endotelyum, plateletler, kemik ve immün sistem hücreleri gibi çeşitli doku ve hücrelerde sentezlenmektedir (6, 17, 21). Farklı izoformların (TGF β 1, 2, 3) etkileri hedef hücrelerin tipine, farklılaşma durumlarına ve diğer sitokinlerin varlığına bağlıdır. Örneğin, in-vitro TGF- β ailesinin kemik, kırık gibi destekleyici dokulardan kaynaklanan hücreler için mitojenik diğer birçok hücre için inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir. Yine hücre tipine bağlı stimülatör veya inhibitör etkiler ile farklılaşmayı düzenlediği, ekstrasellüler matriks oluşumunu stimüle ettiği, bazı hücreler için hücre göçünü sağladığı ve erken embriyogenesis sırasında mezoderm oluşumunu indüklediği gösteren çalışmalar mevcuttur. TGF- β ailesinin embriyonik gelişimde önemli rol aldığı düşünülmektedir (17, 21).

2.3. TGF- β Süperailisinin Moleküler Yapısı

Bu ailenin üyeleri, prepropeptid öncül molekülü olarak sentezlenirler ve golgi aygıtında plazmin (proteaz) tarafından regüle edilir. TGF- β süperailisinin moleküler yapıları, ortamda prodomain kısmı amino uçta sinyal peptid ve karboksi uçta olgun protein bulunmaktadır (8,10,19, 22). Sinyal peptid parçası, molekülün sekretuar kontrolünü sağlar, prodomain parça doğru katlanmayı, alt ünitelerin dimerizasyonunu ve aktivitenin regülasyonunu sağlar. Karboksi uçtan itibaren 110-140 aminoasitlik kısım olgun proteini oluşturur. Olgun protein, yapısında yedi tane korunmuş sistin kalıntısı içerir. Bunlar molekül içi ve moleküller arası disülfid bağlar oluşturarak dimerik yapının oluşmasını sağlar. Olgun protein parçasının dimerizasyonu ile biyolojik olarak aktif molekül oluşur. Olgun proteinden, LAP (Latency associated peptide) adı verilen propeptidin ayrılması ile protein olgun formuna ulaşır. Bu işlem plazma membranında gerçekleşir. LAP, nonkovalent etkileşimlerle olgun domaine bağlanmıştır ve olgun

proteinin aktivitesini ve TGF- β 'nın reseptörlere bağlanmasını engeller. LAP, ayrıca latent TGF- β binding protein (LTBP) ile bağlanarak daha da büyük bir kompleks oluşturur (Şekil 2.2.). LTBP'nin rolü, TGF- β /LAP kompleksinin stabilitesini ve sekresyonunu artırmak, TGF- β 'nın doğru katlanmasını sağlamak ve aktivasyonu gerçekleştiği hücrelerin yüzeyine veya ekstrasellüler matriksine TGF- β /LAP kompleksinin sekresyonunu sağlamaktır. Öncül TGF- β 'nın, olgun forma aktivasyonu LAP'ı ayıran plazmin ve katepsin gibi proteazlar tarafından kontrol edilir. Aynı zamanda trombospondin, integrin gibi ekstrasellüler matriks proteinleri ve lipoprotein-a da latent TGF- β 'nın aktivasyonunu düzenler (23).

Synthesis (intracellular)



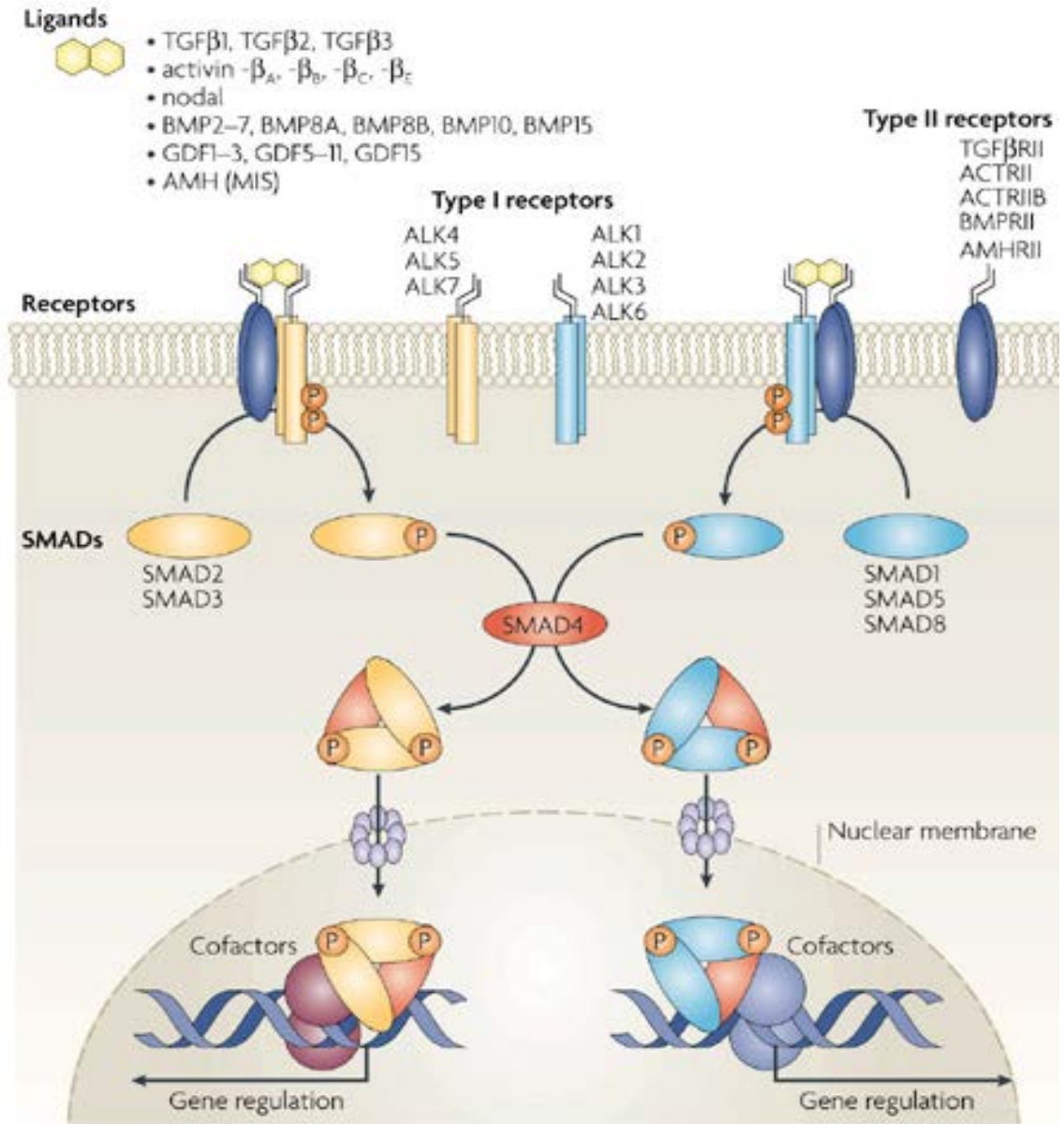
Şekil 2.2. TGF- β molekülünün sentezi ve sekresyonu

TGF- β süperailisi üyeleri transmembranik serin/threonin kinaz reseptörlerinin 2 tipini aktive ederek etki gösterir (8, 9, 10, 12, 13, 14, 25). Daha sonra transkripsiyonel regülatörler olarak fonksiyon gören sitoplazmadan çekirdeğe kadar yerleşmiş düzenleyici Smad (R-Smad) proteinlerini indükler (24, -, 27). Sinyal iletimi için Tip II reseptörlere bağlanmış ligand kompleksinin tip I reseptörleri fosforile etmesi gerekmektedir. TGF- β sinyali için bu fosforilasyon gereklidir. Çekirdeğe, sinyalin iletimi için Co-Smad'lar, R-Smad'lar ile heterooligomerler oluşturur ve birlikte çekirdeğe geçerler. Burada, transripsiyonel faktörler yardımı ile DNA üzerindeki hedef gen bölgesine bağlanarak transkripsiyonel cevabı oluştururlar (28, - 34).

2.6. TGF- β Süperailisi Reseptörleri

TGF- β süperailisi üyelerinin glikoprotein yapıdaki TGF- β reseptörleri tip I tip II ve tip III olarak üç alt gruptan oluşur (19-21, 28, 35). Tip I ve Tip II sinyal iletiminden sorumludurlar. Tip I ve Tip II reseptörler transmembranik yerleşimli serin-treonin kinaz ailesine ait reseptörlerdir ve tüm TGF- β ailesi üyelerinin sinyal iletimine aracılık ederler (GDNF hariç) (19, 20, 28, 36). Bu reseptörler yaklaşık 150 aminoasitten oluşan içinde bu bölgenin katlanmasını sağlayan 10'dan fazla sistein aminoasidinin bulunduğu ekstrasellüler ligand bağlama bölgesi, tek transmembranik bölge ve serin-treonin kinaz aktivitesi gösteren intrasellüler bölgeden oluşmaktadır. Tip I reseptörler için 30 aminoasitlik intrasellüler bölgede yüksek oranda korunmuş glisin ve serince zengin GS domainleri bulunmaktadır (20, 37). Sinyal iletimi için Tip II reseptörlere bağlanmış ligand kompleksinin Tip I reseptördeki GS domainlerini fosforile etmesi gerekmektedir. TGF- β sinyali için bu fosforilasyon gereklidir (32-38). Tip I ve Tip II reseptörler kendilerine bağlanan ligandlara göre farklı isimler alırlar. İnsan genomunda 7 adet Tip I reseptör (Aktivin reseptör-like kinaz (ALKs) 1-2-3-4-5-6-7), 5 adet Tip II reseptör (Act-IIA, Act-IIB, BMPR-II, AMHR-II, TBR II) saptanmıştır. Tip I reseptörler, farklı isimler alırlar. Örneğin; aktivin reseptörleri, ALK 4, Act RIB (Aktivin reseptör tip IB), BMP reseptörleri BMPR1A ve BMPR1B sırasıyla ALK 3 ve ALK 6 olarak da bilinirler. TGF- β süperailisinin her üyesi, Tip I ve Tip II reseptörlerin karakteristik kombinasyonlarına bağlanır. TGF- β ve Aktivinlerde önce Tip II reseptörlere direkt olarak bağlanma meydana gelir ve daha sonra Tip I reseptörlerin aktivasyonu gerçekleşir. Buna karşın BMP reseptör ligandları, Tip I ve Tip II reseptörlerin her ikisine birden bağlanarak kompleks oluşturur. TGF- β tarafından indüklenmiş heteromerik Tip I ve Tip II reseptörler kompleksindeki moleküllerin birbirleriyle ne ölçülerde birleştikleri hakkında kesin bilgi yoktur. Ancak, kompleksin iki TGF- β Tip I (TBR1; ALK 5) reseptörü ve iki TGF- β Tip II (TBR II) reseptörü kapsayan bir heterotetramer olduğu düşünülmektedir. Ligandların yokluğunda TBR1 ve TBR2 plazma membranında homodimer olarak bulunur. TBR2 reseptörünün kinaz aktivasyonu dimerizasyon ile düzenlenir. Çoğu hücre tipinde, TGF- β sinyali ALK 5 aracılığıyla olur. Endotelial hücrelerdeki yapılan son çalışmalarda TGF- β , ALK 1 ve ALK 5 reseptörleri aracılığıyla sinyalleri iletirler. ALK5 yaygın olarak sentezlenir. ALK1 ise daha çok endotelial hücreler ile epitelial ve mezensimal hücreler arasındaki

spesifik etkileşim bölgelerinde sentezlenirler. Fakat TGF- β /ALK5 ve TGF- β /ALK1 komplekslerinin endotelial hücreler üzerinde oluşturduğu etkiler zıttır. ALK5, endotelial hücre migrasyonu ve proliferasyonunu inhibe ederken, ALK 1, her iki işlemi de stimüle eder. Yapılan çalışmalarda, aynı zamanda ALK 5'in TGF- β /ALK 1 kompleksinin oluşmasında önemli ve gerekli olduğu gösterilmiştir (35, - 39). TGF- β indüksiyonu ile endotelial hücrelerde birbirine zıt etki ile çalışan bu reseptörler biyolojik cevabın regulasyonunu sağlar. Daha sonra Tip I reseptörler sitoplazmadan çekirdeğe kadar sinyal akısını sağlayan Smad proteinlerinin fosforilasyonunu sağlar (8, 17, 20, 22, 32, 37-39, 40). TGF- β süperaillesinin sinyal iletiminde aracı olan diğer bir reseptör, Tip III reseptördür. Tip III reseptörler, hücre dışında ligandları karşılayarak sinyal reseptörlerine (Tip I/II) ulaşmasını sağlar. Betaglikan ve endoglin bu reseptörlere iki örnektir. Endoglin, monosit, eritrosit prekürsörleri ve diğer hücrelerde çok az düzeylerde, endotelial hücrelerde ise yüksek düzeylerde sentezlenen hücre yüzey proteinidir. Betaglikan ise TGF- β 'nın Tip II reseptöre bağlanmasında yardımcı olan membrana bağlanmış bir preteoglikandır. Betaglikan inhibin'i de bağlayabilir ve onun Aktivin Tip II reseptörlerine bağlanmasını sağlar. Bu sebeple reseptörler için aktivin ile yarışmaya girer ve aktivin sinyalini antagonize eder (8, 17, 19, 22, 41, 42) (Şekil 2.4.).



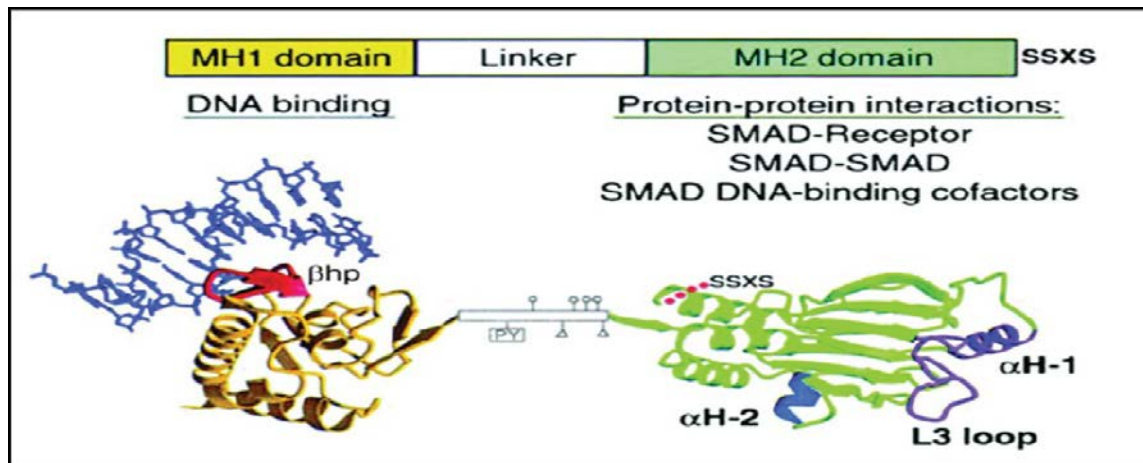
Şekil 2.4. TGF- β süperailesi reseptör ve ligantları

2.7. Smad Proteinleri

Smad proteinleri sinyal iletiminden sorumlu Tip I reseptör kinazların substratı olarak tanımlanmıştır. Reseptör den alınan sinyali çekirdeğe iletilmesinden sorupudur. Bu ailenin ilk üyeleri *Drosophila melanogaster* de Mad (Mother against decapentaplegic), *Caenorhabditis elegans*'larda Sma (Smilar to mother against) olarak isimlendirilmiştir. Vertebralılarda ise bu proteinlerin homolojileri Sma ve Mad kısaltmaları birleştirilerek Smad olarak isimlendirilmiştir ve günümüze kadar yaklaşık 10 adet Smad proteini tanımlanmıştır (8, 17, 17,19, 22, 25, 43).

2.8. Smad Proteinlerinin Yapısı

Smad proteinleri, N-terminal mad homology 1 (MH1), C-terminal mad homology 2 (MH2) domainleri ve bu ikisi arasında bağlayıcı bölge (Linker domain) olarak tanımlanan toplam üç domainden oluşur. (Şekil 2. 5.). MH1 domaini, aktive edilmiş durumda, Smad'ların DNA üzerindeki CACGAC dizisini tanıyıp bağlanmasından sorumludur (40). Bunun dışında fosforilasyon bölgelerini de içerir. MH2 domaini, bazal durumda, spesifik Smad-reseptör etkileşimi, Smad homomerizasyonu, aktive durumda ise diğer Smad'lar (Smad 1, 2, 3 ve 4) ve çekirdek faktörleri (transkripsiyonel koaktivatörler ve korepressörler) ile bağ kurulmasını sağlar. Özellikle Smad 2 ve 3'ün MH2 domaini intrinsek nükleer import aktivitesine sahiptir. MH1 domaininin diğer aktivitesi bazal durumda, MH2 domaininin yukarıda bahsedilen transkripsiyonel ve biyolojik aktivitelerini inhibe eder. Bunun yanında Drosophila'larda yapılan çalışmalarda Mad MH1'in DNA bağlayıcı aktivitesi Mad MH2 domaini tarafından inhibe edilmiştir. Yani MH1 ve MH2 domainleri bazal durumda karşılıklı olarak birbirlerinin inhibitörü olarak davranırlar (42-44). Linker domaini ise aktive edildiğinde Smad 1 için MAP (Mitogen activated protein)-Kinaz, Smad 2 ve 3 için Cam Kinaz II (Ca⁺⁺2-Calmodulin- dependent kinaseII) ve CDKs, Smad 2 de GRK-2 (G protein-coupled Receptor Kinase 2) tarafından fosforile edilen bölgeler ihtiva eder (40-42, 45).



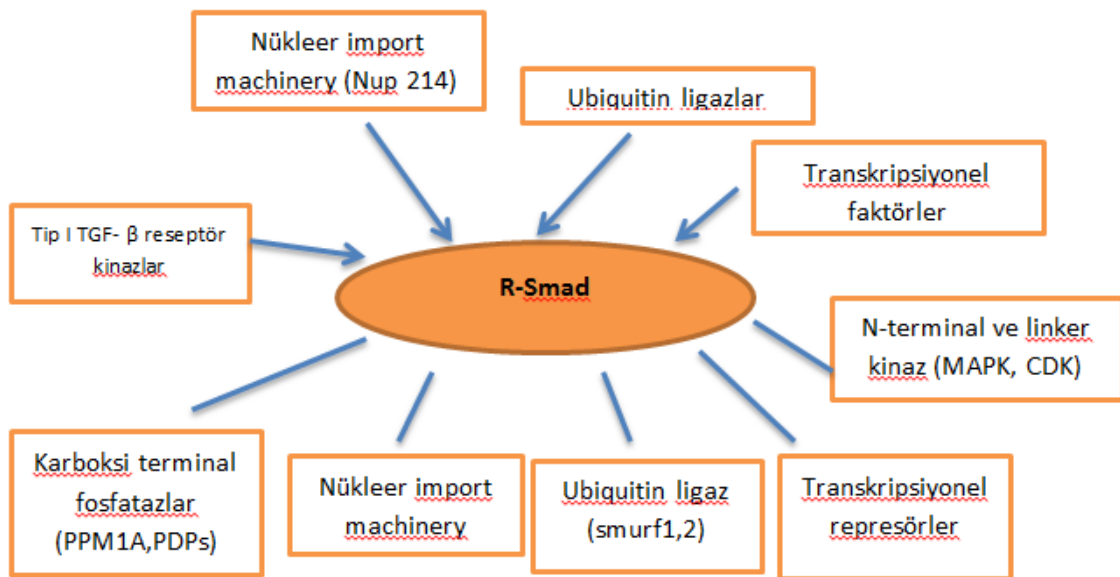
Şekil 2.5. Smad proteinlerinin yapısı

2.9. Smad Proteinlerinin Sınıflandırılması

Smad proteinleri yapısal ve fonksiyonel olarak 3 gruba ayrılır (8, 19, 20, 46) (şekil 2. 6.). Grup1 smadlar; “receptor-regulated Smad” yani R-Smad olarak isimlendirilir.

2.10. Smad Proteinlerinin Aktivasyonu

Smad proteinleri, TGF- β sinyal yolunda önemlidir. Smad sinyal yolu üzerindeki farklı bileşenler Smad proteinleri üzerindeki bölgeler ile etkileşerek, Smad proteinlerinin fosforilasyonunu ve sinyalin başlamasını indükler. Çoğu Smad'lar sitoplazmada lokalize olmaktadır. Smad 2 ve 3 fosforilasyondan önce ve sırasında T β RI ve SARA (Smad anchor for receptor activation) proteinleri ile bağlanır ve sonrasında Smad 4 ile kompleks oluştururlar. Bu Smad kompleksi, T β RI ve SARA moleküllerinden ayrılarak çekirdekte toplanır. Bu işlemlerin yarışmalı etkileşimlerin aracılığıyla gerçekleştiğini birçok çalışma desteklemektedir. Smad 2'nin MH2 domainin L3 Loop bölgesi aktive olmuş T β RI reseptörü homomerik Smad 2/3 ile etkileşebilen tanınma bölgeleri içermektedir. Ayrıca R-Smad'ların fosforile olmuş SXS motifi homomerizasyonunda ve Smad 2/3-Smad 4 komplekslerinin oluşmasında etkilidir. R-Smad'ların fosforilasyonu ve Smad kompleksinin oluşumu T β RI den ayrılması ile sonuçlanır. Benzer şekilde, SARA'nın Smad Binding domaini (SBD), R-Smad'ların MH2 domainin β 1-strand domaini ile etkileşir. β 1-strand domaini aynı zamanda aktive olmuş Smad kompleksini oluşturan birimler (R-Smad ve Smad 4) arasındaki etkileşimde de sorumludur. Smad kompleksinin oluşumu SARA'dan ayrılması sonucu gerçekleşir. SARA ile bağlanmış R-Smad'lar sitoplazmada tutulur ve çekirdeğe geçisi engellenir. Aynı zamanda aktive olmuş reseptörlere Smad'ların sunumu kolaylaşır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. R-Smad proteinlerinin aktivasyonu ve inhibisyonu

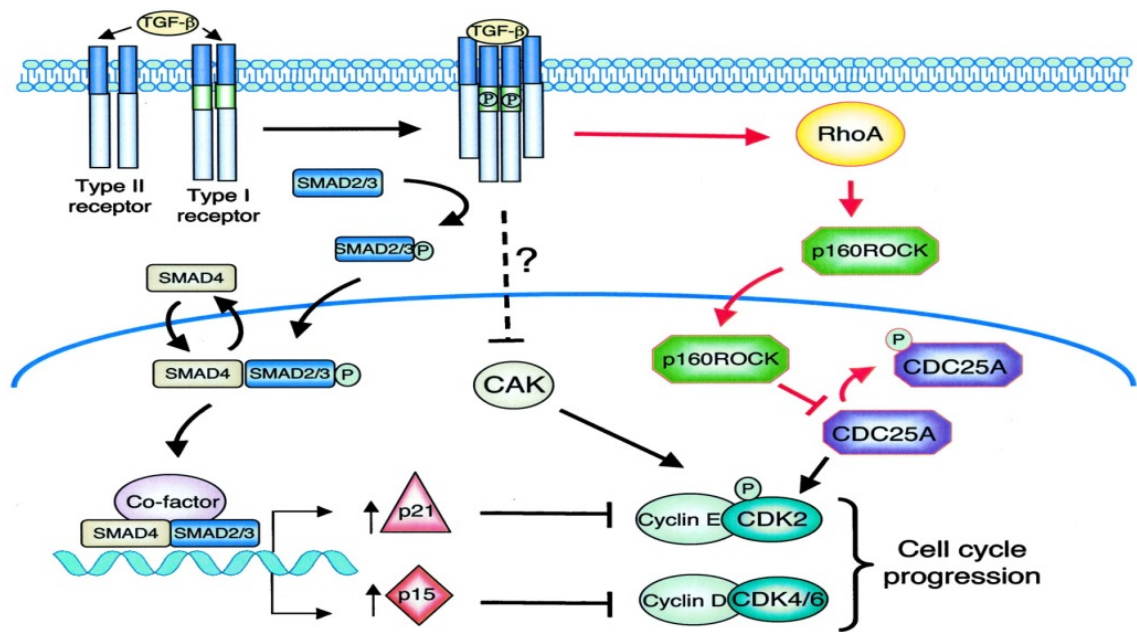
R-Smad'lar eğer T β RI ile SXS motiflerinden fosforile edilirse SARA'ya olan afiniteleride azalır, Co-Smad'lara (Smad 4) karşı artar ve çekirdeğe geçebilirler. Smad 4 proteinleri ligand'ların yokluğunda yapılarında bulunan nükleer export sinyal motifi (NES) etkisi ile çekirdek dışında kalır (8, 10, 12, 41-44, 47, 48).

TGF- β sinyal iletiminde, önemli role sahip olan Smad proteinlerinin inhibisyonu ile TGF- β sinyal cevabı negatif yönde düzenlenebilmektedir (49). Özellikle, R-Smad'ların inhibisyonunu sağlayarak TGF- β sinyal iletimini engelleyen proteinler İnhibitör Smad (Smad 6, 7) grubudur. Smad 6, BMP sinyalini inhibe eder. Smad 7 ise hem TGF- β hem de BMP sinyalini inhibe eder. Yapılan çalışmalarda Smad 6 ve 7 proteinlerinin, BMP, Aktivin, veya TGF- β 'ya cevapta negatif feed-back kontrolü ile düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (8, 46, 50). İnhibitör özellikte diğer grup Fosfatazlardır (Pirüvat dehidrogenaz fosfataz, PDP gibi). Etkisini R-Smad'ların C-terminallerinin defosforilasyonu yaparak gerçekleştirir. Örneğin; embriyonik gelişimde sekonder axisin indüksiyonu ve BMP sinyalinin inhibisyonunda görev alan SCP (Small C-terminal domain phosphatases) ve yine embriyonik gelişimde rol alan PDP, R-Smad'ların defosforilasyonuna sebep olurlar. Yine Smad proteinlerinin defosforilasyonu sağlayan Ubiquitin Ligaz (Smurf 1, 2)'lar ile de inhibisyon gerçekleştirilir. R-Smad fonksiyonlarının inhibisyonunda, Smad'ların N-terminal ve Linker bölgelerin fosforilasyonundan sorumlu Kinazlar (Mitogen Aktivated Protein Kinase MAPK, Cyclin- Dependent Kinase CDK gibi) etkilidir. Bu bölge endojen MAP kinazlar, Cam kinaz, CDK'lar tarafından fosforile edilen multiple Ser-Pro ve Thr-Pro birimlerini içerir. Yapılan çalışmalarda Smad 2 ve 3 ün CDK ve MAPK tarafından fosforilasyonu epitelyal hücrelerde büyümenin baskılanması fonksiyonunu antagonize ettiği, MAPK kinaz ailesinin bir üyesi olan TAK1 (TGF- β activating kinase 1)'in TGF- β ile indüklenmiş gen ekspresyonunun regulasyonunda etkili aynı zamanda BMP ile indüklenmiş mesoderm oluşumu ve embriyonik patern olayında da düzenleyici öneme sahip olduğu rapor edilmiştir (51-53).

2.11. Smad Proteinlerinin Nükleositooplazmik Geçisi

Smad'lar hem bazal hem de sinyal durumunda sitoplazma ve çekirdek arasında sürekli geçiş gösteren proteinlerdir. Smad'ların nükleositooplazmik geçişlerinde, nükleoporinler (Nup) (özellikle Nup 214, 153) aracılık eder. Bu olay Smad 2 ve 3'ün MH2 domaini

üzerindeki nükleoporin bağlanma bölgeleri arasındaki bağlanma ile olur. Smad'ların çekirdekten çıkarılması ve alınmasında nükleer transport reseptörleride etkilidir. Smad 4'ün çekirdekten çıkarılması, Smad 4'ün linker bölgesinde bulunan nükleer export sinyal motifine nükleer exporter olan CRM1'in bağlanması ile yapılır. Smad 2/3'ün çıkarılması Exportin 4, çekirdeğe alınması ise İmportin β 1 transport proteini eşliğinde olur (Şekil 2. 8) (46, 54).



Şekil 2.8. Smad proteinlerinin nükleostoplazmik geçişleri

2.12. Smad Kompleksinin Çekirdekteki Etkileşimleri

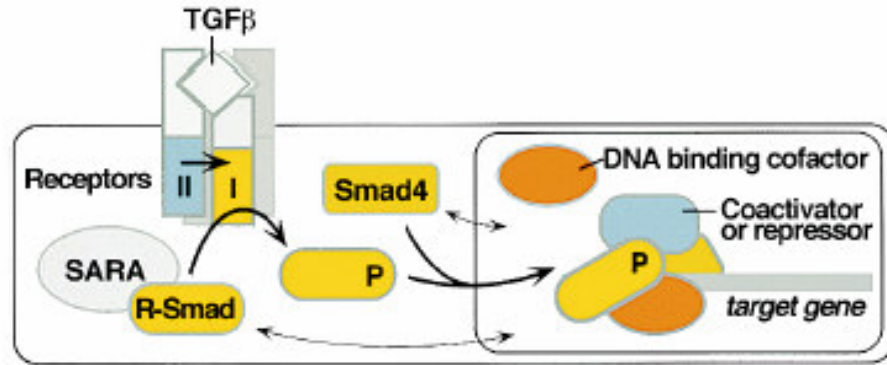
Ligand aktivasyonu ile Smad kompleksleri, çekirdeğe geçtikten sonra DNA üzerindeki hedef bölgelerine bağlanarak sinyal iletimine devam ederler. DNA'ya bağlanmada ve hedef bölgenin seçiminde Smad kompleksleri ile etkileşen moleküller ile sağlanır. Bu moleküller, iki grupta toplanır. Bunlar, DNA bağlayıcı-transkripsiyon faktörleri ve transkripsiyonel koaktivatörler/korepressörlerdir (46, 54, 55) (Şekil 2. 9.).

Smad komplekslerinin tek başına DNA'ya olan bağlanma afiniteleri çok düşüktür. Bu amaçla hedef genlerin spesifik promotor elementlerine bağlanmalarını sağlayan DNA Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörleri kullanılır. İlk tanımlanan Smad kompleksi ile etkilenen transkripsiyon faktörü *Xenopus* FoxH1 dir. FoxH1 ve diğer transkripsiyon

faktörlerinin yapısında ortak olan ve aktive Smad komplekslerini bağlayan prolinden zengin Smad ile etkileşen motif (SIM) ve FoxH1 motif (FM)'i bulunmaktadır. SIM ve FM, R-Smad'ların MH2 domaini ile etkileşir. FoxH1'in DNA bağlayıcı domaini de DNA'ya aktive Smad kompleksi bağlar. Aktive edilmiş Smad 4, Smad 2/3 kompleksine bağlanan FoxH1 memelilerde Aktivine yanıt veren gen üzerindeki promotor bölgede Aktivin Responsive Element (ARE)'e bağlanır ve transkripsiyon başlatılmış olur. Bu bağlanmada transkripsiyon aktivatörü olan Smad 4'ün MH2 birimi önemlidir. MH1 birimi ile de DNA'ya bağlanarak MH2 biriminin inaktivasyonu ile transkripsiyonun sonlandırılması sağlanır. FoxH1 proteinlerinin fosforilasyonu bunların çekirdekten ayrılmasına ve bazı durumlarda proteozom aracılı degradasyonuna olanak sağlar. Bu gibi olaylar kofaktörlerin Smad'lar ile fonksiyon görme yeteneğini etkileyebilir. FoxH1 geninin olmadığı çalışmalarda, anterior primitif çizgi ve düğüm oluşumundaki bozukluklardan dolayı erken embriyonik ölümler olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar ile bir hücrede TGF- β 'nin indüklediği yüzlerce gen yanıtının (aktivasyon/inaktivasyon) oluşumunda her bir Smad/Kofaktör kompleksinin farklı gen gruplarına etki ettiği tespit edilmiştir (45, 46, 55, 56).

Çekirdekte R-Smad'ların farklı kofaktörler (FoxH1, Mixer, OAZ, Jun, TFE3, Left1/TFE3 gibi) ile bağlanmak üzere yarışması hedef gen bölgesinin belirlenmesinde ve sinyal yolunun spesifitesinin oluşmasında düzenleyici rol oynar.

DNA'ya bağlanmış Smad kompleksleri ile etkileşen diğer moleküller Transkripsiyonel koaktivatörler ve korepressörlerdir. Koaktivatörler, DNA üzerindeki spesifik promotor bölgelerine bağlanmış Smad kompleksine (Smad 4 üzerindeki motiflere) bağlanarak pozitif yönde sinyal iletimine katılır. Bu koaktivatörlerden önemli iki tanesi; cAMP-response element binding protein (CREB)'i bağlayıcı protein olan CBP ve p300 dür. Bunlar Smad 2/3-Smad 4 ile birlikte TGF- β /Activin aracılı gen transkripsiyonun aktivasyonunu sağlarlar. Yapılan çalışmalarla CBP ve p300 deki bazı gelişimsel defektlerin TGF- β süperailisi sinyal yolağında bozukluklara neden olduğu gözlenmiştir. Korepressörler (Ski, SnoN, TGIF vb) ise bu bağlanmayı baskılayarak hem Smad fonksiyonlarının negatif düzenleyicileri hem de gen down-regülasyonunun aracısı olarak davranırlar. TGF- β sinyalinde koaktivatör ve korepressörler arasındaki seçim proteinlerin miktarına bağlıdır (46, 47, 56, 57).

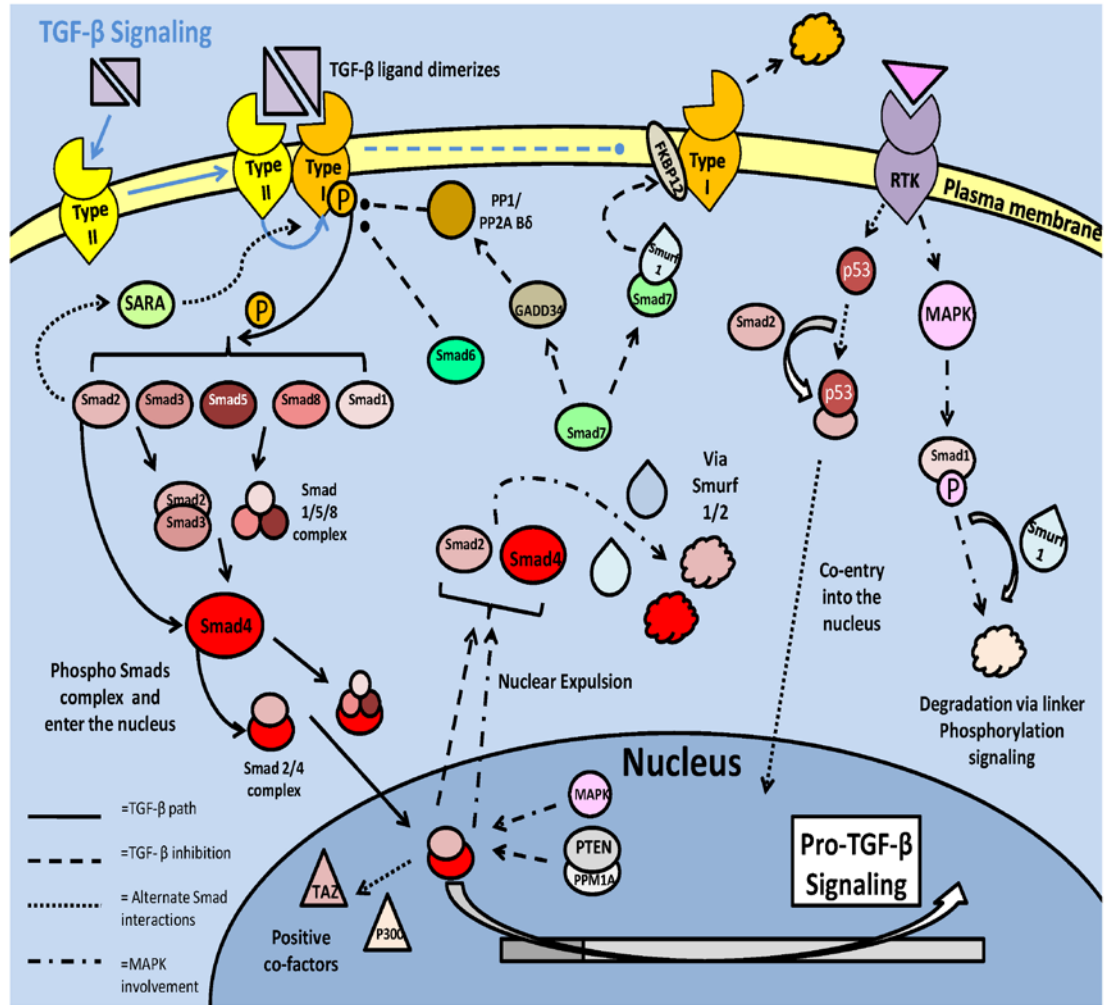


Şekil 2.9. Smad kompleksinin çekirdekdeki etkileşimleri

2.13. TGF- β / Smad Sinyal İletiminin Regülasyonu

TGF- β / Smad sinyal iletiminde ortamda TGF- β 'nın varlığı sonucu oluşan TGF- β -reseptör kompleksinin sinyal cevabının aktivasyonu veya inaktivasyonu iki farklı yolla kontrol edilir (8, 17, 24, 32, 56, 58). Birinci yol, Klatrin-bağımlı yol olup; TGF- β 'nın TGF- β reseptör tip I ve II'yi aktive etmesi sonucunda oluşan TGF- β -reseptör kompleksinin, endozom içinde, SARA varlığında Smad 2/3'e sunulmasıdır. Aktive olmuş Smad 2/3, Smad 4 ile bağlanarak heteromerik kompleksler oluşturarak çekirdeğe geçer ve transkripsiyondan sorumlu faktörlerin aktivasyonuna neden olur. (Şekil 2.10.).

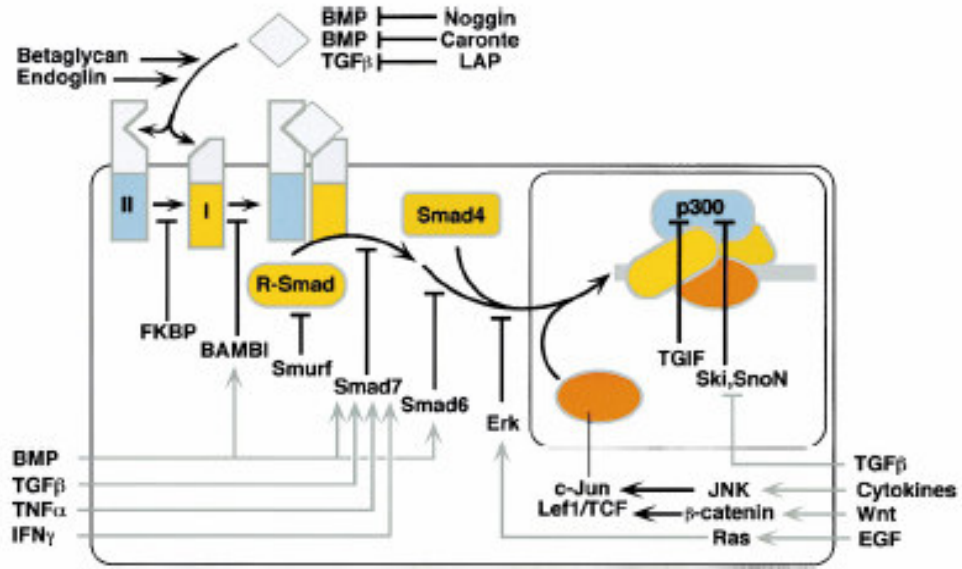
İkinci yol, kolesterol ve kaveolinden zengin kaveol-aracılı yoldur. Bu yolda, TGF- β reseptör yıkımı gerçekleşir. Smad 6 ve Smad 7 gibi inhibitör özellikteki Smad proteinleri Smurf1 veya 2 ile kompleks oluşturarak aktive olmuş TGF- β reseptör kompleksine bağlanırlar. Gerçekleşen poly-ubiquinasyon ve takibindeki proteozomal degradasyon ile bu kompleks yıkılır. Sonuç olarak, TGF- β -reseptör kompleksinin inhibisyonu gerçekleşir (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. TGF-β- reseptör kompleksine oluşturulan cevaplar

TGF-β sinyalinde yolun başlama noktası olan ligandların reseptöre bağlanması, sıkı bir şekilde kontrol edilir. Membrandaki reseptörlere TGF-β bağlanmasını önleyen kendisine TGF-β faktörlerini bağlayan yapısal olarak farklı birçok çözünür proteinler tanımlanmıştır. Örneğin; Latency-associated protein (LAP), TGF-β'ya, Noggin, Chordin, Caronte, Cerberus, BMPs'ye, Follistatin, Activine bağlanır. Follistatin aynı zamanda Aktivinden daha düşük afinitede BMP-7'ye de bağlanabilir ve in vivo BMP sinyalini antagonize eder. Bu proteinlerin ekspresyonları veya aktiviteleri çeşitli sinyaller tarafından kontrol edilir (Örneğin; LAP, trombospondin tarafından kontrol edilir). Buna karşın, reseptörlere ligand bağlanmasını artıran membrana bağlı protein grupları da bulunmaktadır. Tip III reseptör olarak da bilinen Betaglikan ve Endoglin TGF-β'nın reseptörlerine bağlanmasını artırıcı yönde davranır. Yine hücre içinde

bulunan Tip I reseptörlerini bazal durumda tutan FKBP12 ve tip I reseptörlerin aktivasyonunu önleyen BAMBI sinyal ağı içindeki faktörlerdendir (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. TGF-β sinyal ileti yolunun düzenlenmesi

Sonuç olarak; TGF-β molekülü tip II reseptörün sisteince zengin ekstraselüler dimerine bağlanır ve tip I reseptör aktive olarak heterodimerizasyon gerçekleşir. Bu heterokompleks yapı daha sonra membranın sitoplamik kısmında bulunan SARA (Smad anchor for reseptor activation) olarak anlandırılan ZFTVE9 geni tarafından kodlanan, Zinc finger FYVE domain-containing protein 9 ' un varlığında tip I reseptör, tipII reseptörün yapısından serin/threonin kinaz enzimi ile fosforile olur. SARA proteini hem TGFβRII in serin/threonin domainine hem de R- Smad olarak bilinen, Smad 2, Smad3, Smad 5 ve Smad 8 moleküllerin MH2 bölgelerine bağlanabilme karakterindedir. Böylece TGFβRII ve R-Smad'ların fosforilasyonuna olanak sağlar. Smad proteinleri N- terminal MH1 domaini ve C-terminal MH2 domaini şeklinde iki korunmuş domainden oluşmaktadır. Bu iki domain birbirine Linker bölgesi ile bağlıdır. MH1 domaini DNA ya bağlanma yeteneğindedir, MH2 ise TβRI'a bağlanma yeteneğine ve transkripsiyon aktivasyonuna sahiptir. TipI reseptöre spesifik olarak etkileşen ve R-Smad-Co-Smad etkileşimi MH2 domainin L3 loop'u ve α-helix kısmıdır. L3 Loop domaini Smad4 de yani Co-Smad proteininde bulunmamaktadır. Linker bölgesi

regülatör fonksiyonuna ve Erk (Extracellular protein kinase) ile MAPK (Mitogen-activated protein kinase)'a sahiptir. Smad ailesi üç kısma ayrılır. Bunlar regülatör görevi gören R-Smadlar (Smad1/5/8) BMP reseptörlerinin substratesleri ve TGF- β ve aktivin substratesleri (Smad2/3). R-Smad'ları nükleusa taşıyan Co-Smad (Smad4) ve negatif feedback ile R-Smad-Co-Smad birlikteliğini inhibe eden I-Smadlar (Smad 6/7). R-Smad proteinlerinden herhangi biri fosfatlanmış tip I reseptörden fosfat grubunu serin/threonin kinaz enzimi ile yapısına bağlar. Bu Smad gruplarının hangisinin fosforilasyona uğradığı önemlidir çünkü sinyal yolağı ilk fosforillenen Smad proteinine bağlı olarak değişiklik gösterecektir. Smad 2' in fosfatlanması durumunda Smad 4 direk olarak aktive olabilir ya da Smad 2 ile Smad 3 birleşerek birlikte Smad 4 (Co-Smad) ile heterokompleks oluşturabilmektedir. Smad 5 veya Smad 8'den herhangi biri tip I reseptörün fosfat grubunu koparıp kendi yapısına bağlar ise bu iki Smad grubu (Smad 5, Smad 8) birleşerek kompleks oluştururlar. Oluşan bu kompleks Smad 4'ü aktive eder ve heterokompleks yapı oluşturur ancak kendi aralarında kompleks oluşturmaksızın Co-Smad ile heterokompleks oluşturamazlar. Bu farklı yollarla aktive olan Smad 2/Smad 3 veya Smad 5/Smad 8 Co-Smad ile heterokompleks oluşturur. Smad4'ün nükleusa geçmesi burada CRM-I in aracılığı ile promotora taşınır. Smad4'ün DNA ya bağlandığı an itibarıyla artık geri dönüşümsüz bir süreci başlatır ve sentezlenecek mRNA içeriği değişecektir. Ancak Smad4 promotora bağlanmadan önce heterokompleks defosforile olursa degrade olur ve CRM-I 'i tanıyamaz. Heterokompleks Smad SBEs (Smad binding element)'in sunduğu çeşitli hücre döngüsünü düzenleyen genlerin promotor sekanslarını tanıyabilir ve bağlanır. SBE 8 palindromik dizisini GTCTAGAC veya GTCT yada AGAC multi kopyaları içerir. Oluşan bu heterokompleks yapı nükleus porlarını aşabilme yeteneğindedir. Nükleusa ulaşan heterokompleks burada transkripsiyon faktörleri ile etkileşir ve hedef genin promotor bölgesine MH2 domain kısmı ile bağlanır. Burada TGF β response elementini oluşturur. Heterokompleks Smad yapısı transkripsiyon faktörleriyle etkileşemezler ise bu kompleks sitozole geçer degrade olur. Bu degradasyon sonrası I-Smadlar aktive olur (24, 27, 32, 34, 37, 44-48, 53-56, 59).

2.14. Real Time PCR

1988 yılında "Thermus aquaticus" bakterisinden saflastırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte polimeraz zincir reaksiyonları için (PCR) otomatize termal siklus cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. Higuchi ve

arkadaşlarının 1992 yılında floresan ısıma teknigini kullanarak Real-time PCR'ı geliştirmislerdir. Bu gelişim sayesinde artık PCR reaksiyonunu boyunca oluşan ürün miktarını ekranda izlemek ve gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek mümkün olmuştur.

RT-PCR konvansiyonel PCR ve prob hibridizasyon yöntemlerinin birlikte kullanıldığı nükleik asit kantitasyon teknigidir. Spesifik bir floresan işaretli prob DNA/cDNA hedef ile bağlanarak PCR reaksiyon sisteminin içine eklenir. PCR amplifikasyonunun ekstensiyon fazı boyunca spesifik floresan işaretli prob taq polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile kesilir. Bu da tespit edilebilen bir floresan miktarı üretir. Bu reaksiyonda salınan floresan miktarı hedef sekans sayısı ile doğru orantılıdır. Bu sebeple başlangıç hedef DNA/cDNA kopya sayısının doğru ve mutlak sayısal değerlendirilmesi kapalı bir tüp tekniği sistemi ile yapılabilir. Bu teknik konvansiyonel PCR'da gerekli olan PCR sonrası işlemlere gerek duymaz ve geleneksel PCR da kaçınılmaz olan kontaminasyon ihtimalini azaltır, dahası bu yöntem amplifikasyon primerlerine yönelik sekanslarda prob hibridizasyonunun kullanımı sayesinde yanlış pozitif veya negatif sonuç ihtimalini azaltmaktadır.

RT-PCR günümüzde çeşitli hastalıklarda, PCR temelli ölçmede sıkça kullanılan bir metoddur. RT-PCR nested PCR'a göre daha az sensitiv olmasına rağmen alınan örnekte residüel hastalığı bulmada internal kontrol genlerini içermesiyle yeterince hassastır ve residüel hastalığın miktarına tam olarak karar vermeyi sağlar. RT-PCR yöntemi spesifik genlerin (füzyon gen, anormal eksprese edilen gen) mRNA seviyelerini ölçer (60).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Demirbaş Malzemeler Aletler

- Buzdolabı
- Derin Dondurucu (-20°C)
- Derin Dondurucu (-80°C)
- Mikrosantrifüj
- Otomatik Mikropipetler
- Nano-drop
- Thermo Real Time PCR cihazı
- Soğutmalı Santrifüj
- Thermocycler
- Isıtıcı plate
- Elisa reader
- Laminer airflow
- Hücre kültürü flaskları, falkon tüpleri, ependorf tüpleri
- Mikroskop

3.2. Sarf Malzemeler ve Kimyasal Maddeler

- Trizol
- Etanol
- Kloroform B
- Buzluk
- Ependorf Tüpler (0.2,0.5,1.5,2 µL'lik)
- DNA sentez kiti
- Pastör pipeti
- Otomatik pipet

- Otomatik puar
- Hücre kültürü flaskaları, falkon tüpleri
- DZNep

3.3. DZNep ilacının hazırlanması

- DZNep: 5mg MA : 262,3
- Hazırlanacak stok : 5000 mM
- 5 mg DZNep ilacı 3,8 mL DMSO da çözündürülür.
- Daha sonra enjektör yardımı filtre (0.20 um) den geçirilir.
- Çalışma konsantrasyonu: 10 mM (1x)
- Hazırlanan stok: 5 μ M (500x)
- 50 uL olarak steril ependorflara stoklanır

3.4. Hücre Kültürü

Çalışmamızda insan karaciğer hepatosellüler karsinoma hücre hattı olarak HEPG2 kullanılmıştır. HEPG2 hücre hattı, adheren özelliğe sahip ve doubling time'ı 48 saattir. HEPG2 hücre hattı Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD'dan Prof.Dr. Abdulkarim Bedir tarafından hediye edilmiştir. Hücreler verilen protokole göre pasajlanmıştır.

3.4.1. Hücre Kültür Solüsyonları

1) DMEM pH; 7.4

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Likit, kullanıma hazır, 2-8 °C'de son kullanım tarihine kadar saklanabilir.

2) Fetal Bovin Serum (FBS)

- Sigma Aldrich, 500 mL, USA
- Isı ile inaktive edilmiş, steril filtre edilmiş, böcek hücre kültüründe test edilmiş.
- Stok solüsyon 15 mL'lik falkon tüplere 10'ar mL alikotlanarak -80 °C'de saklanır.

3) L-Glutamin 200mM, 20 mL

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Stok solüsyon 15 mL'lik falkon tüplere 2'şer mL alikotlanarak -80 °C'de saklanır.

4) Tripsin-EDTA (%0,25 tripsin, %0,02 EDTA) 100 mL

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Stok solüsyon 15 mL'lik falkon tüplere 10'ar mL alikotlanarak -80 °C'de saklanır.

5) Penisilin–Streptomisin Solüsyonu (Penisilin:10000 units/mL+streptomisin 10mg/mL)

- 15'lik falkon tüplere 5'er mL olacak şekilde alikotlanarak -80 °C'ye kaldırılır.

6) Fosfat Buffer Salin (dPBS) pH;7.4

Ticari olarak satılan Biological Industries Dulbecco's Phosphate Buffer Saline kullanılmıştır.

7) Hücre Kültür Komplet Medyum Hazırlığı

- Çalışmamızda kullanılan komplet medyum 50 mL lik falkonlara hazırlanmıştır.
- 44 mL DMEM Low glukoz
- 500µL penisilin streptomisin karışımı
- 500µL L-Glutamin
- 5 mL FBS
- Solüsyonlar lamina flow'da steril şartlara dikkat edilerek hazırlanmıştır.
- 50 mL hücre kültürü medyum miktarları tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Komplet Medyum Hazırlığı

Solüsyonlar	Volüm	Konsantrasyon Yüzdesi
FBS	5 mL	%10
Penisilin/Strep	500µl	%1
L-Glutamin 200 mM	500µl L-Glutamin	%1
DMEM	44 mL	%88

7) DMEM Freeze-Medyum Hazırlığı,

- İlk önce Cryoprotectant hazırlanır.
- 3 Birim Haes + 2 Birim DMSO = 5 Birim Cryoprotectant hazırlandı.
- DMEM komplet medyum benmaride 37 °C ye getirildi.
- Mr. Frosty'nin içine cryo tüpler etiketlenip konuldu.
- Hücre dondurmada $\frac{3}{4}$ oranında hücre $\frac{1}{4}$ Cryoprotectant kullanıldı.
- Her bir cryo tüpüne 150µL Haes + 10 0µL DMSO+ 750µL = 1 mL (1 000 000 hücre için) kullanıldı.
- 24 saat -80°C de bekletildi daha sonra -196 °C azot tankına kaldırıldı.
- 1 000 000 hücre için 1mL freeze medyum hazırlandı (Tablo 3.2.)

Tablo 3.2. Freeze Medyum Hazırlığı

Solüsyonlar	Volüm	Konsantrasyon Yüzdesi
Komplet Medyum	750 µL	% 75
DMSO	100 µL	% 10
HAES	150 µL	% 15

3.5. Hücre Kültürü Protokolleri

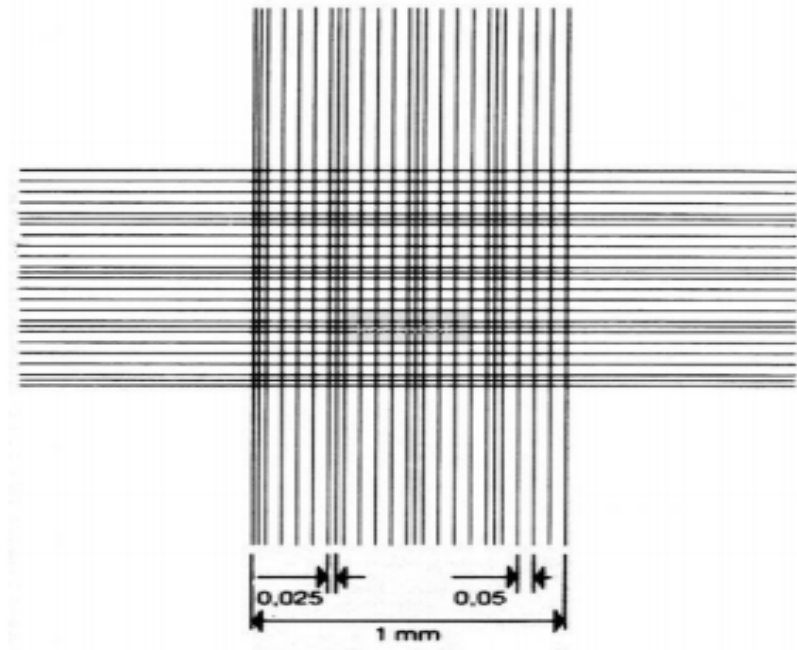
3.5.1. Hücrelerin Çözdürülmesi

- İçinde dondurulmuş hücre bulunan cryo tüp 37 °C benmaride hızlı, çok az buz kalacak şekilde çözdürülür.
- 5 mL DMEM low komplete medyum falkon içine yavaşça bırakılır.
- Fazla sarsmadan 350 xg de 5 dakika satrifüj edilir.
- Süpernatant kısmı uzaklaştırılır ve 5 mL DMEM low komplet medyumda çözdürülür.
- Ependorf'a 100 µL alınır ve Thoma lamında hücreler sayılır.
- 350 xg 5 dakika santrifüj edilir
- Süpernatant kısmı uzaklaştırılır, hücre sayısına ve ekilecek olan flaska göre DMEM low komplet ile çözdürülür flasklara ekim yapılır.

3.5.2. Hücre Sayımı

Hücre sayımı tripan mavisi ile boya dışlama metoduna göre yapıldı. Bu yöntemde, canlı hücreler membran bütünlüğünü koruduğu için tripan mavisi içeri giremezken; ölü hücrelerde membran bütünlüğünü bozulduğu için boya içeri geçer bu yüzden koyu mavi renge boyanır. Hücreler, Thoma lamı olarak adlandırılan bir çeşit bölmeli lama damlatılır ve üzeri lamel ile kapatılarak mikroskop altında tek tek sayılır. Protokol şu şekildedir:

- İnkübatördeki hücreler çıkarıldı, daha önce anlatılan tripsinizasyon ve santrifüj işleminden sonra hücreler 1 mL besiyeri ile süspansiyon haline getirildi.
- Lamel, kenarları önceden su ile ıslatılan Thoma lamının tam ortasına gelecek şekilde yerleştirildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Thoma Lamı

- Hücre yoğunluğuna göre seyreltilen örnekten 50 μ L, tripan mavisinden (%0.4) 50 μ L (eşit hacimde olmalı) 1.5 mL'lik ependorf tüpe alındı ve pipet ile 2-3 defa pipetaj yaparak homojen olarak karışmaları sağlandı.
- 10 μ L hücre/tripan mavi karışımı pipetle çekildi ve pipet ucuyla lamele emdirilerek thoma lamının kenarından aktarıldı (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2.Örneğin uygulması

- Thoma lamı mikroskoba yerleştirildi ve küçük büyütmede Thoma lamının çizgileri bulundu. Şekil 3.2’de gösterildiği gibi, sadece merkezde çizgilerin keştiği 1 mm²’lik alandaki 16 karenin içindeki canlı hücreler sayıldı. Ölü hücrelerin her tarafı mavi olacağından, mavi olmayan hücreler sayıldı.

Bu işlem 5 defa yapıldı ve ortalaması alındı. Aşağıdaki formüle göre 1 mL’deki canlı hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Canlı hücre sayısı (hücre/mL)} = \text{Ortalama hücre sayısı} \times 2 \times 10^4$$

Ortalama hücre sayısı: 5 defa 1 mm²’lik alandaki 16 kare sayıldıktan sonra, toplam hücre sayısının 5’e bölünmesiyle elde edilir.

10⁴: Her 1 mm² alan hacim olarak 0.1 mm³’e, bu da 10⁻⁴ mL’ye eşit olduğu için, mL’deki hücre sayısını bulmak için 10⁴ ile çarpılır.

2: Alınan örnek hacmine eşit miktarda tripan mavisi konulduğu için 2 kat seyrelir, bu yüzden 2 ile çarpılır.

Sayım için alınan örnek seyreltiliyse, bulunan sonuç en son seyreltme faktörü ile çarpılır.

3.5.3. Hücrelerinin pasajlanması

Hücreler sıkışık (konfluent) duruma gelince hem besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelir, hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalmaları durur. Bu nedenle hücrelerin pasajlanmaları gerekir.

- DMEM low komplete hücre kültür ortamı, FBS ve tripsin-EDTA su banyosunda 37°C’ye ısıtılır. d-PBS ise oda sıcaklığında bekletilir.
- Flasktaki hücreler %70-80 confluent olduğunda pasajlama yapılır.
- Hücreler CO² inkübatöründen alınır ve mikroskopta incelenir.
- Flask dik konuma getirilir ve hücre tabakasının olduğu yüzeye pipet değdirilmeden ortam yavaşça çekilir.
- Hücre tabakasına pipet değdirilmeden flask alt köşesine d- PBS eklenir, yüzey yıkanır ve PBS yavaşça çekilir.

- Yeni bir pipet ile ortama tripsin eklenir ve flask 2-3 dakika CO₂ inkübatöründe tutulur.
- Mikroskopta hücrelerin flask tabanından serbestleşip serbestleşmediği kontrol edilir.
- Hücreler serbest ise flaskta konulan tripsin miktarının %10 u kadar FBS eklenir ve hücreler santrifüj tüpüne (falkon) aktarılır.
- Hücreler 350 g'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Supernatant uzaklaştırılır.
- Hücre pelletini çözmek için falkona 10 mL DMEM eklenir ve pipetaj yapılır (pelletin yoğunluğuna göre değişir)
- Hücre sayımı Thoma lamına 10 uL hücre solüsyonundan eklenerek çalışılan hücre hattı için uygun ekim yoğunluğunda pasajlanır.
- Flask üzerine hücre hattı ismi, pasaj numarası, pasaj tarihi yazılır.
- Hücreler mikroskopta incelenir.
- Flasklar CO₂ inkübatörüne yerleştirilir.
- Medium 2-3 gün aralıklarla değiştirilir.

3.5.4. Hücrelerinin dondurulması

- İlk önce Cryoprotectant hazırlanır.
- Daha sonra Mr. Frosty 'nin içine Cryo tüpler etiketlenip konulur.
- Hücre dondurmada $\frac{3}{4}$ oranında Hücre, $\frac{1}{4}$ oranında Cryoprotectant kullanılır.
- Her bir cryo tüpüne 750 uL Hücre + 250 uL Cryoprotectant = 1 mL (1.000.000 hücre için) konulur.

3.6. Hücreden RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için trizol yöntemi ile gerçekleştirildi.

- 6'lı well platelerin her bir welline 100.000 hücre ekildi.
- 24 saat inkübe edi ve hücrelerin yapışması sağlandı.
- Daha sonra ilaçlı gruba 5uM DZNep eklendi.(Her bir welle 2 mL DMEM + 2 uL DZNep)

- -20°C’de dondurulan karaciğer HEPG2 hücre pelleti 0.5 mL denatüre edici çözelti ile karıştırılarak lizis yapılır ve 1,5 mL’lik RNaz ve DNaz içermeyen ependorf tüplere alındı.
- 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Tüp üzerine 0.5 mL ekstraksiyon çözeltisi eklenir. 15 saniye vorteks ile karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Karışım, +4°C’de, 12 000 x g’de 15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası çözelti üç faza ayrılır. En üstteki renksiz kısım RNA’yı içerir. Protein içeren sarı renkli orta faz ile DNA’yı içeren pembe renkli alt faz, Western Blot yapılmak üzere -20°C’de tutulabilir.
- En üstteki renksiz kısım RNA’yı içerdiği için çekilerek ayrı bir ependorf tüpe alındı. Üzerine 0.5 mL izopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- Karışım, +4°C’de, 12 000 x g’de 8 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı, RNA’yı içeren beyaz renkli pellet 1 mL %75 etanol ile vorteksenerek yıkandı ve +4°C’de, 7 500 x g’de 5 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve 5 dakika etanolün uçması için oda sıcaklığında bekletildi.
- RNA 100 µL DEPC ile muamele edildi.

Elde edilen RNA’nın konsantrasyonu 260 nm’de absorbans ölçülerek aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times \text{seyreltme faktörü} \times 40 \mu\text{g/mL}$$

(Tek zincirli RNA molekülü için, 1 optik dansite (OD) 40 µg/mL’ye karşılık gelmektedir.)

RNA saflığı ise A_{260}/A_{280} oranı ile belirlendi.

Elde edilen RNA’lar, RT-PCR yapılana kadar -20°C’de bekletildi.

3.7. Reverse transkriptaz PCR (RT-PCR) ile cDNA sentezi

RT-PCR RNA’dan revers transkriptaz enzimi sayesinde komplementer DNA (cDNA) sentezinin gerçekleştiği yöntemdir. Bu çalışmada RNA’dan cDNA sentezi için First Strand

cDNA sentez kiti kullanıldı. Kitde bulunan malzemelerin karışımdaki içerikleri aşağıda gösterilmiştir:

1X M-MuLV Enzim karışımı:

- 0.5 ünite/μl M-MuLV Reverse Transkriptaz ,
- 1 ünite/μl Murine RNaz inhibitörü

1X M-MuLV Reaction Karışımı:

- 50 mM Tris-Acetate (pH 8.3)
- 75 mM KOAc (potasyum asetat)
- 3.1 mM Mg(OAc)₂
- 0.5 mM içerecek şekilde deoksिनुकлеотит karışımı (dNTPs, N = A, G, C ve T)

First Strand cDNA sentez protokolü “thermocycler” programı ayarlanarak Biorad iCycler PCR cihazında şu şekilde yapıldı:

İlk olarak tüm bileşenler elde eritildi ve buz üzerine kondu.

- RNA örnekleri ile oligo primer d(T)23VN, 0.2 mL’lik RNaz içermeyen steril PCR tüplerine eklendi ve pipetle karıştırıldı.

Total RNA	1–6 μl (0.5 μg)
d(T)23VN primer (50 μM)	2 μl
nükleaz içermeyen H ₂ O	değişken
Total Hacim	8 μl

- Cihaza yerleştirilen tüplerdeki RNA 5 dk boyunca 70°C’de denature edildi ve buz üzerine alındı.

- Tüp üzerine aşağıdaki bileşenler eklendi.

M-MuLV Reaksiyon Karışımı	10μl
M-MuLV Enzim Karışımı	2 μl

- 20 μl cDNA sentez karışımı cihazda 42°C’de bir saat inkübe edildi.

- v. Enzim 80°C’de 5 dk inaktive edildi. Karışım 30 µl nükleaz içermeyen H₂O ile 50 µl’ye seyreltilti.

cDNA ürünleri PCR yapılarına kadar –20°C’de saklandı.

3.7. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Elde edilen hasta ve kontrol cDNA’ları, TGF-β, Smad2, Smad4, Smad5, Smad6, Smad7 ve housekeeping gen mRNA dizisine spesifik FAM ile isaretili primer/problar ile 20 µl reaksiyon hacminde 0,2mL PCR tüplerinin içinde amplifiye edildi. Ayrıca EZH2 gen ekspresyonu da çalışıldı. Amplifikasyon için Primerdesign marka primer/prob kiti kullanıldı. Genlerin mRNA kopya sayılarının belirlenmesinde her bir gen için 100000, 10000 ve 1000 kopya içeren pozitif kontroller (standartlar) kullanıldı. Amplifikasyonlar Real-Time RT PCR cihazı olan LightCycler 480 cihazında gerçekleştirildi. Çalışmaya alınan bütün örnekler standartlar ile birlikte ve en az 3 kez çalışıldı.

Tablo 3.3. Real-Time PCR reaksiyonu için gerekli karışım içeriği ve miktarları

Konponent	Hacim
RT ² SYBR Green Mastermiks	12,5 µL
Preamplikasyon ürünü	3µL
RT ² qPCR Primer (10µM)	1µL
Nükleaz içermeyen su	10,5 µL
Toplam hacim	25 µL

Tablo 3.4. Real-Time PCR döngüleri ve ısı değerleri

Döngü Sayısı	Süre	Isı Derecesi	Açıklama
1	10 dk	95°C	Bubasamakda DNA Taq Polimeraz ısı ile aktive “olmaktadır
40	15 sn 1 dk	95°C 60°C	DNA zincirinin uzaması Floresan ile veriyi toplama işlemi gerçekleştirilir.

3.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, SPSS 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences) istatistik programı kullanılarak yapıldı. Parametrelerin karşılaştırılmasında Student- t testi kullanıldı. 0.05'in altındaki p degeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda hepatosellüler karsinomanın moleküler patogenezin aydınlatılmasına katkısı olması amacı ile HEPG2 hücrelerine DZNep tedavisi uygulayarak TGF- β /Smad yolağı araştırıldı. 5 μ M DZNep, hücrelerimize 72 saat boyunca uygulandı.

DZNep'in hücrelerimize etkili olup olmadığı EZH2 ekspresyonu ölçülerek kontrol edildi. DZNep'in HEPG2 hücrelerinde EZH2 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak düşürdüğü tespit edildi ($p<0.001$). TGF- β , Smad 2-7 genlerinin ekspresyon düzeyi farklılıklarını, bir house keeping gen olan GAPDH geni ile normalize edildi. Ayrıca kontrol grubu olarak da DZNep verilmemiş HEPG2 hücreleri kullanarak ekspresyon değerlerini karşılaştırdık. Ct (cycle threshold) değeri PCR sırasında florasan sinyallerin görüldüğü eşik değerini ifade eder. Bu değer ne kadar küçükse genin ekspresyon (ifade) olma oranı o kadar yüksektir. Çalışmamızda her gen en az üç kez çalışılmıştır. Bu çalışmada TGF- β , Smad 2-7 genleri ile bu genlerin kontrol gruplarına göre farklılıkları Hedef Gen/Referans Gen Normalizasyon oranlarının ortalaması alınarak, Student- t Testi ile istatistiksel analiz yapıldı. Sonuçları aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Tablo 4.1, Tablo 4.2).

TGF- β , Smad 2-7 genlerinin gruplar arasında Ct değerleri karşılaştırıldığında, DZNep verilen grupta tüm genlerin, DZNep verilmeyen gruba göre çok daha erken ct değerlerine sahip olduğu görüldü (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Araştırılan genlerin ortalama Ct değerleri

	DZNep (Ct)	Kontrol (Ct)
TGF- β	15	10
SMAD-2	15	10
SMAD-3	16	10
SMAD-4	14	10
SMAD-5	20	10
SMAD-6	22	10
SMAD-7	19	10

Relatif kantitasyon Gen ekspresyonunun relatif kantitasyonu, farklı dokulardaki spesifik genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıkları belirlemeye izin verir. Bu farklılık, absöü kantitasyonda olduğu gibi bir değer olarak değer, n-katı şeklinde ifade edilir. Real-time PCR kantifikasyonunda hedef numunenin başlangıç miktarındaki küçük farklılıklar, amplifikasyon ürününe katlanarak yansır. Bu durum özellikle farklı bireylerden alınan örneklerle başlanan reaksiyonlarda izlenir. Bu relatif kantitasyonda yanlış sonuçlara sebep olur. Bir internal kontrol kullanılarak bu başlangıç farklılıklarını standardize etmek ve elde edilen sonucun normalizasyonu bu yüzden çok faydalıdır. İdeal bir internal kontrol tüm dokulardan ekspresse olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan ‘housekeeping gen’ler ökaryotlarda çok çeşitli olmakla birlikte en sık Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), β actin, Asidik ribozomal fosfoprotein (36B4) ve rRNA kullanılmaktadır. Bu genler referans gen olarak da isimlendirilmektedir. Biz çalışmamızda GAPDH genini kullandık.

$\Delta\Delta CT$ metodu olarak da isimlendirilen bu metod da, standart eğri metoduna benzer ama konsantrasyonların yerine CT değerleri kullanılır. Hedef genin CT değer bir referans genin CT değerine oran olarak normalize edilir. Daha sonra standart eğri metodunda olduğu gibi normalize CT değerleri seçilen bir kalibratöre oranlanır. Sonuçlar kalibratörün n-katı şeklinde verilir. CT’nin doğru hesaplanabilmesi için,

CT metodu, $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile ifade edilir. Burada:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{hedef}) - \Delta CT(\text{kalibratör})$$

$$\Delta CT(\text{hedef}) = CT(\text{hedef}) - CT(\text{referans})$$

$$\Delta CT(\text{kalibratör}) = CT(\text{kalibratör}) - CT(\text{referans})' \text{ dir. .}$$

Araştırılan genlerin Hedef Gen/Referans Gen Normalizasyon oranı aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4.2.)

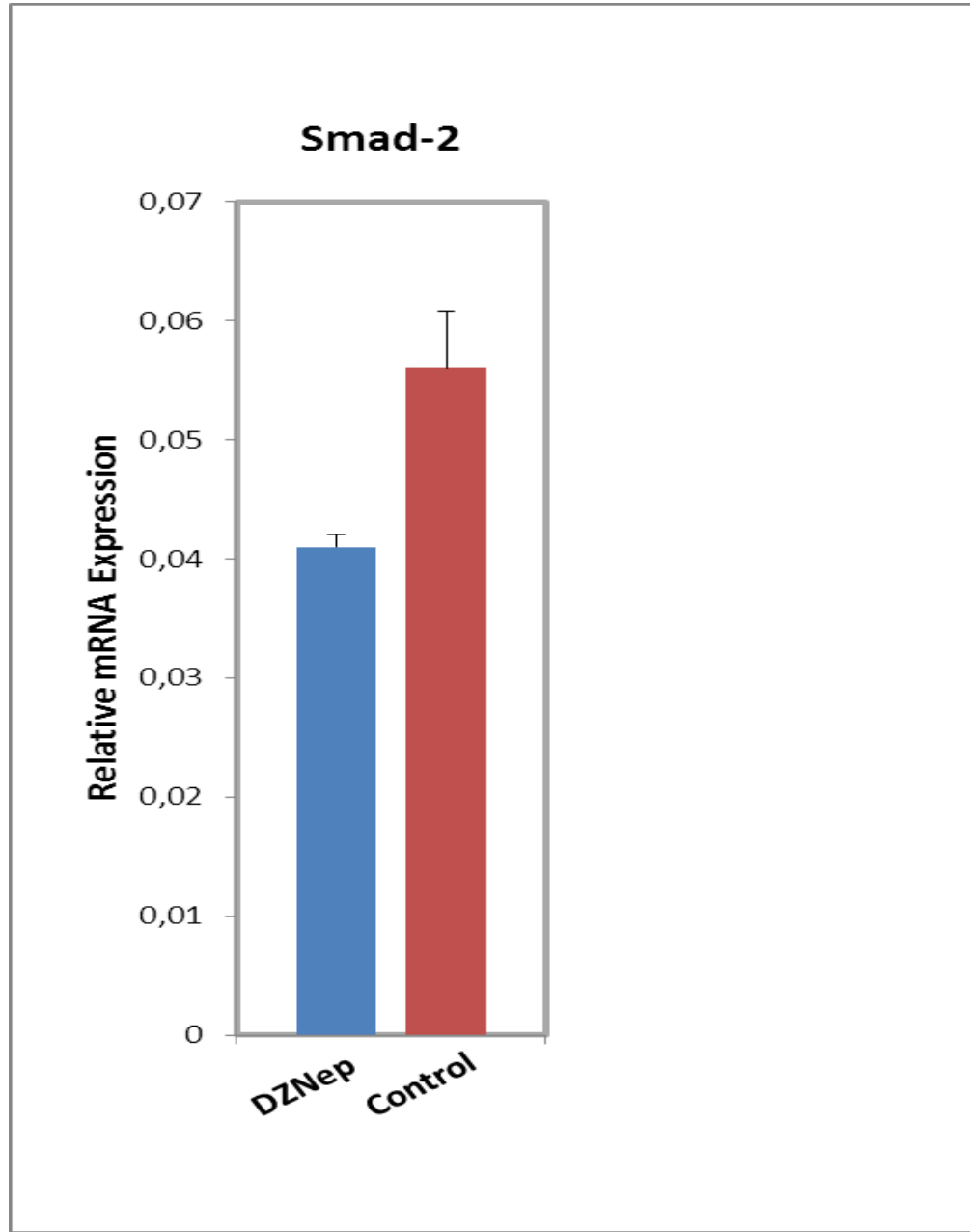
Tablo 4.2. Araştırılan genlerin Hedef Gen/Referans Gen Normalizasyon oranı

	Hedef Gen/Referans Gen Normalizasyon oranı DZNep	Hedef Gen/Referans Gen Normalizasyon oranı Kontrol
TGF-β	4.85E-03 5.12E-03 5.09E-03	3.81E-02 3.67E-02 4.01E-02
SMAD-2	3.97E-02 4.17E-02 4.15E-02	5.50E-02 5.20E-02 6.12E-02
SMAD-3	4.07E-03 4.01E-03 4.24E-03	2.61E-02 2.76E-02 2.81E-02
SMAD-4	3.61E-02 4.09E-02 4.13E-02	7.35E-02 6.30E-02 7.48E-02
SMAD-5	9.15E-04 9.35E-04 8.80E-04	1.20E-03 1.13E-03 1.22E-03
SMAD-6	9.83E-05 9.26E-05 7.83E-05	2.78E-04 3.24E-04 3.75E-04
SMAD-7	3.00E-03 2.91E-03 2.93E-03	3.53E-03 3.51E-03 3.95E-03S

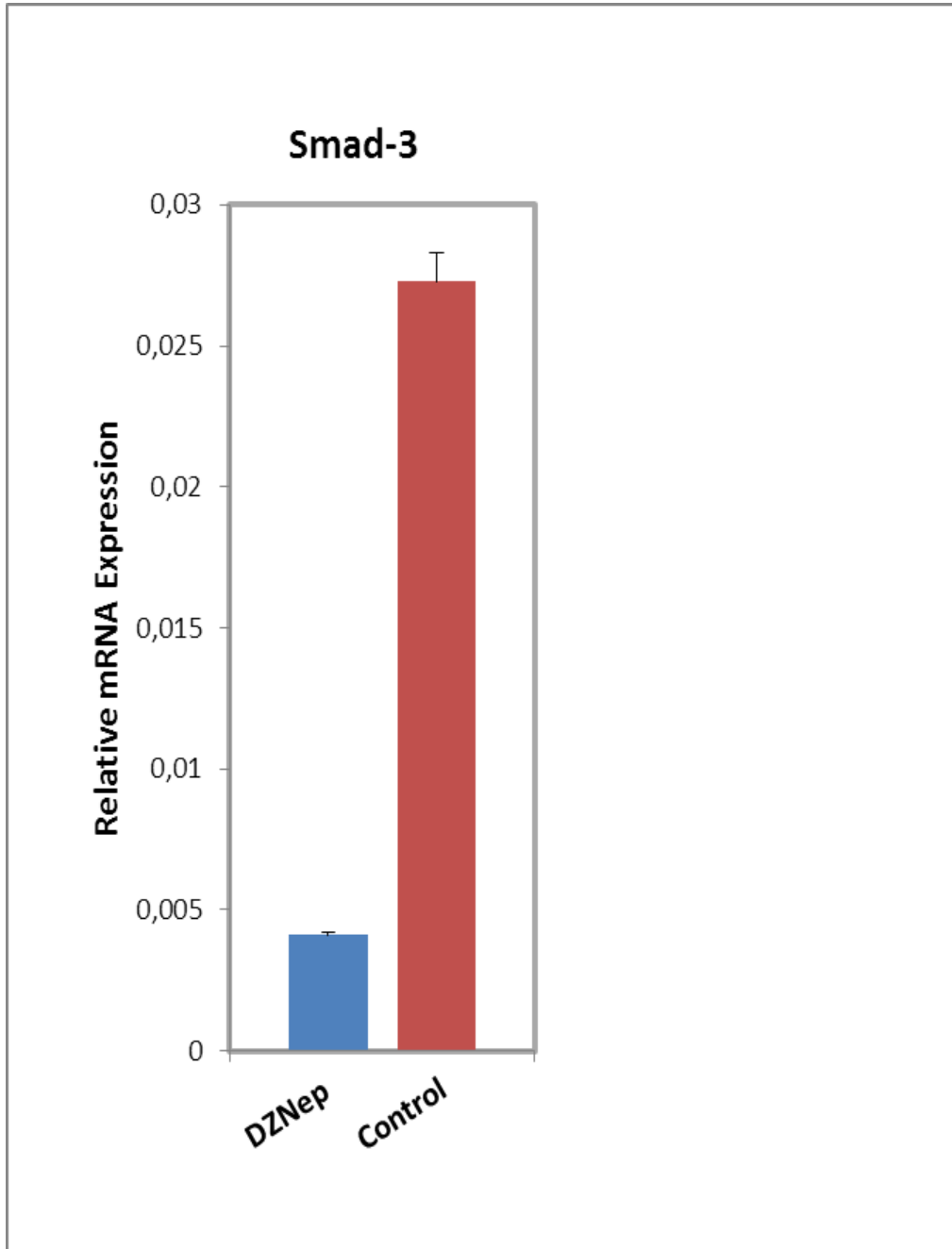
Bu sonuçlara göre 72 saat DZNep uyguladığımız HEPG2 hücrelerinde, ilaç uygulamadığımız gruba göre TGF- β , Smad 2, Smad 3, Smad 4, Smad 5, Smad 6, Smad 7 ekspresyon düzeyleri (normalizasyon oranı) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu (Tablo 4.3, Şekil 4.1-şekil 4.7).

Tablo 4.3. Araştırılan genlerin istatistiksel analizi (Hedef Gen/Referans Gen Normalizasyon oranı ortalamalarının karşılaştırılması)

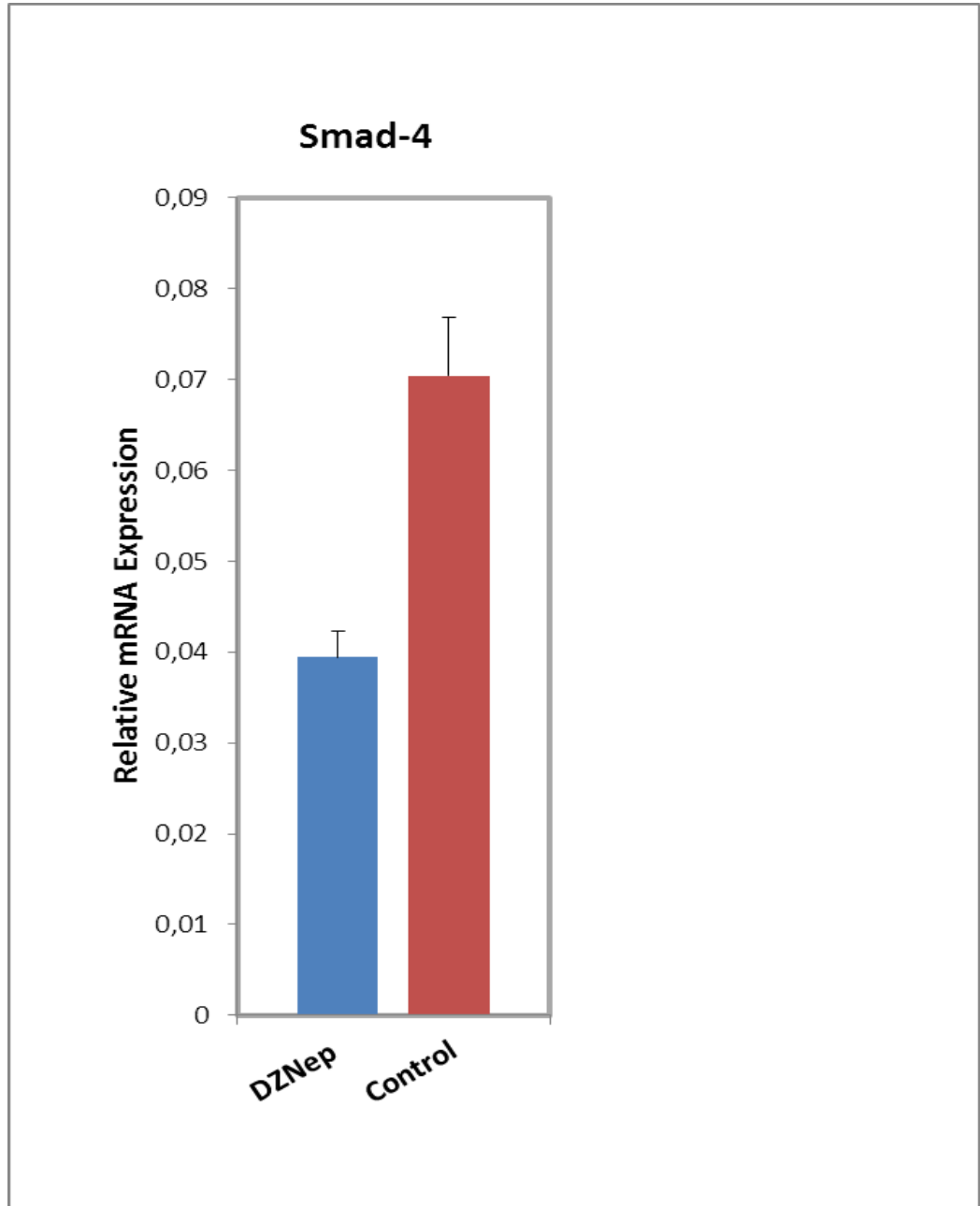
	Grup	Ortalama	SD	<i>p</i>
TGF- β	DZNep	0.0050200	0.00014799	0.001
	Kontrol	0.0383000	0.00170880	
SMAD-2	DZNep	0.040967	0.0011015	0.006
	Kontrol	0.056067	0.0046918	
SMAD-3	DZNep	0.00410667	0.0001193035	0.001
	Kontrol	0.0272667	0.0010408330	
SMAD-4	DZNep	0.039433	0.0028937	0.002
	Kontrol	0.070433	0.0064702	
SMAD-5	DZNep	0.000910	0.0000278	0.001
	Kontrol	0,001183	0,0000473	
SMAD-6	DZNep	0.00008973	0.0000103036	0.001
	Kontrol	0.00032567	0.0000485215	
SMAD-7	DZNep	0.00294667	0.0000472582	0.008
	Kontrol	0.00366333	0.0002484619	



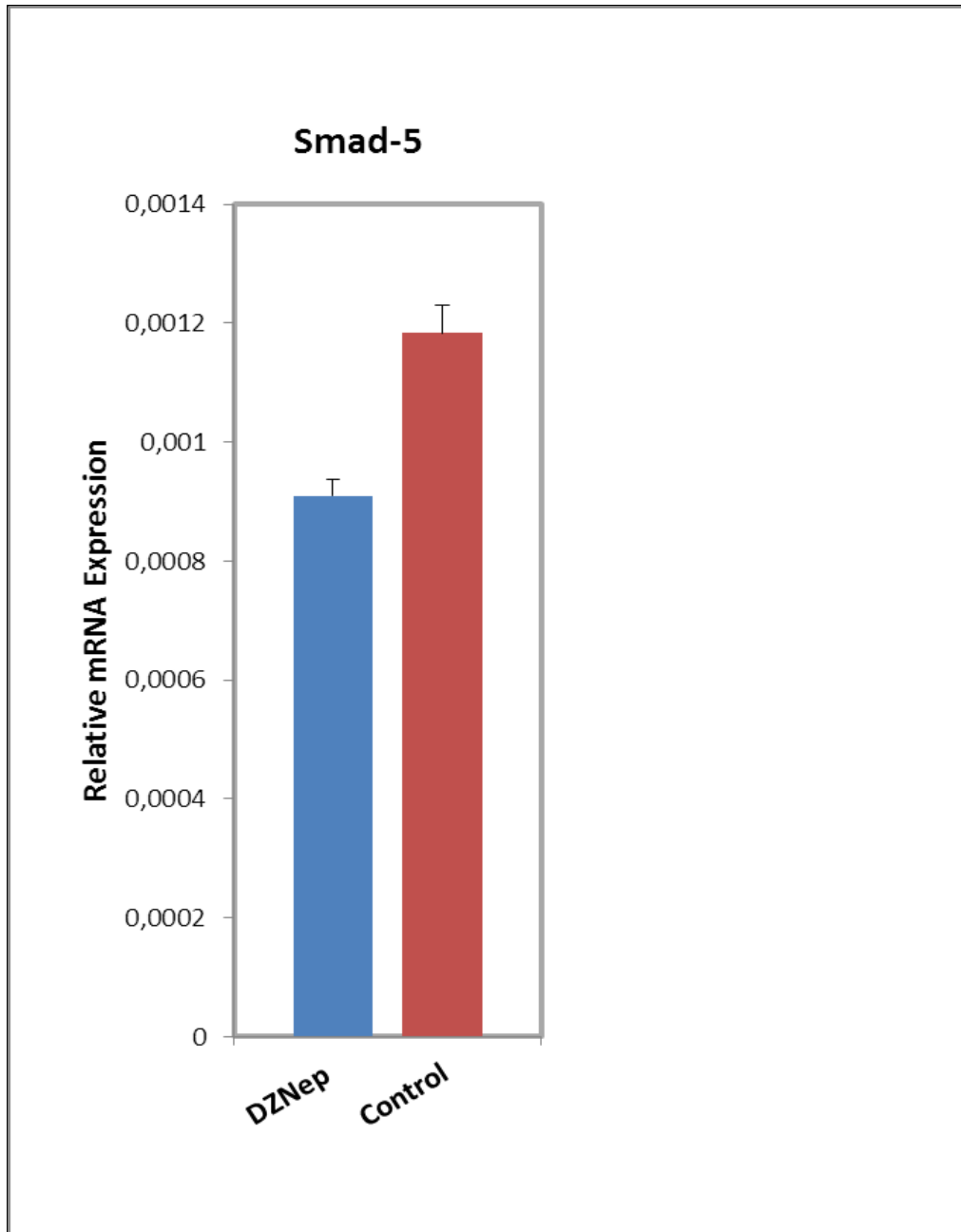
Şekil 4.1. Smad-2 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması



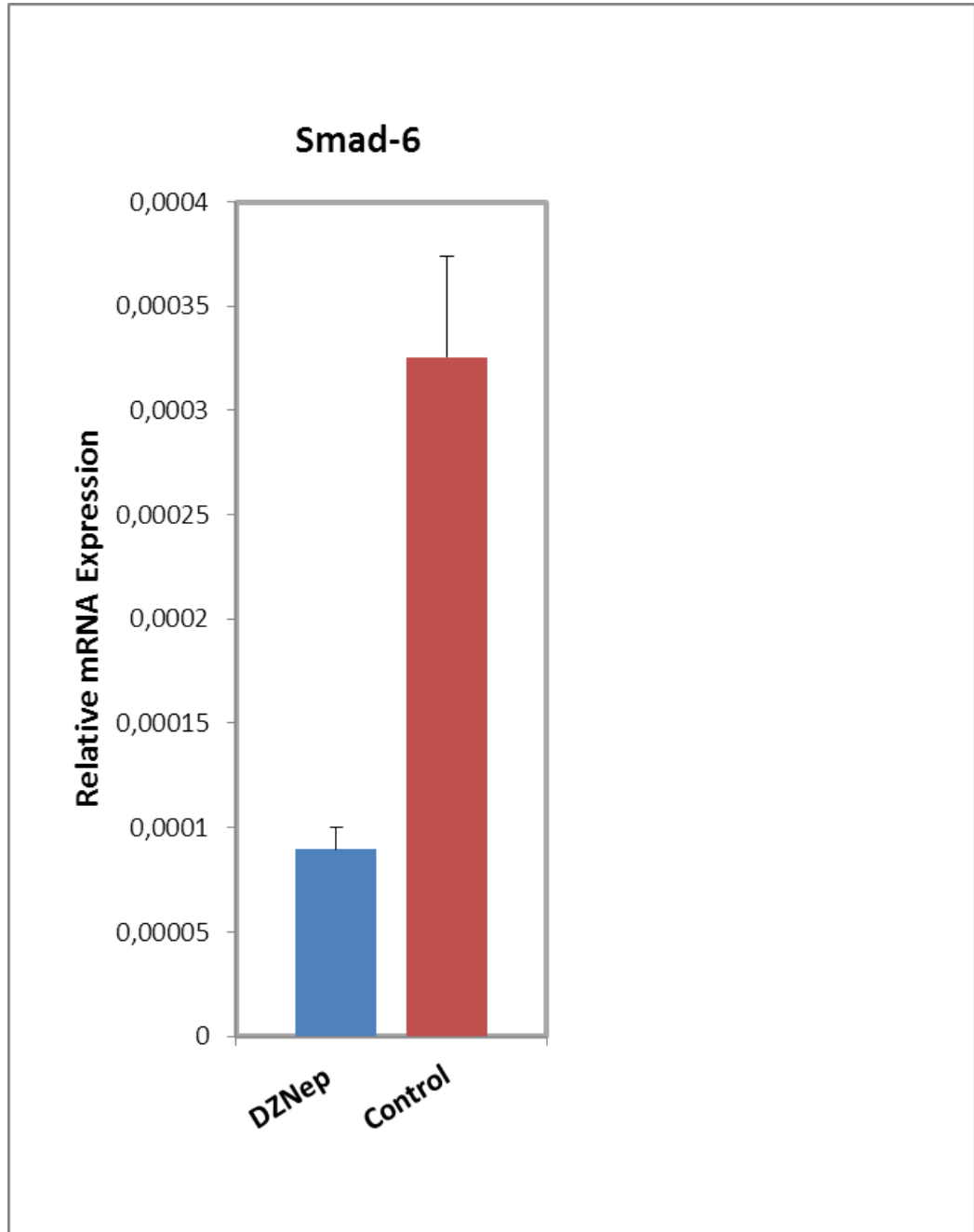
Şekil 4.2. Smad-3 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması



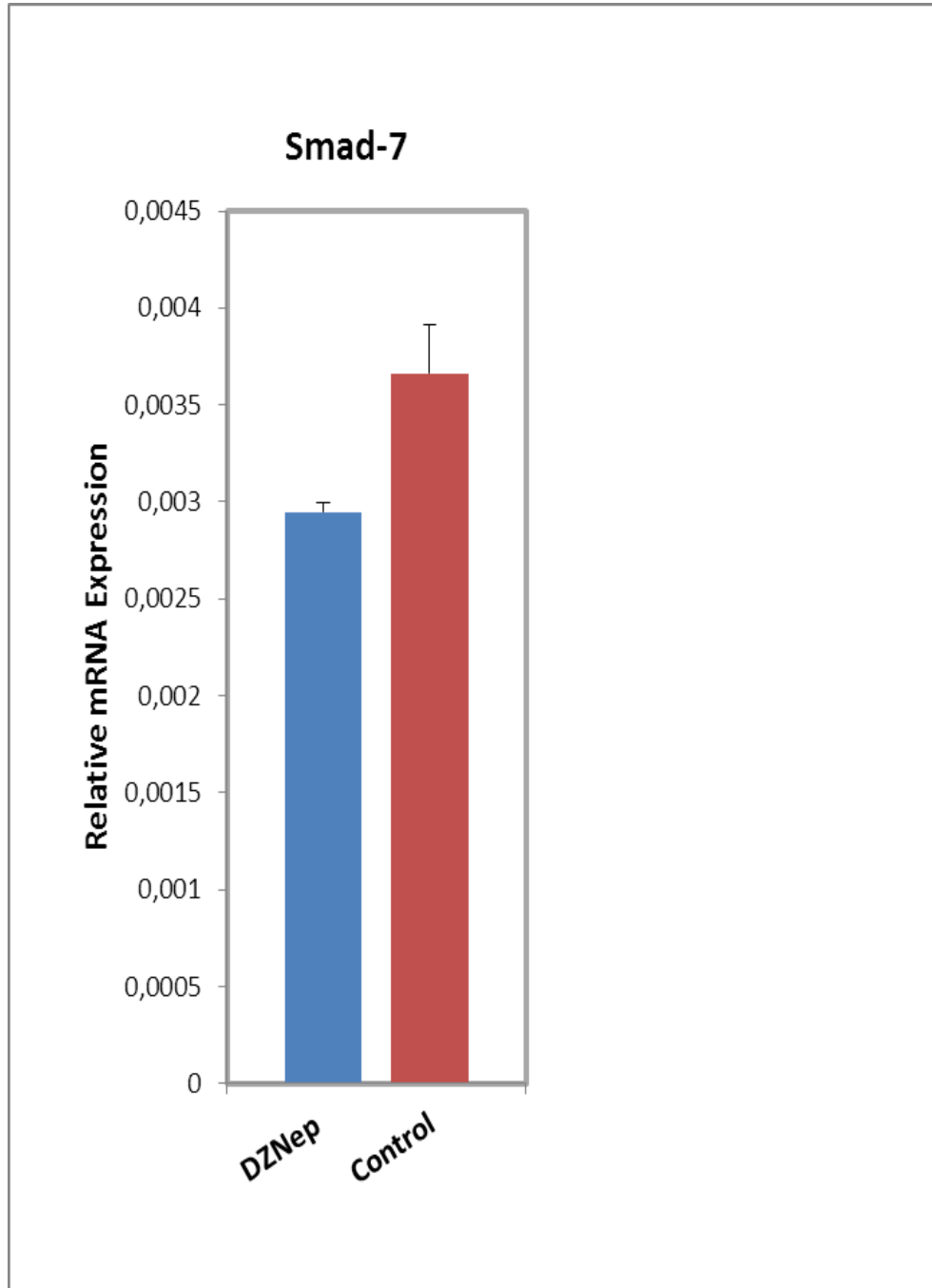
Şekil 4.3. Smad-4 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması



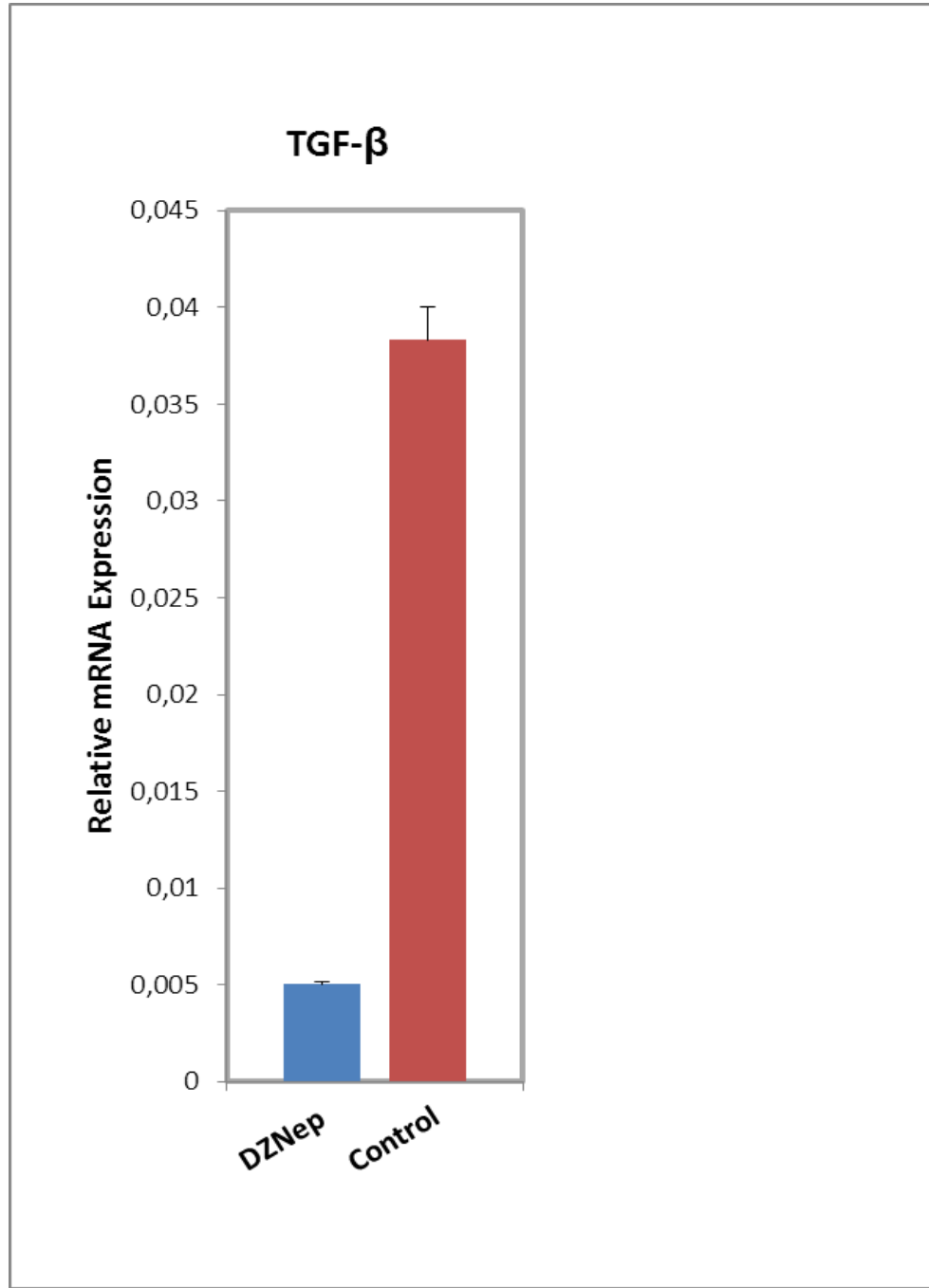
Şekil 4.4. Smad-5 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması



Şekil 4.5. Smad-6 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması



Şekil 4.6. Smad-7 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması



Şekil 4.7. Smad-TGF-β geninin mRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hepatosellüler karsinom (HCC), hepatositlerden köken alan ve karaciğerin en sık rastlanan primer malign tümörüdür. En sık görülen 5. kanser türüdür. Kanser ile ilişkili ölümlerde 3. sırada yer alır. Dünya genelinde yılda 250 bin ile 1 milyon arasında insanın ölümüne yol açar. Hepatosellüler karsinom aynı zamanda, sık intrahepatik metastazlara neden olan agresif bir tümördür ve cerrahi sonrası nüks sıktır. Major ölüm nedeni kanser nüksüdür ve nükslerin büyük bir çoğunluğu cerrahiden sonraki 2 yıl içerisinde gerçekleşir (1, 61). Son yirmi yıldır gelişen cerrahi tekniklere ve tıbbi tedavilere rağmen, rekürrens ve metastazdan dolayı hastaların sağkalımı düşüktür. Bunun yanı sıra HCC hastalarının büyük bir çoğunluğunda, tanı konulduğu anda ilerlemiş metastazlar mevcuttur. HCC'nin patogenezinde ve kanserin ilerlemesinde, gen mutasyonları, epigenetik değişiklikler, kodlanan ve kodlanmayan genlerin disregülasyonu gibi, birçok anormal biyolojik oluşum suçlanmaktadır (62). HCC'nin doğru tanısı ve etkili tedavisi için, patogenezinin ve progresyonunun altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılmasına acil olarak ihtiyaç duyulmaktadır.

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 . Bu metilasyon aracılığıyla, ilgili hedef genin susturulduğu bildirilmiştir (63). Son yıllarda yapılan çalışmalar, EZH2'nin özellikle hücre proliferasyonu, invazyon, apoptosis, angiogenes ve metastaz gibi olaylarda rol oynadığını göstermiştir (64). PRC2'nin, (EZH2 aracılığıyla H3K27'yi trimetilasyona uğratarak) gen ekspresyonunun regülasyonunda rol oynadığı bildirilmiştir. EZH2'nin onkojenik rolü olduğu bildirilmektedir. Aynı zamanda EZH2'nin, migrasyon ve invazyon üzerine de etkili olduğu bildirilmiştir. Çeşitli kanserlerde (meme kanserleri, HCC, Kolorektal karsinoma, pankreas kanseri, sarkoma, Endometrial karsinoma, ovaryum kanseri, özefagus

kanserleri, akciğer kanseri, melanoma, lösemiler gibi) EZH2 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (2, 65). Son yıllarda, EZH2'nin HCC'de de arttığı bildirilmektedir (66). Üstelik çeşitli kanser türlerinde EZH2'nin inhibisyonunun, kanser migrasyonu ve invazyonunu azalttığına dair bilgiler de giderek artmaktadır (67). Bununla beraber, kanser hücrelerinde, EZH2'nin artışı ve EZH2 inhibisyonunun hangi mekanizmalarla, invazyon ve metastazı inhibe ettiği netlik kazanmamıştır. Ayrıca moleküler mekanizması net değildir. Yine yapılan literatür taramasında HCC'de, DZNep aracılığıyla EZH2 geninin inhibe olmasından sonra TGF- β /Smad yolağı üzerine etkisine dair bir çalışmaya da rastlanılmadı.

Yaptığımız bu tez çalışmasında, EZH2'nin inhibisyonu için 3-Deazaneplanocin A (DZNep) verilmiştir. 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.

DZNep, hematojik malignitelerde FDA onayı almış bir ilaçtır. Bununla birlikte, diğer kanser türlerinde özellikle ilerlemiş kanser vakalarında kullanımı ile ilgili çalışmalar giderek artmaktadır (3, 68).

Çalışmamızda karaciğer kanser hücre hattı olan HEPG2 hücreleri kullanılmıştır. 5 μ M DZNep, hücrelerimize 72 saat boyunca uygulandı. Trizol ile RNA'lar toplandı. Sırasıyla RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR işlemleri yapıldı. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı. RT-PCR'da TGF- β , Smad2, Smad 3, Smad 4, Smad 5, Smad 6, Smad 7 genlerinin ekspresyonlarına bakıldı. GAPDH ile normalizasyon yapıldıktan sonra, istatistiksel analiz yapıldı.

Bu sonuçlara göre 72 saat DZNep uyguladığımız HEPG2 hücrelerinde, ilaç uygulamadığımız gruba göre TGF- β , Smad 2, Smad 3, Smad 4, Smad 5, Smad 6, Smad 7 ekspresyon düzeyleri (normalizasyon oranı) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu.

Genel olarak tüm genlerin mRNA ifadesinde anlamlı bir şekilde düşüş gözlenmiştir. Bu genlerin mRNA ifadelerindeki istatistiksel veriler, TGF- β ($p<0.001$), Smad 2 ($p<0.006$), Smad 3 ($p<0.000$), Smad 4 ($p<0.002$), Smad 5 ($p<0.001$), Smad 6 ($p<0.001$) , Smad7

($p < 0.008$) şeklindedir. Smad 2 ve Smad 3 mRNA ifadelerindeki düşüş oranlarındaki farkın büyüklüğü dikkat çekmektedir R-Smad olan Smad 2 direk olarak Co-Smad olan Smad 4 ile heterokompleks oluşturabilme yeteneğindedir fakat yine R-smad olan Smad 3, Smad 2 ile birleşmeksizin Smad 4 ile heterokompleks oluşturma yeteneğine sahip değildir. Sinyal yolağının devamı için Smad 3, Smad 2 bağımlı gibi düşünülebilir. Bu nedenle oranların arasındaki farkın büyüklüğü, TGF- β /Smad yolağının temel R-Smad olarak Smad 'nin görev yaptığını literatür çalışmaları söylesede, Smad 3'ün de Smad 2 kadar önem taşıdığını çalışmamız göstermektedir. TGF- β 'nın gen ifadesindeki düşüş göz önüne alındığında çok büyük bir oran olduğu ve diğer R-Smad'ların özellikle Smad 3'ün bu yolak üzerindeki etkisi literatür verilerinin çok üzerinde olduğu görülmektedir (44, 69). Smad 4 genin mRNA ifadelerindeki düşüş Smad 2 ile tutarlı olduğu ve kullanılan ilacın gen ifadesindeki işleyişi değiştirip kanser hücrelerine moleküler düzeyde etki yaptığı görülmektedir. DZNep ilacı çeşitli kanser türlerinde ve kanser hücre hatlarında histon metilasyonunu inhibe ettiği ve EZH2 üzerinden ponst transkripsiyonel modifikasyona uğratarak gen ekspresyon seviyelerinde düşüş gözlemlendiği çeşitli çalışmalar mevcuttur. TGF- β bazı çalışmalarda birçok kanser hücre hatlarında tümör supresör olarak etki gösterdiği ve kanser olmayan hücrelerde ise onkogen etki yaptığı gözlenmesi ilginçtir (70). TGF- β 'nın moleküler etki mekanizması net değildir. Onkogen mi yoksa tümör supresör mü olduğu net değildir. Ayrıca DZNep'in TGF- β 'nın ekspresyon seviyelerinde düşüşe yol açtığına dair çalışmalar da oldukça fazladır. HEPG2 hücre hattında TGF- β 'nın ekspresyon seviyelerin oldukça düşmesi ve diğer Smad'larda da azalmanın olması DZNep in HEPG2 hücre TGF- β /Smad yolağına etki ettiğini düşündürmektedir (71, 72).

Yapılan literatür taramasında, DZNep ilacının karaciğer kanserinde, TGF- β /Smad yolağı üzerine etkisini araştıran çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tez çalışması ile literatüre katkı sağladığımızı düşünmekteyiz.

REFERANSLAR

1. Scaggiante B, Kazemi M, Pozzato G, Dapas B, Farra R, Grassi M, Zanconati F, Grassi G. Novel hepatocellular carcinoma molecules with prognostic and therapeutic potentials. *World J Gastroenterol* 2014; 20(5): 1268-88.
2. Verma SK. Inhibition of the histone lysine methyltransferase EZH2 for the treatment of cancer. *Curr Top Med Chem.* 2015; 15(8):714-9.
3. 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.
4. Li MO, Wan Y, Sonjabi S, Robertson AL, Flavell RA. Transforming growth factor- β regulation of immun response, *Annual Review of immunology* 2006; 24: 99-146.
5. David CT, Rosemary R, George JT, Luis PV. Developmental Expression of Rat transforming Growth factor mRNA, *Molecular an Cellular Biology* 1985;3644-3646.
6. Harvey L, David B, Arnold B, Lawrence Z, Paul M, James D. *Molecular Cell Biology*, Third edition. Scientific American Boks 1995;1160-1167.
7. Massague J. Transforming growth factor – β family, *Annu rev. Cell Biol* 1990;6: 597-641.
8. Coffey RJ Jr, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL, Pittelkow MR. Production and auto induction of transforming growth factor- α in human keratinocytes, *Nature* 1987;328: 817-20.
9. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factor β : biological function and chemical structure, *Science* 1986; 233: 532-4.
10. Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. What is transforming growth factor β , *The British Association of Plastic surgens* 2004;57: 215-221.
11. Itoh S, Dijke PT. Negative regulation of TGF- β receptor/sm α d signal transduction, *Curr Opin Cell Biol* 2007;19: 176-184.

12. Massaqué J, Gomis RR. The logic of TGF- β signaling, *FEBS Letter* 2006;580: 2811-2820.
13. Alexsandrow MG, Moses HL. Transforming Growth Factor β and cell cycle regulation, *Cancer Res* 1995;55: 1452-1457.
14. Moses HL, Serra R. Regulation of differantiation by TGF-beta, *Curr. Opin. Genet. Dev* 1996;6(5):581-6.
15. Moustakas A, Pardalı K, Gaal A, Heldin CH. Mechanism of TGF- beta signaling in regulation of cell growth and differantiation, *İmmunol Lett* 2002;82: 85-91.
16. Siegel PM. Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- beta in homeostasis and cancer, *Nat. Rev. Cancer* 2003;3: 807-820.
17. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. Tgf-beta signaling in tumor supression and cancer progression, *Nat Genet* 2001;29:117-29.
18. Gold LI. The role for transforming growth factor- beta in human cancer, *Crit. Rev. Oncog* 1999;10(4): 303-360.
19. Massaque J, Cheifetz S, Laiho M, et al. Transforming Growth Factor-beta, *Cancer Surv* 1992;12:81-103.
20. Dijke PT, Hill C. New insights into TGF-beta / smad signalling, *Trends in Biochemical Sciences* 2014;29(5): 267-273.
21. Lawrence DA. Transforming growth factor beta: A General Review, *Eur. Cytokine netw* 1996;7: 363-374.
22. Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily, *Endocr. Rev.* Dec 2002; 23(6): 787-823.
23. Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M. Smad 6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily, *Nature* 1997;389.9: 622-626.
24. Böttner M, Krieglstein K, Unsicker K. The Transforming Growth Factor- β . Structure, signaling, and roles in nervous system development and functions, *Neurochem* 2000;75: 2227–2240.

25. Massagué J, Weis – Garcia F. Serine/ threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals, *Cancer surv* 1996;27: 41-64.
26. Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR. Crystal structure of transforming growth factor- β 2: An unuauual fold for the superfamily, *Science* 1992; 257(17): 369-373.
27. Itoh S, Itoh F, Goumans M, Dijke, P, Signaling of transforming growth factor-family members through Smad proteins, *Eur J. Biochem* 2000 267: 6954-67.
28. Piek E, Heldm CH, Dijke PT. Specificity diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling, *Faseb* 1999;13: 2105-2124.
29. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and smad-independent pathways in tgf-beta family signaling, *Nature* 2003;425: 577-584.
30. Massaue J. TGF-beta signal transduction, *Annu. Rev. Biochem* 1998;67:753-791.
31. Kawabata M, Imamura T, Inoue H, Hanai J, Nishihara A, Hanyu A, Takase M, Ishidou Y, Udagawa Y, Oeda E, Goto D, Yagi D, Kato M, Miyazono K. Intracellular Signaling of the TGF-beta Superfamily by Smad Proteins, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999;886:73-82.
32. Shi Y, Massaue J. Mechanism of TGF- beta signaling from cell membrane to the nucleus, *Cell* 2003;113(6): 685-700.
33. Clarke DC, Betterton MD, Liu X. Systems theory of Smad signaling, *IEE Proc. Syst. Biol* 2006;153(6): 412-24.
34. Feng XH, Derynck R. Specificity And Versatility In Tgf-beta Signaling Through Smads, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2005;21: 659-693.
35. Verrecchia F, Mauviel A, Farge D. Transforming growth factor- beta signaling through the smad proteins: Role in systemic sclerosis, *Autoimmunity Reviews*, 2006;5: 563-567.
36. Itoh S, Itoh F, Goumans JM, Dijke PT. Signaling of tarnsforming growth factor – beta family members through smad proteins. *Eur.J.Biochem* 2000;267: 6954-67.

37. Massagué J, How cells read TGF- β signals, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* 2001;1:169-178.
38. Massagué J. TGF- β signal transduction, *Annu.Rev. Biochem* 1998;67:753-791.
39. Cheifetz S, Bassols A, Stanley K, Ohta M, Greenberger J, Massagué J. Heterodimeric transforming growth factor – β , *J Biol Chem.*, Aug1995; 5; 263 (22): 10783-9.
40. Wrana J L, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué, J. Mechanism of activation of the tgf- β receptor, *Nature* 1994;370 (6488): 341-347.
41. Massagué J. Receptors for the TGF- β family, *Cell* 1992s;69: 1067-1070.
42. Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang ML, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massagué J. The transforming growth factor- β system, a complex pattern of crossreactive ligands and receptors, *Cell*, Feb 1987;13; 48 (3): 409-15.
43. Zhang Y, Feng XH, Wu RY, Derynck R. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- β response, *Nature* 1996;383(12): 168-172.
44. Kretzschmar M, Massagué J. SMADs: mediator and regulators of TGF- β signaling, *Cur. Op. Gen.& Dev*1998;8:103-111.
45. Attisano L, Hoeflich ST. The Smads. *Genom Biol* 2001;2(8):
46. Hill CH. The Smads, *Int J Biochem. Cell. Biol* 1999;31:1249-54.
47. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113: 685-700.
48. Massagué J, Chen YG. Controlling TGF- β signaling, *Genes&Development* 2000;14: 627- 644.
49. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF- β signal transduction, *J Cell sci* 2001;114: 4359-69.
50. Xu L. Regulation of smad activities, *Biochimica et Biophysica Acta* 2006;1759: 503
51. Heldin CH, Miyazono K, Dijke PT. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins, *Nature* 1997;390(4): 465-470.

52. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors, *Genes&Dev* 2005;19: 2783-2810.
53. Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF- β responses, *Cell* 1998;95: 737-740.
54. Stroschein S L, Wang W, Zhou S, Zhou Q, Luo K. Negative feedback regulation of TGF- β signaling by the SnoN oncoprotein, *Science* 1999;286: 771-774.
55. Wotton D, Lo, RS, Lee S, Massagué J, Smad transcriptional corepressor, *Cell* 1999 97: 29-39.
56. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors, *Genes. Dev* 2005 19: 2783- 2810.
57. Lo RS. Ubiquitin-dependent degradation of TGF- β -activated Smad2, *Nat Cell Biol* 1999;1: 472-478.
58. Xu L, Alarcon C, Col S, Massague J. Distinct Domain Utilization by Smad3 and Smad4 for Nucleoporin Interaction and Nuclear Import, *J. Biol. Chem.*, October 24 2003;278(43): 42569 – 42577.
59. Inman GJ, Nicolas FJ, Hill CS, Nucleostoplasmic shuttling of Smads 2, 3 and 4 permits sensing of TGF- beta receptor activity. *Mol. Cell*, 10 (2): 283-294, 2002.
60. Savlı H, Hatırnaz Ö. Sayımsal Gerçek Zamanlı-Polimer Zincir Reaksiyonu ve Hematolojik Gen Anlatım Analizleri Türkiye Klinikleri *J Med Sci* 2004; 24:653-660
61. Chiba T, Suzuki E, Saito T, Ogasawara S, Ooka Y, Tawada A, Iwama A, Yokosuka, O. Biological features and biomarkers in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2015;7(16):2020-8.
62. Nishida N, Kudo M. Alteration of Epigenetic Profile in Human Hepatocellular Carcinoma and Its Clinical Implications. *Liver Cancer* 2014;3(3-4):417-27
63. Bae WK, Kang K, Yu JH, Yoo KH, Factor VM, Kaji K, Matter M, Thorgeirsson S Hennighausen L. The methyltransferases enhancer of zeste homolog (EZH) 1

- and EZH2 control hepatocyte homeostasis and regeneration. *FASEB J* 2003; 29(5):1653 -1662.
64. Tan JZ, Yan Y, Wang XX, JiangY, Xu, HE. “EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 2014;35(2):161-74.
 65. McCabe MT, Creasy CL. EZH2 as a potential target in cancer therapy. *Epigenomics* 2014;6(3):341-51.
 66. Gao SB, Zheng QF, Xu B, Pan CB, Li KL, Zhao Y, Zheng QL, Lin X, Xue LX, Jin GH. EZH2 represses target genes through H3K27-dependent and H3K27-independent mechanisms in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Res* 2014;12(10):1388-97.
 67. Moore HM, Gonzalez ME, Toy KA, Cimino-Mathews A, Argani P, Kleer CG. EZH2 inhibition decreases p38 signaling and suppresses breast cancer motility and metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 2013;138(3):741-52.
 68. Tanaka M, Roberts JM, Qi J, Bradner JE. Inhibitors of emerging epigenetic targets for cancer therapy: a patent review (2010-2014). *Pharm Pat Anal* 2015 4(4):261-84.
 69. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factorbeta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000; 267(24):6954- 67.
 70. He SB, Zhou H, Zhou J et al. Inhibition of EZH2 expression is associated with the proliferation, apoptosis and migration of SW620 colorectal cancer cells in vitro. *Exp. Biol. Med.* 2015, 240, 546–555.
 71. Chen JF, Luo X, Xiang LS et al. EZH2 promotes colorectal cancer stem-like cell expansion by activating p21cip1-Wnt/ β -catenin signaling. *Oncotarget* 2016.
 72. Zhang K, SunX, Zhou X, Han L, Chen L, Shi Z, Zhang A, Ye M, Wang Q, Liu C et al. Long non-coding RNA hotair promotes glioblastoma cell cycle progression in an EZH2 dependent manner. *Oncotarget* 2015, 6, 537–546.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı : İlker GÜVEN
Uyruğu : Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 07 ŞUBAT 1988, KAYSERİ
Medeni Durum : Bekar
Tel : 0553 216 96 07
Email : eruilkerguven@gmail.com
Yazışma Adresi : Gültepe mah. Kışla Cad. 11/29 Melikgazi/ KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	EÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2016
Lisans	EÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji	2013
Lise	KAYSERİ Lisesi	2006
Orta Öğretim	60. Yıl Cumhuriyet İ.Ö.O	2002