

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HEPATİT OLGUSUNDA(HBX) *NF-κB* ve AHR GEN
ETKİLEŞİMLERİ İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAZMİYE ÖLMEZ

DENİZLİ, MAYIS - 2019

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**HEPATİT OLGUSUNDA(HBX) *NF-KB* VE AHR GEN
ETKİLEŞİMLERİ İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAZMIYE ÖLMEZ

DENİZLİ, MAYIS - 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

NAZMIYE ÖLMEZ tarafından hazırlanan “HEPATİT OLGUSUNDA(HBX) NF-κB ve AHR GEN ETKİLEŞİMLERİ İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 03.05.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Üye
Prof. Dr. Orhan ADALI


Üye
Prof. Dr. Mustafa DURAN


.....

.....

.....

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
12/06/2019 tarih ve 24/10..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


.....

Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması PAÜ-BAP tarafından 2016 FBE 041 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

Nazmiye ÖLMEZ

ÖZET

HEPATİT OLGUSUNDA(HBX) *NF-κB* ve AHR GEN ETKİLEŞİMLERİ İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
NAZMİYE ÖLMEZ
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ

(TEZ DANIŞMANI:PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)
(EŞ DANIŞMAN:DOÇ. DR. ASLI SEMİZ)
DENİZLİ, MAYIS - 2019

Primer karaciğer kanserlerinin %85-90'ını oluşturan Hepatosellüler Karsinom (HCC) dünyada en sık rastlanan kanserlerden olup, risk faktörleri olarak en başta kronik hepatit B (HBV) ve hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonlarıdır. Bu çalışmada, Hepatit B X (HBX) olgusunda, Aril Hidrokarbon Reseptörü (AHR) ve Nükleer Faktör kappa B (*NF-κB*) genlerinin Hepatit B virüsü ile enfekte edilen insan hepatosellüler karsinom hücre hattında (HepG2-HBV (HBX)) protein-protein etkileşim potansiyelinin moleküler yaklaşımlar ile aydınlatılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla etki mekanizma çalışmaları HepG2-HBV (HBX) hücre hattında gerçekleştirildi. Total RNA, HBX pozitif hücrelerden izole edildi. Daha sonra cDNA, oligo-dT primerler kullanılarak toplam RNA'dan ters transkriptaz ile sentezlendi. *NF-κB* ve AHR genleri gen spesifik primerler kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu(PZR) ile amplifiye edildi ve DNA ürünleri "pGEM-T easy vector" ile klonlandı. Klonlanan *NF-κB* ve AHR plazmidleri DH-5α 'ya transforme edildi ve daha sonra saf plazmidler izole edildi. Plazmit *NF-κB* ve AHR genlerinin PZR ürünleri, spesifik restriksiyon enzimleri ile kesildi ve "Flexi Vector System" kullanılarak alıcı plazmitlerin uygun bölgesine klonlandı.Rekombinant plazmitler daha sonra lusiferaz plazmid ile birlikte HBX hücre hattına transfekte edildi. Uygun inkübasyon süresinin sonunda, Renilla geni içeren pGL4.31[*luc2P/Gal4UAS/Hygro*] pGL4.31 plazmiti transfekte edilen hücrelere eklendi. 'Firefly lusiferaz' aktivitesi ölçüldü. Yapılan çalışmalar sonucunda *NF-κB* ve AHR genlerinin hepatit B olgusunda etkileşime girdiğini kuvvetle desteklemektedir. Hepatokarsinogenez oluşumunda bu iki transkripsiyon

faktörünün etkileşim halinde olup, ekspresyon artışına sebep olmaktadır. Bu etkileşimin nasıl durdurulacağı konusunda yapılacak çalışmalarla desteklenirse HBX varlığında oluşan hepatokarsinogenezin önüne geçilerek yeni tedavi yöntemleri ortaya çıkartılabilir. Bu veriler literatürde yenidir.

ANAHTAR KELİMELEER:Hepatoselüler Karsinom, Nükleer Faktör Kappa B, Aril Hidrokarbon Reseptör, HBX

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *NF- κ B* AND AHR GENE INTERACTION IN RELATION TO THE DEVELOPMENT OF HEPATITIS

MSC THESIS
NAZMİYE ÖLMEZ
PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BİOLOGY

(SUPERVISOR:PROF. DR. ALAATTİN ŞEN)
(CO-SUPERVISOR:DOÇ. DR. ASLI SEMİZ)
DENİZLİ, MAY 2019

Hepatocellular carcinoma (HCC), which constitutes 85-90% of primary liver cancers, is one of the most common cancers in the world, and is the most common risk factors for chronic hepatitis B (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infections. In this study, protein-protein interaction in human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2-HBV (HBX)) infected with Hepatitis B virus of Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) and Nuclear Factor kappa B (*NF- κ B*) genes in Hepatitis BX (HBX) case The aim of this study was to elucidate its potential with molecular approaches.

For this purpose, mechanism studies were performed in HepG2-HBV (HBX) cell line. Total RNA was isolated from HBX-positive cells. The cDNA was then synthesized by reverse transcriptase from total RNA using oligo-dT primers. *NF- κ B* and AHR genes were amplified by Polymerase chain reaction (PCR) using gene-specific primers and the DNA products were cloned with "pGEM-T easy vector". The cloned *NF- κ B* and AHR plasmids were transformed into DH-5 α and then pure plasmids were isolated. The PCR products of plasmid *NF- κ B* and AHR genes were cut with specific restriction enzymes and cloned into the appropriate site of the recipient plasmids using the "Flexi Vector System". Recombinant plasmids were then transfected into the HBX cell line with the luciferase plasmid. At the end of the appropriate incubation period, the plasmid pGL4.31 [luc2P / Gal4UAS / Hygro] pGL4.31 containing the Renilla gene was added to the transfected cells. Dü Firefly luciferase 1 activity was measured. As a result of the studies, it strongly supports that *NF- κ B* and AHR genes interact in the hepatitis B case. In the formation of hepatocarcinogenesis, these two transcription

factors are affected and cause an increase in expression. If these studies are supported by the studies on how to stop it, new treatment methods can be created by preventing hepatocarcinogenesis in the presence of HBX. These data are new in the literature.

KEYWORDS: Hepatocellular Carcinoma, Nuclear Factor Kappa B, Aryl Hydrocarbon Receptor, HBX

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Hepataselüler Karsinom	1
1.2 Epidemiyoloji ve Etiyoloji	3
1.3 Viral Hepatitler ve HCC	5
1.4 Transkripsiyon Faktörleri	11
1.5 Nükleer Faktör Kappa B	13
1.6 Aril hidrokarbon reseptörü (AHR)	16
1.7 Klonlamada Kullanılan Vektörler	19
1.8 Tezin Amacı	20
2. MATERYAL VE METHOD	21
2.1 Materyal.....	21
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	21
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	22
2.2 Method.....	22
2.2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları	22
2.2.2 Besiyeri Hazırlanışı	22
2.2.3 Hücrelerin Büyütülmesi	23
2.2.4 Hücrelerin Pasajı	23
2.2.5 RNA İzolasyonu	24
2.2.6 Total RNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi.....	24
2.2.7 cDNA sentezi	25
2.2.8 Primer Tasarımı	26
2.2.9 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	27
2.2.10 PZR Sıcaklık Optimizasyon Çalışmaları	29
2.2.11 PZR Ürünlerinin Saflaştırılması	29
2.2.12 PZR Ürünlerinin Klonlanması	30
2.2.13 Transformasyon	31
2.2.14 Plazmit İzolasyonu.....	33
2.2.15 Giriş Klonları Aktarım.....	34
2.2.16 Transfeksiyon.....	38
2.2.17 Lusiferaz Aktivite Ölçümü	39
2.2.18 İstatiksel Analiz	40
3. BULGULAR	41
3.1 Hücrelerin Büyütülmesi	41
3.2 RNA İzolasyonu Sonuçları.....	42
3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR) Sonuçları.....	43
3.4 PZR Ürünlerinin Ligasyonunun Eldesi	45
3.5 TransformasyonSonuçları	46

3.6	Plazmit DNA İzolasyonu Sonuçları	48
3.7	Plazmit DNA ile PZR Sonuçları	49
3.8	Lusiferaz Aktivite Ölçüm Sonuçları.....	49
4.	TARTIŞMA	55
5.	SONUÇ	60
6.	KAYNAKLAR.....	61
7.	EKLER.....	68
	ÖZGEÇMİŞ.....	74

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: Hepatit B Virüsü (HBV) Antijenik yapısı	2
Şekil 2: Dünyadaki hepatoselüler karsinom insidansı.	4
Şekil 3: Hepatit B Virüsü genomu	8
Şekil 4: Nükleer Faktör Kappa B alt birimleri	14
Şekil 5: Hepatit B virüsü aracılı <i>NF-κB</i> 'nin aktivasyon yolağı	15
Şekil 6: Aril Hidrokarbon reseptör domain.....	17
Şekil 7: Aril Hidrokarbon reseptör sinyal yolağı	17
Şekil 8: Aril Hidrokarbon reseptörünün Tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) veya polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve Hepatit B Virüsü aracılı sinyal yolağı	18
Şekil 9: pGEM-T Vektörün promotörü ve çoklu klonlama sekansı.	20
Şekil 10: Primer Tasarımı Aşamaları	26
Şekil 11: pGEM-T Vektör Harita ve Sıra Referans Noktaları	30
Şekil 12: Bir protein kodlama bölgesinin Flexi Vektörlerine Klonlanması.....	35
Şekil 13: pGL4.31[luc2P/Gal4UAS/Hygro] vektör haritası	39
Şekil 14: HBX hücrelerinin ışık mikroskopunda görüntüsü.	41
Şekil 15: HBX hücrelerinin ışık mikroskopunda görüntüsü.	42
Şekil 16: HBX hücrelerinden izole edilen RNA'ların % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	43
Şekil 17: AHR'nin PZR % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.	44
Şekil 18: <i>NF-κB</i> 'nin PZR % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.	44
Şekil 19: <i>NF-κB</i> ve AHR'nin PZR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	45
Şekil 20: pGEM-T vektör + <i>NF-κB</i> ve pGEM-T vektör + AHR PZR % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	46
Şekil 21: Tarama PZR Görüntüsü	47
Şekil 22: Tarama PZR Görüntüsü	47
Şekil 23: PZR'nin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	48
Şekil 24: Plazmit DNA ile elde edilen PZR ürününün % 1 agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	49
Şekil 25: 'Firefly Lusiferaz' aktivitesi ölçüm sonuçları.	50
Şekil 26: 'Firefly Lusiferaz' aktivitesi ölçüm sonuçları.	51
Şekil 27: 'Firefly Lusiferaz' aktivitesi ölçüm sonuçları.	52
Şekil 28: 'Firefly Lusiferaz' aktivitesi ölçüm sonuçları.	53
Şekil 29: Lüminometrik ölçüm sonuçları.....	54
Şekil 30: <i>NF-κB</i> ve AHR'nin PZR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	69
Şekil 31: AHR'nin PZR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	70
Şekil 32: AHR ve <i>NF-κB</i> 'nin PZR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	71
Şekil 33: AHR ve <i>NF-κB</i> 'nin PZR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.	72
Şekil 34: AHR ve <i>NF-κB</i> 'nin PZR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.	73

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Projede kullanılan hücre hattı, özellikleri ve ihtiyaçları	22
Tablo 2: cDNA sentez karışımı	25
Tablo 3: <i>NF-κB</i> ve AHR genlerinin sekans ve uzunlukları	27
Tablo 4: <i>NF-κB</i> ve AHR genlerinin sekans ve uzunlukları	28
Tablo 5: PZR sıcaklık, döngü ve zamanları	28
Tablo 6: pGEM-t Vektör Ligasyon Reaksiyonu	31
Tablo 7: Luria broth (LB) / Ampisilin (Antibiyotik) / IPTG (İzopropiltiogalaktozid) /X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil-β-D- galaktopiranosid) Besiyeri Hazırlanışı	32
Tablo 8: Luria broth (LB) / Ampisilin (Antibiyotik) / IPTG (İzopropiltiogalaktozid) /X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil-β-D- galaktopiranosid) Sıvı-Besiyeri Hazırlanışı	33
Tablo 9: PZR koşulları	34
Tablo 10: PZR sıcaklık, döngü ve zamanları	34
Tablo 11: PZR ürünleri Giriş Klonu Koşulları	37
Tablo 12: Akseptör flexi Giriş Klonu Koşulları	37
Tablo 13: Fugune HD Tranfeksiyon Reaktif oranları	39
Tablo 14: Deney Gruplarına ait ortalama ve standart sapma değerleri.....	53
Tablo 15: <i>NF-κB</i> ve AHR genlerinin sekans ve uzunlukları	68

SEMBOL LİSTESİ

AP-1	:	Aktive Edici Protein
cccDNA	:	Kapalı dairesel DNA
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Besi Ortamı
DMSO	:	Dimetil sulfoksit
dNTP	:	Deoksiniükleotid trifosfat
EtBr	:	Etiyüm Bromür
FBS	:	Fetal dana serumu
GSHV	:	Ground Squirrel Hepatit Virüsü
HBV	:	Hepatit B Virüsü
HBV	:	Hepatit B Virüsü
HBcag	:	Hepatit B Virüsü çekirdek antijeni
HBeAg	:	Hepatit B Virüsü antikoru
HCC	:	Hepatoselüler Karsinom
HCV	:	Hepatit C Virüsü
IFN-I	:	Tip 1 İnterferon
IκB	:	İnhibitör kappa B
IPTG	:	İzopriltiogalaktozid
LB	:	Luria Broth
LHB	:	Büyük Hepatit B
Map-K	:	Map Kinaz Yolağı
MHB	:	Orta Hepatit B
Nm	:	Nanometre
NF-κB	:	Nüklear Faktör Kappa B
ORF	:	Açık okuma çerçevesi
PBS	:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PZR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
rcDNA	:	Çift sarmallı geniş dairesel DNA
SOC	:	Besin açısından zengin bakteri üreme ortamı
SHB	:	Küçük Hepatit B
TAE	:	Tris-Asetik asit-EDTA
TCDD	:	Tetraklorobenzo-p-dioksin
Tm	:	Erime Noktası
WHC	:	Hepatit B Virüsü
X-gal	:	5-bromo-4kloro
XRE	:	Ksenobiyotik Cevap Elementi
WHV	:	Woodchuck Hepatit Virüsü

ÖNSÖZ

Hepatosellüler Kanser Gelişiminde, Hepatit Olgusunda (HBX) *NF-κB* ve AHR Gen Etkileşimleri İlişkisinin Araştırılması çalışması Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D. Biyokimya ve Moleküler Toksikoloji Araştırma Laboratuvarında yapılarak yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (PAUBAP) Tez projesi olarak sunduğumuz bu çalışma PAUBAP tarafından 2016 FBE 041 kodu ile desteklenmiştir. Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine destekleri için teşekkürlerimizi sunuyoruz.

Laboratuvarının tüm imkânlarını sonuna kadar açan, deneyim olarak lisans, yüksek lisans süresince yetişmemde çok büyük emeği olan, tez çalışmamın başından sonuna kadar, öncesinde ve sonrasında manevi destek ve yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, kendisiyle çalıştığım için her zaman şanslı hissettiğim, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım, titiz ve disiplinli çalışmasını örnek aldığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN' e ve ek danışmanım Doç.DR. Aslı SEMİZ' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin düzenlenmesi ve değerlendirilmesi aşamasındaki yardımlarından ve katkılarından dolayı değerli jüri üyelerim Prof. Dr. Orhan Adalı ve Prof. Dr. Mustafa Duran'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve beni her zaman motive eden çok değerli ablam Özden ÖZGÜN ACAR' a; laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Elif KALE ve Gurbet ÇELİK TURGUT' a; İyi günümde, kötü günümde bana destek olan, eşim Yunus ÖLMEZ'e ve her zaman yanımda olan ve beni bugünlere özveriyle getiren aileme sonsuz teşekkürler ederim.

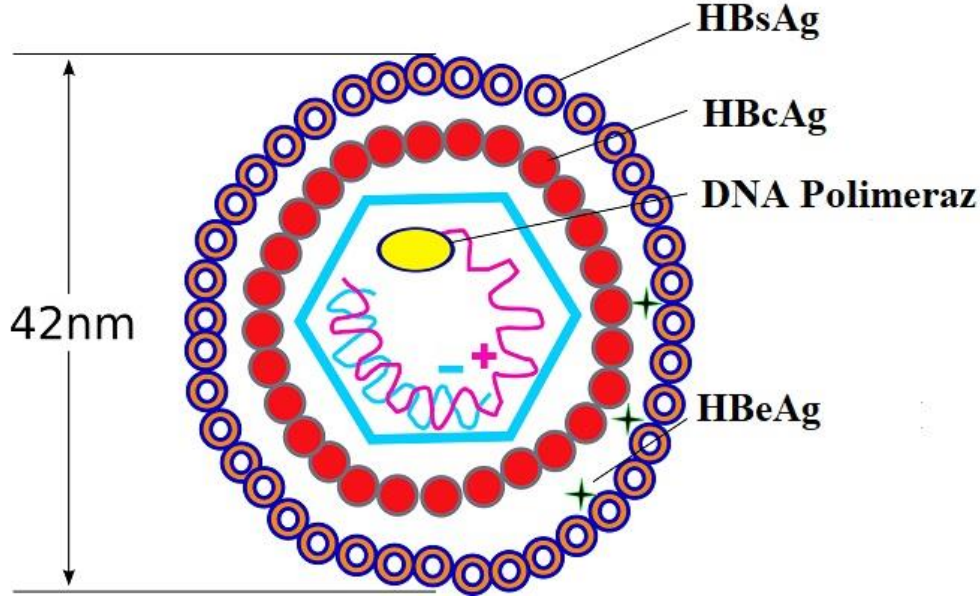
Ayrıca maddi desteği sağladığı için Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (2016FBE041) teşekkür ederiz.

1. GİRİŞ

1.1 Hepataselüler Karsinom

Hepatoselüler Karsinom (HCC) , her yıl yaklaşık 435.000 yeni vakanın teşhis edildiği en sık rastlanan beşinci kanser türüdür. Bu veriler tüm kanser vakalarının %5.4' ünü oluşturmaktadır (Wang ve diğ. 2016). Kanser türleri içerisinde ölüme sebep olmada dördüncü sıradadır (Parkin ve diğ. 1999; Pisani ve diğ. 1999). Asya ve Afrika'da ise yetişkinlerde kanser türünden ölümlerde birinci sırada yer almaktadır (Di Bisceglie ve diğ. 1988). HCC, viral enfeksiyon ve aflatoksin gibi dış faktörlerin en çok rol oynadığı kanser türlerindedir. Belirtileri ülkeden ülkeye farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin Kuzey Afrika Bandilerinde zayıflık, büyük bir kitle ve buna ait belirtiler hâkimdir (Berman 1951). Diğer yandan Japonya ve ülkemizde hastalar daha çok siroza bağlı olarak ortaya çıkan belirtilerden yakınır. Buradaki hastalar tümör ileri boyutlara ulaşmadan sirozun komplikasyonlarından ölebilirler (Tekali ve Balık 2003). Dolayısıyla, HCC'nin dağılımı bu etkenlerin dağılımına göre değişebilir. Bu yüzden de önlenebilir kanserlerin başında gelmektedir. Hepatit B Virüsü (HBV) hepatotropik, zarflı, kısmen çift sarmallı DNA virüsü olup kronik hepatit, siroz ve hepataselüler karsinom oluşumunda rol oynayan en önemli etiyolojik faktörlerden biridir (Beasley Ve Hwang, 1984).HBV, hepatotrop olduğundan ve DNA içerdiğinden Hepadnavirus grubuna sokulan, 42 nm çapında çok kompleks antijenik yapıya sahip bir virüstür. Virion, yani komplet infeksiyöz virüse "Dane" partikülü de denir. Virion, kısmen çift sarmallı DNA içeren bir iç çekirdek (core) ve bunu çevreleyen bir zarftan (HBsAg) ibarettir. İç çekirdekte HBcAg ve solubl HBeAg vardır (Şekil.1). HBV'nin 6 genotip, 12 subtipi vardır. Subtipler, HBsAg'nin yapısındaki küçük değişikliklere göre ayrılır. "a" determinantı tüm subtiplerde bulunur ve bağışıklığı sağlar, d/y ile w/r alt determinatları ise 12 serolojik alt tipi oluşturur (ayw, ayr, adw). HBV-DNA'sı üzerinde virüsün antijenlerini kodlayan 4 gen bulunur. PreS/S geni ön-S1, ön-S2 ve HBsAg'ini kodlar. C geninin ön-C ve C denen iki bölgesi vardır, HBeAg ile HBcAg'i kodlar. Ön-C mutantları HBeAg sentezleyemez. P geni DNA polimeraz ve endonükleaz

enzimlerini ve X geni ise HBxAg'i kodlar. HBV'nin son yıllarda önemleri iyice anlaşılan bazı mutantları tanımlanmıştır. Zarf ve ön-C bölgesi mutantları en dikkati çekenleridir. Aşı, prognoz ve tedavi açısından önemleri vardır.



Şekil 1: Hepatit B Virüsü (HBV) Antijenik yapısı

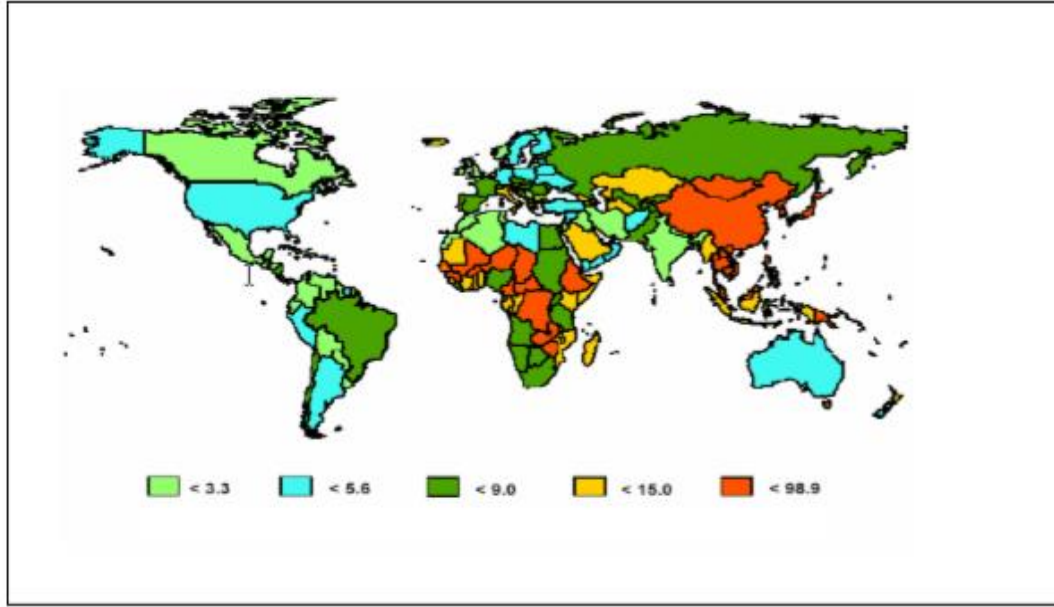
Virüs karaciğer hücresi çekirdeğinde, DNA polimerazı yardımıyla çoğalır (Şekil 1). Önceleri sadece hepatositlerde ürediği sanılan HBV'nin pankreas, kemik iliği hücreleri, lenfosit ve granülositlerde de çoğalabildiği gösterilmiştir. Bununla beraber primer üreme organı karaciğerdir. Hepatositlerde çoğalmasını tamamlayan virüs ve antijenleri buradan kana bulaşır. Kanda daha çok HBsAg partikülleri, kısmende Dane partikülleri bulunur. Portörlerde çoğunlukla kanda sadece HBsAg vardır, infeksiyöz virüs partikülleri bulunmaz. Portörlerde, infeksiyöz virüs olmaksızın devamlı HBsAg üretimini sağlayan mekanizmanın, HBV-DNA'sının hepatosit DNA'sına integre olması ve dolayısıyla HBsAg sentezinin karaciğer hücresi tarafından yapılması ile olduğu anlaşılmıştır. HBV'ye bağlı karaciğer kanseri de, HBV-DNA'ı ile integre olmuş hepatositlerin zamanla kanser hücresine dönüşme eğilimi göstermesi sonucu oluşmaktadır. HBV'nin oluşturduğu karaciğer harabiyeti, vücudun virusa karşı geliştirdiği immün yanıt sonucu olmaktadır. Yani HBV'nin direkt sitopatik etkisi yoktur.

Hepatosellüler karsinom primer karaciğer hücrelerinden köken alan malign tümördür. Tüm dünyada hepatosellüler karsinomun görülme sıklığı coğrafi bölgeden

bölgeye değişiklik göstermekle birlikte, HBV enfeksiyonunun endemik olduğu bölgeler olan Asya, Afrika ve Uzak Doğu hastalığın en çok görüldüğü yerlerdir. Güney Amerika, Batı Avrupa ve Avustralya gibi yerlerde görüme sıklığı daha düşüktür (Chenn ve diğ., 1997).

1.2 Epidemiyoloji ve Etiyoloji

Avrupada her yıl bir milyon insan kronik HBV ile enfekte olmaktadır. ABD de her yıl 140.000-320.000 insanda akut HBV enfeksiyonunun gerçekleştiği bulunmuştur. Bu enfeksiyonların büyük bir bölümü kronik hastalığa neden olmadan kendiliğinden iyileşmektedir. Tüm dünyada yılda ortalama bir milyondan fazla yeni vaka tanı almaktadır. Bunların sağ kalım oranları 5 yıl için %3 den azdır. Bazı araştırmalara göre, her yıl bir buçuk milyondan fazla insan bu hastalık nedeniyle ölmektedir (Feitelson ve diğ., 1993). Kronik HBV taşıyıcılarında hepatosellüler karsinom gelişme riski, enfeksiyonu olmayan insanlara göre yaklaşık 100 kat daha fazladır ve bugüne kadar bilinen en yüksek viral etken kanser oluşum riski ilişkisidir (Chenn ve diğ., 1997). Kronik karaciğer hastalığı olan kişilerin %15-%25'inde ölüm sebebi HBV ile ilişkili karaciğer hastalıklarıdır. Tüm dünyada yılda yaklaşık bir milyona yakın sayıda yeni HCC vakasına rastlanmakta, hemen hemen aynı sayıdaki hasta bu nedenle hayatını kaybetmektedir. HCC, erkeklerde kadınlara oranında dört kat daha fazla görülmektedir. Yıllık insidans ve mortalitenin neredeyse eşit oluşu tümörün kötü gidişi yönünden ipucu vermektedir. HCC'nin ortalama görülme yaşı 55 olmakla birlikte, özellikle Mozambik ve Çin gibi vertikal hepatit B virüsü (HBV) geçişinin baskın olduğu yerlerde HCC gelişimi çok daha erken yaşlarda ortaya çıkabilmektedir (Fong ve diğ. 2001; Akriviadis ve diğ. 1998). Tümörün rastlanma sıklığı belirli coğrafi bölgelerde artmaktadır. Bu açıdan en dikkat çekici bölgeler Doğu/Güney Doğu Asya, bazı Pasifik adaları ve Afrika'nın bazı bölgeleridir (Kew ve diğ. 2002)(Şekil 2)



Şekil 2:Dünyadaki hepatoselüler karsinom insidansı. (100.000 popülasyonda)

HCC gelişiminde birden fazla sebep söz konusudur. Gelişmekte olan ülkelerde kronik HBV enfeksiyonu önde gelen nedendir. Endüstrileşmiş bir toplum olmasına rağmen yüksek insidansın görüldüğü Japonya ile İtalya ve İspanya gibi Güney Avrupa ülkelerinde Hepatit C virüsü (HCV) daha ön plana çıkmaktadır. Yine diğer orta-düşük riskli ülkelerde alkolik karaciğer hastalığı, kronik HCV enfeksiyonu ya da alkol ve HCV enfeksiyonu birlikteliği HCC gelişimi için önde gelen nedenlerdendir (Kew ve diğ. 2002). Ayrıca HBV ve HCV enfeksiyonlarının sinerjik etki gösterdiği bilinmektedir (Akriviadis ve diğ. 1998). Siroz da HCC gelişiminde rol oynayan en önemli faktörlerden biridir. Ülkemizdeki HCC'lerin %90'ının zemininde siroza rastlanmaktadır (Bayraktar ve diğ. 1996). HCC vakalarının %80'inden fazlasının sebebi HBV ve HCV virüsleridir. Bu virüsler, hepatoselüler karsinom için başlıca çevresel faktör olarak tanımlanırlar. HCC gelişiminde rol oynayan diğer çevresel ajanlar ya tek başlarına ya da viral enfeksiyon ile sinerjik etki gösterirler. HCC gelişiminde rol oynayan diğer çevresel ajanlar, aflatoksin B1'e maruz kalma, sigara içimi, yoğun alkol kullanımı vb. olarak söylenebilir. Bir çeşit mantar toksini olan aflatoksin B1 özellikle Çin gibi coğrafik bölgelerde HCC oluşumuna neden olan en önemli faktörlerden biridir (Chen ve diğ. 1997). Alkol ve sigara kullanımı batı ülkelerinde aflatoksin B1'den daha önemlidir. Çünkü bu bölgelerde aflatoksin B1'e maruz kalma daha az olmaktadır (Wang ve diğ. 2002).

1.3 Viral Hepatitler ve HCC

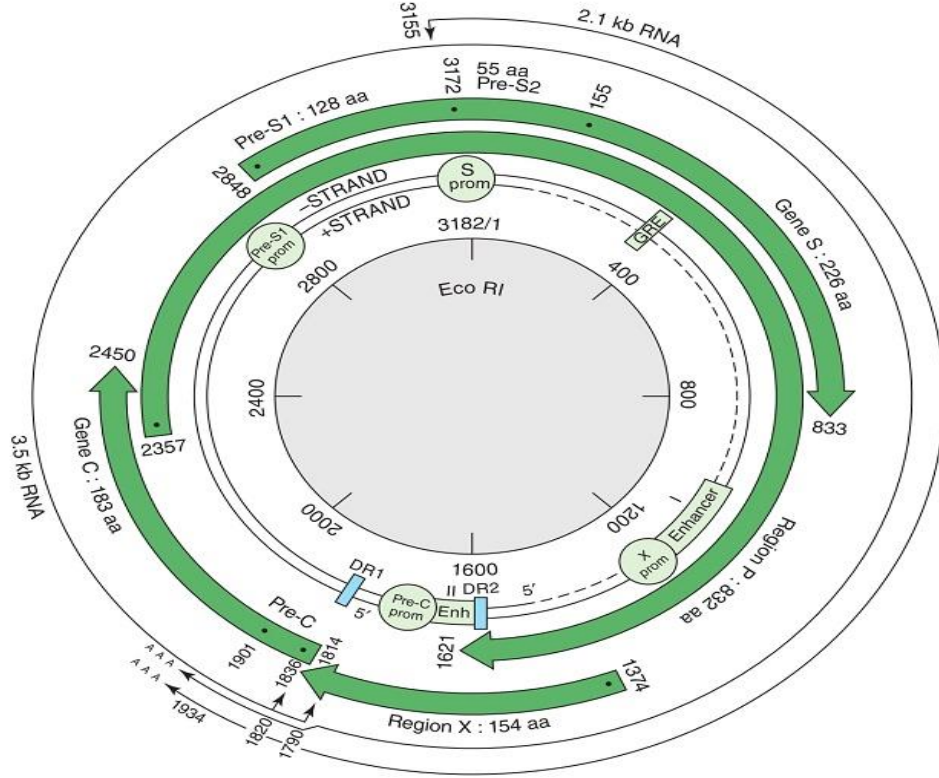
Hepatit B virüsü ve Hepatit C virüsü HCC gelişimine neden olan başlıca virüslerdir. HBV kronik taşıyıcılarının %25'inde tümör gelişimi gözlenmektedir. HBsAg seropozitif kronik enfeksiyonlu hastalarda, seronegatif hastalarla karşılaştırıldığında HCC gelişiminin 70 kat fazla olduğu görülmüştür. Hayvanlarda hepatit virüsleriyle ilgili çalışmalarda da Hepatit B virüsü ile HCC gelişimi arasındaki ilişkiye benzer bir ilişki bulunmuştur. WHV (woodchuck hepatitis virus) ve GSHV'nin (ground squirrel hepatitis virus), yerleştikleri türlerde HCC gelişimine sebep oldukları saptanmıştır (Gerin ve diğ. 1990; Hansen ve diğ. 1993). İnsan tümörlerinin genomunda Hepatit B virüsü DNA'sına rastlanması, HBV ile ilişkili kanser oluşumu için önemli bir ipucu niteliğindedir. Birçok HCC'li vakada HBV DNA dizileri hücre genomuna entegre olmuş bir şekilde bulunabilir ve viral proteinler bu entegrasyon boyunca sentezlenebilir (Matsubara ve diğ. 1990; Su ve diğ. 1998). HBV'nin bazı entegrasyonlarının tümör oluşumu için aday olan siklin A (Wang ve diğ. 1992), epidermal büyüme faktörü kinaz (Zhang ve diğ. 1992), mevalonat kinaz (Graef ve diğ. 1994), karboksipeptidaz N (Pineau ve diğ. 1996) gibi hücre genlerinin içinde ya da civarında meydana gelmesine rağmen, insan genomunda HBV için karakteristik bir entegrasyon yeri bulunmamaktadır (Rabe ve diğ. 2001). HBV'nin konakçı hücre genomuna entegrasyonu, konakçı hücrenin gen ekspresyonunu direkt ya da indirekt yollarla düzenleyebilir. Entegrasyonun meydana gelmesi, kromozomal instabilite, viral proteinlerin sentezinin tamamlanmaması, HBx proteininin sentezinin artması, hücre gen ve protoonkogenlerde değişiklikler ve insersiyonal mutagenез (cis aktivasyonu) ile sonuçlanabilmektedir (Wang ve diğ. 1991).

HBV vücuda girip karaciğere yerleştiğinde kendisi direkt olarak karaciğerde hasar oluşturmaz. Vücudun virüse karşı oluşturduğu immün yanıt sonucunda karaciğer hücreleri zarar görür. Virüs karaciğer hücresinde çoğaldıkça daha fazla immün yanıt oluşur ve bu da daha fazla karaciğer hücresinin zarar görmesi demektir. Zamanla zarar gören hücrelerin yerinde bağ dokusu oluşmaya başlar ve karaciğerde yaygın bağ dokusunun oluşumu sonucu karaciğer sirozudur. Kanda yüksek oranda virüs bulunan hastalarda karaciğer hasarı daha ciddi boyutlardadır. Kronik Hepatit B Virüsünün doğal seyri, HBV'nün genotipleri ve coğrafi bölgeleri arasında farklılık

göstermesine rağmen dört aşamaya ayrılır. Bunlar; yüksek HBV DNA'sı ile immün tolerans, HBV DNA'sı ile azalan immün sistem ile karaciğer iltaplanması ve fibröz, viral DNA ile belirlenemeyen şekilde serumda HB antijenlerinin azalması ve mutasyonların oluşması ile etkinleştirme aşamasının gerçekleştirilmesidir (Fietelson ve diğ., 1993).HBV'nin hepatokarsinogenez oluşumundaki moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Anzola, 2003; Arbuthnot ve Kew, 2001). Günümüzde kabul edilen model sistem, viral enfeksiyon süresince HBV DNA'sının belirli parçalarının konakçı hepatosit DNA'sına entegre olması ve bunun sonucunda konakçı hepatosit DNA'sında çeşitli değişiklikler ve hasarlar meydana getirmesidir. Bu değişikliklerin özellikle hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol oynayan pek çok gen üzerinden olduğu düşünülmektedir. Viral-konakçı DNA entegrasyonunun özel bir yerde lokalize olduğu gösterilmemiştir ve bu olay değişik veya rastgele bölgelerde olabilir (Caselmann, 1995). Hepatositler, HBV'ü ile enfekte olan hücrelerdir. Bu hücreler, hücre yüzey reseptörü gibi hepatosite özgü hücre içi faktörler ile kontrol edilir (Qadri ve diğ., 1995). HBV'nün hücre yüzey reseptörü bilinmemektedir ve HBV'nün hepatositlere girdiği mekanizma açık değildir. Fakat HBV'nün hepatositlere klatrin bağımlı endositoz yoluyla hepatositlere girdiği son zamanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. viral genomun konakçı hücreye girmesinden sonra kovalent olarak kapalı dairesel DNA'lar (cccDNA) oluşur. cccDNA, pre- genomik DNA da dahil olmak üzere viral mRNA transkripsiyonu için bir modeldir. Viral transkript daha sonra çeşitli proteinler oluşturmak için çevrilir. Pre- genomik RNA viral kapsidler halinde paketlenir ve ters transkriptaz tarafından transkribe edilir. Viral genomun ikinci tamamlayıcı DNA'sı farklı uzunluklarda tamamlanır. Viral yüzey proteinleri endoplazmik retikulumda hücrelerden salgılanır (Shin, 2013). Konakçı genomuna HBV'ün entegrasyonu, kronik HBV ile enfekte olmuş hastaların hepatositlerinde gözlenmiştir. Entegre olan HBV DNA'sı, kansere duyarlı bölgelerde, kırılğan bölgelerde, telomeraz geni ve siklin A tarafından algılanır (Ganem ve Prince, 2004). HBV'ü, hepadnaviridae ailesine ait olup sadece insanları enfekte eder. Hepadnavirüsler, ördek, balıkçıl, kazlar, kuşlar ve bazı memeliler ile insanlara bulaşırlar (Caselmann, 1995). Hepadnavirüsler kısmen çift sarmallı geniş dairesel DNA 'dan (rcDNA) oluşur ve benzer virion yapılarına sahiptir. Bu bölge doğrudan tekrarlanan 2 dizi içerir. Bunlar Doğrudan Tekrar 1 (DR1) ve Doğrudan Tekrar 2 (DR2)'dir. Bunlar, 10-12 nükleotidlik dizilerdir. Bu diziler viral replikasyon için gereklidir ve konak hücre içine DNA etkileşiminin habercisi olabilir

(Dejean ve diğ., 1984). Hepatit B virüsü (HBV) en önemli hepatokarsinojenlerden biridir. Anti-HBV tedavisinin nihai amacı, hepatoselüler karsinom (HCC) gelişimini önlemektir. Son yirmi yılda, mevcut mevcut anti-HBV tedavilerinin (lamivudin, entecavir ve tenofovir disoproksil fumarat) kullanılmasıyla, HBV ile ilişkili HCC (HBV-HCC) görülme sıklığında bir azalma olmuştur. Ayrıca, birkaç çalışma, ilk HCC tümör ablasyonundan sonra tekrarlayan veya yeni HCC gelişiminde bir azalma olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, 10 ila 20 yıl arasında değişen bir gözlem süresi boyunca, bazı vaka raporları, saptanamayan serum HBV DNA'sı olan hastalarda bile yeni, daha sonra yeni ve tekrarlayan HCC'nin gelişimini göstermiştir. HCC için kalıcı risk, hepatosit çekirdeğinde, HBV replikasyonu için bir şablon olarak çalışmaya devam eden kovalent olarak kapalı cccDNA varlığına bağlanmaktadır. HBV'nün genomik organizasyonu karmaşıktır. Çünkü çok küçük genom için birden fazla proteine ihtiyaç vardır. HBV genomu tamamen kodlama olduğundan, tüm düzenleyici sinyaller, arttırıcılar, transkripsiyonel başlama bölgeleri ve poliadenilasyon sinyalleri de dahil olmak üzere tüm düzenleyici sinyaller kodlama bölgeleri içinde gömülürler. HBV gen ekspresyonu, viral promotörler üzerindeki koaktivatörler ve transkripsiyon faktörleri ile düzenlenir. Bu virüs, zarflı ve çift sarmallı DNA virüsüdür. Viral genom, yaklaşık 3200 nükleotidden oluşur (Feitelson, 1993). Zarflı virüs olmasına rağmen ısı, dondurma, düşük pH'a ve çözmeye dayanıklıdır (Natoli ve diğ., 1994). HBV genomu, çekirdek proteini ve DNA polimeraz ile paketlenir. Virüs bir hepatosit içine reseptör aracılığı ile girer. Virüs DNA'sı konakçı genoma entegre olur. DNA replikasyonu burada gerçekleşir. Virüs partikülleri sitoplazmada toplandıktan sonra hepatosit tarafından serbest bırakılır (Anzola, 2005). HBV'ü, bir DNA virüsü olmasına rağmen ters transkriptaz enzimi kodlar ve bu sayede RNA aracısı üzerinden kendisini eşler. HBV genomu (Şekil 3), uzun sarmalı üzerinde Yüzey (S), Kor (C), X ve Polimeraz (P) olarak adlandırılan, dört değişik protein kodlayan nükleik asit dizisine "açık okuma çerçevesi" (ORF) sahiptir (Caselmann, 1995; Anzola, 2003). S geni, sırasıyla büyük, orta ve küçük yüzey proteinleri olan Büyük Hepatit B (LHB), Orta Hepatit B (MHB) ve Küçük Hepatit B (SHB) proteinlerini kodlar. C geni, çekirdek ve HB antijenlerini kodlar. P geni, ters transkriptaz ve RNaz faaliyetleri olan bir viral polimerazı ve HBV DNA sentezi için gerekli olan çok fonksiyonlu proteinleri kodlar. C ve P genleri DNA replikasyonu ve zarf proteinleri için gereklidir. HBV X geni, HBV genomundaki en küçük gen bölgesidir. HBX geni, 154 aminoasitlik polipeptit içerir ve 17 kDa'luk HB

X olarak adlandırılan proteini kodlar (Feitelson, 1993). Ayrıca X geni, bazı direkt olmayan etkiler ile viral ve bazı hüresel genlerin transkripsiyonunu arttırabilme özelliğine sahiptir (Feitelson ve Lee, 2007).



Şekil 3:Hepatit B Virüsü genomu

HBX proteininin ve HB antijeninin doğal enfeksiyon boyunca ifadesi çok açık olmamaktadır (Anzola, 2003). HBX, hücre tipine ve şartlarına uygun olarak farklı işlevleri uygulayan çok işlevli bir proteindir. Bu işlevler, HBV patogenezinde çeşitli hüresel proteinlerle HBX'in etkileşim halinde olmasıdır. HBX'in karşılaştırmalı analizleri sonucunda sarmal yapısında aminoterminal, karboksiterminal ve bobin-bobin motifi dahil olmak üzere son derece korunmuş alanlar ortaya çıkmıştır. Aminoasit 69 ve aminoasit 110-139 arasındaki fonksiyonel alanlar HBX in transaktivasyonu için kritik bölgelerdir. Özellikle HBX'in amino terminaldeki ilk 50 aminoasit transaktivasyonu düzenlemeye izin veren negatif düzenleyici etki alanıdır. HBX in hücre içindeki lokalizasyonu tartışılmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğu HBX in sitoplazmada olduğunu göstermiştir (Doria ve diğ., 1995). Fakat bazı çalışmalar da HBX in çekirdekte olduğunu göstermiştir (Haviv, 1995). Çekirdekte HBX düşük seviyede ifade edilmesine rağmen

sitoplazmada protein düzeyinin yüksek olması ve aşırı ifade edilmesi sitoplazmada lokalize olduğunu göstermiştir (Qadri ve diğ., 2011). Sitoplazmada lokalize olan HBX, farklı sitoplazmik sinyal yollarını etkiler. Bu yollar; stres aktivasyon protein kinaz/NH2-terminal-Jun Kinaz (SAPK/JNK), ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK), protein kinaz B (PKB), Ras-Raf Mitojen Aktivasyon protein kinaz (Ras-Raf-MAPK), Janus Kinaz/STAT ve adezyon kinaz (FAK) yollarıdır (Seto ve diğ., 1996). Çekirdekte de düşük seviyede ifade edilen HBX, bazı transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasına neden olur. Bu transkripsiyon faktörleri, *NF-κB* kompleksleri, AP1/2, ATF2/cAMP cevap element bağlanma proteini, bazal transkripsiyon faktörü TATA kutusu bağlanma proteini, RNA polimeraz alt üyesi RPB5, Transkripsiyon Faktörü II B ve Transkripsiyon Faktörü II H kompleksleri, tümör proteini (p53) ve siklik AMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) proteinleridir (Qadri ve diğ., 2011). HBV aracılı hepatokarsinogenez için çeşitli mekanizmalar vardır. Kromozomlara entegre olan HBV DNA'sının, HBX protein benzeri faktörler tarafından hepatositlerdeki büyümesi kontrol edilir. HBV'ü DNA dizilerini ekleyerek hücre genlerinin transkripsiyonunu etkinleştirir. Hücre ölümü, hepatosit yenilenmesi ve fibrozis ile kronik inflamasyona neden olur (Anzola, 2003). HBV gen ifadesi, viral promotorlar üzerindeki koaktivatörler ve transkripsiyon faktörleri ile düzenlenir. Hepatosit nükleer faktör 1 (HNF1), hepatosit nükleer faktör 4 (HNF4), siklik AMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB), proliferatör-aktive reseptörü (PPAR) ve farnesoid X reseptörü (FXR) gibi HBV aracılı transkripsiyon faktörlerinin karaciğer metabolizmasının kontrolünde önemli rol oynadığı görülmüştür. Transkripsiyonel transaktivatör fonksiyonu ile HBV gen ekspresyonunu ve replikasyonunu destekleyen HB X proteininin hepatokarsinogenez oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir (Qadri ve diğ., 2011). Ayrıca Hepatit B X gen bölgesi, konakçı DNA'sına en çok uyumlu olan HBV DNA parçasıdır. Bu entegrasyonlar pek çok farklı bölgelerden olabilir ve sonucunda enfekte karaciğer ve karaciğer tümör dokusunda çoğunlukla X bölgesine ait mRNA oluşumuna yol açar (Heidelberger, 1973; Koike ve diğ., 1994; Rawat ve diğ., 2012). Çeşitli araştırmalar HBX protein pozitifliğinin, hastalığın ağırlığı ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir (Balsano ve diğ., 1991). HB X proteini yüksek miktarda eksprese edilen HB X transgenik hayvan modellerinde de hepatoselüler karsinom oluşumu gözlenmiştir (Koike ve diğ., 1994; Chieochansin, 2006). Hepatoselüler karsinom olgularından izole edilen HBV X genine ait DNA bölgesi, in vitro şartlarda karaciğer hücre dizinine transfekte edildiği

durumlarda da, bu hücrelerde transformasyon gözlenmiştir (Chieochansin, 2006). Bu birbirinden bağımsız olarak yapılmış araştırmalar HB X proteininin hepatoselüler karsinom oluşumunda önemli bir rolü olduğunu ve bu katkının HB X proteininin transkripsiyonel trans-aktivatör fonksiyonuna bağlı olarak gerçekleşebileceğini düşündürmektedir (Benn ve Scheinder, 1995; Cheong ve diğ., 1995). HBX viral enfeksiyon için gerekli olan ve viral karsinogeneze potansiyeli olan bir kofaktördür (Beasley, 1988; Paterlını ve diğ., 1995). HBX, doğrudan DNA'ya bağlanmamasına rağmen çeşitli modellerle hareket eden bir trans-aktivatör olarak kabul edilir. Bir model, HBX'in sitoplazmada ve çekirdekte çeşitli sinyal yolları ile etkileşim halinde olmasıdır. HBX'in transkripsiyonel süreçlerde DNA'ya doğrudan bağlanmaması ile ilgili bir diğer model; HBX'in transaktivasyonu için, HBX, proteozom alt üniteleri olan proteozom alt birim alfa tip-7(PSMA7) ve 26S proteoz düzenleyici alt birim 4 PSMC1 ile etkileşim halinde olmasıdır (Havıv ve diğ., 1996). Çeşitli çalışmalar, HBX aktivasyonunun inflamasyon, kanser gelişimi ve viral replikasyon ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Çok çeşitli sinyal yollarının ve transkripsiyon faktörlerinin HBX tarafından aktive olduğu bilinmektedir. Bunlara örnek olarak Ras, Raf, Map Kinaz (MAPK), Nükleer Faktör Kappa B (*NF-κB*), aktive edici protein (AP-1) verilebilir. Bunlardan en önemlisi Nükleer Faktör kapa B (*NF-κB*)' dir (Havıv ve diğ., 1996). *NF-κB* , DNA transkripsiyonu, sitokin üretimi ve hücre canlılığını kontrol eden bir protein kompleksidir (Gilmore 2006).*NF-κB* tüm hücre tiplerinde bulunan, immün sistem ve inflamatuvar yanıtta, hücresel strese, oksidatif strese görev alan dimerik bir transkripsiyon faktörüdür. Bu transkripsiyon faktörü 300 aminoasitlik Rel Homoloji Domain içerir. Rel Homoloji Domain, İnhibitör Kappa B (IκB) ile arttırıcıların bağlanmasını, dimerizasyonu ve etkileşimleri kontrol eder. Sınıf I ve Sınıf II olmak üzere 2 çeşit *NF-κB* vardır. *NF-κB 1* ve *NF-κB 2*Sınıf I *NF-κB* 'ye aittir. RelA, RelB ve RelC, sınıf II *NF-κB* 'ye ait transkripsiyon faktörüdür (Tank ve diğ., 1996). *NF-κB*proteinleri, IκB proteinleri ile düzenlenir. *NF-κB*geni sitoplazmada normalde inaktif haldedir. Hücre zararlı maddeye maruz kaldığında bu gen aktif hale gelir. Hücre çeşitli uyarılara maruz kaldığında hücreye sinyal gelir. Sinyaller reseptöre bağlanır. Daha sonra IκB enzimi, IκBα'nın RelA/p50 kompleksinden ayrılmasını sağlar. RelA/p50 kompleksi sitoplazmadan çekirdeğe geçer. Burada koaktivatör ve RNA polimeraz ile birlikte hedef gene bağlanır. Böylece *NF-κB*geni uyarılır (Tank ve diğ., 1996; Feı ve Robert, 1996). Son zamanlarda, hepatosellüler karsinomun ilerlemesinde *NF-κB/p65* gibi

transkripsiyon faktörlerinin önemli rol oynadığı bulunmuştur (Fei ve Robert, 1996). *NF-κB*, T Hücre Lösemi Tip1, Herpes Virüsü, Epstein Barr Virüsü, Hepatit B ve Hepatit C Virüsü gibi insan onkojenik virüsleri ile de düzenlenir. Bu virüslerin spesifik onkoproteinleri, *NF-κB*'nin farklı bölgelerine bağlanır ve sonunda *NF-κB* aktivasyonuna neden olur. Bu virüsler arasında Hepatit B Virüsü, *NF-κB*'nin düzenlenmesinde önemli role sahiptir (Fei ve Robert, 1996). HBX tarafından *NF-κB*'nin düzenlenmesi ile yapılan aktivasyon, hücre büyümesi ve kanser gelişim genlerini düzenler (Chirillo ve diğ., 1996; Hong ve diğ., 2012). *NF-κB*'nin rol aldığı hastalık grupları diyabet, böbrek hastalıkları, yaşlanma, Alzheimer, virüs hastalıkları, deri hastalıkları, AIDS, astım, gut hastalığı, kronik karaciğer hastalıkları, kalp yetmezliği, crohn hastalığı. Aril Hidrokarbon Reseptörleri (AHR) ligand ile aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür. Ksenobiyotikler tarafından AHR aracılığı ile CYP1A1 gen ekspresyonu uyarılır. AHR sitoplazmada Hsp90 şaperonlarıyla kompleks halinde bulunur. Bazı ksenobiyotikler sonucunda AHR/Hsp90 kompleksi ayrılır. Ligand ile birlikte AHR nucleusa geçer. Çekirdekte Ksenobiyotik cevap elementi (XRE) bulunan sekansa bağlanır. Böylece CYP1A1 gen ekspresyonu uyarılır. CYP1A1 gen ekspresyonunun uyarılmasıyla hücre içindeki konsantrasyonu artan CYP1A1 enziminin bazı ksenobiyotik metabolizması sonucu ara metabolitler oluşur. Bu ara metabolitler karsinojenik maddelerdir. Bundan dolayı bazı ksenobiyotikler tarafından bir hücrenin karsinogenez sürecinin başlatılması söz konusudur.

1.4 Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon faktörü genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için DNA üzerinde belli bir diziye bağlanabilen bir proteindir. Bunlar diziye-özümlü DNA bağlanma proteini olarak da adlandırılır. Transkripsiyon faktörleri tek başına veya bir komplekste yer alan başka proteinlerle beraber, RNA polimeraz tarafından bir genin transkripsiyonunu ya (bir aktivatör olarak) kolaylaştırırlar ya da (bir represör olarak) engeller. Transkripsiyon faktörleri DNA'daki genetik bilgiyi okuyup yorumlayan protein gruplarından biridir. DNA'ya bağlanırlar ve gen transkripsiyonunun artması veya azalmasına yol açarlar. Bu bakımdan pek çok önemli hücresel süreçte hayati bir konuma sahiptirler. Transkripsiyon faktörlerinin ilişkili olduğu bazı önemli

fonksiyonlar aşağıdadır: Bazal transkripsiyon düzenlemesi Ökaryotlarda transkripsiyonun gerçekleşmesi için "genel transkripsiyon faktörü" diye adlandırılan önemli bir transkripsiyon faktörü sınıfının üyeleri gereklidir. Bu faktörlerin çoğu doğrudan DNA'ya bağlı değildir, ama RNA polimeraz ile doğrudan etkileşirler. Bunların en önemlileri transkripsiyon faktörleri olan TFIIA, TFIIB, TFIID, TATA bağlanma proteini, TFIIE, TFIIIF ve TFIIH'dir. Gelişme çok hücreli canlıların gelişmesinde pek çok transkripsiyon faktörü rol oynar. Uyarılara tepki veren bu transkripsiyon faktörleri, ilgili genleri çalıştırlar veya durdururlar, bu da hücre morfolojisinde, hücre kaderi belirlenmesinde ve hücresel başkalaşımında gerekli olan değişiklikleri mümkün kılar. Örneğin, Hox transkripsiyon faktör ailesi sirke sineğinden insana kadar pek çok canlıda vücut biçiminin oluşması için önemlidir. Bir diğer örnek, insanlarda cinsiyetin belirleyici gen (SRY)'dir.

Hücreler, sinyal molekülleri salgılayarak birbirleriyle haberleşirler, bu moleküller alıcı hücrelerde sinyal silsileleri başlatır. Eğer sinyal, alıcı hücredeki genlerin ifadesinin değişmesini gerektiriyorsa sinyal silsilesinin akış aşamasında genelde bir transkripsiyon faktörü bulunur. Basit bir örnek olarak estrojen sinyalleme verilebilir: estrojen, plasenta ve yumurtalık gibi dokular tarafından salgılanır, alıcı hücrenin hücre zarından geçip sitoplazmasındaki estrojen reseptörüne bağlanır; sonra estrojen reseptörü çekirdeğe gidip kendi DNA bağlanma yerine bağlanır, bu da ilgili genlerin transkripsiyon denetimini değiştirir. Çevreye tepki vermek transkripsiyon faktörleri çevresel uyarıların doğurduğu sinyal silsilelerinin ucunda da yer alabilirler. Buna örnekler, yüksek sıcaklıkta canlı kalmayı sağlayan ısı şoku faktörü (HSF), düşük oksijenli ortamda yaşamı sağlayan hipoksiya indüklenebilir faktör ve hücre içindeki lipid seviyelerini düzenleyen sterol düzenleyici elemana bağlanıcı protein olarak sayılabilir. Hücre döngüsü kontrolü çoğu transkripsiyon faktörü, özellikle onkogen veya tümör baskılayıcı genler hücre döngüsünü düzenlerler, dolayısıyla bir hücrenin ne kadar büyüyeceğine ve ne zaman bölüneceğini belirler. Bunun bir örneği hücre büyümesi ve apoptozda önemli rol oynayan Myc onkogenidir.

Transkripsiyon faktörlerinin yapıları modülerdir ve şu bölgelerden oluşur; DNA bağlanma bölgesi düzenlenen genin bitişiğindeki promotör bölgesindeki veya daha uzağındaki hızlandırıcı DNA dizilerine bağlanır. Trans-aktivasyon bölgesi transkripsiyon eşdüzenleyici başka proteinler için bağlanmalarına sahiptir.

Bazen bulunan bir sinyal algılama bölgesi, örneğin bir ligand bağlanma bölgesi, moleküler sinyalleri algılayıp transkripsiyon kompleksinin geri kalanına ileterek genin aşağı veya yukarı ayarlamasını yapar. Bazen DNA bağlanma bölgesi ve sinyal algılama bölgesi, transkripsiyon kompleksini oluşturan farklı proteinlerde yer alırlar.

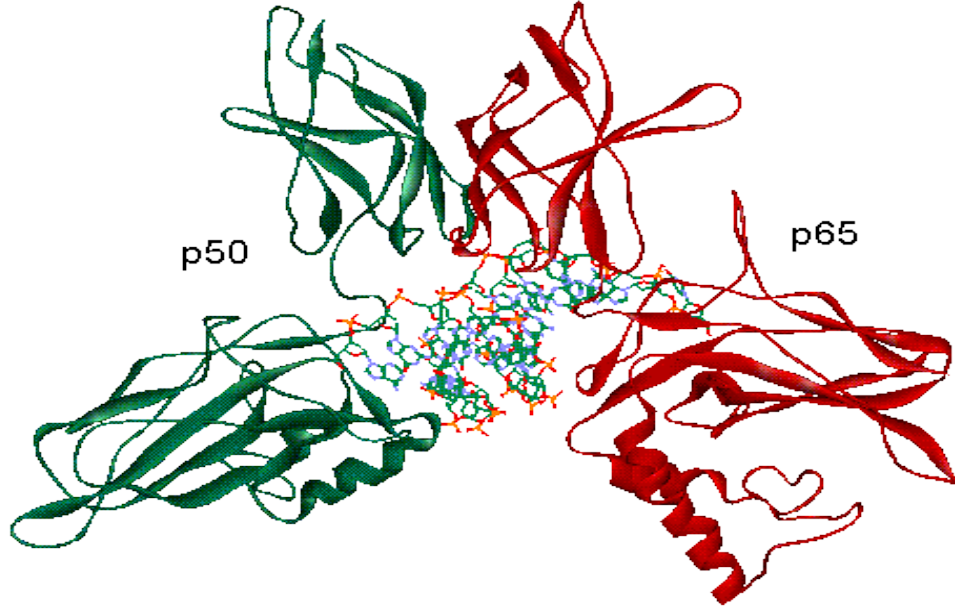
Transkripsiyon faktörleri gen ifadesinin düzenlenmesi için zaruridir ve dolayısıyla her canlıda bulunur. Canlılarda bulunan transkripsiyon faktörü sayısı genom büyüklüğü ile orantılıdır, daha büyük genomlarda gen başına transkripsiyon sayısı daha çoktur.

İnsan genomunda DNA'ya bağlanabilen yaklaşık 2600 protein vardır, bunların çoğunun transkripsiyon faktörü olduğu tahmin edilmektedir. Dolayısıyla genomdaki genlerin yaklaşık %10' u transkripsiyon faktörlerini şifrelemektedir, yani bu protein grubu insan proteinleri arasında en kalabalık olanıdır. Genlerin genelde iki tarafında birkaç farklı transkripsiyon faktörünün bağlanma yerleri bulunmaktadır ve bu genlerin verimli olarak ifadesi için birkaç transkripsiyon faktörünün beraberce etkisi gerekmektedir. Yani 2000 insan transkripsiyon faktörünün belli bir alt kümesinin kombinezonları insan genomundaki her genin gelişim sırasındaki kendine has denetimini açıklamaya yeterlidir. Kansere çoğu transkripsiyon faktörü tümör baskılayıcısı veya onkogendir, bu yüzden onları mutasyonu veya hatalı denetimi kanserle ilişkilidir.

1.5 Nükleer Faktör Kappa B

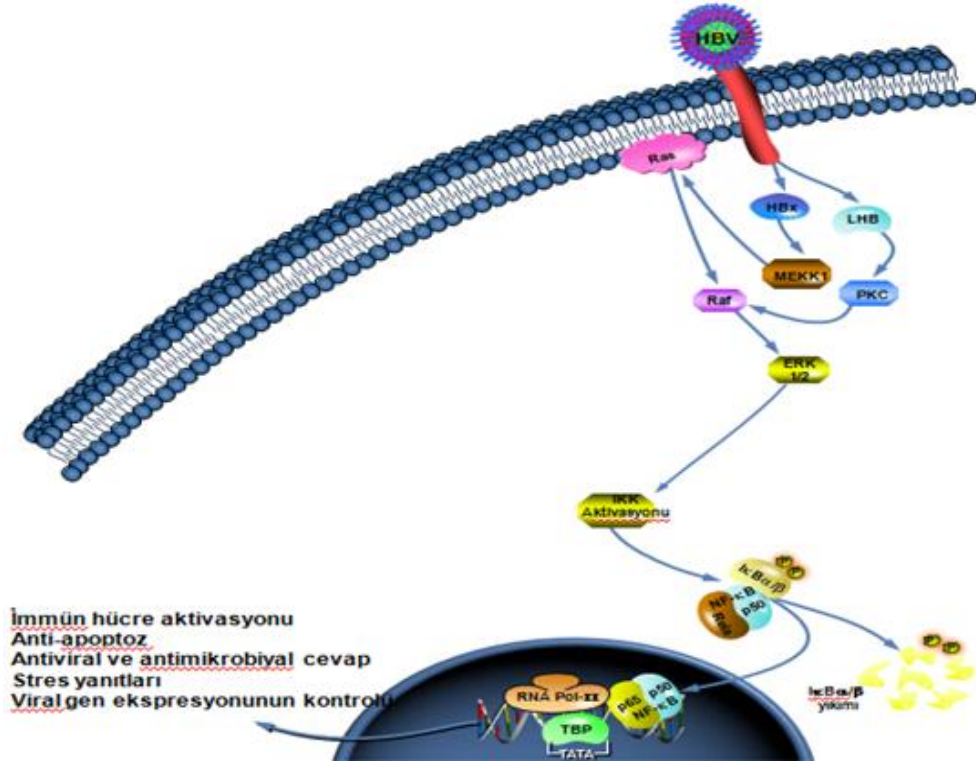
Tüm hücre tiplerinde bulunan *NF-κB*, 400'e yakın genin regülasyonunu sağlayan bir protein kompleksi, immün yanıtta yer alan, hücre proliferasyonuna ve apoptoza katılan yaygın bulunan enhancer bağlayıcı, dimerik bir transkripsiyon faktörüdür. Bu transkripsiyon faktörü 300 aminoasitlik Rel homoloji domain içerir. Bu genler Rel Ailesi (5 üyesi olan) olarak bilinir ve birimleri şunlardır; Rel A (p65), Rel B, C-Rel (REL), *NF-κB1* (p50 ve prekürsörü p105) ve *NF-κB2* (p52 ve prekürsörü p100). Bu transkripsiyon faktörü 50 ve 65 kDa alt birimlerden (p50 ve p65) oluşur (Şekil 4). p50 DNA'ya bağlanır, p65 ise transkripsiyonel aktivasyon yapar. p65, IκB denen inhibitör sitoplazmik protein ailesine bağlı halde bulunur. Bu

bağlanma, $NF-\kappa B$ 'nin çekirdeğe translokasyonunu ve dolayısıyla DNA'ya bağlanmasını engeller. I κ B, proteolizle regüle edilir ve yıkımı $NF-\kappa B$ 'nin serbest kalmasını, örneğin transkripsiyonel aktivasyon yapar.



Şekil 4:Nükleer Faktör Kappa B alt birimleri

$NF-\kappa B$ sitozolde inaktif formda bulunmaktadır, I κ B ailesi proteinlerine bağlıdır. Homodimer veya heterodimer formda olup aktive edildiğinde hızla nükleusa gider ve bir kaskad aktive eder. $NF-\kappa B$ sinyalleri klasik ve alternatif yolla gelişir. Hepatit B virüsü, $NF-\kappa B$ 'nin düzenlenmesinde önemli role sahiptir. HBX tarafından $NF-\kappa B$ 'nin düzenlenmesi ile yapılan aktivasyon, hücre büyümesi ve kanser gelişim genlerini düzenler (Şekil 4).



Şekil 5: Hepatit B virüsü aracılı $NF-\kappa B$ 'nin aktivasyon yolu

$NF-\kappa B$ 'nin rol aldığı hastalık grupları $NF-\kappa B$ ilk kez 1986 yılında Baltimore ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. İlk tanımlandığında B hücrelerinde immüoglobulin kappa hafif zincirinin üretimini kolaylaştıran bir faktör olarak tarif edilen $NF-\kappa B$, daha sonraları birçok organizmada ve hemen her hücre tipinde bulunan, organizmanın kendi kendini savunmada kullandığı ana şarhlerden birisi olarak kabul edilmiştir (Brasier, 2006). Aktif hale gelen $NF-\kappa B$, immüno-inflamatuvar yanıtlar, hücre döngüsü, apoptoz, hücre adezyonu, anjiyogenez gibi olaylarda rol oynayan 200'den fazla genin transkripsiyonunu kontrol etmektedir (Maeda ve Omata; 2008). $NF-\kappa B$ klinik olarak da viral enfeksiyonlar, immüno-inflamatuvar hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde rol oynamaktadır (Şekil 5) (Hiscott ve diğ. 2006; Okamoto, 2006; Horie, 2007). Hepatoselüler karsinomun ilerlemesinde $NF-\kappa B$ -p65 gibi transkripsiyon faktörlerinin rol oynadığı bulunmuştur.

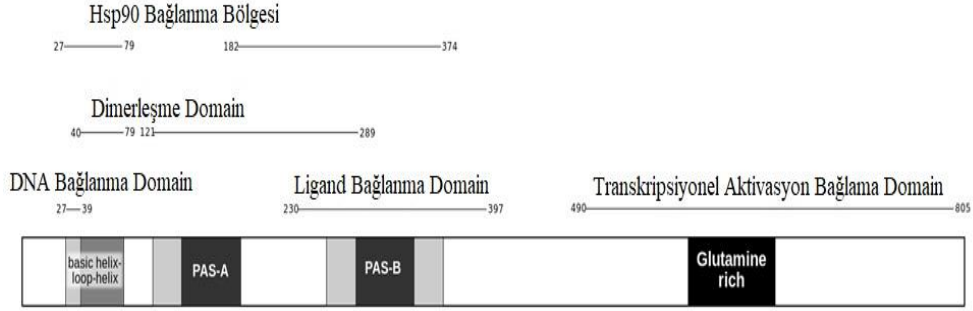
AHR, yüzlerce geni (Kerley-Hamilton ve diğ., 2012) ve birçok hücresel yolu düzenleyen bir ligand / toksik madde ile aktiveleştirilen bir nükleer reseptördür ve Ahr geni ile fareler çeşitli gelişimsel ve metabolik anomalilere maruz kalır (Fernandez-Salguero ve diğ., 1995; Lahvis ve diğ., 2000; Quintana ve diğ., 2008). Zıt bağlanma

üzerine, AHR, AHR nükleer translokator ile komplekslendiği çekirdeğe yer değiştirir (Hoffman ve diğ., 1991). AHR, sitokrom P450 CYP1 familyasındaki genlerin çevresel toksiklerinin ve birkaç Faz II detoksifikasyon geninin indüksiyonu ile iyi bilinir (Nebert ve diğ., 1993 ve Hankinson, 1995). Tüm hücrel sinyal yollarında olduğu gibi, AHR'nin dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) indükleyici (Gaido ve diğ., 1992) dahil olmak üzere birçok başka sinyal yoluyla (Puga ve diğ., 2005) etkileşime girdiği bilinmektedir. Özet olarak, AHR vasküler modelleme, organ modelleme, hücre dışı matris birikimi, hücre çoğalması, apoptoz ve kardiyak sistemde hayati bir rol oynar.

Bununla birlikte, viral enfeksiyon sırasındaki doğal immün cevaplardaki rolü tam olarak anlaşılmamıştır. Burada, kurucu AHR sinyalinin, çeşitli virüs türleriyle enfeksiyon sırasında tip I interferon (IFN-I) tepkisini olumsuz şekilde düzenlediğini gösterilmiştir (Puga ve diğ., 2005). Virüs kaynaklı IFN- β üretimi, AHR eksikliği olan hücrelerde ve farelerde arttırıldı, sınırlı viral replikasyonla sonuçlandı. AHR'nin, ADP-ribosilaz TIPARP'ın ifadesini düzenlediğini ve bunun da IFN-I yanıtının aşağı regülasyonuna neden olduğunu bulunmuştur. Mekanik olarak, TIPARP, kinaz TBK1 ile etkileşime girmiş ve aktivitesini ADP-ribosilasyon ile bastırmıştır. Bu nedenle, bu çalışma, IFN-I aracılı doğal tepkinin şekillendirilmesinde AHR sinyalinin endojen aktivasyonunun fizyolojik önemini ortaya koymaktadır ve ayrıca AHR-TIPARP ekseninin, antiviral tepkilerin arttırılması için potansiyel bir terapötik hedef olduğunu öne sürmektedir.

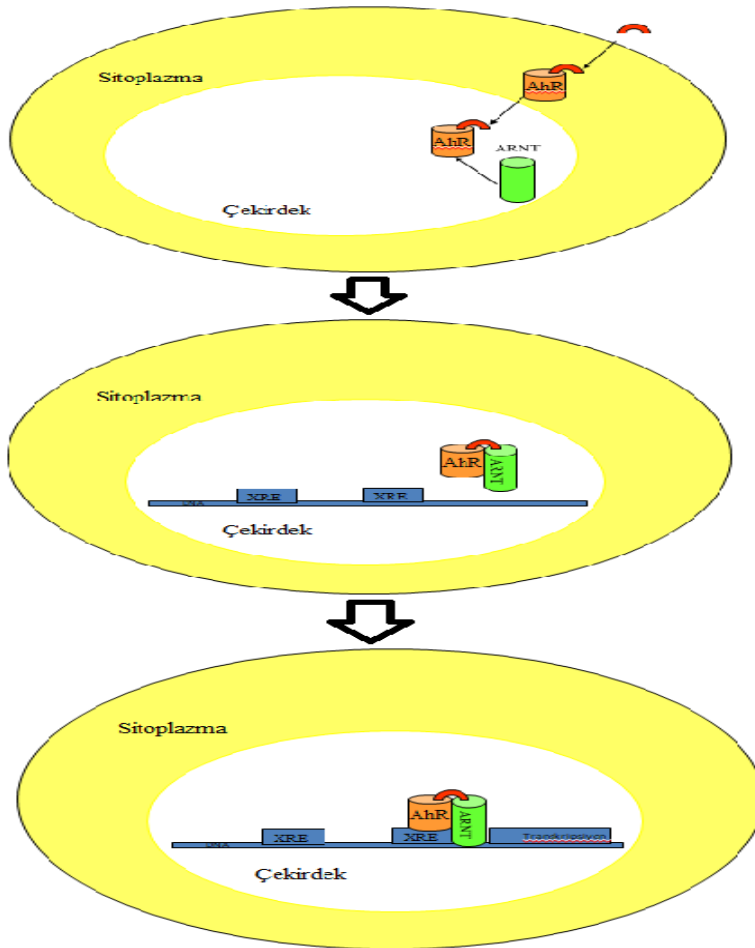
1.6 Aril hidrokarbon reseptörü (AHR)

AHR, gen ekspresyonunun geniş spektrumunu düzenleyen ligand aktif transkripsiyon faktörüdür (Şekil 6). AHR' nin ana aracısı, çeşitli ciddi sağlık etkilerine neden olan yaygın çevresel kirletici olan 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) veya polisiklik aromatik hidrokarbonlardır; immünsüpresyon, karsinogenez ve hepatotoksisitede rol alırlar. AHR, transkripsiyon faktörlerinin temel helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim (bHLH-PAS) üst ailesinin bir üyesidir. Ligandın yokluğunda AHR, 90 kDa (Hsp90)ısı şoku proteininin bir dimerine ve (ayrıca XAP2 ve ARA9 olarak da bilinir) immünofilin benzeri protein a dimerine bağlı olan sitozolde bulunabilir.



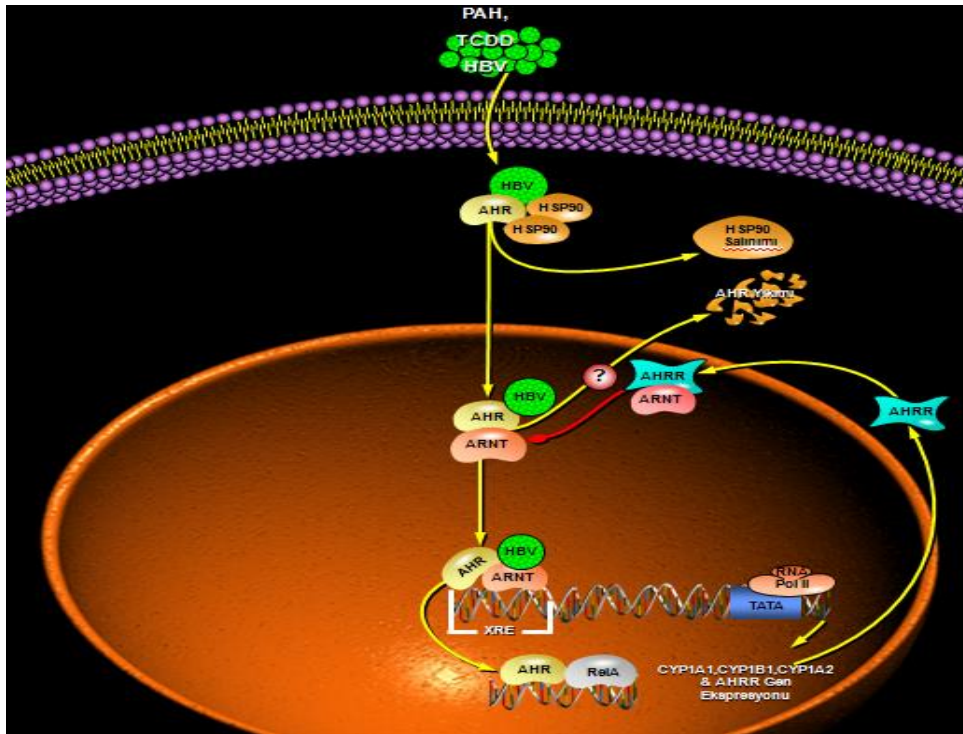
Şekil 6: Aril Hidrokarbon reseptör domain

Ligand bağlanması üzerine AHR, çekirdeğe yer değiştirir ve ARNT ile bağlanır. AHR / ARNT heterodimer, ksenobiyotik tepki elemanlarına bağlanır ve çeşitli gen kümesini düzenler (Şekil 7).



Şekil 7: Aril Hidrokarbon reseptör sinyal yoluğu

AHR, yüzlerce geni (Kerley-Hamilton ve diğ., 2012) ve birçok hücreyel yolu düzenleyen bir ligand / toksik madde ile aktifleştirilen bir nükleer reseptördür ve AHR geni ile fareler çeşitli gelişimsel ve metabolik anomalilere maruz kalır (Fernandez-Salguero ve diğ., 1995; Lahvis ve diğ. 2000; Quintana ve diğ. 2008). Zıt bağlanma üzerine, AHR, AHR nükleer translokator ile komplekslendiği çekirdeğe yer değiştirir (Hoffman ve diğ. 1991). AHR, sitokrom P450 CYP1 familyasındaki genlerin çevresel toksiklerinin ve birkaç Faz II detoksifikasyon geninin indüksiyonu ile iyi bilinir (Nebert ve diğ. 1993 ve Hankinson 1995). Tüm hücreyel sinyal yollarında olduğu gibi, AHR' nin TGF (Gaido ve diğ. 1992) dahil olmak üzere birçok başka sinyal yoluyla (Puga ve diğ. 2005) etkileşime girdiği bilinmektedir (Şekil 8). Özet olarak, AHR vasküler modelleme, organ modelleme, hücre dışı matris birikimi, hücre çoğalması, apoptoz ve kardiyak sistemde hayati bir rol oynar. Bununla birlikte, viral enfeksiyon sırasındaki doğal immün cevaplardaki rolü tam olarak anlaşılmamıştır. AHR sinyalinin, çeşitli virüs türleriyle enfeksiyon sırasında tip I interferon (IFN-I) tepkisini olumsuz şekilde düzenlediğini gösterilmiştir. Ek olarak AHR karaciğer ve diğer doku inflamasyonlarında önemli rollere sahiptir. Yapılan çalışmalarda AHR' nin *NF-κB*-p65 alt ünitesi ile interakisyona girdiği gösterilmiştir (Qvrevik, 2014) (Şekil 8).

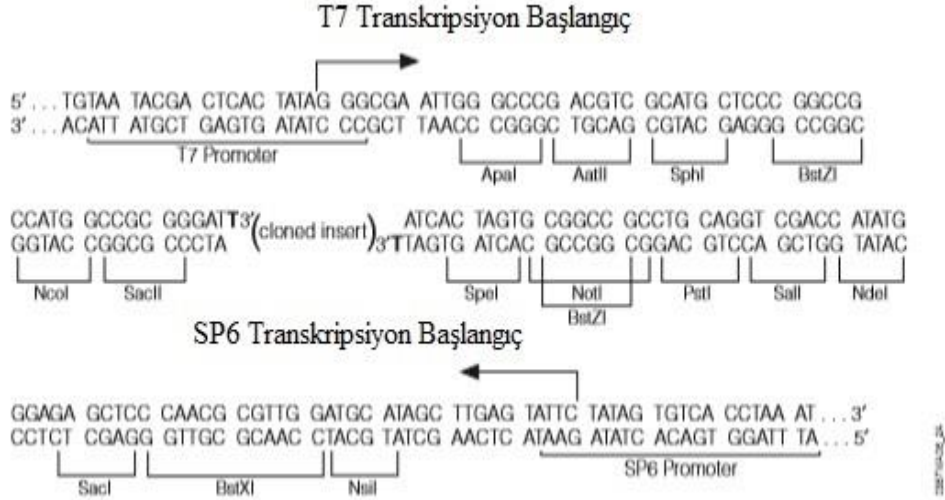


Şekil 8: Aril Hidrokarbon reseptörünün Tetraklorodibenzo-p-dioksin(TCDD) veya polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve Hepatit B Virüsü aracılı sinyal yolu

1.7 Klonlamada Kullanılan Vektörler

Bir organizmanın herhangi bir DNA bölgesinin özgül olarak diğer bölgeler arasından izole edilip başka bir yere ilave edilerek ifade olmasını sağlamaya klonlama denir. Vektörler ise izole edilen DNA parçalarının yapıştırıldığı ve parçaları taşıyan sistemlere veya özel nükleotid dizilerinden retriksiyon endonükleazlarla kesilmiş DNA parçalarının alıcı hücreye aktarılmasını sağlayan yapılardır. Bir vektörde alıcı hücrenin kromozomundan bağımsız olarak kendini çoğaltabilmesi gerekir yani replikasyon orjini olmalı, vektöre diğer hücreler arasından seçebilmesini sağlayacak özellik kazandıran bir gen taşımalı (antibiyotik direnç, metale direnç vs.). Bulunduğu ortamda ayrı bir molekül olarak izole edilebilmelidir ve tek bir retriksiyon endonükleaz kesim bölgesi bulundurmalıdır.

Deneyimizde kullanacağım vektör sistemi “pGEM-T” kolay vektörleri, EcoR V ile keserek ve her iki ucuna da 3' terminal timidin ekleyerek hazırlanır. Yerleştirme alanındaki bu tek 3'-T sarkmaları, vektörün devirdaim olmasını önleyerek ve bazı termostabil polimerazlar tarafından üretilen PZR ürünleri için uyumlu bir çıkıntı sağlayarak bir PZR ürününün plazmidlere bağlanmasının etkinliğini büyük ölçüde artırır. Bu polimerazlar, çoğunlukla, çoğaltılmış fragmanların 3' uçlarına şablondan bağımsız bir şekilde tek bir deoksiadenozin ekler. Yüksek sayıdaki “pGEM-T ve pGEM-T” Kolay Vektörleri, enzim beta-galaktosidazın alfa-peptid kodlama bölgesi içinde çoklu bir klonlama bölgesini çevreleyen T7 ve SP6 RNA polimeraz promotörleri içerir (Şekil 9). Alfa-peptidin yerleştirilmesinin etkisizleştirilmesi, rekombinant klonların gösterge plakaları üzerinde mavi / beyaz tarama ile doğrudan tanımlanmasına izin verir.



Şekil 9: pGEM-T Vektörün promotörü ve çoklu klonlama sekansı. Üst iplik T7 RNA polimerazı tarafından sentezlenen RNA'ya karşılık gelir. Alt iplik, SP6 RNA polimerazı tarafından sentezlenen RNA'ya karşılık gelir.

1.8 Tezin Amacı

Hepatoselüler Karsinom, her yıl yaklaşık 435.000 yeni vakanın teşhis edildiği en sık rastlanan beşinci kanser türüdür. Bu veriler tüm kanser vakalarının %5.4'ünü oluşturmaktadır (Wang ve diğ. 2016). Gen ekspresyonununun *NF-κB* tarafından düzenlendiği birçok araştırmada gösterilmiştir. Ancak, Hepatit B varlığındaki hepatoselüler kanser gelişiminde *NF-κB* ve AHR gen etkileşimleri ile ilgili bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Hepatit B virüs varlığında gelişen karaciğer olgularının kansere olan yatkınlıklarının açıklanmasında, *NF-κB* ve AHR geninin uyarılma mekanizmasının aydınlatılması için büyük önem taşımaktadır.

Amacımız, Hepatit B X'in hepatokarsinogenez oluşumunda önerilen *NF-κB* ve AHR genleri üzerine etkilerinin insan hepatoselüler karsinom hücre hattında (HepG2) aydınlatılmasıdır.

2. MATERYAL VE METHOD

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

L-Glutamin (Sigma-G8540); Sığır serum albümin (Sigma-A4919); EasyScript™ Plus cDNA Sentez Kiti (G236), Fetal Sığır Serumu Gibco (ThermoFisherScientific, 81 Wyman Street, Waltham, MA 02451 USA) firmasından; Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM, 12-741F), Penislin-Streptomisin karışımı (17602), RNeasy Plus Mini Kit (74136), Oligo-DNA (primerler) Metabion (metabion international AG Semmelweisstr. 3 82152 Planegg Germany) firmasından; trizol reaktifi (Sigma-T-9424), flexi system, entry/transfer 5 entry and 20 transfer reactions(Promega-0000127963), checkmate™/flexivector mammalian two-hybrid system (Promega-0000053694),pureyield™ plasmid miniprep system (Promega-0000129329), 10x flexi-enzyme blend (Promega), wizard® plus sv minipreps dna purification system (Promega-0000128286), Wizard sv Jel ve Pzr Saflaştırma Kiti (Promega-0000123188), Fugene hd Transfeksiyon Kiti (Promega-0000139198), pgl4.26[luc2/minp/hygro] vector (Promega), pgl4.73[hrluc/sv40] vector (Promega), Dual-Glo Lusiferaz (Promega-0000220660), pgem®-t easy vector system 11 (Promega), tfl dna polymerase (Promega), Trizol (15553), kloroform (C2432), 2-propanol (19516), agaroz (A5093) Sigma'dan elde edildi. Agaroz (Sigma, A9539), DEPC (Sigma, D5758), Etanol (Riedel, 071029) (% 70 konsantrasyonunda etanol kullanılmıştır), Etidyum Bromür (Sigma, E8751), 6X DNA İzleme Boyası (10 mM Tris-HCL, % 0,03 Bromfenol Blue, % 0,03 Ksilen Siyanol FF, % 60 Gliserol, 60 mM EDTA ile 10 ml olacak şekilde hazırlandı).

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Deneysel çalışmalarımız sırasında; Sigma 1-14K soğutmalı/soğutmasız santrifüjler, Bioneer ve Veriti PZR cihazı, Biossa kuru blok ısıtma termostadı, Biossa kuru blok ısıtma termostadı, DNR jel görüntüleme sistemi, Thermo agaroz jel elektroforez sistemi, Thermo Scientific Maestrogen Nanodrop cihazı, Bioneer Exi Spin PZR tüp karıştırıcısı, Nuare Biological Safety Cabinets Class II Laminar Flow, Nuare DHD Auotoflow CO₂ İnkübatör, Hücre Sayıcı (Nexcellom), Nuare -85 °C Ultralow Freezer, Human Power Scholar-UV saf su sistemi, Hirayama Hiclave HVE-50 otoklav, Olympus ters mikroskop, Olympus CX31 mikroskop, Metler Toledo MP 220 pH metre, Nüve ST 402 su banyosu, Labnet vorteks karıştırıcı, Mettler Toledo klasik ve Precisa hassas tartı, Biotek synergy çok modlu luminometrik okuyucu kullanılmıştır.

2.2 Method

2.2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları

2.2.2 Besiyeri Hazırlanışı

Tezde kullanılan hücre hattı, üretici firma, ürün numarası, hücre hattının elde edildiği organizma ve doku, büyüme özelliği, kullanılan besiyeri, antibiyotik ve serum ihtiyacı, saklama koşulları Tablo 1’de verildi. Hepatit B X virüsü ile enfekte edilen hepatosellüler karsinom hücre (HepG2-HBX hücre) ve HepG2 hücre hattı, tablodaki şartlara göre büyütülmüştür.

Tablo 1: Projede kullanılan hücre hattı, özellikleri ve ihtiyaçları

Firma	Organizma	Hücre Hattı	Doku	Büyüme Özelliği	Besiyeri	Antibiyotik	FBS	Saklama
ATCC	İnsan	HepG2	Karaciğer	Yapışık	DMEM	% 1	% 10	% 10 DMSO

NF-κB ve *AHR* genlerinin interaksiyonunun belirlenmesi amacıyla HepG2-HBX hücresi 37°C'de %5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe büyütüldü. Hücreleri büyütme için kullanılan ticari DMEM besiyerinin içine %1 antibiyotik (Penisilin-Streptomisin) ve %10 Fetal Dana Serum (FBS) ilave edilerek hazırlandı ve +4°C de saklandı. Besiyeri kullanılmadan 30 dakika önce +4°C'den çıkartılıp 37°C olan su banyosunda ısıtılıp kullanıldı.

2.2.3 Hücrelerin Büyütülmesi

Deneyde kullandığımız hücre hattı haftada iki kez düzenli pasajlandı. Üretim sırasında kontaminasyonu önlemek amacıyla filtre kapaklı hücre kültürü kapları kullanıldı. -80°C'de % 10 Dimetil sulfoksit (DMSO) içerisinde olan hücreler, 37 °C'de eriyene kadar bekletilip, eridikten sonra hücre kültür kaplarına ekilip ve üzerine 10 ml uygun besi ortamı eklenerek 37°C' de, % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren ortamda 1 gün inkübe edildi. Ertesi gün DMSO'dan kurtarmak için hücre kültür kaplarındaki besiyeri değiştirildi. Besiyeri pipetle uzaklaştırıldıktan sonra hücreler bir kez Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ tuzları içermeyen steril PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkandı.

2.2.4 Hücrelerin Pasajı

Hücrelerin çoğaltıldığı kültür kaplarında, hücreler tek tabaka olduklarında pasajları yapıldı. Pasaj işlemi için öncelikle kültür besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2 ml % 0,25' lik tripsin ile yaklaşık 5 dakika muamele edilecek ve hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Süspansiyon haline getirilen hücreler steril santrifüj tüpüne alındıktan sonra tripsinin inaktif hale gelmesi için üzerine 2 ml uygun besi ortamı eklendi ve pelet üzerine 1 ml besi ortamı eklenerek, ependorfta hazırlanan trapan mavisi (1:1000) ve hücre karışımı (1:1) thoma lamında sayıldı ve hücreler deney planına göre ekim için hazır hale getirildi.

2.2.5 RNA İzolasyonu

Besiyeri hücrelerden uzaklaştırıldı ve fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 3 kez yıkandı. RNA, “Qiagen RNeasy Plus Universal Kit” kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda izole edildi. RNA izolasyonu için hücreler 600 µl ‘Qiazol Lysis Reagent’ ile toplandı. ‘Qiazol Lysis Reagent’ ile toplanan hücreler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzerine 100 µl kit içinde bulunan ‘gDNA Eliminator’ solüsyonundan eklendi ve 15 saniye karıştırıldı. Daha sonra 180 µl kloroform eklenip ve tekrar karıştırıldıktan sonra 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda 12.000 xg’de ve +4°C’ de 30 dakika santrifüj edildi. Üst faz 2ml’lik steril ependorf tüpe toplandı ve alınan üst faza eşit miktarda % 70 etanol eklenip iyice karıştırıldı. Karışım ‘RNeasy mini spin’ kolona eklendi ve 30 saniye 9.000 xg’de santrifüj edildi ve alta geçen kısım döküldü. Kolunun üzerine 700 µl kit içinde bulunan yıkama tamponu ‘RWT’ eklendi ve 30 saniye 9.000 xg’ de santrifüj edildi. Alta geçen kısım dökülüp kolonun üzerine 500 µl kit içinde bulunan yıkama tamponu ‘RPE’ eklendi ve 30 saniye 9.000 xg’ de santrifüj edilip, alta geçen kısım döküldü. Kolon üzerine tekrar RPE tamponu eklendi ve 2 dakika 30 saniye 9.000 xg’de santrifüj edildi ve alta geçen kısım döküldü. Son olarak kolon yeni tüpe alındı ve üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 1 dakika 15 saniye 9.000 xg’ de santrifüj edildi. Elde edilen RNA kalitesi agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve konsantrasyonları nanodrop (MaestroNano) cihazında ölçüldü. RNA’ nın saflığını değerlendirirken A260/A280 ve A260/A230 oranına bakılmaktadır. A260/A280 oranının yaklaşık olarak 1,9 ve A260/A230 oranının ise 1,8 ile 2,2 arasında olması izole edilen RNA’nın saf olduğunu göstermektedir.

2.2.6 Total RNA’nın Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi

İzole edilen RNA’lar % 1’ lik agaroz jel hazırlanarak Thermo yatay agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü. % 1’ lik agaroz jel, Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu ile hazırlandı. Agaroz çözünene kadar mikrodalga fırında kontrollü bir şekilde ısıtma işlemi yapıldı. Çözünme işleminden sonra agaroz solüsyonu soğutularak üzerine 1 µL EtBr (Etidyum bromür) eklendi ve elektroforez tablasına dökülerek katı hal oluşuncaya kadar beklendi. Katı hal alan agaroz jel, elektroforez

tankına kuyucuklar RNA'nın '- den +' ya yürüyebilmesi için elektroforezin (-) kutbuna doğru yerleştirildi. Elektroforez tankı RNA'yı yürütmek için 1 X TAE yürütme tamponuyla dolduruldu. 3 µL RNA örneği, 5 µL steril su ve 2 µl yürütme boyası ile muamele edilerek mikropipet ile jelde bulunan kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlandı ve 90 volt, maksimum 500 mA'de 45 dakika boyunca yürütüldü. Yürütme bitince jel UV transilluminatörde görüntülenip 'DNR LightBis ProImage Analysis System' (DNR BioImaging System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazında fotoğraflandı.

2.2.7 cDNA sentezi

Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları nanodrop (MaestroNano) cihazında ölçüldü cDNA sentezi 'Easy Script Plus cDNA sentez kiti' ile oligo d(T) primeri ve Ters Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. cDNA sentez karışım prosedürü Tablo 2'de verildi.

Tablo 2:cDNA sentez karışımı

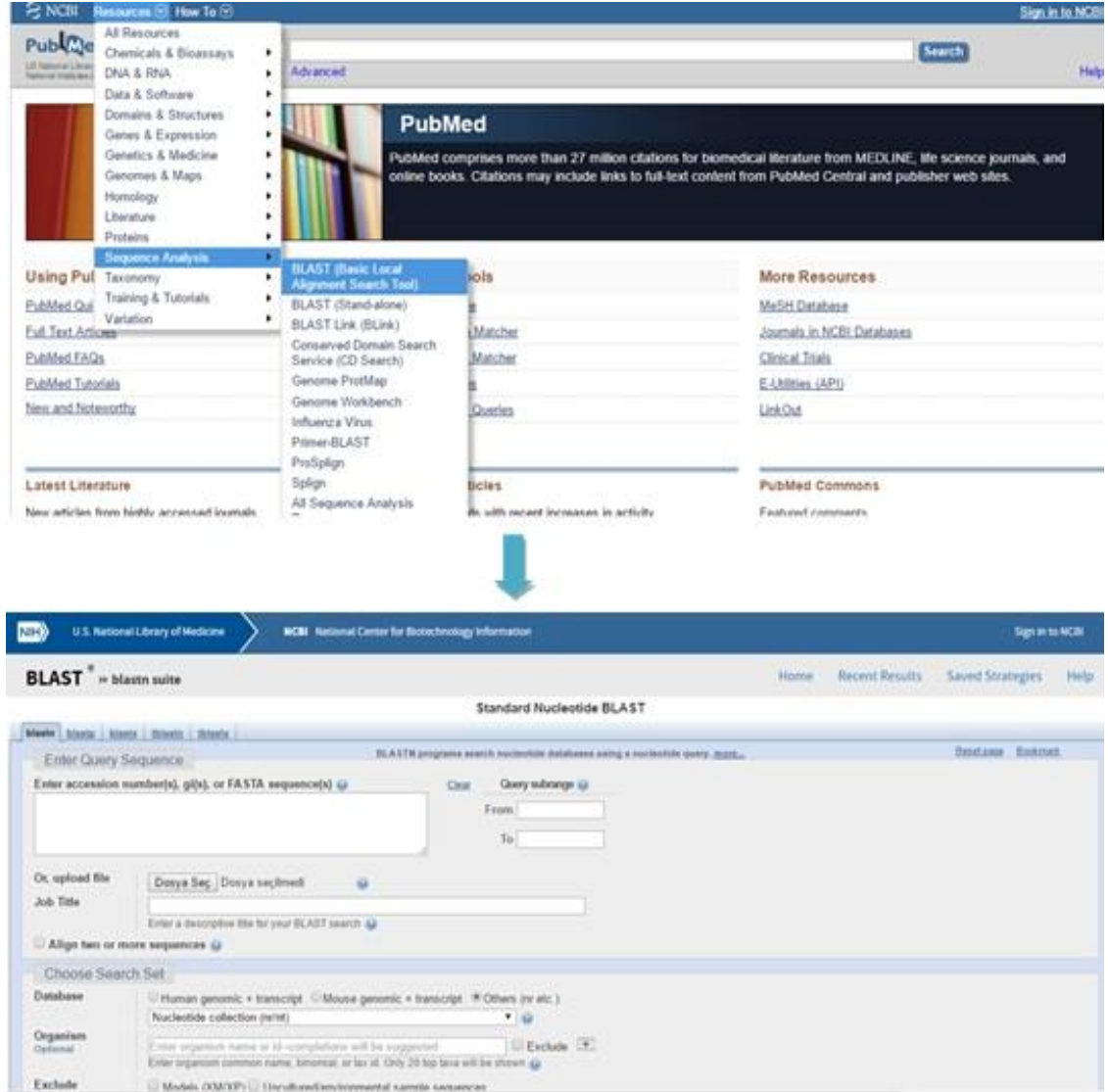
	Hacim	Son konsantrasyon
Total RNA	Değişken	2ug
Oligo (dT) (10µM)	1 µl	0,5 µM
dNTP Karışımı (10mM)	1 µl	500 µM
RNAaz içermeyen su	Değişken	-
5X RT tamponu	4 µl	1X
Ribonükleaz inhibitörü(40U/µl)	0,5 µl	20 U/rxn
Easyscript plus RTase (200U/µL)	1 µl	200 U/rxn
Son Hacim	20 µl	

Bir PZR tüpü içerisinde 2,5 µg total RNA kit içerisindeki oligo d(T) primerleri (1µl), dNTP çözeltisi (1µl) ve RNAz içermeyen su (bu aşamada son hacim 14,5 µl olacak şekilde eklendi) ile karıştırılarak 65°C'de 5 dakika ön işleme tabi tutuldu. Ardından bu karışım yine kit içeriğinde yer alan reaksiyon tamponu (4 µl), RNAz inhibitörü (0,5 µl) ve 'EasyScript RTase' enzimi (1 µl) ile birleştirildi. Böylece bir tüpteki son hacim 20 µl olur. Karışım hazırlandıktan sonra cDNA sentezi

için 50°C’de 1 saat inkübe edildi ve süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85°C’de 5 dakika bekletildi. Sentezlenen cDNA’lar, PZR yapmak üzere -80°C muhafaza edildi.

2.2.8 Primer Tasarımı

Makalelerden dizileri saptanan *NF-κB* ve AHR genleri Pubmed’in nükleotit blast bölümünde taranıp erişim numaraları belirlendi. Güvenirliliği artırmak için pubmed’in primer blast bölümünde erişim numaraları ile uygun organizma seçilip tarandı. Tm (erime noktası) sıcaklıkları birbirine yakın seçildi. Yanlış eşleşme yapıp yapmadığına, GC oranının % 50 üzerinde olmasına dikkat edildi (Şekil 9).



Şekil 10:Primer Tasarımı Aşamaları

Seçilen primerlerin en fazla 3000 bp büyüklüğünde olması sağlandı. Yanlış yapmamak için Pubmed' in primer blast bölümü tekrar açılıp forward ve revers primer yazıldı, organizma seçildi ve doğru gen bölgesi olup olmadığı kontrol edildi.

2.2.9 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Literatür ve veri bankaları taranarak *NF-κB* ve AHR genleri ile ilişkili GenBank/EMBL veri bankaları taranarak seçilen genler için uygun primer dizileri saptandı. Primerlerin isimleri, bu primerlerin nükleotid dizileri, uzunlukları ve yapışma sıcaklıkları Tablo 3' de verildi. Belirlenen genlerin PZR yöntemi ile kantite edildi. Bu amaçla genler için ayrı ayrı polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklıkları optimize edildi (Şekil x). Tüm genler için kopya sayısı döngü sayısı ilişkisinin doğrusal olması için döngü sayısı 40 olarak belirlendi. PZR koşulları Tablo 4 'de; sıcaklık, döngü ve zamanları ise Tablo 5' de verildi.

PZR ürünlerinin 10 µl' si % 1' lik agaroz jelde 90 Volt, maksimum 500 mA'de 45 dakika süresince yürütüldü ve yürütme bitince jel UV transilluminatörde EtBr boyamayla bantlar gözlemlenip DNR LightBis ProImage Analysis System (DNR BioImaging System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazında fotoğraflandı.

Tablo 3: *NF-κB* ve AHR genlerinin sekans ve uzunlukları

Gen	İleri Primer ve Geri Primerleri (5'>3')	Uzunluk (bç)	TM
<i>NF-κB-F</i>	AAAC GCGATCGC GAC ATG GTG GTC GGC TTC GC	32	65
<i>NF-κB-R</i>	AAAC GTTTAAAC CTG ACT GTA CCC CCA GAG ACC TCA T	37	69
<i>AHR-F</i>	AAAC GCGATCGC ATG AAC AGC AGC AGC GCC AAC ATC ACC	39	71
<i>AHR-R</i>	AAAC GTTTAAAC GAT ACA TCG ACA CGG CCC CAG CAT AAC AT	41	72

Tablo 4.*NF-κB* ve AHR genlerinin sekans ve uzunlukları

PZR	Reaksiyon Karışımı
10X PCR Tamponu	2 µl
MgCl ₂	1,5 µl
dNTP	1 µl
cDNA	5 µl
F primer	1 µl
R primer	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,5 µl
dH ₂ O	11 µl

Tablo 5. PZR sıcaklık, döngü ve zamanları

	PCR Koşulları
Ön Denatürasyon	94°C 5 dakika
Denatürasyon	94°C 1 dakika
Yapışma	X°C 1 dakika
Uzama	72°C 1 dakika
Döngü Sayısı	40 öngü

2.2.10 PZR Sıcaklık Optimizasyon Çalışmaları

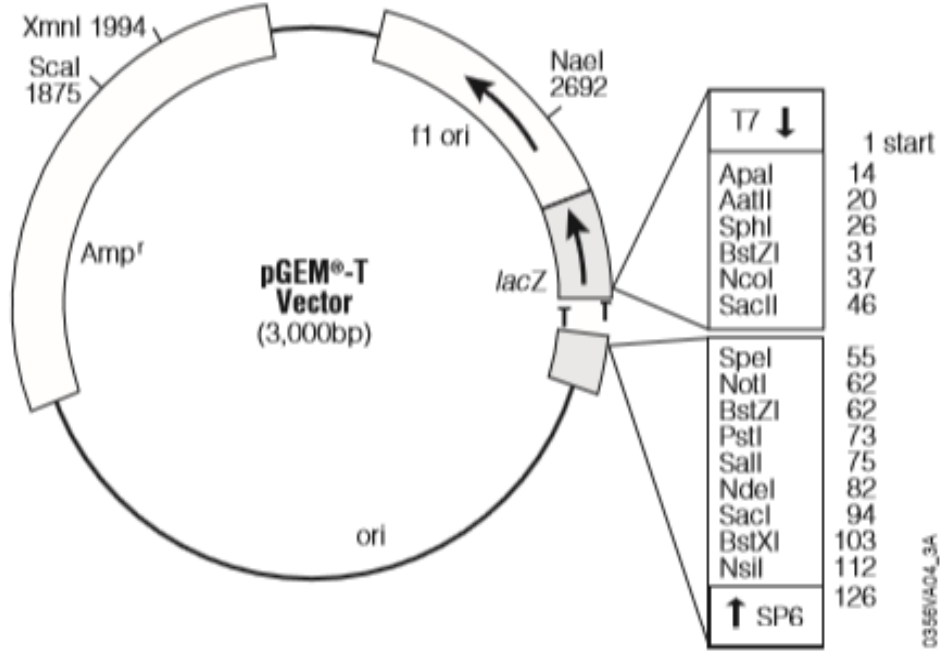
RNA optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra gerçek zamanlı PZR çalışmalarında kullanılacak olan her gen için sıcaklık, cDNA miktarı ve primer konsantrasyonu çalışmaları yapıldı. Öncelikle her genin çalıştığı sıcaklık belirlendi sonrasında belirlenen sıcaklıkta cDNA ve primer konsantrasyonu denemeleri yapıldı. Bununla ilgili çalışmalara ait sonuçlar bölümünde verilmiştir. Her gen için gradient PZR yapılmış ve en iyi çalıştığı sıcaklık belirlendi. Örneğin *NF-κB* ve AHR genleri için 45°C - 70°C arası sıcaklıklar denendi .

2.2.11 PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Saflaştırma işlemi, “Wizard sv Jel ve PZR Saflaştırma Kiti” kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrusunda gerçekleştirildi. PZR örnekleri %1 düşük sıcaklıkta eriyen agaroz jelde 1X TAE tamponda yürütüldü ve DNA görüntüldü. Görüntülenen DNA UV lambası altında jeli 30 saniyeden fazla açık tutulmadan kesildi. Jeli kestikten sonra darası tartılan ependorfa jel parçası aktarıldı ve eklendikten sonra ependorf tartılarak darası çıkarıldı. Her 10mg jel parçası için 10µl “Membrane Binding solution (guanidine isothiocyanate)” eklendi. Vorteksledi ve jel çözülene kadar 10 dakika 65°C inkübe edildi, her iki dakikada bir çözünmeyi hızlandırmak için vorteksleme işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemden sonra PZR amplifikasyonuna eşit hacimde “Membrane Binding solution” eklendi. Solüsyon toplama tüp içindeki “SV mikrocolumn’ a” eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 16.000 xg’ de 1dakika santrifüj edildikten sonra alta geçen kısım döküldü. 700µl “membrane wash solution” eklendi, 16.000 xg’ de 1dakika santrifüj edildi ve alta geçen kısım döküldü. 500µl membran yıkama solüsyonu eklendi 16.000 xg’ de 5dakika santrifüj edilerek, alta geçen kısım dökülür. Boş toplama tüp 1dakika kapağı kapalı santrifüj edildi ve etanolün buharlaşması sağlandı. Minikolon temiz 1.5 ependorfa alınarak 50µl nükleaz içermeyen su eklendi. 1dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 16.000 xg’ de 1dakika santrifüj edilerek işlem tamamlandı. Saflaştırılmış PZR örnekleri + 4 °C saklandı.

2.2.12 PCR Ürünlerinin Klonlanması

Ligasyon, “pGEM-T ve pGEM-T Easy Vektör Kit” kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapıldı (Tablo 6). “pGEM-T ve pGEM-T Easy Vektör Kit” sistemi ile *NF-kB* ve *AHR* genleri ile elde edilen PZR ürünleri kullanılarak, PZR ürünlerinin ligasyon etkinliği artırılması amaçlanmıştır. pGEM-T ve pGEM-T Kolay Vektör Sistemleri, PZR ürünlerinin klonlanması için uygun sistemlerdir. “pGEM-T ve pGEM-T Easy Vektör” her iki uçta bir 3’ Timidin içeren doğrulaştırılmış bir vektördür (Şekil 9). PZR ürünlerin hızlı ve uygun şekilde klonlanmasını sağlarlar. pGEM-T Vektör 3000 bp’dir (Şekil 11).



Şekil 11:pGEM-T Vektör Harita ve Sıra Referans Noktaları

pGEM-T ve pGEM-T Kolay Vektör ve kontrol PZR tüpleri kısa santrifüj edildi. Ligasyon reaksiyonu Tablo 6’da verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 6:pGEM-t Vektör Ligasyon Reaksiyonu

Reaksiyon Bileşenleri	Standart Reaksiyon	Pozitif Kontrol	Arka plan Kontrol
2XLigasyon Tamponu	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM-T Vektör (50ng)	1 µl	1 µl	1 µl
PZR ürünü	2 µl	-	-
Kontrol Giriş DNA'sı	-	2 µl	-
T4 DNA Ligaz	1 µl	1 µl	1 µl
dH ₂ O	1 µl	1 µl	3 µl

pGEM-Tvektör Sistemleri, PZR ürünlerinin ligasyonu için 2X Ligasyon Tamponunu içerir. Bu tamponu kullanan reaksiyonlar, 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilebilir. Kuluçka dönemi, dönüşümden sonra koloni sayısını arttırmak için kullanılmıştır.

2.2.13 Transformasyon

Ligasyon, “One Shot TOP10 Kompotent Hücreler Kiti ” kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrusunda yapıldı. İlk olarak Luria broth (LB) Agar besiyeripetrilere hazırlandı (Tablo 7).

Tablo 7:Luria broth (LB) / Ampisilin (Antibiyotik) / IPTG (İzopropiltiogalaktozid) /X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil-β-D-galaktopiranosid) Besiyeri Hazırlanışı

LB/Ampisilin/IPGT/X-gal Katman	
NaCl	0,5 gr
Trypton	0,5 gr
Agar	0,75 gr
Maya ekstraktı	0,25 gr
50 MmL dH ₂ O Eklenir ve Otoklavlanır	
Ampisilin	0,1mg/mL

180°C’ de 3 saat bekletilen steril petrilerin içine hazırlanan LBbesiyerinden~10-15 mL olacak şekilde eklenir. Petriler ters çevirilir etüvde 37 ° C’ de 12 saati geçmeyecek şekilde bekletilir üreme yoksa parafilmlemlenip saklanır.

Petriler etüvden çıkartılır ve oda sıcaklığında gelince transformasyon işlemine başlanır. İlk olarak DH5-Alpha (DH5-a) kompotent hücresi buz üzerine alınır buz üzerinde yaklaşık 5 dakikada eritilip ve hafifçe karışması sağlandı, tüm işlemler buz üzerinde gerçekleşir. 2 µl ligasyon reaksiyonunu içeren tüplere 50 µl DH5-a kompotent hücre eklenir, kontrol DNA’ya 100 µl DH5-a kompotent hücre eklenir ve nazikçe karıştırıldıktan sonra 20 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Isı şoku yapıldıktan sonra 42°C’de 50 dakika bekletilip, ardından buz üzerine alınarak 2 dakika bekletildi. Reaksiyona oda sıcaklığındaki SOC besiyerinden 950 µl, kontrol DNA’ ya 900 µl eklenip. Bir buçuk saat 37°C’ de 150 rpm’de karıştırıldı ve LB/ampicilin/IPTG/X-GAL petrilere 100 µl reaksiyon 12 bölgeye ayrılan LB katmanlara kürdan yardımıyla çizgi ekim yapılarak tek koloni düşürülmeye çalışılmıştır. 37°C’ de bir gece etüvde inkübe edilerek, beyaz tekli koloniler seçilerek tarama PZR yapılmıştır ve tüm PZR koşulları Tablo 4 ’de; sıcaklık, döngü ve zamanları ise Tablo 5’ de verildi.

Tarama PZR’ ında *NF-κB* ve AHR genlerinin % 1 lik agaroz jel elektrofezinde varlığı belirlendikten sonra LB sıvı hazırlanarak (Tablo 8) 5 mL LB sıvı besiyerine ekildi ve çalkamalı inkübatöre alınıp 180 rpm ’de 37°C tüm gece inkübe edildi. Plazmit izolasyonu aşamasına geçildi.

Tablo 8:Luria broth (LB) / Ampisilin (Antibiyotik) / IPTG (İzopropiltiogalaktozid) /X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil- β -D-galaktopiranosid) Sıvı-Besiyeri Hazırlanışı

LB/Ampisilin/IPGT/X-gal Sıvı	
NaCl	0,5 gr
Tripton	0,5 gr
Maya ekstraktı	0,25 gr
50 MmL dH ₂ O Eklenir ve Otoklavlanır	
Ampisilin	0,1mg/mL

2.2.14 Plazmit İzolasyonu

Tranformasyondan sonra 'PureLink Quick Plasmid Miniprep' kit kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrusunda plazmit izolasyonu yapıldı. Luria broth (LB) /Ampisilin (Antibiyotik) / IPTG (İzopropiltiogalaktozid) /X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil- β -D-galaktopiranosid) sıvı besi ortamı içerisinde çoğaltılmış olan *NF- κ B*+pGEM-T ve AHR+pGEM-T plazmitleri izole edildi. Transforme olan kolonilerden 5 ml LB besi ortamı inoküle edilip, bütün gece inkübe edilen kültürler 8000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan supernatant pelletten uzaklaştırılıp, 15mL' lik falkon tüp üzerine 250 μ l RNase A içeren resüpsansiyon tamponu eklendi. Karıştırılarak homojen hale getirilip üzerine 250 μ l parçalanma tamponu eklendikten sonra, oda sıcaklığında 4 dakika inkübe edilip 350 μ l çöktürme tamponu eklendi. 12.000 xg' de 10 dakika santrifüj edilip, oluşan süpernatant alınarak dönüş sütununa konularak dönüş sütunu santrifüj edilip, yıkama solüsyonu ile kolon yıkanıp, santrifüj edildi. Dönüş sütununa elüsyon tamponu eklenerek. Alta geçen kısım toplanıp, elde edilen plazmid DNA' lar, yürütme bitince jel UV transilluminatörde görüntülenip 'DNR LightBis ProImage Analysis System' (DNR BioImaging System Ltd. Jerusalem, Israel) cihazında fotoğraflandı. Elde edilen RNA' ların konsantrasyonları nanodrop (MaestroNano) cihazında ölçüldü. Elde edilen *NF- κ B* ve AHR plazmit DNA' dan .PZR yapılmıştır, PZR koşulları Tablo 9' da; sıcaklık, döngü ve zamanları ise Tablo 10' da bulunmaktadır.

Tablo 9:PZR koşulları

PZR	Reaksiyon Karışımı
10X PCR Tamponu	2 ml
MgCl ₂	1,5 ml
dNTP	1 ml
Plazmit DNA	5 ml
F primer	1 ml
R primer	1 ml
Taq DNA Polimeraz	0,5 ml
dH ₂ O	11 ml

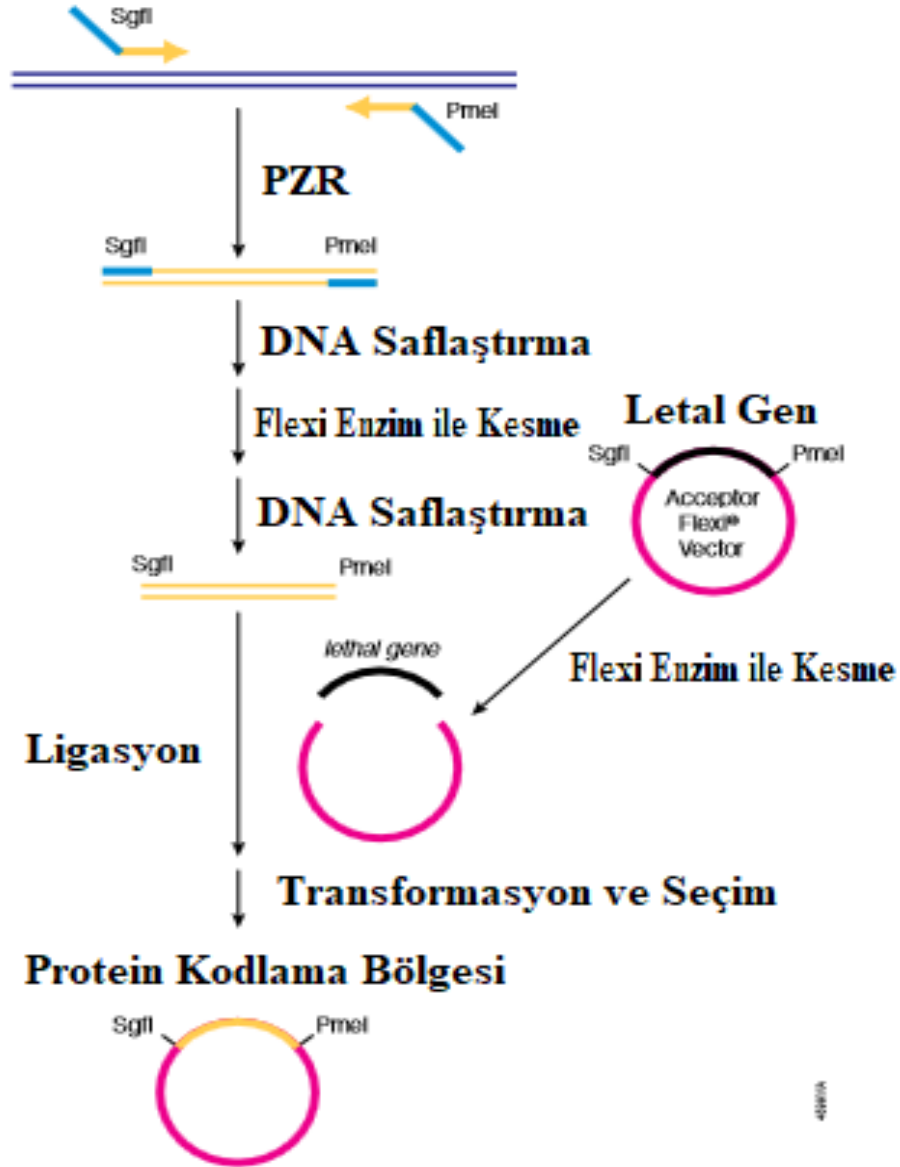
Tablo 10. PZR sıcaklık, döngü ve zamanları

	PCR Koşulları
Ön Denatürasyon	94°C 5 dakika
Denatürasyon	94°C 1 dakika
Yapışma	X°C 1 dakika
Uzama	72°C 1 dakika
Döngü Sayısı	40 Döngü

2.2.15 Giriş Klonları Aktarım

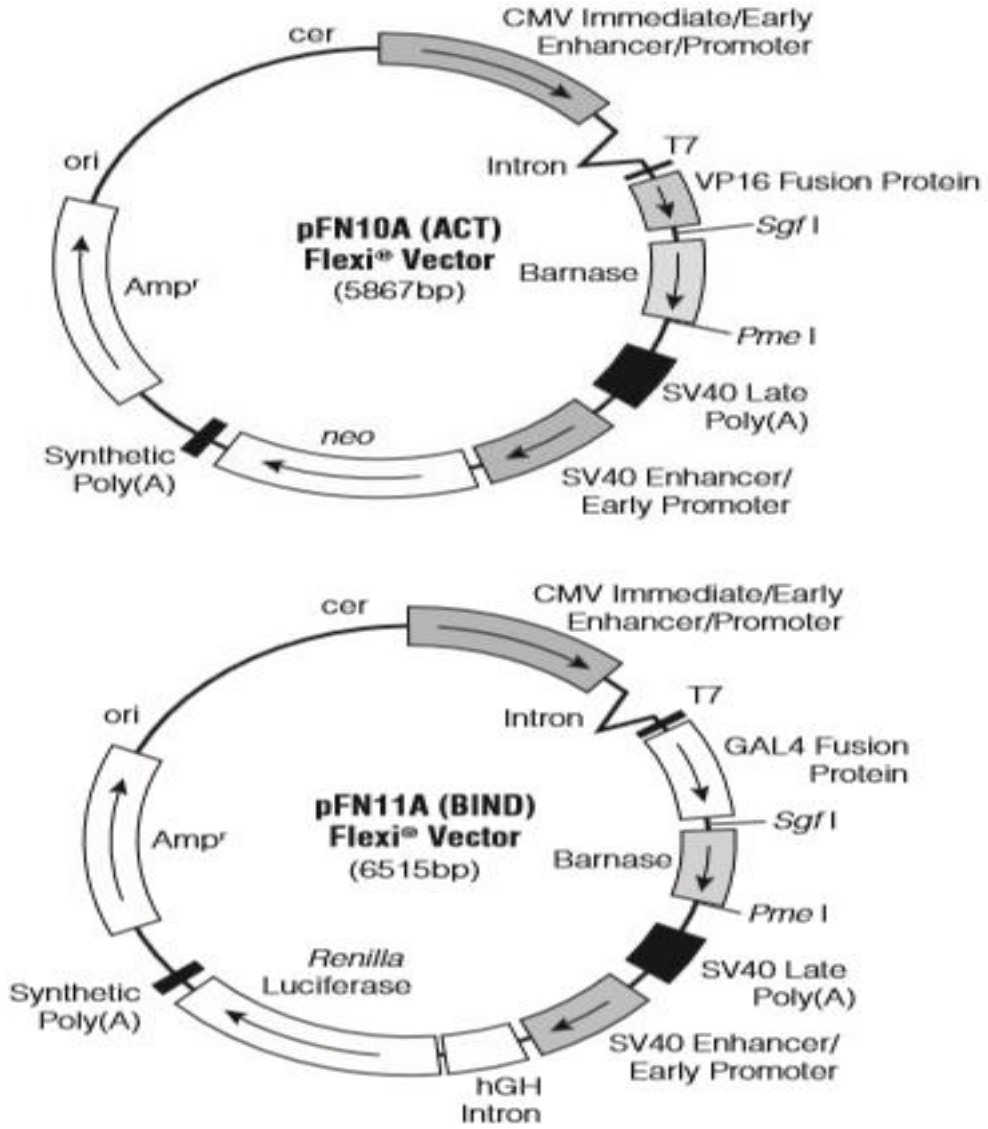
'Flexi Vector Systems' kit kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda giriş klonları yapılmıştır. Flexi Vektör Sistemleri, farklı fonksiyonel özelliklere sahip vektörler arasındaki protein kodlayan bölgelerin mekik klonlama

yükünü azaltarak, protein fonksiyonunun çoklu yüzeylerinin çalışmasını kolaylaştırır. Protein kodlayan bölgeniz bir Flexi Vektöre klonlandıktan sonra, benzerini yapmadan kolaylıkla diğer birçok Flexi Vektöre yerleştirebilir. PZR primerleri, SgfI ve PmeI bölgelerini protein kodlama bölgesine eklemek için tasarlanmıştır. Amplifikasyondan sonra, PZR ürünü, DNA polimerazı ve primerlerini çıkarmak için saflaştırılır ve SgfI ve PmeI ile kesilir. Kısıtlama enzimleri tarafından salınan küçük oligonükleotitleri çıkarmak için DNA tekrar saflaştırılır. Kesilen PZR ürünü, SgfI ve PmeI ile sindirilmiş bir alıcı Flexi Vektör'e bağlanır (Şekil 13). Dönüşümün ardından hücreler, kullanılan belirli Flexi vektöre için uygun antibiyotik ile seçilir (Şekil 12).



Şekil 12: Bir protein kodlama bölgesinin Flexi Vektörlerine Klonlanması

5X Flexi parçalama tamponu ve acceptor flexi vektör buz üzerinde eritildiğinden kısaca vorteks edildi. Elde edilen *NF-κB* ve AHR'nin plazmit DNA yapılan PZR numuneleri kullanılarak reaksiyon başlatılmıştır. Akseptör vektörler pFN10A (ACT) ve pFN10A (BIND)'dır (Şekil 13). PCR ürünleri giriş klonu için koşullar Tablo 11'deki gibidir. Akseptör flexi vektör için koşullar Tablo 12'deki gibidir.



Şekil 13:pFN10A (ACT) ve pFN10A (BIND) Harita ve Sıra Referans Noktaları

Tablo 11:PZR ürünleri Giriş Klonu Koşulları

Reaksiyon Bileşenleri	Reaksiyon Karışımı
5X Flexi Parçalama Tamponu	4 µl
PZR Ürünü (500 ng)	Değişken
Flexi Enzyme Blend(Sgf1&Pme1)	4 µl
RNAaz içermeyen su	Değişken (Total hacim 20 µl)

Tablo 12:Akseptör flexi Giriş Klonu Koşulları

Reaksiyon Bileşenleri	Reaksiyon Karışımı
RNAaz içermeyen su	12 µl
5X Flexi Digest Buffer	4 µl
Acceptor flexi vektör(200 ng)	2 µl
Flexi Enzyme Blend(Sgf1&Pme1)	2 µl

Yukarıdaki tablolara göre bileşenler hazırlandıktan sonra 37 °C’ de inkübe edildi. Ardından retriksiyon enzimini inaktive edebilmek için 65 °C’ de 20 dakika inkübe edildi. Tüm gece 4 °C de bekletilen ‘ligation’ tüpünden alınarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda ‘component hücre’ olan DH5-a’ ya transformasyon yapıldı. Ardından LB besiyerlerine 150 µl olacak şekilde drigalski özesi ile yayıldı. 37 °C’ de etüvde tüm gece inkübe edildi. Oluşan beyaz pozitif tek kolonilerden PZR taraması yapıldı aynı anda hem PZR hem de LB sıvı stok alındı. PZR sonrası istenen bölgede görüntülenen ürünler için ekilen plakalardan sıvıya ekim yapılarak plazmid DNA elde edildi.

2.2.16 Transfeksiyon

Transfeksiyon işlemi yapılmadan bir gün önce hücreler 96 kuyulu hücre kültür kaplarına ekildi. Deneyin yapıldığı gün ‘‘Fugene HD tranfeksiyon reaktifi’’ oda sıcaklığına çıkarıldı ve kısa bir spin yapıldı.

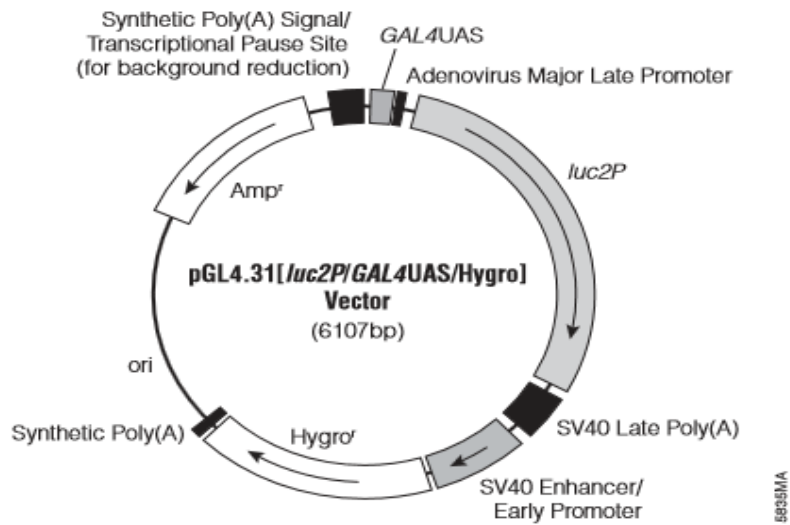
HepG2-HBX hücreleri 96 kuyuluk hücre kültür kaplarına ekildikten sonra hücre kültür kabını yaklaşık % 75’lik alanını kaplayacak şekilde büyümesi beklendi. 96 kuyuluk hücre kültür kaplarına 90 µl besiyerinde 10⁴ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin yapışması için CO₂ inkübatöründe 37°C’ de 24 saat bekletildi. Kontrol grubu ve diğer kombinasyonlar (Tablo 13) üçer tekrar halinde, iki tekrar deneyi olarak yapıldı. DNA transfeksiyon karışımı hazırlandı. Bunun için 10 µl DMEM 0,2 µg pGL4.31[*luc2P/Gal4UAS/Hygro*] plazmit DNA ile 15 dakika inkübe edildi. 2.1 µl Fugene HD reaktifi eklendi. DNA transfeksiyon karışımı bir gün önce ekilen hücrelere 10 µl uygulandı, 37°C’ de 18 saat inkübe edildi.

Tablo 13:Fugune HD Tranfeksiyon Reaktifi oranları

DNA için Fugun HD Tranfeksiyon Reaktifi Oranı						
	4:1	3:5.1	3:1	2:5:1	2:1	1:5:1
Total Hacim	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
DNA Miktarı	2 μ g	2 μ g	2 μ g	2 μ g	2 μ g	2 μ g
Fugune HD tranfeksiyon reaktifİ hacmi	8 μ l	7 μ l	6 μ l	5 μ l	4 μ l	3 μ l

2.2.17 Lusiferaz Aktivite Ölçümü

Lusiferaz aktivitesini ölçmek için Promega' nın 'Dual-Glo Lusiferaz' reaktifi kullanıldı. Her bir kuyu için 75 μ l besiyeri ve 75 μ l 'Dual-Glo Lusiferaz' reaktifi karıştırılarak Renilla geni içeren pGL4.31[*luc2P*/*Gal4UAS*/Hygro] pGL4.31(Şekil 14) plazmiti transfekte edilen hücelere eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. 'Synergy HTX' luminometre (BioTek) kullanılarak 'Firefly lusiferaz' aktivitesi ölçüldü. 75 μ l besiyeri ve 75 μ l 'Dual-Glo Stop & Glo Lusiferaz' reaktifi karıştırılarak hücelere uygulandı. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. 'Synergy HTX' luminometre (BioTek) kullanılarak 'Renilla lusiferaz' aktivitesi ölçüldü.



Şekil 14:pGL4.31[*luc2P*/*Gal4UAS*/Hygro] vektör haritası

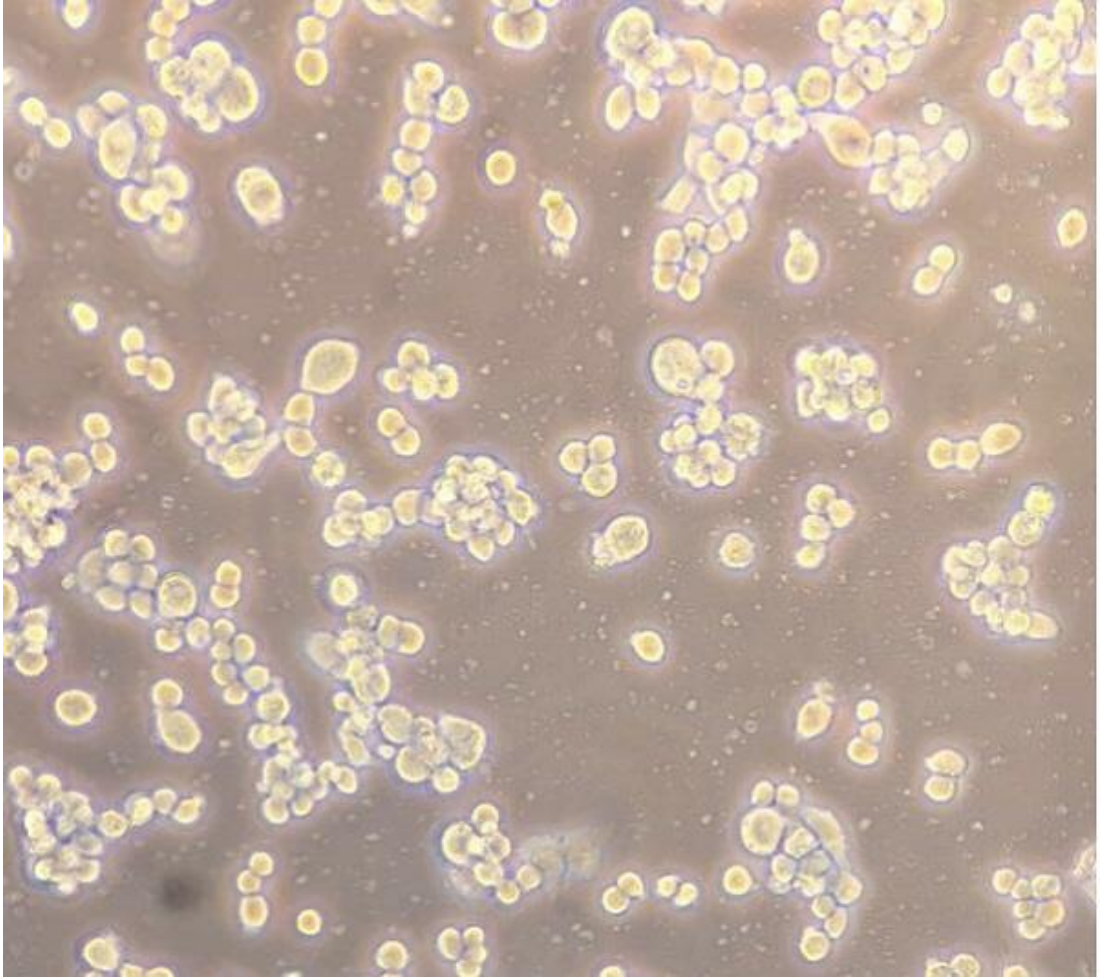
2.2.18 İstatiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar SPSS yazılımı (SPSS Ver18 Science, Chicago, IL) kullanılarak analiz edildi. Grupları karşılaştırmak için Student's t-testi ve Wilcoxon testi uygulandı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi. 0.05'in altındaki P değerleri anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

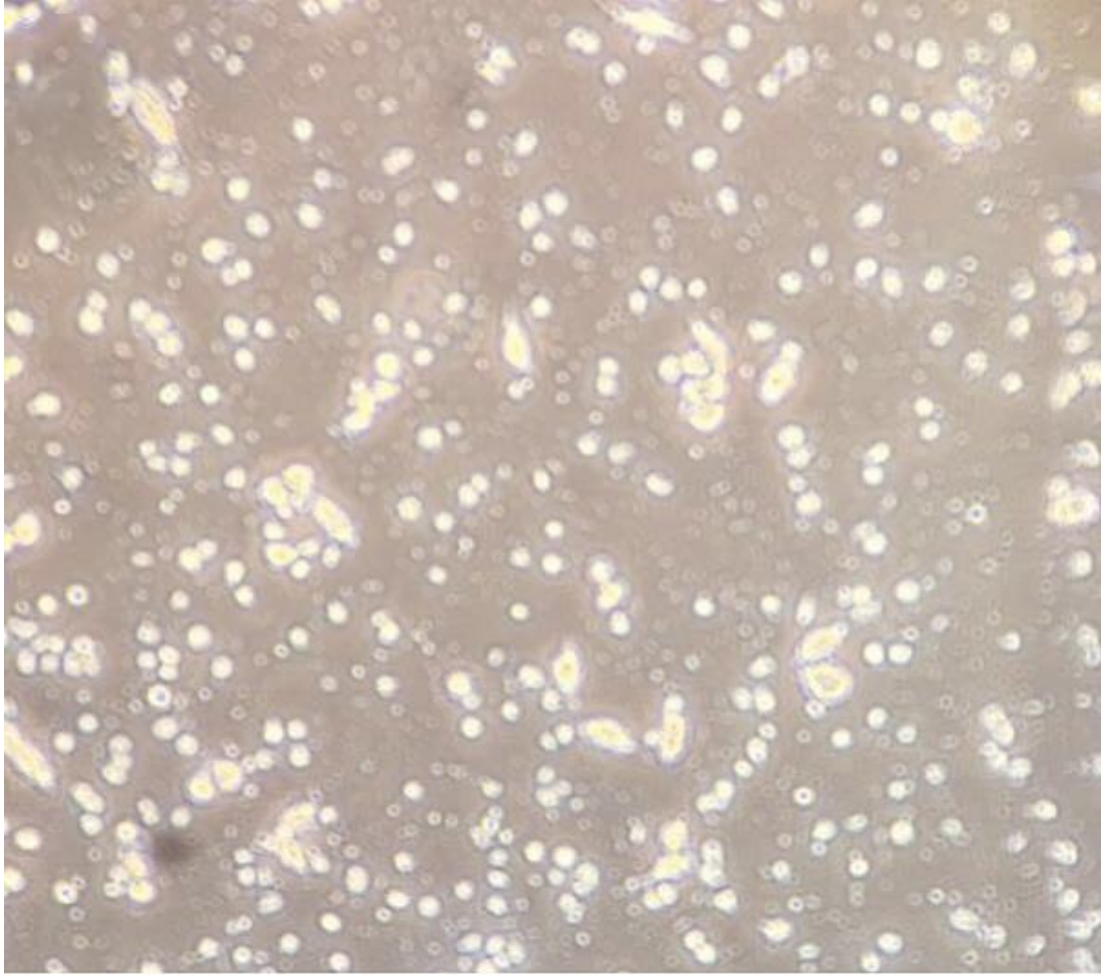
3.1 Hücrelerin Büyütülmesi

Çalışma boyunca kullanılan HBX virüsü ile enfekte edilen HepG2-HBX hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü Şekil 15 ve 16 'de gösterilmiştir.



Şekil 15:HBX hücrelerinin ışık mikroskobunda görüntüsü.

Hepatit B X virüsü ile enfekte edilen karaciğer kanseri (HepG2) hücreleri HBX (HepG2-HBX hücresi) hücreleri olarak adlandırıldı. Işık mikroskobunda 4X büyütme gücü ile görüntülenmiştir.

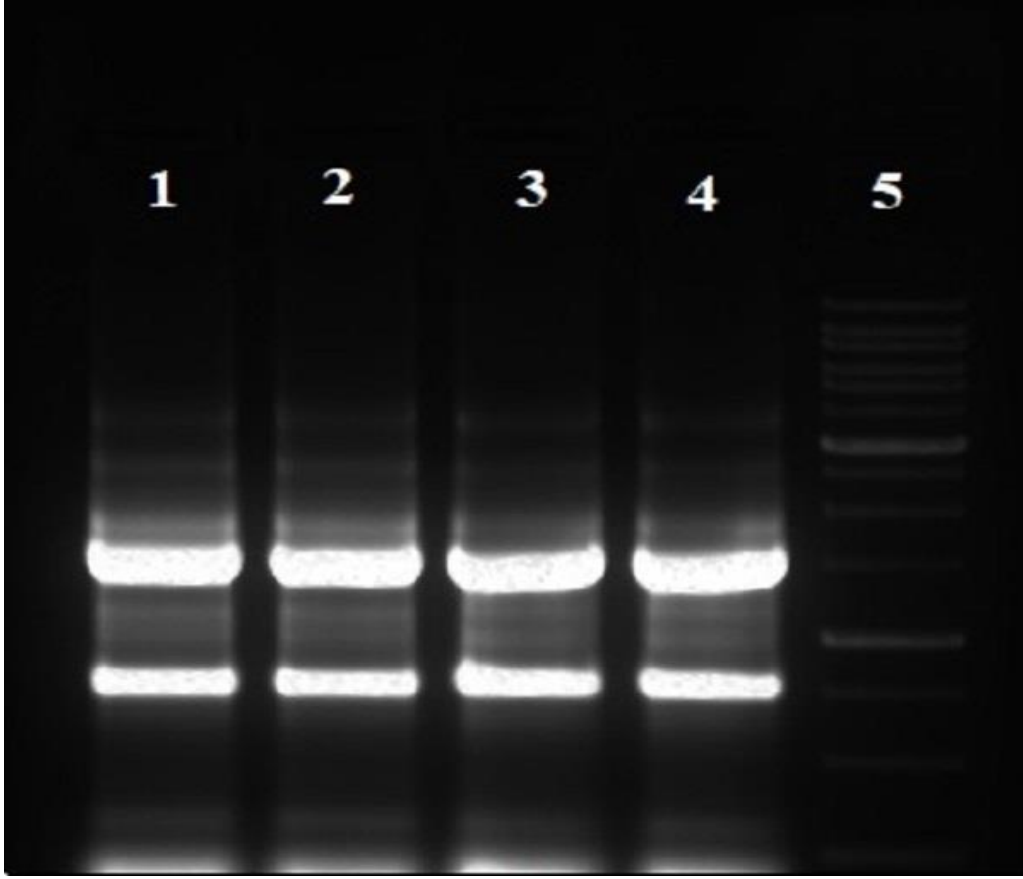


Şekil 16:HBX hücrelerinin ışık mikroskopunda görüntüsü.

HepatitB X virüsü ile enfekte edilen karaciğer kanseri (HepG2) hücreleri HBX (HepG2-HBX hücresi) hücreleri olarak adlandırıldı. Işık mikroskopunda 4X büyütme gücü ile görüntülenmiştir.

3.2 RNA İzolasyonu Sonuçları

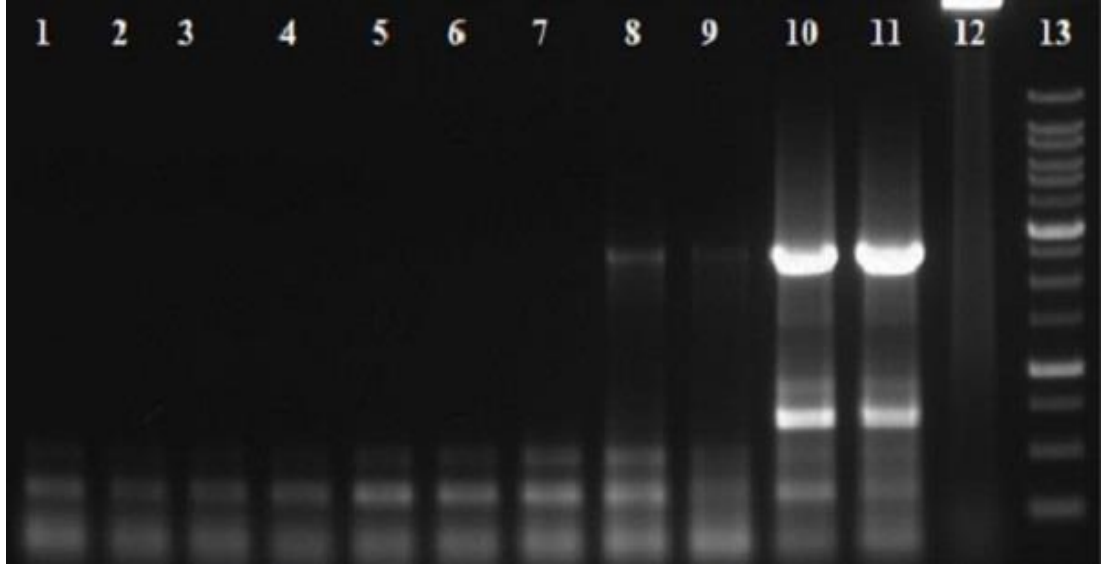
Petrilere 10^6 hücre ekildi ve bir gün inkübasyonun ardından 24 saatin sonunda hücrelerden total RNA izolasyonu ‘QIAGEN RNeasy Plus Mini Kiti’ kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve % 1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. Elde edilen RNA görüntüleri Şekil 17’de verilmiştir.



Şekil 17:HBX hücrelerinden izole edilen RNA'ların % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Elde edilen RNA' lar (3 µl) % 1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. Hat 1: HBX, Hat 2: HBX, Hat 3: HBX, Hat 4: HBX, Hat 5:Promega1 kb DNA izleyici.

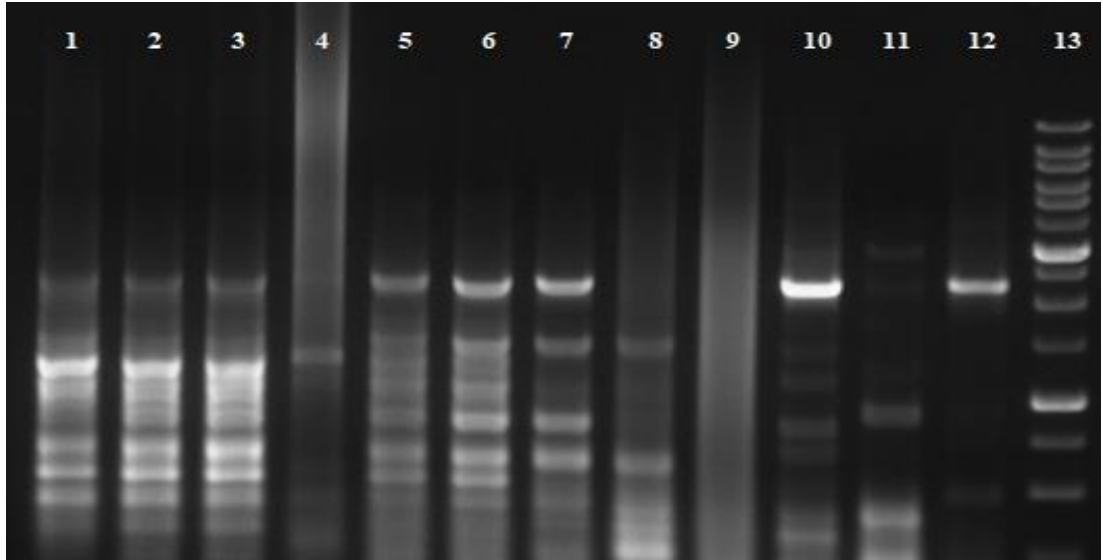
3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR) Sonuçları

Literatür ve veri bankaları taranarak *NF-κB* ve AHR genleri ile ilişkili GenBank/EMBL veri bankaları taranarak seçilen genler için uygun primer dizileri saptandı. Primerlerin isimleri, bu primerlerin nükleotid dizileri, uzunlukları ve yapışma sıcaklıkları Tablo 3'de verildi. Belirlenen genlerin mRNA düzeyleri PZR yöntemi ile kantite edildi. Elde edilen RNA'lardan ve 'ABM EasyScript cDNA' sentez kiti kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre sentezlendi. Sentezlenen cDNA'dan özgün *NF-κB* ve AHR gradient PZR ile primerlerin yapışma sıcaklıkları belirlendi (Şekil 18, 19, 20).

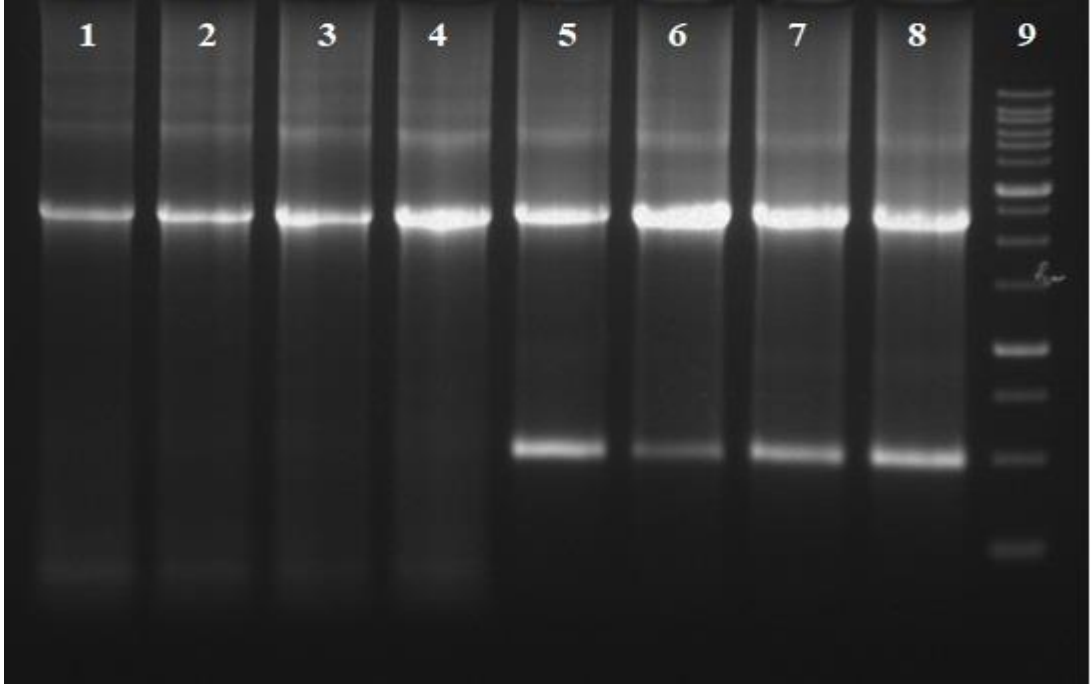


Şekil 18:AHR'nin PZR % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

AHR primeri kullanılarak HBX hücre hattından elde edilen RNA' lar ile elde edilen PZR örnekleri (5 µl) % 1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. Hat 1: AHR PZR 45°C' de, Hat 2: AHR PZR 47.2°C' de, Hat 3: AHR PZR 49.4°C' de, Hat 4: AHR PZR 51.6°C' de, Hat 5: AHR PZR 53.8°C' de, Hat 6: AHR PZR 56°C' de, Hat 7: AHR PZR 58.2°C' de, Hat 8: AHR PZR 60.4°C' de, Hat 9: AHR PZR 62.6°C' de, Hat 10: AHR PZR 64.8°C' de, Hat 11: AHR PZR 67.0°C' de, Hat 12: AHR PZR 70.0°C' de, Hat 13: Promega 1 kb DNA izleyici.



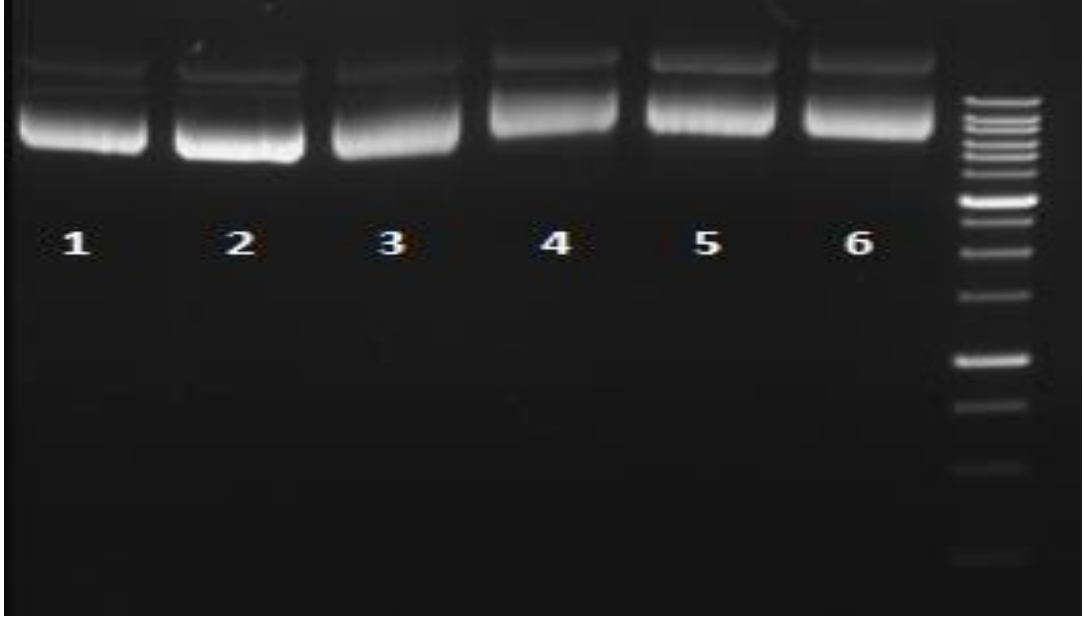
Şekil 19:*NF-κB*' nin PZR % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. *NF-κB* primeri kullanılarak HBX hücre hattından elde edilen RNA' lar ile elde edilen PZR örnekleri (5 µl) % 1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. Hat 1: *NF-κB* PZR 45°C' de, Hat 2: *NF-κB* PZR 47.2°C' de, Hat 3: *NF-κB* PZR 49.4°C' de, Hat 4: *NF-κB* PZR 51.6°C' de, Hat 5: *NF-κB* PZR 53.8°C' de, Hat 6: *NF-κB* PZR 56°C' de, Hat 7: *NF-κB* PZR 58.2°C' de, Hat 8: *NF-κB* PZR 60.4°C' de, Hat 9: *NF-κB* PZR 62.6°C' de, Hat 10: *NF-κB* PZR 64.8°C' de, Hat 11: *NF-κB* PZR 67.0°C' de, Hat 12: *NF-κB* PZR 70.0°C' de, Hat 13: Promega 1 kb DNA izleyici.



Şekil 20: *NF-κB* ve AHR' nin PZR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. *NF-κB* ve AHR primerleri kullanılarak HBX hücre hattından elde edilen RNA' lardanelde edilen PZR örnekleri (5 µl) % 1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. Hat 1-4: *NF-κB* PZR, Hat 5-8: AHR PZR, Hat 9: Promega 1 kb DNA izleyici.

3.4 PZR Ürünlerinin Ligasyonunun Eldesi

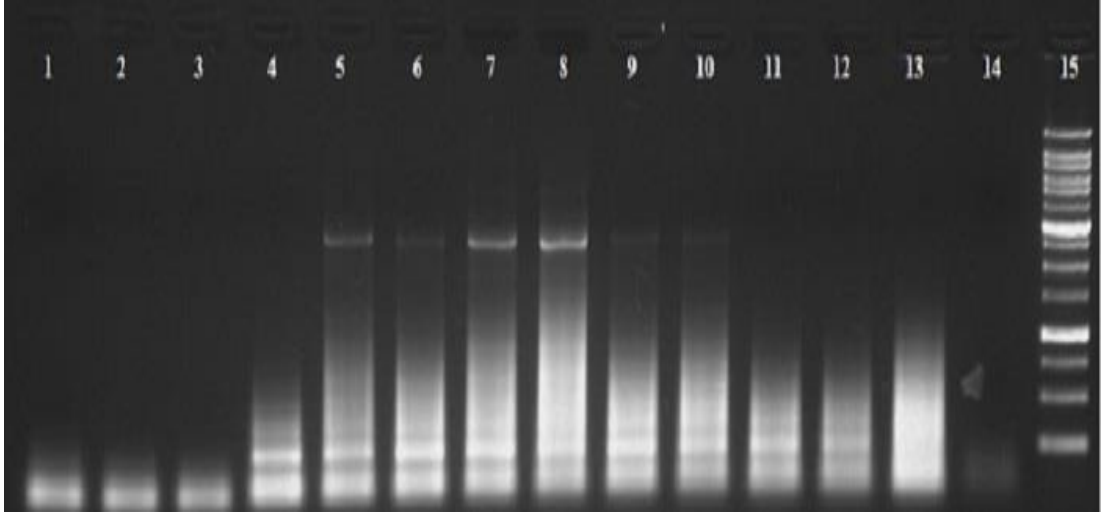
Ligasyon, “pGEM-T ve pGEM-T Easy Vektör Kit” kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrusunda yapıldı (Tablo 6). “pGEM-T ve pGEM-T Easy Vektör Kit” sistemi ile *NF-κB* ve AHR genleri ile elde edilen PCR ürünleri kullanılarak, PCR ürünlerinin ligasyon etkinliği artırılması amaçlanmıştır (Şekil 21). pGEM-T+*NF-κB* ve pGEM-T+AHR pGEM-T Easy Vektör 3000 baz çifti (bp)' dir.



Şekil 21:pGEM-T vektör +*NF-κB* ve pGEM-T vektör + AHR PZR % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. *NF-κB* AHR primeri kullanılarak vektör sistemi ile birleşmesiyle ilgili elde edilen PZR örnekleri (5 µl) % 1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. Hat 1-3 pGEM-T vektör + *NF-κB* ve pGEM-T vektör + AHR, Hat 7: Promega 1 kb DNA izleyici.

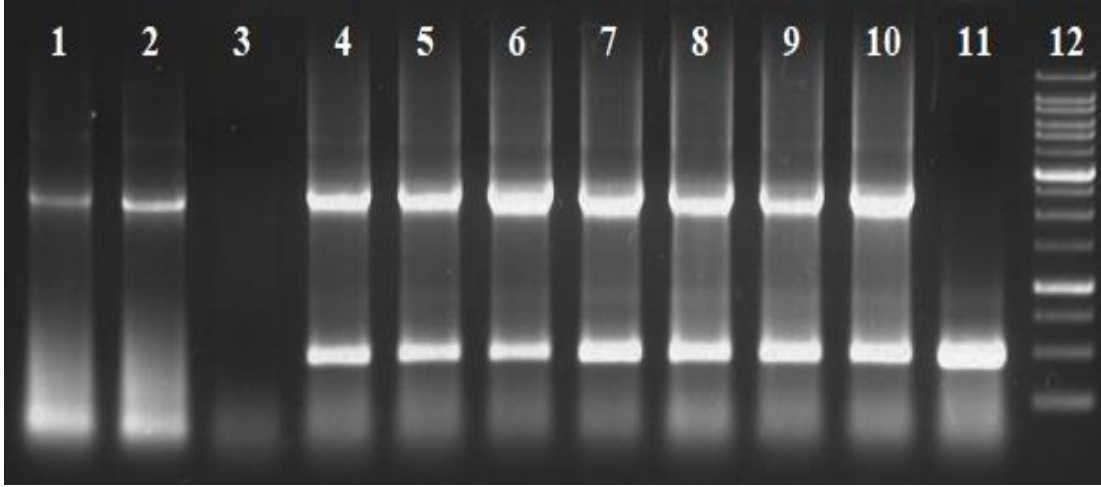
3.5 Transformasyon Sonuçları

Elde edilen PZR ürünleri 'Wizard Plus SV Miniprep' sistem ile saflaştırıldı. Transformasyon 'Flexi Vector Systems' kit kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrusunda giriş klonları yapılmıştır. Sonrasında LB Agar besiyeri hazırlandı Ligasyon , "One Shot TOP10 Kompetent Hücreler Kiti " kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrusunda yapıldı. DH5-a komponent hücrelerine transforme edildi ve LB platelere drigalski özesi ile yayılarak 37 ° C' de bütün gece inkübe edildi. Oluşan kolonilerden tarama PZR yapılarak varlığı tespit edildi. Şekil 22 ve 23 'de gösterilmiştir.



Şekil 22:Tarama PZR Görüntüsü

Hat 1-14: pFN11A(BIND) + *NF-κB* DH5-a komponent hücrelerinden tarama PZR 'nin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. *NF-κB* primeri kullanılarak vektör sistemi ile birleşmesiyle ilgili elde edilen PZR örnekleri (5 µl) % 1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. Hat 15: Promega 1 kb DNA izleyici.

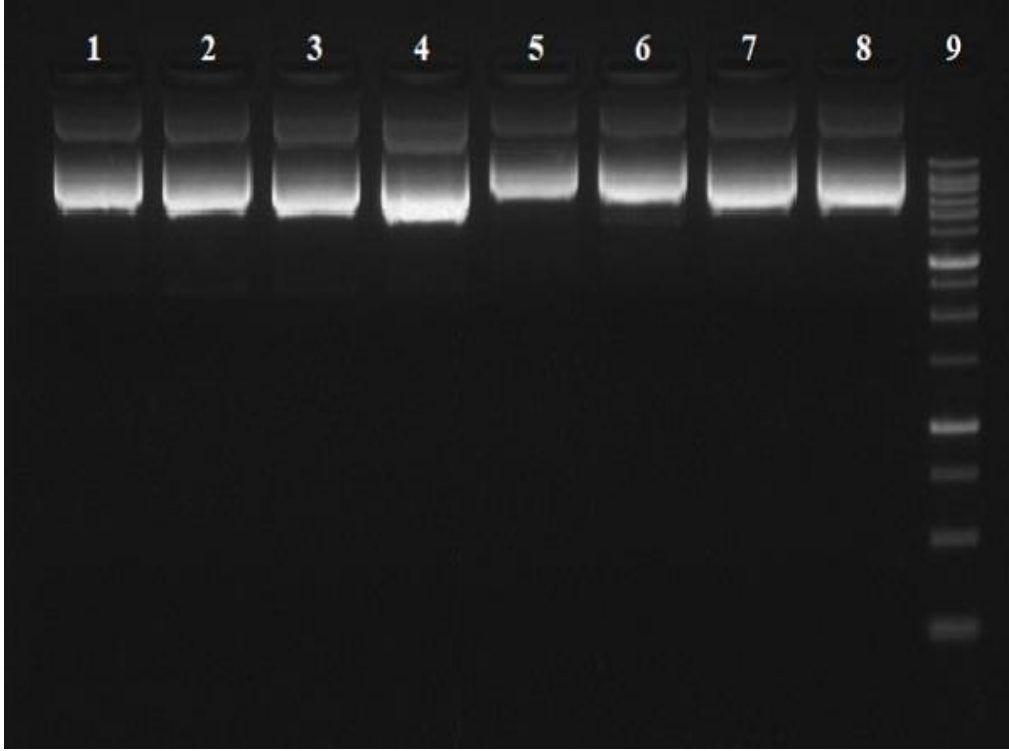


Şekil 23: Tarama PZR Görüntüsü

DH5-a komponent hücrelerinden tarama PZR 'nin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Hat 1-2: pFN10A(ACT) + *NF-κB*, Hat 3-6 pFN11A(BIND) +AHR, Hat 6-11 pFN10A(ACT) + AHR. *NF-κB* ve AHR primerleri kullanılarak vektör sistemi ile birleşmesiyle ilgili elde edilen PZR örnekleri (5 µl) % 1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. Hat 12: Promega 1 kb DNA izleyici.

3.6 Plazmit DNA İzolasyonu Sonuçları

Tranformasyondan sonra 'PureLink Quick Plasmid Miniprep' kit kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda plazmit izolasyonu yapıldı. Luria broth (LB) / Ampisilin (Antibiyotik) / IPTG (İzopropiltiogalaktozid) /X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil- β -D-galaktopiranosid) PZR taraması yaparken pozitif olabileceği için her tarama ürününün tek koloni düşecek şekilde aynı anda LB sıvı besiy ortamı içerisinde ekim yapıldı çoğaltılmış olan PZR taraması sonucunda pozitif çıkan ve beyaz koloni oluşturan ürünleri LB sıvıya ekerek bir gece çalkamalı inkübatörde bekletip ertesi gün uygun prosedüre göre pFN10A(ACT) + AHR, pFN11A(BIND) +AHR, pFN10A(ACT) + *NF- κ B*ve pFN11A(BIND) + *NF- κ B* plazmit DNA izole edildi (Şekil 24).

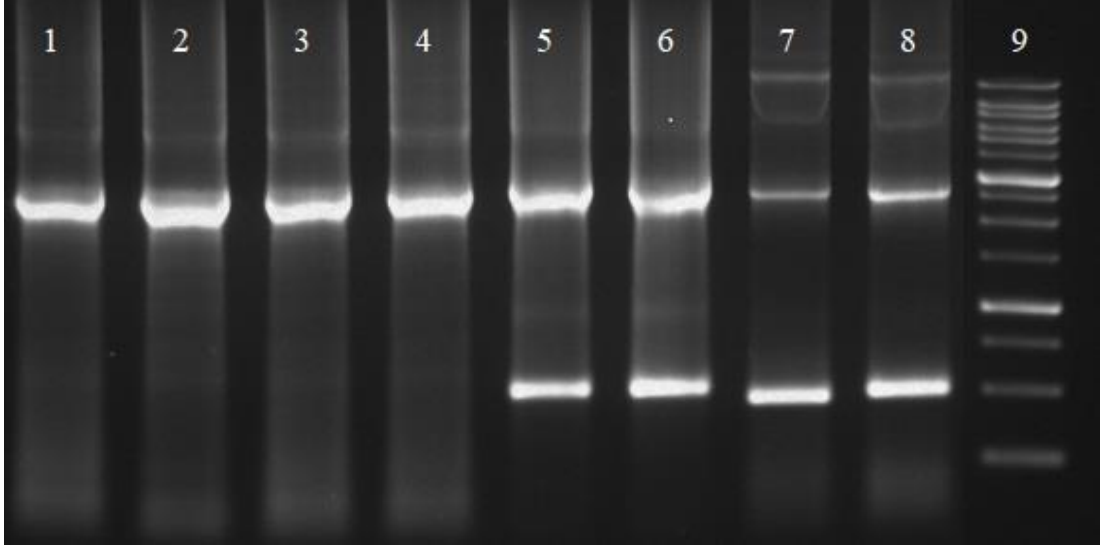


Şekil 24:PZR 'nin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü

Hat 1-2: pFN11A(BIND) + *NF- κ B* Plazmit DNA, Hat 3-4: pFN10A(ACT) + *NF- κ B* Plazmit DNA, Hat 5-6pFN11A(BIND) +AHR Plazmit DNA, Hat 7-8 pFN10A(ACT) + AHR Plazmit DNA. Plazmit DNA örnekleri (5 μ l) % 1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülendi. Hat 9: Promega 1 kb DNA izleyici.

3.7 Plazmit DNA ile PZR Sonuçları

Elde Edilen Plazmit DNA' lar ile PZR reaksiyonu aynı şartlarda tekrarlandı. İstenen gen bölgesinde olduğu % 1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntüledi (Şekil 25) ve transfeksiyon basamağına geçildi.

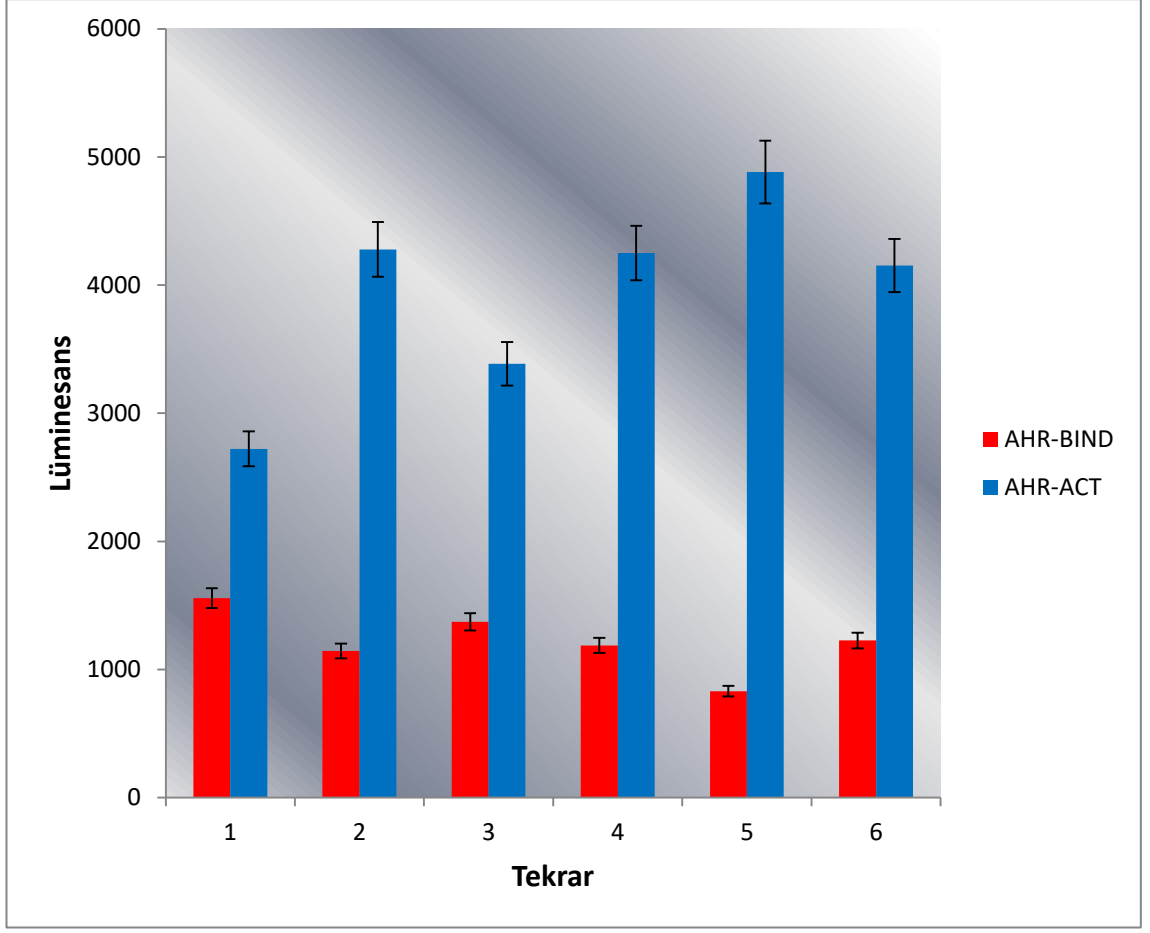


Şekil 25:Plazmit DNA ile elde edilen PZR ürününün % 1 agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

Hat 1-2: pFN11A(BIND) + *NF-κB* PZR, Hat 2-3: pFN10A(ACT) + *NF-κBa*, Hat 5-6: pFN10A(ACT) + AHR PZR, Hat 7-8: pFN10A(ACT) + AHR, Hat 9: Promega 1 kb DNA izleyici.

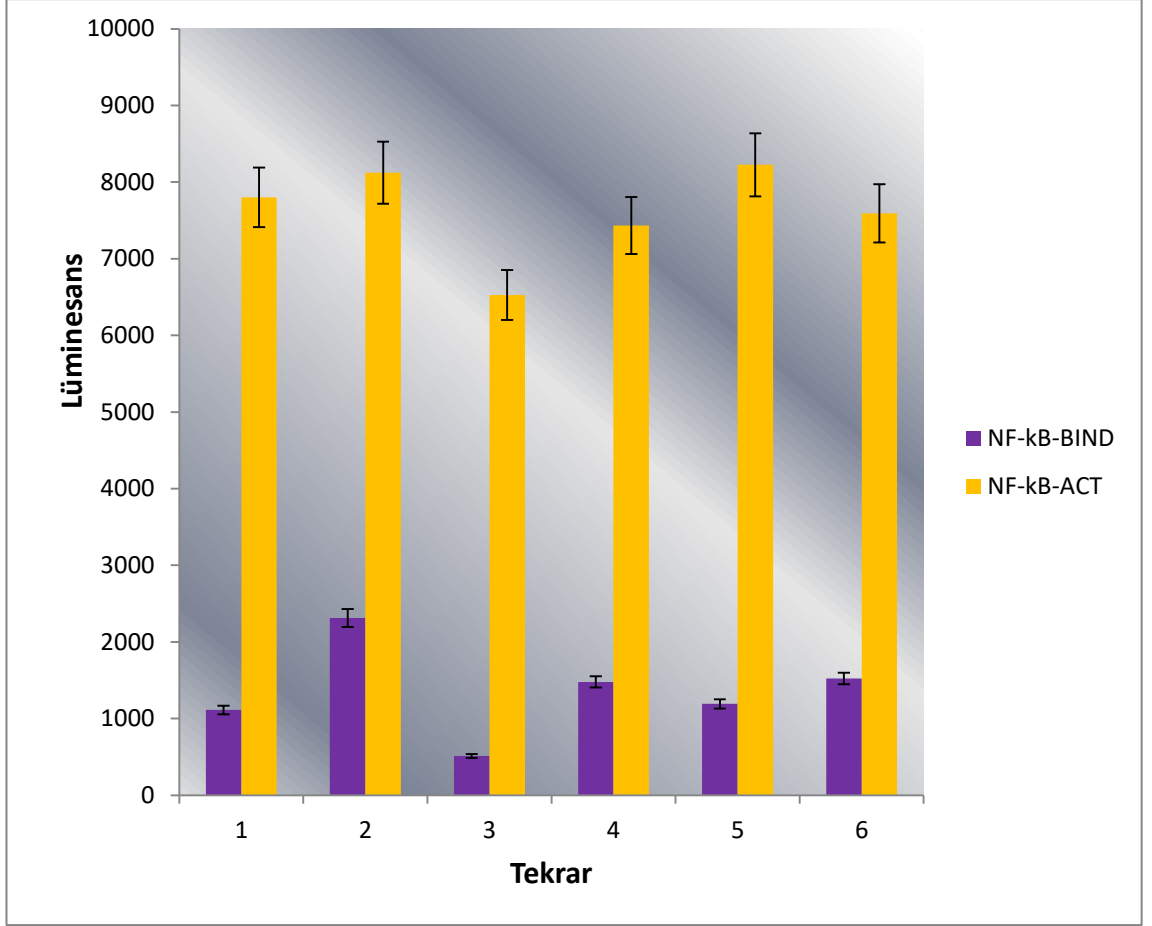
3.8 Lusiferaz Aktivite Ölçüm Sonuçları

Lusiferaz aktivitesini ölçmek için Promega' nın 'Dual-Glo Lusiferaz' reaktifi kullanıldı. 'Synergy HTX' luminometre (BioTek) kullanılarak 'Firefly lusiferaz' aktivitesi ölçüldü. Ölçüm sonuçları Şekil 26,27 ve 28'de gösterilmiştir.



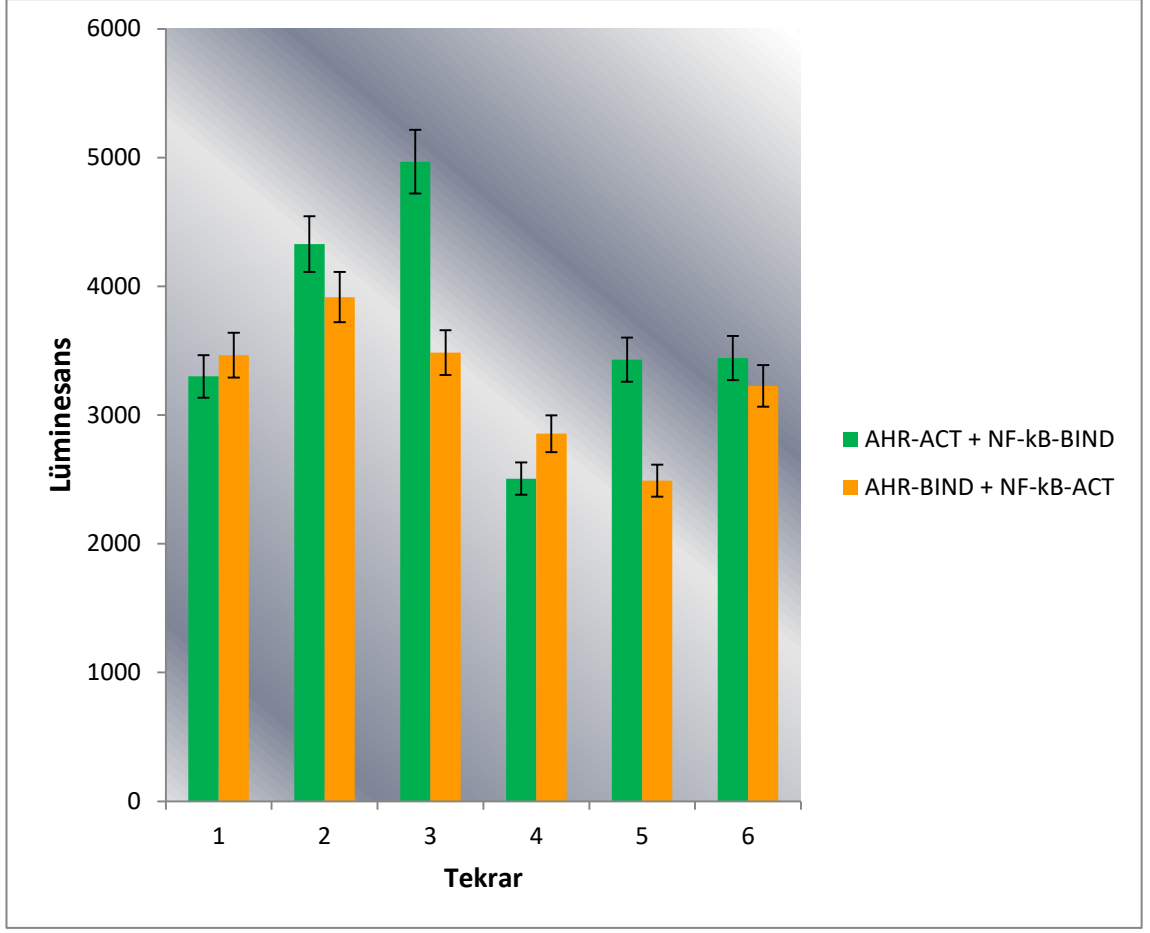
Şekil 26: ‘Firefly Lusiferaz’ aktivitesi ölçüm sonuçları.

Lüminometrik ölçüm sonuçları Promega’ nın ‘Dual-Glo Lusiferaz’ reaktifi kullanılarak, ‘Synergy HTX’ luminometre (BioTek) cihazı ile yapıldı 6 ölçüm olarak tekrarlanmıştır. **AHR-BIND:** HBX-ACT (PFN10A) + AHR-BIND (PFN11A) + PGL4.31, **AHR-ACT:** HBX-BIND (PFN11A) + AHR-ACT (PFN10A) + PGL4.31. AHR’ nin akseptöre bağlandığında HBX hücre hattında ekspresyonunun artışı; istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,000).



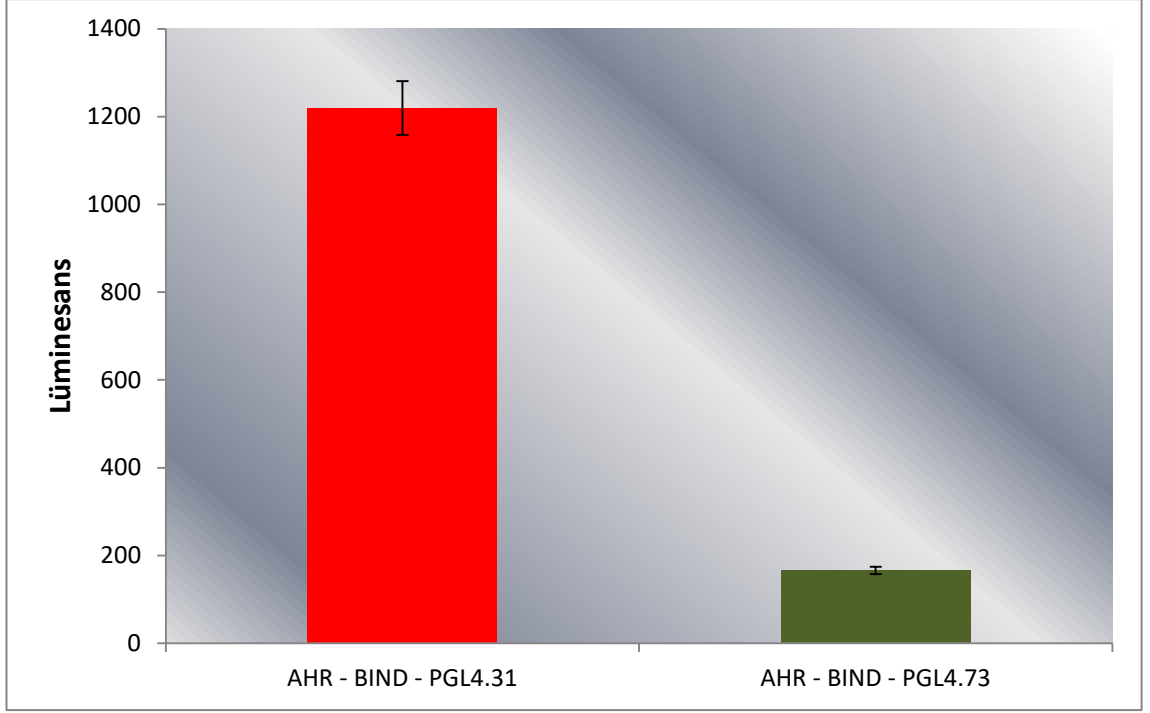
Şekil 27: ‘Firefly Lusiferaz’ aktivitesi ölçüm sonuçları.

Lüminometrik ölçüm sonuçları. Promega’ nın ‘Dual-Glo Lusiferaz’ reaktifi kullanılarak, ‘Synergy HTX’ luminometre (BioTek) cihazı ile yapıldı. 6 ölçüm olarak tekrarlanmıştır. **NF-κB-BIND:** HBX-ACT (PFN10A) + NF-κB-BIND (PFN11A) + PGL4.31, **NF-κB-ACT:** HBX-BIND (PFN11A) + NF-κB-ACT (PFN10A) + PGL4.31 NF-κB’ nin akseptöre bağlandığında HBX hücre hattında ekspresyonunun artışı; istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,000).



Şekil 28: ‘Firefly Lusiferaz’ aktivitesi ölçüm sonuçları.

Lüminometrik ölçüm sonuçları Promega’ nın ‘Dual-Glo Lusiferaz’ reaktifi kullanılarak, ‘Synergy HTX’ luminometre (BioTek) cihazı ile yapıldı. 6 ölçüm olarak tekrarlanmıştır. **AHR-ACT + NF-κB-BIND:** AHR-ACT (PFN10A) + NF-κB-BIND (PFN11A) + PGL4.31, **AHR-BIND + NF-κB-ACT:** AHR-BIND (PFN11A) + NF-κB-ACT (PFN10A) + PGL4.31 AHR’ nin akseptöre + NF-κB’ nin bind’ a bağlandığında, AHR’ nin bind’ a + NF-κB’ nin akseptöre bağlandığında HBX hücre hattında ekspresyonunun artışında; istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (p=0,380).

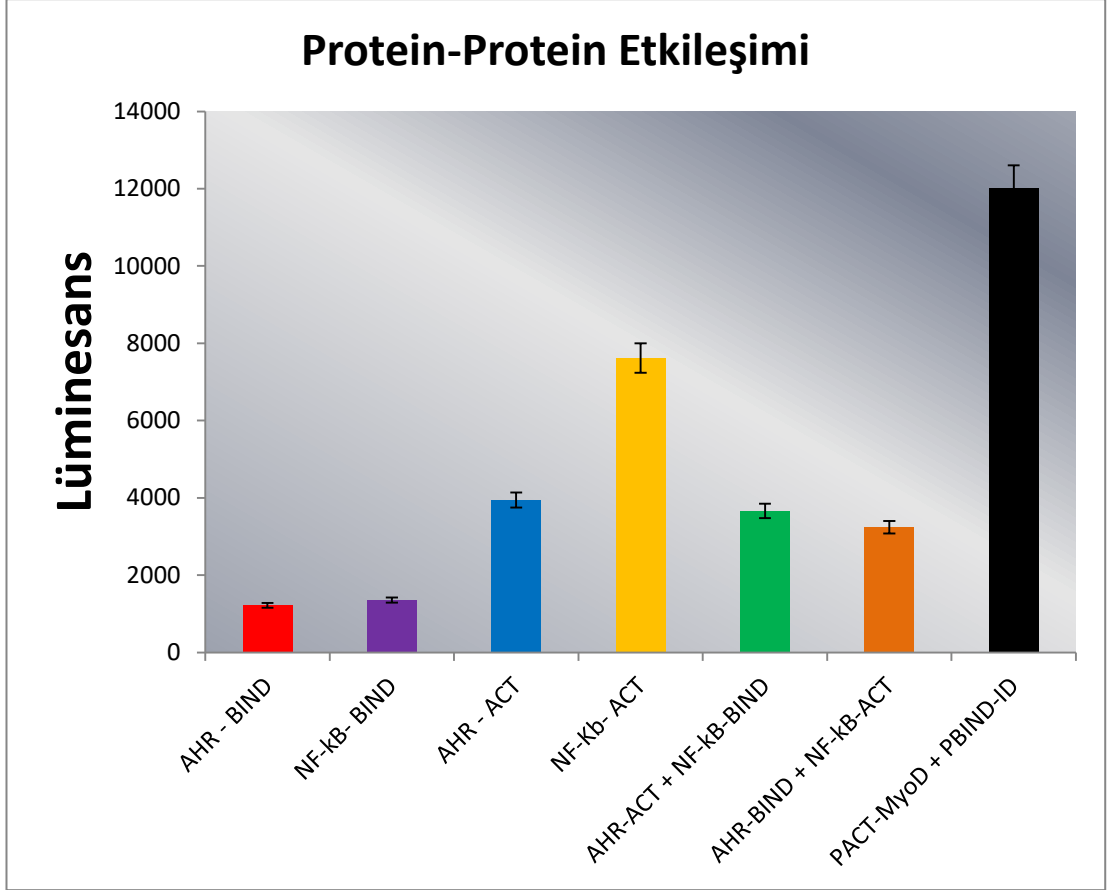


Şekil 29: ‘Firefly Lusiferaz’ aktivitesi ölçüm sonuçları.

Lüçiferaz repoter vektör olan ve Renilla geni içeren pGL4.31 [*luc2P/ Gal4UAS/ Hygro*] ve pGL4.73 [*hRluc/ SV40*] ile HBX-ACT (PFN10A) + AHR-BIND (PFN11A) + PGL4.31 ve HBX-ACT (PFN10A) + AHR-BIND (PFN11A) + PGL4.73 6’ şar tekrar olacak şekilde denendi ve ortalama toplam değerlere göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,371$).

Tablo 14: Deney Gruplarına ait ortalama ve standart sapma değerleri

Gruplar	Ortalama ± Standart Sapma
HBX-ACT(PFN10A)+AHR-BIND(PFN11A)+PGL4.31	1219,5 ± 194,9158
HBX-ACT(PFN10A)+NFkB-BIND(PFN11A)+PGL4.31	1355,167 ± 60,57548
HBX-BIND(PFN11A)+AHR-ACT(PFN10A)+PGL4.31	3945,167 ± 683,3009
HBX-BIND(PFN11A)+NFkB-ACT(PFN10A)+PGL4.31	7616,667 ± 188,5618
AHR-ACT(PFN10A)+NFkB-BIND(PFN11A)+PGL4.31	3662,333 ± 758,0185
AHR-BIND(PFN11A)+NFkB-ACT(PFN10A)+PGL4.31	3239,667 ± 540,2296
PACT-MyoD+PBIND-ID+PGL4.31	12005,783 ± 1420,743



HBX-ACT(PFN10A)+AHR-BIND(PFN11A)+PGL4.31	HBX-ACT(PFN10A)+NFKB-BIND(PFN11A)+PGL4.31	HBX-BIND(PFN11A) +AHR-ACT(PFN10A)+PGL4.31
HBX-BIND(PFN11A)+NFKB-ACT(PFN10A)+PGL4.31	AHR-ACT(PFN10A)+NFKB-BIND(PFN11A)+PGL4.31	AHR-BIND(PFN11A)+NFKB-ACT(PFN10A)+PGL4.31
PACT-MyoD+PBIND-ID+PGL4.31		

Şekil 13: Lüminometrik ölçüm sonuçları

Promega' nın 'Dual-Glo Lusiferaz' reaktifi kullanılarak , 'Synergy HTX' luminometre (BioTek) cihazı ile yapıldı.

4. TARTIŞMA

Dünya çapında hepatoselüler karsinom (HCC) en sık görülen kanser türleri arasında ve kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir. Hepatit B virüsü (HBV) veya hepatit C virüsü (HCV) ile kronik enfeksiyon, HCC vakalarının % 80' ine tekabül eder 15 (El-Serag ve diğ. 2007).

HBV enfeksiyonu, karaciğer fibrozu, siroz ve HCC ile ilişkili enfekte hepatositlerin immün aracılı imhasına ve daha sonra karaciğer rejenerasyonuna neden olur 16 (Tarocchi ve diğ. 2014). HBV enfeksiyonunu HCC' ye bağlayan kesin mekanizma tam olarak anlaşılmamıştır, çünkü HBV' nin sadece zayıf kanserojen olduğu düşünülmektedir (Kew ve diğ. 2011). Sürekli immün aracılı HBV klirensi ve inflamatuvar sitokin seviyelerinde artışların hücre proliferasyonunu ve hayatta kalma sinyallerini aktive ettiği öne sürülmüştür. 17 kDa' lık bir moleküler kütleyle sahip olan bir 154-amino-asit proteini olan HBV X proteini (HBx), kronik aktif hepatitin uzun vadeli hastalık sürecine ana katkı maddesidir. Doğrudan DNA' ya bağlanma yerine, HBx proteini NF- κ B, aktivatör protein-1 (AP-1), ATF / CREB, proto-onkojenler (c-myc ve c-jun) ve HIF-1 gibi transkripsiyon faktörlerini dolaylı olarak aktive eder. HBx ayrıca RAS, RAF – MAPK yolunu RAS, Shc, Grb2 ve SOS ile birleşerek aktive ederek hücre çoğalmasını teşvik eder, böylece RAS-GDP yüklemesini uyarır. Her ne kadar birçok rapor HBx aktivitelerini tanımlamış olsa da, HBX aktivitesini HCC' ye bağlayan moleküler mekanizma yeterince anlaşılmamıştır. Birçok çalışma bu olaya birkaç konakçı protein partnerinin dahil edilmesini önermiştir.(Kim ve diğ., 2008) .Hepatoselüler kanser gelişimi ile HBV ilişkisi bilinmesine rağmen moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. HBV ile hepatoselüler kanser gelişiminde 3 faktör vardır. Bunlardan birincisi, konakçı hücrenin genomuna viral DNA'nin girmesidir. İkincisi, kronik HBV enfeksiyonu için konağın bağışıklık yanıtına bağlı inflamasyondur. Üçüncüsü, HBX gibi sinyal iletim yollarını düzenleyen proteinlerdir (Kim ve diğ., 1991).

Yapmış olduğumuz çalışmada Hepatit B X' in hepatokarsinogenez oluşumda önerilen *NF- κ B* ve AHR genleri üzerine etkilerininin insan hepatoselüler karsinom

hücre hattında (HepG2) aydınlatılmasıdır. Burada ilk defa karaciğerde bir HBx – NF- κ B – AHR yolağının varlığını rapor ediyoruz. AHR ve *NF- κ B* ekspresyonu eşleşen HBV ile ilişkili HCC dokularından anlamlı derecede artmaktadır.

HBX ile etkileşim halinde olan yollardan en önemlisi *NF- κ B*'dir. *NF- κ B* tüm hücre tiplerinde bulunan, immün sistem ve inflamatuvar yanıtta, hücrel strese, oksidatif strese görev alan dimerik bir transkripsiyon faktörüdür ve I κ B tarafından düzenlenir. Bu transkripsiyon faktörü, akciğer kanseri, meme kanseri ve pankreas kanserinde aşırı ifade edilir (Hong ve diğ., 2012). Yapılan Bir çalışmada da, *NF- κ B*'nin HBV ile ilişkili karaciğer kanserinde HBX geni ile etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir (Kım ve diğ., 2008). HBX ve *NF- κ B* arasındaki mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. HBV aracılı hepatokarsinogenez için çeşitli mekanizmalar vardır; HBV DNA' sının, HBX protein benzeri faktörler tarafından hepositlerdeki büyümesi kontrol edilir ya da HBV'ü DNA dizilerini ekleyerek hücrel genlerin transkripsiyonunu etkinleştirir. Bir dimerik transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-kappa B (NF-B), NF-B1 (p105 ve p50), NF-B2 (p100 ve p52), RelA (p65), c-Rel, ve RelB, NF- κ B normal olarak sitoplazmaya lokalize olur ve NF- κ B' nin nükleer translokasyonunu bloke eden inhibitör I κ B ailesinin üyelerine (I κ B α , I κ B β , p105 ve p100) bağlanır. NF- κ B' yi aktive etmek için, HBX sitoplazmada I κ B α ile kompleksler oluşturur veya sitoplazmik p105 proteinlerinin seviyelerini azaltır, NF- κ B' nin nükleer birikimine ve NF- κ B yolunun aktivasyonuna yol açar. NF- κ B, hepatoselüler hasarla mücadelede ikili pro-enflamatuar ve anti-apoptotik rollere etki eder. Konakçı hücre genomuna Hepatit B virüsü (HBV) entegrasyonunun enfeksiyonun erken döneminde meydana geldiği ve HCC' nin başlamasına neden olan hepatositlerde pro-onkojenik değişiklikler meydana getirdiği bildirilmektedir. Ancak, bu değişikliklerin hepatokarsinogenez sırasında gerçekleştiği zaman belirsizliğini koruyor. HBV enfeksiyonunun klonal genişleme evresinde ortaya çıkan HBV DNA entegrasyonunun spesifik hücrel bölgeleri için önemli seçim olmadığını göstermektedir. Bu nedenle, HBV DNA entegrasyon olayları muhtemelen daha önce önerilmiş olan aktif karaciğer kanseri süreçlerini temsil etmektedir.

Entegre HBV DNA, HBV viral replikasyon bir yan ürünü olarak üretilen virüsün replikasyon eksik bir formudur (Tu ve diğ. 2017). Reseptör aracılı girişi

takiben, rahat dairesel DNA (rcDNA) veya daha nadiren içeren HBV nükleokapsidi, çift sarmallı lineer DNA (dsDNA), HBV genomu sitoplazmaya salınır ve çekirdek taşınır (Blondot ve diğ.2008). İntranükleer HBV DNA, HBV mRNA'lar için kararlı epizomal transkripsiyonel şablon olan kovalent olarak kapalı dairesel DNA' ya (cccDNA) dönüştürülür. Nükleer içi dsDNA için ek bir olası kader (ya giriş virüsünün içinde ya da muhtemelen enfekte olmuş hücre tarafından yeni üretilenler) HBV genomları, homolog olmayan uç birleşmesi ile çift sarmallı DNA kırılmalarının yerinde konak hücre genomuna entegrasyondur. (NHEJ) veya bazı durumlarda, mikrohomojoloji aracılı son birleşmeye (MMEJ) aracılık eder (Tuve diğ.2018)(Bill ve diğ.2004). Entegrasyon ~ 10 içinde 1 bir sıklıkta gözlenir hücre kültür enfeksiyon sistemlerinde hücreler HBV enfeksiyonlarının dağ sıçanı ve ördek modellerinde ve kronik olarak enfekte HBV hastalarda (Mason ve diğ. 2005)(Yang ve diğ. 1999).

HBV DNA entegrasyonu, kronik HBV enfeksiyonunun tüm aşamalarında tespit edilebilir. Kronik HBV enfeksiyonu (hayat boyu kronik enfeksiyonun genellikle ilk üç yıl) 'nın başlangıçtaki düşük enflamasyon aşamasında, HBV DNA entegre içeren küçük hepatosit klonlarının sayıda saptanabilir (Tu ve diğ.2015). Bu aşamada kanda yüksek seviyelerde salgılanmış viral antijenler, özellikle HBV yüzeyi ve e antijenleri (sırasıyla HBsAg ve HBeAg) tespit edilebilir.

Yapmış olduğumuzda çalışmada HBX' in akseptöre bağlandığında ekspresyonunun artışının HBX-hücreyel füzyon transkriptlerinin oluşması yoluyla hepatokarsinogenezin ana sürücüler olduğu ve açığa çıkan hücreyel genlerin, açığa çıkan HBV çekirdek promotöründen geçirilmesi ile meydana geldiğini göstermektedir.

NF-κB' nin aktivasyonu, hepatoselüler karsinom (HCC) dahil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde iyi karakterize edilmiştir (Karın ve diğ.2005). Klasik NF-κB sinyal yolunda, heterodimerik NF-κB (p50-p65) sitoplazmada inB proteini (IκB) inhibitörleri tarafından tutuklanır. NF-B yolunun uyarılması üzerine, IB, bir düzenleyici alt birim NEMO (ayrıca IKKγ olarak da bilinir) ve katalitik alt birim IKKa ve IKKβ' dan oluşan IKK kompleksi tarafından fosforile edilir. Fosforile edilmiş IB daha sonra bozunur ve NF-B (p50-p65) çekirdeğe translokasyon olur.

NF- κ B' nin, insan T hücreli lösemi virüsü tip 1, herpes virüsü, epstein-barr virüsü ve hepatit B gibi bir dizi insan onkogenik virüsü tarafından anormal bir şekilde düzenlenmektedir. Bu virüslerin spesifik onkoproteinleri, NF-KB yolunun farklı bölgelerini hedefler ve sonunda NF-KB ' nin anormal aktivasyonuna yol açar (Sun ve diğ.2011). Bu virüsler arasında, hepatit B virüsü (HBV), karaciğer iltihabı, siroz ve HCC gibi çeşitli karaciğer hastalıkları ile ilişkilidir (Kremsdorf ve diğ. 2006). HBV X proteininin (HBX), HBV ile ilişkili HCC gelişiminde, hücre büyümesiyle ilgili transkripsiyonun uyarılması ve kansere bağlı sinyal yolları gibi bir takım mekanizmalar yoluyla kritik bir rol oynadığı bilinmektedir (Tang ve diğ. 2006). Özellikle, HBx' in NF- κ B sinyalini aktive ettiği belgelenmiştir (Ohata ve diğ. 2003).

Ayrıca, birçok çalışma bu olaya birkaç konakçı protein partnerinin dahil edilmesini önermiştir. (Kim ve diğ.2008) (Hong ve diğ.2012).AHR'ü bHLH (basic Helix-Loop-Helix) grubuna ait olan bir transkripsiyon faktörüdür. Birçok gelişimsel ve fizyolojik olayların kontrolünü düzenler. Bu Ayrıca AHR NF- κ B' nin sinyal yoluyla etkileşim halindedir. Bu önerilerin desteklenmesi amacıyla yapmış olduğumuz çalışmada lüminometrik ölçüm sonuçlarına göre HBX' in neden olduğu NF-KB sinyalini arttırdığıda gösterilmiştir ek olarak; HBX' in varlığında NF-KB - AHR' nin birlikte etkileşiminin HBX-NFKB etkileşimine göre artış olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak yapılan lüminometrik ölçüm sonuçlarına göre AHR' nin akseptöre bağlandığında HBX hücre hattında ekspresyonunun artışı; istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,000) .NF- κ B' nin akseptöre bağlandığında HBX hücre hattında ekspresyonunun artışı; istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,000). AHR' nin akseptöre + NF- κ B' nin bınd 'a bağlandığında, AHR ' nin bınd 'a + NF- κ B' nin akseptöre bağlandığında HBX hücre hattında ekspresyonunun artışında; istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (p=0,380).

Transkripsiyon faktörlerinin oynadıkları rollerin tamamı bilinmemektedir. DNA' nın kendi ekspresyonunu kontrol altında tutmasını sağlayan proteinler olup, tek boyutlu kodun üç boyutlu proteine tercüme dilerek tekrar tek boyutlu kodu regüle

etmesi gibi bir mekanizmanın elamanlarıdır. Transkripsiyon faktörleri DNA' dan RNA ifadelenirken belirli bir promotore veya enhancere bağlanana protein alt birimleridir. Bu alt birimler transkripsiyonu regule edecek, başlatacak, uyaracak veya durduracak şekilde etki ederler. Ek olarak transkripsiyon faktörlerinin farklı biçimlerde DNA' ya bağlanma şekilleri vardır ki ,bu bağlanma şekilleri ile ilgili gen-gen etkileşimi kütüphaneleri oluşturulmaktadır. Hepatokarsinogenez oluşumunda bu iki transkripsiyon faktörünün etkileşim halinde olup, ekspresyon artışına sebep olmaktadır. Bu etkileşimin nasıl durdurulacağı konusunda yapılacak çalışmalarla desteklenirse HBX varlığında oluşan hepatokarsinogenezin önüne geçilerek yeni tedavi yöntemleri ortaya çıkartılabilir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak yapılan çalışmada Hepatit B virüsünün karaciğer kanseri oluşumundaki moleküler mekanizmasında ve AHR genleri arasında etkileşimlerin olup olmadığı saptanmaya çalışıldı. HBX' in *NF-Kb* ve AHR genleri üzerine etkileri ilk kez rapor edildi.

Yapmış olduğumuz çalışmada HBX' in *NF-Kb* hepatokarsinoma oluşumunda AHR ile arasında etkileşim olduğunu göstermektedir. Hepatit B virüs varlığında gelişen karaciğer kanseri oluşumunun açıklanması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, çalışmamız HBX varlığında NF-κB-AHR aktivasyonunun etkileşim içinde olduğu yeni bir mekanizma göstermektedir ve HBV ile ilişkili hepatokarsinoma için NF-Kb-AHR sistemini nasıl etkilediğinin anlaşılmasını genişletmektedir.

6. KAYNAKLAR

Akrivias, E., A., Lioret, J., M., Efremidis, S., C. 'Hepatocellular carcinoma'. *Br J Surg.*, 85; 1319-1331. (1998).

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J., D. Ch. 24 in 'Molecular biology of the cell'. *Garland Publishing, INC.* (1994).

Alisi, A., Giambartolomei, S., Cupelli, F. 'Physical and functional interaction between HCV core protein and the different p73 isoforms. *Oncogene*', 22(179); 2573-2580. (2003).

Alka, S., Hemlata, D., Vaishali, C., Shahid, J., Kumar, P., S. 'Hepatitis B virus surface (S) transactivator with DNA binding properties' *J Med Virol*, 61; 1-10. (2000).

Anzola, M. 'Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis'. *J Viral Hepat.*, 11; 383-393, (2003).

Arbuthnot P., Kew M., 'Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma' *Int J Exp Pathol*, 82, 77-100, (2001).

Balsano C., Avantaggiati M. L., Natoli G., De Marzio E., Will H., 'Full length and truncated versions of the Hepatitis B virus X Proteins transactivate the cmyc protooncogene at the transcription level' *Biochem Biophys Res Commun*, 985-92, (1991).

Bayraktar, Y., Balkancı, F., Kayhan, B.. 'A comparison of chemoembolization with conventional chemotherapy and symptomatic treatment in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma' *Hepato-Gastroenterol.*, 43; 681-687. (1996).

Berman, J., J.. 'Cell proliferation and the aetiology of hepatocellular carcinoma.' *J Hepatol.*, 7; 305309. (1988).

Black, A., R., Azizkhan-Clifford, J.. 'Regulation of E2F: A family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene*' 237; 281-302. (1999).

Beasley R.P., Hwang L.Y., 'Epidemiology of hepatocellular carcinoma.' In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*, GN Vyas, JL Dienstag, and JH Hoofnagle, Eds. Grune & Stratton, Inc., New York, 209-224, (1984).

Beasley R.P., 'Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma', *Cancer*, 61, 1942-1956, (1988).

Benn J., Schneider R.J., 'HBV X protein activates ras-GTP complex formation and establishes a ras, raf, MAP kinase signaling cascade', *Proc. Natl. Acad. Sci*, 91, 10350-10354, (1994).

Benn J., Schneider R.J., 'Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls', *Proc Natl Acad Sci*, 92, 11215-11219, (1995).

Bill CA, Summers J. 'Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration' *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* ;101:11135–11140 (2004).

Blondot ML, Bruss V, Kann M. 'Intracellular transport and egress of hepatitis B virus' *J. Hepatol.*;64:S49–S59 (2016).

Caselmann, W., H., Renner, M., Schluter, V., Hofschneider, P., H., Kosby, R., Meyer, M.. 'The hepatitis B virus MHBst 67 protein is a pleiotropic transactivator mediating its effect via ubiquitous cellular transcription factors'. *J Gen Virol.*, 78; 1487-1495. (1997).

Caselmann, W., H., Meyer, M., Kekule, A., S., Lauer, U., Hofschneider, P., H., Kosby, R.. 'A transactivator function is generated by integration of hepatitis B virus preS/S sequences in human hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2970-2974. (1990).

Caselmann W.H., 'Transactivation of cellular gene expression by hepatitis B viral proteins: a possible molecular mechanism of hepatocarcinogenesis', *J Hepatol*, 22, 34-37, (1995).

Chenn C.J., Yu M.W., Liaw Y.F., 'Epidemiological characteristics and risk factors of hepatocellular carcinoma', *Journal Gastroenterol Hepatol*, 12, 294-308, (1997).

Chen, J., Lin, J., Levine, A., J.. 'Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the MDM2 oncogene'. *Mol. Med.*, 1; 142-152

Cheng, W., S., Govindarajan, S., Redeker, A., G. 'Hepatocellular carcinoma in a case of Wilson's disease. *Liver*', 12; 42-45 (1995).

Cheong J.H., Yi M., Lin Y., Murakami S., 'Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation', *Embo J*, 14, 142-150, (1995).

Chieochansin T., Chutimitkul S., Payungporn S., Theamboonlers A., 'Rapid detection of lamivudine resistant hepatitis B virus mutations by PCR based methods', *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 210, (2006).

Chirillo P., Falco M., Puri P.L., Artini M., 'Hepatitis B Virus X activates *NF- κ B* dependent transcription through a Raf independent pathway', *J. Virol*, 70, 641-646, (1996).

Chisari, F., V., Klopchin, K., Moriyama, T., Pasquinelli, C., Dunsford, H., A., Sell, S., Pinkert, C., A., Brinster, R., L., Palmiter, R., D. 'Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice'. *Cell*, 59; 1145-1156. (1989).

Dejean A., Sonigo P., Wain-Hobson S., 'Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11 base pair direct repeat', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.81, 53-54, (1984).

Diamantis I.D., McGandy C.E., Chen T.J., Liaw Y.F., Gudat F., Bianchi L., 'Hepatitis B X gene expression in hepatocellular carcinoma', *J Hepatol*, 15, 400-403, (1992).

Doria M, Klein N, Lucito R., 'The Hepatitis B Virus HBX proteins is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors', *EMBO Journal*; 14, 4747-4757, (1995).

Elmore L.W., Hancock A.R., Chang S.F., Wang X.W., Chang S., Callahan C.P., Geller D.A., Will H., Harris C.C., 'Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis', *Proc Natl Acad Sci*, 94, 14707-14712, (1997).

El-Serag HB, Rudolph KL. 'Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis'. *Gastroenterology*. 132: 2557-76 (2007)

Fei S., Robert J. S., 'Hepatitis B Virus HBX protein activates transcription factor *NF-κB* by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of Rel-Related proteins', *Journal of Virology*, 4558-4566, (1996).

Feitelson M.A., Duan L.X., 'Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma', *The American Journal of Pathology*, 150, 1141-1157, (1997).

Feitelson M.A., Lega L., Duan L.X., Clayton M., 'Characteristics of woodchuck hepatitis X antigen in the livers and sera from chronically infected animals', *J Hepatol*, 17, S24-S34, (1993).

Feitelson M.A., Zhu M., Duan L.X., London W.T., 'Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma', *Oncogene*, 8, 1109-1117, (1993).

Feitelson, M.A., Lee, J., 'Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis', *Canc. Lett.*, 252, 157-170, (2007).

Ganem D., Prince A.M., 'Hepatitis B virus infection natural history and clinical consequences', *New England Journal of Medicine*, 350:1118-1129, (2004).

Li,Z., Chen,G., Cai,Z., Dong,X., Qui,L., Xu,H., Zeng,Y., Liu,X., 'Genomic and transcriptional Profiling of tumor infiltrated CD8⁺ T cells revealed functional

heterogeneity of antitumor immunity in hepatocellular carcinoma' *oncoimmunology* (2018)

Gilmore, T.D., 'Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives', *Oncogene*, 25, 6680–6684, (2006).

Gottlob K., Fulco M., Levrero M., Graessmann A., 'The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity', *J Biol Chem*, 273, 33347-33353, (1998).

Haviv I., Vaizel D., Shaul Y., 'pX, the HBV-encoded coactivator, interacts with components of the transcription machinery and stimulates transcription in a TAF-independent manner', *EMBO J*, 15, 3413-3420, (1996).

Haviv I., Vaizel D., Shaul Y., 'The X protein of hepatitis B virus coactivates potent activation domains,' *Mol Cell Biol*, 15, 1079-1085, (1995).

Henkler F., Hoare J., Waseem N., Goldin R. D., McGarvey M. J., Koshy R., King I. A. 'Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein', *J Gen Virol*, 82, 871–82, (2001).

Henkler F., Koshy R., 'Hepatitis B virus transcriptional activators: mechanisms and possible role in oncogenesis', *J Viral Hepat*, 3,109-121, (1996).

Hieldt, E., Saher, G., Bruss, V., Hofschneider, P., H. 'The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator'. *Virology*, 225; 235-239 (1996).

Hong A., Han D.D., Wright C.J., Burch T., Piper J., Osiowy C., Gao C., Chiang S., Magill T., Dick K., Booth T.F., Li X., He R., 'The interaction between hepatitis B virus X protein and AIB1 oncogene is required for the activation of NFκB signal transduction', *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 423, 6–12, (2012).

Hong A., Han D.D., Wright C.J., Burch T., Piper J., 'The interaction between hepatitis B virus X protein and AIB1 oncogene is required for the activation of NFκB signal transduction', *Biochem Biophys Res Commun*, 423, 6–12, (2012).

Karin M, Greten FR 'NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*' 5: 749–759(2005).

Kew MC. 'Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma'. *J Gastroenterol Hepatol.*; 26: 144-152. (2011).

Kim C.M., Koike K., Saito I., Miyamura T., Jay G., 'HBX gene of Hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice', *Nature* 351, 317–320, (1991).

Kim S. Y., Kim J.C., Kim J.K., Kim H.J., Lee H.M., 'Hepatitis B virus X protein enhances NFκB activity through cooperating with VBP1', *BMB Rep*, 41, 158–163, (2008).

Koike K., Moriya K., Iino S., Yotsuyanagi H., Endo Y., Miyamura T., Kurokawa K., 'Highlevel expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice', *Hepatology*, 19, 810-819, (1994).

Kremsdorf D, Soussan P, Paterlini-Brechot P, Brechot C 'Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis'. *Oncogene* 25: 3823–3833(2006).

Luber B., Arnold N., Sturzl M., Hohne M., Schirmacher P., Lauer U., Wienberg J., Hofschneider P.H., Kekule A.S., 'Hepatoma-derived integrated HBV DNA causes multi-stage transformation in vitro' *Oncogene*, 12, 1597-1608, (1996).

Lucito R., Schneider R.J., 'Hepatitis B virus protein activates transcription factor *NF- κ B* without a requirement for protein kinase C', *J Virol*, 66, 983-991, (1992).

Ma Q., Lu A.Y., 'CYP1A1 induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies', *Drug Metab Dispos*, 35, 1009-1016, (2007).

Mason WS, Jilbert AR, Summers J. 'Clonal expansion of hepatocytes during chronic woodchuck hepatitis virus infection'.*Proc. Natl Acad. Sci. USA.*;102:1139–1144 (2005).

Maeda S., Kamata H., Luo L., Leffert H., Karin M.,IKK 'Beta couples hepatocyte death to cytokine driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis', *Cell*, 121, 977-990, (2005)

Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. 'Alcohol and hepatocellular carcinoma'. *Gastroenterology*; 127(Suppl. 1): S87-96 (2004)

Ohata K, Ichikawa T, Nakao K, Shigeno M, Nishimura D, et al. 'Interferon alpha inhibits the nuclear factor kappa B activation triggered by X gene product of hepatitis B virus in human hepatoma cells'. *FEBS Lett* 553: 304–308 (2003).

Paterlini P., Poussin K., Kew M., Franco D., Brechot C., 'Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma', *Hepatology*, 21, 313-321, (1995).

Sun SC, Cesarman E 'NF-kappaB as a target for oncogenic viruses'. *Curr Top Microbiol Immunol* 349: 197–244 (2011).

Rawat S., Clippinger A., Bouchard M., 'Modulation of Apoptotic Signaling by the Hepatitis B Virus X Protein', *Viruses*, 2945-2972, (2012).

Seeger C., Mason W.S., 'Hepatitis B Virus Biology', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 51-68, (2000).

Seto E., Mitchell P.J., Yen T.S., 'Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors', *Nature* 344, 72–4, (1990).

Shin G.C., Ahn S.H., Choi H.S., Lim K.H., Choi D.Y., Kim K.P., Kim K.H., 'Hepatocystin/80KH Inhibits replication of hepatitis B virus through interaction with HBX protein in hepatoma cell', *Biochim Biophys Acta*, 1569-158, (2013).

Sun W., Zhong F., Zhi L., Zhou G., He F., 'Systematic-omics analysis of HBV-associated liver diseases', *Cancer Lett*, 286, 89–95, (2009).

Suzuki T., Yano H., Nakashima Y., Nakashima O., Kojiro M., 'Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: a possible participation of betacatenin in the dedifferentiation process'. *J Gastroenterol Hepatol*, 17, 994–1000, (2002).

Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S 'Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein'. *Cancer Sci* 97: 977–983 (2006).

Tank X., Liu D., Shishodia S., Ozburn N., Behrens C., 'Nuclear Faktor Kappa B is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions', *Cancer*, 107, 2637-2646, (2006).

Taipale J, Beachy PA. 'The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer'. *Nature*, 411:349-354 (2001).

Tarocchi M, Polvani S, Marroncini G, Galli A. 'Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis'. *World J Gastroenterol.*;20: 11630-11640 (2014).

Tu T, 'Clonal expansion of hepatocytes with a selective advantage occurs during all stages of chronic hepatitis B virus infection' *J. Viral Hepat.*;22:737–753 (2015).

Tu, T., Budzinska, M. A., Shackel, N. A. & Urban, S. 'HBV DNA integration: molecular mechanisms and clinical implications'. *Viruses*, 75 (2017).

Tu, T., Budzinska, M. A., Vondran, F. W. R., Shackel, N. A. & Urban, S. 'Hepatitis B virus DNA integration occurs early in the viral life cycle in an in vitro infection model via NTCP-dependent uptake of enveloped virus particles'. *J. Virol.* 10.1128/JVI.02007-17 (2018).

Yang C. H., Cho M., 'Hepatitis B Virus gene differentially modulates cell cycle progression and apoptotic protein expression in hepatocyte versus hepatoma cell lines', *Journal of Viral Hepatitis*, (2012).

Yang W, Summers J. 'Integration of hepadnavirus DNA in infected liver: evidence for a linear precursor'. *J. Virol.*;73:9710–9717 (1999).

Zheng D.L., Zhang L., Cheng N., Xu X., Deng Q., Teng X.M., Wang K.S., Zhang X., Huang J., Han Z.G., 'Epigenetic modification induced by hepatitis virus X protein via interaction with de nova DNA methyltransferase DNMT3A', *Journal of Hepatology* 50, 377–387, (2009).

Wa Schulz. 'Molecular Biology of Human Cancers'. *The Netherlands: Springer* (2007).

Weber GF. 'Molecular Mechanisms of Cancer'. *The Netherlands: Springer* (2007).

Wong CM, Ng IO. 'Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma'. *Liver Int.* 28:160-74 (2008)

World J Hepatol, 'Persistent risk for new, subsequent new and recurrent hepatocellular carcinoma despite successful anti-hepatitis B virus therapy and tumor ablation' *The need for hepatitis B virus cure* 11(1): 65–73, (2019)

Qadri I., Fatima K., Abde L.H.H., 'Hepatitis B virus X protein impedes the DNA repair via its association with transcription factor TFIIH', *BMC Microbiol*, 11, 48, (2011).

Qadri K., Maguire H.F., Siddiqui A., 'Hepatitis B virus trans-activator protein X interacts with the TATA-binding protein', *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 1003-1007, (1995).

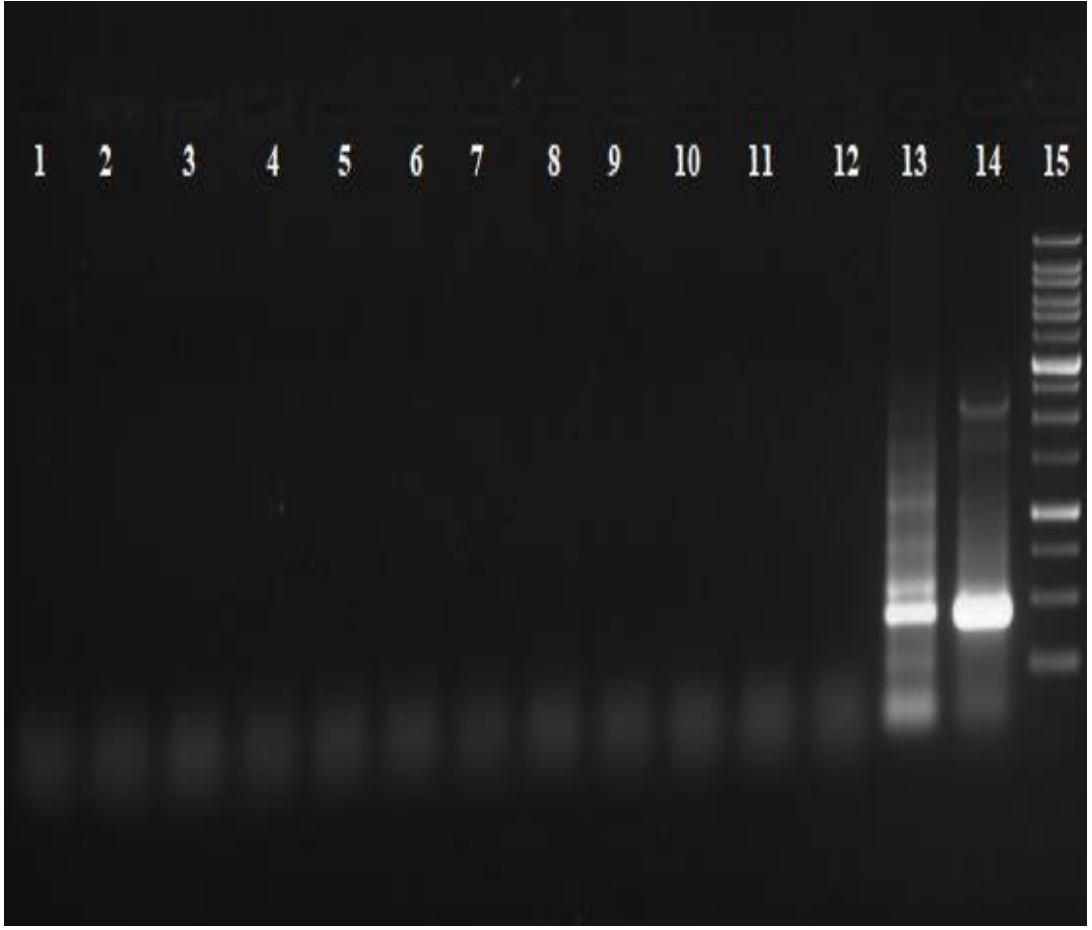
7. EKLER

Bu çalışma kullanılan primerler için diziler Pubmed primer blast kısmında ilgili genlerin genom dizilerinden denenerek elde edildi. Primerlerin seçimi yapılırken sırasıyla primerin özgülüğü; GC baz içeriği, primerin 3' ucu stabilesi, uzunluğu, bağlanma sıcaklığı, primer içinde tekrar eden oligonükleotid dizilimlerinin miktarı, ikincil yapıları dikkate alındı. Deneyimiz için sentezletmiş olduğumuz ilk primer dizilerine ait bilgiler Tablo 15' deki gibidir.

Tablo 15: *NF-κB* ve AHR genlerinin sekans ve uzunlukları

Gen	İleri Primer ve Geri Primerleri (5'>3')	Uzunluk (bç)	TM
<i>NF-κB-F</i>	GAC ATG GTG GTC GGC TTC GC	20	65
<i>NF-κB-R</i>	CTG ACT GTA CCC CCA GAG ACC TCA T	25	69
<i>AHR-F</i>	ATG AAC AGC AGC AGC GCC AAC ATC ACC	27	71
<i>AHR-R</i>	GAT ACA TCG ACA CGG CCC CAG CAT AAC AT	29	72

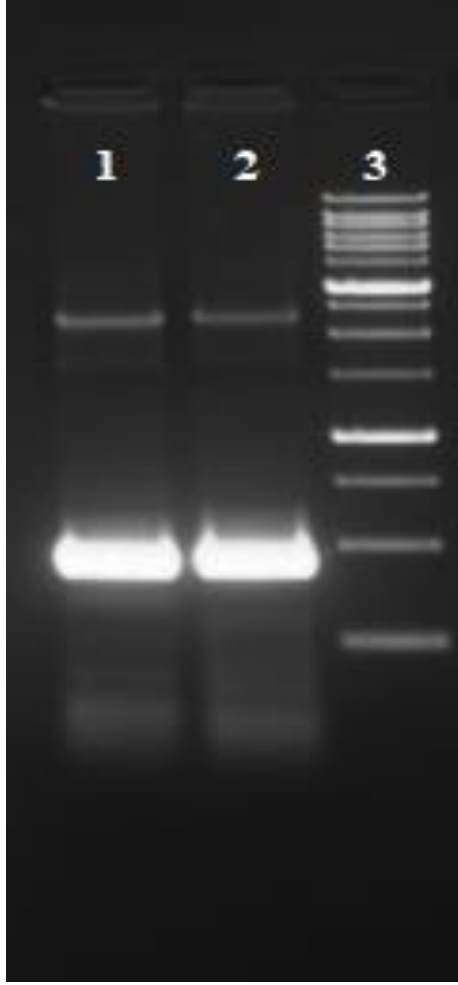
İlk sentezlenen *NF-κB* ve AHR primerleri kullanılarak 12 farklı sıcaklıkta gradient PZR yapıldı, *NF-κB* için ürün eldesi olmadı, AHR için ürün eldesi oldu fakat AHR' nin bulunduğu baz çiftine ek olarak alt kısımda varyantlarından biride elde edildi (Şekil 30).



Şekil 30: NF- κ B ve AHR' nin PZR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü

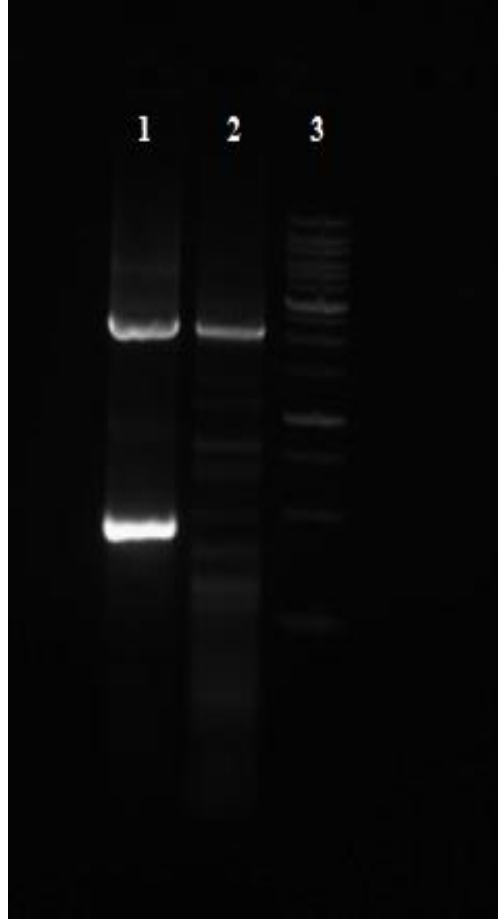
NF- κ B ve AHR primerleri kullanılarak HBX hücre hattından elde edilen RNA' lardan elde edilen PZR örnekleri (5 μ l) % 1 agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntüledi. Hat 1-12: *NF- κ B* PZR (45°C -70 °C arası 12 sıcaklık), Hat 13: AHR PZR 66.2 °C'de, Hat 14: AHR PZR 68 °C'de, Hat 15: Omega 1 kb DNA izleyici.

Bu yüzden AHR ürünü low-melting agaroz yüklenerek jelden istenen PZR ürünü kesildi "Wizard sv Jel ve PZR Saflaştırma Kiti" kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrusunda gerçekleştirildi. PCR ürünlerinin saflaştırılması kısmında ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Elde edilen ürün doğrudan PZR'de cDNA olarak kullanılıp PZR yapılmıştır (Şekil 31). Ürün miktarı az olduğu için kullanılamamıştır. Bu işlemler iki primer için denenmiştir ilgili görüntüler



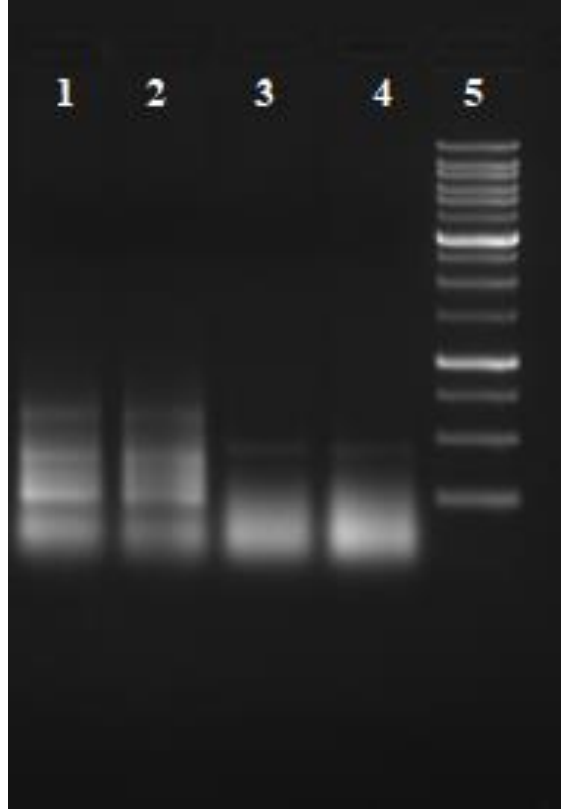
Şekil 31:AHR' nin PZR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. AHR ürünü low-melting agarozla yüklenerek jelden istenen PZR ürünü kesildi ve tekrar PCR yapıldı. Hat 1-2:AHR PZR (68 °C), Hat 3: Promega 1 kb DNA izleyici.

Problemin ne olduğunun anlaşılabilmesi için cDNA konsantrasyonları ölçülmüştür, cDNA yapımında kullanılan tüm parametreler tek tek değiştirilerek PZR tekrarlanmıştır. Örneğin; RNA miktarı %25 fazla olacak şekilde denenmiş olup, dNTP, MgSO₄, RNAaz içermeyen dH₂O, 5XRT tamponu ve enzim değiştirilmiştir. Bunlara ek olarak manuel cDNA yapılmıştır, kullanılan cDNA belli oranlarda sulandırma yapılarak da denenmiştir. PZR ürün miktarı bir sonraki aşamaya geçmek için elde edilememiştir (Şekil 32).



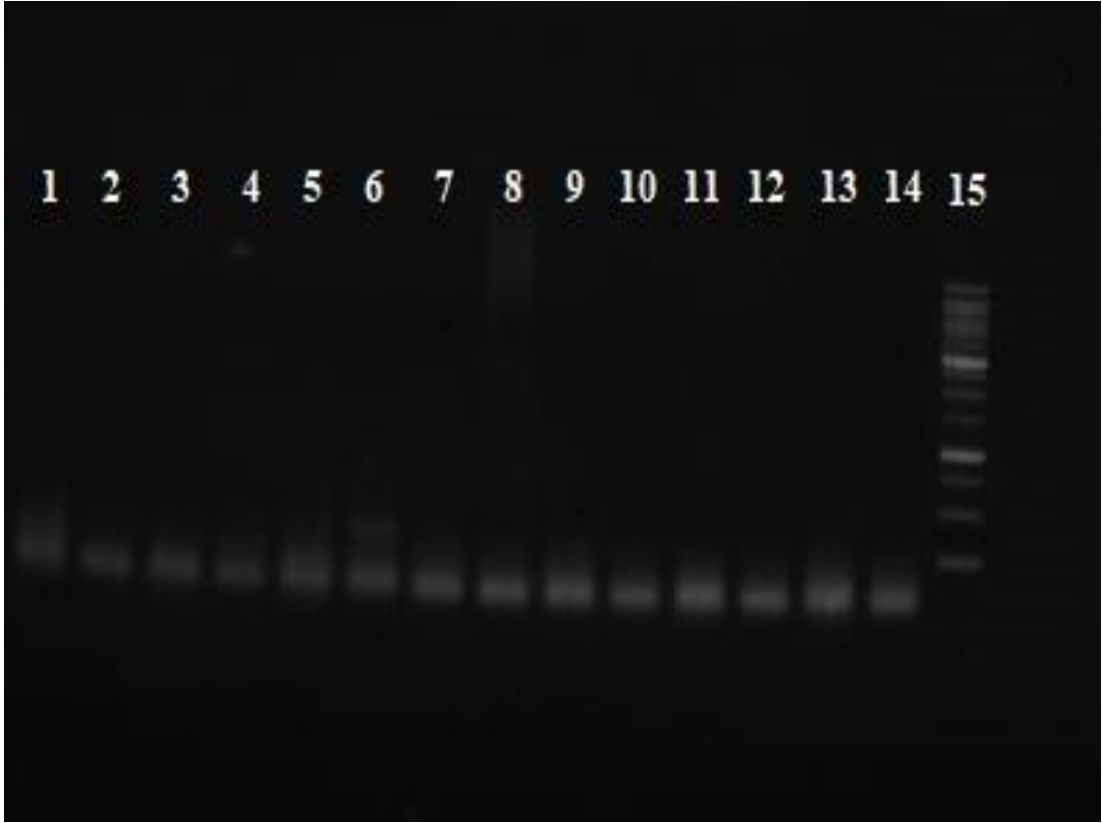
Şekil 32: AHR ve *NF-κB*' nin PZR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Hat 1:AHR PZR (68 °C), Hat 2: *NF-κB* PZR (68 °C) Hat 3: Promega 1 kb DNA izleyici.

RNA'dan cDNA eldesi yapılırken gen spesifik cDNA; cDNA prosedüründe AHR ve *NF-κB* primerlerinden 0.6 µl ve random primerden 0.3 µl olacak şekilde eklenmiştir. PZR eldesi istenen şekilde elde edilememiştir (Şekil 33).



Şekil 33: AHR ve *NF-κB*' nin PZR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Hat 1-2: *NF-κB* PZR, Hat 3-4: AHR PZR Hat 5: Promega 1 kb DNA izleyici.

NF-κB ve AHR' nin HBX hücre hattında mRNA ekspresyonunu arttıran moleküller literatür taraması yapılarak belirlendi, *NF-κB* için lipopolisakkarit (LPS ; 2µg), AHR için polisiklik hidrokarbon olan 3-metilkolantren (3-MC;1µg) uygulandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 34'de verilmiştir.



Şekil 34: AHR ve *NF-κB*' nin PZR sonucunun % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü. Hat 1-7:AHR PZR; 3-MC uygulanan HBX hücre hattından elde edilen RNA ile yapıldı, Hat 8-14: *NF-κB* PZR LPS uygulanan HBX hücre hattından elde edilen RNA ile yapıldı, Hat 15: Promega 1 kb DNA izleyici

Sentezlenen primer dizileri tekrar incelendi ve istenen *NF-κB* ve AHR bölgelerinin eldesi için; Forward primerlere AAAC GCGATCGC, Reverse primerler için AAAC GTTTACCGC eklenerek primerler tekrar sentezlenmiştir ve diğer aşamalar tamamlanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Nazmiye ÖLMEZ

Doğum Yeri ve Tarihi :Amsterdam / HOLLANDA ,25.07.1992

Lisans Üniversitesi :Pamukkale Üniversitesi

Y. Lisans Üniversitesi :Pamukkale Üniversitesi

Elektronik posta : nazmiyebozagac@gmail.com

İletişim Adresi :Muratpaşa mah. 567 sok. Muratpaşa
ANTALYA

Konferans listesi :

- Bozagac N, Kocaoglan D, Celik Turgut G, Ozgun O, Sen A, ‘No Obvious Interaction Between Cytochrome P4501A1 and Hepatitis BX, 4th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey. 27-29 November, Izmir Institute of Technology; page 56 (P14), 2015.
- Bozagac, N, Celik-Turgut, G., Semiz, G., Semiz, A, Sen, A, ‘Initial screening the anti-cancer effect of Vitexagnus castus in neuroblastoma cell lines’, FEBS Journal, September 03-08, page 255, (P-05.02.2-019), 2016.
- Olmez, N, Ozgun-Acar, Sen, A, “Investigation Of Nfkb And Ahr Gene Interaction In Relation To The Development Of Hepatitis”, 5th International Congress of the Molecular biology association of Turkey (P151), 2017.
- Kale E, Bozagac N, Sen A, ‘Regulation Of The Both Anti-Inflammatory And Inflammatory Cytokines Expression By 5-Amiinosalicylic Acid In Caco-2 Cells’ 3th International Symposium on Euroasian Biodiversty, July 05-08, Minsk Belarus, page 33 2017.