

**Hepatit B X Proteininin Ksenobiyotik Metabolizmasında Rol
Oynayan CYP1A1 Üzerine Etkilerinin Araştırılması**

Proje No: 111S612

Prof. Dr. N. Lale Şatıroğlu-Tufan
Tuğba Koç

EYLÜL 2012
DENİZLİ

ÖNSÖZ

Güncel moleküler kanser araştırmaları, Hepatit B virüsü (HBV) X proteininin multi-step hepatoselüler karsinogenezde önemli rolü olduğunu göstermektedir. Fonksiyonu tam olarak ortaya konulamadığı için X olarak isimlendirilen bu protein, hücre proliferasyonunda rol oynayan pek çok sinyal iletim yollarını aktive eder (örneğin, ras-raf-MAPK, NF- kappa B, AP-1, Jak/STAT. Bunlardan en önemlisi Nükleer Faktör–kappa B'dir. Nükleer Faktör–kappa tüm hücre tiplerinde bulunan dimerik bir transkripsiyon faktörüdür. Çok çeşitli uyarılara karşı çok farklı hücresel cevaplarda rol alır; örneğin, stres, bakteriyel ve viral antijenler, serbest radikaller, ultraviyole radyasyon. Nükleer Faktör–kappa B'ye ait hatalı uyarım veya dengesiz aktivasyon durumlarında otoimmün ve inflamatuvar hastalıklar, septik şok, immün gelişim bozuklukları, viral hastalıklar ve kanser en sık karşımıza çıkan durumlardır. Onkogeneizde, özellikle malignleşme potansiyeli gösteren hücrelerde proliferasyonun uyarılması ve apoptozun inhibe edilmesi gibi çok önemli-kritik regülatuar fonksiyonları vardır. Ayrıca, NF-kappa B'nin hücre içi CYP1A1 enzim aktivitesini ve gen ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir. CYP1A1 enzimi hücre içerisinde detoksifikasyonda rol almaktadır. CYP1A1 enzim aktivitesinin artışı veya gen ekspresyonunun uyarılması hücre için toksik etki oluşturma potansiyelindedir. CYP1A1 enzimi özellikle PAH, dioksin TCDD gibi ksenobiyotiklerin metabolizmasında görev yapmaktadır. CYP1A1 geninin ekspresyon artışı ile, hücre içi konsantrasyonu artan CYP1A1 enzimi ksenobiyotik metabolizmasında rol alan bir takım reaktif ara metabolitler oluşturmaktadır. Bu reaktif ara metabolitlerin pek çoğu karsinogenez aşamalarında etkili olan maddelerdir. Bu nedenle ksenobiyotikler tarafından bir hücrenin karsinogenez sürecinin başlatılmasında, CYP1A1 geninin ekspresyonunun arttırılması önemli mekanizmalardan birini oluşturmaktadır. Hücre içi CYP1A1 enzim aktivitesinin ve gen ekspresyonunun NF-kappa B tarafından uyarıldığı pek çok araştırmada gösterilmiştir. Ancak Hepatit B varlığındaki hepatoselüler kanser gelişiminde HBx ve CYP1A1 ile ilgili bir araştırma yapılmamıştır. Tamamlamış olduğumuz projede, Hepatit B X proteininin ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan CYP1A1 ile olan olası etkileri insan karaciğer hücre dizisinde (HepG2) araştırılmıştır.

Çalışmamız, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB), Temel Bilimler Araştırma Grubu tarafından 111T612 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Önsöz.....	2
İçindekiler.....	3
Şekiller Dizini.....	3
Tablolar Dizini.....	4
Özet	5
Abstract.....	6
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER.....	7
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	12
2.1 pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücrelerine geçici transfeksiyonu	12
2.2 Transfeksiyon sonrası hücrelerdeki CYP1A1 varlığının RT-PCR ile kontrolü	16
2.3 Transfeksiyon sonrası hücrelerdeki CYP1A1 varlığının Western Blot ile kontrolü	16
2.4 CYP1A1 ekspresyonunun hücre canlılığına olan etkisinin belirlenmesi.....	17
2.5 Alkoksirezorufin O-Dealkilaz (AROD) Aktivite Tayini (CYP1A1)	17
3. BULGULAR.....	18
3.1 pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücrelerine transfeksiyonu.....	18
3.2 Transfeksiyon sonrası hücrelerdeki CYP1A1 varlığının RT-PCR ile kontrolü	22
3.3 Transfeksiyon sonrası hücrelerdeki CYP1A1 varlığının Western Blot ile kontrolü	24
3.4 CYP1A1 ekspresyonunun hücre canlılığına olan etkisinin belirlenmesi.....	25
3.5 Alkoksirezorufin O-Dealkilaz (AROD) Aktivite Tayini (CYP1A1)	26
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	27
5. REFERANSLAR.....	29
6. PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	35

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1 pCMV6-AC-GFP vektör haritası	13
Şekil 2 pCMV6-AC-GFP vektör klonlama bölgesi	13
Şekil 3 pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörü DNA Dizisi	15
Şekil 4 Alkoksirezorufin dealkilasyonu	18
Şekil 5 pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 PCR ürünlerinin görüntülenmesi	19
Şekil 6 Farklı optimizasyon parametreleri kullanılarak pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2 hücrelerine transfeksiyonu	20

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 7	pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücrelerine geçici (transient) transfeksiyonu ile aktarılan CYP1A1 RNA ifadesinin RT-PCR ile belirlenmesi.....	23
Şekil 8	pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücrelerine geçici (transient) transfeksiyonu ile aktarılan CYP1A1 protein ifadesinin Western Blot ile belirlenmesi.....	24
Şekil 9	CYP1A1 ekspresyonunun hücre canlılığına olan etkisinin XTT metodu ile belirlenmesi.....	25
Şekil 10	CYP1A1 ekspresyonunun hücre canlılığına olan etkisinin WSD metodu ile belirlenmesi.....	26

TABLolar

Sayfa

Tablo 1	Transfeksiyon optimizasyonunda kullanılan turbofectin, plazmid DNA, optiMEM ve serum free medium kullanım parametreleri	16
---------	---	----

ÖZET

HB X proteini sitoplazmada hücre proliferasyonunda rol oynayan pek çok sinyal iletim yollarını aktive eder (örneğin, ras-raf-MAPK, NF- kappa B, AP-1, Jak/STAT. Bunlardan en önemlisi Nükleer Faktör–kappa B'dir. Nükleer Faktör–kappa B tüm hücre tiplerinde bulunan dimerik bir transkripsiyon faktörüdür. RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-kappa B1 (p50), ve NF-kappa B2 (p52) içeren Rel ailesine aittir. Çok çeşitli uyarılara karşı çok farklı hücresel cevaplarda rol alır; örneğin, stres, bakteriyel ve viral antijenler, serbest radikaller, ultraviyole radyasyon. Nükleer Faktör–kappa B'ye ait hatalı uyarım veya dengesiz aktivasyon durumlarında otoimmün ve inflamatuvar hastalıklar, septik şok, immün gelişim bozuklukları, viral hastalıklar ve kanser en sık karşımıza çıkan durumlardır. Onkogeneizde, özellikle malignleşme potansiyeli gösteren hücrelerde proliferasyonun uyarılması ve apoptozun inhibe edilmesi gibi çok önemli-kritik regülatuar fonksiyonları vardır.

CYP1A1 enzimi hücre içerisinde detoksifikasyonda rol almaktadır. CYP1A1 enzim aktivitesinin artışı veya gen ekspresyonunun uyarılması hücre için toksik etki oluşturma potansiyelindedir. CYP1A1 geninin ekspresyon artışı ile hücre içi konsantrasyonu artan CYP1A1 enzimi ksenobiyotik metabolizmasında rol alan bir takım reaktif ara metabolitler oluşturmaktadır. Bu reaktif ara metabolitlerin pek çoğu karsinogenez aşamalarında etkili olan maddelerdir. Bu nedenle ksenobiyotikler tarafından bir hücrenin karsinogenez sürecinin başlatılmasında, CYP1A1 geninin ekspresyonunun arttırılması önemli mekanizmalardan birini oluşturmaktadır.

NF-kappa B'nin hücre içi CYP1A1 enzim aktivitesini ve gen ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir. Ancak, Hepatit B varlığındaki hepatoselüler kanser gelişiminde HBx ve CYP1A1 ile ilgili bir araştırma yapılmamıştır. Tamamlamış olduğumuz projede, Hepatit B X proteininin ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan CYP1A1 ile olan olası etkileri insan karaciğer hücre dizisinde (HepG2) araştırılmıştır. Hepatit B virus varlığında gelişen karaciğer kanseri olgularının kansere olan yatkınlıklarının açıklanmasında, CYP1A1 geninin olası indüklenme mekanizmasının aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B X protein, CYP1A1

ABSTRACT

HB X protein activates several signal transduction pathways having a role in cell proliferation in cytoplasm (eg, ras-raf-MAPK, NF-kappa B, AP-1, Jak / STAT. The most important one is nuclear factor-kappa B. Nuclear Factor B is a dimeric transcription factor-kappa present in all cell types. It belongs to the family of Rel including RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-kappa B1 (p50), and NF-kappa B2 (P52). It is involved in a wide range of different cellular stimuli responses for example, stress, bacterial and viral antigens, free radicals, ultraviolet radiation. Activation of Nuclear Factor-kappa B by faulty or unbalanced stimulation may result in frequently encountered situations like autoimmune diseases, inflammatory diseases, septic shock, development of immune disorders, viral diseases and cancer. It has very important-the critical regulatory functions in oncogenesis, especially in the stimulation of proliferation and inhibition of apoptosis in cells having malign potential.

CYP1A1 enzyme is involved in detoxification within the cell. Increase in CYP1A1 enzyme activity or gene expression has the potential of toxic effects to the cells. Increased CYP1A1 gene expression and increasing concentration of CYP1A1 enzyme may result in the production of reactive intermediate metabolites constitute intracellular enzymes involved in xenobiotic metabolism, These reactive intermediate metabolites are substances that are effective in many stages of carcinogenesis. Therefore, increased expression of CYP1A1 gene is one of the most important mechanisms in the initiation process of carcinogenesis of a cell by xenobiotics.

It has been shown that NF-kappa B induces CYP1A1 gene expression and CYP1A1enzyme activity within the cell. However, there has been no research project done regarding CYP1A1, HBx and the development of hepatitis B-related hepatocellular cancer. Putative effects of hepatitis B X protein on CYP1A1 involved in xenobiotic metabolism has been investigated in this project. Elucidation of the mechanism of induction of CYP1A1 has a great importance in the explanation of the Hepatitis B virus related liver cancer cases which are prone to developing liver cancer.

Key words: Hepatit B X protein, CYP1A1

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Hepatit B virüsü (HBV) hepatotropik, zarflı, kısmen çift sarmallı bir DNA virüsü olup kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinom oluşumunda en önemli etiolojik faktörlerden biridir [ARBUTHNOT, 2001; BEASLEY, 1984]. Hepatoselüler karsinom primer karaciğer hücrelerinden köken alan malign tümördür. Tüm dünyada hepatoselüler karsinom görülme sıklığı coğrafi bölgeden bölgeye değişiklik göstermekle birlikte, HBV enfeksiyonunun endemik olduğu bölgeler olan Asya, Afrika ve Uzak Doğu bu hastalığın en çok görüldüğü yerlerdir. Tüm dünyada yılda ortalama bir milyondan fazla yeni vaka tanı almaktadır ve bunların sağ kalım oranları 5 yıl için %3'den azdır. Bazı araştırmalara göre, her yıl bir buçuk milyondan fazla insan bu hastalık nedeniyle ölmektedir [CHEN, 1997]. Kronik hepatit B virüsü taşıyıcılarında hepatoselüler karsinom gelişme riski, enfeksiyonu olmayan insanlara göre yaklaşık 100 kat daha fazladır ve bu bugüne kadar bilinen en yüksek viral etken-kanser oluşum riski ilişkisidir [BEASLEY 1984; BEASLEY 1988].

HBV'nin hepatokarsinogenez oluşumundaki moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [ARBUTHNOT, 2001; BEASLEY, 1984; CHEN, 1997; BEASLEY 1988; FEITELSON, 1997]. 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/hasarlar meydana gelmesidir. 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. HBV genomu, uzun sarmalı üzerinde Yüzey-Surface (S), Kor-Cor (C), X ve Polimeraz olarak adlandırılan dört değişik protein kodlayan nükleik asit dizisine "open reading frame" (ORF) sahiptir. HBV X geni, HBV genomundaki en küçük gen bölgesidir. Transkripsiyonel trans-aktivatör fonksiyonu ile HBV gen ekspresyonunu ve replikasyonunu destekleyen 16 kDa molekül ağırlığındaki HB X proteini, hepatokarsinogenez oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir [CASELMANN, 1997; HENKLER, 1996]. Ayrıca Hepatit B X gen bölgesi konakçı DNA'sına en çok entegre 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 [MATSUBARA, 1990; DIAMANTIS, 1992; PATERLINI, 1995; KATAYAMA, 1989; VITVITSKI, 1988; WANG, 1991; WANG, 1991a]. Çeşitli araştırmalar HB X protein pozitifliğinin hastalığın ağırlığı ile doğru orantılı olduğu göstermiştir [FEITELSON, 1993]. HB X proteini yüksek miktarda eksprese edilen "HB X transgenik hayvan" modellerinde de hepatoselüler karsinom oluşumu gözlemlenmiştir [KOIKE, 1994; UEDA, 1995]. Hepatoselüler karsinom olgularından izole edilen HBV X

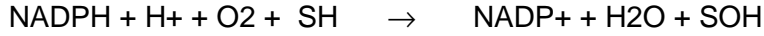
genine ait DNA bölgesi, in vitro şartlarda karaciğer hücre dizinine transfekte edildiği durumunda da, bu hücrelerde transformasyon gözlemlenmiştir [HOHNE, 1990; LUBER, 1996]. Bu birbirinden bağımsız olarak yapılmış araştırmalar HB X proteininin hepatoselüler kanser oluşumunda önemli bir rolü olduğunu ve bu katkının HB X proteininin transkripsiyonel trans-aktivatör fonksiyonuna bağlı olarak gerçekleşebileceğini düşündürmektedir [CASELMANN, 1995; HENKLER, 1996; ROSSNER, 1992].

HB X proteini sitoplazmada hücre proliferasyonunda rol oynayan pek çok sinyal iletim yollarını aktive eder (örneğin, ras-raf-MAPK, NF- kappa B, AP-1, Jak/STAT) [BENN, 1994; LUCITO, 1992; NATOLI, 1994; LEE, 1998]. Çekirdekte ise TATA bağlayan protein, RNA polimeraz II'nin bir alt yapısı, ATF-2 ve diğer bazal transkripsiyon komponentleri gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girdiği gözlemlenmiştir [CHEONG, 1995; QADRI, 1995; MAGUIRE, 1991; HAVIV, 1995; HAVIV, 1996]. DNA tamirinde görev yapan "ultraviolet induced DNA binding protein" ve "p53/excision-repair cross-complementing type 3 protein" kompleksine bağlanması ile yeterli "transkripsiyona bağımlı DNA tamirinin" yapılamayacağı ve böylelikle pek çok mutasyon birikimine neden olabileceği düşünülmektedir [LEE, 1995; WANG, 1994]. Negatif büyüme regülatörlerinden p53 [WANG, 1994; FEITELSON, 1993] ve p55sen [SUN, 1998] ile fonksiyon baskılayıcı ilişkiye geçmesi, ve ayrıca siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21WAF1/CIP1/SDI1 [FEITELSON, 1999] ve translasyon başlatıcı faktör olan sui1'in (translation initiation factor, sui1) [LIAN, 1999], hücre içi ekspresyonlarının HB X proteini varlığında azalması, hücre çoğalmasının kontrolünde çeşitli bozukluklara yol açmaktadır. Ayrıca HB X proteininin apoptoz ve hücre siklusu regülasyonu üzerine de pek çok etkileri gösterilmiştir [ELMORE, 1997; KIM, 1998; SIRMA, 1999; GOTTLOB, 1998; BENN, 1995]. Yapılan son araştırmalar HB X proteininin pek çok değişik mekanizma ile hücre içi gen ekspresyonlarını değiştirdiğini ve bu fonksiyonlarını özgün-yeni veya daha önce tanımlanmış genler üzerinden yaptığını düşündürmektedir.

Sitokrom p450 terimi; bakterilerde, mantarlarda, böceklerde, bitkilerde, balıkta, memelilerde ve primatlarda, katalizlediği reaksiyonların çeşitliliği ve substrat olarak kullandığı birçok bileşiğin yapısından dolayı, genel oksijenazlar (oksijen-kullanan enzim) olarak kabul edilen, tek hem protein ailesini ifade etmektedir. Sitokrom p450 proteinleri yüzlerce gen içeren bir gen süper ailesi tarafından kodlanmaktadır. Bu enzimlerin substratlarını, endojen olarak sentezlenen bileşikler; kolesterol, steroid hormonlar, yağ asitleri; eksogen bileşikler; ilaçlar, yiyecek katkı maddeleri, içilen sigara bileşenleri, pestisidler ve endüstride kullanılan, vücuda yeme, solunum ya da deri yoluyla alınan kimyasallar oluşturmaktadır.

Sitokrom p450 sistemi ilaç alanında geniş bir yere sahiptir. İnaktivasyon veya aktivasyonlar; teropatik ilaçların hücrede istenmeyen, hücre hasarları, hücre ölümü ya da mutasyona neden olan kimyasallara dönüştürülmesi; steroid hormon üretimi; yağ asitlerinin, prostoglandinlerin lokotrienlerin ve retinoidlerin metabolizması; ve ilaç-ilaç ve ters etkileşimi sonucunda meydana gelen enzim inhibisyonu ya da indüksiyonu ile ilgilenmektedir. Sitokrom p450 proteinleri, tromboksan, prostasiklin ile allen oksid sentezi ve nitrik oksid sentezinde payı olan sistein tiolat-bağlı hem proteindir (ARINÇ, 1976; PORTER, 1991; OLEKSIK, 2002).

Sitokrom p450 tarafından katalizlenen genel reaksiyon şu şekildedir:



Substratları steroid, yağ asiti, ilaç, ya da diğer kimyasal; alkan, alken, aromatik halka ya da oksijenasyon için bir konum yaratan heterosiklik halkasal "substituent"lerdir. Monoksijenaz enzimi substrattaki iki oksijen atomundan sadece birisiyle birleştiği için reaksiyonun ismi monooksijenasyondur. Memeli hücrelerinde, ya endoplazmik retikulumda ya da elektron transport sisteminde Sitokrom p450 terminal elektron alıcısı olarak işe yarar. Sitokrom p450 proteini basit bir demir iyonu olan protoporfirin IX (hem) prostetik grubu içerir. Bu grup oksijene bağlanır ve substrata bağlanma bölgeleri içerir. Sitokrom p450'nin hem demiri, porfirin halkanın ve iki uç ligandin, bunlardan birisi sitokrom p450 molekülünün karboksil ucuna yakın bir yerde bulunan sistein rezidüsünden oluşan sülfidril gruptur, 4 pirol azot atomuyla çevrilidir. Hem demiri iki farklı yerde dönme hareketine sahiptir.

Sitokrom p450 1 ailesi enzimleri (CYP1A1, CYP1A2 ve CYP1B1), poliaromatik hidrokarbonları, poliklorlanmış bifenilleri ve arilaminleri içeren çevresel kontaminantların hidrolize edilmesinde önemli role sahiptirler. En fazla sitokrom p450 çalışması sitokrom P4501A üzerinedir. İnsandaki CYP1A alt ailesi 3 üyeden oluşur (CYP1A1, CYP1A2 ve CYP1B1). CYP1A1 genellikle ekstrahepatik dokularda görülürken, CYP1A2 genelde karaciğerde görülür. CYP1A1'in indüklenmesine; akciğer ve plasenta gibi ekstrahepatik dokularda sigara kullanımı ve polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) maruziyeti neden olur. (GUENGERICH 1991)

CYP1A1, çeşitli organik kimyasalların oksidasyonunu katalizleyerek onları daha hidrofilik veya Faz II enzimleri tarafından ileri konjügasyonlara uğratılabilecek formlara dönüştürüp vücuttan atılımını sağlayan sitokrom p450 bağımlı karışık fonksiyonlu oksidazların alt

ailesidir. Sitokrom P450 bağımlı karışık fonksiyonlu oksidazlar ayrıca yabancı kimyasalların reaktif ara ürünlere aktivasyonundan da sorumludur. Özellikle CYP1A1 izozimi, PCB, PAH ve dioksin gibi kimyasalların reaktif ara ürünlere dönüşümlerini katalize eder. PAH'ların bir üyesi olan, petrol ürünlerinde ve endüstriyel atıklarda bulunan benzo(a) piren, mutajenik ve karsinojenik forma CYP1A1 tarafından katalize edilerek dönüşür (CONNEY VE BURNS 1972, HEIDELBERGER 1973). Sitokrom p4501A proteini karsinojenlerin aktivasyonu ve metabolizmasındaki rolleri (GELBOIN 1980, CONNEY 1982, STEGEMAN VE HAHN 1994), çevresel kirlilik için biyomarkör olarak kullanılma potansiyelleri nedeni ile oldukça geniş bir şekilde çalışılmıştır. Benzo(a)piren hidrosilasyon ve 7-etoksirezorufin 0-deetilaz (EROD) reaksiyonları için en büyük katalizördür. 3-Metilkolantren (3-MC) ve B(a)P tarafından oldukça fazla indüklenirler, bununla birlikte muamele olmamış balıklarda çok zor tespit edilirler. Moleküler ağırlıkları 58000 dolaylarındadır ve değişik ortologlar ile oldukça güçlü çapraz bağlanmalar gösterirler. 3-MC, B(a)P, 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD), poliklorlubifenil (PCB) ve diğer halojenli bileşikler sitokrom P4501A1'in güçlü indükleyicileri olarak bilinir.

Akciğer kanseri (MCLEMORE, 1990), kolorektal kanser (SIVARAMAN, 1994) ve meme kanseri (JEFCOATE, 2000) gibi karsinojenik oluşumlarda CYP1 izoformlarının önemli rol oynadığı gösterilmiştir. CYP2E1 etanol ile indüklenabilen, küçük moleküler ağırlıklı bileşiklerin ve asetaminofen gibi yaygın olarak kullanılan ilaçların biyo transformasyonunda rol alan ve karsinojen (özellikle arilaminlerin) metabolizmasında hayli öneme sahip olan bir diğer CYP izoformudur. Ayrıca, aseton, asetat ve laurik asit, oleik asit gibi uzun zincirli yağ asitleri gibi endojen maddelerinde metabolizmasında önemli rol oynar (LIEBER, 1999; KLOZ, 1998).

HB X proteini sitoplazmada hücre proliferasyonunda rol oynayan pek çok sinyal iletim yollarını aktive eder. Bunlardan en önemlisi Nükleer Faktör–kappa B'dir. Nükleer Faktör–kappa tüm hücre tiplerinde bulunan dimerik bir transkripsiyon faktörüdür. RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-kappa B1 (p50), ve NF-kappa B2 (p52) içeren Rel ailesine aittir. Çok çeşitli uyarılara karşı çok farklı hücresel cevaplarda rol alır; örneğin, stres, bakteriyel ve viral antijenler, serbest radikaller, ultraviyole radyasyon. Nükleer Faktör–kappa B'ye ait hatalı uyarım veya dengesiz aktivasyon durumlarında otoimmün ve inflamatuvar hastalıklar, septik şok, immun gelişim bozuklukları, viral hastalıklar ve kanser en sık karşımıza çıkan durumlardır. Onkogeneizde, özellikle malignleşme potansiyeli gösteren hücrelerde proliferasyonun uyarılması ve apoptozun inhibe edilmesi gibi çok önemli-kritik regülatuar fonksiyonları vardır.

Ayrıca, NF-kappa B'nin hücre içi CYP1A1 enzim aktivitesinin ve gen ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir.

CYP1A1 enzimi hücre içerisinde detoksifikasyonda rol almaktadır. CYP1A1 enziminin aktivitesinin artışı veya gen ekspresyonunun uyarılması hücre için toksik etki oluşturma potansiyelindedir. CYP1A1 enzimi özellikle PAH, dioksin TCDD gibi ksenobiyotiklerin metabolizmasında görev yapmaktadır. CYP1A1 geninin ekspresyon artışı ile hücre içi konsantrasyonu artan CYP1A1 enzimi ksenobiyotik metabolizmasında rol alan bir takım reaktif ara metabolitler oluşturmaktadır. Bu reaktif ara metabolitlerin pek çoğu karsinogenez aşamalarında etkili olan maddelerdir. Bu nedenle ksenobiyotikler tarafından bir hücrenin karsinogenez sürecinin başlatılmasında, CYP1A1 geninin ekspresyonunun artırılması önemli mekanizmalardan birini oluşturmaktadır.

CYP1A1enzimindeki aktivite artışı ile karsinogenez gelişimi arasındaki ilişki iki şekilde açıklanmaktadır. Birincisi; besin ve diğer yollarla organizmaya alınan ksenobiyotiklerin, hücrede CYP1A1 geninin ekspresyonunu arttırdığı ve enzimin hücre içi konsantrasyonunu yükselttiği düşünülmektedir. Böylece CYP1A1 enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonların artması ile oluşan zararlı ara metabolitler, Glutasyon S-Transferaz (GST) ve NAD(P) H: quionine oxidoreductase (NQO-I) gibi Faz II enzimlerince yeterli biçimde polar ve zararsız metabolitlere dönüştürülemeyecektir. Hücre içerisinde biriken bu zararlı reaktif ara metabolitler DNA, RNA ve proteinlerin yapısını değiştirebilmektedir. Hücre organik moleküllerinin yapısında meydana gelen değişiklikler, hücrenin karsinojenik forma dönüşümünü başlatmaktadır (MA VE LU 2003).

CYP1A1'in indüklenmesiyle, hücrede karsinogenez sürecinin başlaması arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik ikinci yaklaşım ise; CYP1A1'in indüklenmesiyle başlayan katalitik reaksiyonlar sonunda oluşan reaktif oksijen türleriyle ilgilidir. CYP1A1 gibi monooksijenazların katalitik aktiviteleri sırasında reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Reaktif oksijen türleri, DNA, RNA ve proteinlerin oksidasyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle, indüklenen CYP1A1 enzimleri tarafından, bir takım ksenobiyotik metabolizması sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin hücrenin karsinojenik forma dönüşümünü tetikleyebileceği bildirilmektedir (BAROUKI VE MOREL, 2001).

Literatürde Hepatit B varlığındaki hepatoselüler kanser gelişiminde HBx ve CYP1A1 ile ilgili bir araştırma yapılmamıştır bu nedenle basılmış veri bulunamamıştır. Ancak; akciğer kanseri (MCLEMORE, 1990), kolorektal kanser (SIVARAMAN, 1994) ve meme kanseri (JEFCOATE,

2000) gibi karsinojenik olusumlarda CYP1 izoformlarının önemli rol oynadığı gösterilmiştir. HBV, Tamamlamış olduğumuz HBx ve CYP1A1 ilişkisinin araştırılması projesi literatürdeki önemli bir eksikliğin kapatılabilmesi için bir ön çalışma niteliğindedir.

Hücre içi CYP1A1 enzim aktivitesinin ve gen ekspresyonunun NF-kappa B tarafından uyarıldığı pek çok araştırmada gösterilmiştir. Ancak Hepatit B varlığındaki hepatoselüler kanser gelişiminde HBx ve CYP1A1 ile ilgili bir araştırma yapılmamıştır. Tamamlamış olduğumuz projede, Hepatit B X proteininin ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan CYP1A1 ile olan olası etkileri insan karaciğer hücre dizisinde (HepG2) araştırılmıştır. Hepatit B virus varlığında gelişen karaciğer kanseri olgularının, kansere olan yatkınlıklarının açıklanmasında, CYP1A1 geninin indüklenme mekanizması büyük önem taşımaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM:

2.1 pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücrelerine geçici transfeksiyonu:

pCMV6-AC-GFP (Origene, Rockville, MD, USA) vektör haritası ve klonlama bölgesi Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir. Projemiz kapsamında kullanılan insan hepatosellüler kanser hücre dizinleri aşağıda özetlenmiştir:

Deneyleerde kullanılan hücre dizinleri:

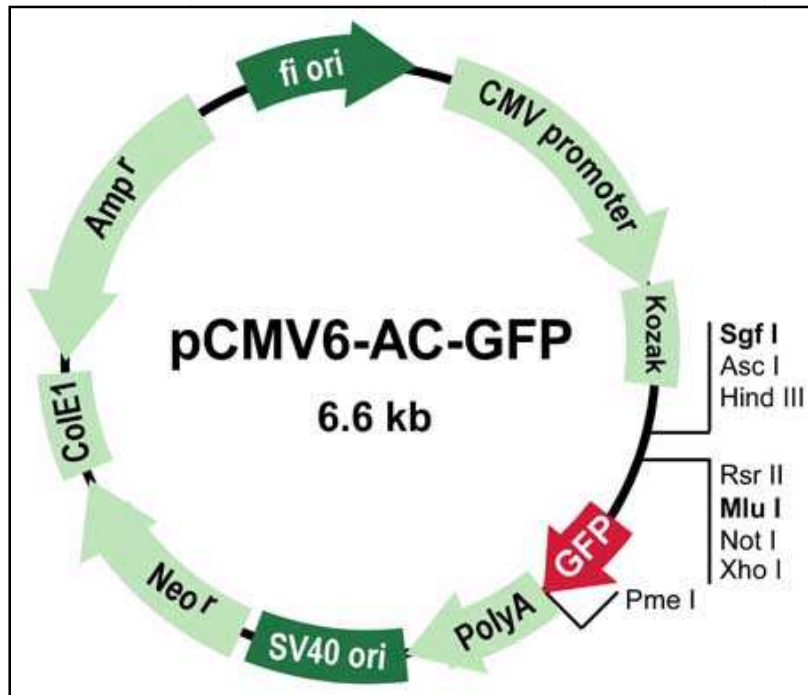
- HepG2-pcDNA3
- HepG2- pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1
- HepG2-pcDNA3-HBx
- HepG2-pcDNA3-HBx- pCMV6-AC-GFP-CYP1A1

Hücre dizinlerinin büyümesi için kullanılan besi yeri detay bilgileri:

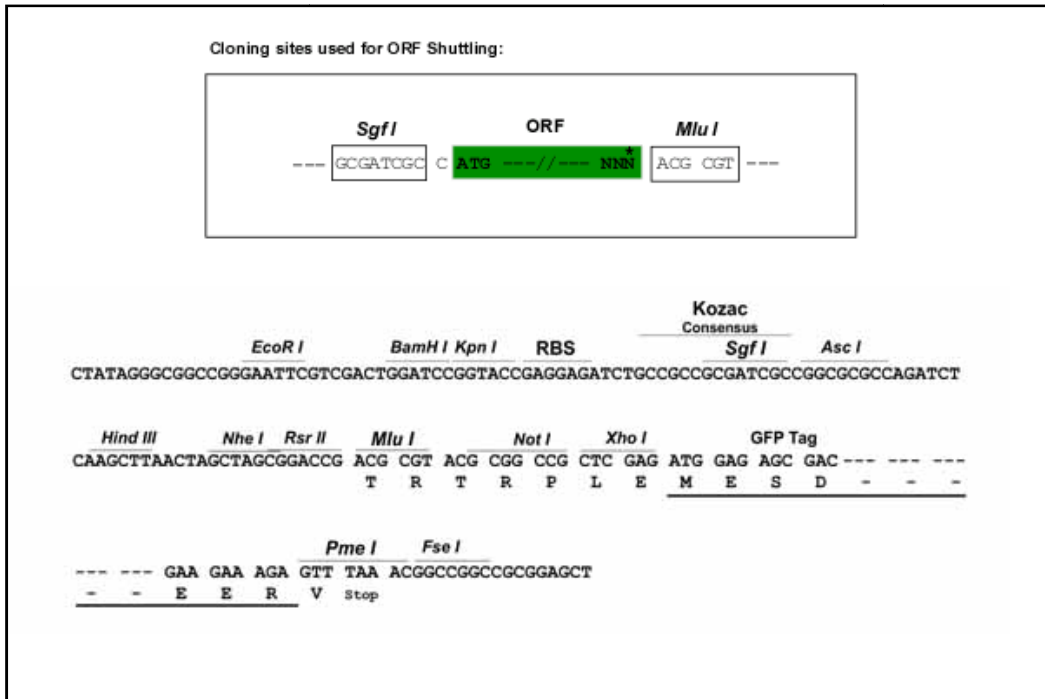
- Earle's Minimum Essential Medium (EMEM) w/o L-Glutamine (01-025-1A, Biological Industries)
- %10 FBS (Fetal sığır serumu) (04-121-1B, Biological Industries)
- 0.1 mM Non-Essential Amino Acids Solution (01-340-1B, Biological Industries)
- 2 mM Glutamin (03-020-1B, Biological Industries)
- 1 mM Sodyum Piruvat (03-042-1B, Biological Industries)
- 100U/0.1mg Penisilin/Streptomisin (03-031-1C, Biological Industries)

Tip II kollajen (Collagen R solution 47254.01, Serva) ile kaplanmış hücre kültür kaplarına yapışarak çoğalan bu hücreler, yukarıda detaylandırılmış olan besi yerinde, 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda üretilmiştir.

Şekil 1. pCMV6-AC-GFP vektör haritası



Şekil 2. pCMV6-AC-GFP vektör klonlama bölgesi



Öncelikle pCMV6-AC-GFP vektörüne klonlanmış olan CYP1A1, dizi analizi ile teyit edilmek üzere tarafımızdan primerler tasarlanmış, ilgili polimeraz zincir reaksiyonları yapılmış ve ürünler dizi analizine gönderilmiştir.

PZR'da kullanılan primerler aşağıda belirtilmiştir.:

hVP15 F: 5' GGACTTTCCAAAATGTCTG 3'

hXL39 R: 5' GGACTTTCCAAAATGTCTG 3'

hCYP1A1 F: 5' AAGTCAGCTGGGTTTCCAGA 3'

hCYP1A1 R: 5' AAGTCAGCTGGGTTTCCAGA 3'

PCR 1: **hVP15 F-hCYP1A1 R:** Amplikon 820 bç

PCR 2: **hXL39 R-hCYP1A1 F:** Amplikon 1798 bç

PCR 3: **hVP15 F-hXL39 R:** Amplikon 2574 bç

PCR 4: **hCYP1A1 F-hCYP1A1 R** Amplikon 199 bç

Çok az miktarda satın alınan pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 plazmidin, transfeksiyon deneylerinde kullanılacak miktarda elde edilmesi amacı ile E.coli DH5 α Competent Hücreler (TAKARA Cat No:9057) kullanılarak transformasyon gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (INVITROGEN, K2100-11) kullanılarak, LB Medium içerisinde çoğaltılmış olan E.Coli ve yanı sıra ilgili plazmid izole edilmiştir. Üretilmiş olan pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 plazmid ilgili primer çiftleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonları yapılmış ve ürünler dizi analizine gönderilmiştir.

pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücrelerine geçici (transient) transfeksiyonu için ilgili firmanın önermiş olduğu protokoller uygulanmıştır. Kısaca, HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına (2'li kontrolü olarak-duplicate) transfeksiyondan 24 saat önce ekilmiştir. Transfeksiyon optimizasyonunda kullanılan turbofectin, plazmid DNA, optiMEM ve serum free medium kullanım parametreleri Tablo 1'de özetlenmiştir. Transfeksiyon verimi (efficiency), GFP içeren vektör kullanımı nedeniyle floresan mikroskop ile 24-48-72. saatlerde takip edilmiştir.

Şekil 3. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörü DNA Dizisi (updated Oct.21st,2008)

AACAAAATATTAACGCTTACAATTTCCATTGCGCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGI
GGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTG
AAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACCG.
CCAGTGCCAAAGCTGATCTATACATTGAATCAATATTGGCAATTAGCCATATTAGTC/
TTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCA/
TGTACATTTATATTGGCATGTCCAATATGACCGCCATGTTGACATTGATTATTGA
TTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTATAGCCCATATATGGAGTTCCC
ACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCA1
GTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGC
TCCGCCCCCTATTGACGTCATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAG
GACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAATCGCTATTA
GTGATGGCGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGC
TCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAAC
CTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCGTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGT
GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTGTGTAACCGTCAGAAATTTGTAATA
TCACTATAGGGCGGCCGGGAATTCGTCGACTGGATCCGGTACCGAGGAGATCTGI
CGGATCGCATGCTTTTCCAATCTCCATGTCGGCCACGGAGTTTCTTCTGGCCT/
ATCTTCTGTCTGGTATTCTGGGTAATCAGGGCCTCAAGACCTCAGGTCCCCAAAG/
AAGAATCCACAGGGCCATGGGGCTGGCCTCTGATTGGGCACATGCTGACCCGT/
GAACCCGCACCTGGCACTGTCAAGGATGAGCCAGCAGTATGGGGACGTGCTGCA
CGAATTGGCTCCACACCCGTTGGTGGTGTGAGCGGCTGGACACCATCCGGCAG
TGGTGGGCGAGGGCGATGATTTCAAGGGCCGGCCCGACCTCTACACCTTACCC/
AGTAATGGTCAGAGCATGTCTTCAGCCAGACTCTGACCAGTGTGGGCTGCC
GCGCCTGGCCAGAAATGGCCTGAAAAGTTTCTCCATTGCCTCTGACCCAGCCTCC
CCTCTGCTACCTGGAAGAGCATGTGAGCAAGGAGGCTGAGGTTCCATAAGCA/
GACGACCTGATGGCAGGGCCTGGGCACCTTAACCCCTACAGGTATGTGGTGGTA/
GACCAATGTCATCTGTGCCATTTGCTTTGGCCGGCGCTATGACCACAACCACCA/
GCTTAGCCTAGTCAACCTGAATAATAATTTCCGGGAGGTGGTTGGCTCTGGAAAG/
TGACTTCATCCCTATTCTTCGCTACCTACCAACCCCTCCCTGAATGCCTTCAAGG.
AATGAGAAGTTTACAGCTTATGCAGAAGATGGTCAAGGAGCACTACAAAACCT/
AAGGGCCACATCCGGGACATCACAGACGCCTGATTGAGCACTGTCAAGGAGAAG/
GGATGAGAACGCCAATGTCCAGCTGTGAGATGAGAAGATCATTACATCGTCTTG/
CTTTGGAGCTGGGTTTGCACACAGTCAAACTGCTATCTCCTGGAGCCTCATGTATT
GATGAACCCAGGGTACAGAGAAAGATCCAAGAGGAGTACAGACAGTATTGGC/
CACGGCCGGCCCGGCTCTGACAGATCCCATCTGCCCTATATGGAGGCCTTCAT
GAGACCTTCCGACACTTCTCTTCGTCGCCCTTACCATCCCCACAGCACAACAA/
ACAAGTTTGAAGGGCTTTTACATCCCCAAGGGGCGTTGTGTCTTTGTAACCCAGT/
ATCAACCATGACCAGAAGCTAGGGTCAACCCATCTGAGTTCTTACCTGAACGGTT/
CCCCTGATGGTGCTATCGACAAGGTGTTAAGTGAGAAGTGATTATCTTTGGCATG/
GCGGAAGTGATCGGTGAGACCATGCCCCGCTGGGAGGTCTTTCTCTTCTGGCT/
TGCTGCAACGGGTGGAATTCAGCGTGCCACTGGGCGTGAAGGTGGACATGACCC
CTATGGGCTAACCATGAAGCATGCCTGCTGTGAGCACTTCCAAATGCAAGCTGCG/
GCGTACGCGGCCGCTCGAGATGGAGAGCGACGAGAGCGGCCCTGCCCGCCATGG
CGAGTGCCGCATCACCGGCACCCGTAACCGCGTGGAGTTTCGAGCTGGTGGGCG/
AGAGGGCACCCCGAGCAGGGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGCACCAAAAGC
CTGACCTTACGCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGCTACGGCTTCTACCACT
CACCTACCCAGCGGCTACGAGAACCCCTTCTGCACGCCATCAACAACGGCGG/
CCAACACCCGCATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGCGTGTGACAGTGAAGCTTCA
CCGATACGAGGCCGGCCGCTGATCGGCGACTTCAAGGTGATGGGACCCGGCT/
GAGGACAGCGTGTCTTACCGACAAGATCATCCGCAGCAACGCCACCGTGGAG/
GCACCCCATGGGCGATAACGATCTGGATGGCAGCTTACCCCGACCTTACGCCCT/
ACGGCGGCTACTACAGCTCCGTGGTGGACAGCCACATGCACCTCAAGAGCGCCA/
CCCAGCATCCTGCAGAACGGGGGCCCATGTTTCGCTTCCGCCGCTGGAGGAG/
ACAGCAACACCGAGCTGGGCATCGTGGAGTACCAGCACGCCTTCAAGACCCCGG
AGATGCCGGTGAAGAAAGAGTTTAAACGGCCGGCCGCGGTATAGCTGTTTCCCT/
GATCCCGGTTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCAAGTGCCTCTCTGGCCCTGGAA/
CACTCCAAGTGCACACAGCCTTGTCTTAATAAAATTAAGTTGCATCATTGTTGTG/
GTGTCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAC
GAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGT/
CAATCTGGCTCACTGCAATCTCCGCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCTGCCCT/
CCCAGATTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTT
TAGAGACGGGTTTTACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCTAATCTCAGG/
TACCCACCTTGGCCTCCCAAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGTCTCCCT/
GTCTTCTGATTTTTAAAATAACTATACAGCAGGAGGACGCTCCAGACACAGCATAG
CCTGGCCATGCCAACCAGGTTGGGACATTTGAGTTGCTTGGTGGCACTGTCTCT/
CGTTGGGTCCACTCAGTAGATGCCTGTTGAATTGGGTACGCGGCCAGCTTGGCT/
ATGTGTGTGAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAGTA1
AGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAAGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAG
CAGAAGTATGCAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCCGCCCTAA/
GCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATCTCCGCCCATGGGTG/
TTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATCCAGAAC
GAGGAGGCTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGAT.
TTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGATGATTGAACAAGAT
TGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGG

Tablo 1. Transfeksiyon optimizasyonunda kullanılan turbofectin, plazmid DNA, optiMEM ve serum free medium kullanım parametreleri

Deney sayısı	Turbofectin (ul)	Plazmid DNA (ug)	OptiMEM	Serum free medium
1	3	1		+
2	6	2		+
3	8	2		+
4	8	3		+
5	8	4		+
6	8	6		+
7	9	3	+	
8	15	5	+	

2.2 Transfeksiyon sonrası hücrelerdeki CYP1A1 varlığının RT-PCR ile kontrolü:

İlgili vektör transfeksiyonundan 24 saat sonrasında, HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-HBx, HepG2-pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1, HepG2-pcDNA3-HBx-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücre dizinlerinden RNA izolasyonu, TRI-Reagent (Sigma) ile üretici firmanın önerdiği protokol çerçevesinde yapılmıştır. RNA kalitesi ve miktarları belirlendikten sonra, ilgili ampikonlar OneStep RT-PCR kit (Cat# 210212, Qiagen) kullanılarak, tek aşamalı semikantitatif RT-PCR reaksiyonu ile çoğaltılıp, EtBr ile boyanmış %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

2.3 Transfeksiyon sonrası hücrelerdeki CYP1A1 varlığının Western Blot ile kontrolü:

İlgili vektör transfeksiyonundan 48 saat sonrasında, HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-HBx, HepG2-pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1, HepG2-pcDNA3-HBx-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücre dizinlerinden protein izolasyonu yapılmıştır. Kısaca, hücreler soğuk (ice-cold) PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 10 dakika RİPA solüsyonu [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet, 0.5% sodium deoxycholate, 1% SDS, proteaz inhibitörleri (1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 10 ug/ml leupeptin, 20 ug/ml aprotinin), ve fosfataz inhibitörü (0.2 mM sodium orthovanadate)] ile buz üstünde bekletilmiştir. 10.000 rpm ve 4°C'de santrifüj sonrasında hücre debris çöktürülmüş ve total protein elde edilmiştir. Protein konsantrasyonu BioRad Protein assay kit (Bradford dye-binding procedure) yardımı ile yapılmıştır. İzolasyonu yapılmış olan protein örnekleri (her birinden 50 veya 100ug) SDS-PAGE'e (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis – 8% resolving gel- (BioRad) tabii tutulduktan sonra PVDF membrana (Millipore) geçirilmiştir. Proteinleri içeren

PVDF membran, taze hazırlanmış PBS + 5% yağsız süt tozu + 0.05% Tween-20 içinde ve oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir. PBS yıkamaları sonrasında, birincil antikor olarak 1:500 – 1:1000 oranında anti-CYP1A1 (Rabbit polyclonal, AbCam) veya 1:1000 – 1:5000 oranında anti- β -aktin (Rabbit polyclonal, AbCam) ve sonrasında horseradish peroxidase (HRP) konjuge ikincil antikorlar (goat anti-rabbit IgG – Accurate Chemical & Scientific Corporation) kullanılmıştır. Sonuçlar “enhanced chemiluminescence” (SuperSignal Chemiluminescent Detection) tekniği ile görüntülenmiştir.

2.4 CYP1A1 ekspresyonunun hücre canlılığına olan etkisinin belirlenmesi:

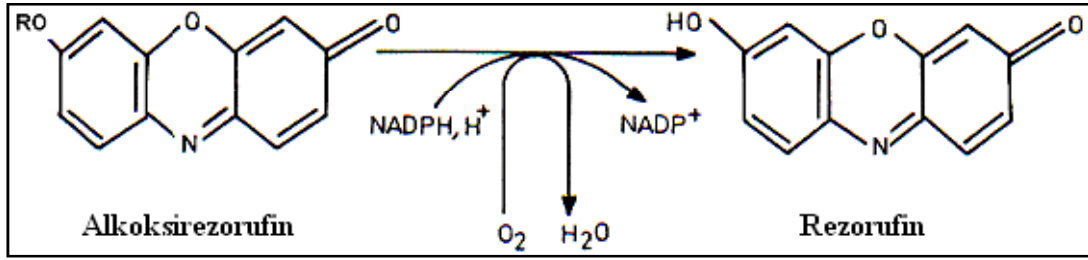
HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-HBx, HepG2-pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1, HepG2-pcDNA3-HBx-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına (2’li kontrolü olarak-duplicate) ekilmiş, ve ilgili vektör transfeksiyonu sonrasında büyüme faktörleri varlığında (EMEM + 10% FBS) ve/veya büyüme faktörleri yokluğunda (EMEM) olmak üzere iki farklı besi yerinde üretilmiştir. 5 gün süresince, canlı hücre sayısı günlük hemasitometre sayımları yapılarak tripan blue boyama tekniği ile belirlenmiştir. Ayrıca, hücre canlılığı ve proliferasyon deneyleri için ilgili hücreler; “HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-HBx, HepG2-pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1, HepG2-pcDNA3-HBx-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1” Tip II kollajen (Collagen R solution 47254.01, Serva) ile kaplanmış 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında 1×10^4 /kuyucuk miktarında ekilmiştir. İlgili vektör transfeksiyonu sonrasında hücre proliferasyonu “Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Cat # 20-300-1000-Biological Industries)” ile araştırılmıştır. Kit içeriğinde reaktif madde olarak tetrazolium tuzu olan “XTT” içermektedir. siRNA transfeksiyonunu takip eden 1-2-3-4-5. günlerde, aktive edilmiş XTT solüsyonu aynı saatte eklenip ve hücreler 2 ve/veya 4 saat 37°C’de, %5 CO²’li ortamda bekletilmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan renk reaksiyonu 450nm’de 96 kuyucuklu eliza okuyucuda tespit edilmiştir. Ayrıca sonuçlar WST-1 Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kit kullanılarak tekrarlanmıştır.

2.5 Alkoksirezorufin O-Dealkilaz (AROD) Aktivite Tayini (CYP1A1):

HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-HBx, HepG2-pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1, HepG2-pcDNA3-HBx-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücre homojenatlarında AROD aktiviteleri Burke ve Mayer (1974) metodu ile ve Arınç ve Sen (1994) tarafından optimize edilen şartlar kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 4). Bu aktivite tayinlerinde substrat olarak 7-etoksirezorufin

7-etoksirezorufin substrat için enzim aktivitesi etoksirezorufin O-deetilaz (EROD) olarak isimlendirilmektedir.

Şekil 4. Alkoksirezorufin dealkilasyonu



Buna göre tipik reaksiyon ortamı 100 mM potasyum fosfat tamponu pH 7,80, 100 mM NaCl, 1,2 mg BSA, belirli miktarda protein ve 1,5 µM 7-Etoksirezorufin substrat olarak ve ve 0,1 M NADPH içerir. Reaksiyon çözeltisi stok çözeltilerden florometre küvetinde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatıldıktan sonra reaksiyon Cary Eclipse (Varian) Florometre’de 6 dakika boyunca takip edilmiştir. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak resorufinin bilinen miktarı eklenip ve floresanstaki artış kaydedilmiştir. Enzim aktivitesi, resorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

Proje deneylerinin öncesinde, kullanılacak hücrelerin temel karakterizasyonu, “HepG2 hücrelerine pcDNA3 vektörü ile aktarılan HBx gen ifadesinin Multiplex Semikantitatif RT-PCR ile belirlenmesi (Stabil transfeksiyonun kontrolü)” laboratuvarımız koşullarında yapılmıştır.

3.1 pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücrelerine transfeksiyonu:

pCMV6-AC-GFP vektörüne klonlanmış olan CYP1A1 dizisi teyit edilmek üzere tarafımızdan primerler tasarlanmış, ilgili polimeraz zincir reaksiyonları yapılmış ve ürünler görüntülenmiştir (Şekil 5).

ŞEKİL 5. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 PCR ürünlerinin görüntülenmesi:

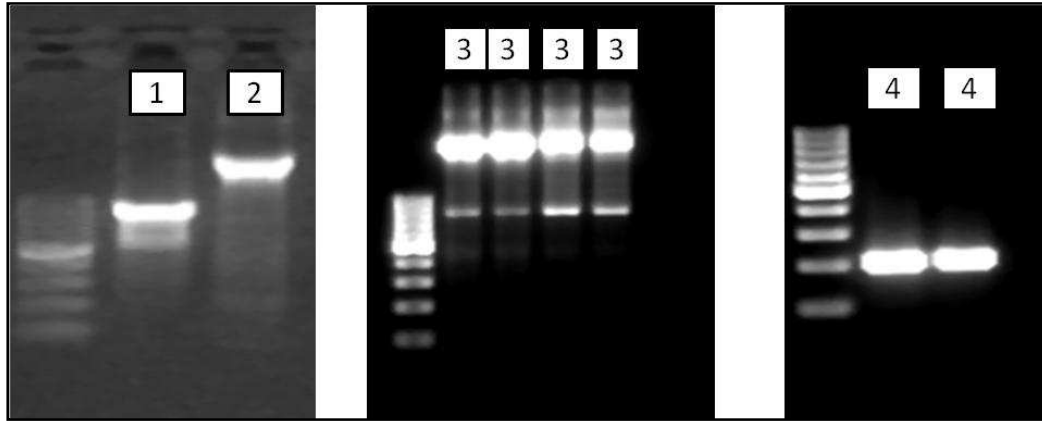
Farklı bağlanma dereceleri kullanılarak PCR optimizasyonu sağlanmıştır. Sadece 3. PCR reaksiyonundaki ekstra bant ekarte edilememiştir. Bu nedenle ilgili ürün jelden kesilip, E.Z.N.A gel Extraction Kit ile izolasyonu sağlandıktan sonra dizi analizine gönderilmiştir.

PCR 1: **hVP15 F**-**hCYP1A1 R**: Amplikon 820 bp

PCR 2: **hXL39 R**-**hCYP1A1 F**: Amplikon 1798 bp

PCR 3: **hVP15 F**-**hXL39 R**: Amplikon 2574 bp

PCR 4: **hCYP1A1 F**-**hCYP1A1 R**: Amplikon 199 bp



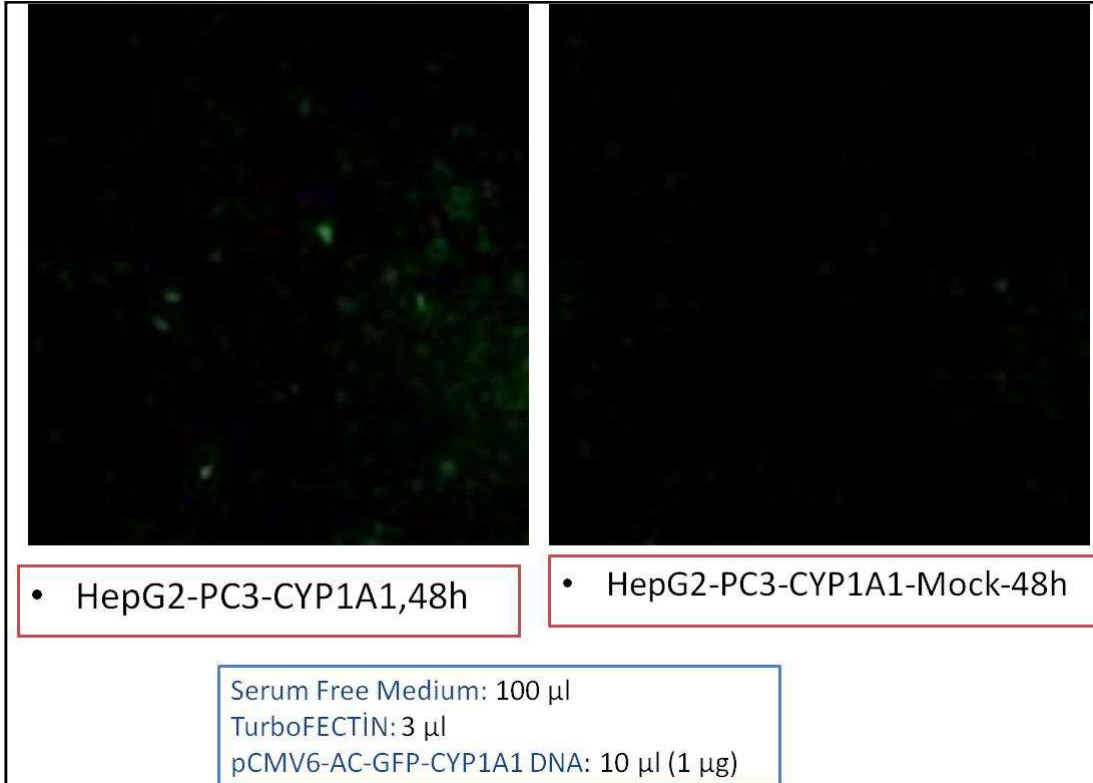
pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücrelerine geçici (transient) transfeksiyonu için ilgili firmanın önermiş olduğu protokoller uygulanmıştır. Kısaca, HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına (2'li kontrolü olarak-duplicate) transfeksiyondan 24 saat önce ekilmiştir. Transfeksiyon optimizasyonunda kullanılan turbofectin, plazmid DNA, optiMEM ve serum free medium kullanım parametreleri Tablo 1'de özetlenmiştir. Transfeksiyon verimi (efficiency), GFP içeren vektör kullanımı nedeniyle floresan mikroskop ile 24-48-72. saatlerde takip edilmiştir. Deneylere ait resimler Şekil 6A-E'de gösterilmiştir.

Şekil 6. Farklı optimizasyon parametreleri kullanılarak pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2 hücrelerine transfeksiyonu

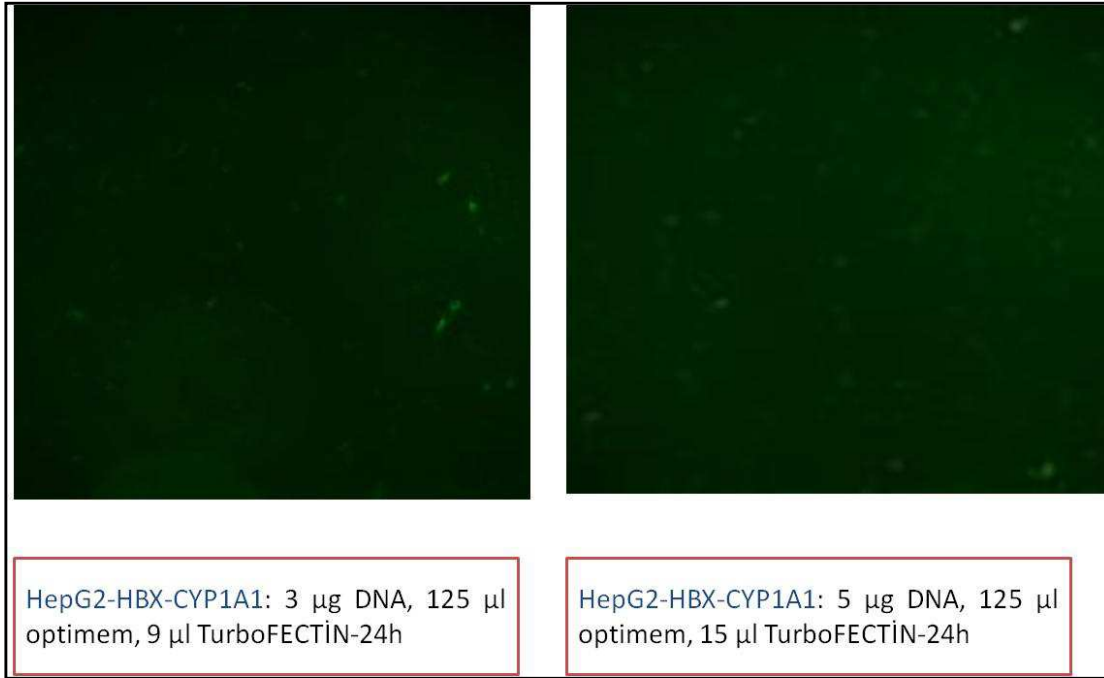
Şekil 6A.



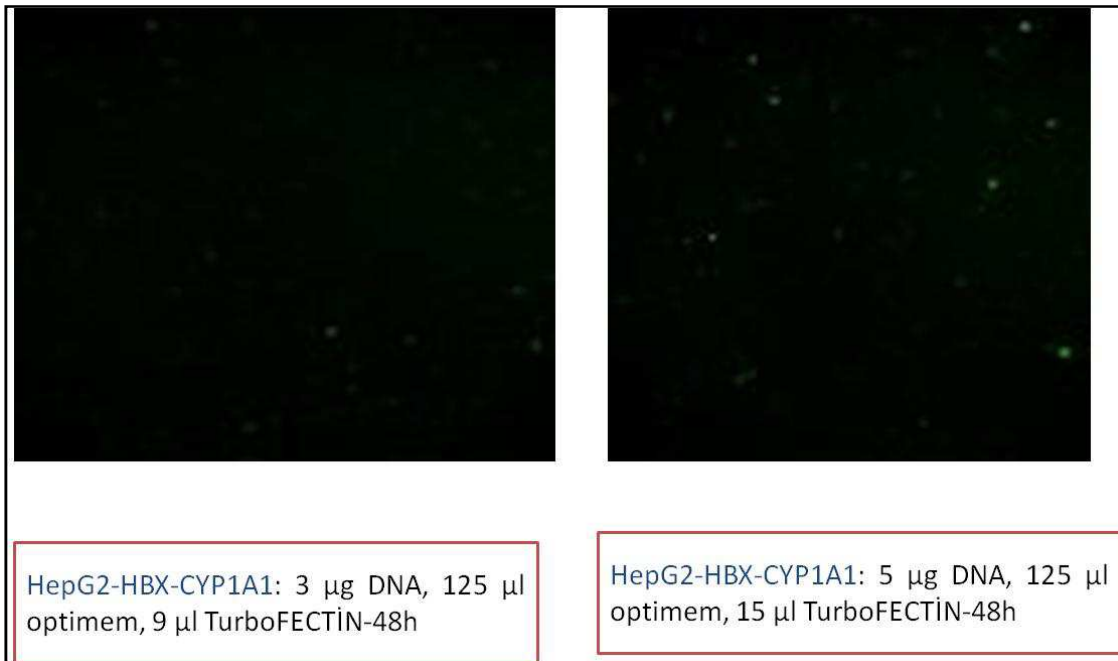
Şekil 6B.



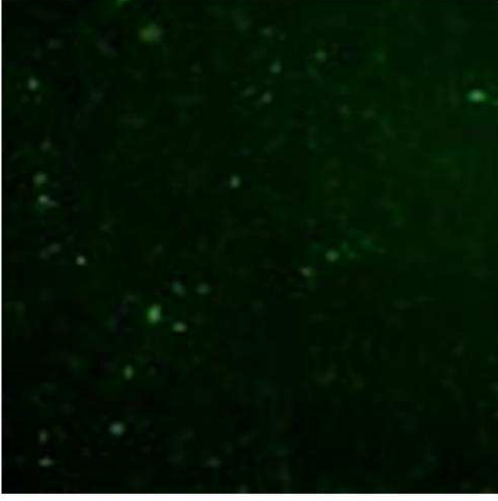
Şekil 6C.



Şekil 6D.



Şekil 6E.

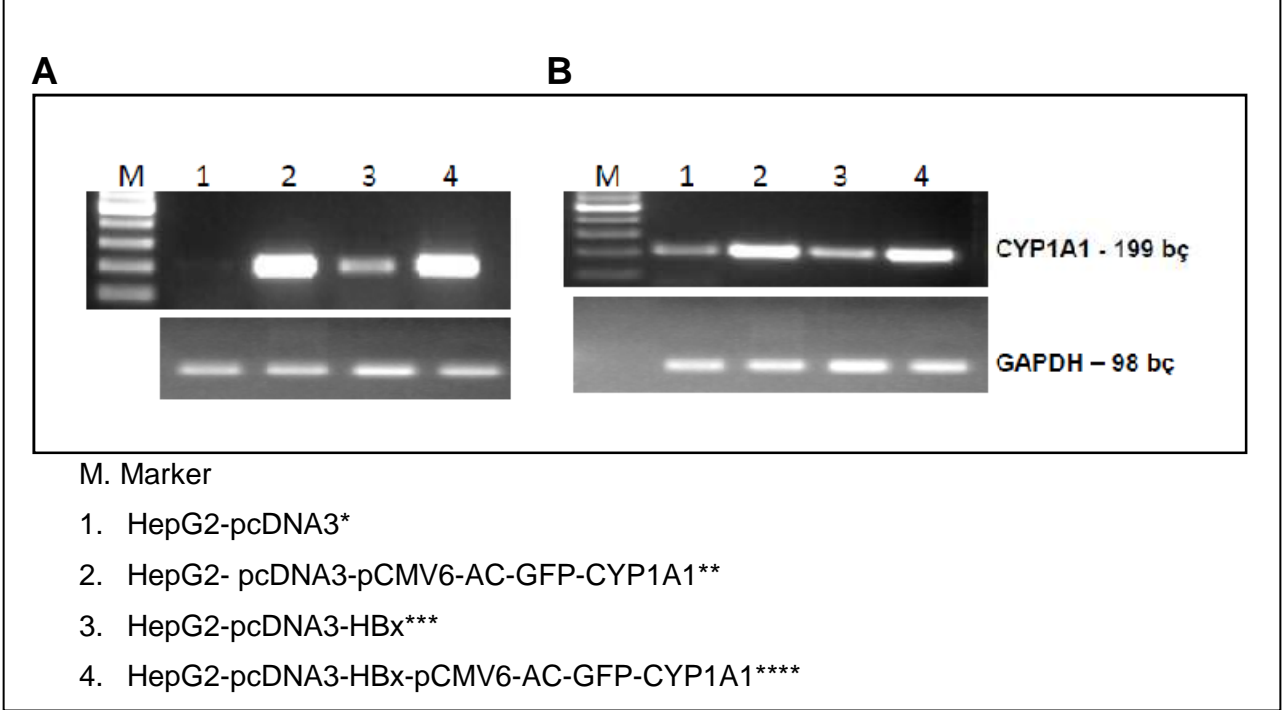


HepG2-HBX-CYP1A1: 5 µg DNA, 125 µl
optimem, 15 µl TurboFECTİN-48h

3.2 Transfeksiyon sonrası hücrelerdeki CYP1A1 varlığının RT-PCR ile kontrolü:

pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücrelerine geçici (transient) transfeksiyonu ile aktarılan CYP1A1 ve kontrol GAPDH RNA ifadesi semikantitatif RT-PCR ile belirlenmiştir (Şekil 7). CYP1A1 ekspresyon düzeyinin floresan mikroskop ile yapılmış olan takiple uyumlu olduğu gözlemlenmiştir

Şekil 7. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücrelerine geçici (transient) transfeksiyonu ile aktarılan CYP1A1 RNA ifadesinin RT-PCR ile belirlenmesi:



* HepG2-pcDNA3 hücre dizinindeki CYP1A1 mRNA ekspresyonu farklı PCR koşullarına göre değişkenlik göstermekle birlikte baz bir miktarda ifade edildiği düşünülmektedir (Şekil 7A ve 7B).

** HepG2-pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücre dizinininde, transfeksiyon sonrasında CYP1A1 mRNA'sı belirgin şekilde artmıştır.

*** HepG2-pcDNA3-HBx hücre dizinindeki CYP1A1 mRNA ekspresyonu baz miktarda ifade edildiği gözlemlenmiştir (Şekil 7A ve 7B).

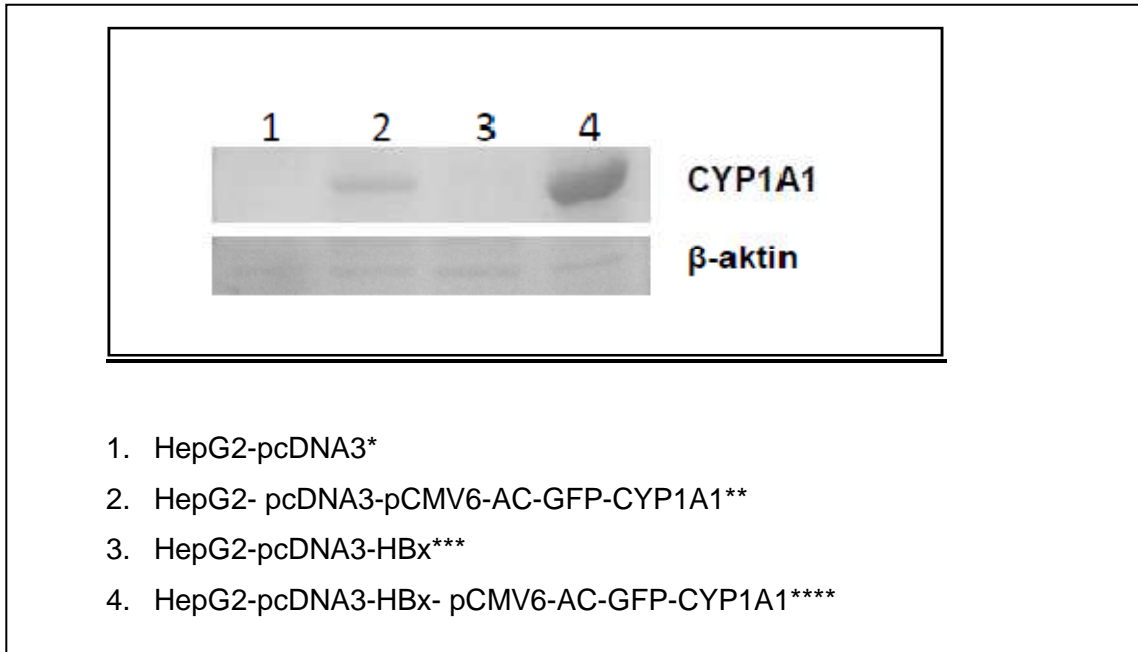
**** HepG2-pcDNA3-HBx-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücre dizininde, transfeksiyon sonrasında CYP1A1 mRNA'sı belirgin şekilde artmıştır.

*** HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-HBx, HepG2-pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1, HepG2-pcDNA3-HBx-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücre dizinleri kullanılarak yapılan Semikantitatif RT-PCR reaksiyonunda, Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) gen ifadesi "kontrol gen ifadesi (housekeeping gene expression)" olarak kullanılmıştır.

3.3 Transfeksiyon sonrası hücrelerdeki CYP1A1 varlığının Western Blot ile kontrolü:

pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücrelerine geçici (transient) transfeksiyonu ile aktarılan CYP1A1 ve kontrol β -Aktin protein ifadesi Western blot ile belirlenmiştir (Şekil 8).

Şekil 8. pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 vektörünün HepG2-pcDNA3 ve HepG2-pcDNA3-HBx hücrelerine geçici (transient) transfeksiyonu ile aktarılan CYP1A1 protein ifadesinin Western Blot ile belirlenmesi:



* HepG2-pcDNA3 hücre dizinindeki CYP1A1 protein ekspresyonu, farklı Western blot koşulları kullanılmasına rağmen (antikor konsantrasyonu, inkübasyon süresi, farklı antikor kullanımı vb) belirgin şekilde ifade edilmediği tespit edilmiştir (Şekil 8).

** HepG2-pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücre dizinininde transfeksiyon sonrasında CYP1A1 protein ifadesi elde edilen 1 western blot deneyinde belirgin şekilde artmıştır (Şekil 8), ancak bu sonuç tekrarlanan Western blot sonuçları ile teyit edilememiştir.

*** HepG2-pcDNA3-HBx hücre dizinindeki CYP1A1 protein ekspresyonu, farklı Western blot koşulları kullanılmasına rağmen (antikor konsantrasyonu, inkübasyon süresi, farklı antikor kullanımı vb) belirgin şekilde ifade edilmediği tespit edilmiştir (Şekil 8).

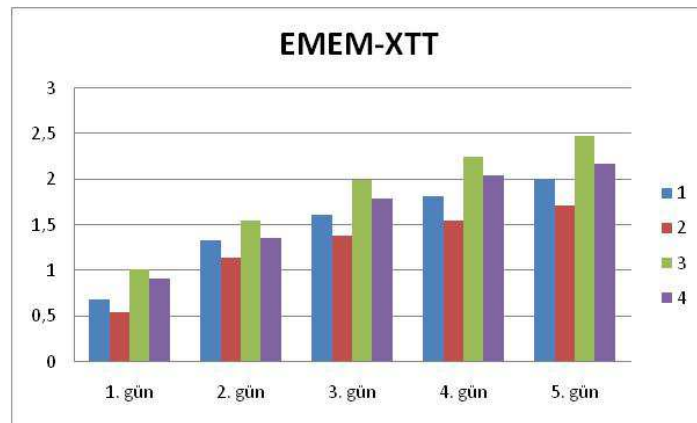
**** HepG2-pcDNA3-HBx-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücre dizininde transfeksiyon sonrasında CYP1A1 protein ifadesi, elde edilen 1 western blot deneyinde belirgin şekilde artmıştır (Şekil 8), ancak bu sonuç tekrarlanan Western blot sonuçları ile teyit edilememiştir.

*** HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-HBx, HepG2-pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1, HepG2-pcDNA3-HBx-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücre dizinleri kullanılarak yapılan Western Blot'ta β -aktin antikoru "kontrol protein ifadesi" olarak kullanılmıştır.

3.4 CYP1A1 ekspresyonunun hücre canlılığına olan etkisinin belirlenmesi:

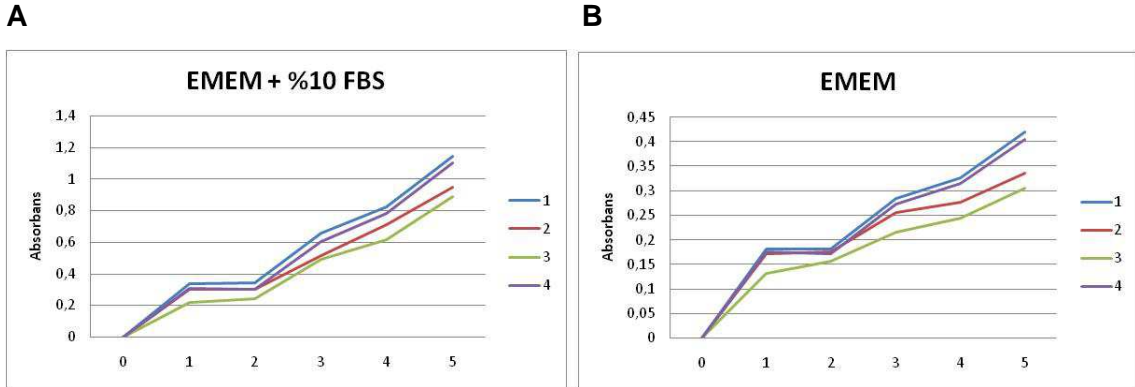
HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-HBx, HepG2-pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1, HepG2-pcDNA3-HBx-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücreleri kullanılarak yapılan hücre canlılığı deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler sonucundan Hücre canlılığı deney sonuçları, CYP1A1 ekspresyonunun yaşama bağlı olduğu ve toksik bir etki göstermediğini göstermektedir (Şekil 9 ve Şekil 10A ve B). CYP1A1 ifadesi varlığında (HepG2-pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1, HepG2-pcDNA3-HBx-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1) veya yokluğunda (HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-HBx), büyüme faktörleri varlığında veya yokluğunda ilgili hücre dizinleri arasında proliferasyon bakımından anlamlı farklılıklar gözlemlenmemiştir (Şekil 9 ve Şekil 10A ve B).

Şekil 9. CYP1A1 ekspresyonunun hücre canlılığına olan etkisinin XTT metodu ile belirlenmesi



1. HepG2-pcDNA3*
2. HepG2- pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1**
3. HepG2-pcDNA3-HBx***
4. HepG2-pcDNA3-HBx- pCMV6-AC-GFP-CYP1A1****

Şekil 10. CYP1A1 ekspresyonunun hücre canlılığına olan etkisinin WSD metodu ile belirlenmesi



1. HepG2-pcDNA3-HBx***
2. HepG2-pcDNA3*
3. HepG2-pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1**
4. HepG2-pcDNA3-HBx-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1****

3.4 İlgili hücrelerde Alkoksirezorufin O-Dealkilaz (AROD) Aktivite Tayini (CYP1A1):

CYP1A1 aktivitesini tayin ve takip etmek için kullanılan en özgün ve hassas metot EROD (7-EtoksiRezorufin O-Deetilaz) aktivitesidir (Burke ve Meyer, 1974). HepG2-pcDNA3, HepG2-pcDNA3-HBx, HepG2-pcDNA3-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1, HepG2-pcDNA3-HBx-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücre homojenatlarında AROD aktiviteleri Burke ve Mayer (1974) metodu ile ve Arınç ve Sen (1994) tarafından optimize edilen şartlar kullanılarak tespit edilmiştir (Şekil 4). Bu aktivite tayinlerinde substrat olarak 7-etoksirezorufin 7-etoksirezorufin substrat için enzim aktivitesi etoksirezorufin O-deetilaz (EROD) olarak isimlendirilmektedir.

CYP1A1 geni içeren plasmidler ile geçici transfekte edilen HepG2-HBx hücrelerinde CYP1A1 mRNA düzeylerinde artış gözlenmiştir. Ancak CYP1A1 mRNA düzeyindeki gözlenen artışlara paralel artışların protein düzeyinde de gerçekleşmediği Western blot tayinleri ve EROD aktivite ölçümleri ile teyit edilmiştir. EROD aktiviteleri HepG2-pcDNA3 hücre hatları (kontrol) ile HepG2-pcDNA3-HBx hücre hatları arasında da anlamlı farklılıklar göstermemiştir. Tespit edilen EROD aktivite düzeylerinin oldukça düşük olması ifade edilen protein düzeyinin etkileşimi tetikleyecek düzeye ulaşmadığını gösterir niteliktedir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

HB X proteini sitoplazmada hücre proliferasyonunda rol oynayan pek çok sinyal iletim yollarını aktive eder (örneğin, ras-raf-MAPK, NF- kappa B, AP-1, Jak/STAT. Bunlardan en önemlisi Nükleer Faktör–kappa B'dir. Nükleer Faktör–kappa B tüm hücre tiplerinde bulunan dimerik bir transkripsiyon faktörüdür. RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-kappa B1 (p50), ve NF-kappa B2 (p52) içeren Rel ailesine aittir. Çok çeşitli uyarılara karşı çok farklı hücrel cevaplarda rol alır; örneğin, stres, bakteriyel ve viral antijenler, serbest radikaller, ultraviyole radyasyon. Nükleer Faktör–kappa B'ye ait hatalı uyarım veya dengesiz aktivasyon durumlarında otoimmün ve inflamatuvar hastalıklar, septik şok, immün gelişim bozuklukları, viral hastalıklar ve kanser en sık karşımıza çıkan durumlardır. Onkogeneizde, özellikle malignleşme potansiyeli gösteren hücrelerde proliferasyonun uyarılması ve apoptozun inhibe edilmesi gibi çok önemli-kritik regülatuar fonksiyonları vardır.

CYP1A1 enzimi hücre içerisinde detoksifikasyonda rol almaktadır. CYP1A1 enziminin aktivitesinin artışı veya gen ekspresyonunun uyarılması hücre için toksik etki oluşturma potansiyelindedir. CYP1A1 geninin ekspresyon artışı ile hücre içi konsantrasyonu artan CYP1A1 enzimi ksenobiyotik metabolizmasında rol alan bir takım reaktif ara metabolitler oluşturmaktadır. Bu reaktif ara metabolitlerin pek çoğu karsinogenez aşamalarında etkili olan maddelerdir. Bu nedenle ksenobiyotikler tarafından bir hücrenin karsinogenez sürecinin başlatılmasında, CYP1A1 geninin ekspresyonunun arttırılması önemli mekanizmalardan birini oluşturmaktadır.

NF-kappa B'nin hücre içi CYP1A1 enzim aktivitesini ve gen ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir. Ancak, Hepatit B varlığındaki hepatoselüler kanser gelişiminde HBx ve CYP1A1 ile ilgili bir araştırma yapılmamıştır. Sunmuş olduğumuz projedeki amacımız, Hepatit B X proteininin ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan CYP1A1 üzerine etkilerini araştırmaktır. Hepatit B virus varlığında gelişen karaciğer kanseri olgularının kansere olan yatkınlıklarının açıklanmasında, CYP1A1 geninin indüklenme mekanizmasının aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

CYP1A1 aktivitesini tayin ve takip etmek için kullanılan en özgün ve hassas metot EROD (7-EtoksiRezorufin O-Deetilaz) aktivitesidir (BURKE ve MEYER, 1974). CYP1A1 aktivitesinin artışı hücrelerde bu enzimin substratı olan çeşitli toksik ajanların etkilerini artırarak değişik patofizyolojik durumlara neden olduğu uzun zamandır bilinmektedir (WHITLOCK, 1996). Ancak, son zamanlarda özellikle CYP1A1'in protein-protein etkileşimleri ile çeşitli yolları uyararak değişik enzimlerin/proteinlerin aktivitelerini etkileyerek yine gen

ifadelerini değiştirebildiği de bildirilmektedir (MARCHAND ve ark., 2004). Bu alışmada Hepatit B virüsünün hepatokarsinogenez oluşumundaki moleküler mekanizmasında HB X proteini ile CYP1A1 etkileşiminin rol alıp almadığı saptanmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlarda CYP1A1 geni içeren plasmidler ile transient-geçici transfekte edilen HepG2-HBx hücreslerinde CYP1A1 mRNA düzeylerinde artış gözlenmiştir. Ancak, CYP1A1 mRNA düzeyindeki gözlenen artışlara paralel artışların protein düzeyinde de gerçekleşmediği EROD aktivite ölçümleri ve Western blot tayinleri ile teyit edilmiştir. EROD aktiviteleri HepG2-pcDNA3 hücre hatları (kontrol) ile HepG2-pcDNA3-HBX hücre hatları arasında anlamlı farklılıklar göstermemiştir. Ayrıca, HepG2-pcDNA3-HBX-pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hatlarında elde edilen nispeten yüksek EROD aktiviteleri de bu iki protein arasında bir etkileşim olduğunu teyit etmemektedir. Bunun nedeni yeterli düzeyde protein ürününün (CYP1A1 proteini) olmaması olabilir. Tespit edilen EROD aktivite düzeylerinin oldukça düşük olması ifade edilen protein düzeyinin etkileşimi tetikleyecek düzeye ulaşmadığını gösterir niteliktedir. Buna ilave olarak, geçici transfeksiyon ile olası etkileşimin gerçekleşmemesi de bir neden olabilir. Ayrıca, sitotoksisite sonuçları da dikkate alındığında HepG2-pcDNA3-HBX pCMV6-AC-GFP-CYP1A1 hücrelerinde transformasyon olmadığını doğrulamaktadır. Hücrelerde artan bir toksisite tespit edilmemiş olması, EROD düzeyinin düşük olması ve CYP1A1 protein düzeyinin nedeysede tayin edilemeyecek düzeyde olması hepatit B bazlı hepatokarsinogenez oluşumunun moleküler mekanizmasında HB X proteini ile CYP1A1 arasında bir etkileşiminin rol oynamadığını doğrular niteliktedir. En azından etkileşim var ise bile, bunun CYP1A1 aktivitesinin değişik yolları uyaracak ve toksisite oluşturacak düzeye ulaşmamış olması düşünülebilir. Fakat kesin sonuçlara ulaşabilmek ve daha kapsamlı bir çıkarım yapabilmek için kararlı transfeksiyon, ko-immunopresipitasyon ve EMSA (elektroforetikmobilitate kayma testi) gibi ilave deneyler gerçekleştirilmesi gereklidir. Ayrıca, transfeksiyon süresince besiyeri ortamına CYP1A1 indükleyici substratlar eklenmesi gibi değişik şartların denenmesi düşünölmektedir, çünkü literatürde CYP1A1 bazlı etkileşimlerde CYP1A1'in ligandı ile aktive olması gerektiğini bildiren öneriler yer almaktadır. Proje süresi tamamlandıktan sonra bu deneylere devam edilmektedir. Sonuç olarak, mevcut veriler HB X proteini ile CYP1A1 arasında bir etkileşiminin olmadığını ve bunun CYP1A1 aktivitesine etki etmediğini göstermektedir.

Referanslar

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

ARINÇ, E. and Philpot, R.M. Preparation And Properties Of Partially Purified Pulmonary Cytochrome P-450 From Rabbits. *J. Biol. Chem.*, 251:3213-3220, (1976).

BAROUKİ R, Morel Y. Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol.*, 61(5):511-6 (2001).

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

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. (1984). pp. 209-224.

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. USA*, 91, 10350-10354, (1994).

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

BURKE, M., and Mayer, R. (1974). Ethoxyresorufin: directfluometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylchloranthrene. *Drug Metab Dispos* 2:583-588.

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).

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

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).

CONNAY AH, Burns JJ. Metabolic interactions among environmental chemicals and drugs. *Science* 178(61):576-86, (1972).

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).

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 USA*, 94, 14707-14712, (1997).

FEITELSON M.A., Duan L.X., Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma, *Am J Pathol*, 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., Reis, H., Pan, J., Lian, Z., Fang, J., Liu, J., Zhu, X., Zhu, M., Sun, B., Abrogation of negative growth regulatory pathways by hepatitis B virus encoded X antigen in the development of hepatocellular carcinoma, In *Normal and Malignant Liver Cell Growth: FALK Workshop*. WE Fleig, Ed. Kluwer Academic Publishers, Lancaster, UK, (1999), pp.156-170.

GELBOIN HV. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev*. 60(4):1107-66 (1980).

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).

GUENGERICH FP, Kim DH, Iwasaki M: Role of human cytochrome P450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol* 4: 168-179, (1998).

HAHN ME, Stegeman JJ. Regulation of cytochrome P4501A1 in teleosts: sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Toxicol Appl Pharmacol.* 127(2):187-98 (1994).

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).

HEIDELBERGER C. Current trends in chemical carcinogenesis. *Fed Proc.* 32(12):2154-61, (1973).

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

HOHNE M., Schaefer S., Seifer M., Feitelson M.A., Paul D., Gerlich W.H., Malignant transformation of immortalized transgenic hepatocytes after transfection with hepatitis B virus DNA, *EMBO J*, 9, 1137-1145, (1990).

JEFCOATE, C.R., Liehr, J.G., Santen, R.J., Sutter, T.R., Yager, J.D., Yue, W., Santner, S.J., Katayama K., Hayashi N., Sasaki Y., Kasahara A., Ueda K., Fusamoto H., Sato N., Chisaka O., Matsubara K., Kamada T., Detection of hepatitis B virus X gene protein and antibody in type B chronic liver disease, *Gastroenterology*, 97, 990-998, (1989).

KIM H., Lee H., Yun Y., X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells, *J Biol Chem*, 273, 381-385, (1998).

KLOTZ, U., Ammon, E. Clinical and toxicological consequences of the inductive potential of ethanol. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 54, 7-12, (1998).

KOIKE K., Moriya K., Iino S., Yotsuyanagi H., Endo Y., Miyamura T., Kurokawa K., High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice, *Hepatology*, 19, 810-819, (1994).

LEE T.H., Elledge S.J., Butel J.S., Hepatitis B virus X protein interacts with a probable cellular DNA repair protein, *J Virol*, 69, 1107-1114, (1995).

LEE Y.H., Yun Y., HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling, *J Biol Chem*, 273, 25510-25515, (1998).

LIAN Z., Pan J., Liu J., Zhu M., Arbuthnot P., Kew M.C., Feitelson M.A., The translation initiation factor, SUI1, may be a target of hepatitis B x antigen in hepatocarcinogenesis, *Oncogene*, 18, 1677-1687, (1999).

LIEBER, C.S. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): The first 30 years 1968-1998)- A Review. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* 23, 991-1007, (1999).

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 AY: CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1009-1016.

MAGUIRE H.F., Hoeffler J.P., Siddiqui A. HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions, *Science*, 252, 842-844, (1991).

MARCHAND A, Barouki R, Garlatti M.(2004) Regulation of NAD(P)H:quinoneoxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity. *Mol Pharmacol.* 65(4):1029-37.

MATSUBARA K., Tokino T., Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis, *Mol Biol Med*, 7, 243-260, (1990).

MCLEMORE, T.L., Adelberg, S., Liu, M.C., McMahon, N.A., Yu, S.J., Hubbard, W.C., Czerwinski, M., Wood, T.G., Storeng, R., Lubet, R.A., et al. Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1333-1339, (1990).

NATOLI G., Avantaggiati M.L., Chirillo P., Costanzo A., Artini M., Balsano C., Levrero M., Induction of the DNA binding activity of c-Jun/c-Fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator pX, *Mol Cell Biol*, 14, 989-998, (1994).

OLEKSIK, M. F., Wu, S., Parker, Qu, W., Cox, R., Zeldin, D. C., and Stegeman, J. J. Identification and regulation of a new vertebrate cytochrome P450 subfamily, the CYP2Ps, and functional characterization of CYP2P3, a conserved arachidonic acid epoxygenase/19-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 411(2): 223-234, (2002).

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).

PORTER, T. D., and Coon M. J. Cytochrome P450, Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 266(2 1):13469-13472, (1991).

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).

ROSSNER M.T., Hepatitis B virus X-gene product: a promiscuous transcriptional activator, *J Med Virol*, 36, 101-117, (1992).

SIRMA, H., Giannini, C., Poussin, K., Paterlini, P., Kremsforf, D., Brechot, C., Genetic and functional analysis of the effects of hepatitis B viral transactivator HBx on cell growth and apoptosis: implications for viral replication and hepatocarcinogenesis, In *Normal and Malignant Liver Cell Growth: FALK Workshop*. WE Fleig, Ed. Kluwer Academic Publishers, Lancaster, UK, pp. 171-186, (1999).

SIVARAMAN, L., Leatham, M.P., Yee, J., Wilkens, L.R., Lau, A.F., Le Marchand, L. CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Res.* 54:3692-3695, (1994).

SUN B.S., Zhu X., Clayton M.M., Pan J., Feitelson M.A., Identification and preliminary characterization of a protein involved in cellular senescence which binds to hepatitis B virus X antigen, *Hepatology*, 27, 228-239, (1998).

Tekmal, R., Demers, L., Pauley, R., Naftolin, F., Mor, G., Berstein, L. Tissuespecific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 95-112, (2000).

UEDA H., Ullrich S.J., Gangemi J.D., Kappel C.A., Ngo L., Feitelson M.A., Jay G., Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer, *Nat Genet*, 9, 41-47, (1995).

WANG W., London W.T., Feitelson M.A., Hepatitis B x antigen in hepatitis B virus carrier patients with liver cancer, *Cancer Res*, 51, 4971-4977, (1991).

WANG W., London W.T., Lega L., Feitelson M.A., Hepatitis B x antigen in liver from carrier patients with chronic hepatitis and cirrhosis, *Hepatology*, 14, 29-37, (1991a).

WANG X.W., Forrester K., Yeh H., Feitelson M.A., Gu J., Harris C.C., Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity and association with ERCC3, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 2230-2234, (1994).

WHITLOCK JP Jr, Okino ST, Dong L, Ko HP, Clarke-Katzenberg R, Ma Q, Li H (1996) Cytochromes P450 5: induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *Review FASEB J.* 10(8): 809-818.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: 111T612
Proje Başlığı: Hepatit B X Proteininin Ksenobiyotik Metabolizmasında Rol Oynayan CYP1A1 Üzerine Etkilerinin Araştırılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. N. Lale Şatıroğlu-Tufan, Tuğba Koç
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK-TBAG
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1 Ağustos 2011 – 1 Ağustos 2012
Öz (en çok 70 kelime) HB X proteini hücre proliferasyonunda rol oynayan Nükleer Faktör-kapa-B'yi aktive eder. Nükleer Faktör-kapa-B onkogeneze, özellikle malignleşme potansiyelindeki hücrelerde proliferasyonun uyarılması ve apoptozun inhibe edilmesi gibi çok-önemli-kritik regülatuar fonksiyonları vardır. CYP1A1 enzimi hücre içerisinde detoksifikasyonda rol almaktadır. NF-kappa B'nin hücre içi CYP1A1 enzim aktivitesini ve gen ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir. Tamamlamış olduğumuz projede, Hepatit B X proteininin ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan CYP1A1 ile olan olası etkileri HepG2 hücre dizisinde araştırılmıştır.
Anahtar Kelimeler: HB X proteini, CYP1A1
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/>
<small>Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.</small>
Projeden Yapılan Yayınlar:
Ekte Bulunan “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”, “Kazanımlar” Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarının Başarı Öyküsü Niteliği Taşındığını Düşünüyorsanız “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”nu doldurunuz.