

T.C.
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA KEMİK MORFOJENİK
PROTEİN 9 (BMP9)'UN siRNA İLE BASKILANARAK FONKSİYONEL
ANALİZİ

Hazırlayan:

Tuğçe YAŞAR

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk HATİPOĞLU

Bu tez TUBİTAK 3001 projesi (Proje No: 213S111) kapsamında desteklenmiştir

Ankara-Haziran 2015

T.C.
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA KEMİK MORFOJENİK
PROTEİN 9 (BMP9)'UN siRNA İLE BASKILANARAK FONKSİYONEL
ANALİZİ

Hazırlayan:

Tuğçe YAŞAR

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk HATİPOĞLU

Bu tez TUBİTAK 3001 projesi (Proje No: 213S111) kapsamında desteklenmiştir

Ankara-Haziran 2015

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

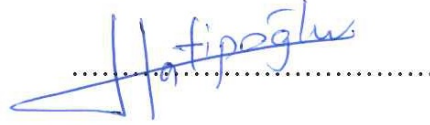
Turgut Özal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

Tuğçe YAŞAR

ONAY

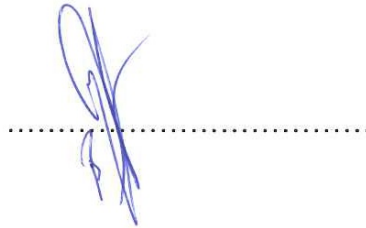
Tuğçe YAŞAR tarafından hazırlanan “*HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA KEMİK MORFOJENİK PROTEİN 9 (BMP9)’UN siRNA İLE BASKILANARAK FONKSİYONEL ANALİZİ*” başlıklı bu çalışma,16/06/2015 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda (*oybirliği/oyçokluğu*) ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından TIBBİ GENETİK ANABİLİM dalında *Yüksek lisans* tezi olarak kabul edilmiştir.



Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk HATİPOĞLU
(Danışman)



Yrd. Doç. Dr. Murat ÖZNUR



Doç. Dr. Beyhan CENGİZ

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca mesleki yetenek ve bilgi birikimine hayran olduğum, hiçbir zaman sorumluluk vermekten kaçınmayıp bana sonsuz güvenen, her zaman güler yüzüyle deneyimlerini bizimle paylaşan, hem mükemmel bir anne, hem bir hanımefendi ve de başarılı bir akademisyen olunabileceğinin en güzel örneğini sergileyen Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Sayın Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ'e sonsuz teşekkür ederim.

Bilimselliğini, yapıcı ve yaratıcı düşünme şekli ile davranışlarını örnek almaya çalıştığım Prof. Dr. Mehmet GÜNDÜZ'e lisansüstü eğitimim boyunca desteğini, eleştirilerini, fikirlerini benden esirgemediği için teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında yakın ilgisi ve önerileri ile beni yönlendiren, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bana destek olan ve güler yüzünü hiç eksik etmeyen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk HATİPOĞLU'na minnet duygularımı iletmeyi bir borç bilirim.

Lisansüstü öğrenimim boyunca bilgi birikimime katkıda bulunan, destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Muradiye ACAR, Yrd. Doç. Dr. Sultan YILMAZ, Yrd. Doç. Dr. Murat ÖZNUR'a, Dr. Eyyüp ÜÇTEPE'ye, Arş. Gör. Burak YILMAZ'a teşekkür ederim.

Tezimin her aşamalarında yer alıp, deneyim ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmamın farklı aşamalarında yönlendirmeleri ile yol gösteren ve tezimin hazırlanmasında önemli katkıları olan Sayın Dr. Sadık ÇİĞDEM'e sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca tanımaktan mutluluk duyduğum, maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan değerli arkadaşlarım Catherine MOROSKİ-ERKUL, Beyzanur YİĞİTOĞLU, Bilge KALYONCU, Gizem SEVİNÇ, Dilara ACER, Esra EROĞLU, Kübra AKBAŞ, Kübra YILDIRIM, Elif Nihan ÇETİN, Ayfer BAYATOĞLU, Nazlı KURT, Birsen DOĞAN, Esmanur BAL, Büşra

AYNEKİN, Onur BENDER, Yunus Emre BİLGEN, Hayrettin ÖKSÜZ'e teşekkürü borç bilirim.

Hayatım boyunca her koşulda beni destekleyen ve güvenen, hiçbir fedakârlıktan çekinmeyen varlıkları benim için büyük bir nimet olan sevgili annem Ayfer YAŞAR'a, sevgili babam Resul YAŞAR'a canım kardeşim İlyas YAŞAR'a ve Büşra YAŞAR'a sonsuz teşekkür ediyorum.

Bu çalışmamın uygulama kısmında 3001 Başlangıç Ar-Ge Projelerini Destekleme Programı 213S111 nolu proje ile beni destekleyen TÜBİTAK'a çok teşekkür ederim.

Tuğçe YAŞAR

Ankara-Haziran 2015

ÖZET

[YAŞAR, Tuğçe]. [Hepatosellüler Karsinomada Kemik Morfojenik Protein 9 (BMP9)'un siRNA ile Baskılanarak Fonksiyonel Analizi], [Yüksek lisans tezi], Ankara, [2015].

Hepatosellüler karsinoma (HSK) genelde kronik karaciğer zemininde gelişen karaciğerin primer bir tümörüdür. Kronik karaciğer hastalığı zemininde gelişen HSK on yıllar boyunca mevcut cerrahi ve cerrahi uygulanamayan vakalarda kemoembolizasyon, kemoterapi, alkol enjeksiyonu, radyofrekans ablasyonu gibi yöntemlerdeki gelişmelere rağmen sağkalım oranlarında önemli bir değişim olmamıştır. Mevcut tedavilerin yetersiz kalmasında en büyük etken, kanserin başlangıç ve sonraki büyüme mekanizmalarının bilinmemesi, erken teşhisin yapılamamasıdır.

Son yıllarda en heyecan verici buluş küçük engelleyici RNA (siRNA)'ların gen sessizleştirilmesinde kullanılabilir olmasıdır. Mekanizma olarak RNAi (RNA interferans), gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir sistemdir.

Kemik Morfojenik Protein (BMP), büyüme faktörlerinin geniş bir ailesi olan Transforme edici büyüme faktörü beta ailesinin (TGF- β) bir üyesidir. BMP ailesinin alt üyesi olan BMP9, hücre farklılaşmasında, çoğalmasında, büyümesinde, apoptozda önemli rol oynamaktadır. BMP9 ekspresyon analizi, BMP9 proteininin hepatositler ve intrahepatik safra yolu epitel hücreleri tarafından üretildiğini göstermektedir.

Bu çalışmada; HepG2 insan hepatosellüler karsinoma hücre hattı, BMP9 genine özgü siRNA ile transfekte edilerek BMP9 geninin ne kadar sessizleştirildiği ve gen ekspresyon düzeyi total RNA kullanılarak qRT-PCR'da belirlenmiştir. Aynı şekilde BMP9 sinyal yol alt bileşenleri olan SMAD1/5/8, SMAD4 ve hedef genlerden p21, Id1 ve Id2 genlerinin ekspresyonları bu genlere özgü mRNA primerleri tasarlanarak bloke edilip edilmediği ortaya konuldu. Bununla beraber protein seviyesindeki değişiklikleri gözlemleyebilmek için de BMP9 ve alakalı diğer proteinler Western Blotting yapılarak teyit edilmesi sağlanmıştır. Bu

sessizleştirmenin hücre çoğalmasını nasıl etkilediği xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile ortaya konmuştur.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, HepG2 insan hepatosellüler karsinoma hücre hattında BMP9-siRNA kullanımı sonucu en etkili susturmanın 48.saatte 25nM konsantrasyonda (%64) olarak belirlendi. Aynı zamanda BMP9, HepG2 hücrelerinde hücre proliferasyonunu susturduğu (baskıladığı) da ortaya konmuştur. Sonuç olarak hepatosellüler karsinomada önemli rol olan BMP-9 geninin siRNA yöntemi kullanılarak sessizleştirilmesi ve hepatosellüler karsinoma oluşum mekanizmalarında en önemli aşamalardan biri olan bu sürecin tedavisinin mümkün kılınacağını ve kanser tedavisinde oldukça faydalı bir araç olabileceği belirlendi.

Anahtar Sözcükler

1. Kanser
2. Hepatosellüler karsinoma
3. BMP9
4. RNAi
5. siRNA

ABSTRACT

[YASAR, Tugce]. [Functional Analysis of siRNA-mediated knock-down of Bone Morphogenetic Protein 9 (BMP9) in Hepatocellular Carcinoma], [Master's Thesis], Ankara, [2015].

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a primary tumor of the liver that generally develops as a result of chronic liver disease. Available treatments include surgery, or in cases in which surgery is not a viable option, treatment methods such as chemoembolization, chemotherapy, alcohol injection and radiofrequency ablation are used. Despite decades of developments in these treatments for HCC, there has been no significant change in the survival rate for patients with this disease. The major factors that contribute to the insufficiency of treatment is the fact that early diagnosis is not possible, there is insufficient understanding of how this cancer develops, and little knowledge of subsequent growth mechanisms.

In recent years, the most exciting finding has been the possible use of small-interfering RNA (siRNA) for gene silencing. The mechanism involved, RNA interference, plays an important role in regulation of gene expression.

Bone morphogenetic proteins (BMP) makes up a large family of growth factors and is a member of the TGF beta (TGF- β) family. One of the members of the BMP family, BMP9, plays an important role in cell differentiation, proliferation, growth and apoptosis. Expression analysis has shown that BMP9 is produced by hepatocytes and intrahepatic and biliary tract epithelial cells.

In this study, using transfection of BMP9-specific siRNA to a human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2), we show gene knock-down using qRT-PCR. We analyze the expression of genes in the BMP9 pathway including SMAD 1/5/8, SMAD4 and target genes p21, Id1 and Id2. In addition, we also analyzed changes in protein expression of these genes using Western Blot. To determine the effect of BMP9 siRNA-mediated knock-down on cell proliferation, we used the xCELLigence real-time cell analysis system.

The most significant level of BMP9 knock-down (64%) was seen with a dose of 25 nM at 48 hours after transfection of HepG2 cells. It is also shown that BMP9 reduces proliferation in HepG2 cells. In conclusion, using siRNA silencing of BMP9, which is known to play an important role in HCC, we show that this gene plays an important role in development of HCC and that suppression of this gene could be used in cancer treatment.

Keywords

1. Cancer
2. Hepatocellular carcinoma
3. BMP9
4. RNAi
5. SiRNA

İçindekiler Tablosu

ÖNSÖZ-----	i
ÖZET -----	iii
KISALTMALAR -----	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ-----	xiv
TABLolar DİZİNİ-----	xvii
1. GİRİŞ -----	1
2. GENEL BİLGİLER-----	4
2.1. KANSER	4
2.2. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA	6
2.2.1. Cinsiyet	6
2.2.2. Yaş	7
2.2.3. Irksal ve Etnik Farklılıklar	7
2.3. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMAYA NEDEN OLAN ETKENLER....	7
2.3.1. Hepatit B	8
2.3.2. Hepatit C	9
2.3.3. Çevresel Toksik Maddelere Maruziyet	10
2.3.4. Alkol Kullanımı	10
2.3.5. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı.....	10
2.3.6. Diyabetes Mellitus	11
2.3.7. Hemokromatozis	11
2.3.8. Wilson Hastalığı (Hepatolentiküler dejenerasyon)	11
2.4. KLİNİK BULGULAR	12
2.5. EVRELEME ve SINIFLANDIRMA	12
2.6. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA TANI.....	15
2.6.1. AFP ve Diğer serum belirteçleri	15
2.6.2. Görüntüleme Yöntemleri	16
2.6.2.1. Ultrasonografi (USG) -----	16
2.6.2.2. Bilgisayarlı Tomografi (BT) -----	16

2.6.2.3.	Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) -----	17
2.6.2.4.	Anjiografi -----	17
2.6.2.5.	BT Hepatik Arteriografi ve Arteriyel portografi -----	17
2.7.	HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA TEDAVİ YAKLAŞIMI.....	18
2.7.1.	Parsiyel Hepatektomi	18
2.7.2.	Ortotopik Karaciğer Transplantasyonu (OLT).....	18
2.7.3.	Radyofrekans Ablasyon (RFA).....	19
2.7.4.	Perkütan Etanol Enjeksiyonu (PEI)	19
2.7.5.	Transarteriyel Kemoembolizasyon (TACE)	20
2.7.6.	Hormonal Tedavi	20
2.7.7.	Sistemik Kemoterapi.....	20
2.8.	EPIGENETİK.....	21
2.9.	RNA İNTERFERANS (RNAi)	21
2.9.1.	MikroRNA (miRNA).....	22
2.9.2.	Küçük engelleyici RNA (small interfering RNA= siRNA).....	23
2.9.2.1.	Sentetik siRNA' ların Transfeksiyonu-----	24
2.9.2.2.	siRNA'ların Kanser Tedavisindeki Kullanım Alanları-----	25
2.10.	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β) ve Sinyalizasyon Yolu.....	27
2.11.	Bone Morfojenik Proteinlerin (BMP) Sınıflandırılması ve Kimyasal Yapısı	29
2.12.	BMP'nin Sinyal Mekanizması	32
3.	MATERYAL VE YÖNTEMLER -----	33
3.1.	KULLANILAN MATERYALLER	34
3.1.1.	Kimyasal Sarf Malzemesi	34
3.1.2.	Kullanılan Cihazlar ve Üretici Firmaları	36
3.2.	KULLANILAN YÖNTEMLER	38
3.2.1.	Hücre Kültürü.....	38
3.2.1.1.	Hücre Kültüründe Kullanılan Medyumun Hazırlanışı -----	39
3.2.1.2.	Stok Hücrelerin Ekimi -----	39
3.2.1.3.	Medyum Değişimi -----	40
3.2.1.4.	Hücrelerin Pasajlanması -----	40

3.2.1.5.	Hücre Sayımı	41
3.2.2.	siRNA'ların Hazırlanması.....	41
3.2.3.	xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Proliferasyon Analizi	42
3.2.4.	Hücelere siRNA'ların Transfeksiyonu	43
3.2.5.	mRNA Düzeyinde Susturmanın Gösterilmesi	44
3.2.5.1.	TRİZOL ile Hücreden RNA İzolasyonu	44
3.2.5.2.	RNA'ların cDNA Formuna Çevrilmesi	45
3.2.5.3.	BETA AKTİN, GAPDH, BMP9 ve Hedef Genlerin Primerlerinin Hazırlanması.....	46
3.2.5.4.	Gradyent PCR	48
3.2.5.5.	Agaroz Jel Elektroforezi	49
3.2.5.6.	Jel Ekstraksiyonu	50
3.2.5.7.	Real-time PCR için Standartların Hazırlanması.....	51
3.2.5.8.	Kantitatif Real Time PCR (RT-PCR) Protokolü	51
3.2.6.	Protein Düzeyinde Baskılamanın Gösterilmesi	53
3.2.6.1.	Protein İzolasyonu	53
3.2.6.2.	Hücrelerden Protein İzolasyonu	53
3.3.	WESTERN BLOTTİNG	54
3.3.1.	Proteinlerin Boyanması	54
3.3.2.	%10'luk SDS-PAGE Jelin Hazırlanması	54
3.3.3.	Jelin Hazırlanması:.....	56
3.3.4.	Proteinlerin Jele Yüklenmesi	57
3.3.5.	Membrana Transfer Aşaması	58
3.3.6.	Bloklama	58
3.3.7.	Birincil Antikorla Muamele	59
3.3.8.	Yıkama	60
3.3.9.	İkincil Antikorla Muamele	60
3.3.10.	Yıkama ve Görüntüleme	61
3.4.	Dokuların Temini	61

3.4.1.	mRNA Düzeyinde Ekspresyonun Gösterilmesi.....	62
3.4.1.1.	Dokulardan RNA İzolasyonu -----	62
3.4.1.2.	RNA'ların cDNA Formuna Çevrilmesi -----	62
3.4.1.3.	Gradient PCR Çalışması -----	62
3.4.1.4.	Kantitatif Real Time PCR Çalışması -----	62
3.5.	PARAFİN DOKUDAN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA.....	63
4.	BULGULAR -----	65
4.1.	siRNA UYGULAMASININ HepG2 HÜCRELERİNE UYGULANMASI ARDINDAN MORFOLOJİLERİNİN GÖZLEMLENMESİ	65
4.2.	HepG2 HÜCRE PROLİFERASYONU ÜZERİNDE BMP9-siRNA UYGULAMASININ ETKİSİ	66
4.2.1.	HepG2 hücresinde BMP9-siRNA uygulamasının etkisi.....	67
4.3.	BMP9-siRNA'nın ETKİSİNİ GÖSTEREN REAL-TİME PCR SONUÇLARI	68
4.3.1.	HepG2 Hücre Hattında BMP9-siRNA'nın BMP9 ve GAPDH Ekspresyonlarına Olan Etkisinin Real-Time PCR Sonuçları	69
4.3.2.	HepG2 hücre hattında BMP9 siRNA uygulama sonrası BMP9 sinyal yol alt bileşenleri ve hedef genlerin ekspresyonlarına olan etkisinin Real-Time PCR sonuçları70	
4.4.	BMP9-siRNA'nın ETKİSİNİ GÖSTEREN WESTERN BLOTTİNG SONUÇLARI	74
4.4.1.	HepG2 Hücre Hattında BMP9-siRNA Uygulamasının BMP9, P-SMAD 1/5/8, Anti-SMAD 1/5/8, ID-1, ID-2 Ve Anti-p21 Proteinlerine Olan Etkisinin Western Blotting Sonuçları.....	75
4.5.	HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA ve NORMAL HEPATOSİT DOKULARINDA BMP9 EKSPRESYONUNUN REAL-TİME PCR SONUÇLARI	79
4.6.	PARAFİN DOKUDAN İMMÜNOHİSTOKİMYA BOYAMA ANALİZİ SONUÇLARI	80
5.	TARTIŞMA -----	81
6.	SONUÇ -----	87
7.	KAYNAKLAR -----	89

KISALTMALAR**Acıklaması**

AFP.....	Alpha-FetoProtein
ALK1.....	Activin Receptor-Like Kinase
AMH.....	Antimullerian Hormone
BMP9.....	Bone Morphogenetic Protein9
BT.....	Computed Tomography
CDK.....	Cyclin-Dependent Kinase
dsRNA.....	Double-Stranded RNA
FGF.....	Fibroblast-Like Growth Factor
HSK.....	Hepatocellular Carcinoma
HBV.....	Hepatitis B virus
HBsAg.....	Hepatit B Surface Antigen
HCV.....	Hepatitis C virüs
HFE.....	Hemochromatosis Gene
HPV.....	Human Papilloma Virus
ID1.....	İnhibitor of DNA Binding-1
ID2.....	İnhibitor of DNA Binding-2
IGF.....	Insulin-Like Growth Factor
MAPK.....	Mitogen-Activated Protein Kinase
miRNA.....	MicroRNA
MRG.....	Magnetic Resonance İmaging
NAYK.....	Non Alkolik Steatohepatit
OLT.....	Orthotopic Liver Transplantation
PEI.....	Percutaneous Ethanol İnjection
PI3K.....	Fosfoinozitid 3- Kinase

PDGF.....	Platelet-Derived Growth Factor
RNAi.....	RNA Interference
RFA.....	Radio-Frequency Ablation
RISC.....	RNA-Induced Silencing Complex
siRNA.....	Small Interfering RNA
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TACE.....	Transarterial Chemoembolization
T β RI.....	Transforming Growth Factor Beta Type I
T β RII.....	Transforming Growth Factor Beta Type II
T β RIII.....	Transforming Growth Factor Beta Type III
USG.....	Ultrasonography
VEGF.....	Vascular Endothelial Growth Factor

SEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kanser hücrelerinin oluşumu.....	5
Şekil 2. HSK ile HBV insidansı arasındaki paralel coğrafik ilişki.....	8
Şekil 3. HCV enfeksiyonunun doğal seyri.....	9
Şekil 4. miRNA mekanizması.....	23
Şekil 5. siRNA'nın gen ifadesini engellemesi.....	24
Şekil 6. RNA susturma mekanizmasının genel işleyişi.....	26
Şekil 7. TGF- β 'nin antiproliferatif etkisini sağladığı aracı moleküller.....	29
Şekil 8. BMP sinyal mekanizması.....	32
Şekil 9. Çalışmamızda kullanılan metodların akış şeması.....	33
Şekil 10. Bio-Rad's New TC10™ Automated Cell Counter'da hücre sayım	
Aşamaları.....	41
Şekil 11. Hepatosellüler karsinoma hücrelerine (HepG2) 25nM BMP9-siRNA, NT- siRNA ve GAPDH-siRNA uygulamasından 24 saat sonra hücrelerin görünümleri.....	65
Şekil 12. Hepatosellüler karsinoma hücrelerine (HepG2) 25nM BMP9-siRNA, NT-siRNA ve GAPDH-siRNA uygulamasından 48 saat sonra hücrelerin görünümleri.....	66
Şekil 13. HepG2 hücrelerinin xCELLigence grafiği. Yeşil (kontrol), kırmızı (25nM BMP9- siRNA) uygulanması.....	67
Şekil 14. HepG2 hücrelerinin xCELLigence grafiği. Mavi (kontrol), pembe (25nM BMP9-siRNA) ve FBS(+). Kırmızı (kontrol), yeşil (25nM BMP9-siRNA) ve FBS (-) uygulanması.....	67

Şekil 15. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-GAPDH siRNA uygulaması sonrasında GAPDH ekspresyonunun RT-PCR sonucu.....	69
Şekil 16. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında BMP9 ekspresyonunun RT-PCR sonucu	69
Şekil 17. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında Anti-P21 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu.....	70
Şekil 18. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında ID1 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu.....	71
Şekil 19. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında ID2 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu.....	71
Şekil 20. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında SMAD1 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu.....	72
Şekil 21. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında SMAD5 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu.....	72
Şekil 22. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında SMAD8 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu.....	73
Şekil 23. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında SMAD4 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu.....	73
Şekil 24. HepG2 hücre hattında 48 saatlik BMP9-siRNA sonrası western blot yöntemiyle BMP9, P-MAD 1/5/8, Anti SMAD 1/5/8, Id-1, Id-2, p21 ve β -actin tayini. 1. Kontrol, 2. Kontrol, 3. BMP9-siRNA, 4. BMP9-siRNA....	75
Şekil 25. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında BMP9 ekspresyonunun western blotting sonucu.....	75
Şekil 26. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında P-SMAD 1/5/8 protein ekspresyonunun western blotting sonucu.....	76

- Şekil 27.** HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında ANTI-SMAD 1/5/8 protein ekspresyonunun western blotting sonucu.....76
- Şekil 28.** HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında ID1 protein ekspresyonunun western blotting sonucu.....77
- Şekil 29.** HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında ID2 protein ekspresyonunun western blotting sonucu.....77
- Şekil 30.** HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında Anti-p21 protein ekspresyonunun western blotting sonucu.....78
- Şekil 31.** Hepatosellüler karsinoma ve Normal hepatosit dokularında BMP9 (GDF2) ekspresyonu.....79
- Şekil 32.** Parafin dokularında anti-BMP9 antikorunu kullanılarak immünohistokimya analizi.....80

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Hepatosellüler karsinomada AJCC'ye göre evreleme.....	13
Tablo 2. Primer tümör (T), Bölgesel Lenf Bezleri (N) ve Uzak Metastaz (M) değerlendirmesi (TNM evrelemesi).....	14
Tablo 3. BMP ailesi.....	31
Tablo 4. HepG2 hücre hattının özellikleri.....	38
Tablo 5. Transfeksiyon için karışımın hazırlanması.....	43
Tablo 6. Hedef genlerin ekspresyon analizi için yapılan RT-PCR'da kullanılan primer listesi	47
Tablo 7. Gradient PCR çalışması için gerekli reaktifler ve miktarları.....	48
Tablo 8. Gradient PCR çalışması uygulanan amplifikasyon koşulları.....	49
Tablo 9. Kantitatif Real Time PCR çalışması için gerekli reaktifler ve miktarları.....	52
Tablo 10. Western Blot jeli için gerekli solüsyonların hazırlanması.....	55
Tablo 11. Western Blot Running jel hazırlanışı.....	55
Tablo 12. Western Blot Stacking jel hazırlanışı.....	56
Tablo 13. Kullanılan antikorlara ait bilgiler ve optimize edilmiş dilüsyon koşulları.....	60

1. GİRİŞ

Kanser, bir hastadan diğere çok değişkenlik gösteren, gelişimi ve sonuçları açısından da oldukça kompleks bir hastalıktır. Aynı heterojenlik ve çeşitlilik hem hücresel düzeyde hem de moleküler düzeyde kendini göstermektedir. Hücrelerin metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirerek, aşırı ve kontrolsüz şekilde çoğalması sonucu meydana gelen ve uzaktaki dokuları ve organları da istila ederek metastazlar oluşturmaya neden olan çok basamaklı bir süreçtir [1].

Karaciğer kanseri, dünyada en sık görülen 5. kanser olup, kanser ile ilişkili ölümlerde ise 3.sırada gösterilmektedir [2]. Karaciğer kanserleri hepatosit adı verilen karaciğer hücrelerinden köken alırlar. Bu sebeple, karaciğer kanserlerine hepatosellüler karsinoma (HSK) adı da verilir [3]. HSK, karaciğerin içinde en sık rastlanan primer tümördür ve primer karaciğer kanserlerinin %80'ini oluşturmaktadır [4].

HSK, genelde kronik karaciğer hastalığı zemininde gelişen karaciğerin primer bir tümördür [4]. Etiyoloji ve insidansı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir [5,6]. HSK insidansı Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da 100.000'de 1-4 iken, Afrika ve Asya'da 50-150'dir [7,8]. HSK oluşumunda siroz, Hepatit B virüsü (HBV), Hepatit C virüsü (HCV), aflatoksin B enfeksiyonları önemli risk faktörleri arasındadır [9].

Ülkemizde karaciğer kanserinin tedavi seçeneklerinde cerrahi rezeksiyon, karaciğer nakli, alkol enjeksiyonu, kriyoterapi, devaskularizasyon, kemo-embolizasyon, kemoterapi, termoterapi gibi yöntemlerdeki gelişmelere rağmen sağkalım oranlarında önemli bir değişim olmamıştır. Mevcut tedavilerin yetersiz kalmasında en büyük etken, kanserin başlangıç ve sonraki büyüme mekanizmalarının bilinmemesi, erken teşhisin yapılamamasıdır. Ayrıca yapılan ameliyatlardan sonra hastalar yaşam kalitelerini olumsuz etkileyen pek çok fiziksel, sosyal, psikolojik sorunla karşılaşmaktadır. Karaciğer kanseri nedeniyle ameliyat olan hastaların sıklıkla safra yollarına ait darlıklar, safra kaçakları, karın içi apseler, atar damar ve

portal damar darlıkları veya tam tıkanıklıkları, karın içine olan kanamalar gibi komplikasyonlar ve küçük yara yeri enfeksiyonları ve bazı gastrointestinal rahatsızlıklar (sindirim güçlüğü, bulantı) en çok rastlanan sorunlarla karşılaştıkları belirtilmektedir.

BMP9 ilk hematopoetik, hepatogenik, osteojenik faktör olarak tanımlanmıştır [10-13]. Son zamanlarda BMP9 aktivin reseptör-benzeri kinaz 1 (ALK1, activin receptor-like kinase1) için fizyolojik ligandı olduğu bulunmuştur. Ayrıca ALK1'in çözünür kimerik proteini (ALK1-Fc) ile bloke edildiğinde anti-anjiyogenik ve anti-tümör etki gösterilmiştir [14,15]. BMP9 %40 inaktif ve %60 aktif olmak üzere hepatositlerde 2 formda bulunmaktadır. BMP9 ekspresyon analizi, BMP9 proteininin hepatositler ve intrahepatik safra yolu ve epitel hücreleri tarafından üretilir olduğunu ortaya konmuştur [16].

RNA interferans (RNAi), transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun susturulması için son yıllarda moleküler biyoloji alanında sıklıkla kullanılan en önemli tekniklerden birisidir. Transkripsiyon sonrası aşamada genlerin susturularak fonksiyonu tam olarak bilinmeyen çok sayıda geni açığa çıkarmak ve hedefteki istenmeyen genetik aktivitenin durdurulması yolu ile hastalık tedavisinde özgün bir yaklaşım sunmakla beraber fonksiyonel genomik araştırmalarında geniş bir uygulama alanına sahiptir [17].

Bu çalışmada; HepG2 hepatosellüler karsinoma hücre hattı, BMP9 genine özgü siRNA ile transfekte edilerek BMP9 geninin ne kadar susturulduğu ve BMP9 sinyal yolağı alt bileşenleri olan SMAD1/5/8, SMAD4 ve hedef genlerden p21, Id1 ve Id2 genlerinin ekspresyonlarındaki değişimleri ile beraber bu susturmanın hücre çoğalmasına olan etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

Hepatosellüler karsinomada oldukça önemli olan ve bu süreçte rol aldığı kanıtlanan; BMP9 geninin siRNA yöntemi kullanılarak susturulması ve hepatosellüler karsinomadaki oluşum mekanizmalarının en önemli aşamalarından biri olan bu sürecin yeni bir gen tedavi yöntemi olan siRNA tedavisi ile mümkün kılınmasını sağlamak ve çalışmamızda karaciğer kanserinin moleküler temellerinin

daha iyi anlaşılmasına katkı sunması ve yeni tedavi hedeflerinin geliştirilmesinde yol gösterici olması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER

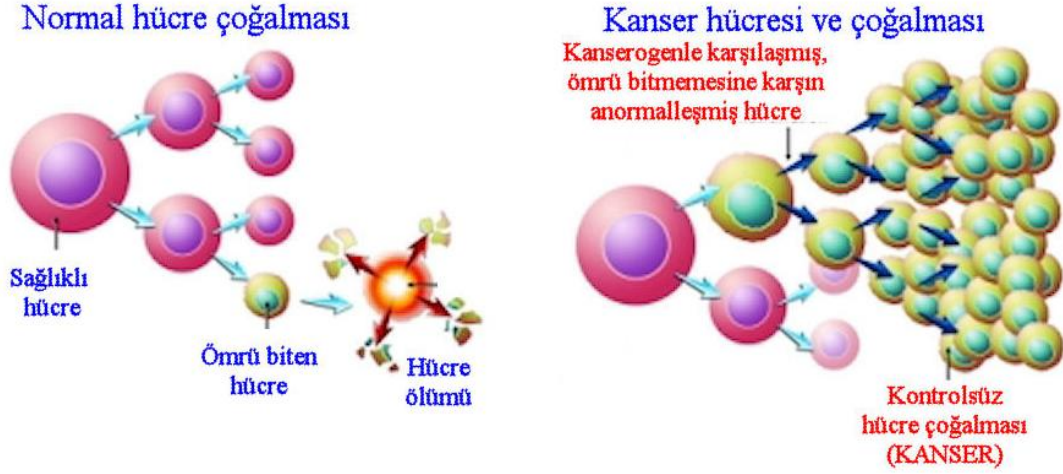
Kanser, çağımızın en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır ve bugün birçok gelişmiş ülkede en çok ölüme neden olan ikinci hastalık grubunu oluşturmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık ölümlerin yaklaşık 5'te biri kanser nedeniyledir. Dünyada yılda her 100,000 insandan 100-350'si kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın verilerine göre 2008 yılında dünya genelinde 12 milyon kişiye kanser teşhisi konulurken, bu rakamın 2030 yılında ise 26 milyonu aşacağı tahmin edilmektedir. Kansere kimyasallar, sigara, beslenme, morötesi radyasyon gibi karsinojenlere maruz kalma sonucunda oluşan mutasyonlar neden olabileceği gibi hormonlar, immün koşullar da etkili olmaktadır [18].

Kanserin gelişmesine neden olan temel değişiklik kanser hücrelerinin sürekli ve kontrolsüz çoğalmasıdır. Kanser hücreleri, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi göstermek yerine kontrolsüz şekilde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürerek, normal doku ve organları da istila eder ve tüm vücuda yayılır. Hücre çoğalması, apoptoz, farklılaşması gibi hücrenel süreçleri düzenleyen onkogenleri ve baskılayıcı genleri kodlayan bölgelerdeki mutasyonlar kanser gelişimindeki rolleri belirgindir [18-20].

Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi için;

- sınırsız çoğalma,
- büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık,
- apoptozdan kaçma gibi özellikleri kazanması gereklidir.

Sürekli anjiogenez (daha önce mevcut olan damarların endotel hücrelerinden kaynaklı yeni damar oluşumu), invazyon (çevre dokulara yayılma) ve dokunun istilası ve metastaz (primer tümördeki hücreler yeni bölgelere göç ederek orada sekonder tümör oluşturması) gibi değişikliklerin meydana gelmesi gerekir (Şekil 1) [21].



Şekil 1. Kanser hücresinin oluşumu [22] no'lu kaynaktan uyarlanmıştır.

Genellikle köken aldıkları dokuya ve karakterine bakılmaksızın vücutta oluşan anormal doku kitlelerine tümör adı verilir. Tümörler beklenen biyolojik davranışlara göre iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) tümörler olmak üzere 2 ana grup altında toplanır. İyi huylu tümörler, sınırlı bir büyüme potansiyeline sahiptirler ve köken aldığı dokuya benzerlik gösteren (iyi farklılaşmış) çoğu kapsüllü oluşumlardır. Uzak bölgelere metastaz yapmazlar. Kötü huylu tümörler ise, genellikle hızla çoğalan, köken aldığı dokudan yapısal ve fonksiyonel bakımlardan uzaklaşmış (az farklılaşmış) oluşumlardır. Uzak organlara metastaz yapan tümörlerdir. Bu tümörler oluştuğunda çevre dokulara yayılır (invazyon) ve primer tümördeki hücreler yeni bölgelere göç ederek orada sekonder tümör oluştururlar (metastaz) [23].

Tümörler türedikleri hücre tipine göre 3 grup altında toplanabilir [24]:

Karsinomalar: Bilinen en yaygın kötü huylu tümör tipleridir. İnsan kanserlerinin %90'dan fazlasını oluştururlar [24].

Sarkomlar: İnsanda az görülen tümör tipidir. Kemik iliği dışındaki mezenkimal dokular olan kas, kemik, sinir ve bağ doku öncüllerinden gelişen solid tümörlerdir [24].

Lösemi ve lenfomalar: Kemik iliği ve kan kaynaklı hücrelerden gelişirler. Lösemiler kanda bireysel hücreler olarak çoğalırken, diğer tümörlerin çoğu sert kitleler şeklinde büyürler. Lenfomalar lenfositlerin ve plazma hücrelerinin oluşturduğu katı tümörlerdir [24].

2.2. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA

Malign karaciğer tümörlerinin %90-95 kadarı parankim hücrelerinden oluşan hepatosellüler karsinomadır (HSK). Dünyada en sık görülen 5. kanser olup, kanser ile ilişkili ölümlerde ise 3.sırada yer almaktadır. HSK, coğrafik bölgeler, etnik gruplar ve cinsiyete göre çeşitli epidemiyolojik özelliklere sahiptir. HSK insidansı dünyada bölgelere göre farklılık göstermektedir. İnsidansı Doğu Asya ve Sub-Saharan Afrika'da (%80) görülürken, Kuzey ve Batı Avrupa ile Amerika düşük insidans gösterir [2,25,26].

2.2.1. Cinsiyet

HSK erkeklerde kadınlara oranla 2-7 kat daha sık görülmektedir. Bu oran dünya genelinde farklılık göstermektedir. Erkeklerin karaciğer kanserinde daha yüksek orana sahip olma nedenleri arasında sigara ve alkol kullanma gibi karaciğer karsinojenlerine, hepatit taşıyıcılığı durumu, çevresel toksinlere maruz kalma oranlarının daha yüksek olması ve androjenlerin trofik etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir [2,27,28].

2.2.2. Yaş

HSK'da yaş dağılımı cinsiyet, insidans oranları, bölgesel ve etyolojiye bağlı olarak farklılık gösterir. Genel olarak tüm bölgelerde kadınlardaki yaş piki erkeklerden 5 yaş daha fazladır. Düşük riskli populasyonlarda (ABD, Kanada, İngiltere gibi) 75 yaş ve üzeri gibi daha ileri yaşlarda görülürken, benzer tablo yüksek riskli Asya populasyonlarında da görülmektedir [2].

2.2.3. Irksal ve Etnik Farklılıklar

ABD'de yapılan araştırmaya göre HSK insidansında irksal ve etnik varyasyonlar gösterilmiştir [29]. Yüksek insidansa sahip olan Asyalılar (11/100 000), Hispaniklerin yaklaşık olarak iki katı iken (6,8/100 000) Kafkas ırkının ise dört katıdır (2,6/100 000). Etnik gruplar arasındaki farklılık altta yatan karaciğer hastalığı ve HSK için risk faktörlerine maruz kalma süresindeki farklılıktan kaynaklanır.

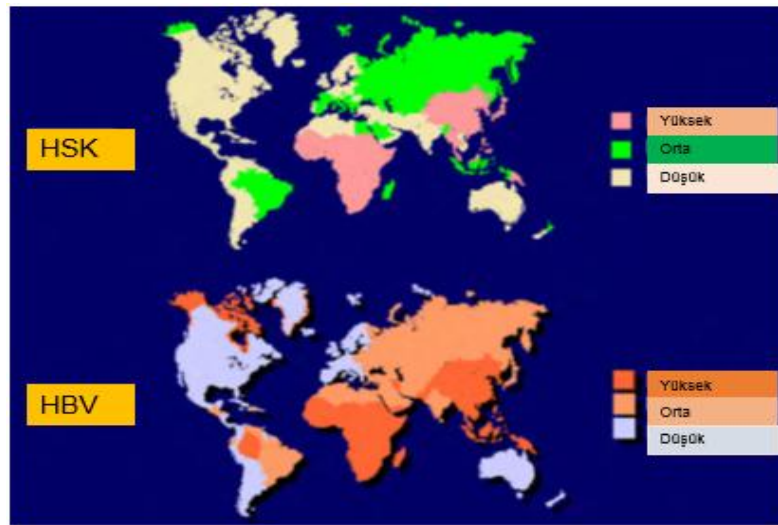
2.3. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMAYA NEDEN OLAN ETKENLER

HSK gelişimine neden olan risk faktörleri belirlenmiştir. Viral nedenler (kronik hepatit B ve hepatit C), aflatoksin ve alkol gibi toksik maddeler, metabolik karaciğer hastalığı (hemokromatozis, alfa-1-antitripsin eksikliği), insülin direnci (non-alkolik karaciğer yağlanması, diabetes mellitus) gibi çeşitli faktörler oluşturmaktadır [2].

2.3.1. Hepatit B

Hepatit B virüsü (HBV) HSK gelişimine neden olan önemli virüsdür. Dünya genelinde 400 milyona yakın HBV taşıyıcısı bulunmaktadır [30]. HBV enfeksiyonun Dünyada'ki dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir. HBV endemisi Dünyada düşük, orta ve yüksek endemili bölgeler olmak üzere 3 ayrı bölgeye ayrılmaktadır. Bölgedeki Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ve anti-HBs pozitifliği oranları, enfeksiyonun alınma yaşı ve virüsün hangi yolla bulaştığı sınıflandırmada göz önünde bulundurulmuştur. "Düşük endemili" bölgeler, Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Kuzey Avrupa ve Avustralya'dır. HBsAg sıklığı %2'den azdır. "Orta endemili" bölgeler, Güney ve Doğu Avrupa, Güney ve Orta Amerika, Ortadoğu ve Japonya'dır. HBsAg sıklığı %2-10 arasındadır. "Yüksek endemili" bölgeler, Afrika, Güneydoğu ve Uzakdoğu Asya ile Pasifik Adalar'dır. HBsAg sıklığı %10'dan fazladır

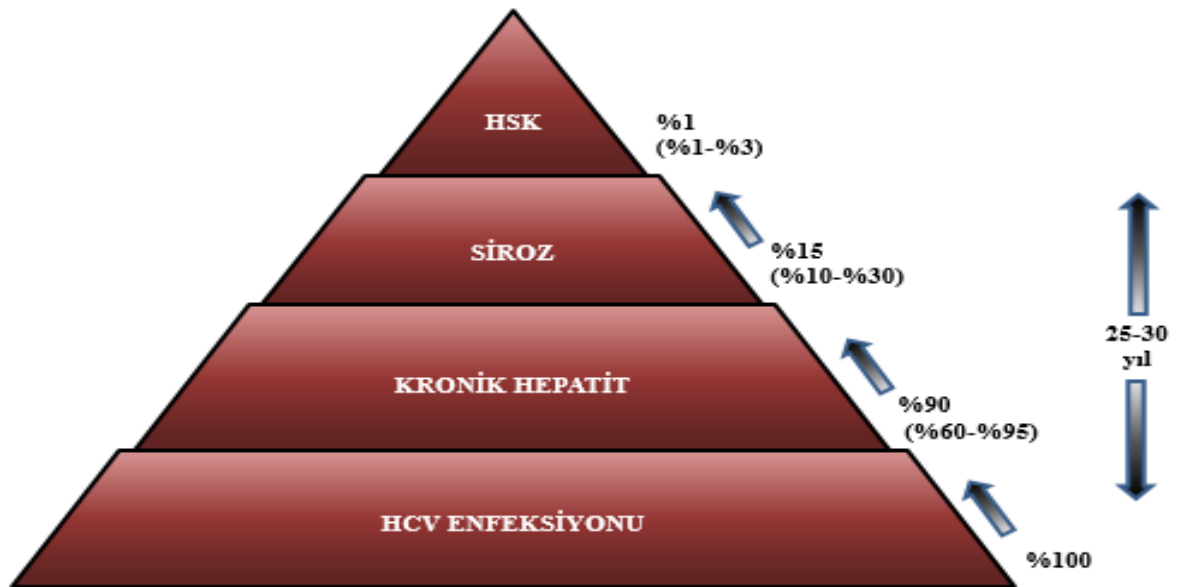
HSK'nın coğrafik bölgelere dağılımı kapsamında tümör oluşumu yüksek olan bölgeler HBV'nin endemik veya hiperendemik olduğu bölgelerle uyumluluk göstermektedir. HSK'nın düşük olduğu bölgelerde ise HBV taşıyıcılığının da düşük olduğu görülmektedir (Şekil 2) [31].



Şekil 2. HSK ile HBV insidansı arasındaki paralel coğrafik ilişki

2.3.2. Hepatit C

Hepatit C virüsü (HCV), siroz, kronik karaciğer hastalığı ve HSK gelişimine neden olan tek sarmallı RNA virüsüdür. Tüm Dünya’da anti-HCV insidansı %0.3 ile %1.7 arasındadır [32]. Gelişmekte olan ülkelerde bu oran daha da yüksektir. HCV enfeksiyonunun Dünyada’ki dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir. Prevalansın en düşük olduğu Kuzey Avrupa ve Amerika’da HCV prevalansı %1’den düşüktür. Prevalansın yüksek olduğu ülkeler ise Asya ve Afrika’da yer alır. En düşük prevalans İngiltere’de %1’in altında iken, en yüksek prevalans ise Mısır’dan %15-20 bildirilmiştir [33,34]. HCV ile ilişkili siroz tanısının konulmasından sonra, yıllık HSK’nın gelişim oranı %1-4 arasındadır. Enfeksiyondan 25-30 yıl sonra siroz oranları %15-35 arasında değişkenlik gösterir (Şekil 3) [35].



Şekil 3: HCV enfeksiyonunun doğal seyri

HCV ile enfekte hastalarda, çevresel ve kişisel faktörler viral faktörlere göre siroza ilerlemesinde daha etkili gibi görünmektedir. Bu faktörler içerisinde erkek cinsiyet, alkol kullanımı, ileri yaş, diyabet, obezite sayılabilir [36].

2.3.3. Çevresel Toksik Maddelere Maruziyet

Aflatoksin, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen bir mikotoksindir [37]. Aflatoksinler yerfıstığı, fındık, mısır, soya fasulyesi, pirinç ve diğer tahıl ürünlerinde yaygın şekilde bulunmaktadır [38-40]. Aflatoksinler akut ve kronik toksisiteye ve büyük çoğunluğu ise karsinojenik, mutajenik etkiye sahiptirler [41]. Türkiye’de yapılan bir çalışmada viral hepatit hastalarında sağlıklı kişilere göre aflatoksine yüksek oranda maruziyet kalındığında bu durumun hepatosellüler karsinoma gelişiminde önemli rol oynayabileceği belirtilmiştir [42].

2.3.4. Alkol Kullanımı

Alkol tüketimi HSK’nın meydana gelmesi için bir risk faktörüdür. Düşük veya orta düzeyde alkol tüketiminin HSK’yı belirgin şekilde artırıp artırmadığı net değildir. Yüksek alkol tüketimi ile HBV ve HCV enfeksiyon birlikteliğinin sinerjistik etkisini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [43]. Viral hepatit hastalarında alkole bağlı HSK gelişim riski daha da artmaktadır [44,45].

2.3.5. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYK) sıklığı dünyada artan obezite, diyabet, hipertansiyon, insülin direnci gibi metabolik sendrom sıklığına paralel olarak artış göstermektedir [46]. Farklı ülkelerde bildirilen prevalansı yaklaşık %10-24 saptanmasına rağmen [47], obez ve diyabet olanlarda bu sıklık %70-90'lara kadar yükselmektedir. NAYK ile Tip2 DM ve bozulmuş glukoz toleransı birlikteliği %21-75 olarak saptanmıştır. Hiperlipidemi ile NAYK birlikteliği %21-83 oranında tespit edilmiştir [46-49].

HSK olan hastalarda altta yatan karaciğer hastalığı olarak NAYK prevalansı paralel artış göstermesi oldukça önemli bir kanıttır [50].

2.3.6. Diyabetes Mellitus

Diyabet NAYK gelişimi üzerinden hem kronik karaciğer hastalığı hem de HSK gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. ABD, İtalya, Yunanistan ve Japonya'dan birçok retrospektif çalışma diyabet ile HSK gelişimi arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Son dönemde yapılan prospektif araştırmada 173.643 diyabetik hasta ve 650.620 diyabeti olmayan hastada HSK sıklığı araştırılmış ve bu çalışmada diyabeti olan hastalarda HSK sıklığının iki kat arttığı saptanmıştır [51].

2.3.7. Hemokromatozis

Sık görülen bir otozomal resesif geçişli bir demir metabolizma hastalığıdır. Hastalık 1/200-300 arasında görülür ve en sık görülen genetik metabolik hastalıklar içerisinde yer alır. Tam olarak nedeni bilinmemekle birlikte gastrointestinal demir absorpsiyonunda artış ve karaciğer, pankreas, kalp gibi organlarda parankimal demir birikimi ile karakterlidir. Son yıllarda moleküler düzeyde yapılan çalışmalar hemokromatoziste kalıtımın HLA ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Hemokromatozis geni (HFE) 6.kromozom üzerinde yer alır. Yeni bir klas I MHC benzeri genin (HFE) hemokromatozisli hastaların %80-100'ünde mutasyona uğradığı bulunmuştur. Hasta kişilerde özellikle 2 tür mutasyon saptanmıştır: 282. pozisyonda sisteinden tirozine, 63. pozisyonda histidinin aspartata değişimidir. Çoğu hastada özellikle 282 mutasyonu saptanmaktadır [52-55].

2.3.8. Wilson Hastalığı (Hepatolentiküler dejenerasyon)

Bakır metabolizmasının otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalığıdır. Hastalığın sıklığı 1/5000-1/30.000 arasında değişmektedir. Hastalıklı gen frekansı 1/93'dür. Wilson geni 13.kromozomun uzun kolunda (13q14-q21) lokalizedir. Wilson geni bakır transportu yapan ve esasen karaciğerde lokalize bir P tip adenozintrifosfataz ATPaz'ı (ATP7B) kodlar. ATP7B'de, 300'den fazla mutasyon

olduğu saptanmıştır. En sık görülen mutasyon, His1069Gln (H1069Q) olup, beyaz ırktaki mutasyonların %30-60'ından sorumludur [56-59].

2.4. KLİNİK BULGULAR

HSK sıklıkla siroz zemininde gelişebilmekle beraber daha seyrek olarak sağlam karaciğerde de gelişebilir. Sirotik zeminde HSK gelişen hastalarda kronik karaciğer parankim hastalığının semptom ve bulgularından farklı semptomlar görülmez. Ancak daha önce kompanse olduğu bilinen bir karaciğer hastasında asit, ensefalopati, sarılık ve varis kanaması gibi dekompanseasyon belirtilerinin varlığı HSK gelişmesi açısından şüphede uyandırmalıdır. Bazı hastalarda hastalığın ileri dönemlerinde halsizlik, karın ağrısı, kilo kaybı ve erken doygunluk; daha seyrek olarak sarılık, diare, metastaza bağlı kemik ağrıları, dispne ve intraabdominal hemoraji olabilir. Sağlam karaciğer zemininde gelişen hastalıkta sağ st kadran ağrısı, zayıflama, halsizlik, iştahsızlık, bulantı, kusma v.s. nonspesifik semptomlar görülebilir. HSK'nın semptomatolojisinde paraneoplastik sendromlara ait bulgularda önemli bir yer alır. HSK'da görülebilecek paraneoplastik sendromlar; Hipoglisemi, Polisitemi (eritrositosis), Hiperkalsemi, Sistemik arterial hipertansiyon, Porfiriya, Osteoporoz, Nöropati, Cilt bulguları: Pitriyazis rotunda, Leser-Trelat işareti, Dermatomiyoit, Pemphigus foliaceus [60].

2.5. EVRELEME ve SINIFLANDIRMA

Evrelendirme Amerikan Birleşik Kanseri Komitesi (American Joint Committee on Cancer-AJCC) tarafından yayınlanan 2002 evreleme sistemine göre yapılmaktadır (Tablo 1 ve 2) [61].

Tablo 1. Hepatosellüler karsinomada AJCC'ye göre evreleme

EVRE I	T1	N0	M0
EVRE II	T2	N0	M0
EVRE III A	T3	N0	M0
EVRE III B	T4	N0	M0
EVRE III C	Herhangi bir T	N1	M0
EVRE IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

Tablo 2. Primer tümör (T), Bölgesel Lenf Bezleri (N) ve Uzak Metastaz (M) değerlendirmesi (TNM evrelemesi)

TX	Primer tümör değerlendirilmedi
T0	Primer tümör yok
T1	Damar invazyonu olmayan tek odaklı tümör
T2	Damar invazyonu olan tek odaklı tümör veya birden çok sayıda 5 cm'den küçük tümörler
T3	Portal ya da hepatik damarların ana dallarından birini invaze eden tümör veya 5 cm'den büyük multiple tümör
T4	Safra kesesi dışında çevre organların direkt uzanımı olan ya da visseral peritonu perforasyon eden tümör
NX	Lenf nodu değerlendirilmedi
N0	Lenf nodu metastazı yok
N1	Lenf nodu metastazı var
MX	Uzak metastaz değerlendirilmedi
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

2.6. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA TANI

HSK'li hastalarda kan bulgularında kronik karaciğer hastalığına ait değişiklikler dışında önemli bir laboratuvar sapması bulunmaz; transaminazlar sıklıkla normal ve kolestatik enzimler normalin 2-3 katından daha fazla olmamak üzere yüksektir. HSK için en sık kullanılan serum belirleyicisi olan Alfa fetoprotein (AFP), diğer belirteçler ve görüntüleme yöntemleri en sık kullanılan tanı yöntemleridir [62].

2.6.1. AFP ve Diğer serum belirteçleri

HSK için en sık kullanılan serum belirleyicisi AFP düzeyi olup, olguların %70-90 kadarında yüksek saptanır. Alfa fetoprotein normalde gebelik sırasında fetal karaciğer ve yolk kesesi tarafından üretilen bir glikoproteindir. HSK dışında Alfa fetoprotein yüksekliği gebelikte, gonadal kökenli tümörlerde, HSK'siz akut ve kronik karaciğer hastalığında ve metastazlarda yükselebilir. Kronik karaciğer hastalığı zemininde görülen AFP yüksekliği HSK tanısı açısından sorun yaratmakla beraber, serum düzeylerinin 300-500 ng/ml üzerinde olması HSK varlığı açısından yönlendiricidir. Serum AFP düzeyi tümör büyüklüğü ile korelasyon göstermez [62]. HSK tanısı için serum belirleyicisi olan AFP dışında yapılan diğer belirteçler:

- Tümör kaynaklı gammaglutamil transpeptidaz
- Serum Alfa-L-fukosidaz
- İntersellüler adhezyon molekül konsantrasyonu
- Des-gamma-karboksi-protrombin

2.6.2. Görüntüleme Yöntemleri

HSK tanısında en sık kullanılan görüntüleme yöntemleri ultrasonografi (USG), bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve anjiyografi'dir.

2.6.2.1. Ultrasonografi (USG)

HSK'yi diğer solid karaciğer tümörlerinden ayırmamakla beraber noninvaziv, ucuz ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle HSK taramalarında sık olarak kullanılmaktadır. USG doppler ile birlikte kullanıldığında vasküler yatağın açıklığı-invazyon konusunda fikir vermesi sebebiyle avantaj taşır, kontrast madde kullanımının devreye girmesiyle beraber ise USG'nin HSK'deki tanı değeri artmıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda USG'nin sensitivitesi %84 ve spesifitesi %90'dan fazla olduğu saptanmıştır [63].

2.6.2.2. Bilgisayarlı Tomografi (BT)

Bilgisayarlı tomografi izodens olan veya boyutu 2 cm'den küçük olan tümörler dışındaki lezyonları ortaya koyabilmesi ve ayrıca karaciğer dışına yayılımı gösterebilmesi açısından HSK taramalarında sık kullanılan görüntüleme yöntemidir. Yapılan çalışmalarda sensitivitesi %68 ve spesifitesi %93 saptanmıştır [63]. Konvansiyonel BT ile ortaya konamayan lezyonlarda dinamik BT, helikal BT yöntemi uygulanabilmekte ve tanı değeri %90'ları aşmaktadır. İntraarteriyel lipiodol uygulaması yöntemin sensitivitesini %97'lere çıkarmakla beraber intraarteriyel girişim olduğu için sık uygulanmamaktadır.

2.6.2.3. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

MRG yönteminde nefrotoksik ajan kullanılmaması ve iyonize radyasyon verilmemesi bir avantajdır. Dual-kontrast MRG HSK tanısında en güvenilir MRG yöntemi olup, tanı değeri helikal BT'ye ulaşmaktadır, ancak daha pahalı olması ise bir dezavantajdır [64].

2.6.2.4. Anjiyografi

Anjiyografi önceleri HSK tanısında uygulanmış olmasına rağmen, artık günümüzde daha az invaziv tanı yöntemlerin gelişmesi nedeniyle eskisi kadar kullanılmamaktadır. Anjiyografi daha çok HSK tedavisinde transarteriyel kemoembolizasyon (TACE)'da kullanılmaktadır.

2.6.2.5. BT Hepatik Arteriografi ve Arteriyel portografi

Anjiyografi ile BT veya MRG yöntemlerinin kombinasyonudur. Bu yöntem BT veya MRG çekiminden hemen önce intraarteriyel (superior mezenterik arter, inferior mezenterik arter veya splenik arter içine) kontrast madde verilmesi ile yapılır. Rezeksiyon düşünülen hastalarda preoperatif değerlendirme amacıyla yapılmaktadır. Ayrıca pahalı ve invaziv olduğundan sık kullanılan bir tanı yöntemi değildir [65-68].

2.7. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA TEDAVİ YAKLAŞIMI

Kronik karaciğer hastalığı zemininde gelişen HSK, agresif seyirli bir kanserdir. Tanı konduğunda genelde ileri evrededir. Tedavi yöntemini belirleyen en önemli faktörler karaciğer disfonksiyonu ve tümör evresidir.

2.7.1. Parsiyel Hepatektomi

Bu tedavi yönteminin uygulanabileceği hasta grubu karaciğer rezervinin iyi korunmuş olduğu, ünifokal, tümörün hepatik vasküler invazyonu olmayan ve karaciğer dışına yayılmadığı hastalar rezeksiyon için uygundur. Fakat hastaların büyük bir kısmı tanı sırasında bu aşamayı geçmiş bulduklarından parsiyel hepatektomiye uygun değildir. Tümörün 5 cm'den büyük olduğu hastalarda bölgesel ve uzak metastaz varlığının sık olması nedeniyle, tümör çapı rezeksiyon uygulanabilirliği açısından önemli bir kriterdir. Parsiyel hepatektomi sonrasında sirozlu hastalarda rezerv azalmasına bağlı hızla dekompanseasyon gelişmektedir, bu nedenle Child-Pugh evre C olan hastalarda postoperatif mortalite riskinin yüksek olması nedeniyle bu tedavinin yapılması uygun değildir; A grubu hastalar ise bu tedaviye en uygun grubu oluşturmaktadır. Küratif değeri en yüksek olan tedavi şekli cerrahi rezeksiyon olmasına rağmen, 5 yıl içinde rekürrens oranı %38-68 ve 5 yıllık yaşam süresi %30 oranındadır [69].

2.7.2. Ortotopik Karaciğer Transplantasyonu (OLT)

Primer karaciğer hastalıklarının tedavisinde ortotopik karaciğer transplantasyonu günümüzde teorik olarak en uygun tedavi şekli olarak görünmektedir. Ortotopik karaciğer transplantasyonu (OLT; karaciğer dışında tümör olmaması, tek tümör olan hastalarda tümör büyüklüğünün 5 cm'den küçük olması, multiple tümörü olanlarda tümör sayısının 3'den az ve her bir tümörün

büyükliğünün 3 cm'den küçük olması, vasküler invazyon olmaması) uygun seçenektir. OLT için varolan bir diğer problem transplantasyonu bekleme süresinde (U.S.A. için ortalama 24 ay) tanı konduğunda transplantasyona uygun olan tümörün progresyon göstermesidir [70].

2.7.3. Radyofrekans Ablasyon (RFA)

Bu yöntem radyofrekans termal enerjinin lokal uygulanması ile tümör nekrozuna yol açmasıdır. Perkütan, laparoskopik, açık cerrahi yöntemlerle uygulanabilir. RFA en etkin olduğu tümör büyüklüğü 5 cm'nin altında olan hasta gruplarıdır. Uygulama için tümör sayısı önemli değildir. Bu yöntemin Perkütan Etanol Enjeksiyonu (PEİ) ile kıyaslamasında daha fazla oranda tümör nekrozuna neden olduğu, daha az seans uygulama gerektirdiği ancak daha fazla komplikasyona neden olduğu saptanmıştır.

2.7.4. Perkütan Etanol Enjeksiyonu (PEİ)

%95'lik etanolün tümör içerisine USG veya BT eşliğinde perkütan girişimle uygulanması tümörde küçülmeye ve nekroza yol açarak yaşam süresini uzatabilmektedir. PEİ uygulaması; karaciğerde tek tümör varlığı, hastalarda tümör büyüklüğünün 3 cm'den küçük olması, hepatik rezervin cerrahi rezeksiyona uygun olmaması gibi durumlarda uygulanabilmektedir. PEİ'nin en önemli avantajı her Child-Pugh evresine uygulanabilmesi olmakla birlikte, tedavinin uygulandığı hastalarda yaşam süresini belirleyen en önemli faktör karaciğer hastalığının evresidir [71].

2.7.5. Transarteryel Kemoembolizasyon (TACE)

HSK'nin kanlanması çoğu hepatik arter yolu ile olmaktadır. TACE hepatik arterin gelfoam veya metal coil'lerle tıkanması ile tümör kanlanmasının bozulup iskemik nekroza uğratılması ve aynı seansta hepatik arter yolu ile tümör içine direkt kemoterapötik ajan verilmesi yöntemidir. Kemoterapötik ajan genellikle lipiodol ile birlikte verilmektedir. Lipiodol, kemoterapötik ajanın tümör içinde retansiyonunu sağlar. TACE genellikle postembolizasyon sendromu olarak bilinen ateş ve karın ağrısına neden olmaktadır. Kronik karaciğer hastalığı olan (Child-Pugh evre C) ve portal ven trombozu olan hastalarda karaciğer yetmezliği görülebileceğinden bu tür tedaviler önerilmemektedir [72].

2.7.6. Hormonal Tedavi

Östrojen reseptörü taşıyan HSK'lerin tamoxifenle reseptör blokajı yapılması düşüncesinden hormonal tedavi gündeme gelmiştir, fakat tamoxifen kullanımının yaşam süresini uzatmadığı saptanmıştır. Bazı tümörlerde ise değişik derecelerde somatostatin reseptörü saptanmış, bu hastalara somatostatin analogu olan octreotid verildiğinde, plaseboya göre yaşam süresinin uzadığı (octreotid alanlar 13 ay, plasebo alanlar 4 ay) gösterilmiştir [73].

2.7.7. Sistemik Kemoterapi

HSK, kemoterapiye dirençli bir tümör olarak bilinmektedir. Bu durumun, ilaç rezistansına neden olan farklı genlerin tümörde yüksek oranda ekspres edilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sistemik kemoterapi için doksorubisin, mitomisin, 5 fluorourasil en sık kullanılan kemoterapötik ajanlardır [74,75].

2.8. EPİGENETİK

DNA'nın nükleotit dizisinden bağımsız olarak gen işlevinde ortaya çıkan kalıtsal değişiklikler “epigenetik” olarak adlandırılmaktadır [76-78]. Bir canlının tüm hücrelerde DNA yapısı ve nükleotit dizilişi aynı olmakla beraber, hücreler arası farklılıkların ise gen işlevindeki değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir [76]. Bu değişiklikler ise epigenetik mekanizmalar aracılığı ile olmaktadır. Önemli epigenetik mekanizmalar arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, RNA ile indüklenen susturma (RNA-induced silencing) yer almaktadır [76]. Bu mekanizmalar kalıtsal değişikliklere neden olmaktadır. Ve mekanizmalardan herhangi birindeki bozukluk gen işlevinin artmasına ya da susmasına neden olmakla birlikte, epigenetik mekanizmalarla ortaya çıkan hastalıklara neden olmaktadır [76-78].

Son yıllarda gen ifadesinin susturulmasını sağlayan kodlamayan RNA (non-coding RNA) adı verilen küçük RNA moleküllerin “small interfering RNA (siRNA)”, “mikro RNA (miRNA) ” ve X kromozom inaktivasyonundan sorumlu olan XIST RNA adı verilen RNA parçacıklarının epigenetik süreçte önemli rol aldıkları gösterilmiştir [76].

2.9. RNA İNTERFERANS (RNAi)

RNA interferans, çift iplikçikli RNA'nın hücreye girdiği zaman spesifik mRNA molekülünün diziye özgü yıkılması ile sonuçlanan transkripsiyon sonrası (post transkripsiyonel) gen susturma mekanizmasıdır [79]. Bu susturma mekanizması ilk olarak 2 botanikçi tarafından koyu renkte petunya çiçeği elde etmek isterken beyaz-mor alacalı ve beyaz renkte çiçekler elde etmeleriyle fark etmişlerdir. Petunya bitkisine *Agrobacterium tumefaciens* adı verilen vektör ile Petunyada pigmentasyonu

katalizleyen enzimlerin genleri eklenerek daha koyu renkte petunyalar elde edilmek istenmiştir ancak ya tamamen renksiz ya da normal renkten daha açık renkte petunyalar elde edilmiştir [80,81].

1990 yılında yapılan bu çalışmadan sonra 1998 yılında Andrew Fire ve Craig Mello bir nematod olan *C.elegans*'da uygun çift zincirli RNA'nın (dsRNA) molekülleriyle gerçekleştirilen gen susturma mekanizmasına RNAi adını vererek Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülü almışlardır [82].

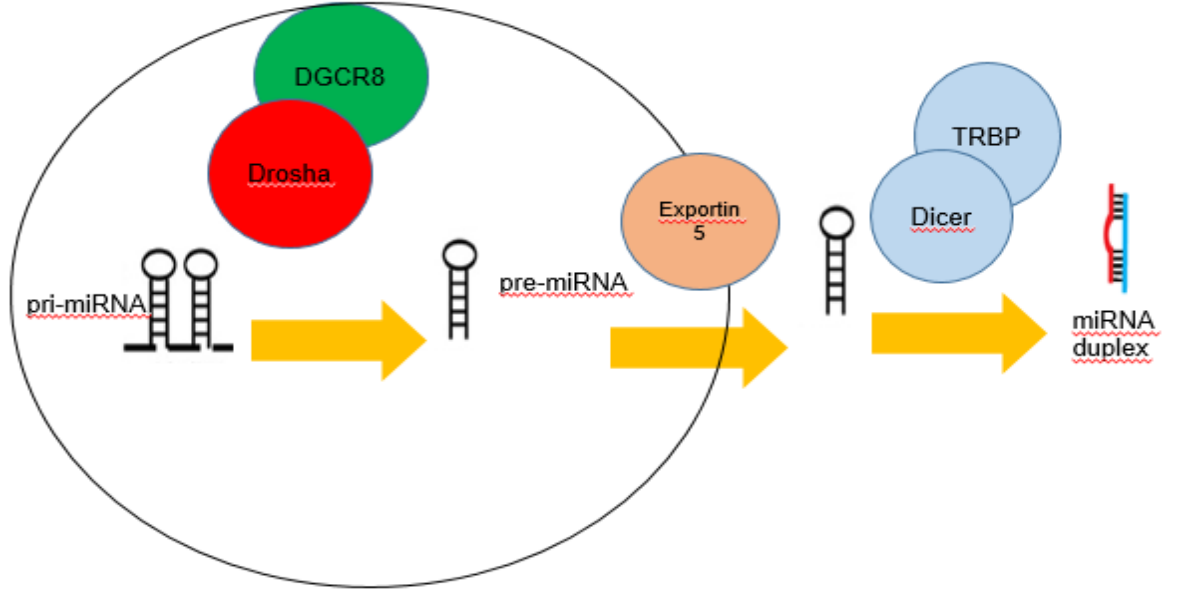
RNAi gen susturma mekanizması olarak bilinmektedir. Bu mekanizma hücrenin sitoplazmasında ve nukleusunda olmak üzere gerçekleşebilmektedir. Sitoplazmada transkripsiyon esnasında mRNA'ların kesilmesi ve translasyon esnasında da translasyon engellerek genin susturulması sağlanırken; nukleusta ise transkripsiyon esnasında transkripsiyonun engellenmesi ile genin susturulması sağlanmaktadır.

RNAi sistemi mikroRNA'lar (miRNA), ve small interfering RNA (siRNA) aracılığı ile beraber iki farklı mekanizma kullanarak gerçekleşir [83-85].

2.9.1. MikroRNA (miRNA)

MikroRNA (miRNA)'lar küçük, protein kodlamayan ve gen ifadesini transkripsiyon sonrası kontrol eden RNA molekülleridir. miRNA'lar bir ya da daha çok geni susturarak çoğalma, hücre farklılaşması ve hücre ölümü gibi süreçlerde önemli fonksiyonları vardır. İlk defa 1993 yılında *C.elegans*'ın gelişimini çalışan Lee ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. MikroRNA terimi ilk olarak 2001 yılında kullanılmaya başlanmıştır. miRNA genlerinin büyük çoğunluğu protein kodlayan genlerin ekzonik, intronik ve genler arası bölgelerinde de bulunabilir. miRNA ilk olarak primer miRNA olarak sentezlenir, daha sonra RNaz III enzim ailesi üyesi olan Drosha, pre-miRNA formuna dönüşür ve bu süreçte sitoplazmaya transfer edilir. Sitoplazmada ise RNaz III enzim ailesinden bir endonükleaz olan Dicer enzimi ile kesilerek 20-23 nükleotid uzunluğunda olgun miRNA'yı oluştururlar. Bu olgun miRNA'lar RISC (RNA-aracılı ile indüklenen susturma kompleksi) bağlanarak

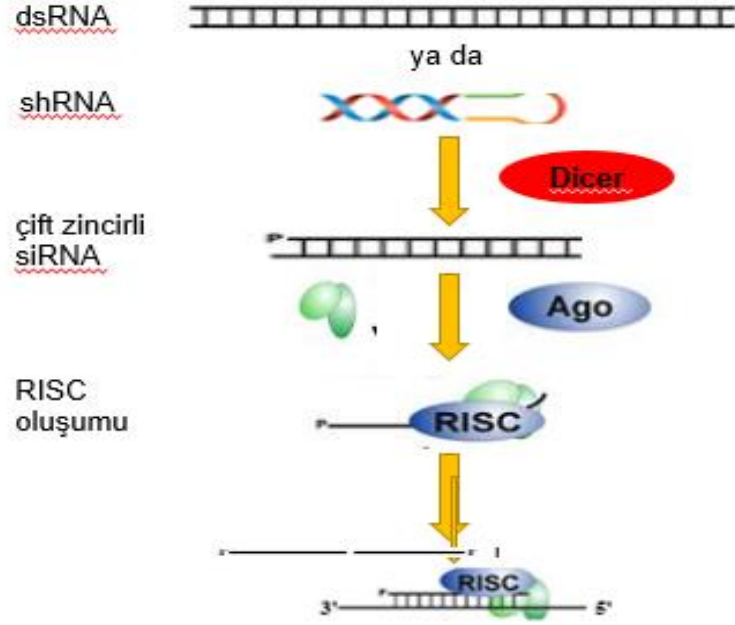
mRNA'ya hedefler ve burada ise hedef mRNA'nının yıkımına ve genin susmasına neden olur (Şekil 4) [86-88].



Şekil 4. miRNA mekanizması

2.9.2. Küçük engelleyici RNA (small interfering RNA= siRNA)

Small interfering RNA olarak bilinen siRNA'lar 20-25 nükleotid uzunluğunda, eksojen kaynaklı çift iplikli RNA (dsRNA)'lardır [89-94]. Bu RNA'lar hücre içerisine girdiğinde 'Dicer' enzimi tarafından tanınarak ve yaklaşık 21-23 nükleotidlik uzunluğunda küçük fragman parçalara dönüştürülür ve bu parçalar, RISC (RNA-aracılı ile indüklenen susturma kompleksi) ile birleşir [92,94,95]. Çift iplikli olan siRNA'lar RISC ile kompleks oluşturarak bu süre sonunda denatürasyona uğrar ve tek iplikli yapıya sahip olan hedef mRNA'yı parçalar. Böylece gen ifadesi baskılanmış (susturulmuş) olur. Bir siRNA gen ifadesini sustururken ya promotor bölgesinde bulunan genin susturucu kromatin değişimlerini tetikleyerek ya da mRNA'nın parçalanmasını tetikleyerek susturur (Şekil 5).



Şekil 5. siRNA'nın gen ifadesini engellemesi [96] no'lu kaynaktan uyarlanmıştır.

2.9.2.1. Sentetik siRNA'ların Transfeksiyonu

Uygun şekilde tasarlanmış olan bir siRNA kullanıldığı zaman, hücre içerisindeki hedef genlerden herhangi biri RNAi mekanizmasından yararlanılarak susturulabilir. Bu sayede herhangi bir inhibitör kullanmaya gerek kalmadan daha etkin terapötik yanıt elde edilebilir.

İn vivo yapılan çalışmalar sonucunda hepatit B virüsü (HBV) [97-99], insan papillom virüsü (HPV) [100], siroz [97,98], kemik iliği kanseri [100-102] gibi birçok hastalık olmak üzere sentetik olan siRNA'larla hedeflenen genin susturulduğu gösterilmiştir. Kliniksek olarak uygulanabilmesi için güvenilir ve sistematik uygulama şekillerinin olması gerekir. Kimyasal olarak modifiye edilmiş olan siRNA'lar beyin gibi belirli olan organlarda faydalı olmasına rağmen, vücuttaki diğer organlara da uygulanabilmesi için transfeksiyon ajanlara gerek duyulmaktadır [103,104]. Modifiye edilmemiş olan siRNA'ların çok fazla kullanım alanlarının olmamasının sebebi ise yaklaşık olarak 13 kDa olup hücresel membranları

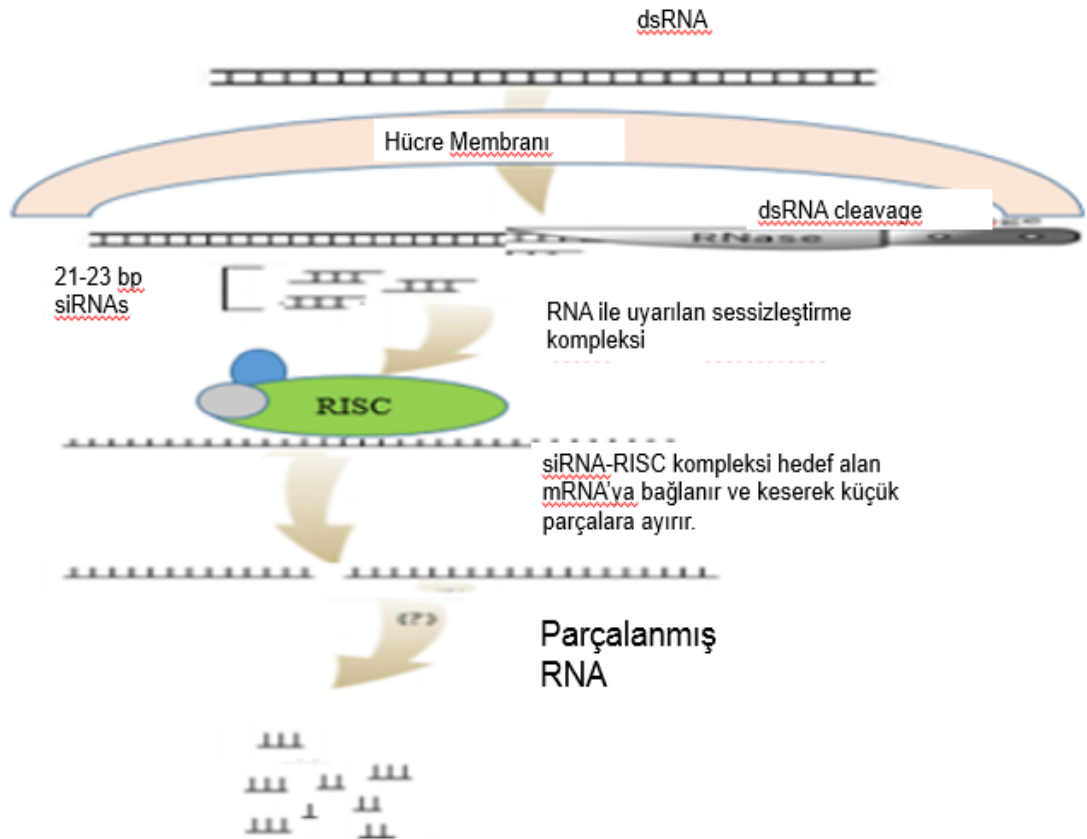
geçemeyecek büyüklüğe sahip olmaları ve negatif yüklü olmalarından kaynaklanmaktadır.

siRNA transfeksiyonun kolay olması için vücuttaki organ veya dokunun da kolay ulaşılabilir olması gerekmektedir. Sistematik uygulamada, aşılması gerekli olan sıkıntılardan birisi de siRNA'nın diğer hedef olmayan organlara da yönelmesidir. Çünkü bu uygulama şeklinde siRNA'lar damar içine enjekte edilir ve bu sayede siRNA doku veya organa ulaşabilmesi için vücudu baştan sona dolaşır. Lokal siRNA uygulamasında ise vücuttaki hedeflenen dokuya ya da dokunun yakınına siRNA verilerek işlem yapılır [105-108].

2.9.2.2. siRNA'ların Kanser Tedavisindeki Kullanım Alanları

Son yıllarda en heyecan verici buluş küçük engelleyici RNA'ların, yani siRNA'ların gen susturulmasında kullanılabilir olmasıdır. Mekanizma olarak RNAi (RNA interference), gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir yoldur. RNAi günümüzde daha fazla tercih edilen bir metot haline gelmiştir. Bunda siRNA'ların çok düşük konsantrasyonlarda bile etkin gen susturma yeteneği olmalarından ve de böylece hedef bölgeye kolayca bağlanabilmelerinin rolü büyüktür. RNAi, dsRNA'nın hücre içerisine girdiği zaman komplementer mRNA dizisini hedef alarak parçalayabilen gen susturma mekanizmasıdır. RNA interferans mekanizmasının basamakları aşağıda özetlenmektedir (Şekil 6) [109].

- 1- Çift iplikli RNA'yı tanıma ve tarama süreci,
- 2- RNase III Ribonükleaz ailesine ait olan Dicer enziminin çift zincirli RNA'yı tanıması ve kesilmesi,
- 3- 21-23 nükleotid uzunluğunda RNA'ların oluşumu,
- 4- RISC (RNA-aracılı ile indüklenen susturma kompleksi)'nin oluşumunun RNAi faktörlerinin bir araya gelmesiyle olması,
- 5- RISC içindeki exonükleazlar tarafından hedef mRNA'nın yıkılarak kodladığı protein sentezinin engellenmesi.



Şekil 6. RNA susturma mekanizmasının genel işleyişi [110] no'lu kaynaktan uyarlanmıştır.

1998 yılında Andrew Fire ve Craig Mello bir nematod olan *C.elegans*'da, çift zincirli RNA'nın (dsRNA) molekülleriyle gerçekleştirilen gen ekspresyonunu susturabilme yeteneğini keşettikten sonra, RNAi mekanizması ilgi uyandırmaya başlamıştır [111]. 3 yıl sonra ise Tuschl ve ark. siRNA'ların diziye özgül olacak şekilde gen susturmasını başardıklarını memeli hücrelerde göstermiştir [112]. Bundan hemen sonra ise başarılı bir siRNA kullanımının, farede Hepatit C hedef alınarak gen susturulması gerçekleştirilmiştir [113]. O süreçten bu yana siRNA'ları geliştirebilmek için biyoteknoloji sektörü sürekli çalışmakla beraber kanser, enfeksiyon gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için de siRNA'ları yeni bir terapötik hedef olarak görmektedir.

İn vitro hücre kültürü ve in vivo hayvan modellerinde genlerin kalıcı ya da geçici etkilerle susturulmasının avantajları vardır. İn vitro ortamında yapılan

çalışmalar sonucunda astrositom hücre hattında STAT3 gen ekspresyonunun siRNA muamelesi ile susturulduğunda tümör olan hücrelerin apoptoza uğradıkları literatürde gösterilmiştir [114,115]. Hayvan modelleri oluşturulurken ise genlerin susturulmasının hayvanların öldürülmesine gerek kalmadan yapılmasıdır. Bu da hedeflenen sonuçlardan birisidir. Böylece RNAi teknolojisi ile beraber deney hayvanlarında gelişimsel herhangi bir bozukluk yaratılmadan genin hücresel ve biyolojik fonksiyonları incelenenabilmektedir [116].

2.10. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β) ve Sinyalizasyon Yolu

Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β) süperailisi, omurgasız ve omurgalılarda gelişim düzenlenmesinde rol oynayan hücre dışı çok sayıda ilişkili sinyal moleküllerini içerir. Bu süperailenin bir üyesi olan kemik morfojenik proteini başlangıçta kültür hücrelerinde kemik oluşumunu indüklemeye yeteneğinden dolayı tanımlanmıştır. TGF- β reseptörleri ve ilişkili olan polipeptidler, substratları olan proteinleri tirozinden değil, serin ya da treoninden fosforilleyen protein kinazlardır. TGF- β , birçok çeşitli hücre tarafından sentezlenen hücre bölünmesi (proliferasyon), farklılaşması (diferansiasyon) ve programlı hücre ölümü gibi hücresel süreçlerin kontrolünü sağlamaktadır. Ligandın reseptörlerine bağlanması ile TGF- β sinyalizasyon yolunun aktivasyonu gerçekleşmeye başlamaktadır [117-120].

TGF- β tip I (T β RI) ve TGF- β tip II (T β RII) olmak üzere hücre membranında 2 tip reseptör bulunmaktadır. Bir monomerik transmembran proteini olan TGF- β tip III (T β RIII), TGF- β 'nin ilk iki tip reseptörlerine bağlanmalarını kolaylaştırmak üzere TGF- β moleküllerine bağlanır ve olgun TGF- β moleküllerinin hücre yüzeyine yakın olacak şekilde toplanmasını sağlar. Tip I ve Tip II reseptörler sitozolik domainlerinin bir parçası olarak, serin/treonin kinaza sahip dimerik transmembran proteinlerdir. T β RII sürekli kinaz aktivitesine sahiptir, yani TGF- β 'ya bağlı olmadığı zamanlarda bile aktiftir. TGF- β 'nin bağlanması T β RI ve T β RII'nin her birinin iki kopyasını içeren kompleksin oluşumunu indükler. T β RII altbirimi daha sonra plazma zarının sitozolik yüzeyine bitişik olan T β RI altbiriminin yüksek düzeyde korunmuş olan

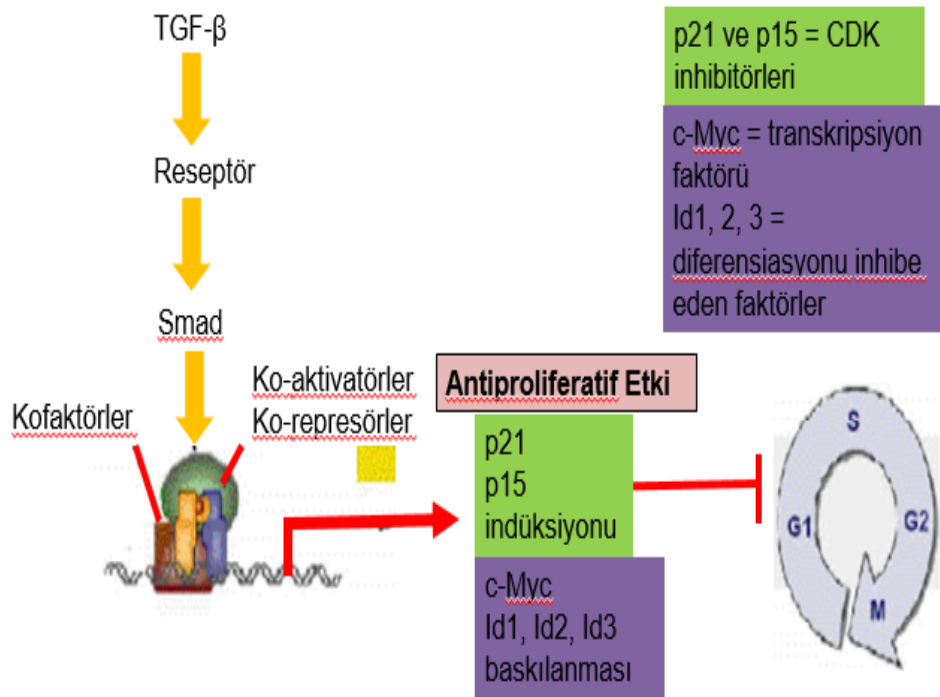
dizisinde serin ve treonin bölgesinin fosforilasyonunu sağlamaktadır ve böylece T β RI sitozolde bulunan Smad proteinleri fosforiller [121]. Smad proteinlerinin 8 alt üyesi bulunmaktadır. Reseptör aracılı (RSmad) olarak bilinen Smad 2 ve 3 TGF β , Smad 1, 5 ve 8 ise BMP ve AMH (antimüllerian hormone) sinyalizasyon yolunda yer almakla beraber ligand/reseptör kompleksleri tarafından fosforillenerek aktif hale gelir. Smad 4 (ko-smad) RSmad proteinlerinin etkisi ile fosforillenmektedir [122].

TGF β -Smad yolundaki sinyal iletilsinin sonlanması TGF- β reseptörlerinden ayrılınca, nükleus içinde R-Smad proteinleri sürekli olarak defosforile edilerek inaktive olur [123].

Son yıllarda TGF- β yolunun Smad proteinlerinin aracılık etmediği başka sinyalizasyon yolu ile etkileştiği çalışmalarda bildirilmiştir. Bu yollar arasında MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K (fosfoinozimid 3-kinaz), PP2A (protein fosfat) gibi aracılık eden yollar yer almaktadır [124-128].

Normal hücrelerde TGF- β embriyonik gelişim ve doku hasar onarımında, yara iyileşmesi ve doku homeostazisinde önemli rol oynar. TGF- β , epitelyal ve hematopoetik hücrelerde antiproliferatif etkilidir. Normal hücrelerde TGF- β sinyal yolunun aktivasyonu hücre siklusunun G1 fazında durmasını sağlamaktadır [129].

Sikline bağımlı kinazların (CDK) inhibitörleri olan p21 ve p15 proteinlerinin sentezini aktiflemesi TGF- β 'nin etkisi ile olmaktadır [130,131]. TGF- β aynı zamanda bir transkripsiyon faktörü olan c-Myc ve diferansiyasyonu inhibe edici faktörler olan Id1, 2 ve 3 genlerinin de inaktivasyonunu sağlamaktadır (Şekil 7) [132,133].



Şekil 7. TGF-β'nin antiproliferatif etkisini sağladığı aracı moleküller [134] no'lu kaynaktan uyarlanmıştır.

2.11. Bone Morfojenik Proteinlerin (BMP) Sınıflandırılması ve Kimyasal Yapısı

Bone Morfojenik Protein (BMP), transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) ailesine ait olan çok fonksiyonlu büyüme faktörüdür. BMP alt grubu 15'den fazla protein içerir. BMP ve TGF- β yapı olarak birbirlerine benzemelerine rağmen fonksiyon olarak birbirlerinden farklıdır. BMP'de TGF- β aile üyesine benzer şekilde öncü protein olarak sentezlenir. Proteinin olgun olan kısmı, öncü molekülün karboksil ucuna yerleştirilmiştir. BMP'ler de TGF- β aile üyesi gibi 7 adet sistein aminoasit kalıntılarını içerir ve 120 aminoasitten oluşmaktadır [135].

BMP diğer bilinen tüm büyüme faktörleri arasında olmasına rağmen, tektir. Bağı dokusu hücrelerini osteoprogenitör hücrelere dönüştürebilme yeteneğine sahip

olan tek morfojendir. TGF- β , insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), platelet derivesi büyüme faktörü (PDGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörleri hücre çoğalmasını sağlamakta olduğu halde bir hücreyi başka bir hücreye dönüştürebilme yeteneğine sahip değildirler [136].

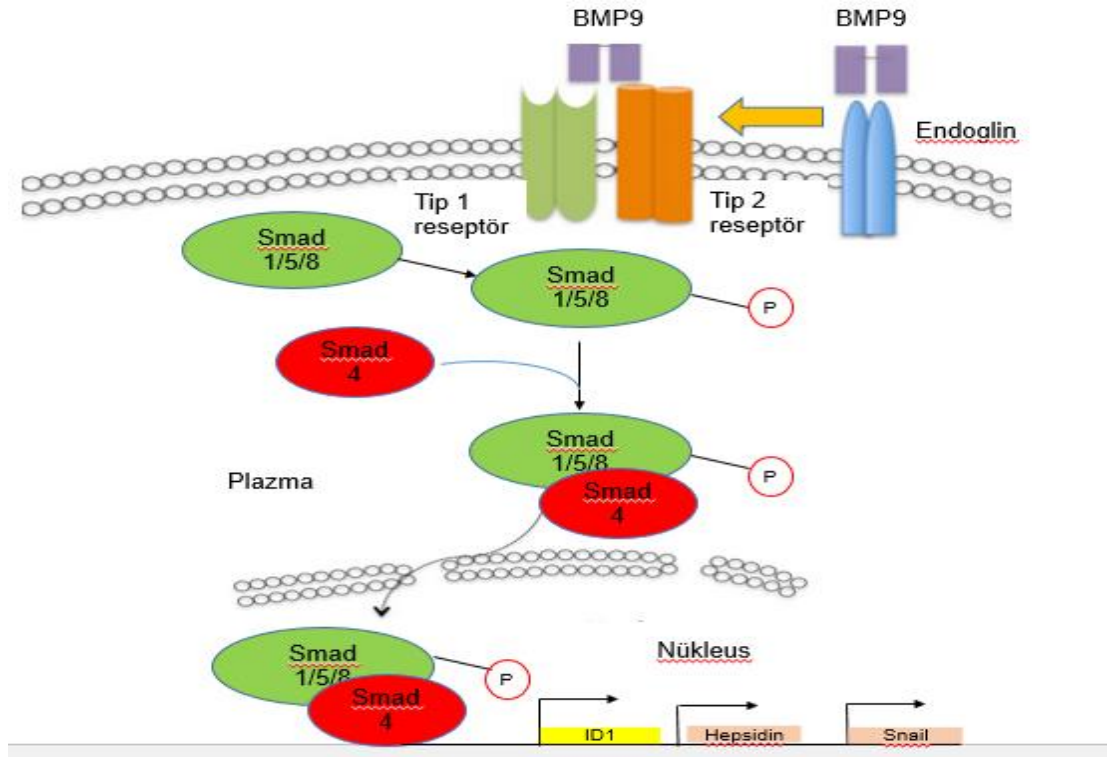
BMP'ler genel olarak 3 alt gruba ayrılırlar. Birinci grup olan, BMP-2 ve BMP-4 %80 benzerlik gösteren aminoasit dizilimi içerir. İkinci grup ise BMP-5, BMP-6, BMP-7 ve BMP-8'den oluşmaktadır. Aminoasit dizilimi ise %70 benzerlik gösterir. Üçüncü grup olan BMP-3 diğer BMP üyelerinden farklılık göstermekle beraber genellikle yalnız başına değerlendirilmektedir [136,137]. 2005 yılında ise bu alt gruba 5 yeni aile grubu daha eklenmiştir. Bu alt grup ise BMP-9 (GDF-2), BMP-10, BMP-11, BMP-15 ve BMP-16'dan oluşmaktadır [138]. BMP ailesi ve fonksiyonları Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. BMP ailesi

BMP Alt Ailesi	Fonksiyonu
BMP-2	Osteoindüktif, osteoblast farklılaşması, apoptozis
BMP-4	Kondrogenezis
BMP-3	Osteogenezise engel olur
BMP-5	Osteoblast diferasyonu
BMP-6	Böbrek ve göz oluşumu
BMP-7	Osteoindüktif
BMP-8	Sinir sistemi, hepatogenesis
BMP-9	Kardiak gelişimi
BMP-10	Nöral dokular
BMP-11	Tendon-iliak formasyonu
BMP-12	Tendon-ligament formasyonu
BMP-13	Kondrogenezis, tendon iyileşmesi
BMP-14	Folikül stimüle edici hormon aktivitesini düzenleme

2.12. BMP'nin Sinyal Mekanizması

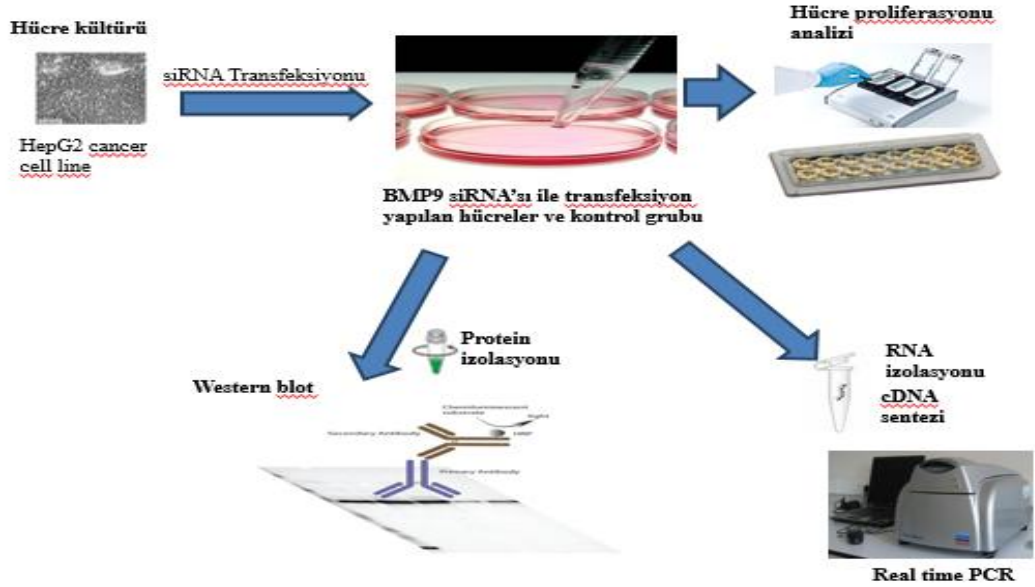
Hücre üzerinde Tip 1 ve Tip 2 serin/threonin kinaz proteinlerinden oluşan BMP reseptörleri vardır. Ve bu reseptörlerin ligand ile bağlanması heterotetramer kompleksi formasyonu ile sonuçlanır. Böylece sinyal mekanizması harekete geçer. Bağlanma olduktan sonra ise Tip 2 reseptörü Tip 1 reseptörünü fosforlar. Fosforlanma olduktan hemen sonra Smad1/5/8 ve Smad 4'e bağlanarak hücre çekirdeğine yerleşir. Fosforlanmış olan Smad1/5/8 ve Smad 4 ile heterodimer oluşturarak hücre çekirdeğine karışır. Ve BMP ile ilgili genlerin aktivasyonunu sağlarlar (Şekil 8) [139].



Şekil 8. BMP sinyal mekanizması [140] no'lu kaynaktan uyarlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

Bu çalışma kısaca özetlenecek olursa, hepatosellüler karsinoma hücre hattına BMP9 genine özgü siRNA ile transfekte edilerek BMP9 geninin ne kadar susturulduğu ve bu susturmanın hücre çoğalmasını nasıl etkilediği xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile ortaya konmuştur. Hepatosellüler karsinoma hücre hattına siRNA transfeksiyonu yapıldıktan sonra, gen ekspresyon düzeyi total RNA kullanılarak qRT-PCR’da belirlenmiştir. Aynı zamanda BMP9 sinyal yol alt bileşenleri olan SMAD1/5/8, SMAD4 ve hedef genlerden p21, Id1 ve Id2 genlerinin ekspresyonlarının değişimleri de incelenmiştir. Gen ekspresyonlarına baktıktan sonra ise protein seviyesindeki değişiklikleri gözlemleyebilmek için de BMP9 ve alakalı diğer proteinler Western Blotting yapılarak sonuçların teyit edilmesi sağlanmıştır. Yapılan deneylerin genel olarak özeti Şekil 9’da gösterilmiştir.



Şekil 9. Çalışmamızda kullanılan metodların akış şeması

3.1. KULLANILAN MATERYALLER

3.1.1. Kimyasal Sarf Malzemesi

Kimyasallar	Üretici
DMEM Medyum	Lonza,
FBS (Fetal Bovin Serum)	HyClone,
L- Glutamin	HyClone,
Penicillin/Streptomycin	HyClone,
PBS (Phosphate Buffered Saline)	HyClone,
Plazmosin	InvivoGen,
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fisher Scientific,
Etidyum Bromür	Merck, Germany
Depc Treated Water	Invitrogen, Germany
Izopropanol	Sigma, Germany
Etanol	Merck, Germany
Metanol	Sigma, Germany
Kloroform	Merck, Germany
Ksilen	Merck, Germany
İzoamil Alkol	Merck, Germany
N, N-Metilen Bisakrilamid	Fluka, Schweiz
Merkaptoetanol	Invitrogen, Germany
Amonyum PerSülfat (APS)	Sigma, Germany
Skim Milk Powder	Fluka, Schweiz

TAE (Tris/Asetik Asit /EDTA)	Sigma, Germany
Agaroz	Invitrogen, Germany
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	Sigma, Germany
TEMED	BIO-RAD
Tripan Blue	BIO-RAD
Tripsin 0.25%	HyClone
Glycine	Sigma, Germany
Gliserol	Fisher Scientific
Trizol	Invitrogen, Germany
Tween20	BIO-RAD
TRITONX-100	Fisher Scientific
Opti-MEM	Life Technologies
Eozin	Merck, Germany
Hematoksilen	Merck, Germany
Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	Sigma, Germany
Sitrat buffer	Thermo Scientific
Western ECL Solüsyon	BIO-RAD
5X siRNA Buffer	Thermo Scientific
DharmaFECT Transfeksiyon Ajanı	Thermo Scientific

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Üretici Firmaları

Cihazlar	Üretici
İnkübatör	Sanyo
Mikroskop	Leica
Heat Block	Techne, UK
Azot Saklama Tankı	Air
-80°C Dondurucu	Sanyo
-20°C Dondurucu	Bosch
Hücre Sayım Cihazı	BIO-RAD
Santrifüj	Hettich Rotina, Germany
Katı ve Sıvı Otoklav	Nüve SteamArt
Su Banyosu	Nüve
Ph metre	Hanna
Hassas Terazî	Shimadzu, Japan
Jel Elektforez Sistemi	Thermo Scientific, USA
Mikrodalga Fırını	Samsung, Korea
UV Translüminatör	Herolab, Germany
Vortex	VWR International, Germany
Steril Hücre Kültürü Kabini	Thermo BioSafety Cabinet Class II
XCELLigence	Roche
Elektforez Güç Kaynağı	Consort, Belgium
Manyetik Karıştırıcı	Cleaver Scientific

Spin atırıcı	VWR advanced, Korea
Mini ve Midi Format Elektroforez Sistemi	VWR Galaxy Ministar, Korea
Sonikasyon Cihazı	BIO-RAD
Western Transfer Cihazı	Diagenode
Biospec-nano Spektrofotometre	Thermo Scientific
Orbital Shaker	Shimadzu, Japan
Buz Makinesi	VWR
Ultra Saf Su Cihazı	Scotsman IL, USA
Etüv	Thermo Scientific, USA
Thermal Cyclers	Nüve
Real-Time PCR Cihazı	BIO-RAD
Kriyo Tüp	QIAGEN
Hücre Kültür Flaskı (25cm ² - 175cm ²)	Thermo Scientific
Santrifüj Tüpleri (15mL - 50mL)	Thermo Scientific
Santrifüj Tüpleri (0.5mL – 2 mL)	Thermo Scientific
Serolojik Pipet	NEPTUNE
Hücre Kazıyıcı	SARSTEDT
Well Plate (6-12)	Greiner, Germany
Petri	Thermo Scientific
Hücre Sayım Lamı	Nunclon
Neşter	BIO-RAD
Pipet Ucu	Broche
PVDF Transfer Membran	NEPTUNE
	Thermo Scientific

Western Görüntüleme Cihazı	BIO-RAD ChemiDoc MP
Pipet Tabancası	Thermo Scientific
Otomatik Pipetler	Gilson Pipetman

3.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmada Riken Hücre Bankasından sağlanan HepG2 (Resource no: RBRC-RCB1886) hepatosellüler karsinoma hücre hattı kullanıldı. Bu hücre hattının özellikleri temel olarak şu şekildedir

Tablo 4. HepG2 hücre hattının özellikleri

Riken kodu ve hücre hattının adı	RCB1886- HepG2
Kaynak	İnsan
Doku	Karaciğer
Morfoloji	epithelial-like
Yapışma özelliği	Evet
Antibiyotik	Yok
Büyüme sıcaklığı	37 °C
Karbondioksit konsantrasyonu	5%
Pasaj metodu	0.25% tripsin
Ayırım oranı	1:8
Ömür	Sonsuz

3.2.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Medyumun Hazırlanışı

500 ml DMEM/High Glukoz (HY-SH30243.01) medyumun içerisine aşağıdaki bileşenler eklenerek kullanılır:

Bileşenler şu şekildedir:

- 50 ml FBS (Wisent- 080110 veya HY- CH30160.02)
- 5 ml penisilin /streptomysin (HY-SV30010)
- 4 ml L-Glutamin (Wisent-609-065-ZL)
- 0,05 ml Plasmocin (ant-mpt (Invivogen))

olacak şekilde medyum hazırlandı. Medyum +4 °C derecede muhafaza edildi.

3.2.1.2. Stok Hücrelerin Ekimi

1. Her çalışmaya başlamadan yarım saat önce kabinin UV ışığı açılarak kabin sterilize edildi. Kabin ve kullanılacak pipetler, çalışma öncesinde %70'lik etanol ile temizlendi.
Tüm işlemler sırasında steril eldiven kullanıldı.
2. Su banyosu 37°C'ye ayarlandı.
3. Stok hücreler alınarak 37 °C'deki su banyosunda 2 dakika bekletildi.
4. Cryovial tüplerin etrafı alkol ile temizlenip, kapak o şekilde açıldı.
5. 5 ml medyum konan falkon tüpünün içine stok solüsyonu içindeki hücreler aktarıldı.
6. 25 °C'de 900 rpm'de 3 dk. santrifüj yapıldı.
7. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı (Bu aşamada hücrelere zarar verilmemelidir).
8. Hücrelerin üzerine 5 ml medyum konuldu, pipetaj yapılarak hücreler çözüldü.
9. 10 ml DMEM medyum konmuş flasklara pipetaj yapılarak çözülen hücreler ekildi.

10. Flasktaki hücrelerin homojen olarak dağılması sağlandıktan sonra, flask 37°C % 5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu.

3.2.1.3.Medyum Değişimi

- 1- Medyum 37 °C'de ısıtıldı.
- 2- Flasktaki medyum uzaklaştırıldı.
- 3- 10 ml medyum eklendi ve 37°C, % 5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu.

3.2.1.4. Hücrelerin Pasajlanması

- 1- Hücreler buldukları flasklarda yeterli doluluğa ulaştığı zamanlarda pasajlama işlemi yapıldı.
- 2- DMEM, 1X PBS ve tripsin-EDTA su banyosunda 37°C'ye ısıtıldı.
- 3- Flask dik konuma getirildi ve hücre tabakasının olduğu yüzeye pipet değdirilmeden medyum yavaşça çekildi.
- 4- Hücre tabakasına pipet değdirilmeden flask alt köşesine 1X PBS (5 ml) ilave edildi, yüzey yıkandı ve PBS yavaşça çekildi.
- 5- 3 ml Tripsin-EDTA (HY-SH30042.01) eklendi ve flask 3-5 dk. CO₂ inkübatöründe tutuldu, hücrelerin kalkması sağlandı.
- 6- Mikroskopta hücrelerin flask tabanından kalkıp kalkmadığı kontrol edildi.
- 7- 5 ml medyum eklenip, pipetaj yapılarak 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı.
- 8- 25 °C'de 900 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi.
- 9- Süpernatant atıldı ve pellet temiz medyum içinde homojen olana kadar çözdürüldü.
- 10- İstenilen deney kabına ekim işlemi gerçekleştirildi.
- 11- 37°C, % 5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu.

3.2.1.5. Hücre Sayımı

Yukarıda belirtildiği gibi flasktan kaldırılan hücreler medyumda çözündürülüp, homojenize edildi.

- 1- 10 µl Tripan Blue, 10 µl hücre örneği ile karıştırıldı.
- 2- Bio-Rad's New TC10™ Automated Cell Counter cihazının slaytına bu karışımdan 10 µl aktararak ölçüm yapıldı.
- 3- Konsantrasyon (hücre/ml)=canlı hücre sayısı ve hücrelerin canlılık oranı belirlendi. Ekim yapılacak plate'e uygun hesap yapıp, ekim gerçekleştirildi (Şekil 10).



Şekil 10. Bio-Rad's New TC10™ Automated Cell Counter'da hücre sayım aşamaları

3.2.2. siRNA'ların Hazırlanması

Tüm deneylerde siRNA-pool teknolojisi kullanıldı. Proje kapsamında Human BMP9 siRNA-SMARTpool, Non-Targeting Pool and GAPD Control Pool Dharmacon firmasından temin edildi. siRNA'lar firmadan liyofilize halde geldi. Liyofilize haldeki siRNA'lar üreticinin talimatlarına göre 1X siRNA Buffer ile sulandırıldı. Uygun miktarlarda sulandırılan siRNA'ların konsantrasyonları 100 µM oldu. siRNA'lar 100 µM konsantrasyonda -20 °C derecede muhafaza edildi. Deneylerde ise 100 µM siRNA'lar öncelikle yine 1X siRNA Buffer ile 5 µM'a indirildi ve 5 µM üzerinden hesaplamalar yapıldı. Transfeksiyon ajanı olarak ise

yine aynı firmadan bu siRNA pool'ların transfeksiyonuna uygun Dharmafect Transfection Reagent temin edildi. Dharmafect ise +4 °C derecede muhafaza edildi.

3.2.3. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi ile Proliferasyon Analizi

- 1- xCELLigence özel platelerine DMEM'den 100 µl her kuyucuğa eklenip, cihaza okutuldu.
- 2- Pasajdan elde edilen hücreler hücre sayımı yapıldıktan sonra 6 well platelere ekildi.
- 3- Ekimden 24 saat sonra BMP9-siRNA ve NT-siRNA hücrelere 3'erli olacak şekilde transfekte edildi.
- 4- Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve her bir well'e 2×10^4 olacak şekilde xCELLigence sistemine ait özel E-Plate 16'lara ekildi.
- 5- Ekim ardından 30 dakika oda sıcaklığında bu plateler bekletildi.
- 6- Plateler 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörün içerisinde bulunan xCeLLigence cihazına yerleştirildi.
- 7- Ekim sonrası sistem her 15 dakikada bir ölçüm alacak şekilde 96 saat civarı okuma yaptırıldı.
- 8- Cihazda kurulan program bittiğinde analiz kısmına geçildi.

3.2.4. Hücrelere siRNA'ların Transfeksiyonu

Hücreler öncelikle, kültürden sonra, RNA izolasyonu için 12'lik well plate'e ve Protein izolasyonu için 6'lık well plate'e ekilerek, antibiyotiksiz (Penicillin ve Plasmocin içermeyen) medium'da kültür edildi. Plate'e ekimden 24 saat sonra transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. Hücre sayıları 24 saat sonra %60-70 doluluğa ulaşacak şekilde ayarlandı (12'lik well için yaklaşık $2 \cdot 10^5$ hücre /well ve 6'lık well için yaklaşık $3 \cdot 10^5$ hücre/well). Tüm deneylerde 25 nM siRNA dozu kullanıldı. Hücrelerin Dharmafect ajanı ile siRNA transfeksiyonları için aşağıdaki deney protokolü uygulanmıştır.

- 1- Transfeksiyon için öncelikle Opti-MEM ve Dharmafect aşağıdaki tabloda belirtilen miktarlarda koyularak çok kısa vorteks yapıldı ve spin atırıldı (Tablo 5).

Tablo 5. Transfeksiyon için karışımın hazırlanması

Karışım	Non-Target (NT)	BMP9	GAPDH
Opti-MEM	600 µl	600 µl	600 µl
100 µm siRNA	3 µl	3 µl	3 µl
Dharmafect	24 µl	24 µl	24 µl

- 2- 5 dk. oda ısısında inkübe edildi.
- 3- Ve son olarak siRNA'lar koyularak vorteks yapıldı ve spin atırıldı.
- 4- Transfeksiyon karışımı 10 dk. oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Sonra inkübatörden hücreler çıkartıldı.
- 5- İnkübasyonu tamamlanan transfeksiyon karışımı, 12'lik well için her bir kuyu başına 100 µl olacak şekilde son hacim 1 ml, 6'lık well için ise her bir kuyu başına 200 µl olacak şekilde son hacim 2 ml şeklinde ayarlanarak hücrelerin üzerine damla damla eklendi.
- 6- Karışımın homojen olarak dağılması için plate'ler hafifçe ileri geri hareket ettirildi.

- 7- 37°C % 5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu.
- 8- 48.saatte hem mRNA düzeyinde analiz, hem de protein düzeyinde analiz gerçekleştirildi.

3.2.5. mRNA Düzeyinde Susturmanın Gösterilmesi

3.2.5.1.TRİZOL ile Hücreden RNA İzolasyonu

Hücreler RNA izolasyonu için HepG2 insan hepatosellüler karsinoma hücreleri, 12 well platelere 2.0×10^5 hücre/well olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra 25 nM BMP9-siRNA, 25 nM NT-siRNA, 25 nM GAPD siRNA, sadece Dharmafect ve pozitif kontrol için sadece medyum her bir grup için en az 3'erli tekrar olacak şekilde hücrelere uygulandı. 48 saat sonra aşağıdaki TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostic) protokol takip edilerek RNA izolasyonu yapıldı. Ayrıca deney esnasında sadece Dharmafect ve Pozitif kontrol için sadece medyum verilen hücrelerde 48 saat süresince belli aralıklarla gözlemlendi. Kullanılan Dharmafect dozunun hücrelere herhangi toksik etki yapmadığı görüldü.

- 1- 12'lik welllerdeki hücreler buz üzerine alındı ve medyumdan uzaklaştırıldı.
- 2- 1X PBS ile (1mL) 2 kez yıkama yapıldı.
- 3- Her bir kuyucuktaki hücrelerin üzerine 500 µl TRİZOL kimyasalı (Invitrogen, Cat. No.15596-026) ilave edildi ve pipet ucu ile hücreler kazındı.
- 4- Her kuyucuktaki hücreler 1,5 mL'lik ependorf tüplere alındı.
- 5- Oda ısısında 5 dk. inkübe edildi.
- 6- Ependorflar içine alınan hücre solüsyonu üzerine 100 µL kloroform (Merck, Cat.No.102431) eklendi ve renk değişene kadar 2-3 dk sallandı (10sn. vorteks yapıldı).
- 7- Organik ve sulu fazın ayrışması için 15.000 x rpm'de 15 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı.
- 8- RNA'ları içeren sulu faz yeni 1,5 mL'lik ependorf tüpe alındı.

- 9- 500 µL %100 etanol eklenip, sallanarak karıştırıldı ve buz üzerinde 10 dk. inkübe edildi.
- 10- 15.000 x rpm'de 15 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı.
- 11- Süpernatant RNA'ya zarar vermeden dikkatlice atıldı. % 70'lik etanolden (Merck, Cat. No.100993) 160 µL eklendi ve hafifçe sallandı.
- 12- 15.000 x rpm'de 5 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı.
- 13- Çöktürülen RNA pelleti etanolün uzaklaşması için kurumaya bırakıldı.
- 14- Kuruyan RNA pelleti 20 µL PCR-grade DEPC (Invitrogen, Cat.No.46-2224) su içerisinde çözüldü.
- 15- RNA'lar nanodropta ölçüldü, konsantrasyonları ve OD değerleri belirlendi.
- 16- RNA diğer deneylerde kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

3.2.5.2.RNA'ların cDNA Formuna Çevrilmesi

İzole edilen total RNA'ların cDNA formuna çevrilmesi için cDNA sentez kiti (RevertAid First Strand cDNA sentez kit, Thermo Sci. K1612) yararlanılarak cDNA sentezlendi.

- RNA ölçüm sonuçlarına göre cDNA formuna çevirilecek tüm RNA örnekleri 1 µg'a eşitlendi.
- Hesaplama işlemi şöyle yapıldı;

Örneğin izole edilen RNA değeri $X=274,2$ ng/µl olsun. Bunu 1 µg'na eşitlemek isteniliyorsa;

$$274,2 \text{ ng} = 0,274 \text{ µg}$$

(0,274'ü neyle çarparsam 1'e eşitlenir diye hesap yapılır)

$$0,274 \times 3,65 \approx 1,0001 \text{ µg}$$

3,65 µl = alınacak RNA miktarı

- Hesaplamaları yaptıktan sonra çalışmaya geçildi.

(NOT: RNA ve kitin içinde bulunan malzemeler her zaman buzda bekletilmelidir).

1. Örnek sayısı kadar 1,5 ml'lik ependorf tüp çıkartıldı.

2. Her tüpe ayrı ayrı 1µl oligo(dT)₁₈ primer konuldu.
3. Her bir örnek için hesaplanan miktarda RNA sırasıyla ependorf tüplere konuldu.
4. Her bir örnek için hesaplanan miktarda su (kitin içinde mevcut) sırasıyla ependorf tüplere konuldu (örneğin RNA 2 µl ise 11 µl'ye tamamlayacak şekilde yani 9 µl su tüplere konuldu).
5. Ayrı bir temiz ependorf tüpün içinde aşağıdaki oranlarda mix hazırlandı.
 - ❖ Bir örnek için hazırlanacak miktarlar (örnek sayısıyla çarpılarak mix hazırlandı).
 - 5X Reaction Buffer 4µl
 - Ribolock™ RNase Inhibitor(20 u/µl) 1µl
 - 10mM DNTP Mix 2µl
 - RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase(200 u/µl) 1µl
 - Hazırlanan mix örnek tüplerinin üstüne 8 µl olacak şekilde dağıtıldı.
 - Toplam hacim 20 µl oldu (12 µl önceden vardı 8 µl mix eklenerek toplam 20 µl oldu).
6. 42 °C'de 60 dk. inkübasyona bırakıldı. Sonra 70°C de 5 dk. bekletildi. Spin atırıldı.
7. Elde edilen cDNA'lar etiketlendikten sonra kullanılacağı zamana kadar -70°C de muhafaza edildi.

3.2.5.3.BETA AKTIN, GAPDH, BMP9 ve Hedef Genlerin Primerlerinin Hazırlanması

Liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarda 1XTE (Tris-EDTA) eklenerek 100 pmol/mL'lik stok çözeltiler hazırlandı. PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 20 µL alınarak 80 µL 1×TE tamponu eklendi.

Kullanılan primer sekansları ve PCR ürünlerinin uzunlukları tablo 6'da tanımlanmaktadır:

Tablo 6. Hedef genlerin ekspresyon analizi için yapılan RT-PCR'da kullanılan primer listesi

Primer Adı	Forward Primer Dizisi (5'→3')	Reverse Primer Dizisi (5'→3')	PCR ürün uzunluğu (bp)	T _m
GAPDH	CAAGGTCATCCATGACAACCTTG	GTCCACCACCCTGTGCTGTAG	496	58
BETA-ACTİN	TTCCTGGGCATGGAGTCCT	AGGAGGAGCAATGATCTTGATC	204	58
BMP9 (GDF2)	AAGATGTGCTTCTGGAAGGG	TCCGATAAGTCGACTACGCC	107	58
SMAD1	CTACCATCATGGATTCATCCTACT	TGTCTGACTCATCCATCCTCAAG	387	55
SMAD5	CCCAGCCTATGGATAACAAGC	TGAAAAGCTTCTCCAACACG	151	55
SMAD8 (SMAD9)	TCAACGATAGAAAATACCAGGAGA	CTGCACAAAAGATGCTGCTGT	108	55
SMAD4	AGGATCAGTAGGTGGAATAG	TCTAAAGGTTGTGGGTCTGC	240	55
P21	CGTGGCTACATCTCCCATTT	TCCCTCATGACCAGGATCTC	315	58
ID1	ACATGAACGGCTGTTACTCA	TCCAACCTGAAGGTCCTGAT	121	58
ID2	CATCCCCAGAACAAGAAGG	TGGTGATGCAGGCTGACAAT	117	58

3.2.5.4. Gradyent PCR

Kantitatif Real Time PCR çalışmasına başlamadan önce ekspresyon çalışması yapılacak tüm genlere ait primerler için Gradient PCR çalışması yapıldı.

Gradient PCR çalışması için HepG2 insan hepatosellüler karsinoma hücre hatlarından elde edilmiş bir cDNA kullanıldı. PCR işlemi Tablo 7'de gösterildiği şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 7. Gradient PCR çalışması için gerekli reaktifler ve miktarları

Reaktif	Miktar
(NH ₄)SO ₂ buffer	2,5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
dNTP	0,5 µl
20 pmol Forward Primer	0,5 µl
20 pmol Reverse Primer	0,5 µl
Taq DNA Polymerase	0,2 µl
dH ₂ O	16,3 µl
cDNA	2 µl

Yukarıdaki bileşenler son hacim 25 µl olacak şekilde karıştırıldı. Her bir gen için 55-57-58-60°C derece sıcaklıklarda Gradient PCR çalışması kuruldu. BIO-RAD T100 model PCR cihazında Tablo 8'de belirtilen koşullarda amplifikasyon gerçekleştirildi.

Tablo 8. Gradient PCR çalışması uygulanan amplifikasyon koşulları

Reaksiyon	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	95 °C	5 dakika	42 döngü
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	
Primer bağlanma	55-60 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son uzama	72°C	5 dakika	

BMP9, Beta-Aktin, GAPDH, P21, ID1, ID2 için uygun sıcaklık 58°C ; SMAD1, SMAD5, SMAD8, SMAD4 için uygun sıcaklık 55°C olarak belirlendi.

3.2.5.5. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonrası istenen bölgenin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için %2'lik agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü.

1. 100 mL 1xTAE (Tris/Asetik Asit /EDTA) tamponunun içine 2 gr agaroz (Invitrogen kat no: 16500-100g) konuldu.
2. Mikrodalga fırında homojen olana kadar tutuldu.
3. 1.8 µL ethidium bromide (Merck, 11608.0030) ilave edildikten sonra jel kalıba dökülerek donmaya bırakıldı.
4. PCR ürünlerinden 5 µL alınarak 1 µL 6x Loading dye (Thermo, #R0611) ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi.
5. PCR reaksiyonu ile elde edilen ürünler %2 agaroz jel elektrofrezinde, 95V akım altında, 40dk. yürütüldükten sonra UV transliminatörde görüntülendi.

3.2.5.6. Jel Ekstraksiyonu

Jel ekstraksiyonu Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, cat. No 28704) ile yapıldı.

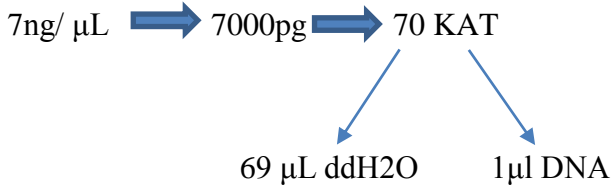
1. Jel ekstraksiyonu yapılacak PCR ürünleri (20 μ L) yeni hazırlanmış taze kalın taraklı jele yüklendi.
2. Dimerlerin uzaklaşması için mümkün olan en uzun süre yürütüldü.
3. Karanlık odada bantlara bakılıp, hangisinin alınacağına karar verildi.
4. DNA bantları bant kesici (extractor) ile dikkatlice alındı.
5. Kesilen jel parçası tartılıp ependorf tüpe aktarıldı.
6. Örneğin; 1 Jel 40 mg = 40 μ L hesabına göre kaç kuyucuk kesildi ise 2 ya da 3 oranda 2x40, 3x40 düşünöldü.
7. 40x örnek sayısı kadar QG tamponu eklendi (QIAGEN).
8. 50 °C'de 10 dk. inkübasyona bırakıldı.
9. Jel parçaları tamamen eriyene kadar 2-3 dakikada bir vortex yapıldı. (Jel parçaları eridikten sonra tamponun rengi sarı olmalı, eğer turuncu ya da mor renk oluşursa renk sarı olana kadar 10 μ L 3M sodyum asetat eklenir.)
10. Süpernatant mor kapaklı spin kolona aktarıldı ve 13.000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi.
11. Altındaki toplama tüpü boşaltılıp tekrar takıldı.
12. İçindeki alkolün tamamen uzaklaşması için boş olarak tekrar santrifüj yapıldı.
13. Spin kolon yeni ependorf tüpe oturtuldu. Toplama tüpleri atıldı.
14. 30 μ L EB buffer (QIAGEN) eklendi. 4dk. oda sıcaklığında bekletildi.
15. 13.000 rpm'de 1dk. santrifüjlendi. DNA değeri spektrofotometrede okutuldu.

3.2.5.7. Real-time PCR için Standartların Hazırlanması

Jel ekstraksiyonu yapılan DNA'lardan standart hazırlanır. Primere ait jel ekstraksiyonu yaptıktan sonra spektrofotometrede konsantrasyon ve kalite ölçümü yapıldı.

ÖRNEK:

BETA-ACTİN geninin jel ekstraksiyon sonucu:



Şeklinde hesaplama ile sulandırma katsayısı bulundu. Sonrasında 1:10 miktarında seri dilüsyon yapıldı. Standartlar birinci standart hazırlandıktan sonra dilüe edilerek sırayla hazırlandı.

3.2.5.8. Kantitatif Real Time PCR (RT-PCR) Protokolü

Hücre hatlarında siRNA uygulamasının mRNA düzeyinde etkinliğini saptamak için Qiagen Rotor Gene Q cihazı kullanılarak real time PCR çalışması yapıldı. BMP9 hedef gen, Beta Actin standardizasyon, GAPDH hücre hatlarının transfeksiyon etkinliğini saptamak için siRNA uygulamaları ile elde edilen baskılama oranları ve hedef genlerde olan değişiklikler incelendi.

Real-time PCR'da kullanılan sybr green ışıktan etkilendiği için çalışma alanı karanlıkta, metal bloklarda ve tablo 9'daki miktarlarda (bir örnek için) çalışıldı.

Tablo 9. Kantitatif Real Time PCR çalışması için gerekli reaktifler ve miktarları

Reaktif	Miktar
2X <u>QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix</u>	12,5 µl
20 <u>pmol Forward Primer</u>	0,5 µl
20 <u>pmol Reverse Primer</u>	0,5 µl
dH ₂ O	9 µl
<u>cDNA</u>	2,5 µl

Yukarıdaki bileşenler her bir örnek için son hacim 25 µl olacak şekilde karıştırıldı ve Rotor Gene Q cihazında her bir genimiz için uygun bağlanma sıcaklığında 45 döngüye ayarlanarak Real Time PCR çalışması gerçekleştirildi. Her bir örnek için örnek sayısı en az 3 olacak şekilde çalışıldı. Sonuçlar hazırlanan standartlar ile birlikte Rotor Gene Q Software programında analiz edildi. İlgili genlerdeki ekspresyon değerleri housekeeping gen olan Beta Actin değerlerine oranlanarak sonuçlar analiz edildi.

3.2.6. Protein Düzeyinde Baskılamanın Gösterilmesi

3.2.6.1. Protein İzolasyonu

Real Time PCR ile BMP9 geninin baskılandığı gösterildikten sonra, aynı sonuçları protein seviyesinde de konfirme etmek için Western Blot yapıldı. Hücreler protein izolasyonu için 6 well platalere 3.0×10^5 sayıda olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra 25nM BMP9-siRNA, 25nM NT-siRNA her bir siRNA için en az 3'erli tekrar olacak şekilde hücrelere transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra protein izolasyonu yapıldı.

3.2.6.2. Hücrelerden Protein İzolasyonu

- 1- 6'lık well plate'de bulunan hücrelerin medyum tamamen çekildi.
- 2- Hücreler üzerine 1X PBS eklendi. PBS'le yıkayıp, kazıyıcı yardımıyla petri yüzeyinden kaldırıldı.
- 3- Her kuyucuktaki hücreler 1.5 mL'lik ependorf tüplere alındı.
- 4- Elde edilen hücre süspansiyonu $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 4000 rpm'de 4 dk. santrifüj edildi.
- 5- Süpernatant pelete zarar vermeyecek şekilde uzaklaştırıldı.
- 6- 1.5 mL'lik ependorf tüpün içerisine 980 μL RIPA Lizis Buffer (Santa Cruz, Cat.No: sc-24948), 10 μL Proteaz İnhibitörü (Calbiochem, Cat.No:539137), 10 μL Fosfotaz İnhibitörü (Thermo Scientific Cat.No: 1862495) konularak karışım hazırlandı.
- 7- Her bir peletin üzerine hazırlanan karışımdan 150'şer μL konuldu.
- 8- Çok hafif vorteks yapıldı. Ve buz üzerinde 5 dk. inkübe edildi.
- 9- Sonra spin atırıldı.
- 10- Her bir örnek 0,5 mL'lik ependorf tüpüne aktarılıp 2.5 dk. boyunca sonikasyon işlemi yapılarak proteinlerin parçalanması sağlandı.
- 11- Örnekler tekrar 1,5 mL'lik ependorf tüpe alındı. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 150.000 rpm hızında 5 dk. santrifüj edildi.

3.3. WESTERN BLOTTİNG

3.3.1. Proteinlerin Boyanması

- 1- Proteinleri boyamak için buffer hazırlandı.
- 2- Buffer'ın içeriği ve oranları: Sample Buffer (%95) + Merkaptoetanol (%5) Beta-Merkaptoetanol; proteinin sülfidril bağlarını kırarak 3 boyutlu yapısını düz ip haline getirir. Bu sayede kırılmalardan kaynaklanabilecek farklı yürümler engellenmiş olur ve bize proteinin boyu hakkında en doğru bilgiyi vermiş olur). Beta-merkaptoetanol'ün insan sağlığı açısından çeker ocakta konulması önemlidir.
- 3- +4°C'de 150.000 rpm hızında 5 dk. santrifüjlenen örneklerin süpernatantı yeni bir tüpe alındı ve üzerine hazırlanan sample buffer'dan 1:3 oranında eklendi.
- 4- Hafif vorteks yapıldı ve spin atırıldı.
- 5- 95°C'de 5 dk. proteinlerin inkübe edilmesi sağlandı.

3.3.2. %10'luk SDS-PAGE Jelin Hazırlanması

- 2 ayrı jel karışımı hazırlandı. (Running jel ve Stacking jel)
- Jel için gerekli solüsyonların hazırlanması:

Tablo 10. Western Blot jeli için gerekli solüsyonların hazırlanması

%30 ACA (akrilamid)	58 gr ACA + 2 gr N,N,metilen bis ACA + 200 mL dW
2M Tris HCL	72 gr Tris + 250 Ml dW karışımı hazırlanır ve iyice çözüldükten sonra pH:8,8 e ayarlanır.
0.5M Tris HCL	6 gr Tris + 80 Ml dW karışımı hazırlanır ve iyice çözüldükten sonra pH:6,8 e ayarlanır.
%10APS (amonyumpersulfat)	25 mg APS + 250 μ L dW karışımı hazırlanır. Bu karışım uzun süre dayanmaz o yüzden hemen hazırlayıp kullanmalıyız.
%10SDS (sodyumdodesilsulfat)	5gr SDS tartılıp 50 mL'ye dW ile tamamlanır.

a. Running Jel Oranları

Elde edilen proteinin moleküler boyutuna göre jelin % kaçlık olacağına karar verildi ve çalışma protokolüne göre jel hazırlandı.

Tablo 11. Western Blot Running jel hazırlanışı

Bileşen	%10
<u>dW</u>	8.26 <u>mL</u>
%30 ACA	6 <u>mL</u>
2M <u>Tris</u>	3.38 <u>mL</u>
%10 APS	180 μ L
%10 SDS	180 μ L
TEMED	20 μ L

b. Stacking Jel Oranları

Tablo 12. Western Blot Stacking jel hazırlanışı

Bileşen	%10
<u>dW</u>	4.055 <u>mL</u>
%30 ACA	0.7 <u>mL</u>
0,5 M <u>Tris</u>	1.5 <u>mL</u>
%10 APS	50 μ L
%10 SDS	60 μ L
TEMED	10 μ L

NOT: Bu tablolardaki oranlar 2 adet jel dökmek için gerekli olan oranlardır.

3.3.3. Jelin Hazırlanması:

1. Önce Running jel hazırlandı.
2. Yapım aşaması yukarıda tabloda belirtilen oranlarda malzemelerin hazırlanması ve birleştirilmesiyle tamamlandı.
3. Malzemelerin 50 ml'lik falkonda birbirine karıştırılması sırasında APS ve TEMED eklenmesi sona bırakıldı. Çünkü jelin donmasını sağlayan bu iki maddenin birbiriyle etkileşimidir.
4. Camlar birbirine paralel olacak şekilde ayarlandı ve sıkıştırıldı. Suyla sızdırma olup olmadığı kontrol edildi.
5. Daha sonra tarak takılarak tarağın ulaştığı son nokta camda işaretlendi. Bu noktaya kadar olacak şekilde Running jel pipetle hızlıca ve köpük bırakmadan eklendi.
6. Ardından hemen izopropanol eklendi.
7. Running jel donduğunda donduğunu anlamak için camları eğik bir pozisyona getirerek donan jelin konumunu koruması ve akışkan olan

alkolün hareket etmesi sebebiyle kırıklı bir yapı oluşuyor. Bu sayede jelin donduğu anlaşılır. Bu aşamadan sonra alkol döküldü.

8. Stacking jel eklendi ve hemen tarak takıldı.
9. Donduğundan emin olunca tarak çıkartıldı. Proteinler yüklemeye hazır hale geldi.
10. Çıkarıldıktan sonra gözle kuyucukların yamuk olup olmadığı çatlak olup olmadığı kontrol edildi ve daha sonra camlar tanka takıldı.
11. Tanka takılırken iki cam arasına önce olmak üzere, üzerine 1x Running Buffer eklendi. Eğer buffer sızdırıyorsa çıkarıp tekrar takmak gerekir. Çünkü bu sızdırma proteinler yüklenip güç kaynağına takıp proteinler yürümeye başladığında bu sızıntı verilen elektriğin de bu sızıntıdan sızmasına ve proteinler yavaş veya hiç yürümemesine sebep olur. O yüzden çok önemlidir.
12. Sızdırmadığından emin olduktan sonra ve Running buffer eklendikten sonra protein yükleme aşamasına geçildi.

3.3.4. Proteinlerin Jele Yüklenmesi

- 1- İzole edilen proteinlerin jele yükleneceği miktar tespit edildi.
- 2- Ardından 1:3 oranında sample buffer ile karıştırıldı. 95°C’de 5dk. tutuldu ve buza alındı.
- 3- Proteinler jele yüklendi ve tank güç kaynağına bağlandı.
- 4- Proteinler yüklendikten sonra ProSieve™ EX Running Buffer 1X (Lonza) içerisinde 100 V’da 5 dk. ve 240 V’da 17 dk. yürütüldü.

3.3.5. Membrana Transfer Aşaması

1. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jeli camdan ayırarak transfer aşamasına geçildi.
 2. Nitroselüloz membran özel olarak saklandığı kutusundan çıkarılarak jele uygun bir şekilde kesilerek tekrar aynı kutunun içerisine koyuldu. Membran kullanılırken en önemli şey kurumamasına dikkat etmektir. Şayet kurursa proteini tutma özelliğini kaybeder.
 3. Nitroselüloz membran %100 metanol konulan bir kabın içerisinde 2-3 dk. bekletildi.
 4. Transfer buffer daha geniş yayvan bir kabın içerisine dolduruldu.
 5. İçerisine filtre kâğıtları konuldu. İşlem boyunca filtre kâğıtlarının ıslak bir şekilde kalması sağlandı.
- Membranın bekleme işlemi tamamlanıp jelin camlardan ayrılması sağlandıktan sonra membrana transfer için, Pierce G2 Fast Blotter (Thermo Scientific) cihazına sırasıyla filtre kağıdı-nitroselüloz membran-jel-filtre kağıdı şeklinde düzenek oluşturuldu. Ve hava kabarcığı kalmaması için hafifçe rulo ile basılarak işlem tamamlandı.
 - Transfer cihazı eksiden artıya doğru elektrik akımı vererek proteinlerin jelden membrana geçmesini sağladı

3.3.6. Bloklama

Proteinleri jelden membrana aktardıktan sonra membrana geçen proteinlerin dışındaki boşlukların kapatılması amacıyla bloklama yapılır. Yani bu sayede proteinin yapısında olan antikorların membranların boş olan kısımlarına bağlanmasını elimizden geldiğince en aza indirgemiş oluyoruz.

1. Anlamlı ve güvenilir sonuç elde etmek için antikorların membran üzerinde hangi proteinlerle ilgileniliyorsa o proteinlere bağlanmış olmasıdır. Membran üzerindeki nonspesifik bağlanmaların ortadan kaldırılması gerekir. Bunu yaparken de % 2,5'lik süt tozu çözeltisi kullanıldı.

2. Falkonda 1,25 g sütünun üzerini TBS-T ile 50 ml'ye tamamlayarak sütün çözeltisi hazırlandı. Ve vortekslendi.
3. Membranı süt tozu çözeltisine koymadan önce membranın önü ve arkası neresi diye karıştırmamak için işaret konuldu. Proteinler hep membranın üst kısmında kalmalı bu yüzden membranın ön yüzünün üzerine işaret konuldu.
4. Hangi antibody kaç kDa bantında görülmesi gerekiyorsa membran üzerindeki markerın kaç kDa bantlarına karşılık gelen yerleri işaretlendi. Görüntüleme sonrası proteinin kaç kDa olduğunun analizinin yapılması açısından kolaylık sağlar.
5. Normal bir kaba membran koyuldu.
6. Ve süt tozu membranın yüzeyini kaplayacak şekilde koyuldu.
7. Membran sütün çözeltisinde oda sıcaklığındaki orbital shakerda 30 dk. bekletildi.

3.3.7. Birincil Antikorla Muamele

Bloklama sonrasında, HepG2 hücrelerinin proteinlerinin bulunduğu membranlar primer antikorlar ile muamele edildi. Bu aşamada BMP9 (sc-27821, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)), Smad 1/5/8 (sc-6031-R, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)), P-Smad 1/5/8 (sc-12353, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)), Id-1 (sc-488, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)), Id-2 (sc-489, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)), Anti-p21(ab-7960, Abcam), Beta Actin (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)) antikorları kullanıldı.

1. Antikorlar yağsız süt tozu içinde BMP9 1/250, Anti-Smad 1/5/8 1/250, P-Smad 1/5/8 1/250, Id-1 1/250, Id-2 1/250, Anti-p21 1/1000 ve Beta Actin ise 1/1000 oranında eklendikten sonra membranlar +4 °C'de orbital shaker üzerinde overnight bırakıldı (Tablo 13).

Tablo 13. Kullanılan antikorlara ait bilgiler ve optimize edilmiş dilüsyon koşulları

Birinci Antibody	Protein (kDa)	Birinci Antikor (μ L antikor /ml süt tozu)	İkinci Antikor	İkinci Antikor (μ L antikor /ml TBS-T)
B-actin	42	1/1000	Mouse	1/2500
BMP9 (GDF2)	55	1/250	Goat	1/2500
Anti-SMAD 1/5/8	55	1/250	Rabbit	1/2500
P-SMAD 1/5/8	55	1/250	Goat	1/2500
Anti-P21	18	1/1000	Rabbit	1/2500
ID-1	15	1/250	Rabbit	1/2500
ID-2	15	1/250	Rabbit	1/2500

3.3.8. Yıkama

Ortamdaki gereksiz olan bağlanmaları ortadan kaldırmak için yıkama yapılır.

- 1- Yaklaşık 16 saat sonra membranlar üzerinde bulunan primer antikorlar alındı.
- 2- Antibody alındıktan sonra membran 1X TBS-T ile dolu bir kaba alındı. Ve 2 kez 5 dakika orbital shakerda yıkama yapıldı.

3.3.9. İkincil Antikorla Muamele

1. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra ikincil antikor muamelesine geçildi. Burada dikkat edilmesi gereken birincil antikor hangi hayvanın antijenine karşı uygulandıysa ikincil antikor da yine o hayvana ait olmalıdır. Mesela birinci antibody mouse ise ikinci antibody'de anti-mouse olmalıdır.
2. Kullanılacak olan ikincil antikor çözeltisi hazırlandı.

3. Yıkama sonrasında 1X TBS-T içerisinde 1/2500 oranında anti-mouse IgG, HRP-linked secondary antibody (7076P2; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) ile oda ısısında 30 dk. orbital shaker üzerinde bekletildi.

3.3.10. Yıkama ve Görüntüleme

1. 30 dk. sonunda membranlar yine 1X TBS-T ile dolu bir kaba alındı.
2. Ve 2 kez 5 dakika orbital shakerda sallanarak yıkama yapıldı.
3. Son yıkama yapılırken bir taraftanda ECL solüsyonu hazırlandı. ECL solüsyonu, ikincil antikora bağlanarak ışımaya yapar.
4. 750 µl Lumi A, 750 µl Lumi B solüsyonundan alınarak ve pipetaj yapılarak enzim çözeltisi hazırlandı. Bu oran 500 µl'de olabilir. Membranınızın büyüklüğüne göre değişir.
5. Tezgah önce izopropanol ile silindi. Ve strech yayarak düz zemin oluşturuldu.
6. Membranın üzerine hazırlanan enzim çözeltisi eklendi. Ve 5 dk. bekletildi.
7. Bu bekleme arasında görüntüleme yapılacak olan Biorad ChemiDoc MP. Cihazının açılması sağlandı.
8. 5 dk. olduktan sonra membran CD poşetin arasına yerleştirildi. Poşet ile membran arasında hava kabarcığının kalmamasına dikkat edildi. Görüntü almaya hazır hale gelindi.
9. Membranlar UV cihazda görüntülendi.

3.4. Dokuların Temini

Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı polikliniğinde takip edilen hepatosellüler karsinomlu hastaların karaciğer patolojik dokusu ile patolojik dokunun yanındaki sağlıklı dokular (kontrol grubu) temin edilerek iki gruba ayrıldı.

3.4.1. mRNA Düzeyinde Ekspresyonun Gösterilmesi

3.4.1.1.Dokulardan RNA İzolasyonu

Dokular küçük parçalara ayrılıp, 2 ml'lik ependorf tüpe konuldu. (Protokol için bkz. Bölüm 1.2.2.1).

3.4.1.2.RNA'ların cDNA Formuna Çevrilmesi

RNA ölçüm sonuçlarına göre cDNA formuna çevirilecek tüm RNA örnekleri 1 µg'a eşitlendi. Daha sonra RNA'lar cDNA'ya çevrildi (Protokol için bkz. Bölüm 1.2.2.2).

3.4.1.3.Gradient PCR Çalışması

Gradient PCR çalışması için HepG2 insan hücre hatlarından elde edilmiş bir cDNA kullanılarak BMP9 (GDF2) ve GAPDH genleri için gradient PCR kuruldu (Protokol için bkz. Bölüm 1.2.3.1).

3.4.1.4.Kantitatif Real Time PCR Çalışması

Kanserli ve normal karaciğer dokusu örneklerinde BMP9 (GDF2) ekspresyonunun mRNA düzeyinde ekspresyonunu belirlemek için real time PCR çalışması (Qiagen Rotor Gene Q) yapıldı. BMP9 hedef gen ile Beta Actin ekspresyon standardizasyonu yapıldıktan sonra doku örneklerinin ekspresyon seviyesindeki değişiklikleri incelendi.

Real time PCR deneyleri Tablo 3' de gösterilen primerler ve tabloda belirtilen bağlanma sıcaklıkları (T_m) ile aşağıdaki Tablo 4' de gösterildiği gibi gerçekleştirildi.

3.5. PARAFİN DOKUDAN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA

1. Formalinle fikse edilen ve parafine gömülü bloklardan 3-5 µm kalınlığında hazırlanan doku kesitleri önce 65°C'de 30 dk. etüvde bekletildikten sonra 5'er dk. süreyle Xylol'de 2 defa deparafinize edildi.
2. Bu işlemden sonra dokular sırasıyla 5'er dk. %50, %70, %90, %100 derecelik alkollerden geçirildi ve distile suya alındı.
3. Dokudaki antijen geri kazanımını etkinleştirmek için tüm antikorlarla boyanacak kesitler pH değeri 9 olan Sitrat Buffer içinde protein yüzleri karşılıklı gelmeyecek şekilde şaleye yerleştirildi.
4. Şale otoklav içerisine yerleştirilip 120°C çıkması beklenildi. Ve 120°C'de 5 dk. bekletildikten sonra otoklav kapatıldı. Soğuması beklenilip şale alındı.
5. PBS (Phosphate Buffer Saline) solüsyonunda 5 dk. yıkandıktan sonra antijen geri kazanımı için %3'lük H₂O₂ solüsyonunda 5 dk. bekletildi.

H₂O₂ solüsyonunun hazırlanışı; 50 ml metanol üzerine 1,5 ml H₂O₂ eklenerek solüsyon hazırlandı.

6. 10 dk. PBS solüsyonunda tutulduktan sonra preparatlara %1'lik BSA (Bovin Serum Albumin) solüsyonundan damlatılarak 30 dk. boyunca bekletildi.

BSA hazırlanışı; 100 mg BSA üzerine 10 ml PBS-T eklenerek solüsyon hazırlandı.

PBS-T hazırlanışı; 100 ml PBS (10X) solüsyonundan alınır. Üzeri 900 ml distile su ile tamamlanır. Ve 1 ml Tween20 eklenerek solüsyon hazırlandı.

7. Sonrasında kullanıma hazır BMP9 (Rabbit Polyclonal anti-BMP9, ab35088) antikorunu BSA'nın içerisinde dilüe ederek 1/500 oranı ile +4°C 'de overnight inkübasyon yapıldı.
8. PBS'de 2 defa 5 dakika yıkandı.
9. İşaretli 2.Antikoru BSA'nın içerisinde dilüe ederek 1/500 oranı ile oda sıcaklığında 30-40 dk. inkübasyon yapıldı.

Bu bekleme süresinde 11. Basamakta kullanılacak olan ABC solüsyon hazırlandı.

10. PBS'de 2 defa 5 dk. yıkandı.

11. ABC (Avidin-Biotin Complex) solüsyonundan damlatılarak 20 dk. boyunca bekletildi.

ABC solüsyonunun hazırlanışı; 1 ml PBS'in içine 10 µl Avidin + 10 µl Biotin solüsyonundan konularak oda sıcaklığında 30 dk. inkübasyona bırakıldı.

12. PBS'de 2 defa 5 dk. yıkandı.

13. DAP'da 2 dk. bekletildi (DAP süresi 0-10 arasında değişebilir).

DAP hazırlanışı; 1 ml DAP için: 16 µl buffer, 32 µl DAP, 16 µl H₂O₂ konularak solüsyon hazırlandı (Örnek sayısına ve dokunun büyüklüğüne göre solüsyon miktarı değiştirilebilir).

14. Çeşme suyunda 5 dk. bekletildi.

15. Meyers Hematoksilen solüsyonunda 1 dk. boyandı.

16. PBS'de 2 defa 5 dk. yıkandı.

17. Distile su ile 5 dk. yıkandı.

18. Bu işlemden sonra dokular sırasıyla 5'er dk. %50, %70, %90, %100 derecelik alkollerden geçirildi.

19. Ve kesitler Xylol'de 5 dk.tutuldu (2 defa).

NOT: Xylol entellanı parçalar bu yüzden kurumaması beklenildi.

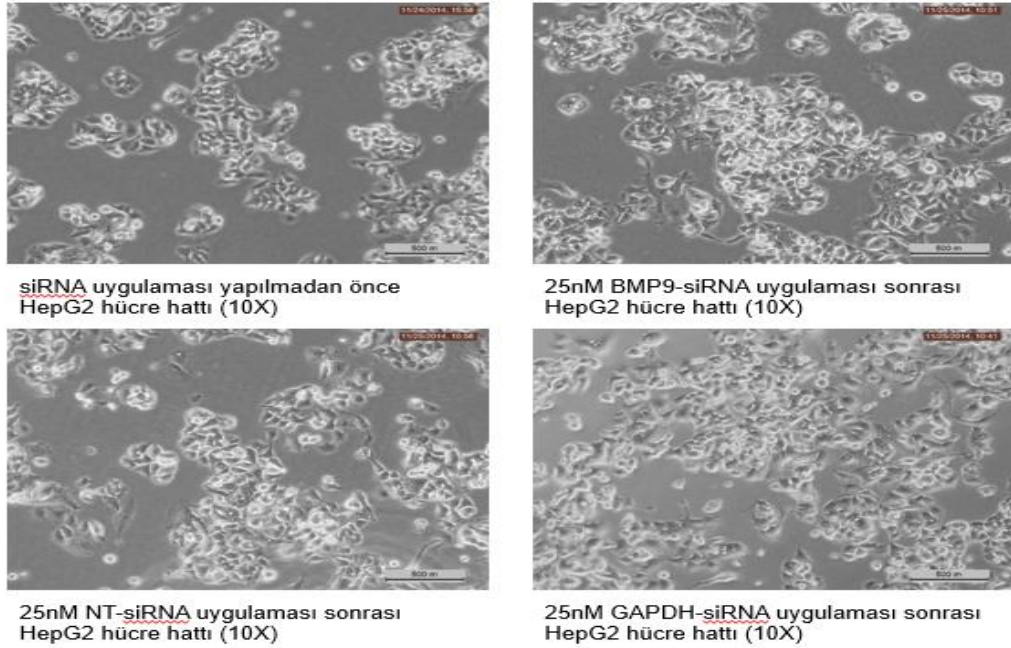
20. Doku kurutuldu ve entellan kapatma solüsyonu kullanılarak lamel ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi.

NOT: Entellan ile kapatma sırasında baloncuk kalmamasına dikkat edildi.

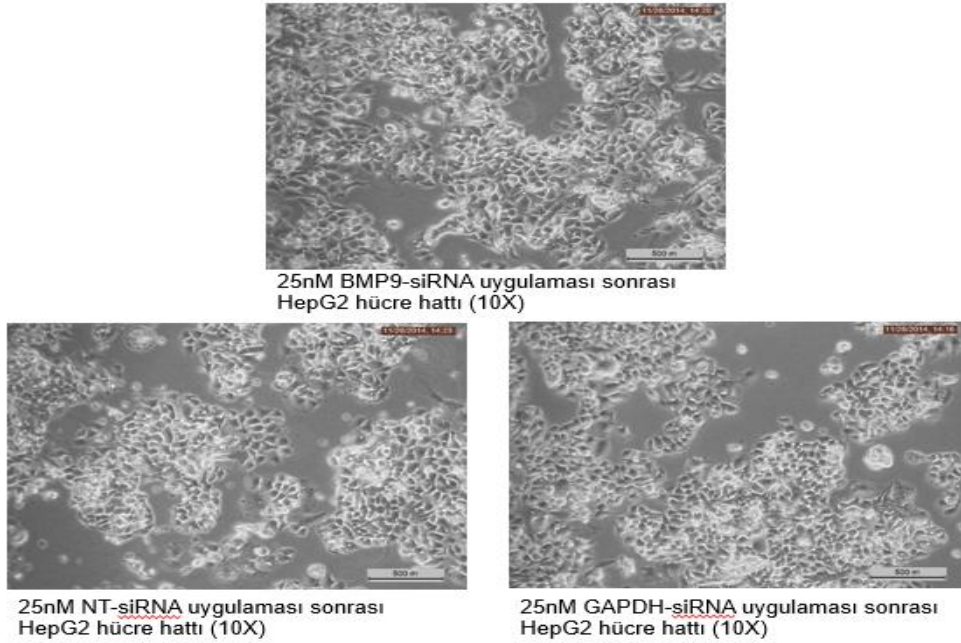
4. BULGULAR

4.1. siRNA UYGULAMASININ HepG2 HÜCRELERİNE UYGULANMASI ARDINDAN MORFOLOJİLERİNİN GÖZLEMLENMESİ

HepG2 hücre hattına 25nM NT-siRNA, GAPD-siRNA ve BMP9-siRNA uygulaması yapıldıktan 24 ve 48 saat sonra hücreler invert mikroskop altında 10X optik büyütmede görüntülendi. Aldığımız görüntüler ışığında siRNA uygulanan HepG2 hücre hattında 24. ve 48. saat sonra proliferasyon görülmüş olup herhangi bir morfolojik değişiklik tespit edilmemiştir (Şekil 11, 12).



Şekil 11. Hepatosellüler karsinoma hücrelerine (HepG2) 25nM BMP9-siRNA, NT-siRNA ve GAPDH-siRNA uygulamasından 24 saat sonra hücrelerin görünüşleri.

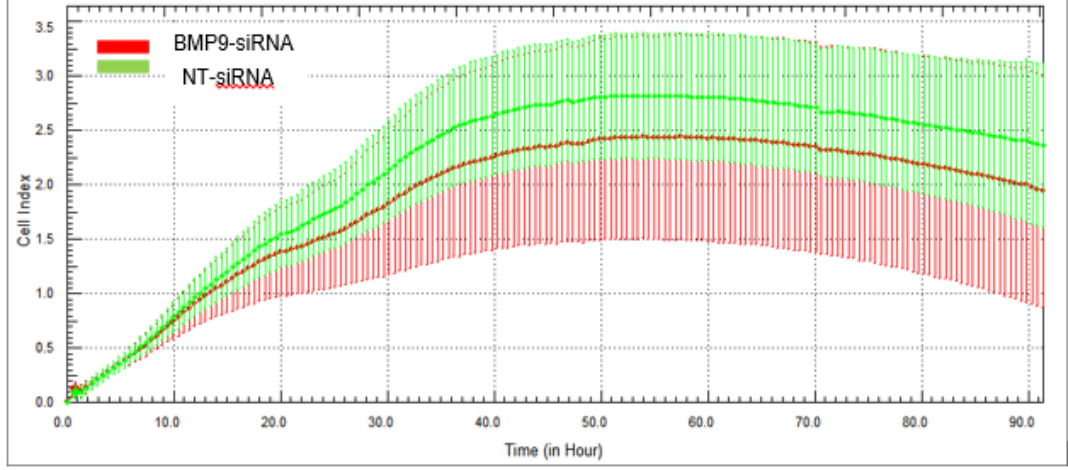


Şekil 12. Hepatosellüler karsinoma hücrelerine (HepG2) 25nM BMP9-siRNA, NT-siRNA ve GAPDH-siRNA uygulamasından 48 saat sonra hücrelerin görünüşleri.

4.2. HepG2 HÜCRE PROLİFERASYONU ÜZERİNDE BMP9-siRNA UYGULAMASININ ETKİSİ

BMP9 geninin hepatosellüler karsinoma hücre hattı üzerine proliferasyona olan etkisinin gözlemlenmesi amacıyla xCELLigence sistemi kullanıldı. Bunun için öncelikle HepG2 hücre hattı 6 well plâtelere ekildi. Ekimden 24 saat sonra BMP9-siRNA ve NT-siRNA hücrelere 3'erli olacak şekilde transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve her bir well'e 2×10^4 olacak şekilde xCELLigence sistemine ait özel E-Plate 16'lara ekildi. Her grup n=4 olacak şekilde dizayn edildi ve error bar'lar grafik üzerinde eş zamanlı olarak gösterildi. Ekim sonrası sistem her 15 dakikada bir ölçüm alacak şekilde 96 saate ayarlandı. 96 saat sonunda analizler elde edildi.

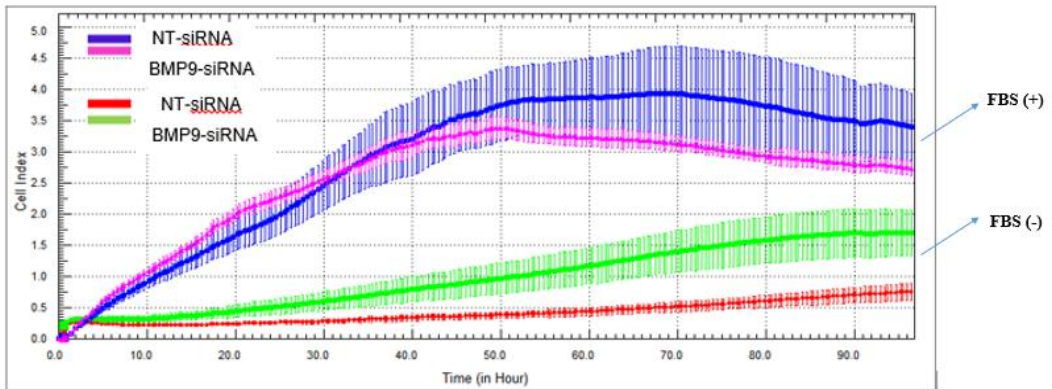
4.2.1. HepG2 hücrelerinde BMP9-siRNA uygulamasının etkisi



Şekil 13. HepG2 hücrelerinin xCELLigence grafiği. Yeşil (kontrol), kırmızı (25nM BMP9- siRNA) uygulanması.

Bu grafiğe göre hücelere BMP9-siRNA transfeksiyonunu takiben 90 saat sonra iki grup arasında çok az da olsa bir fark oluşmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$) (Şekil 13).

BMP9'un hedef genleri başka sinyal yolları tarafından da aktif oluyor, dolayısıyla bu diğer sinyal yollarını devre dışı bırakmak için bu sinyal yollarının önemli etkeni olan Fetal Bovine Serum (FBS)'u medyumdan uzaklaştırmak gerektiğini düşündük. Bu nedenle hedef genlerin analizi ve hücre büyümesinin proliferasyon analizi FBS'siz ortamda tekrar yapıldı.



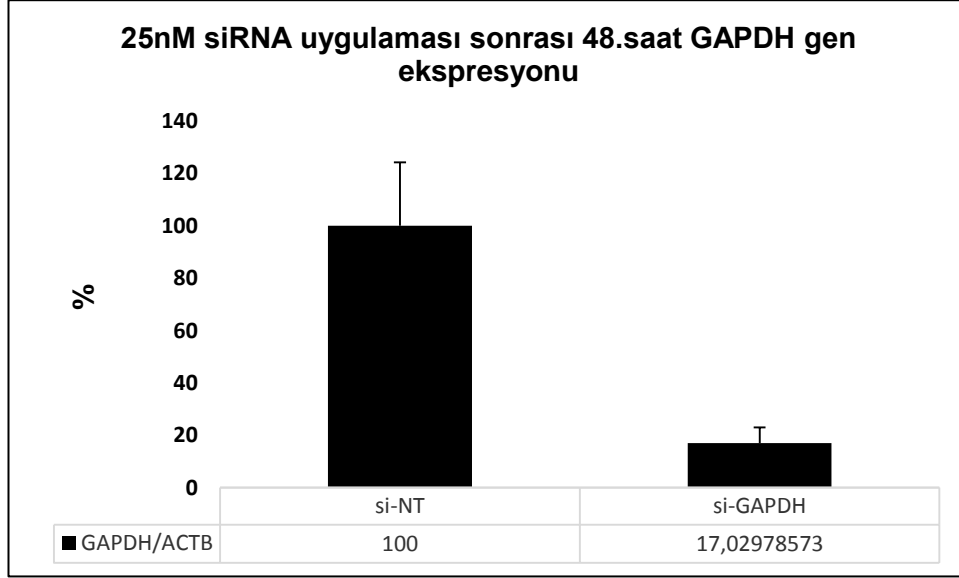
Şekil 14. HepG2 hücrelerinin xCELLigence grafiği. Mavi (kontrol), pembe (25nM BMP9-siRNA) ve FBS(+). Kırmızı (kontrol), yeşil (25nM BMP9-siRNA) ve FBS (-) uygulanması.

Bu grafiğe göre hücreler FBS (+) olan ortamda BMP9-siRNA transfeksiyonunu takiben 96 saat sonra iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı gözlemlendi $p>0,05$. Bununla beraber FBS (-) olan ortamda ise BMP9'un baskılanmasının hücre proliferasyonunu artırdığını ve istatistiksel olarak da anlamlı bir farkın olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak BMP9, HepG2 hücrelerinde hücre proliferasyonunu baskıladığı ve istatistiksel olarak da anlamlı bir farkın olduğu gözlemlendi ($p<0,05$) (Şekil 14).

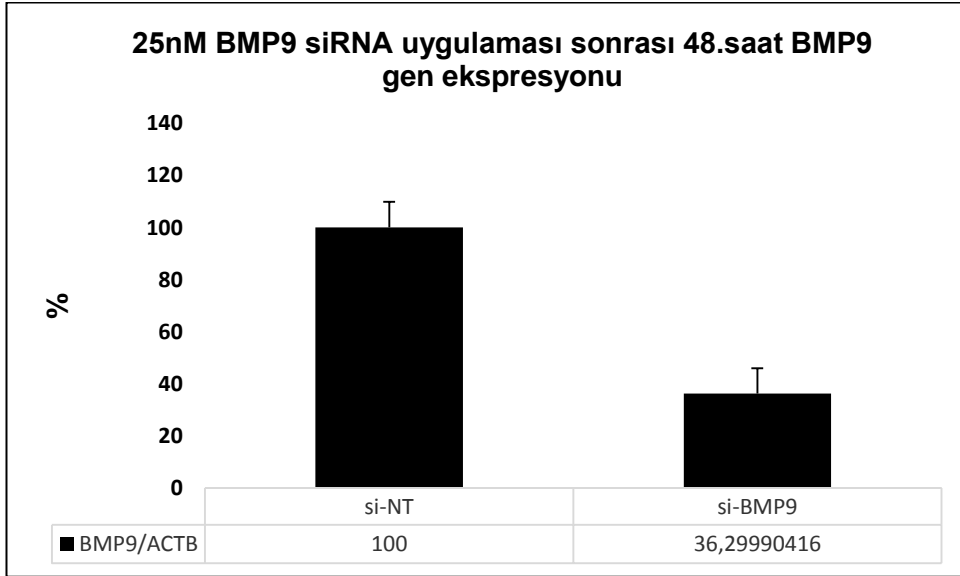
4.3. BMP9-siRNA'nın ETKİSİNİ GÖSTEREN REAL-TİME PCR SONUÇLARI

Hücre hatlarında siRNA uygulamasının mRNA düzeyinde etkinliğini saptamak için Qiagen Rotor Gene Q cihazı kullanılarak real time PCR çalışması yapıldı. BMP9 hedef gen, Beta Actin standardizasyon, GAPDH hücre hatlarının transfeksiyon etkinliğini saptamak için siRNA uygulamaları ile elde edilen susturma oranları ve hedef genlerde olan değişiklikler incelendi.

4.3.1. HepG2 Hücre Hattında BMP9-siRNA'nın BMP9 ve GAPDH Ekspresyonlarına Olan Etkisinin Real-Time PCR Sonuçları



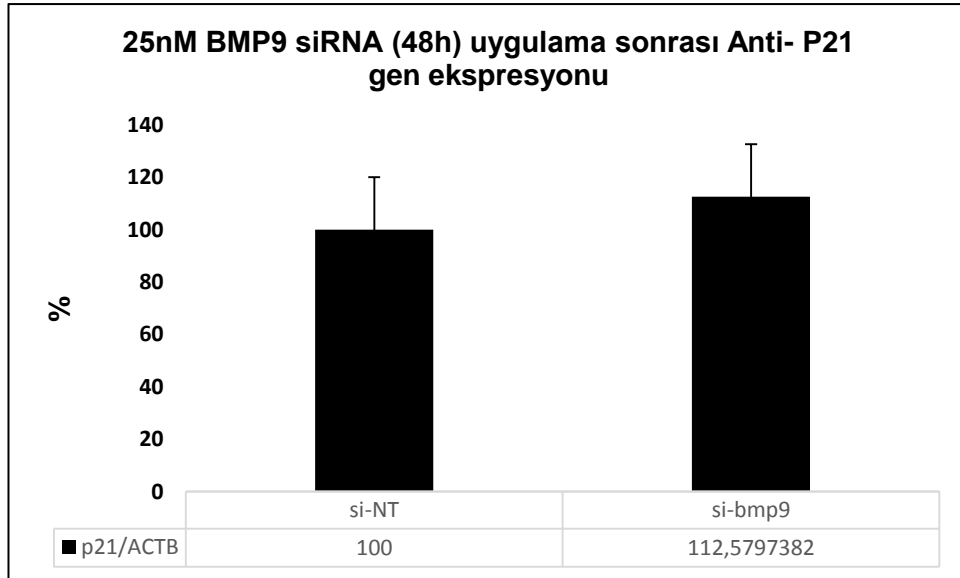
Şekil 15. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-GAPDH siRNA uygulaması sonrasında GAPDH ekspresyonunun RT-PCR sonucu ($p<0,01$) ($n=4$)



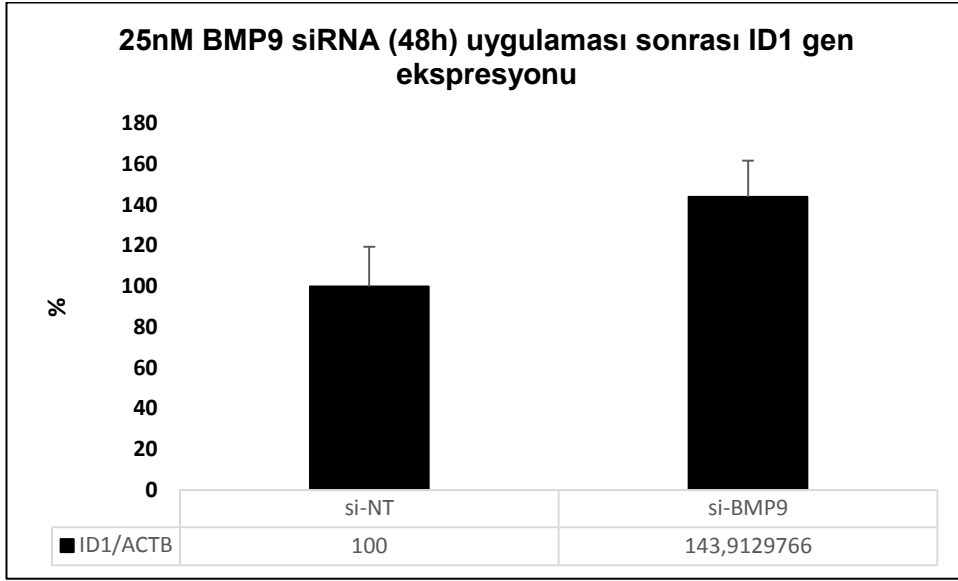
Şekil 16. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında BMP9 ekspresyonunun RT-PCR sonucu ($p<0,01$) ($n=4$)

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonrasında, HepG2 insan hepatosellüler karsinoma hücre hattında nihai Real Time PCR sonuçlarına göre; optimizasyon çalışmalarımız sonucunda 25nM siRNA uygulamasını takiben 48. saatte susturmanın (knock down) oluşumunun en ideal şekilde gerçekleştiğini gözlemledik. Her bir örnek için n=4 ve her örnekte 4'lü şekilde çalışıldı. Hücre hatlarının susturma (knock down) oranları, GAPDH geni için %83 ($p<0,01$), BMP9 geni için %64 ($p<0,01$) olarak gözlemlendi. Ve istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 15 ve 16). Sonuç olarak HepG2 hücre hattında da siRNA'larımız başarılı bir şekilde transfekte oldu ve susturma gerçekleşti.

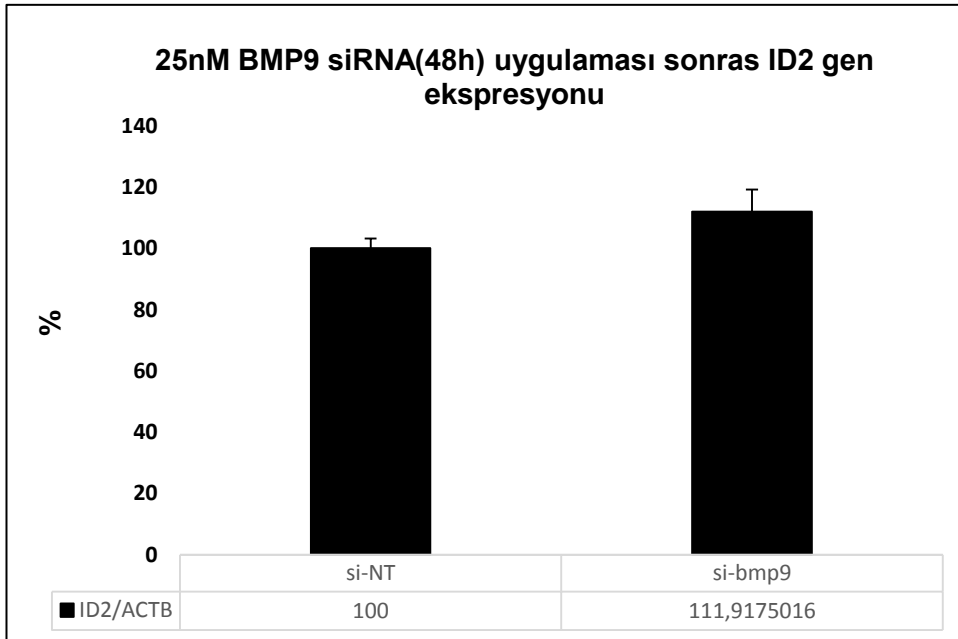
4.3.2. HepG2 hücre hattında BMP9 siRNA uygulama sonrası BMP9 sinyal yol alt bileşenleri ve hedef genlerin ekspresyonlarına olan etkisinin Real-Time PCR sonuçları



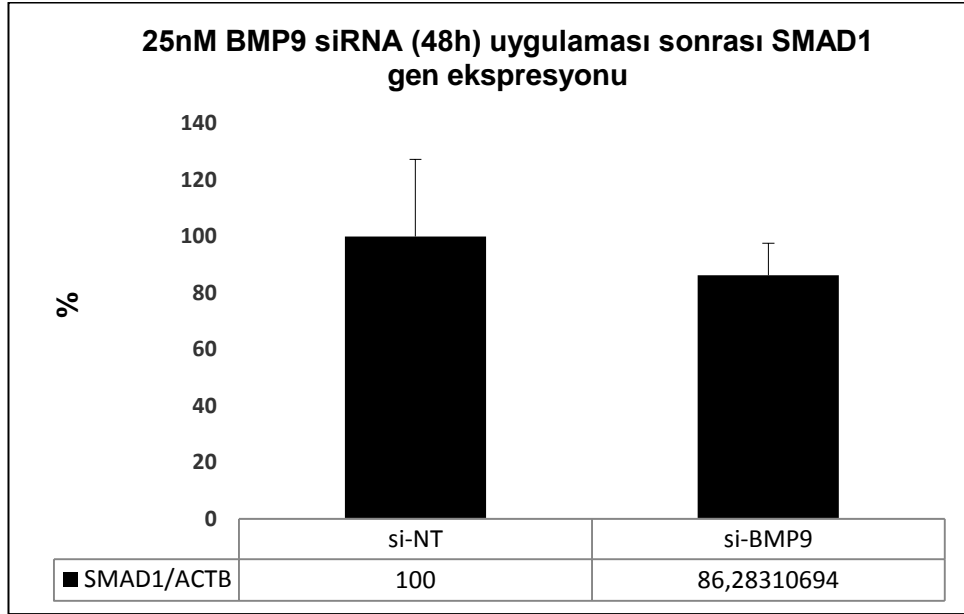
Şekil 17. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında Anti-P21 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu ($p>0,05$) (n=4)



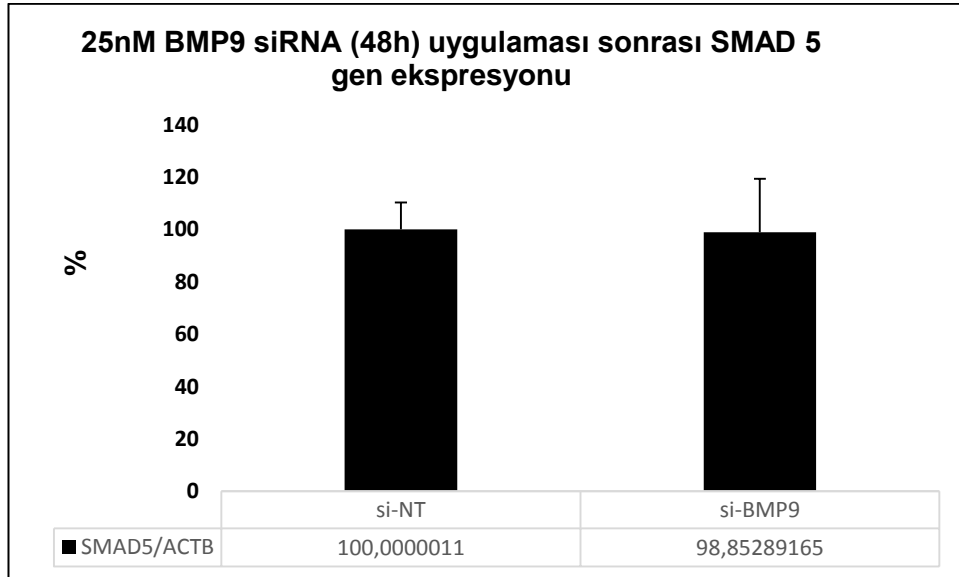
Şekil 18. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında ID1 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu ($p < 0,05$) ($n=4$)



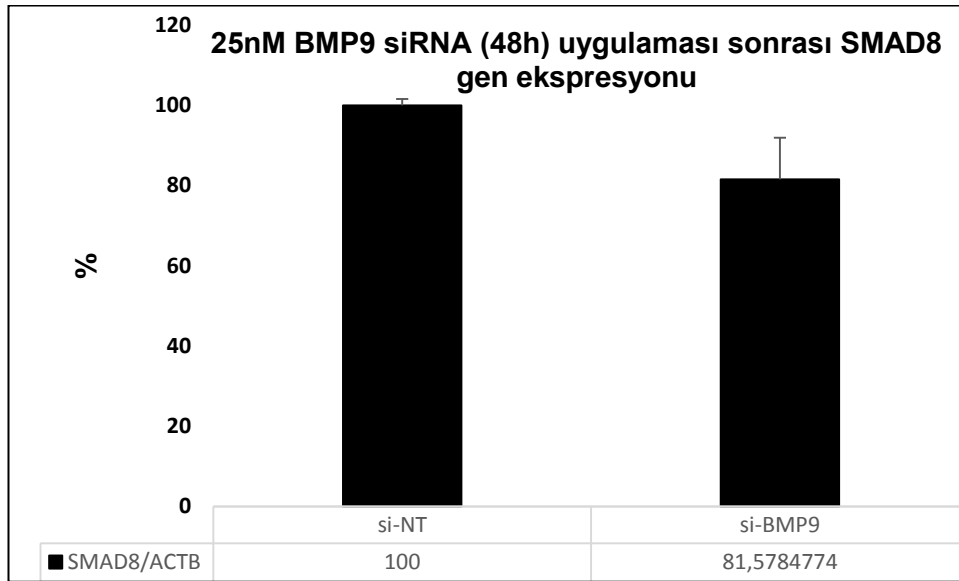
Şekil 19. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında ID2 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu ($p > 0,05$) ($n=4$)



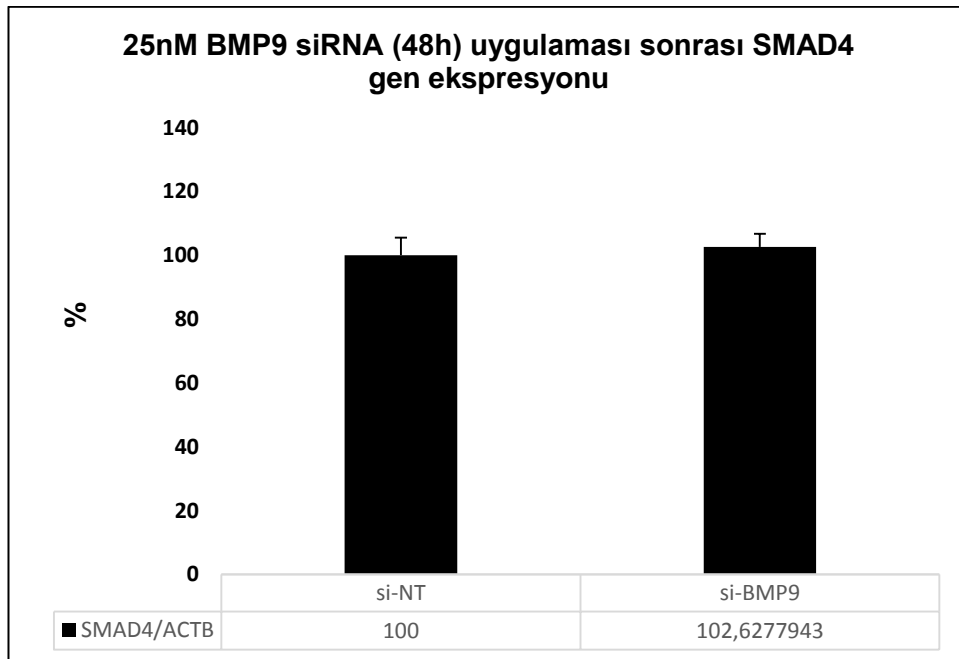
Şekil 20. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında SMAD1 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu ($p>0,05$) ($n=4$)



Şekil 21. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında SMAD5 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu ($p>0,05$) ($n=4$)



Şekil 22. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında SMAD8 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu ($p>0,05$) ($n=4$)



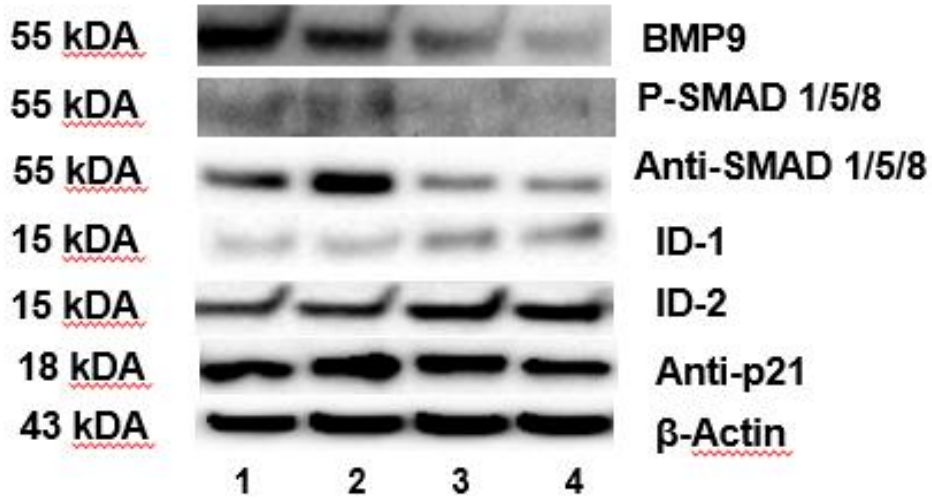
Şekil 23. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında SMAD4 gen ekspresyonunun RT-PCR sonucu ($p>0,05$) ($n=4$)

Sonuç olarak HepG2 hücre hattında siRNA'larımız başarılı bir şekilde transfekte oldu ve susturulma gerçekleşti. BMP9'un susturulmasından sonra BMP9 sinyal yol alt bileşenleri ve hedef genlerin ekspresyon seviyeleri incelendi. Hedef genlerden olan Anti-p21'in ekspresyon seviyesinin çok az oranda arttığı gözlemlendiği ($p>0,05$) (Şekil 17), Id1'in ise ekspresyon seviyesinin arttığı gözlemlendi. İstatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) (Şekil 18), Id2'nin ekspresyon seviyesinin çok az oranda arttığı gözlemlendiği ($p>0,05$) (Şekil 19). BMP9 sinyal yol alt bileşenleri olan Smad1'in ekspresyon seviyesinde çok az oranda azalma olduğunu ($p>0,05$) (Şekil 20), Smad5'in değişmediğini ($p>0,05$) (Şekil 21), SMAD8'in çok az oranda arttığını ($p>0,05$) (Şekil 22), Smad4'ün ise değişmediği ($p>0,05$) (Şekil 23) gözlemlendi. Her bir örnek için $n=4$ ve her örnekte 4'lü şekilde çalışıldı.

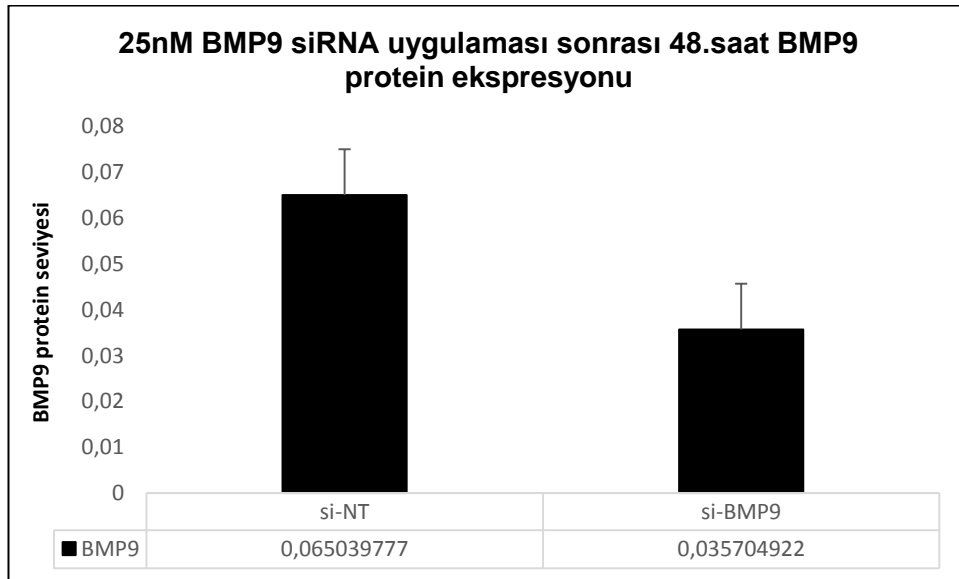
4.4. BMP9-siRNA'nın ETKİSİNİ GÖSTEREN WESTERN BLOTTING SONUÇLARI

HepG2 hücreleri hücre kültüründe büyütülerek BMP9-siRNA uygulanmasının ardından western blotting yapmak üzere proteinleri izole edildi ve western blotting yöntemi ile BMP9, P-SMAD 1/5/8, Anti-SMAD 1/5/8, ID-1, ID-2, Anti-p21 ve beta aktin protein seviyelerine etkisi gözlemlendi.

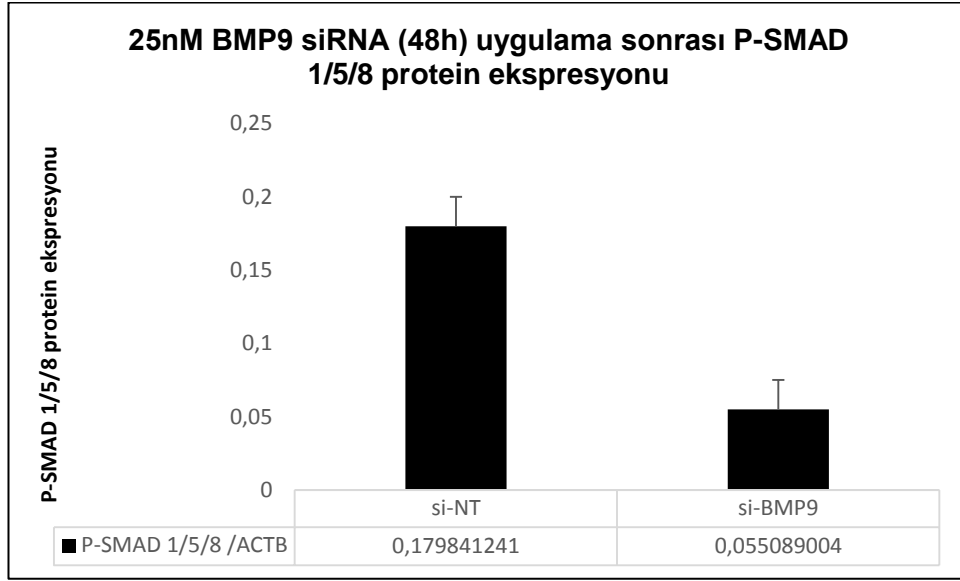
4.4.1. HepG2 Hücre Hattında BMP9-siRNA Uygulamasının BMP9, P-SMAD 1/5/8, Anti-SMAD 1/5/8, ID-1, ID-2 Ve Anti-p21 Proteinlerine Olan Etkisinin Western Blotting Sonuçları



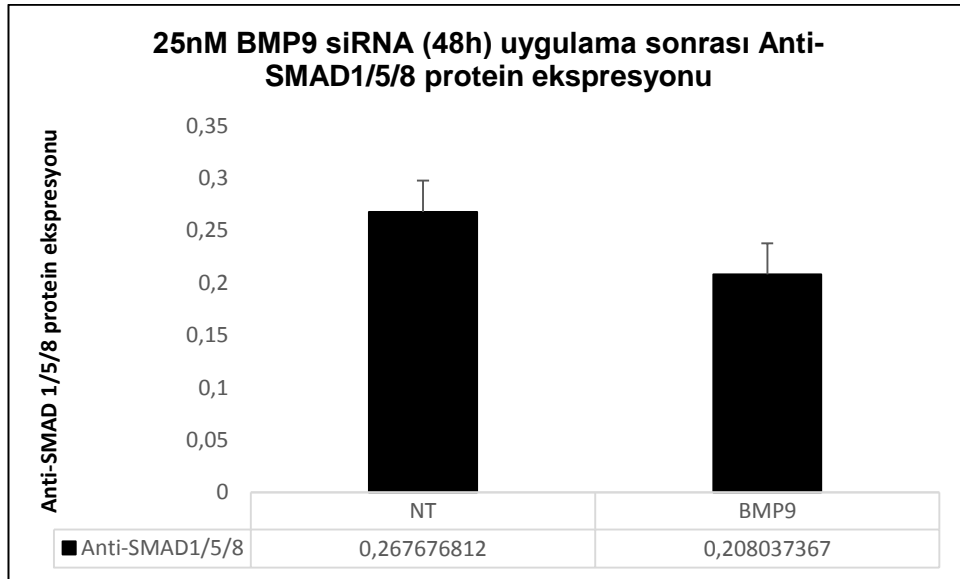
Şekil 24: HepG2 hücre hattında 48 saatlik BMP9-siRNA sonrası western blot yöntemiyle BMP9, P-MAD 1/5/8, Anti SMAD 1/5/8, Id-1, Id-2, p21 ve β -actin tayini. 1. Kontrol, 2. Kontrol, 3. BMP9-siRNA, 4. BMP9-siRNA.



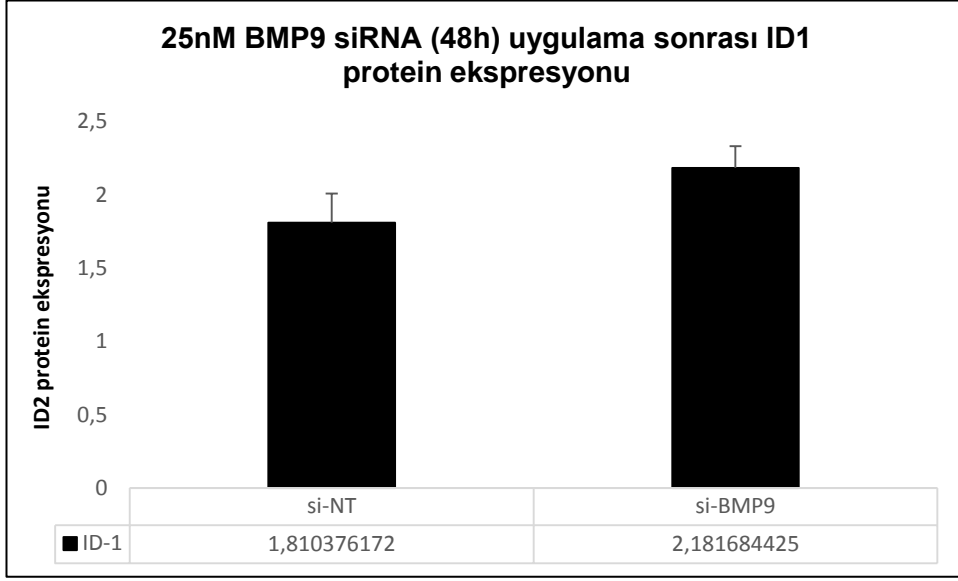
Şekil 25. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında BMP9 ekspresyonunun western blotting sonucu ($p < 0,05$) ($n = 3$)



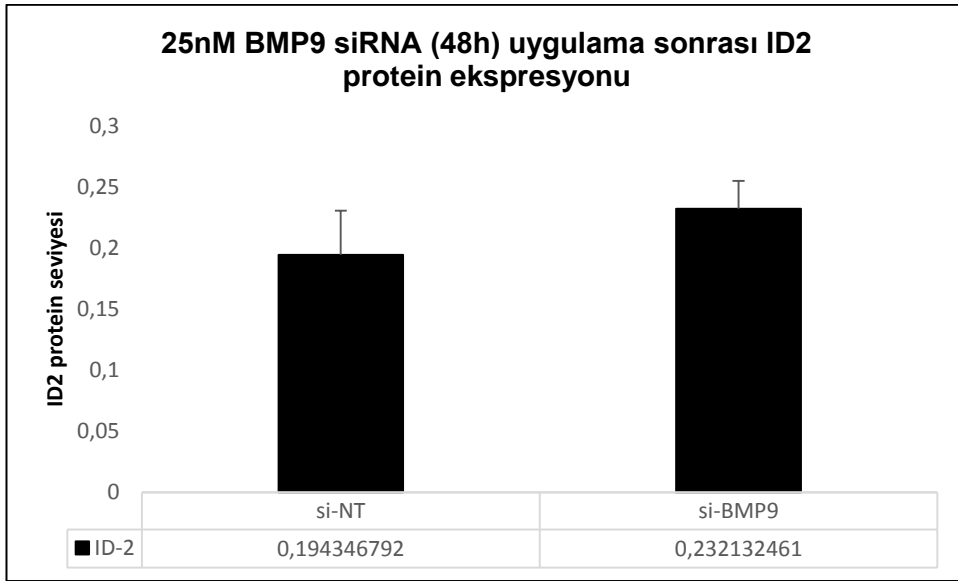
Şekil 26. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında P-SMAD 1/5/8 protein ekspresyonunun western blotting sonucu ($p<0,05$) ($n=3$)



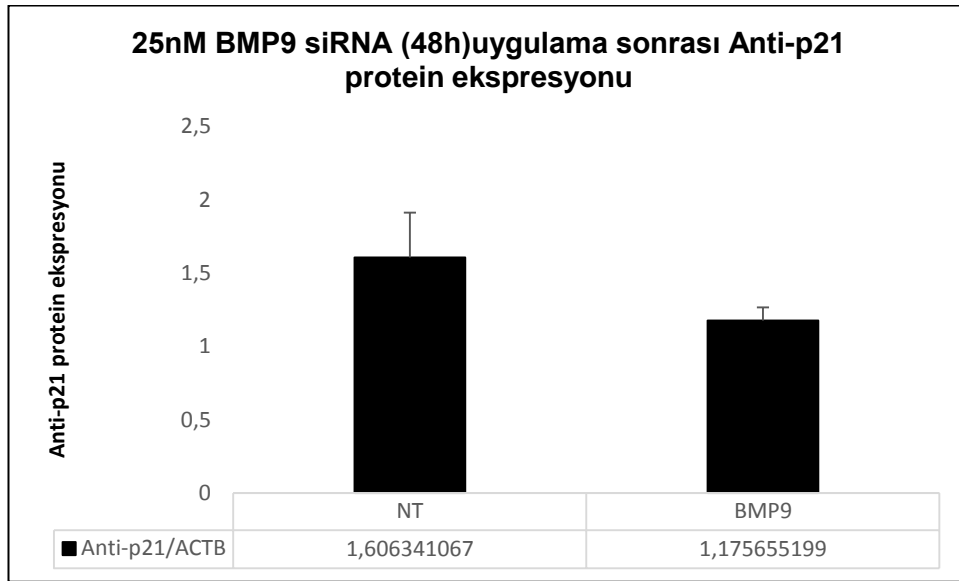
Şekil 27. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında ANTI-SMAD 1/5/8 protein ekspresyonunun western blotting sonucu ($p<0,05$) ($n=3$)



Şekil 28. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında ID1 protein ekspresyonunun western blotting sonucu ($p < 0,05$) ($n=3$)



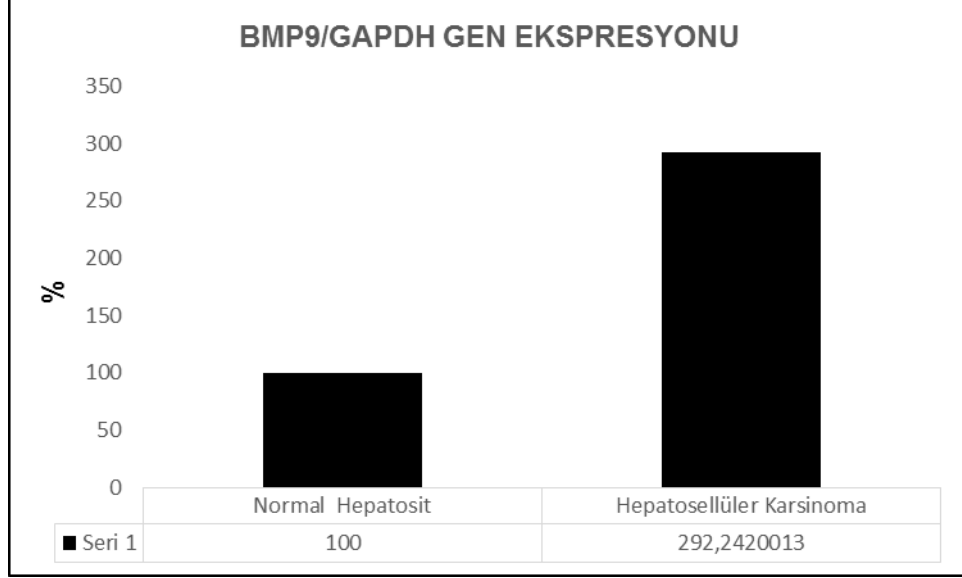
Şekil 29. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında ID2 protein ekspresyonunun western blotting sonucu ($p > 0,05$) ($n=3$)



Şekil 30. HepG2 hücre hattında 48 saatlik Anti-BMP9 siRNA uygulaması sonrasında Anti-p21 protein ekspresyonunun western blotting sonucu ($p < 0,05$) ($n=3$)

HepG2 hücrelerinden izole edilen proteinlerle yapılan western blotting sonuçlarına bakıldığında BMP9 geninin ekspresyonunun susturulduğu gözlemlendi. İstatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Bu sonuçlar mRNA düzeyinde elde ettiğimiz sonuçları konfirme etti. Bununla beraber BMP9-siRNA ile NT-siRNA grupları arasında P-SMAD1/5/8'in ve Anti-Smad1/5/8'in protein ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi. İstatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) (Şekil 26 ve 27). Id1'in protein ekspresyonunun arttığı gözlemlendi. İstatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) Id2'nin protein ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$) (Şekil 28 ve 29). Anti-p21'in protein ekspresyonunun ise azaldığı gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) (Şekil 30). Her bir örnek için $n=3$ ve her örnekte 3'lü şekilde çalışıldı.

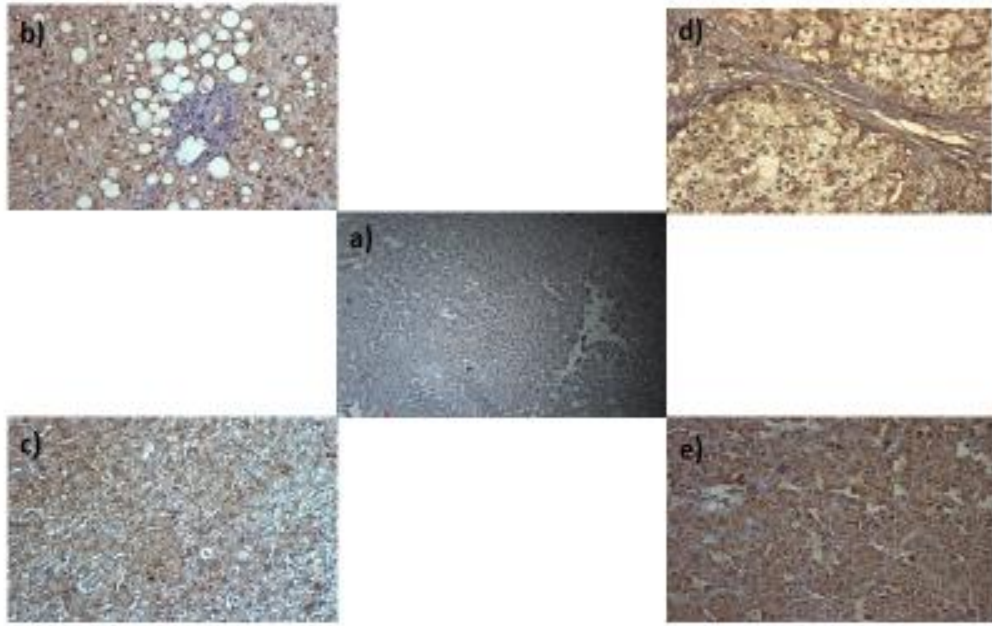
4.5. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA ve NORMAL HEPATOSİT DOKULARINDA BMP9 EKSPRESYONUNUN REAL-TİME PCR SONUÇLARI



Şekil 31. Hepatosellüler karsinoma ve Normal hepatosit dokularında BMP9 (GDF2) ekspresyonu ($p < 0,05$)

Yapılan çalışma sonucunda, doku örneklerinin Real Time PCR sonuçlarına göre; hepatosellüler karsinoma dokusunun BMP9 ekspresyon seviyesi normal hepatosit dokusuna göre arttığı gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) (Şekil 31).

4.6. PARAFİN DOKUDAN İMMÜNOHİSTOKİMYA BOYAMA ANALİZİ SONUÇLARI



Şekil 32. Parafin dokularında anti-BMP9 antikoru kullanılarak immünohistokimya analizi. a) Negatif kontrol; b), c) 2 farklı sağlıklı hepatosellüler karsinoma dokusunu; d), e) ise sırasıyla karşılık gelen kanserli dokuları göstermektedir. Büyütme 20X'dir.

İmmünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre hepatosellüler karsinoma ve normal hepatosit parafin dokularından yapılan çalışmada boyama sonucuna göre, hepatosellüler karsinoma dokusunun ekspresyonu, sağlıklı hepatosellüler karsinoma dokusuna göre daha fazla sitoplazmik boyama gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 32). Böylece hepatosellüler karsinoma ve normal hepatosit dokularının ekspresyon değerlendirmesi İmmünohistokimyasal boyama yöntemi ile de konfirme edildi.

5. TARTIŞMA

Kanser bugün birçok ülkede kalp ve damar hastalıklarından sonra ölüme neden olan ikinci hastalık grubudur. Kanser aşırı hızlı yayılım göstermesi özelliğinden dolayı tedavisi oldukça zor bir hastalıktır. Çok farklı tedavi yöntemleri uygulanarak sorun çözülmeye çalışılmaktadır. Bu farklı olan tedavi yöntemlerinin ortak bir amacı ise tümörün büyümesini kontrol altına alarak yok edilmesini sağlamaktır. Fakat bu süreç yan etkiyi de beraberinde getirerek metabolizmanın altüst olmasını sağlar. Bu sebeple tedavi yöntemlerinin oldukça iyi araştırılması ve tedavinin de kontrollü bir şekilde sürdürülmesi gerekmektedir [141].

HSK, dünyada en sık görülen 5. kanser olup, kanser ile ilişkili ölümlerde ise 3. sırada gelmektedir. Etiyoloji ve insidansı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermektedir. Kronik HBV ve HCV enfeksiyonları, aflatoksin B ve siroz HSK gelişimi için en önemli risk faktörüdür [2,25,26].

Günümüzde HSK tedavisinde cerrahi rezeksiyon, karaciğer nakli, alkol enjeksiyonu, cryotherapi, devaskularizasyon, kemo-embolizasyon, kemoterapi, termoterapi gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır [69,71,72,74,75].

Kanserin tedavisinde ne kadar da umut verici gelişmeler olsa da, hastalığın sayısının yüksek olması ve başarı yüzdesinin ise düşük olması insanları bu zorlu mücadelede bir parça da olsa umutlarını arttırdıkları düşüncesiyle birtakım alternatif metotlara başvurmaya başlarlar. Bunların başında da bu geleneksel olan tedavi yöntemlerine ek olarak son zamanlarda geliştirilen gen tedavisi, fonksiyonel olan genin hücre içerisine sokulması ya da genlerin susturulması şeklinde de uygulanabilmektedir [142].

Proteinlerin işlevlerinin, susturulması ya da baskılanması araştırılan sık yöntemlerden birisidir. mRNA seviyesinde gen susturulması için kullanışlı bir yöntemin bulunmuş olması, biyolojik araştırmalarda ve tıpta önemli gelişmelere yol açacak önemli bir araçtır. Gen ekspresyonunun susturulması ya da durdurulması amacıyla siRNA kullanımına dayalı olan bu yöntemde hücre içerisindeki hedef genlerden herhangi biri RNAi mekanizmasından yararlanılarak susturulabilir. Bu

mekanizma aynı zamanda moleküler biyolojide gen-protein işlevi analizinde ve gen tedavisi alanında yeni bir uygulama alanına sahiptir.

Diğer taraftan kemik morfojenik proteinler (BMP'ler), transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) süper ailesi üyeleridirler. Hücre diferasyonunda, proliferasyonunda, büyümesinde, apoptosiste ve dokulara migrasyon üzerinde etkili olduğu vurgulanmıştır. BMP'lerin özellikle kardiyak, nöral ve kıkırdak diferasyonunda esansiyel rol aldıkları saptanmıştır. Bone morfojenik protein reseptörleri (BMPR) sinyalleri ve BMP yolunu inhibe edecek moleküller üzerinde çalışılmaktadır. Bu sebeple, geliştirilmiş olan tirozin kinaz inhibitörleri ve gen susturucular üzerinde yapılan çalışmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir [16,143].

siRNA yönteminin kanserle ilgili yapılan çalışmaların çoğunluğunda bu mekanizmanın etkili bir tedavi yöntemi olabileceği öngörülmektedir. Bu yöntem ile seçici olarak, her türlü gen susturulamaktadır. Sinyalizasyon mekanizmaları, enfeksiyon gibi birçok farklı alanlarda da kullanımı mevcuttur. Bunların yanında bugün siRNA'ların terapötik kullanımı da gündemdedir. Yapılan çalışmalarda in vitro ortamında ne kadar etkin başarılar elde edilmiş olsa da klinik çalışmalar için daha da fazla deneysel çalışmaya ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır. İn vivo ortamında yapılan çalışmalarda siRNA'nın hücrenin içerisine etkili bir şekilde aktarılamaması karşılaşılan en büyük problemlerden birisidir. siRNA'nın hücrenin içerisine aktarılmasında kullanılan ajanlar hücrede toksik etki yapabilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda hücrenin içerisine siRNA aktarımının hedeflenen dizinin dışında olarak hücrede interferon yanıtının olduğu saptanmıştır. Tüm bu gelişmeler, in vivo çalışmaların sayısını arttırmış ve de klinikteki uygulamalar için umut vaadeden sonuçlar haline gelmiştir.

İlk gen susturma çalışması 2002 yılında McCaffrey ve arkadaşları tarafından in vivo olarak gerçekleştirilen bu çalışmada sentetik olarak hazırlanan siRNA, farelere lusiferaz ekspresyon eden plazmid ile birlikte verilerek uygulanmıştır [144]. Çalışma sonunda farelere verilen siRNA'nın kontrollerle karşılaştırıldığı zaman karaciğer hücrelerindeki lusiferaz ekspresyonunu %80 oranında düşürdüğü saptanmıştır [144].

Kemik morfojenik proteinler (BMP'ler), tip I ve tip II BMP reseptörlerine bağlandığında R-Smad denilen hücre içi proteinin fosforilasyonunu gerçekleştirir. Bu protein hücrenin nükleusuna taşınarak hedef genin aktive olmasını sağlar [139].

BMP9; çeşitli hücre tiplerinde farklı hücresel süreçleri düzenler ve özellikle de, BMP9/ALK1 eksenini endotel hücre biyolojisinin önemli bir düzenleyicisi olarak tanıttı. Karaciğer gelişiminde BMP sinyalizasyonunun önemli bir rolü olduğu iyi bilinmektedir. Ancak, yalnızca son birkaç yıl içinde BMP sinyalizasyonunu içeren yetişkin karaciğer homeostazisi ortaya çıkarılmıştır. Özellikle, karaciğer hücrelerinde BMP9'un rolü sadece kısmen anlaşılmıştır. Bu bağlamda, son zamanlarda HSK hücrelerinin göçündeki bir artışın BMP9'un EMT yi indüklemesiyle sonuçlandığı gösterilmiştir [145].

Blanca ve ark.'ları 2013 yılında yaptığı çalışmada, hepatosellüler karsinomada kemik morfojenik protein 9 (BMP9) geninin oldukça önemli roller üstlendiği kanıtlanmıştır. Bu çalışma ile BMP9'un alt SMAD bileşenlerini aktive ettiği ve bunun sonucu olarak hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini indüklediği gösterilmiştir [146].

Marie Bidart ve ark.'ları 2011 yılında yapmış olduğu çalışmada, BMP9'un ekspresyonu analizinde BMP9'un hepatositler ve intrahepatik safra yolu epitel hücreleri tarafından üretilir olduğunu ortaya koymuştur [145].

Daha önce BMP9 geni ile ilgili meme, kolon, prostat kanserlerinde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar sonucunda BMP9 geninin anjiyogenezde ve tümör oluşumunda rol oynadığı tespit edilmiştir [146-148].

Xing Liu ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, mezenkimal kök hücrelerin osteojenik yani kemik hücrelerine doğru farklılaşmasında BMP9'un diğer BMP'lere kıyasla önemli olduğunu daha önceki çalışmalarda bulmuşlardı. Bu çalışmalarında ise Epidermal büyüme faktörü (EGF) yolağı ile BMP9 arasında bir etkileşim olup olmadığını incelediler. Önceki çalışmalarında BMP9'un mezenkimal kök hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşmasındaki rolünü anlamak için önce ve sonra kemik hücrelerine dair markırlara baktılar. Aynı şekilde, EGF'nin BMP9 ile uyarılan mezenkimal kök hücrelerini kemik hücreye farklılaşması yönünde mi yoksa tam tersi

yönde yani BMP9'un etkisini azaltan yönde mi etki gösterdiğini anlamak için markırlara bakıldı ve EGF'nin bu markırların ekspresyon dozunu arttırdığını tespit etmişler. Yani EGF'de aynı BMP9 gibi mezenkimal kök hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşmasında rol oynadıklarını düşünmüşlerdir. Tam tersi çıksaydı yani kemik markırlarının seviyesi EGF kullanıldığında azalsaydı BMP9'un etkisini azalttığı söylenebilirdi. Ancak çıkan durum birbirlerine kemik istikametinde destek olduklarını göstermişlerdir. İn vivoda yapılan kök hücre implantasyon deneylerinde de yine aynı şekilde EGF'nin BMP9 ile beraber mezenkimal kök hücrelerden kemik oluşumu yönünde çalıştığı ve bu sebeple daha fazla olgun kemik kitleleri oluştuğunu göstermişlerdir. Bir yandan EGF'nin, mezenkimal kök hücrelerde BMP9 ekspresyonu arttırdığını bulurken diğer taraftan BMP9'un Smad1/5/8 yolağı ile Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ekspresyonunu arttırdığını bulmuşlar [145]. Yani sadece EGF'nin BMP9'u etkilemesi değil aynı zamanda BMP9'un da EGFR reseptörünü etkilemesi de söz konusu olduğu kanaatine varmışlardır. Karşılıklı bir etkileşim olduğu sonucuna varmışlardır. Sonuç olarak BMP9 ile EGF arasında bir sinerjinin olduğunu yani mezenkimal kök hücrelerin kemiğe doğru farklılaşması yönünde birbirlerini olumlu etkilediklerini göstermişlerdir [149].

Blanca Herrera ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, karaciğer tümör hücre biyolojisinde BMP9'un ilişkisini araştırmışlar ve BMP9'un HSK hücrelerinde hem bağımlı hem de bağımsız büyüme ve canlılığı arttıran çift öncü tümörojenik fonksiyonlarının olduğunu aramışlardır. BMP9'un EGF, İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF1) veya insülin gibi köklü karaciğer büyüme faktörleriyle aynı düzeyde hücre büyümesini arttırdığını saptamışlardır. BMP9'un sadece güçlü bir mitojen değil, aynı zamanda düşük serumla indüklenen apoptozise karşı da hayati derecede önemli bir role sahip olduğunu düşünmüşlerdir. Bu çalışmadaki veriler BMP'lerin HSK'da tümörojenik rolleri olabileceğini ve HSK tedavisinde potansiyel terapötik hedefler olarak düşünülebileceğini öneren vücut büyümesinde kanıt sağladığını göstermişlerdir [146].

Bizde bu çalışmamızda, bir susturma yöntemi olan siRNA mekanizmasını kullanarak, hepatosellüler karsinomada etkili olduğu öngörülen BMP'lerden BMP9 susturulmasının hepatosellüler karsinoma hücrelerinde hangi konsantrasyonda etkili

olduğunu, hücre canlılığı ve protein düzeylerini nasıl etkilediğini araştırmayı amaçladık.

Öncelikle BMP9-siRNA ile muamele edilen hepatosellüler karsinoma hücre hatlarının proliferasyonlarındaki değişim incelendi. xCELLigence sistemi kullanılarak proliferasyon deneyleri yapıldı. FBS (+) ortamda yapılan proliferasyon deneyi sonucunda iki grup arasında çok az miktarda fark olduğu görülmüştür. Bu da istatistiksel olarak anlamlı değildir. Daha sonra literatür taranarak BMP9'un hedef genleri başka sinyal yolları tarafından da aktif olduğunu gördük, dolayısıyla bu diğer sinyal yollarını devre dışı bırakmak için bu sinyal yollarının önemli etkeni olan Fetal Bovine Serum (FBS)'i medyumdan uzaklaştırmak gerektiğini düşündük. Bu nedenle hedef genlerin analizini ve hücre büyümesinin proliferasyon analizini FBS'siz ortamda tekrar yaptık. Bu sonuca göre ise FBS (-) olan ortamda BMP9'un baskılanması hücre proliferasyonunu artırmıştır. Sonuç olarak BMP9, HepG2 hücrelerinde hücre proliferasyonunu baskıladığı gözlemlenmiştir. Ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Sonuç olarak BMP9, HepG2 hücrelerinde hücre proliferasyonunu susturduğu gözlemlendi.

Hepatosellüler karsinoma hücre hatlarına BMP9-siRNA uygulandıktan sonra, RNA izolasyonu yapıldı, cDNA sentezi gerçekleştirilerek Real Time PCR yapılarak siRNA uygulamaları ile elde edilen susturma oranları ve hedef genlerde olan değişiklikler incelendi. Sonucunda ise 25nM siRNA uygulamasını takiben 48. saatte susturmanın (knock down) oluşumunun en ideal şekilde gerçekleştiğini gözlemledik. Hücre hatlarının susturma (knock down) oranları, GAPDH geni için %83, BMP9 geni için %64 olarak gözlemlendi. İstatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,01$). BMP9 sinyal yol alt bileşenleri olan Smad 1/5/8, Smad 4 ve hedef genlerden olan p21, Id1 ve Id2 genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişim incelendi. Smad1'in ekspresyon seviyesinde çok az oranda azalma olduğu ($p > 0,05$), Smad5'in ekspresyon seviyesinin değişmediği ($p > 0,05$), SMAD8'in ekspresyon seviyesinin çok az oranda azaldığı ($p > 0,05$), Smad4'ün ekspresyon seviyesinin değişmediği ($p > 0,05$) gözlemlendi. Hedef genlerden olan Anti-p21'in ve Id2'nin ekspresyon seviyesinin çok az oranda arttığı ($p > 0,05$), Id1'in ekspresyon seviyesinin

ise arttığı ($p<0,05$) gözlemlenmiştir. Sonuç olarak HepG2 hücre hattında da siRNA'larımız başarılı bir şekilde transfekte oldu ve susturma gerçekleşti. Real time PCR ile BMP9 ve GAPDH genlerinin siRNA uygulamaları ile elde edilen susturma oranları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi. Daha sonra ise mRNA düzeyindeki sonuçları konfirme etmek için western blotting yöntemi yapıldı. Protein düzeyinde ise BMP9, P-Smad 1/5/8, Anti-Smad 1/5/8, Anti-p21, Id1 ve Id2 proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişim incelendi. Sonuç olarak protein düzeyinde de western blotting yöntemi ile konfirme edildi. BMP9'un protein düzeyinde de susturmasının doğrulandığı gözlemlendi. İstatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). P-Smad 1/5/8 ve Anti-Smad 1/5/8'in protein ekspresyonunun azaldığı ($p<0,05$), Id1'in protein ekspresyonunun arttığını ($p<0,05$), Id2'nin protein ekspresyonunun arttığını ($p>0,05$) ve de Anti-p21'in ise protein seviyesinin azaldığı ($p<0,05$) gözlemlenmiştir. Böylece sonuçlar her iki yönden de doğrulanmış oldu.

Hepatosellüler karsinoma ve normal hepatosit dokularında BMP9'un ekspresyonuna bakmak için, tümörlü ve normal dokulardan önce RNA izolasyonu yapıldı, daha sonra cDNA sentezi gerçekleştirildi. Daha sonra genimizin mRNA ekspresyonunu değerlendirmek için Real-Time PCR yapıldı. Ve doku örneklerinin Real Time PCR sonuçlarına göre; hepatosellüler karsinoma dokusunun BMP9 ekspresyon seviyesi normal hepatosit dokusuna göre arttığı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu deneyi konfirme etmek için immünohistokimyasal boyama yapıldı. Tümörlü ve normal dokularından alınan kesitler BMP9 antikorları ile boyanarak, immünohistokimyasal inceleme yapıldı. İmmünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre hepatosellüler karsinoma ve normal hepatosit parafin dokularından yapılan çalışmada boyama sonucuna göre, hepatosellüler karsinoma dokusunun ekspresyonu, sağlıklı hepatosellüler karsinoma dokusuna göre arttığı bulunmuştur. Böylece her iki sonuç da birbirini doğruladı.

Günümüzde siRNA uygulamaları, hedefe yönelik terapi geliştirme çalışmalarında önemli yöntem olarak karşımıza çıkmakla beraber, kolay uygulanabiliyor olması ve hızlı sonuca götürmesi siRNA uygulamalarını gen susturma çalışmaları için ideal bir yöntem haline getirmiştir.

6. SONUÇ

25nM BMP9-siRNA kullanarak HepG2 hücre dizilerinde gerçekleştirdiğimiz sessizleştirme sonucu önemli görülen aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. BMP9- siRNA kullanımı sonucu mRNA düzeyinde BMP9 genini susturma oranı HepG2 hücre hattında en etkili olarak 48. saatte 25nM konsantrasyonda (%64) belirlendi.
2. BMP9-siRNA kullanımının HepG2 hepatosellüler karsinoma hücre hattı üzerine proliferasyona olan etkisi FBS (+) olan ortamda kontrol grubu ile kıyaslandığında çok az oranda susturduğu gözlemlendi. Bu da istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmedi.
3. BMP9-siRNA kullanımının HepG2 hepatosellüler karsinoma hücre hattı üzerine proliferasyona olan etkisi FBS (-) olan ortamda ise BMP9, HepG2 hücrelerinde hücre proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı susturduğu gözlemlendi.
4. BMP9- siRNA kullanımı sonucu protein düzeyinde BMP9 genini susturma oranı HepG2 hücre hattında en etkili olarak 48. saatte 25nM konsantrasyonda belirlendi. Bu sonuç mRNA düzeyindeki sonuç ile birbirini konfirme etti.
5. BMP9-siRNA kullanımı sonucu, 48.satte HepG2 hücrelerinde protein düzeyinde P-Smad 1/5/8'in önemli düzeyde azaldığı belirlendi.
Hepatosellüler karsinoma ve normal hepatosit doku örneklerinin Real Time PCR sonuçlarına göre; hepatosellüler karsinoma dokusu, BMP9 ekspresyon seviyesi normal hepatosit dokusu BMP9 ekspresyon seviyesine göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur.
6. İmmünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre hepatosellüler karsinoma ve normal hepatosit parafin dokularından yapılan çalışmada boyama sonucuna göre, hepatosellüler karsinoma dokusunun ekspresyonu, sağlıklı hepatosellüler karsinoma dokusuna göre arttığı bulunmuştur. Böylece her iki sonuç da birbirini doğruladı.

Tüm bu sonuçlar ele alındığında, hepatosellüler karsinomada önemli rol olan ve bu süreçte rol aldığı kanıtlanan; BMP9 geninin siRNA yönteminin kullanılarak susturulması ve hepatosellüler karsinoma oluşum mekanizmalarında en önemli aşamalardan biri olan bu sürecin tedavisinin mümkün kılınabileceğini, literatüre ve bilim dünyasına önemli katkılar sunmasını, mevcut tedavilerin ilerisinde siRNA tabanlı moleküler hedef ve yeni gen tedavilerinin önünü açmasını ve hepatosellüler karsinomada aydınlatılan bu mekanizma, diğer benzer hastalıklar için de model oluşturmasını umut ediyoruz.

TEŞEKKÜR

Bu tez TÜBİTAK 213S111 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. **Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J. ve Maley, C. C.** (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*, **6**: 924-935
2. **El-Serag, H. B. ve Rudolph, K. L.** (2007). Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, **132**: 2557-2576
3. **Srivatanakul, P., Sriplung, H. ve Deerasamee, S.** (2004). Epidemiology of liver cancer: an overview. *Asian Pac J Cancer Prev*, **5**: 118-125
4. **Farazi, P. A. ve DePinho, R. A.** (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*, **6**: 674-687
5. **Parkin, D. M., Pisani, P. ve Ferlay, J.** (1993). Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer*, **54**: 594-606
6. **Pisani, P., Parkin, D. M., Bray, F. ve Ferlay, J.** (1999). Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*, **83**: 18-29
7. **Montalto, G., Cervello, M., Giannitrapani, L., Dantona, F., Terranova, A. ve Castagnetta, L. A.** (2002). Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*, **963**: 13-20
8. **Borzio, M., Colloredo, G., Pioltelli, P., Quagliuolo, M. ve Gruppo Epatologico, L.** (2007). Epidemiology and outcome of hepatocellular carcinoma in Lombardy. *Dig Liver Dis*, **39**: 1011-1017
9. **Gish, R. G.** (2006). Hepatocellular carcinoma: overcoming challenges in disease management. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **4**: 252-261
10. **Canalis, E., Economides, A. N. ve Gaggero, E.** (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev*, **24**: 218-235
11. **Li, J. Z., Li, H., Sasaki, T., Holman, D., Beres, B., Dumont, R. J., Pittman, D. D., Hankins, G. R. ve Helm, G. A.** (2003). Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat. *Gene Ther*, **10**: 1735-1743
12. **Ploemacher, R. E., Engels, L. J., Mayer, A. E., Thies, S. ve Neben, S.** (1999). Bone morphogenetic protein 9 is a potent synergistic factor for murine hemopoietic progenitor cell generation and colony formation in serum-free cultures. *Leukemia*, **13**: 428-437
13. **Song, J. J., Celeste, A. J., Kong, F. M., Jirtle, R. L., Rosen, V. ve Thies, R. S.** (1995). Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endocrinology*, **136**: 4293-4297
14. **Cunha, S. I., Pardali, E., Thorikay, M., Anderberg, C., Hawinkels, L., Goumans, M. J., Sehra, J., Heldin, C. H., ten Dijke, P. ve Pietras, K.** (2010). Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis. *J Exp Med*, **207**: 85-100

15. **Mitchell, D., Pobre, E. G., Mulivor, A. W., Grinberg, A. V., Castonguay, R., Monnell, T. E., Solban, N., Ucran, J. A., Pearsall, R. S., Underwood, K. W., Seehra, J. ve Kumar, R.** (2010). ALK1-Fc inhibits multiple mediators of angiogenesis and suppresses tumor growth. *Mol Cancer Ther*, **9**: 379-388
16. **Miller, A. F., Harvey, S. A., Thies, R. S. ve Olson, M. S.** (2000). Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J Biol Chem*, **275**: 17937-17945
17. **Schepers, V. U.** (2005) RNA Interference in Practice: Principles, Basics, and Methods for Gene Silencing in *C. elegans*. WILEY-VCH.
18. **Society, A. C.** (2014). Cancer Facts & Figures.
19. **Duursma, A. M. ve Agami, R.** (2003). Ras interference as cancer therapy. *Semin Cancer Biol*, **13**: 267-273
20. **Scholzova, E., Malik, R., Sevcik, J. ve Kleibl, Z.** (2007). RNA regulation and cancer development. *Cancer Lett*, **246**: 12-23
21. **Davidson, B., Konstantinovskiy, S., Kleinberg, L., Nguyen, M. T., Bassarova, A., Kvalheim, G., Nesland, J. M. ve Reich, R.** (2006). The mitogen-activated protein kinases (MAPK) p38 and JNK are markers of tumor progression in breast carcinoma. *Gynecol Oncol*, **102**: 453-461
22. 2015 Kanser türleri ve zararları. 2013; <http://saglik.zararlari.com/kanser-turleri-ve-zararlari.html>. Accessed 15.06.2015, 2015.
23. **Lippman, M. E.** (1998) Breast Cancer, Harrison's Principles of Internal Medicine. 14th ed. New York: McGraw-Hill Companies.
24. **Nussbaum, R. L., McInnes, R. R. ve Willard, H. F.** (2001) Genetics and Cancer: Thompson & Thompson, Genetics in Medicine. 6th ed. USA: W.B. Saunders Company Press.
25. (2002). Cancer incidence in five continents. Volume VIII. *IARC Sci Publ*: 1-781
26. **Bozkaya, G., Korhan, P., Cokakli, M., Erdal, E., Sagol, O., Karademir, S., Korch, C. ve Atabey, N.** (2012). Cooperative interaction of MUC1 with the HGF/c-Met pathway during hepatocarcinogenesis. *Mol Cancer*, **11**: 64
27. **Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. ve Pisani, P.** (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **55**: 74-108
28. **Yu, M. W. ve Chen, C. J.** (1993). Elevated serum testosterone levels and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, **53**: 790-794
29. **Wong, R. ve Corley, D. A.** (2008). Racial and ethnic variations in hepatocellular carcinoma incidence within the United States. *Am J Med*, **121**: 525-531
30. **Lai, C. L., Ratziu, V., Yuen, M. F. ve Poynard, T.** (2003). Viral hepatitis B. *Lancet*, **362**: 2089-2094

31. **Niu, X. Y., Peng, Z. L., Duan, W. Q., Wang, H. ve Wang, P.** (2006). Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference in vitro and in vivo. *Int J Gynecol Cancer*, **16**: 743-751
32. **Lavanchy, D.** (2009). The global burden of hepatitis C. *Liver Int*, **29 Suppl 1**: 74-81
33. **Alter, M. J.** (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*, **13**: 2436-2441
34. **Frank, C., Mohamed, M. K., Strickland, G. T., Lavanchy, D., Arthur, R. R., Magder, L. S., El Khoby, T., Abdel-Wahab, Y., Aly Ohn, E. S., Anwar, W. ve Sallam, I.** (2000). The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*, **355**: 887-891
35. **Freeman, A. J., Dore, G. J., Law, M. G., Thorpe, M., Von Overbeck, J., Lloyd, A. R., Marinos, G. ve Kaldor, J. M.** (2001). Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, **34**: 809-816
36. **Cramp, M. E.** (1999). Hbv + Hcv = Hcc? *Gut*, **45**: 168-169
37. **Zinedine, A., Gonzalez-Osnaya, L., Soriano, J. M., Molto, J. C., Idrissi, L. ve Manes, J.** (2007). Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *Int J Food Microbiol*, **114**: 25-29
38. **Banu, N. ve Muthumary, J.** (2010). Taxol as chemical detoxificant of aflatoxin produced by aspergillus flavus isolated from sunflower seed. *Health*, **Vol.02No.07**: 7
39. **COLAK, H., BINGOL, E. B., HAMPIKYAN, H. ve NAZLI, B.** (2006). Determination of Aflatoxin Contamination in Red-Scaled, Red and Black Pepper by ELISA and HPLC. *J Food Drug Anal*, **14**: 292-296
40. **Yentür, G., Er, B., Gür Özkan, M. ve Bayhan Öktem, A.** (2006). Determination of aflatoxins in peanut butter and sesame samples using high-performance liquid chromatography method. *European Food Research and Technology*, **224**: 167-170
41. **Oveisi, M.-R., Jannat, B., Sadeghi, N., Hajimahmoodi, M. ve Nikzad, A.** (2007). Presence of aflatoxin M1 in milk and infant milk products in Tehran, Iran. *Food Control*, **18**: 1216-1218
42. **Mizrak, D., Engin, B., Onder, F. O., Yener, B., Bektas, M., Biyikli, Z., Idilman, R., Cinar, K., Karayalcin, K., Ersoz, S., Karayalcin, S., Ozden, A., Yurdaydin, C., Yazihan, N., Ataoglu, H., Bozkaya, H. ve Uzunlimoglu, O.** (2009). Aflatoxin exposure in viral hepatitis patients in Turkey. *Turk J Gastroenterol*, **20**: 192-197
43. **Donato, F., Tagger, A., Gelatti, U., Parrinello, G., Boffetta, P., Albertini, A., Decarli, A., Trevisi, P., Ribero, M. L., Martelli, C., Porru, S. ve Nardi, G.** (2002). Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*, **155**: 323-331

44. **SW., F.** (2004). The role of hypoxia in the pathogenesis of alcoholic liver disease.
45. **Brechot, C., Nalpas, B. ve Feitelson, M. A.** (1996). Interactions between alcohol and hepatitis viruses in the liver. *Clin Lab Med*, **16**: 273-287
46. **Farrell, G. C. ve Larter, C. Z.** (2006). Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*, **43**: S99-S112
47. **Angulo, P.** (2007). GI epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*, **25**: 883-889
48. **Musso, G., Gambino, R., Bo, S., Uberti, B., Biroli, G., Pagano, G. ve Cassader, M.** (2008). Should nonalcoholic fatty liver disease be included in the definition of metabolic syndrome? A cross-sectional comparison with Adult Treatment Panel III criteria in nonobese nondiabetic subjects. *Diabetes Care*, **31**: 562-568
49. **Sookoian, S., Burgueno, A. L., Castano, G. ve Pirola, C. J.** (2008). Should nonalcoholic fatty liver disease be included in the definition of metabolic syndrome? A cross-sectional comparison with adult treatment panel III criteria in nonobese nondiabetic subjects: response to Musso et al. *Diabetes Care*, **31**: e42; author reply e43
50. **Marrero, J. A., Fontana, R. J., Su, G. L., Conjeevaram, H. S., Emick, D. M. ve Lok, A. S.** (2002). NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology*, **36**: 1349-1354
51. **El-Serag, H. B., Tran, T. ve Everhart, J. E.** (2004). Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, **126**: 460-468
52. **Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R., Jr., Ellis, M. C., Fullan, A., Hinton, L. M., Jones, N. L., Kimmel, B. E., Kronmal, G. S., Lauer, P., Lee, V. K., Loeb, D. B., Mapa, F. A., McClelland, E., Meyer, N. C., Mintier, G. A., Moeller, N., Moore, T., Morikang, E., Prass, C. E., Quintana, L., Starnes, S. M., Schatzman, R. C., Brunke, K. J., Drayna, D. T., Risch, N. J., Bacon, B. R. ve Wolff, R. K.** (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*, **13**: 399-408
53. **Adams, P. C. ve Chakrabarti, S.** (1998). Genotypic/phenotypic correlations in genetic hemochromatosis: evolution of diagnostic criteria. *Gastroenterology*, **114**: 319-323
54. **P, B. ve Y., D.** (1999) Oxford textbook of Clinical Hepatology
55. **Powell, L. W., Subramaniam, V. N. ve Yapp, T. R.** (2000). Haemochromatosis in the new millennium. *J Hepatol*, **32**: 48-62

56. **Thomas, G. R., Forbes, J. R., Roberts, E. A., Walshe, J. M. ve Cox, D. W.** (1995). The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nat Genet*, **9**: 210-217
57. **Steindl, P., Ferenci, P., Dienes, H. P., Grimm, G., Pabinger, I., Madl, C., Maier-Dobersberger, T., Herneth, A., Dragosics, B., Meryn, S., Knoflach, P., Granditsch, G. ve Gangl, A.** (1997). Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology*, **113**: 212-218
58. **Stremmel, W., Meyerrose, K. W., Niederau, C., Hefter, H., Kreuzpaintner, G. ve Strohmeyer, G.** (1991). Wilson disease: clinical presentation, treatment, and survival. *Ann Intern Med*, **115**: 720-726
59. **I, H. ve D, G.** (1999) Oxford textbook of Clinical Hepatology 2nd ed.
60. **Collier, J. ve Sherman, M.** (1998). Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **27**: 273-278
61. **Greene FL, P. D., Fleming ID, et al. (eds).** . (2002). Liver (Including Intrahepatic Bile Ducts). .
62. **Dresel, S., Kirsch, C. M., Tatsch, K., Zchoval, R., Hahn, K. ve Goldenberg, D. M.** (1997). Detection of hepatocellular carcinoma with a new alpha-fetoprotein antibody imaging kit. *J Clin Oncol*, **15**: 2683-2690
63. **Colli, A., Fraquelli, M., Casazza, G., Massironi, S., Colucci, A., Conte, D. ve Duca, P.** (2006). Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Am J Gastroenterol*, **101**: 513-523
64. **Yu, S. C., Yeung, D. T. ve So, N. M.** (2004). Imaging features of hepatocellular carcinoma. *Clin Radiol*, **59**: 145-156
65. **Heiken, J. P., Weyman, P. J., Lee, J. K., Balfe, D. M., Picus, D., Brunt, E. M. ve Flye, M. W.** (1989). Detection of focal hepatic masses: prospective evaluation with CT, delayed CT, CT during arterial portography, and MR imaging. *Radiology*, **171**: 47-51
66. **Yu, J. S., Kim, K. W., Lee, J. T. ve Yoo, H. S.** (1998). MR imaging during arterial portography for assessment of hepatocellular carcinoma: comparison with CT during arterial portography. *AJR Am J Roentgenol*, **170**: 1501-1506
67. **Kanematsu, M., Hoshi, H., Murakami, T., Inaba, Y., Kim, T., Yamada, T., Kato, M., Yokoyama, R. ve Nakamura, H.** (1997). Detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: MR imaging versus angiographically assisted helical CT. *AJR Am J Roentgenol*, **169**: 1507-1515
68. **Murakami, T., Oi, H., Hori, M., Kim, T., Takahashi, S., Tomoda, K., Narumi, Y. ve Nakamura, H.** (1997). Helical CT during arterial portography and hepatic arteriography for detecting hypervascular hepatocellular carcinoma. *AJR Am J Roentgenol*, **169**: 131-135
69. **Takayama, T., Makuuchi, M., Hirohashi, S., Sakamoto, M., Yamamoto, J., Shimada, K., Kosuge, T., Okada, S., Takayasu, K. ve Yamasaki, S.**

- (1998). Early hepatocellular carcinoma as an entity with a high rate of surgical cure. *Hepatology*, **28**: 1241-1246
70. **Pichlmayr, R., Weimann, A. ve Ringe, B.** (1994). Indications for liver transplantation in hepatobiliary malignancy. *Hepatology*, **20**: 33S-40S
 71. **Livraghi, T., Benedini, V., Lazzaroni, S., Meloni, F., Torzilli, G. ve Vettori, C.** (1998). Long term results of single session percutaneous ethanol injection in patients with large hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **83**: 48-57
 72. **Lau, W. Y. ve Lai, E. C.** (2008). Treatment of unresectable hepatocellular carcinoma with transarterial radioembolization: iodine-131-lipiodol. *ANZ J Surg*, **78**: 331-332
 73. **Bruix, J.** (1997). Treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **25**: 259-262
 74. **Okuda, K., Ohtsuki, T., Obata, H., Tomimatsu, M., Okazaki, N., Hasegawa, H., Nakajima, Y. ve Ohnishi, K.** (1985). Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer*, **56**: 918-928
 75. **Nerenstone, S. R., Ihde, D. C. ve Friedman, M. A.** (1988). Clinical trials in primary hepatocellular carcinoma: current status and future directions. *Cancer Treat Rev*, **15**: 1-31
 76. **Tatar, G. B. ve Hayat, E. Y.** (2007). Epigenetik hastalıklar ve tedavi yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **38**: 48-54
 77. **Cortez, C. C. ve Jones, P. A.** (2008). Chromatin, cancer and drug therapies. *Mutat Res*, **647**: 44-51
 78. **Herranz, M. ve Esteller, M.** (2007). DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets. *Methods Mol Biol*, **361**: 25-62
 79. **Atalay A.** (2007). RNA İnterferans Kursu
 80. **Napoli, C., Lemieux, C. ve Jorgensen, R.** (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**: 279-289
 81. **Jorgensen, R.** (1990). Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol*, **8**: 340-344
 82. **Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. ve Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**: 806-811
 83. **Berkhout, B. ve Haasnoot, J.** (2006). The interplay between virus infection and the cellular RNA interference machinery. *FEBS Lett*, **580**: 2896-2902
 84. **Gartel, A. L. ve Kandel, E. S.** (2006). RNA interference in cancer. *Biomol Eng*, **23**: 17-34

85. **Grosshans, H. ve Filipowicz, W.** (2008). Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature*, **451**: 414-416
86. **Le Quesne J, C. C.** (2010). Micro-RNAs and breast cancer.:
87. **Garzon R, F. M., Cimmino A, Calin GA, Croce ve CM.** (2006). MicroRNA expression and function in cancer.
88. **Sapru, M. K., Yates, J. W., Hogan, S., Jiang, L., Halter, J. ve Bohn, M. C.** (2006). Silencing of human alpha-synuclein in vitro and in rat brain using lentiviral-mediated RNAi. *Exp Neurol*, **198**: 382-390
89. **Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. ve Bartel, D. P.** (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**: 25-33
90. **Karp, G.** (2002) Cell and Molecular Biology. 4th ed. Florida: John Wiley & Sons, Inc.
91. **Gündoğdu, R. ve Çelik, V.** (2009). RNA İnterferans (RNAi). *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **25**: 34-47
92. **Karagüzel, A., Kalay, E. ve Celep, F.** (2007). RNA İnterferans (RNAi): Gen Sessizleştirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **33**: 41-44
93. **Pehlivan, S. ve Durmaz, B.** (2006). Küçük RNA'ların etki mekanizmaları ve önemi. *ARŞİV Kaynak Tarama Dergisi*, **15**: 320-330
94. **Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J. ve Joshua-Tor, L.** (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, **305**: 1434-1437
95. **Elbashir, S. M., Lendeckel, W. ve Tuschl, T.** (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, **15**: 188-200
96. 2015 siRNA'nın gen ifadesini engellemesi. <http://www.gene-quantification.de/si-rna.html>. Accessed 15.06.2015, 2015.
97. **Frank-Kamenetsky, M., Grefhorst, A., Anderson, N. N., Racie, T. S., Bramlage, B., Akinc, A., Butler, D., Charisse, K., Dorkin, R., Fan, Y., Gamba-Vitalo, C., Hadwiger, P., Jayaraman, M., John, M., Jayaprakash, K. N., Maier, M., Nechev, L., Rajeev, K. G., Read, T., Röhl, I., Soutschek, J., Tan, P., Wong, J., Wang, G., Zimmermann, T., de Fougerolles, A., Vornlocher, H.-P., Langer, R., Anderson, D. G., Manoharan, M., Kotliansky, V., Horton, J. D. ve Fitzgerald, K.** (2008). Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*:
98. **Sato, Y., Murase, K., Kato, J., Kobune, M., Sato, T., Kawano, Y., Takimoto, R., Takada, K., Miyanishi, K., Matsunaga, T., Takayama, T. ve Niitsu, Y.** (2008). Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat Biotechnol*, **26**: 431-442

99. Song, E., Lee, S. K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P. ve Lieberman, J. (2003). RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*, **9**: 347-351
100. Ghildiyal M, Z. P. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe.:
101. Halder, J., Kamat, A. A., Landen, C. N., Jr., Han, L. Y., Lutgendorf, S. K., Lin, Y. G., Merritt, W. M., Jennings, N. B., Chavez-Reyes, A., Coleman, R. L., Gershenson, D. M., Schmandt, R., Cole, S. W., Lopez-Berestein, G. ve Sood, A. K. (2006). Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy. *Clin Cancer Res*, **12**: 4916-4924
102. Takeshita, F., Minakuchi, Y., Nagahara, S., Honma, K., Sasaki, H., Hirai, K., Teratani, T., Namatame, N., Yamamoto, Y., Hanai, K., Kato, T., Sano, A. ve Ochiya, T. (2005). Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**: 12177-12182
103. de Fougères, A. ve Novobrantseva, T. (2008). siRNA and the lung: research tool or therapeutic drug? *Curr Opin Pharmacol*, **8**: 280-285
104. DiFiglia, M., Sena-Esteves, M., Chase, K., Sapp, E., Pfister, E., Sass, M., Yoder, J., Reeves, P., Pandey, R. K., Rajeev, K. G., Manoharan, M., Sah, D. W., Zamore, P. D. ve Aronin, N. (2007). Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**: 17204-17209
105. Fattal, E. ve Bochot, A. (2006). Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev*, **58**: 1203-1223
106. Grzelinski, M., Urban-Klein, B., Martens, T., Lamszus, K., Bakowsky, U., Hobel, S., Czubyko, F. ve Aigner, A. (2006). RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through polyethylenimine-complexed small interfering RNAs in vivo exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts. *Hum Gene Ther*, **17**: 751-766
107. Inoue, T., Sugimoto, M., Sakurai, T., Saito, R., Futaki, N., Hashimoto, Y., Honma, Y., Arai, I. ve Nakaike, S. (2007). Modulation of scratching behavior by silencing an endogenous cyclooxygenase-1 gene in the skin through the administration of siRNA. *J Gene Med*, **9**: 994-1001
108. Palliser, D., Chowdhury, D., Wang, Q. Y., Lee, S. J., Bronson, R. T., Knipe, D. M. ve Lieberman, J. (2006). An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature*, **439**: 89-94
109. Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**: 23-36
110. Ambion Inc. (2007). RNA Interference Overview. *The RNA Company*:

111. **N., K.** (2003). RNA Interference in Functional Genomics and Medicine.
112. **Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. ve Tuschl, T.** (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**: 494-498
113. **Melo, J. V., Hughes, T. P. ve Apperley, J. F.** (2003). Chronic myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 132-152
114. **Chiu, Y. L. ve Rana, T. M.** (2003). siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA*, **9**: 1034-1048
115. **Konnikova, L., Kotecki, M., Kruger, M. M. ve Cochran, B. H.** (2003). Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC Cancer*, **3**: 23
116. **. Lin SL, C. D., Ying SY. .** (2005). Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly.
117. **Luo, K.** (2004). Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev*, **14**: 65-70
118. **Massague, J., Seoane, J. ve Wotton, D.** (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev*, **19**: 2783-2810
119. **Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. ve Heldin, C. H.** (2001). Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci*, **114**: 4359-4369
120. **Xu, L. ve Massague, J.** (2004). Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**: 209-219
121. **Shi, Y. ve Massague, J.** (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, **113**: 685-700
122. **Conidi A, C. S., Beets K, Coddens K, Collart C, et al.** (2011). Few Smad proteins and many Smad-interacting proteins yield multiple functions and action modes in TGFbeta/BMP signaling in vivo.:
123. **Inman, G. J., Nicolas, F. J. ve Hill, C. S.** (2002). Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell*, **10**: 283-294
124. **Derynck, R. ve Zhang, Y. E.** (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, **425**: 577-584
125. **Thawani JP, W. A., Than KD, Lin CY, La Marca F, et al..** (2010). Bone morphogenetic proteins and cancer: review of the literature.
126. **Moustakas, A. ve Heldin, C. H.** (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci*, **118**: 3573-3584
127. **Mulder, K. M.** (2000). Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, **11**: 23-35

128. **Petritsch, C., Beug, H., Balmain, A. ve Oft, M.** (2000). TGF-beta inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest. *Genes Dev*, **14**: 3093-3101
129. **Siegel, P. M. ve Massague, J.** (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**: 807-821
130. **Pardali, K., Kurisaki, A., Moren, A., ten Dijke, P., Kardassis, D. ve Moustakas, A.** (2000). Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, **275**: 29244-29256
131. **Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M. ve Massague, J.** (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol*, **3**: 400-408
132. **Chen, C.-R., Kang, Y., Siegel, P. M. ve Massagué, J.** (2002). E2F4/5 and p107 as Smad Cofactors Linking the TGFβ Receptor to c-myc Repression. *Cell*, **110**: 19-32
133. **Iavarone, A., Garg, P., Lasorella, A., Hsu, J. ve Israel, M. A.** (1994). The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev*, **8**: 1270-1284
134. **Vural, P.** (2010). The Suppressing Role of Transforming Growth Factor- β in Cancer. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*:
135. **Nakashima, M. ve Reddi, A. H.** (2003). The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol*, **21**: 1025-1032
136. **Rengachary, S. S.** (2002). Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus*, **13**: e2
137. **Wozney, J. M.** (2002). Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine (Phila Pa 1976)*, **27**: S2-8
138. **Termaat, M. F., Den Boer, F. C., Bakker, F. C., Patka, P. ve Haarman, H. J.** (2005). Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am*, **87**: 1367-1378
139. **Conidi, A., Cazzola, S., Beets, K., Coddens, K., Collart, C., Cornelis, F., Cox, L., Joke, D., Dobрева, M. P., Dries, R., Esguerra, C., Francis, A., Ibrahimi, A., Kroes, R., Lesage, F., Maas, E., Moya, I., Pereira, P. N., Stappers, E., Stryjewska, A., van den Berghe, V., Vermeire, L., Verstappen, G., Seuntjens, E., Umans, L., Zwijsen, A. ve Huylebroeck, D.** (2011). Few Smad proteins and many Smad-interacting proteins yield multiple functions and action modes in TGFbeta/BMP signaling in vivo. *Cytokine Growth Factor Rev*, **22**: 287-300
140. **Ge, J. B. a. S.** (2014). Potential Roles of BMP9 in Liver Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci*:

141. **Dhanikula, A. B. ve Panchagnula, R.** (1999). Localized paclitaxel delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **183**: 85-100
142. **Baytop, T.** (1999) Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçimişte ve Bugün. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri.
143. **David, L., Mallet, C., Keramidas, M., Lamande, N., Gasc, J. M., Dupuis-Girod, S., Plauchu, H., Feige, J. J. ve Bailly, S.** (2008). Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res*, **102**: 914-922
144. **McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J. and Kay, M.A.,** . (2002). RNA interference in adult mice.
145. **Bidart, M., Ricard, N., Levet, S., Samson, M., Mallet, C., David, L., Subileau, M., Tillet, E., Feige, J. J. ve Bailly, S.** (2012). BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci*, **69**: 313-324
146. **Herrera, B., Dooley, S. ve Breitkopf-Heinlein, K.** (2014). Potential roles of bone morphogenetic protein (BMP)-9 in human liver diseases. *Int J Mol Sci*, **15**: 5199-5220
147. **Alarmo, E. L. ve Kallioniemi, A.** (2010). Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumorigenesis? *Endocr Relat Cancer*, **17**: R123-139
148. **Thawani, J. P., Wang, A. C., Than, K. D., Lin, C. Y., La Marca, F. ve Park, P.** (2010). Bone morphogenetic proteins and cancer: review of the literature. *Neurosurgery*, **66**: 233-246; discussion 246
149. **Liu, X., Qin, J., Luo, Q., Bi, Y., Zhu, G., Jiang, W., Kim, S. H., Li, M., Su, Y., Nan, G., Cui, J., Zhang, W., Li, R., Chen, X., Kong, Y., Zhang, J., Wang, J., Rogers, M. R., Zhang, H., Shui, W., Zhao, C., Wang, N., Liang, X., Wu, N., He, Y., Luu, H. H., Haydon, R. C., Shi, L. L., Li, T., He, T. C. ve Li, M.** (2013). Cross-talk between EGF and BMP9 signalling pathways regulates the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med*, **17**: 1160-1172