T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA PEROKSİZOM İLİŞKİLİ GENLERİN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ

Sema ŞABANÇELEBİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR
(danışman imzalı olacaktır)
II. DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Kübra TOMBULTÜRK

Haziran, 2024

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Tezli Yüksek Lisans Programı

TEZ KABUL VE ONAYI

Sema ŞABANÇELEBİ tarafından, **Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR** danışmanlığında hazırlanan **" Hepatosellüler Karsinomada Peroksizom İlişkili Genlerin Ekspresyon Profillerinin İncelenmesi "** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **07/08/2024** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Yelda ARGÜDEN İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Tuğba SOYDAŞ İstanbul Aydın Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Aileme ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA PEROKSİZOM İLİŞKİLİ GENLERİN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 37431

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen tez yazım sürecinde tüm engellerde çözüm için bana yardımcı olan saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR'e

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen değerli ikinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Fatma Kübra TOMBULTÜRK'e;

Araştırma ve laboratuvar çalışmalarım sırasında her zaman bana yardımcı olan arkadaşlarım Dr. Metehan KARATAŞ ve Evren ATAK'a

Lisansüstü eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi her zaman yanımda olan, tavsiye ve özverilerini eksik etmeyen sevgili aileme;

Yüksek lisans tez projesini tamamlamam için bana destek sağlayan İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunarım (Proje numarası:37431).

Haziran 2024 Sema ŞABANÇELEBİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ii
BEYAN iii
BÜTÇE DESTEKLERİ v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
ŞEKİL LİSTESİ ix
TABLO LİSTESİ x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ xi
ÖZET xii
ABSTRACT xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 166
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE 200
2.1. Hepatosellüler Karsinom (HCC), Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri 200
2.2. Peroksizom ve Kanser 211
2.2.1 Peroksizom Biyogenezinde *PEX16* Geninin Rolü ve Kanser 244
2.2.2 *DHRS4* geninin peroksizom metabolizmasındaki önemi ve kanser ile ilişkisi 244
3. YÖNTEM 266
3.1 Materyal 266
3.2 Metot 266
3.2.1 Biyoinformatik Analizlerle Genlerin Tayin Edilmesi 266
3.2.2 Hücre Kültürü 276
3.2.3 Örneklerden RNA izolasyonu 287
3.2.4 cDNA Dönüşümü 287
3.2.5 Gen Ekspresyon Deneyleri İçin Primer Tasarımı 29
3.2.6 *DHRS4* ve *PEX16* Ekspresyon Seviyelerinin QRT-PCR Yöntemi ile Tespit Edilmesi…… 29
3.2.7 Veri Analizi 300
4. BULGULAR 311

5. TARTIŞMA.....355
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....376
7. KAYNAKLAR.....387
8. İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI….....40
9. ETİK KURUL İZİN YAZISI.....41
10. KURUM İZNİ YAZILARI.....42
11. PATENT HAKKI İZNİ.....43
12. ÖZGEÇMİŞ.....44

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.1 Hepatoselüler karsinomda risk faktörleri……21

Şekil 2.2.1 Peroksizom ile ilişkili genler şeması……..23

Şekil 3.2.1 NCBI-GEO arama ekranı……26

Şekil 3.2.1.2 Veri seti analizinde kullanılan R kodu……..27

Şekil 4.1 DHRS4 geni için Tümör ve sağlıklı kontrole ait örneklerinin karşılaştırılması. ……...…32

Şekil 4.2 İki grup arasında *DHRS4*'nin karşılaştırılması…...…….32

Şekil 4.3 *PEX16* geni için Tümör ve sağlıklı kontrole ait örneklerinin karşılaştırılması. ……...33

Şekil 4.4 İki grup arasında *PEX16*'nIn karşılaştırılması ……33

Şekil 4.5 İki grup arasında *PEX16* ve *DHRS4* genlerinin kat değişiminin karşılaştırılması….34

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1 Deneylerin yürütülmesinde kullanılan cizhazlar……26
Tablo 3.2 cDA sentezi için kullanılan solüsyonlar ve miktarları……..28
Tablo 3.3 cDNA reaksiyon koşulları…….28
Tablo 3.4 Ekspresyon profilleri incelenecek olan *PEX16* ve *DHRS4* genlerine ait primerlerin tasarımları……..28
Tablo 3.5 Ekspresyon deneyleri için gerekli QRT-PCR reaksiyon solüsyonları…...…….29
Tablo 3.6 Ekspresyon deneyleri için gerekli QRT-PCR reaksiyon koşulları……...29
Tablo 4.1 İki grup için kat değişimlerinin karşılaştırılması……..31

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
HCC	: Hepatosellüler karsinom
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktör-beta
TACE	**:** Transkateter arteriyel kemoembolizasyon
PMP	: Peroksizomal membran proteinleri
PBB	: Peroksizom biyogenez bozuklukları
PPV	: Peroksizom öncü vezikülleri
DLP1	: dinamin benzeri protein 1
DHRS4	: Dehidrojenaz/redüktaz 4
PEX16	: Peroksizom biyogenez faktör 16
PMP	: Peroksizomal membran proteinleri
DNMT1	: DNA metiltransferaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
ER	: Endoplazmik Retikulum
HDACi	: Histon deasetilaz inhibitör
qRT-PCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA PEROKSİZOM İLİŞKİLİ GENLERİN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ

Sema ŞABANÇELEBİ

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman : Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR

II. Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Fatma Kübra TOMBULTÜRK

Hepatosellüler karsinom (HCC), karaciğer kanserinin en yaygın türüdür ve dünya çapında kanserden kaynaklanan ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Hücre içindeki metabolik aktivitelerde gerçekleşen değişiklikler kanserin en karakterize özelliklerindendir. Peroksizomlar, kanser hücresi büyümesini ve hayatta kalmasını etkileyen organellerdir. Bazı kanser hücreleri, bir enerji kaynağı olarak peroksizomal lipid yıkımına güvenir. Ayrıca, peroksizomal lipid sentezi ve redoks dengesi, genellikle besin ve oksijen eksikliği olan tümör mikroçevresinde kanser hücresinin hayatta kalmasını destekleyebilir. Bu bilgiler doğrultusunda peroksizom biyogenezi ve metabolizmasının HCC patogenezinde rol oynayabileceği muhtemeldir. Bu sebeple çalışmada; kanser ile bu denli önemli ilişkisi olan peroksizom ilişkili genlerin hepatosellüler karsinomda ekspresyon profilleri incelenerek peroksizom yolağının hepatosellüler karsinom ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, HCC hücre hattı (HEPG2) ve sağlıklı kontrol hücre hattı (HUVEC) çalışmalarından elde edilen RNA örnekleri kullanılmıştır. cDNA sentezi ardından, RT-PCR yöntemi ile gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. *ACTB* geni, referans gen olarak kullanılmıştır. Gen ekspresyon seviyeleri Ct (threshold cycle) değerleri ile belirlenmiş ve 2^-ΔΔCt yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir.PEX ve DHRS genlerinin ACTB genine kıyasla

ekspresyon profilleri incelenmesi amacıyla 2^-ΔΔCt yöntemi kullanılarak yapılan analiz sonucunda; hem *PEX16* geninin hem de *DHRS4* geninin HCC'de ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır.

Bu çalışma, HCC'de peroksizom ilişkili *PEX16* ve *DHRS4* genlerinin ekspresyon düzeylerinin önemli ölçüde artmış olduğunu göstermektedir. *PEX16* ve *DHRS4* genlerinin ekspresyon profilleri, HCC patogenezinde önemli bir rol oynayabilir ve bu genler, HCC'nin biyolojik davranışını anlamak ve potansiyel terapötik hedefler geliştirmek için gelecekteki çalışmalarda araştırılması gereken adaylar olarak değerlendirilebilir.

Anahtar kelimeler: Peroksizom İlişkili Genler, Hepatosellüler Karsinom, Gen Ekspresyonu

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE EXPRESSION PROFILES OF PEROXISOME-RELATED GENES IN HEPATOCELLLULAR CARCINOMA

Sema Şabançelebi

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Medical Biology, Master's Degree Program with Thesis

Supervisor : Academic Title Name SURNAME

Co-Supervisor: Academic Title Name SURNAME

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common type of liver cancer and a leading cause of cancer-related deaths worldwide. Changes in metabolic activities within cells are among the characterized features of cancer. Peroxisomes are organelles that affect cancer cell growth and survival. Some cancer cells rely on peroxisomal lipid breakdown as an energy source. Additionally, peroxisomal lipid synthesis and redox balance can support cancer cell survival in tumor microenvironments typically lacking nutrients and oxygen. Based on this information, it is likely that peroxisome biogenesis and metabolism may play a role in HCC pathogenesis. Therefore, this study aimed to investigate the relationship between peroxisome-associated genes and HCC by examining expression profiles of these genes in hepatocellular carcinoma.

In this study, RNA samples obtained from HCC cell line (HEPG2) and healthy control cell line (HUVEC) studies were used. Following cDNA synthesis, gene expression levels were determined using RT-PCR. The ACTB gene was used as a reference gene. Gene expression levels were determined using Ct (threshold cycle) values and analyzed using the 2^-ΔΔCt method.

The analysis using the 2^-ΔΔCt method aimed to examine the expression profiles of PEX and DHRS genes compared to the ACTB gene. As a result, both *PEX16* and *DHRS4* genes showed significantly increased expression in HCC compared to the control group.

This study demonstrates that the expression levels of peroxisome-associated genes *PEX16* and *DHRS4* are significantly elevated in HCC. The expression profiles of *PEX16* and *DHRS4* genes may play an important role in HCC pathogenesis and could be considered as candidates to be investigated in future studies to understand the biological behavior of HCC and develop potential therapeutic targets.

June 2024

Keywords: Peroxisome-Associated Genes, Hepatocellular Carcinoma, Gene Expression

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatoselüler karsinom (HCC), primer karaciğer kanserinin baskın histolojik alt tipini temsil eder ve yüksek prevalansı, mortalite oranları ve sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle önemli bir küresel bir sağlık problemidir. Hepatositlerin malign dönüşümü ile karakterize edilen HCC, tipik olarak kronik hepatit B ve C virüsü enfeksiyonları, alkolik karaciğer hastalığı, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı ve sirozun neden olduğu kronik karaciğer hastalığı ortamında ortaya çıkar. Metabolik bozukluklar ve çevresel faktörler de patogenezine katkıda bulunabilir. HCC'nin moleküler patogenezi çok faktörlüdür ve genetik değişiklikler, epigenetik değişiklikler ve çevresel faktörlerin etkileşimini içerir. Wnt/β-katenin, Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt/mTOR ve TGF-β sinyal yolları dahil olmak üzere anahtar sinyal yollarını etkileyen genetik mutasyonların hepatokarsinogenezde rol oynadığı ve düzensiz hücre çoğalmasına, apoptoz kaçağına yol açtığı gösterilmiştir. HCC tanısı, klinik değerlendirme, görüntüleme çalışmaları (ultrason, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme gibi) ve serum biyobelirteçlerinin (alfa-fetoprotein ve des-gamma-karboksi protrombin gibi) kombinasyonuna dayanır. Şüpheli vakalarda kesin tanı için karaciğer biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesi altın standart olmaya devam etmektedir. HCC için tedavi stratejileri, hastalığın evresine, karaciğer fonksiyonuna ve hastanın genel sağlığına göre belirlenir. Erken evre HCC için küratif tedavi seçenekleri arasında cerrahi rezeksiyon, karaciğer nakli ve radyofrekans ablasyonu ve mikrodalga ablasyonu gibi lokal ablatif tedaviler yer alır. Lokal olarak ilerlemiş veya rezeke edilemeyen HCC, transkateter arteriyel kemoembolizasyon (TACE), radyoembolizasyon, moleküler hedefli ajanlarla (sorafenib, lenvatinib ve regorafenib gibi) sistemik tedavi veya ilerlemiş hastalar için immün kontrol noktası inhibitörleri (nivolumab ve pembrolizumab gibi) ile yönetilebilir [1,2].

Peroksizomlar, yağ asidi oksidasyonu, eter lipit sentezi, reaktif oksijen türlerinin metabolizması ve zararlı bileşiklerin detoksifikasyonu dahil olmak üzere çeşitli metabolik süreçlerde yer alan temel hücre altı organellerdir. Peroksizomların biyogenezi ve işlevi, peroksizomal yapı ve işlevin çeşitli yönlerinden sorumlu olan proteinleri kodlayan bir dizi gen tarafından düzenlenir. Peroksizom biyogenez bozukluklarının (PBB'ler) genetik temeli, peroksizomal genlerin insan sağlığındaki kritik rolünün altını çizmektedir. PBB'ler, metabolizmanın bozulmasına ve çoklu

organ sistemlerinin anormal gelişimine yol açan, kusurlu peroksizom birleşimi ve işlevi ile karakterize edilen, nadir ve sıklıkla şiddetli bir grup genetik bozukluğu içerir. Bu bozukluklara, peroksizom biyogenezinde rol oynayan peroksinleri kodlayan genlerdeki (PEX proteinleri) veya spesifik metabolik yollar için gerekli olan peroksizomal enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar neden olur [3,4]. İnsanlarda sayıları en az 16 olan PEX genleri, peroksizomal membran düzeneği, matriks protein import edilmesi ve peroksizom proliferasyonu dahil olmak üzere peroksizom biyogenezinin çeşitli yönlerinde yer alan proteinleri kodlar. PEX genlerindeki mutasyonlar, peroksizom düzeneğinin ve fonksiyonunun bozulmasına neden olur ve PBBlerin klinik belirtilerine yol açar. Peroksizom biyogenez genlerine ek olarak, peroksizomal enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar da peroksizomal enzim eksiklikleri olarak bilinen metabolik bozukluklara neden olabilir. Bu bozukluklar, yağ asidi oksidasyonu, safra asidi sentezi ve plazmalojen biyosentezi gibi peroksizomlarda lokalize olan spesifik metabolik yolları bozarak toksik ara ürünlerin birikmesine ve metabolik dengesizliklere yol açar [5].

İnsanlarda 11. kromozomda bulunan Peroxisomal Biogenesis Factor 16 (*PEX16*) geni, peroksizom biyogenezinin ana düzenleyicisi olarak görev yapan bir membran proteinini kodlar. *PEX16* öncelikle peroksizomal membranda lokalize olup, burada peroksizom oluşumunun ve bölünmesinin erken aşamalarında merkezi bir rol oynar. *PEX16*, diğer peroksinler ve membran bileşenleriyle olan etkileşimleri sayesinde peroksizomal membran proteinlerinin (PMP'ler) toplanmasını ve birleştirilmesini kolaylaştırır, böylece peroksizom büyümesini ve proliferasyonunu teşvik eder [6,7]. *PEX16*, peroksizom biyogenezinin kritik bir aracısı olarak görev yapar, peroksizomal membranların montajını ve matris proteinlerinin import edilmesini düzenler. *PEX16*, endoplazmik retikulum (ER) membranına yerleştirildikten sonra, peroksizom öncü vezikülleri (PPV'ler) olarak bilinen peroksizomal membran yapılarının oluşumunu başlatmak için diğer peroksinleri ve lipitleri alır. Daha sonra bu PPV'ler, peroksizomal ithalat mekanizmasının aracılık ettiği bir dizi membran füzyonu ve protein ithalatı olayı yoluyla fonksiyonel peroksizomlara olgunlaşır [8,9]. Peroksizom biyogenezindeki rolüne ek olarak *PEX16*, fisyon ve proliferasyon dahil olmak üzere peroksizom dinamiklerinin düzenlenmesinde de rol oynar. *PEX16*, olgun peroksizomların daha küçük yavru organellere bölünmesini kolaylaştırmak için peroksizomal fisyonun ana düzenleyicisi olan dinamin benzeri protein 1 (DLP1) ile etkileşime girer. Ayrıca, *PEX16* ekspresyon seviyeleri ve hücre altı lokalizasyonu, metabolik ihtiyaçlar ve stres uyaranları gibi hücresel sinyallere yanıt olarak düzenlenir, böylece

peroksizom çokluğu ve işlevi hücresel ihtiyaçlara göre modüle edilir [10,11]. Peroksizom biyogenezi ve dinamiğindeki merkezi rolü göz önüne alındığında, *PEX16* ekspresyonunun veya fonksiyonunun düzensizliğinin hücresel fizyoloji ve insan sağlığı üzerinde derin etkileri olabilir. *PEX16* genindeki mutasyonlar, peroksizom oluşumu ve fonksiyonunda bozulma ile karakterize edilen bir grup nadir genetik hastalık olan peroksizom biyogenez bozuklukları (PBB'ler) ile ilişkilendirilmiştir. *PEX16* mutasyonları olan hastalar tipik olarak gelişimsel anormallikler, nörolojik fonksiyon bozuklukları ve metabolik bozukluklar dahil olmak üzere bir dizi klinik belirtiyle ortaya çıkar ve bu da *PEX16*'nın hücresel homeostazın korunmasındaki kritik öneminin altını çizer [12,13].

Son araştırmalar, HCC patogenezi ile *PEX16* geni arasındaki karmaşık ilişkiye ışık tutarak, hepatokarsinogenezin altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında değerli bilgiler sunmaktadır. *PEX16* disfonksiyonu ile HCC patogenezi arasında potansiyel bir bağlantı olduğunu göstermektedir. HCC dokularında, komşu tümör olmayan dokularla karşılaştırıldığında değişen *PEX16* ekspresyon seviyeleri gözlemlenmiştir ve bu durum *PEX16* düzensizliğinin karaciğer kanseri gelişiminde potansiyel bir rol oynadığını göstermektedir [14,15].

PEX16 ve HCC arasındaki ilişkinin altında yatan moleküler mekanizmalar çok yönlüdür. *PEX16* fonksiyon bozukluğundan kaynaklanan düzensiz peroksizom biyogenezi ve bozulmuş lipid metabolizması, inflamasyonu ve oksidatif stresi destekler ve bunların tümü HCC gelişiminde rol oynar. Ek olarak, PI3K/Akt/mTOR yolu gibi hücresel sinyal yollarındaki *PEX16* aracılı değişiklikler, hücre çoğalmasını, hayatta kalmasını ve anjiyogenezi teşvik ederek HCC ilerlemesine katkıda bulunur. [16,17].

Dehidrojenaz/redüktaz 4 (*DHRS4*) enzimini kodlayan *DHRS4* geni, hücresel metabolizma, lipit homeostazisi ve steroid hormon metabolizmasında çeşitli roller oynar. İnsanlarda 14q11.2 kromozomunda bulunan *DHRS4* geni, kısa zincirli dehidrojenaz/redüktaz (SDR) süper ailesine ait bir proteini kodlayan birkaç eksondan oluşur. *DHRS4* enzimi, retinoidler, steroidler ve yağ asitleri gibi çeşitli substratların indirgenmesi de dahil olmak üzere çok yönlü enzimatik aktiviteler sergiler. Ek olarak *DHRS4*, safra asitleri ve kolesterol metabolizmasına katılarak lipid homeostazisine ve hücresel sinyal yollarına katkıda bulunur [18].

DHRS4 geninin ifadesi, transkripsiyonel, transkripsiyon sonrası ve epigenetik mekanizmalar tarafından karmaşık düzenlemeye tabidir. Karaciğer X reseptörleri (LXR'ler), peroksizom

proliferatörüyle aktifleştirilen reseptörler (PPAR'ler) ve retinoik asit reseptörleri (RAR'ler) gibi transkripsiyon faktörleri, hücresel sinyallere ve çevresel ipuçlarına yanıt olarak *DHRS4* ekspresyonunu düzenler. Ayrıca mikroRNA'lar ve uzun kodlamayan RNA'lar, transkripsiyon sonrası *DHRS4* ekspresyonunu modüle ederek enzimatik aktivitesini ve hücresel fonksiyonlarını etkiler [19,20]. *DHRS4*, hem katalitik hem de düzenleyici işlevler uygulayarak lipid metabolizmasında ve steroid hormon homeostazisinde kritik roller oynar. *DHRS4*, retinoidlerin azaltılmasını katalize ederek hücre farklılaşması, büyümesi ve apoptozda rol oynayan retinoik asit sinyal yollarını düzenler. Ayrıca, kortizol ve aldosteron gibi steroid hormonlarının *DHRS4* aracılı metabolizması, strese karşı hücresel tepkileri, elektrolit dengesini ve kan basıncı düzenlemesini etkiler [21,22]. *DHRS4* ekspresyonu veya aktivitesinin düzensizliği, metabolik bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda rol oynamaktadır. Obezite, diyabet ve dislipidemi hastalarında değişen *DHRS4* ekspresyon düzeylerinin gözlemlenmesi, metabolik sendrom patogenezindeki rolünü vurgulamaktadır. Üstelik anormal *DHRS4* aktivitesinin ateroskleroz, hipertansiyon ve kardiyovasküler komplikasyonlarla ilişkilendirilmesi, bunun kardiyovasküler sağlıktaki öneminin altını çiziyor. Ek olarak, düzensiz *DHRS4* ekspresyonunun, meme kanseri ve hepatoselüler karsinom dahil olmak üzere bazı kanserlerin gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynadığı, bunun kanser tedavisinde tanısal bir biyobelirteç ve terapötik hedef olarak potansiyelini ortaya koyduğunu göstermektedir [23,24].

Tez çalışmamızda hepatosellüler karsinoma'nın peroksizom ilişkili genlerle olan bağlantısını araştırmak amacıyla gen ekspresyon profilleme veri setleri NCBI-GEO'dan elde edilmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan yöntemler, kontrollerin varlığı, hasta sayısının eşit veya yakın olması gibi karakterlere göre GSE183349 ve GSE14945 kodlarına sahip GEO veri setleri seçilmiştir. Bu veriler R programı ile analiz edilerek hepatosellüler karsinomda *PEX16* geninin ekspresyonunun 0,4 kat, *DHRS4* geninin ekspresyonunun 0,5 kat artmış olacağı saptanmıştır. Yapılan bu in silico çalışmayı desteklemek amacı ile laboratuvar ortamında ekspresyon çalışmaları yapılarak sonuçlar desteklenmiştir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

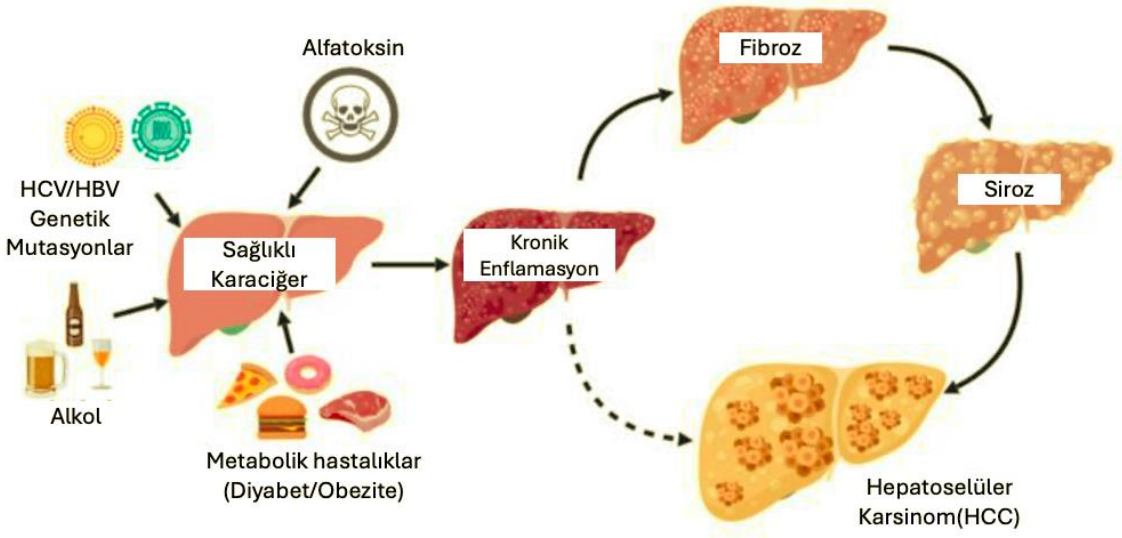
2.1. Hepatosellüler Karsinom (HCC), Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Hepatositler karaciğerdeki primer hücre tipidir ve malign bir tümör olan hepatoselüler karsinomun (HCC) kaynağıdır. Hepatoselüler karsinom dünya genelinde en sık görülen beşinci tümördür. Asya ve Sahra-altı Afrika'da oldukça yaygındır. Tedavi olmadan HCC'nin 5 yıllık hayatta kalma oranı %5'ten azdır. HCC herhangi bir kronik inflamatuar karaciğer hastalığından kaynaklanabilir, ancak siroz, vakaların %80'ini oluşturan patofizyolojik mekanizmadır. Bu malignitelerin yüzde 90 ila 95'i hepatit B ve hepatit C virüslerinin neden olduğu kalıcı enfeksiyonların sonucudur. Hemokromatoz, uzun süreli alkolik siroz, alfa1-antitripsin eksikliği ve tirozinemi gibi bir dizi hastalık, kronik Hepatit B veya C'ye ek olarak yüksek HCC prevalansı ile bağlantılıdır. Tümör çapı 10 cm'ye ulaşana veya hastalık iyice ilerleyene kadar sıklıkla klinik olarak sessiz seyreder.

Avrupa, Japonya, Latin Amerika ve Amerika Birleşik Devletleri'nde HCC'nin ana nedeni, hepatit C virüsü enfeksiyonunun neden olduğu sirozdur ve yıllık görülme sıklığı %2 ila %8 arasında değişmektedir. Genel olarak HCV ile enfekte olan hastalarda HCC gelişme riski, enfekte olmayanlara göre 17 kat daha fazladır. HCV, konak genomuna entegre olamayan, RNA içeren bir virüstür ve bu nedenle apoptotik yolaklardaki değişiklikler ve tümör oluşumu gibi çeşitli dolaylı mekanizmalar yoluyla HCC'ye neden olur.

Obezite ve diyabet, HCC riskinin artması ile ilişkilendirilmiştir. Obezite ve/veya diyabet hastalarında HCC gelişme olasılığı obezite ve/veya diyabeti olmayan kişilere göre iki kat daha fazladır. Alkol, HCC oluşumunda diğer bir risk faktörüdür ve alkol alım düzeyi arttıkça HCC oluşma riski artar. Günlük olarak 40 ila 60 gram arası alkolün düzenli tüketimi HCC ile oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Aflatoksin; Aspergillus flavus ve ilgili mantarlar tarafından üretilen, pirinç, mısır, soya fasulyesi ve yer fıstığı gibi depolanmış gıdaları kirleten bir mikotoksindir. Dünyanın bazı bölgelerinde, özellikle Asya ve Afrika'da, HCC'nin önde gelen risk faktörleridir. Aflatoksine düzenli olarak maruz kalma; hepatik hücrelerin DNA'sına zarar verir ve p53 tümör baskılayıcı genin mutasyonuna neden olur ve bu nedenle HCC ile ilişkilendirilmiştir. Diğer genlerdeki mutasyonlar ve kromozom anomalileri de HCC'de nedenleri arasında gösterilmektedir. c-KRAS geninin nokta mutasyonu ve siklin D1 geninin birlikte amplifikasyonu nadirdir ve HCC'lerin sırasıyla %3 ve %11'inde saptanmıştır. p21WAF/CIP1 (evrensel CDK inhibitörü) ekspresyonunun azalması, P16 protein kaybı, yüksek düzeyde

transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-beta) ekspresyonu, DNA metiltransferaz (DNMT1) mRNA'nın yüksek ekspresyonu HCC'lerin önemli bir yüzdesinde bulunur [25].



Şekil 2.1.1 Hepatoselüler karsinomda risk faktörleri

2.2. Peroksizom ve Kanser

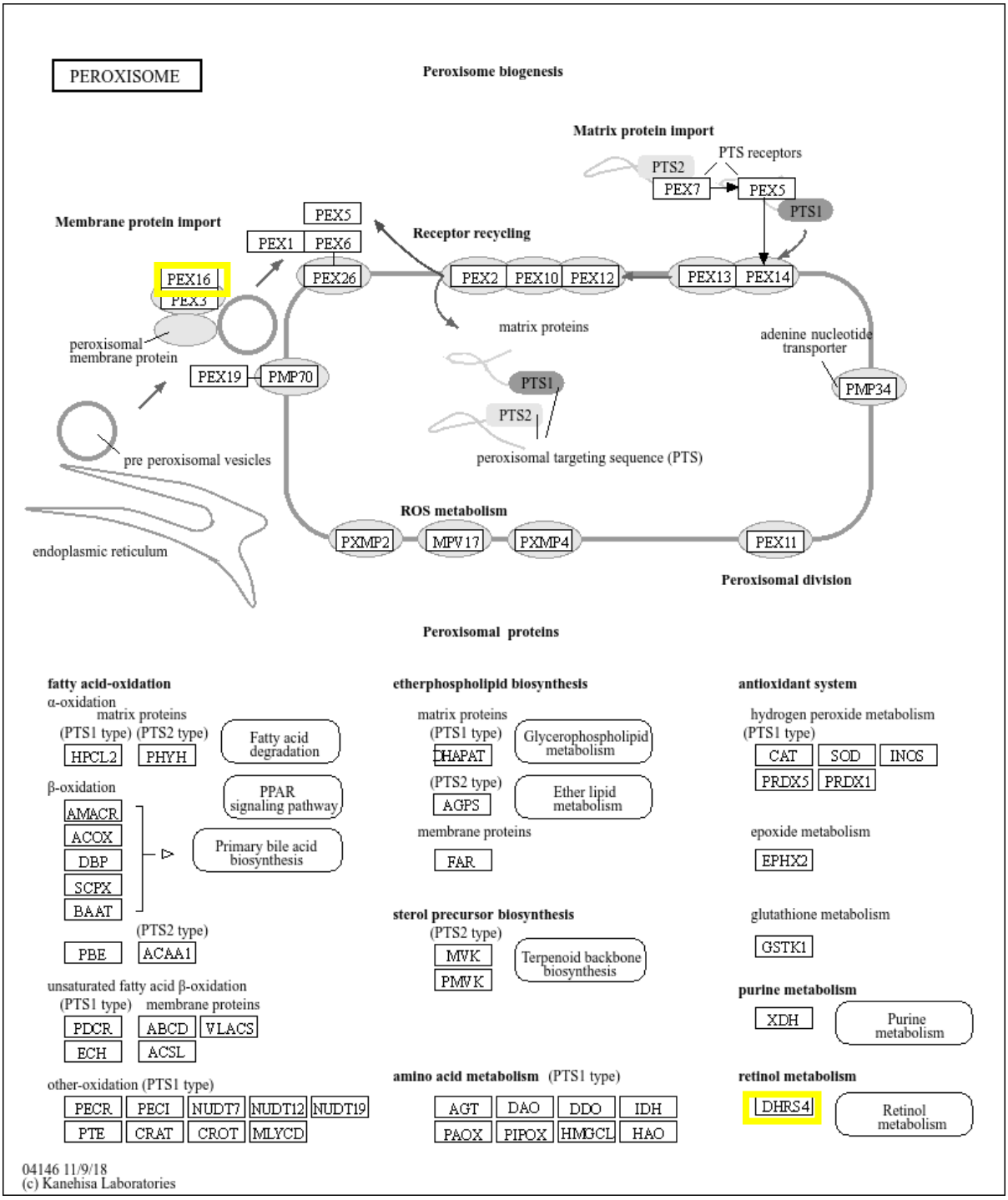
Kanserde metabolik yeniden programlama, malign hücrelerin başlangıç ve ilerlemesi için seçici bir avantaj sağlar [26]. Hücre içinde alınan metabolitler genellikle ilk olarak sitoplazmada işlenir ve daha sonra mitokondri ve peroksizom gibi hücresel organellere taşınarak daha fazla işleme tabi tutulur. Mitokondriler kanser hücre metabolizmasında kritik merkezler olarak kabul edilirken, kanser hücrelerinde diğer organellerin metabolik rolleri daha az araştırılmış ve daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

Peroksizomlar, memelilerde 50'den fazla farklı enzimatik aktiviteye katılan tek zarlı organellerdir. Bu enzimler arasında lipid metabolizması için kritik olan eter fosfolipid sentezi, çok uzun ve dallanmış zincirli yağ asitlerinin oksidasyonu ve hidrojen peroksit (H_2O_2) metabolizması bulunur [27]. Peroksizomal proteinleri kodlayan genlerdeki kusurlar, peroksizomal bozukluklarla ilişkilendirilir ve bu bozukluklar doğuştan gelen metabolik hataları içerir. Peroksizom eksikliği olan hastalarda, peroksizomal lipid metabolizmasının substratlarının düşük, ürünlerinin ise yüksek olduğu saptanmış ve bu durum hastalık tanısı için klinik uygulamalar sunmuştur [28].

Lipid metabolizması, hücre zarı yapısı, enerji depolama ve hücre sinyal iletimi için temel öneme sahiptir. Hızla çoğalan kanser hücreleri, yoğun hücre zarı sentezi gerektirdiğinden lipid sentezi yollarının aktivasyonunu ve ilgili sinyal ağlarının koordinasyonunu sağlarlar. Bazı tümör tiplerinde, yüksek eter fosfolipid düzeyleri, artan peroksizomal lipid sentezi ile tümör ilerlemesi arasında ilişki olduğunu göstermektedir [28].

Yağ asidi oksidasyonu, kanser hücrelerinde lipid ara ürünlerinin kısaltılmasıyla her döngüde NADH, $FADH_2$ ve asetil-CoA gibi indirgenmiş formların üretildiği katabolik bir süreçtir. Ayrıca, yağ asidi oksidasyonu, katalitik reaksiyonlar sırasında oksidatif stresi karşılamak için NADPH üretir. Metabolik reaksiyonlar sırasında oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), hücresel oksidatif stresin ana kaynaklarından biridir [29]. Kanser hücreleri genellikle onkogenik mutasyonlar ve tümör mikroçevresi nedeniyle artmış ROS üretimine sahiptirler, ancak antioksidan savunma sistemlerini artırarak ROS birikimini apoptoz seviyelerine ulaşmadan önlerler [26]. Yağ asidi oksidasyonu, NADPH üretimi ile birlikte antioksidan bir yol olarak kritik bir rol oynar. Özellikle bazı tümör tiplerinde, prostat kanseri ve hematolojik maligniteler gibi, yağ asidi oksidasyonuna bağımlılığın arttığı gözlemlenmiştir [29].

Peroksizomlar, yağ asidi oksidasyonu için mitokondri ile etkileşir. Uzun ve dallanmış zincirli yağ asitlerinin peroksizomal işlenmesi, mitokondri içinde sitrik asit döngüsüne substrat sağlayarak ATP üretimini artırır. Ayrıca, peroksizomların kanser metabolizmasındaki fonksiyonel önemini vurgulayan peroksizomal inaktivasyonun, mitokondriyal redoks dengesi üzerindeki etkileri de dikkat çekicidir.



Şekil 2.2.1 Peroksizom ile ilişkili genler şeması

2.2.1 Peroksizom Biyogenezinde *PEX16* Geninin Rolü ve Kanser

Peroksizom biyogenezi, lipid zarının edinilmesini, ardından matris proteinlerinin eklenmesini ve organelin genişlemesini içerir. Bu süreç hala aktif araştırılan bir alandır ve birçok model, endoplazmik retikulumun (ER), peroksizom biyogenezi için bir başlangıç veya de novo oluşum bölgesi olarak hizmet edebileceğini öne sürmektedir. *PEX3* ve *PEX16* gibi peroksizom biyogenez faktörleri öncelikle ER membranına bağlanır, ardından ER'den tomurcuklanan veziküllerde ayrılır ve *PEX19* ile etkileşime girer. Sitolojide bulunan *PEX19,* yeni sentezlenen peroksizomal membran proteinlerine (PMP'ler) eşlik eden bir döngü reseptörüdür. *PEX19,* bağlı PMP'leri ve *PEX3*'ü de içerecek şekilde birleşir ve daha sonra peroksizomal membrana PMP'leri ekler. İnsanlarda *PEX3, PEX16* veya *PEX19*'deki mutasyonlar, peroksizom membranlarının eksikliğine ve buna bağlı olarak peroksizom biyogenezinde bozukluklara yol açabilir[30].

Lenfoma model sistemlerinde yapılan çalışmalar, *PEX3, PEX16* ve *PEX19*'un, histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi) ile indüklenen hücre ölümüne karşı koruma sağlayarak tümör oluşumunu teşvik ettiğini göstermiştir; bu, hedefe yönelik bir kanser tedavi yöntemidir. Bu deneylerde, *PEX3*'ün genetik olarak susturulması, *PEX16* ve *PEX19* protein seviyelerinin düşmesine, peroksizom sayılarının azalmasına ve HDACi aracılı apoptozun artmasına neden olmuştur. Önemli bir nokta olarak, HDACi'ye dirençli hücrelerde *PEX3* susturulmasının, ilacın pro-apoptotik etkilerine kısmi duyarlılık gösterdiği gözlemlenmiştir.[31]

Kanser hücrelerinin, normal hücrelere kıyasla peroksizom biyogenezini inhibe etme konusunda daha hassas olup olmadığı, halen önemli bir araştırma konusudur ve bu konunun detaylı olarak incelenmesi, klinik uygulamalar açısından önemli sonuçlar doğurabilir.

2.2.2 *DHRS4* geninin peroksizom metabolizmasındaki önemi ve kanser ile ilişkisi

DHRS4 geni, dehidrojenaz/redüktaz 4 enzimini kodlayan ve hücresel metabolizma ile steroid hormon düzenlemesinde çeşitli rolleri olan bir gen olarak kanser biyolojisinde önemli bir oyuncu olarak ortaya çıkmıştır. Başlangıçta 3α-hidroksisteroid dehidrojenazı enzim fonksiyonu için tanınan *DHRS4*, steroidlerin, safra asitlerinin ve yağ asitlerinin metabolizmasında yer alır. Bu fonksiyonların ötesinde, son araştırmalar *DHRS4*'ün peroksizomlarla ilişkilendirildiğini göstermiştir, bu da lipid metabolizması ve redoks homeostazı açısından önemli olan hücresel organellerdir. *DHRS4*'ün enzimatik aktivitesi steroid hormon metabolizmasını etkiler; bu da

kanser gelişimi için kritiktir. Steroid hormon düzeylerinin veya metabolizmasının bozulması meme, prostat ve over kanseri gibi hormon duyarlı dokularda kanser riskini ve ilerlemesini etkileyebilir. *DHRS4*'ün bu yollardaki rolü, kanser hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını düzenlemede etkili olabileceğini göstermektedir. Peroksizomlar, hücreler içinde lipid metabolizması ve redoks düzenlemesi için hayati öneme sahiptir. *DHRS4*'ün peroksizomal lipid metabolizma yollarında yer aldığı belirtilmiştir; bu yollar, kanser hücrelerinin proliferasyonu ve metabolik streslere adaptasyonu için kritiktir[32]. *DHRS4*, çeşitli kanserlerde dislejit steroid hormon biosentezi ve metabolizmasında yer alır. Meme kanserinde *DHRS4* ekspresyonu, östrojen reseptörü durumu ve tamoksifen direnci ile ilişkilendirilmiş; bu da hormon tedavi direnç mekanizmalarında potansiyel rol oynadığını gösterir [33]. Çeşitli kanser tiplerinde normal dokularla karşılaştırıldığında değişen *DHRS4* ekspresyonu gözlenmiştir. Yüksek *DHRS4* ekspresyonu genellikle kötü prognozla ilişkilidir, bu da hastalığın ilerlemesi veya terapötik yanıta biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini düşündürür [34].

Bu bağlamda, HCC'de peroksizom ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerinin incelenmesi, tümör biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir. Peroksizomların hücresel metabolizma, lipid homeostazı ve oksidatif stres yönetimi üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, bu organellerin ve ilişkili genlerin HCC'deki rolü büyük önem taşımaktadır. Bu çalışma, HCC'de peroksizom biyogenezi ile ilişkili *PEX16* ve *DHRS4* genlerinin ekspresyon profillerini değerlendirmeyi ve bu genlerin *ACTB* genine kıyasla nasıl değişiklikler gösterdiğini belirlemeyi amaçlamaktadır. Elde edilen bulgular, peroksizomların HCC'deki fonksiyonel rolünü aydınlatacak ve bu organellerin HCC'nin gelişimi ve ilerlemesindeki potansiyel etkilerini ortaya koyacaktır. Bu sayede, peroksizom ilişkili genlerin HCC tedavisinde yeni hedefler olarak değerlendirilebileceği ve bu alanda gelecekte yapılacak araştırmalar için temel oluşturabileceği öngörülmektedir.

3. YÖNTEM

3.1 Materyal

Proje kapsamında kullanılan cihazlar Tablo 3.1'de bulunmaktadır.

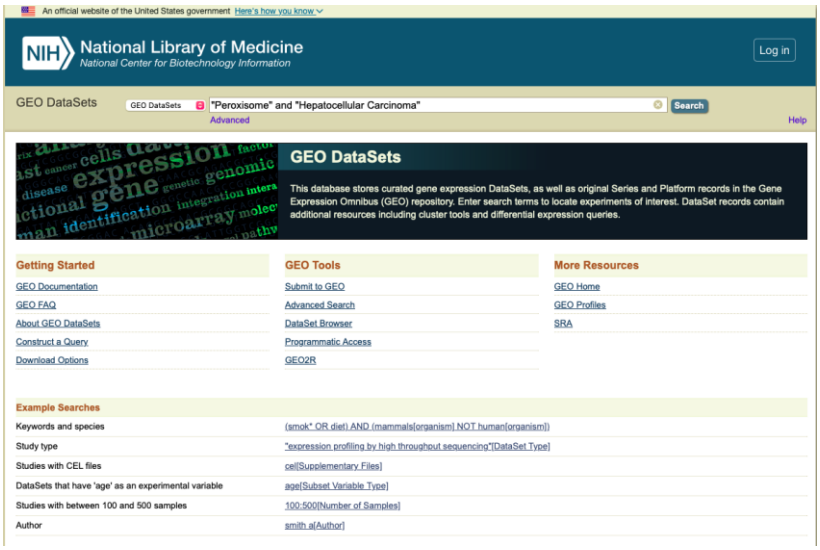
DNM-9602 Microplate Reader
Buzdolabı ve Derin Dondurucu
Santrifüj cihazı
İnkübator
Termal Cycler
Otoklav
Çalkalamalı Su Banyosu
Vorteks
Laminer flow
Mikropipetler
Hassas terazi
Saf Su Cihazı

Tablo 3.1 Deneylerin yürütülmesinde kullanılan cihazlar

3.2 Metot

3.2.1 Biyoinformatik Analizlerle Genlerin Tayin Edilmesi

Hepatosellüler karsinoma'nın gen ekspresyon profilleme veri setleri NCBI-GEO (Barrett et al.,2013)'dan elde edilmiştir[39]. NCBI-GEO sayfasında arama motoruna"Peroksizom ve HCC" , "Peroksizom ve Kanser" anahtar kelimeleri yazılarak arama yapılmıştır.(Şekil 3.2.1).



Şekil 3.2.1 NCBI-GEO arama ekranı

Yapılan aramalar sonucunda yüzlerce farklı veri seti sonucu alınmıştır. Bu veri setleri arasından çalışmamıza en uygun olacak veri setlerini seçebilmek için veri setlerini refere eden makaleler

incelenmiştir. Kullanılan yöntem, kontrollerin varlığı ve örnek sayısına bakılarak GSE183349 ve GSE14945 kodlarına sahip GEO veri setleri seçilmiştir.

Ardından Şekil 3.2.1.2'de görülen kod R programında yazılmıştır ve veri setleri sonuçları bu kod aracılığıyla elde edilmiştir. Elde edilen veriler P değeri($p<0,05$) ve LogFC değerlerine bakılarak filtre edildi. Bu filtreleme sonucunda önemli ölçüde ifade edilen genlerin *PEX16* ve *DHRS4* genleri olduğu tespit edilmiştir.

```
# Version info: R 4.2.2, Biobase 2.58.0, GEOquery 2.66.0, limma 3.54.0
################################################################
#   Differential expression analysis with limma
library(GEOquery)
library(limma)
#install.packages("writexl")
library("writexl")
# load series and platform data from GEO

gset <- getGEO("GSE14945", GSEMatrix =TRUE, AnnotGPL=FALSE)
if (length(gset) > 1) idx <- grep("GPL21185", attr(gset, "names")) else idx <- 1
gset <- gset[[idx]]

# make proper column names to match toptable
fvarLabels(gset) <- make.names(fvarLabels(gset))

# group membership for all samples
gsms <- "11111100000000000XXXXXXXXXX"
sml <- strsplit(gsms, split="")[[1]]

# filter out excluded samples (marked as "X")
sel <- which(sml != "X")
sml <- sml[sel]
gset <- gset[ ,sel]

# log2 transformation
ex <- exprs(gset)
qx <- as.numeric(quantile(ex, c(0., 0.25, 0.5, 0.75, 0.99, 1.0), na.rm=T))
LogC <- (qx[5] > 100) ||
  (qx[6]-qx[1] > 50 && qx[2] > 0)
if (LogC) { ex[which(ex <= 0)] <- NaN
exprs(gset) <- log2(ex) }

# assign samples to groups and set up design matrix
gs <- factor(sml)
groups <- make.names(c("T","N"))
levels(gs) <- groups
gset$group <- gs
design <- model.matrix(~group + 0, gset)
colnames(design) <- levels(gs)

gset <- gset[complete.cases(exprs(gset)), ] # skip missing values

fit <- lmFit(gset, design)  # fit linear model

# set up contrasts of interest and recalculate model coefficients
cts <- paste(groups[1], groups[2], sep="-")
cont.matrix <- makeContrasts(contrasts=cts, levels=design)
fit2 <- contrasts.fit(fit, cont.matrix)

# compute statistics and table of top significant genes
fit2 <- eBayes(fit2, 0.01)
tT <- topTable(fit2, adjust="fdr", sort.by="B", number=25000)

tT <- subset(tT, select=c("GENE_SYMBOL","GENE_NAME","P.Value","logFC"))
write_xlsx(tT, path = "C:\\R Sonuç\\sema_hcc.xlsx")
```

Şekil 3.2.1.2 Veri seti analizinde kullanılan R kodu

3.2.2 Hücre Kültürü

HepG2 ve HUVEC hücre hatlarının uygun koşullarda çoğalma, büyüme ve farklılaşmalarını sağlamak amacıyla besiyeri hazırlandı. Besiyeri; 500 ml Dulbecco Minimal Eagle's Medium (DMEM) içerisine, % 10 inaktive edilmiş fetal sığır serum (FBS), %1 L-glutamin amino asit ve %1 penisilin- streptomisin antibiyotiği ilave edilerek hazırlanmışdı. Hücreler %5 CO2, 37°C

derece ve %96 oranda nemde inkübe edilmiştir. Flasklar bir gün ara ile mikroskop ile gözlemlenmiştir. Hücre yoğunluğu %80'e ulaşan flasklardaki hücreler pasajlanmıştır. Pasajlanacak hücreleri yüzeyden kaldırabilmek için hücrelere her flask için 3 ml % 25'lik tripsin/EDTA solüsyonu eklendi ardından inkübatörde 5 dakika bekletildi. Yüzeyden kaldırılan hücrelere taze serumlu medyum ilave edilerek tripsin etkisi inaktive edildi. Ardından hücreler, kültür kabından toplandı ve 15 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı.

3.2.3 Örneklerden RNA izolasyonu

Elde edilen örneklerin RNA izolasyonu "All-In-One DNA/RNA Mini-Preps Kit" ile firmanın sağladığı protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

- Elde edilen hücreler öncelikle 350µl "Buffer Lysis-DR" ile muamele edildi.
- Elde edilen karışım 12.000xg'de 3 dakika sntrifüj edildi.
- Ardından süpernatant EZ-10 DNA isimli DNA'yı filtresine hapseden kolonlu tüplere aktarıldı.
- Elde edilen pelete 250µl etanol eklenerek homojenize edildi.
- Homojen karışım yeni filtreli kolonlara aktarıldı.
- A9000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Supernatant ortamdan uzaklaştırıldı.
- "500 µl GT Solution" eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi.
- 1 dakika 9000xg'de santrifüj edildi.
- Aynı işlem "500µl NT Solution" eklenerek tekrar edildi.
- 9000xg'de 2 dakika santrifuj edildi. Supernetant uzaklaştırıldı.
- RNA'yı barındıran filtreli kolon yeni bir 1.5 ml'lik santrifük tüpüne yerleştirildi.
- "50 µl RNA Free Water" eklendi.
- Oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi.
- 2 dakika 9000xg'de santrifüj eidldi.
- RNA örekleri elde edildi.

3.2.4 cDNA Dönüşümü

Elde edilen total RNA örneklerinden cDNA dönüşümü için "OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit" kullanıldı. Firma tarafından sağlanan protokol kurallara uygun şekilde gerçekleştirildi.

Aşağıdaki tablolardaki karışım ve reaksiyon koşullarına göre elde edilen cDNA örnekleri -20^{o}C' de saklandı.

Solüsyon	Miktar
Total RNA	2 µl
5x RT Tamponu	4 µl
dNTP	1 µl
Primer	1 µl
OnceScript Plus Rtase	1 µl
Distile Su	20 µl'ye kadar

Tablo 3.2 cDA sentezi için kullanılan solüsyonlar ve miktarları

T°C	Zaman
55°C	40 Dakika
85°C	5 Dakika
25°C	10 Dakika

Tablo 3.3 cDNA reaksiyon koşulları

3.2.5 Gen Ekspresyon Deneyleri İçin Primer Tasarımı

Biyoinformatik analizler sonucu belirlenen *PEX16* ve *DHRS4* genlerinin ekspresyon profilini incelemek için gerekli primer tasarımları internette kullanıma açık olan Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) programları ile tarafımızca tasarlanmıştır (Tablo 3.4).

PEX16 Forward Primer	5' ACCATCCTGCTGCTCTACTA '3
PEX16 Reverse Primer	3' CAGGTGGGCAAGTAATCCAT '5
DHRS4 Forward Primer	5' TCTCCAATGCTGCTGTCAAC '3
DHRS4 Reverse Primer	3' AGTCCAGGTGCTAGGCAGTT '5
ACTB Forward Primer	5′-TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT-3′
ACTB Reverse Primer	5′-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA-3′

Tablo 3.4 Ekspresyon profilleri incelenecek olan *PEX16* ve *DHRS4* genlerine ait primerlerin tasarımları

3.2.6 *DHRS4* ve *PEX16* Ekspresyon Seviyelerinin QRT-PCR Yöntemi ile Tespit Edilmesi

Hücre hatlarından elde edilen RNA örneklerinin cDNA dönüşümü sonrasında *DHRS4* ve *PEX16* genlerinin ekspresyon durumları SYBR Green tabanlı kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile belirlenmiştir. SYBR Green boyasının

kullanılmasının temel nedeni ise DNA'ya bağlanarak belirli bir sınır değerinden sonra ışıma yapabilmesidir. Reaksiyon koşulları içerisinde belirgin bir süre zarfında bu boya ışıma yaparak Ct değerlerini oluşturur. Bu Ct değerleri ile ekspresyon seviyelerinin relatif olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

Ekspresyon seviyeleri: HUVEC ve HepG2 hücrelerinden elde edilen *PEX16* ve *DHRS4* gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. cDNA örnekleri qRT-PCR için gerekli reaksiyon karışımlarıyla homojenize edilerek kuyu başına 20 µl olacak şekilde 96 kuyuluk plakalara dağıtılmıştır. Ardından plaka yüzeyi kapatılarak reaksiyon gen için belirlenen spesifik sıcaklıkta yürütülmüştür. QRT-PCR için kullanılan reaksiyon karışımları ve koşulları aşağıdaki gibidir;

Reaksiyon Solüsyonları	Örnek Başın Hacim
BlasTaqTM 2X qPCR MM	10
Forward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
dH2O	6
cDNA	3

Tablo 3.5 Ekspresyon deneyleri için gerekli QRT-PCR reaksiyon solüsyonları

PCR Aşamaları	**T (°C)**	**Zaman**
Enzim Reaksiyonu	95°C	3 Dakika
Denaturasyon	95°C	15 Saniye
Uzama/Bağlanma(40 Döngü)	57°C	27 Saniye
Erime Eğrisi	95°C	15 Saniye
	60°C	1 Dakika
	95°C	15 Saniye
Soğuma	40°C	30 Saniye

Tablo 3.6 Ekspresyon deneyleri için gerekli QRT-PCR reaksiyon koşulları

3.2.7 Veri Analizi

Elde edilen bulguların birbiriyle olan ilişkisini ortaya koymak için, GraphPad 8.0 (Dotmatics, USA) programı kullanılmıştır. Ekspresyon seviyelerinin gruplar arasında incelenmesi için paired t-testi kullanılmıştır. $p \leq 0,05$ istatistiksel anlamlılık değeri olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Biyoinformatik Analizlerle Genlerin Tayin Edilmesinin Sonuçları

Veri setleri R programı ile analiz edildikten sonra elde edilen veriler P değeri($p<0.05$) ve LogFC değerlerine göre listelenmiştir. LogFC değerinin sıfırın altında olması gen ekspresyonunun o katsayıda azaldığını gösterirken, sıfırın üzerinde olması da gen ekspresyonunun o kadar arttığını göstermektedir. Bizim yaptığımız analizler sonucunda PEX16 için; LogFC değeri 0,40 (p=0,026) olarak elde edilmiştir. Bu sonuç ekspesyonda 0,40 kat artış meydana geleceğini göstermktedir. DHRS4 geni için ise; LogFC değeri 0,51 (p=0,026) olarak elde edilmiştir. Bu sonuç ekspesyonda 0,51 kat artış meydana geleceğini göstermktedir.

4.2 Real Time PCR ile Tespit Edilen Ekspresyon Seviyelerinin Sonuçları

HUVEC ve HepG2 hücre hatlarından elde edilen 5 farklı pasajdan elde edilen hücrelere ait *DHRS4, PEX16* genlerinin kantitatif ekspresyon seviyeleri 3 deney tekrarı olmak üzere SYBR Green kullanılarak qRT-PCR yöntemi aracılığıyla incelendi. Deney sonrası analiz Light Cycler 480 yazılımı içerisinde yer alan Temel Relatif Ölçüm (Basic Relative Quantification) programı ile gerçekleştirildi. Referans (*ACTB*) ve hedef genlere (*DHRS4, PEX16*) ait Ct değerleri $2^{\Delta Ct}$ yöntemi ile normalize edildikten sonra tümör ve normal hücre hatlarının birbirine karşı relatif ekspresyon seviyelerini belirlemek için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metotu kullanılarak katlanma değişimi (Fold Change) grafiği oluşturuldu. Katsayı 1 olarak kabul edilip, katsayı<1 ekspresyondaki azalışı, katsayı>1 ekspresyondaki artışı ve katsayı=1 ekspresyonda bir değişiklik olmadığı şeklinde belirtildi.

HEPG2 ve HUVEC hücre hatlarına ait örnekler karşılaştırıldığında; *DHRS4* geni HUVEC örneklerinin %40 (2/5)'ında ekspresyon azalması gözlemlenirken, %60 (3/5)'ında ekspresyon artışı saptanmıştır (Şekil 4.1). HEPG2 hücre hattının tüm örneklerinde ise *DHRS4* gen ekspresyonunda artış gözlenmiştir. HUVEC ve HEPG2 ekspresyon sonuçları karşılaştırıldığında *DHRS4* artışının HepG2 hücrelerinde anlamlı düzeyde daha fazla arttığı tespit edilmiştir (p=0.038) (Şekil 4.2).

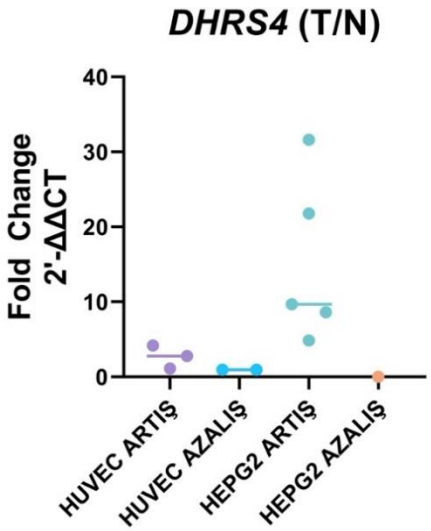
HEPG2 ve HUVEC hücre hatlarına ait örnekler karşılaştırdığımızda; *PEX16* geni HUVEC örneklerinin %60 (3/5)'inde ekspresyon artışı, %40 (2/5)'ında ekspresyon azalması

saptanmıştır (Şekil 4.3). HEPG2 hücre hattının tüm örneklerinde ise *PEX16* gen ekspresyonunda artış gözlenmiştir. HUVEC ve HEPG2 ekspresyon sonuçları karşılaştırıldığında *PEX16*'nın HepG2'de anlamlı düzeyde daha fazla arttığı tespit edilmiştir (p= 0.0021) (Şekil 4.4).

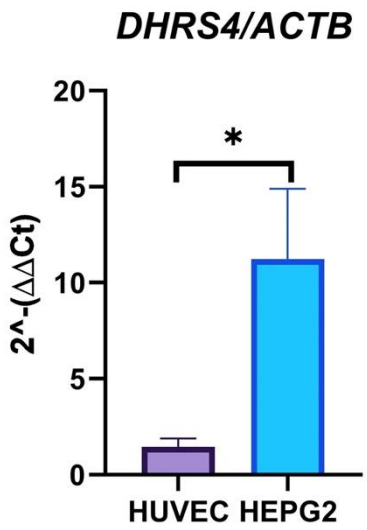
İki grup içinde *DHRS4* ve *PEX16* genlerinin kat değişimi incelendiğinde her iki geninde tümör hücrelerinde (HEPG2) anlamlı şekilde arttığı Tablo 4.1'de görülmektedir.

	HUVEC		HEPG2	
	Ortalama	Standart Hata	Ortalama	Standart Hata
PEX16	1,092	0,2272	7,48	1,5
DHRS4	1,45	0,4483	11,23	3,664

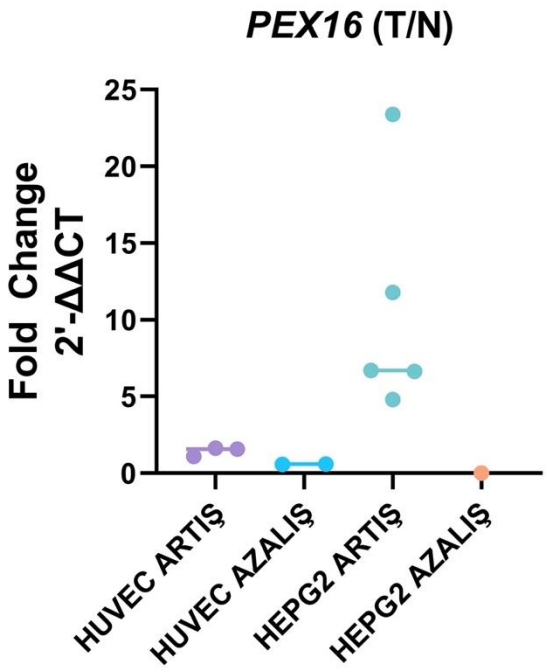
Tablo 4.1 İki grup için kat değişimlerinin karşılaştırılması (Ort±SE) (Şekil 4.5).



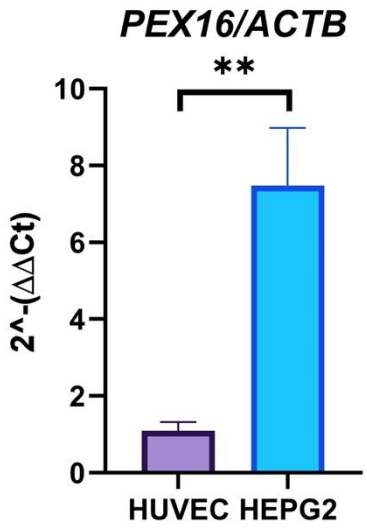
Şekil 4.1 *DHRS4* geni için Tümör ve sağlıklı kontrole ait örneklerinin karşılaştırılması.



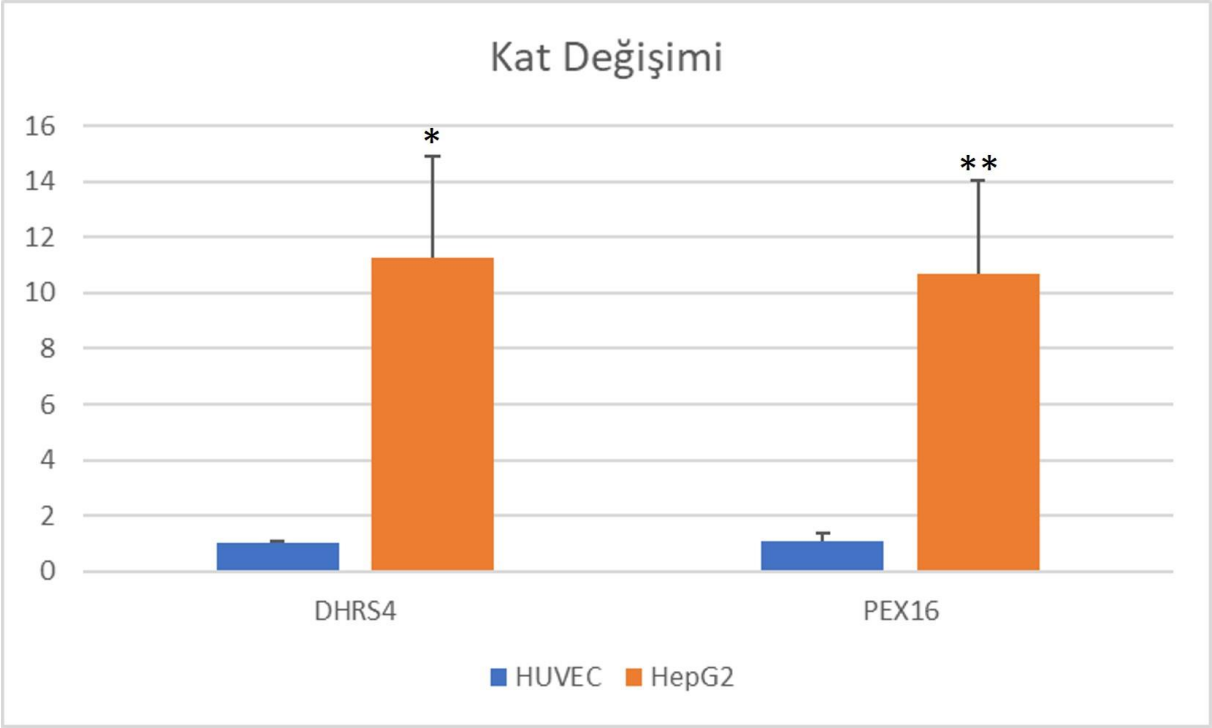
Şekil 4.2 İki grup arasında *DHRS4*'nin karşılaştırılması(*; p= 0,038).



Şekil 4.3 *PEX16* geni için Tümör ve sağlıklı kontrole ait örneklerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.4 İki grup arasında *PEX16*'nIn karşılaştırılması (**; p= 0,0021).



Şekil 4.5 İki grup arasında *PEX16* ve *DHRS4* genlerinin kat değişiminin karşılaştırılması (*; p= 0,038)/ (**; p= 0,0021)

5. TARTIŞMA

Peroksizomlar, lipid metabolizması, redoks homeostazı ve detoksifikasyon gibi karmaşık metabolik yolların anahtar rol oynayan organelleridir. Son araştırmalar, peroksizomla ilişkili genlerin prostat, meme kanseri ve lenfoma gibi çeşitli kanser türlerinin başlangıcı ve ilerlemesindeki karmaşık rollerini vurgulamaktadır[38,41].

PEX16'nın normal dokuya kıyasla tümörlü dokularda nispeten yüksek ekspresse olduğu gözlemlenmiştir. *PEX16'*nın, normal hücrelerle karşılaştırıldığında kanserde mitokondri-peroksizom füzyonuna dayalı peroksizom biyogenezini teşvik ettiği ve anormal metabolizma ile ilişkilendirilmiştir[35]. *PEX16* geninin meme kanseri dokularında normal dokulardan anlamlı derecede farklı bir şekilde düzenlendiği bulunmuştur[36]. Peroksizom yağ asidi oksidasyonu metabolizmasında rol oynamaktadır. Bu metabolik reaksiyon sonucu ROS oluşmaktadır. B hücreli lenfoma hastalarında ROS aracılı apoptozu teşvik ettiği düşünülen ve başka bir HDAC inhibitörü olan panobinostat'a dirençli olanlarda, peroksizom gen transkriptlerinin, *FAR1, FAR2* ve *CAT*'in ekspresyonunun da arttığı gözlenmiştir; bu bulguda peroksizomların ROS aracılı kanser hücre ölümü karşısında dirençle ilişkili olduğunu desteklemektedir. Bu nedenle, peroksizom aracılı antioksidan sistemin, oksidatif stresi artırmak için kemoterapi ile birlikte bir kanser hedefi olma potansiyeli vardır [40]. Yapılan diğer bir çalışmada ise yine peroksizom ilişkili genlerden olan Peroksizom Proliferatör Aktivatör Reseptörü Gamma (PPARγ)'nın benign prostat bezlerinde güçlü şekilde ifade edildiği gözlemlenmiştir ve her bir prostatektomi örneğinde en az bir pozitif benign bez bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu durum; PPARγ'nin prostat kanserinde bir onkogen olarak işlev gördüğü fikrini desteklemektedir[41].

Yapılan çalışmalarda *DHRS4* geninin prostat kanseri hastalarında normal dokulardan daha yüksek düzeyde ekspresyon gösterdiği bulunmuştur. Bu durum, *DHRS4*'ün prostat kanserinde olası bir rolü olduğunu düşündürmektedir [37]. *DHRS4* geninin meme kanseri hücrelerinde de normal dokulardan daha yüksek seviyelerde bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, genin meme kanserinde potansiyel bir biyolojik rol oynayabileceğini işaret etmektedir[38]. *DHRS4* geninin HCC'deki rolü hakkında mekanistik anlayışımız sınırlıdır ve bu konuda daha fazla deneysel çalışma gerekmektedir. DHRS gen ailesindeki diğer genlerle ilgili de kanser ile

ilişkilerini anlamak amacıyla bazı çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar da *DHRS2* bazı kanserlerde tümör baskılayıcı bir gen olarak değerlendirilmiştir. Özefagus skuamöz hücreli karsinomada, *DHRS2* reaktif oksijen türlerini azaltabilir, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (oksitlenmiş/reduktif) seviyelerini düşürebilir, *p53* stabilitesini artırabilir ve Rb fosforilasyonunu azaltabilir, böylece özefagus skuamöz hücreli karsinom gelişimini ve ilerlemesini baskılayabilir denilmiştir [42]. Kolorektal kanser de *DHRS9* geni için primer kolorektal kanser dokuları ile normal dokular karşılaştırılmış ve transkripsiyonel hem de translasyonel olarak azaldığını bildirilmiştir. Buna ek olarak, *DHRS9* ifadesindeki azalma; lenf nodu metastazı, ileri tümör–nod–metastaz evresi, hastalık nüksü ve yaşam durumu gibi çeşitli önemli klinikopatolojik parametrelerle anlamlı şekilde ilişkilendirilmiştir. Tüm bu verilere dayanarak *DHRS9* geninin kolorektal kanser için prognostik biyomarker olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür[43].

Peroksizom ile ilişkili genler üzerine yapılan bir takım çalışmalar bulunmaktadır. Tez çalışmamızda da bu genlerden *PEX16* ve *DHRS4* ile çalışılmıştır. Literatürde çalıştığımız genler ve bu genlerin aileleri içinde bulunan genler ile kanser arasındaki ilişkiyi araştıran pek çok çalışma olmasına rağmen hepatosllüler karsinom ile ilişkisini net veya dolaylı yoldan ortaya koyan bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan çalışmamızın bilimsel anlamda litaretüre katkı sağlama potansiyeli bulunmaktadır.

Tez çalışmamız kapsamında Geodatasetler incelenmiş ve R programı aracılığı ile en çok ifade edilen genlerin *PEX16* ve *DHRS4* genleri olduğu tespit edilmiştir. Ardından HepG2 ve HUVEC peroksizom ilişkili genler olan PEX16 ve DHRS4 genlerinin ekspresyonu incelenmiştir. HUVEC örneklerinin %60'ında DHRS4 geni ekspresyon artışı saptanırken, HepG2 hücrelerinde DHRS4 artışının anlamlı düzeyde daha fazla olduğu tespit edilmiştir. HUVEC örneklerinin %60'ında PEX16 geni ekspresyon artışı saptanırken, HepG2 hücrelerinde PEX16'nın anlamlı düzeyde daha fazla arttığı tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; elde ettiğimiz veriler in vivo ve in silico veriler birbiri ile uyumlu sonuç vermiştir ancak bu genlerin biyomarker potansiyelini anlamak için örnek sayısının arttırılarak daha fazla veri toplanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Llovet, J. M., Kelley, R. K., & Villanueva, A. (2021). Hepatocellular carcinoma. New England Journal of Medicine, 384(20), 1985-2002.
2. Villanueva, A. (2019). Hepatocellular carcinoma. New England Journal of Medicine, 380(15), 1450-1462.
3. Waterham, H. R., & Ebberink, M. S. (2012). Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1822(9), 1430-1441.
4. Steinberg, S. J., Dodt, G., Raymond, G. V., & Braverman, N. E. (2006). Peroxisome biogenesis disorders. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1763(12), 1733-1748.
5. Ferdinandusse, S., Denis, S., Faust, P. L., & Wanders, R. J. (2009). Bile acids: the role of peroxisomes. Journal of Lipid Research, 50(11), 2139-2147.
6. Smith, J. J., Aitchison, J. D., & Peroxisome Biogenesis Disorders Consortium. (2013). Peroxisomes take shape. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 14(12), 803-817.
7. Matsuzono, Y., & Fujiki, Y. (2008). In vitro transport of membrane proteins to peroxisomes by shuttling receptor Pex19p. The Journal of Biological Chemistry, 283(2), 1284-1292.
8. Fujiki Y, Yagita Y, Matsuzaki T. (2012). Peroxisome biogenesis disorders: molecular basis for impaired peroxisomal membrane assembly: in metabolic functions and biogenesis of peroxisomes in health and disease. Biochim Biophys Acta. 1822(9):1337-42.
9. Schrader, M., Costello, J. L., & Godinho, L. F. (2016). Islinger M. Peroxisome-mitochondria interplay and disease. Journal of Inherited Metabolic Disease, 39(4), 557-563.
10. Schrader, M., Bonekamp, N. A., Islinger, M., & Fichter, E. (2012). Peroxisomal dynamics. Trends in Cell Biology, 22(10), 522-530.
11. Sugiura, A., & Mattie, S. (2021). Dynamics of the peroxisomal membrane. Trends in Cell Biology, 31(3), 218-231.
12. Waterham, H. R., & Ebberink, M. S. (2012). Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1822(9), 1430-1441.

13. Steinberg, S. J., Dodt, G., & Raymond, G. V. (2006). Peroxisome biogenesis disorders. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 1763(12), 1733-1748.
14. Li, L., Zeng, T. T., Zhang, Y., Chen, S. Y., & Wang, X. H. (2016). Role of *PEX16* in the progression of hepatocellular carcinoma. Oncology Reports, 36(4), 2233-2240.
15. Pisonero-Vaquero, S., Martínez-Botas, J., & Fernández-Hernando, C. (2018). The Intersection of Lipid Metabolism and the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. Cancers, 10(9), 288.
16. Li, X., Li, Y., Zhang, L., Liu, Y., Zhou, L., & Song, L. (2017). *PEX16*: A putative target for anticancer therapy. Medical Hypotheses, 104, 119-122.
17. Horie, T., & Ohdan, H. (2019). The role of peroxisome proliferator-activated receptors in the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. Annals of Translational Medicine, 7(Suppl 1), S11.
18. Qin, W., & Zhang, Y. (2020). Lipid metabolism in atherosclerosis. Clinica Chimica Acta, 502, 178-187.
19. Mark, M., & Ghyselinck, N. B. (2006). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. Endocrine Reviews, 27(4), 485-526.
20. Cimino, P. J., Huang, L., Du, L., & Wu, Y. (2012). PPARγ, PTEN, and the fight against cancer. PPAR Research, 2012, 1-11.
21. Staels, B., & Rubenstrunk, A. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor α ligands for the treatment of type 2 diabetes. Expert Opinion on Investigational Drugs, 16(10), 1231-1248.
22. Nomura, M., & Hata, S. (2018). Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 25(3), 239-246.
23. Cazanave, S. C., & Elmi, N. A. (2018). Acetyl-CoA carboxylase and the metabolism of metformin. The FASEB Journal, 32(3), 1561-1568.
24. Gallagher, E. J., & Leroith, D. (2011). Obesity and diabetes: the increased risk of cancer and cancer-related mortality. Physiology, 26(4), 41-51.
25. Hirohashi S, Blum HE, Ishak KG, Deugnier Y, Kojiro M, Laurent Puig P, Wanless IR, Fischer HP, Theise ND, Sakamoto M, Tsukuma H. Hepatocellular carcinoma in World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System IARCPress Lyon, 2000
26. Warburg O. On the origin of cancer cells. Science. 1956;123(3191):309-314.

27. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2012;1822(9):1363-1373.
28. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. Nature Reviews Cancer. 2007;7(10):763-777.
29. Wanders RJA, Waterham HR. Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited. Annual Review of Biochemistry. 2006;75:295-332.
30. A. Aranovich, R. Hua, A.D. Rutenberg, P.K. Kim, *PEX16* contributes to peroxisome maintenance by constantly trafficking PEX3 via the ER, J. Cell Sci. 127 (2014) 3675–3686.
31. M.S. Dahabieh, Z. Ha, E. Di Pietro, J.N. Nichol, A.M. Bolt, C. Goncalves, D. Dupere-Richer, F. Pettersson, K.K. Mann, N.E. Braverman, S.V. Del Rincon, W.H. Miller Jr., Peroxisomes protect lymphoma cells from HDAC inhibitor-mediated apoptosis, Cell Death Differ. 24 (2017) 1912–1924.
32. Ferdinandusse, S., Denis, S., & Ijlst, L. (2018). Clinical, biochemical, and genetic aspects and peroxisomal beta-oxidation: A tribute to professor Hans R. Waterham. Advances in Experimental Medicine and Biology, 53-68.
33. Huang, W., Li, Y., Lv, Z., & Yang, W. (2014). *DHRS4* regulates estrogen receptor α function in breast cancer. Biochemical and Biophysical Research Communications, 450(1), 107-112.
34. Wu, X., Xu, K., Zhang, L., Deng, X., Wang, P., Yang, J., ... & Zhou, X. (2020). *DHRS4* is downregulated in breast cancer cells and inhibits cell proliferation and invasion. Biochemical and Biophysical Research Communications, 522(3), 649-655.
35. Yan, B., Xie, S., Liu, F., Li, X., Chen, J., Gan, M., ... & Wang, L. (2018). Regulation of glycolysis by PIM kinases through translational modulation of HIF-1α. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1870*(1), 76-87.
36. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(9):1363-73.
37. Kropotova ES, Zinovieva OL, Zyryanova AF, Dybovaya VI, Prasolov VS, Beresten SF. Downregulation of human mir-629-5p in prostate cancer and its relevance to clinicopathological features. *Oncol Res Treat*. 2014;37(12):6709-19.

38. Petraki C, Vaslamatzis M, Petraki K, et al. Analysis of dehydroepiandrosterone sulfate and its relation to breast cancer phenotype and genotype. *Breast Cancer Res Treat*.2009;115(3):573-82.
39. *Home - GEO DataSets - NCBI*. (n.d.). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds
40. Kim, J. (2020). Peroxisome metabolism in cancer. *Cells*, *9*(7), 1692. https://doi.org/10.3390/cells9071692
41. Elix, C. C., Salgia, M. M., Otto-Duessel, M., Copeland, B. T., Yoo, C., Lee, M., Tew, B. Y., Ann, D., Pal, S. K., & Jones, J. O. (2019). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma controls prostate cancer cell growth through AR-dependent and independent mechanisms. *The Prostate*, *80*(2), 162–172. https://doi.org/10.1002/pros.23928
42. Zhou Y, Wang L, Ban X et al. DHRS2 inhibits cell growth and motility in esophageal squamous cell carcinoma. Oncogene 37(8), 1086–1094 (2018).
43. Hu, L., Chen, H., Han, T., Yang, G., Feng, D., Qi, C., Gong, H., Zhai, Y., Cai, Q., & Gao, C. (2015). Downregulation of DHRS9 expression in colorectal cancer tissues and its prognostic significance. Tumor Biology, 37(1), 837–845. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3880-6

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA PEROKSİZOM İLİŞKİLİ GENLERİN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%7	%5	%5	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Eroglu, Nazikter Betul. "Kitozan/Pai-1 Sirna nanopleksilerinin hepatoselluler Karsinoma hucre hatlarinda Anti- Anjiyogenik Ve Anti-Karsinojenik Etkilerinin arastirilmasi", Marmara Universitesi (Turkey), 2020 Yayın	%1
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
5	www.frontiersin.org İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
7	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<%1

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

☐ **Etik Kurul izni gerekmektedir.**

☒ **Etik Kurul izni gerekmemektedir.**

Sema ŞABANÇELEBİ
(İmza)

KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

☐ **Kurum izni gerekmektedir.**

☒ **Kurum izni gerekmemektedir.**

Sema ŞABANÇELEBİ
(İmza)

ÖZGEÇMİŞ