

Sıçanlarda Karaciğer Rejenerasyonunda Ubiquitin Sinyal Yolağının Rolü

Ayşe Özmen Yaylacı

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 2020

The Role of Ubiquitin Signaling Pathway on Liver Regeneration in Rats

Ayşe Özmen Yaylacı

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biology

June 2020

Sıçanlarda Karaciğer Rejenerasyonunda Ubiquitin Sinyal Yolağının Rolü

Ayşe Özmen Yaylacı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Mediha Canbek

İkinci Danışman: Prof. Dr. Didem Turgut Coşan

Bu tez Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Koordinasyonu Biriminin “201719040” no’lu projesi çerçevesinde desteklenmiştir

Haziran 2020

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Mediha Canbek danışmanlığında hazırlamış olduğum “Sıçanlarda Karaciğer Rejenerasyonunda Ubiquitin Sinyal Yolağının Rolü” başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim.

Bu çalışmanın hayvan deneyleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)'nun 549 karar numarası ile 29.09.2016 tarihli izni ile gerçekleştirilmiştir. 18/06/2020

Ayşe Özmen Yaylacı

İmza

ÖZET

Karaciğer rejenerasyonu birçok stimulatör ve inhibitör uyarılar tarafından düzenlenerek üç safhada incelenmektedir. G₀ fazı, hücrelerin büyüme ve transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle G₁ fazına geçtiği rejenerasyonun başlangıç fazını oluşturur. Geçiş fazı, DNA replikasyonu ve mitoz olaylarını içerir. Bitiş fazı, bölünmenin durduğu karaciğer dokusunun şekillendiği fazdır. Rejenerasyon sürecinde meydana gelen olaylar oldukça karmaşıktır. Ubikütin sinyal yolağı, karaciğer rejenerasyonu sürecinde rol oynamakla birlikte; moleküler etki mekanizmaları henüz açık değildir.

Ubikütin sinyal yolağı bilinenin aksine sadece proteinlerin yıkımında değil aynı zamanda da DNA hasarı tamiri, hücre döngüsü, mitofaji, mitokondriyal füzyon gibi mekanizmalarla da ilişkili büyük bir yolaktır ve karaciğer rejenerasyonunda rol oynadığı bilinen bazı yollarla da bağlantılıdır.

Çalışmada deney grupları 3 ana grup (Kontrol, Sham, PH) şeklinde oluşturuldu. Sham ve PH grupları 6 alt grup (0, 6, 12, 24, 48, 72 saat) içermektedir. Deney sonunda ki67 immunohistokimyasal işaretlenmeyle rejenerasyon oranları hesaplandı. RT-PCR array ve Western blot analizleri (BRCA1, BARD1, UBE2T, APC2) gerçekleştirildi.

Elde edilen verilerde karaciğer rejenerasyonunun farklı saatlerine göre ubikütin yolağının hücre döngüsü (ANAPC2, ANAPC11, Cdc20), DNA onarımı (BRCA1, BRCA2, UBE2T, UBE2C), mitokondriyal füzyon (Mull1), apoptoz (Tp53) ile ilişkili olduğu tespit edildi. Mekanizması açık olmayan bazı genlerde benzer ekspresyonlar görüldü.

Sonuç olarak; Ubikütin yolağıyla bağlantılı olduğu bilinen DNA onarımı (Fankoni yolağı, homolog rekombinasyon), hücre döngüsü, apoptoz mekanizmalarının, karaciğer rejenerasyonu sürecinde rol oynadığı gösterilmiştir. Mitokondriyal füzyonun karaciğer rejenerasyonu ile ilişkili olabileceği ilk kez ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer Rejenerasyonu, Ubikütin, DNA onarımı, Mitokondri, RT-PCR array

SUMMARY

Liver regeneration is considered to be regulated by many stimulators and inhibitory stimuli and is studied in three stages. The G0 phase is initial phase of regeneration in which cells go to the G1 phase, under the influence of growth and transcription factors. Cells stop dividing in termination phase and liver tissue begins to take shape. The events that occur during the regeneration process are quite complicated. Ubiquitin signaling pathway plays a role in liver regeneration process but molecular mechanisms were not yet clear.

Ubiquitin signaling is a major pathway which does not only play role in protein degradation, but also it regulates DNA damage repair, cell cycle, autophagy, mitochondrial fusion. And It is also linked to some pathways known to play role in liver regeneration.

In our study, experimental groups were designed as 3 main groups (Control, Sham, PH). Sham and PH groups contain 6 subgroups (0, 6, 12, 24, 48, 72 hours after PH). At the end of the experiment, regeneration rates were calculated; ki67 immunohistochemistry, RT-PCR-array and Western blot analyzes (BRCA1, BARD1, UBE2T, APC2) were performed.

In the obtained data according to the hours of regeneration, ubiquitin signaling pathway was found to be associated with the cell cycle (ANAPC2, ANAPC11, Cdc20), DNA repair (BRCA1, BRCA2, UBE2T, UBE2C), mitokondrial fission (Mul1), Apoptosis (Tp53) in the liver regeneration model.

As a result; DNA repair (Fankoni pathway, homologous recombination), cell cycle, apoptosis mechanisms which is known related to the ubikutin pathway, have been shown to play role in the liver regeneration process. It has been determined for the first time that mitochondrial fission may be associated with liver regeneration.

Keywords: liver regeneration, Ubiquitin, DNA repair, mitochondria, RT-PCR array

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı 201719040 kodlu ve “Sıçanlarda Karaciğer Rejenerasyonunda Ubiquitin Sinyal Yolağının Rolü” başlıklı bilimsel araştırma projesi olarak destekleyen ESOGÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu’na;

Doktora eğitimim için vermiş olduğu destek ve imkânlar için Hitit Üniversitesi Rektörlüğü’ne;

Lisansüstü eğitimim boyunca bana rehberlik eden, benden desteklerini esirgemeyen ve yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Mediha Canbek ve ikinci danışmanım Prof. Dr. Didem Turgut Coşan hocama;

Tez çalışmalarım sırasında tecrübesini, yardımlarını, hoşgörü ve ilgisini esirgemeyen hocalarım Doç. Dr. Filiz Susuz Alanyalı ve Prof. Dr. Hakan Şentürk’e; bilgi ve tecrübeleriyle her zaman desteğini yanımda hissettiğim Doç. Dr. Mustafa Uyanoğlu’na ve Prof. Dr. Gökhan Bayramoğlu hocalarıma; tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Burak Berber’e;

Tezimin deneyleri sırasında zaman zaman bana yardım eden öğrencilerim Neda Hamid, Kübra Koç, Akın Karahasan’a;

Canım oğlum Çınar varlığın ile bana güç verdiğin için ve her daim benim yanımda olan, hayat arkadaşım Ömer Koray Yaylacı’ya gösterdiği büyük sabır ve destekleri için;

Beni yetiştiren, bugünlere getiren ve her zaman yanımda olan canım anneme ve babama;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	viiix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	4
3. GENEL BİLGİLER	7
3.1. Karaciğerin Yapısı.....	7
3.1.1. Sıçan karaciğeri yapısı.....	9
3.2. %70 Parsiyal Hepatektomi Modeli.....	10
3.3. Karaciğer Rejenerasyonu.....	11
3.3.1. Başlangıç (Priming) Faz (PH sonra 0.5-4 saat)	11
3.3.2. Geçiş (responsive) fazı	12
3.3.2.1. <u>Hücre döngüsü</u>	13
3.3.3. Bitiş (termination) fazı (PH sonrası 72-168 saat)	16
3.4. Ubikutin Sinyal Yolağı	17
3.4.1. Ubikutin kodu	18
3.4.2. Proteinlerin ubikutin ile işaretlenmesi (Ubikütinasyon).....	21
3.4.3. Proteinlerin 26S proteozomlar ile degradasyonu.....	22
3.5. E3 Ubikutin Ligazlar	23

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.5.1. Cullin-RING E3 ligazlar (CRL)	25
3.5.1.1. <u>SKP1-CUL1-Fbox (SCF) kompleksleri</u>	27
3.5.1.2. <u>Anaphase Promoting Complex (APC/C Kompleksi, Siklozom)</u>	30
3.5.1.3. <u>BRCA1/BARD1 E3 ligaz kompleksi</u>	32
3.5.1.4. <u>Diğer RING E3 ligazlar</u>	32
3.5.2. HECT E3 ligazlar	34
3.5.3. RBR E3 ligazlar	36
3.6. E2 Ubikutin Konjuge Edici Enzimler.....	38
3.7. E1 Enzimleri	41
3.8. Ubikutin Yolağının İlişkili Olduğu Hücrel Mekanizmalar	42
3.8.1. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan E3 ubikutin ligazlar.....	42
3.8.2. Sentrozom duplikasyonu	47
3.8.3. DNA onarım mekanizmaları.....	49
3.8.3.1. <u>Fankoni anemi yolağı (DNA çapraz bağ onarımı)</u>	49
3.8.3.2. <u>Translezyon sentezi ile DNA hasarının baypas edilmesi</u>	52
3.8.3.3. <u>Homolog rekombinasyon ile DNA tamiri</u>	54
3.8.4. Mitokondriyal dinamikler (mitokondriyal fizyon/ füzyon)	56
3.8.5. Mitofaji	57
4. MATERYAL VE YÖNTEM	60
4.1. Deney Grupları	60
4.2. Anestezi ve Hepatektomi İşlemi	61
4.3. Karaciğer Rejenerasyon Oranı.....	62
4.4. ki67 İmmunohistokimyasal Boyama	62
4.5. RT-PCR Array Analizleri	63

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.5.1. Dokudan RNA izolasyonu	65
4.5.2. İzole edilen RNA'nın cDNA'ya çevrilmesi.....	66
4.5.3. RT-PCR Array analizi	66
4.5.3.1. <u>RT-PCR Array primer plate nin hazırlanışı</u>	66
4.5.3.2. <u>Reaksiyon Plate'nin hazırlanışı</u>	67
4.5.3.3. <u>RT-PCR verilerinin hesaplanması</u>	68
4.5.4. Western blot analizleri	69
4.5.4.1. <u>Protein izolasyonu</u>	69
4.5.4.2. <u>SDS jel elektroforezi ile proteinlerin ayrıştırılması</u>	70
4.5.4.3. <u>Proteinlerin jelden membrana aktarılması ve antikorlar ile muamelesi</u>	71
4.5.4.4. <u>Görüntüleme ve analiz</u>	73
4.6. İstatistiksel Değerlendirme	73
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	74
5.1. Karaciğer Rejenerasyon Oranı.....	74
5.2. ki67 İmmunohistokimya Analizi	75
5.3. PH Modeline Uygun Referans Genlerin Belirlenmesi	82
5.4. RT-PCR Array Gen İfadesi Analiz Sonuçları	83
5.4.1. Karaciğer rejenerasyonunda ubikutin yolağı aracılığı ile hücre düzenlenmesinde rol oynayan olası mekanizmalar.....	95
5.4.2. Karaciğer rejenerasyonunda ubikutin yolağı aracılığı ile DNA onarımının düzenlenmesinde rol oynayan olası mekanizmalar.....	106
5.4.3. Karaciğer rejenerasyonunda p53 ve p53'ün düzenlenmesinde rol oynayan olası mekanizmalar	117
5.4.4. Karaciğer rejenerasyonunda ubikutin yolağı aracılı mitokondriyal fizyon ve mitofajinin olası rolü.....	119

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5.4.5. İfadesi farklılık gösteren diğer genler ve karaciğer rejenerasyonu üzerine olası rolleri	125
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	136
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	139
EK AÇIKLAMALAR	163
Ek Açıklamalar- A. Etik Kurul Raporu	163
ÖZGEÇMİŞ	166

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Karaciğerin yapısı.....	8
3.2. Sıçan karaciğeri yapısı.....	10
3.3. A. Sıçan karaciğeri genel görünüşü B. %70 partial hepatektomi modeli ile alınan median ve sol loblar.....	10
3.4. Hücre döngüsü.....	13
3.5. Karaciğer rejenerasyonunda hücre döngüsü.....	15
3.6. Ubikutin molekülü üzerindeki yedi Lys ve bir Met modifikasyon bölgeleri	19
3.7. Ubikutin modifikasyonları.....	19
3.8. Proteinlerin ubikutinasyon, degradasyon ve deubikutinasyon basamakları.....	22
3.9. 26S Proteozom yapısı	23
3.10. RING ve HECT E3 ligazların çalışma prensibi.....	24
3.11. A. CRL ailesinin bazı üyeleri B. CRL yapısı	26
3.12. APC/C E3 ligaz kompleksi yapısı ve alt birimleri	31
3.13 BRCA1 ve BARD1 protein yapısı.....	31
3.14. HECT E3 ligaz, Nedd4 ailesi üyeleri ve yapılarının karşılaştırılması.....	35
3.15 APC/C ^{Cdc20} ve APC/C ^{Cdh1} kompleksleri ve hücre siklusunun kontrolü	45
3.16. Hücre döngüsü inhibitörlerinden p27 ve p21'in SCF ^{skp2} E3 ligaz kompleksi tarafından degradasyonu ile hücrelerin G ₁ -S kontrol noktasından (R) geçişi mekanizması	45
3.17. Kardeş kromatitleri bir arada tutan kohezinlerin kontrolü	47
3.18. Sentrozom duplikasyonu ve BRCA1/BARD1 ilişkisi.....	48
3.19 Fankoni çekirdek kompleksi.....	51
3.20. Fankoni anemi (FA) yolağı çekirdek kompleksi ve DNA zincirlerinin çapraz bağlanması hasarının tamiri ve UBE2T.....	51
3.21. DNA hasarı toleransı. Tlz: translezyon sentezi, hatasız baypas	53
3.22. BRCA1/BARD1 E3 ligaz kompleksi ve DNA çift zincir kırığı onarımı	55
3.23. Mitokondriyal fizyon ve füzyon mekanizmaları	56
3.24. Parkin aracılı mitofaji	58

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Liyofilize primerlerin RT-PCR analizleri için hazırlanışı.....	67
5.1. Parsiyal Hepatektomi Gruplarına ait karaciğer rejenerasyon oranları.....	74
5.2. Karaciğer kesitlerinde Ki67 immunohistokimya boyama. Kontrol Grubu	77
5.3. Karaciğer kesitlerinde Ki67 immunohistokimya boyama	77
5.4. Karaciğer kesitlerinde Ki67 immunohistokimya boyama	78
5.5. Karaciğer kesitlerinde Ki67 immunohistokimya boyama	78
5.6. Karaciğer kesitlerinde Ki67 immunohistokimya boyama	79
5.7. PH48 grubu karaciğer kesitlerinde Ki67 immunohistokimya boyama ve mitoz safhaları.	79
5.8. Karaciğer kesitlerinde Ki67 immunohistokimya boyama	80
5.9. PH72 grubu karaciğer kesitlerinde Ki67 immunohistokimya boyama ve mitoz safhaları.	80
5.10. Parsiyal hepatektomi gruplarında ki67 pozitif hücre sayısı.....	81
5.11. Genorm Analiz programı referans gen stabilitesi. En stabil referans gen sıralaması.....	83
5.12. Gruplara ait ANAPC2 gen ifadesi	98
5.13. Western blot analizlerinden elde edilen ANAPC2 proteinine ait bant görüntüleri	98
5.14. Gruplara ait ANAPC11 gen ifadesi.	99
5.15. Gruplara ait UBE2C gen ifadesi	100
5.16 Western blot analizlerinden elde edilen ANAPC2 proteinine ait bant görüntüleri.....	100
5.17. Gruplara ait Cdc20 gen ifadesi.	101
5.18. Gruplara ait UBE2T gen ifadesi.	107
5.19. Western blot analizlerinden elde edilen UBE2T proteinine ait bant görüntüleri.....	107
5.20. Gruplara ait BARD1 gen ifadesi.	109
5.21. Western blot analizlerinden elde edilen BARD1 proteinine ait bant görüntüleri	109
5.22. Gruplara ait BRCA1 gen ifadesi.....	111
5.23. Western blot analizlerinden elde edilen BRCA1 proteinine ait bant görüntüleri	111
5.26. Gruplara ait TP53 gen ifadesi	118
5.24. Gruplara ait ARIH1 gen ifadesi	120
5.25. Gruplara ait MLL1 gen ifadesi	120

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.27. Gruplara ait UBA2 gen ifadesi.	125
5.28. Gruplara ait UBA5 gen ifadesi	126
5.29. Gruplara ait UBE2J2 gen ifadesi.	128
5.30. Gruplara ait RNF180 gen ifadesi.....	129
5.31. Gruplara ait UBE2D3 gen ifadesi.....	130
5.32. Gruplara ait UBE2G1 gen ifadesi.....	131
5.33. Gruplara ait RNF40 gen ifadesi.....	132
5.34. Gruplara ait UBE2Q1 gen ifadesi.....	134
5.35. Gruplara ait WWP1 gen ifadesi.....	134

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. RBR E3 ligazlar.....	37
3.2. E2 enzimleri ve biyolojik fonksiyonları	39
4.1. Deney grupları	60
4.2. RT-PCR Array Plate’de yer alan ubikutin yolağına ait genler	64
4.3. cDNA sentezi için gerekli olan reaktifler ve miktarları	66
4.4. Reaksiyon Plate’nin bir kuyusu için gerekli olan reaktifler ve miktarları.....	67
4.5. Ayırıştırma jeli hazırlanışında kullanılan malzemeler ve miktarları	70
4.6. Yığma jeli hazırlanışında kullanılan malzemeler ve miktarları.....	71
5.1. PH gruplarına ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold değerleri).....	84
5.2. Sham ve PH gruplarına ait ortalama $\Delta Ct \pm SD$ değerleri	86
5.3. Sham ve PH gruplarına ait Cdc20 ortalama $\Delta Ct \pm SD$ değerleri.....	92
5.4. ANAPC2 Western blot jel görüntülerine ait band yoğunlukları	98
5.5. UBE2C Western blot jel görüntülerine ait band yoğunlukları	100
5.6. UBE2T Western blot jel görüntülerine ait band yoğunlukları	107
5.7. BARD1 Western blot jel görüntülerine ait band yoğunlukları	109
5.8. BRCA1 Western blot jel görüntülerine ait band yoğunlukları	111

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

µl	Mikrolitre
dk	Dakika
g	Gravity
gr	Gram
kDa	kiloDalton
leu	Lösin
lys	Lizin
mA	miliamper
met	metionin
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
rpm	Revolutions Per Minute
V	Volt
W	Watt
WD	Trp-Asp

Kısaltmalar

Açıklama

ALR	Augmenter of Liver Regeneration
ERAD	ER ile ilişkili protein yıkımında
APC/C	Anaphase Promoting Complex
Arih1	Ariadne RBR E3 Ub protein ligase 1
BARD1	BRCA1-associated RING domain 1

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
BRCA1	Breast Cancer 1,
C/EBP	Ccaat/Enhancer-Binding Protein Beta
Cdc20	Cell-Division Cycle Protein-20
CDH1	Cdc20 Homologue-1
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
DDB1	Damage Binding Protein-1
Dsu	Distile Su
ECM	Ekstrasellular Matris
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EMI1	Early Mitotic İnhibitor 1
ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	Endoplazmik Retikulum Aracılı Degradasyon
FA	Fankoni Anemi
HECT	Homologous To The E6-AP Carboxyl Terminus
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IBR	İn Beetwen Ring
ID kompleks	FANCD2/FANCI Kompleksi
ILK	İntegrin-Linked Kinase
MCC	Mitotic Checkpoint Complex
MDA	Malondialdehit
MDC1	Mediator Of Dna Damage Protein 1
Mfn1	Mitofusin 1
Mfn2	Mitofusin 2
Mul1	Mitochondrial E3 Ubiquitin Protein
NF-κB	Nuclear Factor-
Opa 1	Optik Atrofi 1
PH	Partiyal Hepatektomi
PINK1	PTEN İnduced Putative Kinase 1

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Rb	Retinoblastoma
RBR	Ring Between Ring
Rb	Retinoblastoma
RING	Really Interesting New Gene
ROS	Reaktif Oksijen Radikalleri
SCF	Skp1/Cullin/F-Box
SOCS	Supressors Of Cytokine Signaling
STAT3	Signal Transducer And Activator Of Transcription-3
TGF α	Transforming Growth Factor-Alpha
TNF	Tumor Necrosis Factor
UBC	Ubikutin Konjugasyon Domaini
Ubl	Ubikutin Benzeri Modifikasyonlar
UFM1	Ubiquitin-Fold Modifier1
uPA	Urokinaz Plazminojen Aktivatörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer çok sayıda hayati fonksiyona sahip rejenerasyon kapasitesi yüksek bir organdır. Karaciğerde cerrahi müdahale sırasında veya çeşitli sebeplerden dolayı meydana gelen hasar hızlı bir rejenerasyon sürecini başlatır. Karaciğer rejenerasyon sonunda eski anatomik yapısına ulaşamaz; bunun yerine canlının metabolik faaliyetlerini karşılayabileceği kadar kalan karaciğer dokusu hacmini artırır (Abu Rmilah vd, 2019).

%70 Parsiyal hepatektomi (PH) modeli, karaciğer rejenerasyonu mekanizmalarının çalışılmasında en sık kullanılan modellerden bir tanesidir. *In vivo* hücre döngüsünün düzenlenmesi ile ilgili analizler için en iyi çalışma modellerinden birini oluşturur (Hu vd, 2014). Doku büyümesinin başlaması, ilerlemesi ve sonlanması mekanizmalarını çalışmak için güçlü bir modeldir (Kurinna ve Barton, 2011). Sıçanlarda %70 PH sonrası karaciğer rejenerasyonu 5-7 günde tamamlanır ve hücresel ve moleküler düzeyde çok sayıda kompleks rol oynar (Taub, 2004).

Karaciğer rejenerasyonunun erken fazını temsil eden PH sonrası yaklaşık 0,5-4 saatlik sürede, hemodinamik değişiklikler, ekstrasellüler matriks, büyüme faktörlerinin etkisiyle hepatositlerin büyük çoğunluğu G_0 fazından G_1 fazına geçer (Fausto, 2000; Michalopoulos, 2010). PH sonrası 6-72 saatlerinde (geçiş fazında) hücreler, G_1 -S- G_2 -M aşamalarını geçerek bölünürler (Abu Rmilah vd., 2019). PH sonrası 72-168 saatlerde doku farklılaşması, kaybolan dokunun yeniden inşasıyla rejenerasyonun sonlandırılmasını içerir (Xu vd., 2005; Kurinna ve Barton, 2011; Wang vd., 2009).

Ubikutin sinyal yolağı, hücresel mekanizmaların devamlılığı için gerekli olan protein yıkımından sorumlu temel yollardan biridir. Ancak sadece protein yıkımı değil; hücre döngüsünün kontrolü, proteinlerin taşınması, DNA hasarı tamiri, transkripsiyon, endositoz, otofaji, mitofaji, apoptoz gibi farklı hücresel mekanizmalarla ilişkili büyük bir yoldur (Ciechanover, 1998; Yau ve Rape, 2016). Bu hücresel mekanizmaların düzenlenmesini sağlayan farklılıklar, hedef proteinlere eklenen ubikutin moleküllerinin farklı sayı, modifikasyon ve çeşitlilikte bağlanmasıyla tanımlanan “ubikutin kodu” ile ilişkilidir. Ubikutinler, hedef proteinlere E1, E2 ve E3 enzimleri ile bağlanır ve proteozom aracılığı ile yıkılırlar (Zinngrebe vd., 2013).

E3 ubiquitin ligazlar, diğer enzimlere göre (E1, E2) daha çok sayıya ve çeşitliliğe sahiptir (Zinngrebe *vd.*, 2013). E3 ligazlar, ubiquitinasyon reaksiyonunun etkinlik ve substrat spesifikliğini sıkı bir şekilde kontrol etmeleri nedeniyle bu kademenin kritik bileşenleridir (Zheng ve Shabek, 2017; Oh *vd.*, 2018).

E3 ligazlardan APC/C ve SCF kompleksleri, hücre döngüsünü düzenleyen temel komplekslerdir. Bunlar hücre siklusu kontrol noktalarının aşılması, replikasyon sırasında DNA'nın sadece bir kez çoğaltılması ve kromozomların kardeş kromatidlere düzgün ayrılması gibi önemli görevler üstlenmiştir (Koepp *vd.*, 1999; Peters, 2002; Wu *vd.*, 2016).

RING E3 ligazlardan BRCA1/BARD1 heterodimeri, homolog rekombinasyon DNA tamiri ve sentrozom duplikasyonu mekanizmalarında rol oynar. DNA'daki çapraz bağların onarımından Fankoni yolağı sorumludur. Fankoni yolağı, BRCA1 ile ilişkilidir ve bir E2 enzimi olan UBE2T'e ihtiyaç duyar (Garcia-Higuera *vd.*, 2001; Cheung ve Taniguchi, 2017).

Mitofaji, hasarlı, yaşlanmış veya gereksiz mitokondrilerin seçilerek yok edilmesidir (Villa *vd.*, 2018). En iyi tanımlanmış mitofaji yolağı RBR E3 ligaz Parkin aracılığıyla gerçekleştirilen yoldur (Villa *vd.*, 2018). Parkin aracısız mitofaji yolaklarında Mul1, Atrh1, Smurf1 gibi farklı E3 ligazlar rol oynar (Montava-Garriga ve Ganley, 2019).

Mitokondriyal fizyon, mitokondrinin bölünerek hasarlı kısmının hasarsız kısmından ayrılmasıdır. Mitokondriyal füzyon ise işlevsiz mitokondrinin, fonksiyonel mitokondriyle birleşerek bileşenlerinin difüzyon aracılığı ile paylaşılmasıyla stresten kurtarılmasıdır (Youle ve Van Der Bliek, 2012). RING E3 ligaz yapısına sahip Mul1, mitokondriyal fizyon-füzyon ve mitofaji mekanizmalarının düzenlenmesinde görev alır (Peng *vd.*, 2016).

Karaciğer rejenerasyonu erken, geçiş ve bitiş fazları boyunca sürekli değişen dinamik bir hücre hareketliliği gösterir. Karaciğer rejenerasyonu boyunca çok sayıda sinyal yolu farklı zaman aralıklarında sinerjistik veya antogonist aktivite gösterir. Hücre döngüsünün gerçekleşebilmesi yine çok sayıda proteinin yıkımı ve sentezi ile ilişkilidir. Bu mekanizmaların devamlılığı, proteinlerin sentezi ve yıkımının sıkı kontrolü ile mümkündür. Ubikutin yolağı, proteinlerin yıkımından sorumlu temel bir yoldur. DNA hasarı tamiri, hücre döngüsü, mitofaji, mitokondriyal füzyon gibi mekanizmalarla da ilişkili büyük bir yoldur ve karaciğer rejenerasyonunda rol oynadığı bilinen bazı yolaklarla da bağlantılıdır. Ancak karaciğer

rejenerasyonu sürecinde, ubikutin sinyalinin rolüyle ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur ve henüz tam olarak açıklanamamıştır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, rejenerasyon sırasında proteinlerin dinamik değişimlerini sağlayan mekanizmaların açıklanmayı beklediğini belirterek (Strand vd., 2018); bu alandaki çalışma ihtiyacını ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda %70 PH sonrası karaciğer rejenerasyonunun erken ve geçiş fazını kapsayan 0-72 saatlerinde, farklı zaman noktalarında (0, 6, 12, 24, 48, 72sa), ubikutin yolağına ait 88 genin ifadeleri RT-PCR array yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu genlere ek olarak Cdc20 gen ifadesine de bakılmıştır. RT-PCR array analizleri sonucunda ifadesi anlamlı olan genler arasından seçilen dört genin (BRCA1, BARD1, UBE2T, UBE2C) protein miktarları western blot ile analiz edilmiştir. Ayrıca saatlere göre rejenerasyon oranları ki67 immunohistokimya analizleri ve karaciğer ağırlık hesapları ile ortaya konmuştur.

Çalışmamızın ubikutin ve/veya rejenerasyon ile ilişkili moleküler mekanizmaların aydınlatılması konusunda yol gösterici olacağı kanaatindeyiz.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Karaciğer rejenerasyonunun moleküler temelleri son zamanlarda yapılan çalışmalar ile aydınlatılmaya çalışılmaktadır ve rejenerasyon sürecinde sürekli değişiklik arz eden protein regülasyonu mekanizmaları henüz bilinmemektedir (Strand vd., 2018). Ubikutin yolağı proteinlerin yıkımından sorumlu olduğu gibi çok sayıda hücresel süreçlerle de ilişkilidir. %70 PH ile tetiklenen karaciğer rejenerasyonu modelinde ubikutin yolağının rolünü içeren kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Daha basit canlılar ile yapılan çalışmalar, rejenerasyon ile ubikutin yolağı ilişkisine işaret etmektedir. *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* üzerinde yapılan araştırmalar sinaptik gelişim ve aksonal rejenerasyon için ubikutin yolağının gerekli olduğuna işaret etmektedir (Tian ve Wu, 2013).

Drosophila'da HHARI etkisi incelenmiştir. HHARI, Aih1 geni tarafından kodlanan RING/HECT hibrit ubikitin E3 ligazıdır. HHARI'nın *Drosophila*'da hücresel proliferasyonu düzenlediği gösterilmiştir (Elmehdawi vd., 2013).

Saccharomyces cerevisiae da DNA onarım geni Rad6'nın DNA hasarı sonrasında ve mayoz sırasında arttığı; ancak mitoz sırasında önemli bir değişiklik göstermediği belirtilmiştir (Madura vd., 1990). Mayalardaki Rad6'nın memelilerdeki homoloğu UBE2A ve UBE2B'dir. UBE2A ve UBE2B, ubikutin yolağına ait E2 enzimleridir (Hosseini vd., 2019).

Planarya gibi rejenerasyon kapasitesi yüksek yapısal olarak daha basit organizmalarda ubikutin ilişkili genlere bakılmıştır. Strand ve vd.nin bu çalışmasında SCF E3 ligaz kompleksine ait genler susturulduğunda blastom oluşumu, organ rejenerasyonu, sinir sistemi rejenerasyonunda defektler olduğu gösterilmiştir (Strand vd., 2018).

Çeşitli kanser hücre kültürlerinde ubikutin yolağına ait genlerin proliferasyon ve DNA onarımındaki rolü incelenmiştir (Shabbeer vd., 2013; Hosseini vd., 2019). Ancak *in vivo* çalışma sayısının sınırlı olduğu belirlenmiştir.

Rejenerasyon mekanizmalarının araştırıldığı farklı çalışma modellerinde ubikutin yolu ile rejenerasyonun ilişkili olabileceğine dikkat çekmektedir (Mourkioti vd., 2006; Wan vd., 2008; Pasten vd., 2012). Pasten ve vd.nin çalışmasında (2012) ince barsak rejenerasyonu sırasında ubikutin- proteozom sistem bileşiklerinin ifadesinin arttığı belirtilmiştir. Wan ve vd.nin (2008) çalışmasında kemik rejenerasyonunun, ubikutin sinyal yolu aracılığıyla düzenlenebileceğinden bahsedilmiştir. Bu çalışmaların yanı sıra çalışma modelimizi oluşturan PH'i içeren sınırlı sayıda yakın çalışmalara da rastlanmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde PH'nin farklı sürelerinde gen ifadelerine göre analizleri içermektedir.

Liao ve vd.nin çalışmasında (2004) APC/C E3 ligaz kompleksi adaptör proteini Cdc20 ekspresyonu; %70 parsial hepatektomi uygulanan farelerde farklı rejenerasyon sürelerine (0, 2, 4, 6, 12, 24, 36, 48, 72 sa) göre değerlendirilmiştir. Cdc20 gen ifadesinin PH sonrası ilk 12 saat boyunca değişmediği, 36. saatten itibaren hızla artış göstererek 48. saatte en yüksek seviyesine ulaştığı ve 72. saatte düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Cdc20'nin karaciğer rejenerasyonu sürecinde meydana gelen hücrelerin proliferasyonu için gerekli olduğu belirtilmiştir.

Wang ve Xu'nun çalışmasında (2011); DNA hasarı onarımı ile ilişkili genlerin ifade değişiklikleri 0, 2, 6, 12, 24, 30, 36, 72, 120 ve 168 saatlik rejenerasyon sürelerine göre sıçan genom array'i kullanılarak değerlendirilmiştir. DNA hasarı onarım mekanizmalarından homolog rekombinasyon, DNA çapraz bağ tamiri, homolog olmayan uç birleştirme mekanizmalarına ait gen ifadelerinin, özellikle karaciğer rejenerasyonu geçiş fazında değiştiği gösterilmiştir.

Çalışmamızdan farklı olarak bazı çalışmalar, PH modelinde gen susturulması yöntemini kullanarak ilgili genin görevlerinin belirlenmesini amaçlamıştır.

Cheng ve vd.nin çalışmasında (2017); farelerde %70 PH ile tetiklenen karaciğer rejenerasyonunda APC/C E3 ligaz kompleksinin adaptör proteini olan Cdh1 geninin silinmesinin etkileri incelenmiştir. Cdh1 geninin silinmiş hepatositlerin S fazına erken girdiği, S fazında uzun süre kaldıkları ve DNA onarımının azaldığı gösterilmiştir.

Yamaji ve vd.nin çalışmasında, Cullin RING grubuna ait Cul4'ün adaptör proteini DDB1'in karaciğer rejenerasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Sadece fare hepatosit hücrelerinde DDB1 geni silinmiştir. Çalışmada DDB1 yokluğunda çok az sayıda hepatositin hücre döngüsüne girebildiği belirlenmiştir. PH sonrası rejenerasyon sırasında DNA replikasyonunda sorun yaşandığı için hepatositler farklı telafi edici yolları kullanarak çoğalmış ve hepatosellular karsinoma gelişimine yol açmıştır (2010).

SOCS3, Cullin Ring E3 Ubikutin Ligazlardandır. SOCS3, karaciğer rejenerasyonunun ilk saatlerinde ifadesi önemli oranda artış gösteren IL-6'nın inhibitörüdür. (Taub, 2004; Mao vd., 2014). SOCS1'de rejenerasyon süreci ile ilişkili görünmektedir. Gui ve vd.nin çalışmasında (2011) SOCS1 knockout farelerin prematüreyken öldüğü belirtilmiştir. Bu nedenle PH sonrası karaciğer rejenerasyonunda SOCS1'in etkileri araştırılırken SOCS1 ve Ifn-g knockout fareler kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre PH sonrası karaciğer rejenerasyonunda SOCS1 knockout farelerde rejenerasyon sürecini hızlandırıcı yönde etki ettiği gösterilmiştir.

Literatür araştırmalarında mitokondri ile rejenerasyonun ilişkili olabileceğini işaret eden çalışmalar mevcuttur; ancak moleküler mekanizması açık değildir. Duguez ve vd.nin çalışmasında (2002), mitokondriyal protein sentezi inhibe edildiğinde; kas farklılaşmasının gerçekleşmediği gösterilmiştir. Han ve vd.nin çalışmasında (2016); hasarlı aksonlarda mitokondri sayısının artırılmasının rejenerasyon sürecine destek olduğu belirtilmiştir. Polimeno ve vd.nin çalışmasında (2000); Augmenter of Liver Regeneration (ALR) proteinin sıçanlardaki etkisi araştırılmıştır. ALR'nin, hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda arttığı bilinmektedir. ALR enjekte edilen sıçanlarda mitokondriyal proteinlerin ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü-A'nın artışı sağlanmıştır. Bu faktörlerin artışı ise karaciğer mitokondrilerinin oksidatif fosforilasyon artışı ile ilişkilendirilmiştir. Karaciğer rejenerasyonu ile mitofaji ya da mitokondriyal fizyon ilişkisini açıklayan herhangi çalışmaya rastlanmamıştır.

3. GENEL BİLGİLER

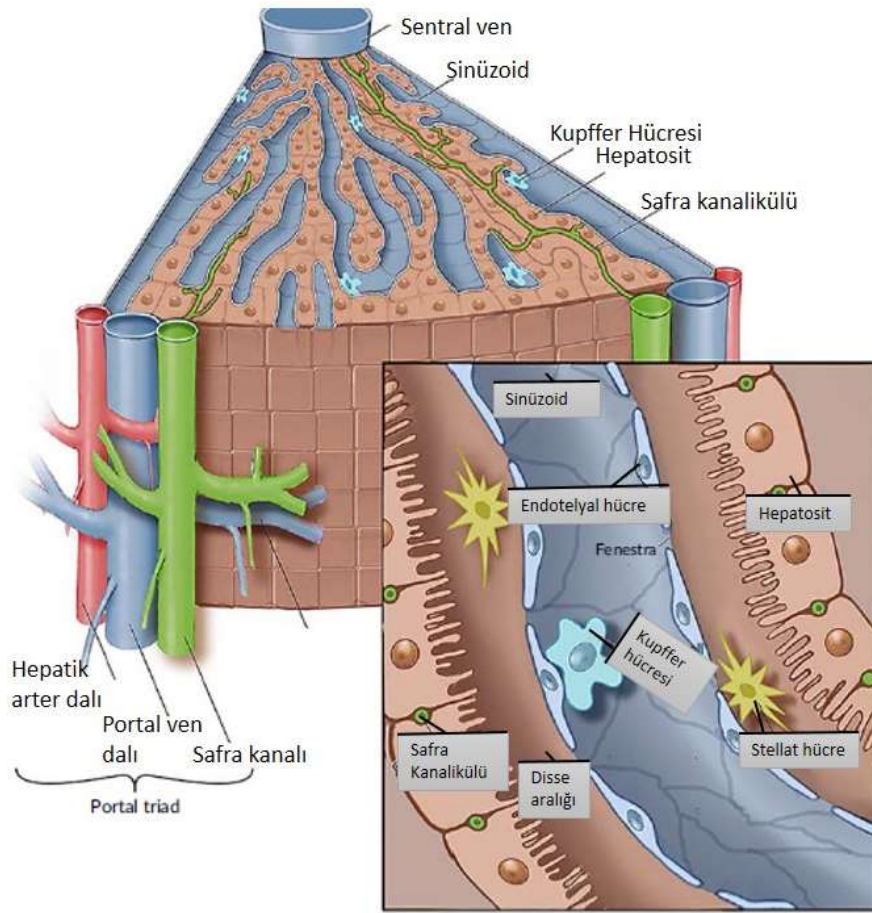
3.1. Karaciğerin Yapısı

Karaciğer yaşamsal fonksiyonları destekleyen önemli bir organdır (Michalopoulos, 2007). Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu, metabolizmanın düzenlenmesi, hormon salınımı, ozmotik regülasyon, vitaminlerin depolanması gibi önemli görevleri vardır (Dilek, 2003).

Karaciğerin en küçük yapısal birimi lobüldür (Wakim, 2017) ve altıgen görünümlüdür (Malarkey vd., 2005). Herbir altıgen lobülün ortasında **sentral ven** yer alır (Şekil 3.1). Lobüllerin, komşu lobüllerle birleştiği yerin köşelerinde **portal triad (portal alan)** yer alır (Şekil 3.1). Portal triad, hepatik arterin dalı, portal venin dalı ve safra boşaltım kanalından oluşur. Hepatositler sentral venden periferine doğru kordon şeklinde yayılır ve **hepatosit plaklarını** oluşturur (Şekil 3.1) (Malarkey vd., 2005). Hepatosit plaklarının arasında, karaciğer kapilleri olan **sinüzoidler** yer alır. Sinüzoidlerin iç yüzü kesintili pencereci endotelyal hücreleri ve Kupffer hücreleri ile çevrilidir (Abu Rmilah vd., 2019). Sinüzoidler ve hepatositler arasında perisinüzoidal alan (**Disse Aralığı**) yer alır (Şekil 3.1) (Wakim, 2017). Hepatositlerin bu aralığa bakan yüzlerinde mikrovilluslar bulunur (Wakim, 2017). İki hepatositin bitişik olduğu her yerde, hücrelerin arasında tübüler yapıda **safra kanalikülü** bulunur (Wakim, 2017).

Karaciğere kan, hepatik arter ve portal ven aracılığı ile gelir. Portal vendeki kan, mezenter, mide, dalak ve pankreastan toplanarak karaciğerde dallanır (Malarkey vd., 2005). Dallanarak portal triada gelen kan, sinüzoidlerde birbirine karışarak sentral vene; oradan da hepatik venler aracılığı ile vena cava ya dökülür (Malarkey vd., 2005).

Safra kanal sisteminin en basit yapısını safra kanalikülleri oluşturur. Hepatositler tarafında üretilen safra, safra kanaliküllerine salgılanır. Safra kanaliküllerinden ise **safra kanalcıklarına (Herring Kanalları)**; oradan da portal triada yer alan safra kanallarına boşalır. Safra salgısı, kan akışının tersi yönünde yani lobülün merkezinden periferine doğrudur (Aytekin vd., 1998).



Şekil 3.1. Karaciğerin yapısı (Abu Rmilah vd, 2019)

Karaciğerin %80'ini hepatositler oluşturur. Sinüzoidal endotelial hücreler, Kupffer hücreleri, hepatik stellat hücreler ve safra epitel hücreleri ise diğer önemli çoğunluğu oluşturan hücrelerdir (Malarkey vd., 2005). **Hepatositler**, büyük ve yuvarlak nükleusa sahiptir ve iki çekirdekli olan hücelere de rastlanır. Mitokondri, golgi, endoplazmik retikulum, lizozom, peroksizom, bakımından zengindirler (Aytekin vd., 1998). **Kupffer hücreleri**, dolaşım sisteminden alınan monosit kökenli fagositik hücrelerdir ve lokal olarak çoğalabilirler (Şekil 3.1). Sitokinler gibi inflamasyon ile ilişkili mediatörlerin salınımından sorumlu birincil hücrelerdir (Malarkey vd., 2005; Wakim, 2017). **Sinüzoidal endotelial hücreler**, sinüzoidlere yayılan kan ile Disse aralığı arasında bariyer görevi görür. Kan, pencereli bir yapıya sahip olan bu hücrelerin arasından geçerken, hücreler molekülleri ve partikülleri endositoz ile alabilirler. Sinüzoidal endotelial hücrelerin bazal laminaları yoktur ve hücre iskeleti ile desteklenirler (Malarkey vd., 2005). **Hepatik stellat hücreleri (İto Hücreleri)**, sitoplazmik uzantılara sahip yıldız hücrelerdir (Şekil 3.1). Ekstrasellular matriksin yeniden düzenlenmesinde etkilidirler (Dilek, 2003; Malarkey vd., 2005).

Hepatositler dolaşımdan gelen kanın içeriğine göre gradientli bir yapı gösterir. Maruz kaldıkları oksijen ve madde içeriğine göre **3 bölgeye** ayrılırlar (Malarkey vd., 2005):

Bölge I (Periportal): Buradaki hücreler damarlara en yakın konumda yer alır. Bu nedenle dolaşım ile gelen kandan ilk etkilenen hücrelerdir (Aytekin vd., 1998). Sinüzoidal kanda oksijen yoğunluğu yüksektir. Hepatositler aktif olarak glikojeni ve plazma proteinlerini sentezler (Demir, 2006).

Bölge II: Ara zondur ve kana ikinci olarak yanıt oluşturan hücrelerden oluşur (Demir, 2006).

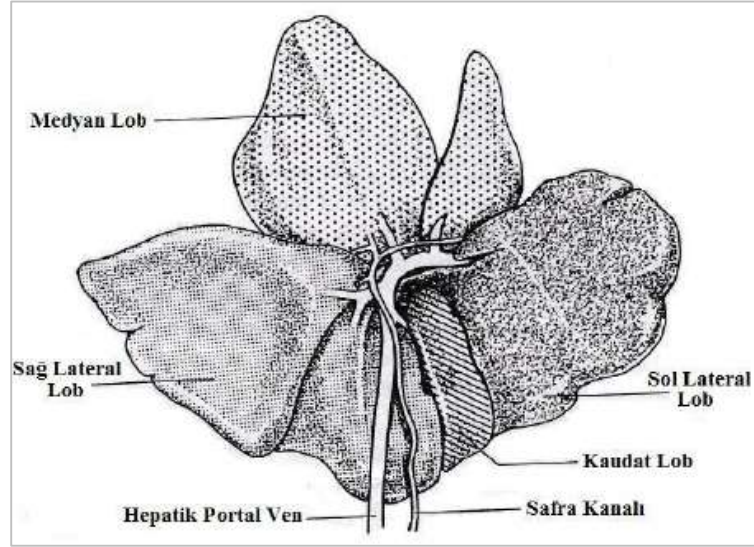
Bölge III: Oksijen yoğunluğunun en az olduğu bölgedir. Detoksifikasyonla görevlidir. Buradaki hepatositler, hipoksi sonucu oluşacak harabiyetlere karşı açıktırlar (Demir, 2006).

3.1.1. Sıçan karaciğeri yapısı

Sıçanların karaciğeri dört lobdan oluşur. Bunlar median lob, sağ lob, sol lob ve kaudat lobtur. Sol lob dışında diğer loblar parçalı yapıdadır (Waynforth ve Flecknell, 2001; Malarkey vd., 2005; Wakim, 2017).

Farelerde ve insanlarda safra kesesi olmasına rağmen; sıçanlarda yoktur. Sıçan karaciğer loblarında yer alan temel portal ve hepatik ven sistemleri, insanlardakine benzerdir; ancak farklılıklar da içermektedir (Malarkey vd., 2005).

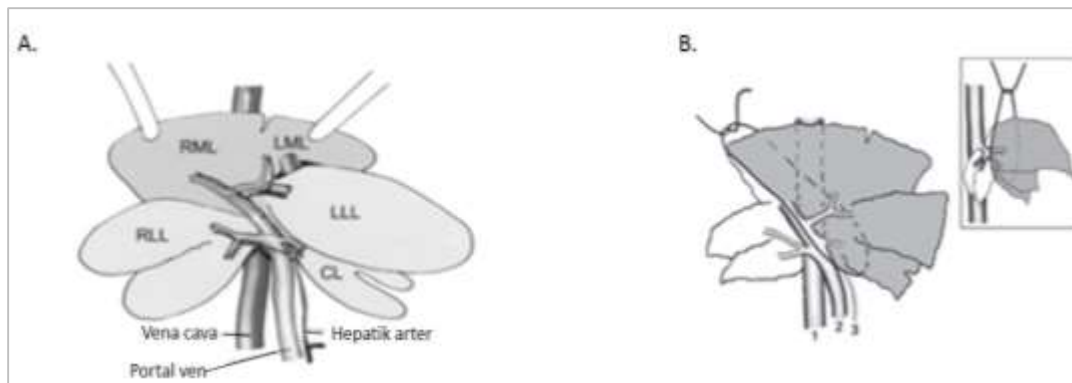
Karaciğerin median ve sol lobları %70'lik kısmını oluşturur. Sağ laterak lob, median lob ile üst üste binmiştir ve sağ tarafta yer alır. En küçük lob kaudat lobdur ve özefagusun abdominal kısmını çevreler. Karaciğer lobları birbirlerine ligamentler aracılığı ile tutunurlar (Şekil 3.2) (Waynforth ve Flecknell, 2001).



Şekil 3.2. Sıçan karaciğeri yapısı (Waynforth ve Flecknell, 2001)

3.2. %70 Parsiyal Hepatektomi Modeli

Karaciğerin %70'lik kısmının cerrahi müdahale ile çıkarılmasına dayanır ve 2/3 parsiyal hepatektomi (PH) modeli olarak da adlandırılır. Bu teknik ilk kez 1931 yılında Higgins ve Anderson tarafından gerçekleştirilmiştir. Karaciğerin sol lateral lobunun ve median lobunun cerrahi müdahale ile çıkarılmasına dayanır (Aller vd., 2012) (Şekil 3.3). Kalan loblar (sağ ve kaudat lob) karaciğerin metabolik faaliyetlerini yerine getirebileceği şekilde rejenerasyona uğrar, sol lateral ve median loblar tekrar oluşmaz (Leonidas vd., 2003).



Şekil 3.3. A. Sıçan karaciğeri genel görünüşü (Bao vd., 2011). B. %70 partial hepatektomi modeli ile alınan median ve sol loblar (Tannuri vd., 2007).

Parsiyal hepatektomiden sonraki karaciğer rejenerasyonu doku büyümesinin başlaması, ilerlemesi ve sonlanması mekanizmalarını çalışmak için güçlü bir modeldir (Kurinna and Barton, 2011). *in vivo* hücre döngüsünün düzenlenmesi ile ilgili analizler için en iyi çalışma modellerinden birini oluşturur (Hu vd., 2014).

PH modelinde en çok fareler ve sıçanlar tercih edilmektedir. Ancak türler arasında rejenerasyon süreleri farklılık göstermektedir (Michalopoulos, 2007).

3.3. Karaciğer Rejenerasyonu

Karaciğer yüksek rejenerasyon yeteneğine sahip bir organdır (Michalopoulos, 2007). Karaciğerin büyük bir kısmının çeşitli sebepler ile kaybedilmesi karaciğer rejenerasyonunu tetikler (Michalopoulos, 2007). Rejenerasyon sürecinde hücrel ve moleküler düzeyde birçok kompleks olayın rol aldığı bilinmektedir ve henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Genel olarak üç faza ayrılmaktadır:

- **Başlangıç (Priming) Faz**
- **Geçiş (Responsive) Fazı**
- **Bitiş (Termination) Fazı**

3.3.1. Başlangıç (Priming) Faz (PH sonra 0.5-4 saat)

Başlangıç (priming) fazı karaciğer hücrelerinin hızlı proliferasyonu ile rejenerasyonun başladığı safhadır. Hepatositlerin ve parankimal olmayan hücrelerin G_0 fazından G_1 fazına geçişini temsil eder (Kurinna ve Barton, 2011). Hücrelerin G_0 - G_1 geçişini tetikleyen bazı faktörlerden bahsedilmektedir. Bunların arasında hemodinamik değişiklikler, urokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) ve ekstrasellular matriksin (ECM) yeniden düzenlenmesi yer almaktadır.

A. Hemodinamik Değişiklikler: PH sonrası dokuların bir kısmının alınmasına bağlı olarak karaciğerin yapısal fonksiyonu azalmaktadır ve doku miktarına göre portal venden gelen kan miktarı üç kat artmaktadır (Michalopoulos, 2010). Karaciğer dokusunda

meydana gelen bu hemodinamik değişikliklerin hücrelerin G₀-G₁ geçişinde etkili olduğu düşünölmektedir (Michalopoulos, 2007; Kurinna ve Barton, 2011). Bununla birlikte düşmüş oksijen miktarına bağlı olarak tetiklenen oksidatif stres mekanizmalarının da (HIF1 α) etkili olduğu bilinmektedir (Michalopoulos, 2007).

B. uPA'nin Yeniden Düzenlenmesi: PH ile artmış portal ven kan basıncı, endotel hücrelerinde mekanik bir strese sebep olur. Endotel hücreleri, mekanik strese cevap olarak uPA salınımını artırır. uPA, plazminojenin plazmine çevrilmesinde etkilidir. Plazmin ve matriks metalloproteinaz, ikisi birlikte, PH sonrası ekstrasellular matriksin yeniden düzenlenmesinde görev alır (Kim vd., 1997; Abu Rmilah vd., 2019). uPA yoksunluğunda hepatositlerin rejenerasyonu gecikmektedir (Roselli vd., 1998).

C. ECM Yeniden Düzenlenmesi: ECM yeniden düzenlenmesinde, rejenerasyon başlatıcı faktörlerinden biri olan HGF de etkilidir. HGF, İnaktif linear yapıdayken ECM'e tutunur ve uPA aracılığı ile HGF'nin dimerizasyonu tetikler. Aktif formuna dönüşen HGF (Michalopoulos, 2007; Abu Rmilah vd., 2019) rejenerasyonu tetikler (Michalopoulos, 2007). Transforming Growth Factor Alpha (TGF α), Epidermal Growth Factor (EGF) gibi büyüme faktörleri, PH sonrasında ilk 30-60 dakikada artar (Stolz vd., 1999). Büyüme faktörleri, hücrelerin durağan G₀ fazından G₁ fazına geçişi için gereklidir (Fausto, 2000).

Akut-Faz Mediatör Genlerin (Immediate-Early Genes) ekspresyonu PH'den sonraki 1 saat içinde artar (Michalopoulos, 2017) ve yaklaşık 4 saat sürer (Fausto, 2000). c-jun, c-fos, c-Myc genleri bu grupta yer alır (Şekil 3.5) (Mao vd., 2014; Michalopoulos, 2017). Norepinephrine, tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL) 6, (Michalopoulos, 2017) Nuclear Factor κ B (NF- κ B), Signal Transducer & Activator of Transcription-3 (STAT3), CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP), aktivasyonları gerçekleşir (Mao vd., 2014; Michalopoulos, 2017). IL-6 ve TNF- α , G₀-G₁ kontrol noktasının aşılmasında rol oynar (Mao vd., 2014).

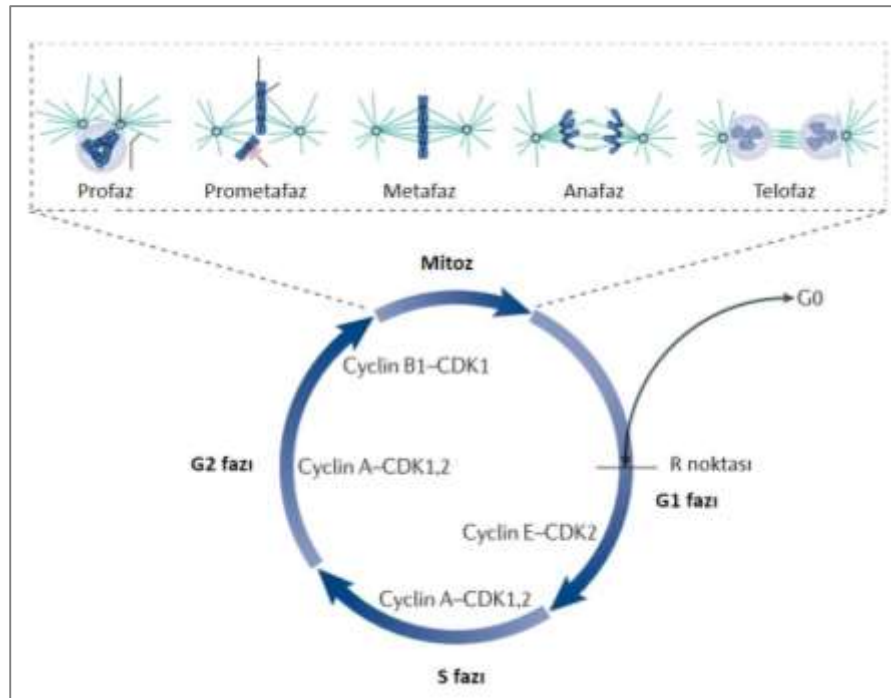
3.3.2. Geçiş (responsive) fazı

Geçiş (responsive) Fazı (PH sonra 6-72 saat) hücrelerin, hücre döngüsünde G₁-S-G₂-M aşamalarını geçerek mitozun gerçekleştiği safhayı temsil eder (Abu Rmilah vd.,

2019). PH sonrasında büyüme faktörleri ve mitojenlerin etkisi ile G_1 fazına geçen hücreler, siklin ve siklin bağımlı kinazların (Cdk) kontrolünde hücre döngüsünü tamamlar (Zimmermann, 2004).

3.3.2.1. Hücre döngüsü

Hücre döngüsü dört fazdan oluşur: G_1 , S, G_2 , M. G_1 (Gap 1) fazı DNA sentezi için hazırlık fazıdır ve mikroskop altında bakıldığında görülmez; ancak metabolik aktivite vardır. S (synthesis) fazı, DNA sentezini temsil eder ve DNA replikasyonunun gerçekleştiği fazdır. G_2 (Gap 2) fazında hücreler mitoz hazırlanır ve M fazında mitoz gerçekleşir ve ışık mikroskopunda gözlenebilir (Assy ve Minuk, 1997) (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Hücre döngüsü (Pines, 2011)

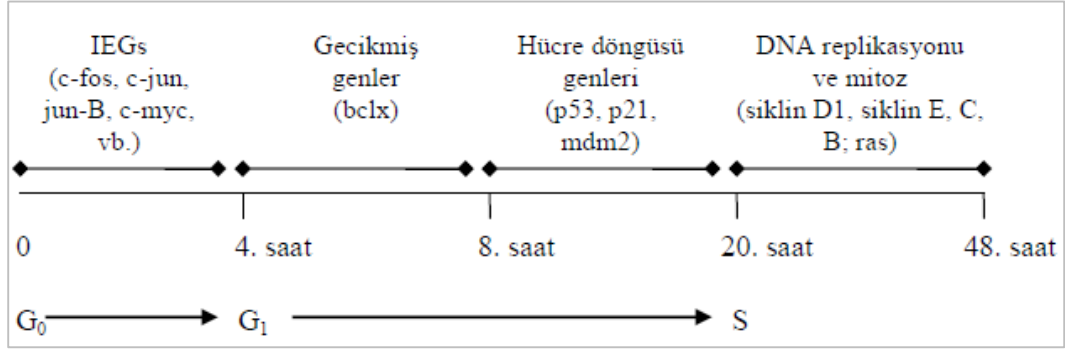
Hücre döngüsü basamaklarının temel düzenleyicileri siklin ve siklin bağımlı kinazlar olan Cdk'lerdir. G_1 fazında siklin-D1\Cdk4,6 kompleksi oluşmaya başlar (Ehrenfried vd., 1997) (Şekil 3.4). Hızla artış gösteren siklin-D1\Cdk4,6 kompleksi, Rb-E2F Retinoblastoma (Rb)'yi fosforilleyerek E2F'nin serbest kalmasını sağlar. Serbest kalan E2F, çekirdeğe giderek G_1 kontrol noktasının aşılmasını ve S fazı için gerekli olan genlerin ifadesini başlatır (Albrecht vd., 1998; Kato vd., 1998; Abu Rmilah vd., 2019).

E2F'nin serbest kalması ve siklin E/Cdk2 kompleksinin oluşması ile birlikte G₁ kontrol noktası aşılr. S fazına geçilebilmesi için siklin-A\Cdk2 kompleksi oluşmalıdır siklin-A\Cdk2 olmadan DNA sentezi başlamaz (Şekil 3.4) (Albrecht vd., 1998; Starkel vd., 2005; Karimian vd., 2016). S fazının ilerleyen safhasında (Geç S fazı) siklin-A\Cdk1 kompleksi oluşur ve hücreler G₂ fazına geçiş için hazırlanır (Şekil 3.4) (Abu Rmilah vd., 2019). G₂ fazında siklin-A\Cdk1 kompleksi bir süre daha varlığını sürdürür. Geç G₂ fazında siklin-B\Cdk1 kompleksi oluşur ve G₂-M kontrol noktasının aşılmasıyla, hücrelere mitozaya doğru ilerler (Albrecht vd., 1998; Abu Rmilah vd., 2019) (Şekil 3.4).

Cdk inhibitörleri hücre siklusunun negatif düzenleyicisidirler (Ehrenfried vd., 1997; Albrecht vd., 1998; Jeong vd., 1999). Cdk inhibitörleri iki gruba ayrılır: INK4 ve Cip/Kip ailesi. INK4 ailesi (p15, p16, p18 ve p19) üyeleri, Cdk 4 ve Cdk6 inhibitörleridir. Cip/Kip ailesi (p21, p27, p57) üyeleri, siklin D\Cdk4,6, siklin E\Cdk2, siklin A\Cdk2' i içeren çok sayıda Cdk'ları inhibe eder. (Albrecht vd., 1998; Jeong vd., 1999).

Cdk4 ve Cdk6 inhibitörü p53, tümör baskılayıcıdır ve hücre siklusunu durdurucu, apoptoz, farklılaşma gibi süreçlerde rol oynar (Alisi vd., 2005). p53, çeşitli stres sinyalleri (UV, hipoksi, DNA hasarı vb) üzerine aktive edilir. DNA hasarı, hücre döngüsünün G₁-S (Kastan vd., 1995) ve G₂-M (Li vd., 2009) kontrol noktalarında durmasına yol açar (Agarwal vd., 1995). Kontrol noktalarında bölünmesi durdurulan hücrelere hasarın onarımı için fırsat tanınmış olur (Agarwal vd., 1995). DNA hasarının tamir edilmesi durumunda hücre döngüsü kaldığı yerden devam eder; tamir edilememesi durumunda apoptoz mekanizmaları devreye girerek hasarlı hücreyi ortadan kaldırır (Kastan vd., 1995).

p53'ün temel düzenleyicisi Mdm2'dir. Mdm2, E3 ubiquitin ligazdır ve ubiquitin yolağı aracılığı ile p53'ün hem sitoplazmada hem de nükleusta degradasyonunu sağlar (Moll ve Petrenko, 2003). Normal koşullarda p53 miktarı oldukça düşüktür ve Mdm2 tarafından sürekli yıkılmaktadır (Moll ve Petrenko, 2003). Mdm2, p53'e bağlanarak p53'ün nükleusa geçmesini engeller (Chène, 2003). Stres koşullarında, p53 ve/veya Mdm2 fosforillenerek birbirlerine bağlanması engellenir. Serbest kalan p53 nükleusa geçer ve hedef genlerinin transkripsiyonunu gerçekleştirir (Moll ve Petrenko, 2003). Hedef genlerinden birisi de Mdm2'dir. P53, Mdm2 ifadesini artırır, Mdm2 ise p53'ü inhibe eder (Chène, 2003).



Şekil 3.5. Karaciğer rejenerasyonunda hücre döngüsü (Fausto, 2000)

PH sonrası karaciğer rejenerasyonun hücre döngüsü basamakları incelendiğinde türler arasında farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Farelerdeki G₁ evresinin süresi sıçanlardakine göre daha uzundur (Fausto, 2000). Sıçanlarda hücrelerin G₁ fazına girişi PH sonrası 4-6 saat olarak kabul edilmektedir (Şekil 3.5) (Ozeki ve Tsukamoto, 1999; Fausto, 2000). Karaciğer rejenerasyonunda G₁ fazına giriş ve ilerlemenin 12-16. saatlere denk geldiği ileri sürülmüştür (Ozeki ve Tsukamoto, 1999). Hücre döngüsünde S fazı DNA replikasyonunun gerçekleştiği fazdır. PH sonrası DNA replikasyonunun 12-15. saatler arasında başladığı düşünülmektedir (Steer, 1995). Fausto (2000) ise PH sonrası 14. saatte DNA replikasyonunun başladığını belirtmiştir (Fausto, 2000). Başka bir literatürde hücrelerin S fazına girişinin PH sonrası 12. saate denk geldiği ve replikasyonun 18-30 saatleri arasında gerçekleştiği belirtilmektedir (Xu vd., 2005). PH sonrası DNA replikasyonunun 24. saatte en yüksek seviyesine ulaştığı (Starkel vd., 2005) ve 30-32. saate kadar devam ettiği belirtilmektedir (Rininger vd., 1997; Xu vd., 2005). G₂ fazının ise 2-4 saat sürdüğü (PH sonrası 31-34. saat) bilinmektedir (Xu vd., 2005). Hepatositler PH sonrası yaklaşık 36-48. saatlerinde mitozla girdiği düşünülmektedir (Şekil 3.5) (Steer, 1995; Fausto, 2000; Kurinna ve Barton 2011). Yaklaşık 72 saat sonrasında hepatositlerin mitozdan çıktığı ve G₀ fazına geri döndüğü bilinmektedir (Taub, 2004; Kurinna ve Barton, 2011). Hepatositlerin çok küçük bir kısmı ikinci kez proliferere olabilir ve ikinci mitozdan çıkış ancak PH sonrası 96. saate kadar sürebilir (Taub, 2004; Kurinna ve Barton, 2011). PH sonrası 3. günün sonunda çoğu hepatosit proliferasyonunu tamamlamış olur (Zimmermann, 2004). Hepatositlerde bir hücre döngüsünün 30 saatte tamamlandığı gösterilmiştir; ancak bu diğer hücre tiplerinin olmadığı hücre kültürü ortamında gerçekleştiği süredir (Xu vd., 2005).

Sıçanlarda PH sonrası karaciğer rejenerasyonunda doku farklılaşması ve kaybolan dokunun yeniden inşası 72-144 saatleri arasında gerçekleştiği tahmin edilmektedir (Xu vd., 2005).

Hücre döngüsünün bir diğer düzenleyicileri ise G₁, S, G₂, M geçişlerinde siklinlerin yıkımından sorumlu E3 ubiquitin ligaz kompleksleridir. Bunlar **Anaphase Promoting Complex (APC)** ve **Skp1/cullin/F-box (SCF)** kompleksleridir (Chauhan vd., 2011; Zheng, vd., 2016a) ve ubiquitin sinyal yolağı başlığı altında detaylandırılmıştır.

3.3.3. Bitiş (termination) fazı (PH sonrası 72-168 saat)

Karaciğer rejenerasyonu kitle/vücut ağırlığı %2.5 oranına ulaştığında sonlandırılır (Nygård vd., 2012). Bitiş (termination) fazı, (PH sonra 72-168 saat), hücrelerin bir-iki bölünmeden sonra tekrar G₀ fazına geçişini temsil eder (Kurinna ve Barton, 2011; Wang et. al., 2009). Karaciğer rejenerasyonunun sonlandırılması ile ilgili bilinenler oldukça sınırlıdır (Mao vd., 2014). Ancak TGF- β , Suppressors of Cytokine Signaling (Socs), Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1), aktivin ve ECM içeren bazı mekanizmalar, karaciğer rejenerasyonunun sonlandırılmasında görev aldığı bilinmektedir (Zimmermann, 2004; Michalopoulos, 2010; Kurinna ve Barton, 2011).

TGF- β , proliferasyonda en iyi tanımlanmış hücre dışı inhibitördür. Hücre döngüsünü G₁'de durdurabilir. Bu etkisini ise Cdk4,6/siklin-D komplekslerine bağlanan Cdk inhibitörü p15'in uyarılması ile gerçekleştirir (Sherr ve Roberts, 1999; Cooper, 2006). Cdk inhibitörlerinin uyarılmasının yanında Cdk2, Cdk4, siklin-E, siklin-D üretimini baskılar (Abu Rmilah vd., 2019).

Karaciğer rejenerasyonunda TGF- β , yıldızlı hücrelerden ve makrofajlar tarafından (Michalopoulos, 2017) rejenerasyonun ilk beş saati içinde, HGF ve EGF faktörlerine cevap olarak salınmaya başlar. TGF- β salınımındaki artışa karşılık hepatositler TGF- β reseptörlerini 48. saate kadar azaltarak proliferasyonlarına devam ederler (Michalopoulos, 2010; Mao vd., 2014). TGF- β , ECM proteinlerinden biri olan decorine, periportal alandan sentral alana doğru kademeli olarak bağlanarak proliferasyonu inhibe eder (Michalopoulos, 2017). TGF- β , PAI-1 ekspresyonunu artırarak DNA sentezini inhibe eder (Kurinna ve

Barton, 2011). Ayrıca TGF- β , tübülogenezi ve yeni damar oluşumunu tetikler. Karaciğer rejenerasyonu bittikten sonra yeni ECM'in oluşumu başlar. TGF- β ekspresyonunun en yüksek olduğu PH sonraki üçüncü günde (72 saat) sinüsoidal kapillar ağ oluşumu meydana gelir (Michalopoulos, 2007).

Aktivin A, hepatositlerin DNA sentezini otokrin olarak inhibe eden faktördür (Zimmermann, 2004). Aktivin A, karaciğer büyümesini azaltıcı ve apoptozu tetikleyici etkilere sahiptir. Aktivin A ekspresyonunun rejenerasyonun ilk 24 saatinde düştüğü ve 72. saatten itibaren tekrar normal seviyesine geldiği belirtilmektedir (Zimmermann, 2004).

ECM aracılığı ile rejenerasyonun sonlandırılması mekanizmaları; integrin-linked kinase (ILK) (Kurinna ve Barton, 2011; Michalopoulos, 2017), ECM komponenti olan Glypican-3 (Michalopoulos, 2010) ile ilişkili olabilir. TGF- β , ECM proteinlerinin sentezini artırarak rejenerasyonun sonlandırılmasına katkı sağlar ECM, karaciğer rejenerasyonunun sonlandırılması için TGF- β , Aktivin ile birlikte etki gösterir (Michalopoulos, 2007).

SOCS3, Cullin Ring E3 Ubikutin Ligazlardandır. SOCS3, karaciğer rejenerasyonunun ilk saatlerinde ifadesi önemli oranda artış gösteren IL-6'nın inhibitörüdür. IL-6 ekspresyonundaki artış aynı zamanda SOCS3 ekspresyonunu da artırır. SOCS3 zamanla IL-6 ekspresyonunu inhibe eder (Taub, 2004; Mao vd., 2014). Yapılan çalışmalarda SOCS3'ün karaciğer rejenerasyonunu inhibe edici etkisi olduğunu göstermektedir (Riehle vd., 2008).

3.4. Ubikutin Sinyal Yolu

Ubikutin 76 aminoasitlik (8.5kDa) küçük bir proteindir. Tüm ökaryot canlılarda güçlü bir düzenleyicidir ve mayalardan insanlara kadar büyük oranda korunmuştur (Liu ve Walters, 2010).

Proteinler hücre içerisinde oldukça fazladır ve fizyolojik süreçlerin yürütülmesinden sorumludur. Bu hücrel mekanizmaların devam edebilmesi için protein sentezi ve yıkımının sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerekir. Hücre içi protein miktarının düzenlenmesinde rol oynayan mekanizmaların başında Ubikutin-Proteozom Sistemi (UPS)

gelir (Herrmann vd., 2007; J. Liu vd., 2015). Ubikutin ile etiketlenmiş protein, proteozomdan bağımsız olarak da işlev gösterebilir. Transkripsiyonun regülasyonu örneğinde olduğu gibi; bir histon proteini olan H2A'nın ubikütinasyonu, DNA ipliğinin gevşemesini ve transkripsiyonun başlamasını sağlar (Zhou vd., 2009; Sümer ve Uyanıkgil, 2010).

Ubikutin sinyali, hücre döngüsünün kontrolü, proteinlerin taşınması, DNA hasarı tamiri, transkripsiyon, endositoz, otofaji, mitofaji, apoptoz ve diğer bazı yollar (NF- κ B yolağı, Wnt yolağı) ile ilişkilidir (Ciechanover, 1998; Yau ve Rape, 2016). Proteinlerin yıkılıp yıkılmaması ya da farklı hücrel süreçlerdeki rolü, proteine eklenen ubikutin koduna bağlıdır (Swatek ve Komander, 2016; Yau ve Rape, 2016; Kwon ve Ciechanover, 2017; Galves vd., 2019).

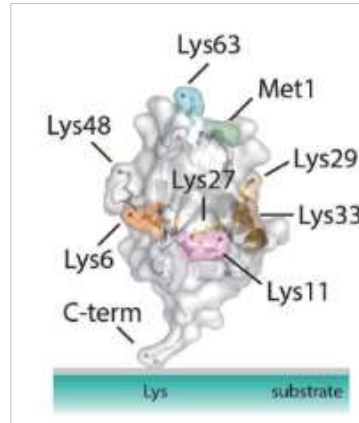
3.4.1. Ubikutin kodu

Hedef proteindeki çeşitli ubikutin modifikasyonları (monoubikütinasyon, poliubikütinasyon) ve ubikütinasyon tipleri, farklı uyumları benimser ve farklı sonuçlara yol açar. Çeşitli hücre içi cevapların oluşmasını sağlayan bu modifikasyonlar **ubikutin kodu** olarak tanımlanmaktadır (Komander ve Rape, 2012; Swatek ve Komander, 2016; Yau ve Rape, 2016).

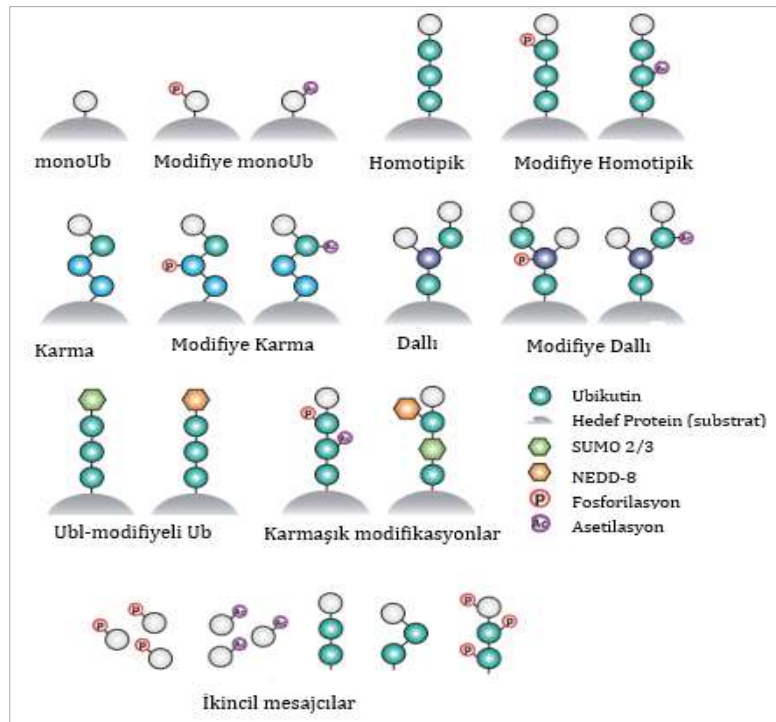
Ubikutin, başka bir ubikutin molekülünün bağlanabileceği yedi lizin (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, and Lys63) ve bir metionin (Met1) kalıntısına sahiptir (Swatek ve Komander, 2016; Yau ve Rape, 2016) (Şekil 3.6).

En basit ubikutin modifikasyonu monoubikütinasyondur ve hedef proteine tek bir ubikutinün bağlanması anlamına gelir. Bu reaksiyonun birkaç bağlanma bölgesinde meydana gelmesine multi-monoubikütinasyon denir (Yau ve Rape, 2016).

Monoubikütinasyon sonrasında aynı bölgeye ubikutin moleküllerinin eklenmesi poliubikütinasyon olarak tanımlanır (Hershko, 1997; Yerlikaya, 2004) (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. Ubikutin molekülü üzerindeki yedi Lys ve bir Met modifikasyon bölgeleri (Swatek ve Komander, 2016).



Şekil 3.7. Ubikutin modifikasyonları (Swatek ve Komander, 2016).

Hedef proteine bağlanan ubikutin moleküllerinin hepsi aynı modifikasyon bölgesinden birbirlerine bağlanıyorsa homotipik; farklı modifikasyon bölgelerinden birbirlerine bağlanıyorsa heterotipik ubikutin zincirlerini oluşturur (Yau ve Rape, 2016).

Heterotipik ubikutin zincirleri ise dallı (branched) veya karma (mixed) ubikutin zincirlerinden oluşur (Swatek ve Komander, 2016; Galves vd., 2019). Karma ubikutin zinciri herbir ubikutin molekülünün, diğer ubikutin molekülüne farklı modifikasyon bölgelerinden biri ile bağlanması sonucu oluşur. Dallı ubikutin zincirleri ise bir ubikutine iki veya daha fazla ubikutin molekülünün bağlanması ile oluşur (Yau ve Rape, 2016) (Şekil 3.7).

Poliubikütinasyon genellikle proteozom aracılı degradasyon ile sonuçlanırken; monoubikütinasyon daha çok reseptör aracılı endositoz, transkripsiyon ve DNA onarımı ile ilişkili görünmektedir (Lee ve Peter, 2003). H2A histon proteinin monoubikütinasyonu transkripsiyonla ilişkilendirilirken (Yau ve Rape, 2016); farklı bir Lys bölgesinden ubikütinasyonu, DNA onarımı ile ilişkilendirilmektedir (Lee ve Peter, 2003).

Ubikutin zincirleri kimyasal (fosforilasyon, asetilasyon) modifikasyonlarla da işaretlenebilmektedir. Ayrıca bazı ubikutin zincirlerine, ubikutin benzeri proteinler (Ubikutin like proteins, Ubl) olan SUMO, NEDD8 proteinleri eklenebilmektedir (Herrmann vd., 2007; Swatek ve Komander, 2016) (Şekil 3.7).

Bu kadar çok modifikasyon, hücre içindeki çok farklı olayları yönetmektedir. Bu nedenle ubikutin yolağı oldukça kompleks ve büyük bir yolak haline gelmektedir.

Lys48 ilişkili ubikutin zincirleri, hücre içinde en sık karşılaşılan modifikasyonlardır (Swatek ve Komander, 2016) ve görevleri substrat proteinin degradasyonu için proteozomlara hedeflenmesidir (Swatek ve Komander, 2016; Yau ve Rape, 2016). **Lys63** zincirlerinin ise NF- κ B aktivasyonunun düzenlenmesi başta olmak üzere hasarlı mitokondrilerin temizlenmesi, immun yanıt mekanizmaları ile ilişkilidir. **Met1** ilişkili zincirlerin de benzer şekilde NF- κ B aktivasyonu ve immun yanıtın oluşturulmasında görev aldığı bilinmektedir (Yau ve Rape, 2016). **Lys11** heterotipik zincirleri ise hücre siklusunun düzenlenmesinden sorumlu proteinlerin proteozomal degradasyonu ile

ilişkilendirilmektedir (Yau ve Rape, 2016). **Lys6** zincirleri, mitofaji ve DNA onarımı ile ilişkilendirilmektedir. **Lys33** post-golgi membran protein trafiğinin düzenlenmesinde rol oynadığı belirtilmektedir. **Lys27** DNA onarımı ve otoimmunité ile ilişkili olduğu (Swatek ve Komander, 2016; Yau ve Rape, 2016) ve **Lys29**'un ise lizozomal degradasyon ile ilişkilendirilmektedir (Herrmann vd., 2007). Lys11/48 heterotipik ubikutin zincirleri ile işaretlenmiş substrat proteinlerin daha hızlı proteozomal degradasyona uğramaktadır. Lys11/48 dışında Lys29/48, Lys11/63, Lys48/63, ve M1/Lys63 heterotipik zincirleri de tanımlanmıştır (Stolz ve Dikic, 2018).

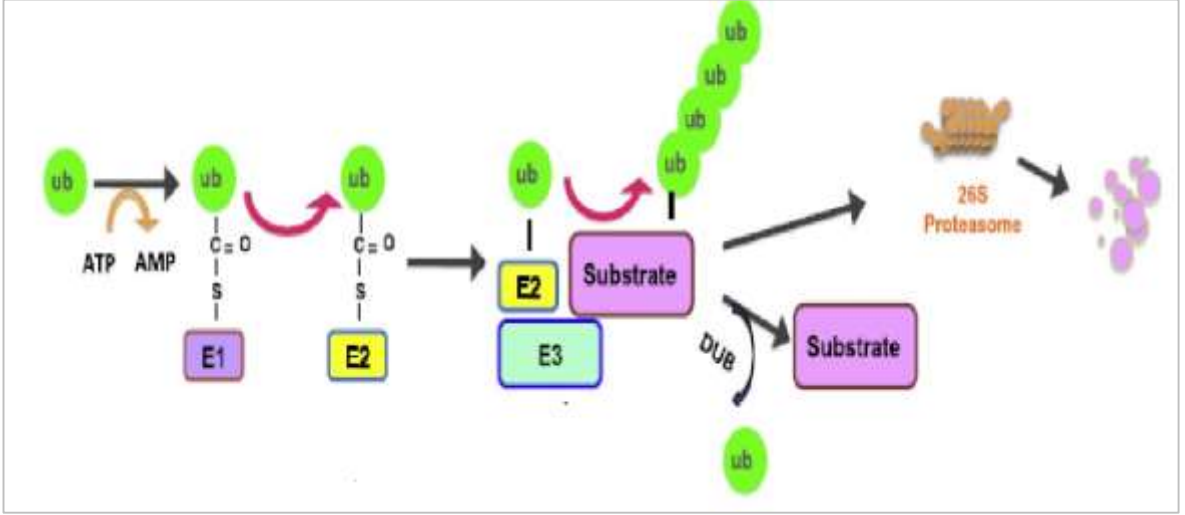
Hedef proteinlerin UPS aracılığı ile yıkılması iki basamakta gerçekleşir (Herrmann vd., 2007). Bunlar *proteinlerin ubikutin ile işaretlenmesi (Ubikütinasyon)* ve *proteinlerin 26S proteozomlar ile degradasyonu*'dur.

3.4.2. Proteinlerin ubikutin ile işaretlenmesi (Ubikütinasyon)

Ubikütinasyon, ubikutin molekülünün, hüresel proteinlere kovalent bağla bağlanması sürecidir (Oh vd., 2018). Kovalent bağ, hedef proteinin ϵ - amino grubunda yer alan lizin (Lys) kalıntısı ile ubikutin C-terminal ucu arasında oluşur (Yau ve Rape, 2016) ve üç tip enzim görevlidir: E1 (ubikitin aktifleştirici enzim), E2 (ubikitin konjuge edici enzim) ve E3 (ubikitin ligaz). İnsanlarda 2 tane E1, yaklaşık 40 tane E2 ve 600'den fazla E3 olduğu tahmin edilmektedir (Deshaies ve Joazeiro, 2009; Liu ve Walters, 2010; Oh vd., 2018). Ubikütinasyon genel olarak üç basamakta gerçekleşir.

A. Aktivasyon: E1 (ubikitin aktifleştirici enzim), ATP kullanarak ubikutin molekülünü aktifleştirir. Ubikutin aktivasyonu iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta; Ubikutin-adenilat ara ürünü oluşur ve ikinci basamakta ubikutin, E1 enziminin sistein kalıntısına bağlanarak tiol ester bağı oluşturur ve AMP açığa çıkar (Herrmann vd., 2007) (Şekil 3.8).

B. Konjugasyon: E2 aracılığıyla gerçekleştirilir. Aktif ubikutin molekülü, E2 (ubikitin konjuge edici enzim) enziminin sistein kalıntısına aktarılır. E1, E2 ile direkt bağlanarak ubikutin molekülünü aktarır ve sonra serbest kalır (Herrmann vd., 2007). (Şekil 3.8).

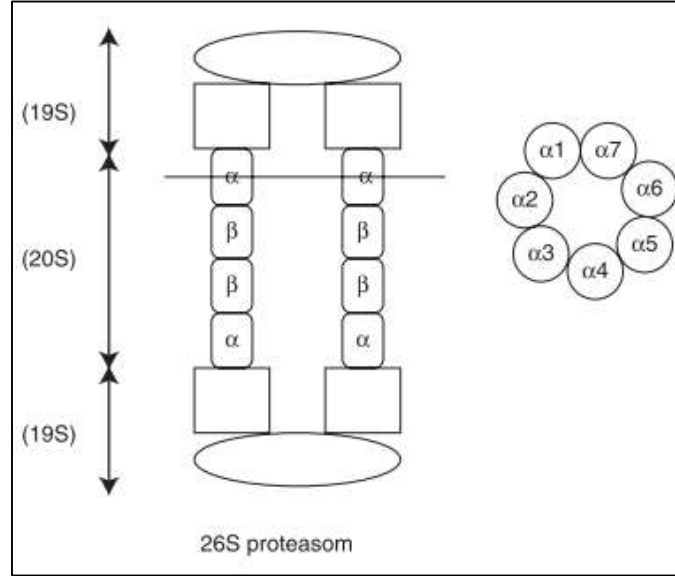


Şekil 3.8. Proteinlerin ubikütinasyon, degradasyon ve deubikütinasyon basamakları (Liu vd., 2015).

C. Ligasyon: E3 Ubikütin ligazlar (ubikütin ligaz, E3 ligaz) tarafından katalizlenir. Ubikütin ligazlar, E2 ve hedef proteini bir araya getiren köprü görevi görürler ve ubikütin molekülünün E2'den hedef proteine aktarımını sağlar (Herrmann vd., 2007; Deshaies ve Joazeiro, 2009). Bütün E2 enzimleri 150 a.a'lık korunmuş bir Ubikütin Konjugasyon Domainine (Ubiquitin Conjugation domain, UBC) sahiptir. E2 enziminin çekirdeğinde yer alan bu domain ubikütini bağlama özelliğine sahip bir sistein kalıntısı içerir (Mani ve Gelmann, 2005; Valimberti vd., 2015). E3 ligazlar, substratları olan hedef proteinlerine özgü oldukları için ubikütin sinyal yolağının en spesifik enzimleridir. E3 ligazlar, ubikütinasyon reaksiyonunun hem etkinliği hem de substrat spesifikliğini sıkı bir şekilde kontrol etmeleri nedeniyle bu kademenin kritik bileşenleridir (Zheng ve Shabek, 2017; Oh vd., 2018) (Şekil 3.8).

3.4.3. Proteinlerin 26S proteozomlar ile degradasyonu

Multi-ubikütinlenmiş proteinler, proteozom adı verilen çok alt birimli proteaz kompleksi tarafından tanınır ve yıkılırlar. 26S proteozom 19S ve 20S alt birimlerinden oluşur. 20S altbiriminin alt ve üst uçlarında 19S altbirimleri yer alır (Şekil 3.9) (Herrmann vd., 2007).



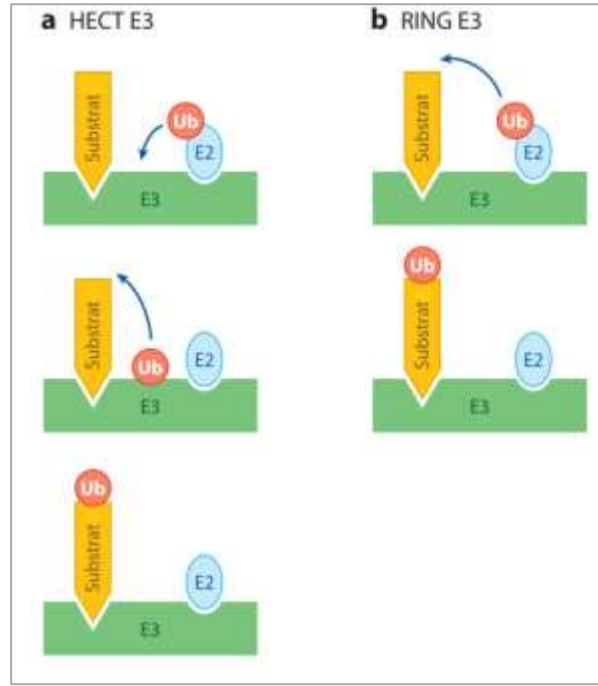
Şekil 3.9. 26S Proteozom yapısı (Ihara vd., 2012)

19S alt birimi düzenleyicidir ve birçok ATPaz ve ubiquitin bağlayıcı bölge içerir (Mani ve Gelmann, 2014). 19S alt birimi ATP kullanarak proteinlerin katlanmadan silindirik yapıdaki 20S altbirimine girmesini sağlar. 20S alt birimi katalitiktir ve proteolitik kısımlar içerir (Mani ve Gelmann, 2005; Herrmann vd., 2007). Sırasıyla α , β , β , α halkalarından oluşur ve herbiri de 7 alt birimden (α_1 - α_7) meydana gelir (Ihara vd., 2012). α altbirimleri, proteolitik olan β altbirimleri için kapak görevi görür (Herrmann vd., 2007). Proteozom, substratlarını 6-10 aminoasit içeren parçalara böler ve bu peptitler sitozolde tamamen hidrolize olurlar. Bu işlem sırasında ubiquitinler serbest kalır ve başka bir döngüde tekrar kullanılırlar (Mani ve Gelmann, 2014).

3.5. E3 Ubikutin Ligazlar

Ubikütinasyon enzimlerinden üçüncüsü, E3 ubiquitin ligazlar, diğer enzimlere göre (E1, E2) daha çok sayıya ve çeşitliliğe sahiptir. Substratlarına özgül aktivite gösterirler ve doğru substrat bölgesine eklenmesini garantilerler (Zinngrebe vd., 2013). E3 ligazlar, ubiquitin zincir tipi üzerinde etkileyici ve tanımlayıcı bir rol oynarken; E2'nin böyle bir etkisi yoktur. Ancak diğer taraftan E2 ve E3 kombinasyonu, substrata nasıl ubiquitin ekleneceğini belirler (Liu ve Walters, 2010).

E3 ubikutin ligazlar, E2 enzimlerine bağlanma özellikleri bakımından farklı mekanizmalar ile çalışan büyük ve heterojen protein ailesinden oluşur (Mani ve Gelmann, 2005). Taşıdıkları domaine ve çalışma prensiplerine göre dörde ayrılırlar. Bunlar Really Interesting New Gene (RING), Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus (HECT), U-Box, Ring Between Ring (RBR)'dir (Oh vd., 2018). RING, bunların en büyük grubudur (Pickart ve Eddins, 2004; Zheng ve Shabek, 2017).



Şekil 3.10. RING ve HECT E3 ligazların çalışma prensibi. **a.** HECT E3 **b.** RING E3 (Deshaies ve Joazeiro, 2009)

RING alt birimi, korunmuş bir sistein ve histidin dizisi ile iki Zn^{+} iyonuna sahiptir ve E3 ligazların herhangi bir bölgesinde yer alabilir. HECT alt birimi E3 ligazların C-ucunda yer alır (Zinngrebe vd., 2013). E3 ligazların üçüncü ailesini oluşturan RBR ailesi üç alt birimden oluşur. RING alt birimini taşıyan birinci ve üçüncü alt birimlere Ring1 ve Ring2; bu iki alt birimin arasında bulunan ikinci alt birime ise “in between Ring (IBR) alt birimi” denir. RBR E3 ligazlar, yapısal olarak RING E3 ligazlara benzemesine rağmen; çalışma prensibi olarak HECT E3’lere benzemektedir (Zinngrebe vd., 2013; Walden ve Rittinger, 2018).

RING ve HECT E3 ligazların çalışma mekanizmaları birbirinden farklıdır ve Şekil 3.10’de özetlenmiştir. RING alt birimine sahip E3 ligazlar, E2 ve substratı bir araya

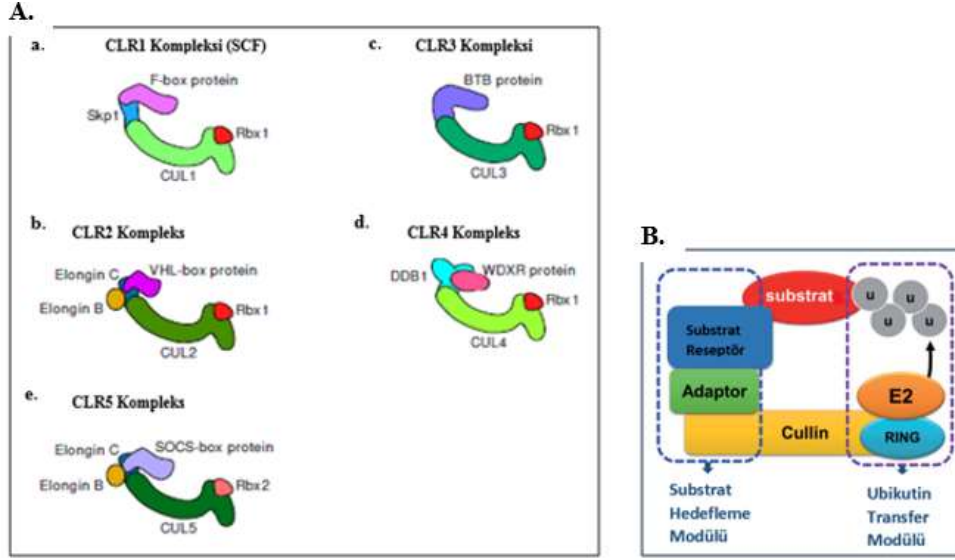
getirdikten sonra ubiquitini E2'den direkt olarak substrata transfer ederler. HECT alt birimine sahip E3 ligazlarda ise; ubiquitin öncelikle HECT E3 ligazların yapısında bulunan sisteine eklenerek tiyoester bağı oluşturur. Sonrasında ise substrata eklenir. RING alt birimine sahip E3 ligazlar böyle bir tiyoester bağı oluşturmaz ve ubiquitin, doğrudan substrat proteine aktarılır (Şekil 3.10) (Deshaies ve Joazeiro, 2009).

3.5.1. Cullin-RING E3 ligazlar (CRL)

Cullin-RING Ligazlar (CRL), RING E3 ligazların en büyük ve en kompleks alt grubunu oluştururlar (Abbas ve Dutta, 2011; Hua ve Vierstra, 2011). CRL ailesi üyelerinin yapıları benzerdir ve bir cullin proteini (Cul1, 2, 3, 4a, 4b, 5, 7), RING yapısına sahip Ring Box proteini (Rbx-1veya Rbx2) ve substrat proteini tanıyan adaptör proteinlerinden oluşur. İçerdikleri Cullin proteini tipine göre CRL1 (SCF), CRL2, CRL3, CRL4A, CRL5 olarak da adlandırılırlar (Şekil 3.11A). Bunlardan en çok çalışılan CRL1'dir ve SCF kompleksi olarak da bilinir. (Duda vd., 2011). Hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan Cullin benzeri alt birime (APC2) sahip APC/C kompleksi de CRL ailesinden kabul edilir (Skaar ve Pagano, 2009) ve APC/C kompleksi yapısal olarak diğer CRL üyelerinden farklıdır (Emanuele ve Enrico, 2019).

Cullin proteini öncelikle adaptör proteine bağlanır. Adaptör protein ise hedef proteini tanıma özelliğine sahip substrat reseptör proteinine bağlanır (F-box, BTB, VHL vb.) ve “Substrat Hedefleme Modülü” oluşur. Cullin proteinin diğer ucuna ise RING birimi içeren proteinlerden biri (Rbx-1, Rbx-2) bağlanarak E2 enzimlerine bağlanabilme özelliği kazanır. Bu ikisi birlikte “Ubikutin Transfer Modülü” nü oluşturur (Şekil 3.11B) (Emanuele ve Enrico, 2019).

Cull: CRL ailesinde ilk fark edilen cullin proteinlerindedir ve SCF kompleksinin alt birimlerinden birini oluşturur (Cheng vd., 2018). Substrat reseptör proteini F-box'dır ve Cul1, F-Box'a Skp1 aracılığı ile bağlanır. Çok sayıda F-box proteini bulunmaktadır. Cul1'in diğer tarafında ise Rbx-1 yer almaktadır (Chen vd., 2015; Emanuele ve Enrico, 2019) (Şekil 3.11Aa).



Şekil 3.11. A. CRL ailesinin bazı üyeleri (Bosu ve Kipreos, 2008) değiştirilerek yapılmıştır. B. CRL yapısı (Emanuele ve Enrico, 2019)

Cul2: CLR2 kompleksi yapısında yer alır. Adaptör proteinleri Elongin-B ve Elongin-C aracılığı ile substrat reseptör proteinleri olan Von Hippel–Lindau Tumor Suppressor Gene VHL-box proteinlerine bağlanır (3. 11Ab). İnsan üreme hücrelerinde meydana gelen VHL gen mutasyonu bireylerde retinal ve sinir sistemi kanserleri, böbrek kanserlerine sebep olduğu bilinmektedir (Kondo ve Kaelin, 2001). VHL tümör baskılayıcıdır ve anjiyogenez için önemli olan Hypoxia-Inducible Factor- α (HIF- α) bağlanarak degradasyonunda rol oynar (Feng vd., 1999; Ratcliffe vd., 1999). Cul2, *C. elegans* üreme hücrelerinde mayoz-II’de polarite oluşumu (Sonneville, 2004) ve G₁-S fazı için gerekli görülmektedir (Feng vd., 1999). Ayrıca *C. elegans*’da mitotik kromatin ipliklerinin yoğunlaşabilmesi için Cul2’nin gerekli olduğu belirtilmiştir (Feng vd., 1999).

Cul3: Diğer cullin proteinlerinden farklı olarak Cul3, adaptör proteine ihtiyaç duymadan doğrudan supstrat reseptör proteini olan BTB proteinlerine bağlanır ve BCR kompleksini (BTB-Cul-3-Rbx1) oluşturur (Şekil 3.11 Ac) (Chen vd., 2015). BTB proteinleri çok sayıda farklı aileden oluşur ve Cul3, farklı BTB proteinlerine bağlanarak çeşitli hücresel süreçlerde rol oynamaktadır. İnsanda yaklaşık 200 BTB proteini kodlayan genom bulunmaktadır. Ancak bunların hepsi Cul3 ile bağlantı kuramamaktadır (Chen ve Chen, 2016). Cul3, hücresel antioksidan cevabın oluşturulmasında (Furukawa ve Xiong, 2004; Chen ve Chen, 2016) hücre döngüsü (McEvoy vd., 2007; Sumara vd., 2007),

anjyogenez (Kim *vd.*, 2014), hücre farklılaşması (Dubiel *vd.*, 2018) gibi birçok süreçte rol oynar.

Cul4: CLR4 kompleksi alt birimlerinden biridir. Cul4 adaptör proteini DNA Damage Binding Protein-1 (DDB1)'dir. Cul4, DDB1 aracılığı ile substrat reseptör proteini olan WDXR (DXR, Bazı kaynaklarda DCAF) bağlanır (Şekil 3.11 Ad) (Bosu ve Kipreos, 2008). Diğer substrat reseptör proteinlerinde olduğu gibi çok sayıda WDXR proteini mevcuttur (Lee ve Zhou, 2007; Abbas ve Dutta, 2011). DDB1, Cul4 adaptör proteindir. DDB1 geninin farklı canlılarda silinmesi ile mayoz bölünmede problem (Holmberg *vd.*, 2005), erken gelişim sırasında ölüm, bölünmekte olan hücrelerde defektlere sebep olduğu bilinmektedir (Cang *vd.*, 2006). DDB'nin UV ile hasarlanmış DNA ipliklerine bağlanabildiği ve DNA onarımında etkili olduğu düşünülmektedir (Chen *vd.*, 2001).

Cul5: Yapısal olarak Cul2'ye benzerdir. Adaptör proteini Cul2 ile aynıdır ve Elongin-B ve Elongin-C'dir. RING birimi içeren proteinlerden Rbx2 yapısında bulunur. Diğer cullin proteinler Rbx1 alt birimi ile bağlantı kurar. Cul2 ile yapısal farklılığı bu özelliğinden ileri gelmektedir (Lamsoul *vd.*, 2016). Substrat adaptör proteini SOCS'dur (şekil 3.11 Ae). SOCS proteinleri, JAK ve reseptör trozin kinazların negatif düzenleyicisidirler (Mahrouf *vd.*, 2008). Cul5, nöronal göç (Feng *vd.*, 2007; Simo *vd.*, 2010), sitokinlerin salınımı (Feng *vd.*, 2007), hücre döngüsü düzenleyici (Ma *vd.*, 2013; Tapia-Laliena *vd.*, 2019), otofaji (Antonioli *vd.*, 2014) mekanizmalarında rol oynadığı düşünülmektedir (Zhu *vd.*, 2016). Cul5 substrat adaptör proteinlerinden olan SOCS3, karaciğer rejenerasyonu ile ilişkili IL-6'nın inhibitörüdür. (Wüstefeld *vd.*, 2000).

CRL ailesi birkaç alt aileye ayrılır. Bunlar: c-Cbl, BRCA1 (breast cancer 1), BARD1 (BRCA1-associated RING domain 1), APC ve SCF'dir (Cheng *vd.*, 2018). SCF ve APC kompleksleri, hücre döngüsünü düzenlenmesinde etkin rol oynarken; BRCA1/BARD1, DNA onarımında rol oynar.

3.5.1.1. SKP1-CUL1-Fbox (SCF) kompleksleri

SCF kompleksi adaptör proteini Skp1'dir ve substrat reseptörü F-box proteinleridir. Skp-1 ve F-box, Cul-1 tipi proteine bağlanarak substrat proteinlerini tanıyabilir. Cul-1'in diğer ucunda ise Rbx-1 bağlı bulunur ve E2 enzimlerini tanır (Randle ve Laman, 2016;

Zheng, vd., 2016a; Emanuele ve Enrico, 2019). F-box protein ailesi 69 farklı proteini temsil eder (Emanuele ve Enrico, 2019). F-box motifi, protein-protein etkileşimi için gerekli görülmektedir. F-box proteinleri amino terminal yarısında F-box motifi taşıırken; C-ucunda ise leu tekrarları veya WD (Trp-Asp) tekrarları içermektedir. F-box motifi yanında içermiş oldukları aminoasit tekrarlarına göre üç sınıfa ayrılırlar: Fbxl, Fbxw, Fbxo (Kipreos ve Pagano, 2000; Zheng, vd., 2016a).

Fbxw: Bu proteinler N-terminalinde F-box motifi taşıırken, C-terminalinde WD aminoasitlerinin tekrarlarını taşırlar (Kipreos ve Pagano, 2000). Toplam on tanedir (Zheng, vd., 2016a).

Fbxw9: Yapılan literatür araştırmalarına göre Fbxw9 ile ilgili çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Hücre döngüsündeki rolü henüz bilinmemektedir (Zheng, vd., 2016b). Ancak *C. elegans* ile yapılan çalışmada, Fbxw9 (met-15) mutasyonunun, dokunma reseptörü nöronlarının sinaps oluşumunda ve mekanik dokunmaya karşı hissetmede bozulmalar olduğu belirtilmiştir. Doku reseptör nöronlarının hücre iskelet yapılarını düzenleyerek etkili olabileceği gösterilmiştir (Bounoutas vd., 2009; Sun vd., 2013). Transmitterlerin geçişi için gerekli olabileceği belirtilmiştir (Zheng, vd., 2016b).

Fbxl: Bu proteinler N-terminalinde F-box motifi taşıırken; C-terminalinde leu aminoasit tekrarları taşırlar (Kipreos ve Pagano, 2000; Zheng, vd., 2016a). Toplam 22 tane Fbxl proteini vardır. Hücre döngüsünün kontrolünde düzenleyici rol oynadıkları bilinmektedir (Zheng, vd., 2016a).

Skp2 (fbx11): SCF^{skp2} hücre döngüsünün G₁-S geçinin kontrolünde etkindir ve birçok hedef proteini vardır. Bunlardan bazıları hücre döngüsünü düzenleyen Cdk inhibitörleri (p27, p21, p57); p130, siklin-A, siklin-D, E2F1, FOXO1, Myc'dir. Literatürde en çok çalışılan SCF^{skp2} kompleksi hedef proteini p27 ve ikincil hedefi p21'den bahsedilmektedir (Yu vd., 1998; Bhattacharya vd., 2003; Nakayama vd., 2004; Nakayama ve Nakayama, 2006; Chan vd., 2010; K. Liu vd., 2018).

Fbxo: Fbxw ve Fbxl dışında kalan 36 tane F-box motifi taşıyan protein bu ailedendir (Zheng, vd., 2016a). Fbxo alt ailesi üyeleri N-terminalinde F-box motifi taşıırken; C-

terminal ucunca leu ve WD aminoasit tekrarları dışında herhangi bir aktif alt birim taşıyabilir (Kipreos ve Pagano, 2000; Zheng, vd., 2016a). Fbxo ailesinin tam fonksiyonu bilinmemekle birlikte hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Zheng, vd., 2016a).

Fbxo4: SCF^{Fbxo4} telomer uzunluğu, hücresel büyüme ve hücre döngüsü ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Zheng, vd., 2016b). Fbxo4'ün dört izoformu (Fbxo4 α , β , γ , δ) bulunmaktadır (Chu vd., 2014). SCF^{Fbxo4} kompleksi tarafından siklin-D1'i yıkarak hücre döngüsünü düzenler (Lin vd., 2006; Vaites vd., 2011). Fbxo4 geni silinen hücrelerin hücre döngüsünde daha hızlı ilerlediği gözlenmiştir (Lin vd., 2006; Zheng, vd., 2016b). Bazı kanser türlerinde Fbxo4 ekspresyonunun çok düşük olduğu ve Fbxo4'ün olası tümör baskılayıcı faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir (Heo vd., 2016).

Fbxo6: Hücre siklusunun S fazının sonlandırılmasında (Zhang vd., 2009) ve mitoz sırasında kardeş kromatitlerin düzgün ayrılmasında (Xu vd., 2018) görev aldığı bilinmektedir. Yüksek Fbxo6 ekspresyonunun, hücrelerin proliferasyonu üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Xu vd., 2018). Fbxo6'nın hücre döngüsündeki fizyolojik görevinin anlaşılabilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır (Zheng vd., 2016a).

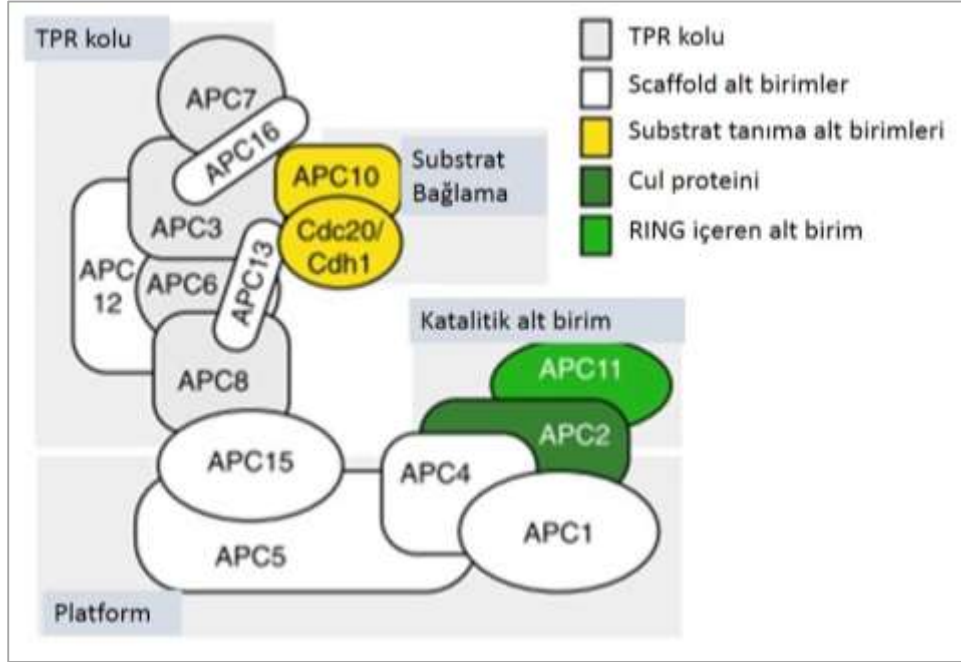
Fbxo11: Fbxo11 nematodlardan memelilere kadar korunmuş bir proteindir (Rossi vd., 2013). Fbxo11 delesyonu veya mutasyonu ile fonksiyon kaybına bağlı Diffuse Large B-Cell Lymphomas (DLBCL) oluşumu gözlenmiştir. Bazı kanser türlerinde (kafa, boyun, kolon, ovaryum, akciğer), Fbxo11 mutasyonu/delesyonu gözlenmiştir; ancak moleküler mekanizması henüz çözülememiştir (Abbas vd., 2013).

Fbxo32 (Atrogin-1, MAFbx(Muscle Atrophy Fbox)): Fbxo32'in kaslara özgü bir gen olduğu ve kas atrofisinde rol oynadığı bilinmektedir (Gomes vd., 2001). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarla kanser türlerinde ifadesinin düşük olduğu gösterilmiştir (Zhou vd., 2017). Fbxo32'nin apoptozun düzenleyicisi (Tan vd., 2007) ve sağ kalım yolağı inhibitörü (Stitt vd., 2004) olabileceği belirtilmiştir. Fbxo32, TGF- β /Smad hedef genlerinden biridir (Chou vd., 2010; Guo vd., 2014) ve TGF- β /Smad, karaciğer rejenerasyonu bitiş fazında proliferasyonu durdurucu etkiye sahiptir (Zhong vd., 2011).

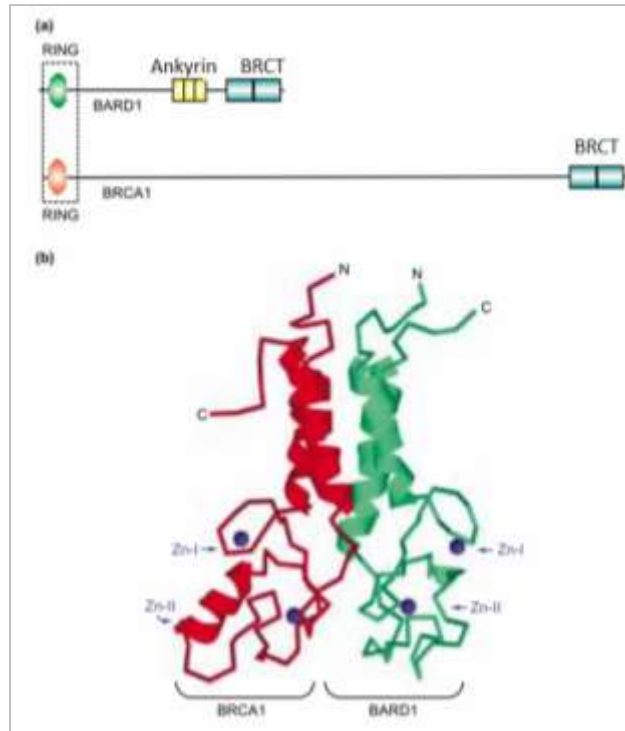
3.5.1.2. Anaphase Promoting Complex (APC/C Kompleksi, Siklozom)

APC/C, E3 ubiquitin ligazlardan CRL grubuna aittir. Diğer E3 ligazlara nazaran oldukça büyük ve kompleks bir yapıya sahiptir (Skaar ve Pagano, 2009; Boer vd., 2016a; Emanuele ve Enrico, 2019). Memelilerde APC/C kompleksi 14 alt birimden oluşmaktadır (Boer, vd., 2016a). Bu alt birimler APC1/TSG24, **APC2**, APC3/Cdc27, APC4, APC5, APC6/Cdc6, APC7, APC8/Cdc23, APC10/Doc1, **APC11 (ANAPC11)**, APC13/SWM1, APC15/Mnd2, APC16 ve Cdc26'dır. Bunlardan APC11, RING yapısına sahiptir ve APC2 Cul-benzeri alt birimi oluşturmaktadır. SCF E3 ligazlara göre daha çok sayıda farklı görevlere sahip altbirimleri vardır ve SCF ligazlar gibi substrat tanıma bölgesi içerir (Zhang vd., 2014). Son yapılan çalışmalara göre APC/C kompleksi üç fonksiyonel alt birimden oluşmaktadır. Diğer APC/C altbirimlerinin tutunabilmesi için iskelet görevi gören bir platform alt birimi, katalitik alt birim ve trikopeptit tekrarları (TPR) kolundan oluşmaktadır (Şekil 3.12). Platform alt birimi, APC1, APC4 ve APC5'den oluşur ve diğer alt birimlerin bağlanabilmesi için platform görevi görür. Katalitik alt birim ise CRL grubu E3 ligazların özelliği olan RING yapısında APC11 ve Cul-benzeri protein olan APC2 alt birimlerini taşımaktadır. Bunların yanı sıra APC10/Doc1 de katalitik alt birimde yer almaktadır. Katalitik alt birim, E2 ligazların bağlandığı bölgedir ve hedef proteinin ubiquitin molekülleri ile işaretlenmesini sağlar. TPR kolunda APC3/Cdc27, APC6/Cdc16 ve APC8/Cdc23 proteinleri yer alır. Bunların yanısıra Cdc26, APC13/Swm1 ve yeni tanımlanan APC16'nın TPR kolunun stabilizasyonunda rol aldığı düşünülmektedir. TPR kolu substrat adaptör tanıma bölgesini oluşturur. APC/C kompleksinin iki substrat adaptör proteini tanımlanmıştır: Cell-Division Cycle Protein-20(Cdc20) ve CDC20 Homologue-1(CDH1) (Şekil 3.12). Bu bölge ayrıca inhibitör olan mitotic checkpoint complex (MCC) ile de bağlantı kurabilir (Pines, 2011; Zhang vd., 2014; Sivakumar ve Gorbsky, 2015).

APC/C kompleksi ile birlikte hedef proteinlere ubiquitin eklenmesi ve zincir uzatılmasında görevli bazı E2 enzimleri tanımlanmıştır. Bunlardan **UBE2C**, hedef proteine ilk ubiquitini ekleyen APC/C kompleksi E2 enzimidir. Diğer ubiquitinasyon başlatıcı enzim ise **UBE2D** olarak tanımlanmıştır. Ubikutin zincirinin uzatılmasından **UBE2S**'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Sivakumar ve Gorbsky, 2015; Kernan vd., 2018).



Şekil 3.12. APC/C E3 ligaz kompleksi yapısı ve alt birimleri (Boer vd., 2016a)



Şekil 3.13 BRCA1 ve BARD1 protein yapısı: (a) Her iki proteinin de yapısında yer alan RING motifi (b) BRCA1/BARD1 E3 ligaz kompleksi (Baer ve Ludwig, 2002)

3.5.1.3. BRCA1/BARD1 E3 ligaz kompleksi

Tümör baskılayıcı genlerden olan BRCA1, meme ve ovaryum kanserleri ile ilişkilidir. DNA onarımı, hücre siklusunun düzenlenmesi, transkripsiyonun ve sentrozom duplikasyonunun düzenlenmesi gibi hücresel süreçlerle de yakın ilişkilidir (Brodie ve Henderson, 2010; Matsuzawa vd., 2014).

BRCA1, BARD1 ile kompleks oluşturur (Şekil 3.13). Yapısal olarak birbirlerine benzerler. BRCA1 proteininin N-terminalinde RING motifi vardır ve C-terminalinde iki tekrarlı BRCT alt birimi içerir (Baer ve Ludwig, 2002). BARD1 ise benzer şekilde N-terminalinde RING motifi taşır ve C terminalinde BRCT alt birimlerinden önce ankyrin tekrarları içerir (Şekil 3.13) (Irminger-Finger vd., 2016). BRCA1 E3 ligaz hakkında bilinenler oldukça sınırlıdır (Shabbeer vd., 2013).

3.5.1.4. Diğer RING E3 ligazlar

Mul1 (mitochondrial E3 ubiquitin protein ligaz, Mulan, Map1, Gide): Mul1, mitokondriyal dinamikler, mitofaji, hücre büyümesi, apoptoz gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynayan fonksiyonel mitokondriyal proteindir. Mul1 RING domainin benzer şekilde $\beta\alpha\beta$ katlanması gösterdiği ancak α -heliksinin daha kısa olduğu belirtilmektedir (Lee, (M. S. vd., 2019). Mul1, diğer organellerde veya sitozolde bulunmaz; sadece mitokondri yapısında yer alan proteindir (Peng vd., 2016).

Mul1 E3 ligazı, Mfn2 (mitofusin-2), AKT, p53 ve ULK proteinlerinin degradasyonunu sağlayarak mitokondriyal dinamik (Mfn2), hücre sağ kalımı (AKT), apoptoz (p53) ve otofajide (ULK) görev alır (Peng vd., 2016). Mul1, bazı hedef proteinlerine SUMO ekleyebilen SUMO ligaz özelliğine sahiptir (Peng vd., 2016).

RNF2: Histon 2A modifikasyonundan sorumludur. Embriyonik kök hücre, erken gelişim ve kanser gelişimi ile ilişkilidir. Bazı kanser türlerinde ifadesinin yüksek olduğu bilinmektedir. HeLa hücrelerinde RNF2 ifadesinin düşürülmesi, hücrelerde şekil bozukluklarına sebep olmuş ve proliferasyonu durdurmuştur. RNF2'nin hücrelerin G₁ fazına geçişini kontrol ettiği düşünülmektedir (Zhang vd., 2017).

RNF6: RING E3 ligazlardandır. RNF6, hücre büyümesi, hücre döngüsünün ilerlemesi, epitelyal-mezenkimal farklılaşma gibi mekanizmaları düzenlemektedir. Wnt β -catenin sinyal yolağının düzenlenmesinde rol oynar. Farelerde RNF6 gen ifadesinin yüksek olması tümör boyutu ve ağırlığının artışı ile ilişkili bulunmuştur (L. Liu vd, 2018).

RNF8: RNF8, E2 enzimi olan Ubc13 (UBE2N)/Mms2 ile heterodimer oluşturur. RNF8, çift DNA kırığının ilerisinde bulunan histon varyantı H2AX'e tek bir ubikutin ekler. RNF168 ise RNF8'in eklediği ubikutin üzerine ubikutin zincirlerini oluşturur. H2AX'e ubikutin zincirlerinin eklenmesi ile lezyonun bulunduğu bölgede kromatinin açılması sağlanarak DNA onarımı için gerekli proteinlerin yerleşmesi sağlanır (Campbell vd., 2012).

RNF20/RNF40: RNF40, başka bir E3 ligaz olan RNF20 ile kompleks oluşturur. Mayalardan memelilere kadar korunmuştur. RNF20/RNF40 heterodimeri mayalarda bre1'e denk gelmektedir (Shiloh vd., 2011) ve DNA onarımında histon modifikasyonundan sorumludur. RNF40/RNF20 E3 ligazı H2B proteinlerine ubikutin ekler. Ancak RNF40/RNF20 kompleksinin DNA onarımındaki rolüyle ilgili bilinenler oldukça kısıtlıdır (So vd., 2019).

RNF34: 2005 yılında hRF1 olarak tanımlanan bu protein anti-apoptotik özelliği ile bilinmektedir. p53'ün ubikutinasyon ve degradasyonunu sağlar. RNF34'ün yüksek ifade edildiği kanserlerde ilaç direnci geliştiği belirlenmiştir (Huo vd., 2017). Beyinde yüksek ifade edilen RNF34, mitokondriyal oksidatif strese bağlı hasara sebep olmuştur (Qu vd., 2019). RNF34'ün kaslarda mitokondriyal biyogenez ile ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Wei vd., 2018).

RNF144B: RNF144B, apoptoz ve hücre proliferasyonu mekanizmalarının düzenlenmesiyle ilişkilidir. RNF144B ifadesinin olmadığı hücrelerde hücre proliferasyonu bozulmuştur (Zhou vd., 2016).

RNF167: RNF167, PA-TM-RING E3 ligaz ailesindedir. Bir sinyal peptidi, PA alt birimi ve RING alt birimine sahip transmembran proteindir. RNF167, endozom, lizozom, plazma membranında yer alır. RNF167'nin vezikül- ilişkili membran protein 3 gibi farklı

hedef proteinleri mevcuttur. Endozomal trafiğin tekrar sirkülasyonu, hücre içinde lizozomun konumlanması ve endozom-lizozom birleşimi üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir (Deshar vd., 2016).

RNF180 (Rines): RNF180, endoplazmik retikulumun sitoplazmaya bakan yüzünde yer alır. RNF180, transkripsiyon faktörü Zic2 ile etkileşir. Beyinde ifadesinin yüksek olduğu bilinmektedir. RNF180, tümör baskılayıcıdır ve apoptozu tetikleyebilir. Mide kanserlerinde ifadesinin düşük olduğu bilinmektedir. *in vivo* fonksiyonu henüz bilinmemektedir (Ogawa vd., 2008; Nakamura, 2011; Deng vd., 2016).

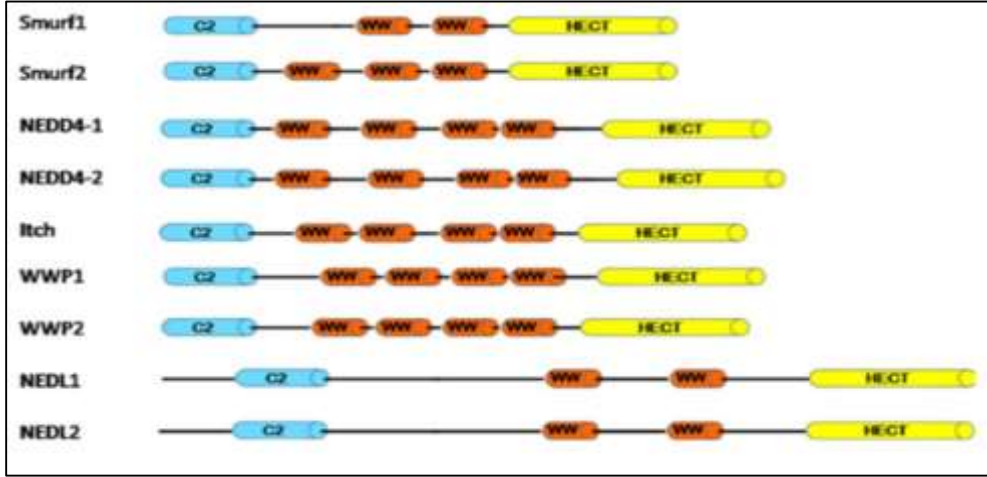
3.5.2. HECT E3 ligazlar

HECT E3 ligazlar, hücre döngüsünün ilerlemesi, proliferasyon, otofaji, inflamasyon gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynarlar. Aktiviteleri titizlikle kontrol edilir ve disregülasyonu kanser, immun hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojilerle ilişkilidir (Wang vd., 2019).

HECT E3 ligazlar çalışma şekli olarak RING E3 ligazlardan farklıdır, RING E3 ligazlarda aktif ubiquitin doğrudan hedef proteine aktarılırken; HECT E3 ligazlarda öncelikle HECT E3 ligaza sonrasında hedef proteine aktarılmaktadır (Bkz Şekil 3.10) (Mani ve Gelmann, 2005; Deshaies ve Joazeiro, 2009).

HECT E3 ligazların C-terminalinde karakteristik HECT altbirimi taşırlar. HECT altbirimi, ubiquitin molekülünü E2 enziminden alıp kendi yapısına aktarır (Wang vd., 2019). HECT E2 enzimi UBE2L3 olarak tanımlanmıştır (Rotin ve Kumar, 2009).

HECT E3 ligazlar, taşıdığı oldukları diğer farklı altbirimlere göre üç gruba ayrılırlar: Nedd4 ailesi (9 üye), HERC ailesi (6 üye) ve diğer HECT'ler (13 üye) (Rotin ve Kumar, 2009). HECT E3 ligazların en çok çalışılmış ve en bilinen ailesi Nedd4 ailesidir. Nedd4 ailesi üyeleri ve yapıları Şekil 3.14'de verilmiştir.



Şekil 3.14. HECT E3 ligaz, Nedd4 ailesi üyeleri ve yapılarının karşılaştırılması (Cao ve Zhang, 2013)

Nedd4 ailesi: Bu aileye ait üyelerin C-terminalinde yer alan HECT domaini yanında N-terminalinde 2-4 tane WW tekrarları içerir. Bu alt birim hücre içi lokalizasyon, substrat tanıma gibi görevleri üstlenmiştir. Nedd4 ailesi 9 üyeden oluşur. Bunlar Itch, Smurf1, Smurf2, Wwp1, Wwp2, Nedd4, Nedd4-2, Hecw1, ve Hecw2'dir (Rotin ve Kumar, 2009; Wang vd., 2019).

Smurf1 ve Smurf2 (Smad ubiquitination regulatory factor 1 ve 2): Smurf1 ve Smurf2 eksikliğinin fareler için ölümcül olduğu gösterilmiştir (Tang vd., 2018). En iyi bilinen özellikleri TGF- β sinyal yolağını inhibe etmeleridir (Rotin ve Kumar, 2009; Koganti vd., 2018).

Smurf ve Smurf2'nin hücre siklusundaki fonksiyonları ile ilgili az sayıda araştırma yer almaktadır. Smurf2'nin, iğ kontrol noktası için gerekli olduğu gösterilmiştir. Smurf2 geninin silinmesi ile iğ iplikleri düzenleme kontrol noktasının bozulmasına bağlı olarak; kromozomların yanlış eşlenmesi ve yanlış ayrılması, olgunlaşmamış anafaz safhasına giriş ve hasarlı sitokinez gözlenmiştir (Osmundson vd., 2008). Smurf2'nin, RNF20 degradasyonunu sağlayarak, histon proteini H2B ubikütinasyonu ile DNA'nın açılmasını engeller. RNF20 ile birlikte çift zincir kırığı onarımında rol oynadığı düşünülmektedir ve tümör baskılayıcı etkisinin olabileceği belirtilmektedir (Blank vd., 2012).

Smurf1'in hücre siklusundaki rolü ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır ve bu çalışmalar son yıllara aittir. 2017 yılına ait çalışmada Smurf1'in Securin degradasyonu ile

kardeş kromatitlerin ayrılmasında rol oynayabileceği belirtilmektedir (Wei, vd., 2017b). Başka bir çalışmada ise hücre siklusunun S fazına ilerleyebilmesi için Smurf1 aracılı Wee1 degradasyonunun gerekli olduğu ortaya konmuştur (Wei, vd., 2017a).

WWP1 (WW Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1): WWP1, nöronal polarizasyon, hücre protein trafiği, degradasyon, transkripsiyon, sinyalizasyon gibi hücresel süreçlerde rol oynar. Kanser, nöral hastalıklar, enfeksiyonel hastalıklar ve yaşlanma ile ilişkilidir (Zhi ve Chen, 2012; Wang vd., 2019). Çeşitli kanser türlerinde ifadesinin düşük olduğu ya da hiç olmadığı bilinmektedir (Rotin ve Kumar, 2009). Hedef proteinleri arasında p53, p63, büyüme inhibitörü olan KLF2, KLF5, JunB, HER4, TGF- β yer almaktadır (Zhi ve Chen, 2012; Wang vd., 2019). TGF- β 'nin WWP1 ekspresyonunu tetiklediği bulunmuştur ve WWP1'in olası bir negatif feedback mekanizması ile TGF- β sinyal yolağını düzenlediği düşünülmektedir (Zhi ve Chen, 2012).

ITCH: Bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde rol oynar (Rotin ve Kumar, 2009). ITCH gen mutasyonuna sahip farelerde, yardımcı T hücre farklılaşması bozukluğu olduğu belirlenmiştir (Rotin ve Kumar, 2009). Akut dermatit, sedef hastalığı gibi bazı otoimmün hastalıklarla ilişkilidir (Yosipovitch ve Papoiu, 2008). ITCH, JunB'nin (Li vd., 2016) düzenlenmesinde etkilidir. ITCH, p53 ile ilişkili olan ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan p73'ü (Oberst vd., 2005; Rossi vd., 2005; Yosipovitch ve Papoiu, 2008) ve p63'ü (Melino vd., 2006; Rossi vd., 2006) düzenler. ITCH, Kaspaz-8 inhibitörü FLIP'i parçalayarak hücrelerin apoptozunda rol oynar (Liao vd., 2013). Bununla birlikte ITCH, TGF- β sinyalinin pozitif düzenleyicisi (Bai vd., 2004) ve hematopoietik kök hücrelerin negatif düzenleyicidir (Rathinam vd., 2011).

3.5.3. RBR E3 ligazlar

RBR E3 ligazlar, yapısal olarak RING E3 ligazlara benzemesine rağmen; çalışma prensibi olarak HECT E3'lere benzemektedir (Zinngrebe vd., 2013; Walden ve Rittinger, 2018). Bunlar iki tane RING alt birimi (RING1 ve RING2) ve bunların arasında yer alan ring finger (RBR) alt birimlerinden oluşur. 14 üyesi vardır (Çizelge 3.1).

Parkin ile Arih1 (Ariadne RBR E3 Ub protein ligase 1) bu grupta yer alır (Villa vd., 2017) ve her ikisi de mitofajide görev alır (Villa vd., 2018).

Çizelge 3.1. RBR E3 ligazlar (Smit ve Sixma, 2014)

RBR-E3 LİGAZLAR	
İsmi	Alternatif İsmi
ARIH1	ARI1,HHARI
ARIH2	ARI2,TRIAD1
CUL9	PARC,H7-AP1, KIAA0708
ANKIB1	KIAA1386
PARK2	PRKN, PARKIN
RNF144A	KIAA0161, hUIP4, UBCE7IP4,
RNF144B	P53RFP, IBRDC2
RBCK1	HOIL-1L, RNF54,XAP3
RNF19A	DORFIN
RNF19B	NKLAM, IBRDC3, DJ174N9.1
RNF31	HOIP, PAUL, ZIBRA
RNF216	ZIN, TRIAD3, UBCE7IP1
RNF14	ARA54
RNF217	C6orf172, IBRDC1, FLJ16403

Parkin (Park2): Parkin, mitokondriyal depolarizasyon sonrası mitofajide PINK1 (PTEN induced putative kinase 1) ile birlikte görev yapar (Montava-Garriga ve Ganley, 2019). Her iki proteinin birlikte mutasyonu ailesel Parkinson hastalığına sebep olur (Montava-Garriga ve Ganley, 2019).

Arih1 (Ariadne RBR E3 Ub protein ligase 1): Yapısal olarak Parkin’le benzer özellik gösterebilir birçok yönden farklılıklar içerir. Parkin genellikle nöronal hücrelerde sentezlenir ve kanser hücrelerinde bulunmazken; Arih1 pluripotent kök hücrelerde ve çeşitli kanser hücrelerinde sentezlenir. Her ikisi de aynı E2 konjuge edici enzimi (UBE2L3) kullanır. Ancak hedef aldıkları proteinler farklıdır (Villa vd., 2018). Kemoterapi ajanları tarafından ekspresyonu artırılabilir ve kanser hücrelerini kemoterapiden koruyarak ilaç direnci gelişimine katkı sağlar (Villa vd., 2017, 2018; Macleod, 2020).

RNF144B (Ring Finger Protein 144B, PIR2, KIAA0161, hUIP4, UBCE7IP4): E2 enzimlerinden UBE2L3 ve UBE2L6 ile çalışır. İlişkili olduğu proteinler arasında p53, p63, p73, p21 ve Bax yer almaktadır (Spratt vd., 2014).

3.6. E2 Ubikutin Konjuge Edici Enzimler

E2 enzimleri, ubikutinlerin hücrel proteinlere eklenmesini sağlar. Yaklaşık 35-40 civarında E2 enzimi bulunmaktadır (Kumar vd., 2015; Alpi vd., 2016). E2 enzimleri, bir E1 enzimiyle ve bir veya daha fazla sayıda E3 enzimi ile bağlantı kurabilir (Stewart vd., 2016). Bu özelliklerinden dolayı ubikutin yolağının önemli parçasını oluştururlar (Papaleo vd., 2012). Hücre siklusu, DNA onarımı gibi önemli hücrel süreçlerde rol oynar (Hosseini vd., 2019).

Bütün E2'lerin ortak özelliği, katalitik bir çekirdeğe sahip olmalarıdır ve bu alt birim Ubikutin kojuje edici altbirim (UBC) olarak adlandırılmaktadır (Alpi vd., 2016). Yapılan araştırmalarda 4 sınıfa ayrıldıkları gösterilmektedir (Oughtred vd., 1998; Hosseini vd., 2019). Sınıf I E2 enzimleri yalnızca UBC altbirimi içerirken; sınıf II ve III E2 enzimleri UBC alt birimine ek, sırasıyla, N ve C-terminal alt birimlerini de içerir. Sınıf IV E2 enzimleri N ve C-terminal alt birimlerin ikisini birlikte içerir (Hosseini vd., 2019). Çizelge 3.2'de E2 enzimleri yer almaktadır.

UBE2A-UBE2B (Rad6A-B): UBE2A ve UBE2B transkripsiyon ve DNA onarımında rol oynayan E2 enzimleridir. UBE2A, UBE2B ile %95 homoloji gösterir ve mayalardaki Rad6'nın homologudur (Bruinsma vd., 2016). UBE2A geni X kromozomlarından biri ile ilişkili iken; UBE2B otozomaldir. UBE2A'da meydana gelen mutasyonlar, dişilerde X kromozomuna bağlı mental retardasyona sebep olmaktadır (Nascimento vd., 2006). Bununla birlikte UBE2A, Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarla da ilişkilidir (Zhao vd., 2016). UBE2B mutasyonlarının erkek bireylerde infertiliteye sebep olduğu bilinmektedir (de Oliveira vd., 2019). UBE2A/B, histon proteini H2B'nin monoubikütinasyonunu sağlar ve RNF20/40 ile birlikte iş görür (Pavri vd., 2006; Mulugeta Achame vd., 2010; Kumar vd., 2015). En iyi bilinen hücrel mekanizması DNA hasarının tolere edilmesi üzerinedir.

Çizelge 3.2. E2 enzimleri ve biyolojik fonksiyonları (Hosseini vd., 2019).

E2 ENZİMLERİ VE BİYOLOJİK FONKSİYONLARI	
Adı	Fonksiyonu
UBE2A	DNA Onarımı, Transkripsiyonun düzenlenmesi
UBE2B	DNA Onarımı, Hücre Döngüsü, Spermatogenez
UBE2C	Hücre Döngüsü
UBE2D1	DNA Onarımı, Demir Transportu
UBE2D2	DNA Onarımı, Parkin Aracılı Mitofaji
UBE2D3	DNA Onarımı, NF- κ B sinyali
UBE2D4	DNA Onarımı
UBE2E1	PTEN ubiquitinasyonu ve transportu
UBE2E2	Glukoz Dengesi
UBE2E3	Nrf2 Transportu
UBE2F	Protein Nedilasyonu
UBE2G1	İskelet kası proteini düzenlenmesi
UBE2G2	ER ilişkili degradasyon (ERAD)
UBE2H	Histon ve hücre iskeleti ubiquitinasyonu
UBE2I	SUMO E2
UBE2J1	ERAD, Spermiogenezis
UBE2J2	ERAD
UBE2K	Poliglutamin B'nin Agregat Oluşumu
UBE2L3	proteinler
UBE2L6	NF- κ B sinyali
UBE2M	Protein Nedilasyonu
UBE2N	DNA Onarımı
UBE2O	AMPK α 2 Ubikütinasyonu ve degradasyonu, MLL Degradasyonu , Endositik Trafik
UBE2Q1	β -catenin-EGFR-PI3K-AKT-mTOR sinyali
UBE2Q2	Apoptoz
UBE2R1	Hücre Döngüsü
UBE2R2	β -catenin degradasyonu
UBE2S	Hücre Döngüsü
UBE2T	DNA Onarımı
UBE2U	DNA Onarımı
UBE2W	α -amino grup ubiquitinasyonu için E2
UBE2Z	FAT10 Konjugasyonu

UBE2C (UbcH10): UBE2C, E2 enzimlerinden Sınıf III'e aittir. 179 aminoasit içerir ve molekül ağırlığı 19.65 kDa'dur (Xie vd., 2014). E3 ligazlardan APC/C kompleksi ile birlikte çalışan E2 enzimidir. APC/C kompleksi APC2 (ANAPC2) ve APC11 (ANAPC11) içeren 14 alt birimden oluşmaktadır. UBE2C mitotik siklinlerin ve mitozla ilişkili substratların yıkımı için gereklidir. Metafaz sırasında UBE2C, APC/C^{Cdc20} aracılığı ile securin ve siklin-B'nin yıkılmasını teşvik ederek anafaza doğru ilerlemeyi teşvik eder. "APC/C kompleksi" başlığı altında daha detaylı bilgi verilmiştir (Bkz Şekil 3.12).

UBE2D (UbcH5): 4 farklı UBE2D (UBCHL5) aile üyesi vardır. Bunlar UBE2D1 (UbcH5a), UBE2D2 (UbcH5b), UBE2D3 (UbcH5c) ve UBE2D4 (UbcH5d)'dür (Stewart vd., 2016). APC/C kompleksi ile birlikte çalıştığı belirtilen E2 enzimlerinden biridir (Jin vd., 2008; Barford, 2011; Zhang vd., 2014). DNA onarım mekanizmalarının düzenlenmesinde (Yang vd., 2013), Parkin-aracılı mitofajide (Geisler vd., 2014) görev aldığı bilinmektedir.

UBE2J (Ubc6): UBE2J1 ve UBE2J2 olmak üzere iki türü vardır. ER'de yer alır (Hosseini vd., 2019). ER, hücrede proteinlerin salgılanmasından ve doğru katlanmasından sorumlu organeldir. Ancak artan çevresel sorunlar proteinlerin yanlış katlanmasına sebep olabilir. Bunun sonucunda yanlış katlanmış proteinler için hücrel yanıt oluşur. Hücreleri proteotoksisteden korumak için ER-aracılı degradasyon (ERAD) sistemi aktif edilir. ERAD, yanlış katlanmış proteinlere karşı verilen yanıtta görevli temel mekanizmadır ve bir ubiquitin–proteozom sistemidir. UBE2J2 ise ERAD'ın başlıca enzimlerinden biridir (Lam vd., 2014). UBE2J2, hidroksil eklenmiş aminoasitlerin yıkımından sorumludur (Wang vd., 2009). Kanser hücrelerinin invazyonunda ve hücre farklılaşmasında etkin olduğu düşünülmektedir (Chen vd., 2017).

UBE2Q: Üç farklı çeşidi vardır. Bunlar UBE2Q1, UBE2Q2, UBE2QL'dir (Stewart vd., 2016). Görevleri tam olarak bilinmemekle birlikte; birçok kanser türünde (hepatosellular karsinoma, meme, kolorektal kanser, lösemi) ifadelerinin yüksek olduğu bilinmektedir (Zhang vd., 2018; Hosseini vd., 2019). UBE2Q1'in proliferasyonda rol oynadığı düşünülmektedir.

UBE2T (FANCT): DNA onarımında rol oynayan Fankoni yolağına ait bir proteindir. Fankoni yolağında meydana gelen mutasyonlar fankoni anemisi (FA) olarak adlandırılan genetik bir hastalığa sebep olmaktadır ve hastaların kansere yakalanma riski yüksektir (Krishnan vd., 2016). Hastalarda kemik iliği yetmezliği, hipopigmentasyon görülür. Renal, kardiyak, gastrointestinal ve üreme sistemleri de etkilenir. FA hastalarında DNA zinciri çapraz bağ hasarının tamir edilemediği bilinmektedir. Bu hastalarda artmış DNA hasarlarına bağlı hematopoietik kök hücre yetmezliği ve kanser gözlenir (Moldovan ve D'Andrea, 2009).

3.7. E1 Enzimleri

UBA1: UBA1 ve UBA6, ubikutin aktive edici E1 enzimleridir. Diğer UBA ailesi, ubikutin benzeri proteinlerin (SUMO, Nedd4, ISG15 gibi) aktivasyonundan sorumludur (Moudry vd., 2012). UBA1 iki basamakta (adenilasyon ve tiyoester bağının oluşturulması) ubikutin aktivasyonunu gerçekleştirir. Aktif ubikutin, daha sonra E2 enzime aktarılır (Liu vd., 2017; Williams vd., 2019). UBA1, hücre döngüsünün G₁-S fazı geçişinde rol oynayan Cdc34 degradasyonunda görevlidir (Williams vd., 2019).

UBA2: Ubikutin benzeri moleküllerden biri de SUMO'dur. SUMO, 100 aminoasitten oluşan bir polipeptittir ve hedef proteinlere eklenmesinde ubikutinasyona benzer şekilde üç enzim görevlidir. Heterodimer Aos1/Uba2 enzimi SUMO aktifleyici E1 enzimidir. Aktif SUMO molekülü E2 enzimi olan Ubc9'a aktarılır ve sonrasında E3 aracılığıyla hedef proteine bağlanır (Di Bacco ve Gill, 2006). Günümüzde dört tane SUMO ligaz tanımlanmıştır (Eifler ve Vertegaal, 2015).

UBA3: Nedilasyonda görevli E1 enzimlerinden biridir (Diğeri NAE'dir). NEDD8, ubikutin ile %60 benzerlik göstermektedir. Nedilasyon, ubikutinasyona benzer şekilde E1, E2, E3 enzimleriyle gerçekleştirilir. NEDD8, heterodimer yapıdaki APPBP1/UBA3 E1 enzimi aracılığı ile aktive edilir. Aktif NEDD8 sonrasında E2 enzime (UBC12) aktarılır (Chen vd., 2012). NEDD8 modifikasyonları, hedef peroteinlerin yapısında konformasyonel değişiklik sağlayarak; lokalizasyonunu ve DNA'ya/proteinlere bağlanma afinitesini düzenler. Nedilasyon mekanizmasındaki bozukluklar tümör, nörodejenerasyon, inflamasyon, immün yetmezlik ve kalp yetmezliği gibi patolojilere neden olur (Chen vd., 2012).

UBA5: UFMilasyonda görevli E1 enzimidir. Ubiquitin-fold modifier1 (UFM1), ubikutin benzeri moleküllerden biridir. UBA5, UFMilasyonda görev alan E1 enzimidir. E2 benzeri enzimi UFC1'dir ve E3 benzeri enzimi UFL1'dir. UFMilasyon daha az bilinen bir mekanizmadır (Qin vd., 2019). UFMilasyon, hematopoietik kök hücreler için gereklidir (M. Zhang vd., 2015; Lee L. vd., 2019). Son yapılan çalışmalar DNA ipliğinde meydana gelen çift zincir kırığı onarımı için oluşturulan hücresel yanıtta ATM aktivasyonu için UFMilasyonun gerekli olduğunu ortaya koymaktadır (Qin vd., 2019).

UBA6: UBA6, ubikutin molekülünün aktiflenmesinden sorumlu iki E1enziminden biridir. UBA6, ubikutin aktivasyonu yanı sıra; ubikutin benzeri başka bir molekül olan FAT10 modifikasyonunu da sağlar. FAT10 modifikasyonuna bağlı proteinlerin yıkılması, bağışıklık ve metabolizma ile ilişkili görünmektedir. UBA6 aracılı ubikütinasyon embriyonik gelişim için gerekli görünmektedir. UBA6 yoksunu hücrelerin sürekli hücre döngüsüne devam ettiği ve kendiliğinden epidermal-mezenkimal geçişe sebep olduğu belirtilmiştir (Liu vd., 2017).

3.8. Ubikutin Yolağının İlişkili Olduğu Hücresel Mekanizmalar

3.8.1. Hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan E3 ubikutin ligazlar

PH sonrası karaciğer, organizmanın fonksiyonel ihtiyaçlarını karşılayabilecek boyutlara ulaşabilmesi için hızlıca rejenere olmalıdır. Bu amaçla PH ile birlikte durağan hücreler G₁ fazına geçerler. PH sonrası 72-96 saat içinde hücreler mitozu tamamlar (Fausto, 2000).

Hücre döngüsü siklin/Cdk'lar aracılığı ile düzenlenir. Döngü boyunca siklin/Cdk'lar dinamik değişikliklere uğrayarak hücrelerin siklus boyunca ilerlemesini sağlarlar. Hücre döngüsünün doğru zamanlamayla ilerleyebilmesi için siklin/Cdk'ların ve bazı proteinlerin doğru zamanlama ile yıkılması gerekir. Bu görevi E3 ubikutin ligazlar üstlenmiştir (Kernan vd., 2018).

Hücre siklusunu düzenleyen E3 ligazlardan en çok çalışılanları Anaphase Promoting Complex (APC/C) ve Skp1-Cul1-Fbox (SCF) kompleksleridir. Bunlar hücre siklusu kontrol noktalarından geçişin sağlanması, DNA replikasyonunun sadece bir kez çoğaltılması ve kromozomların kardeş kromatidlere düzgün ayrılması gibi önemli görevleri bulunmaktadır (Koepp vd., 1999; Peters, 2002; Wu vd., 2016).

Hücre döngüsü kontrol noktaları, hücre döngüsü sırasında bir önceki evredeki olaylar tamamlanmadan sonraki evreye geçişi engellemeyi amaçlar. DNA hasarı kontrol noktası olarak adlandırılan kontrol noktaları, hasarlı DNA'nın kopyalanarak yavru hücrelere geçmesini engeller. Bu kontrol noktaları hasarlı ya da replikasyonunu tamamlamamış DNA'yı algıladıklarında, hücre döngüsünü replikasyon tamamlanincaya

kadar ya da hasarı onarıncaya kadar durdurur. Dört tane hücre döngüsü kontrol noktası vardır. G_1 sonunda yer alan **G_1 -S kontrol noktasında** büyüme faktörleri yoksa hücreler durağan G_0 evresine geçerler. G_1 -S kontrol noktasının geçilebilmesi, hücrenin replikasyon için gerekli proteinlerin yeterli miktarda olmasını gerektirir (Mullany vd., 2008). **S kontrol noktası**, DNA'nın bütünlüğünü sürekli denetleyerek hasarlı DNA'nın onarılmadan kopyalanmasını engeller. S kontrol noktası replikasyon sırasında ortaya çıkabilen çeşitli DNA hasarlarını da belirleyerek replikasyon sırasında DNA'nın kalite kontrolünü de gerçekleştirir. Replikasyon çatalının durması da S kontrol noktasını aktive eder (Taylor ve Stark, 2001) **G_2 kontrol noktası**, DNA tamamen replike olmadan ya da DNA hasarı tamamen onarılmadan M evresine geçişi engeller. G_2 kontrol noktası replikasyonun tamamlanması ve DNA hasarının onarımı için hücreye zaman kazandırır (Taylor ve Stark, 2001). Kromozomların düzgün ayrılmasını kontrol eden diğer önemli kontrol noktası **İğ kontrol noktasıdır** (Cooper, 2016).

Mitoz sırasında kromozomların hepsinin doğru şekilde İğ ipliklerine tutunması İğ kontrol noktası tarafından denetlenir. İğ ipliklerine bağlanmamış tek bir kinetokorun kalması hücre döngüsünün İğ kontrol noktasını aktive eder ve hücre siklusu metafaz safhasında durdurulur. İğ kontrol noktasında, kardeş kromatidlerin İğ ipliklerine doğru bağlanması ve kutuplara ayrılması iki temel mekanizma ile düzenlenir. Bunlar E3 ligazlar olan APC/C^{Cdc20} ve APC/C^{Cdh1} kompleksleridir (Deng, 2006). APC/C aktivitesi hücre siklusu sırasında hassas şekilde kontrol edilir. (Kernan vd., 2018). APC/C^{Cdc20} erken ve orta mitoz evrelerinde rol oynarken; APC/C^{Cdh1}, mitotik çıkış, G_1 fazı ve G_1 -S kontrol noktasının düzenlenmesinde rol oynar (Malumbres ve Barbacid, 2009; Sivakumar ve Gorbsky, 2015). SCF^{Skp2} E3 ligaz kompleksi ise hücrelerin S evresine geçişini düzenler (Rowlands vd., 2004).

Hücre döngüsünün erken G_1 fazında APC/C, adaptör proteini Cdh1'e bağlanır ve APC/C^{Cdh1} kompleksi oluşur. APC/C^{Cdh1} kompleksinin degradasyona uğrattığı hedef proteinlerden ikisi Skp2 ve siklin-A'dır (Pines, 2011).

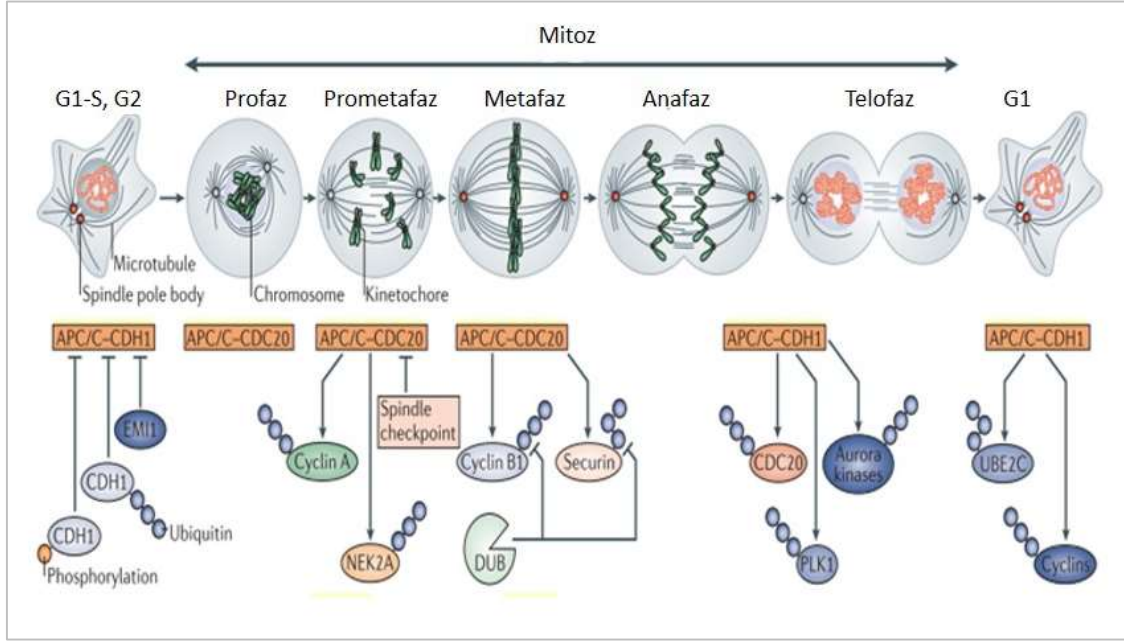
Siklin-A, S fazına girilmesi ile birlikte siklin-A\Cdk2 kompleksini oluşturur ve bu kompleks DNA replikasyonunun başlaması için gereklidir (Albrecht vd., 1998; Starkel vd.,

2005; Karimian vd., 2016). Geç S fazında siklin-A, siklin-A\Cdk1 kompleksini oluşturur ve bu kompleks G₂ fazına geçilmesine yardımcı olur (Abu Rmilah vd., 2019).

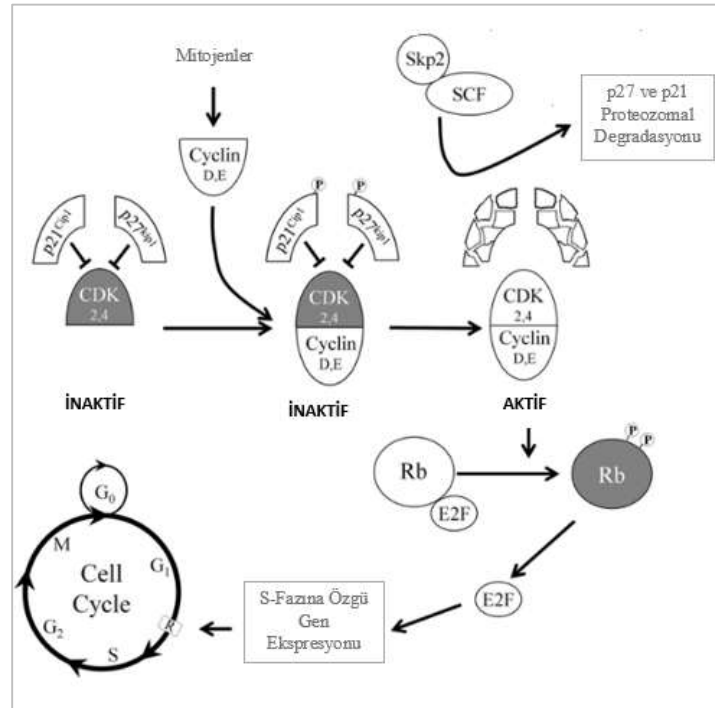
Skp2 ve siklin-A, G₁ fazında oluşan APC/C^{Cdh1} kompleksi tarafından yıkılır. Bunun sonucu p27 miktarı artar ve S fazı için gerekli olan siklin-A\Cdk1,2 kompleksi oluşamaz (Pines, 2011). Artmış p27 miktarı hücrelerin G₁-S kontrol noktasında durmasını sağlar. Buna ek olarak ortamda siklin A\Cdk1,2 komplekslerinin oluşmaması da eklenince; G₁-S kontrol noktasında güçlü bir inhibe edici kontrol mekanizması ortaya çıkar. APC/C^{Cdh1} kompleksi aracılığı ile gerçekleşen kısa süreli bu mola, replikasyon orjini için gerekli olan proteinlerin toplanması için zaman kazandırır (Pines, 2011).

G₁-S kontrol noktasının geçilebilmesi APC/C^{Cdh1} E3 ligaz kompleksinin E2F'nin serbest kalmasına bağlı inhibisyonu ile mümkün görünmektedir (Albrecht vd., 1998; Kato vd., 1998; Abu Rmilah vd., 2019). Serbest kalan E2F siklin-A ve Early Mitotic İnhibitor 1 (EMI1)'in ifadelerini artırır. EMI1, APC/C^{Cdh1} kompleksi inhibitörüdür. APC/C^{Cdh1}'in inhibe edilmesi ile birlikte hedef proteini Skp2 miktarı artar, p27 baskılanır ve hücreler S fazına doğru ilerler (Şekil 3.15) (Pines, 2011). SCF^{skp2} kompleks oluşumu, Siklin-D, PI3K, ERK, büyüme faktörleri, PI3K/Akt, Notch, NFκB sinyal yollarının katkısıyla daha da artar (Rowlands vd., 2004; Chan vd., 2010).

SCF^{skp2} kompleksi hücre siklusunun G₁-S kontrol noktasında p27 ve p21'in ubiquitinasyonu ve yıkımından sorumlu E3 ligazdır (Kitagawa ve Kitagawa, 2016). S fazına geçilebilmesi, Cdk inhibitörlerinden p27 ve kısmen p21'in yıkımını gerektirir (Rowlands vd., 2004). p21 ve p27'nin SCF^{skp2} E3 ligaz tarafından parçalanmasıyla hücreler S fazına doğru ilerler (Nakayama ve Nakayama, 2006). p27, cyclin E/Cdk2 tarafından fosforillenerek işaretlenir ve böylece SCF^{skp2} kompleksi tarafından tanınarak degradasyona uğrar (Şekil 3.16) (Nakayama vd., 2004; Emanuele ve Enrico, 2019). p27'nin ubiquitinasyonu ve degradasyonu sırasında, SCF^{skp2} kompleksi, Cks1 kofaktörüne ihtiyaç duyar (Chan vd., 2010).



Şekil 3.15 APC/C^{Cdc20} ve APC/C^{Cdh1} kompleksleri ve hücre siklusunun kontrolü (Sivakumar ve Gorbsky, 2015)

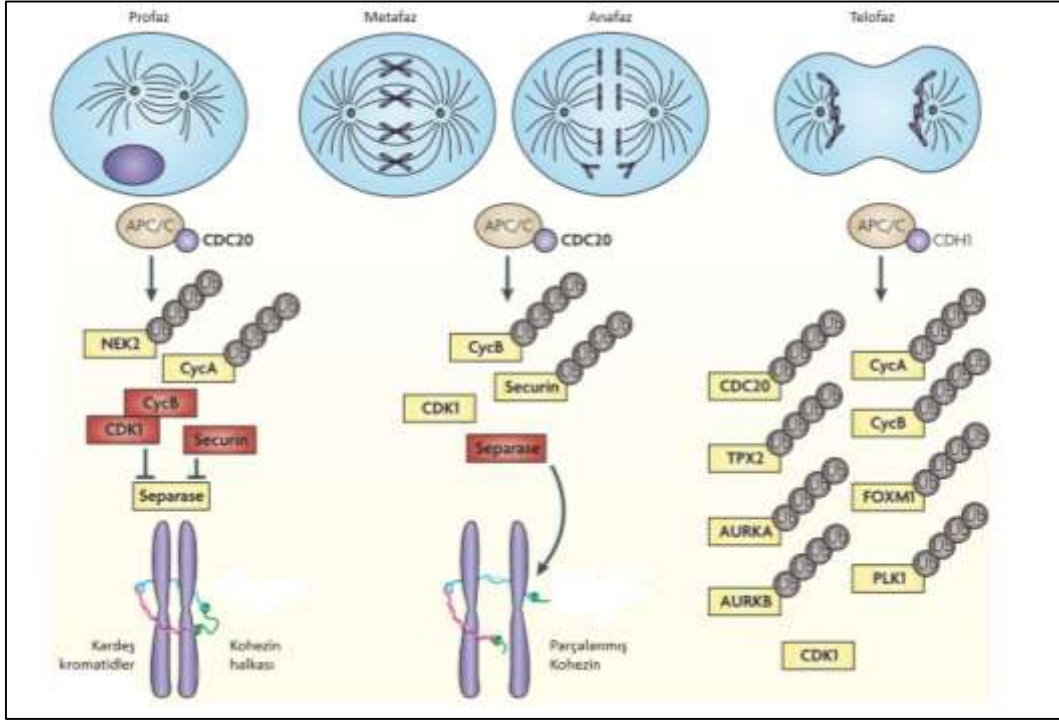


Şekil 3.16. Hücre döngüsü inhibitörlerinden p27 ve p21'in SCF^{skp2} E3 ligaz kompleksi tarafından degradasyonu ile hücrelerin G₁-S kontrol noktasından (R) geçişi mekanizması (Bond ve Wu, 2011).

Skp2 seviyesinin, hücre döngüsünün erken G₁ ve M fazlarında düşük olduğu; G₁-S kontrol noktasının aşılacağı sırada arttığı bilinmektedir (Chan vd., 2010). Skp2 Akt ve Cdk2 aracılığıyla fosforillenir (ser64 ve ser72) ve stabil hale gelir. Stabil Skp2'e APC^{Cdh1} kompleksi bağlanamaz ve degradasyonu engellenmiş olur (Chan vd., 2010). APC^{Cdh1} kompleksi tarafından SCF^{skp2} kompleksinin yıkımı titizlikle kontrol edilmektedir ve bu mekanizma hücrelerin S fazına erkenden girmesini engellediği için önemlidir (Bond ve Wu, 2011).

APC/C^{Cdc20} erken ve orta mitoz evrelerinde rol oynar (Musacchio, 2015; Boer, vd., 2016a). Mitoz metafazında, kardeş kromatitler kinetokor bölgesinden iğ ipliklerine tutunması aracılığıyla APC/C^{Cdc20} kompleksi aktive olur (Deng, 2006). Metafazda sıraya girmemiş tek bir kromozom varlığında dahi APC/C^{Cdc20} aktivasyonu baskılanır (Cooper, 2016).

APC/C^{Cdc20} aktivasyonu, henüz iğ ipliklerine tutunmamış kinetokorlar üzerinde oluşan MCC (BubR1- Bub3-Mad2-Cdc20 complex) kompleksi tarafından kontrol edilir (Cooper, 2016). BubR1-Bub3-Cdc20 ve Mad2-Cdc2 kompleksi birleşerek MCC kompleksini oluşturur. Cdc20, MCC kompleksi yapısına bağlı kaldığından APC/C^{Cdc20} kompleksi oluşamaz ve inaktiftir. MCC kompleksi, APC/C^{Cdc20} kompleksi oluşumunu engellemiş olur (Deng, 2006). Bütün kromozomlar aynı hizaya gelip iğ ipliklerine tutununcaya kadar APC/C^{Cdc20} aktiflenmez (Boer vd., 2016). Metafaz evresinde iğ mikrotübülleri kinetokorlara bağlandıklarında MCC kompleksi oluşamaz ve Cdc20 serbest kalır. Cdc20 adaptör proteini, APC/C'e bağlanarak APC/C^{Cdc20} kompleksini oluşmasını sağlar. APC/C^{Cdc20} kompleksinin hedef proteinlerinden biri securindir. Securin, seperaza bağlı bulunarak aktivasyonunu engeller. Seperaz, kardeş kromatidleri bir arada tutan kohezinleri parçalamakla görevlidir ve normal koşullarda securine bağlı formda inaktiftir. Ancak mitoz metafazında kromozomların hepsi aynı hizaya geldiğinde APC/C^{Cdc20} kompleksi oluşur ve securini parçalar. Securin'in parçalanması ile serbest kalan seperaz, kardeş kromatidleri birarada tutan kohezinleri parçalayarak ayrılmasını ve kutuplara doğru hareket etmesini tetikler (Şekil 3.17) (Musacchio ve Salmon, 2007; Musacchio, 2015; Sivakumar ve Gorbsky, 2015).



Şekil 3.17. Kardeş kromatitleri bir arada tutan kohezinlerin kontrolü (Malumbres ve Barbacid, 2009).

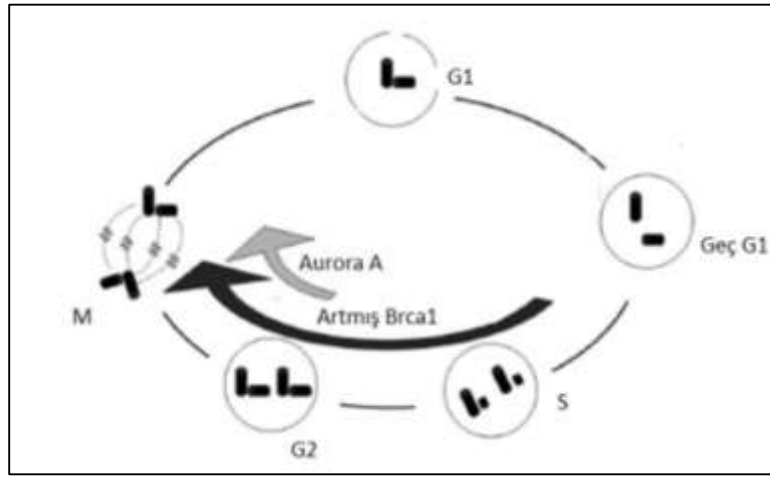
Anafaz safhasında Cdh1, Cdc20 ile yer değiştirerek tekrar APC/C^{Cdh1} kompleksini oluşturur. APC/C^{Cdh1} kompleksinin substratları arasında siklin-A, siklin-B, Aurora A, Aurora B, Cdc20 ve DNA replikasyon proteinleri olan CDC6, Geminin ve Skp2 yer alır. Mitozdan çıkış sırasında bu proteinlerin degradasyonu ile birlikte Cdk1 aktivasyonu engellenir ve hücre döngüsü G₁ fazına doğru ilerler (Malumbres ve Barbacid, 2009).

3.8.2. Sentrozom duplikasyonu

BRCA1/BARD1 kompleksi sentrozom duplikasyonunda rol oynar. Sentrozom mitoz sırasında mikrotübül ağını düzenleyerek bipolar iğ ipliklerini oluşturur ve herbir kardeş kromatidin kutuplara eşit ayrılmasını sağlar. Sentrozom veya iğ ipliklerinde meydana gelen aksaklıklar kromozomların iki hücreye eşit dağılımını engeller (Deng, 2002; Kais ve Parvin, 2008).

Hücre siklusunda sentrozomlar sadece bir kez çoğalırlar ve mitoz sonunda herbiri bir yavru hücreye geçer (Kais ve Parvin, 2008). Sentrozom duplikasyonu geç G₁ fazında başlar ve S fazı boyunca devam eder (Deng, 2002) ve beş fazda gerçekleşir. Bu fazlar

disoryantasyon, duplikasyon, uzama, olgunlaşma ve ayrılma olarak adlandırılır. Hücre siklusunun geç G₁ fazında sentrozom, sentriollerine ayrılmaya başlar. Ayrılmış olan her bir sentriol ana sentriolü oluşturur ve kardeş sentrioller sentezlenmeye başlar. Sentez, erken S fazında devam eder ve kardeş sentrioller, ana sentriollerin yanında yer alırlar. Geç S fazında yeni oluşan sentriollerin uzaması başlar ve G₂ fazında da devam eder. G₂ fazı sentrozomların olgunlaştığı safhadır ve γ -tubulin molekülleri birikerek bağlanmaya başlar. Ayrılma safhasında sentrozomlar birbirinden ayrılarak, nükleusun karşıt kutuplarına doğru ilerler ve iğ ipliklerini oluşturur (Şekil 3.18) (Kais ve Parvin, 2008).



Şekil 3.18. Sentrozom duplikasyonu ve BRCA1/BARD1 ilişkisi (Kais ve Parvin)

BRCA1/BARD1 E3 ligaz kompleksinin hücre içinde bulunduğu yerlerden biri de sentrozomlardır. BRCA1/BARD1 E3 kompleksi, iğ mikrotübüllerini oluşturan γ -tubulin moleküllerini ubiquitinleyerek yıkar ve iğ ipliklerinin oluşumunu engeller. Geç G₁ fazından itibaren artış gösteren BRCA1, sentrozomların tekrar tekrar duplike olmasını engeller (Deng, 2002; Kais ve Parvin, 2008; Parvin *vd.*, 2010). Geç G₂ fazında sentrozomlarda yer alan Aurora A Kinaz, BRCA1'i fosforilleyerek inhibe edici etkisini ortadan kaldırır ve mitoz için iğ iplikleri oluşmaya başlar (Şekil 3.18) (Kais ve Parvin, 2008). BRCA1/BARD1 E3 kompleksi yanı sıra p53, BRCA2, Rb, siklin-A\Cdk2 ve siklin-E\Cdk2'nin de sentrozom duplikasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (Deng, 2002). Cdk2, sentrozom duplikasyonunda pozitif rol oynarken; p21 ve p53 negatif rol oynamaktadır (Deng, 2002). BRCA1/BARD1 kompleksi, sentrozom duplikasyonunda tek başına görev almadığı düşünülmektedir (Deng, 2002) ve mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır.

3.8.3. DNA onarım mekanizmaları

3.8.3.1. Fankoni anemi yolağı (DNA çapraz bağ onarımı)

Fankoni yolağı, DNA çift zincirleri arasında meydana gelen çapraz bağların tamirinden sorumludur. DNA zincirleri arası çapraz bağlanma, karşıt DNA iplikçikleri üzerindeki nükleotitlerin kovalent bir bağa maruz kalmalarıyla meydana gelir. Mitomisin C, cisplatin, asetaldehit, formaldehit, malondialdehit ve akrolein gibi kimyasallar, DNA'da çapraz bağların oluşumuna sebep olabilmektedir (Krishnan vd., 2016). DNA çapraz bağları, DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrılmasını dolayısı ile transkripsiyonu ve replikasyonu engeller (Jones ve Huang, 2012).

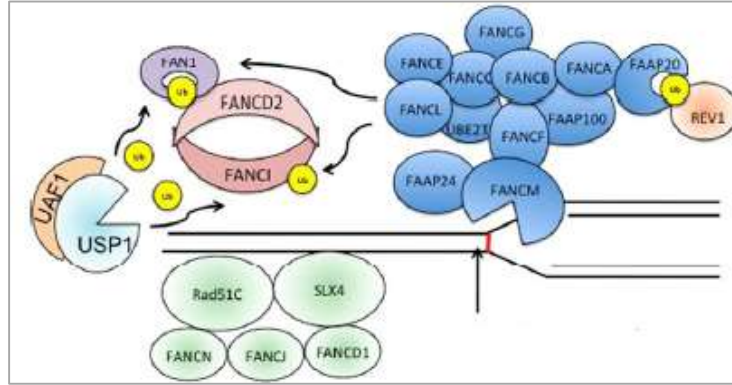
DNA çapraz bağlarının onarılması 4 aşamada gerçekleşir: 1.DNA çapraz bağlanma hasarının tanınması, 2.Fankoni yolağına ait FA çekirdek kompleksi tarafından FANCI/FANCD2'in monoubikütinasyonu, 3.DNA çapraz bağlantı bölgesinin kesilmesi 4. DNA çapraz bağını taşıyan DNA zinciri translezyon sentezi ile baypas edilirken; boşluk içeren DNA zincirinin HR ile doldurulması (Krishnan vd., 2016).

DNA üzerindeki çapraz bağlanma hasarı son zamanlarda keşfedilen UHRF1 sensör proteini tarafından tanır (Liang vd., 2015; Cheung ve Taniguchi, 2017). Replizom DNA çapraz bağlanma hasarı ile karşılaştığında replikasyon çapraz bağların olduğu yerden 20-40 nükleotidlik uzaklıkta durur ve helikaz, BRCA1 tarafından uzaklaştırılır. Sonra birer nükleotid olacak şekilde DNA ipliği üzerinde ilerler (Krishnan vd., 2016). FANCM-FAAP24-MHF1 kompleksi, DNA çapraz bağlanma hasarını tanıyan proteinlerden ilkidir. FANCM-FAAP24 kompleksi DNA'ya bağlanma özelliğine sahiptir ve tek iplikli DNA'ya bağlanabilen RPA proteinlerinin birikimini sağlar. RPA proteinlerinin birikimi ATR'i çağırır (Krishnan vd., 2016). ATR'e yanıt olarak Fankoni yolağına ait çekirdek (core) kompleksi toplanmaya başlar (Moldovan ve D'Andrea, 2009; Jones ve Huang, 2012; Krishnan vd., 2016). FANCM, DNA'ya bağlanabilme özelliğine sahip tek çekirdek kompleksidir ve Fankoni yolağı çekirdek kompleksi FANCA, B, C, E, F, G, L, M and N proteinlerinden ve Fankoni yolağı yardımcı proteinleri FAAP20, FAAP24 ve FAAP100'den oluşur (Şekil 3.19) (Jones ve Huang, 2012). Fankoni çekirdek kompleksinin alt birimi olan ve katalitik aktivite gösteren FANCL (E3 ubiquitin Ligaz) ile

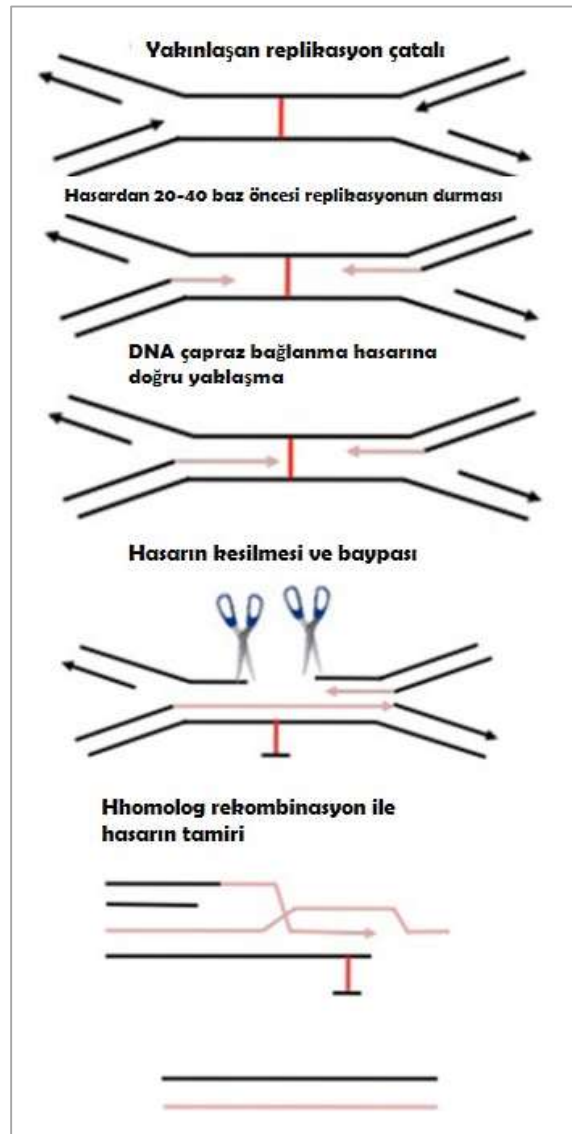
UBE2T (E2 konjuge edici enzim), FANCD2/FANCI kompleksinin (ID kompleks) monoubikütinasyonundan sorumludur (Jones ve Huang, 2012; Krishnan vd., 2016). UBE2T'nin hücrelerden silinmesi ile Fanconi yolağı ilişkili olarak radyal kromozomların varlığı rapor edilmiştir (Krishnan vd., 2016).

Monoubikütinasyona uğramış FANCD2/FANCI kompleksinin hasarlı DNA üzerinde birikimiyle çapraz bağın, kardeş ipliklerin birinden ayrılması sağlanır. Buna “unhooking”(askıdan indirmek, kancadan kurtarmak) denir. Bu süreçte FANCD2/FANCI kompleksi ile birlikte birçok proteinin rol oynadığı bilinmektedir; ancak henüz anlaşılammıştır (Ceccaldi vd., 2016). Bu reaksiyon sonrasında farklı DNA lezyonlarına sahip iki kardeş kromatid oluşur. Kardeş kromatidlerden biri, çapraz bağı içerirken, diğeri çift zincir kırığı içerir. Çapraz bağlantıyı taşıyan kardeş kromatid kolu, çapraz bağlantıyı bypass eden translezyon polimerazları tarafından tamir edilir. Çift zincir kırığı taşıyan diğerkardeş kromatid ise DNA onarım proteinleri BRCA2 (FANCD1), PALB2 (FANCN) FANCI (BRIP1) ve FANCO (RAD51C) aracılı homolog rekombinasyon ile tamir edilir (Moldovan ve D'Andrea, 2009; Ceccaldi vd., 2016; Krishnan vd., 2016).

DNA çift zincir kırığı 4 basamakta tamir edilir. İlk önce DNA uçlarından bir kısmı kesilerek tek zincirli (ssDNA) 3' DNA uçları oluşturulur. Bu uçlar, daha sonra, hata eğilimli polimeraz-θ tarafından homolog olmayan uç birleştirme tamiri (NHEJ) ile tamir edilir. Bir sonraki adımda helikaz ve eksonükleazlar tarafından daha uzun ssDNA kolları oluşturulur. ssDNA'ya RPA proteinleri bağlanır. Bu kısımda RAD51 nükleoflamentleri oluşur ve PALB2 ve BRCA2 bağlanır. PALB2, homolog rekombinasyonun önemli iki proteini olan BRCA1 ve BRCA2'i birbirine bağlar. Homolog rekombinasyon ve Fankoni yolağı arasında önemli bir ilişki olduğu görüşü hakimdir (Cheung ve Taniguchi, 2017; Niraj vd., 2019).



Şekil 3.19 Fankoni çekirdek kompleksi (Jones ve Huang 2019)



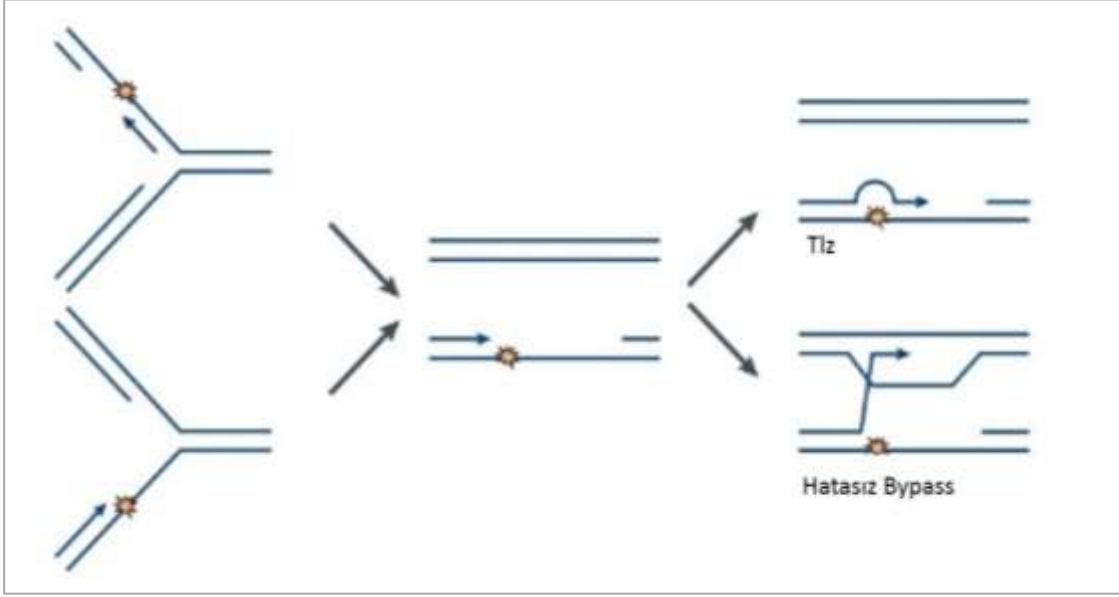
Şekil 3.20. Fankoni anemi (FA) yolu çekirdek kompleksi ve DNA zincirlerinin çapraz bağlanması hasarının tamiri ve UBE2T (Jones ve Huang, 2012)

3.8.3.2. Translezyon sentezi ile DNA hasarının baypas edilmesi

DNA hasarının tolere edilmesinde (bypass) çoğunlukla RAD6 (insanlarda UBE2A ve UBE2B) ile ilişkili hata eğilimli translezyon sentezi yolağı kullanılır ve PCNA'nın monoubikütinasyonuna dayanır (Karras ve Jentsch, 2010). DNA replikasyonu sırasında, replikasyon bloğu ile karşılaşılmasına bağlı DNA ipliğinin gevşemesi veya çözülmesi tek iplikli DNA yapısının oluşmasına sebep olur ve DNA hasarı tolerans mekanizmalarını aktive eder. Bu mekanizma DNA lezyonunun tamirini içermez; fakat semptomları iyileştirerek hücrenin sağkalımını hedefler (Karras ve Jentsch, 2010).

DNA replikasyonu sırasında bir lezyon onarılmadan kaldığında replikasyon çatalı durur. Bu durumda lezyonun tamir edilmesi ya da lezyonun tamir edilmeden geçilmesi (bypass) gerekir. Lezyonun tamir edilebilmesi ipliğin kesilmesine bağlıdır. Ancak devam eden replikasyon sırasında ipliğin kesilmesi, replikasyon çatalının çökmesine (Ulrich ve Walden, 2010) çift zincir DNA kırıklarına ve bunun sonucunda kromozomal düzende bozukluklar, hücre siklusunun durması, hücre ölüm meydana gelir. Bu nedenle hücre sağkalımı ve hücre döngüsünün tamamlanabilmesi için lezyonun onarımının ertelenmesi daha avantajlıdır. (Hedglin ve Benkovic, 2015). İki farklı mekanizmadan bahsedilmektedir: Translezyon sentezi ve hatasız baypas (Şekil 3.21) (Karras ve Jentsch, 2010; Ulrich ve Walden, 2010; Fiesel vd., 2014).

Translezyon sentezi Rad6 ile ilişkilidir ve hata eğilimlidir. Translezyon sentezi mekanizmalarında hata-eğilimli DNA polimerazlar görev alır (Karras ve Jentsch, 2010). Ökaryotik hücrelerde normal replikasyon sırasında yüksek doğruluklu DNA polimerazlar (DNA polimeraz δ , ϵ , α) kullanılmaktadır ve DNA lezyonlarını atlama yetenekleri yoktur (Hedglin ve Benkovic, 2015). Yüksek doğruluklu polimerazların aktif bölgesi yeni oluşmuş baz çiftini sıkıca sarabilir. Hata eğilimli polimerazların aktif bölgesi ise daha geniş ve daha gevşektir (Beldüz, 2014).



Şekil 3.21. DNA hasarı toleransı. Tlz: translezyon sentezi, hatasız baypas (Karras ve Jentsch, 2010).

Her iki mekanizma da Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ile ilişkilidir. (García-Rodríguez vd., 2018). PCNA, DNA replikasyonu sırasında, replikasyon ile ilişkili faktörlerin bağlanabilmesi için platform görevi görür ve kayan bir kelepçe gibidir (Karras ve Jentsch, 2010). PCNA'nın monoubikütinasyonu translezyon sentezi mekanizmasını aktive ederken; PCNA'nın poliubikütinasyonu hatasız baypas mekanizmasını aktive eder (Hedglin ve Benkovic, 2015). PCNA'nın monoubikütinasyonu E2/E3 enzim kompleksi olan Rad6/Rad18 tarafından gerçekleştirilir ve PCNA lizin kalıntısı K164'den gerçekleşir (Branzei ve Foiani, 2005; Ulrich ve Walden, 2010; Yang vd., 2013; García-Rodríguez vd., 2018). Lezyonun türüne göre translezyon proteinleri çağırılır (Yang vd., 2013). Polimeraz η (Pol η), Polimeraz ι (Pol ι), Polimeraz κ (Pol κ), Rev1 ve Pol ζ translezyon polimerazlarıdır. Pol η , pirimidin dimerlerini hasarsız DNA polimerazlarına benzer hızda ve doğrulukta baypas edebilir. Pol ι , 8-okso-G lezyonunun karşısına C ekleyebilir. Pol κ , diğer polimerazlar tarafından lezyonun karşısına eklenen nükleotid sonrasında zinciri uzatabilme özelliğine sahiptir (Yang vd., 2013).

Hatasız baypas mekanizması, PCNA'nın K164 kalıntısının poliubikütinasyonu ile aktive olur. İlk ubikutin, Rad6/Rad18 aracılığı ile eklenir ve sonraki ubikutinler K63 kalıntısından Ubc13-Mms2/Rad5 aracılığı ile PCNA'a eklenir (Yang vd., 2013). Hatasız baypas mekanizması henüz çözülememiştir (García-Rodríguez vd., 2018); ancak Şekil

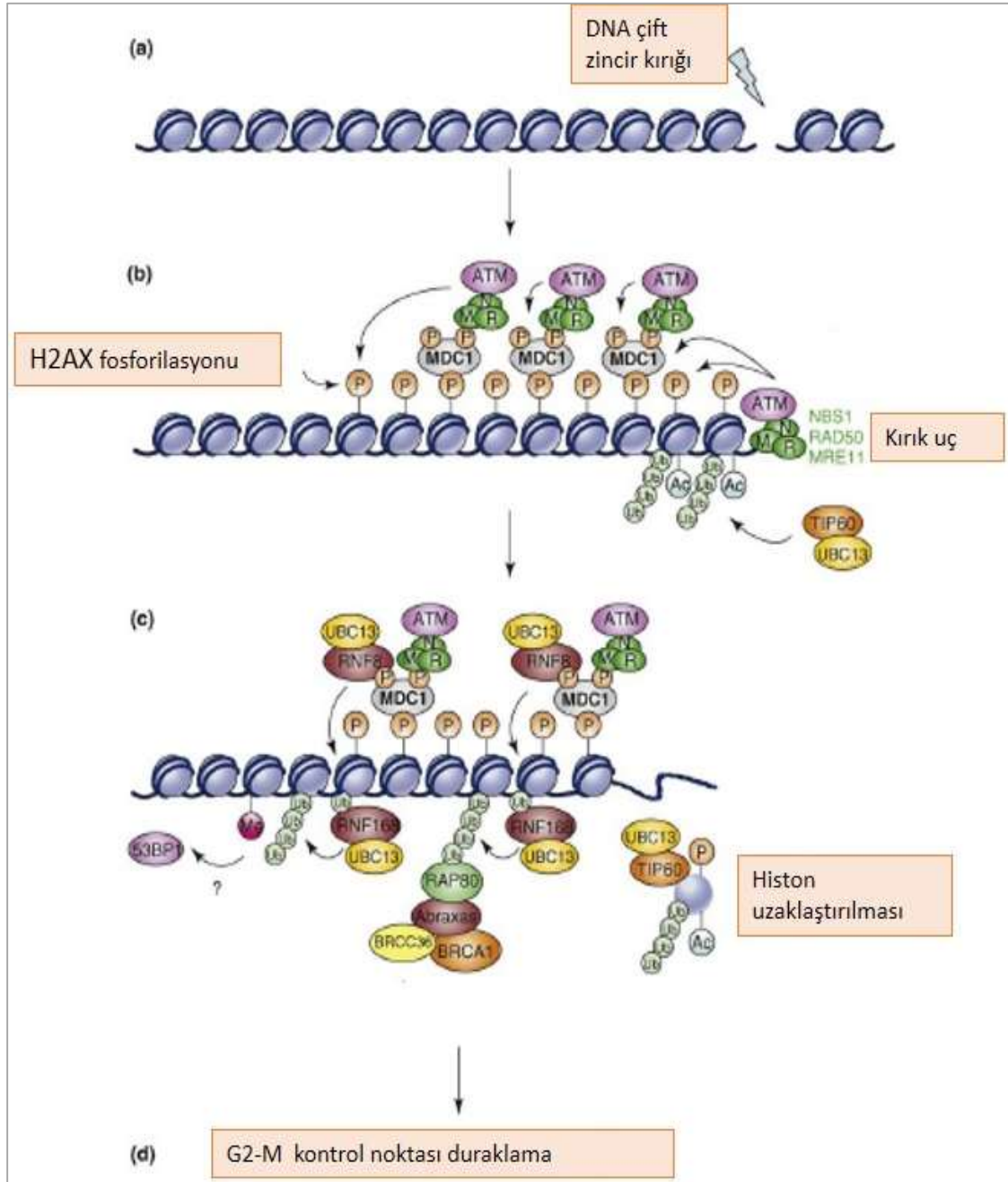
3.21’de yer aldığı gibi kardeş kromatid kullanılarak lezyonun baypas edildiği bilinmektedir (Ulrich ve Walden, 2010; Yang vd., 2013).

3.8.3.3. Homolog rekombinasyon ile DNA tamiri

DNA hasarı normal fizyolojik DNA replikasyonu endojen veya egzojen faktörlerin etkisi ile meydana gelebilir. Hergün genomda yaklaşık 10^5 DNA hasarının meydana geldiği tahmin edilmektedir. DNA hasarına karşı DNA onarım mekanizmaları devreye girmektedir (Irminger-Finger vd., 2016). BRCA1/BARD1 kompleksi, çift DNA ipliği kırılımı onarım mekanizmalarından Homolog Rekombinasyonda görev alırlar. Çift zincir kırıkları; ekzojen kaynaklarla indüklenebildiği gibi hücrel metabolizmanın yan ürünleri olan reaktif oksijen türlerinin etkisiyle replikasyon, mayotik rekombinasyon ve DNA onarımı sırasında replikasyon çatalının çökmesi sonucu meydana gelebilmektedir (Kurtoğlu ve Tekedereli, 2001; Chapman vd., 2012).

DNA’nın her iki zincirinin kırılması ile birlikte MRN kompleksi (Mre11-RAD50-Nbs1), kırık uçlara bağlanır ve 5’-3’ yönünde uçları bir miktar kırar. Bu diğer hasar tanıma proteinlerini toplanması için bir sinyal oluşturur (Şekil 3.22a) (Kurtoğlu ve Tekedereli, 2001). Hata sensör proteinlerinden ATM; DNA replikasyonu kaynaklı ise ATR proteini hasarlı bölgeye gelir (Caestecker ve Van de Walle, 2013). ATM veya ATR histon proteinlerinden H2AX’i fosforiller ve γ H2AX oluşur (van Attikum ve Gasser, 2009). H2AX fosforilasyonu, Mediator Of DNA Damage Protein 1 (MDC1)’e ihtiyaç duyar ve γ H2AX’ a bağlanır. MDC1, hasarlı bölgenin uç kısmınlarında yer alan daha çok sayıdaki H2AX’in fosforilasyonunu sağlar ve bu megabaz boyutunda γ H2AX’leri oluşturur. Bu sırada TIP60 tarafından γ H2AX asetilasyonu gerçekleştirilir ve E2 enzimi olan UBC13 tarafından asetilenmiş γ H2AX proteinlerine ubikutin zincirleri eklenir (Şekil 3.22b). γ H2AX proteinlerinde meydana gelen bu asetilasyon ve ubikütinasyon ile histon proteini kromatinden ayrılır (Şekil 3.22c) (van Attikum ve Gasser, 2009; Caestecker ve Van de Walle, 2013). RNF8/RNF168 yolağını aktive eder (Fukuda vd., 2016). RNF8 ve RNF168 DNA hasarının olduğu bölgede ubikutin zincirlerinin oluşmasını sağlar (Zhao vd., 2014). Histonlara bağlı bu ubikutin zinciri BRCA1/BARD1 kompleksinin bağlanabilmesi için sinyal oluşturur. BRCA1/BARD1 kompleksi, Abraxas/RAP80 proteinleri aracılığı ile bağlanabilir (Caestecker ve Van de Walle, 2013; Fukuda vd., 2016). BRCA1/BARD1

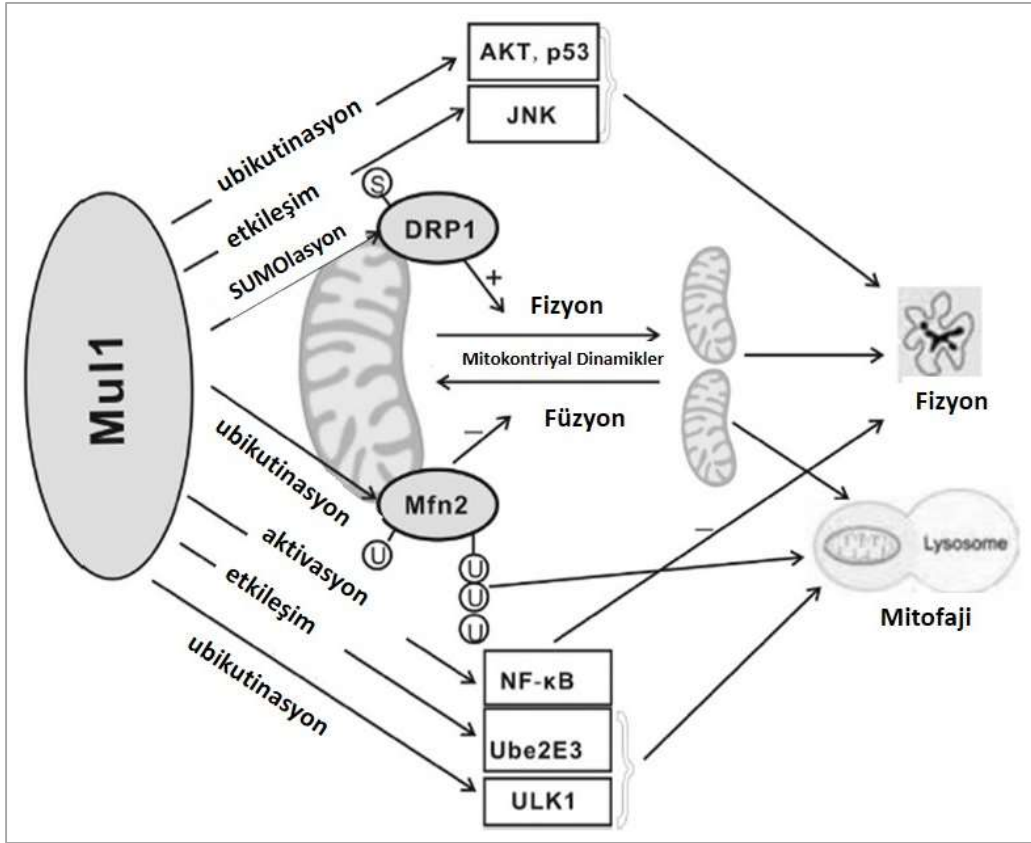
kompleksi, hücre siklusunun G₂-M kontrol noktasında kesintiye uğratar ve hasarın onarımı için zaman kazandırır (Şekil 3.22) (van Attikum ve Gasser, 2009). DNA hasarına karşı oluşturulan cevapta BRCA1/BARD1 rol oynadığı bilinmesine rağmen BRCA1/BARD1 aracılı ubikütinasyon mekanizması henüz açık değildir.



Şekil 3.22. BRCA1/BARD1 E3 ligaz kompleksi ve DNA çift zincir kırığı onarımı (van Attikum ve Gasser, 2009).

3.8.4. Mitokondriyal dinamikler (mitokondriyal fizyon/ füzyon)

Mitokondriyal dinamik süreçleri bir dizi spesifik mitokondriyal fizyon ve füzyon proteini tarafından yönetilir. Drp1 'ana regülâtör' olarak görev alırken; mitofusin 1 (Mfn1), Mfn2 ve optik atrofi 1 (OPA1) önemli görevlere sahiptir. Mfn1 Mfn2'e bağlanarak degradasyonu sağlar. Drp1'e SUMO ekleyerek mitokondri fizyonunu başlatır ve füzyonu engeller (Peng vd., 2016). NF-κB aktivasyonuna bağlı stres koşulunda tetiklenen mitokondriyal füzyonda da rol alır (Lee M. S. vd., 2019). Fizyon ile mitokondrinin hasarlı kısmı, hasarsız kısmından ayrılır. Füzyon ile işlevsiz mitokondri, fonksiyonel mitokondri ile birleşir ve bileşenler organeller arasında paylaştırılarak stresten kurtarılır (Youle ve Van Der Blik, 2012) (Şekil 3.23).



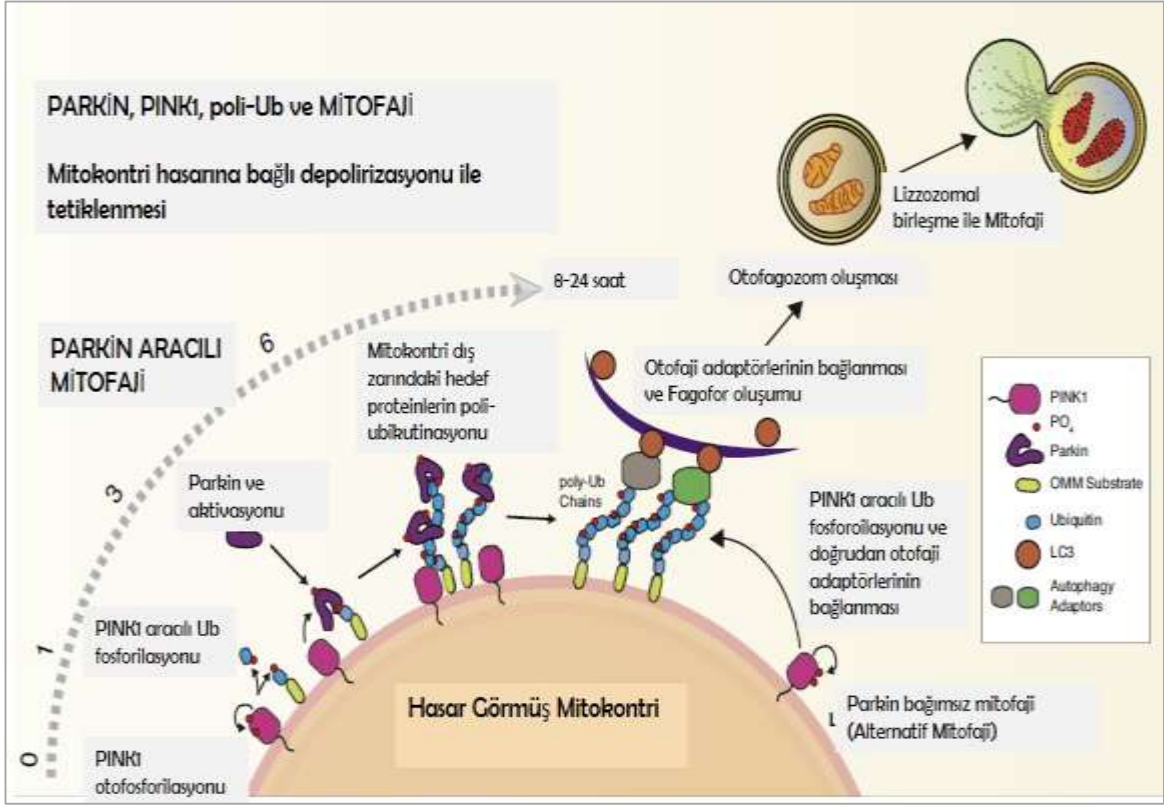
Şekil 3.23. Mitokondriyal fizyon ve füzyon mekanizmaları (Peng vd., 2016)

3.8.5. Mitofaji

Mitofaji, hasarlı, yaşlanmış veya gereksiz mitokondrilerin seçilerek yok edilmesidir (Villa vd., 2018). Bu degradasyon şeklinin avantajı bütün bir mitokondriyi membran, proteinleri ve nükleik asitleri ile birlikte yok etmesidir (Villa vd., 2018). Mitofaji, mitokondrilerin kalite kontrolünü içerir (Villa vd., 2018). En iyi tanımlanmış mitofaji yolu Parkin (E3 ligaz) ve PINK1 proteinleri tarafından gerçekleştirilen yoldur (Villa vd., 2018).

Normal koşullarda, PINK1, mitokondri iç zarına geçer ve burada bulunan bazı proteazlar tarafından sürekli parçalanır. Parçalanmış yapıdaki PINK1 daha sonra ubiquitin proteozom sistem tarafından ortadan kaldırılır. Mitokondriyal membran potansiyeli bozulduğunda, PINK1 mitokondri içine giremez ve mitokondriyal dış zarda stabil hale gelir (Palikaras vd., 2018). PINK1 mitokondri yüzeyinde daha önceden var olan ubiquitin moleküllerini fosforilleyerek fosfo-ubikutin moleküllerini oluşturur. PINK1, Parkin'i de fosforiller. Fosfo-ubikutin, fosforilasyona uğramış Parkin'e yüksek afinite gösterir. Parkinin fosforilasyona uğraması ve fosfo-ubikutin ile etkileşime girmesi Parkin aktivasyonunu artırır. Aktifleşen Parkin, mitokondrinin dış zarında bulunan çok sayıdaki proteine ubiquitin ekler (McWilliams ve Muqit, 2017). Mitokondri dış zarında poliubikutinasyona uğramış bu proteinler otofaji adaptör proteinleri tarafından tanınır veya proteozomal degradasyon ile ortadan kaldırılırlar. Poli-ubikutin zincirleri bir nevi "beni ye" sinyali oluşturur (Palikaras vd., 2018). Memelilerde bulunan p62, NBR1, NDP52, opti- neurin (OPTN) ve TAX1BP1 reseptörleri otofaji ile ilişkilidir (Pickles vd., 2018). Adaptör proteinler (p62, OPTN, NDP52) tarafından mitokondri dış zarında yer alan poliubikutinlenmiş proteinler tanınır ve LC3'in de bağlanması ile otofagozom oluşumu başlar (Palikaras vd., 2018) (Şekil 3.24).

Son yapılan çalışmalarda, E2 konjuge edici enzimlerinden UBE2N, UBE2L3, UBE2D2 ve UBE2D3 (UBE2D2/ 3)'ün parkin bağımlı mitofaji de gerekli olduğunu ortaya koymaktadır (Geisler vd., 2014).



Şekil 3.24. Parkin aracılı mitofaji (McWilliams ve Muqit, 2017)

Parkin-PINK1 proteinleri aracılığı ile mitofaji dışında Parkin'in gerekli olmadığı farklı mitofaji yolları da bulunmuştur. **Mul1**, **Arih1**, **Siah1**, **Smurf1** ve **Gp78** alternatif mitofaji mekanizmaları ile ilişkili bulunmuştur (Montava-Garriga ve Ganley, 2019).

Arih1 mitofajinin alternatif yollarında rol oynar ve PINK1'e gereksinim duyarken; Parkin'e gereksinim duymaz. (Villa vd., 2017, 2018; Macleod, 2020).

Mul1 ile ilişkili mitofaji, Parkin-PINK1 ilişkili mitofaji yolağının paralelidir ve Parkin, PINK1 mutasyonlarında kurtarıcıdır (Villa vd., 2018). Mul1, mitokondriyal füzyon proteini olan Mfn2'e ubiquitin molekülleri ekleyerek poliubikütinasyonunu sağlar (Peng vd., 2016). Poli-ubikütinli dış mitokntri zarı proteinlerine, otofaji adaptör proteinleri bağlanır ve fagofor oluşumu ve alternatif (parkin bağımsız) mitofajiyi başlatır (Villa vd., 2018). Mul1-Ube2E3 kompleksi Parkin'e ihtiyaç duymadan doğrudan otofaji reseptörleri ile bağlantı kurabilir (Villa vd., 2018).

Bu çalışmada parsiyal hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunun farklı süreçlerinde (0, 6, 12, 24, 48, 72 saatleri) ubikutin sinyalinin olası rolü/rollerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ubikutin yolağının birçok hücresel mekanizmada (proteinlerin degradasyonu, proliferasyon, DNA onarımı, transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi, otofaji, mitofaji gibi) rol oynadığı bilinmektedir; fakat karaciğer rejenerasyon sürecindeki rolü tam olarak belli değildir. Bu çalışmada karaciğer rejenerasyonunun farklı süreçlerinde ubikutin sinyalinin rolü, bu yolağa ait 88 genin ifadeleri RT-PCR array tekniği kullanılarak irdelenmiştir. RT-PCR array analizleri sonucu ifadesi anlamlı olan beş genin proteinlerine bakılmıştır. Karaciğerin rejenerasyonu olduğu ki67'nin immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi ve rejenerasyon süreleri sonunda karaciğer ağırlık oranlarının hesaplanması ile ortaya konmuştur.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

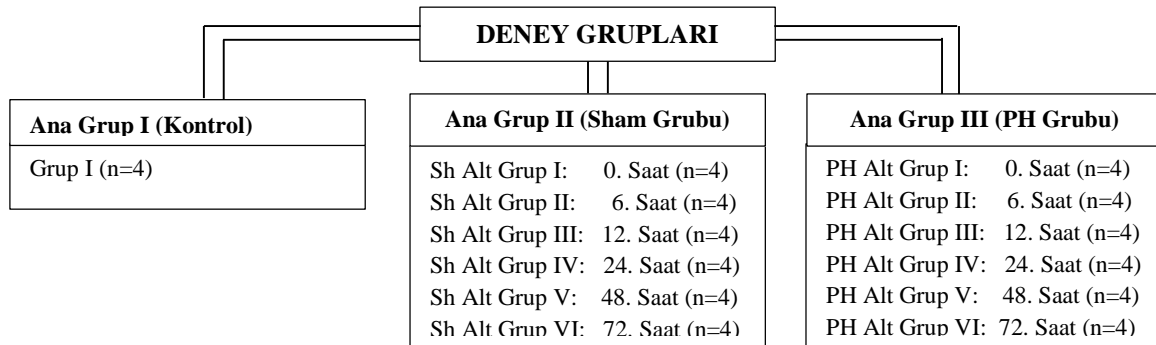
Çalışmamızın bir kısmını oluşturan hayvan deneyleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (TICAM) Laboratuvarları'nda; diğer analizler ise Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)'nin 549/2016 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

4.1. Deney Grupları

Deneyde kullanılan tüm hayvanlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Deneyimizde 250±300 gr ağırlığında erkek Wistar albino ırkı sıçanlar kullanılmıştır. Deney süresince sıçanlar 12:12 aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı (22±2°C), nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ve çeşme suyu verilerek yaşatılmıştır.

Deney Hayvanları arasından rastgele seçimle n=4 olacak şekilde toplam 52 tane sıçan kullanılmıştır. Deney grupları 3 ana grup (Kontrol, Sham, PH) ve 13 alt grup olacak şekilde düzenlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Deney grupları



Ana Grup I (Kontrol Grubu): Hiçbir cerrahi işlem uygulanmamış olup; bu grupta bulunan sıçanların tümünden (n=4) Ki67 immunohistokimyasal analizleri, RT-PCR analizleri ve Western blot analizleri için karaciğer doku örnekleri alınmıştır.

Ana Grup II (Sham Grupları): Bu gruptaki sıçanlara parsiyal hepatektomi yapılacakmış gibi karaciğerin öndeki sağ orta ve sol yan loplari ayrılarak iplik geçirilmiş ve PH yapılmadan laparotomi bölgesi kapatılmıştır. Belirlenen sürelerin (0, 6, 12, 24, 48 72 saat) sonunda diseksiyonları gerçekleştirilmiştir. Ki67 immunohistokimyasal analizleri, RT-PCR analizleri ve Western blot analizleri için karaciğer doku örnekleri alınmıştır.

Ana Grup III (PH Grubu): Bu gruptaki sıçanların karaciğerlerinin %70'lik kısmını oluşturan sol lateral ve median lobları çıkarılmıştır. Belirlenen sürelerin (0, 6, 12, 24, 48, 72 saat) sonunda diseksiyonları gerçekleştirilmiştir. Ki67 immunohistokimyasal analizleri, RT-PCR analizleri ve Western blot analizleri için karaciğer doku örnekleri alınmıştır.

4.2. Anestezi ve Hepatektomi İşlemi

Tüm deneysel çalışmalar steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirildi. Diurnal hormonal değişimlerin sıçanlar üzerine olası etkileri dikkate alınarak tüm cerrahi işlemler 09.00 ile 12.00 saatleri arasında yapılmıştır. Deney gruplarına ait hayvanlara intramuskular olarak 10 mg.kg⁻¹ ksilazin ve 70 mg.kg⁻¹ ketamin anestezisi uygulanmıştır.

Sıçanlar sırt üstü pozisyonda, sıcaklığı ılık ve sabit olan diseksiyon tablasına sabitlenmiştir. Cerrahi uygulama bölgesi %70'lik etil alkol ile temizliği yapıp Higgins ve Anderson' un (1931) tekniğiyle parsiyal hepatektomi gerçekleştirilmiştir (Higgins ve Anderson, 1931). Buna göre, deney hayvanının karın bölgesinde vücuda paralel 2-3 cm' lik bir orta hat kesisi ile karaciğer loblarını birbirine bağlayan zarlar ayrılmıştır. Karaciğerin yaklaşık %68-70 oranında kütesini teşkil eden öndeki orta (median) ve sol loba ait hepatik arter, ven ve safra kanallarının etrafına ipek iplik geçirilerek bağlanmış ve hemen üstünden kesim gerçekleştirilmiştir. Her bir hayvana cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerinin ortadan kaldırılması için karın boşluğuna 1ml steril serum fizyolojik verilmiştir. Sonrasında kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 4/0 ipek sutürle dikilerek

laparotomi bölgesi kapatılmıştır ve antiseptik solüsyon ile temizlenmiştir. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak diyet değişikliği yapılmaksızın 6, 12, 24, 48, 72 saat boyunca yaşatılmıştır. PH 0. saat alt grubundaki sıçanlarda, PH işleminden sonra laparotomi bölgesi kapatılmadan intrakardiyak bütün kan alınmıştır.

6, 12, 24, 48, 72 saat boyunca yaşatılan PH ve sham gruplarına ait hayvanlara intramuskular olarak 10 mg.kg⁻¹ ksilazin ve 70 mg.kg⁻¹ ketamin anestezisi altında intrakardiyak olarak kalpten bütün kanın alınması yoluyla öldürülmüştür ve analizler için karaciğer doku örnekleri alınmıştır. Western blot ve RT-PCR analizleri için alınan karaciğer parçaları çalışılacağı zamana kadar -80 °C saklanmıştır. Ki67 immunohistokimya analizleri için alınan karaciğer parçaları formaldehitte fikse edilmiştir.

4.3. Karaciğer Rejenerasyon Oranı

PH işlemi sırasında karaciğeri %68-70'ini oluşturan median lob ve sol lateral lobun yaş ağırlıkları hassas terazide tartılarak hepatektomi sırasında alınan karaciğerin toplam ağırlığı hesaplanmıştır. 0, 6, 12, 24, 48, 72. saatlerin sonunda diseksiyon sırasında çıkarılan rejenera karaciğer parçaları da tartılmıştır. Aşağıdaki formüle yerleştirilerek rejenerasyon oranları hesaplanmıştır (Kogure *vd.*, 1998; Schmidt, 2010; Zhang *vd.*, 2011; Gul *vd.*, 2013; Komori *vd.*, 2014).

$$\text{Rejenerasyon Oranı (RO)} = \frac{\text{Otopsi sırasındaki karaciğer ağırlığı} - \text{Hepatektomiden sonra kalan Karaciğerin tahmini ağırlığı}}{\text{Hepatektomi sırasında alınan KC ağırlığı}} \times 100$$

4.4. ki67 İmmunohistokimyasal Boyama

0, 6, 12, 24, 48, 72 saatlik rejenerasyon süreleri sonunda karaciğer dokusundan alınan örneklerin bir kısmı ki67 immunohistokimyasal boyama için %10 formaldehit fiksatifine alınarak 24 saat süre ile fiksasyonu sağlanmıştır. Fiksasyon aşamasından sonra, dokular, akan suyun altında 24 saat yıkanarak rutin doku takibi gerçekleştirilmiştir. Karaciğer dokuları, etil alkol serilerinde (%70, %80, %90, %96₁, %96₂) birer saatlik sürelerde bekletilerek dehidratasyonları sağlanmıştır. Dokular 30'ar dakika olmak üzere iki

kez ksilol serilerinden geçirilmiştir. Parafinizasyon işlemi için dokular 60°C'deki 3 ayrı parafinde sırasıyla 30dk, 60dk, 60dk bekletilerek, parafin bloklara gömülmüştür. Bu bloklardan 4-5 µm kalınlığında mikrotom (Leica RM 2025) kesitleri alınmıştır. Lam üzerindeki kesitler 60°C etüvde 1 saat bekletilerek iki kez ksilol serisinden geçirilmiştir. Etil alkol serilerinden (%96, %90, %80) 3'er dakika olacak şekilde geçirildikten sonra distile su ile yıkanmıştır. Maskelenmiş olması muhtemel doku antijenlerinin ortaya çıkarılması için, kesitler %10' luk sitrat tamponu (pH=6) içine koyularak 3-5 dakika su buharı basıncı maruz bırakılmıştır. Kesitler TBS-T (Tris-buffered saline-Tween) solüsyonunda 1dk yıkanmıştır ve blokama solüsyonu ile bloklanmıştır. Herbir lama primer antikor (1:500 dilüsyon) damlatılarak inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında sekonder antikor ile muamele edilerek, primer antikorlara bağlanması sağlanmıştır. Lamaların üzerine renk güçlendirici damlatılarak 30 dk muamele edilmiştir. TBS-T ile birkaç kez ve sonrasında distile su ile yıkanarak hematoksilen ile 1 dk boyanmıştır. Lamalar artan alkol serilerinden (%70, %80, %90, %96₁, %96₂) ve sonrasında ksilol serilerinden geçirilerek entellan ile kapatılmıştır.

ki67 pozitif hücre çekirdeklerinin kahverengi-kızıl olduğu gözlenirken; ki67 negatif hücre çekirdeklerinin mavi olduğu gözlenmiştir. Görüntü alanında (x40) rastgele seçilmiş 1000 adet parankimal karaciğer hücresinde belirlenen ki67 pozitif çekirdekli hücreler % olarak ifade edilerek ki-67 indeksi çıkarılmıştır. Hazırlanan tüm doku kesitleri Olympus CX31 marka ve model ışık mikroskopunda incelenerek Olympus PMTVC marka, 1K07455 model compact dijital kamera ile fotoğraflanmıştır.

4.5. RT-PCR Array Analizleri

PCR-array analizleri her bir alt grupta 4 biyolojik tekrar olacak şekilde yapılmıştır. Çalışmada kullanılan Ubiquitin yolağına ait 88 gen ve 8 kontrol genine (Actb, Hprt, gapdh, b2m, Gusb, ppia, rpl13a) ait RT-PCR primerleri Gen-Era Diagnostik Firması'ndan 96'lık plate şeklinde hazır olarak temin edilmiştir ve Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Bu genlere ek olarak ubikutin yolağına ait Cdc20 gen ifadesi de ayrıca analiz edilmiştir.

Çizelge 4.2. RT-PCR Array Plate’de yer alan ubikutin yolağına ait genler

Kuyu	Sembol	Gen ismi	Kuyu	Sembol	Gen ismi
A1	Anapc2	anaphase promoting complex subunit 2	E1	Stub1	STIP1 homology and U-Box containing protein 1
A2	Anapc11	anaphase promoting complex subunit 11	E2	Syvn1	synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin
A3	Arih1	ariadne ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein homolog 1	E3	Tmem189	transmembrane protein 189
A4	Atg7	ATG7 autophagy related 7 homolog	E4	Tp53	tumor protein p53
A5	Bard1	BRCA1 associated RING domain 1	E5	Uba1	ubiquitin-like modifier activating enzyme1
A6	Brca1	In multiple Geneids	E6	Uba2	ubiquitin-like modifier activating enzyme2
A7	Brca2	In multiple Geneids	E7	Uba3	ubiquitin-like modifier activating enzyme3
A8	Brc3	BRCA1/BRCA2-containing complex, subunit 3	E8	Uba5	ubiquitin-like modifier activating enzyme5
A9	Btrc	beta-transducin repeat containing	E9	Uba6	ubiquitin-like modifier activating enzyme6
A10	Cbl	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence	E10	Ube2a	ubiquitin-conjugating enzyme E2A
A11	Cdc34	cell division cycle 34 homolog	E11	Ube2b	ubiquitin-conjugating enzyme E2B
A12	Cul1	cullin 1	E12	Ube2c	ubiquitin-conjugating enzyme E2C
B1	Cul2	cullin 2	F1	Ube2d1	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1
B2	Cul3	cullin 3	F2	Ube2d3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3
B3	Cul4b	cullin 4B	F3	Ube2e2	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2
B4	Cul5	cullin 5	F4	Ube2e3	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3
B5	Ddb1	damage-specific DNA binding protein 1	F5	Ube2g1	ubiquitin-conjugating enzyme E2G 1
B6	Fbxo11	F-box protein 11	F6	Ube2g2	ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2
B7	Fbxo32	F-box protein 32	F7	Ube2i	ubiquitin-conjugating enzyme E2I
B8	Fbxo4	F-box protein 4	F8	Ube2j1	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1
B9	Fbxo6	F-box protein 6	F9	Ube2j2	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2
B10	Fbxw9	F-box and WD repeat domain containing 9	F10	Ube2k	ubiquitin-conjugating enzyme E2K
B11	Hecw2	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	F11	Ube2l3	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3
B12	Itch	itchy E3 ubiquitin protein ligase homolog	F12	Ube2l6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6
C1	March5	membrane-associated ring finger 5	G1	Ube2m	ubiquitin-conjugating enzyme E2M
C2	Mdm2	Mdm2 p53 binding protein homolog	G2	Ube2n	ubiquitin-conjugating enzyme E2N
C3	Mib1	mindbomb homolog 1 (Drosophila)	G3	Ube2q1	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 1
C4	Mocs3	molybdenum cofactor synthesis 3	G4	Ube2q2	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 2
C5	Mul1	mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1	G5	Ube2q2l	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 2-like
C6	Nae1	NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1	G6	Ube2s	ubiquitin-conjugating enzyme E2S
C7	Nedd8	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8	G7	Ube2t	ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)
C8	Park2	Parkinson disease (autosomal recessive, juvenile) 2, parkin	G8	Ube2v1	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1
C9	Rfwd2	ring finger and WD repeat domain 2	G9	Ube2v2	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
C10	Rlim	ring finger protein, LIM domain interacting	G10	Ube2z	ubiquitin-conjugating enzyme E2Z
C11	Rnf144b	ring finger protein 144B	G11	Ube4a	ubiquitination factor E4A
C12	Rnf167	ring finger protein 167	G12	Uchl1	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)
D1	Rnf180	ring finger protein 180	H1	Uchl3	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase)
D2	Rnf2	ring finger protein 2	H2	Uchl5	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5
D3	Rnf20	ring finger protein 20	H3	Vhl	von Hippel-Lindau tumor suppressor
D4	Rnf34	ring finger protein 34	H4	Wwp1	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1
D5	Rnf40	ring finger protein 40	H5	ACTB	Actin, beta
D6	Rnf6	ring finger protein (C3H2C3 type) 6	H6	B2M	Beta-2-microglobulin
D7	Rnf8	ring finger protein 8	H7	GAPD	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
D8	Sae1	SUMO1 activating enzyme subunit 1	H8	GUSB	Glucuronidase, beta
D9	Skp1	S-phase kinase-associated protein 1	H9	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
D10	Skp2	S-phase kinase-associated protein 2	H10	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1
D11	Smurf1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	H11	PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
D12	Smurf2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	H12	RPL13A	Ribosomal protein L13a

4.5.1. Dokudan RNA izolasyonu

RNA izolasyonu, sırasında aşağıdaki basamaklar izlenmiştir.

- İçerisinde ZrOB05-0,5 mm RNase free boncuklar (Norgen P/N26231) ve 1,5 ml trizol (Thermo Fischer Products, Ambion Trizol Reagent Ref:15596026) bulunan kapaklı kriyo-tüplere herbir deney hayvanından alınan 0.5 gr karaciğer örnekleri koyulmuştur. Homojenizasyon işlemi Next Advace Bullet Blender Storm 24 marka cihaz ile gerçekleştirilmiştir.
- Trizol içerisinde homojenize edilen örnekler oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Tüplere 1000 µl kloroform eklendi ve 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- 4°C'de 12.000 rpm'de 20dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda 3 faz oluşmuştur. En üstte yer alan renksiz faz RNA, beyaz renkli ara faz DNA, pembe renkli en alttaki faz ise protein içermektedir.
- RNA içeren renksiz fazdan 400 µl ayrı steril ependorf tüplere alınmıştır.
- Üzerine eşit hacimde izopropanol eklenmiştir. Tüpler ters-yüz edilerek alkolün karışması sağlanmıştır. Oda ısısında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- 4°C'de 12.000 rpm'de 20dk santrifüj edilmiştir. Tüplerin dibinde beyaz RNA çökeleği oluşmuştur. Süpernatant atılmıştır.
- Oluşan çökeleğin üzerine 1 ml %75'lik etil alkol soğuk (-20°C) olarak ilave edilmiştir.
- 4°C'de 7.500 rpm'de 10dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
- 37°C'ye ayarlanmış etüvde 15-20 dk. etil alkol uçuncaya kadar inkübe edilmiştir.
- Kalan çökeleğin üzerine 100 µl RNase free su eklenerek pipetaj yapılmıştır.
- Herbir örneğe ait RNA miktarları Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) cihazı ile 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülerek belirlenmiştir. İzole edilen RNA'ların saflığı 260 nm ve 280 nm'deki absorbanslarının oranı ile kontrol edilmiştir, ideal saflıktaki kaliteli RNA'nın A260/A280 absorbans oranı 1,8-2,0 olanlar cDNA'ya çevrilmek üzere alınmıştır. Bu değerlerin dışında olan örnekler için yeniden RNA izole edilmiştir.
- Herbir örneğe ait RNA miktarları, RNase free su kullanılarak 200 ng/µl'ye eşitlenmiştir. İzole edilen RNA örnekleri -80°C'de saklanmıştır.

4.5.2. İzole edilen RNA'nın cDNA'ya çevrilmesi

RNA örneklerinin cDNA'ya çevrilmesinde EvoScript Universal cDNA Master kit (Cat. No. 07 912 439 001, Roche) kullanılarak üretici firmanın protokolü uygulanmıştır:

Çizelge 4.3. cDNA sentezi için gerekli olan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim
Su, (PCR Grade)	
Reaksiyon Tampon Çözeltisi RNA	4 ul
Revers Transkriptaz enzim karışımı	2 ul
Toplam	20 µl

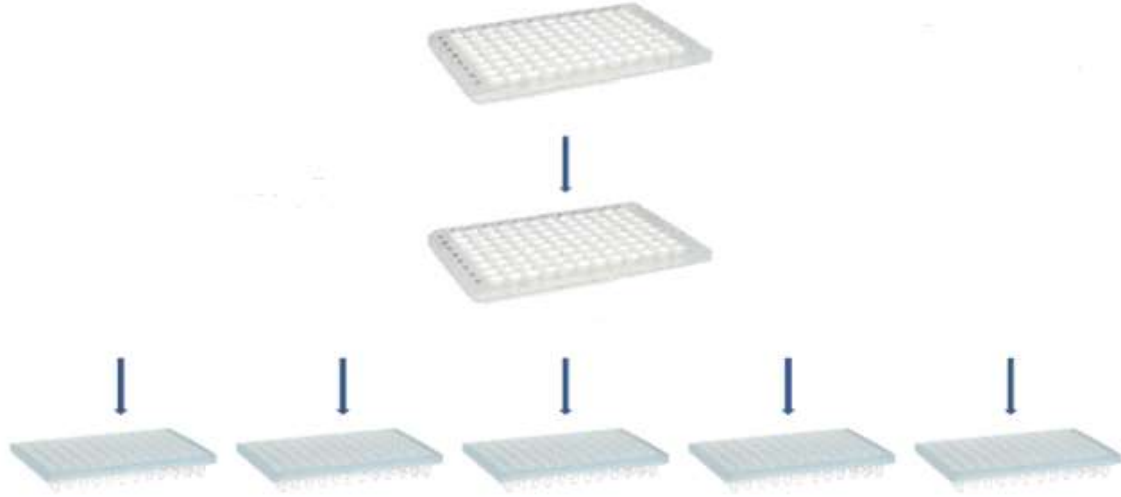
- Kit içerisinden çıkan enzim karışımı, Reaksiyon Tampon Çözeltisi, su (PCR Grade) buz üzerine alınarak erimesi sağlanmıştır. Enzim karışımı en son çözülmüştür.
- Çizelge 4.3'de verilen bir örnek için gerekli reaktif miktarları örnek sayısına göre hesaplanmıştır.
- Buz üzerine yerleştirilen her bir örneğe ait RNase free kapaklı tüplere sırasıyla su, reaksiyon tampon çözeltisi ve RNA eklenmiştir. Enzim karışımı en son eklenerek pipetleme işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Revers Transkriptaz Enzim karışımına göre üretici firmanın belirlemiş olduğu protokol (42°C'de 15dk, 85 °C'de 5dk, 65 °C'de 15dk, 4 °C'de ∞) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.
- Elde edilen cDNA kullanılacağı zamana kadar -20°C'de saklanmıştır.

4.5.3. RT-PCR Array analizi

4.5.3.1. RT-PCR Array primer plate nin hazırlanışı

Ubiquitin yolağına ait gen primerlerinin yer aldığı ve liyofilize halde gelen plate firmanın belirttiği şekilde sulandırılarak hazırlanmıştır. Buna göre stok plate'nin her bir kuyusuna 40 µl RNase free su eklenerek primer konsantrasyonu 10 µM'a ayarlanmıştır. stok plate'den örnek sayısına göre primer (20 µl'lik reaksiyon için 1 µl primer) 1:9

oranında RNase free su ile seyreltilerek “ara plate” oluşturulmuştur. Ara plate uzun bir süre -20°C’de saklanabilir. Ara Plate’den alınan primerler, gen ekspresyonu analizlerinin yapılacağı “reaksiyon plate”lerine aktarılmıştır (Şekil 4.1.)



Şekil 4.1. Liyofilize primerlerin RT-PCR analizleri için hazırlanışı. stok plate, ara plate, reaksiyon plate (<https://www.realtimprimers.com>)

4.5.3.2. Reaksiyon Plate'nin hazırlanışı

FastStart Essential DNA Green Master (Cat. No. 06 402 712 001, Roche) kit protokolü kullanılarak hazırlanmıştır. Çizelge 4.4’de verilen reaktifler 1 gen için verilen miktarlardır ve 96 gene göre hesaplanarak, 96’lık plate dağıtılmıştır.

Çizelge 4.4. Reaksiyon Plate’nin bir kuyusu için gerekli olan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim
Su (RNase free)	3 μ l
PCR Primer	2 μ l
Master Mix	10 μ l
cDNA	5 μ l
Toplam	20 μl

- Öncelikle boş reaksiyon plate'i buz üzerine alınmıştır.
- Su (RNase free) ve master mix RNase free ependorf tüpünde karıştırılarak kuyulara 5'er µl dağıtılmıştır.
- cDNA örnekleri 1:10 seyreltilmiştir. Seyreltilmiş cDNA örneği kuyulara 5'er µl dağıtılmıştır.
- Ara plate de yer alan 96 gene (88 yolağa ait gen+8 endojen kontrol geni) ait primerler Çizelge 4.2'de belirtilen yerlerine göre 96 kuyuya 2'şer µl olacak şekilde dağıtılmıştır.
- Reaktif plate'in üzeri optik adheziv film ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılmıştır.
- Kuyularda hava kabarcığı kalmaması için kısa süreli santrifüjlenmiştir.
- RT-PCR analizleri StepOnePlus™ Real-Time PCR cihazında (ThermoFisher Scientific, ABD) gerçekleştirildi. RT-PCR basamakları, 95°C'de 10sn, 58 °C'de 10sn, 72 °C'de 10sn (Amplifikasyon), 95°C'de 10sn, 65°C'de 60sn, 97 °C'de 1sn (Melting) ve 40 döngüde gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR array plate'inde bulunan genlerin yanı sıra ubikutin Cdc20'nin de gen ifadesi analiz edilmiştir.

4.5.3.3. RT-PCR verilerinin hesaplanması

RT-PCR Array analizlerinde gen ekspresyonu farklılıklarının hesaplanmasında ΔC_t ve $\Delta\Delta C_t$ metodu (Livak metodu) kullanılmıştır. Bu analiz metodunda hiçbir koşulda ifadesinin değişmediği kabul edilen referans genler kullanılmaktadır. Bu sayede RNA'nın hazırlanması ve cDNA'nın sentezi aşamasındaki farklılıkların en aza indirilmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca son zamanlarda yapılan araştırmalar, birden fazla referans gen kullanılmasının daha doğru sonuçlar verdiğini belirtmektedir (Silver vd., 2006). Uygun referans genlerin seçimi için Genorm yazılımı kullanılmıştır (Alizai vd., 2016).

Genorm yazılım programı ile çalışmamızda yer alan sekiz kontrol geni arasından ifadesi en stabil olanlar belirlenmiştir. Bu genlerin geometrik ortalaması alınmıştır (Rychtrmoc vd., 2012) ve ΔC_t bulunarak normalizasyonları gerçekleştirilmiştir. $\Delta\Delta C_t$ değeri, $\Delta C_t \text{ örnek} - \Delta C_t \text{ ref. gen}$ formülüne göre bulunmuştur. $\Delta\Delta C_t$ değerleri, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerlerine

dönüştürülerek fold değerleri hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001; Alizai vd., 2016; Yu vd., 2016). Fold değeri ≤ 0.5 ve fold değeri ≥ 2 olanlar anlamlı kabul edilmiştir (Fujimoto vd., 2012). Hesaplama Excel ve Qiagene Data Analysis Center kullanıldı (<https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>). RT-PCR analiz kalitesi melt curve de meydana gelen tek bir eğrinin varlığı ile kontrol edilmiştir (Yu vd., 2016)

4.5.4. Western blot analizleri

Gen ifadesi yüksek olan ve istatistik açıdan anlamlı ($p \leq 0.05$) beş tane gen Western blot analizleri için seçilmiştir: UBE2T (25 kDa), UBE2C (20 kDa), ANAPC2 (100 kDa), BRCA1 (207 kDa), BARD1 (87 kDa)

Western blot analizlerinde aşağıdaki basamaklar izlenmiştir:

- Protein İzolasyonu
- SDS Jel Elektroforezi İle Proteinlerin Ayrıştırılması
- Proteinlerin Jelden Membrana Aktarılması ve Antikorlar ile Muamelesi
- Görüntüleme ve Analiz

4.5.4.1. Protein izolasyonu

- Yaklaşık 300-350 mg alınan karaciğer doku örnekleri proteaz inhibitör kokteyli (Cell Signaling Technology, Ref:5871) ve PMSF (Cell Signaling Technology, Ref:8553) eklenmiş RIPA buffer (Cell Signaling Technology, Ref:9806)'dan 1ml eklenerek homojenize edilmiştir.
- Homojenat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20.000g'de 30dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant alınarak çökelti atılmıştır.

Gruplara ait örneklerdeki protein miktarları Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fischer Scientific) cihazı kullanılarak kit protokolüne uygun spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Protein miktarları $20 \mu\text{g/ml}$ 'ye eşitlenmiştir.

- Numune yükleme solüsyonu ve denatüre edici ajan olarak Dithiothreitol (DTT) içeren Blue Loading Buffer Pack (Cell Signaling Technology, Ref:7722) kullanılmıştır. 1X Blue Loading Buffer Pack'e 1/10X DTT olacak şekilde hazırlanan solüsyondan örnek miktarının yarısı kadar örnekler ilave edilmiştir.
- Örnekler yaklaşık 100 °C'de 5 dk. bekletildikten sonra örnekler hemen buz üzerine alınarak denatürasyonu sağlanmıştır.
- Denatürasyon sonrası örnekler 1000g'de 30sn santrifüj edilerek olası partiküllerin çökmesi sağlanmıştır.

4.5.4.2. SDS jel elektroforezi ile proteinlerin ayrıştırılması

Ayrıştırma Jelinin (Separating Gel) Hazırlanışı:

Çizelge 4.5. Ayrıştırma jeli hazırlanışında kullanılan malzemeler ve miktarları

<i>Stok Solüsyon</i>	<i>%7</i>	<i>%10</i>
Distile su	15.3 ml	3.65 ml
*1M Tris-HCl (pH:8.8)	7.5 ml	3.75 ml
*%40 Akrilamid	6.9 ml	2.50ml
*%10 SDS	150 µl	100 µl
*%10 Amonyum Persülfat	150 µl	100 µl
TEMED	200 µl	6 µl

*1M Tris-HCl (pH 8,8) Hazırlanışı: 12,114g Tris-HCl, distile suda çözdürülerek 100 ml'ye tamamlanır. 1N HCl veya 1N NaOH ile pH:8.8'e ayarlanır.

*%40'luk Akrilamid/Bisakrilamid Hazırlanışı: 19,48g akrilamid, 0,52g bisakrilamid 50mL suda çözülerek hazırlanır.

*%10'luk Amonyum Persülfat Hazırlanışı:0,1g Amonyum Persülfat tartılır, distile suda çözülerek 1ml'e tamamlanır. Jel hazırlanışı sırasında taze olarak hazırlanmalıdır.

*%10'luk SDS Hazırlanışı: 4g SDS tartılır distile suda çözülerek 40ml'e tamamlanır.

Çizelge 4.5'e göre hazırlanan ayrıştırma jeli cam plakalar arasına dökülmüştür. Üzerine 1-2 ml propanol eklenmiştir. Jel donduktan sonra propanol dökülerek üzerine yağma jeli hazırlanarak dökülmüştür.

Yığıma Jelinin (Stacking Gel) Hazırlanışı

Yığıma jeli Çizelge 4.6'a göre hazırlanarak ayrıştırma jelinin üzerine dökülerek tarak yerleştirilmiştir. Yığıma jeli donduktan sonra tarak çıkarılmıştır. Oluşan kuyuların üzeri SDS jel elektroforezinde kullanılan running buffer ile kapılmıştır.

Çizelge 4.6. Yığıma jeli hazırlanışında kullanılan malzemeler ve miktarları

<i>Stok Solüsyon</i>	
Distile su	2.329 ml
*1M Tris-HCl (pH:6.8)	375 µl
%40 Akrilamid	281 µl
%10 SDS	30 µl
%10 Amonyum Persülfat	30 µl
TEMED	5 µl

*1M Tris-HCl (pH 6,8) Hazırlanışı: 12,114g Tris-HCl, distile suda çözdürülerek 100 ml'ye tamamlanır. 1N HCl veya 1N NaOH ile pH:6.8'e ayarlanır.

2X Elektroforez tamponu (Running Buffer) Hazırlanışı: 12g Tris Base, 57,6g Glisin, 4g SDS tartılarak distile su ile 2 litre çözelti hazırlanır. Elektroforez işleminden önce 1:1 oranında sulandırılarak kullanılır.

Yığıma jelindeki ilk kuyuya protein marker (Cell Signaling Technology, Ref: 14208) yüklenmiştir. Diğer kuyulara örnekler yüklenerek jel 70V'da yaklaşık 2 saat 30 dk yürütülmüştür. mA ve W değerleri en yüksek olacak şekilde ayarlanmıştır.

4.5.4.3. Proteinlerin jelden membrana aktarılması ve antikorlar ile muamelesi

Proteinlerin jelden membrana aktarılması sırasında yarı-kuru sistem özelliğine sahip Biometra Fasblot cihazı (Analytik jena, Almanya) kullanılmıştır. Transfer sırasında Transfer tamponu (transfer buffer) kullanılmıştır.

Transfer Tamponu (Transfer Buffer) Hazırlanışı: 25 mM Tris base, 192 mM Glisin, %7 Metanol, 50.07 SDS içerir. 28.826 gr Glisin, 6.057 g Tris-Base, 1.4 g Sds ve 140 ml metanol karıştırılarak hazırlanır.

Çalışmamızda Tris-Glycine Transfer Buffer (Cell Signaling Technology, Ref. 12539) kullanıldı. Firmanın protokolünde belirtildiği üzere 1:10 distile su ile sulandırılarak ve metanol eklenmiştir (10 ml Transfer Buffer, 70ml dsu, 20ml metanol (saf)).

- Yürütme işleminden sonra jel, cam plakalar arasından çıkarılarak yığma jelinden ayrılmıştır.
- Jel transfer solüsyonuna alınarak yaklaşık 15 dakika bekletilmiştir.
- 11x10 cm ebatlarında on iki kurutma kağıdı kesilmiştir. Kesilen kurutma kağıtlarından altı tanesi transfer solüsyonunda ıslatılarak cihazın tabanına yerleştirilmiştir.
- Cihaza yerleştirilen kurutma kağıtlarının üzerine membrana ait kurutma kağıdı da, transfer solüsyonu ile ıslatılarak, yerleştirilmiştir.
- 8x9 cm ebatlarında hazır kesilmiş nitroselüloz membran (Cell Signaling Technology, Ref:12369), transfer solüsyonunda bekletilerek kurutma kağıtlarının üzerine yerleştirilmiştir.
- Membran üzerine jel yerleştirilerek üzerine membrana ait kurutma kağıdı ıslatılarak yerleştirilmiştir. Roller kullanılarak membran ile jel arasındaki hava kabarcıkları çıkarılmıştır.
- 11x10 cm ebatlarında kesilmiş olan altı kurutma kağıdı transfer solüsyonunda ıslatılarak jelin üzerine yerleştirilmiştir.
- Cihazın kapağı yerleştirildikten sonra 20-30 mA'de yaklaşık 3 saatte proteinlerin transferi gerçekleştirilmiştir.
- Membran +4°C'de bir gece veya en az 1 saat oda sıcaklığında bloklama solüsyonu içerisinde (%5 TBST Solüsyonuyla hazırlanan yağsız süt tozu) bekletilmiştir.
- Membran, blotlama işleminden sonra üç kez TBST solüsyonu ile yıkanmıştır (15dk, 5 dk, 5dk).
- Yıkama işleminden sonra 1:1000 oranında sulandırılmış primer antikor solüsyonu eklenerek 1 gece +4 °C'de bekletilmiştir.
- Membran primer antikor muamelesinden sonra üç kez TBST solüsyonu ile yıkanmıştır (15dk, 5 dk, 5dk).

- Membran, 1:2000 oranında dilue edilen (%5 yağsız süt tozu TBST ile) sekonder antikör (Anti-rabbit IgG HRP Linked Antibody) ile 1 saat çalkalanarak muamele edilmiştir.
- Membran TBST ile yıkanmıştır.
- Membran siyah zemine alınmıştır ECL substratından eşit miktarda Reagent A ve Reagent B karıştırılarak membran üzerine dökülmüştür, 1 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir.
- Karanlıkta bekletildikten sonra membranın üzeri kurumasını engellemek için şeffaf bir plastik ile kapatılmıştır. Roller ile hava kabarcıkları çıkarılarak görüntüleme cihazına yerleştirilmiştir.

4.5.4.4. Görüntüleme ve analiz

Western blot jel görüntüleri Gel Logic Imaging system (Kodak) kullanılarak alınmıştır. Oluşan bantların kantitatif analizi için GelQuant.NET programı kullanılmıştır.

4.6. İstatistiksel Değerlendirme

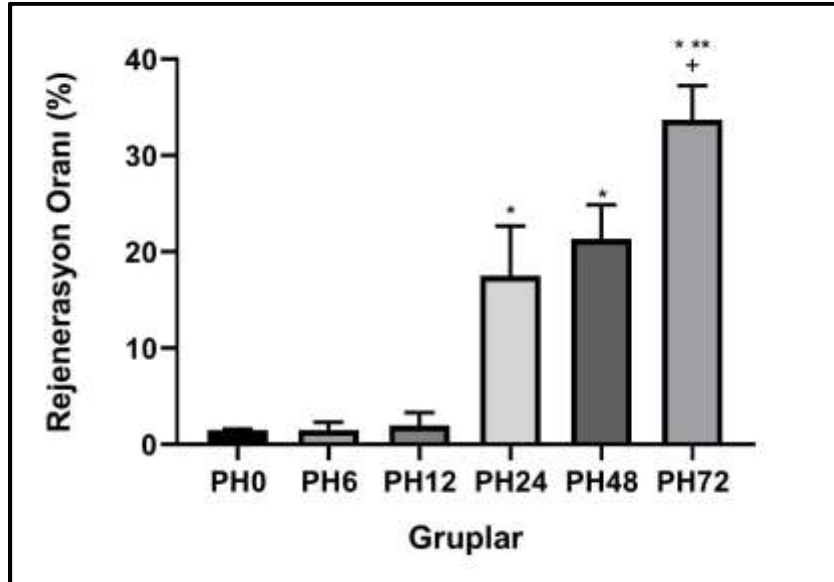
Çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde “GraphPad Prism 8” yazılımı kullanılmıştır. Karaciğer ağırlıklarına göre rejenerasyon oranı, ki67 pozitif hücre sayısı istatistiksel analizlerinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıkların ortaya koyulmasında Tukey Testi kullanılmıştır. RT-PCR gen ifadesi analizleri Livak Metodu’na göre değerlendirilmiştir ve gruplar arasındaki gen ifadesi farklılıklarının kat sayısı $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ile ifade edilmiştir. Gen ifadesinin istatistiksel analizlerinde kontrol grubu ile karşılaştırılmasında Qiagen Data analiz Center kullanılmıştır. Ayrıca gruplar arasındaki gen ifadelerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde ΔCt kullanılarak ANOVA Bonferonni Testi uygulanmıştır (Fernandes vd., 2013). Tüm analiz sonuçlarında $p \leq 0.05$ göre anlamlı kabul edilmiştir ve $\pm SD$ kullanılmıştır.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Karaciğer Rejenerasyon Oranı

Karaciğerin bir kısmı alındıktan sonra karaciğer fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için vücut ağırlığına oranla kitlesini arttırmaya gider. Bu nedenle G_0 fazındaki hepatositler bölünmeye başlar ve bir-iki bölünmeden sonra tekrar kontrollü şekilde G_0 fazına geri dönerler. %70 parsiyal hepatektominin hemen arkasından ilk saatlerden itibaren hepatositlerin proliferasyonu uyarılır (Fausto, 2000). DNA sentezi 14. saatte başlar ve 24. saatte en yüksek seviyesine ulaşır. 48. saatte kalan karaciğer neredeyse iki katına çıkar ve bir haftada kendini tamamen yenilemiş olur ve hepatositler tekrar G_0 fazına geçerler (Wang vd., 2009; Toydemir vd., 2015).

Çalışmamızda PH sonrası rejenerasyon oranları karaciğer ağırlıklarına göre hesaplanmıştır. Şekil 5.1’de gruplar arasındaki karşılaştırmalar verilmiştir.



Şekil 5.1. Parsiyal Hepatektomi Gruplarına ait karaciğer rejenerasyon oranları (Ortalama±SD). * $P < .0001$ PH0, PH6, PH12’e göre; ** $P < .0001$ PH24’e göre; + $P < .001$ PH48’e göre anlamlı fark vardır.

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde; PH0, PH6, PH12 grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. PH0, 6, 12 saatler ile PH24, 48, 72 saatleri arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($p \leq 0.05$). PH48. saatte, PH24. saate göre rejenerasyon oranı artmış olmasına rağmen anlamlı bir fark bulunmamıştır. PH72. saatte karaciğer rejenerasyon oranı en yüksektir ve diğer tüm PH guplarına göre anlamlı fark gözlenmiştir ($p \leq 0.05$).

Literatürde benzer sonuçlara rastlanmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde PH sonrası rejenerasyonun 1. günde artmaya başladığı Mizutani ve vd.nin (2013) tarafından da gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda rejenerasyon oranının genellikle zamana bağlı artış gösterdiği belirtilmiştir (Matot vd., 2018; Meier vd., 2016; Mizutani vd., 2013; Niiya vd., 1999; Jianhua Yu vd., 2015).

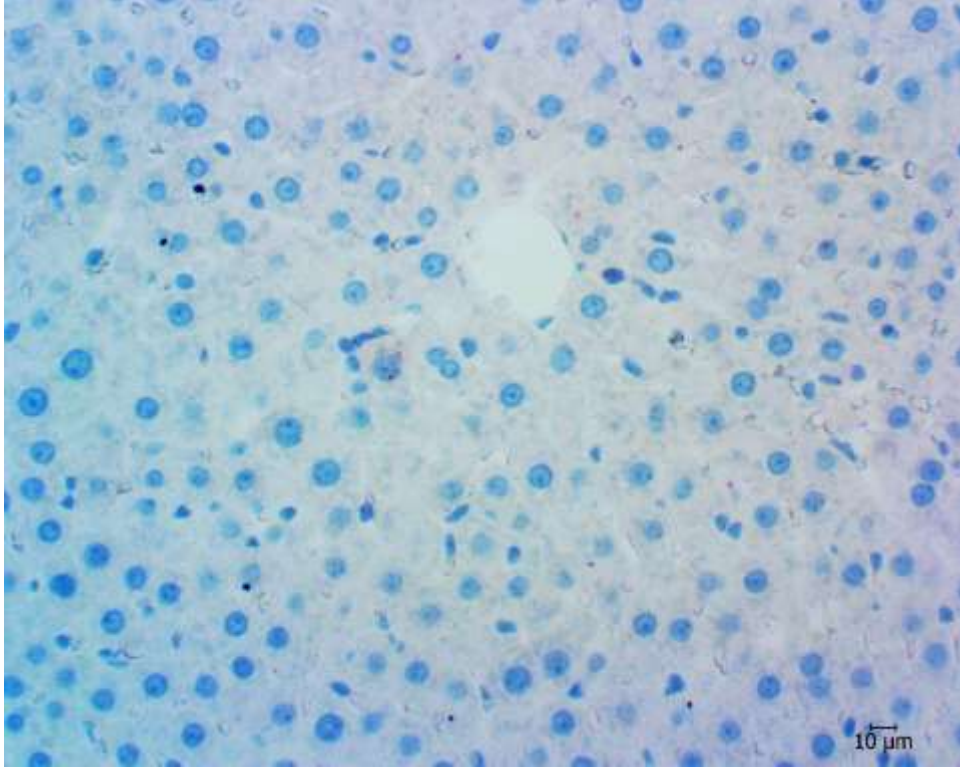
5.2. ki67 İmmunohistokimya Analizi

Karaciğer rejenerasyon oranının hesaplanmasında karaciğer ağırlık oranlarının hesaplanması yeterli olmayabilmektedir ve farklı analizler ile desteklenmesi gereklidir (Assy ve Minuk, 1997).

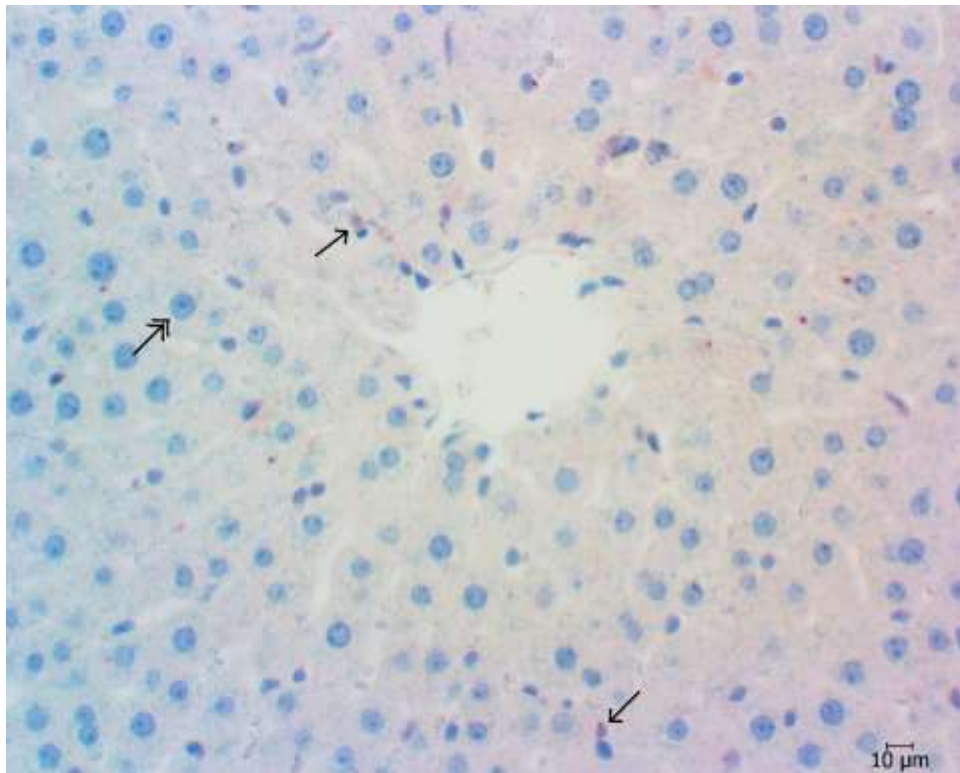
ki67, proliferasyon belirteci olarak en çok tercih edilen immunohistokimyasal markırlardan biridir. ki67 proteini hücrelerin dinlenme fazı olan G_0 fazında bulunmazken; hücre döngüsünün tüm safhalarında (G_1 , S, G_2 , M) aktif olarak bulunur (Bruno ve Darzynkiewicz, 1992). S fazında miktarının arttığı bilinmektedir (Bruno ve Darzynkiewicz, 1992). ki67'nin hücredeki moleküler mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak Cuylen ve vd.nin yapmış olduğu çalışmada (2016); ki67'nin mitotik kromozom çevresini sararak tek kromatin yapısına dönmesini engellediği ve bu sayede kromozomların mitotik iğe bağlanabileceği belirtilmektedir (Cuylen vd., 2016).

Çalışmamızda ki67 ile immunohistokimyasal olarak boyanmış doku kesitleri incelendiğinde hepatositlerde kıvıllı-kahverengi görünümümlü çekirdeğe sahip ki67 pozitif hücrelere rastlanmıştır. Kontrol grubu ve sham grupları (SH6, SH12, SH24, SH48, SH72) ve PH grupları başlangıç saatleri olan PH0, PH6 gruplarında ki67 pozitif hücre sayısı birbirine yakın ve oldukça az sayıda olduğu görülmüştür (Şekil 5.2, Şekil 5.3). PH12 saat grubunda, kontrol, sham, PH0, PH6 saat gruplarına göre ki67 pozitif hücre sayısında bir

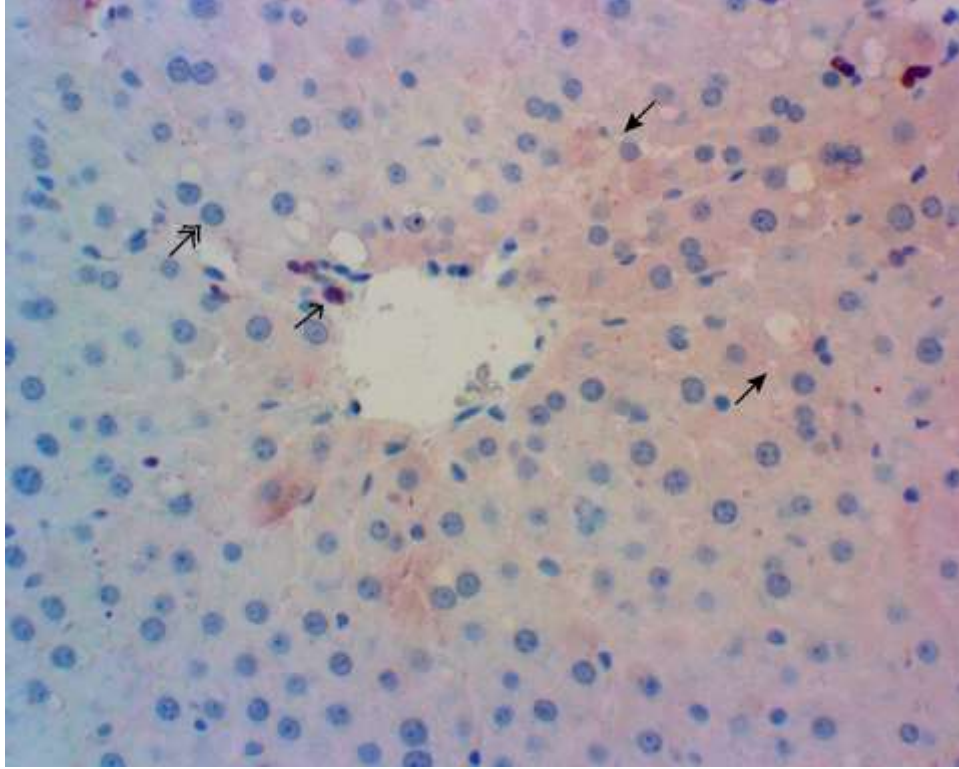
miktar artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.4). PH24 saat grubunda ki67 pozitif hücrelerde önemli oranda artış olduğu görülmüştür (Şekil 5.5) ve PH48 saat grubunda ki67 pozitif hücre sayısının en fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.6). PH72 saat grubunda PH48 saat grubuna göre daha az ki67 pozitif hücreye rastlanırken; PH24 saat grubu ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.5, Şekil 5.8). PH gruplarında rejenerasyona bağlı vakuolizasyon tespit edilmiştir (Şekil 5.4-Şekil 5.9).



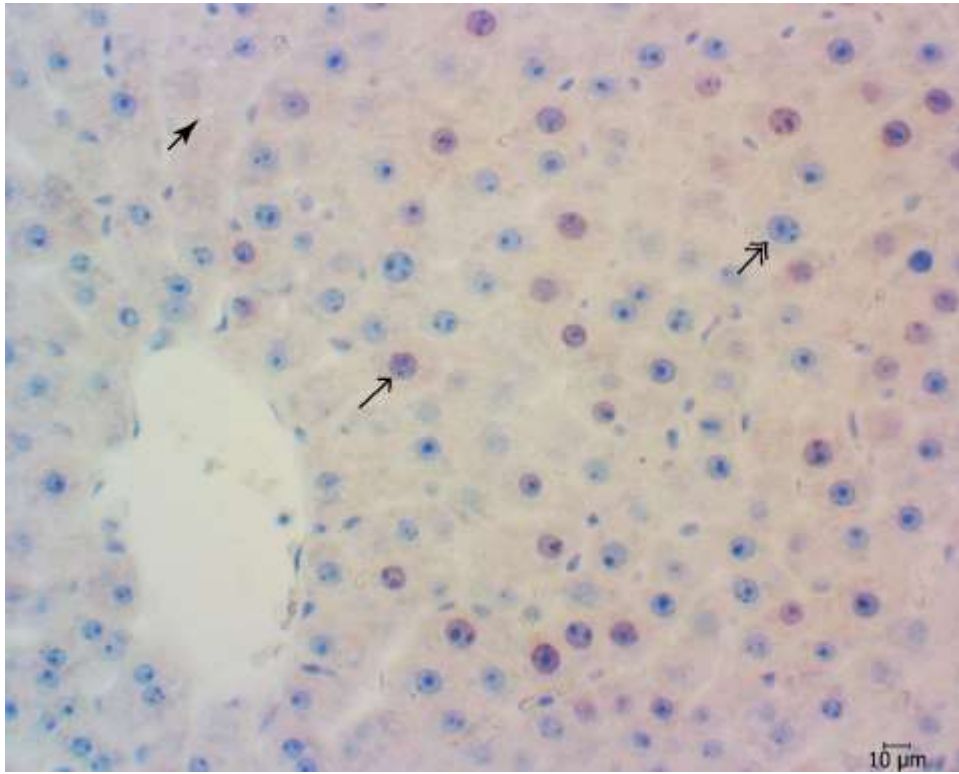
Şekil 5.2. Karaciğer kesitlerinde ki67 immunohistokimya boyama. Kontrol Grubu



Şekil 5.3. Karaciğer kesitlerinde ki67 immunohistokimya boyama. PH6 grubu Ki67 pozitif (→) ve Ki67 negatif hücreler (→→)



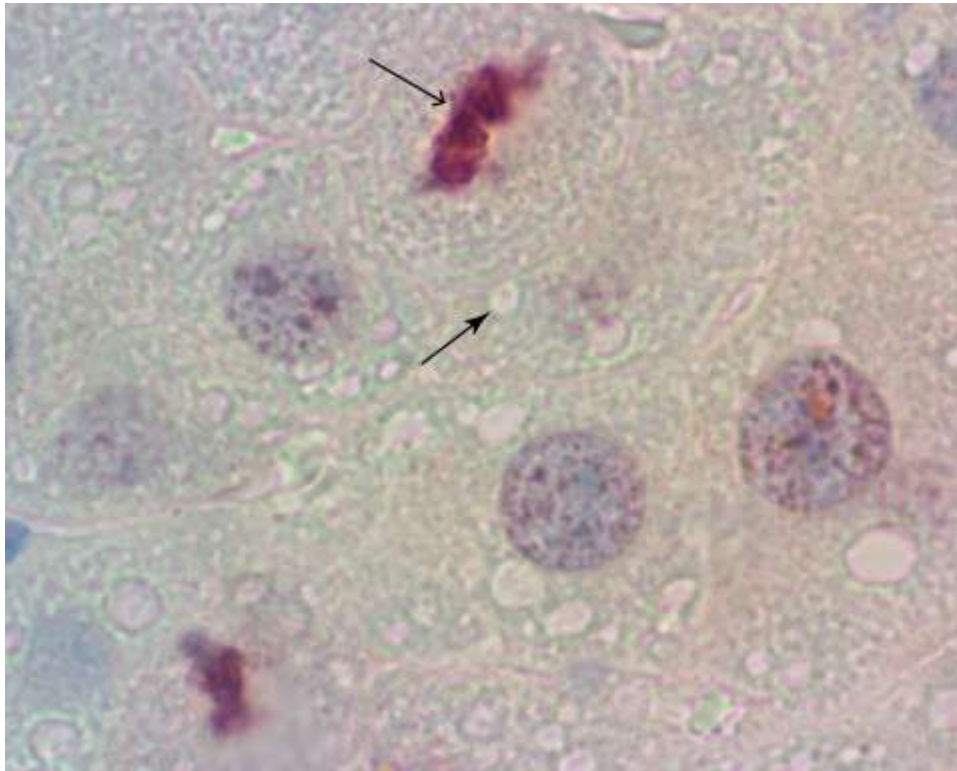
Şekil 5.4. Karaciğer kesitlerinde ki67 immunohistokimya boyama. PH12 grubu yer yer ki67 pozitif hücreler (→), ki67 negatif hücreler (→) ve vakuolizasyon (→)



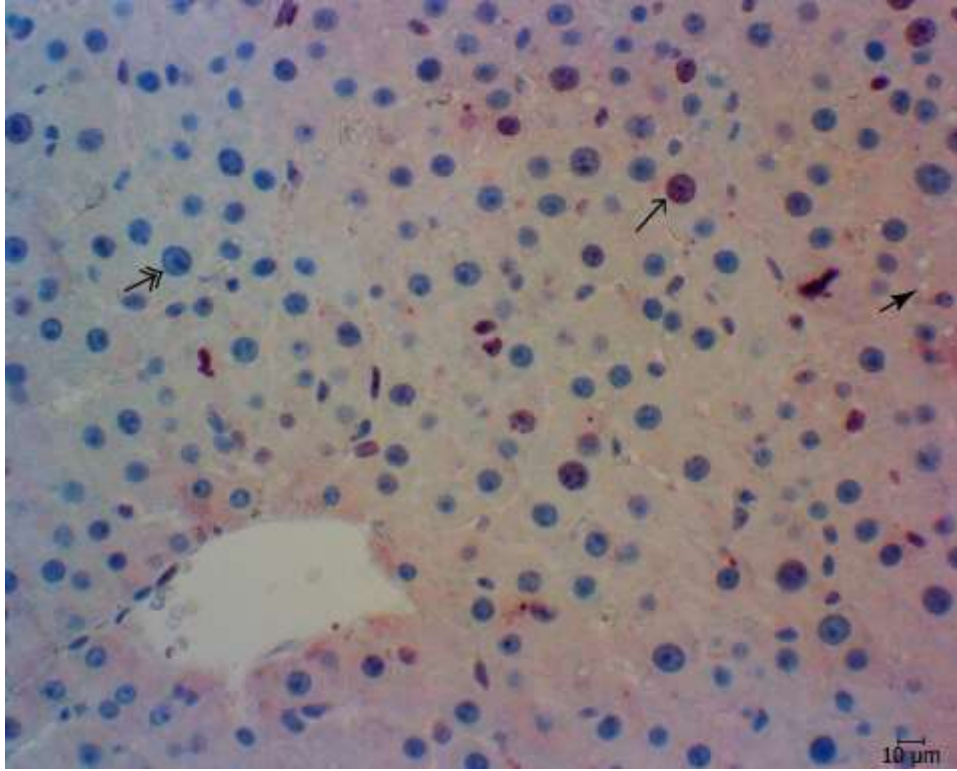
Şekil 5.5. Karaciğer kesitlerinde ki67 immunohistokimya boyama. PH24 grubu yer yer ki67 pozitif hücreler (→), ki67 negatif hücreler (→) ve vakuolizasyon (→)



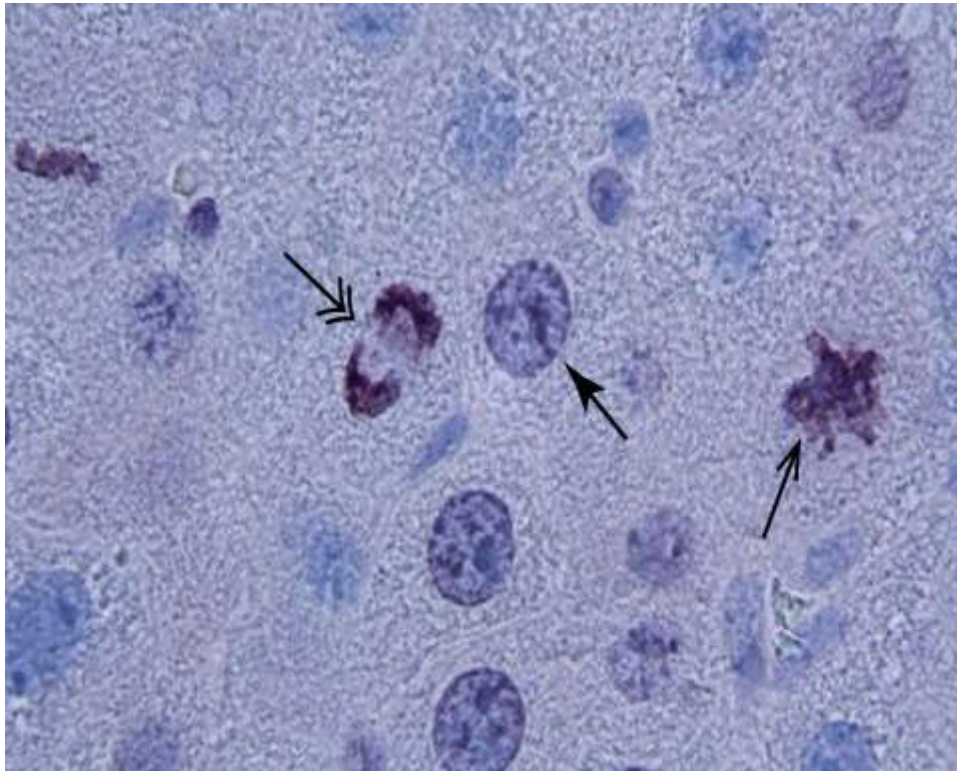
Şekil 5.6. Karaciğer kesitlerinde ki67 immunohistokimya boyama. PH48 grubu yer yer Ki67 pozitif hücreler(→), ki67 negatif hücreler (⇨) ve vakuolizasyon (→)



Şekil 5.7. PH48 grubu karaciğer kesitlerinde ki67 immunohistokimya boyama ve mitoz safhaları. Metafaz (→) Vakuolizasyon (→) (x100)

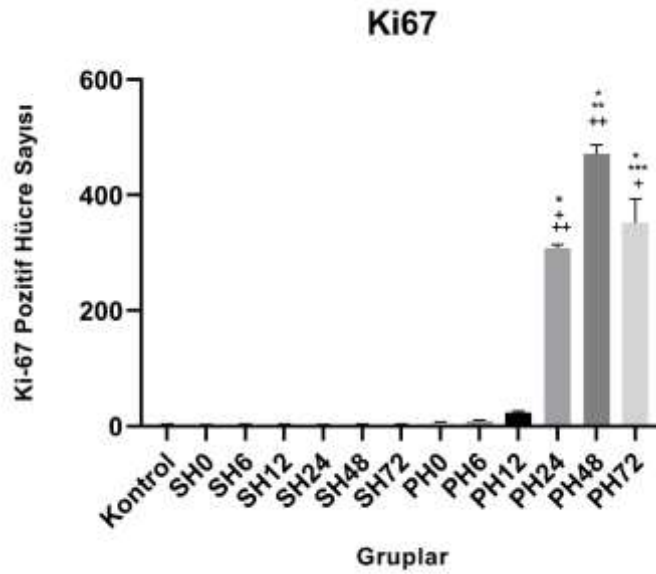


Şekil 5.8. Karaciğer kesitlerinde ki67 immunohistokimya boyama. PH72 grubu yer yer Ki67 pozitif hücreler (→), ki67 negatif hücreler (→→) ve vakuolizasyon (→)



Şekil 5.9. PH72 grubu karaciğer kesitlerinde ki67 immunohistokimya boyama ve mitoz safhaları. Profaz (→→) Metafaz (→) Anafaz (→→) (x100)

Ki67 pozitif hücre sayıları gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; kontrol grubu, sham grupları, PH0, PH6, PH12 arasında ki67 pozitif hücre sayısı bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kontrol grubu, sham grupları, PH0, PH6, PH12 grupları ile PH24, PH48, PH72 grupları arasında ileri derecede anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.0001$). PH24, PH48 ve PH72 saatler ki67 pozitif hücre sayıları bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında PH48 saatte ki67 pozitif hücre sayısının diğer tüm gruplara göre en yüksek olduğu istatistiksel olarak ortaya konmuştur ($p<0.0001$). PH72 saatte ki67 pozitif hücre sayısı PH24 saate göre daha yüksektir ($p<0.01$) (Şekil 5.10).



Şekil 5.10. Parsiyal hepatektomi gruplarında ki67 pozitif hücre sayısı (Ortalama± SD).
 * $P<.0001$ Kontrol, SH0, SH6, SH12, SH24, SH48, SH72, PH0, PH6, PH12'e göre;
 ** $P<.0001$ PH24 'e göre; *** $P<.001$ PH24 'e göre + $P<.0001$ PH48'e göre,
 ++ $P<.0001$ PH72'e göre anlamlı fark vardır.

PH ile tetiklenen karaciğer rejenerasyonu modelinde ki67 pozitif hücrelerin PH sonrasında 6. güne kadar görülebildiği belirtilmiştir. Hepatositlerde proliferasyonun 24. saatten itibaren başladığı, 2.5 gün (60 saat) boyunca aktif olarak devam ettiği, 4. günde de (96 saat) proliferasyonun yavaşladığı gösterilmiştir. 4,5 gün ve sonrasında (~108sa) sadece çok az miktardaki hepatosit popülasyonunun tekrar proliferasyon gösterdiği belirtilmiştir (Zou vd., 2012). Zou ve vd.nin çalışmasında ki67 pozitif hücre sayısının PH sonrası 48. saatte 72. saate göre yüksek olduğu gösterilmiştir (Zou vd., 2012) ve çalışmamızla paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, PH sonrası 24, 48, 72 saatlerde ki67 pozitif hücre sayıları karşılaştırılmış ve çalışmamıza benzer şekilde sırasıyla 48. saat,

72. saat ve 24. saatlerde en yüksek olduğu belirlenmiştir (Lehmann vd., 2012). Çalışmamızın sonuçlarını destekleyen çok sayıda literature rastlanmıştır (Furrer vd., 2008; Gerlach vd., 1997).

5.3. PH Modeline Uygun Referans Genlerin Belirlenmesi

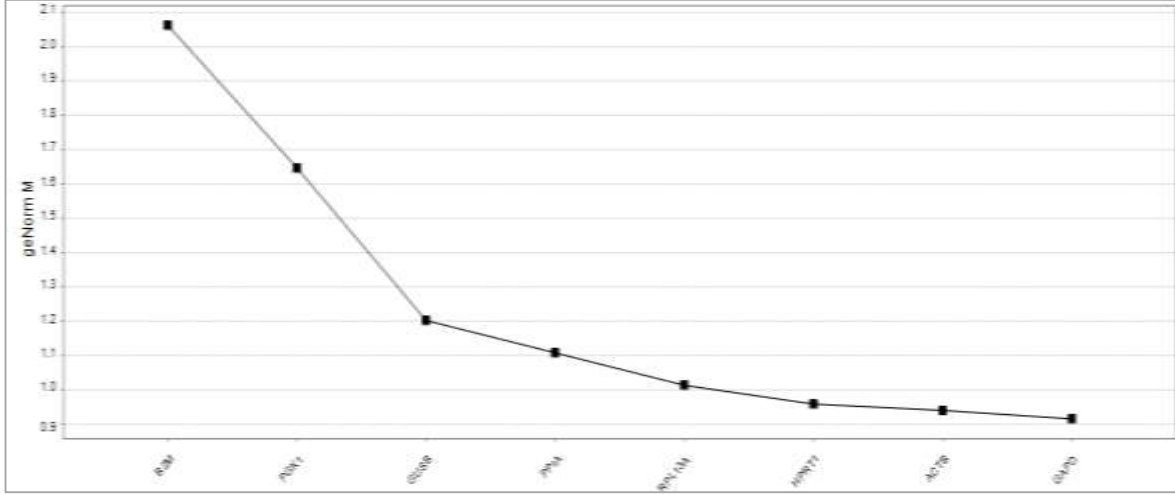
Referans gen, farklı deney koşullarında ifadesi değişiklik göstermeyen veya etkilenmeyen gen olarak kabul edilir (Radonic vd., 2004). Referans genler, RT-PCR analizlerinde, amplifiye olan cDNA miktarındaki farklılıkların, RNA'nın hazırlanması ve cDNA'nın sentezi aşamasındaki farklılıkların en aza indirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Radonic vd., 2004). Referans gen ile hedef gen aynı hazırlama aşamalarından geçtiği kabul edilir. Referans gende meydana gelen ekspresyon farklılıklarına göre hedef genin normalizasyonu gerçekleştirilerek kullanıcı kaynaklı hataları en aza indirmeye çalışılmaktadır.

Suzuki ve vd.nin araştırmasında benzer çalışmaların çoğunda referans gen olarak genellikle GAPDH veya ACTB'nin kullanıldığı belirtilmiştir. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bu genlerin çalışma modeline, dokuya ve hücre tipine (*in vitro* çalışmalarda) göre ekspresyonlarında farklılıklar olabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle farklı deney modellerinde referans genlerin doğrulanması önemlidir (Silver vd., 2006). Referans genlerin stabilitesi deney modeline ve doku/hücre tipine göre değişkenlik gösterdiği çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur (Silver vd., 2006; Schmittgen ve Zakrajsek 2000; Xing vd., 2009). Uygun referans gen seçimini sağlayan farklı yazılımlar (GeNorm, Normfinder, Bestkeeper) mevcuttur. Çalışma modelimize uygun referans genlerin seçiminde literatürlerde de sıklıkla tercih edilen Genorm yazılımı kullanılmıştır.

Çalışmamızda RT-PCR Array plate nde yer alan ACTB, B2M, GAPDH, GUSB, HPRT1, PGK1, PPIA VE RPL13A referans genleri arasında PH modeli için en uygun olanları Genorm analiz programı aracılığı ile belirlenmiştir. Bu genlere ait CT değerlerinin Genorm analiz programına girilmesi ile Şekil 5.11'deki grafik elde edilmiştir.

Genorm analiz programından elde edilen analizlerle kontrol genleri en stabil olacak şekilde GAPDH>ACTB>HPRT1>RPL13A>PPIA>GUSB>PGK1>B2M sıralanmıştır. Bu

verilere göre en stabil referans gen GAPDH iken; ekspresyonu en değişken referans gen B2M'dir. Genorm analiz programı en stabil beş genin referans gen olarak kullanılmasını önermiştir. Bu sonuçlardan elde edilen verilere göre GAPDH, ACTB, HPRT1, RPL13A, PPIA referans genleri çalışmamız için en uygun referans genler olarak belirlenmiş ve RT-PCR-Array plate'nde yer alan hedef genlerin fold değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 5.11. Genorm Analiz Programı referans gen stabilitesi. En stabil referans gen sıralaması: Gapdh>Actb>Hprt1>Rpl13a>Ppia>Gusb>Pgk1>B2m

5.4. RT-PCR Array Gen İfadesi Analiz Sonuçları

RT-PCR analizleri sonucu cihazın verdiği Ct değerleri Livak metoduna göre $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold değerleri) hesaplanmıştır. Genlerin fold değerleri Çizelge 5.1'de verilmiştir.

RT-PCR sonucunda elde edilen Ct değerleri Livak metodu (Comparative $\Delta\Delta Ct$ metod) na göre hesaplanarak ΔCt , $\Delta\Delta Ct$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold change, relative quantification) değerleri hesaplanmıştır. Herbir biyolojik örneğe ait ΔCt değerleri GraphPad Prism 8 programında ANOVA Bonferroni testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Çizelge 5.2 ve Çizelge 5.3'de sham ve rejenerasyon gruplarına ait ortalama $\Delta Ct \pm SD$ değerleri ve analizler sonucunda elde edilen p değerleri verilmiştir. Karşılaştırmalar sonucunda gen ifadeleri $p < 0.05$ ve fold değeri ≤ 0.5 ve fold değeri ≥ 2 olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 5.1. PH gruplarına ait $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (fold değerleri). Grup 8 (PH0), Grup 9(PH12), Grup 10 (PH24), Grup11 (PH48), Grup12 (PH72) **kırmızı**: fold değeri ≥ 2 ve **yeşil** Fold değeri ≤ 0.5 olarak ifade edilmiştir.

Fold change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) Expresyonu artan (↑) ve azalan (↓) genler						
Gen	Grup 8	Grup 9	Grup 10	Grup 11	Grup 12	Grup 13
ANAPC2	7,05	19,01	3,30	2,50	13,12	5,93
ANAPC11	0,47	0,75	0,87	0,13	0,37	0,39
ARIH1	0,52	0,37	0,48	0,18	0,23	0,26
ATG7	0,61	1,16	0,95	0,51	0,90	0,72
BARD1	4,17	4,68	3,28	66,47	46,26	19,67
BRCA1	0,77	0,23	0,21	4,34	3,58	3,12
BRCA2	0,98	0,74	1,31	3,94	2,29	2,77
BRCC3	0,34	0,36	0,45	0,12	0,23	0,58
BTRC	0,46	0,52	0,30	0,39	0,16	0,55
CB1	2,26	1,06	1,76	1,12	1,04	2,68
CDC34	1,38	1,16	1,52	0,97	1,81	1,16
CUL1	1,65	0,74	0,92	0,69	0,91	1,38
CUL2	0,70	0,33	0,65	0,29	0,64	0,49
CUL3	1,16	0,65	1,53	0,58	0,64	2,79
CUL4B	0,97	0,25	1,08	0,57	0,13	0,97
CUL5	1,12	2,66	1,49	0,40	0,52	2,25
DDB1	2,04	2,30	1,92	1,45	2,26	1,71
FBXO11	0,29	0,52	0,54	0,29	0,32	0,41
FBXO32	0,73	0,29	0,17	0,08	0,14	0,33
FBXO4	0,59	0,03	0,07	0,04	0,13	0,42
FBXO6	0,13	0,09	0,11	0,09	0,44	0,22
FBXW9	0,40	0,09	0,64	0,24	0,45	1,37
HECW2	1,10	1,32	1,03	0,33	0,65	0,46
ITCH	1,64	0,52	0,45	0,29	0,64	0,69
MARCH5	0,36	0,82	0,29	0,15	0,51	0,61
NDM2	1,09	1,05	1,03	1,55	1,29	2,22
MIB1	0,39	0,29	1,73	0,65	0,04	1,09
MOCS3	0,48	0,35	1,28	0,34	0,22	0,95
MUL1	2,17	1,09	8,09	0,90	1,07	0,76
NAE1	0,69	0,82	2,88	0,77	2,56	0,64
NEDD8	1,27	0,05	1,71	0,53	1,00	0,38
PARK2	0,82	0,03	0,04	0,04	0,05	0,09
RFWD2	0,46	0,27	0,50	0,37	0,85	0,76
RLIM	0,32	0,23	1,02	0,16	0,57	0,65
RNF144B	0,31	1,16	0,96	0,61	0,46	0,72
RNF167	1,30	0,41	1,02	1,31	1,02	0,92
RNF2	0,31	1,16	0,96	0,61	0,46	0,72
RNF20	0,77	0,26	0,73	0,46	0,05	0,65
RNF34	0,68	0,13	2,16	0,20	0,05	3,29
RNF40	1,53	1,16	4,06	1,09	1,80	2,58
RNF6	0,88	0,59	9,11	0,88	2,29	1,73
RNF8	0,91	0,51	2,89	1,53	2,54	6,13
SAE1	0,65	0,36	2,06	1,09	1,81	4,37
SKP1	0,11	0,12	0,30	0,16	0,14	0,16
SKP2	0,61	0,06	0,29	1,45	1,28	1,73
SMURF1	1,30	0,33	1,46	0,65	0,81	2,63
SMURF2	1,22	0,52	0,96	1,03	1,28	1,23
STUB1	0,73	1,16	1,92	1,02	1,13	1,45

Çizelge 5.1. (devam)

Fold change ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) Expresyonu artan (↑) ve azalan (↓) genler						
Gen	Grup 8	Grup 9	Grup 10	Grup 11	Grup 12	Grup 13
SYVN1	0,58	0,36	1,29	0,82	0,45	2,75
TMEM189	0,77	0,41	0,86	0,77	0,40	1,10
TP53	0,46	0,10	2,90	0,65	0,25	1,84
UBA1	1,24	0,58	3,28	1,03	1,14	2,08
UBA2	1,84	1,84	5,72	2,19	2,28	2,16
UBA3	1,25	0,21	1,65	0,88	1,31	1,49
UBA5	0,27	0,20	5,42	1,21	2,55	2,03
UBA6	0,24	0,01	0,38	0,12	0,12	0,58
UBE2A	0,19	0,16	1,22	0,46	0,51	0,46
UBE2B	0,14	1,04	1,46	0,23	0,32	0,05
UBE2C	2,05	1,63	3,22	23,07	51,56	16,35
UBE2D3	0,78	0,93	1,22	0,55	0,23	1,11
UBE2E2	0,69	0,46	0,91	0,34	0,23	0,41
UBE2G1	0,74	0,25	0,82	0,31	0,39	0,37
UBE2G2	0,87	4,66	5,51	1,03	1,15	1,23
UBE2I	0,97	0,09	2,15	0,29	0,90	1,64
UBE2J1	0,70	0,37	1,55	0,49	0,58	0,49
UBE2J2	0,47	0,46	3,49	1,57	0,11	3,15
UBE2K	0,24	0,26	0,65	0,21	0,32	0,25
UBE2L3	0,48	0,51	0,45	0,34	1,01	0,24
UBE2L6	0,99	1,06	0,39	1,17	0,65	0,99
UBE2M	1,46	1,31	1,37	1,03	1,29	1,03
UBE2N	0,48	1,29	1,83	0,57	0,80	0,68
UBE2Q1	0,69	0,73	0,91	0,34	0,18	0,49
UBE2Q2	0,24	0,16	1,09	0,17	0,07	0,70
UBE2Q2L	0,53	0,11	0,86	0,23	0,23	0,77
UBE2S	0,51	0,58	1,36	0,86	0,90	1,45
UBE2T	2,89	0,72	5,55	39,47	74,04	79,29
UBE2V1	0,10	0,07	0,88	0,23	0,23	0,66
UBE2V2	0,49	0,51	1,82	0,34	0,51	1,37
UBE2Z	1,64	0,14	1,29	0,69	1,44	0,82
UBE4A	1,08	0,29	0,85	0,54	1,42	1,53
UHL1	1,04	0,94	2,31	1,75	1,46	2,09
UHL5	1,01	1,16	3,79	0,42	0,22	0,51
VHL	0,87	1,64	1,14	0,73	0,64	0,51

Çizelge 5.2. Sham ve PH gruplarına ait ortalama $\Delta Ct \pm SD$ değerleri ve analizler sonucunda elde edilen p değerler

Gen		ΔCt value \pm SD						SH Grubu ve PH Grubu İntergen Analizleri P değerleri					
		0h	6h	12h	24h	48h	72	SH0-PH0	SH6-PH6	SH12-PH12	SH24-PH24	SH48-PH48	SH72-PH72
Anapc2	SH	7,84 \pm 1,92	11,49 \pm 0,39	8,61 \pm 1,17	10,53 \pm 1,52	10,83 \pm 1,16	7,62 \pm 0,65	>0,9999	0,0006	>0,9999	>0,9999	0,0063	>0,9999
	PH	7,75 \pm 0,20	6,32 \pm 0,68	8,84 \pm 1,94	9,25 \pm 0,86	6,85 \pm 0,63	8,00 \pm 0,72						
Anapc11	SH	11,59 \pm 0,26	12,14 \pm 1,14	13,94 \pm 2,07	9,01 \pm 0,45	10,07 \pm 1,11	11,61 \pm 1,16	>0,9999	>0,9999	0,1983	< 0,0001	0,0772	>0,9999
	PH	12,50 \pm 1,39	11,82 \pm 1,94	11,59 \pm 1,13	14,31 \pm 1,95	12,84 \pm 1,49	12,74 \pm 1,34						
Arih1	SH	5,84 \pm 1,59	5,81 \pm 0,31	7,44 \pm 1,88	6,03 \pm 0,75	4,57 \pm 1,69	5,62 \pm 0,92	>0,9999	>0,9999	0,7404	0,4306	0,0250	0,5375
	PH	6,00 \pm 0,87	6,49 \pm 0,58	6,09 \pm 0,59	7,50 \pm 1,13	7,19 \pm 1,19	7,00 \pm 1,26						
Atg	SH	5,59 \pm 0,93	4,46 \pm 0,41	5,58 \pm 1,12	4,86 \pm 0,57	5,07 \pm 0,43	4,84 \pm 0,97	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,6939	>0,9999	>0,9999
	PH	5,74 \pm 1,53	4,81 \pm 0,31	5,09 \pm 0,60	5,99 \pm 0,73	5,18 \pm 1,19	5,49 \pm 1,40						
Bard1	SH	11,82 \pm 0,49	13,48 \pm 0,40	14,93 \pm 1,15	14,80 \pm 2,52	12,32 \pm 0,66	11,86 \pm 2,25	>0,9999	0,1120	0,0062	< 0,0001	0,0002	0,0121
	PH	10,98 \pm 0,29	10,82 \pm 0,31	11,33 \pm 0,92	6,99 \pm 0,73	7,51 \pm 0,93	8,74 \pm 0,86						
Brca1	SH	6,87 \pm 0,69	8,63 \pm 0,66	6,47 \pm 0,93	6,20 \pm 0,89	6,64 \pm 0,54	7,63 \pm 1,70	>0,9999	>0,9999	0,0122	0,0397	0,0453	0,0011
	PH	7,13 \pm 0,30	8,74 \pm 0,52	8,72 \pm 1,37	4,39 \pm 0,77	4,72 \pm 0,86	5,01 \pm 0,88						
Brca2	SH	10,08 \pm 1,77	13,14 \pm 0,84	11,94 \pm 1,50	10,77 \pm 0,75	11,33 \pm 1,41	9,85 \pm 0,16	>0,9999	0,4616	0,7525	0,2336	0,5160	>0,9999
	PH	10,74 \pm 0,65	11,14 \pm 1,46	10,33 \pm 0,28	8,74 \pm 0,52	9,52 \pm 0,78	9,25 \pm 0,78						
Brcc3	SH	8,34 \pm 2,93	10,82 \pm 0,83	8,92 \pm 1,48	10,04 \pm 0,44	10,59 \pm 0,89	7,87 \pm 1,28	0,9384	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	10,25 \pm 0,48	10,17 \pm 3,34	9,85 \pm 1,26	11,76 \pm 1,49	10,86 \pm 1,38	9,50 \pm 1,86						
Btrc	SH	3,33 \pm 1,71	5,47 \pm 0,60	5,28 \pm 1,75	3,09 \pm 0,45	5,32 \pm 0,74	4,11 \pm 1,41	0,5626	>0,9999	>0,9999	0,1920	>0,9999	>0,9999
	PH	4,98 \pm 0,87	4,81 \pm 0,31	5,58 \pm 1,87	5,24 \pm 1,14	6,51 \pm 0,79	4,74 \pm 1,54						
Cb1	SH	8,09 \pm 1,22	9,49 \pm 0,61	9,63 \pm 0,55	9,53 \pm 0,79	9,58 \pm 0,81	7,86 \pm 1,56	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	7,74 \pm 1,05	8,82 \pm 1,31	8,09 \pm 1,15	8,74 \pm 1,19	8,85 \pm 0,39	7,49 \pm 0,78						
Cdc34	SH	6,09 \pm 0,82	5,81 \pm 0,31	6,30 \pm 0,98	6,53 \pm 1,02	6,82 \pm 0,92	6,37 \pm 0,70	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,7283	>0,9999
	PH	6,24 \pm 0,49	6,49 \pm 0,89	6,11 \pm 0,57	6,75 \pm 0,77	5,85 \pm 0,76	6,49 \pm 0,85						
Cul1	SH	5,34 \pm 1,37	5,48 \pm 0,86	6,27 \pm 0,98	6,28 \pm 0,86	5,83 \pm 0,44	5,37 \pm 1,39	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	5,00 \pm 0,87	6,16 \pm 0,83	5,84 \pm 1,06	6,25 \pm 1,14	5,85 \pm 0,39	5,25 \pm 1,12						
Cul2	SH	5,34 \pm 0,81	6,48 \pm 1,39	5,26 \pm 1,03	6,28 \pm 2,23	6,57 \pm 0,88	5,86 \pm 0,74	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	5,74 \pm 0,66	6,83 \pm 0,81	5,84 \pm 1,23	6,99 \pm 0,61	5,86 \pm 0,64	6,25 \pm 0,56						
Cul3	SH	5,83 \pm 1,75	8,15 \pm 0,84	6,60 \pm 2,09	8,03 \pm 2,19	9,33 \pm 1,55	5,85 \pm 0,17	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	6,99 \pm 1,30	7,83 \pm 0,30	6,59 \pm 0,39	7,99 \pm 2,01	7,85 \pm 0,63	5,72 \pm 0,26						

Çizelge 5.2. (devam)

Gen		ΔCT value ± SD						SH Grubu ve PH Grubu İntergen Analizleri P değerleri					
		0h	6h	12h	24h	48h	72	SH0-PH0	SH6-PH6	SH12-PH12	SH24-PH24	SH48-PH48	SH72-PH72
Cul4b	SH	7,87±3,09	10,15±1,47	7,94±3,55	8,78±1,01	9,59±1,13	8,86±1,40	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	8,23±1,64	10,16±1,13	8,08±1,69	9,00±0,92	11,18±3,85	8,23±1,75						
Cul5	SH	8,08±1,08	9,48±0,62	12,28±1,04	10,44±3,36	11,08±0,83	8,35±0,88	>0,9999	0,9483	0,0247	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	8,74±1,65	7,49±1,85	8,32±1,01	10,23±1,21	9,85±2,34	7,73±2,48						
Ddb1	SH	4,84±0,50	4,81±0,84	5,30±1,02	5,53±1,65	5,58±0,82	4,37±0,71	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,5745	>0,9999
	PH	3,99±1,45	3,82±2,05	4,08±1,70	4,49±0,87	3,85±0,39	4,25±1,24						
FBXO4	SH	12,04±2,09	12,35±7,03	15,87±0,34	14,31±4,37	14,10±1,97	16,12±0,76	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	12,78±3,02	16,91±0,95	15,85±1,53	16,55±0,88	14,88±3,83	13,26±3,63						
FBXO6	SH	9,63±1,32	10,82±0,34	10,30±1,00	9,10±0,44	9,82±1,16	9,88±1,48	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,7024	>0,9999	>0,9999
	PH	10,26±0,96	10,83±0,32	10,59±1,20	10,76±0,76	8,53±2,61	9,50±0,61						
FBXO11	SH	6,83±1,58	8,48±0,60	8,62±2,09	9,02±1,16	9,33±0,65	7,61±2,36	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	7,99±0,86	7,15±1,46	7,10±1,20	8,00±2,10	7,85±1,38	7,48±1,00						
FBXO32	SH	11,85±3,29	12,83±1,24	13,95±1,54	13,80±0,51	13,59±0,97	12,63±1,70	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,9893	>0,9999	>0,9999
	PH	11,51±2,18	12,82±0,98	13,59±2,86	14,77±2,14	13,87±3,00	12,62±0,93						
FBXW9	SH	12,30±1,84	12,82±0,94	12,29±2,64	12,02±0,78	12,35±1,28	11,13±2,18	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	11,01±2,79	13,17±1,12	10,35±2,61	11,76±2,43	10,85±1,17	9,25±2,73						
HECW2	SH	10,34±1,47	12,14±0,30	10,94±0,62	12,03±0,45	11,57±0,82	10,87±0,77	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	9,75±1,43	11,83±0,97	9,84±1,24	11,49±0,86	12,51±1,77	11,01±1,06						
ITCH	SH	5,35±0,62	5,48±0,40	5,93±1,16	5,03±0,45	5,07±1,20	4,11±0,52	0,1048	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	3,49±0,48	5,15±2,37	5,34±1,00	5,99±1,34	4,85±1,36	4,74±1,17						
MARCH	SH	5,58±0,95	5,15±0,29	4,58±0,63	5,27±1,79	5,58±0,52	4,62±0,54	>0,9999	>0,9999	0,2156	0,0746	>0,9999	>0,9999
	PH	5,99±0,60	4,82±1,24	6,34±2,03	7,25±1,19	5,52±1,23	5,24±0,45						
MDM2	SH	5,58±0,93	5,47±0,88	4,60±0,56	6,52±1,96	6,32±1,33	5,36±1,04	>0,9999	>0,9999	0,9102	0,6565	>0,9999	>0,9999
	PH	5,75±0,21	5,81±0,71	5,83±0,70	5,25±1,18	5,51±1,15	4,73±0,67						
MIB1	SH	6,60±2,63	10,17±1,71	7,63±4,17	12,30±1,71	10,34±2,34	6,37±1,20	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,2701	>0,9999	>0,9999
	PH	8,75±2,67	9,17±2,70	6,59±3,46	8,00±4,23	11,86±2,46	7,25±1,73						
MOCS3	SH	9,64±2,02	10,82±1,31	13,94±2,10	12,23±4,26	10,59±2,50	11,13±1,11	>0,9999	>0,9999	0,0375	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	10,73±1,31	11,17±1,11	9,31±1,69	11,24±2,02	11,86±2,39	9,75±1,98						

Çizelge 5.2. (devam)

Gen		ΔCT value ± SD						SH Grubu ve PH Grubu İntergen Analizleri P değerleri					
		0h	6h	12h	24h	48h	72	SH0-PH0	SH6-PH6	SH12-PH12	SH24-PH24	SH48-PH48	SH72-PH72
MUL1	SH	7,26±1,84	11,80±1,35	12,95±1,52	8,52±0,89	10,56±3,21	7,84±1,45	>0,9999	>0,9999	0,0001	>0,9999	0,4954	>0,9999
	PH	6,48±1,99	10,96±1,03	4,57±2,35	7,74±2,77	7,50±1,13	8,00±0,76						
NAE1	SH	13,30±0,40	15,50±0,90	14,62±0,57	14,08±1,96	13,43±0,86	13,63±2,24	>0,9999	>0,9999	0,6003	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	12,01±3,39	13,16±3,40	11,35±1,95	13,25±2,47	11,52±2,81	13,51±1,48						
NEDD8	SH	9,97±3,37	11,18±1,83	13,92±4,24	14,81±1,07	12,10±5,20	10,38±2,13	>0,9999	>0,9999	0,0989	0,1293	0,7671	>0,9999
	PH	7,51±3,21	12,19±0,69	7,09±4,05	8,77±2,86	7,86±4,96	9,25±2,08						
PARK2 PARKIN	SH	13,10±4,66	15,88±0,32	15,65±4,69	15,55±2,15	15,14±2,53	13,62±3,33	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	13,41±3,33	16,55±1,44	15,90±2,35	15,79±1,99	15,54±0,21	13,00±3,26						
RFWD2	SH	6,97±0,83	6,82±0,33	8,45±1,24	6,77±1,26	6,82±0,42	6,61±0,99	>0,9999	>0,9999	0,1230	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	6,71±0,80	7,48±0,58	6,58±0,55	7,03±1,52	5,84±1,39	5,99±1,12						
RLIM	SH	7,63±0,95	6,49±0,61	11,81±0,48	12,29±1,37	12,30±0,92	6,36±1,33	>0,9999	>0,9999	0,0005	0,0016	<0,0001	>0,9999
	PH	7,00±1,30	7,50±1,38	6,36±2,24	8,00±1,86	6,17±1,46	6,00±1,93						
RNF2	SH	6,59±0,57	5,80±0,32	5,27±0,03	6,03±0,99	6,57±0,33	6,11±0,55	0,3496	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	7,73±0,20	5,82±0,81	6,09±0,92	6,73±0,35	7,16±0,44	6,50±1,49						
RNF6	SH	6,36±1,36	7,49±0,40	7,61±3,07	9,29±1,05	8,57±1,39	7,61±2,36	>0,9999	>0,9999	0,0605	0,5746	0,2563	>0,9999
	PH	7,25±1,71	7,82±1,13	3,87±0,54	7,25±1,79	5,86±1,19	6,26±1,49						
RNF8	SH	10,10±4,23	11,84±2,04	14,30±6,10	15,32±0,94	10,34±4,56	11,12±2,55	>0,9999	>0,9999	0,2608	0,5198	>0,9999	>0,9999
	PH	10,76±3,09	11,17±1,96	9,10±3,23	11,26±2,70	9,18±2,31	9,00±2,31						
RNF20	SH	7,35±3,01	11,18±1,82	9,62±5,83	12,80±3,79	12,09±3,14	7,37±1,43	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,1451	>0,9999	>0,9999
	PH	7,25±1,25	8,83±3,24	7,34±2,95	8,00±2,75	11,20±2,99	7,50±1,30						
RNF34	SH	8,86±3,68	12,49±2,61	12,64±2,06	12,29±1,73	10,83±2,97	11,62±1,95	>0,9999	>0,9999	0,3785	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	9,75±2,87	12,15±0,29	8,09±4,77	11,50±2,46	13,53±4,38	7,48±1,97						
RNF40	SH	8,59±0,78	8,48±0,40	7,59±1,50	6,51±1,53	6,57±1,82	8,62±0,54	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,0300	0,3376	>0,9999
	PH	8,75±1,05	9,15±0,28	7,34±1,89	9,24±1,20	8,51±0,90	8,00±0,72						
RNF144B	SH	6,10±1,75	9,82±0,83	8,25±2,71	10,54±2,20	9,34±2,30	5,12±1,56	>0,9999	0,8056	>0,9999	0,3104	0,5753	>0,9999
	PH	5,50±0,93	6,49±3,76	8,36±2,98	6,74±2,09	5,85±1,16	4,99±1,45						
RNF167	SH	6,84±1,03	6,14±1,14	10,96±3,06	11,79±1,94	8,82±1,12	6,35±0,69	>0,9999	0,5453	0,0032	<0,0001	0,4572	0,9999
	PH	6,49±0,71	8,15±2,01	6,84±1,29	6,49±0,87	6,84±1,35	6,99±0,72						

Çizelge 5.2. (devam)

Gen		ΔCT value ± SD						SH Grubu ve PH Grubu İntergen Analizleri P değerleri					
		0h	6h	12h	24h	48h	72	SH0-PH0	SH6-PH6	SH12-PH12	SH24-PH24	SH48-PH48	SH72-PH72
RNF180	SH	16,19±1,94	15,90±0,30	16,56±1,64	10,78±1,26	15,28±1,21	16,22±0,99	>0,9999	>0,9999	>0,9999	<0,0001	>0,9999	>0,9999
	PH	15,80±1,32	16,90±1,00	16,91±2,03	16,63±0,94	14,90±3,19	15,52±1,54						
SAE1	SH	7,59±2,76	10,82±1,15	10,61±4,77	12,54±2,73	11,59±3,39	8,37±2,35	>0,9999	>0,9999	0,7337	0,1885	0,3428	>0,9999
	PH	9,00±2,16	9,83±3,89	7,34±2,96	8,25±2,36	7,52±3,46	6,25±1,51						
SMURF1	SH	10,09±2,29	10,15±0,71	11,96±2,51	12,02±1,39	11,34±1,71	8,11±1,16	>0,9999	>0,9999	0,3189	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	9,50±1,08	11,50±0,86	9,34±1,83	10,50±2,44	10,19±1,93	8,49±0,99						
SMURF2	SH	4,57±0,57	4,13±0,30	5,58±0,59	5,27±0,28	5,08±0,77	4,10±1,10	>0,9999	0,2138	0,5677	0,8888	0,7494	>0,9999
	PH	4,24±0,49	5,48±0,42	4,59±1,05	4,49±0,86	4,17±0,78	4,23±0,44						
SKP1	SH	7,31±2,76	7,83±1,31	12,32±1,01	10,12±2,94	10,11±1,10	7,39±2,78	>0,9999	>0,9999	0,0393	0,7594	>0,9999	>0,9999
	PH	7,50±3,16	7,50±1,38	6,11±4,12	7,01±3,24	7,18±3,42	7,01±2,95						
SKP2	SH	13,58±3,00	15,85±0,31	16,96±0,61	15,06±0,66	16,09±0,76	15,12±0,91	>0,9999	>0,9999	0,6263	0,2514	0,1053	0,1552
	PH	13,25±1,76	16,49±0,43	14,34±2,82	11,99±1,82	12,18±2,43	11,74±1,38						
STUB1	SH	8,85±0,35	8,16±0,85	8,31±1,98	7,28±2,15	7,33±0,65	9,13±1,05	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,2025	0,4717	>0,9999
	PH	9,51±1,25	8,83±0,70	8,10±1,40	9,01±0,61	8,86±0,39	8,51±0,93						
SVYN1	SH	7,08±3,48	6,48±0,88	5,28±0,98	6,02±1,24	7,07±0,75	6,87±1,49	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,8386
	PH	7,50±0,47	8,16±0,29	6,33±1,08	6,99±1,24	7,86±1,62	5,24±1,33						
TMEM189	SH	7,84±1,03	7,14±0,84	6,59±1,57	9,03±1,38	7,57±1,88	7,61±1,10	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,3088	>0,9999	>0,9999
	PH	7,25±1,25	8,16±0,96	7,09±1,20	7,25±1,19	8,19±2,06	6,74±0,79						
TP53	SH	5,83±1,76	5,15±0,72	8,63±1,16	6,77±3,23	6,56±1,12	5,37±1,72	>0,9999	0,2915	0,0029	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	6,00±2,19	8,17±0,29	3,34±1,68	5,50±1,65	6,85±1,96	3,99±1,50						
UBA1	SH	7,09±1,77	10,16±0,85	7,62±1,13	6,53±2,16	5,08±2,92	7,62±0,51	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,4087	>0,9999
	PH	7,75±1,76	8,83±1,24	6,34±2,72	8,01±2,54	7,87±1,17	7,00±1,45						
UBA2	SH	6,09±0,63	4,81±0,32	6,93±1,54	7,02±1,38	7,07±0,86	5,62±0,98	>0,9999	>0,9999	0,0034	0,1416	0,1575	>0,9999
	PH	5,48±0,93	5,49±0,57	3,85±1,49	5,23±1,18	5,17±0,61	5,25±0,44						
UBA3	SH	5,84±2,70	7,48±0,88	7,29±2,64	9,04±1,00	7,84±0,84	5,11±1,48	>0,9999	>0,9999	0,4742	0,0756	0,3377	>0,9999
	PH	5,25±1,90	7,83±1,12	4,85±1,56	5,75±1,63	5,17±1,94	4,99±1,04						
UBA5	SH	10,98±2,38	11,16±1,46	14,31±0,99	13,81±1,09	10,58±3,76	13,13±2,60	>0,9999	>0,9999	0,0029	0,0794	>0,9999	0,0707
	PH	11,40±2,51	11,84±1,68	7,09±2,98	9,26±2,20	8,18±2,61	8,50±2,42						

Çizelge 5.2. (devam)

Gen		ΔCT value ± SD						SH Grubu ve PH Grubu İntergen Analizleri P değerleri					
		0h	6h	12h	24h	48h	72	SH0-PH0	SH6-PH6	SH12-PH12	SH24-PH24	SH48-PH48	SH72-PH72
UBA6	SH	10,34±4,79	15,50±0,90	13,31±5,19	13,81±1,05	16,11±0,77	9,87±3,29	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,4408	>0,9999
	PH	10,50±1,59	15,52±1,38	9,84±4,98	11,50±4,56	11,54±4,47	9,24±2,40						
UBE2A	SH	11,63±2,96	12,15±0,71	11,62±2,89	13,53±2,15	13,84±0,92	13,11±2,20	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,4255	0,2983	0,7704
	PH	12,25±1,63	12,50±1,39	9,59±1,66	10,99±2,08	10,84±1,17	10,99±1,82						
UBE2B	SH	8,64±2,22	9,50±0,61	9,59±3,88	13,80±0,40	12,29±0,22	10,13±1,77	>0,9999	0,9801	0,4296	0,0329	0,3090	>0,9999
	PH	9,75±2,52	6,83±2,93	6,34±2,61	9,00±1,45	8,52±2,61	11,18±3,26						
UBE2C	SH	6,84±1,16	8,47±0,61	9,27±1,72	9,02±0,99	7,82±0,67	7,35±0,61	>0,9999	0,3890	0,0009	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	PH	6,49±1,25	6,82±1,24	5,84±0,46	3,00±1,41	1,84±0,63	3,50±1,07						
UBE2D3	SH	-1,16±1,03	-0,20±1,31	-0,74±0,97	-2,71±0,92	-0,94±1,58	0,11±1,05	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,0157	0,1051	>0,9999
	PH	-0,26±1,05	-0,52±1,84	-0,91±0,69	0,25±0,86	1,52±2,71	-0,77±1,53						
UBE2E2	SH	4,85±2,69	6,15±0,85	4,61±0,60	7,78±1,01	5,07±1,24	6,37±1,76	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	5,25±1,25	5,83±0,70	4,85±1,97	6,26±2,13	6,85±3,28	6,00±1,57						
UBE2G1	SH	8,84±2,35	9,81±0,32	10,62±0,58	8,52±1,53	6,82±2,53	10,36±1,04	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,4511	0,0390	>0,9999
	PH	9,24±1,79	10,82±0,31	9,09±1,23	10,49±1,64	10,18±0,42	10,25±0,78						
UBE2G2	SH	9,36±1,61	5,49±0,39	6,28±1,98	7,03±1,07	8,83±1,91	9,38±1,44	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,4726	>0,9999	>0,9999
	PH	9,25±0,72	6,83±0,31	6,59±1,26	9,01±1,32	8,85±0,63	8,76±2,32						
UBE2I	SH	9,60±4,13	11,50±0,60	12,94±4,21	14,80±1,17	12,85±2,76	10,38±1,23	>0,9999	>0,9999	0,2894	0,6141	>0,9999	>0,9999
	PH	9,76±3,09	13,18±1,12	8,61±3,25	11,52±2,40	9,86±2,39	9,00±1,04						
UBE2J1	SH	7,34±2,23	7,48±0,89	7,94±3,24	11,54±1,40	8,33±2,81	6,11±0,96	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,0455	>0,9999	>0,9999
	PH	7,25±1,25	8,16±1,12	6,09±1,76	7,75±2,12	7,51±1,90	7,74±1,35						
UBE2J2	SH	8,64±2,40	11,84±0,82	14,82±0,49	13,13±1,32	12,86±1,65	7,87±3,22	>0,9999	>0,9999	0,0019	0,0311	>0,9999	>0,9999
	PH	8,50±2,15	8,52±4,37	5,60±4,82	6,75±3,71	10,53±2,46	5,75±1,39						
UBE2K	SH	7,84±2,45	7,49±0,40	7,60±2,11	7,78±1,31	7,58±0,53	7,12±1,24	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	8,25±1,97	8,17±1,13	6,85±1,46	8,51±1,24	7,86±1,36	8,25±1,08						
UBE2L3	SH	8,60±1,82	10,15±0,30	10,96±1,54	11,28±0,92	10,58±1,71	9,12±1,75	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,3693	>0,9999
	PH	9,24±0,72	9,15±3,20	9,34±1,59	9,74±0,85	8,18±0,62	10,25±0,79						
UBE2L6	SH	3,85±0,62	4,80±0,31	4,92±0,55	3,52±0,24	4,32±0,66	4,11±1,10	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	4,23±0,49	4,13±1,46	5,58±0,52	3,99±0,61	4,84±0,64	4,23±0,75						

Çizelge 5.2. (devam)

Gen		ΔCT value ± SD						SH Grubu ve PH Grubu İntergen Analizleri P değerleri					
		0h	6h	12h	24h	48h	72	SH0-PH0	SH6-PH6	SH12-PH12	SH24-PH24	SH48-PH48	SH72-PH72
UBE2M	SH	3,82±1,03	4,80±0,33	4,27±0,99	3,76±0,40	5,07±1,13	4,86±0,16	0,6078	>0,9999	>0,9999	0,1021	>0,9999	>0,9999
	PH	4,99±0,60	5,14±0,28	5,08±1,07	5,49±0,38	5,17±2,73	5,49±1,07						
UBE2N	SH	4,82±0,36	4,81±0,33	5,61±0,58	5,52±0,92	5,33±0,74	5,63±1,05	0,1053	>0,9999	0,2755	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	6,24±0,95	4,83±1,12	4,33±0,58	6,00±0,67	5,52±1,15	5,75±0,67						
UBE2Q1	SH	4,84±0,34	4,81±0,32	5,27±0,02	4,10±0,91	5,59±0,35	4,87±0,16	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,0017	0,0545	0,6830
	PH	5,24±0,49	5,15±0,29	4,84±0,78	6,25±1,07	7,18±2,06	5,74±0,80						
UBE2Q2	SH	8,98±1,42	7,81±0,32	6,93±0,58	9,38±2,24	9,58±0,32	9,12±1,52	>0,9999	0,3582	>0,9999	>0,9999	0,8813	0,7819
	PH	9,25±1,63	9,81±0,32	7,09±1,21	9,75±1,67	11,01±1,19	7,74±1,17						
UBE2Q2L	SH	13,83±2,34	15,49±0,59	12,27±1,03	12,02±1,08	13,07±2,67	13,88±2,14	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,7484	>0,9999	>0,9999
	PH	13,28±1,38	15,48±0,86	12,58±2,25	14,49±2,07	14,51±1,90	12,74±1,34						
UBE2S	SH	5,34±0,63	5,81±0,32	5,60±0,58	6,02±1,07	6,06±0,82	6,36±1,14	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,0936
	PH	5,99±0,61	5,82±1,31	4,59±1,10	5,24±1,79	5,18±0,42	4,49±0,26						
UBE2T	SH	16,66±1,29	15,98±0,34	18,72±0,45	15,85±1,83	16,11±0,78	16,20±1,10	0,3160	>0,9999	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001
	PH	14,54±0,94	16,53±0,39	13,60±2,16	10,77±1,48	9,86±1,38	9,76±1,38						
UBE2V1	SH	8,11±4,06	12,50±0,89	10,29±4,39	13,06±2,51	10,85±1,71	6,37±2,51	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	10,76±2,53	11,17±3,31	7,60±5,01	9,52±4,67	9,53±5,49	8,01±3,11						
UBE2V2	SH	6,96±1,45	5,82±0,30	6,26±1,77	6,44±0,09	6,32±0,66	5,61±0,50	>0,9999	>0,9999	0,1942	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	6,24±1,09	6,16±0,29	4,34±0,95	6,75±2,36	6,18±0,97	4,74±0,57						
UBE2Z	SH	9,11±1,51	9,16±0,71	8,62±2,09	9,54±1,71	9,84±1,30	6,87±1,37	0,5827	>0,9999	>0,9999	>0,9999	0,3262	>0,9999
	PH	7,00±2,00	10,50±0,59	7,35±2,42	8,25±2,97	7,19±1,46	8,01±1,12						
UBE4A	SH	4,84±1,76	4,81±0,32	4,61±1,53	5,27±1,06	5,09±0,78	3,86±1,27	>0,9999	0,9786	>0,9999	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	4,25±0,79	6,16±0,73	4,59±0,77	5,24±1,80	3,85±0,77	3,74±1,16						
UCHL1	SH	11,57±1,45	13,46±0,89	14,28±2,67	11,01±0,99	12,80±1,20	13,09±0,53	0,5827	>0,9999	0,2128	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	12,97±0,88	13,13±1,82	11,83±1,50	12,23±1,11	12,49±1,22	11,97±0,73						
UCHL5	SH	13,85±1,68	14,46±0,40	15,62±1,53	12,01±0,45	13,99±0,92	14,35±0,47	>0,9999	>0,9999	0,0011	0,0005	0,0860	>0,9999
	PH	14,00±1,07	13,81±1,69	12,09±0,76	15,27±0,90	16,17±1,19	15,00±1,07						
VHL	SH	8,34±0,89	6,80±0,32	8,59±2,05	7,27±0,86	7,31±0,65	7,61±1,09	>0,9999	>0,9999	0,5675	>0,9999	>0,9999	>0,9999
	PH	7,73±0,99	6,81±0,31	7,34±0,27	7,99±0,73	8,18±1,20	8,49±0,60						
WWP1	SH	17,14±0,99	15,87±0,33	13,96±1,15	13,83±1,72	16,11±0,77	14,39±1,72	0,2646	>0,9999	0,0252	0,0227	>0,9999	>0,9999
	PH	15,28±1,14	16,86±0,96	16,89±1,56	16,58±0,87	17,26±1,75	15,54±0,95						

Çizelge 5.3. Sham ve PH gruplarına ait Cdc20 ortalama $\Delta Ct \pm SD$ değerleri ve analizler sonucunda elde edilen p değerleri

Gen		ΔCt value \pm SD						SH Grubu ve PH Grubu İntergen Analizleri P değerleri					
		0h	6h	12h	24h	48h	72	SH0- PH0	SH6- PH6	SH12- PH12	SH24- PH24	SH48- PH48	SH72- PH72
Cdc20	SH	11,85 \pm 1,46	12,79 \pm 0,19	13,89 \pm 0,38	12,40 \pm 0,05	12,45 \pm 0,67	11,78 \pm 1,15	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	PH	7,99 \pm 0,64	8,42 \pm 1,26	9,63 \pm 0,63	5,51 \pm 1,11	4,46 \pm 0,96	4,26 \pm 1,04						

Karaciğer rejenerasyonunda moleküler düzeyde birçok kompleks hücresel olay meydana gelmektedir (Chen vd., 2010). Karaciğer rejenerasyonunda meydana gelen bu hücresel olayların moleküler mekanizmaları araştırılmaya devam etmektedir.

Ubikutin yolağının genellikle proteinlerin degradasyonunda rol oynadığı bilinir; ancak yapılan araştırmalar, degradasyondan başka mekanizmalar için de sinyal oluşturduğunu ortaya koymaktadır. DNA replikasyonu, DNA tamiri, otofaji, DNA'nın transkripsiyonel düzenlenmesi, mitoz, endositoz gibi hücresel süreçler bunlardan bazılarıdır. Bununla birlikte ubikutin yolağı, çok sayıda sinyal yolağıyla da etkileşim halindedir (Ciechanover, 1998; Yau ve Rape, 2016). Ubikutin yolağının karaciğer rejenerasyonu sürecindeki rolü henüz bilinmemektedir.

Tüm çalışma gruplarında, RT-PCR array metodu kullanılarak ubikutin yolağına ait 88 genin ifadeleri PH sonrası 0, 6, 12, 24, 48, 72 saatlerine göre SH gruplarıyla (SH0, SH6, SH12, SH24, SH48, SH72) karşılaştırılarak incelenmiştir.

RT-PCR array analizleri sonucunda fold2'i geçen veya fold0.5 altında kalan ve $p < 0.05$ olan genler anlamlı kabul edilmiştir (Ceyhan vd., 2018) Bu genler ANAPC2, ANAPC11, BARD1, BRCA1, Arih1, MUL1, RNF40, RNF180, TP53, UBA2, UBA5, UBE2C, UBE2D3, UBE2G1, UBE2J2, UBE2Q1, UBE2T WWP1 genleridir. CDC20 gen ifadesi de RT-PCR'da ayrıca analiz edilmiş ve anlamlı bulunmuştur. Bu genlere ait fold değerleri ve istatistik analizleri içeren çizelgeler 0, 6, 12, 24, 48, 72 saatlere göre sham grubu ile karşılaştırılarak verilmiştir (Çizelge 5.1, Çizelge 5.2, Çizelge 5.3).

RT-PCR array analizleri sonucunda ifadesi anlamlı bulunan ANAPC2, BARD1, BRCA1, UBE2T, UBE2C genlerinin Western blot analizleriyle protein miktarları belirlenmiştir.

ANAPC2, ANAPC11, BARD1, BRCA1, Arih1, MUL1, RNF40, RNF180, TP53, WWP1 ve CDC20 genleri ubikutin yolağına ait E3 ligazlardır. UBE2C, UBE2D3, UBE2G1, UBE2J2, UBE2Q1, UBE2T genleri ise ubikutin yolağına ait E2 enzimleridir. UBA2, UBA5 ubikutin benzeri moleküllerin hedef proteinlere eklenmesinde rol oynayan E1 enzimleridir.

E1 enzimleri ATP aracılığıyla ubikutini aktifler. Aktiflenmiş ubikutin molekülü E2 enzimlerine aktarılır. E3 ligazlar, E2 ve hedef proteini bir araya getiren köprü görevi görür ve ubikutin molekülünün E2'den hedef proteine aktarımını sağlar (Herrmann vd, 2007; Deshaies ve Joazeiro, 2009).

ANAPC2, UBE2C, CDC20, BRCA1, BARD1, UBE2T, MUL1, TP53, UBE2J2, UBA2, UBA5 gen ifadeleri PH gruplarında farklı saatlerde ifadeleri artış gösteren genlerdir. ANAPC11, RNF40, WWP1, RNF180, UBE2D3, UBE2G1, UBE2Q1 gen ifadeleri SH gruplarında artış gösterirken; PH gruplarında baskılanmıştır.

Çalışmamızda RT-PCR array analizleri sonucunda anlamlı bulunan genlerin literatür taramalarında başlıca hücre döngüsünün düzenlenmesi, DNA onarımı, mitofaji, mitokondriyal fizyon mekanizmalarıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Söz konusu genlerden ANAPC2, ANAPC11, UBE2C, CDC20 genleri APC/C E3 ligaz kompleksi ile ilişkilidir ve hücre döngüsü aşamalarının kontrolünde rol oynadığı bilinmektedir (Zhang vd., 2014; Sivakumar ve Gorbisky, 2015). BRCA1, BARD1, UBE2T, RNF40 genleri DNA onarım mekanizmaları ile ilişkilidir (Caestecker ve Van de Walle, 2013; Ceccaldi vd., 2016). Mul1, mitokondriyal dinamikler (fizyon, füzyon) ve mitofaji mekanizmalarıyla ilişkilidir (Peng vd., 2016). p53, tümör baskılayıcıdır ve hücre siklusunu durdurucu, apoptoz gibi çeşitli süreçlerde rol oynar (Alisi vd., 2005). UBE2J2, ER-aracılı degradasyon (ERAD) aracılı proteinlerin yıkımından sorumludur. UBA2, ubikutin benzeri proteinlerden SUMO aktivasyonunda görevli E1 enzimidir (Di Bacco ve Gill, 2006). UBA5 ubikutin benzeri proteinlerden Ufl1 aktivasyonundan sorumlu E1 enzimidir. WWP1, RNF180, UBE2D3, UBE2G1, UBE2Q1 genlerinin çeşitli hücresel olaylarda rol oynadığı bilinmesine rağmen; moleküler mekanizmaları açık değildir.

5.4.1. Karaciğer rejenerasyonunda ubiquitin yolağı aracılığı ile hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan olası mekanizmalar

%70 partial hepatektomi modeli *in vivo* hücre döngüsünün düzenlenmesi ile ilgili analizler için en iyi çalışma modellerinden bir tanesidir (Hu vd., 2014). Karaciğer rejenerasyonunda hücre döngüsü basamaklarının PH sonrası hangi saatlere denk geldiği çeşitli çalışmalarla belirlenmeye çalışılmıştır.

PH sonrasında hücrelerin G₀ fazından G₁ fazına girişi PH'den 4-6 saatler olduğuna işaret edilmiştir (Fausto, 2000; Ozeki ve Tsukamoto, 1999). G₁ fazının ise 12-16. saatlere kadar devam ettiği düşünülmektedir (Ozeki ve Tsukamoto, 1999). Xu ve vd.nin çalışmasında (2005) hücrelerin S fazına girişinin PH sonrası 12. saate denk geldiği bildirilmiştir. DNA replikasyonunun, 24. saate en yüksek seviyesine ulaştığı (Starkel vd., 2005) ve 30-32. saate kadar devam ettiği belirtilmiştir (Rininger vd., 1997; Xu vd., 2005). G₂ fazının ise 2-4 saat sürdüğü (Xu vd., 2005) ve hücrelerin yaklaşık 36-48. saate mitozaya girdiği düşünülmektedir (Steer, 1995; Fausto, 2000; Kurinna ve Barton 2011).

Karaciğer rejenerasyonunun moleküler mekanizması son zamanlarda yapılan çalışmalar ile aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Ancak rejenerasyon sırasında dinamik değişiklik gösteren proteinlerin düzenlenmesi hakkında bilinenler oldukça sınırlıdır (Strand vd., 2018).

Ubiquitin yolağı E3 ligazlarından APC/C ve SCF kompleksleri, hücre döngüsünü düzenlenmesinde rol oynayan iki önemli enzimdir (Koepp vd., 1999; Peters, 2002; Wu vd., 2016). APC/C ve SCF komplekslerinin karaciğer rejenerasyonu sürecindeki etki mekanizmaları henüz aydınlatılamamıştır.

ANAPC2 ve ANAPC11 proteinleri, APC/C kompleksinin katalitik alt birimleridir (Boer vd., 2016a; Pines, 2011). APC/C kompleksinin biyolojik aktivitesi, ilişkili bulunduğu adaptör proteine göre değişmektedir (Cheng vd., 2017). APC/C kompleksinin Cdc20 ve Cdh1 olmak üzere iki adaptör proteini mevcuttur (Pines, 2011; Sivakumar ve Gorbisky, 2015; Zhang, J. vd., 2014) ve APC/C kompleksine bağlanarak hücre döngüsü aşamalarını düzenlerler (Malumbres ve Barbacid, 2009; Pines, 2011). UBE2C, APC/C E3

ligazla birlikte çalıştığı belirlenen E2 enzimlerinden biridir (Sivakumar ve Gorbsky, 2015). APC/C kompleksleri bir başka E3 ligaz SCF^{Skp2} ile birlikte hücre döngüsü aşamalarını dönüşümlü olarak düzenler (Pines, 2011).

APC/C^{Cdc20} metafazdan anafaza geçiş sırasında görev alırken; APC/C^{Cdh1} mitoz çıkışı, G₁ fazı ve G₁-S kontrol noktasının aşılmasında görev alır. SCF^{Skp2} kompleksi ise G₁-S kontrol noktasının aşılmasında APC/C^{Cdh1} tarafından düzenlenir (Pines, 2011).

APC^{Cdh1}, G₁ fazında aktiftir ve hücrelerin erkenden S fazına girişini engeller. (Pines, 2011). APC^{Cdh1} E3 ligaz kompleksinin hedef proteinlerinden biri Skp2'dir. APC^{Cdh1} kompleksi tarafından Skp2'nin yıkılması, SCF^{Skp2} E3 ligaz kompleksi oluşumunu engeller ve bunun sonucunda SCF^{Skp2} E3 kompleksi hedef proteini p27 yıkılamadığı için ortamdaki miktarı artar. Ortamdaki miktarı artan p27, hücre döngüsünün G₁-S kontrol noktasında durdurur (Kitagawa ve Kitagawa, 2016). Bu mekanizma hücrelere DNA replikasyonu için gerekli proteinlerin toplanması için zaman kazandırır ve hücrelerin zamanından önce S fazına geçişini engeller (Pines, 2011). Hücreler, hücre döngüsünün S fazına geçmek için hazır olduğunda APC^{Cdh1} kompleks inhibitörünün ekspresyonu artar. APC^{Cdh1} kompleksinin inhibe edilmesiyle ortamda Skp2 birikir ve SCF^{Skp2} E3 ligaz kompleksi oluşur. SCF^{Skp2} kompleksi hedef proteini p27'yi yıkarak hücrelerin G₁-S kontrol noktasını aşmasını sağlar (Nakayama ve Nakayama, 2006). Mitoz safhasına gelindiğinde Cdh1, Cdc20 adaptörü ile yer değiştirir ve APC/C^{Cdc20} E3 ligazın görevi başlar (Sivakumar ve Gorbsky, 2015).

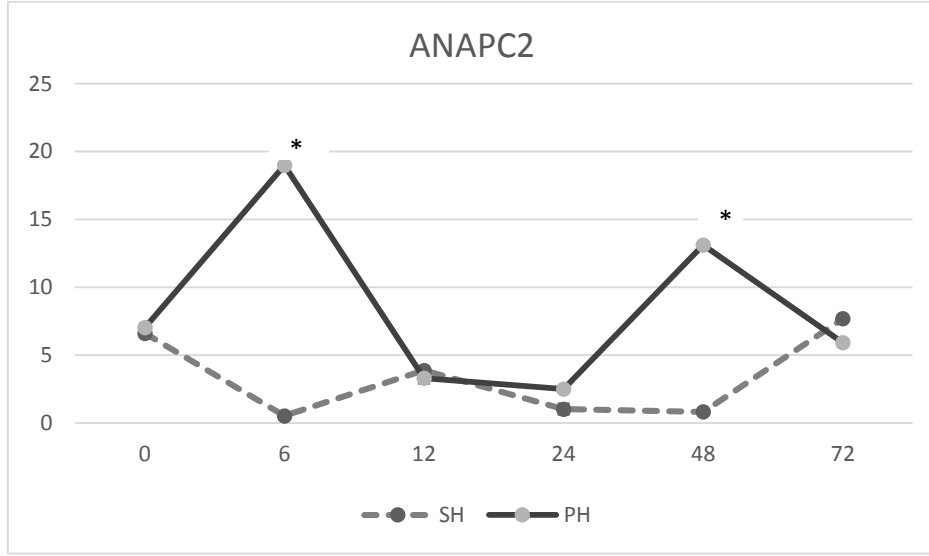
APC/C^{Cdc20} kompleksinin görevi iğ ipliklerinin doğru zamanda düzgün ayrılmasını sağlayarak; metafaz anafaz kromozomların kardeş kromatitlere düzgün ayrılmasını kontrol etmektir. Pro-metafaz safhasında APC/C^{Cdc20} kompleksi inaktiftir ve bütün kromozomlar aynı hizaya gelip iğ ipliklerine tutununcaya kadar APC/C^{Cdc20} aktiflenmez (Boer vd., 2016a). Metafaz evresinde kromatidler aynı eksen üzerine geldikten sonra Cdc20 adaptör proteini APC/C'e bağlanarak APC/C^{Cdc20} kompleksini oluşturur (Musacchio, 2015; Musacchio ve Salmon, 2007; Sivakumar ve Gorbsky, 2015). APC/C^{Cdc20} kompleksinin hedef proteinlerinden biri seperaz inhibitörü securindir. Securin, seperaza bağlanarak onu inaktif formda tutar. Seperazın görevi ise kardeş kromatitleri bir arada tutan kohesinleri parçalamaktır (Musacchio ve Salmon, 2007). Oluşan APC/C^{Cdc20} kompleksi securini

parçalar. Serbest kalan seperaz, kohezineri parçalayarak kardeş kromatitlerin birbirinden ayrılmasını ve kutuplara doğru hareketini sağlar (Musacchio, 2015; Musacchio ve Salmon, 2007; Sivakumar ve Gorbsky, 2015). APC/C^{Cdc20} kompleksi, tüm kromozomların metafaz safhasında düzgün sıralanmasından sonra aktifleşerek, kromozomların vaktinden önce ayrılmasının önüne geçmiş olur.

Anafaz safhasından sonra tekrar APC/C^{Cdh1} kompleksi aktifleşir. APC/C^{Cdh1} kompleksinin substratları arasında siklin-A, siklin-B, TPX2, Aurora A, Aurora B, CDC20 ve DNA replikasyon proteinleri olan CDC6, Geminin ve Skp2 yer almaktadır. Mitozdan çıkış sırasında bu proteinlerin degradasyonu hücrelerin tekrar G₁ fazına geçişi engellenir (Malumbres ve Barbacid, 2009).

Çalışmamızda yer alan ANAPC2, ANAPC11, UBE2C, CDC20 E3 ligazları, APC/C kompleksi ile ilişkilidir (Malumbres ve Barbacid, 2009; Pines, 2011). ANAPC2, ANAPC11, UBE2C, CDC20 genlerine ait RT-PCR analizleri ile ANAPC2 ve UBE2C'nin Western blot analizleri incelenmiştir.

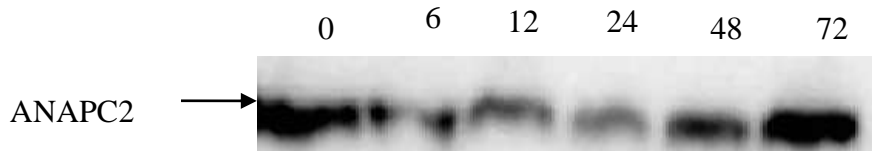
APC/C yapısında yer alan ANAPC2 gen ifadesi 0, 6, 12, 24, 48, 72 saatlerine göre değerlendirilerek SH gruplarıyla karşılaştırılmıştır. ANAPC2 ifadesinin PH6 (fold=19.01) ve PH48 (fold=13.12) gruplarında pik yaptığı ve anlamlı fark gösterdiği belirlenmiştir. SH ve PH 12, 24, 72 saat grupları arasında fark bulunmamıştır (Şekil 5.12). ANAPC2'nin Western blot analizlerinde; PH0, PH48 ve PH72 gruplarında ANAPC2 protein miktarı yüksek; PH6, PH12, PH24 gruplarında protein miktarı düşük bulunmuştur (Şekil 5.12, Şekil 5.13).



Şekil 5.12. Gruplara ait ANAPC2 gen ifadesi. * $p < 0,001$

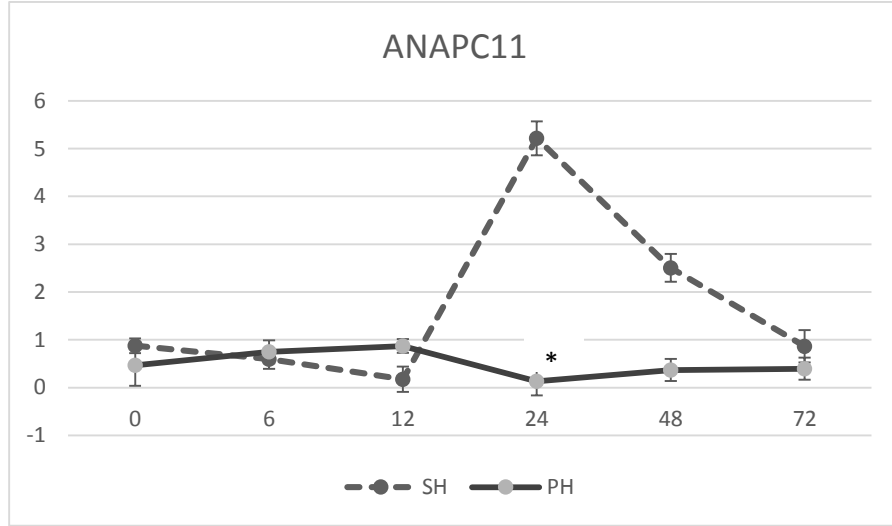
Çizelge 5.4. ANAPC2 Western blot jel görüntülerine ait band yoğunlukları ($\times 10^2$)

ANAPC2 (APC2)						
Gruplar	0	6	12	24	48	72
Bant Yoğunluğu ($\times 10^2$)	13,022	8,409	8,598	8,60	15,438	26,776



Şekil 5.13. Western blot analizlerinden elde edilen ANAPC2 proteininin ait bant görüntüleri.

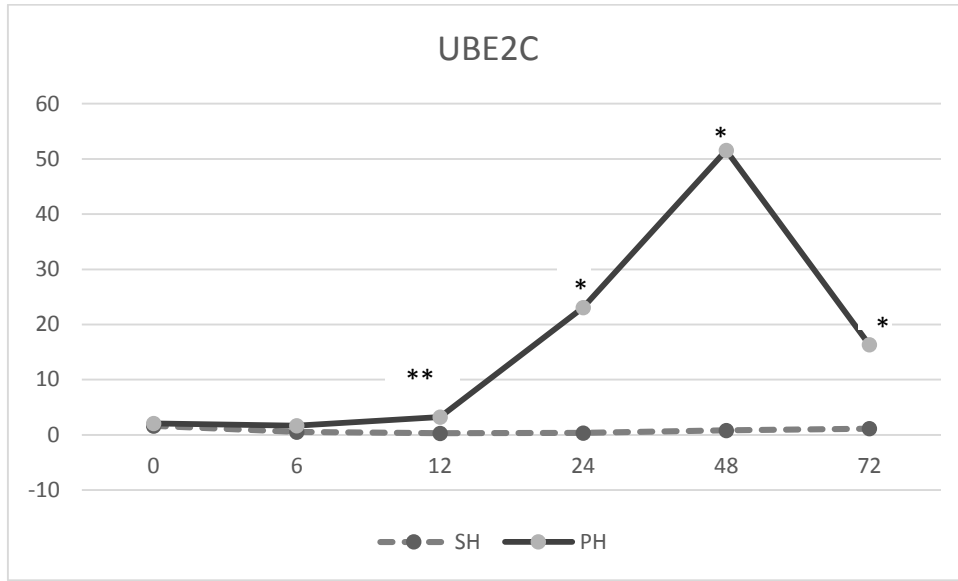
Çalışmamızda APC/C yapısında yer alan bir diğer protein ANAPC11'dir. PH'nin tüm saat gruplarında ANAPC11 gen ifadesinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. SH grupları ile PH grupları karşılaştırıldığında; SH24 grubunda gözlenen ANAPC11 gen ifadesindeki artış anlamlıdır. PH24 grubunda önemli bir değişiklik olmazken; SH24 grubunda yaklaşık 5 kat artış meydana gelmiştir (Şekil 5.14).



Şekil 5.14. Gruplara ait ANAPC11 gen ifadesi. * $p < 0.0001$

APC/C E3 ligaz kompleksinin, ubiquitin konjuge edici E2 enzimlerinden biri UBE2C'dir. Şekil 5.15'e bakıldığında; UBE2C'nin 0 ve 6. saatlerdeki gen ifadeleri SH ve PH gruplarına benzerdir. PH sonrası 6. saatten itibaren UBE2C gen ifadesinin artmaya başladığı; 12, 24, 48. saatlerde bu artışın giderek arttığı; 48. saatte en yüksek seviyesine ulaştığı ve 72. saatte düştüğü belirlenmiştir. SH ve PH grupları, saatlerine göre kıyaslandığında ise; UBE2C'nin gen ifadesinin PH12, PH24, PH48, PH72 gruplarında yüksek olduğu tespit edilmiştir. PH12 grubunda anlamlı fark ($p < 0.001$); PH24, PH48, PH72 gruplarında ileri derecede anlamlı fark ($p < 0.0001$) bulunmuştur (Şekil 5.15).

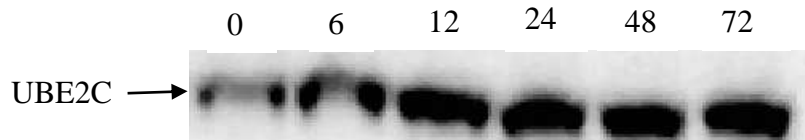
UBE2C'nin Western blot analizleri sonrasında bant yoğunlukları incelendiğinde; PH12 ve PH24 saat gruplarındaki UBE2C proteinine ait bant yoğunlukları birbirlerine yakın ve PH6 grubuna göre yüksektir. PH72 saat grubunda da UBE2C protein miktarının bir miktar artış gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 5.10, Şekil 5.15).



Şekil 5.15. Gruplara ait UBE2C gen ifadesi. **p<0.001 *p<0.0001

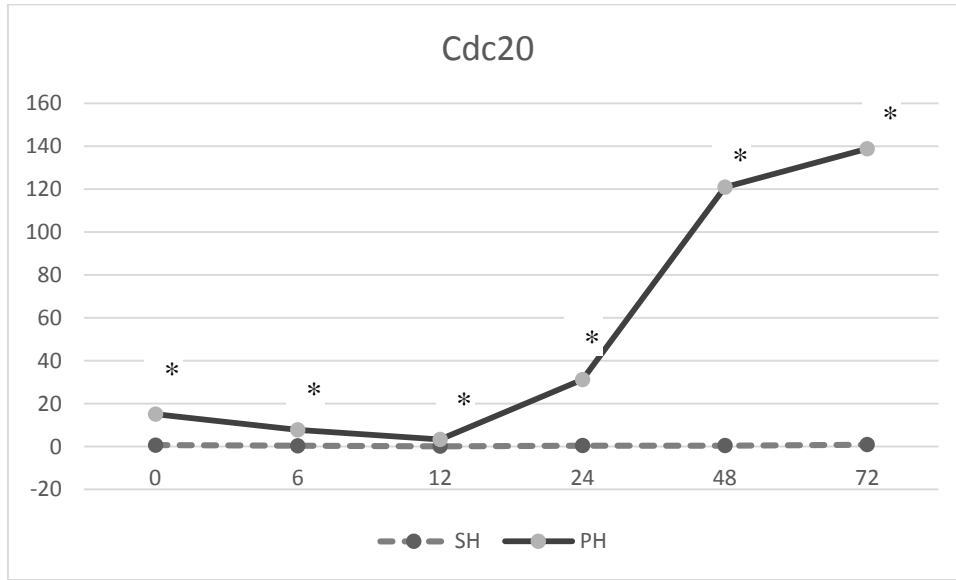
Çizelge 5.5. UBE2C Western blot jel görüntülerine ait band yoğunlukları

UBE2C	0	6	12	24	48	72
Gruplar						
Bant Yoğunluğu (X10 ²)	8,168	8,265	16,616	16,632	17,252	18,980



Şekil 5.16 Western blot analizlerinden elde edilen ANAPC2 proteinine ait band görüntüleri.

APC/C kompleksi adaptör proteinlerinden biri olan Cdc20'nin gen ifadeleri sürelerle göre değerlendirilmiştir. Şekil 5.17'de incelendiğinde; PH0 grubundan PH12 grubuna kadar kademeli bir düşüş; PH12 grubundan PH72 grubuna kadar hızlı bir artış olduğu gözlenmiştir. PH24 saat grubunda gen ifadesi, kontrol grubuna göre, 30 kat artış gösterirken; PH48 saat grubunda 120 kata yükselmiştir. PH48-PH72 saat arasında Cdc20 gen ifadesindeki artış yavaşlayarak devam etmiştir. SH grupları ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda anlamlı fark belirlenmiştir (Şekil 5.17).



Şekil 5.17. Gruplara ait Cdc20 gen ifadesi. *p<0.0001

Yapılan literatür araştırmasında rejenerasyon sürecinde APC/C^{Cdh1} kompleksi ile ilişkili Cheng ve vd.nin yapmış olduğu çalışmaya rastlanmıştır (Cheng vd., 2017). Karaciğer rejenerasyonunda APC/C^{Cdc20} E3 ligaz kompleksi ile ilgili kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Cheng ve vd.nin çalışmasında (2017); APC/C E3 ligazın adaptör proteinlerden Cdh1 geni farelerde silinmiştir ve APC/C^{Cdh1} kompleksinin etkisi karaciğer rejenerasyonununun 0, 12, 24, 36, 48, 72. saat gruplarına göre incelenmiştir. PH sonrası normal karaciğer rejenerasyonu sürecinde Cdh1'in S fazında (12, 24sa) ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Cdh1 geni silinmiş hepatositlerin S fazına erken girdiği, S fazında uzun süre kaldıkları ve DNA onarım mekanizmalarının azaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada APC/C kompleks proteininin inhibe edilmesinin rejenerasyon sürecini olumsuz yönde daha çok etkilediği belirlenmiş ve sebebi Cdc20 ile ilişkilendirilmiştir.

APC/C kompleksi yapısında yer alan ANAPC2 gen ifadesi incelendiğinde PH0. saatten itibaren artış göstermeye başlamış ve PH6. saatte en yüksek seviyesine (~19 kat) ulaşarak düşüşe geçmiştir. PH sonra 12. saat ile 24. saatlerde ANAPC2 ifadeleri birbirlerine yakın ve çok düşüktür. ANAPC2 gen ifadesi 24. saatten sonra artış göstererek 48. saatte ikinci kez yükselme (~13 kat) göstermiş ve 72. saatte tekrar düşüş göstermiştir. Protein ifadeleri incelendiğinde RT-PCR analizleri ile paralellik göstermiştir. Bu veriler ışığında ANAPC2 ekspresyonunun, PH modelinde hücrelerin büyük çoğunluğunun G₀-G₁ geçtiği düşünülen 4-6. saatte (Fausto, 2000; Ozeki ve Tsukamoto, 1999) ve mitozda girdiği düşünülen 36-48. saatlerde (Steer, 1995; Fausto, 2000; Kurinna ve Barton 2011) yüksek olduğu belirlenmiştir. APC/C kompleksinin adaptör proteinlerinden biri olan Cdc20 ifadesi incelendiğinde; PH sonrası 24. saatten itibaren 72. saate kadar hızlı bir artış göstermiştir. Literatürlerde PH sonrası 36-48 saat aralığında hücrelerin büyük bir çoğunluğunun mitozda girdiği belirtilmektedir (Steer, 1995; Fausto, 2000; Kurinna ve Barton 2011) ve APC/C^{Cdc20} kompleksinin erken ve orta mitozda rol oynadığı bilinmektedir (Pines, 2011). Çalışmamız Liao ve vd.nin (2004) çalışma sonuçlarıyla da paralellik göstermektedir. Fareler üzerinde yapılan çalışmada PH sonrası ilk 12 saat boyunca ifadesinin değişmediği 48. saatte hızla yükselerek pik yaptığı ve 72. saatte düştüğü gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde Cdc20 gen ifadesinin ilk 12 saat değişiklik göstermediği ve 24. saatten sonra hızla artış gösterdiği tespit edilmiştir. Liao ve vd.nin çalışmasından (2004) farklı olarak bizim çalışmamızda PH sonrası 72. saatte Cdc20 gen ifadesi bir anda düşmemiş; ancak ifadesi oldukça yavaşlamıştır. İki çalışma arasında Cdc20 gen ifadesinde PH72. saatte meydana gelen bu farklılığın sebebi PH modelinde kullanılan hayvan türlerinin farklı olmasıyla ilgili olabilir. Bilindiği üzere rejenerasyon süreleri türler arasında farklılık göstermektedir (Taub, 2004).

Bu durumda PH24. saatten itibaren Cdc20 gen ifadesinin artmasının sebebi APC/C^{Cdc20} kompleksinin mitozun pro-metafaz ve anafaza geçiş safhalarındaki rolü ile açıklanabilir. ANAPC2'nin PH'den sonra ilk saatlerinde artış göstermesi APC/C'nin bir diğer adaptör proteini olan Cdh1 ile ilişkili görünmektedir. Cheng ve vd.nin çalışmasında (2017); PH sonrası ilk saatlerde Cdh1 protein miktarının yüksek olduğu gösterilmiştir.

APC/C kompleksinin diğer katalitik alt birimi olan ANAPC11'in gen ifadesi incelendiğinde PH 24, 48 ve 72 saatlerinde düşük olduğu gözlenmiştir. SH24. saat

grubunda ANAPC11 gen ifadesi artış gösterirken P24. saat grubunda ekspresyonu baskılanmıştır.

ANAPC11 ve ANAPC2, APC/C kompleksinin katalitik alt biriminde yer alır. ANAPC2 ve ANAPC11 sıkı bir kompleks oluşturarak E2 için bağlanma bölgesi oluştururlar ve birlikte ubikütinasyonu katalizler (Barford, 2011; Gmachl vd., 2000; Leverson vd., 2000; Sivakumar ve Gorbisky, 2015; Tang vd., 2001). Birlikte ubikütinasyonu katalizleyebildikleri gibi ANAPC2 veya ANAPC11'in ayrı olarak da ubikütinasyonu katalizleyebilecekleri ileri sürülmüştür (Tang vd., 2001). Mayalar üzerine yapılan araştırmada ANAPC2 olmaksızın yalnız ANAPC11 ve E2 enzimi (Ubc4) nin birlikte hedef proteinlere ubikutin ekleyebildikleri gösterilmiştir (Gmachl vd., 2000). Ancak ANAPC2 ile ilgili benzer bir literatüre rastlanmamıştır. Çalışmamızda ANAPC11 gen ifadesinde düşüş gözlenirken; ANAPC2 ifadesinin artması ANAPC2'nin de benzer ubikütinasyon mekanizmasına sahip olabileceğini düşündürmektedir.

UBE2C (UBCH10), APC/C kompleksi ile birlikte aktivite gösteren başlıca E2 enzimlerinden biridir (Jin vd, 2008). UBE2C, APC/C kompleksi yapısında yer alan katalitik alt birime bağlanır. APC/C^{Cdc20} veya APC/C^{Cdh1} hedef proteine bağlandıktan sonra UBE2C'den hedef proteinlere ubikutin aktarımı ile Lys11 ubikutin zincirleri oluşturulur. UBE2C, mitotik siklin ve securin yıkımı için gereklidir. Mitozun metafaz safhası sırasında UBE2C, APC/C^{Cdc20} ile birlikte siklin-B ve securin yıkımını sağlayarak metafazdan anafaza geçişi düzenler. Siklin-B mitozu kadar aktiftir. Mitozun metafazı sırasında APC/C^{Cdc20} kompleksi tarafından siklin-B'nin yıkılması Cdk1'in serbest kalmasına ve APC/C^{Cdh1} kompleksinin oluşmasına sebep olur. APC/C^{Cdh1} kompleksi ve UBE2C ile birlikte mitozdan çıkışı düzenler (Xie vd., 2014).

Çalışmamızda UBE2C'nin gen ifadesi ve protein miktarları incelenmiştir. Sham grubunda gen ifadesinin oldukça az olduğu gözlenmiştir. Okamoto ve vd.nin çalışmasında da normal dokularda ifadesinin düşük olduğu gösterilmiştir (2003). UBE2C geninin PH0, PH6 ve PH12 saatlerinde sham gruplarına benzer şekilde ifade edilmediği belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda hücre döngüsünün G₁ fazı boyunca UBE2C'nin APC/C kompleksi aracılığıyla yıkıldığı tespit edilmiştir (Ma vd., 2016). PH12. saatten sonra UBE2C ifadesi artmaya başlamış, PH48. saatte en yüksek seviyesine ulaşarak (~50kat); PH72. saatte hızla

düşmüştür (~16 kat). Protein miktar analizleri değerlendirildiğinde, UBE2C gen ifadesine benzer şekilde, PH0 ve PH6 saatlerde protein miktarları düşük; PH12, 24, 48 ve 72 saatlerde arttığı belirlenmiştir ve bu sonuçlar gen ifadesi analizlerini destekler niteliktedir.

Farklı çalışmalar UBE2C'nin G₁ fazında düşük olduğu (Van Ree vd., 2010; Walker, Acquaviva, Matsusaka, Koop, & Pines, 2008), DNA replikasyonundan hemen öncesinde arttığı (Walker vd., 2008), S ve G₂ fazında dereceli olarak artış göstererek mitoz sırasında en yüksek seviyesine ulaştığı ve mitozun geç anafaz safhasında hızlıca düşüş gösterdiği belirtilmektedir (Arvand vd., 1998; Xie vd., 2014). Çalışma sonuçlarımız bu çalışma sonuçları ile yakındır. Çalışmamızda da benzer şekilde DNA replikasyonunun başladığı saatler olduğu tahmin edilen PH12. saatte UBE2C ifadesi artmaya başlamıştır. Hücrelerin büyük çoğunluğunun mitozu girdiği belirtilen PH48. saat UBE2C ifadesinin en yüksek olduğu zamandır ve mitoz sonuna yaklaşıldığı düşünülen PH72 saatte UBE2C ifadesi hızla düşmüştür. Çalışmamızda PH sonrası 12, 24, 48 saatlerde UBE2C ifadesinin artarak devam etmesi mitozun APC/C kompleksi aracılığı ile düzenlenmesi mekanizmaları ile ilişkili görünmektedir.

Çeşitli kanser türlerinde UBE2C'nin sürekli transkripsiyonunun olduğu belirtilmektedir. Hatta farelere aktarılan devamlı UBE2C ekspresyonu özelliği normal hücrelerde kanserleşmeye sebep olmuştur (Van Ree vd., 2010). UBE2C gen ifadesindeki bu düşüş hücre döngüsünü kanserleşme sürecine doğru gitmeden durdurmak amaçlı olabilir. UBE2C'nin rejenerasyonun 72. saatinde gen ifadesinin düşmesinde etkili olan hücresel mekanizmaların aydınlatılması kanser mekanizmalarının çözülmesine katkı sağlayabilir.

UBE2D (UBCHL5) APC/C kompleksi ile birlikte çalıştığı belirtilen E2 enzimlerinden biridir (Barford, 2011; Jin vd., 2008; Zhang J. vd., 2014). APC/C kompleksi hedef proteinlerine UBE2C veya UBE2D ailesi üyeleri tarafından ilk ubikutin eklendikten sonra UBE2S tarafından K11-Ubikutin zincirleri oluşturulur. Oluşturulan bu ubikutin zinciri APC/C E3 ligaz kompleksi aracılı yıkımın işaretidir (Stewart vd., 2016). Çalışmamızda UBE2D ailesi üyelerinden UBE2D3'ün gen ifadesine bakılmıştır. PH grupları arasında UBE2D3'ün gen ifadesinde fold değeri bakımından önemli bir farklılık belirlenmemiştir. Bazı literatürlerde UBE2S'nin de APC/C kompleksi ile birlikte çalıştığı

ve UBE2S'nin silinmesinin ya da mutasyonların mitozun bozulmasına sebep olduğu belirtilmektedir (Sivakumar ve Gorbsky, 2015). Çalışmamızda UBE2S gen ifadesi de incelenmiştir. PH grupları arasında UBE2S gen ifadesinde fold değeri bakımından önemli bir farklılık belirlenmemiştir.

PH sonrası karaciğer rejenerasyonunda APC/C kompleksinin, ubiquitin yolağına ait E2 enzimlerinden aktif olarak UBE2C ile çalıştığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda APC/C kompleksiyle ilişkili genlerin yanısıra; SCF^{Skp2} kompleksi adaptör proteini olan Skp2 ifadesi de değerlendirilmiştir. Ancak anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir. SCF^{Skp2} kompleksi oluşumu APC/C^{Cdh1} tarafından kontrol edilmektedir ve G₁-S kontrol noktasının aşılması sırasında oluşmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda hücre döngüsü boyunca ifade edilmesine rağmen; protein stabilitesinin farklılık gösterdiği belirtilmektedir (Rowlands vd., 2004). SCF^{Skp2} kompleksinin karaciğer rejenerasyonundaki rolünün anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

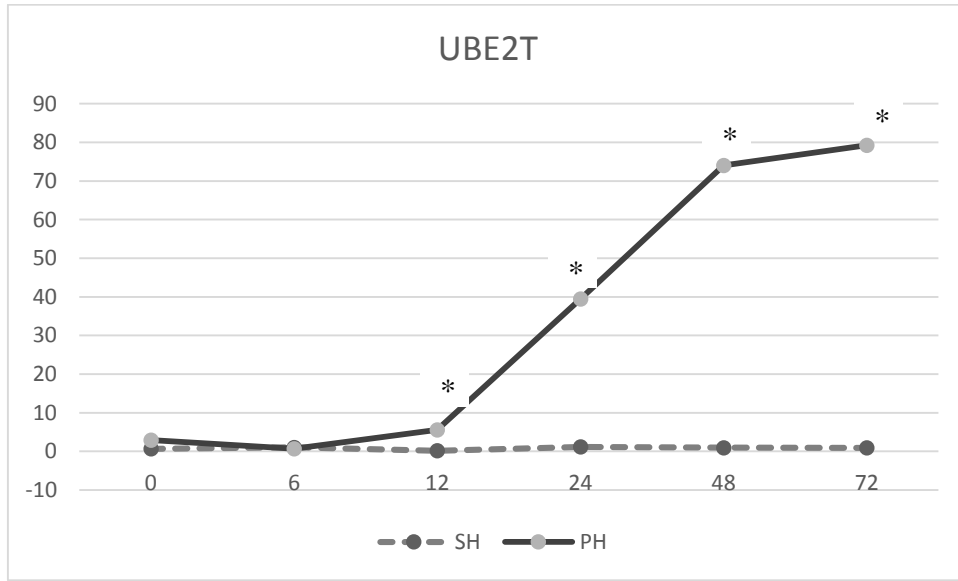
5.4.2. Karaciğer rejenerasyonunda ubikutin yolağı aracılığı ile DNA onarımının düzenlenmesinde rol oynayan olası mekanizmalar

Ubikutin yolağı DNA onarım mekanizmalarıyla da ilişkilidir. Çalışmamızda RT-PCR array analizleri yapılan 88 gen arasından gen ifadesi hem kat değeri (fold) hem istatistik analizleri bakımından anlamlı olan BRCA1, BARD1, UBE2T genleri DNA onarımı mekanizmaları ile ilişkilidir. Bu genlerin ifadeleri PH sonrası karaciğer rejenerasyonun altı farklı zaman diliminde (PH0, PH6, PH12, PH24, PH48, PH72) SH grupları (SH0, SH6, SH12, SH24, SH48, SH72) ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

UBE2T (FANCT), DNA onarımında rol oynayan Fankoni yolağına ait bir E2 enzimidir. Fankoni yolağı, DNA çift zincirleri arasında meydana gelen çapraz bağların tamirinden sorumludur. Fankoni yolağı, translezyon sentezi yolu ile tamir ve homolog rekombinasyon tamir mekanizmalarının da dahil olduğu DNA onarım mekanizmasıdır (Krishnan vd., 2016). UBE2T, homolog rekombinasyon onarımında görev alan BRCA1 ve BARD1 ile birlikte Fankoni yolağında görev alır (Moldovan ve D'Andrea, 2009).

UBE2T ifadesi PH sonrasında farklı rejenerasyon sürelerine göre incelenmiştir. Şekil 5.18'e göre; PH gruplarında; UBE2T ifadesi 6. saatten itibaren artmaya başlamıştır. PH sonrası 12. saatten 48. saate kadar hızlı bir artış gözlenirken; 48. saatten sonra 72. saate kadar bu artış oldukça yavaşlamıştır. SH grupları ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; PH12, PH24, PH48 ve PH72 saat gruplarında anlamlı fark ($p \leq 0.0001$) gözlenmiştir (Şekil 5.18).

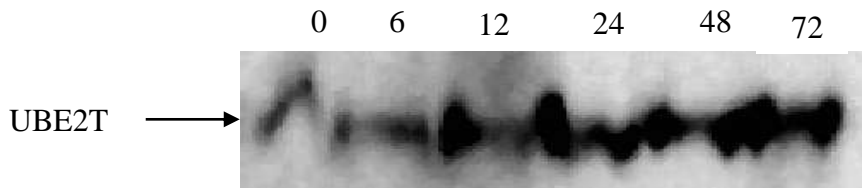
UBE2T protein miktarları incelendiğinde; PH6. saatten itibaren PH12, PH24, PH48, PH72 saatlerde protein miktarı PH0'a göre önemli oranda artış göstermiştir (Şekil 5.19, Çizelge 5.6).



Şekil 5.18. Gruplara ait UBE2T gen ifadesi. * $p \leq 0.0001$.

Çizelge 5.6. UBE2T Western blot jel görüntülerine ait band yoğunlukları ($\times 10^2$)

UBE2T						
Gruplar	0	6	12	24	48	72
Bant Yoğunluğu ($\times 10^2$)	10,643	15,359	15,623	12,85	18,636	26,339

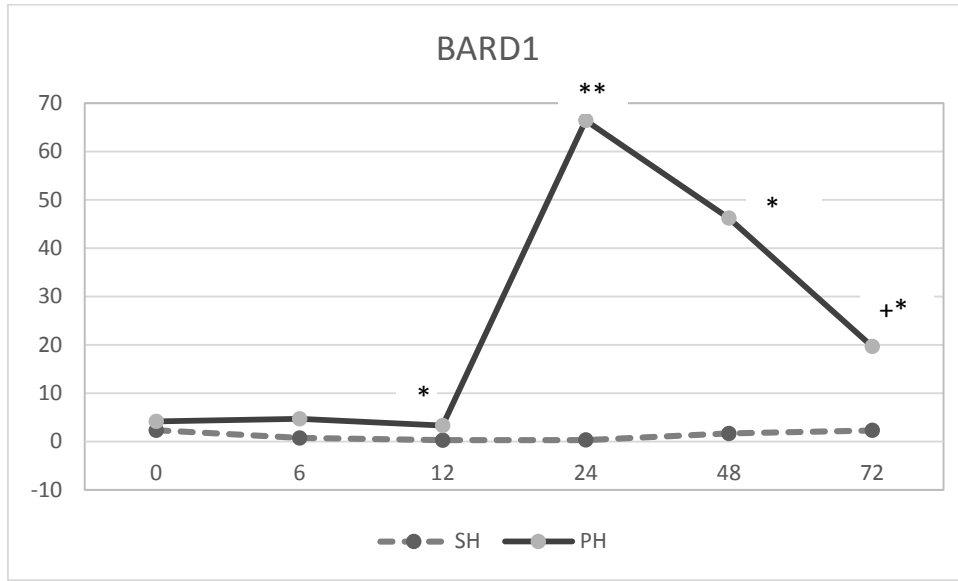


Şekil 5.19. Western blot analizlerinden elde edilen UBE2T proteinine ait bant görüntüleri.

BRCA1, tümör baskılayıcı genlerdendir. BRCA1, BARD1 ile birlikte DNA çift iplik kırılmasına bağlı homolog rekombinasyon tamir mekanizmasında görev alır. BRCA1 tek başına aktivite gösterdiği gibi BARD1 ile daha güçlü E3 ligaz aktivitesi gösterir. BARD1'in tek başına E3 ligaz aktivitesi göstermediği bilinmektedir (Fang *et al.*, 2003). BRCA1 ve BARD1'in gen ve protein miktarları incelenmiştir.

BARD1'in gen ifadesi rejenerasyonun farklı sürelerinde (0, 6, 12, 24, 48, 72) incelenmiştir. Şekil 5.20'e göre; PH gruplarında, BARD1'in ifadesi 12. saatten itibaren artmaya başlamış; 24. saatte en yüksek seviyesine ulaşarak (~70 kat), 72. saate kadar düşüş göstermiştir (~20 kat). İstatistiksel olarak Sham grupları ile karşılaştırıldığında PH12 ($p<0.001$), PH24 ($p<0.0001$), PH48 ($p<0.001$) ve PH72 ($p<0.05$) saat gruplarında anlamlı farklılık belirlenmiştir (Şekil 5.20).

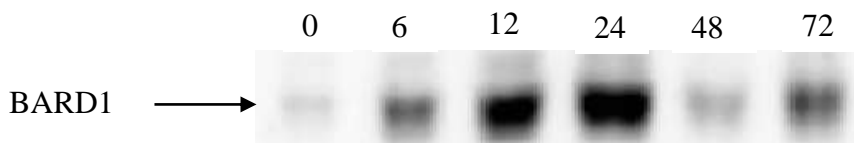
BARD1 Western blot analizleri incelendiğinde PH6, PH12, PH24, PH48 ve PH72 saat gruplarında protein miktarlarında artış olduğu belirlenmiştir. BARD1 protein miktarlarındaki artış PH12 ve PH24 saat gruplarında en belirgindir ve PH24 saat grubunda BARD1 proteini bant yoğunluğu en yüksektir. PH72 saat grubunda protein miktarı bant yoğunluğu PH12 ve PH24 saat gruplarına göre düşüş göstermiştir (Çizelge 5.7 Şekil 5.21).



Şekil 5.20. Gruplara ait BARD1 gen ifadesi. * $p < 0.001$ ** $p < 0.0001$ *+ $p < 0.05$

Çizelge 5.7. BARD1 Western blot jel görüntülerine ait band yoğunlukları ($\times 10^2$)

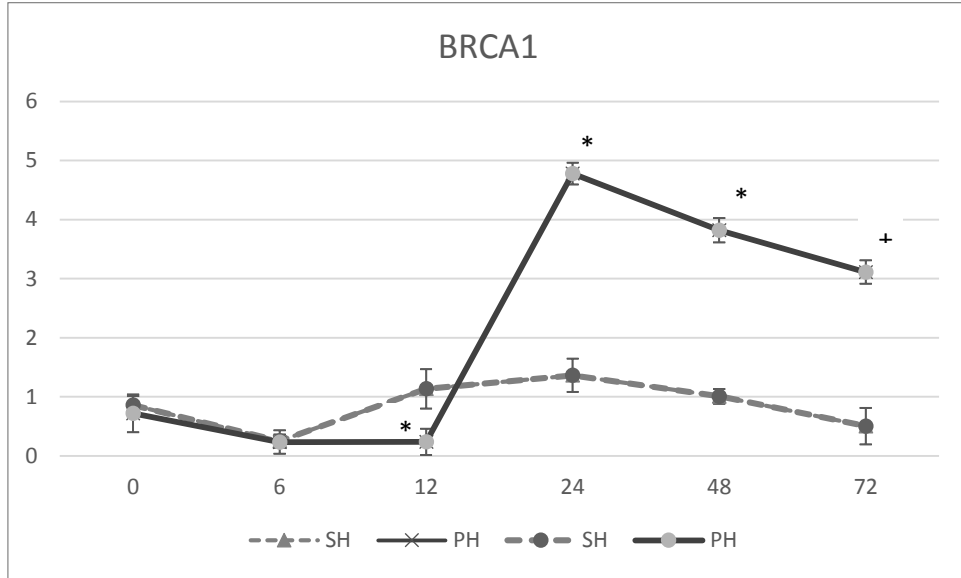
BARD1						
Gruplar	0	6	12	24	48	72
Bant Yoğunluğu ($\times 10^2$)	1,568	9,55	21,921	37,399	6,048	19,915



Şekil 5.21. Western blot analizlerinden elde edilen BARD1 proteinine ait band görüntüleri.

BRCA1 gen ifadesine ait veriler incelenmiştir. PH gruplarında, 12. saatten itibaren BRCA1 gen ifadesinin artmaya başladığı, 24. saatte en yüksek seviyesine (~5 kat) ulaşarak 72. saate kadar düşüş (~3 kat) gösterdiği belirlenmiştir. İstatistiksel olarak SH grupları ile karşılaştırıldığında; PH 12, 24, 48, 72 saat gruplarında meydana gelen artışların anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.22).

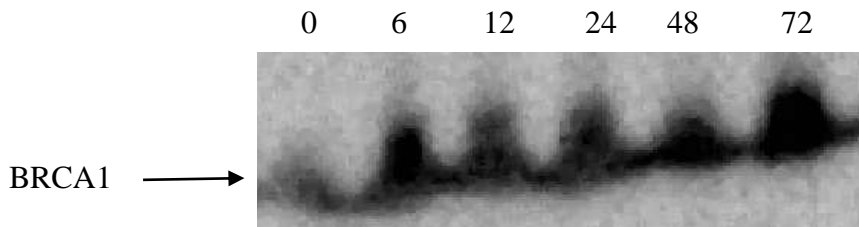
BRCA1'e ait Western blot jeli bant yoğunlukları incelendiğinde PH6, PH12, PH24, PH48, PH72 protein miktarlarının arttığı belirlendi. PH6'da artış gösteren protein miktarı PH12 ve PH24 saat gruplarında da artmaya devam etmiştir ve PH72 saat grubunda en yüksek seviyesine ulaşmıştır. PH48 saat grubunda BRCA1 protein miktarında bir miktar düşüş olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.23, Çizelge 5.8).



Şekil 5.22. Gruplara ait BRCA1 gen ifadesi. *p<0.05 +p<0.01

Çizelge 5.8. BRCA1 Western blot jel görüntülerine ait band yoğunlukları ($\times 10^2$)

BRCA1						
Gruplar	0	6	12	24	48	72
Bant Yoğunluğu ($\times 10^2$)	8,253	14,109	15,398	15,017	13,018	17,614



Şekil 5.23. Western blot analizlerinden elde edilen BRCA1 proteinine ait bant görüntüleri.

UBE2T, Fankoni yolağında görevli E2 enzimidir. BARD1 ve BRCA1, DNA onarım mekaizmalarından homolog rekombinasyonda görev alır.

Fankoni yolağı, homolog rekombinasyon, nükleotit eksizyon onarımı ve translezyon sentezini içeren karmaşık bir mekanizmayı koordine ettiği düşünülmektedir (Moldovan ve D'Andrea, 2009). Fankoni yolağında meydana gelen mutasyonlar, hastalarda Fankoni anemisine sebep olur ve bu hastalarda DNA'da meydana gelen çapraz bağ hasarı tamir edilemediği için kansere yakalanma riski yüksektir (Cheung ve Taniguchi, 2017).

UBE2T, Fankoni yolağının alt basamaklarında yer alan FANCI/FAND2 kompleksinin monoubikütinasyonundan sorumludur (Cheung ve Taniguchi, 2017). FANCI/FAND2 monoubikütinasyonunun gerçekleşmesi BRCA1 ile ilişkili efektör proteinlerin kromatine bağlanabilmeleri için gereklidir (Jones ve Huang, 2012).

UBE2T ile ilgili son zamanlarda yapılan çalışmalarda UBE2T gen mutasyonlarının Fankoni anemisine sebep olabileceği (Hira vd., 2015) ve sürekli ekspresyonunun ise kanseri tetiklediği gösterilmiştir (Hu vd., 2016). 2019 yılına ait bir çalışmada hepatosellular karsinoma (HCC) hücrelerinde UBE2T geninin silinmesi proliferasyonu durdurmuştur. Bu çalışma sonuçlarına göre UBE2T, siklin-B ve Cdk1'i düzenleyerek G₂-M kontrol noktasının aşılmasına yardımcı olmaktadır (Liu vd., 2019). Karaciğer rejenerasyonunda hücrelerin G₂ fazı 2-4 saat sürmektedir (Xu vd., 2005) ve hücreler, PH sonrası yaklaşık 36-48. saatte mitozu girmektedir (Steer, 1995; Fausto, 2000; Kurinna ve Barton 2011). UBE2T gen ifadesinin ve protein miktarının PH12. saat sonrasında artış göstermesi rejenerasyona bağlı G₂-M kontrol noktasının aşılması için gerekli olabilir.

Karaciğer rejenerasyonu sırasında UBE2T gen ifadesi ve protein miktarındaki artış aynı zamanda Fankoni yolağı ile ilişkili olabilir. Fankoni yolağı bazı kimyasalların, iyonize radyasyon, UV gibi DNA ipliğinde karşılıklı çapraz bağlanmaya sebep olan ajanların etkisi ile aktive olur. Fankoni yolağının hiçbir ajana maruz kalınmasını gerektirmeden endojen faktör kaynaklı da aktive olduğu bilinmektedir. Endojen faktörlerden bir tanesinin de replikasyon stresi olduğu düşünülmektedir (Jones ve Huang, 2012). Replikasyon stresinin sınırları çizilmiş belli bir tanımı henüz yoktur. Ancak replikasyon stresi "replikasyon

çatalının çökmesi” olarak tanımlanabilir (Zeman ve Cimprich, 2014). Replikasyon, yüksek organizmalarda onbinlerce replikasyon orjininden aynı anda başlar. Replikasyon orjinleri S fazından önce proteinlerle işaretlenir. DNA replikasyonu başladığı anda, replikasyonun etkili bir şekilde tamamlanabilmesi için hız, doğruluk, nükleotitler ve replikasyon faktörleri gibi ilgili kaynakların tüketim ve dağılımının dengeli olması gerekir. Nükleotid miktarının yetersiz olması, DNA replikasyonu devam ederken bir taraftan da transkripsiyonun gerçekleşmesi, tekrarlayan DNA elemanları, DNA sekonder yapısı, kırılğan bölgeler gibi bir dizi koşul ve engeller replikasyon çatalının durmasına neden olur (Zeman ve Cimprich, 2014). Durmuş replikasyon çatalında, engeller ortadan kaldırıldıktan sonra replikasyon tekrar devam eder. Engellerin kaldırılmadığı durumlarda ise replikasyon çatalı çöker ve DNA hasarı meydana gelir (Zeman ve Cimprich, 2014). Fankoni yolağı, replikasyona bağlı oluşan bazı hasarların tamirini içerir (Moldovan ve D’Andrea, 2009). Öncelikle DNA çapraz bağlantı bölgesi tanınır ve Fankoni yolağına ait proteinler bu bölgede toplanarak UBE2T tarafından FANCI/FANCD2’ye monoubikutin eklenir. Sonrasında DNA’da bulunan çapraz bağ kesilir ve bu kısım homolog rekombinasyon mekanizması yoluyla tamir edilir. DNA’nın diğer ipliği ise translezyon sentezi ile baypas edilir (Krishnan vd., 2016).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, Fankoni yolağı ile mitokondri ilişkisini ortaya koyar niteliktedir. Fankoni yolağının harekete geçiren ve DNA’da hasar oluşturan endojen kaynaklar arasında aldehit yer almaktadır. Aldehitin asetata dönüştürülmesinde rol oynayan aldehit-dehidrogenaz mitokondride yer almaktadır (Cheung ve Taniguchi, 2017). Lavie ve vd.nin çalışmasında (2018) suksinat dehidrojenaz alt birimi A’nın ubikutin proteozom sistemine bağlı yıkımının ATP üretimine katkı sağladığı belirtilmiştir. Bu çalışmada ayrıca Ubikutin yolağının ortamdaki ATP miktarına bağlı olarak degrade edeceği hedef proteinin değişebileceği belirtilmektedir. PH sonrası karaciğer rejenerasyonu sırasında mitokondri sayısının ve ATP miktarının arttığı bilinmektedir. Mitokondride yer alan ve Fankoni anemi yolağı ile ilişkili olan mitokondriyal proteinlerin ubikutin proteozom aracılığı ile yıkımının bahsedilen süreçteki etkileri henüz bilinmemektedir.

Translezyon sentezi Rad6 ile ilişkilidir. Mayalarda bulunan Rad6’nın homoloğu UBE2A ve UBE2B’dir. Çalışmamızda UBE2A ve UBE2B ifadeleri PH12. saatte hafif artış göstermiş; ancak fold2’nin altında kaldığı için anlamsız kabul edilmiştir.

Rad6/Rad18 E3 ligaz kompleksi PCNA'ya ubikutin ekler. Mayalarda yapılan bir çalışmada Rad6 miktarının, DNA hasarlı hücrelerde ve mayoz sırasında artış gösterdiği mitoz sırasında ise değişmeden kaldığı gösterilmiştir (Madura vd., 1990). Farklı hücre tipleriyle yapılan çalışmada, UBE2A ve UBE2B RNA ve protein miktarlarının mitoz sırasında artış göstermediği belirtilmiştir (Koken vd., 1996). Hedglin ve Bekovic araştırmasında (2015) Rad6/rad18 aracılığı ile oluşturulan cevabın genotoksisiteden bağımsız aktive olabileceğinden bahsetmektedir. Rejenerasyon sürecindeki ifadeleri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır Bu mekanizmaların aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Homolog rekombinasyon tamir mekanizması BRCA1 ve BARD1 ile ilişkilidir (Garcia-Higuera vd., 2001; Balta vd., 2003; Moldovan ve D'Andrea, 2009; Jones ve Huang, 2012; Ceccaldi vd., 2016; Hu vd., 2016). BRCA1 tek başına E3 ligaz aktivitesi gösterebilirken; heterodimer yapı gösterdiği BARD1 tek başına E3 ligaz aktivitesi gösteremez. BRCA1/BARD1 ise daha güçlü bir E3 ligaz aktivitesi gösterir (Fang vd., 2003). Yapılan literatür araştırmalarında sıçanlarda karaciğer rejenerasyonunda BRCA1 gen ifadesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır Karaciğer rejenerasyonunda BARD1'in ele alındığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

BRCA1'in karaciğer rejenerasyonu üzerine etkisi henüz bilinmemektedir. Hücre kültürü çalışmalarında BRCA1 geninin G₀ ve erken G₁ fazında oldukça düşük eksprese edildiği, geç G₁ ve S fazında ekspresyonunun maksimum seviyeye ulaştığı gösterilmiştir (Vaughn vd., 1996). Çalışmamız sonuçları bu çalışma ile paraleldir ve PH sonrası hücrelerin olası G₁ fazına denk gelen PH6. saatte BRCA1 proteininin varlığı gösterilmiş; DNA replikasyonunun en yüksek olduğu PH24. Saatte BRCA1 gen ifadesinin en yüksek olduğu ortaya konmuştur.

2011 yılında Wang ve Xu'nun çalışmasında, PH ile karaciğer rejenerasyonunun tetiklendiği sıçanlarda BRCA1 gen ifadesinin iki ekspresyon piki oluşturduğu ve bu piklerin birinin 24-30 saat, diğerinin 36-72 saatte meydana geldiği belirtilmiştir. Çalışmamız ile karşılaştırıldığında BRCA1 gen ifadesinin 24. saatte benzer şekilde pik yapmıştır. Çalışmamızda ikinci bir pik gözlenmemiştir; ancak bunun sebebi PH sonrası 30 ve 36. Saat gruplarının çalışmamızda yer almamasıyla ilişkili olabilir. Çalışmamızda PH30

ve 36 saatleri yer almadığı için BRCA1 gen ifadesinde doğrudan bir düşüş izlenmiştir. BRCA1 gen ifadesinde meydana gelen PH24. saatteki pik ve PH72. saatte meydana gelen düşüş Wang ve Xu'nun çalışması (2011) ile benzerdir. Başka bir çalışmada %60 PH modelinde, BRCA1 gen ifadesinin G₁ fazında arttığı gösterilmiştir (Nygård vd., 2012). Alkolik karaciğer (Liu H. vd., 2015) ve kimyasal ile tetiklenen karaciğer rejenerasyonu modeli (Borude vd., 2018) çalışmalarında BRCA1 gen ifadesinin arttığı gösterilmiştir. Xu ve vd.nin PH çalışmasında (2009) BRCA1 gen ifadesinin mitozun metafaz safhasında arttığı bildirilmiştir.

BRCA1/BARD1 ile birlikte homolog rekombinasyon tamirinde rol oynayan ve hasarın olduğu bölgede ubiquitin zincirleri oluşturan RNF8/RNF168 heterodimer kompleksinden RNF8'in gen ifadeleri incelenmiştir. RNF8 ekspresyonu PH12. saatte pik yaparak SH12 grubuna göre 3 kat artış göstermiştir. Ancak istatistiksel analizinde anlamlı bir fark oluşturmadığı için grafiği verilmemiştir. (Çizelge 5.1, Çizelge 5.2). Çalışmamızda BRCA1 ve BARD1 PH24. saat en yüksek seviyesine ulaşmıştır. RNF8/RNF168'in BRCA1/BARD1 kompleksinden hemen önce aktive olduğu düşünüldüğünde PH12. saatte pik göstermesi olağandır. RNF8'in 3 kat artış göstermesi ile karaciğer rejenerasyonunda homolog rekombinasyon tamir mekanizmasının aktif olduğu görüşünü desteklemektedir.

Homolog rekombinasyonda buraya kadar bahsedilen mekanizma bilinmesine rağmen ilk basamağı oluşturan ubiquitinasyon aşaması bilinmemektedir. UBA1 ve UBA6, ubiquitinasyonun ilk basamağını oluşturan E1 enzimleridir. Diğer UBA ailesi ubiquitin benzeri moleküllerin aktivasyonundan sorumludur. Moudry ve vd.nin çalışmasında (2012) UBA1'in homolog rekombinasyon ile DNA hasarının onarımı sırasında, çekirdekte bulunmasına rağmen hasarlı kromatinin olduğu bölgeye bağlanmadığını göstermiştir. Benzer şekilde UBA6 da çift DNA zincir kırığının bulunduğu bölgede birikim göstermemiştir. Ancak UBA1'in DNA hasarına karşı oluşturulan yanıt için gerekli olduğu gösterilmiştir (Moudry vd., 2012). Çalışmamızda UBA1 ve UBA6 gen ifadeleri değerlendirildiğinde; UBA1 ve UBA6 ifadesinde PH12. saatte hafif bir artış olmasına rağmen anlamlı bulunmamıştır. Ancak ubiquitin benzeri moleküllerin aktivasyonundan sorumlu UBA ailesinin diğer üyelerinden UBA2 ve UBA5'in ifadesinde PH12. saatte anlamlı fark gözlenmiştir. PH sonrası karaciğer rejenerasyonunda DNA çift zincir kırığına karşı homolog rekombinasyonel onarım için oluşturulan hücresel yanıtta UBA2 ve UBA5

daha aktif rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Qin ve vd.nin çalışması da (2019) bu hipotezi desteklemektedir. Bu çalışmada UBA5'in rol oynadığı UFMilasyonunun, DNA çift zincir kırıklarına karşı hücrel yanıt oluşturulması sırasında ATM aktivasyonu için gerekli olduğu ortaya konmuştur.

Elde edilen literatür taramaları ve sonuçlarımıza göre DNA çift zincir kırığına bağlı homolog rekombinasyon mekanizmalarının karaciğer rejenerasyonu 12-24. saatlerin aktif olduğunu göstermektedir. Bilindiği gibi PH sonrası 24. saat DNA replikasyonunun en yüksek olduğu zamandır. DNA replikasyonunun yüksek olduğu durumda yüksek organizmalarda replikasyon stresinin meydana gelmesi olası görünmektedir. Ledesma ve vd.nin çalışmasında replikasyonun başarısız olması sonucunda çift zincir kırıklarının kendiliğinden meydana gelebileceği belirtilmiştir (Cortés-Ledesma ve Aguilera, 2006). Replikasyon stresi, replikasyon çatalının durmasına hatta çökmesine sebep olabilir. BRCA1/BARD1'in durmuş replikasyon çatalını koruduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (Daza-Martin vd., 2019). Ancak durmuş replikasyon çatalının yeniden replikasyona başlaması sırasında homolog rekombinasyonun nasıl bir katkısı olduğu henüz netlik kazanmamıştır (Costes ve Lambert, 2013).

Çalışmamızda PH sonrası 24. saatte BRCA1 ve BARD1'in yüksek olması; DNA'nın homolog rekombinasyon tamiriyle ilişkilendirilebilir. RNF8 gen ifadesinde meydana gelen artış da bu ilişkiyi destekler niteliktedir. Ayrıca UBA1'den ziyade UBA2 ve UBA5'in daha aktif rol oynayabileceği düşünülmektedir (Kurtoğlu ve Tekedereli, 2001; Chapman vd., 2012).

BRCA1/BARD1, DNA onarımının yanısıra G₂-M kontrol noktasının aşılması ve sentrozom duplikasyonu (Deng, 2002; Kais ve Parvin, 2008) mekanizmalarıyla da ilişkilidir. Çalışmamızda BARD1 ve BRCA1 ifadesinin PH72. saate kadar devam ediyor olması G₂-M kontrol noktasının aşılması ve sentrozom duplikasyonu mekanizmaları ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bazı araştırmalar hücre döngüsünün kontrolünde rol oynayan önemli bir faktör olan APC/C kompleksi ile DNA onarım mekanizmaları arasında da ilişki olabileceğini göstermektedir. Mitozun erken metafazı sırasında iğ kontrol noktasının düzenlenmesinde

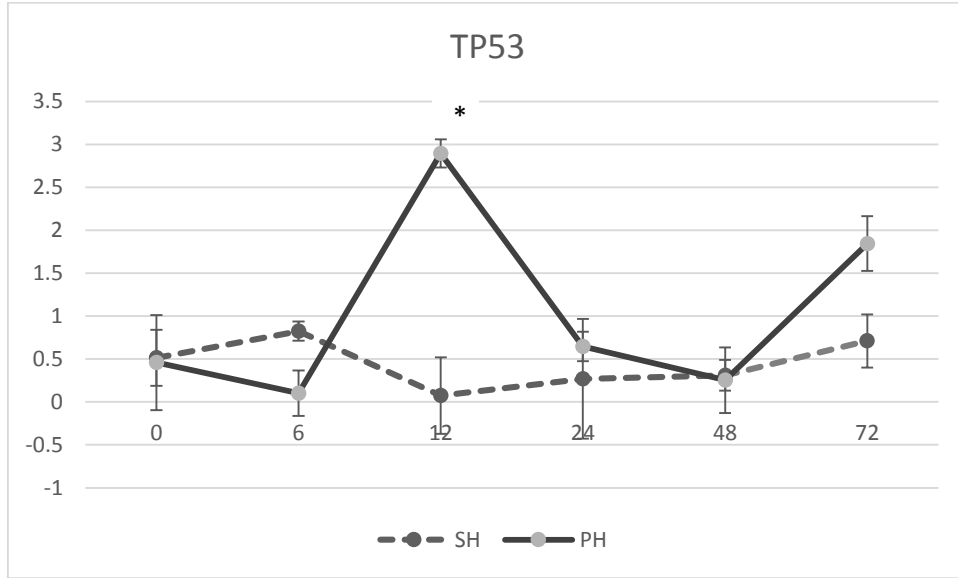
rol oynayan APC/C^{cdc20} inhibitörü MCC yapısında bulunun Mad2 proteininin ekspresyonu ile BRCA1 ekspresyonu ilişkili bulunmuştur (Deng, 2006). BRCA1 defekti bulunan farelerde Mad2 ekspresyonunun da düşük olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2004). APC/C^{cdh1} E3 ligazının da DNA onarım mekanizmalarından translezyon sentezinde rol oynadığı belirtilmektedir (Boer vd., 2016b).

5.4.3. Karaciğer rejenerasyonunda p53 ve p53'ün düzenlenmesinde rol oynayan olası mekanizmalar

p53, UV, hipoksi, virüs enfeksiyonu ve DNA hasarı gibi stres sinyalleri üzerine aktive edilir. Hasarlı DNA yapısına sahip hücrelerin, G₁-S (Kastan vd., 1995) ve G₂-M (Li vd., 2009) kontrol noktalarında durdurulmasında rol oynar (Agarwal vd., 1995). DNA hasarının tamir edilmesi durumunda hücre döngüsü kaldığı yerden devam eder; tamir edilememesi durumunda apoptoz mekanizmaları devreye girerek hasarlı hücre ortadan kaldırılır (Kastan vd., 1995).

p53, E3 ligaz olan Mdm2'nin hedef proteini'dir. p53 çalışmamızda yer alan hem BRCA1/BARD1 E3 ligaz hem de Mui1 E3 ligaz kompleksleri ile ilişkilidir. (Fabbro vd., 2004; Peng vd., 2016).

PH sonrası karaciğer rejenerasyonunun farklı sürelerinde p53 gen ifadesi incelendiğinde PH12 saat grubunun anlamlı olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir. PH0, PH6, PH24, PH48 ve PH72 saat grupları, sırasıyla SH0, SH6, SH24, SH48 ve SH72 saat grubu ile karşılaştırıldığında birbirlerine yakın bulunmuştur. PH72 saat grubunda da p53 gen ifadesinde artış olduğu belirlenmiş; ancak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 5.26).



Şekil 5.24. Gruplara ait TP53 gen ifadesi.

Karaciğer rejenerasyonunda G_1 fazına giriş 4-6 saat olarak belirtilmektedir ve G_1 fazına girildikten sonra ve mitozdan önceki fazda p53 gen ifadesinin arttığı gösterilmiştir (Thompson vd., 1986; Ozeki ve Tsukamoto, 1999). Yapılan çalışmalarda PH sonrası 8. Saatte p53 gen ekspresyonunun artış gösterdiği ve 12. saate kadar devam ettiği gösterilmiştir (Thompson vd., 1986 Ozeki ve Tsukamoto, 1999). Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve PH sonrası 6. Saatte p53 gen ekspresyonunun artış gösterdiği ve 12. saatte en yüksek (3 kat) seviyesine ulaştığı gözlenmiştir.

PH sonrası 12. saatteki p53 gen ifadesindeki bu artış BRCA1/BARD1 ve Mnl1 gen ifadeleri ile de paralellik göstermektedir. Hücrede DNA çift zincir kırığı DNA hasarı oluştuğunda BRCA1/BARD1 DNA'ya yerleşir ve p53 aracılığı ile hücre döngüsü durdurulur. Mnl1 hedef proteinlerinden Mfn2, p53'ün yıkımından sorumludur (Peng vd., 2016). Mnl1 gen ifadesindeki artışa bağlı olarak Mfn2 yıkılacağından; Mfn2 aracılı p53 yıkımı olmayacaktır. Bu nedenle PH 12. saatte Mnl1 gen ifadesindeki artış ile yine aynı saatte p53 gen ifadesindeki artışı dolaylı olarak etkilemiş olabilir.

Karaciğer rejenerasyonunun bitiş fazında, p53'ün hücre döngüsünün durdurulmasından sorumlu olduğu bilinmektedir (Kurinna ve Barton, 2011). Çalışmamızda PH48-PH72. saatlerde gözlenen p53 gen ifadesindeki hafif artış karaciğer rejenerasyonunun sonlandırılmasıyla ilişkili olabilir.

5.4.4. Karaciğer rejenerasyonunda ubikutin yolağı aracılı mitokondriyal fizyon ve mitofajinin olası rolü

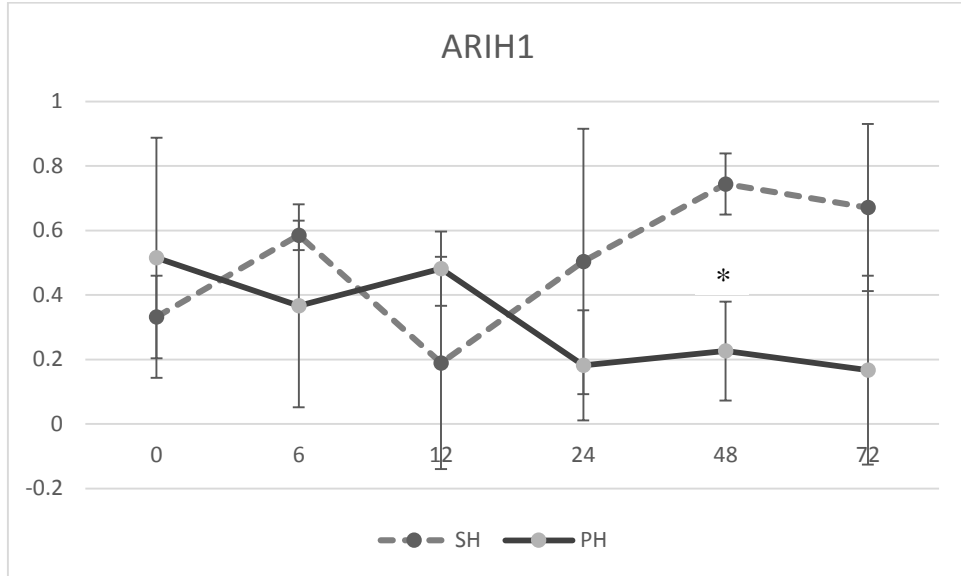
Ubikutin ilişkili olduğı diğer bir mekanizma mitofajidir. Mitofaji, hasarlı, yaşlanmış veya gereksiz mitokondrilerin seçilerek yok edilmesidir (Villa vd., 2018). Mitokondri ROS kaynağıdır. Zamanla mtDNA'ı etkileyerek oksidatif fosforilasyon ve biyogenez mekanizmalarında bozulmayla birlikte hücre ölümüne neden olabilir. ROS, hücredeki lipit protein gibi temel yapıları bozar. Bu nedenle hücrelerin varlığını devam ettirebilmeleri için mitofaji mantıklı bir yoldur (Lemasters, 2005). Mitofaji Parkin aracılı-mitofaji ve Parkin-aracısız-mitofaji olarak sınıflandırılmaktadır (Palikaras vd., 2018). En iyi tanımlanmış mitofaji yolağı Parkin (E3 ligaz) ve PINK1 proteinleri tarafından gerçekleştirilen yoldur (McWilliams ve Muqit, 2017; Palikaras vd., 2018).

Çalışmamızda PARK2 gen ifadesi incelendiğinde tüm gruplarda ekspresyon göstermediğı belirlenmiştir (Çizelge 5.1, Çizelge 5.2). Son yapılan çalışmalarda, E2 enzimlerinden UBE2N, UBE2L3, UBE2D2 ve UBE2D3 (UBE2D2/ 3)'ün Parkin bağımlı mitofaji için gerekli olduğı gösterilmiştir (Geisler vd., 2014). Bu genler arasında UBE2N, UBE2L3 ve UBE2D3'ün gen ifadeleri çalışmamızda incelenmiştir. UBE2N ve UBE2L3 ifadelerinde saatlere göre anlamlı bir fark bulunmamıştır. UBE2D3'ün PH grubu içinde, saatlere göre incelendiğinde, ifadesinde önemli bir farklılık göstermediğı belirlenmiştir.

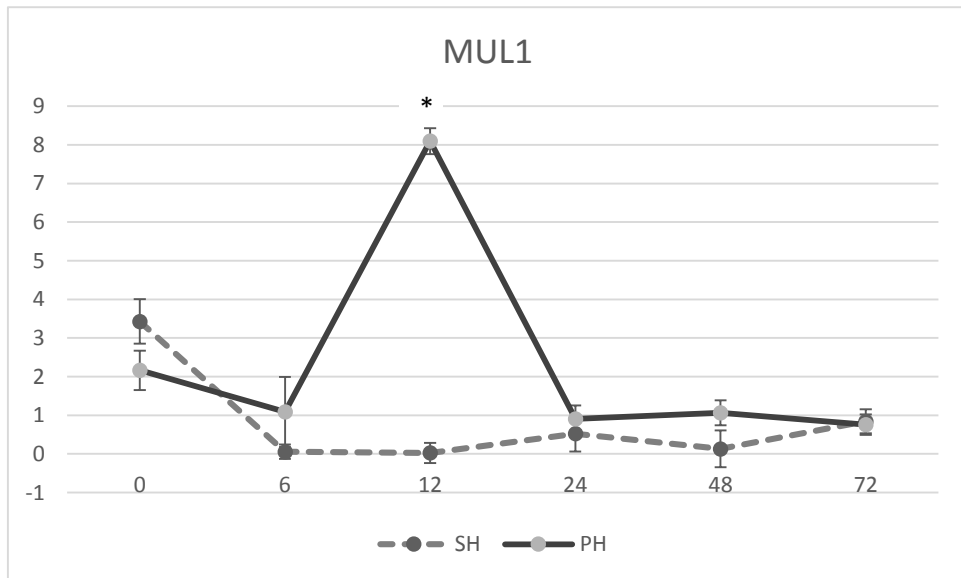
Özet olarak Parkin-aracılı mitofaji ile ilişkili Parkin (PARK2), UBE2N, UBE2L3 ve UBE2D3 genlerinin ifadelerinde; PH sonrası karaciğer rejenerasyonunun 0, 6, 12, 24, 48, 72 saatlerinde anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir. Bu sonuçlara göre Parkin aracılı mitofajinin PH sonrası karaciğer rejenerasyonu 0-72 saat sürecinde aktif olmadığı anlaşılmaktadır.

Parkin-aracısız mitofajinin düzenlenmesinde Aih1, Smurf1 ve Mull, rol oynar ve her üçü de mitokondri zarında yer almaktadır (Villa vd., 2017, 2018; Montava-Garriga ve Ganley, 2019; Macleod, 2020). Çalışmamızda bu yolak ile ilişkili Aih1, Smurf1, Mull'in gen ifadeleri saatlere göre incelenmiştir.

Smurf1 gen ifadesi incelendiğinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Aih1 gen ifadesinde PH sonrasında düşüş gözlenmiştir. Aih1 gen ifadesinde gözlenen bu düşüş SH grubu ile karşılaştırıldığında PH48. saat grubunda anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.24).



Şekil 5.25. Gruplara ait Arih1 gen ifadesi. *p<0.0001



Şekil 5.26. Gruplara ait Mul1 gen ifadesi. *p<0.0001

Mul1 gen ifadesi değerlendirilmiştir. Şekil 5.25’de PH gruplarına bakıldığında; Mul1’in 12. saatte en yüksek seviyesine ulaştığı (8 kat) ve 24. saatte hızlı bir düşüş (~1 kat) gösterdiği belirlenmiştir. İstatistiksel olarak SH grupları ile karşılaştırıldığında; PH grubunda 12. saatte meydana gelen bu artış anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$).

Mul1 mitofajiden farklı olarak mitokondriyal fizyon ve füzyon olaylarında etkin rol oynar. Mul1, Drp1’e SUMO ekleyerek mitokondriyal fizyonu başlatırken; mitokondriyal füzyonu engeller (Peng vd., 2016). Fizyon ile mitokondrinin hasarlı kısmı, hasarsız kısmından ayrılmış olur (Youle ve Van Der Blik, 2012).

Yapılan literatür araştırmalarında mitokondri ile rejenerasyonun ilişkili olabileceğini işaret eden çalışmalar mevcuttur; ancak moleküler mekanizması açık değildir. Duguez ve vd.nin çalışmasında (2002), mitokondriyal protein sentezi inhibe edildiğinde; kas farklılaşmasının gerçekleşmediği gösterilmiştir. Han ve vd.nin çalışmasında (2016); hasarlı aksonlarda mitokondri sayısının artırılmasının rejenerasyon sürecine destek olduğu belirtilmiştir. Polimeno ve vd.nin çalışmasında (2000); Augmenter of Liver Regeneration (ALR) proteinin sıçanlardaki etkisi araştırılmıştır. ALR’nin, hepatektomi sonrası karaciğer rejenerasyonunda arttığı bilinmektedir. ALR enjekte edilen sıçanlarda mitokondriyal proteinlerin ve mitokondriyal transkripsiyon faktörü-A’nın artışı sağlanmıştır. Bu faktörlerin artışı ise karaciğer mitokondrilerinin oksidatif fosforilasyon artışı ile ilişkilendirilmiştir.

Karaciğer rejenerasyonu ile mitofaji ya da mitokondriyal fizyon ilişkisini açıklayan herhangi çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak karaciğer rejenerasyonu sırasında mitokondri sayı ve yapısının bahsedildiği araştırmalara rastlanmıştır. Vıragh ve Bartok’un çalışmasında PH sonrası farklı rejenerasyon sürelerinde karaciğer dokusu elektron mikroskopunda incelenmiştir. PH24. saatte mitokondrilerin şişmiş, kaba, düzensiz şekilli ve krista sayılarının az olduğu belirtilmiştir (Viragh ve Bartok, 1966). Başka bir çalışmada karaciğer rejenerasyonunda DNA replikasyonu başlamadan önce fonksiyonlarının bozulduğu belirtilmiştir. Fonksiyonlarının bozulması, mitokondrilerde gözlenen şişmenin ultrasütural yapısının bozulması ve matriks proteinlerinin sitoplazmaya salınmasıyla ilgili olabileceği belirtilmiştir (Ferri vd., 2005). PH sonrası 7-24 saatleri arasında azalmış ATP sentezi de mitokondriyal disfonksiyonu desteklemektedir (Guerrieri vd., 1999).

PH sonrasında kalan karaciğer dokusuna gelen kan akımı üç kat artmaktadır. Artmış oksijen miktarına bağlı olarak ROS salınımla oksidatif stres meydana gelmektedir (Ferri vd., 2005). Karaciğer rejenerasyonunun erken fazında ROS'un arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda lipid peroksidasyonu göstergesi olarak kullanılan malondialdehit (MDA) ve oksitlenmiş protein PH7-24 saatlerinde artış göstermiştir (Guerrieri vd., 1999). PH sonrası karaciğer rejenerasyonu erken fazında dokuya gelen kan akımının artmasına bağlı olarak meydana gelen oksidatif hasar, mitokondri yapı ve fonksiyonunu da etkilemektedir (Ferri vd., 2005; Guerrieri vd., 1999; Guerrieri 1995). Bozulmuş mitokondrinin ise daha fazla ROS ürettiği düşünülmektedir (Guerrieri vd., 1999). Bozulmuş mitokondriler, hücreye daha fazla zarar vermeden ortadan kaldırılması veya zarar vermesi engellenmelidir (Lemasters, 2005; Montava-Garriga ve Ganley, 2019; Youle ve Van Der Blik, 2012).

Mitofaji, fonksiyonu bozulmuş bütün bir mitokondrinin komponentleri ile beraber yok edilmesidir. Mitokondriyal fizyon ise, mitokondrinin fonksiyonu bozulmuş kısmının fonksiyonu bozulmamış kısmından bölünerek ayrılmasıdır. Füzyon, işlevsiz mitokondrinin, fonksiyonel mitokondri ile birleşmesidir ve bu sayede mitokondriler arasında bileşenlerin paylaşılmasıyla bozuk mitokondri stresten kurtarılır (Youle ve Van Der Blik, 2012). Her ne kadar mitokondriyal füzyon ile iki mitokondri içeriğinin birleşimi homeostazi açısından iyi olduğu belirtilse de bununla ilgili bir testin olmayışı, kanser, karaciğer yağlanması, miyopati gibi patolojik durumlarda mitokondriyal fizyon yokluğu ve azalması, megamitokondrilere rastlanması karışıklığa sebep olmaktadır (Yamada vd., 2018).

Özetle; PH ile beraber artan oksidatif stres mitokondrilerin yapı ve fonksiyonlarında bozulmaya sebep olur. Bir yandan da karaciğerin PH ile kaybolan metabolik aktivitesinin tekrar kazandırılması için hücrelerin proliferasyonu gereklidir. PH sonrasında karaciğer rejenerasyonu gerekli olan enerji ve hücresel madde ihtiyacının karşılanması DNA replikasyonunun düzgün ilerleyebilmesi için şarttır. DNA replikasyonu sırasında enerji ve protein ihtiyacının karşılanmaması, replikasyon stresi gibi sonuçlara sebep olabilir. Hücrelerin yüksek enerji ihtiyacını karşılayabilmek için mitofaji ile mitokondrilerin yıkılması yerine fizyonu tercih ettiği düşünülmektedir (Montava-Garriga ve Ganley, 2019). Mitokondriyal fizyon, büyüyen ve bölünen hücreler için gerekli görülmektedir (Youle ve Van Der Blik, 2012). Çalışmamızda Parkin-aracılı mitofaji

yolağı genlerinden Parkin'in gen ifadesinde tüm gruplarda belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Parkin-aracısız mitofaji yolları ile ilişkili Arih1 gen ifadesinde 48. saatte düşüş görülmüştür. Mul1 gen ifadesinde 12. saatte anlamlı artış belirgindir. PH sonrası 12. saatte belirgin artış gösteren Mul1, parkin-aracısız mitofaji yolağı yanısıra mitokondriyal fizyon ile de bağlantılı bir gendir. Çalışmamız PH sonrası karaciğer rejenerasyonunun, Mul1 aracılı mitofaji ve mitokondriyal fizyon mekanizmaları ile ilişkili olabileceğini ortaya koyan ilk çalışmadır.

Çalışmamızda yer alan MOCS3 geni ilginç olduğunu düşündüğümüz genlerden bir tanesidir. Son zamanlarda yapılan ve ödül alan çalışma verileri (Weber vd., 2020) ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

MOCS3, molibden kofaktör sentezinden sorumlu enzimlerden bir tanesidir. Ancak ökaryotlarda iki yönlü fonksiyonu ile bilinir. MOCS3 aynı zamanda ubiquitin-related modifier 1 (URM1)'i de aktive eder. URM1, tRNA'lara 2-tiyüridin ekler. Tiyüridin içeren tRNA modifikasyonları ise mitokondriyal tRNA'lardır (Neukranz vd., 2019). Dolayısıyla MOCS3'ün aktive ettiği URM1 vasıtasıyla mitokondriyal tRNA sentezi ile dolaylı olarak ilişkilidir. MOCS3, 2-tiyüridin tRNA sentezinde gerekli olan sülfürü, sitozolik NFS1'den temin eder. NFS1 ise mitokondrideki Fe-S kümelerinin biyosentezinden sorumludur. Bu çalışmada Crisp/Casp9 ile oluşturulan MOCS3 knockout hücrelerde, [4Fe-4S] yapısındaki akonidaz enzim miktarı ölçülerek MOCS3'ün rolü araştırılmıştır. Buna göre MOCS3 knockout hücre hatlarının üçüncü günün sonunda olması gerekenin neredeyse yarısı kadar olduğu ve akonidaz sentezinin ise %50 oranında azaldığı gösterilmiştir. Akonidaz sentezindeki bu azalmanın, Fe-S ile ilişkili olup olmadığı bilinmektedir (Neukranz vd., 2019). Ancak akonidaz enzim miktarının azalması, MOCS3'ün Fe-S kümesi biyosentezi üzerine olası etkisi ile ilişkili gibi görünmektedir.

Diğer taraftan ödül alan Weber ve vd.nin çalışmasında (2020), hücre proliferasyonu için daha asitik lizozomun gerekli olduğu gösterilmiştir. Lizozom bazı anabolik ve katabolik fonksiyonlar için önemlidir ve demir homeostazında anahtar rol oynadığı gösterilmiştir. Bunun yanısıra BafA1 aracılığı ile lizozom zarında bulunan asiditeyi sağlayan pompa inhibe edilerek; proliferasyon için gerekli olan düşük pH engellenmiştir. Oluşturulan bu lizozomal bozukluk; Fe-S küme proteinlerinden SDHB ve FECH'in

katalitik aktivitesini ya da stabilitesini bozmuştur. FECH, hem biyosentezinin en son basamağındaki enzimdir ve akonidazın katalitik aktivitesi için gereklidir. Ayrıca bu çalışma ile demir yetersizliğine bağlı lizozomal disfonksiyonuyla elektron taşıma zincirinde bozukluk, hipoksi benzeri sinyal yolağının aktivasyonu, merkezi karbon metabolizmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada lizozomal fonksiyon bozukluğunun mitokondriyal metabolizma bozukluğuna sebep olabileceğine işaret edilmiştir.

Ferecatu ve vd.nin çalışmasında mitokondriyal transmembran potansiyelinin düzenlenmesi ile lizozomun ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Hatta kanser hücrelerinde görülen megamitokondriilerin oluşmasına sebep olan mitokondriyal fizyon/füzyon dengesinin bozulmasıyla değişmeyen mitokondriyal transmembran potansiyeli ilişkilendirilmiştir (Ferecatu vd., 2018).

Çalışmamızda MOCS3 ifadesi fold2'nin altında kalmasına rağmen; PH12 saat grubunda 1.5 katlık artışla SH grubuna göre anlamlı fark oluşturmuştur. Her ne kadar fold2'nin altında kalsa da son zamanlarda yapılan araştırmalar ile olan olası ilişkisi dikkat çekicidir. Neukranz ve vd.nin çalışması MOCS3'in Fe-S protein sentezi ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir. Weber ve vd.nin çalışması ise proliferasyon için demirin gerekli olduğunu ve lizozomal disfonksiyonun Fe-S proteinlerinde bozukluklara sebep olabileceğini göstererek Fe-S proteinleri ile lizozom ilişkisine işaret etmektedir. Ferecatu ve vd.nin çalışması ise lizozom mitokondriyal potansiyel ve mitokondriyal fizyon/füzyon dengesi arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır (2018). Bu literatür verileri göz önüne alındığında; çalışmamızda MOCS3 ifadesindeki artış Fe-S proteinlerinin sentezi, lizozom aktivitesi dolayısıyla mitokondriyal potansiyel ve mitokondriyal fizyon/füzyon ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir. Literatürde bununla ilgili yeterli veri bulunmamaktadır.

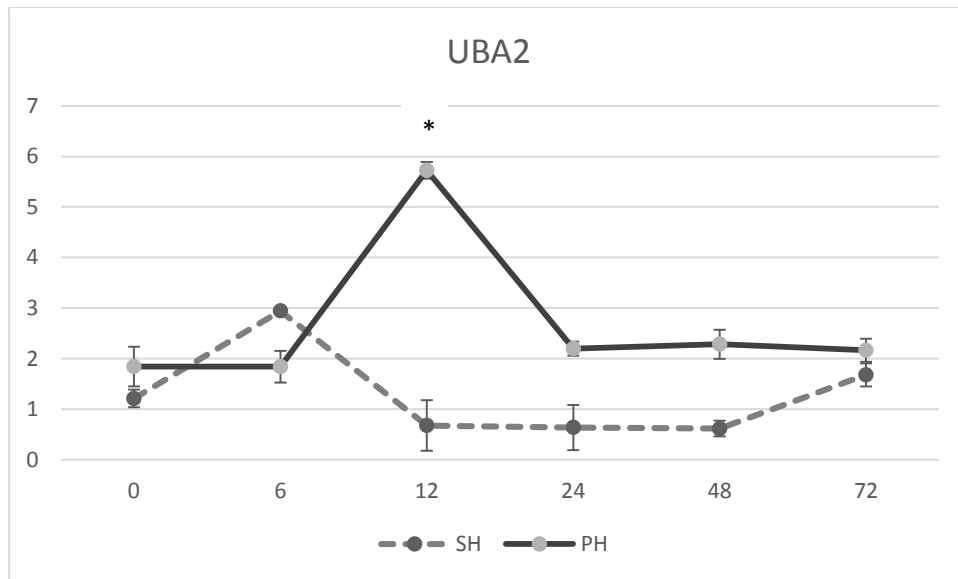
Bununla birlikte Fe-S proteinlerinden bir tanesi de Fanconi yolağına ait komplekslerden FANCF'dir (Zhang, 2014). Fe-S protein miktarındaki artışın Fanconi yolağını aktive etmesi olası bir sonuçtur. Bu da çalışmamızda rejenerasyon sırasında Fanconi yolağına ait UBE2T ifadesindeki artışın moleküler mekanizmasına ışık tutmaktadır.

5.4.5. İfadesi farklılık gösteren diğer genler ve karaciğer rejenerasyonu üzerine olası rolleri

Çalışmamızda UBE2J2, UBA2 UBA5, WWP1, RNF180, UBE2D3, UBE2G1, UBE2Q1 genlerinin ifadesinde de SH gruplarına göre anlamlı farklılıklara rastlanılmıştır. Bu genlerden RNF180, UBE2D3, UBE2G1, UBE2Q1'in görevleri tam olarak bilinmemekle birlikte çalışmamızda yakın ekspresyon profilleri gösterdiği belirlenmiştir. UBE2J2, UBA2 UBA5 genleri ise görevleri kısmen bilinmesine rağmen bahsedilen mekanizmalardan farklılık gösterdiği için ayrı olarak değerlendirilmiştir.

UBA2, hedef proteinlere ubikutin benzeri proteinlerden SUMO eklenmesinde görevli E1 enzimidir. DNA onarımı, kromozomların kardeş kromatidlere ayrılması, transkripsiyonun düzenlenmesi, nüklear proteinlerin hedeflenmesi gibi çeşitli hücrel süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir (Di Bacco ve Gill, 2006).

UBA2 analizleri değerlendirildiğinde; SH ve PH gruplarının 24, 48, 72 saat gruplarında UBA2 ifadesinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak PH12 saat grubu 5.7 kat artış göstererek en yüksek seviyesine ulaşmış ve SH12 grubuna göre önemli fark göstermiştir ($p<0.001$) (Şekil 5.27).



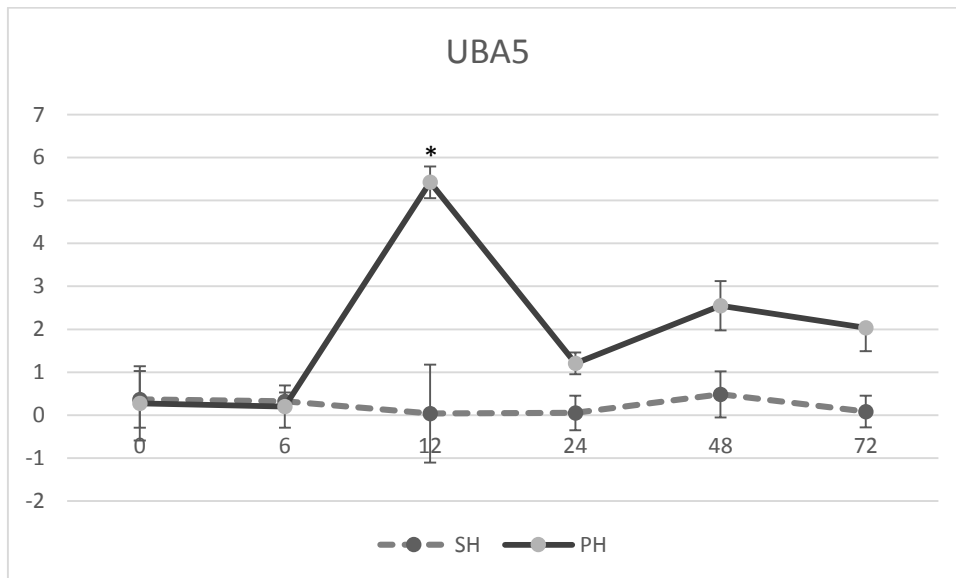
Şekil 5.27. Gruplara ait UBA2 gen ifadesi. * $p<0.001$

He ve vd.nin çalışmasında kolorektal kanserlerde, normal dokulara göre UBA2 ifadesinin arttığı ve proliferasyon için gerekli olduğu gösterilmiştir (He vd., 2018).

Yapılan çalışmalarda SUMOlasyon mekanizmasının hücre döngüsü aşamalarının düzgün ilerleyebilmesi için gerekli olduğu ortaya konmuştur; ancak hücre döngüsü aşamaları arasında geçişi sağlayan mekanizmalar henüz açık değildir (Eifler ve Vertegaal, 2015). DNA onarım mekanizmaları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sarangi ve Zhao, 2015). Çalışmamızda UBA2 gen ifadesi PH12 grubunda anlamlı fark göstermiştir. PH sonrası karaciğer rejenerasyonu 12. saatte DNA replikasyonunun başladığı bilinmektedir (Xu vd., 2005). UBA2 gen ifadesinin karaciğer rejenerasyonu sürecindeki etkisi ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır.

UBA5 (ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5), hedef proteine ubiquitin benzeri proteinlerden UFM-1 eklenmesinde rol oynayan E1 enzimidir (Fang ve Pan, 2019).

UBA5'in gen ifadesi incelendiğinde PH grubunda 12. saatte ifadesinin 5.4 kat arttığı tespit edilmiştir. SH grubu ile karşılaştırıldığında UBA5 geninde PH12. saatte meydana gelen bu artışı anlamlıdır. ($p < 0.001$) (Şekil 5.28).



Şekil 5.28. Gruplara ait UBA5 gen ifadesi. * $p < 0.001$

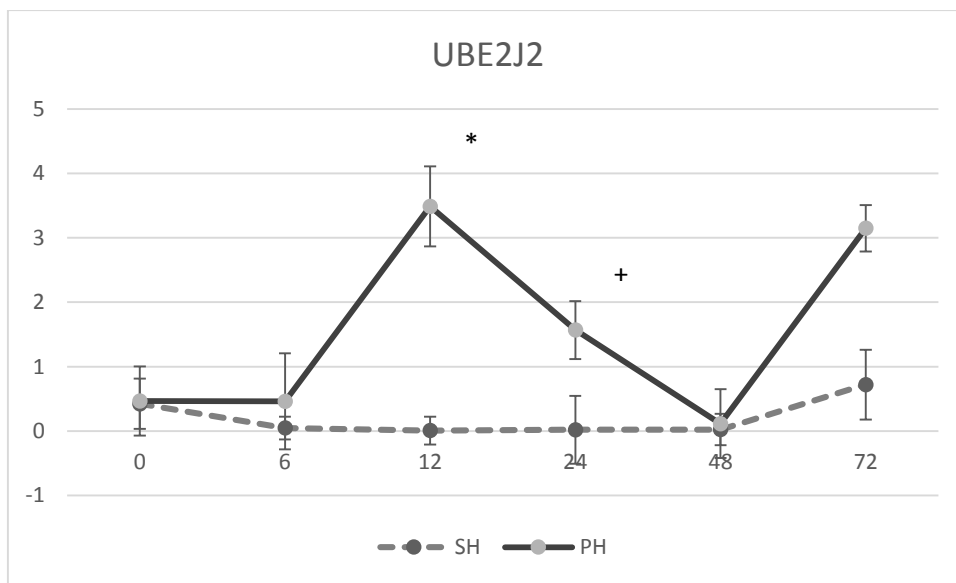
UFMilasyonun, ER stresi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Fang ve Pan, 2019). Son yapılan çalışmalarla DNA çift zincir kırıklarına karşı oluşturulan hücrel cevap mekanizması ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (Fang ve Pan, 2019). UFMilasyon mekanizması henüz bilinmemektedir; ancak kanser, hepatopoeiz, ensefalopati, ateroskleroz gibi birçok patoloji altında UFMilasyon bozukluğu ile ilişkilidir. UFMilasyon yolağı ile ilişkili genlerin down-regülasyonu, karaciğer fonksiyon bozukluklarıyla ilişkili olup çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (Fang ve Pan, 2019). Qin ve vd.nin çalışmasında (2019) H4 UFMilasyonunun, DNA çift zincir kırıklarına karşı hücrel yanıt oluşturulurken ATM aktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Meme kanserlerinde proliferasyon üzerine etkili olan östrojen reseptörü hedef genlerinin transkripsiyonunda etkilidir (Yoo vd., 2014). UFM1 ve UFMilasyonun E3 ligazı olan UFL1 genleri silinmiş zebra balıklarında hematopoiyetik hücrelerin telomer uzunluklarının kısa olduğu belirlenmiştir (Lee L. vd., 2019).

UFMilasyonda görevli başka bir E3 ligaz olan RCAD/Ufl1 yokluğunda anemiye sebep olduğu, hematopoiyetik hücrelerde büyük mitokondrilerin varlığı, artmış ER stresi, ROS üretimi ve artmış p53 miktarına sebep olduğu belirtilmiştir (Lee L. vd., 2019). Karaciğer rejenerasyonunda UBA5 ve UFMilasyonun rolü henüz bilinmemektedir. Çalışmamızla UBA5'in karaciğer rejenerasyonu ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Elde edilen literatür taramalarına göre karaciğer rejenerasyonunda PH12. saatte UBA5 ekspresyonu artışı, DNA çift zincir kırığına karşı hücrel yanıtın oluşturulması, mitokondriyal dinamik ve hematopoeiz ile ilişkili olabilir.

UBE2J2 (Ubc6) endoplazmik retikulum (ER) zarında bulunan ve ER-aracılı degradasyon (ERAD)'da görev alan E2 enzimlerindedir (Wang vd., 2009). UBE2J2 ifadesinde PH gruplarında 12. saatte yaklaşık 3.5 kat artış göstererek en yüksek seviyesine ulaşmıştır ve 24. saatte düşüş göstererek (yaklaşık 1.7 fold), 48. saatte sham grubu ile aynı gen ifadesi düzeyine inmiştir. PH72 saat grubunda tekrar artış göstermeye başlamış; ancak anlamlı bir fark oluşturmamıştır. UBE2J2 ifadesi SH grupları ile karşılaştırıldığında; PH12 ve PH24 saat gruplarında anlamlı fark belirlenmiştir (Şekil 5.29).

UBE2J2 (Ubc6), ER yer alan E2 enzimlerinden biridir. ER, hücrede proteinlerin salgılanmasından ve doğru katlanmasından sorumludur. Ancak artan çevresel sorunlar

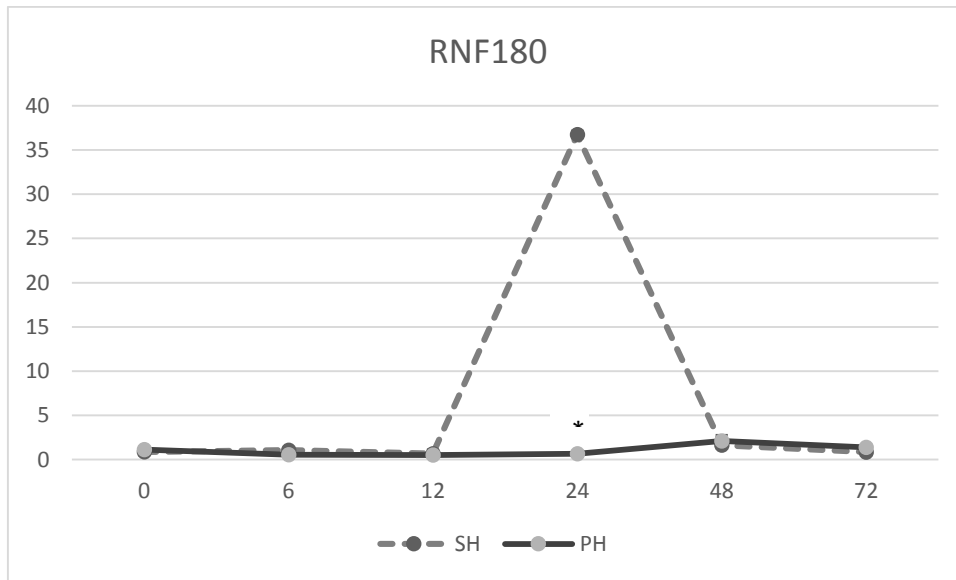
proteinlerin yanlış katlanmasına sebep olabilir. Bunun sonucunda yanlış katlanmış proteinler için hücresel yanıt oluşur. Hücreleri proteotoksiteden korumak için ERAD sistemi aktif olur. ERAD, yanlış katlanmış proteinlere karşı verilen yanıtta görevli temel mekanizmadır ve bir ubiquitin proteozom sistemidir (Lam vd., 2014). UBE2J, çevresel faktörler ile oluşan yanlış katlanmış proteinlerin, hücrede farkedilmesinden yaklaşık dört saat sonra ifadesinin arttığı çalışmalar ile gösterilmiştir (Oh vd., 2006; Lam vd., 2014). Bu sonuç çalışmamız ile paralellik göstermektedir. UBE2J2 gen ifadesi PH6. saatte artmaya başlamıştır (Şekil 5.29). PH'nin hemen sonrasında oluşan oksidatif stres bağlı olarak hücresel proteinlerin yapısında da bozulmalar meydana gelecektir. Bu nedenle PH sonrası oluşan hasarlı proteinlerin yıkılması amacıyla UBE2J2'nin PH6. saatte ifadesinin artmaya başlaması olağandır. UBE2J2'nin gen ifadesine bakarak ERAD aktivasyonunun PH12. saatte en yüksek olduğunu ve PH48. saate kadar devam ettiğini söyleyebiliriz (Şekil 5.29). PH48. saat hepatositlerin çoğunun mitozu girdiği göz önüne alındığında G₂-M fazında UBE2J2'nin ifadesi düşmüştür. PH72. saatte UBE2J2'nin gen ifadesi tekrar artmaya başlamıştır (Şekil 5.29). Karaciğer rejenerasyonunda 72. saatten sonrası bitiş fazıdır ve hücre farklılaşması belirgindir. UBE2J2'nin PH72. saatteki artışı hücre farklılaşması rolü ile ilişkilendirilebilir. UBE2J2'nin HCC hücrelerinde, hücre farklılaşması ve invazyonda rol oynayabileceği gösterilmiştir (Chen vd., 2017). Literatür taramaları ile desteklediğimiz sonuçlarımıza göre karaciğer rejenerasyonunda UBE2J2 gen ifadesindeki değişiklikler, ER-aracılı proteinlerin degradasyonu ve hücrelerin farklılaşması ile ilişkili olabilir.



Şekil 5.29. Gruplara ait UBE2J2 gen ifadesi. *p<0.01, +p<0.05

WWP1, RNF180, RNF40 UBE2D3, UBE2G1, UBE2Q1'in ifadeleri SH grubunun 24. ve/veya 48. saatlerinde artış göstermiştir. APC/C kompleksi yapısında yer alan ANAPC11 de benzer ekspresyon göstermiştir. Literatürlerde bu genlerin DNA onarımı ve proliferasyon ile ilişkili olduğu bilinmektedir; ancak birbirleri ile ilişkili olabileceklerine dair veri oldukça sınırlıdır.

RNF180 (Rines), ER'nin sitoplazmaya bakan zarında bulunur ve RING E3 ligazlarda bulunan RING alt birimine sahiptir. (Ogawa vd., 2008). RNF180 gen ifadeleri saatlere göre değerlendirildiğinde; PH0, PH6, PH12, PH48 ve PH72 saat grupları ile SH0, SH6, SH12, SH48 ve SH72 saat gruplarının benzer bulunmuştur. PH24 saat grubuna ait RNF180 gen ifadesinin, SH24 saat grubuna göre yaklaşık 37 kat düştüğü belirlenmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 5.30).



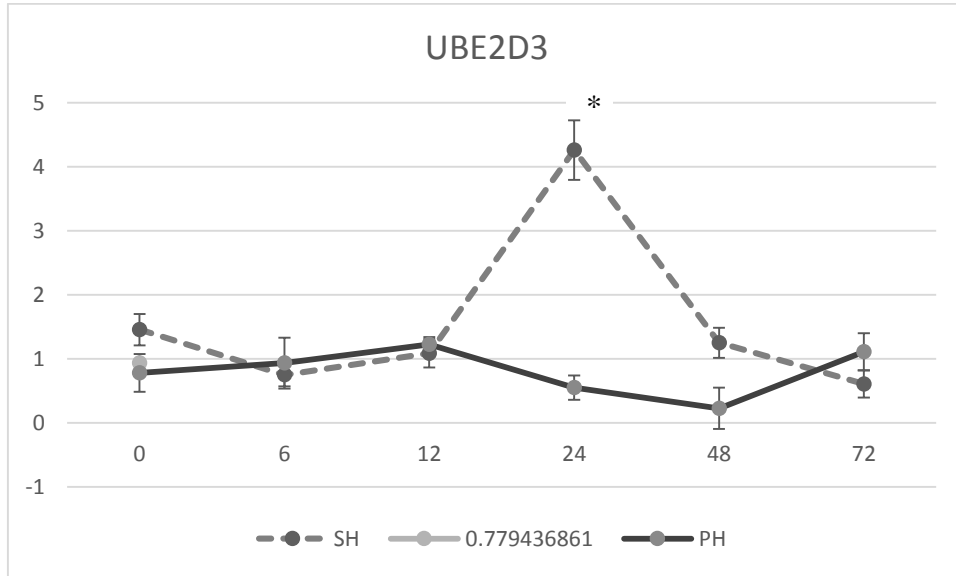
Şekil 5.30. Gruplara ait RNF180 gen ifadesi. * $p<0.0001$

Mide kanserlerinde RNF180 gen ifadesinin olmadığı ya da düşük ifade edildiği belirtilmiştir. RNF180'in tümör baskılayıcı etkisi olduğu ve apoptozu tetikleyebileceği gösterilmiştir (Cheung vd., 2012). Çalışmamızda PH gruplarında RNF180 gen ifadesi oldukça düşüktür ve proliferasyon için RNF180'in apoptotik etkisinin baskılanması için gerekli olabileceğini düşündürmüştür.

UBE2D E2 enzimlerinden biridir ve dört farklı UBE2D (UBCHL5) ailesi üyesi vardır. Bunlar UBE2D1 (Ubchl5a), UBE2D2 (Ubchl5b), UBE2D3 (Ubchl5c) ve UBE2D4

(UbcH5d)'dir. UBE2D ailesinin farklı tip E3 ligazlar ile çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir (Stewart vd., 2016). UBE2D ailesi üyelerinin hücre döngüsü (Watson vd., 2019), DNA onarımı (Yang vd., 2013), otofaji (Geisler vd., 2014; Kwon ve Ciechanover, 2017) mekanizmaları ile ilişkili olduğu belirtilmektedir.

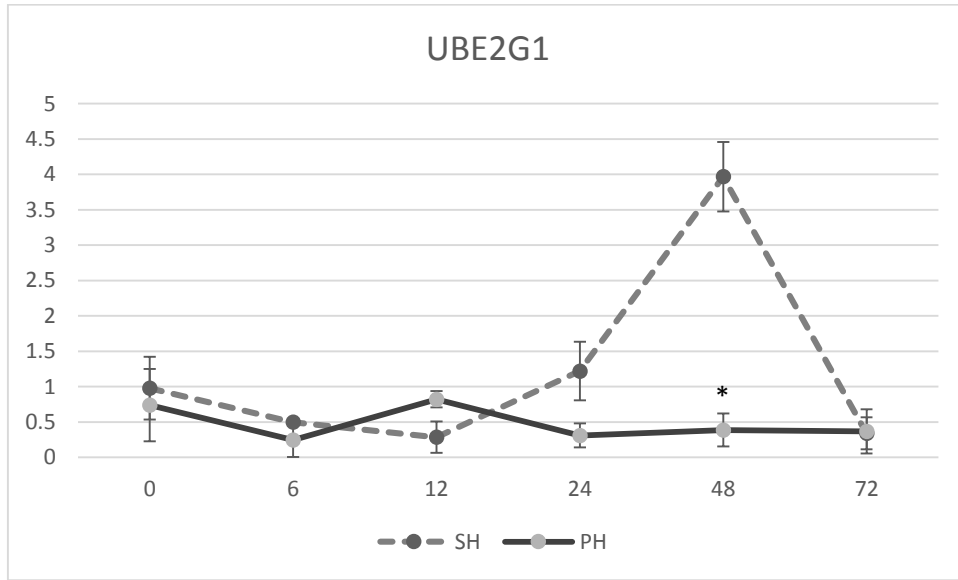
Çalışmamızda UBE2D ailesi üyelerinden UBE2D3'ün gen ifadeleri PH'nin farklı saatlerine göre incelenerek SH grupları ile karşılaştırılmıştır. SH24 saat grubunda UBE2D3 ifadesinin pik yaptığı gözlenirken; PH24 saat grubunda gen ifadesi baskılandığı gözlenmiştir. SH24 saat grubunun UBE2D3 gen ifadesi PH24 saat grubuna göre yüksektir ($p<0.05$) (Şekil 5.31).



Şekil 5.31. Gruplara ait UBE2D3 gen ifadesi. $p<0.05$

Yang ve vd.nin çalışmasında (2016); özefagus kanser hücrelerinde UBE2D3'ün yüksek ekspresyonunun DNA hasarı onarımı oranını düşürdüğü belirtilmiştir. Aynı ekibin yapmış olduğu farklı bir çalışma UBE2D3'ün hedef proteinlerinden birinin hTERT olabileceği gösterilmiştir. hTERT ökaryotlarda telomerin uzatılmasını sağlayan ribonükleoprotein enzimdir (Gao vd., 2016). Bu durumda UBE2D3'ün fazla olması bu proteinin aktivasyonunu düşürecektir. Çalışmamızda UBE2D3 ifadesinin PH grubunda düşük olmasının bölünen hücrelerin telomer uzunluğunun sağlanması ve hücrelere DNA onarımı devamlılığı için gerekli olduğunu düşündürmüştür.

UBE2D3 ve UBE2G1 (Ubc7) enzimleri birbirinden farklıdır; ancak birbirlerini tamamlayıcı rol oynadığı bilinmektedir. UBE2D3'ün aynı hedef proteine monoubikutin eklediği; UBE2G1'in de eklenecek monoubikutin üzerine ubikitin molekülleri ekleyerek poliubikutin zinciri oluşturduğu düşünülmektedir (Sievers vd., 2018). Çalışmamızda UBE2D3'de sham grubunda 24. saatte (Şekil 5.31); UBE2G1'de 48. saatte tek pik gözlenmiştir (Şekil 5.32) ve bu fark PH24. saate göre anlamlıdır ($p < 0.05$). UBE2G1'in hedef proteinlere, UBE2D3'den sonra ubikitin molekülleri eklediği göz önüne alındığında; gen ifadesinin UBE2D3'den sonra olması olağan görünmektedir.



Şekil 5.32. Gruplara ait UBE2G1 gen ifadesi. * $p < 0.05$

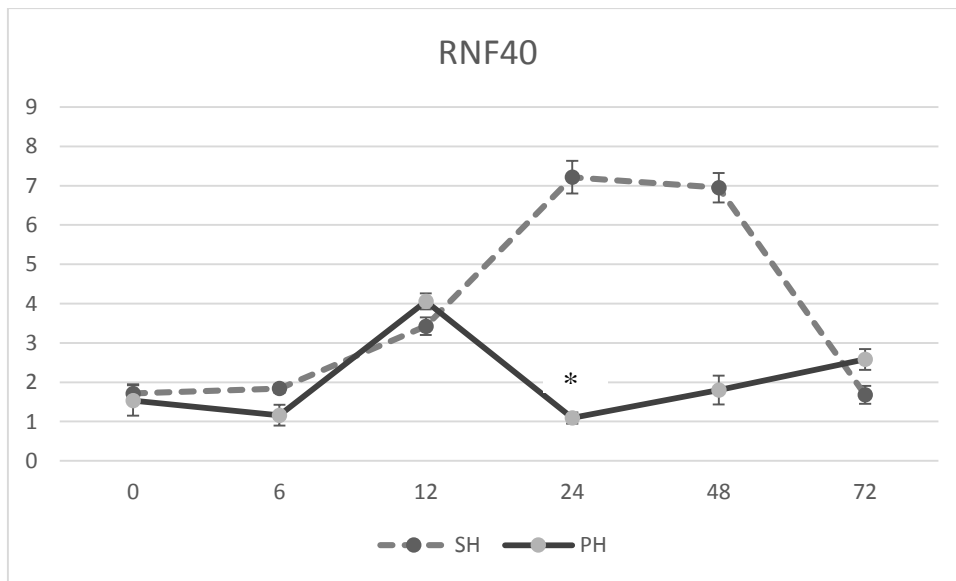
UBE2G1, başka bir E3 ligaz olan CRL4^{CRBN}'in adaptör proteini CRBN yıkımından sorumludur ve DNA hasarına hücrel yanıt oluşturulmasında rolü olduğu düşünülmektedir. Ancak DNA onarımında nasıl bir rol oynadığı bilinmemektedir (Zhou ve Xu, 2019). Zhou ve Xu'nun çalışmasında (2019); UBE2G1'in DNA hasarı ile tetiklenen apoptozdan hücreleri koruyarak DNA hasarına verilen cevabı inhibe ettiği düşünülmektedir. UBE2D3 ile ilgili farklı bir çalışmada da benzer şekilde UBE2D3'ün yüksek ekspresyonunun DNA hasarı onarımı oranını düşürdüğü yönünde sonuç elde edilmiştir (Yang vd. 2016). Çalışmamızda UBE2G1'in ifadesinin düşük olması, DNA onarımı ile ilişkili görünmektedir.

UBE2G1, ER membranında yer alır (Cyr vd., 2002) ve ERAD aracılı protein yıkımı ile ilişkili görünmektedir. (Fang vd., 2001).

Elde edilen literatür taramaları her iki genin yüksek ifadesinin ilaç direnci ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (Gao vd., 2016; Lu vd., 2018). İlaç direnci mekanizmaları, mitokondriyal fizyon/füzyon dengesinin korunmasında rol oynayan mitokondri transmembran potansiyeliyle de ilişkili bulunmuştur (Ferecatu vd., 2018). Bu anlamda UBE2D3 ve UBE2G1 ifadelerinin PH gruplarında düşük olmasını sağlayan mekanizmaların aydınlatılması yönündeki çalışmaların; ilaç direnci mekanizmalarına katkı sağlayacağı görüşündeyiz.

RNF40, RING E3 ligazlardandır ve RNF20 ile heterodimer kompleksi oluşturur. RNF20/RNF40 DNA çift iplik kırılımının onarımında rol oynadığı belirtilmektedir.

Çalışmamızda RNF40'ın gen ifadeleri PH'nin farklı saatlerine göre incelenerek SH grupları ile karşılaştırılmıştır. PH gruplarında 12.saatte 4 kat artış göstermiş; ancak SH12 grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark göstermemiştir. Diğer taraftan RNF40 ifadesi SH24 ve SH48 gruplarında artış (~7 kat) gözlenirken; PH24 ve PH48 gruplarında artış olmamıştır. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde SH24 saat grubundaki artış anlamlıdır ($p < 0.05$) (Şekil 5.33).



Şekil 5.33. Gruplara ait RNF40 gen ifadesi ($p < 0.05$).

RNF40'ın DNA çift zincir kırığı hasarı onarımında rol oynadığı düşünülmektedir. RNF40, başka bir E3 ligaz olan RNF20 ile kompleks oluşturur. DNA çift zincir onarımı ile histon proteinlerinin modifikasyonları iç içedir. Çünkü kırığın olduğu bölgede sıkı paketlenmiş histon proteinlerinin gevşetilmesi ve DNA tamiriyle ilişkili proteinlerin o bölgeye yerleşmesi gereklidir. BRCA1/BARD1 kompleksi, DNA çift zincir kırığının olduğu bölgedeki H2AX histon varyant proteinin ubikütinasyonunda ve ipliğin gevşemesinde rol oynar. Benzer şekilde RNF40/RNF20 E3 ligazı ise H2B histon proteinin ubikütinasyonundan sorumludur. Ancak RNF40/RNF20 kompleksinin DNA onarım mekanizması ile ilgili bilinenler oldukça kısıtlıdır (So ve Ramachandran, 2019).

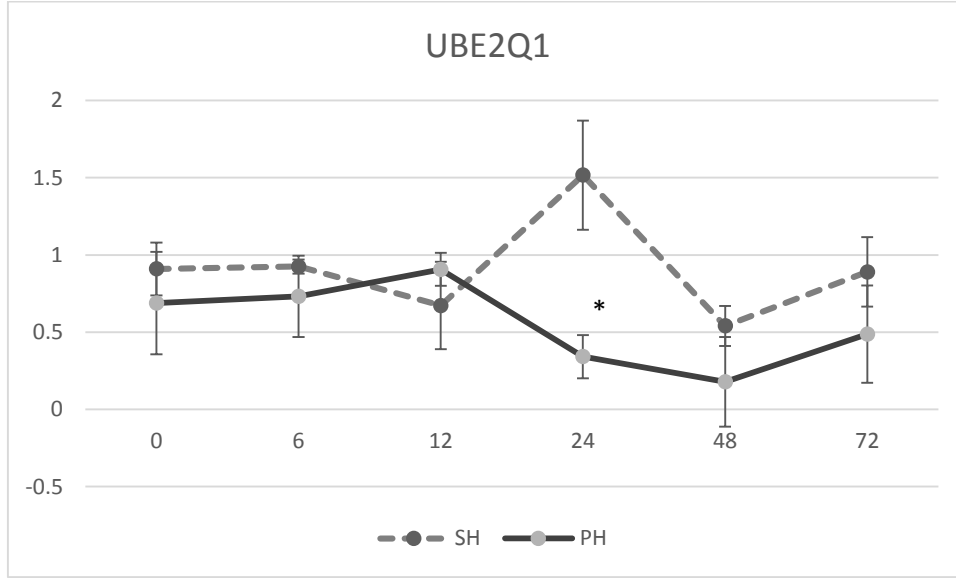
Çalışmamızda RNF40'ın ifadesi sham grubu 24. saatte yüksek olmasına rağmen; PH grubunda düşüktür. Bu durum PH grubu 24. saatte RNF40 ekspresyonunun baskılandığını düşündürmektedir. RNF40 dışında bazı genlerin ifadesinde de benzer sonuçlara rastlanmıştır. Bu genlerin karaciğer rejenerasyonu ile ilişkisi açık değildir.

Dong ve vd.nin çalışmasında UBE2D3'ün, BRCA1/BRCA2/BARD1 kompleksi ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (2003). Yang ve vd.nin çalışmasında (2015); özefagus kanser hücrelerinde UBE2D3'ün yüksek ekspresyonunun DNA hasarı onarımı oranını düşürdüğü gösterilmiştir (Yang H. vd., 2016). DNA onarımı ile ilişkili olduğu düşünülen UBE2D3 ve RNF40'ın 24. saatte meydana gelen gen ifadelerindeki benzerlik ilginçtir. RNF40 ve UBE2D3'ün PH sonrası karaciğer rejenerasyonundaki rolü bilinmemektedir.

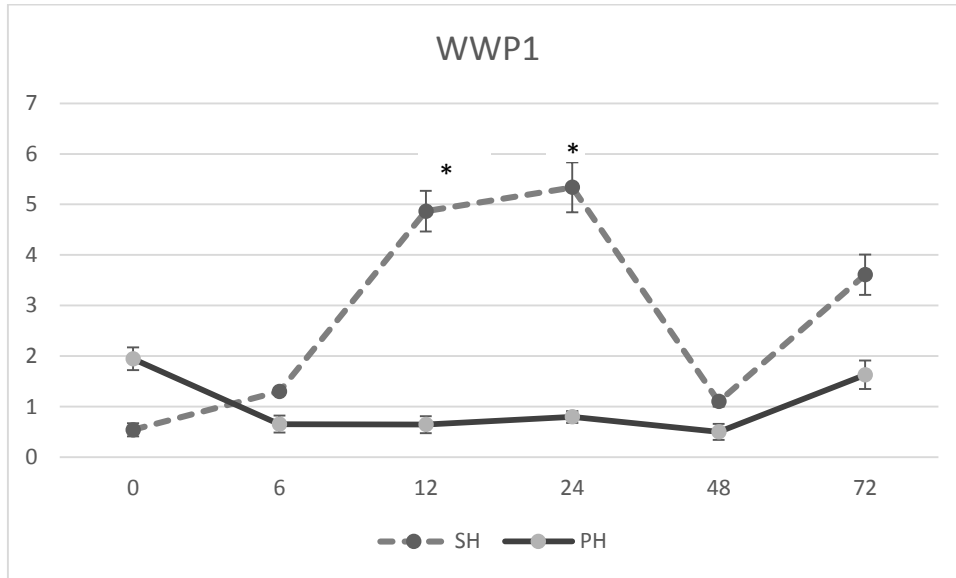
UBE2Q1'in görevi tam olarak bilinmemekle birlikte; birçok kanser türünde yüksek ifade edildiği bilinmektedir (Chang vd., 2015; Hosseini vd., 2019). Proliferasyon ve hücre döngüsünün ilerlemesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Chang vd., 2015). Çalışmamızda UBE2Q1'in PH24, PH48, PH72 saat gruplarında ifadesinin fold0.5'in altında olduğu belirlenmiştir. PH ve SH grupları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında SH24 saat grubunda UBE2Q1 gen ifadesi artış gösterirken; PH24 saat grubunda gen ifadesinin baskılandığı ve düşüş gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5.34).

UBE2Q1 ifadesinin yüksek olduğu bilinen HCC hücrelerinde UBE2Q1 ifadesinin inhibe edilmesi ile hücre döngüsünün kesintiye uğradığı ve UBE2Q1'in HCC oluşumu üzerine etkili olabileceği belirtilmiştir. UBE2Q1'in kanserleşme sürecindeki rolü henüz

bilinmemektedir. (Chang vd., 2015). Çalışmamızda UBE2Q1 ekspresyonunun karaciğer rejenerasyonunda baskılanması, hücreleri kanserleşmeden koruyor olabilir.



Şekil 5.34. Gruplara ait UBE2Q1 gen ifadesi. * $p < 0.01$



Şekil 5.35. Gruplara ait WWP1 gen ifadesi ($p < 0.005$).

WWP1'in bazı fizyolojik süreçlerde rol oynadığı bilinmesine rağmen üstlendiği rol ve mekanizmaları henüz açık değildir. WWP1 genine ait RT-PCR sonuçları

incelendiğinde; SH12 ve SH24 saat gruplarında yüksek olan gen ifadesinin PH12 ve PH24 saat gruplarında anlamlı düşüş gösterdiği belirlendi (Şekil 5.35).

WWP1 ile ilgili araştırmaların çoğu da kanser üzerinedir. Şöyle ki bazı kanser türlerinde WWP1 ekspresyonunun düşük/hiç olmaması, kanserin daha kötü olduğu anlamına gelirken; bazı kanser türlerinde ise aksine WWP1 ekspresyonunun yüksek olması daha kötü anlamına gelmektedir (L. Zhang vd., 2015). Bazı kaynaklarda tümör baskılayıcı olarak tanımlanırken (Nguyen Huu vd., 2008); bazı kaynaklarda da onkogen olabileceği belirtilmektedir (Wu vd., 2015). WWP1'in çift yönlü bir etkisi olabilir. Çeşitli araştırmalarda da bu durum ifade edilmiştir (Li vd., 2008; Zhi ve Chen, 2012; L. Zhang vd., 2015). Bizim çalışmamızda WWP1 ekspresyonu PH12 ve PH24. saatlerde SH grubunda artış gösterirken; PH grubunda gen ifadesi baskılanmıştır.

Çalışmamızda sham gruplarında 24 ve/veya 48. saatlerinde ANAPC11, WWP1, RNF40, RNF180, UBE2D3, UBE2G1, UBE2Q1 genleri birbirine benzer ekspresyon tablosu göstermişlerdir. Literatür taramalarında bu genlerin çeşitli kanser türleri ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. PH gruplarında ekspresyonları değişmezken ya da düşüş gösterirken; SH gruplarında 24 ve/veya 48. saatlerinde bir anda yükselip düşmesi ilginç görünmektedir. ANAPC11, WWP1, RNF40, RNF180, UBE2D3, UBE2G1, UBE2Q1 genlerinin PH sonrası karaciğer rejenerasyonundaki görevlerinin anlaşılması kanserleşmeye giden süreçlerin aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karaciğer rejenerasyonu çok sayıda hücresel olaylar dizisinin farklı zamanlarda etkili olduğu kompleks mekanizmalar dizisidir ve cereyan eden hücresel olaylar henüz aydınlatılamamıştır. Karaciğer rejenerasyonunda ubikutin yolağının rolü henüz bilinmemektedir ve yapılan incelemelerde karaciğer rejenerasyonu sürecinde ubikutin yolağının rolünü içeren detaylı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda %70 PH ile tetiklenen karaciğer rejenerasyonu tetiklenmiş ve 6 farklı zaman diliminde (0, 6, 12, 24, 48, 72 saat) ubikutin yolağının rolü araştırılmıştır. RT-PCR array metodu kullanılarak ubikutin yolağına ait 88 genin ekspresyonları 8 referans gen ile değerlendirilmiştir. Çalışma modelimiz için en uygun 6 referans gen (GAPDH, ACTB, HPRT1, RPL13A, PPIA) genorm analiz programı ile belirlenmiştir. Elde edilen RT-PCR array sonuçlarından ekspresyonları yüksek olan 5 genin proteinleri (UBE2T, UBE2C, ANAPC2 BRCA1, BARD1) Western blot analizleri ile belirlenmiştir. Ayrıca karaciğer kesitlerinde ki67 immunohistokimya pozitif hücre sayısı ve karaciğer ağırlık oranları hesaplanarak rejenerasyon oranları saatlere göre (0, 6, 12, 24, 48, 72 saat) belirlenmiştir.

Elde edilen veriler değerlendirilmiştir. Karaciğer ağırlıklarına göre rejenerasyon oranı en yüksek PH72 saat grubu olarak belirlenmiştir. PH48 saat grubuna ait karaciğer kesitlerinde ki67pozitif hücre sayısının en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Literatüre benzer olarak PH sonrası 48. saatte rejenerasyonun en yüksek olduğu; ancak karaciğer ağırlığının 72. saatte artış gösterdiği sonucuna varılmıştır. RT-PCR array ve Western blot analizleri sonucunda karaciğer rejenerasyonu farklı sürelerinde (0, 6, 12, 24, 48, 72 saat) ubikutin yolağının hücre döngüsünün kontrolü, DNA onarımı, mitokondriyal fizyon, mitofaji gibi hücresel mekanizmalar ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir.

APC/C kompleksi hücre döngüsünün kontrolünde görevli bir Ubikutin E3 ligaz kompleksidir. Literatür taramalarında APC/C kompleksinin karaciğer rejenerasyonu sürecindeki rolü ile ilgili sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır ve etkisi henüz açıklanamamıştır. Çalışmamız ile APC/C kompleksi ilişkili bazı genlerin ifadesi ve protein miktarları PH modelinde farklı zaman noktalarında analiz edilmiştir. APC/C kompleksinin

katalitik alt birimlerini oluşturan ANAPC11 ve ANAPC2 gen ifadelerindeki farklılık ilginç bulunmuştur. Elde ettiğimiz ANAPC2, Cdc20 verileri incelendiğinde literatür ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Ancak karaciğer rejenerasyonu süresince ANAPC11 ile ilgili yeterli verinin olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda APC/C kompleksi katalitik alt birimlerinde gözlenen bu farklılık ANAPC11 ve ANAPC2 alt birimlerinin farklı mekanizmaların aktivasyonunda ayrı ayrı görev yapabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda ANAPC11'e benzer ekspresyon tablosu gösteren diğer genlerin varlığı; bu görüşü destekler niteliktedir. Mayalarda ANAPC11'in tek başına aktivite göstermesi (Leverson vd., 2000) de ANAPC2 ve ANAPC11'in ayrı ayrı farklı mekanizmalar üzerinde etki gösteriyor olması görüşümüzü desteklemektedir.

APC/C kompleksinin hücre onarım mekanizmalarının düzenlenmesi üzerine etkili olabileceğini gösteren literatürlere rastlanmıştır (Deng, 2006; Boer, vd., 2016b). Ancak APC/C kompleksi ile DNA onarım mekanizmaları arasındaki ilişki henüz açıklanamamıştır.

Çalışmamızda rejenerasyonun çeşitli saatlerinde aktif olduğu belirlenen BRCA1, BARD1, UBE2T genleri DNA onarım mekanizmalarıyla ilişkilidir (Wang and Xu, 2011). Çalışmamızda bu genlerin aktivasyonu, PH sonrası artan ROS ile ilişkilendirilmiştir. Çeşitli çalışmalarda DNA onarım mekanizmalarının, replikasyon stresine bağlı olarak da aktive olabileceğini ileri sürülmüştür (Cortés-Ledesma ve Aguilera, 2006). Karaciğer rejenerasyonu sürecinde DNA onarım mekanizmalarının niçin aktive olduğu henüz netlik kazanmamıştır. Çalışmamız bu mekanizmaların aydınlatılması yönünde literatüre önemli katkılar sağlamıştır.

Çalışmamızda ifadeleri incelenen Parkin, Arih1, Smurf1 genleri mitofaji ile ilişkilidir. Parkin, Parkin-aracılı mitofaji mekanizmasında; Arih-1 ve Smurf1 ise Parkin-aracısız mitofaji mekanizmalarında görev almaktadır (Montava-Garriga ve Ganley, 2019).. Çalışmamızla karaciğer rejenerasyonunda Arih-1 aracılı ve Parkin aracılı mitofaji yollarının aktif olmadığına ilişkin ilk veriler sunulmuştur.

Mul1, mitokondriyal dinamikler, mitofaji, hücre büyümesi, apoptoz gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynayan fonksiyonel mitokondriyal proteindir (Peng vd., 2016; Montava-Garriga ve Ganley, 2019). Çalışmamızda Mul1 gen ifadesi PH12 saatte meydana

gelen artışı, mitokondriyal fizyon ve parkin bağımsız mitofaji mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir. Karaciğer rejenerasyonu ile mitofaji ya da mitokondriyal fizyon ilişkisini açıklayan herhangi çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu olası ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışmadır.

UBA2 SUMOlasyonda görevli ilk enzimdir ve UBA5 ise UFMilasyonun ilk basamağını oluşturmaktadır. Çalışma sonuçlarımız, karaciğer rejenerasyonunun SUMO ve UFM mekanizmaları ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Karaciğer rejenerasyonunda SUMOlasyon ve UFMilasyon ilişkili mekanizmalar henüz bilinmemektedir. Bu alanda daha ileri çalışmalar gerçekleştirilebilir.

Sonuç olarak; karaciğer rejenerasyonunda ubikutin yolağının DNA onarımı (BRCA1, BARD1, UBE2T), hücre döngüsü (ANAPC2, ANAPC11, UBE2C, Cdc20), mitokondriyal fizyon (Mul1), mitofaji (Mul1) mekanizmalarında rolü olduğu rejenerasyonun 0, 6, 12, 24, 48, 72 saatlerine göre ortaya konmuştur. Çalışmamızın henüz bilinmeyen birçok hücresel mekanizmanın aydınlatılmasında yönünde yol gösterici olacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbas, T., Dutta, A., 2011, CRL4^{Cdt2}: Master coordinator of cell cycle progression and genome stability, *Cell Cycle*, 10(2), 241–249.
- Abbas, T., Keaton, M., Dutta, A. 2013, Regulation of TGF- β Signaling, Exit From the Cell Cycle, and Cellular Migration Through Cullin Cross- Regulation: SCF-FBXO11 turns off CRL4-Cdt2”, *Cell Cycle*, 12(14), 2175–2182.
- Abu Rmilah, A., Zhou, W., Nelson, E., 2019, Understanding the Marvels Behind Liver Regeneration, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 8(e340), 1–28. doi: 10.1002/wdev.340.
- Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R., 1995, p53 Controls Both the G2/M And The G1 Cell Cycle Checkpoints and Mediates Reversible Growth Arrest in Human Fibroblasts, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8493–8497.
- Albrecht, J. H., Poon, R. Y. C., Ahonen, C. L., Rieland, B. M., Deng, C., *vd.* 1998, Involvement of p21 and p27 in the Regulation of CDK Activity and Cell Cycle Progression in the Regenerating Liver, *Oncogene*, 16, 2141–2150.
- Alisi, A., Demori, I., Spagnuolo, S., Pierantozzi, E., Fugassa, E., *vd.* 2005, Thyroid Status Affects Rat Liver Regeneration After Partial Hepatectomy by Regulating Cell Cycle and Apoptosis Proteins, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 15, 69–76.
- Alizai, P. H., Bertram, L., Fragoulis, A., Wruck, C. J., Kroy, D. C., *vd.* 2016, in vivo Imaging of Antioxidant Response Element Activity During Liver Regeneration After Partial Hepatectomy, *Journal of Surgical Research*. Elsevier Inc, 2016(206), 525–535.
- Aller, M. A., Arias, N., Prieto, I., Agudo, S., Gilsanz *vd.*, 2012, A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research, *World Journal of Hepatology*, 4(7), 199–208.
- Alpi, A. F., Chaugule, V., Walden, H. 2016, Mechanism and Disease Association of E2-Conjugating Enzymes: Lessons from UBE2T and UBE2L3, *Biochemical Journal*, 473(20), 3401–3419.
- Antonioli, M., Albiero, F., Nazio, F., Vescovo, T., Perdomo, A. B., *vd.*, 2014, AMBRA1 Interplay with Cullin E3 Ubiquitin Ligases Regulates Autophagy Dynamics, *Developmental Cell*, 31(6), 734–746.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Arvand, A., Bastians, H., Welford, S. M., Thompson, A. D., Ruderman, J. V vd., 1998, EWS/FLI1 up Regulates mE2-C, a Cyclin-Selective Ubiquitin Conjugating Enzyme Involved in Cyclin B Destruction. *Oncogene*, 17(16), 2039–2045.
- Assy, N., Minuk, G. Y., 1997, Liver Regeneration : Methods for Monitoring and Their Applications, *Journal of Hepatology*, 26, 945–952.
- Aytekin, Y., Solakoğlu, S. ve Ahışalı, B. 1998, Temel Histoloji. Barış Kitabevi.
- Baer, R., Ludwig, T., 2002, The BRCA1/BARD1 Heterodimer, a Tumor Suppressor Complex with Ubiquitin E3 Ligase Activity, *Current Opinion in Genetics and Development*, 12(1), 86–91.
- Bai, Y., Yang, C., Hu, K., Elly, C., Liu, Y.-C., 2004, Itch E3 Ligase-Mediated Regulation of TGF- β Signaling by Modulating Smad2 Phosphorylation, *Molecular Cell*, 15(5), 825–831.
- Balta, G., Gümruk, F., Altay, Ç., 2003, Fankoni Anemisinin Genetik ve Moleküler Temelleri, 308–316.
- Bao, J., Shi, Y., Sun, H., Yin, X., Yang, R., vd., 2011, Construction of a portal implantable functional tissue-engineered liver using perfusion-decellularized matrix and hepatocytes in rats, *Cell Transplantation*, 20(5), 753–766.
- Barford, D. 2011, Structure, function and mechanism of the anaphase promoting complex (APC/C), *Quarterly Reviews of Biophysics*, 44(2), 153-190
- Beldüz A.O., 2014, Temel Moleküler Biyoloji, Palme Yayıncılık
- Bhattacharya, S., Garriga, J., Calbó, J., Yong, T., Haines, D. S., vd., 2003, SKP2 Associates with P130 and Accelerates P130 Ubiquitylation and Degradation in Human Cells, *Oncogene*, 22(16), 2443–2451.
- Blank, M., Tang, Y., Yamashita, M., Burkett, S. S., Cheng, S. Y., vd., 2012, A Tumor Suppressor Function of Smurf2 Associated with Controlling Chromatin Landscape and Genome Stability through RNF20, *Nature Medicine*, 18(2), 227–234.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Boer, H. R. De, Guerrero, S., Marcel, L. 2016a, Erratum to : Controlling the Response to DNA Damage by the APC /C-Cdh1, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(15), 2985–2998.
- Boer, H. R. De, Guerrero, S., Marcel, L. 2016b, Controlling the Response to DNA Damage by the APC/C-Cdh1, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73:949–960
- Bond, M., Wu, Y. J., 2011, Proliferation Unleashed: The Role of Skp2 in Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation, *Frontiers in Bioscience*, 16, 1517–1535.
- Borude, P., Bhushan, B., Apte, U., 2018, DNA Damage Response Regulates Initiation of Liver Regeneration Following Acetaminophen Overdose, *Gene Expression*, 18(2), 115–123.
- Bosu, D. R., Kipreos, E. T., 2008, Cullin-RING Ubiquitin Ligases: Global Regulation and Activation Cycles, *Cell Division*, 3, 1–13.
- Bounoutas, A., Zheng, Q., Nonet, M. L., Chalfie, M., 2009, mec-15 Encodes An F-Box Protein Required for Touch Receptor Neuron Mechanosensation, Synapse Formation and Development, *Genetics*, 183(2), 607–617.
- Branzei, D., Foiani, M. 2005, The DNA Damage Response During DNA Replication”, *Current Opinion in Cell Biology*, 17(6), 568–575.
- Brodie, K. M., Henderson, B. R., 2010, Differential modulation of BRCA1 and BARD1 nuclear localisation and foci assembly by DNA damage, *Cellular Signalling*, 22(2), 291–302.
- Bruinsma, C. F., Savelberg, S. M. C., Kool, M. J., Jolfaei, M. A., Van Woerden, G. M., *vd.*, 2016, An Essential Role for UBE2A/HR6A in Learning and Memory and mGLUR-Dependent Long-Term Depression, *Human Molecular Genetics*, 25(1), 1–8.
- Bruno, S., Darzynkiewicz, Z., 1992, Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells, *Cell Proliferation*, 25, 31-40.
- Caestecker, K. W., Van de Walle, G. R. 2013, The role of BRCA1 in DNA Double-Strand Repair: Past and Present, *Experimental Cell Research*, 319(5), 575–587.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Campbell, S. J., Edwards, R. A., Leung, C. C. Y., Neculai, D., Hodge, C. D., *vd.* 2012, Molecular Insights into the Function of RING Finger (RNF)-Containing Proteins hRNF8 and hRNF168 in Ubc13/Mms2-Dependent Ubiquitylation, *Journal of Biological Chemistry*, 287(28), 23900–23910.
- Cang, Y., Zhang, J., Nicholas, S. A., Bastien, J., Li, B., *vd.*, 2006, Deletion of DDB1 in Mouse Brain and Lens Leads to p53-Dependent Elimination of Proliferating Cells, *Cell*, 127(5), 929–940.
- Cao, Y., Zhang, L., 2013, A Smurf1 tale: Function and Regulation of an Ubiquitin Ligase in Multiple Cellular Networks, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(13), 2305–2317.
- Ceccaldi, R., Sarangi, P. ve D’Andrea, A. D., 2016, The Fanconi Anaemia Pathway: New Players and New Functions, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(6), 337–349.
- Chan, C. H., Lee, S. W., Wang, J., 2010, Regulation of Skp2 Expression and Activity and Its Role in Cancer Progression, *TheScientificWorldJournal*, 10, 1001–1015.
- Chang, R., Wei, L., Lu, Y., Cui, X., Lu, C., *vd.*, 2015, Upregulated Expression of Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2Q1 (UBE2Q1) is Associated with Enhanced Cell Proliferation and Poor Prognosis in Human Hepatocellular Carcinoma, *Journal of Molecular Histology*, 46(1), 45–56.
- Chapman, J. R., Taylor, M. R. G., Boulton, S. J., 2012, Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice, *Cell Press Molecular Cell*, 47(4), 497–510.
- Chauhan, A., Lorenzen, S., Herzel, H., 2011, Regulation of Mammalian Cell Cycle Progression in the Regenerating Liver”, *Journal of Theoretical Biology*, 283(1), 103–112.
- Chen, H.-Y., Chen, R.-H. 2016, Cullin 3 Ubiquitin Ligases in Cancer Biology: Functions and Therapeutic Implications, *Frontiers in Oncology*, 6(113), 1-10
- Chen, S., Tan, Y., Deng, H., Shen, Z., Liu, Y., *vd.* 2017, “UBE2J2 Promotes Hepatocellular Carcinoma Cell Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasion *in vitro*”, *Oncotarget*, 8(42), 71736–71749.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, X., Zhang, Y., Douglas, L., Zhou, P., 2001, UV-damaged DNA-binding Proteins are Targets of CUL-4A-mediated Ubiquitination and Degradation, *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 48175–48182.
- Chen, Y., Neve, R. L., Liu, H., 2012, Neddylation Dysfunction in Alzheimer's Disease, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(11), 2583–2591.
- Chen, S., Zheng, J., Hao, Q., Yang, S., Wang, J., vd., 2010. p53-Insensitive PUMA Down-Regulation is Essential in the Early Phase of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice. *Journal of Hepatology*, 52, 864–71.
- Chen, Z., Sui, J., Zhang, F., 2015, Cullin Family Proteins and Tumorigenesis: Genetic Association and Molecular Mechanisms, *Journal of Cancer*, 6(3), 233–242.
- Chène, P. 2003, Inhibiting the p53-MDM2 Interaction: an Important Target for Cancer Therapy, *Nature Reviews Cancer*, 3(2), 102–109.
- Cheng, J., Guo, J., Wang, Z., North, B. J., Tao, K., vd. 2018, Functional analysis of Cullin3 E3 ligases in tumorigenesis, *Biochimica et Biophysica Acta- Reviews on Cancer*, 1869(1), 11–28.
- Cheng, R., Lianga, X., Zhaoa, Q, Lian Z, Tang, L., vd., 2017, APC^{Cdh1} Controls Cell Cycle Entry During Liver Regeneration, *Experimental Cell Research* 354: 78–84.
- Cheung, K. F., Lam, C. N. Y., Wu, K., Ng, E. K. O., Chong, W. W. S., vd. 2012, Characterization of the Gene Structure, Functional Significance, and Clinical Application of RNF180, a Novel Gene in Gastric Cancer, *Cancer*, 118(4), 947–959.
- Cheung, R. S., Taniguchi, T. 2017, Recent Insights into the Molecular Basis of Fanconi Anemia: Genes, Modifiers, and Drivers, *International Journal of Hematology*, 106(3), 335–344.
- Chou, J. L., Su, H. Y., Chen, L. Y., Liao, Y. P., Hartman-Frey, C., vd. 2010, Promoter Hypermethylation of FBXO32, a Novel TGF-B/SMAD4 Target Gene and Tumor Suppressor, is Associated with Poor Prognosis in human Ovarian Cancer, *Laboratory Investigation*, 90(3), 414–425.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chu, X., Zhang, T., Wang, J., Li, M., Zhang, X., *vd.* 2014, Alternative Splicing Variants of Human Fbx4 Disturb Cyclin D1 Proteolysis in Human Cancer, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 447(1), 158–164.
- Ciechanover, A. 1998, The ubiquitin proteasome pathway : on protein death and cell life, *The EMBO Journal*, 17(24), 7151–7160.
- Cooper G. M., Hausman R. E., 2014, *Hücre moleküler Yaklaşım*, İzmir Tıp Kitapevi Üçüncü Baskı.
- Cortés-Ledesma, F., Aguilera, A., 2006, Double-Strand Breaks Arising by Replication Through a Nick are Repaired by Cohesin-Dependent Sister-Chromatid Exchange, *EMBO Reports*, 7(9), 919–926.
- Costes, A. ve Lambert, S. A. E. 2013, Homologous Recombination as a Replication Fork Escort:Fork-protection and Recovery, *Biomolecules*, 3(1), 39–71.
- Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A. Z., Muller-Reichert, T., Neumann, B., *vd.*, 2016, Ki-67 Acts as a Biological Surfactant to Disperse Mitotic Chromosomes, *Nature*, 535, 308-315.
- Cyr, D. M., Höhfeld, J., Patterson, C., 2002, Protein Quality Control: U-box-Containing E3 Ubiquitin Ligases Join the Fold, *Trends in Biochemical Sciences*, 27(7), 368–375.
- Daza-Martin, M., Starowicz, K., Jamshad, M., Tye, S., Ronson, G. E., *vd.* 2019, Isomerization of BRCA1–BARD1 Promotes Replication Fork Protection, *Nature*, 571(7766), 521–527.
- Demir, R. 2006, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. Ankara: Palme Yayıncılık.
- Deng, C. X. 2002, Roles of BRCA1 in centrosome duplication, *Oncogene*, 21, 6222–6227.
- Deng, C. X. 2006, BRCA1: Cell Cycle Checkpoint, Genetic Instability, DNA Damage Response And Cancer Evolution, *Nucleic Acids Research*, 34(5), 1416–1426.
- Deng, J., Liang, H., Zhang, R., Hou, Y., Liu, Y., *vd.* 2016, Clinical and Experimental Role of Ring Finger Protein 180 on Lymph Node Metastasis and Survival in Gastric Cancer, *British Journal of Surgery*, 103(4), 407–416.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Deshaies, R. J., Joazeiro, C. A. P. 2009, RING Domain E3 Ubiquitin Ligases, Annual Review of Biochemistry, 78, 399–434.
- Deshar, R., Moon, S., Yoo, W., Cho, E. B., Yoon, S. K., *vd.* 2016, RNF167 Targets Arl8B for Degradation to Regulate Lysosome Positioning And Endocytic Trafficking, FEBS Journal, 283(24), 4583–4599.
- Di Bacco, A., Gill, G., 2006, SUMO-Specific Proteases and the Cell Cycle: an Essential Role for SENP5 in Cell Proliferation, Cell Cycle, 5(20), 2310–2313.
- Dilek, O. N. 2003, Karaciğer. Afyon Kocatepe Üniversitesi Klinik Tıp Kitapları Serisi.
- Dong, Y., Hakimi, M.-A., Chen, X., Kumaraswamy, E., Cooch, N. S., *vd.*, 2003, Regulation of BRCC, a Holoenzyme Complex Containing BRCA1 and BRCA2, by a Signalosome-like Subunit and Its Role in DNA Repair. Molecular Cell, 12(5), 1087–1099.
- Dubiel, W., Dubiel, D., Wolf, D. A., Naumann, M. 2018, Cullin 3-Based Ubiquitin Ligases as Master Regulators of Mammalian Cell Differentiation, Trends in Biochemical Sciences, 43(2), 95–107.
- Duda, D. M., Scott, D. C., Calabrese, M. F., Zimmerman, E. S., Zheng, N., *vd.* 2011, Structural Regulation of Cullin-RING Ubiquitin Ligase Complexes, Current Opinion in Structural Biology, 21(2), 257–264.
- Duguez, S., Féasson, L., Denis, C. Freyssenet, D. 2002, Mitochondrial Biogenesis During Skeletal Muscle Regeneration, American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 282(4 45-4), 802–809.
- Ehrenfried, J. A., Ko, T. C., Thompson, E. A., 1997, Cell Cycle-Mediated Regulation Of Hepatic Regeneration, Surgery, 122(5), 927–935.
- Eifler, K., Vertegaal, A. C. O., 2015, SUMOylation-Mediated Regulation of Cell Cycle Progression and Cancer, Trends in Biochemical Sciences, 40(12), 779–793.
- Elmehdawi, F., Wheway, G., Szymanska, K., Adams, M., High, A. S., *vd.* 2013, Human Homolog of Drosophila Ariadne (HHARI) is a marker of cellular proliferation associated with nuclear bodies, Experimental Cell Research, 319(3), 161–172.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Emanuele, M. J., Enrico, T. P. 2019, Ubiquitin Signaling in Regulation of the Start of the Cell Cycle, içinde Ubiquitin Proteasome System - Current Insights into Mechanism Cellular Regulation and Disease 1, 13.
- Fabbro, M., Savage, K., Hobson, K., Deans, A. J., Powell, S. N., *vd.* 2004, BRCA1-BARD1 Complexes are Required for P53Ser-15 Phosphorylation and a G1/S Arrest Following Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31251–31258.
- Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J. P., Tiwari, S., *vd.* 2001, The Tumor Autocrine Motility Factor Receptor, gp78, is a Ubiquitin Protein Ligase Implicated in Degradation from the Endoplasmic Reticulum, *Journal of Biological Chemistry*, 98(25), 14422–14427.
- Fang, S., Lorick, K. L., Jensen, J. P. ve Weissman, A. M. 2003, RING Finger Ubiquitin Protein Ligases: Implications for Tumorigenesis, Metastasis and for Molecular Targets in Cancer, *Seminars in Cancer Biology*, 13(1), 5–14.
- Fang, Z., Pan, Z. 2019, Essential Role of Ubiquitin-Fold Modifier 1 Conjugation in DNA Damage Response, *DNA and Cell Biology*, 38(10), 1030–1039.
- Fausto, N. 2000, Liver regeneration, *Journal of Hepatology*, 32, 19–31.
- Feng, H., Zhong, W., Punkosdy, G., Gu, S., Zhou, L., *vd.* 1999, CUL-2 is Required for the G1-to-S-phase Transition and Mitotic Chromosome Condensation in *Caenorhabditis elegans*, *Nature Cell Biology*, 486–492.
- Feng, L., Allen, N. S., Simo, S., Cooper, J. A. 2007, “Cullin 5 Regulates Dab1 Protein Levels and Neuron Positioning during Cortical Development”, *Genes and Development*, 21(21), 2717–2730.
- Ferecatu, I., Canal, F., Fabbri, L., Mazure, N. M., Bouton, C., *vd.* 2018, Dysfunction in the Mitochondrial Fe-S Assembly Machinery Leads to Formation of the Chemoresistant Truncated VDAC1 Isoform without HIF-1 α Activation, *PLoS ONE*, 13(3), 1–21.
- Ferri, D., Moro, L., Mastrodonato, M., Capuano, F., Marra, E *vd.*, 2005, Ultrastructural Zonal Heterogeneity of Hepatocytes and Mitochondria Within the Hepatic Acinus During Liver Regeneration after Partial Hepatectomy, *Biology of the Cell*, 97(4), 277–288.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fernandes, K. A., Harder, J. M., Kim, J., Libby, R. T. 2013, JUN Regulates Early Transcriptional Responses To Axonal Injury in Retinal Ganglion Cells, *Experimental Eye Research*, 112, 106–117.
- Fiesel, F. C., Moussaud-Lamodière, E. L., Ando, M., Springer, W. 2014, A Specific Subset of E2 Ubiquitin-Conjugating Enzymes Regulate Parkin Activation and Mitophagy Differently, *Journal of Cell Science*, 127, 3488–504.
- Fujimoto, A., Totoki, Y., Abe, T., Borojevich, K. A., Hosoda, F., *vd.* 2012, Whole-Genome Sequencing of Liver Cancers Identifies Etiological Influences on Mutation Patterns and Recurrent Mutations in Chromatin Regulators, *Nature Genetics*, 44(7), 760–764.
- Fukuda, T., Tsuruga, T., Kuroda, T., Takeuchi, J., Wu, W., *vd.* 2016, The BARD1/HP1 Interaction: Another Clue to Heterochromatin Involvement in Homologous Recombination, *Molecular and Cellular Oncology*, 3(2), e1030535-1- e1030535-3.
- Furrer, K., Tian, Y., Pfammatter, T., Jochum, W., El-Badry, A. M., *vd.*, 2008, Selective Portal Vein Embolization and Ligation Trigger Different Regenerative Responses in the Rat Liver, *Hepatology*, 47(5), 1615–1623.
- Furukawa, M., Xiong, Y. 2004, BTB Protein Keap1 Targets Antioxidant Transcription Factor Nrf2 for Ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 Ligase, *Molecular and Cellular Biology*, 25(1), 162–171.
- Galves, M., Rathi, R., Prag, G., 2019, Ubiquitin Signaling and Degradation of Aggregate-Prone Proteins, *Cell Press Trends in Biochemical Sciences*, 1–13.
- Gao, X., Wang, W., Yang, H., Wu, L., He, Z., *vd.* 2016, UBE2D3 Gene Overexpression Increases Radiosensitivity of EC109 Esophageal Cancer Cells in vitro and in vivo, *Oncotarget*, 32543–32553.
- Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M. S., Timmers, C., *vd.* 2001, Interaction of the Fanconi Anemia Proteins and BRCA1 in a Common Pathway, *Molecular Cell*, 7(2), 249–262.
- García-Rodríguez, N., Wong, R. P., Ulrich, H. D. 2018, The Helicase Pif1 Functions in the Template Switching Pathway of DNA Damage Bypass, *Nucleic Acids Research*, 46(16), 8347–8356.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Geisler, S., Vollmer, S., Golombek, S., Kahle, P. J. 2014, The Ubiquitin-Conjugating Enzymes UBE2N, UBE2L3 and UBE2D2/3 are Essential for Parkin-Dependent Mitophagy, *Journal of Cell Science*, 127(15), 3280–3293.
- Gerlach, C., Sakkab, D. Y., Scholzen, T., Daßler, R., Alison, M. R., vd., 1997, Ki-67 Expression During Rat Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *Hepatology*, 26(3), 573–578.
- Gmachl, M., Gieffers, C., Podtelejnikov, A. V., 2000, The RING-H2 Finger Protein APC11 and the E2 Enzyme UBC4 are Sufficient to Ubiquitinate Substrates of the Anaphase-Promoting Complex, *PNAS*, 97(16), 8973–8978.
- Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., 2001, Atrogin-1, a Muscle-Specific F-Box Protein Highly Expressed During Muscle Atrophy, *PNAS*, 98(25), 1–6.
- Guerrieri, F., Muolo, L., Cocco, T., Capozza, G., Turturro, N. vd., 1995, Correlation between Rat Liver Regeneration and Mitochondrial Energy Metabolism, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1272 (1995) 95-100
- Guerrieri, F., Vendemiale, G., Grattagliano, I., Cocco, T., Pellecchia, G vd., 1999, Mitochondrial Oxidative Alterations Following Partial Hepatectomy, *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1-2), 34–41.
- Gui, Y., Yeganeh, M., Ramanathan, S., Leblanc, C., Pomerleau, V., vd. 2011, SOCS1 Controls Liver Regeneration by Regulating HGF Signaling in Hepatocytes, *Journal of Hepatology*, 55(6), 1300–1308.
- Gul, M., Cömert, M., Karadeniz, G., Kertis, G., Ugurbas, E. vd., 2013, Effect of Erythropoietin on Liver Regeneration in an Experimental Model of Partial Hepatectomy, *International Journal of Surgery*, 11(1), 59–63.
- Guo, W., Zhang, M., Shen, S., Guo, Y., Kuang, G., vd. 2014, Aberrant Methylation and Decreased Expression of the TGF-B/Smad Target Gene FBXO32 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma, *Cancer*, 120(16), 2412–2423.
- Han, S. M., Baig, H. S., Hammarlund, M. 2016, Mitochondria Localize to Injured Axons to Support Regeneration, *Neuron*, 92(6), 1308–1323.
- He, P., Sun, X., Cheng, H. J., Zou, Y. Bin, Wang, Q., vd. 2018, UBA2 Promotes Proliferation of Colorectal Cancer, *Molecular Medicine Reports*, 18(6), 5552–5562.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hedglin, M., Benkovic, S. J. 2015, Regulation of Rad6/Rad18 Activity During DNA Damage Tolerance, *Annual Review of Biophysics*, 44, 207–228.
- Heo, J., Eki, R., Abbas, T., 2016, Deregulation of F-box Proteins and Its Consequence on Cancer Development, Progression and Metastasis, *Seminars in Cancer Biology*, 36, 33–51.
- Herrmann, J., Lerman, L. O., Lerman, A. 2007, Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in Protein Regulation, *Circulation Research*, 100, 1276-1291.
- Hershko, A. 1997, Roles of Ubiquitin-Mediated Proteolysis in Cell Cycle Control, *Current Opinion in Cell Biology*, 9, 788–799.
- Higgins G. M., Anderson R. M., 1931, Experimental pathology of the liver –Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Archive Pathology.*;12:186-202
- Hira, A., Yoshida, K., Sato, K., Okuno, Y., Shiraiishi, Y., *vd.* 2015, Mutations in the Gene Encoding the E2 Conjugating Enzyme UBE2T Cause Fanconi Anemia, *The American Journal of Human Genetics*, 96(6), 1001–1007.
- Holmberg, C., Fleck, O., Hansen, H. A., Liu, C., Slaaby, R., *vd.* 2005, Ddb1 Controls Genome Stability and Meiosis in Fission Yeast, *Genes and Development*, 19(7), 853–862.
- Hosseini, S. M., Okoye, I., Chaleshtari, M. G., Hazhirkarzar, B., Mohamadnejad, J., *vd.*, 2019, E2 Ubiquitin-Conjugating Enzymes in Cancer: Implications for Immunotherapeutic Interventions, *Clinica Chimica Acta*, 498, 126–134.
- Hu, W., Nevzorova, Y. A., Haas, U., *vd.*, 2014. Concurrent deletion of cyclin E1 and cyclin-dependent kinase 2 in hepatocytes inhibits DNA replication and liver regeneration in mice, *Hepatology*, 59(2), 651–660.
- Hu, W., Xiao, L., Cao, C., 2016, UBE2T Promotes Nasopharyngeal Carcinoma Cell Proliferation, Invasion, and Metastasis by Activating the AKT/GSK β / β -Catenin Pathway, *Oncotarget*, 7(12), 15161–15172.
- Hua, Z., Vierstra, R. D. 2011, The Cullin-RING Ubiquitin-Protein Ligases, *Annual Review of Plant Biology*, 62, 299–334.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huo, T., Canepa, R., Sura, A., 2017, Colorectal Cancer Stages Transcriptome Analysis, PLoS ONE, 12(11), 1–11.
- Ihara, Y., Morishima-Kawashima, M. ve Nixon, R. 2012, The Ubiquitin–Proteasome System and the Autophagic-Lysosomal System in Alzheimer Disease, Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine, 2(a006361), 1-27.
- Irminger-Finger, I., Ratajska, M., Pilyugin, M. 2016, New Concepts on BARD1: Regulator of BRCA Pathways and Beyond, International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 72, 1–17.
- Jeong, Jin S., Lee, J. H., Kim, H. I., 1999, Changes in Expression of cell Cycle Regulators and Their Hepatic Lobular Distribution in Partial Hepatectomy-Induced Regenerating Rat Liver, Journal of Korean Medical Sciences, 14, 635–42.
- Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., 2008, Mechanism of Ubiquitin-Chain Formation by the Human Anaphase-Promoting Complex, Cell, 133(4), 653–665.
- Jones, M. J. K., Huang, T. T. 2012, The Fanconi Anemia Pathway in Replication Stress and DNA Crosslink Repair, Cellular and Molecular Life Sciences, 69(23), 3963–3974.
- Kais, Z., Parvin, J. D. 2008, Regulation of Centrosomes by the BRCA1-Dependent Ubiquitin Ligase, Cancer Biology and Therapy, 7(10), 1540–1543.
- Karimian, A., Ahmadi, Y., Yousefi, B., 2016, Multiple Functions of p21 in Cell Cycle, Apoptosis and Transcriptional Regulation after DNA Damage, DNA Repair, 42, 63–71.
- Karras, G. I., Jentsch, S. 2010, The RAD6 DNA Damage Tolerance Pathway Operates Uncoupled from the Replication Fork and is Functional Beyond S Phase, Cell, 141(2), 255–267.
- Kastan, M. B., Canman, C. E. Leonard, C. J. 1995, P53, Cell Cycle Control and Apoptosis: Implications for Cancer, Cancer and Metastasis Reviews, 14(1), 3–15.
- Kato, A., Ota, S., Bamba, H., Wong, R. M., Ohmura, E., *vd.* 1998, Regulation of Cyclin D-Dependent Kinase Activity in Rat Liver Regeneration, Biochemical and Biophysical Research Communications 74(245), 70–74.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kernan, J., Bonacci, T., Emanuele, M. J., 2018, Who Guards the Guardian? Mechanisms that Restrain APC/C During the Cell Cycle, *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research*, 1865(12), 1924–1933.
- Krishnan, V., Tay, L.S., Ito, Y., 2016, The Fanconi Anemia Pathway of DNA Repair and Human Cancer, e-kitap, 255-289,
https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=_mmQDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA255&dq=The+Fanconi+Anemia+Pathway+of+DNA+Repair+and+Human+Cancer&ots=7-rv1SmevA&sig=v15U0nUTS0WkmWMyfAvsiVOg_SU&redir_esc=y#v=onepage&q=The%20Fanconi%20Anemia%20Pathway%20of%20DNA%20Repair%20and%20Human%20Cancer&f=false, erişim tarihi:20.04.2020.
- Kim, J.-H., Lee, K.-S., Lee, D.-K., Kim, J., Kwak, S.-N., *vd.* 2014, Hypoxia-Responsive MicroRNA-101 Promotes Angiogenesis via Heme Oxygenase-1/Vascular Endothelial Growth Factor Axis by Targeting Cullin 3, *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(18), 2469–2482.
- Kim, T. H., Mars, W. M., Stolz, D. B., 1997, Extracellular Matrix Remodeling at the Early Stages of Liver Regeneration in the Rat, *Hepatology*, 26(4), 896–904.
- Kipreos, E. T., Pagano, M., 2000, The F-box protein family, *Genome Biology*, 1(5), 1–7.
- Kitagawa, K., Kitagawa, M., 2016, The SCF-Type E3 Ubiquitin Ligases as Cancer Targets, *Current Cancer Drug Targets*, 16(2), 119–129.
- Koepp, DM., Harper, JW., Elledge, SJ., 1999, How the Cyclin Became a Cyclin: Regulated Proteolysis in the Cell Cycle, *Cell*, 97, 431-434.
- Koganti, P., Levy-Cohen, G., Blank, M., 2018, Smurfs in Protein Homeostasis, Signaling, and Cancer, *Frontiers in Oncology*, 8(295), 1–11.
- Kogure, K., Zhang, Y., Shibata, H., 1998, Immediate onset of DNA synthesis in remnant rat liver after 90% hepatectomy by an administration of follistatin, 29, 977–984.
- Koken, M. H. M., Hoogerbrugge, J. W., Jaspers-Dekker, I., de Wit, J., Willemsen, R., *vd.* 1996, Expression of the Ubiquitin-Conjugating DNA Repair Enzymes HHR6A and Suggests a Role in Spermatogenesis and Chromatin Modification, *Developmental Biology*, 173, 119–132.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Komander, D., Rape, M. 2012, The Ubiquitin Code, *Annual Review of Biochemistry*, 81, 203–229.
- Komori, Y., Iwashita, Y. Ohta, M., Yuichiro, K., Masafumi, I., vd., 2014, Effects of Different Pressure Levels of CO₂ Pneumoperitoneum on Liver Regeneration after Liver Resection in a Rat Model, *Surgical Endoscopy*, 28, 2466–2473.
- Kondo, K., Kaelin, W. G. 2001, The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene, *Experimental Cell Research*, 264, 117–125.
- Kumar, P., Magala, P., Geiger-Schuller, K. R., Majumdar, A., Tolman, J. R., vd. 2015, Role of a Non-Canonical Surface of Rad6 in Ubiquitin Conjugating Activity, *Nucleic Acids Research*. Narnia, 43(18), 9039–9050.
- Kurinna, S., Barton, M. C. 2011, Cascades of Transcription Regulation During Liver Regeneration., *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(2), 189–97.
- Kurtoğlu, E. L., Tekedereli, İ. 2001, DNA Onarım Mekanizmaları, *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4(3), 169-177.
- Kwon, Y. T., Ciechanover, A., 2017, The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy, *Trends in Biochemical Sciences*, 42(11), 873–886.
- Lam, S. Y., Murphy, C., Foley, L. A., Ross, S. A., Wang, T. C., vd. 2014, The Human Ubiquitin Conjugating Enzyme UBE2J2 (Ubc6) is a Substrate for Proteasomal Degradation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451(3), 361–366.
- Lamsoul, I., Uttenweiler-Joseph, S., Moog-Lutz, C., 2016, Cullin 5-RING E3 Ubiquitin Ligases, New Therapeutic Targets?, *Biochimie*, 122, 339–347.
- Lavie, J., De Belvalet, H., Sonon, S., Ion, A M., Dumon, E vd., 2018, Ubiquitin-Dependent Degradation of Mitochondrial Proteins Regulates Energy Metabolism, *Cell Reports*, 23 (10) 2852-2863.
- Lee, J. C., Peter, M. E., 2003, Regulation of Apoptosis by Ubiquitination, 193, 39–47.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lee, J., Zhou, P. 2007, DCAFs, the Missing Link of the CUL4-DDB1 Ubiquitin Ligase, *Molecular Cell*, 26(6), 775–780.
- Lee, L., Oliva, A. B. P., Churikov, D., Martinez-Balsalobr, E., Joshua Peter, *vd.* 2019, UFMylation of MRE11 is Essential for Maintenance of Telomere Length and Hematopoietic Stem Cell Survival, *.biorxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/846477>
- Lee, M. S., Lee, S. O., Lee, M. K., Yi, G. S., Lee, C. K., *vd.* 2019, Solution Structure of MUL1-RING Domain and its Interaction with P53 Transactivation Domain, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 516(2), 533–539.
- Lehmann, K., Tschuor, C., Rickenbacher, A., Jang, J. H., Oberkofler, C. E., *vd.*, 2012, Liver Failure after Extended Hepatectomy in Mice is Mediated by a p21-Dependent Barrier to Liver Regeneration. *Gastroenterology*, 143(6), 1609-1619.e4.
- Lemasters, J. J. 2005, Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Rejuvenation Research*, 8(1), 3–5.
- Leonidas G. K., HMcKillop, I., Schwartz, 2003, *Liver Regeneration*, 197, 4, 634-659.
- Leverson, J. D., Joazeiro, C. A. P., Page, A. M., Huang, H. K., Hieter, P., *vd.* 2000, The APC11 RING-H2 Finger Mediates E2-Dependent Ubiquitination, *Molecular Biology of the Cell*, 11(7), 2315–2325.
- Li, C., Chu, H., Yang, C., 2009, Aurora-A Overexpression in Mouse Liver Causes p53-Dependent Premitotic Arrest during Liver Regeneration, *Molecular Cancer Research*, 7 (5), 678–689.
- Li, H., Zhu, H., Liu, Y., He, F., Xie, P., *vd.*, 2016, Itch Promotes the Neddylation of JunB and Regulates JunB-dependent Transcription, *Cellular Signalling*, 28(9), 1186–1195.
- Li, Y., Zhou, Z., Chen, C. 2008, WW domain-containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 Targets p63 Transcription Factor for Ubiquitin-Mediated Proteasomal Degradation and Regulates Apoptosis, *Cell Death & Differentiation*. 15(12), 1941–1951.
- Liang, C. C., Zhan, B., Yoshikawa, Y., Haas, W., Gygi, S. P., *vd.* 2015, UHRF1 is a Sensor for DNA Interstrand Crosslinks and Recruits FANCD2 to Initiate the Fanconi Anemia Pathway, *Cell Reports*, 10(12), 1947–1956.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liao, B., Zhong, X., Xu, H., Xiao, F., Fang, Z., *vd.* 2013, Itch, an E3 Ligase of Oct4, is Required for Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Pluripotency Induction, *Journal of Cellular Physiology*, 228(7), 1443–1451.
- Liao, Y., Shikapwashya, O. N., Shteyer, E., Dieckgraefe, B. K., Hruz, P. W., *vd.*, 2004, Delayed Hepatocellular Mitotic Progression and Impaired Liver Regeneration in Early Growth Response-1-deficient Mice, *The Journal Of Biological Chemistry*, 279(41), 43107–43116.
- Lin, D. I., Barbash, O., Kumar, K. G. S., Weber, J. D., Harper, J. W., *vd.* 2006, Phosphorylation-Dependent Ubiquitination of Cyclin D1 by the SCF^{FBX4- α B Crystallin} Complex, *Molecular Cell*, 24(3), 355–366.
- Liu, F., Walters, K. J. 2010, Multitasking with Ubiquitin through Multivalent Interactions, *Trends in Biochemical Sciences*, 35(6), 352–360.
- Liu, H., Gong, M., French, B. A., Liao, G., Li, J., *vd.* 2015, Aberrant Modulation of the BRCA1 and G1/S Cell Cycle Pathways in Alcoholic Hepatitis Patients with Mallory Denk Bodies Revealed by RNA Sequencing, *Oncotarget*, 6(40), 42491–42503.
- Liu, L. L., Zhu, J. M., Yu, X. N., Zhu, H. R., Shi, X., *vd.*, 2019, UBE2T Promotes Proliferation via G2/M Checkpoint in Hepatocellular Carcinoma, *Cancer Management and Research*, 11, 8359–8370.
- Liu, L., Zhang, Y., Wong, C. C., Zhang, J., Dong, Y., *vd.* 2018, RNF6 Promotes Colorectal Cancer by Activating the Wnt/b-catenin Pathway via Ubiquitination of TLE3, *Cancer Research*, 78(8), 1958–1971.
- Liu, X., Sun, L., Gursel, D. B., Cheng, C., Huang, S., *vd.* 2017, The Non-Canonical Ubiquitin Activating Enzyme UBA6 Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition of Mammary Epithelial Cells, *Oncotarget*, 8(50), 87480–87493.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method, 25, 402–408.
- Lu, G., Weng, S., Matyskiela, M., Zheng, X., Fang, W., *vd.* 2018, UBE2G1 governs the destruction of cereblon neomorphic substrates, *eLife*, 7, 1–24.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ma, C., Qi, Y., Shao, L., Liu, M., Li, X., vd. 2013, Downregulation of miR-7 Upregulates Cullin 5 (CUL5) to facilitate G1/S Transition in Human Hepatocellular Carcinoma Cells, *IUBMB Life*, 65(12), 1026–1034.
- Ma, R., Kang, X., Zhang, G., Fang, F., Du, Y., vd., 2016, High Expression Of UBE2C is Associated with the Aggressive Progression and Poor Outcome of Malignant Glioma, *Oncology Letters*, 11(3) 2300-2304.
- Macleod, K. F. 2020, Mitophagy and Mitochondrial Dysfunction in Cancer, *Annual Review of Cancer Biology*, 41–60.
- Madura, K., Prakash, S., Prakash, L. 1990, Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA Repair Gene RAD6 that Encodes a Ubiquitin Conjugating Enzyme, Increases in Response to DNA Damage and in Meiosis but Remains Constant During the Mitotic Cell Cycle, *Nucleic Acids Research*, 18(4), 771–778.
- Mahrour, N., Redwine, W. B., Florens, L., Swanson, S. K., Martin-Brown, S., vd. 2008, Characterization of Cullin-Box Sequences that Direct Recruitment of Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 Modules To Elongin BC-Based Ubiquitin Ligases, *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 8005–8013.
- Malarkey, D. E., Johnson, K., Ryan, L., 2005, New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology, *Toxicologic Pathology*, 33(1), 27–34.
- Malumbres, M., Barbacid, M. 2009, Cell cycle, CDKs and Cancer: a Changing Paradigm, *Nature Reviews Cancer*, 9, 153-166
- Mani, A., Gelmann, E. P. 2005, The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Its Role in Cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 23(21), 4776–4789.
- Mao, S. A., Glorioso, J. M., Nyberg, S. L. 2014, Liver regeneration, *Translational Research*, 163(4), 352–362.
- Matot, I., Nachmansson, N., Duev, O., Schulz, S., Schroeder-stein, K., vd.. 2018. Impaired liver regeneration after hepatectomy and bleeding is associated with a shift from hepatocyte proliferation to hypertrophy. 5283–5295.
- Matsuzawa, A., Kanno, SI, Nakayama, M., Mochiduki, H., Wei, L., vd. 2014, The BRCA1/BARD1-Interacting Protein OLA1 Functions in Centrosome Regulation, *Molecular Cell*, 53(1), 101–114.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McEvoy, J. D., Kossatz, U., Malek, N., 2007, Constitutive Turnover of Cyclin E by Cul3 Maintains Quiescence, *Molecular and Cellular Biology*, 27(10), 3651–3666.
- McWilliams, T.G., Muqit, M. M. 2017, PINK1 and Parkin: Emerging Themes in Mitochondrial Homeostasis, *Current Opinion in Cell Biology*, 45, 83–91.
- Meier, M., Andersen, K. J., Knudsen, A. R., Nyengaard, R., Hamilton-dutoit, S., vd. 2016. Liver regeneration is dependent on the extent of hepatectomy, *Journal of Surgical Research*, 6, 5–7.
- Melino, G., Knight, R. A. ve Cesareni, G. 2006, Degradation of p63 by itch, *Cell Cycle*, 5(16), 1735–1739. doi: 10.4161/cc.5.16.3260.
- Michalopoulos, G. 2007, Advances in Liver Regeneration, *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 8(8), 897-907.
- Michalopoulos, G. K. 2010, Liver Regeneration after Partial Hepatectomy:Critical Analysis of Mechanistic Dilemmas, *The American Journal of Pathology*, 176 2– 13.
- Michalopoulos, G. K. 2017, Hepatostat: Liver Regeneration and Normal Liver Tissue Maintenance, *Hepatology*, 65(4), 1384–1392.
- Mizutani, T., Yokoyama, Y., Kokuryo, T., 2013, Calcitonin generelated peptide regulates the early phase of liver regeneration, 183 (1) 138-145.
- Moldovan, G. L. and D’Andrea, A. D., 2009, How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome., *Annual Review of Genetics*. 43, 223–49.
- Moll, U. M., Petrenko, O. 2003, The MDM2-p53 Interaction, *Molecular Cancer Research*, 1, 1001–1008.
- Montava-Garriga, L., Ganley, I. G. 2019, Outstanding Questions in Mitophagy: What We Do and Do Not Know, *Journal of Molecular Biology*. doi: 10.1016/j.jmb.2019.06.032.
- Moudry, P., Lukas, C., Macurek, L., Hanzlikova, H., Hodny, Z., vd. 2012, Ubiquitin-Activating Enzyme UBA1 is Required for Cellular Response to DNA Damage, *Cell Cycle*, 11(8), 1573–1582.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mourkioti, F., Kratsios, P., Luedde, T., Song, Y. H., Delafontaine, P., *vd.* 2006, Targeted Ablation of IKK2 Improves Skeletal Muscle Strength, Maintains Mass, and Promotes Regeneration, *Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 2945-2954.
- Mullany, L. K., White, P., Hanse, E. A., Nelsen, C. J., Goggin, M. M., *vd.* 2008, Distinct proliferative and Transcriptional Effects of the D-type Cyclins *in vivo*, *Cell Cycle*, 7(14), 2215–2224.
- Mulugeta Achame, E., Wassenaar, E., Hoogerbrugge, J. W., Sleddens-Linkels, E., Ooms, M., *vd.* 2010, The Ubiquitin-Conjugating Enzyme HR6B is Required for Maintenance of X Chromosome Silencing in Mouse Spermatocytes and Spermatids, *BMC Genomics*, 11, 367.
- Musacchio, A. 2015, The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics, *Current Biology*, 25(20), R1002–R1018. doi: 10.1016/j.cub.2015.08.051.
- Musacchio, A., Salmon, E. D., 2007, The spindle-assembly checkpoint in space and time, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5), 379–393.
- Nakamura, N. 2011, The role of the transmembrane RING finger proteins in cellular and organelle function, *Membranes*, 1(4), 354–393.
- Nakayama, K. I., Miyake, S., Natsume, T., Iemura, S., Nakayama, K., *vd.* 2004, Skp2-Mediated Degradation of p27 Regulates Progression into Mitosis, *Developmental Cell*, 6(5), 661–672.
- Nakayama, K. I. ve Nakayama, K., 2006, Ubiquitin ligases: Cell-cycle control and cancer, *Nature Reviews Cancer*, 6(5), 369–381.
- Nascimento, R. M. P., Otto, P. A., de Brouwer, A. P. M., 2006, UBE2A, Which Encodes a Ubiquitin-Conjugating Enzyme, is Mutated in a Novel X-Linked Mental Retardation Syndrome, *The American Journal of Human Genetics*, 79(3), 549–555.
- Neukranz, Y., Kotter, A., Beilschmidt, L., Marelja, Z., Helm, M., *vd.* 2019, Analysis of the Cellular Roles of MOCS3 Identifies a MOCS3-Independent Localization of NFS1 at the Tips of the Centrosome, *Biochemistry*, 58(13), 1786–1798.
- Nguyen Huu, N., Ryder, W., Zeps, N., Flaszka, M., Chiu, M., *vd.* 2008, Tumour-promoting Activity of Altered WWP1 Expression in Breast Cancer and Its Utility as a Prognostic indicator, *The Journal of Pathology*, 216, 93–102.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Niraj, J., Färkkilä, A., D'Andrea, A. D. 2019, The Fanconi Anemia Pathway in Cancer, *Annual Review of Cancer Biology*, *Annual Review of Cancer Biology*, 3, 457–478.
- Nygård, I. E., Mortensen, K. E., Hedegaard, J., Conley, L. N., Kalstad, T., *vd.* 2012, The Genetic Regulation of the Terminating Phase of Liver Regeneration, *Comparative Hepatology*, 11(1), 1–15.
- Oberst, A., Rossi, M., Salomoni, P., Pandolfi, P. P., Oren, M., *vd.* 2005, Regulation of the p73 Protein Stability and Degradation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(3), 707–712.
- Ogawa, M., Mizugishi, K., Ishiguro, A., Koyabu, Y., Imai, Y., *vd.* 2008, Rines/RNF180, a Novel RING Finger Gene-Encoded Product, is a Membrane-Bound Ubiquitin Ligase, *Genes to Cells*, 13(4), 397–409.
- Oh, E., Akopian, D., Rape, M. 2018, Principles of Ubiquitin- Dependent Signaling, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1–26.
- Oh, R. S., Bai, X. ve Rommens, J. M. 2006, Human homologs of Ubc6p Ubiquitin-Conjugating Enzyme and Phosphorylation of HsUbc6e in Response to Endoplasmic Reticulum Stress, *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21480–21490.
- Okamoto, Y., Ozaki, T., Miyazaki, K., 2003, UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme. *Cancer Research*, 63(14), 4167–4173.
- de Oliveira, J. F., do Prado, P. F. V., da Costa, S. S., Sforça, M. L., Canateli, C., *vd.* 2019, Mechanistic Insights Revealed by a UBE2A Mutation Linked to Intellectual Disability, *Nature Chemical Biology*, 15(1), 62–70.
- Osmundson, E. C., Ray, D., Moore, F. E., Gao, Q., Thomsen, G. H., *vd.* 2008, The HECT E3 ligase Smurf2 is Required for Mad2-Dependent Spindle Assembly Checkpoint, *The Journal of Cell Biology*, 183(2), 267–277.
- Oughtred, R., Bédard, N., Vrieling, A., 1998, Identification of Amino Acid Residues in A Class I Ubiquitin-Conjugating Enzyme involved in Determining Specificity of Conjugation of Ubiquitin to Proteins, *the Journal Of Biological Chemistry*, 273(29), 18435–42.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ozeki, A., Tsukamoto, I. 1999, Retinoic Acid Repressed the Expression of c-fos and c-jun and Induced Apoptosis in Regenerating Rat Liver after Partial Hepatectomy, 1450, 308–319.
- Palikaras, K., Lionaki, E., Tavernarakis, N. 2018, Mechanisms of Mitophagy in Cellular Homeostasis, Physiology And Pathology, Nature Cell Biology, 20(9), 1013–1022.
- Papaleo, E., Casiraghi, N., Arrigoni, A., Vanoni, M., Coccetti, P., *vd.* 2012, Loop 7 of E2 Enzymes: An Ancestral Conserved Functional Motif Involved in the E2-Mediated Steps of the Ubiquitination Cascade, PLoS ONE, 7(7), e40786.
- Parvin, J. D. 2010, The BRCA1-Dependent Ubiquitin Ligase, c-Tubulin, and Centrosomes, Environmental and Molecular Mutagenesis, 50, 649–653.
- Pasten, C., Ortiz-pineda, P. A., Garcı, E. 2012, Ubiquitin–Proteasome System Components are Upregulated During Intestinal Regeneration, Genesis, 365, 350–365.
- Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., *vd.* 2006, Histone H2B Monoubiquitination Functions Cooperatively with FACT to Regulate Elongation by RNA Polymerase II, Cell, 125(4), 703–717.
- Peng, J., Ren, K. Di, Yang, J., 2016, Mitochondrial E3 ubiquitin Ligase 1: A Key Enzyme in Regulation of Mitochondrial Dynamics and Functions, Mitochondrion, 28, 49–53.
- Peters, J. M., 2002, The Anaphase-Promoting Complex: Proteolysis in Mitosis and Beyond, Molecular Cell, 9, 931–943.
- Pickart, C. M., Eddins, M. J. 2004, Ubiquitin: Structures, Functions, Mechanisms, Biochimica et Biophysica Acta, 1695, 55–72.
- Pickles, S., Vigié, P., Youle, R. J. 2018, Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance, Current Biology, 28(4), R170–R185.
- Pines, J. 2011, Cubism and the Cell Cycle: The Many Faces of the APC/C, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 12(7), 427–438.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Polimeno, L., Capuano, F., Marangi, L. C., Margiotta, M., Lisowsky, T., *vd.* 2000, The Augmenter of Liver Regeneration Induces Mitochondrial Gene Expression in Rat Liver and Enhances Oxidative Phosphorylation Capacity of Liver Mitochondria, *Digestive and Liver Disease*, 32(6), 510–517.
- Qin, B., Yu, J., Nowsheen, S., Wang, M., Tu, X., *vd.* 2019, UFL1 Promotes Histone H4 Ufmlylation and ATM Activation, *Nature Communications*, 10 (1242), 1-13
- Qu, X., Wang, N., Chen, W., Qi, M., Xue, Y., *vd.* 2019, RNF34 Overexpression Exacerbates Neurological Deficits and Brain Injury in A Mouse Model of Intracerebral Hemorrhage By Potentiating Mitochondrial Dysfunction-Mediated Oxidative Stress, *Scientific Reports*, 9(1), 1–11.
- Polimeno, L., Capuano, F., Marangi, L. C., Margiotta, M., Lisowsky, T., *vd.* 2000. The augmenter of liver regeneration induces mitochondrial gene expression in rat liver and enhances oxidative phosphorylation capacity of liver mitochondria. *Digestive and Liver Disease*, 32(6), 510–517.
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, *vd.*, 2004, Guideline to Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313, 856–862.
- Randle, S. J., Laman, H. 2016, Seminars in Cancer Biology F-box protein interactions with the hallmark pathways in cancer, *Seminars in Cancer Biology*, 36, 3–17.
- Ratcliffe, P. J., Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G.-W., Clifford, S. C., *vd.* 1999, The Tumour Suppressor Protein VHL Targets Hypoxia-Inducible Factors for Oxygen-Dependent Proteolysis, *Nature*, 399(6733), 271–275.
- Rathinam, C., Matesic, L. E. ve Flavell, R. A. 2011, The E3 Ligase Itch is a Negative Regulator of the Homeostasis and Function of Hematopoietic Stem Cells, *Nature Immunology*, 12(5), 399–407.
- Riehle, K. J., Campbell, J. S., McMahan, R. S., Johnson, M. M., Beyer, R. P., *vd.* 2008, Regulation of Liver Regeneration and Hepatocarcinogenesis by Suppressor of Cytokine Signaling 3, *The Journal of Experimental Medicine*, 205(1), 91–103.
- Rininger, J., GoldsWorthy, T., Babish, J. 1997, Time Course Comparison of Cell-Cycle Protein Expression Following Partial Hepatectomy and WY14,643-Induced Hepatic Cell Proliferation in F344 Rats, *Carcinogenesis*, 18(5), 935–941.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Roselli, H. T., Su, M., Washington, K., Kerins, D. M., Vaughan, D. E., *vd.* 1998, Liver regeneration is transiently impaired in urokinase-deficient mice, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 275(6), G1472–G1479.
- Rossi, M., Aqeilan, R. I., Neale, M., Candi, E., Salomoni, P., *vd.* 2006, The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(34), 12753–12758.
- Rossi, M., Duan, S., Jeong, Y. T., Horn, M., Saraf, A., *vd.* 2013, Regulation of the CRL4^{Cdt2} ubiquitin ligase and Cell-Cycle exit by the SCF^{Fbxo11} ubiquitin ligase, *Molecular Cell*, 49(6), 1159–1166.
- Rossi, M., De Laurenzi, V., Munarriz, E., Green, D. R., Liu, Y. C., *vd.* 2005, The ubiquitin-protein ligase Itch regulates p73 stability, *EMBO Journal*, 24(4), 836–848.
- Rotin, D., Kumar, S. 2009, Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(6), 398–409.
- Rowlands, T. M., Pechenkina, I. V., Cowin, P. 2004, Don't Skip the G1 Phase How APC/C^{Cdh1} Keeps SCF^{Skp2} in Check, *Cell Cycle* 3(2), 145–148.
- Rychtrmoc, D., Hubálková L., Víšková, A., Libra, A., Bunček, M. Červinková Z. *vd.* 2012, Transcriptome temporal and functional analysis of liver regeneration termination, *Physiological Research*, 61(2), 77-79
- Sarangi, P., Zhao, X. 2015, SUMO-mediated regulation of DNA damage repair and responses, *Trends in Biochemical Sciences*, 40(4), 233–242.
- Schmidt, S. C., Schumacher, G., Klage, N., 2010, The Impact of Carbon Dioxide Pneumoperitoneum on Liver Regeneration after Liver Resection in a Rat Model, *Surgical Endoscopy*, 24, 1–8.
- Schmittgen D.T., Zakrajsek B.A., 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR *Journal of Biochemal Biophysical Methods* 46: 69–81
- Shabbeer, S., Omer, D., Berneman, D., Weitzman, O., Alpaugh, A., *vd.* 2013, BRCA1 targets G2/M cell cycle proteins for ubiquitination and proteasomal degradation, *Oncogene*, 32(42), 5005–5016.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sherr, C. J. ve Roberts, J. M. 1999, CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes & Development*, (901), 1501–1512.
- Shiloh, Y., Shema, E., Moyal, L., Oren, M. 2011, RNF20-RNF40: A ubiquitin-driven link between gene expression and the DNA damage response, *FEBS Letters*, 585(18), 2795–2802.
- Sievers, Q. L., Gasser, J. A., Cowley, G. S., 2018, Genome-wide screen identifies cullin-RING ligase machinery required for lenalidomide-dependent CRL4^{CRBN} activity, *Blood*, 132(12), 1293–1303.
- Silver N., Best S., Jiang J., 2006, Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR, *BMC Molecular Biology*, 7:33
- Simo, S., Jossin, Y. ve Cooper, J. A. 2010, Cullin 5 Regulates Cortical Layering by Modulating the Speed and Duration of Dab1-Dependent Neuronal Migration, *Journal of Neuroscience*, 30(16), 5668–5676.
- Sivakumar, S., Gorbsky, G. J. 2015, Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(2), 82–94.
- Skaar, J. R., Pagano, M. 2009, Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases, *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 816–824.
- Smit, J. J. ve Sixma, T. K. 2014, RBR E3-ligases at work, *EMBO reports*. 15(2), 142–154.
- So, C. C., Ramachandran, S., Martin A., 2019, E3 Ubiquitin Ligases RNF20 and RNF40 are Required for Double-Stranded Break (DSB) Repair: Evidence for Monoubiquitination of Histone H2B Lysine 120 as a Novel Axis of DSB Signaling and Repair Clare, *Molecular and Cellular Biology* 39(8),1–19.
- Sonneville, R. 2004, zyg-11 and cul-2 Regulate Progression through Meiosis II and Polarity Establishment in *C. elegans*, *Development*, 131(15), 3527–3543.
- Spratt, D. E., Walden, H., Shaw, G. S. 2014, RBR E3 Ubiquitin Ligases: New Structures, New Insights, New Questions, *Biochemical Journal*, 458(3), 421–437.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Starkel, P., De Saeger, C., Sempoux, C., Legrand, E., Leclercq, I., *vd.* 2005, Blunted DNA synthesis and delayed S-phase entry following inhibition of Cdk2 activity in the regenerating rat liver, 85(4), 562–571.
- Steer, C. Z., Liver Regeneration, FASEB, 1995;9:1396-400
- Stewart, M. D., Ritterhoff, T., Klevit, R. E., 2016, E2 Enzymes: More than just Middle Men, Cell Research. 26(4), 423-440.
- Stitt, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., Panaro, F., Timofeyva, Y., *vd.*, 2004, The IGF1/PI3K/Akt Pathway Prevents Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligases by Inhibiting FOXO Transcription Factors, Molecular Cell, 14, 395–403.
- Stolz, A., Dikic, I. 2018, Heterotypic Ubiquitin Chains: Seeing is Believing, Trends in Cell Biology, 28(1), 1–3.
- Stolz, D. B., Mars, W. M., Petersen, B. E., 1999, Growth Factor Signal Transduction Immediately After Two-Thirds Partial Hepatectomy in the Rat, Cancer Research, 59(16), 3954–3960.
- Strand, N. S., Allen, J. M., Ghulam, M., Taylor, M. R., Munday, R. K., *vd.* 2018, Dissecting the Function of Cullin-RING Ubiquitin Ligase Complex Genes in Planarian Regeneration, Developmental Biology, 433(2), 210–217.
- Sumara, I., Quadroni, M., Frei, C., Olma, M. H., Sumara, G., *vd.* 2007, A Cul3-Based E3 Ligase Removes Aurora B from Mitotic Chromosomes, Regulating Mitotic Progression and Completion of Cytokinesis in Human Cells, Developmental Cell, 12(6), 887–900.
- Sümer, N. C., Uyanıkgil, Y. 2010, Ubikitin- Proteozom Yolağının Karsinogenezdeki Rolü, Arşiv, 19(36), 36–55.
- Sun, Y., Hu, Z., Goeb, Y., 2013, The F-Box Protein MEC-15 (FBXW9) Promotes Synaptic Transmission in GABAergic Motor Neurons in *C. elegans*, PLoS ONE, 8(3), 1-7
- Swatek, K. N., Komander, D. 2016, Ubiquitin Modifications, Cell Research, 26(4), 399–422.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Jiang, X., Chen, W., *vd.* 2007, Pharmacologic Disruption of Polycomb-Repressive Complex 2-Mediated Gene Repression Selectively Induces Apoptosis in Cancer Cells, *Genes and Development*, 21(9), 1050–1063.
- Tang, Z., Li, B., Bharadwaj, R., Zhu, H., Özkan, E., *vd.*, 2001, APC2 Cullin Protein and APC11 RING Protein Comprise the Minimal Ubiquitin Ligase Module of the Anaphase-promoting Complex, *Molecular Biology of the Cell*, 12, 3839-3851.
- Tang, Y., Tang, L.-Y., Xu, X., Li, C., Deng, C., *vd.* 2018, Generation of Smurf2 Conditional Knockout Mice, *International Journal of Biological Sciences*, 14(5), 542–548.
- Tannuri, A. C. A., Tannuri, U., Coelho, M. C., 2007, Experimental Models of Hepatectomy and Liver Regeneration Using Newborn and Weaning Rats, *Clinics*, 62(6), 757–762.
- Tapia-Laliena, M. Á., Korzeniewski, N., Peña-Llopis, S., Scholl, C., Fröhling, S., *vd.* 2019, Cullin 5 is a Novel Candidate Tumor Suppressor in Renal Cell Carcinoma Involved in the Maintenance of Genome Stability, *Oncogenesis*, 8(4), 1-11.
- Taub, R. 2004, Liver regeneration: from myth to mechanism, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(10), 836–847.
- Taylor, W. R., Stark, G. R. 2001, Regulation of the G2/M Transition by p53, *Oncogene*, 20(15), 1803–1815.
- Thompson, N. L., Mead, J. E., Braun, L., Goyette, M., Shank, P. R., *vd.* 1986, Sequential Protooncogene Expression during Rat Liver Regeneration , (17), 3111–3117.
- Tian, X., Wu, C. 2013, The Role of Ubiquitin-Mediated Pathways in Regulating Synaptic Development, Axonal Degeneration and Regeneration: Insights from Fly and Worm, *The Journal of Physiology*, 591(13), 3133–43.
- Toydemir, T., Kanter, M., Erboğa, M., 2015, Antioxidative, antiapoptotic, and proliferative effect of curcumin on liver regeneration after partial hepatectomy in rats, *Toxicology and Industrial Health*, 31(2)162-172.
- Ulrich, H. D., Walden, H. 2010, Ubiquitin Signalling in DNA Replication and Repair, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(7), 479–489.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vaites, L. P., Lee, E. K., Lian, Z., Barbash, O., Roy, D., *vd.* 2011, The Fbx4 Tumor Suppressor Regulates Cyclin D1 Accumulation and Prevents Neoplastic Transformation, *Molecular and Cellular Biology*, 31(22), 4513–4523.
- Valimberti, I., Tiberti, M., Lambrughi, M., 2015, E2 Superfamily of Ubiquitin-Conjugating Enzymes: Constitutively Active or Activated through Phosphorylation in the Catalytic Cleft, *Scientific Reports*, 5(14849), 1–13.
- van Attikum, H., Gasser, S. M., 2009, Crosstalk Between Histone Modifications During the DNA Damage Response, *Trends in Cell Biology*, 19(5), 207–217.
- Van Ree, J. H., Jeganathan, K. B., Malureanu, L., 2010, Overexpression of the E2 Ubiquitin-Conjugating Enzyme Ubch10 Causes Chromosome Missegregation and Tumor Formation. *Journal Of Cell Biology*, 188(1), 83–100.
- Vaughn, J. P., Davis, P. L., Jarboe, M. D., Huper, G., Craig Evans, A., *vd.* 1996, BRCA1 Expression is Induced before DNA Synthesis in both Normal and Tumor-derived Breast Cells, *Cell Growth and Differentiation*, 7(6), 711–715.
- Villa, E., Marchetti, S., Ricci, J. E. 2018, No Parkin Zone: Mitophagy without Parkin, *Trends in Cell Biology*, 28(11), 882–895.
- Villa, E., Proïcs, E., Rubio-Patiño, C., Obba, S., Zunino, B., *vd.* 2017, Parkin-Independent Mitophagy Controls Chemotherapeutic Response in Cancer Cells, *Cell Reports*, 20(12), 2846–2859.
- Viragh, S., Bartok, I., 1966, An Electron Microscopic Study of the Regeneration of the Liver Following Partial Hepatectomy, *The Journal of Laryngology & Otology*, 549(5), 825-839.
- Wakim, K. G. 2017, Physiology of the Liver, *The American Journal of Medicine*, 4(8), 13–24.
- Walden, H., Rittinger, K. 2018, RBR Ligase-mediated Ubiquitin Transfer: A Tale with many Twists and Turns, *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(6), 440–445.
- Walker, A., Acquaviva, C., Matsusaka, T., 2008, UbcH10 Has a Rate-Limiting Role in G1 Phase but Might Not Act in the Spindle Checkpoint or as Part of an Autonomous Oscillator, *Journal of Cell Science*, 121(14), 2319–2326.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wan, C., Shawn, R. G., Wang, Y., Cao, X., Shen, X., *vd.* 2008, Activation of the Hypoxia-Inducible Factor-1 α Pathway Accelerates Bone Regeneration, *PNAS*, 105(2), 686–691.
- Wang, G. P., Xu, C. S. 2011, Alterations in DNA Repair Gene Expression and Their Possible Regulation in Rat-Liver Regeneration, *Genetics and Molecular Biology*, 34(2), 304–309.
- Wang, R. H., Yu, H., Deng, C. X. 2004, A Requirement for Breast-Cancer-Associated Gene 1 (BRCA1) in the Spindle Checkpoint, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), 17108–17113.
- Wang, X., Herr, R. A., Rabelink, M., Hoeben, R. C., Wiertz, E. J. H. J., *vd.* 2009, Ube2j2 Ubiquitinates Hydroxylated Amino Acids On ER-Associated Degradation Substrates, *Journal of Cell Biology*, 187(5), 655–668.
- Wang, Z., Liu, Z., Chen, X., Li, J., Yao, W., *vd.* 2019, A Multi-Lock Inhibitory Mechanism For Fine-Tuning Enzyme Activities of the HECT Family E3 Ligases, *Nature Communications*, 10(1), 3162.
- Watson, E. R., Brown, N. G., Peters, J. M., 2019, Posing the APC/C E3 Ubiquitin Ligase to Orchestrate Cell Division, *Trends in Cell Biology*, 29(2), 117–134.
- Waynforth, H. B. ve Flecknell, P. A. 2001, *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. Second Edi. San Diego San Francisco New York Boston London Sydney Tokyo: Academic Press.
- Weber, R. A., Yen, F. S., Nicholson, S. P. V., Alwaseem, H., Bayraktar, E. C., *vd.* 2020, Maintaining Iron Homeostasis is the Key Role of Lysosomal Acidity for Cell Proliferation, *Molecular Cell*, 77(3), 645-655.
- Wei, P., Guo, J., Xue, W., Zhao, Y., Yang, J., *vd.* 2018, RNF34 Modulates the Mitochondrial Biogenesis and Exercise Capacity in Muscle and Lipid Metabolism through Ubiquitination of Pgc-1 in *Drosophila*, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(10), 1038–1046.
- Wei, R., Guo, J., Li, M., Yang, X., Zhu, R., *vd.* 2017a, Smurf1 Controls S Phase Progression and Tumorigenesis through Wee1 Degradation, *FEBS Letters*, 591(8), 1150–1158.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wei, R., Li, B., Guo, J., Li, M., Zhu, R., *vd.* 2017b, Smurf1 targets Securin for Ubiquitin-Dependent Degradation and Regulates the Metaphase-to-Anaphase Transition, *Cellular Signalling*, 38, 60–66.
- Williams, K. M., Qie, S., Atkison, J. H., Salazar-Arango, S., Alan Diehl, J., *vd.* 2019, Structural Insights into E1 Recognition and the Ubiquitin-Conjugating Activity of the E2 Enzyme Cdc34, *Nature Communications*, 10(1).
- Wu, ZX., Zan, PF., Li, S., Liu, JL., Wang, J., *vd.* 2015, Knockdown of WWP1 Inhibits growth and Invasion, but Induces Apoptosis of Osteosarcoma Cells, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(7):7869-7877.
- Wu, SY., Kuan VJW., Tzeng, YW., Schuyler, SC., Juang YL., 2016, The anaphase-promoting complex works together with the SCF complex for proteolysis of the S-phase cyclin Clb6 during the transition from G1 to S phase, *Fungal Genetics and Biology* 91 (2016) 6–19.
- Wüstefeld, T., Rakemann, T., Kubicka, S., Manns, M. P. ve Trautwein, C. 2000, Hyperstimulation with Interleukin 6 Inhibits Cell Cycle Progression after Hepatectomy in Mice, *Hepatology*, 32(3), 514–522.
- Xie, C., Powell, C., Yao, M., 2014, Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2C: A Potential Cancer Biomarker, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 47, 113–117.
- Xing W., Deng M., Zhang J., Huang H., Dirsch O., *vd.*, 2009. Quantitative Evaluation and Selection of Reference Genes in a Rat Model of Extended Liver Resection. *Journal of Biomolecular Techniques* 20: 109–115.
- Xu, C., Chang, C., Yuan, J., Li, W., Han, H., *vd.* 2005, Expressed Genes in Regenerating Rat Liver after Partial Hepatectomy, 11(19), 2932–2940.
- Xu, C. S., Shao, H. Y., Liu, S. S., Qin, B., Sun, X. F., *vd.* 2009, Possible Regulation of Genes Associated with Intracellular Signaling Cascade in Rat Liver Regeneration, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 44(4), 462–470.
- Xu, H. Z., Wang, Z. Q., Shan, H. Z., Zhou, L., Yang, L., *vd.* 2018, Overexpression of Fbxo6 Inactivates Spindle Checkpoint by Interacting with Mad2 and BubR1, *Cell Cycle*, 17(24), 2779–2789.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yamaji, S., Zhang, M., Zhang, J., Endo, Y., Bibikova, E., *vd.* 2010, Hepatocyte-Specific Deletion of DDB1 Induces Liver Regeneration and Tumorigenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(51), 22237–22242.
- Yamada, T., Murata, D., Adachi, Y., Itoh, K., Kameoka, S. *vd.*, 2018, Mitochondrial Stasis Reveals p62-Mediated Ubiquitination in Parkin-Independent Mitophagy and Mitigates Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metabolism*, 28(4), 588-604.e5.
- Yang, H., Wu, L., Ke, S., Wang, W., Yang, L., *vd.* 2016, Downregulation of Ubiquitin-Conjugating Enzyme UBE2D3 Promotes Telomere Maintenance and Radioresistance of Eca-109 Human Esophageal Carcinoma Cells, *Journal of Cancer*, 7(9), 1152–1162.
- Yang, K., Weinacht, C. P., Zhuang, Z. 2013, Regulatory Role of Ubiquitin in Eukaryotic DNA Translesion Synthesis, *Biochemistry*, 52(19), 3217–3228.
- Yau, R., Rape, M. 2016, The Increasing Complexity of the Ubiquitin Code, *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 18(6), 579–586.
- Yerlikaya, A. 2004, Cellular Functions of the 26S Proteasome, *Turkish Journal of Biology*, 28, 31–38.
- Yoo, H. M., Kang, S. H., Kim, J. Y., Lee, J. E., Seong, M. W., *vd.* 2014, Modification of ASC1 by UFM1 is Crucial for ER α Transactivation and Breast Cancer Development, *Molecular Cell*, 56(2), 261–274.
- Yosipovitch, G., Papoiu, A. D. P. 2008, What Causes Itch In Atopic Dermatitis?, *Current Allergy and Asthma Reports*, 8(4), 306–311.
- Youle, R. J., Van Der Blik, A. M. 2012, Mitochondrial Fission, Fusion, And Stress, *Science*, 337(6098), 1062–1065.
- Yu, Z. K., Gervais, J. L. M., Zhang, H., 1998, Human CUL-1 Associates with the SKP1 /SKP2 Complex and Regulates p21 CIP1 / WAF1 and Cyclin D Proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95,11324–11329.
- Yu, J., Gu, X., Yi, S., 2016, Ingenuity Pathway Analysis of Gene Expression Profiles in Distal Nerve Stump following Nerve Injury: Insights into Wallerian Degeneration, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(274), 1–12.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zeman, M. K. ve Cimprich, K. A. 2014, Causes and Consequences of Replication Stress, *Nature Cell Biology*, 16(1), 2–9.
- Zhang, B., Deng, C., Wang, L., Zhou, F., Zhang, S., *vd.* 2018, Upregulation of UBE2Q1 via Gene Copy Number Gain in Hepatocellular Carcinoma Promotes Cancer Progression through β -catenin-EGFR-PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway, *Molecular Carcinogenesis*, 57(2), 201–215.
- Zhang, C. 2014, Essential Functions of Iron-requiring Proteins in DNA Replication, Repair and Cell Cycle Control, *Protein and Cell*, 5(10), 750–760.
- Zhang, J., Niu, J., Dong, C. Ve Meng, X. 2011, Portal Vein Arterialization Used in Partial Hepatectomy Maintains Liver Regeneration, 6(30), 6325–6330.
- Zhang, J., Wan, L., Dai, X., Sun, Y., Wei, W. 2014, Functional Characterization of Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) E3 Ubiquitin Ligases in Tumorigenesis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1845(2), 277–293.
- Zhang, J., Sun, Z., Han, Y., Yao, R., Yue, L., *vd.* 2017, Rnf2 Knockdown Reduces Cell Viability and Promotes Cell Cycle Arrest in Gastric Cancer Cells, *Oncology Letters*, 13(5), 3817–3822.
- Zhang, L., Wu, Z., Ma, Z., Liu, H., Wu, Y., *vd.* 2015, WWP1 as a Potential Tumor Oncogene Regulates PTEN-Akt Signaling Pathway in Human Gastric Carcinoma, *Tumor Biology*, 36(2), 787–798.
- Zhang, M., Zhu, X., Zhang, Y., Cai, Y., Chen, J., *vd.* 2015, RCAD/Ufl1, a Ufm1 E3 Ligase, is Essential for Hematopoietic Stem Cell Function and Murine Hematopoiesis, *Cell Death and Differentiation*, 22(12), 1922–1934.
- Zhang, Y. W., Brognard, J., Coughlin, C., You, Z., Dolled-Filhart, M., *vd.* 2009, The F Box Protein Fbx6 Regulates Chk1 Stability and Cellular Sensitivity to Replication Stress, *Molecular Cell*, 35(4), 442–453.
- Zhao, Y., Alexandrov, P., Jaber, V. 2016, Deficiency in the Ubiquitin Conjugating Enzyme UBE2A in Alzheimer's Disease (AD) is Linked to Deficits in a Natural Circular miRNA-7 Sponge (circRNA; ciRS-7), *Genes*, 7(12), 116.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhao, Y., Brickner, J. R., Majid, M. C., 2014, Crosstalk Between Ubiquitin and Other Post-Translational Modifications on Chromatin During DSB Repair, *Trends Cell Biol*, 24(7), 426–434.
- Zheng, N., Shabek, N. 2017, Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation, *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 129–157.
- Zheng, N., Wang, Z., Wei, W. 2016a, Ubiquitination-Mediated Degradation of Cell Cycle-Related Proteins by F-box Proteins, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 73, 99–110.
- Zheng, N., Zhou, Q., Wang, Z., 2016b, Recent Advances in SCF Ubiquitin Ligase Complex: Clinical Implications, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1866(1), 12–22.
- Zhi, X. ve Chen, C. 2012, WWP1: A Versatile Ubiquitin E3 Ligase in Signaling and Diseases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(9), 1425–1434.
- Zhong, Z., Tsukada, S., Rehman, H., Parsons, C. J., Theruvath, T. P., *vd.* 2011, Inhibition of Transforming Growth Factor- β /Smad Signaling Improves Regeneration of Small-for-Size Rat Liver Grafts, *Liver Transplantation*, 16(2): 181–190.
- Zhou, H., Liu, Y., Zhu, R., Ding, F., Wan, Y., *vd.* 2017, FBXO32 Suppresses Breast Cancer Tumorigenesis through targeting KLF4 to Proteasomal Degradation, *Oncogene*, 36(23), 3312–3321.
- Zhou, L., Xu, G. 2019, Cereblon Attenuates DNA Damage-Induced Apoptosis by Regulating the Transcription-Independent Function of p53, *Cell Death and Disease*. 10(2).
- Zhou, Q., Jackson, T., Elhakhkhny, S., Townsend, P., Crosbie, E., *vd.* 2016, Targeting the E3-ubiquitin ligase RNF144B to inhibit proliferation in oestrogen receptor negative endometrial cancer cells, *European Journal of Cancer*, 61, S168–S169.
- Zhou, W., Wang, X., Rosenfeld, M. G., 2009, Histone H2A Ubiquitination in Transcriptional Regulation and DNA Damage Repair, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(1), 12–15.
- Zhu, Z., Wang, L., Hao, R., Zhao, B., Sun, L., *vd.* 2016, Cutting Edge: A Cullin-5–TRAF6 Interaction Promotes TRAF6 Polyubiquitination and Lipopolysaccharide Signaling, *The Journal of Immunology*, 197(1), 21–26. doi: 10.4049/jimmunol.1600447.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zimmermann, A. 2004, Regulation of liver regeneration, *Nephrology Dialysis Transplantation*, 19(4), 6–10.

Zinngrebe, J., Montinaro, A., Peltzer, N., 2013, Ubiquitin in the Immune System, *EMBO Reports*, 15(1) 28-45.

Zou, Y., Bao, Q., Kumar, S., Hu, M., Wang, G. Y. vd., 2012, Four Waves of Hepatocyte Proliferation Linked with Three Waves of Hepatic Fat Accumulation during Partial Hepatectomy-induced Liver Regeneration. *PLoS ONE*, 7(2).

EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklamalar- A. Etik Kurul Raporu



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(HADYEK)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 29. 09. 2016
TOPLANTI SAYISI	: 101
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 549
KARAR NUMARASI	: 549
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Mediha CANBEK
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Arş. Gör. Ayşe ÖZMEN YAYLACI Arş. Gör. Dr. Emre CEYHAN Yüksek Lis. Öğr. Leman RESULZADE Yüksek Lis. Öğr. Burak BERBER
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: Wistar albino (91 adet erkek)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji / Moleküler Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Prof. Dr. Mediha CANBEK'in araştırma yürütücüsü olduğu 549/2016 kayıt numaralı ve " Sıçanlarda Parsiyal Hepatektomi Sonrası Karaciğer Rejenerasyonunda Ubiquitin Sinyal Yoluğunun Rolü " konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Kevser EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)

Prof. Dr. Emel ULUPINAR (Üye)

Doç. Dr. Ergül YILDIRIM (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Nurdan KIRIMLIOĞLU (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Vet. Hek. Oya ERALP İNAN (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükür KIRDEMİR (Üye)



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(HADYEK)

GEREKÇE

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji / Moleküler Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi **Prof. Dr. Mediha CANBEK**'in araştırma yürütücüsü olduğu 549/2016 kayıt numaralı ve " **Sıçanlarda Parsiyal Hepatektomi Sonrası Karaciğer Rejenerasyonunda Ubiquitin Sinyal Yoluğunun Rolü** " konulu çalışma; tarafımızdan değerlendirilmiştir.

Yöntem:

Ana Gruplar	Alt Gruplar	Tekrar sayısı
<u>Ana Grup I (Kontrol Grubu)</u>	Grup I (n=5)	2
<u>Ana Grup II (Sham Grupları)</u>	Sham Alt Grup I: 0. Saat (n=5) Sham Alt Grup II: 6. Saat (n=5) Sham Alt Grup III: 12. Saat (n=5) Sham Alt Grup IV: 24. Saat (n=5) Sham Alt Grup V: 48. Saat (n=5) Sham Alt Grup VI: 72. Saat (n=5)	2x5
<u>Ana Grup III (PH+SF Grupları)</u>	PH+SF Alt Grup I: 0. Saat (n=5) PH+SF Alt Grup II: 6. Saat (n=5) PH+SF Alt Grup III: 12. Saat (n=5) PH+SF Alt Grup IV: 24. Saat (n=5) PH+SF Alt Grup V: 48. Saat (n=5) PH+SF Alt Grup VI: 72. Saat (n=5)	2x5



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(HADYEK)

karn bölgesinde vücuda paralel 2-3 cm'lik bir orta hat kesisi ile laparotomi yapılacak ve karaciğer loplarm birbirine bağlayan zarlar ayrılarak karaciğerin yaklaşık %68-70 oranında kütleini teşkil eden ösdeki sağ orta ve sol yan loplari ayrılacaktır. Bu loplara ait hepatik arter, ven ve safra kanallarının etrafından ipek iplik geçirilerek bağlanacak ve bağın lop tarafından ve hemen üstünden kesim gerçekleştirilecektir. Her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karn boşluğuna steril serum fizyolojik verilecektir. Ayrıca postoperatif analjezik parasetamol tek seferde 10mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulanacaktır.

Sonra, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 4/0 ipek suturele dikilerek laparotomi bölgesi kapatılacaktır ve povidoneks antiseptik solüsyon ile laparotomi bölgesi temizlenecektir. Cerrahi işlem görnüşü her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak diyet değışikliği yapılmaksızın 0, 6, 12, 24, 48, 72. saat boyunca yaşatılacaktır.

3.Anestezî: Tüm cerrahi işlemler steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirilecektir. Deney gruplarına ait hayvanlar hafif eter anestezisi altında, intrakardiyak olarak kalpten bütün karn alınması yoluyla öldürülecektir. Deney gruplarına ait hayvanlara intramuskular olarak 10 mg.kg-1 ksilazin ve 70 mg.kg-1 ketamin anestezisi uygulanacaktır ve midline laparotomi gerçekleştirilerek karaciğer doku örnekleri alınacaktır.

Her grupta 5x2=10 hayvan kullanılması hayvan sayısı açısından çok bulunmuştur. Ekibin parsiyel hepatektomi üzerindeki deneyimleri göz önüne alındığında daha az hayvanla bu çalışma tamamlanabilir şekilde değerlendirilmiştir.

Kullanılan yöntemler uluslararası standardı olan yöntemlerdir. Gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ayşe Özmen Yaylacı
Doğum Tarihi: 14.06.1987, Uşak

Eğitim Bilgileri:

Doktora: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Tez Aşaması (2012-)

Yüksek Lisans: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı(2009-2011)

Yüksek Lisans Tezi: Karaciğer İskemi Reperfüzyonu Sırasında Oluşan Oksidatif Stres Hasarına Karşı Gallik Asitin Olası Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2005-2009)

İş Deneyimi:

Araştırma Görevlisi, Hitit Üniversitesi Fen edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2011-Halen

Araştırma Görevlisi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2547 sayılı kanununun 35. maddesi kapsamında) 2015-2020

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Canbek M, Ozmen Yaylaci A; Hamid N, 2019. The Relationship of Hyaluronic Acid-CD44 on Cancer Progression and Hyaluronic Acid-Based Self-Assembled Nanoparticle Roles. Biomed J Sci & Tech Res, 22(2): 16560-16564.
2. Canbek M, Ozmen Yaylaci A (2018). The effect of antioxidants on liver regeneration. Biomed J Sci & Tech Res, 6(4):1-
3. Ceyhan E, Canbek Mediha, Uyanoğlu Mustafa, Özen Ahmet, Durmuş Özen Başak, Berber Burak, Özmen Yaylacı Ayşe, Rasulzade Leman (2018). Effect of leucine

on NF- κ B pathway in liver regeneration after partial hepatectomy in rats, as determined by miniarray analysis. Bratislavske lekarske listy, 119(2), 92-97 (SCI-Exp).

4. Bayramoglu, G., Senturk, H., Bayramoglu, A., Uyanoglu, M., Colak, S., Ozmen, A., Kolankaya, D., 2014. Carvacrol partially reverses symptoms of diabetes in STZ-induced diabetic rats., Cytotechnology, 66(2); 251-257.
5. Kanbak, G., Canbek, M., Oğlakçı, A., Kartkaya, K., Şentürk, H., Bayramoğlu, G., Bal, C., Göl, B., Özmen, A., 2012, Preventive role of gallic acid on alcohol dependent and cysteine protease-mediated pancreas injury, Mol Biol Rep, 39:10249-10255.
6. Ozmen, A., Canbek, M., Senturk, H., Bayramoglu, G., Uyanoglu, M., 2012. Possible protective effects of gallic acid against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. Spatula DD, 2(2): 101-106.