



**HEPATOSELLÜLER KARSİNOM PROGNOZUNUN
BELİRLENMESİNDE EPİGENETİK FAKTÖRLERİN
İLERİ BİYOİNFORMATİK YÖNTEMLERLE ANALİZİ**

Ahmet Sami AKBULUT

BİYOİSTATİSTİK ve TIP BİLİŞİMİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Cemil ÇOLAK**

Yüksek Lisans Tezi- 2023

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOM PROGNOZUNUN BELİRLENMESİNDE
EPİGENETİK FAKTÖRLERİN İLERİ BİYİNFORMATİK YÖNTEMLERLE
ANALİZİ**

Ahmet Sami AKBULUT

**Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Cemil ÇOLAK**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL-2022-3138 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2023**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Cemil ÇOLAK danışmanlığında hazırlayıp sunduğum "Hepatosellüler Karsinom Prognozunun Belirlenmesinde Epigenetik Faktörlerin İleri Biyoinformatik Yöntemlerle Analizi" başlıklı Yüksek Lisans tezim için kullandığım açık erişimli veri setinden elde ettiğim verileri, bilgileri ve belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 10/08/2023

Öğrencinin; Ahmet Sami AKBULUT

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hepatosellüler Karsinom (HCC)	3
2.2. HCC ve Genomik İlişkisi.....	9
2.3. Epigenetik Terimi	11
2.4. DNA Metilasyonu.....	13
2.4.1. DNA Metilasyonu ve Gen Ekspresyonu Arasındaki İlişki	14
2.4.2. Transkripsiyonun Kontrolü ve Farklı Metillenen Bölgeler (DMRs: Differentially methylated regions).....	15
2.4.3. DNA Metilasyonu ve Hastalık İlişkisi.....	16
2.5. Histon Modifikasyonları	17
2.5.1. Histon Yapı Değişimleri Hastalık İlişkisi	18
2.6. Kodlamayan RNA'lar	20
2.6.1. Kodlamayan RNA'lar ve Hastalık İlişkisi	21
2.7. Epigenetik Mekanizmalar ve HCC İlişkisi	21
2.7.1. DNA Metilasyonu ve HCC İlişkisi	22
2.7.2. Histon Modifikasyonları ve HCC İlişkisi	24
2.7.3. Kodlanmayan RNA'lar ve HCC İlişkisi	25
2.7.4. miRNA ve HCC İlişkisi	25
2.7.5. lnc-RNA ve HCC İlişkisi.....	26
2.7.6. pi-RNA ve HCC İlişkisi.....	26
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Mikrodizi (Microarray) Transkriptom Analizleri	27
3.1.1. Veri Seti ve Temel Özellikleri	27
3.1.2. Transkriptom Mikrodizi (Microarray) Analizi	28
3.2. Tüm Genom Bisülfid Dizileme (WGBS)	29

3.2.1. Tüm Genom Bisülfıt Dizileme (WGBS) Biyoinformatik Analizleri.....	31
3.3. MeDIP-Sequencing (Methylated DNA immunoprecipitation sequencing).....	32
3.3.1. MEDIP-Seq Biyoinformatik Analizler	33
3.4. Tez Çalışmasının Etik ve Finansal Destek Yönleri	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Mikrodizi (Microarray) Transkriptom Analiz Sonuçları	36
4.2. WGBS (Tüm Genom Bisülfıt Dizileme) Sonuçları	56
4.3. MeDIP-Seq Analiz Sonuçları	72
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR	92
EKLER.....	118
EK-1. Özgeçmiş.....	118
EK-2. Etik Kurul Onayı	119

TEŞEKKÜR

Tez araştırmamı destekleyen, katkı ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Cemil ÇOLAK'a, tez çalışmamın yazım ve düzenleme aşamalarında bana destek olan Araştırma Görevlisi Zeynep KÜÇÜKAKÇALI'ya ve yüksek lisans eğitimim sırasında yardımlarını esirgemeyen Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine ve Araştırma Görevlilerine, bu tezin genel bilgilerinin yazımında karaciğer kanserlerinin genetik ve moleküler yönü konusunda engin bilgilerini benimle paylaşan İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tevfik Tolga ŞAHİN'e ve Hepatosellüler karsinom konusunda akademik çalışmalar yapmam için Karaciğer Nakli Enstitüsü'nün verilerini benimle paylaşan ve karaciğer nakli cerrahisi konusunda belirli bir seviyeye ulaşmamı sağlayan İnönü Üniversitesi Karaciğer Nakli Enstitüsü Müdürü değerli hocam Prof. Dr. Sezai YILMAZ'a,

Hayatım boyunca benden desteğini ve sevgisini esirgemeyen aileme, beni okutmak için ömrünün son günlerine kadar çalışmak zorunda kalan rahmetli babam Bahri AKBULUT'a, hem sağlıklı hem de akademik olarak başarılı olmam için gününün çoğunu bana dua etmekle geçiren ancak COVID-19 pandemisinin benden koparıp aldığı annem Zurab AKBULUT'a ve çalışmalarım süresince gösterdiği anlayış ve desteğinden dolayı çocuklarıma ve eşime,

Son olarak bu tez çalışmamın Biyoinformatik analizlerinin yapılması için gerekli finansal desteği sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimine ve bugüne kadar tüm akademik çalışmalarımda bana destek BAP birimi koordinatörü Prof. Dr. İbrahim TÜRKMEN'e

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Ahmet Sami AKBULUT

ÖZET

Hepatosellüler Karsinom Prognozunun Belirlenmesinde Epigenetik Faktörlerin İleri Biyoinformatik Yöntemlerle Analizi

Amaç: Bu çalışmanın amacı HCC'nin biyolojik davranışında belirleyici olduğu düşünülen moleküler genetik mekanizmaların transkriptomik ve epigenetik analizler sonucu elde edilen veriler kullanılarak tespit edilmesidir.

Materyal ve Metot: HCC ile ilişkili transkriptomik veriler NCBI GEO veri tabanından indirilmiştir. GSE46444 ve GSE63898 erişim numaralı veri setlerinde bulunan gruplar arası ekspresyon farklılıkları GEO2R ile analiz edilmiştir. Ekspresyonda farklılık gösteren genler GO ve KEGG metabolik yolak analizleri ile zenginleştirilmiştir. WGBS ve MeDIP-Seq veri setleri NCBI SRA veri tabanından indirilmiştir. WGBS ve MeDIP-Seq verileri sırasıyla Bismark ve QSEA yazılımı ile analiz edilmiştir. Gruplar arası metilasyona uğrayan bölgeler ile işlevsel zenginleştirme analizi gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: GSE46444 veri setinde sirozlu dokuyla karşılaştırıldığında HCC'li dokuda protein kodlayan 80 genin up- ve 315 genin down-regule olduğu görülmüştür. GSE63898 veri setinde HCC'li grup ile karşılaştırıldığında sirozlu grupta 1.261 genin up- ve 458 genin down-regule olduğu görüldü. WGBS sonucunda sağlıklı dokuyla karşılaştırıldığında HCC'li dokuda hipermetile olan ilk 20 genomik lokasyonda protein-kodlayan genlerin olduğu ve hipometile bölgelerin çoğunun da kodlayan genomik bölge olduğu görülmüştür. Sirozlu dokuyla karşılaştırıldığında HCC'li dokuda metile olan lokasyonlar da sağlıklı dokudaki karşılaştırmalar ile benzerdir. MeDIP-Seq ile HCC'li ve HCC'siz dokular karşılaştırılmıştır. Hiper- ve hipometile olan bölgelerde protein-kodlayan genler belirlenmiştir. Bu bölgelerin işlev zenginleştirme analizinde peroksizom, fokal adhezyon, mTOR, RAP1, Fosfolipaz D, Ras ve PI3K/AKT sinyal yolağında rol oynadığı belirlenmiştir.

Sonuç: Transkriptomik ve epigenetik analizlerle HCC'nin biyolojik davranışında etkili moleküler düzeyde veriler elde edilmiştir. Bunların ileride geliştirilecek hedeflenmiş tedavi için potansiyel aday olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyoinformatik analiz, Epigenetik, Genetik, Hepatoselüler karsinom, Transkriptomik

ABSTRACT

Analysis of Epigenetic Factors Determining the Hepatocellular Carcinoma Prognosis with Advanced Bioinformatics Methods

Aim: The aim of the present study is to evaluate the molecular genetic mechanisms that play a role in the biologic behavior of HCC by analyzing of the transcriptomic and epigenetic signatures of the tumors.

Material and Method: Transcriptomic data were downloaded from the NCBI GEO database. The expression differences between the GSE46444 and GSE63898 data sets were analyzed using the GEO2R. The genes that have shown an expression difference were further evaluated using GO and KEGG metabolic pathway analysis websites. WGBS and MeDIP-Seq data sets were downloaded from the NCBI SRA database. WGBS and MeDIP-Seq data were analyzed by using Bismark and QSEA, respectively. The methylation differences between the groups were evaluated by using the functional enrichment analysis.

Results: In the GSE46444 data set, 80 genes were upregulated, and 315 genes were down-regulated in the HCC tissue when compared to the non-tumorous cirrhotic tissue. In the GSE63898 data set, 1261 genes were upregulated, and 458 genes were down-regulated in the cirrhotic tissue when compared to the HCC tissues. WGBS showed that 20 protein coding loci were hypermethylated and majority of the hypomethylated regions were non-protein coding/protein coding. The methylated residues of the HCC, cirrhotic and healthy tissues were statistically comparable. The MeDIP-Seq was comparatively performed on the HCC and non-HCC tissues and hypermethylated or hypomethylated areas were determined to be protein coding regions. The functional enrichment analysis showed that these genes were related with peroxisome, focal adhesion, mTOR, RAP1, Phospholipase D, Ras and PI3K/AKT signal transduction pathways.

Conclusions: The results of the present study using the transcriptomic and epigenetic methods identified various genes that were effective in the biologic behavior of HCC. These can be potential candidates for developing targeted therapy.

Keywords: Bioinformatic analysis, Epigenetics, Genetics, Hepatocellular carcinoma, Transcriptomics,

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAV2	: Adeno-Associated Virus Type 2
ACSL4	: Acyl-coA Synthetase Long Chain Family Member 4
ACTR5	: Actin Related Protein 5
ADAMTS13	: ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 13
ADH4	: Alcohol Dehydrogenase 4
AKT	: AKT Serine-Threonine Kinase 1 (Protein Kinase B)
ALG1L	: ALG1 Like 1, Pseudogene
Alu	: Arthrobacter Luteus
ANGPTL6	: Angiopoietin Like 6
APC	: Adenomatous Polyposis Coli
APOA2	: Apolipoprotein A2
ARHGAP8	: Rho GTPase Activating Protein 8
ARID1A	: AT-Rich Interactive Domain-Containing Protein 1A
ARID2	: AT Rich Interactive Domain 2
ASPM	: Abnormal Spindle-Like Microcephaly-Associated Protein or Assembly Factor for Spindle Microtubules
ATP7B	: ATPase Copper Transporting Beta
AURKA	: Aurora Kinase A
AURKB	: Aurora Kinase B
BP	: Biological Process (Biyolojik Süreç)
BST2	: Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2
CAP2	: Cyclase Associated Actin Cytoskeleton Regulatory Protein 2
CC	: Cellular Component (Hücresel Bileşen)
CCNA2	: Cyclin A2 (Siklin A2)
CCND1	: Cyclin D1 (Siklin D1)
CCNE1	: Cyclin E1 (Siklin E2)
CCT3	: Chaperonin Containing TCP1 Subunit 3
CDKN2A	: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CHRNA3	: Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 3 Subunit
circRNA	: Circular RNA
CMTM3	: CKLF Like MARVEL Transmembrane Domain Containing 3

CNGB1	: Cyclic Nucleotide Gated Channel Subunit Beta
COLEC10	: Collectin Subfamily Member 10
COX-2	: Cyclooxygenase 2 (Siklooksijenaz 2)
CpG	: Cytosine-Phosphate-Guanine
CRABP1	: Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1
CRHBP	: Corticotropin Releasing Hormone Binding Protein
CRHR2	: Corticotropin Releasing Hormone Receptor 2
CTNNB1	: Catenin β 1(β 1-Katenin)
CXCL14	: Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 14
CYP450	: Cytochrome P450 (Sitokrom P450)
DBPA	: DNA Binding Protein A (DNA Bağlayıcı Protein A)
DMR	: Differentially Methylated Region
DNA	: Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
DNMT	: DNA Methyltransferase (DNA Metiltransferaz)
DOK1	: Docking Protein
DZIP3	: DAZ Interacting Zinc Finger Protein 3
ECT2	: Epithelial Cell Transforming 2
EpCAM-1	: Epithelial Cell Adhesion Molecule
ESCO2	: Establishment of Sister Chromatid Cohesion N-Acetyltransferase 2
EYA4	: EYA Transcriptional Coactivator and Phosphatase 4
FAH	: Fumarylacetoacetate Hydrolase
FAM189B	: Family With Sequence Similarity 189 Member B
FCN3	: Ficolin 3
FDR	: False Discovery Rate (Yanlış Bulgu Oranı)
FGF19	: Fibroblast Growth Factor 19 (Fibroblast Büyüme Faktörü 19)
G6PC	: Glucose-6-Phosphatase Catalytic Subunit
GADD45a	: Growth Arrest and DNA Damage Inducible 45 Alpha
GEO	: Gene Expression Omnibus
GO	: Gene Ontology (Gen Ontolojisi)
GOLPH3L	: Golgi Phosphoprotein 3 Like
GSK3β	: Glycogen Synthase Kinase 3 β
GSTP1	: Glutathione S-Transferase Pi 1
GSTT1	: Glutathione S-Transferase Theta 1
GWAS	: Genome-Wide Association Studies

GYG2	: Glycogenin 2
HAT	: Histone Acetyltransferase (Histon Asetiltransferaz)
HBV	: Hepatitis B Virus (Hepatit B Virüsü)
HCC	: Hepatocellular Carcinoma (Hepatosellüler Karsinom)
HCV	: Hepatitis C Virus (Hepatit C Virüsü)
HDAC	: Histone Deacetylase (Histon Deasetilaz)
HDV	: Hepatitis D Virus (Hepatit D Virüsü)
HEATR2	: Dynein Axonemal Assembly Factor 5 (DNAAF5)
HFE	: Homeostatic Iron Regulator
HGF	: Hepatocyte Growth Factor (Hepatosit Büyüme Faktörü)
HINT1	: Histidine Triad Nucleotide Binding Protein
HLA	: Human Leukocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijenleri)
HMBS	: Hydroxymethylbilane Synthase
HSD17B13	: 13 Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 13
IL-1β	: Interleukin 1 Beta (İnterlökin 1 Beta)
IQGAP3	: IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 3
ITPKA	: Inositol-Trisphosphate 3-Kinase A
ITPKC	: Inositol-Trisphosphate 3-Kinase C
KAT2B	: Lysine Acetyltransferase 2B
KDM5C	: Lysine Demethylase 5C
KDM6B	: Lysine Demethylase 6B
KEGG	: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KIF1B	: Kinesin Family Member 1B
KLHL12	: Kelch Like Family Member 12
KMT2B	: Lysine Methyltransferase 2B
LGR5	: Leucine-Rich Repeat-Containing G-Protein Coupled Receptor 5
LINE1	: Long Interspersed Nuclear Element-1
lnc-RNA	: Long Non-Coding RNA
Log2FC	: Logarithm of Fold Change
MALAT1	: Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MAT	: Methionine Adenosyltransferase
Medip-Seq	: Methylated DNA Immunoprecipitation Sequencing
MET	: Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase

MF	: Molecular Function (Moleküler işlev)
MGC10997	: Protein Pseudogene
MGMT	: Methylguanine Methyltransferase
MICA	: MHC Class I Polypeptide–Related Sequence A
miRNA	: Micro RNA (Mikro RNA)
MnSOD	: Manganese Superoxide Dismutase
mRNA	: Messenger RNA (Mesajcı RNA)
MT1F	: Metallothionein 1F
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin
Myc	: Proto-Oncogene, Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor
NAFLD	: Nonalcoholic Fatty Liver Disease (Non Alkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı)
NASH	: Nonalcoholic Steatohepatitis (Non Alkolik Steatohepatit)
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NCG	: The Network of Cancer Genes
ncRNA	: Non-Coding RNA (Kodlamayan RNA)
NEK2	: Nima Related Kinase 2
NEK6	: NIMA Related Kinase 6
NFE2L2	: Nuclear Factor Erythroid 2 Like 2
NGS	: Next-Generation Sequencing
p15 INK4B	: Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 2B (CDKN2B)
p16 INK4A	: Cyclin Dependent Kinase İnhibitor 2A (CDKN2A)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PDGFRA	: Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha
PI3K	: Phosphatidylinositol 3-Kinase
PITX1	: Paired Like Homeodomain 1
piRNA	: Piwi-İnteracting RNA
PLVAP	: Plasmalemma Vesicle Associated Protein
PNPLA3	: Patatin Like Phospholipase Domain Containing 3
PPARγ	: Peroxisome Proliferator- Activated Receptor Gamma
PRG	: Peroxisome-Related Genes:
PRMT6	: Protein Arginine Methyltransferase 6
PROM1	: Prominin 1
PSME4	: Proteasome Activator Subunit 4
PTEN	: Phosphatase and Tensin Homolog

PTH1R	: Parathyroid Hormone 1 Receptor
PTP1B	: Protein Tyrosine Phosphatase 1B
RA	: Rheumatoid Arthritis (Romatoid Artrit)
RACGAP1	: Rac GTPase Activating Protein
RACGAP1P	: Rac GTPase Activating Protein 1 Pseudogene
RAP1	: Ras-Associated Protein 1
RASSF1A	: Ras Association Domain Family Protein 1
RB1	: Retinoblastoma 1
RISC	: RNA-Induced Silencing Complex
RIZ1	: Retinoblastoma Protein-Interacting Zinc Finger Gene 1
RNA	: Ribonucleic Acid (Ribonükleik Asit)
RPS6KA3	: Ribosomal Protein S6 Kinase A3
rRNA	: Ribosomal RNA
RSPO3	: R-Spondin 3
RUNX3	: Runt-Related Transcription Factor 3
Sat2	: Satellite 2
SCN3B	: Sodium Voltage-Gated Channel Beta Subunit 3
SERPINA-1	: Serpin Family A Member 1
SETD6	: SET Domain Containing 6, Protein Lysine Methyltransferase
SETDB2	: SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 2
SFRP1	: Secreted Frizzled Related Protein 1
SLC26A6	: Solute Carrier Family 26 Member 6
SLC37A4	: Solute Carrier Family 37 Member 4
SLE	: Systemic Lupus Erythematosus (Sistemik Lupus Eritematozus)
snoRNA	: Small Nucleolar RNA
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
snRNA	: Small Nuclear RNA
SNX27	: Sorting Nexin 27
SOCS1	: Suppressor of Cytokine Signaling 1
SOCS3	: Suppressor of Cytokine Signaling 3
SPINK1	: Serine Peptidase Inhibitor Kazal Type 1
SRA	: Sequence Read Archive
SREBP1	: Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1
SUMO	: Small Ubiquitin-Like Modifier

TCGA	: The Cancer Genome Atlas (Kanser Genom Atlası)
TERT	: Telomerase Reverse Transcriptase
TM6SF2	: Transmembrane 6 Superfamily Member 2
TOP2A	: DNA Topoisomerase II Alpha
TP53	: Tumor Protein 1 (p53)
tRNA	: Transfer RNA (Taşıyıcı RNA)
TSA	: Trichostatin A
UBE2B	: Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 B
UGT1A	: Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase Family 1 Member A
UROD	: Uroporphyrinogen Decarboxylase
VEGFA	: Vascular Endothelial Growth Factor A
VIPR1	: Vasoactive İntestinal Peptide Receptor
WGBS	: Whole Genome Bisulfite Sequencing

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. DNA Metilasyonu	14
Şekil 3.1. Tüm genom bisülfid dizileme (WGBS) deneysel ve biyoinformatik iş akışı.....	31
Şekil 3.2. MeDIP-Seq deneysel iş akışı.....	33
Şekil 4.1. Sirozlu ve HCC transkriptom profilinin UMAP dağılımı (Yeşil Noktalar: Sirozlu örnekler, Mor noktalar: Hepatosellüler örnekler).....	36
Şekil 4.2. Sirozlu ve HCC grubu arasında gen ekspresyonu artan (kırmızı noktalar) ve azalan genlerin (mavi noktalar) MA grafiği.	37
Şekil 4.3. Sirozlu ve HCC grubu arasında ekspresyonunda farklılık gösteren ilk 50 genin ısı grafiği (GSE46444 veri seti).	40
Şekil 4.4. Sirozlu ve HCC’li gruplar arasında BP, MF ve CC zenginleştirme grafiği (GSE46444 veri seti)	45
Şekil 4.5. Sirozlu ve HCC’li gruplar arasında metabolik yolak zenginleştirme grafiği (GSE46444 veri seti).	46
Şekil 4.6. Sirozlu ve HCC transkriptom profilinin UMAP dağılımı (Yeşil Noktalar: Sirozlu örnekler, Mor noktalar: Hepatosellüler örnekler).....	47
Şekil 4.7. Sirozlu ve HCC’li gruplar arasında gen ekspresyonu artan (kırmızı noktalar) ve azalan genlerin (mavi noktalar) Volkan grafiği.	47
Şekil 4.8. Sirozlu ve HCC’li gruplar arasında ekspresyonunda farklılık gösteren ilk 100 genin ısı grafiği (GSE638984 veri seti).	50
Şekil 4.9. Sirozlu ve HCC’li gruplar arasında BP, MF ve CC zenginleştirme grafiği (GSE638984 veri seti).	55
Şekil 4.10. Sirozlu ve HCC’li gruplar arasında metabolik yolak zenginleştirme grafiği (GSE638984 veri seti).	56
Şekil 4.11. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC’li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı GO işlevsel anotasyonu.....	69
Şekil 4.12. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC’li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı KEGG yolak anotasyonu.	70
Şekil 4.13. Sirozlu karaciğer dokusuna göre HCC’li karaciğerde “-metile” olan genomik bölgelerin yer aldığı GO işlevsel anotasyonu.....	71

Şekil 4.14. HCC’li ve eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokusunda CpG yoğunluk profili	76
Şekil 4.15. Eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokusuna göre HCC’li karaciğerde MEDIP-Seq ile tespit edilmiş metilasyona uğramış genlerin GO işlevsel anotasyonu.....	77
Şekil 4.16. Eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokusuna göre HCC’li karaciğerde MEDIP-Seq ile tespit edilmiş metilasyona uğramış genlerin KEGG yolak anotasyonu.....	78



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. HCC ile yürütölen transkriptom çalışmasına ait temel bilgiler (a) Illumina Human Whole-Genome DASL HT platformu ve (b) Affymetrix Human Genome U219 Array (HG-U219) platformları kullanılmıştır.	27
Tablo 3.2. WGBS çalışması için NCBI SRA veritabanından seçilen HCC, kanseri olmayan karaciğer dokusu, sağlıklı karaciğer dokusu ve sirozlu karaciğer doku örneklerine ait özet istatistik verisi.	32
Tablo 3.3. HCC ve kanseri olmayan eşlenik karaciğer dokusuna ait MEDIP-Seq örneklerinin özet istatistik verisi.	34
Tablo 4.1. GSE46444 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusunda ekspresyon artışı tespit edilen ilk 25 gen (genler adj P-value göre sıralanmıştır).	38
Tablo 4.2. GSE46444 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusunda ekspresyon düşüşü tespit edilen ilk 25 gen (genler adj P-value göre sıralanmıştır).	39
Tablo 4.3. GSE46444 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiğı biyolojik süreçler (FDR'ye göre sıralanmıştır)	41
Tablo 4.4. GSE46444 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiğı moleküler işlevler (FDR'ye göre sıralanmıştır)	42
Tablo 4.5. GSE46444 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiğı hücresel bileşenler (FDR'ye göre sıralanmıştır).	43
Tablo 4.6. GSE46444 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiğı metabolik yollar (FDR'ye göre sıralanmıştır).	44
Tablo 4.7. GSE63898 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusunda ekspresyon artışı tespit edilen ilk 25 gen (genler adj P-value göre sıralanmıştır).	48

Tablo 4.8. GSE63898 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusunda ekspresyon düşüşü tespit edilen ilk 25 gen (genler adj P-value göre sıralanmıştır).	49
Tablo 4.9. GSE638984 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiği biyolojik süreçler (FDR'ye göre sıralanmıştır).	51
Tablo 4.10. GSE638984 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiği moleküler işlevler (FDR'ye göre sıralanmıştır).	52
Tablo 4.11. GSE638984 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiği hücresel bileşenler (FDR'ye göre sıralanmıştır).	53
Tablo 4.12. GSE638984 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiği metabolik yollar (FDR'ye göre sıralanmıştır).	54
Tablo 4.13. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde hipermetile olan top 20 genomik bölge.	57
Tablo 4.14. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde hipometile olan top 20 genomik bölge.	59
Tablo 4.15. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı biyolojik süreçler.	60
Tablo 4.16. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı moleküler işlevler.	61
Tablo 4.17. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı hücresel bileşenler.	62
Tablo 4.18. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin zenginleştiği metabolik yollar (KEGG).	63
Tablo 4.19. Sirozlu karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde hipermetile olan top 20 genomik bölge.	64
Tablo 4.20. Sirozlu karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde hipometile olan top 20 genomik bölge.	65
Tablo 4.21. Sirozlu karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı biyolojik süreçler.	66

Tablo 4.22. Sirozlu karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı moleküler işlevler.	67
Tablo 4.23. Sirozlu karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı hücresel bileşenler.	68
Tablo 4.24. HCC'li karaciğer ve eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokusunda hiper-metile olan top 25 protein-kodlayan genomik bölge.	74
Tablo 4.25. HCC'li karaciğer ve eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokusunda hipo-metile olan top 25 protein-kodlayan genomik bölge.	75



1. GİRİŞ

Kanser hücrelerinin en önemli özellikleri kendini yenileyebilme, kontrolsüz çoğalma, immortalite ve ekstraselüler matriks modifikasyonu sayesinde invazyon ve metastaz yapabilme kabiliyetleridir (1). Kanser ve kanser benzeri hastalıkların gelişiminde genetik değişimler, epigenetik faktörler ve çevresel faktörler önemli rol almaktadır. Ancak, kanser gelişiminin yani karsinogenezisin temelinde çevresel ve genetik faktörlerin etkileşimi söz konusudur ve bu etkileşimler son derece karmaşık bir olaydır (2). Bu yalnızca bireyin çevresel etkenlere maruziyeti ve genetik yatkınlığı boyutunda geçerli olmayıp aynı zamanda tümör dokusunun kendi mikroçevresi ile etkileşimi için de geçerlidir.

Hücrelerin kalıtsal özellikleri proliferasyon, başkalaşım ve benzeri işlevsel ve yapısal özelliklerini belirlemektedir. Ancak somatik hücrelerin hepsi aynı genetik özelliklere sahip iken farklı özellikte doku ve organ sistemlerine dönüşmelerinin açıklaması seçici gen ifadesinin yanı sıra mikroçevre ile etkileşim sonucu gerçekleşene "epigenetik" değişimlerin bulunduğu bir dizi olayların da bu süreçte rol aldığını göstermektedir. Epigenetik en basit tanımla gen ve gen ürünlerinin etkileşimini konu alan bilim dalıdır. Daha farklı bir tanımla gen ekspresyonunun ekstra-kromozomal [DNA (Deoxyribonucleic acid) dışı genetik bilgi] kontrol mekanizmaları ile düzenlenmesini konu alan bilim dalı olarak ifade edilebilir (3). Epigenetik gen düzenlenmesinin incelenmesi organizmanın çevresel etkenlerle nasıl etkileştiğini ve buna nasıl adapte olduğunu açıklamayı hedefler. Kanser araştırmaları açısından düşünülecek olursa tümör dokusu içerisindeki hücrelerin heterojen yapıda olmasının ve tümör ve mikroçevre etkileşiminin belirlenebilmesi ve hatta kanser kök hücre kavramının açıklanabilmesi için tümör dokusu içerisindeki mutasyon analizleri tek başına yeterli değildir (4, 5). Kanser mutasyon analizi yanında gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesinin de incelenmesi bu süreçlerin anlaşılması için gereklidir. Ancak bu hedefe ulaşılabilirse kanser gelişimini, progresyonunu ve metastazını tam anlamıyla açıklanabilmiş olur (6). Özet olarak kanser, biriken genetik mutasyonların yanında epigenetik değişimlerin ve çevresel etkiler sonucunda gelişen kompleks bir olaydır. Epigenetik değişim mekanizmaları; DNA metilasyonu, histon veya kromatinin transkripsiyon sonrası modifikasyonu ve kodlama yapmayan RNA (Ribonucleic acid)'lardır.

Son yıllarda moleküler genetik tekniklerden elde edilen gelişmeler sayesinde daha karmaşık genetik analizler yapılabilir bir hale gelmiştir. Bu gelişmeler sayesinde tümör baskılayıcı genlerde veya proto-onkogenlerde olan mutasyonların tümör gelişimi ve progresyonunda oynadığı rol fazlaca araştırılmış ve yeteri kadar veri elde edilmiştir. Ancak epigenetik değişimlerle ilgili araştırmalar daha yavaş ilerlemektedir (7). Dolayısı ile bu alanda yapılan klinik çalışmalara daha fazla ihtiyaç vardır.

HCC (Hepatosellüler karsinom) dünya çapında en sık görülen yedinci kanser türüdür ve kanserlere bağlı ölümler arasında üçüncü sırada yer almaktadır (8). Genellikle kronik karaciğer zemininde gelişmektedir ve siroz gelişen olgularda HCC gelişmiş neredeyse kaçınılmazdır (9). HCC'nin demografik ve biyolojik özelliklerine bakılacak olursa çeşitli motiflerle karşılaşılır. Bunlarda birincisi insidansının farklı coğrafi bölgelerde ve çeşitli ırklar arasında göre farklılık göstermesidir (10). Tabii ki bu durum viral hepatitlerin ve çeşitli çevresel etkenlerin yüksek riskli bölgelerde farklı dağılımlar göstermesinden kaynaklanmaktadır (10-13). Ancak bu süreç dinamiktir ve aynı toplumda zaman içerisinde HCC görülme sıklığı ve tümör biyolojisi değişebileceği gibi yüksek ve düşük riskli bölgeler arasında göçlerde de göçmen toplumu içerisindeki görülme sıklığı çevresel etkenlerin değişmesi nedeniyle farklılıklar göstermektedir (14, 15). İkinci en önemli nokta HCC heterojen bir tümör biyolojisine sahiptir ve tümör hücreleri ile mikorçevrenin etkileşimi tümörün davranış paternini ve dolayısıyla hastalığın prognozunu belirlemektedir (16). Bu tümörler heterojen bir moleküler temelden köken alan ve karmaşık kalıtsal ve epigenetik özelliklerin birlikte rol aldığı agresif bir tümörler olarak karşımıza çıkmaktadır (17). Bu motifler incelendiğinde HCC'de genetik mutasyonların yanı sıra gen ekspresyonunun epigenetik kontrolünün de önemli olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle HCC alanında yapılacak çalışmaların bu alanda iletilmesi ve daha fazla veri elde edilmesi gerekmektedir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında hazırlanan bu tez çalışmasında asıl olarak tümörlü (HCC'li) ve tümör içermeyen sirotik karaciğer dokularında transkriptomik analiz yapılarak çeşitli epigenetik düzenleme mekanizmalarındaki değişimlerin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatosellüler Karsinom (HCC)

En güncel epidemiyolojik ve klinik verilere göre, primer karaciğer kanseri dünya çapında en sık teşhis edilen altıncı kanser türü ve kanserlere bağlı ölümlerin en yaygın dördüncü nedenidir (18). Her yıl 841.000 civarında yeni primer karaciğer kanseri vakasının teşhis edildiği ve 782.000 kişinin primer karaciğer kanseri sebebiyle hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir (18). Primer malign karaciğer kanserleri HCC, CC (kolanjiokarsinom), cHCC-CC (kombine hepatokolanjiokarsinom), anjiosarkom ve nöroendokrin kanser olarak sınıflandırılabilir. HCC primer karaciğer kanseri olgularının %90'nını oluşturmaktadır. HCC sıklıkla kronik karaciğer hastalığı zemininde gelişmekte olup karaciğer sirozu ve NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) HCC'nin en önemli risk faktörüdür (19). Etkin tarama ve tanı stratejilerinin olmaması nedeniyle HCC olgularının çoğu ileri evrede tanı almakta olup tedavi imkânları kısıtlı olmaktadır (20). Bu durum ise hastaların prognozunu kötü yönde etkilemektedir (20, 21). HCC ile ilişkili ölüm oranı, malign tümörlerle ilişkili tüm ölüm oranlarının ikinci en yüksek oranıdır ancak ileriye dönük projeksiyonlar 2020 yılından sonra ölüm oranlarında birinci sıraya yerleşeceğini göstermektedir. HCC, dünyadaki en yaygın beşinci malign tümördür (11, 22). Dünya çapında önemli bir sağlık sorunu olan HCC insidansı, ilerleyen yaşla birlikte tüm popülasyonlarda artış göstermekte olup 70 yaşına gelindiğinde zirveye ulaşmaktadır ancak Afrika gibi endemik olduğu bölgelerde görülme sıklığının zirve yaptığı yaş beşinci dekada kadar gerilemektedir (23, 24). Hepatokarsinogenez adım adım gelişmektedir. Viral enfeksiyonlar ya da hepatosteatozun sebep olduğu kronik karaciğer inflamasyonu sonucunda ilk aşamada karaciğer hasarı, fibroz ve siroz oluşup son olarak ise rejeneratif süreçler nedeniyle indüklenen hepatosit proliferasyonu sonucunda biriken DNA hasarı sonucu displazi ve karsinoma *in situ* sekansı gelişerek HCC oluşur (25).

HCC gelişimi için siroz (fibrozis sonucu ortaya çıkan kronik karaciğer hasarı), HBV (hepatit B virüsü) ve HCV (hepatit C virüsü), alkol kullanımı ve metabolik sendrom gibi bir takım risk faktörleri olduğu bilinmektedir. Uzun süre tütün mamüllerine maruziyet ve saklanma koşullarından olayı bazı gıda ürünlerinde ortaya

çıkan küf mantarlarının salgıladığı Aflatoksin B1 gibi kanserojenlerin alımı da önemli risk faktörleri arasında yer almaktadırlar (26).

Aspergillus flavus ve *Aspergillus parasiticus* türü mantarlar tarafından üretilen mikotoksinlerden biri olan aflatoksin B1'in diyet yoluyla alımı Asya'da ve Afrika'nın tropikal bölgelerinde oldukça yaygın görülen bir durumdur. Uluslararası kanser araştırmaları ajansı (IARC: International agency for research on cancer) tarafından grup I karsinojen olarak tanımlanan Aflatoksin B1'in karsinojenik etkilerinin yanında aynı zamanda toksijenik, mutajenik ve teratojenik etikili olduğu bilinmektedir. Aflatoksin B1'e maruziyet genellikle kontamine tahıllarla oral yolla alımı ile gerçekleşir ve hepatik sitokrom p450 (CYP450) tarafından metabolize edilmektedir.

Tütün tüketimi karaciğer fibrozunun hızlanmasına katkıda bulunarak HCC'nin başlamasını gerçekleştirir ve uzun süreli tütün kullanımı HCC ile yakından ilişkilidir. Sigara içimi hepatokarsinojenlerin (örneğin, asetilaminofloren ve 4- aminobifenil) vücuda girişine neden olmakta ve bu durum proinflamatuvar sitokinlerin üretimini arttırmaktadır. Bu durumda ise oksidatif stresi indüklenerek lipid peroksidasyonunu tetikler (15). Yaklaşık olarak %80–90 birçok HCC vakası siroz sebebiyle gelişmektedir (27). Siroz zemininden gelişen HCC nedenleri arasında öncelikli olarak alkol kullanımı gelmekte iken NASH (non-alcoholic steatohepatitis), alfa-1 antitripsin eksikliği ve hemokromatoz da etkili sebepler arasında yer alır. HBV, HCV veya siroz zemininde gelişmeyen HCC'lerde diğer etiyolojik ajanlar arasında AAV2 (Adeno-associated virus type 2) genomunun tamamı veya bir kısmının insan genomunda CCNA2, CCNE1, KMT2B ve TERT gibi protoonkogenik genlerin çeşitli ekzonlarına entegrasyonu sonucu bu genlerin promotör bölgesinin aktivitesinde artış saptanmıştır ve bu da HCC riskini arttırmaktadır (26, 28).

HCC'nin gelişimi ile ilişkili olarak bilinen iki ana virüs vardır. Bunlar HBV ve HCV virüsleridir. HBV, hem doğrudan hem de dolaylı mekanizmalar yoluyla HCC gelişimine katkıda bulunur (29). Son verilere göre, HBV dünya çapındaki tüm HCC vakalarının yarısından fazlasından sorumludur ve bu da HBV'yi tütünden sonra en yaygın ikinci kanserojen yapmaktadır (30, 31). HBV'ye atfedilebilen HCC oranı, HBV enfeksiyonunun coğrafi dağılımını yansıtır ve ABD'deki tüm HCC vakalarının %20'sinden azını ve Çin ve Uzak Doğu'daki olguların yaklaşık %65'inden sorumlu olacak şekilde önemli ölçüde değişir. Avrupa, düşük riskli ve yüksek riskli olarak ikiye ayrılmıştır (32). Kronik HBV taşıyıcıları, enfekte olmayan popülasyonlardan 10-25 kat daha yüksek yaşam boyu HCC geliştirme riskine sahiptir (33). Alkol, NASH ve

HCV'nin neden olduğu HCC vakalarıyla karşılaştırıldığında, HBV ile ilişkili HCC hastaları ilk başvuruda daha gençtir. HBV ile ilişkili HCC hastalarının yaklaşık üçte birinde siroz görülmezken, diğerk risk faktörlerinin neden olduğu HCC vakalarının yaklaşık %80'inde kanser siroz zemininden gelişir (29). Uzun süreli HBV maruziyeti ve erkek cinsiyet, uzun süredir artmış HCC riski ile ilişkilendirilmiştir (34). Alkol tüketimi HCC üzerinde oldukça etkili bir mekanizmaya sahiptir ve HBV'nin karsinojenik riskini iki kattan fazla artırmaktadır. Tütün kullanımı ayrıca HBV ile ilişkili sirozu olan hastalarda artan HCC riski ile bağlantılıdır ve bu, sigara içme ve kanser riski arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Asya ve Afrika'nın bazı subtropikal bölgelerinde, HBV enfeksiyonu ile birlikte aflatoksin B1 maruziyeti, olağanüstü yüksek bir HCC sıklığına neden olur (30, 35, 36). Ek olarak, HBV replikasyonu, HBV genotipi ve HBV genomik mutasyonlarının tümü, HCC gelişme riskini artırır. Klinik ortamda, yüksek serum HBV DNA seviyeleri, karaciğerk hasarının ilerlemesi, siroza gelişimi ve HCC gelişimi ile ilişkili olduğu raporlanmaktadır (37, 38). HBV enfeksiyonu, karaciğerde önemli morbidite ve mortaliteye neden olan küresel bir halk sağlığı sorunudur. HBV, cinsel temas, iğnelerin, şırıngaların veya enjeksiyon için kullanılan diğerk herhangi bir ekipmanın paylaşılması yoluyla veya doğum sırasında bir anneden bebeğine vertikal yolla yayılabilir. Enfeksiyon ve kronik HBV taşıyıcılığı aşılama ile etkili bir şekilde önlenabilir. Kronik olarak enfekte hastalarda hastalığın progresyonu için ana risk faktörü, yüksek serum HBV DNA seviyeleridir; ancak diğerk klinik ve viral parametreler de hastalığın seyrini etkiler. Karaciğerk biyokimyası, virolojik belirteçler ve abdominal ultrasonografiye ek olarak, karaciğerk fibrozunun non-invaziv bir değerlendirmesi temel bir değerlendirme yöntemi olarak ortaya çıkmaktadır (39). Bir HBV enfeksiyonuna ne kadar erken maruz kalınırsa, kronikleşme olasılığı o kadar yüksektir (40). Kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyri ve hastalık seyri, virüs ile konakçının bağışıklık tepkileri arasında dinamik bir etkileşimi içerir ve bu nedenle büyük ölçüde değişebilir. Raporlanan araştırmalara göre değişmekle birlikte, HBV'li birçok hasta siroz, siroz komplikasyonları ve HCC geliştirirken, diğerkleri antiviral tedavi gerektirmeyen ömür boyu sakın hastalık aktivitesine sahiptir (39). Epidemiyolojik çalışmalar, başta HBV gibi hepatotropik virüsler olmak üzere birçok risk faktörünün HCC gelişiminde etkisi olduğunu göstermiştir. HBV enfeksiyonunun arka planından HCC gelişimi için üç temel mekanizma öne sürülmüştür. Birincisi, HBV enfeksiyon sürecinde kronik inflamasyon ve hepatosit rejenerasyonunun gelişmesi, ikincisi, HBV DNA'nın konakçı genoma entegrasyonu sonucu proliferasyondan sorumlu konakçı genlerin aktivasyonu ve

üçüncüsü ise; HBV ilişkili proteinler (HBx protein vb.) hücre proliferasyonunu destekler (41). Bu önemli sonuçlar, HBV ile ilişkili HCC'nin sadece klinik bir hastalık olarak değil; aynı zamanda genetik temelli bir hastalık olarak da düşünülebileceğini göstermektedir.

HCV, hepatotropik RNA virüsleri, sadece karaciğeri enfekte eden kan yoluyla bulaşan bir patojendir. HCV ile enfekte olan çoğu insan, enfeksiyonu doğal olarak temizleyemez ve bu da ömür boyu süren kronik bir enfeksiyonla sonuçlanır. HCV'nin neden olduğu uzun süreli karaciğer iltihabı, fibroz, siroz ve HCC gibi ileri karaciğer hastalıklarının başlamasına yol açar. Şu anda yaklaşık 71 milyon insan HCV ile enfektedir, ancak enfekte olanların sadece %20-30'u karaciğer sirozu geliştirir ve sirozlu hastaların %1-4'ünde her yıl HCC geliştirir (42, 43). Çoğu durumda, HCC siroz zemininde gelişir (44). HCV enfeksiyonunun, HCC gelişen hastalarda siroz olmadan doğrudan HCC'yi indükleyebileceği bildirilmiştir (45). Kronik HCV enfeksiyonu, Batı ülkelerinde HCC'nin önde gelen nedenidir ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki HCC vakalarının yaklaşık %34'ünü oluşturur (45). HCV ile enfekte hastalarda HCC riski 15 ila 20 kat artar (46, 47). HCV'ye atfedilen HCC'den ölümler son on yılda yüzde 21.1 artmış, bu sırada HCV ve alkol dışındaki nedenlere bağlı HCC'den ölümlerin sabit kaldığı bildirilmiştir (46). HCV ile ilişkili HCC insidansı hem coğrafi konuma hem de etnik kökene göre değişir. HCV, ABD, Avrupa, Japonya ve Güney Amerika'da HCC'nin önde gelen etiyolojisidir, oysa Asya ve Afrika'nın çoğunda HCC'nin birincil nedeni HBV'dir (48). Eşzamanlı karaciğer hastalığı, viral genotip, yaşam tarzı faktörleri, obezite ve diabetes mellitus, kronik HCV enfeksiyonunda HCC gelişimi için en kritik risk faktörleridir (49).

HCV enfeksiyonu, büyüyen bir küresel sağlık sorunudur. HCV birçok ülkede endemiktir, toplum ve sağlık sistemleri üzerinde daha önemli bir yük haline gelmektedir. Siroz ve HCC gibi uzun vadeli sekeller giderek yaygınlaşmaktadır (50). Çoğu durumda, kronik HCV enfeksiyonu yavaş ilerler ve enfeksiyondan sonraki ilk 10-15 yılda (fibrozisin ilerlemesi için kofaktörlere sahip bireylerde bile) sınırlı ileri karaciğer hastalığı meydana gelir. Bu nedenle, morbidite ve mortaliteyi belirleyen temel faktörler, hastanın yaşı ve kronik HCV enfeksiyonu geçirme süresinin uzunluğunu içerir (51). Kronik HCV enfeksiyonu, immün toleransın bozulmasına neden olarak karaciğerde uzun süreli bir inflamatuvar yanıtı neden olur. Çok çeşitli viral olmayan ajanlar hücresel strese ve karaciğer hasarına neden olarak steril kronik enflamasyona neden olur. Hasara neden olan ajanlar veya stres faktörleri, hasarın erken evrelerinde

ortadan kaldırılırsa, karaciğerdeki fonksiyonel ve morfojenik değişiklikler geri dönüşümlüdür. Kronik hasarın devam etmesi, karaciğer fizyolojik adaptasyondan patolojik adaptasyona geçerken geri dönüşü olmayan zararlara neden olabilir. Karaciğer sirozu, yaralanmadan kaçmak için karaciğer parankiminde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olan hücresel strese patolojik bir adaptasyondur. Virüs enfeksiyonuna hücresel adaptasyon, stresin doğasına ve şiddetine bağlı olarak geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüzdür (42).

Kanser araştırmaları tümör dokusunun heterojen olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni farklı kanser hücrelerinin klonal ekspansiyonla çoğalarak zaman içinde genetik ve epigenetik değişiklikler geçirdiğini göstermektedir (52). HCC fizyopatolojisinde etkili moleküler mekanizmalar oldukça karmaşıktır. Ancak moleküler biyolojik tekniklerde elde edilen gelişmeler sayesinde HCC gelişimi ve progresyonu ile ilişkili moleküler yollar aydınlatılmaya başlanmıştır. HCC olgularının %80'inden fazlasında telomeraz aktivasyonu, viral genomun konakçı DNA'ya entegrasyonu, kromozom translokasyonu, ve çeşitli protoonkogenlerde görülen amplifikasyonlar gözlenmektedir (53). HCC olgularının %30-50'inde CTNNB1 sinyal yolağında görülen mutasyon sonucu gen ekspresyonunun arttığı görülmüştür (54). Bahsedilen artmış ekspresyonun sonucunda WNT/ β -catenin yolağının aktive olduğu tespit edilmiştir (54). Bunun yanında WNT/ β -catenin yolunun baskılayıcı genleri olan APC ve AXIN-1'de baskılayıcı mutasyonların varlığı bildirilmiştir (54). Ayrıca hücre döngüsünden sorumlu TP53 (p53), RB1, CCNA2, CCNE1, PTEN, ARID1A, ARID2, RPS6KA3 veya NFE2L2 gibi genlerin ekspresyonunda da çeşitli değişiklikler saptanmıştır. Epigenetik kontrol mekanizmaları, oksidatif stres ile ilişkili genler ile AKT-mTOR ve MAPK yolağı ile ilgili gen mutasyonlarının varlığı da HCC patofizyolojisinde etkin olarak saptanmıştır (55). Kromozomal değişiklikler genellikle CCND1, FGF19, VEGFA, Myc ve MET gibi protonkogenlerin olduğu kromozomlarında fokal amplifikasyonlar gözlemlendiği ve gen ekspresyonunun artmasıyla sonuçlandığı da bildirilmiştir (56).

Bütün bunların yanında ailevi görülen HCC olgularından sorumlu çeşitli gen mutasyonları da bildirilmiştir. Bunların başında hemokromatozis geni (HFE), α -1-antitripsin eksikliği geni (SERPINA-1), glikojen depo hastalığı genleri (G6PC, SLC37A4), porfiria geni (HMBS, UROD), tirozinemi geni (FAH), Wilson hastalığı geni (ATP7B) bulunmaktadır. HLA gen lokuslarında (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, MICA) görülen SNP'lerin (tek nükleotid polimorfizmleri; single nucleotide polymorphism) HCC'ye yatkınlığı arttırdığı bildirilmiştir ve bu polimorfizimlerin de

ailevi geçiş göstermektedir (57-62). HCC'ye olan yatkınlığı arttıran diğeri SNP'ler arasında UGT1A ve MnSOD, IL-1 β polimorfizmleri gelmektedir (63). Özellikle Asya popülasyonunda HCC yatkınlığını arttıran önemli SNP'lerden biri RS17401966'dir, kromozom 1p36.22'de bulunmaktadır ve bu lokuta çok önemli bir tümör baskılayıcı gen olan KIF1B (Kinesin family member 1B) bulunmaktadır (64).

Genetik fizyopatolojik mekanizmalar bireysel genetik değışikler ile açıklanamayacak kadar karmaşıktır. Genellikle birden çok risk faktörünün birlikte görülmesi ile HCC gelişimi gerçekleşmektedir. Örnek olarak; PNPLA3 geninde var olan RS738409 SNP hem NASH'e eğilimi arttırmaktadır hem de HCC için risk faktörü oluşturmaktadır (65). Aynı şekilde PNPLA3, TM6SF2 ve HSD17B13 gelerindeki SNP'ler kronik alkolizm ve NASH zemininde gelişen HCC için risk faktörü oluşturmaktadır (66, 67). Aynı şekilde GSTT1 geninde görülen polimorfizmler de HBV ile enfekte olan hastalarda Aflatoksin B1 maruziyetinde toksisiteyi ve uzun dönemde HCC riskini arttırmaktadır (68). Bütün bu örnekler çevresel genetik etkenlerin etkileşimini net olarak ortaya koymaktadır.

HCC biyolojik davranış olarak birbirinden farklı ve karmaşık hücre gruplarının çoğalması sonucu oluşan heterojen yapıda bir tümördür. Bu durumun birçok sebebi olmakla birlikte kanser kök hücreleri temel nedenidir. Kanser kök hücreleri özellikle agresif tümör biyolojisi ve tedaviye direnci belirleyen kendi kendine yenileme ve tümör hücrelerinin rejenerasyonundan sorumlu metabolik olarak stabil ve hipoksi, oksidatif stres gibi durumlara ileri derecede dirençli hücre gruplarıdır. Bu hücreler genellikle santral ven etrafında bulunan LGR5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5) pozitif hepatositlerden ve disse aralığında bulunan EpCAM-1 (Epithelial cell adhesion molecule-1) pozitif duktal hücrelerden köken almaktadır (69, 70).

Genellikle kronik hasar ve inflamasyon sonucu hepatik progenitör hücrelerin devreye girmesi ile rejeneratif nodüllerde proliferasyon uyarılır ve biriken DNA hasarı ve epigenetik değışikliklerle displazi-karsinom değışimi gözlenir (71). Bu aşamada tümör içindeki hücre alt toplulukları farklı genetik ve epigenetik mekanizmalarla birbirinden farklılaşır ve ayrı özellikler göstermeye başlar. Her bir hücre grubu kendine özgü kanser kök hücrelerinden köken almaktadır (72, 73). Bu sözü edilen süreçler biyolojik olarak süreklilik arz etmekte ve karaciğerin birçok farklı bölümünde ve hatta aynı anda çeşitli oranlarda meydana gelebilmektedir (69, 70).

2.2. HCC ve Genomik İlişkisi

Genetik değişikliklerin HCC'nin ortaya çıkışı ve gelişimindeki etkisi karmaşık mekanizmalar ile düzenlenmektedir. Bunun yanında genetik faktörlerin hiçbirisi tek başına HCC fizyopatolojisinde rol almadığı ve dolayısıyla HCC'nin gelişmesi ve tümörün biyolojik davranışında epigenetik ve genetik değişimlerin kümülatif etkisinin daha fazla rol aldığı anlaşılmaktadır. Bir başka ifadeyle; çevresel, epigenetik ve genetik faktörler arasındaki etkileşimlerin HCC oluşumunda etkili mekanizmaların çalışmasına katkıda bulundukları düşünülmektedir. HCC gibi birçok kanserojen ve kronik hastalıkta genetik faktörlerin rolünü belirleyebilmek amacıyla 2000 yılında temelleri atılmış tüm genom ilişki çalışmalarda (GWAS; Genome-wide association studies; Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları) gelişmeler sonucunda 2007 yılından itibaren genetik çalışmalarının ufkunu değiştirebilecek birçok anlamlı sonuç ortaya çıkarılmıştır (74). Tüm genom ilişki çalışmaları genetik varyasyonları tanımlayıp belirleyebilmek için yapılan oldukça büyük çalışmalardır. Bu çalışmalarda birçok gen aynı anda incelenebilmektedir. Özetle; GWAS ile tüm genomun dizilemesi yapılarak ve hastalıkta rol alan tüm gen gruplarının ekspresyonunda ve çalışmasında nasıl değişimler olduğu saptanmıştır. GWAS teknik olarak mikrodizi (microarray) teknolojisi yardımıyla mikroskobik bir alan büyüklüğüne sahip bir DNA dizisinde 500.000 ile 2.000.000 arasındaki SNP birlikte değerlendirilebilmektedir. Tüm genom ilişki çalışmalarının çoğunluğu vaka-kontrol çalışmaları olmakla birlikte; bu çalışmalarda DNA izole edilerek çoğaltılmakta ve her bireyin mikro DNA dizileri analiz edilmektedir. Böylece iki grup arasındaki genotip farklılıkları aleller düzeyinde biyoistatistiksel analizler kullanılarak değerlendirilebilmektedir.

2014 yılında Ngamruengphong ve arkadaşları (75) tarafından organize edilen ve daha sonra akademik bir rapor olarak yayınlanan çalışma HCC ile yapılan en büyük SNP çalışması özelliğini taşımaktadır. Bu çalışmada antropolojik olarak farklı 53 milliyetten oluşan insan popülasyonu kullanılmıştır. Bugüne kadar yapılmış olan bütün çalışmalarda HCC ile ilgili olan SNP'ler analiz edilmiştir. Çalışmanın sonucunda HCC gelişmesinde risk artışıyla ilişkili beş farklı SNP saptanmıştır. HBV ile ilişkili HCC olgularında KIF1B geninde yer alan RS17401966 numaralı SNP ve CRHR2 geninde yer alan RS2267716 numaralı SNP polimorfizmi saptanmıştır. Ayrıca HCV ile ilişkili HCC olgularında MICA geninde yer alan RS2596542 numaralı SNP ve HLA DQ/DR geninde yer alan RS9275572 numaralı SNP polimorfizmi saptanmıştır. Son

olarak, alkol ve HCV ile ilişkili HCC olgularında ise HFE geninde yer alan RS1800562 numaralı SNP polimorfizmi saptanmıştır. KIF1B geninde RS17401966 numaralı SNP'nin AA alelinde bulunması HCC gelişme riskini arttırdığı saptanmıştır. Bu durum SNP alellerinin coğrafi olarak farklılık göstermesi ile daha da karmaşık bir hal almaktadır. Özellikle Avustralya, Orta Asya ve Amerika'da alel sıklığında değişiklikler en yüksek oranda saptanmıştır (75).

Kinezin protein ailesini bir üyesi olan ve 1B proteinin yapılma sürecini yöneten KIF1B geni, 1. kromozomun kısa kolu 36. lokusu 22. pozisyonunda yer alır. Bu 1B proteini hücre içi maddelerin transportu için gerekmektedir. Kinezin proteinleri bir kargo treninin vagonları gibi işlev görmekte olup, taşıdıkları maddeye göre yapıları belirlenmektedir. Araştırmalara göre KIF1B proteini iki farklı transport için özelleşmiştir. Nöronlarda bu protein sinirsel uyarılarının transmisyonu için gerekli olan materyalleri içeren sinaptik vezikülleri taşır. Bir başka görevi ise diğer tüm hücrelerde enerji sağlayan mitokondrileri taşımaktır (76, 77). Bu iki taşıma görevine ek olarak bir tümör supressör gen olarak KIF1B proteini programlı hücre ölümünde yani apoptoz görev almaktadır (78). Apoptoz yaşam boyu gerekli olan bir işlem olup kullanılmayan hücrelerin ortadan kaldırılması olayıdır. Apoptozdaki enerji sağlanması işlemi için mutlaka gerekli olan bu proteinde oluşacak yapısal bozukluklar durumunda birçok kanser türü için risk oluşturabileceği gösterilmektedir (78). Literatüre bakıldığında HBV veya HCV'ye sekonder HCC ve KIF1B (RS17401966) ilişkisi ile ilgili farklı çalışmalara rastlanılmış olup, bunların çoğu HBV ilişkilidir. Ancak HDV (hepatitis D virus)'ye sekonder olarak gelişen HCC ile ne KIF1B (RS17401966) ilişkili ne de herhangi bir SNP çalışması saptanmamıştır. Bunun nedeni ise öncelikle SNP çalışmalarının oldukça büyük popülasyonlarda yapılması ve genellikle HDV sekonder HCC hastalarının tüm dünyada nadir olarak bulunmasıdır. Bu sebeple araştırmacılar kronik HDV seyri ve tedavi etkinliğine yönelik SNP çalışmaları yapmışlardır (79-81). Zhang ve arkadaşlarının (64) Güney Çin'de yaptığı çalışmada 355 HBV ilişkili HCC ve 360 kronik HBV taşıyıcıları hastasını değerlendirip 490794 farklı SNP test etmişlerdir. Değerlendirilen SNP'ler arasında sadece RS17401966 SNP ile HCC gelişimi arasında anlamlı olan bir bağlantı kurulmuştur. Bundan dolayı KIF1B geninin kronik HBV hastalarında HCC gelişiminde etkili olabileceği düşünülmüştür (64). Sonrasında ise Sawai ve arkadaşları (82) Japonya, Kore ve Hong Kong'dan dâhil ettikleri üç farklı kohorttan oluşan HBV sekonder HCC hastalarında KIF1B (RS17401966) genini değerlendirmişlerdir. Fakat değerlendirilen çalışmada hiçbir kohortta anlamlı bir ilişki

bulunamamıştır. Bunun başlıca nedeni ise kullanılan üç farklı popülasyon arasında yer alan genetik çeşitliliğin farklı olması veya çevresel toksinler, yaş, cinsiyet, alkol alımı, HBV viral yük, genotip ve farklı mutasyonlar gibi hepatokarsinogeneze yer alan multifaktörler olduğu düşünülmüştür (82). HCC hastalarındaki doku düzeyi ile yapılan bir çalışmada; HCC ve tümöre komşu karaciğer dokuları değerlendirilerek KIF1B proteini ve mRNA (messenger RNA) düzeyleri incelenmiştir. Sonuçta rekürrens HCC gelişen hastaların tümör hücrelerinde rekürrens gelişmeyen hastaların tümörlü hücrelerindeki göre daha az düzeyde KIF1B proteini saptanmıştır. Aynı zamanda damar invazyonu gözlenen tümör hücrelerinde yine KIF1B protein düzeyinin daha az miktarda olduğu görülmüştür. HCC dokuları ve tümöre komşu karaciğer dokularından sentezlenen KIF1B mRNA ekspresyon oranına bakıldığında genç sağ kalımda (13.5- 20 ay, $p<0.05$) ve hastalısız sağ kalımda (11.5- 19.5 ay, $p<0.05$) anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Sonuç olarak HCC dokularındaki KIF1B gen ekspresyonunun düşük olmasının kötü prognozla ilişkili olduğu neticesine ulaşılmıştır. KIF1B'nin HCC tümör davranışı üzerindeki etkisi ile ilgili ileride yapılacak klinik çalışmalar KIF1B geninin prognostik bir belirteç olarak kullanılmasının önünü açabilir (83). Son yıllarda yapılan çalışmalarda RS17401966 SNP'sinin yanında ek olarak farklı polimorfizmler de değerlendirilmiş. HBV sekonder HCC hastalarında RS1042522 ve RS2279744 SNP'lerinin hem homozigot hem de heterozigot olan hastalarda HCC riskinde anlamlı derecede artış saptanmış ve riskin 2.68 kat artırdığı bulunmuştur (84).

2.3. Epigenetik Terimi

Etimolojik köken bakımından incelenecek olursa genetik ötesi, genetiğe ek veya genetiğin üzerinde (epi: üstünde, üst, genesis: köken, kök) anlamlarına sahip olan epigenetik terimi 1942 yılında Conrad Waddington tarafından 'fenotipin oluşumuna katkıda bulunan genler ve bu genlerin ortaya çıkardığı ürünleri arasında yer alan mevcut ilişkiyi ve gelişim sırasında genotipin, fenotipi nasıl oluşturduğunu inceleyen biyoloji dalı' olarak tanımlanmıştır (85). Kısacası epigenetik; bireylerde fenotipik farklılıkları ortaya koymak adına genetiğe ek olarak işlev gören mekanizmaları tanımlamak amacıyla kullanılmıştır (86). Bu tanım ilk başlarda sadece embriyonik dönemde yer alan gelişimler için kullanılmış olsa da, yapılan çalışmalarla epigenetiğin oldukça fazla biyolojik süreçte önemli rol oynadığı anlaşılmıştır. Günümüzde epigenetik, birincil DNA dizisinde değişiklik oluşturmadan gen ekspresyonunu değiştiren ve bunun sonraki nesillere aktarıldığı kalıtsal mekanizmalar olarak tanımlanabilir (87, 88).

Memelilerde epigenetik mekanizmalar normal gelişim düzeyi açısından ve doku spesifik ekspresyonun devamının sağlanabilmesi açısından gereklidir. Doku spesifik epigenetik mekanizmalar değişken bir yapıda olup, sadece gelişim döneminde gözlenmeyip, hayat boyunca özel hücresel olaylarda gözlenmekte ve uyarlanmaktadır (88).

Epigenetik bilgi aslında DNA'nın yazımı hatta tam olarak alfabesi, dilbilgisi kuralı olarak düşünülebilir. Gerçekleşen epigenetik değişimlerden dolayı birincil DNA dizilimleri aynı olan kişilerde (tek yumurta ikizi veya klonlar) fenotipik farklılıklar gözlenebilmektedir. Tanımlanmış başlıca epigenetik mekanizmalar DNA metilasyonu, histon modifikasyonları yani histonlarda translasyon işlemi sonrası gerçekleşen değişiklikler ile kromatin yapı değişiklikleri ve ncRNA'ların (non-coding RNA) neden olduğu mekanizmalar olarak üç farklı grupta sınıflanmaktadır. Çalışmalar bireylerin ebeveynlerinden kalıtım yolu ile aldığı bu epigenetik değişiklikleri çevresel faktörlerin etkisiyle kendine sonraki nesillere aktarabildiğini ve bu kalıtımın da çevresel faktörler nedeniyle farklılıklar gösterebileceğini göstermektedir (89). Bu tanımlamalara dayanarak epigenetik; mutasyonlar ve polimorfizimlerden farklı olarak DNA diziliminden bağımsız olarak gerçekleşen ve gen ekspresyonunda meydana gelen kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır. Epigenetik olarak ortaya çıkan değişimler, DNA dizisinde bir değişiklik oluşturmazlar ve geri dönüştürülebilir oldukları için genetik değişimlerden farklıdır (90, 91). Epigenetik mekanizmalar, çevresel faktörlerin bireyin kalıtsal özelliklerini nasıl etkilediğini gösteren en önemli mekanizmadır.

Epigenetik mekanizmaların kalıtımla aktarıldığına dair ilk bulgulara toplum sağlığı kayıtlarının incelenmesi ile ulaşılmıştır. İkinci Dünya Savaşı'nın gerçekleştiği yıllarda Hollanda'da tarihte "açlık kışı" olarak bilinen kıtlık olduğu sıralarda hamile olan kadınların, onların çocukları ve torunlarının birbirine benzer sağlık sorunlarına maruz kaldıkları dikkati çekmiştir. Kıtlık sürecinde anne karnında olan ve o süreci anne karnında geçiren ceninin doğum sonrası hayatı boyunca vücudunda bulunan yağ ve şeker miktarlarının azalabileceğine koşullanarak genetik programını değiştirdiği belirlenmiştir. Vücuda alınan besinleri depolamanın oldukça hayati olduğunu öğrenen sürekli depolama eğilimine yönelen genetik yapı, bu bireyleri sonraki yıllarda zamanla yüksek kan basıncı, obeziteyle birlikte çeşitli kalp rahatsızlıklarıyla karşı karşıya bırakmıştır. Bu bulgular, hamilelik sırasında belirli bir zaman dilimi ve ortak koşullar altında birlikte yaşayan üç kuşağın (anne, fetus ve fetusun germ hücreleri) çevresel etkenlere bağlı genetik değişikliklerden benzer şekilde etki gördüklerinin kanıtı olarak

görülmüştür (92). Tanımlanmış başlıca epigenetik mekanizmalar DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, yani histonlarda translasyon işlemi sonrası gerçekleşen değişiklikler ile kromatin yapı değişiklikleri ve ncRNA'ların neden olduğu mekanizmalar olarak üç farklı grupta sınıflanmaktadır.

2.4. DNA Metilasyonu

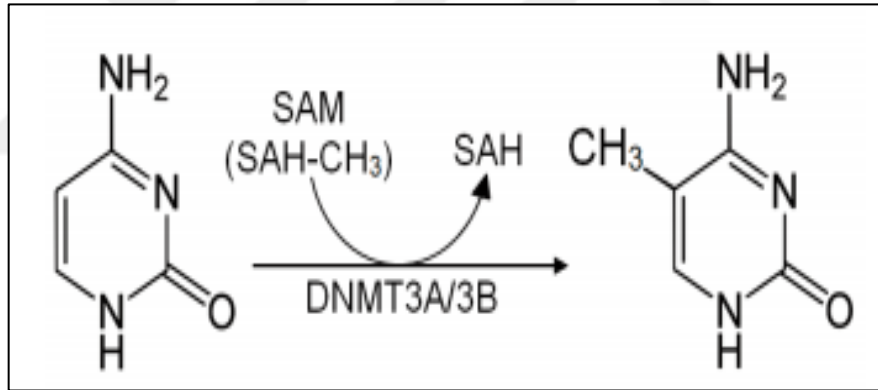
DNA metilasyonu ilk olarak 1980'lerin başında tanımlanmış olup insanlarda epigenetik mekanizmalar arasında en iyi şekilde incelenen ve yapısı ortaya konan mekanizmadır (93). DNA metilasyonu memelilerde gelişim için oldukça gerekli olan bir modifikasyon türü olup gen baskılanması olayının sağlanması, X-kromozom inaktivasyonu, kromatin kararlılığının korunması, embriyonik gelişim, transkripsiyon, kromatin yapısı, genomik "imprinting" in düzenlenmesi gibi birçok biyolojik süreçte fonksiyon göstermektedir (86).

DNA metilasyonu, DNMT (DNA methyltransferase) enzimlerinin katalizörlüğü eşliğinde gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda bir metil grubunun (-CH₃) bir CpG (cytosine-phosphate-guanine) dinükleotidindeki sitozinin 5' karbon molekülüne eklenmesi ile gerçekleşen kovalent bir olay olarak tanımlanır. Bu gerçekleşen kovalent olay gen ekspresyonunu değiştirerek hücre fonksiyonlarının farklılaşmasına yol açmaktadır. Metilasyon, genetik olarak özdeş/aynı bireyler arasında oluşan fenotipik farklılaşmanın yanı sıra çevresel faktörler ile kalıtsal özelliklerin etkileşimini ve bu değişikliklerin nasıl kalıtsal nitelik kazandığının anlaşılması aşamasında da oldukça kritik rol oynamaktadır (87, 94).

CpG dinükleotidlerinin genomda bulunma dağılımları rastgele olmayıp bunların %50-60'ı gen promotor bölgeleri içerisinde yer almaktadır. CpG olarak adlandırılan bu adacıklar gelişim evresi ve doku farklılaşması esnasında genellikle metilasyona uğramamış haldedir (95). Fakat bazı CpG adacıklarının X kromozom inaktivasyonu ve dokuya özgü çeşitli genlerin inaktivasyonun olduğu bazı biyolojik ve gelişimsel olayların gerçekleşmesi esnasında kalıcı olarak metilasyona uğradığı bildirilmiştir (96).

Canlılarda birçok çeşit metil transferaz enziminin varlığı bildirilmekte olup ancak ökaryotlarda tanımlı olup bilinen beş farklı DNMT bulunmaktadır (94). Bunlar; DNMT3L, DNMT3B, DNMT2, DNMT3A ve DNMT1'dir. Gametogenez, embriyogenez ve somatik doku gelişimi esnasında metilasyon deseninin oluşumundan DNMT3L, DNMT3A ve DNMT3B sorumludur. DNMT3A ve DNMT3B *de novo* (yeniden) metilasyonu gerçekleştirmektedir. *De novo* DNA metilasyon deseni oluşumu

esnasında metillenmemiş DNA substrat olarak görev almaktadır. Embriyonik kök hücre ve erken embriyo gibi durumlarda DNMT3A ve DNMT3B'nin inaktive edilmesi durumunda *de novo* metilasyon deseni eksikliği görülür (94). DNMT3L ise diğer *de novo* metiltransferazlara yardımcı bir protein olarak bilinir. DNMT'de aktif bölge motifleri yoktur. Bu nedenle fonksiyonlarını gerçekleştirmesi diğer *de novo* metiltransferazlarla birlikte bulunmasına bağlıdır (97). DNMT1 enzimi, replikasyon olayı esnasında tek zinciri metillenmiş olan DNA'nın yeni zincirinin de metillenmesi olayını gerçekleştirmektedir. Yani, DNMT1 enzimi, kalıp olarak alınan DNA iplikçiğinde varolan metilasyon deseninin yeni sentezlenecek zincire de işlenerek aktarılması olayını gerçekleştirir (94). Bu sayede DNA metilasyonu kalıtsal olarak aktarılabilir ve epigenetik bir olay olarak nesilden nesile kalıtılır. Diğer bir transferaz enzimi olan DNMT2'nin ise DNA hasarı tespit edilmesi, DNA rekombinasyonu ve mutasyon tamiri gibi işlevlerde görev aldığı düşünülmektedir (97). DNA metilasyonuna ait mekanizma Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. DNA Metilasyonu

2.4.1. DNA Metilasyonu ve Gen Ekspresyonu Arasındaki İlişki

DNA metilasyonu canlılarda dokuya özgü gen ekspresyonu işlevlerini düzenlemek, retroviral elementlerin susturulması, genomik baskılama ve X kromozomuna ait inaktivasyonun düzenlenmesi için gerekli olan bir olaydır. Farklı genomik bölgelerde gerçekleşen DNA metilasyonu, bölgeye özgü altta yatan genetik dizilemeye bağlı olarak gen aktiviteleri üzerinde oldukça farklı etkiler ortaya koyabilir (98). CpG adalarında gerçekleşen metilasyon, transkripsiyon faktörü bağlanma işlevini bozabilir, baskılayıcı metil bağlayıcı proteinlerin devreye girmesini sağlayabilir ve gen ekspresyonu gerçekleşmesini susturabilir. CpG adalarında gerçekleşen DNA

metilasyonunun gen ekspresyonuna ne boyutta katkı sağladığını belirleyebilmek için oldukça fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Memeli genomunda yer alan CpG adacıklarının çoğu metillenebildiğinden, genlerin kodlayan bölgelerinde de metilasyon gözlenebilmektedir. Metilasyon ister promotör bölgeler gibi gen regülasyon bölgesinde olsun ister gen gövdesinde olan ekzon bölgelerinde olsun genellikle gen ekspresyonunun baskılanması ile beraber olmaktadır. Ancak farklı genlerin birbiriyle olan ilişkisi göz önünde bulundurulacak olursa elde edilen biyolojik cevap karmaşıktır. Örnek vermek gerekirse; bir tümör baskılayıcı gende gerçekleşen metilasyon sonucu inaktivasyon bu genin kontrol ettiği proto-onkogen ekspresyonunda artışa neden olmakta ve bu da biyolojik cevabı değiştirmektedir. Bu durumda söz konusu süreç bu perspektiften incelendiğinde araştırmaların tespit ettiği bireysel sonuçlardan daha da karmaşık bir hal almaktadır (99, 100).

2.4.2. Transkripsiyonun Kontrolü ve Farklı Metillenen Bölgeler (DMRs: Differentially methylated regions)

Canlıdan türlerinde ve dokulardan dokulara değişim göstermekle birlikte omurgalı DNA'sında yer alan CpG baz çiftlerinin %70'inden fazlası metillenebilme yeteneğine sahiptir. Bunlar, DMRs şeklinde tanımlanmakta olup, toplam genomun yaklaşık olarak %1'ine karşılık gelen sayıda olan metillenmiş sitozinlerin ise genlerin promotör bölümleriyle ilişkili olduğu bilinir (101). Promotör bölümler, gen ekspresyonundaki birincil mekanizma olan transkripsiyonun başlayıp başlamayacağını belirlenmesinden sorumlu alanlardır. Metillenmenin olmadığı durumda promotör dizilerinde bulunan normal sitozinlere transkripsiyon faktörleri bağlanır ve transkripsiyon olayı gerçekleşir. Oysa, bu bölgelerde yer alan CpG adacıklarına bağlanan metil grupları, bağlandıkları baz ya da baz eşleşmelerini etki etmeseler bile yapısal olarak DNA'nın şekil değiştirmesine neden olur ve dışı doğru bir çıkıntı meydana getirerek transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engeller. Bu durum da transkripsiyon ve dolayısıyla da bir sonraki aşama olan translasyonun gerçekleşmesini engellemektedir. Böylece de gen ekspresyonu baskılanmış olur. Farklı metillenmiş bölgelerde bulunan DNA metilasyon desenlerinin belirlenmesi ve ortaya konulması gen ekspresyonu kontrolü bakımından önemlidir (102).

2.4.3. DNA Metilasyonu ve Hastalık İlişkisi

DNA metilasyonunun memeli gelişiminde oldukça önemli birçok genetik olayın gerçekleşmesinde rol aldığı bildirilmiştir. Bu biyolojik etkilerin başında genetik damgalama (imprinting), X kromozom inaktivasyonu, retroviral gibi genetik elementlerin susturulması gelmektedir. Bununla beraber DNA metilasyonunun gen regülasyonunun gerçekleşmesinde de önemli rollere sahip olduğu bildirilmiştir (103). Gende yer alan kodlayıcı bölgede meydana gelen metilasyon düşüşü (hipometilasyon) haberci RNA'nın seviyesinde değişimlere sebep olmaktadır. Gende promoter bölgede yer alan CpG adacıklarında oluşan metilasyon artışı (hipermetilasyon) genin transkripsiyonel açıdan susmasına ve protein ekspresyonunun kaybolması olayına neden olur (104, 105). Pankreatik kanseri oluşumu ve DNA hipometilasyonu ile ilişkinin saptanması amacıyla yapılan bir araştırmada hipometilasyonun pankreatik kanser oluşumu için oldukça sık görülen bir epigenetik mekanizma olduğu belirlenmiştir (106). Otoimmün bir hastalık olan SLE (Systemic lupus erythematosus; Sistemik lupus eritematozus) için uyumsuz olan monozygotik ikizlerle gerçekleştirilen bir araştırmada, hasta ve sağlıklı kardeşler karşılaştırılarak hasta kardeşte global DNA hipometilasyonu belirlenmiştir. Özellikle hastalığın patogeneziyle ilgili olduğu düşünülen 49 genin hasta olan ikizde hipometile olduğu bildirilmiştir (107). Yapılan başka bir çalışmada ise SLE'li hastalarda, genom çapında metilasyon analizi yapılmış ve analizler sonucunda, B hücrelerinde 166 CpG dinükleotit, monositlerde 97 CpG dinükleotit ve T hücrelerinde 1033 CpG dinükleotit metilasyonunda sağlıklı grupla karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik belirlenmiştir. Analizin en çarpıcı sonucu ise üç hücre tipi için de interferon genlerinde hipometilasyon bildirilmiştir (108). Genom çapında DNA metilasyonunun incelendiği bir başka SLE araştırmasında ise hastaların CD4 (+) T hücrelerinde kontrol grubuna göre 236 hipometile ve 105 hipermetile CpG bölgesi belirlenmiştir. Ek olarak hasta grubun da otoimmün sistem ile ilgili olduğu belirlenen PDGFRA, BST2 genlerinde hipometilasyon, T hücre olgunlaşmasına katkı sağlayan bir transkripsiyon faktörü olarak bilinen RUNX3'de ise hipermetilasyon gözlemlendiği bildirilmiştir (109). HCC'de ise bilimsel araştırmalar sınırlı olmakla birlikte tümör ve tümör çevresi dokuda yapılan CpG adacıklarının metilasyon analizi sonucunda önemli tümör baskılayıcı genlerde hipermetilasyon ve baskılanma gözlenmiştir (110, 111). HCC'de metilasyon ile etkilenen TP53 (p53), β -catenin, Erb B reseptörleri, MET, HGF, p16INK4a, E-

cadherin ve COX-2 gibi genler tanımlanmıştır ve genel olarak kanserle gelişimi tetikleyen ana genlerdendir (112).

2.5. Histon Modifikasyonları

Genetik bilgilerin depolandığı DNA; nükleusta histon (H) ve non-histon (non-H) protein yapılarından oluşan kromatin olarak bilinen bir nükleoprotein kompleksi olarak yer alır (113). Histonlar oldukça küçük molekül ağırlıklı yapıda olup, bazik proteinlerdir. Kromatinlerin en küçük fonksiyonel yapıları nükleosomlar olup ikişer molekül histon H2A, H2B, H3 ve H4 proteinlerin ~147 bazlık DNA'nın etrafını iki defa sarması ile oluşmuşlardır (95, 114). Kromatin yapısal olarak iki farklı formda bulunur: heterokromatinler oldukça yoğun, kompakt ve transkripsiyonel bakımdan sessizken, ökromatin gevşek yapıda olup transkripsiyonel açıdan aktif bir durumda bulunmaktadır (95).

Histonların N-terminal kuyruk bölümleri sumolasyon (small ubiquitin-like modifier- SUMO- SUMOylation), metilasyon (methylation), asetilasyon (acetylation), ADP-ribozilasyon (ADP-ribosylation), deaminasyon (deamination), fosforilasyon (phosphorylation), ubikitinasyon (ubiquitination), ve prolin izomerizasyonu (proline isomerization) gibi en az sekiz farklı türde modifikasyon ile posttranslasyonel düzenlenmektedir (115, 116). Bahsedilen bu modifikasyonlar DNA ile histon proteinleri arasında yer alan etkileşimi değiştirebilmektedir (116). Histon modifikasyonları geri dönüşümlü olup dinamik yapıdadır. Histon modifikasyonları tek başına veya kombine bir şekilde DNA tamir ve replikasyonunda, gen transkripsiyonunda, X kromozom inaktivasyonu sağlanmasında ve heterokromatin oluşumu başta olmak üzere birçok epigenetik olayın kodlaması aşamasında görev alırlar (117). Genel olarak histon modifikasyonu gen ekspresyonunun artışı ile sonuçlanmaktadır.

Üzerinde en çok çalışma yapılan histon modifikasyonu türleri asetilasyon ve metilasyondur. Tüm genom çalışmalarında spesifik bir genom bölümünde yer alan çeşitli histon modifikasyonlarının kromatinlerin yapısını "açık" veya "kapalı" duruma getirerek genin aktif veya baskılanmış olmasına neden oldukları belirlenmiştir (95).

Birçok fizyolojik durumda görev alan Histon asetilasyonu dinamik ve reversibl (tersine çevrilebilir) bir durumdur. Genel olarak, histonların asetilasyon düzeyi artış (hiperasetilasyon) durumu ökromatinde bulunur ve transkripsiyon olayı aktif durumdadır. Asetilasyon seviyesinin azalması (hipoasetilasyon) ise heterokromatinde gözlenir ve transkripsiyonel olarak sessiz bilinen genomik alanlarda bulunur (118).

Histon asetilasyonu işleminin gerçekleşmesinden HAT (Histone acetyltransferase) enzimi sorumluyken histon deasetilasyonu işleminden ise HDAC (Histone deacetylase) enzimlerinin sorumlu olduğu kabul edilmektedir (116). Histon modifikasyonları ek olarak demetilaz (demethylases), metiltransferazlar (methyltransferases), deubikitinazlar (deubiquitinases), kinazlar (kinases), ubikitin ligazlar (ubiquitin ligases), fosfatazlar (phosphatases), ve SUMO ligazlar (SUMO ligases) gibi diğer enzimler ile de katalize edilebilir (95). Yapılan ileri teknikli çalışmalar ile kromatinlerde olan değişikliklerin tümörlerin başlangıç evresinde ve ileri aşamaları boyunca gözlemlendiği gösterilmiştir (87). H4 histon proteininde asetilasyonda kayıp ve metilasyonda artış karsinogenez durumlarında erken dönemlerde yaygın olarak görülen bir değişikliktir. Ancak bu durum için önemli olan olay histon asetilasyonundaki azalmadır. Bu durum ise HAT aktivitesinin azlığı veya HDAC aktivitesinin artışı ile ilişkilidir (119).

Birçok kanser türünde HAT ve HDAC aktiviteleri arasında yer alan dengenin bozulması sonucunda oluşan moleküler değişimler görülmektedir. HDAC enzimleri; farklılaşma, apoptoz ve transkripsiyonel sessiz devredeki hücre döngüsü olayı için gerekli olan genleri korumasıyla pro-onkogenik etki göstermektedir (120). HDAC aktivite artışı birden çok mekanizma ile oluşabilmektedir. HDAC aşırı ekspresyonu sonucu global histon hipoasetilasyonu gözlenir ve birçok kanser için bu durum özgün bir mekanizmadır. HDAC alt gruplarının birçok çeşidinin mutasyon ve/veya aberan ekspresyonu kanser dâhil olmak üzere birçok hastalıkta gözlenmiştir (121). Nöroblastoma, prostat, gastrik, kolon, renal, meme, servikal kanser gibi farklı kanser türlerinde ve kanser hücre hatları için HDAC ekspresyon artışı olduğu gözlemlenmiştir (122).

"HDAC inhibitörleri" epigenetik düzenlemedeki etkinlikleri nedeniyle tedavi ajanı olarak tedaviye eklenmiştir (120, 123). Bu tedavi ajanları histonların asetillenmelerini arttırarak, kanser durumunda sessizleşen genlerin tekrar eksprese olup ve malign olan fenotipin geriye döndürülmesini sağlamaktadır (116).

2.5.1. Histon Yapı Değişimleri Hastalık İlişkisi

Genlerin hiperasetilasyon ve hipoasetilasyonlarının birçok hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Birçok çalışma ile de HDAC inhibitörlerinin kanser de dâhil olmak üzere bit çok hastalığın tedavisi amacıyla kullanılabileceği rapor edilmiştir (124). SLE hastalığı üzerine hayvan modeli tasarlanarak yapılan bir araştırmada, TSA (trichostatin A) gibi HDAC inhibitörlerinin SLE'nin tedavisi gelecek vaat ettiği

gösterilmiştir (125). RA (Rheumatoid arthritis; romatoid artrit) hastalığı olanlar ile sağlıklı kontrol grubunun eklemeleri kullanılarak elde edilen sinoviyal dokularda yapılan analizler sonucunda nükleer HDAC aktivitesi ile HDAC1'in mRNA ekspresyon düzeyinin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı bir düzeyde yüksek olduğu rapor edilmiştir (126). RA hastaları ile yapılan bir başka çalışmada ise hasta grubunda HDAC aktivitesinin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış gösterdiği ve bu artış sonucunda RA durumunda HDAC aktivitesinin bozulduğu gösterilmiştir. Bu veriler ile incelenen enzimin hedeflenmiş tedavi için uygun bir aday olduğu gösterilmiştir (127).

Bu modifikasyonların önemi tam olarak açıklığa kavuşturulmamış olsa da lizin asetilasyonu ve metilasyonlarının transkripsiyonel olarak aktivasyon ya da baskılama ile ilgili olduğu belirlenmiştir (128). Lizinin asetilasyon veya deasetilasyonunun gerçekleşmesi kromatinin ulaşılabilir olması ve transkripsiyon durumu ile ilişkilendirilmiş olsa da lizin metilasyonunun gerçekleşmesi için metil gruplarının sayısı ve bunların lizin kuyruklarındaki pozisyonları oldukça önemlidir. Örneğin, H3K9 (histon 3 lizin 9) ve H3K27'deki (histon 3 lizin 27) trimetilasyon heterokromatin modifikasyonuna bağlı iken, H3K4'deki (histon 3 lizin 4) trimetilasyon, H3 (histon 3) ve H4'de (histon 4) gerçekleşen asetilasyon aktif transkripsiyon durumu ve ökromatin modifikasyonu ile ilgilidir (129, 130). RA patogeneğinde mevcut olan epigenetik faktörlerin tanımlanabilmesi adına yapılan bir çalışmada RA hastalarından alınan mononükleer hücrelerin kullanılarak, faktörlerin ekspresyon seviye profilini oluşturmak amacıyla PCR (polymerase chain reaction) tekniği kullanılmıştır. Araştırma sonucunda RA hastalarında; SETD6, SETDB2 ve PRMT6 metiltransferazlar, DZIP3 ve UBE2B protein degradasyon-promoting ubiquitin ligazlar, ESCO2 ve KAT2B deasetilazlar, AURKA, AURKB ve NEK6 histon kinazlar, KDM5C ve KDM6B demetilazlar, HDAC1 ve HDAC11 asetiltransferazlar olmak üzere 14 tane genin ekspresyonunun anlamlı olarak artış ya da azalış gösterdiği bildirilmiştir (131).

Histon modifikasyonları ile kanser arasında da yakın bir ilişki mevcuttur. Kanser araştırmalarında ilk başlarda epigenetik çalışmalara çok önem verilmemiş olmakla birlikte, gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesinin transkripsiyon ve diğer hayati hücresel işlevlerdeki rolü giderek daha iyi anlaşılmaktadır (132). Araştırmalar sonucunda histon modifikasyonunda oluşabilecek ufak değişiklikler ve/veya bozukluklar sonucunda önemli tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonu azalmakta ve buna karşın hücre proliferasyonunu düzenleyen onkogenlerin ekspresyonu artmaktadır.

Dolayısı ile kanser gelişimindeki temel epigenetik mekanizmalardan biri kovalent histon modifikasyonlarıdır. (132).

2.6. Kodlamayan RNA'lar

İnsan genomunun %75'i transkripsiyona uğrar; ancak sadece %3'ü protein translasyonu için kalıp oluşturmaktadır. Bu nedenle insan genomundan kaynaklanan ve herhangi bir kodlama yapmayan ancak epigenetik kontrol mekanizmalarında görev alan bir sürü RNA molekülü vardır ve kodlama yapmayan RNA (non-coding RNA) olarak tanımlanır (133). Gen ekspresyonu ve genomik kararlılığın sağlanabilmesi gibi birçok anahtar olay için kilit rolde olduğu bilinen kodlamayan RNA'ların kısa ve uzun olmak üzere birçok çeşidi mevcuttur (134). Alternatif sınıflamada ise RNA'lar miRNA (mikro RNA; microRNA), lncRNA (Long non-coding RNA; uzun kodlama yapmayan RNA), piRNA (piwi-interacting RNA; piwi etkileşimli RNA) ve circRNA (circular RNA; sirküler RNA) gibi alt gruplara ayrılmasıdır (135). Kısa kodlamayan RNA'lardan olan snRNAs (small nuclear RNAs; küçük nükleer RNA'lar), tRNA'lar (transfer RNA), rRNA'lar (ribosomal RNA) ve snoRNA'lar (small nucleolar RNAs; küçük nükleolar RNA'lar) oldukça uzun yıllardır bilinmekte olup birçok düzenleyici rollere sahiptirler. Bunların bazılarının görevi tam olarak aydınlatılmış olsa da (örneğin; tRNA, rRNA vb.) birçoğunun net görevi ortaya konmamıştır. Ancak miRNA, piRNA, circRNA ve lncRNA'lar hücre çoğalmasının baskılanması ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir (136).

Üzerinde en çok araştırma yapılan kodlanmayan RNA'lar miRNA'lar olup son yıllarda post-transkripsiyonel düzenleyiciler kategorisinde incelenmeye başlanılmışlardır. Bu endojen, kısa (19-22 nükleotid uzunluğunda), tek zincirli kodlanmayan RNA çeşidi genlerin yaklaşık olarak %30'unun düzenlenmesinden sorumludur (134). miRNA'lar birçok gen ekspresyonu post-transkripsiyonel aşamada iken translasyonun baskılanmasını ya da RISC (RNA-induced silencing complex) ile direk etkileşimle mRNA degradasyonunun sağlayan kodlama yapmayan RNA molekülleri çeşididir. miRNA'lar gen susturulması aşamasında hedefine aldığı mRNA'nın translasyonel etkinliğini veya stabilizasyonunu düzenlemekten sorumludur. miRNA'nın hedef dizi üzerindeki etki mekanizması ve işlevi miRNA ve mRNA arasında bulunan baz eşleşmesinin oranıyla ilişkilidir. Tam bir eşleşmenin olmadığı zamanlarda miRNA, mRNA'nın translasyonunu baskılanmasına yol açarken;

eşleşmenin tam olduğu zamanlarda ise miRNA, mRNA'nın kesimi ve yıkımı durumuna yol açar (137, 138).

2.6.1. Kodlamayan RNA'lar ve Hastalık İlişkisi

Kodlamayan RNA'ların birçok hastalığın patolojisiyle ilgili olduğu yapılan çalışmalara bağlı olarak ortaya konmuştur. Birçok hastalık için normal olmayan miRNA ekspresyonu bildirilmiştir. Bir çalışmada prostat kanserli hasta grubunda miR-223-3p'nin ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (139). Son yıllarda yapılan araştırmalar ile miRNA'ların dolaşım, idrar ve benzeri vücut sıvılarında tespit edilebilir oldukları ve bu sebeple hastalıklar için biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. SLE, RA hastaları ile sağlıklı kontrol grubunun kullanıldığı bir araştırmada miR-16, miR-451, miR-223, miR-21'nin SLE hastalarında arttığı ve ek olarak RA hasta grubunda ise bunların ekspresyonun anlamlı şekilde artış gösterdiği bulunmuştur. Bu miRNA'ların tersine miR-146a, miR-125a-3p, miR-155 ekspresyon seviyelerinin ise SLE hastalarında azalma gösterdiği rapor edilmiştir (140). RA'lı hastala ve sağlıklı bireylerle yapılan bir araştırmada ise hastalara ait kan mononükleer hücrelerinde miR-16, miR-146a, miR-132, miR-155'nin ekspresyon seviyelerinde sağlıklı bireylere göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (141).

Kanser araştırmalarında miRNA'lar çok önemli bir yere sahiptir. Örneğin, miRNA-126 özellikle B hücreli lösemilerde fazla miktarda eksprese edilmektedir. miRNA-126 ekspresyonunun artması p53 geninin ekspresyonunu azaltmaktadır (142). Bu nedenle tümör gelişimi ve progresyonu desteklenmektedir. *In vitro* çalışmalarda miRNA-155 nörofibroma hücre hattının sferoid oluşturma kabiliyetlerini arttırdığı gözlenmiştir (143).

2.7. Epigenetik Mekanizmalar ve HCC İlişkisi

Kanser oluşumu dinamik bir şekilde genetik, epigenetik ve mikroçevre gibi faktörlerin katkısıyla gelişmektedir (144). Bu sebeple HCC oluşumu da moleküler bazda incelenecek olursa genetik ve ek olarak epigenetik faktörlerin hastalığın ortaya çıkışında rol aldıkları bildirilmiştir. Hastalığın ortaya çıkışında; bilinen birden çok tümör baskılayıcı gende (RB, TP53 ve p16 vb.), bazı onkogenlerde (c-Myc ve β -katenin vb.) ve kanserle ilişkili olduğu belirlenen bazı genlerde (CCND1 ve E-caderin vb.) somatik mutasyonların olduğu belirlenmiştir. Fakat yapılan ayrıntılı araştırmalar sonucunda bulunan bu mutasyonların hastalığın ortaya çıkması için yeterli olmadığı;

yaşam şekli ve beslenme düzeninin de hastalık mekanizması ile doğrudan ilişkili olduğu tespit edilmiştir (145). Özellikle genlerin promotör kısımlarında hipermetilasyon veya hipometilasyonun gerçekleşmesi, global genomik hipometilasyon, histon modifiye eden enzimler ve DNMTnin hatalı şekilde ekspresyonunun gerçekleşmesi, histon modifikasyonunda hatalar ve kodlanmayan RNA’larda gerçekleşen anormal ekspresyon düzeyleri HCC’de görülen epigenetik değişimlerdenidir (146).

2.7.1. DNA Metilasyonu ve HCC İlişkisi

Epigenetik mekanizmanın en çok üzerinde çalışılmış olanı ve en bilinen mekanizmalarından biri, promotör bölgelerde bulunan bir özel sitozin nükleotidinin metilasyonudur. CpG dinükleotidlerinde bulunan sitozin kalıntılarının metilasyona uğraması DNA’da modifikasyona sebep olur. Bunun sonucunda ise DNA’ya bağlanan transkripsiyon faktörleri ve proteinleri değişime uğrar. Genellikle genlerin promotör bölgelerinde görülen DNA metilasyonu genler arası bölgelerde ve tekrar bölgelerinde de görülebilmektedir. Genler arasındaki bölgelerde olan metilasyon sonucu istenmeyen bölgelerde başlaması olası olan transkripsiyon oluşumu önlenir. Tekrar bölgelerinde gerçekleşen metilasyonun amacı ise transpozonlardaki transpozisyon hareketini durdurabilmektir. Böylece istenmeyen olası rekombinasyonlara engel olunur. DNA’da yer alan CpG bölgelerindeki sitozin nükleotidlerinin yaklaşık olarak %4-8’i metillenmiş durumda bulunmaktadır (147). Bu durum DNMT enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu işlemde sorumlu görevli enzimler S-adenozilmetiyonini (SAM) metil kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. Bu süreç boyunca üç farklı enzim görev yapmaktadır; DNMT 1, DNMT 3A ve DNMT 3B’dir. DNMT1 enzimi hücre bölünmesi aşamasında replikasyon sırasında metilasyonun dengede olabilmesini sağlarken DNMT 3A ve DNMT 3B enzimleri ise embriyo gelişimi sırasında *de novo* (en baştan: yeni baştan) metilasyon için kullanılır (148, 149). Metilasyon olayı oluştuğunda çoğu transkripsiyon faktörü DNA’ya bağlanamamaktadır ve transkripsiyonel baskılanma durumu gerçekleşmez (150). SAM; metiyonin ve ATP (Adenosine triphosphate) moleküllerinden MAT’ların (Methionine adenosyltransferase) katalizlemesi sonucu gerçekleşen bir reaksiyon sonucunda sentezlenmektedir. Fareler ile yapılan araştırmalarda hepatokarsinogenez aşamasında yüksek dozda uygulamasının erken preneoplastik karaciğer lezyonlarının gelişimini engellediği bildirilmiştir. Karaciğere özgü MAT1A, iki ayrı izoenzim kodlamakta olup bunlar MAT I ve MAT III dır. MAT II enzimi ise MAT2A tarafından kodlanmaktadır. Fötal karaciğerde MAT2A enzimi

yüksek düzeyde eksprese edilirken, MAT1A enzimi ise erişkin karaciğerde yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Siroz ve HCC durumunda MAT1A ekspresyonu düzeyindeki düşüş, MAT2A ekspresyonu düzeyindeki artışla ilişkilidir (151-153).

Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre HCC durumunda DNA tamir genleri, tümör baskılayıcı genler ve kanserle ilişkili diğer genler genellikle hipermetilasyon göstermişlerdir. Bunlardan bazıları; APC, MGMT, RASSF1A, SOCS3, p16 INK4A, p15 INK4B, RIZ1, RB1, GSTP1, SOCS1, E-cadherin, HINT1, p73 (TP73) olup, yapılan çalışmalar ile bu genlerin sayısı artmaktadır. Bu genler, hastalığın gelişiminde oldukça önemli görevleri olan DNA tamiri, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü kontrolü ve sitokin sinyalizasyonunun susturulması gibi oldukça farklı sinyal transdüksiyon yolları ile birçok biyolojik görevde yer almaktadır (154).

Kronik HBV ve HCV enfeksiyonları ile alkol; HCC oluşumunda temel risk faktörlerinden olarak bilinmektedir. Zhong ve arkadaşları (155) HBV enfeksiyonu durumunda RASSF1A ve GSTP1 genlerinde hipometilasyon görüldüğünü ve bu genlerin ekspresyon düzeylerinde azalma ortaya çıktığını bildirmişlerdir. P16 geninin promotör bölgesi ise HBV enfeksiyonuna bağlı olarak gerçekleşen HCC’de genellikle hipermetilasyon göstermektedir. Alkol alımı ise HCC gelişiminde etkili olan genlerin sıklıkla hipermetilasyona uğramasında etkilidir. Yapılan çalışmalar ile HCC tanısı alan ve alkol kullanımı olan hastalarda alkol kullanımı olmayan hastalara oranla DOK1, RASSF1A ve GSTP1 genlerine ait promotör bölgelerinde yüksek oranda metilasyon gözlemlendiği bildirilmiştir (155-157).

Aflatoxin ile yapılan çalışmalara göre aflatoxin HCC’de p53 (TP53) tümör baskılayıcı genin promotörünü etkilemekte ve o bölgeyi hipermetilasyona uğratmaktadır. Ek olarak kanserle ilişkili diğer genlerin (GSTP1, p16, RASSF1A ve MGMT) promotör bölgeleri incelendiğinde bu bölgelerinde yüksek oranda metilasyona uğradığı belirlenmiştir (158).

Global DNA hipometilasyonu; HCC oluşumunda hem kodlanmayan tekrar bölgeleri hem de genlerde; kromozom stabilizasyonunu bozup gen ekspresyon düzeyinin artmasını sağlayarak karsinogeneze sebep olmaktadır. Hipometilasyon genellikle intragenik ve intergenik bölgeleri özellikle de hareketli DNA elementleri (transposable elementleri) üzerinde etkili olabilmektedir. Yapılan bir çalışma sonucunda tekrarlı DNA elementlerinden olan LINE1 ve Alu da hipometilasyon gerçekleştiğinde hücrelerde hepatokarsinogeneze eğilimin arttığı görülmüştür (159).

HCC ve metilasyon arasındaki ilişkiyi özetlemek gerekirse kanserin oluşumu ile doğrudan ya da dolaylı olarak ilişkisi olduğu bilinen genler [APC, RB1, GSTP1, SOCS1, RASSF1A, MGMT, CRABP1, HINT1, GSTP1, SOCS3, CHRNA3, DOK1, p15, INK4B, SFRP1, GADD45a, p16, INK4A, E-cadherin, RIZ1 ve p73 (TP73)] hepatokarsinogenez durumunda anormal düzeyde metilasyon göstermektedir.

2.7.2. Histon Modifikasyonları ve HCC İlişkisi

Histonlar nükleozom yapılarının oluşumunu sağlayarak DNA'nın etrafına sarılmasında ve paketlenmesinde görev alan proteinlerdir (160). Histonlar (H: Histone) gen regülasyonunun gerçekleşmesinde görevli olup H1/H5, H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere 5 ana histon ailesi vardır. H2A, H2B, H3 ve H4 histonları kor histon olarak görev yapmakta iken H1 ve H5 histonları nükleozomların birbirlerine bağlanmasında görevlidirler. Histon modifikasyonları kromatinlerin yapısına, gen fonksiyonlarına ve ekspresyonu olaylarına etki edebilmekte ve ayrıca DNA tamiri ve replikasyonu aşamalarında işlev görmektedirler (128, 161). Histon proteinlerinin posttranslasyonel modifikasyonları olan histon modifikasyonları; N-terminal kuyruğunda oluşmaktadır. HCC ile ilişkisi olan ve şu ana kadar keşfedilen modifikasyonlar ise glikolizasyon, bütillasyon, asetilasyon, ubikitinasyon, metilasyon ve sumolasyon'dur (162).

Histon kuyruklarında gerçekleşen asetilasyon işlemi transkripsiyonel aktivasyonun sağlanmasından sorumludur. H3K3 monometilasyonu (H3K9me1) ve H3K4 dimetilasyonu ve trimetilasyonu (H3K34me2 ve H3K4me3) kromatin yapının açılmasına yol açarak gen ekspresyonunun aktifleşmesine katkıda bulunur. Histon 3 lizin 9 dimetilasyonu ve trimetilasyonu (H3K9me2 ve H3K9me3) ve H3K27 dimetilasyonu ve trimetilasyonu (H3K27me2 ve H3K27me3) ise kromatinin ve gen ekspresyonunun inaktif duruma geçmesine sebep olmaktadır (163). HCC durumunda histon modifikasyonlarının değişerek hücredeki epigenetik durumun bozulduğu bildirilmiştir. Gerçekleşen olağan dışı histon modifikasyonlarından dolayı da hepatokarsinogenez gelişimi hız kazanmaktadır.

HCC'nin erken evrelerinde yüksek düzeyde H3K4me3 ekspresyonu bildirilmiştir (164). Yapılan bir çalışmada, HCC'li dokularda normal dokulara oranla H3K27me3 ekspresyonun düzeyinin yüksek düzeyde olduğu ve bunun da vasküler invazyonu artmasına sebep olarak prognozun kötü seyretmesine sebep olduğu bildirilmiştir (165). Bir çalışmada HCC hücre hatlarında; H3K9 dimetilasyonunun artış göstermesiyle bağlantılı olarak RASSF1a ve p16 genlerinin represyonu arasında bir ilişki olduğu

ortaya konmuştur (166). Yapılan bir başka çalışmada ise; HCC gelişiminde H3K27 trimetilasyonunun artışıyla p16 geninin ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Hem promotör aktivasyonunun hem de H3K9'un sessizleştirilmesinin gerçekleşmesiyle retinoblastoma proteini gibi tümör baskılayıcı proteinlerin kodlanmasından sorumlu olan genlerin transkripsiyonel düzeyde susturulmaya uğradığı tespit edilmiştir (167).

2.7.3. Kodlanmayan RNA'lar ve HCC İlişkisi

Proteine çevrilemeyen kodlanmayan RNA'lar bu özelliklerinden dolayı bilgi taşımadıkları ya da fonksiyonları olmadıkları düşüncesi oluşturur; fakat bu RNA'lar kromatin yapının oluşumu, transkripsiyon, epigenetik hafıza, RNA splicing, editing ve translasyon gibi birçok fizyolojik ve gelişimsel yollarda görevlidirler. Mikro RNA'lar (miRNA), uzun kodlanmayan RNA'lar (lnc-RNA) ve piwi proteiniyle ilişkili RNA'lar (pi-RNA) epigenetik mekanizmalarda yer alan bilinen en önemli kodlanmayan RNA'lardır (168).

2.7.4. miRNA ve HCC İlişkisi

Regülasyon düzeyinde bozukluk gözlenen miRNA'lar kanser başlangıcında ve gelişiminde oldukça önemli bir yere sahiptir. Bu miRNA'lar " oncomir " olarak adlandırılmakta olup, işlevleri onkogenlerin fonksiyonlarıyla oldukça benzerlik gösterir. miRNA ekspresyonu yapılacak genler HCC'de genellikle kanserle ilişkisi olan genomik bölgelerde (heterozigotluğunu kaybetmiş bölgeler, onkogenler ve kırılğan alanlar) bulunmaktadırlar. HCC gelişimi ve oluşumu sürecinde miRNA'lar; P13K/AKT/mTOR, p53, RAS/MAPS, MET, Myc, WNT/ β katenin, ve TGF- β gibi birçok yolağa dâhil olup işleyişlerini etkilemektedir. İnsan karaciğerinde bol olarak bulunan miRNA-122 sık bir şekilde regülasyon bozukluğuna uğramaktadır. Tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı düşünülmekte ve HCC durumunda miktarında azalış olmaktadır. miR-221 ise onkogen türevi mikro RNAlardan olup %70-80 oranında oldukça yüksek bir düzeyde HCC durumunda ekspresyonunda artış gözlenmektedir. Bu miRNA'nın kanserle ilişkili olan yollarda işlevsel olduğu da bildirilmiş ve aşırı ekspresyonu durumunda ise büyümede artışa, apoptozisin baskılanmasına, invazyona, proliferasyona ve migrasyona sebep olmaktadır. Ayrıca hepatokarsinogenez durumunda miR-199a-3p ile miR-26, let-7 üyeleri ekspresyonunda azalma gözlenirken, miR-191, miR-21, , miR-17-5p ve miR-155 ekspresyonunda ise artış gözlenir (169).

2.7.5. lnc-RNA ve HCC İlişkisi

lnc-RNA'lar DNA, RNA ya da proteinler ile etkileşimi girerek gen ekspresyonunun oluşumunda etkilidirler. 200 nükleotitten büyük olup gene özgü transkripsiyonun düzenlenmesinden sorumludurlar. Yapılan pek çok çalışmada HCC durumunda lnc-RNA ekspresyonunun anormal düzeylerde olduğu bildirilmiştir (170-173).

2.7.6. pi-RNA ve HCC İlişkisi

piRNA'lar, Piwi proteinleriyle birleşerek ribonükleoprotein yapısı oluştururlar. piRNA'ların transkripsiyonları transpozonlar üzerinden gerçekleşmektedir. Pek çok kanser türünde ve HCC'de piRNA'ların aşırı ekspresyona uğramaları nedeniyle tümör baskılayıcı genler tarafından transkribe olan mRNA'lar inhibisyona ve degradasyona uğrarlar. Düşük seviyede ekspresyona uğramaları durumundaysa onkogenlerin transkripsiyon seviyelerinin artmasına neden olurlar. Ayrıca hareketli DNA elementlerinin susturulması aşamasında oluşan hatalar retrotranspozonların mutasyona uğramasında neden olarak genomik stabilizasyon durumunda bozukluklara sebep olmaktadır (174).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Mikrodizi (Microarray) Transkriptom Analizleri

3.1.1. Veri Seti ve Temel Özellikleri

Hepatositlerden köken alan ve karaciğerin en sık rastlanan primer malign tümörü olan HCC'nin moleküler mekanizmasını aydınlatmak üzere bir dizi yüksek kapsamlı mikrodizi analizleri çeşitli araştırmacılar tarafından yürütülmüştür. Tez projesi kapsamında, söz konusu çalışmalar ileri biyoinformatik ve biyoistatistiksel yazılımlar birlikte analiz edilmiş ve HCC'nin gelişmesinde işlevi olan potansiyel gen adayları ve potansiyel metabolik yollar tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında iki mikrodizi temelli transkriptom veri seti analiz edilmiştir. Bu veri setlerine ait temel özellikler Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. HCC ile yürütülen transkriptom çalışmasına ait temel bilgiler (a) Illumina Human Whole-Genome DASL HT platformu ve (b) Affymetrix Human Genome U219 Array (HG-U219) platformları kullanılmıştır.

GEO Erişim ID	Platform ID	Örnek Sayısı	Çalışmanın Amacı	Kaynakça numarası
GSE46444	GPL13369 ^(a)	136	Bu çalışmada, arşivlenmiş FFPE örnekleri ve taze olarak elde edilmiş dokuların transkriptomik analiz performansları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu eksende, 83 arşiv (6-8 yıllık) HCC FFPE dokusu (5 örnek için 2 doku alınmış olup toplamda 88 örnek) ve 47 yeni alınmış karaciğer siroz dokusu (bir örnek için 2 doku alınmış olup toplamda 48 örnek) ile toplamda 136 doku mikrodizi transkriptom yöntemi ile karşılaştırılmış ve sonuç olarak, çok yıllık FFPE dokusu ile yapılan mikrodizi transkriptom çalışmasının HCC hastalığının teşhisi ve hastalık sınıflandırılmasında kullanılabilir olduğu görülmüştür. Çalışmada hastalığın moleküler süreçleri hakkında ciddi bilgi verilmemiştir. Bu bağlamda, söz konusu veri setinin tez çalışmasında kullanılması düşünülmektedir.	(175)

			Örnek sayısı açısından oldukça kapsamlı olan bu çalışmada, 228 HCC ve 168 karaciğer siroz dokusu mikrodizi transkriptom yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu çalışmayı önemli kılan etmen ise, hem DNA metilasyon mikrodizi analizini hem de transkriptom mikrodizi analizini içermesidir. Böylece, kapsamlı transkriptom analizlerinin yanı sıra, metilasyon profilinin bütünsel (ing. integrative) analiz ile mortalite/epidriver genler ortaya konulmuştur. Çalışma çoğunlukla sağkalım ve gen ekspresyonu/metilasyon profili arasında görülebilecek potansiyel genler üzerine yoğunlaşmıştır. Bununla birlikte, ileri işlevsel zenginleştirme analizleri bulunmamaktadır.	(176)
GSE63898	GPL13667 ^(b)	396		

FFPE: formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş

Her iki çalışmada gerek örneklem büyüklüğü gerekse deneysel tasarım açısından HCC hastalığı ile ilgili önemli moleküler veri sağlamaktadır. Bununla birlikte, her iki çalışma; gen ontolojisi, metabolik yolak, gen seti zenginleştirme, anlamlı genlerin promotör dizilerine ilişkin analizler, transkripsiyon faktörler analizleri, protein-protein etkileşimi ve gen-gen ağ (network) analizleri ve potansiyel hub genlerin ortaya konulması açısından sınırlı bilgi sağlamaktadır. Bu nedenle, bu çalışma kapsamında söz konusu analizlerin yanı sıra hiper/hipo metilasyona uğrayan genler ve bu genlerin rol aldığı yollar belirlenmiştir.

3.1.2. Transkriptom Mikrodizi (Microarray) Analizi

Tüm transkriptom mikrodizi veri seti ".cel" ve ".txt" formatında NCBI GEO (NCBI: National center for biotechnology information, GEO: Gene expression omnibus) veritabanından (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) indirilmiştir. Tüm analizler R platformunda çeşitli Bioconductor (<https://bioconductor.org/>) paket programları ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların deneysel tasarımları farklı olduğu için "GSE46444" ve "GSE63898" veri setleri ayrı ayrı analiz edilmiştir. Bununla birlikte, söz konusu çalışmalar farklı mikrodizi platformları (GSE46444 Illumina, GSE63898) ve problemleri ile analiz edildiği için konsensüs gen isimleri ve ID'leri biomaRt v2.52.0 (177) paketi ile tespit edilmiştir. Böylece, mikrodizi platformu farketmeksizin tüm gen isimleri insan referans genomuna (GRCh38) uygun hale getirilmiştir. Öncelikle, tüm

mikrodizi veri seti, arkaplan düzeltmesi (ing. background correction), log2 dönüşümü ve kantil normalizasyonu affy v1.75.0 (178) paketi içerisinde yer alan "Robust Multichip Average (RMA)" yöntemi ile yapıldı ve veri seti analize hazır hale getirilmiştir.

"GSE46444 " ve "GSE63898" veri setlerinde gruplar arası farklı eksprese edilen genler limma v3.52.4 (179) paketi ile belirlenmiştir (kat artışı, $\log_2FC > 1$, $p < 0.05$, Benjamini and Hochberg False Discovery Rate; Benjamini and Hochberg yanlış bulgu oranı). Bu kriterler hem ekspresyonunda artış görülen (ing. up-regulated) hem de azalış görülen (ing. down-regulated) genler için geçerli olacaktır. Gruplar arasında gen ekspresyon değerleri açısından uyum olup olmadığı temel bileşenler analizi (ing. principal component analizi) yapılacak ve grupların kümelenme durumları ise ClustVis (180) internet aracı ile görselleştirilmiştir. Gruplar arasındaki gen ekspresyon değerlerine ilişkin farklılıkların görselleştirilmesi (volcano plot, MA plot, heatmap vb.) çeşitli R paket programı ile gerçekleştirilmiştir (çoğunlukla, ggplot2). Gen ekspresyonunda farklılık gösteren genlerin biyolojik süreç (BP: biological process), moleküler işlev (MF: molecular function) ve hücresel bileşen (CC: cellular component) gibi kategorilerine ilişkin gen ontoloji (GO) zenginleştirme analizleri ve yolak analizleri ShinyGO v0.61 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) programının yanı sıra, g: Profiler, GSEA, Cytoscape ve EnrichmentMap yazılımlarını bir arada kullanan ve Reimand ve arkadaşlarının (181) geliştirdiği yöntemler izlenerek gerçekleştirilmiştir. Protein-protein etkileşim analizleri STRING v11.5 (182) internet aracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gen seti zenginleştirme analizleri GeneCodis4 (183) yazılımı, gen ortak ifade (co-expreson) ağı ise CoExp (184) ve CEMiTool (185) yazılımları ile oluşturulmuştur.

GSE63898 çalışması ile paralel yürütülen metilasyon profillemeye araştırması da bulunmaktadır. DNA metilasyon profillemeye çalışmasında Milan ve Barselona'da HCC hastalarından elde edilen 221 veri seti bulunmaktadır. Ayrıca, Fransa'da 83 HCC hastası da validasyon veri seti olarak yer almaktadır. Sonuç olarak, transkriptomik analizin yanı sıra, toplamda 304 HCC hastası ile DNA metilasyon çalışması kullanılmıştır.

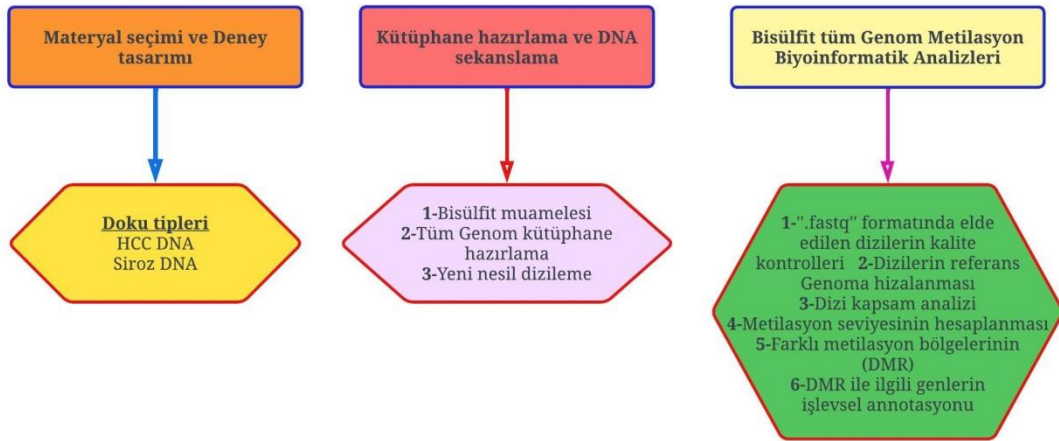
3.2. Tüm Genom Bisülfid Dizileme (WGBS)

DNA metilasyonu sitozin nükleotidine metil (CH₃-) grubunun eklenmesini içeren biyokimyasal süreç olarak tanımlanmaktadır. Metilasyon grubunun eklenmesi sonucu meydana gelen epigenetik modifikasyon hücreler bölünürken veya embriyonik kök hücrelerden özgün hücre tiplerine farklılaşırken gen ekspresyonunun kararlı olarak

değişimine sebebiyet vermektedir. Çoğunlukla gerçekleşen epigenetik modifikasyon kalıcı ve tek yönlü olarak gerçekleşmektedir. Böylece farklılaşmış hücrenin kök hücreye veya farklı bir hücre tipine dönüşmesi moleküler düzeyde engellenmiş olur. Sitozin nükleotidinin 5. pozisyonunda gerçekleşen DNA metilasyon gen ekspresyonunda azalmaya neden olmaktadır ve incelen hemen hemen tüm omurgalılarda bu epigenetik modifikasyon gözlenmektedir. Yetişkin somatik hücrelerde DNA metilasyonu tipik olarak CpG dinükleotid birimlerinde meydana gelmektedir. Bununla birlikte, CpG dışı metilasyon ise embriyonik kök hücrelerde karakteristik ve yaygın olarak gözlenmektedir. DNA metilasyonunun hücre içerisindeki diğer önemli bir görevi ise; zaman içerisinde konak genomu ile bütünleşmiş endojen retrovirüslere ait genlerin ekspresyonunu baskılamaktır. DNA metilasyonu aynı zamanda embriyonik gelişim sırasında organ oluşum sürecinde rol oynayan kromatin yapısının temelini oluşturmaktadır. Ayrıca, CpG metilasyonu başta kanser türleri olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde çok önemli rol oynamaktadır. Kısaca DNA metilasyonu normal hücresel işlevlerin sürdürülmesi, genetik damgalama, embriyonik gelişim ve tümörögenез sürecinde işlev görmesi nedeniyle genom düzeyinde metilasyon profilinin ortaya konulması önem kazanmıştır. PCR yöntemiyle tespit edilebilen gene özgü metilasyon durumunun belirlenmesinin aksine, genom düzeyinde metilasyon profili (ing. whole genome DNA methylation profiling veya WGBS: whole genome bisulfite sequencing) NGS (next-generation sequencing: yeni nesil dizileme) yaklaşımları ile ortaya konulmaktadır.

WGBS tüm genom düzeyinde metilasyon profilini belirlemek için geliştirilmiş bisülfid muamelesi ve yeni nesil dizileme teknolojisinin müşterek kullanıldığı deneysel bir yöntemdir. Bilindiği üzere, bisülfid muamelesi metilasyona uğramamış (ing. unmethylated) sitozin nükleotidinin urasile dönüşmesine, metile olmuş sitozin nükleotidi ise değişime uğramamaktadır. Dolayısı ile genomik DNA'nın bisülfid muamelesi sonrasında metile- olan ve metile-olmayan bölgeleri yeni nesil dizileme reaksiyonu sonucunda genom düzeyinde tespit edilebilmektedir. Söz konusu yöntemin şu avantajları bulunmaktadır; (i) genomda yer alan her sitozin nükleotidinin metilasyon durumunun tespit edilmesi, (ii) her tür için çalışılmasına olanak vermesi ve (iii) metilasyon analizinde standart (ing. gold standard) yöntemdir. Aşağıda belirtilen iş akışında WGBS yöntemine ait deneysel ve biyoinformatik aşamalar yer almaktadır. Burada yer alan örnekte tez çalışması kapsamında yer alan HCC, kontrol ve siroz hastalığına yer verilmiştir (Şekil 3.1).

Tüm-genom bisülfıt dizileme (Whole genome bisulfite sequencing)



Şekil 3.1. Tüm genom bisülfıt dizileme (WGBS) deneysel ve biyoinformatik iş akışı.

3.2.1. Tüm Genom Bisülfıt Dizileme (WGBS) Biyoinformatik Analizleri

Bu tez araştırması kapsamında HCC, kanserli olmayan karaciğer dokusu, sağlıklı karaciğer dokusu ve sirozlu WGBS projelerine ait açık verilerin analizi gerçekleştirilmiştir. Söz konusu projelere ait ".fastq" formatındaki veriler NCBI Sequence Read Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) veri tabanından elde edilmiştir. Veri tabanı arama kriteri ise; ["hepatocellular carcinoma" + "liver tissue" + "cirrhosis" + "adjacent noncancerous liver tissue" + "human"] anahtar kelimelerini kapsamıştır. Bununla birlikte, ["cell" + "cell line" + "murine" + "mouse" + "rat"] kelimeleri ile eşleşen okumalar analizden çıkarılmıştır. SRA veri tabanından veriler SRA Toolkit 3.0.3 (<https://github.com/ncbi/sra-tools>) yazılımı ile iş istasyonlarına indirilmiştir. Analize hazır yüksek kaliteli okumaların elde edilebilmesi için öncelikle ham verilerin filtrelenmesi gereklidir. Filtreleme işlemi Trimmomatic v0.39 (186) ve fastp v0.20.0 (187) yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Filtreleme işlemi şu adımları kapsamaktadır; (i) adaptör dizilerinin kaldırılması, (ii) düşük kaliteli okumaların filtrelenmesi (< Q20, Phred skoru), (iii) baz uzunluğu 50 bp'nin altındaki okumaların kaldırılması ve (iv) okumaların ilk 5 bazında görülen düşük kaliteli dizilerin uzaklaştırılmasıdır. Filtreleme işleminden önce ve sonra okumaların FASTQC v0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) yazılımı ile görselleştirilmiş ve MultiQC v1.6 (188) aracı dosyaların biraraya getirilerek kalite kontrol dosyası oluşturulmuştur. Aşağıdaki tabloda yer alan özet verileri WGBS çalışması için seçilmiş

ve kullanılmıştır (Tablo 3.2). Tüm örneklere ait ayrıntılı veriler ise EK-1 şeklinde ("excel" formatında) sunulmuştur. Özet istatistiksel bilgiler SeqKit v2.3.1 yazılımı ile elde edilmiştir (189).

Tablo 3.2. WGBS çalışması için NCBI SRA veritabanından seçilen HCC, kanserli olmayan karaciğer dokusu, sağlıklı karaciğer dokusu ve sirozlu karaciğer doku örneklerine ait özet istatistik verisi.

Doku Tipi	Örnek Sayısı (n)	Ortalama Okuma Sayısı	Ortalama Nükleotid Sayısı
HCC Dokusu	34	10.690.595	744.661.764
Sağlıklı Karaciğer Dokusu	27	5.132.889	518.421.848
Kanserli Olmayan Karaciğer Dokusu	7	23.028.257	1.278.260.601
Sirozlu Doku	8	30.104.184	1.535.313.410

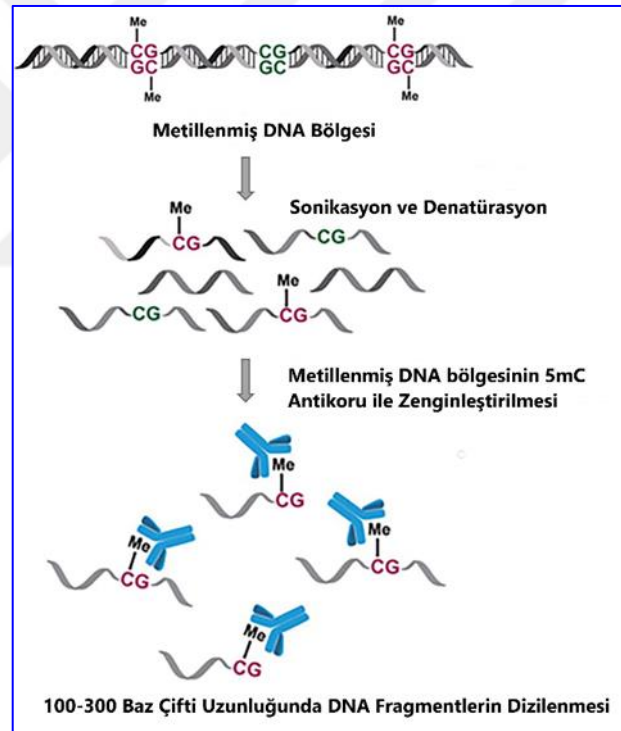
Filtreleme işlemi sonrası elde edilen yüksek kaliteli veriler öncelikle referans insan genomuna (GRCh38/hg38) Bowtie2 v2.5.0 (190) yazılımı ile hizalanmıştır. Genom hizalanmış ".sam" formatındaki veriler Samtools v1.16.1 (191) yazılımı ile ".bam" formatına çevrilerek metilasyon analizleri için hazır hale getirilmiştir. Genom düzeyinde metilasyona uğrayan bölgelerinin çağırılması ise yaygın kullanılan Bismark v0.24.0 (192) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

Gruplar arasında metilasyon profilinde görülen farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olarak belirlenmesi için DSS v2.46.0 Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DSS.html>) paketi kullanmıştır. Daha sonra farklı metilasyon profiline (hipo-, hiper- metilasyon) sahip genomik lokasyonlar bedtools v2.30.0 (193) ile çıkarılmış ve farklı bir dosyaya kaydedilmiştir. Elde edilen bu dosyaların anotasyonları Biomart (<https://www.ensembl.org/info/data/biomart/index.html>) web aracı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genlerin biyolojik süreç, moleküler işlev ve hücresel bileşen gibi gen ontoloji (GO) kategorileri ShinyGO v0.76.3 (194) web aracı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3. MeDIP-Sequencing (Methylated DNA immunoprecipitation sequencing)

MeDIP-Seq (MEDIP dizileme) genom düzeyinde metilasyon profilinin ortaya konulmasında kullanılan yeni nesil dizileme teknolojisine dayalı diğer bir deneysel yöntemdir. WGBS yaklaşımında kullanılan bisülfıt muamelesinin aksinu bu yöntemde 5mC veya 5hmC modifikasyonuna özgü özgün antikolar kullanılmaktadır. Özgün

antikorların kullanımı ile metillenmiş sitozin nükleotidleri araştırılabilir ve yeni nesil dizileme teknolojisi ile metillenmiş genomik DNA bölgesi dizilenebilir. Öncelikle, özgün antikorlar 5mC bölgelerine bağlanır ve fragmentasyon sonrası anti-5mC antikorları ile işaretlenmiş genomik DNA'lar immünopresipitasyon yöntemi ile çöktürülür ve saflaştırılır. Bu işlemleri takiben, standart yeni nesil dizileme yöntemi ile kütüphane kurulur ve DNA fragmentleri dizilenir. WGBS yöntemi ile kıyaslandığında MEDIP-Seq yaklaşımının çözünürlüğünün zayıf ve daha az sayıda DMR (ing. differentially methylated region) tespit edebilmesine rağmen, genomda daha yüksek kapsamda analize imkan tanımaktadır. Bu nedenle, tez projesi kapsamında HCC hastalığına ilişkin daha kapsamlı bilgi etmek için WGBS yönteminin yanı sıra MEDIP-Seq yöntemi de metodoloji olarak benimsenmiştir. MEDIP-Seq yöntemi Şekil 3.2'de özetlenmiştir.



Şekil 3.2. MeDIP-Seq deneysel iş akışı (195)

3.3.1. MEDIP-Seq Biyoinformatik Analizler

Tez kapsamında HCC ve kanserli olmayan karaciğer dokusuna ait MEDIP-Seq açık verilerin analizi gerçekleştirilmiştir. WGBS projesine benzer şekilde ve veri tipi açısından homojenlik oluşturmak için aynı parametreler ile veri seçimine gidilmiştir. Bu bağlamda, söz konusu projelere ait ".fastq" formatındaki veriler NCBI Sequence Read

Archive (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) veri tabanından elde edilmiştir. Veri tabanı arama kriteri ise; ["hepatocellular carcinoma" + "adjacent noncancerous liver tissue" + "human"] anahtar kelimelerini kapsamıştır. Bununla birlikte, ["cell" + "cell line" + "murine" + "mouse" + "rat"] kelimeleri ile eşleşen okumalar analizden çıkarılmıştır. Toplamda 26 HCC'li ve 26 onunla eşlenik kanser olmayan karaciğer dokusu olmak üzere 52 örnek analize dâhil edilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. HCC ve kanserli olmayan eşlenik karaciğer dokusuna ait MEDIP-Seq örneklerinin özet istatistik verisi.

Doku Tipi	Örnek Sayısı (n)	Ortalama Okuma Sayısı	Ortalama Nükleotid Sayısı
HCC Dokusu	26	22.254.325	836.263.008
Kanserli Olmayan Karaciğer Dokusu	26	23.025.232	865.227.639

Yine WGBS analizlerine benzer şekilde tüm bu 52 MEDIP-Seq verisi SRA veri tabanından veriler SRA Toolkit 3.0.3 (<https://github.com/ncbi/sra-tools>) yazılımı ile iş istasyonlarına indirilmiştir. Analize hazır yüksek kaliteli okumaların elde edilebilmesi için öncelikle ham verilerin filtrelenmesi gereklidir. Filtreleme işlemi Trimmomatic v0.39 (186) ve fastp v0.20.0 (187) yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Filtreleme işlemi şu adımları kapsamaktadır; (i) adaptör dizilerinin kaldırılması, (ii) düşük kaliteli okumaların filtrelenmesi ($< Q20$, Phred skoru), (iii) baz uzunluğu 50 bp'nin altındaki okumaların kaldırılması ve (iv) okumaların ilk 5 bazında görülen düşük kaliteli dizilerin uzaklaştırılmasıdır. Filtreleme işleminden önce ve sonra okumaların FASTQC v0.11.9 yazılımı ile görselleştirilmiş ve MultiQC v1.6 (188) aracı dosyaların biraraya getirilerek kalite kontrol dosyası oluşturulmuştur. Düşük kaliteli dizilerin filtreleme işlemi sonrası elde edilen yüksek kaliteli veriler öncelikle referans insan genomuna (GRCh38/hg38) Bowtie2 v2.5.0 (190) yazılımı ile hizalanmıştır. Genoma hizalanmış ".sam" formatındaki veriler Samtools v1.16.1 (191) yazılımı ile ".bam" formatına çevrilerek MEDIP-Seq analizleri için hazır hale getirilmiştir. WGBS analizinden farklı olarak genom düzeyinde metilasyona uğrayan bölgeler QSEA v1.24.0 Biocondutor paketi (196) ile çağrılmıştır. Yine, gruplar arasında metilasyon profilinde görülen farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olarak belirlenmesi için QSEA v1.24.0 Biocondutor paketi kullanılmıştır. Farklı metilasyona sahip (hipo-, hiper- metilasyon) genomik lokasyonların CpG adaları metilasyon profili (metilasyon yoğunluğu) ile

işlevsel anotasyonları ise Biomart (<https://www.ensembl.org/info/data/biomart/index.html>) web aracı ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel açıdan önemli genlerin biyolojik süreç, moleküler işlev, hücresel bileşen gibi gen ontoloji (GO) kategorileri ile Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) metabolik yolak analizleri ShinyGO v0.76.3 (194) web aracı ile gerçekleştirilmiştir. Annotasyonda ayrıca Annotatr v1.24.0 Bioconductor paketi kullanılmıştır (197).

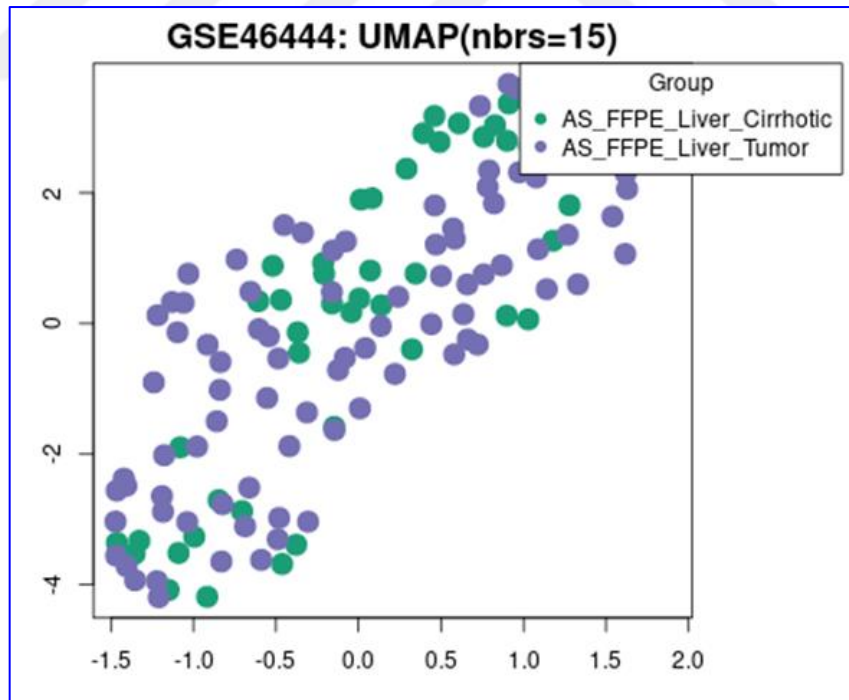
3.4. Tez Çalışmasının Etik ve Finansal Destek Yönleri

Bu lisansüstü tez çalışmasının uygunluğu İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 05.10.2022 tarih ve 44 numaralı toplantısında görüşülmüş ve 2022/44-08-05 numaralı karar sayısı ile uygun görülmüştür. Ardından tez çalışmasına başlamadan önce İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar ve Yayın Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 23.05.2023 tarih ve 3935 sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Bu tez çalışmasında kullanılan açık erişimli genetik tabanlı verilerin Biyoinformatik analizi için gerekli olan finansal destek İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Koordinatörlüğünün 24.11.2022 tarih ve 2022/15 numaralı toplantısında görüşülmüş ve TYL-2022-3138 proje koduyla onaylanmıştır.

4. BULGULAR

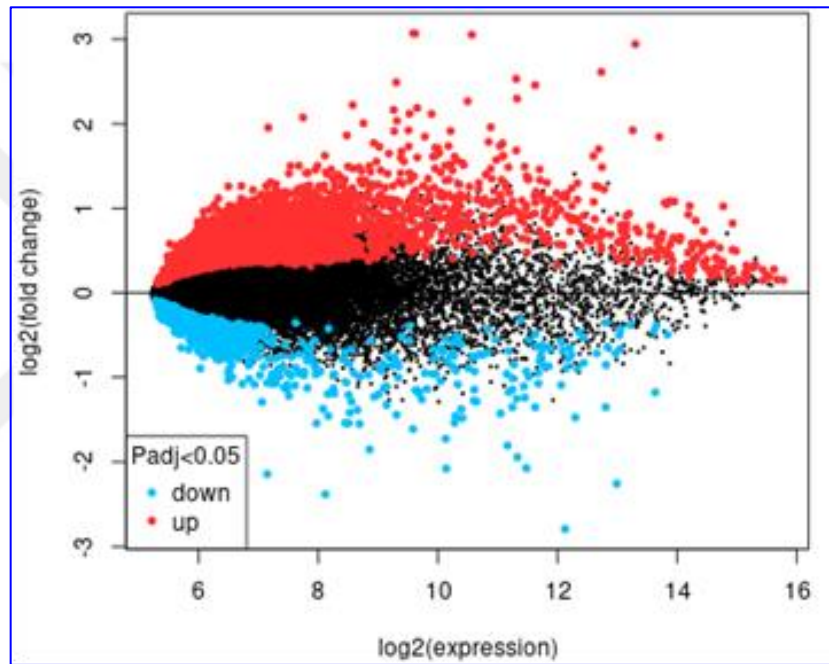
4.1. Mikrodizi (Microarray) Transkriptom Analiz Sonuçları

GSE46444 veri setinde FFPE (formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş)’ye gömülmüş 48 sirozlu karaciğer dokusu ile 88 HCC’li karaciğer dokusu transkriptomik mikrodizi ile karşılaştırılmıştır. Normalizasyon sonrası çalışılan veri setinde örnek heterojenitesinin grup farketmeksizin yüksek olduğu UMAP (ing. Uniform Manifold Approximation and Projection) kümeleme analizinde görülmüştür (Şekil 4.1.). Kümeleme analizi gruplar arası ayrımı önemli ölçüde sergilememesine rağmen, sirozlu örneklerin kısmen birarada olduğu görülmektedir. Siroz HCC öncüsü olabilecek patolojik durum olması nedeniyle gruplar arasında ciddi ayrım gözlenmeyebilir. Diğer bir sebep ise, mikrodizi transkriptom analizleri FFPE örneklerinden çalışıldığı için, yüksek kaliteli RNA’ların aksine elde edilen RNA’nın oldukça degradasyona uğramış olması olabilir.



Şekil 4.1. Sirozlu ve HCC transkriptom profilinin UMAP dağılımı (Yeşil Noktalar: Sirozlu örnekler, Mor noktalar: Hepatosellüler örnekler).

Ayrıca, iki grup arasında gen ekspresyon düzeyinde (yüksek $\uparrow$ up-regulated, düşük $\downarrow$ down-regulated) istatistiksel açıdan önemli farklar bulunmuştur ($|\log_2FC| > 1.0$, $p < 0.05$). HCC'li grup ile karşılaştırıldığında siroz grubundaki karaciğer örneklerinde 423 genin ekspresyonunda artış ve 98 genin ekspresyonunda ise düşüş tespit edilmiştir. Tersine bakıldığında sirozlu grupla karşılaştırıldığında; HCC'li gruptaki 98 genin ekspresyonunun arttığı, buna karşın 423 genin ise ekspresyonunun düştüğü şeklinde de açıklanabilir (Şekil 4.2). İki grup arasında ekspresyon artışı ve düşüşü gösteren ilk 25 protein kodlayan genlere ait bilgiler Tablo 4.1 ve Tablo 4.2' de sunulmuştur. Bu genlere ait ısı grafiği ise Şekil 4.3' de sunulmuştur.



Şekil 4.2. Sirozlu ve HCC grubu arasında gen ekspresyonu artan (kırmızı noktalar) ve azalan genlerin (mavi noktalar) MA grafiği.

Tablo 4.1. GSE46444 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusunda ekspresyon artışı tespit edilen ilk 25 gen (genler adj P-value göre sıralanmıştır).

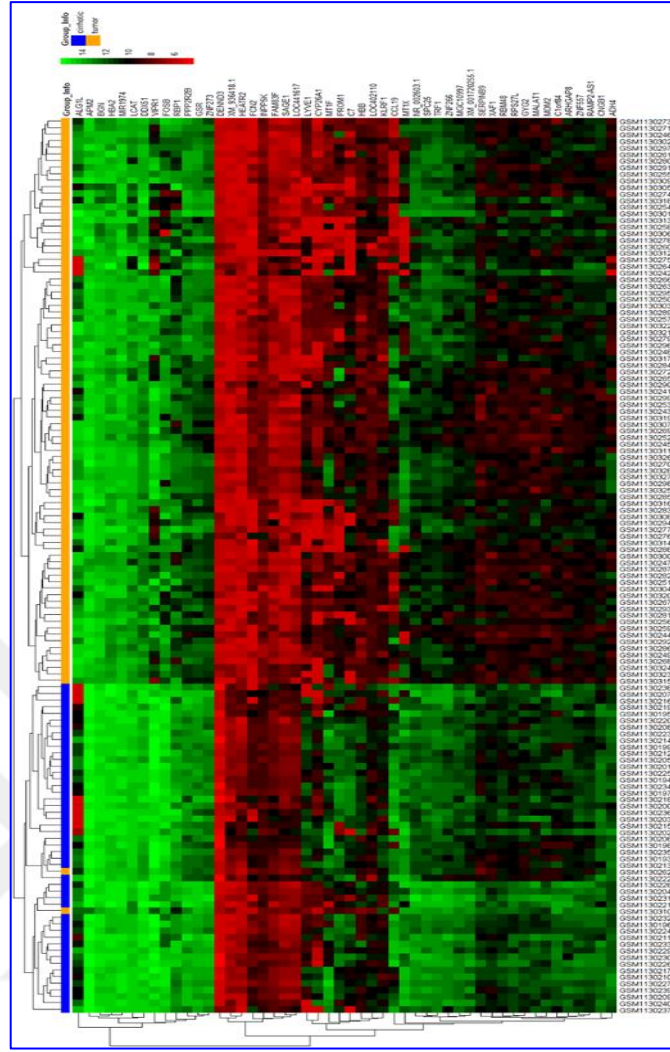
ID	adj.P.Val	P.Value	Log2FC	GI	GB_ACC
ILMN 2136010	5.13E-16	1.08E-20	2.2653643	NM 000670.3	ADH4
ILMN 1702383	2.93E-13	1.24E-17	1.5707109	NM 001297.1	CNGB1
ILMN 2147251	6.92E-13	4.39E-17	1.6130769	NR 001565.1	MGC10997
ILMN 1786720	1.35E-11	1.41E-15	3.0695491	NM 006017.1	PROM1
ILMN 2141650	1.35E-11	1.89E-15	1.7351626	NR 002819.1	MALAT1
ILMN 2245686	2.18E-11	3.68E-15	1.503838	NM 003918.2	GYG2
ILMN 2297096	3.42E-11	6.51E-15	1.5116106	NM 001017526.1	ARHGAP8
ILMN 1718766	4.68E-11	9.90E-15	3.0659617	NM 005949.2	MT1F
ILMN 2199389	6.40E-11	1.49E-14	2.942844	NM 004624.2	VIPR1
ILMN 1732537	6.74E-11	1.71E-14	1.1169017	NM 017802.2	HEATR2
ILMN 2346137	1.28E-10	3.53E-14	1.3014018	NM 001044387.1	ZNF557
ILMN 1714057	2.39E-10	7.06E-14	1.9520979	NM 004108.2	FCN2
ILMN 2126802	3.54E-10	1.12E-13	1.3382916	NM 015920.3	RPS27L
ILMN 2215382	9.46E-10	3.40E-13	1.046457	NM 175066.2	DDX51
ILMN 2100437	1.12E-09	4.26E-13	1.6471325	NM 000518.4	HBB
ILMN 2389851	1.79E-09	7.55E-13	1.5094376	NM 006879.2	MDM2
ILMN 2149400	6.13E-09	2.90E-12	1.3022124	NM 020675.3	SPC25
ILMN 2346562	6.13E-09	2.98E-12	1.2965792	NM 021148.2	ZNF273
ILMN 1687848	2.01E-08	1.06E-11	2.4883833	NM 000587.2	C7
ILMN 2184250	2.01E-08	1.11E-11	1.3491332	NM 004155.3	SERPINB9
ILMN 2357377	2.01E-08	1.07E-11	1.1782223	NM 003218.2	TERF1
ILMN 1683231	2.98E-08	1.76E-11	1.2859716	NM 138435.1	FAM83F
ILMN 2127416	3.52E-08	2.23E-11	1.2504523	NM 000637.2	GSR
ILMN 1751607	3.76E-08	2.54E-11	1.9227058	NM 175066.2	DDX51
ILMN 2215382	9.46E-10	3.40E-13	1.046457	NM 006732.1	FOSB

adj.P.Val: Adjusted P value (düzeltilmiş p değeri), log2FC: Logarithm of fold change (logaritmik kat değişimi), GB_ACC: GenBank accession number (gen bankası erişim numarası), GI: Gene info (gene bilgisi)

Tablo 4.2. GSE46444 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusunda ekspresyon düşüşü tespit edilen ilk 25 gen (genler adj P-value göre sıralanmıştır).

ID	adj.P.Val	P.Value	Log2FC	GI	GB_ACC
ILMN 2131293	3.02E-07	3.19E-10	-2.794612	NM 001015050.1	ALG1L
ILMN 1674386	1.05E-05	2.49E-08	-2.3831282	NM 002653.3	PITX1
ILMN 1787266	1.10E-05	2.64E-08	-2.1452389	NM 003122.2	SPINK1
ILMN 2391458	2.39E-05	7.38E-08	-1.6111474	NM 022977.1	ACSL4
ILMN 1785252	5.95E-05	2.53E-07	-1.1433955	NM 134426.2	SLC26A6
ILMN 1757255	7.23E-05	3.28E-07	-2.0781729	NM 058197.3	CDKN2A
ILMN 1776516	9.59E-05	4.93E-07	-1.3277727	NM 002220.1	ITPKA
ILMN 1688543	1.69E-04	1.18E-06	-2.2565236	NM 001643.1	APOA2
ILMN 1717173	2.00E-04	1.52E-06	-1.0954115	NM 018098.4	ECT2
ILMN 2051373	3.01E-04	2.70E-06	-1.0149922	NM 002497.2	NEK2
ILMN 2360291	3.48E-04	3.25E-06	-1.3762846	NM 020120.2	UGCGL1
ILMN 1809590	4.23E-04	4.25E-06	-1.443501	NM 016095.1	GINS2
ILMN 1678841	4.70E-04	4.98E-06	-1.3529373	NM 006398.2	UBD
ILMN 1811238	5.94E-04	7.15E-06	-1.7252767	NM 052947.3	ALPK2
ILMN 1712803	1.16E-03	1.94E-05	-1.1197562	NM 031966.2	CCNB1
ILMN 2354140	1.44E-03	2.81E-05	-1.2402484	NM 181528.2	NAT5
ILMN 2209515	1.77E-03	3.84E-05	-2.0751683	NR 002739.1	SNORD56
ILMN 1737813	1.78E-03	3.86E-05	-1.4745061	XM 001132636.1	PRNP
ILMN 1756849	1.96E-03	4.48E-05	-1.5426093	NM 021052.2	HIST1H2AE
ILMN 1694268	2.17E-03	5.33E-05	-1.2911237	NM 018645.3	HES6
ILMN 1657204	2.74E-03	7.59E-05	-1.9435086	NM 005500.1	SAE1
ILMN 2322346	2.82E-03	7.89E-05	-1.032828	NM 175729.1	SSX4
ILMN 1806692	2.83E-03	7.95E-05	-1.2883191	NM 000521.2	HEXB
ILMN 1777725	2.85E-03	8.06E-05	-1.2067761	NM 144703.2	LSM14B
ILMN 2409220	3.16E-03	9.49E-05	-1.1261905	NM 012484.1	HMMR

adj.P.Val: Adjusted P value (düzeltilmiş p değeri), log2FC: Logarithm of fold change (logaritmik kat değişimi), GB_ACC: GenBank accession number (gen bankası erişim numarası), GI: Gene info (gene bilgisi)



Şekil 4.3. Sirozlu ve HCC grubu arasında ekspresyonunda farklılık gösteren ilk 50 genin ısı grafiği (GSE46444 veri seti).

İki grup arasında ekspresyonunda farklılık görülen protein kodlayan genler ile işlevsel anotasyon (biyolojik süreç, moleküler işlev, hücresel bileşen) ve KEGG metabolik yolak zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5, Tablo 4.6, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te ayrıntılarıyla verilmiştir.

Tablo 4.3. GSE46444 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiği biyolojik süreçler (FDR'ye göre sıralanmıştır)

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway
4.05201737300478e-08	17	118	8.31435314310234	Long-chain fatty acid metabolic proc.
9.25316106971073e-12	24	167	8.29385280072766	Olefinic compound metabolic proc.
1.34295259215676e-07	16	117	7.89215622633344	Xenobiotic metabolic proc.
6.2258575108948e-08	17	125	7.84874936708861	Cellular response to xenobiotic stimulus
1.36589941640796e-07	16	119	7.75951494521859	Unsaturated fatty acid metabolic proc.
1.34295259215676e-07	17	135	7.26736052508204	Response to xenobiotic stimulus
2.5842886292527e-07	17	147	6.67410660466718	Detoxification
8.23416771299791e-08	19	166	6.605520817447	Cellular hormone metabolic proc.
4.04755935098164e-10	27	264	5.90230149597238	Response to toxic substance
3.0313955234349e-07	22	259	4.90212599579688	Hormone metabolic proc.
2.72954403676217e-07	35	616	3.27905638665132	Cellular metal ion homeostasis
2.5842886292527e-07	37	675	3.16343928738865	Monocarboxylic acid metabolic proc.
2.57108042818129e-07	38	704	3.11510356731876	Cellular cation homeostasis
3.40780778278899e-07	38	719	3.05011531487122	Cellular ion homeostasis
2.09372550098576e-07	50	1102	2.61848422890487	Carboxylic acid metabolic proc.
2.0886503920785e-07	51	1135	2.59319913009535	Oxoacid metabolic proc.
4.46401863280507e-07	51	1178	2.49854075777439	Cellular lipid metabolic proc.
4.08839576313674e-08	65	1555	2.41237331596728	Lipid metabolic proc.
1.36589941640796e-07	72	1911	2.17436957256125	Homeostatic proc.

Enrichment: Zenginleştirme; FDR: False discovery rate (yanlış bulgu oranı), Pathway: Yolak

Tablo 4.4. GSE46444 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiği moleküler işlevler (FDR'ye göre sıralanmıştır)

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway
0.00106176328850607	3	4	43.2835443037975	Anandamide 8,9 epoxidase activity
7.99508555318435e-05	6	19	18.2246502331779	NAD-retinol dehydrogenase activity
0.000500398393326624	5	17	16.9739389426657	Arachidonic acid epoxigenase activity
0.000108692002131146	6	21	16.4889692585895	Arachidonic acid monooxygenase activity
0.000486429621850252	6	28	12.3667269439421	Aromatase activity
8.52970616772582e-06	9	43	12.0791286429202	Steroid hydroxylase activity
9.31379282575115e-05	8	44	10.4929804372842	Oxidoreductase activity
0.000327128546244309	7	39	10.3584550470626	Oxygen binding
0.000114853350878558	8	47	9.82321572852141	Oxidoreductase activity
0.0011197848066443	7	50	8.07959493670886	Cholesterol binding
1.42658412496162e-06	15	121	7.15430484360289	Monooxygenase activity
0.000327128546244309	10	92	6.27297743533297	Alcohol binding
5.97804899805608e-06	16	159	5.80743571371706	Heme binding
8.52970616772582e-06	16	169	5.46380046438469	Tetrapyrrole binding
2.32770318864223e-05	16	184	5.01838194826637	Oxidoreductase activity
0.000500398393326624	13	169	4.43933787731256	Iron ion binding
0.00106176328850607	12	158	4.38314372696683	Oxidoreductase activity
1.9822809866189e-07	43	835	2.97196392026074	Oxidoreductase activity
0.000102105757369892	46	1238	2.14436514590704	Transition metal ion binding

Enrichment: Zenginleştirme; FDR: False discovery rate (yanlış bulgu oranı), Pathway: Yolak

Tablo 4.5. GSE46444 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiği hücresel bileşenler (FDR'ye göre sıralanmıştır).

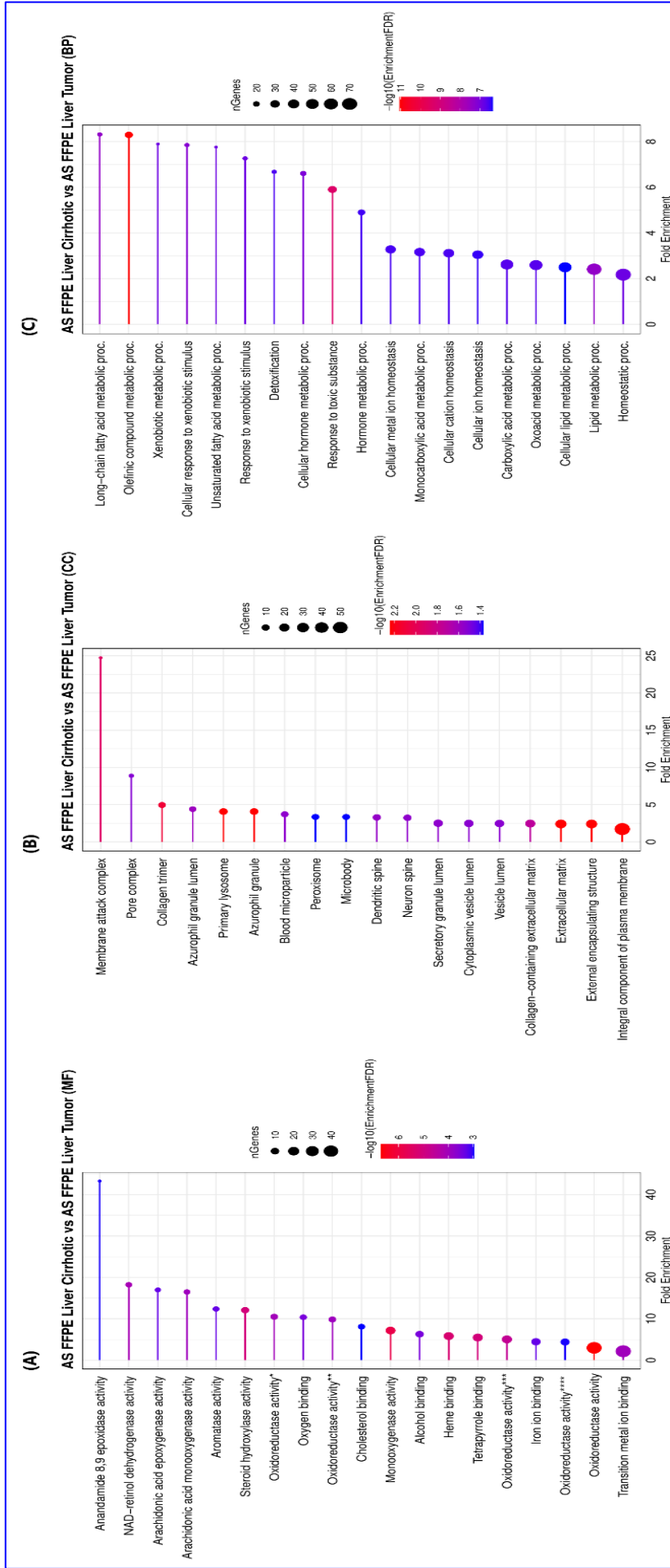
Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway
0.0111323775796193	3	7	24.7334538878843	Membrane attack complex
0.0299607067686291	4	26	8.87867575462512	Pore complex
0.00772304071991529	9	105	4.94669077757685	Collagen trimer
0.0253756528432589	8	105	4.3970584689572	Azurophil granule lumen
0.00578731285408867	12	170	4.07374534623976	Primary lysosome
0.00578731285408867	12	170	4.07374534623976	Azurophil granule
0.0284165688285856	9	140	3.71001808318264	Blood microparticle
0.042853519730291	9	155	3.35098407513271	Peroxisome
0.042853519730291	9	155	3.35098407513271	Microbody
0.0270927732669155	11	193	3.28925034433003	Dendritic spine
0.0282351069112928	11	196	3.23890467579437	Neuron spine
0.0284165688285856	16	368	2.50919097413319	Secretory granule lumen
0.028974042262691	16	372	2.48221042602423	Cytoplasmic vesicle lumen
0.028974042262691	16	374	2.46893657347864	Vesicle lumen
0.0184971584737132	19	446	2.45855707555202	Collagen-containing extracellular matrix
0.00578731285408867	25	600	2.40464135021097	Extracellular matrix
0.00578731285408867	25	601	2.40064028307252	External encapsulating structure
0.00578731285408867	56	1881	1.71814884353192	Integral component of plasma membrane
0.0111323775796193	3	7	24.7334538878843	Membrane attack complex

Enrichment: Zenginleştirme; FDR: False discovery rate (yanlış bulgu oranı), Pathway: Yolak

Tablo 4.6. GSE46444 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiği metabolik yollar (FDR'ye göre sıralanmıştır).

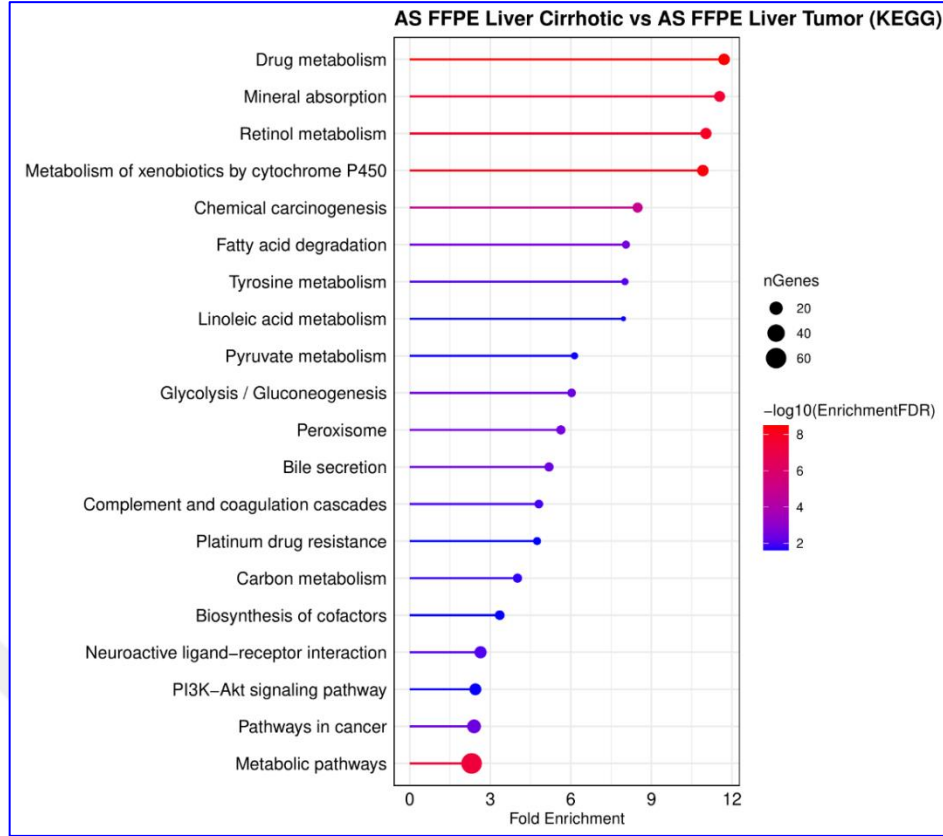
Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway
3.28113110467977e-09	14	69	11.7095578792882	Drug metabolism
2.95481322569978e-08	12	60	11.5422784810127	Mineral absorption
1.32678402894817e-08	13	68	11.0330603127327	Retinol metabolism
4.47350117198117e-09	14	74	10.9183715360931	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450
1.24247171523338e-05	10	68	8.48696947133284	Chemical carcinogenesis
0.00295632814506478	6	43	8.05275242861348	Fatty acid degradation
0.00817325820084135	5	36	8.0154711673699	Tyrosine metabolism
0.0225909884358528	4	29	7.9601920558708	Linoleic acid metabolism
0.02176426644044	5	47	6.13950983032588	Pyruvate metabolism
0.00383058285715991	7	67	6.02954846023049	Glycolysis / Gluconeogenesis
0.00295632814506478	8	82	5.63037974683544	Peroxisome
0.00383058285715991	8	89	5.18754089034277	Bile secretion
0.0123016356796435	7	84	4.80928270042194	Complement and coagulation cascades
0.0228905546118618	6	73	4.74340211548465	Platinum drug resistance
0.0160805935520511	8	115	4.0147055586131	Carbon metabolism
0.0225909884358528	9	155	3.35098407513271	Biosynthesis of cofactors
0.00903605584630444	16	350	2.63823508137432	Neuroactive ligand-receptor interaction
0.0225063400029033	15	354	2.44539798326539	PI3K-Akt signaling pathway
0.00383058285715991	22	530	2.39556723190829	Pathways in cancer
4.74534771656847e-08	61	1527	2.30543217859126	Metabolic pathways

Enrichment: Zenginleştirme; FDR: False discovery rate (yanlış bulgu oranı), Pathway: Yolak



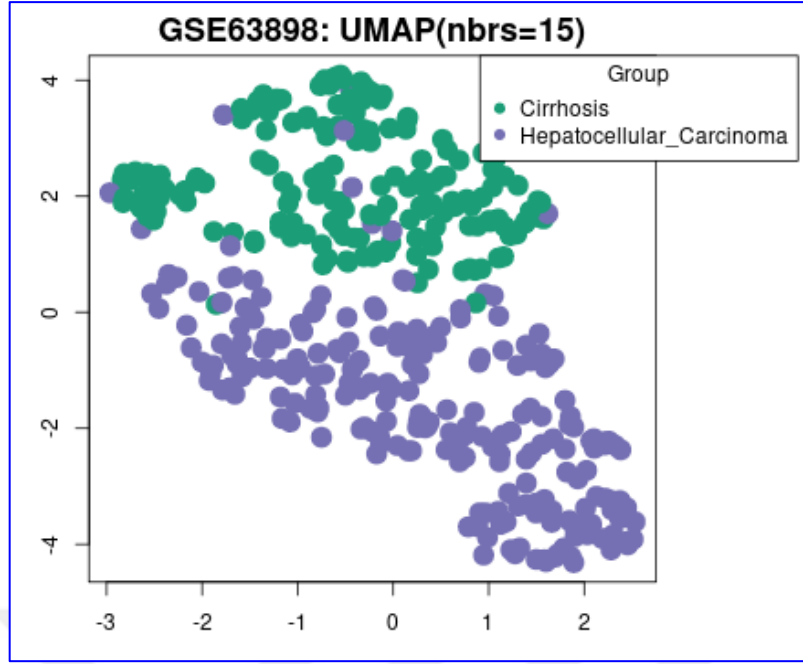
MF: moleküler işlevler, BP: biyolojik süreç, CC: hücresel bileşen

Şekil 4.4. Sirozlu ve HCC’li gruplar arasında BP, MF ve CC zenginleştirme grafiği (GSE46444 veri seti)



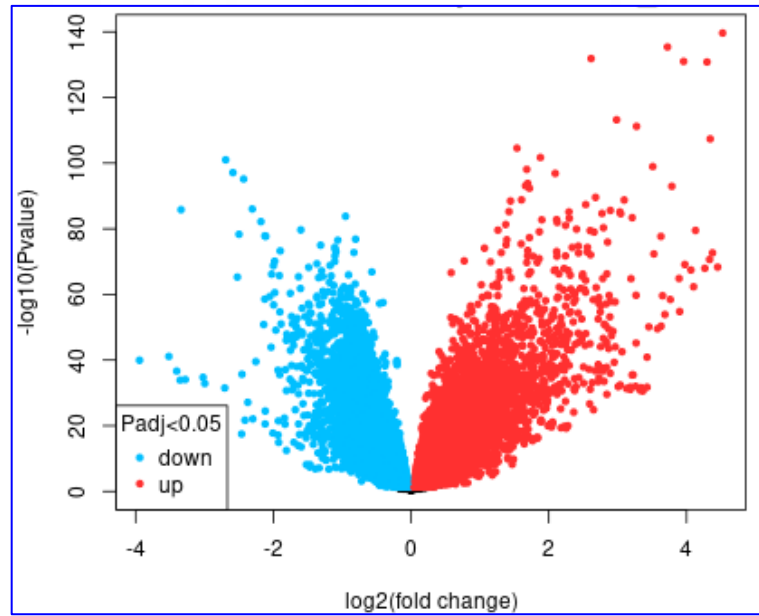
Şekil 4.5. Sirozlu ve HCC’li gruplar arasında metabolik yolak zenginleştirme grafiği (GSE46444 veri seti).

GSE63898 veri setinde 228 HCC ve 168 sirozlu karaciğer dokusu olmak üzere 396 örnek mikrodizi transkriptom yöntemi ile analiz gerçekleştirilmiştir. FFPE’li doku tipini içeren GSE46444 veri setinin aksine, normalizasyon sonrası GSE63898 veri setinde yer alan HCC ve siroz grupları UMAP kümeleme analizinde oldukça başarılı şekilde ayrım göstermiştir (Şekil 4.6). Bu durum, deneysel sürecin oldukça kontrollü ve teknik hatalardan büyük ölçüde arınmış olduğuna işaret etmektedir. Benzer şekilde, GSE63898 veri setinde iki grup arasında gen ekspresyon düzeyinde istatistiksel açıdan önemli farklar bulunmuştur ($|\log_2FC| > 1.0$, $p < 0.05$). HCC’li grup ile karşılaştırıldığında sirozlu örneklerde 1,261 genin ekspresyonu artmış, 458 genin ekspresyonu ise azaldığı görülmüştür (Şekil 4.7). İki grup arasında ekspresyonunda artış ve azalış gösteren ilk 25 protein kodlayan genlere ait bilgiler Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’de verilmiştir. Bu genlere ait ısı grafiği ise Şekil 4.8’de sunulmuştur.



Cirrhosis: Siroz, Hepatocellular carcinoma: HCC (Hepatosellüler karsinom)

Şekil 4.6. Sirozlu ve HCC transkriptom profilinin UMAP dağılımı (Yeşil Noktalar: Sirozlu örnekler, Mor noktalar: Hepatosellüler örnekler).



Şekil 4.7. Sirozlu ve HCC'li gruplar arasında gen ekspresyonu artan (kırmızı noktalar) ve azalan genlerin (mavi noktalar) Volkan grafiği.

Tablo 4.7. GSE63898 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusunda ekspresyon artışı tespit edilen ilk 25 gen (genler adj P-value göre sıralanmıştır).

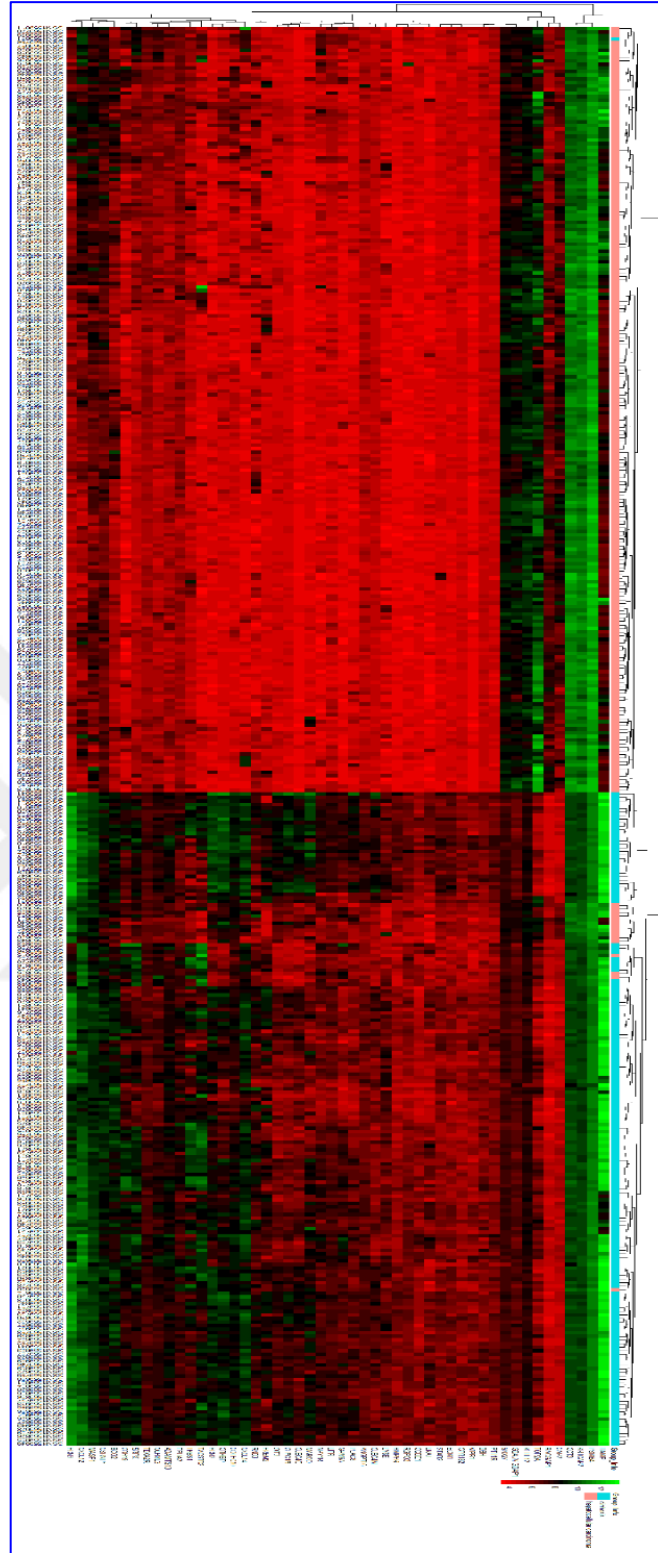
ID	adj.P.Val	P.Value	Log2FC	GB_ACC	GI
11717912_s_at	1.14E-135	2.32E-140	4.52	CXCL14	NM 004887
11731275_at	1.07E-131	4.31E-136	3.72	CLEC4G	NM 198492
11728139_a_at	2.34E-128	1.42E-132	2.61	ADAMTS13	NM 139025
11756838_a_at	1.34E-127	1.08E-131	3.96	FCN2	NM 004108
11756059_a_at	1.53E-127	1.55E-131	4.3	CXCL14	NM 004887
11731276_x_at	5.04E-110	6.13E-114	2.98	CLEC4G	NM 198492
11736982_at	4.51E-108	6.39E-112	3.27	COLEC10	NM 006438
11725216_s_at	2.58E-104	4.18E-108	4.34	FCN3	NM 003665
11725200_a_at	1.47E-101	2.69E-105	1.54	PTH1R	NM 000316
11724619_at	9.52E-99	1.93E-102	1.88	RSPO3	NM 032784
11723068_at	4.65E-96	1.13E-99	3.51	CRHBP	NM 001882
11735149_at	3.04E-95	7.99E-99	1.68	ANGPTL6	NM 031917
11722687_a_at	4.49E-94	1.36E-97	2.09	LIFR	NM 001127671
11729824_at	4.54E-91	1.56E-94	1.69	BMPER	NM 133468
11733298_a_at	2.15E-90	7.85E-94	1.66	VIPR1	NM 004624
11717301_at	3.03E-90	1.17E-93	3.79	TACSTD2	NM 002353
11756904_a_at	1.13E-89	4.56E-93	1.72	STAB2	NM 017564
11732904_a_at	6.22E-87	2.64E-90	2.68	CLEC1B	NM 001099431
11717891_a_at	3.34E-86	1.49E-89	1.6	ECM1	NM 004425
11720818_a_at	3.77E-86	1.75E-89	3.09	CXCL12	NM 000609
11754563_a_at	6.96E-86	3.38E-89	1.44	CCBE1	NM 133459
11742268_x_at	8.48E-85	4.30E-88	2.54	CLEC4M	NM 001144904
11753257_a_at	4.54E-83	2.57E-86	2.89	CXCL12	NM 000609
11752118_x_at	1.01E-82	5.93E-86	1.42	TBXA2R	NM 001060
11731862_at	1.18E-82	7.39E-86	3.03	CDH19	NM 021153

adj.P.Val: Adjusted P value (düzeltilmiş p değeri), log2FC: Logarithm of fold change (logaritmik kat değişimi), GB_ACC: GenBank accession number (gen bankası erişim numarası), GI: Gene info (gene bilgisi)

Tablo 4.8. GSE63898 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusunda ekspresyon düşüşü tespit edilen ilk 25 gen (genler adj P-value göre sıralanmıştır).

ID	adj.P.Val	P.Value	Log2FC	GB_ACC	GI
11748436_x_at	4.43E-98	9.88E-102	-2.69	CAP2	NM 006366
11720970_at	2.83E-83	1.55E-86	-3.34	TOP2A	NM 001067
11742832_a_at	4.6E-76	4.75E-79	-2.5	ASPM	NM 018136
11750144_x_at	2.7E-74	3.17E-77	-1.07	CCT3	NM 001008800
11717664_s_at	3.68E-72	4.77E-75	-1.11	KLHL12	NM 021633
11717176_at	1.78E-71	2.45E-74	-1.1	SNX27	NM 030918
11758149_s_at	3.72E-71	5.27E-74	-1.9	RACGAP1	NM 001126103
11716920_at	4.24E-68	7.56E-71	-1.98	PLVAP	NM 031310
11721562_a_at	2.4E-67	4.51E-70	-1.37	FAM189B	NM 006589
11721480_s_at	7.77E-67	1.5E-69	-1.18	GOLPH3L	NM 018178
11758089_s_at	8.83E-67	1.72E-69	-2	HMMR	NM 001142556
11721042_at	2.99E-66	5.94E-69	-1.49	NSMCE2	NM 173685
11722711_a_at	3.09E-65	6.56E-68	-1.3	PPOX	NM 000309
11718943_a_at	2.88E-64	6.65E-67	-2.02	AURKA	NM 003600
11717521_x_at	7.83E-64	1.87E-66	-1.91	PTTG1	NM 004219
11757699_x_at	9.2E-64	2.22E-66	-1.16	PSMD4	NM 002810
11751086_x_at	1.41E-63	3.42E-66	-1.28	GBA	NM 000157
11718790_at	1.63E-63	4.03E-66	-1.63	HES6	NM 001142853
11733695_a_at	2.08E-63	5.19E-66	-2.52	UBE2C	NM 007019
11747203_x_at	7.95E-62	2.11E-64	-1.19	CLN3	NM 000086
11716336_a_at	6.07E-61	1.66E-63	-1.12	PRCC	NM 005973
11736167_a_at	5.18E-60	1.51E-62	-1.61	CCDC34	NM 030771
11755529_s_at	1.89E-59	5.78E-62	-1.01	ZNF322A	NM 024639
11757036_x_at	4.42E-59	1.38E-61	-1.2	SAC3D1	NM 013299
11716358_s_at	8.76E-59	2.78E-61	-1.98	PRC1	NM 003981

adj.P.Val: Adjusted P value (düzeltilmiş p değeri), log2FC: Logarithm of fold change (logaritmik kat değişimi), GB_ACC: GenBank accession number (gen bankası erişim numarası), GI: Gene info (gene bilgisi)



Şekil 4.8. Sirozlu ve HCC’li gruplar arasında ekspresyonunda farklılık gösteren ilk 100 genin ısı grafiği (GSE638984 veri seti).

İki grup arasında ekspresyonunda farklılık görülen protein kodlayan genler ile işlevsel anotasyon biyolojik süreç, moleküler işlev, hücresel bileşen ve KEGG

metabolik yolak zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.9, Tablo 4.10, Tablo 4.11, Tablo 4.12, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da ayrıntılarıyla verilmiştir.

Tablo 4.9. GSE638984 veri setinde HCC’ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiği biyolojik süreçler (FDR’ye göre sıralanmıştır).

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway
2.27328583057565e-17	42	167	5.57697057247373	Olefinic compound metabolic proc.
8.01936526384558e-16	57	331	3.81867234062562	Carboxylic acid biosynthetic proc.
1.98374277728846e-16	60	352	3.77984612663601	Steroid metabolic proc.
1.05262767697712e-17	68	414	3.64228650914491	Fatty acid metabolic proc.
9.78926469046677e-27	107	675	3.5151635682375	Monocarboxylic acid metabolic proc.
7.78496930260339e-16	79	584	2.9997135014125	Response to inorganic substance
4.95709241762695e-26	140	1102	2.81716299335485	Carboxylic acid metabolic proc.
2.34836366506075e-25	141	1135	2.75479182022318	Oxoacid metabolic proc.
2.39895532071157e-20	117	950	2.73103829612943	Inflammatory response
5.2127583307185e-16	112	1017	2.44209527526218	Response to lipid
2.27328583057565e-17	142	1404	2.24278049375326	Response to cytokine
2.66757054326265e-19	163	1639	2.20533304211783	Cell adhesion
5.53782430294381e-18	154	1555	2.19611895854968	Lipid metabolic proc.
3.63236471683964e-19	163	1646	2.19595434752802	Biological adhesion
2.30940218370398e-21	181	1832	2.19088024399776	Response to oxygen-containing compound
7.15139405605581e-17	153	1590	2.1338301152632	Cell migration
2.27328583057565e-17	166	1769	2.08087402366304	Response to endogenous stimulus
2.27328583057565e-17	169	1817	2.06251592718146	Reg. of cell population proliferation

Enrichment analysis: Zenginleştirme analizi; FDR: False discovery rate (Yanlış bulgu oranı), Pathway: yolak

Tablo 4.10. GSE638984 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiği moleküler işlevler (FDR'ye göre sıralanmıştır).

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway
1.88052153197125e-09	11	17	14.34859235523	Arachidonic acid epoxigenase activity
6.53686128380926e-09	13	28	10.2955808782657	Aromatase activity
2.57951230111518e-11	18	43	9.28259885983169	Steroid hydroxylase activity
4.02368179929045e-10	17	44	8.56765122037496	Oxidoreductase activity
1.09027251286369e-07	15	47	7.07715870519083	Oxidoreductase activity
1.52188606817732e-13	32	121	5.86448853587163	Monooxygenase activity
2.22219354047808e-13	36	159	5.02077674179576	Heme binding
1.36337308035185e-12	36	169	4.72368936062441	Tetrapyrrole binding
1.96657598514269e-13	39	184	4.70015648790391	Oxidoreductase activity
3.2639667952219e-11	34	169	4.46126217392305	Iron ion binding
4.03012637803852e-10	34	186	4.05351240533869	Extracellular matrix structural constituent
9.24696014161281e-07	26	158	3.64906664039797	Oxidoreductase activity
3.16471764032381e-06	24	147	3.62042404510442	Oxidoreductase activity
1.83910810837617e-10	41	253	3.59359283923655	Glycosaminoglycan binding
1.41042115194913e-06	28	184	3.37447132464896	Heparin binding
1.26931089094021e-18	105	835	2.78848528623686	Oxidoreductase activity
2.1352104369373e-09	138	1722	1.77709838799333	Signaling receptor binding
1.52730071759966e-06	99	1238	1.77329130076752	Transition metal ion binding
1.71269713443196e-06	111	1446	1.70223775772156	Protein-containing complex binding

Enrichment analysis: Zenginleştirme analizi; FDR: False discovery rate (Yanlış bulgu oranı)

Tablo 4.11. GSE638984 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiği hücresel bileşenler (FDR'ye göre sıralanmıştır).

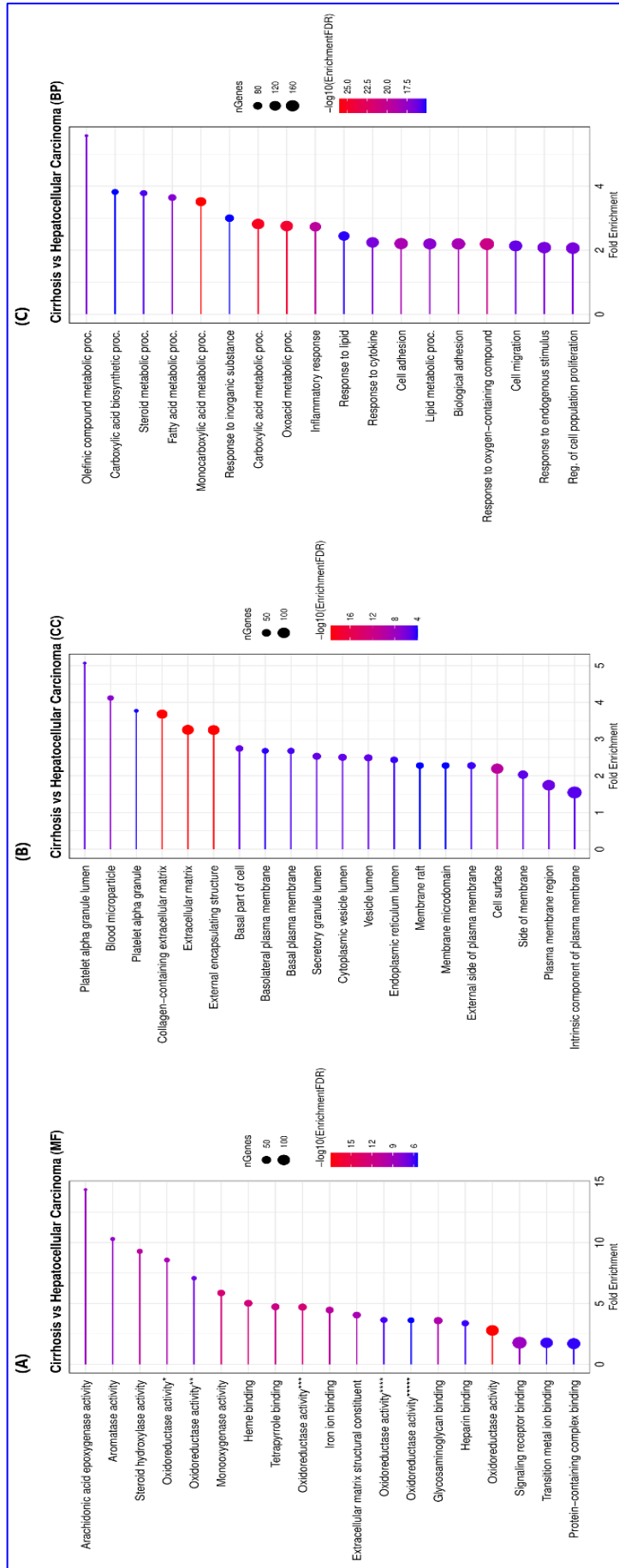
Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway
4.56097746418143e-06	16	70	5.06859366314619	Platelet alpha granule lumen
1.05889557160392e-07	26	140	4.11823235130628	Blood microparticle
9.27543641718456e-05	17	100	3.76976653696498	Platelet alpha granule
3.51021940169203e-20	74	446	3.67927622969412	Collagen-containing extracellular matrix
3.17129764311454e-20	88	600	3.25234760051881	Extracellular matrix
3.17129764311454e-20	88	601	3.24693604045139	External encapsulating structure
4.56097746418143e-06	35	283	2.74250319671117	Basal part of cell
6.24340859099691e-05	29	240	2.67949092088197	Basolateral plasma membrane
2.23308458935479e-05	32	265	2.6777475956244	Basal plasma membrane
3.74396456856492e-06	42	368	2.53085349348672	Secretory granule lumen
4.45697421913458e-06	42	372	2.50364001506213	Cytoplasmic vesicle lumen
4.56097746418143e-06	42	374	2.49025156578372	Vesicle lumen
3.95971152230525e-05	36	328	2.43385214007782	Endoplasmic reticulum lumen
0.000108213454833219	37	360	2.27910722006053	Membrane raft
0.000108213454833219	37	360	2.27910722006053	Membrane microdomain
3.21432864232179e-05	42	409	2.27714935355284	External side of plasma membrane
7.98966016125633e-11	95	960	2.19441066796368	Cell surface
6.41433400553834e-06	62	677	2.03080654524137	Side of membrane
2.43598117902435e-06	104	1323	1.74316713282806	Plasma membrane region

Enrichment analysis: Zenginleştirme analizi; FDR: False discovery rate (Yanlış bulgu oranı)

Tablo 4.12. GSE638984 veri setinde HCC'ye göre sirozlu karaciğer dokusundaki ekspresyonunda istatistiksel açıdan farklılık gösteren genlerin zenginleştiği metabolik yollar (FDR'ye göre sıralanmıştır).

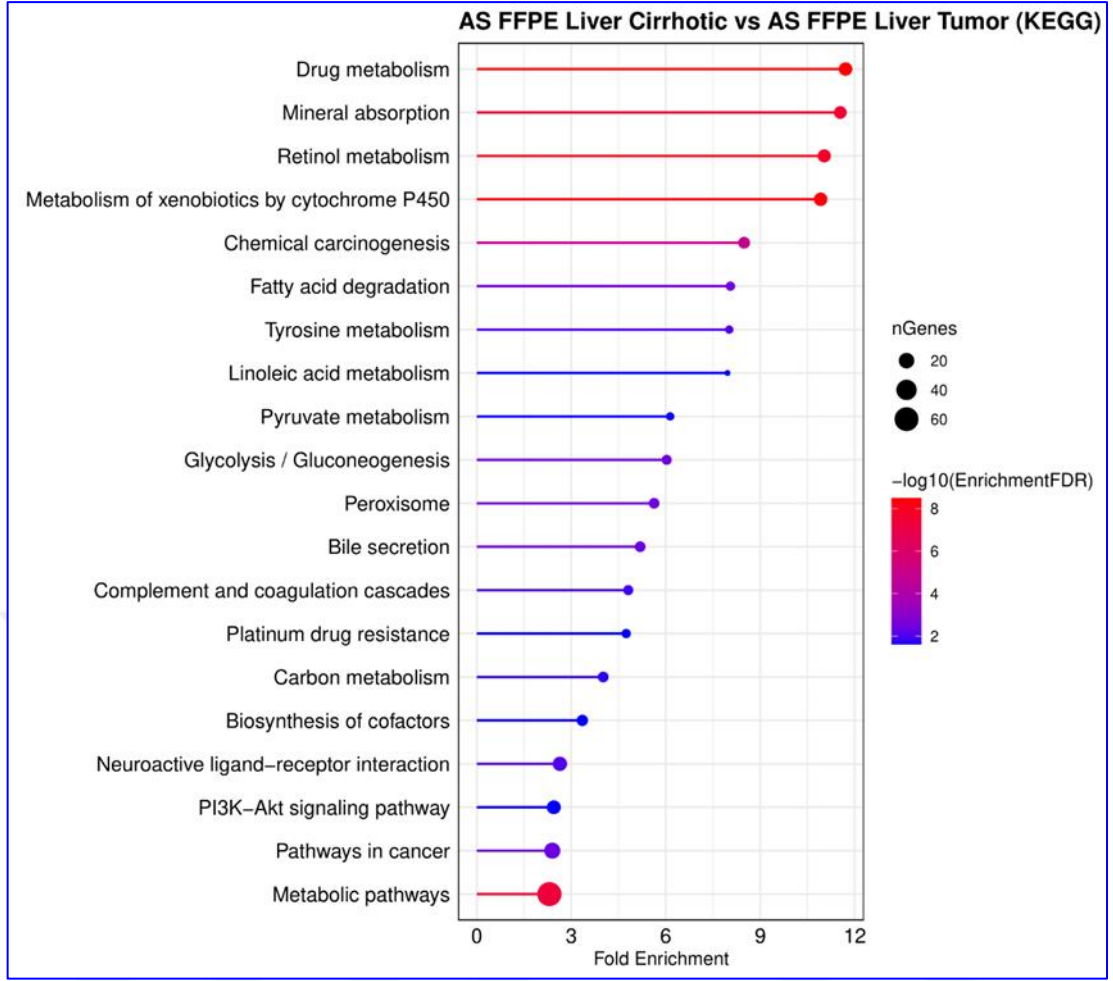
Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathway
1.7380515489285e-11	22	68	7.17429617761502	Retinol metabolism
5.41527970637281e-07	13	43	6.70409917654511	Fatty acid degradation
6.47102366642794e-10	20	68	6.52208743419547	Chemical carcinogenesis
6.47102366642794e-10	20	69	6.42756442790278	Drug metabolism
3.93434491730006e-07	14	49	6.33574207893274	Intestinal immune network for IgA production
5.50884583270273e-10	21	74	6.29293301083184	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450
6.47102366642794e-10	22	84	5.80776357235501	Complement and coagulation cascades
1.75471992846654e-10	24	92	5.7848079851125	Rheumatoid arthritis
7.75271168814308e-07	15	60	5.54377431906615	Mineral absorption
3.93434491730006e-07	16	65	5.45848548338821	Inflammatory bowel disease
8.9164799716463e-07	15	61	5.45289277285195	Arachidonic acid metabolism
8.04090594697217e-10	23	94	5.42582167397963	Staphylococcus aureus infection
1.0512991075765e-07	18	75	5.3220233463035	PPAR signaling pathway
1.22572624189075e-07	18	76	5.25199672332582	Leishmaniasis
6.58848254272e-08	20	89	4.98316792725047	Bile secretion
1.01731915327503e-07	26	151	3.81822867008529	Phagosome
3.93434491730006e-07	24	141	3.77448464276844	Alcoholic liver disease
1.01731915327503e-07	43	354	2.69358526237112	PI3K-Akt signaling pathway
4.30787936263117e-08	57	530	2.38486895235298	Pathways in cancer

Enrichment analysis: Zenginleştirme analizi; FDR: False discovery rate (Yanlış bulgu oranı)



Cirrhosis: siroz, Hepatocellular carcinoma: HCC (hepatosellüler karsinom)x

Şekil 4.9. Sirozlu ve HCC’li gruplar arasında BP, MF ve CC zenginleştirme grafiği (GSE638984 veri seti).



Şekil 4.10. Sirozlu ve HCC'li gruplar arasında metabolik yolak zenginleştirme grafiği (GSE638984 veri seti).

4.2. WGBS (Tüm Genom Bisülfid Dizileme) Sonuçları

Bu tezin temel amacı HCC gelişiminde rol oynayan biyolojik süreçlerin aydınlatılmasıdır. Bu bağlamda, transkriptomik mikrodizi analizinin yanı sıra, kansinogenezde önem taşıyan genom düzeyinde metilasyon profilinin ortaya konulması da amaçlanmıştır. Bu nedenle, NCBI SRA gibi açık genomik verileri içeren veri tabanlarından tüm genom bisülfid verileri indirilmiştir ve i) "HCC metilasyon verisi ile sağlıklı karaciğer metilasyon verisi", (ii) "HCC metilasyon verisi ile siroz metilasyon verisi" karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçları Tablo 4.13 ve Tablo 4.14'te sunulmuştur.

Tablo 4.13. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde hipermetile olan top 20 genomik bölge.

Chr	Start	End	Length	nCG	meanMethy1	meanMethy2	diff.Methy	Gene
Chr 19	18868555	18869451	897	235	0.235186431	0.658857821	-0.42367139	GDF1.CERS1
Chr 12	95548305	95548761	457	123	0.072308236	0.431109339	-0.358801103	USP44
Chr 11	65585129	65585630	502	147	0.440940212	0.810706761	-0.369766549	EHP1L1.SIPA1
Chr 6	149450761	149451029	269	76	0.08041282	0.564716028	-0.484303208	ZC3H12D
Chr 9	97854276	97854644	369	113	0.078294011	0.365391189	-0.287097178	FOXE1
Chr 2	232928064	232928356	293	98	0.143035456	0.485520992	-0.342485535	NGEF
Chr 8	144580889	144581255	367	85	0.136565013	0.488468021	-0.351903007	ARHGAP39
Chr 20	51802166	51802543	378	77	0.156406622	0.543060201	-0.386653579	SALL4
Chr 2	111119083	111119594	512	102	0.140017746	0.400564632	-0.260546886	BCL2L11
Chr 1	228212371	228212665	295	89	0.239497106	0.65430122	-0.414804114	OBSCN.OBSCN-
Chr 11	47590085	47590397	313	93	0.224428863	0.585826515	-0.361397652	C1QTNF4
Chr 10	132785114	132785445	332	74	0.13008709	0.517303457	-0.387216368	NKX6-2
Chr 2	27442370	27442622	253	60	0.202423741	0.715603692	-0.513179951	KRTCAP3
Chr 13	109140491	109140939	449	98	0.183077964	0.505396277	-0.322318313	MYO16
Chr 22	46262914	46263179	266	90	0.200710114	0.517110868	-0.316400754	PKDREJ
Chr 14	69571638	69572053	416	94	0.09199152	0.379308554	-0.287317034	CCDC177
Chr 18	14999182	14999544	363	91	0.280694541	0.587093175	-0.306398634	-
Chr X	20116894	20117130	237	85	0.216460338	0.582363595	-0.365903257	MAP7D2
Chr 22	46536460	46536763	304	98	0.12393005	0.385246352	-0.261316302	CELSR1
Chr 16	54931155	54931474	320	93	0.066441253	0.282466587	-0.216025334	IRX5

Tablo 4.13’de yer alan ve istatistiksel bakımdan önemli ilk 20 genomik bölge incelendiğinde; bu bölgelerde sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC gösteren karaciğerde hipermetilasyona uğrayan genlerin yer aldığı tespit edilmiştir. Tablo 4.14’te ise, sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC gösteren karaciğerde hipometilasyona uğrayan genomik lokasyonlar sunulmuştur (Tablo 4.14).



Tablo 4.14. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde hipometile olan top 20 genomik bölge.

Chr	Start	End	Length	nCG	meanMethy1	meanMethy2	diff.Methy	Gene
Chr 7	54668058	54668219	162	23	0.792011913	0.208281875	0.583730039	non-coding region
Chr 8	56653607	56653810	204	26	0.70370147	0.258297167	0.445404303	non-coding region
Chr 4	164188238	164188326	89	21	0.77572998	0.237901844	0.537828136	ENSG00000250746
Chr 9	134991017	134991130	114	20	0.753474248	0.224125421	0.529348828	non-coding region
Chr 4	134952933	134953049	117	26	0.777062983	0.317149665	0.459913318	non-coding region
Chr 7	118670718	118670921	204	23	0.727011693	0.299386285	0.427625408	non-coding region
Chr 4	35368751	35368869	119	20	0.724687084	0.228252488	0.496434596	non-coding region
Chr Y	11306809	11306901	93	18	0.811512519	0.229931177	0.581581342	non-coding region
Chr 5	17390117	17390187	71	16	0.680504914	0.133607872	0.546897042	non-coding region
Chr 19	39403942	39404055	114	20	0.435369296	0.043617478	0.391751818	non-coding region
Chr 7	19266171	19266240	70	14	0.638600143	0.095398566	0.543201577	non-coding region
Chr 7	72097927	72098010	84	12	0.613731923	0.143528528	0.470203395	non-coding region
Chr 3	84918685	84918795	111	19	0.735090196	0.295136692	0.439953504	non-coding region
Chr 8	67946096	67946163	68	12	0.796230086	0.238049921	0.558180165	non-coding region
Chr 9	20097835	20097903	69	14	0.726523435	0.186747991	0.539775444	non-coding region
Chr 9	80328186	80328388	203	18	0.635562924	0.219394936	0.416167988	non-coding region
Chr 8	141760558	141760670	113	16	0.566602633	0.139929237	0.426673396	non-coding region
Chr 8	91409226	91409367	142	17	0.676085431	0.137734109	0.538351321	non-coding region
Chr 19	35371392	35372097	706	25	0.719273626	0.338686677	0.380586949	GPR42
Chr 11	1194517	1194759	243	23	0.648746685	0.29458712	0.354159565	MUC5AC

Chr: chromosome; The Network of Cancer Genes

HCC genomunda yer alan tüm metilasyon (hipo-, hiper-) bölgeler yer almaktadır. İstatistiksel açıdan anlamlı metilasyon bölgelerine ait işlevsel anotasyon kanser gibi hastalıkların moleküler mekanizmasının aydınlatılması ve yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi bakımından önem taşımaktadır. Sağlıklı ve kanserli karaciğer metilasyon profilleri, Gen ontoloji (GO) ve KEGG metabolik yolak bakımından zenginleştirme analizi gerçekleştirilmiştir. GO zenginleştirme analizleri biyolojik süreç, moleküler işlev ve hücresel bileşen açısından ele alınmış ve sonuçlar Tablo 4.15, Tablo 4.16 Tablo 4.17 ve Şekil 4.11’de ayrıntılarıyla sunulmuştur. Metabolik yolak zenginleştirme sonuçları ise, KEGG veri tabanında yer alan ve oldukça kapsamlı yolakların zenginleştirilmesi ile elde edilmiş, sonuçlar Tablo 4.18 ve Şekil 4.12’de sunulmuştur.

Tablo 4.15. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC’li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı biyolojik süreçler.

Gen Sayısı	BP Gen Sayısı	Biyolojik Süreç (BP)	Kat Artışı	FDR
35	230	Skeletal system morphogenesis	3.617	3.44253E-08
38	274	Sensory organ morphogenesis	3.297	4.98902E-08
42	307	Embryonic organ morphogenesis	3.252	1.61987E-08
37	290	Axon guidance	3.033	7.31354E-07
37	291	Neuron projection guidance	3.022	7.62446E-07
56	460	Embryonic organ development	2.894	2.14456E-09
74	622	Embryonic morphogenesis	2.828	4.28629E-12
57	527	Skeletal system development	2.571	3.80485E-08
65	641	Chordate embryonic development	2.410	3.44253E-08
66	661	Embryo development ending in birth or egg hatching	2.373	3.80485E-08
58	589	Sensory organ development	2.341	7.14944E-07
104	1102	Embryo development	2.243	2.3727E-11
100	1133	Animal organ morphogenesis	2.098	2.5053E-09
75	856	Head development	2.083	6.45516E-07
71	811	Brain development	2.081	1.48731E-06
101	1183	Anatomical structure formation involved in morphogenesis	2.029	9.50111E-09
94	1105	Central nervous system development	2.022	3.44253E-08
124	1624	Generation of neurons	1.815	3.44253E-08
134	1757	Neurogenesis	1.813	9.50111E-09
112	1473	Neuron differentiation	1.807	2.93483E-07

FDR: False discovery rate (Yanlış bulgu oranı)

Tablo 4.16. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı moleküler işlevler.

Gen Sayısı	MF Gen Sayısı	Moleküler İşlev (MF)	Kat Artışı	FDR
15	92	Voltage-gated potassium channel activity	3.876	0.000470357
18	128	Potassium channel activity	3.343	0.000470357
28	211	Voltage-gated ion channel activity	3.154	8.52929E-06
21	166	Potassium ion transmembrane transporter activity	3.007	0.000470357
22	186	Extracellular matrix structural constituent	2.812	0.000722617
37	365	Gated channel activity	2.410	7.40678E-05
41	459	Ion channel activity	2.123	0.00042347
111	1272	Cis-regulatory region sequence-specific DNA binding	2.074	3.93987E-11
108	1253	RNA polymerase II cis-regulatory region sequence-specific DNA binding	2.049	1.59184E-10
43	509	Channel activity	2.008	0.000722617
131	1596	Transcription cis-regulatory region binding	1.951	2.68047E-11
131	1598	Transcription regulatory region nucleic acid binding	1.949	2.68047E-11
118	1446	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific	1.940	3.25729E-10
144	1767	Sequence-specific DNA binding	1.937	8.13517E-12
135	1660	Sequence-specific double-stranded DNA binding	1.933	2.68047E-11
121	1488	RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	1.933	2.35252E-10
123	1515	DNA-binding transcription factor activity	1.930	1.90855E-10
60	770	Calcium ion binding	1.852	0.000302319
136	1775	Double-stranded DNA binding	1.821	5.04506E-10

FDR: False discovery rate (Yanlış bulgu oranı)

Tablo 4.17. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı hücresel bileşenler.

Gen Sayısı	CC Gen Sayısı	Hücresel Bileşen (CC)	Kat Artışı	FDR
9	63	Anchored component of plasma membrane	3.396	0.046906355
10	72	Main axon	3.301	0.037635138
13	94	Voltage-gated potassium channel complex	3.287	0.013040281
13	104	Potassium channel complex	2.971	0.026466861
22	238	Cation channel complex	2.197	0.026466861
29	324	Ion channel complex	2.128	0.011246
25	297	Postsynaptic membrane	2.001	0.037635138
33	401	Synaptic membrane	1.956	0.015576207
106	1316	Chromatin	1.915	5.94107E-08
46	600	Extracellular matrix	1.822	0.008050889
46	601	External encapsulating structure	1.819	0.008050889
34	445	Cell leading edge	1.816	0.032406579
103	1443	Synapse	1.697	2.55204E-05
48	682	Postsynapse	1.673	0.025763777
48	712	Plasma membrane protein complex	1.603	0.040021777
128	1918	Chromosome	1.586	2.55204E-05
58	907	Anchoring junction	1.520	0.042258906
125	1965	Intrinsic component of plasma membrane	1.512	0.000343825
116	1881	Integral component of plasma membrane	1.466	0.002777085

FDR: False discovery rate (Yanlış bulgu oranı)

Tablo 4.18. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC’li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin zenginleştiği metabolik yollar (KEGG).

Gen Sayısı	KEGG Gen Sayısı	Metabolik Yolak	Kat Artışı	FDR
10	63	Basal cell carcinoma	3.773	0.025788425
12	88	ECM-receptor interaction	3.241	0.025788425
16	143	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	2.660	0.025788425
17	155	Cushing syndrome	2.607	0.025788425
39	530	Pathways in cancer	1.749	0.032382387
10	63	Basal cell carcinoma	3.773	0.025788425

FDR: False discovery rate (Yanlış bulgu oranı); KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Genel olarak proje kapsamı açısından genomik/transkriptomik veri tabanları incelendiğinde, siroz ile HCC çalışmaları büyük ölçüde birlikte çalışıldığı görülmektedir. Bu bağlamda, sirozlu bireylerin karaciğer metilasyon profili ile HCC’li bireylerin karaciğer dokusunun metilasyon profilleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda, gruplar arasında hiper- ve hipometilasyona uğrayan genomik bölgeler tespit edilmiştir. Tablo 4.19 ve Tablo 4.20’de söz konusu metilasyon profili top 20 genomik bölgeler için yapılmıştır.

Tablo 4.19. Sirozlu karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde hipermetile olan top 20 genomik bölge.

Chr	Start	End	Length	nCG	meanMethy1	meanMethy2	diff.Methy	Gene
Chr 2	232927897	232928396	500	145	0.063467253	0.440913095	-0.377445842	NGEF
Chr 12	95548305	95548761	457	123	0.043876472	0.431241542	-0.38736507	USP44
Chr 6	43076260	43076765	506	109	0.0323236281	0.377256203	-0.344019922	PTK7
Chr 7	128031530	128032060	531	106	0.121119756	0.495425774	-0.374306018	LRRC4
Chr 8	144580896	144581255	360	79	0.106389766	0.49165857	-0.385268804	ARHGAP39
Chr 3	125141679	125142086	408	92	0.06698527	0.422539198	-0.355553928	non-coding region
Chr 9	131276713	131276935	223	82	0.05783991	0.438544814	-0.380704904	non-coding region
Chr 1	151839734	151840074	341	64	0.055725076	0.468484749	-0.412759673	non-coding region
Chr 7	151115171	151115380	210	73	0.089418907	0.45829101	-0.368872103	AGAP3
Chr 21	31558961	31559197	237	72	0.065122375	0.488994271	-0.423871896	TIAM1
Chr 7	128031127	128031456	330	74	0.148062111	0.556800139	-0.408738028	non-coding region
Chr 17	44325315	44325712	398	75	0.07324964	0.411974315	-0.338724675	non-coding region
Chr 13	109140599	109140996	398	85	0.168588199	0.521719623	-0.353131424	MYO16
Chr 7	151115563	151115820	258	77	0.260565772	0.624263944	-0.363698172	AGAP3
Chr 17	19579914	19580306	393	71	0.046267031	0.38785507	-0.341588039	SLC47A1P1
Chr 20	51802110	51802438	329	69	0.187718991	0.524781834	-0.337062843	SALL4
Chr 20	1803684	1803906	223	62	0.056377936	0.512393429	-0.456015493	non-coding region
Chr 8	144266539	144266767	229	62	0.129486832	0.542830132	-0.413343301	SCX
Chr 3	179451236	179451384	149	56	0.061239652	0.450465669	-0.389226017	GNB4
Chr 12	122183103	122183286	184	54	0.070963497	0.483481567	-0.41251807	LRRRC43

Tablo 4.20. Sirozlu karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde hipometile olan top 20 genomik bölge.

Chr	Start	End	Length	nCG	meanMethy1	meanMethy2	diff.Methy	Gene
Chr 5	20305514	20305688	175	39	0.727918033	0.320174941	0.407743092	CDH18-AS1
Chr 3	84918681	84918867	187	25	0.753673619	0.275345976	0.478327642	non-coding region
Chr 2	2186148	2186257	110	20	0.753486833	0.278419228	0.475067605	non-coding region
Chr 22	48750918	48751051	134	31	0.771046479	0.405988259	0.36505822	TAF5
Chr 8	56653617	56653809	193	23	0.73906471	0.266799066	0.472265644	non-coding region
Chr 9	79193660	79193747	88	28	0.793387747	0.432624033	0.360763714	non-coding region
Chr 14_K1270724	2179	2332	154	23	0.708832338	0.246975489	0.461856848	non-coding region
Chr 4	164188238	164188327	90	22	0.779664509	0.235855584	0.543808925	ENSG00000250746
Chr 6	121682813	121682904	92	24	0.871247676	0.506556164	0.364691513	-
Chr 12	4370512	4370575	64	19	0.787795859	0.293302008	0.494493851	FGF23
Chr 20	24543273	24543453	181	24	0.731130853	0.329728969	0.401401885	SYNDIG1
Chr 7	158570677	158570760	84	21	0.700400634	0.301015809	0.399384825	non-coding region
Chr 4	54890886	54890961	76	18	0.834119604	0.399976716	0.434142888	non-coding region
Chr 12	132260938	132261048	111	26	0.729009305	0.373334188	0.355675117	GALNT9
Chr 17	83134645	83134718	74	20	0.839168489	0.420145925	0.419022564	ENSG00000279143
Chr 11	130473415	130473568	154	23	0.777456089	0.452285251	0.325170838	ADAMTS15
Chr 8	141760558	141760622	65	14	0.626166697	0.131249072	0.494917625	non-coding region
Chr 18	61071276	61071336	61	15	0.839575317	0.372255641	0.467319676	non-coding region
Chr 4	28811954	28812018	65	16	0.745237908	0.256611788	0.488626119	non-coding region
Chr 4	138854078	138854144	67	13	0.777092677	0.300290781	0.476801895	non-coding region

Yukarıdaki tablolara benzer şekilde sızorlu karaciğer ve HCC'li karaciğer dokusunun metilasyon profili işlevsel olarak annotate edilmiştir. Bu anotasyon sonucunda biyolojik süreç, moleküler işlev ve hücresel bileşen gibi süreçlerde zenginleşen metilasyon bölgeleri Tablo 4.21, Tablo 4.22, Tablo 4.23 ve Şekil 4.13'te sunulmuştur. Bununla birlikte her iki grup arasında KEGG metabolik zenginleştirme analizleri yapılmış, fakat istatistiksel olarak anlamlı bir zenginleştirme bulunamamıştır.

Tablo 4.21. Sirozlu karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı biyolojik süreçler.

Gen Sayısı	BP Gen Sayısı	Biyolojik Süreç (BP)	Kat Artışı	FDR
26	225	Reg. of synapse organization	3.599	6.34298E-06
27	236	Reg. of synapse structure or activity	3.563	4.81566E-06
31	307	Embryonic organ morphogenesis	3.145	6.34298E-06
45	451	Synapse organization	3.107	1.2496E-08
44	460	Embryonic organ development	2.979	6.25194E-08
46	490	Axonogenesis	2.924	4.80488E-08
62	686	Neuron projection morphogenesis	2.815	4.43868E-10
48	533	Axon development	2.805	6.57326E-08
63	700	Plasma membrane bounded cell projection morphogenesis	2.803	4.43868E-10
63	704	Cell projection morphogenesis	2.787	4.43868E-10
55	620	Cell morphogenesis involved in neuron differentiation	2.763	9.50396E-09
63	721	Cell part morphogenesis	2.721	7.66194E-10
68	815	Cellular component morphogenesis	2.598	7.66194E-10
63	757	Cell junction organization	2.592	5.30338E-09
63	775	Cell morphogenesis involved in differentiation	2.532	1.0837E-08
77	1085	Cell morphogenesis	2.210	3.34936E-08
73	1045	Neuron projection development	2.175	1.59135E-07
71	1102	Embryo development	2.006	6.34298E-06
94	1624	Generation of neurons	1.803	6.34298E-06
94	1649	Plasma membrane bounded cell projection organization	1.775	1.07248E-05

FDR: False discovery rate (yanlış bulgu oranı)

Tablo 4.22. Sirozlu karaciğer dokusuna göre HCC’li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı moleküler işlevler.

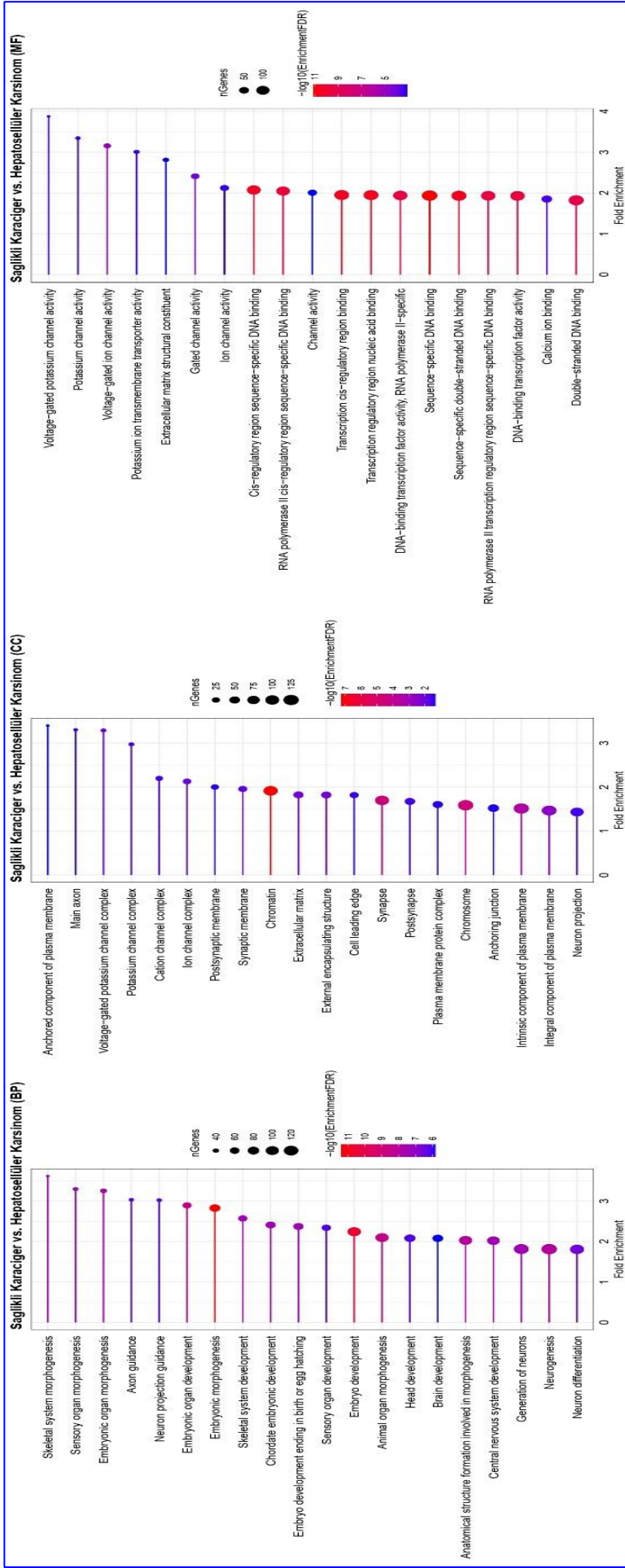
Gen Sayısı	MF Gen Sayısı	Moleküler İşlev (MF)	Kat Artışı	FDR
17	148	Voltage-gated cation channel activity	3.577	0.000346776
21	211	Voltage-gated ion channel activity	3.099	0.000334635
31	350	Cation channel activity	2.758	5.03294E-05
29	365	Gated channel activity	2.474	0.000429512
34	454	Metal ion transmembrane transporter activity	2.332	0.000334635
34	459	Ion channel activity	2.307	0.000354662
37	509	Channel activity	2.264	0.000297826
37	509	Passive transmembrane transporter activity	2.264	0.000297826
77	1272	Cis-regulatory region sequence-specific DNA binding	1.885	1.32545E-05
75	1253	RNA polymerase II cis-regulatory region sequence-specific DNA binding	1.864	2.36264E-05
85	1488	RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	1.779	2.36264E-05
91	1596	Transcription cis-regulatory region binding	1.776	1.32545E-05
91	1598	Transcription regulatory region nucleic acid binding	1.773	1.32545E-05
94	1660	Sequence-specific double-stranded DNA binding	1.763	1.32545E-05
100	1767	Sequence-specific DNA binding	1.762	1.32545E-05
59	1050	Cytoskeletal protein binding	1.750	0.001175395
81	1446	DNA-binding transcription factor activity. RNA polymerase II-specific	1.744	7.3137E-05
83	1515	DNA-binding transcription factor activity	1.706	0.000116846
95	1775	Double-stranded DNA binding	1.667	6.33012E-05
17	148	Voltage-gated cation channel activity	3.577	0.000346776

FDR: False discovery rate (yanlış bulgu oranı)

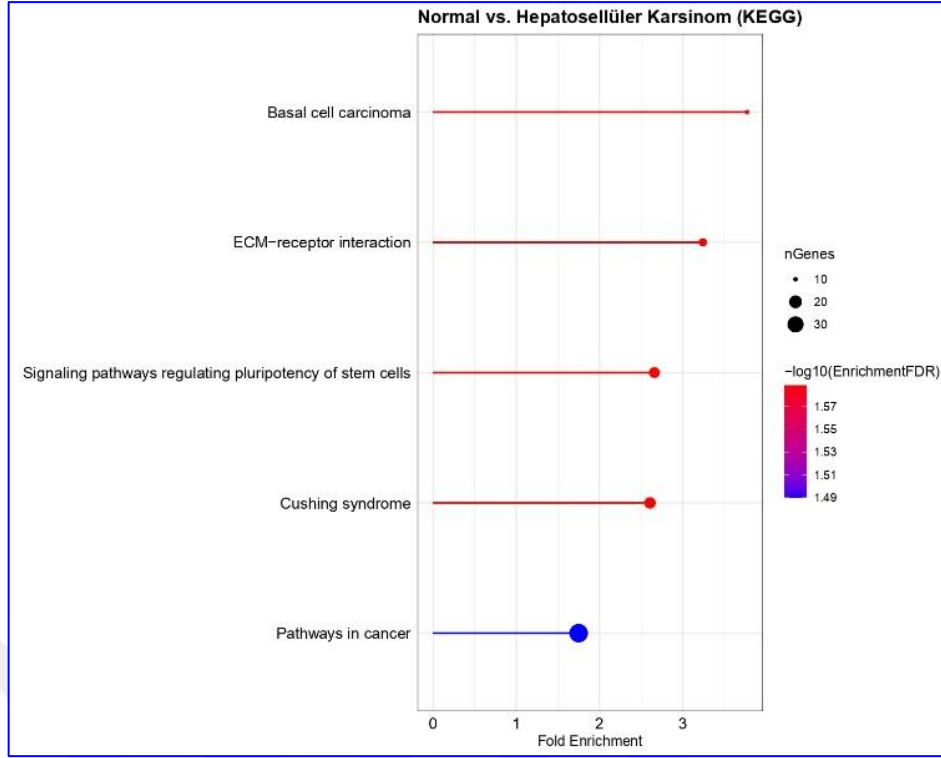
Tablo 4.23. Sirozlu karaciğer dokusuna göre HCC'li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı hücresel bileşenler.

Gen Sayısı	CC Gen Sayısı	Hücresel Bileşen (CC)	Kat Artışı	FDR
4	6	Dentate gyrus mossy fiber	20.761	0.001411971
8	47	Voltage-gated calcium channel complex	5.301	0.004244293
15	143	Sarcolemma	3.267	0.002953484
55	691	Axon	2.479	2.2162E-07
23	297	Postsynaptic membrane	2.412	0.00414515
30	445	Cell leading edge	2.099	0.004244293
35	535	Neuronal cell body	2.037	0.002953484
39	614	Cell body	1.978	0.002657039
91	1444	Neuron projection	1.963	2.2162E-07
37	600	Extracellular matrix	1.920	0.004244293
42	682	Postsynapse	1.918	0.002657039
37	601	External encapsulating structure	1.917	0.004244293
56	913	Somatodendritic compartment	1.910	0.000399709
78	1323	Plasma membrane region	1.836	2.86266E-05
83	1443	Synapse	1.791	2.86266E-05
62	1110	Supramolecular polymer	1.739	0.001411971
73	1316	Chromatin	1.727	0.000414843
61	1102	Supramolecular fiber	1.724	0.001918517
95	1965	Intrinsic component of plasma membrane	1.506	0.002446255
90	1881	Integral component of plasma membrane	1.490	0.003861555

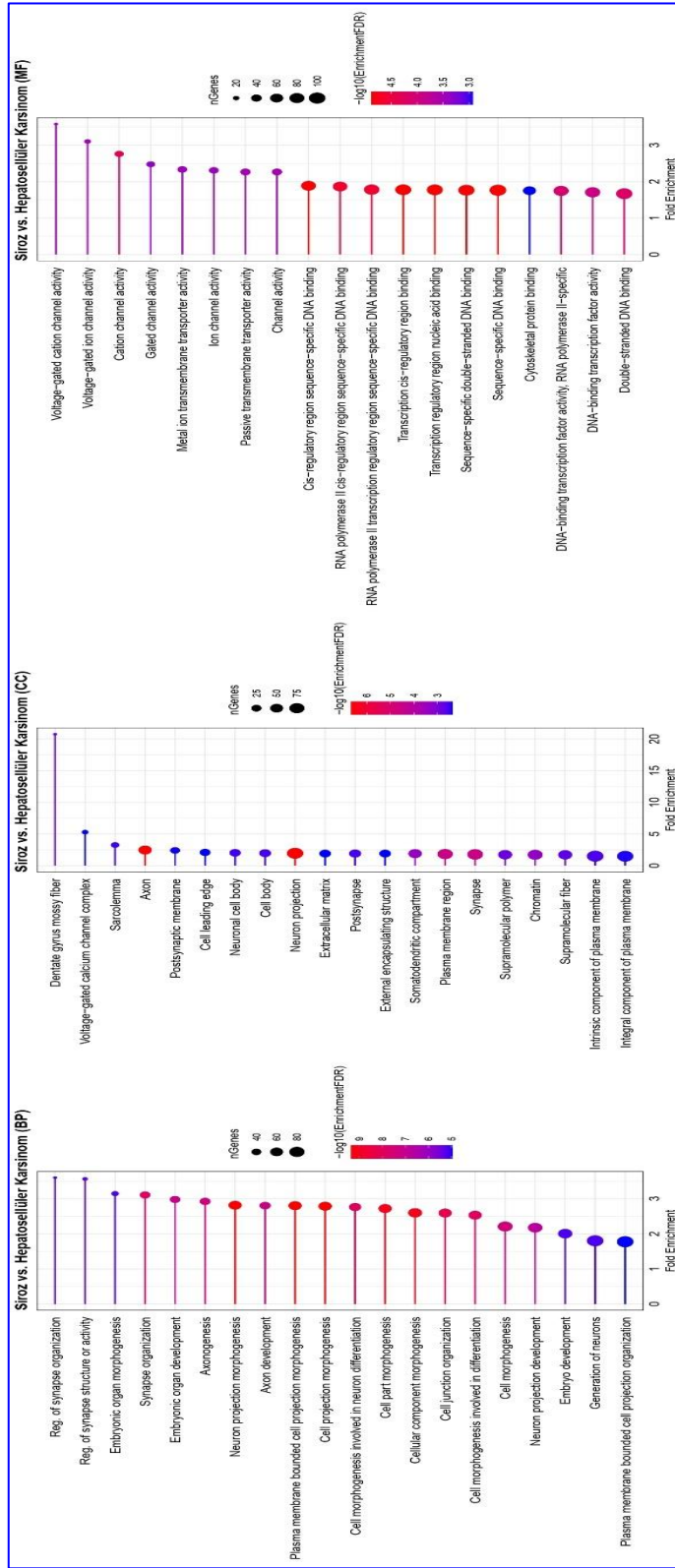
FDR: False discovery rate (Yanlış bulgu oranı)



Şekil 4.11. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC’li karaciğerde “-metile” olan genomik bölgelerin yer aldığı GO işlevsel anotasyonu



Şekil 4.12. Sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC’li karaciğerde "-metile" olan genomik bölgelerin yer aldığı KEGG yolak anotasyonu.



Şekil 4.13. Sirozlu karaciğer dokusuna göre HCC’li karaciğerde “-metile” olan genomik bölgelerin yer aldığı GO işlevsel anotasyonu.

4.3. MeDIP-Seq Analiz Sonuçları

HCC gelişmesinde rol oynayan biyolojik süreçlerin metilasyon perspektifinde aydınlatılması projemizin ana hedefleri arasında yer alması nedeniyle, WGBS metilasyon analizinin yanı sıra MEDIP-Seq analizleride gerçekleştirilmiştir. Bunun ana sebebi ise yeni nesil dizileme teknolojisine dayanan bu yaklaşımlarının birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, WGBS yaklaşımında tek nükleotid pozisyonunda dahi metilasyon profili belirlenebilirken, MEDIP-Seq yaklaşımı antikor-yakalama temelli olduğu için 100 nükleotid genomik bölgenin metilasyon profilini daha yüksek duyarlılıkla yakalayabilmektedir (özellikle high-CpG adacıklarında). Bu nedenle, kansinogenezde önem taşıyan genom düzeyinde metilasyon profilinin ayrıntılı ortaya konulması amaçlanmıştır. Proje kapsamında, NCBI SRA gibi açık genomik verileri içeren veri tabanından (i) "HCC" ve (ii) "HCC olmayan Karaciğer" dokusuna ait MEDIP-Seq verisi indirilmiş ve metilasyon profili açısından karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu elde edilen tüm sonuçlar EK-3'te ayrıntılı olarak sunulmuştur (HCC: MEDIP_Tumor, Kanserli Olmayan Karaciğer: Non-Tumor) ($p < 0.005$). HCC gelişiminde potansiyel olarak rol oynayan genlerin belirlenmesi noktasında metile olmuş genlerin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu bağlamda, hipo- ve hiper-metilasyona uğramış istatistiksel açıdan anlamlı genler işlevsel olarak anotasyona tabii tutulmuştur. Toplamda 18.933 gene ait genomik lokasyonlarda metilasyon tespit edilmiştir (EK-4). Söz konusu genler incelendiğinde; 15.380 protein kodlayan gen, 3.006 uzun kodlanmayan RNA (lncRNAs) ve geri kalan 547 genin ise psödogen olduğu belirlenmiştir. HCC ve sağlıklı bireylerin karşılaştırılması ile elde edilen hipo- ve hiper-metile genomik lokasyonlar ve genler EK-5'te ayrı ayrı verilmiştir. İstatistiksel açıdan anlamlı ve kat artışı ($\log_2FC$) en fazla olan ilk 25 hiper- ve hipo-metile protein kodlayan genler ise Tablo 4.24 ve Tablo 4.25'te sırasıyla sunulmuştur. Tablolarda yer alan şu ifadeler dikkat edilmelidir; "T: HCC'li karaciğer", "N: HCC'li olmayan karaciğer" dokularına işaret etmektedir. Ayrıca, ilgili tablolarda sadece gen ismi verilmiştir, metilasyona uğrayan genik lokasyonların yani intron, ekzon, transkripsiyon başlama pozisyonuna [ing. transcription start site (TSS)] ve 3', 5' translasyona uğramayan (UTR) bölgelere ilişkin ayrıntılı bilgiler ise EK-5'te yer almaktadır. MEDIP-Seq analizinde 52 örneğin CpG metilasyon yoğunluğuna ilişkin zenginleştirme grafikleri Şekil 4.14'de sunulmuştur. HCC içeren ve içermeyen dokular arasında önemli metilasyon farklılıkları görülmektedir. Ayrıca, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı

($\log_2FC > 1$, adjP value < 0.005 : hiper-metile, $\log_2FC < -1$, adP value < 0.005 : hipo-metile) tüm geneler ise GO ve KEGG yolak analizleri ile ayrıca görselleştirilmiştir ve bu görseller Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da verilmiştir.

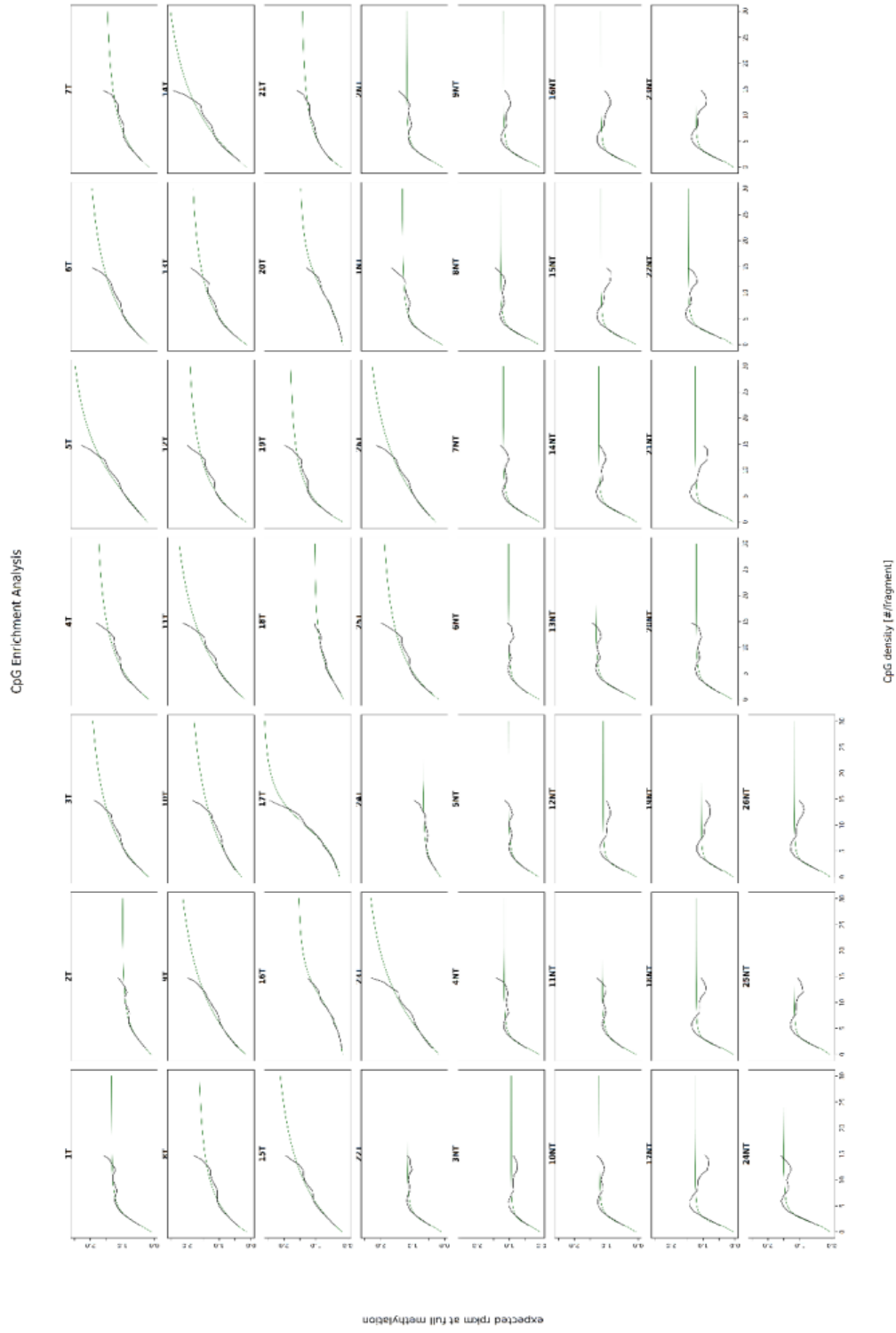


Tablo 4.24. HCC’li karaciğer ve eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokusunda hiper-metile olan top 25 protein-kodlayan genomik bölge.

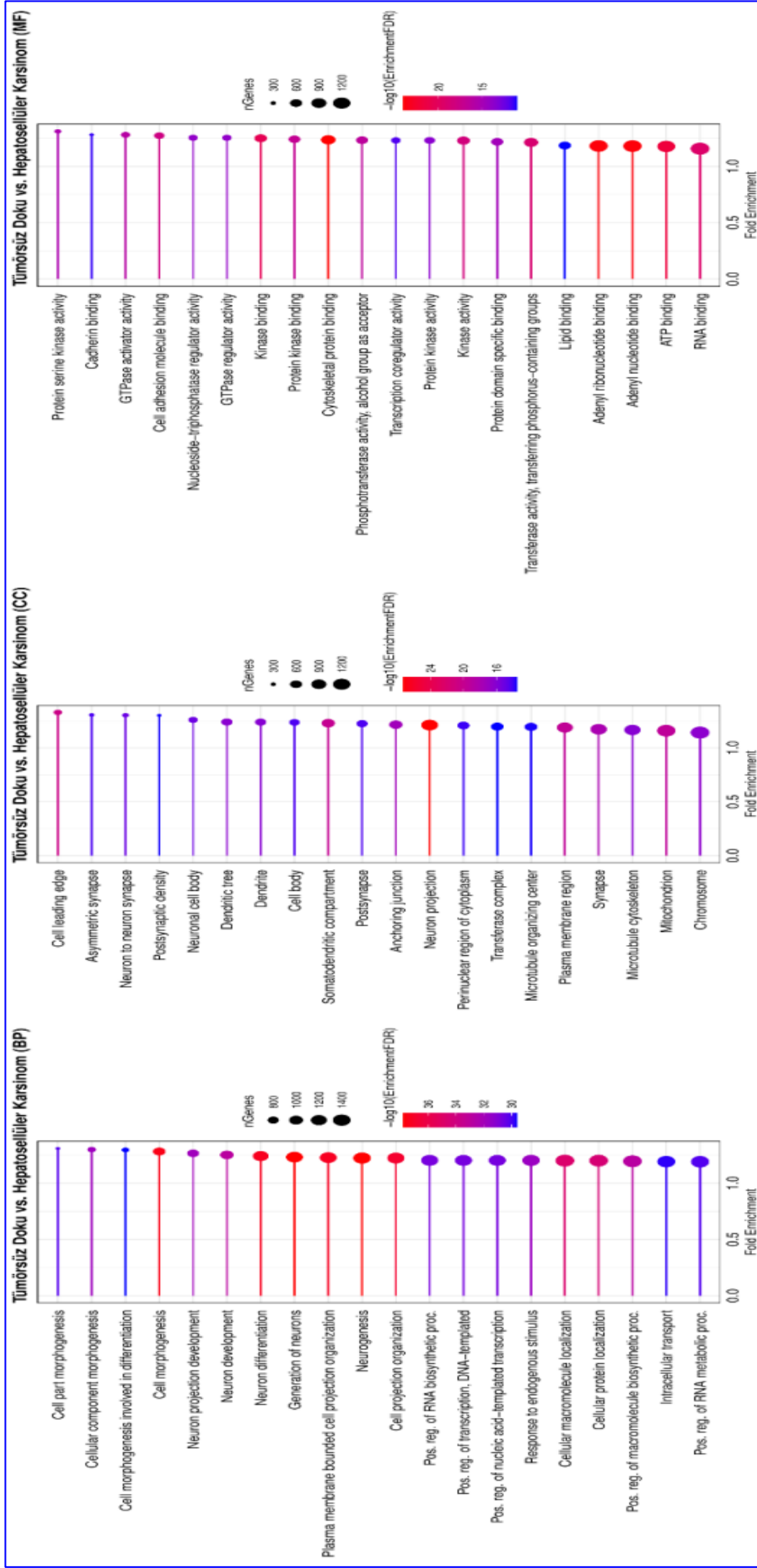
Chr	Window_start	Window_end	CpG_density	Gene	TvN_log2FC	TvN_pvalue	TvN_adjPval
Chr 11	68010001	68010500	4.103108	ALDH3B1	2.573615538	1.33919E-09	2.2043E-07
Chr 11	68313501	68314000	3.951747234	LRP5	2.548263132	3.49252E-09	4.82612E-07
Chr 9	134375001	134375500	2.273332617	RXRA	2.431905946	2.79862E-21	3.69828E-17
Chr 2	240872001	240872500	4.28655468	AGXT	2.399341327	4.0509E-19	2.65266E-15
Chr X	145821001	145821500	2.201302751	SLITRK2	2.364927421	2.76221E-32	8.52987E-27
Chr 1	204363501	204364000	4.418117434	PLEKHA6	2.323727156	7.0765E-14	6.52113E-11
Chr 5	134925001	134925500	3.381178616	PCBD2	2.319114753	8.10166E-24	2.59754E-19
Chr 11	68033501	68034000	4.221942058	NDUFS8	2.314259026	1.34959E-07	9.27821E-06
Chr 1	176904001	176904500	3.283921366	ASTN1	2.155802052	1.05093E-17	4.10802E-14
Chr 1	204143501	204144000	2.068122908	ETNK2	2.153498413	3.63057E-18	1.68526E-14
Chr 7	157916501	157917000	5.314443405	PTPRN2	2.14190611	9.27495E-17	2.53466E-13
Chr 11	68716501	68717000	3.605925123	TESMIN	2.130736717	3.0391E-07	1.77678E-05
Chr 1	213995001	213995500	1.182082448	PROX1	2.123998618	6.18907E-18	2.64481E-14
Chr 11	68081501	68082000	2.936561142	CHKA	2.1164494	9.87008E-06	0.000277105
Chr 11	73140501	73141000	4.832284435	FCHSD2	2.11099418	5.6107E-08	4.58128E-06
Chr 9	125549501	125550000	2.108468335	MAPKAP1	2.109949688	6.2462E-20	5.45048E-16
Chr 14	105476001	105476500	4.435575077	CRIP2	2.108203501	7.23857E-15	9.72095E-12
Chr 11	68209001	68209500	2.050620746	KMT5B	2.096560711	2.69417E-07	1.61348E-05
Chr 1	161237501	161238000	3.211849038	NR1I3	2.085214459	1.95228E-17	6.92122E-14
Chr 21	31968501	31969000	1.511949717	HUNK	2.07778528	2.44048E-22	4.53135E-18
Chr 7	139776001	139776500	2.741003683	HIPK2	2.074895034	1.766E-12	9.47567E-10
Chr 1	225817001	225817500	2.429290459	EPHX1	2.067564788	1.40215E-15	2.44063E-12
Chr 11	2379001	2379500	2.235250164	CD81	2.05622804	9.56585E-15	1.22492E-11
Chr 1	220881001	220881500	6.619039873	MTARC1	2.055136637	1.935E-13	1.50474E-10
Chr 1	16145501	16146000	3.103902137	EPHA2	2.042039815	6.34419E-18	2.70084E-14

Tablo 4.25. HCC'li karaciğer ve eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokusunda hipo-metile olan top 25 protein-kodlayan genomik bölge.

Chr	Window_start	Window_end	CpG_density	Gene	TvN_log2FC	TvN_pvalue	TvN_adjPval
Chr 4	97868501	97869000	0.907064718	STPG2	-2.429825333	1.67989E-34	9.85642E-29
Chr 1	95146001	95146500	0.247935351	TLCD4	-2.373610585	6.54675E-34	2.92013E-28
Chr 17	4916001	4916500	0.775683177	CHRNE	-2.238549308	1.20728E-25	7.08352E-21
Chr 8	26801501	26802000	1.164102419	ADRA1A	-2.186382299	1.0463E-25	6.26425E-21
Chr 8	18395501	18396000	0.482041218	NAT2	-2.167291012	2.16557E-24	8.47073E-20
Chr 5	36275001	36275500	0.544113417	RANBP3L	-2.153139582	3.60237E-21	4.62499E-17
Chr 10	92132001	92132500	0.927199526	CPEB3	-2.152741567	4.1576E-23	1.02496E-18
Chr 6	151926001	151926500	0.233334795	ESR1	-2.14981436	3.01071E-15	4.6474E-12
Chr 12	32867501	32868000	0.508050206	PKP2	-2.132833858	8.60117E-21	9.81824E-17
Chr 10	95053001	95053500	0.984260838	CYP2C8	-2.129297197	7.64939E-28	8.46818E-23
Chr 16	1791501	1792000	11.10055556	SPSB3	-2.11861501	4.70562E-50	2.76093E-43
Chr 4	22718001	22718500	0.769204949	GBA3	-2.113837097	2.13175E-20	2.20187E-16
Chr 12	21593001	21593500	0.402353251	GYS2	-2.108638012	2.42245E-19	1.72911E-15
Chr 4	128130001	128130500	0.747440009	LARP1B	-2.099437852	1.11088E-23	3.37715E-19
Chr 8	18672501	18673000	0.799140255	PSD3	-2.085673646	4.11359E-25	2.11717E-20
Chr 4	184784001	184784500	0.77118852	ACSL1	-2.078916279	2.1856E-22	4.08505E-18
Chr 3	51059001	51059500	0.67822644	DOCK3	-2.075652039	2.17982E-21	3.03793E-17
Chr 15	71666501	71667000	0.495584212	THSD4	-2.071990892	1.00077E-24	4.51681E-20
Chr 10	5174501	5175000	0.487761683	AKR1C8P	-2.071479179	6.23352E-24	2.1264E-19
Chr 9	13113001	13113500	1.060132359	MPDZ	-2.066597013	1.05737E-22	2.21568E-18
Chr 13	29773501	29774000	0.493225189	UBL3	-2.06659615	1.2207E-23	3.61729E-19
Chr 17	3468001	3468500	1.114134459	SPATA22	-2.064531443	7.10369E-24	2.35374E-19
Chr 8	26817001	26817500	0.758446303	FUT10	-2.062545899	5.16231E-21	6.284E-17
Chr 8	33407001	33407500	0.745039673	AADAT	-2.058459098	4.34299E-20	3.96911E-16
Chr 4	170067001	170067500	0.8271594	SCP2	-2.058241178	8.87467E-23	1.89347E-18

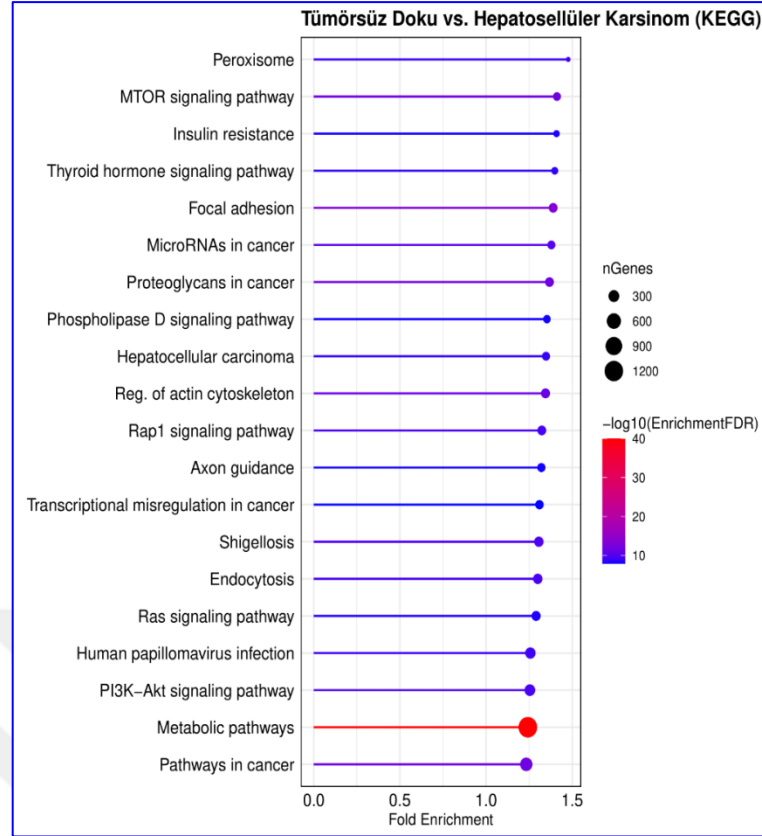


Şekil 4.14. HCC'li ve eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokusunda CpG yoğunluk profili



Şekil 4.15. Eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokusuna göre HCC’li karaciğerde MEDIP-Seq ile tespit edilmiş metilasyona uğramış genlerin

GO işlevsel anotasyonu



Şekil 4.16. Eşlenik tümör içermeyen karaciğer dokusuna göre HCC’li karaciğerde MEDIP-Seq ile tespit edilmiş metilasyona uğramış genlerin KEGG yolak anotasyonu

Şekil 4.16 incelendiğinde, HCC’nin moleküler mekanizmasının metilasyon boyutuyla anlaşılmasında şu yolakların önem taşıdığı görülmektedir; (i) HCC, (ii) RAP1 sinyal yolağı, (iii) endositoz, (iv) Ras sinyal yolağı, (v) papilloma virüs enfeksiyonu ve (vi) PI3K/AKT sinyal iletim yolağı öne çıkmaktadır. PI3K/AKT sinyal iletim yolağı hücre büyümesi ve proliferasyonu, hücrel metabolizmanın sürdürülmesi, motilite, hücrel sağkalım ve homeostasis ile apoptozunu içeren normal hücrel süreçlerde rol oynadığı için bu yolakta yer alan genlerin metilasyon profilleri özellikle önem taşımaktadır.

5. TARTIŞMA

Klinik, biyokimyasal ve moleküler araştırmalar insan karaciğer dokusunda en sık görülen primer malign karaciğer tümörünün HCC olduğunu göstermektedir. Ayrıca HCC global anlamda kansere bağlı mortalinin başlıca sebeplerinden birisidir. Bu nedenle, HCC ile ilişkili prognostik biyobelirteçler ile terapötik hedef genlerin tespit edilmesi hastalığın tanısında ve takibinde hayati önem taşımaktadır (198, 199). Diğer bir ifadeyle; tümör oluşumu, gelişimi ve progresyonu ile ilgili moleküler mekanizmanın aydınlatılması, hastalığın tedavi edilmesinin en öncelikli hedef olarak öne çıkmaktadır. Bu nedenle, HCC ile ilgili çok merkezli olmak üzere yoğun moleküler çalışmalar sürdürülmekte ve üretilen veriler genomik, transkriptomik ve epigenomik veri tabanlarına yüklenmektedir (200, 201). Mikrodizi ve NGS temelli yaklaşımlar HCC araştırmalarında yaygın metodoloji olarak benimsenmeye başlamıştır (175, 176). Bu yöntemlerden elde edilen yüksek ölçekli genomik, transkriptomik ve epigenomik veriler başta TCGA (The Cancer Genome Atlas) (202), GEO (Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (203) ve SRA (Sequence Read Archive, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) gibi tüm araştırmacıların erişebileceği veri tabanlarına yüklenmektedir. Söz konusu veriler, yüksek hacimli olması ve birçok yönüyle ele alınması nedeniyle açık veri tabanlarına yüklenmektedir. Herhangi bir genetik hastalığın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında başta genomik, transkriptomik, epigenomik, proteomik ve metabolomik gibi "-omik" yaklaşımlarından yararlanılmaktadır (204). Özellikle hastalığa ilişkin genomik profil (varyant profili ve Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, GWAS) iyi aydınlatılmış ise, genomik DNA üzerinde bulunan epigenetik profilin tanımlanması ve işlevsel transkriptom dinamiğinin ortaya çıkarılması önem taşımaktadır. Bu bağlamda, söz konusu tez çalışmasında HCC hastalığını moleküler veriler ışığında incelemek için NCBI GEO veri tabanından transkriptomik mikrodizi veri tabanından iki farklı veri seti analiz edilmiştir: (i) PPFE'ye gömülmüş 83 HCC'li ve 47 sirozlu karaciğer dokusundan hazırlanmış transkriptom mikrodizi seti, (ii) 227 HCC'li ve 168 sirozlu karaciğer dokusundan hazırlanmış transkriptom mikrodizi seti ayrıntılı olarak analiz edilmiştir. Bu transkriptomik veri setinin analizi sonucunda HCC'li ve sirozlu karaciğer dokuları karşılaştırılmış istatistiksel açıdan gen ekspresyonunda anlamlı artış ve düşüş gösteren genler ortaya konulmuştur. Gen veya promotör bölgede bulunan metilasyon (CH₃-) gibi

epigenetik mekanizmalar gen ekspresyon düzeyinin belirlenmesinde önem taşımaktadır. Bu nedenle, transkriptom mikrodizi veri setinin analizi sonrası genomda metilasyon profilini analiz etmek üzere HCC ile ilişkili epigenetik veri setleri analiz edilmiştir. Genom düzeyinde metilasyon profilinin ortaya konulmasında NGS temelli iki ana yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla, WGBS ve MeDIP-Seq yöntemleridir. Her iki yöntem yeni nesil temelli olmasına rağmen, deneysel kütüphane hazırlığı sırasında bazı farklılıklar bulunmaktadır. WGBS yönteminde bisülfite kimyasalı ile DNA muamele edilip sitozin bazında bulunan potansiyel metilasyon grupları belirlenirken, MeDIP-Seq yönteminde ise metil (CH₃-) grubuna özgü antikorlarla metile genomik bölge saflaştırılır ve sadece metile bölgeler yeni nesil dizileme teknolojisi ile tespit edilir (205-207). Tez çalışması kapsamında HCC ile ilişkili potansiyel metilasyona uğramış genomik bölgeler tanımlanmıştır ve şu veri setleri analiz edilmiştir; (i) 34 HCC metilasyon ve 27 sağlıklı karaciğer metilasyon WGBS verisi, (ii) HCC metilasyon ile siroz metilasyon WGBS verisi, (iii) 26 HCC metilasyon ve 26 siroz metilasyon MEDIP-Seq verisi analiz edilmiştir.

Başlıca sitozin metilasyonu, histon modifikasyonları (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon, deaminasyon ve ADP-ribozilasyon gibi) ve kodlanmayan kısa RNA (örneğin, miRNA) gibi başlıca epigenetik mekanizmaların temel sonuçlarından birisi gen ekspresyon seviyesinde değişime neden olmasıdır (95, 208, 209). Bu nedenle, sitozin metilasyonu gibi gen ekspresyon düzeyinde azaltıcı yönlü etki yapan epigenetik modifikasyonun tanımlanması ve bu bilginin transkriptomik analizlerle bütüncül yaklaşımla analiz edilmesi HCC hastalığının moleküler düzeyde anlaşılmasına katkı sağlayabilir. Tez projemiz bu eksen doğrultusunda şekillenmiştir ve öncelikle transkriptomik veri setleri analiz edilerek gen ekspresyonu değişim gösteren genler tespit edilmiş, bu genler ile işlevsel anotasyon analizi gerçekleştirilerek hangi biyolojik süreç, moleküler işlev ve hücresel bileşen içinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, metabolik yolak analizler ile HCC ile ilişkili hangi yolakların önemli olduğu ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu işlemleri takiben oldukça ayrıntılı olarak WGBS ve MEDIP-Seq verileri analiz edilmiştir. Bu analizler ışığında HCC, sağlıklı karaciğer dokusu ve siroz ile ilişkili istatistiksel açıdan anlamlı hipo-, hiper-metilasyon genomik bölgeler, bilhassa kodlayan genler üzerinde durulmuştur. İleri derecede metile olmuş veya metilasyon seviyesinde önemli düşüş olan genler işlevsel anotasyon analizine tabii tutulmuştur. Benzer biçimde, hipo- ve hiper-metilasyon genleri biyolojik süreç, moleküler işlev, hücresel bileşen ve yolak analizleri gerçekleştirilmiştir.

GEO [GSE46444] veri seti incelendiğinde (FFPE'ye gömülmüş 83 HCC'li ve 47 sirozlu karaciğer dokusundan hazırlanmış transkriptom mikrodizi seti) sirozlu dokuya göre HCC karaciğer dokusunda 80 protein kodlayan genin up-regule, 315 protein kodlayan genin ise down-regule olduğu görülmüştür. Bu veri setinde, HCC'ye göre sirozlu karaciğerde gen ekspresyonunda artış gösteren (diğer bir ifadeyle HCC'li karaciğer dokusunda ekspresyonu azalan) ilk 10 genin; ADH4, CNGB1, MGC10997, PROM1, MALAT1, GYG2, ARHGAP8, MT1F, VIPR1 ve HEATR2 olduğu görülmüştür. Buna karşın, HCC'ye göre sirozlu karaciğerde gen ekspresyonunda azalış gösteren (diğer bir ifadeyle HCC'li karaciğer dokusunda ekspresyonu artan) ilk 10 genin; ALG1L, PITX1, SPINK1, ACSL4, SLC26A6, CDKN2A, ITPKA, APOA2, ECT2 ve NEK2 genleri olduğu görülmüştür. ALG1L geninin hücre içerisinde glikolizil transferaz işlevi olduğu belirtilmiştir, özellikle ALG1L glikoliztransferazların ekspresyon düzeyinin tespitinin HCC gibi tümörlerin progresyonu ve tümörlerin erken evrede tespiti açısından önemli olduğu vurgulanmıştır (210). PITX1 memelilerde gelişimi kontrol eden önemli transkripsiyon faktörüdür ve özellikle ekstremitelerin oluşumu, kalp ve diğer birçok iç organın gelişim sürecinde rol oynamaktadır (211). Son yıllarda yapılan çalışmalar organ gelişiminde rol oynayan bu genin kanser patogenezinde işlev gördüğü tespit edilmiştir (212). HCC özelinde incelendiğinde, PITX1 gen ekspresyonu sonucu oluşan ve serumda tespit edilen PITX1 protein düzeyinin HCC'nin erken evrede tespit edilmesinde önemli prediktif belirteç olduğu ve aynı zamanda, hastalığın teşhisine yönelik yüksek doğruluğa sahip belirteç olabileceği tespit edilmiştir (213). Diğer bir önemli çalışmada PTP1B proteinin PITX1proteini defosforilleyerek onun protein stabilitesini ve transkripsiyonel aktivitesini azalttığı belirtilmiştir. Özellikle HCC hastalığında Sorafenib isimli onaylı tek ilacında benzer etki mekanizmasına sahip olabileceği tespit edilmiştir (214). SPINK1 proteinin hemokromatozis kaynaklı HCC'de ekspresyon düzeyinin oldukça arttığı saptanmıştır (215). Diğer bir çalışmada ise SPINK1 gen ekspresyonundaki artışın HCC metastazını arttırmış olmasına karşın, bu gene ait ekspresyonun çoğu kanser türünde artmış olması nedeniyle prognostik biyobelirteç olma potansiyelinin düşük olduğu belirlenmiştir (216). Prognoz ölçütü olarak SPINK1 ekspresyonu kullanışlı olmamasına rağmen, 540 örnekte (119 sağlıklı donör, 113 kronik HBV hastası, 122 karaciğer sirozu hastası ve 186 HCC hastası) SPINK1 serum seviyesi ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Analiz sonucunda, SPINK1'in teşhis potansiyelinin oldukça yüksek olduğu saptanmıştır (217). HBV kaynaklı karaciğer sirozundan HCC'ye geçişte mikrodizi temelli çalışmada

SPINK1 ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir (218). 2007-2014 yılları arasında Menoufia Üniversitesi Ulusal Karaciğer Enstitüsü Patoloji Bölümü arşiv materyalinden 93 HCC ve 86 malign olmayan lezyon olarak ayrılan 179 örnek ile yapılan çalışmada, SPINK1 protein ekspresyonunun HCC vakalarının %76.3'ünde tespit edilmiş ve %79.3 tanısal doğrulukla oranına sahip olduğu saptanmıştır (219).

Bu çalışmada HCC'li dokuda ekspresyonu artan ACSL4 geninin hem in vitro hem de in vivo çalışmalar ile sorafenib kaynaklı ferroptozdaki kritik rolünü doğrulamıştır. Ayrıca, rezeke edilmiş HCC dokusunda tedavi öncesi ACSL4 ekspresyonu, sonra uygulanan sorafenib tedavisine HCC tümör yanıtı için prediktif biyobelirteç olabileceği vurgulanmıştır (220). ACSL3 ve ACSL4 izoformlarının HCC, kolanjiokarsinom ve hepatik metastazlarda ekspresyon düzeyi ve subsellüler lokalizasyonları immünohistokimyasal analizler ve HepG2 hücre kültür yöntemi ile değerlendirilmiştir. ACSL3'ün ekspresyon düzeyinin HCC ve hepatik metastazlarda benzer olarak bulunmuştur ancak sağlıklı dokuda daha düşük olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, ACSL4 ekspresyon düzeyinin ise HCC'de diğer tüm tümörlerden önemli ölçüde daha fazla olduğu ve HCC'yi %93.8'lik bir duyarlılık ve %93.6'lık bir özgüllük ile normal karaciğer dokusundan ayırabildiği tespit edilmiştir (221). Diğer bir çalışmada, ACSL4 geninin HCC lipid metabolizmasında yeni rolü keşfedilmiştir. Buna göre, ACSL4, HCC'de hücre içi trigliseritleri, kolesteroller ve lipid damlacıklarını biriktirerek de novo lipogenezi düzenlediği ve mekanistik olarak SREBP1 ve c-Myc yolundaki lipojenik enzimlerini arttırdığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, ACSL4 ekspresyon düzeyinin HCC hastalarında SREBP1 ile güçlü pozitif korelasyon gösterdiği ve HCC için güçlü prediktif potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir (222). HCC ile yürütülen mikrodizi transkriptom çalışmasında ACSL4 ekspresyon düzeyinin HCC hasta dokularına c-Myc ile pozitif korelasyon gösterdiği ve ACSL4 proteinin ERK/FBW7/c-Myc ekseninin aracılık ettiği c-Myc stabilitesi yoluyla, HCC progresyonunu desteklediği ve HCC'de değerli bir prognostik biyobelirteç ve potansiyel bir terapötik hedef olabileceği tespit edilmiştir (200). TCGA LIHC (<https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-LIHC>) kanser veri tabanında yer alan 371 HCC dokusu ve 50 tümör içermeyen komşu karaciğer dokusu ile yapılan RNA-Seq verileri analiz edilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre, SLC transporter gen ailesine ait 118 genin ekspresyon düzeyinin HCC'de arttığı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, SLC26A6 hem mRNA hem de protein seviyelerinde HCC dokularında ileri düzeyde eksprese edildiği görülmüştür. Ayrıca, SLC26A6 geninin ekspresyon

düzeyinin baskılanması hem in vitro hem de in vivo olarak HCC tümör gelişimini önemli ölçüde azalttığı ve umut verici bir terapötik hedef olarak öne çıktığı belirtilmiştir (223). Gene Expression Omnibus (GEO) ve Human Protein Atlas (HPA) veri tabanlarında bulunan veriler ile yapılan gen set zenginleştirme ve protein-protein etkileşim analizleri sonucunda SLC26A6'nın HCC'de up regülasyon gösterdiğini ve bu genin HCC'de diagnostik ve prognostik (kötü prognoz) bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini gösterilmiştir (224). CDKN2A geninin promotör bölgesinin hipermetilasyonu ile p16 protein ekspresyonunun azaldığı HCC hastalarında karakterize edilmiştir. Ayrıca, aynı çalışmada HCC ve karaciğer metastazları arasındaki CDKN2A-metilasyonu ve p16 protein ekspresyon düzeyi farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (225). CDKN2A, HCC'de yüksek oranda ekspresyon edildi gösterilmiştir. Ayrıca, CDKN2A ekspresyon düzeyinin HCC'de bilinen çeşitli immün markör setleri ile güçlü korelasyonlar gösterdiği saptanmıştır. Tüm bulgular, CDKN2A ekspresyon düzeyinin potansiyel olarak tümörle ilişkili makrofajların düzenlenmesine katkıda bulunduğunu ve HCC'de prognozu ve immün infiltrasyonu belirlemek için prognostik bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (226). Diğer bir çalışmada ise, ACTR5'in CDKN2A'yı baskıladığı ve böylece HCC'nin yayılmasına sebebiyet verdiği bulunmuştur (227). ITPKC, inositol 1,4,5-trisfosfat 3-kinaz enzimini kodlayan genin ekspresyon düzeyinin, primer HCC dokusunda tümör olmayan dokulara kıyasla istatistiksel anlamla önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Özellikle, ITPKC ekspresyon düzeyinin vasküler invazyon ile anlamlı ölçüde ilişkili olduğu saptanmıştır (218). Analizlerimizle paralel olarak mikrodizi transkriptom çalışmasında ECT2 geninin ekspresyon düzeyinin artışının erken dönem ve tekrarlayan HCC hastalığı ve kötü yönelmeli sağkalım ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. ECT2 Rho/ERK sinyal ekseninin aktive ederek erken dönemde HCC ortaya çıkmasına sebebiyet verdiği saptanmıştır (228). Dört farklı (GSE76311, GSE101685, GSE101728 ve GSE76427) transkriptomik veri seti ile gerçekleştirilen biyoinformatik analizler sonucunda HCC hücrelerinin göçü ve çoğalmasında ECT2 ekspresyon düzeyinin artışı ile alakalı olduğu bildirilmiştir (229). HCC ile yürütülen miRNA ve hedef genin baskılanması çalışmasında, miR-490-5p'nin ekspresyon düzeyindeki artışın HCC hücrelerinin çoğalması, kökleşmesi ve küresel şekil aldığını sınırladığı belirlenmiştir ve miR-490-5p geninin bu işlemi ECT2 geninin ekspresyon düzeyini baskılayarak gerçekleştirdiği ortaya konulmuştur (230). Transkriptomik mikrodizi çalışmasında diğer bir gen olan NEK2'nin ekspresyon düzeyinin HCC (%37.84; 98/259) oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (231). NEK2

geninin çeşitli HCC hücre hatlarında silinmesi sonucu ise hücrelerin kendini yenileme özelliklerini ve kemoterapötik direnci azalttığı gözlemlenmiştir (232).

GEO [GSE63898] veri setinde 228 HCC ve 168 karaciğer siroz dokusu olmak üzere 396 örnek mikrodizi transkriptom yöntemi ile analiz gerçekleştirilmiştir. HCC'li grup ile karşılaştırıldığında sirozlu örneklerde 1261 genin ekspresyonunun arttığı; buna karşın, 458 genin ekspresyonunun ise azaldığı görülmüştür. Bu veri setinde, HCC'ye göre sirozlu karaciğerde gen ekspresyonunda artış gösteren (diğer bir ifadeyle HCC'li karaciğer dokusunda ekspresyonu azalan) ilk 10 genin; CXCL14, CLEC4G, ADAMTS13, FCN2, CRHBP, ANGPTL6, COLEC10, FCN3, PTH1R ve RSPO3 olduğu görülmüştür. Buna karşın, HCC'ye göre sirozlu karaciğerde gen ekspresyonunda azalış gösteren (diğer bir ifadeyle HCC'li karaciğer dokusunda ekspresyonu artan) ilk 10 genin; CAP2, TOP2A, ASPM, CCT3, KLHL12, SNX27, RACGAP1, PLVAP, FAM189B ve GOLPH3L genleri olduğu görülmüştür. Özellikle gen ekspresyonunda artış olan genlerin ayrıntılı tartışılması, potansiyel geliştirilecek ilaçlar için hedef gen adaylarını ortaya koyabilir. Bu bağlamda ilk olarak CAP2 geni incelendiğinde, bu genin HCC dokularındaki ekspresyonunun (hem mRNA hem de protein düzeyinde) tümör içermeyen komşu karaciğer dokusuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, IHC (immünohistokimya) çalışmaları CAP2 ekspresyonunun HCC vakalarının %77.3'ünde oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, regreasyon ve sağkalım analizleri CAP2 gen ekspresyonunun prognozda kullanılamayacağı belirtilmiştir (233). Diğer bir derleme çalışmasında ise, HSP70, Glypican 3, glutamin sentaz ile birlikte CAP2'nin HCC'nin erken teşhisinde moleküler belirteç olarak kullanılacağı gösterilmiştir (234). Kromozom 17'de lokalize olmuş TOP2A geninin HCC ile ilişkisine yönelik yürütülen birçok çalışma bulunmaktadır. Kanser genom atlası veya veri tabanının TCGA LIHC (<https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-LIHC>) TOP2A geninin ekspresyonu 50 HCC'li ve 50 tümör içermeyen komşu karaciğer dokusunda araştırılmış ve HCC'li dokularda TOP2A gen ekspresyonunun tümör komşuluğundaki dokulara göre istatistiksel açıdan anlamlı ve yüksek bulunmuştur (235). Bu sonuçlar, HCC'li dokularda yüksek TOP2A ekspresyonunun, klinik uygulamada tümör prognozunu tahmin etmek için biyolojik bir gösterge olarak kullanılabileceği, böylelikle tümör progresyonu ve metastazı ile yakından ilişkili olabileceğine işaret etmektedir. FISH ve IHC yöntemi ile TOP2A'nın atipik gen ekspresyonu ve protein seviyesi tümörlü ve tümör içermeyen periferik dokularda ölçülmüştür. Çalışmaya göre HCC'de yüksek protein ekspresyonuna rağmen TOP2A'nın prognostik belirteç olmayacağı

vurgulanmıştır (236). 22 HCC hücre hattında ve 172 HCC farklı evredeki doku mikrodizi analizi ile yürütülen diğer bir çalışmaya göre TOP2A tedavide hedef alınacak potansiyel gen adayı olduğu belirlenmiştir (237). Son zamanlarda yapılan bir çalışmaya göre TOP2A'nın miR-144-3p'nin doğrudan hedefi olduğu ve TOP2A gen ekspresyonunun HCC'li dokularda arttığı ve bu artışın kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yazarlar bu çalışmada miR-144-3p tarafından düzenlenen TOP2A'nın aşırı ekspresyonunun HCC proliferasyonunu ve metastazını kolaylaştırdığını gösterdiklerini ve bu nedenle TOP2A'nın HCC tedavisi için potansiyel bir hedef olarak kabul edilebileceğini öne sürmüşler (238). GEO ve STRING veri tabanında yer alan HCC veri setlerinin kullanılarak gerçekleştirilen gen ekspresyon ağı (ing. gene expression network) ve protein-protein etkileşim (ing. protein-protein interaction) analizinde terapötik hedef olacağı belirtilmiştir (239). Diğer bir çalışmada ise HCC tümöral dokularında TOP2A ekspresyonunun attığı ve buna karşın prognoz potansiyelinin de düşük olduğu bilindiği vurgulanmıştır, çalışmada bu durumun moleküler mekanizması araştırılmıştır (240). shRNA'lar ile MHCC97H hücre hattında (MHCC97H-shRNA-TOP2A) TOP2A gen ekspresyonu baskılandığında hücre büyümesi, göçü ve invazyonu baskılandığı, Hep3B hücre hattında (Hep3B-TOP2A) TOP2A gen ekspresyonu arttırıldığında ise bu özelliklerinde arttığı belirlenmiştir (240).

ASPM gen ekspresyonunun HCC'nin klinikopatolojik özellikleri ile korelasyon sergilediği tespit edilmiştir. 247 HCC hastası ile yürütülen RT-qPCR (reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction) çalışmasında 166 HCC'li karaciğer dokusunda ASPM gen ekspresyonunun arttığı ve AFP (α -fetoprotein) düzeyi ile korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (241). Yapılan diğer bir çalışmada ASPM geninin HCC'li karaciğerde arttığı ve bu durumun tümör agresyonunu arttırdığı ve hasta sağkalımını azalttığı tespit edilmiştir. Buna karşın, in vitro koşullarda ASPM gen ekspresyonu baskılandığında HCC hücrelerinde invazyon, çoğalma ve epitelyal-mezenkimal geçişin azaldığı, in vivo koşullarda ise tümörün indirgendiği saptanmıştır (242). HCC prognozu ile ilişkili gen modüllerini belirlemek için ağırlıklı gen ortak ekspresyon ağı analiz (ing. weighted correlation network analysis) gerçekleştirilmiştir ve analiz sonucunda CCNB2, TOP2A ve ASPM genlerinin yüksek ekspresyonunun hastalığın ilerlemiş durumuna işaret edeceği ve potansiyel terapötik gen adayı olabileceği vurgulanmıştır (243). Ayrıca, eş-immüno-çökeltme (ing. co-IP) çalışması ile ASPM proteinin KIF11 proteini ilişkili olduğu ve HCC hücrelerinin çoğalması, invazyonu ve göçünü bu protein ile ilişkisi sürdürdüğü belirlenmiştir (244).

Fizyopatolojik mekanizmaların değerlendirmesi için gerçekleştirilen diğer bir çalışmada METTL3 ile ASPM mRNA N6-metiladenozin (m6A) modifikasyonunun ASPM'nin HCC'li dokudaki ekspresyonu yükselttiği bulunmuştur. Daha nemlisi, METTL3'n susturulması ASPM gen ekspresyonunun önemli ölçüde baskıladığı ve HCC hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu engellediği tespit edilmiştir (245). CCT3 geninin HCC hastalarında işlevine yönelik çeşitli çalışmalar yrtlmştur. Örneğin, AFP, CCT3 ve IQGAP3 seviyelerini belirlemek için 126 HCC'li, 88 sirozlu hastadan ve 50 sağlıklı gönüllüden kan örnekleri alınmıştır. Çalışmanın sonucuna göre; CCT3 ve IQGAP3 proteinlerinin plazmadaki ekspresyon düzeyi HCC hastalarında sirozlu ve sağlıklı kontrollerden önemli ölçüde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (246). CCT3'n HCC hücrelerindeki moleküler işlevini araştırmak için yapılan diğer bir çalışmada CCT3 geninin hem mRNA hem de protein düzeyinde HCC hücrelerinde ekspresyon düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, CCT3'n tüketilmesi (ing. depletion) HCC hücrelerini vincristine ilacı ile destabilize olan mikrotübüllere karşı duyarlı hale getirdiği belirlenmemiştir. Böylece, CCT3 proteininin HCC hücre profilerasyonu için vazgeçilmez olduğu ve HCC tedavisinde kullanılabilecek potansiyel ilaç adayları için aday olabileceği önerilmiştir (247). HCC hücrelerinde ekspresyonu önemli ölçüde artan genlerden biriside RACGAP1 genidir. Bu genin birçok kanser türünde ekspresyonunun arttığı bilinmesine rağmen, son zamanlarda HCC ile yürütülen gen ekspresyon analizleri sonucunda RACGAP1'in hem in vitro hem in vivo ortamlarda yüksek ekspresyon düzeyine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, RACGAP1 proteini bu HCC hücrelerindeki işlevini PI3K/AKT/CDK2 ve PI3K/AKT/GSK3/ Cyclin D1 sinyal yolu üzerinden gerçekleştirdiği bildirilmiştir (248). RACGAP1 proteini ile yürütülen oldukça önemli diğer bir çalışmaya göre; MAGI2 antisens RNA3 (MAGI2-AS3), RACGAP1 ekspresyon düzeyini düzenleyerek HCC gelişimini etkilediği ve MAGI2-AS3'n tümör baskılayıcı potansiyeli bulunduğu ve HCC tedavisi için umut verici bir hedef olduğu belirtilmiştir (249). HCC hücrelerinde gen ekspresyonu önemli ölçüde artan, büyük tümör boyutu, ileri klinik evre, anormal AFP seviyesi, daha kısa hayatta kalma süresi ve erken nüksle ilgili ilişkili olan diğer bir gen ise RACGAP1P psdogenidir. Ayrıca, in vitro ve in vivo deneyler, RACGAP1P'nin hücre büyümesi ve göçü dahil olmak üzere HCC hücrelerinin habis özelliklerinin gelişimi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca mekanistik araştırmalar RACGAP1P'nin miR-15-5p'yi endojen hedefi RACGAP1'den ayırmak için bir ceRNA olarak onkogenik aktivitesini ortaya çıkardığını, böylece

RACGAP1'in ekspresyon düzeyini arttırdığı ve RhoA/ERK sinyalinin aktivasyonuna yol açtığını gösterilmiştir (250). Çalışmamız kapsamında ekspresyonu artan diğer önemli bir gen ise FAM189B olduğu tespit edilmiştir. Güncel bir çalışmada FAM189B ekspresyonunun HCC tümöral dokularda önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. Özellikle FAM189A1 ve FAM189A2 genlerin ekspresyon düzeyi tümör ve bitişik dokular arasında önemli ölçüde değişmemesine rağmen, FAM189B ekspresyonunun HCC'li tümöral dokularda önemli ölçüde arttığı saptanmıştır (251). Sonuç olarak, GSE46444 ve GSE63898 transkriptomik mikrodizi analizi sonucu elde edilen kümülatif verilere ait sonuçların güncel literatür ile önemli ölçüde örtüştüğü görülmüştür. Bu nedenle, mikrodizi sonucu elde edilen gen adaylarının HCC tedavisi ve prognozunda önemli ilaç ve biyobelirteç adayı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Son zamanlarda yapılan epigenetik temelli güncel araştırmalar HCC tanısı, prognozu, tedavisi ve kemoterapi direncinde metilasyon mekanizmasının önemli olduğunu belirtilmiştir (252-255). Tez çalışması kapsamında WGBS ve MEDIP-Seq yöntemleri ile HCC hastalığının metilasyon profili araştırılmıştır. Her iki yöntemin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları olmasına rağmen, her iki yöntemde genom düzeyinde oldukça yüksek hacimli metilasyon (hiper- ve hipo-metile) profilini sunmaktadır. Bu bağlamda; tüm genom bisülfid dizileme yöntemiyle (i) HCC metilasyon verisi ile sağlıklı karaciğer metilasyon verisi, (ii) HCC metilasyon verisi ile siroz metilasyon verisi analiz edilmiş ve metilasyon profili ortaya konulmuştur. MeDIP-Seq analizi sonucunda ise HCC ve kanserli olmayan karaciğer dokusu metilasyon profili açısından karşılaştırılmıştır.

Tüm genom bisülfid dizileme sonucunda sağlıklı karaciğer dokusuna göre HCC gösteren karaciğerde hipermetile olan ilk 20 genomik lokasyon incelendiğinde bu bölgelerde protein-kodlayan genler yer alırken, hipometile olan bölgelerin büyük kısmının kodlayan genomik bölge olduğu görülmüştür. Sirozlu karaciğer dokusuna göre HCC gösteren karaciğerde hipermetile genomik lokuslarında benzer şekilde protein-kodlayan genleri içerdiği görülürken, hipometile olan bölgelerin büyük kısmının kodlayan genomik bölge olduğu görülmüştür. CpG dinükleotid birimlerde meydana gelen hipermetilasyonun transkripsiyonu baskılayarak dokuya özgü transkript ekspresyonunu sağladığı bilinmektedir (256). Tüm genom bisülfid dizileme yöntemi tek nükleotid seviyesinde bilgi sağlaması nedeniyle çok sayıda genomik lokasyona ilişkin metilasyon (hiper-, hipometilasyon) profili ortaya konulmuştur. Bu nedenle, biyolojik süreç, moleküler işlev, hücresel bileşen ve KEGG metabolik yollar üzerinden

tartışmamızı sürdüreceğiz. HCC’de metilasyon profiline sahip biyolojik süreçler incelendiğinde çoğunlukla morfogenez (örneğin; embriyonik organ ve iskelet kası) ve gelişimle (örneğin, embriyonik doku, organ gelişimi ve nörogenez gibi) ilgili biyolojik süreçlerin etkilendiği ortaya konulmuştur. Bu biyolojik süreçlerdeki yer alan genlerin (hiper, hipometile) voltaj kapılı potasyum kanal aktivitesi, potasyum kanal aktivitesi, voltaj kapılı iyon kanal aktivitesi, potasyum iyonu transmembran taşıyıcı aktivitesi, hücre dışı matriks yapısal bileşeni, kapılı kanal aktivitesi ve iyon kanal aktivitesi gibi moleküler işlevlere sahip olduğu görülmektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada tümör büyümesi ve metastazında önemli rol oynayan ve SCN3B geni tarafından kodlanan voltaj kapılı sodyum kanallarının düzensiz ekspresyonunun p53’ün ekspresyonunu baskılayarak HepG2 hücrelerinde apoptozisi baskıladığı ve hücre bölünmesini hızlandırdığı bildirilmiştir (257). In vitro fonksiyonel testler ile yürütülen diğer bir çalışmada miR-584-5p eksikliğinin HCC hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu azalttığını göstermiştir. Bununla birlikte, miR-584-5p geninin KCNE2’yi (potasyum voltajlı kanal alt ailesi E düzenleyici alt birimi) doğrudan hedeflediği ve miR-584-5p’nin HCC gen ekspresyonunu değiştirdiği bilinmektedir (258). Diğer bir çalışmada, Eag1 voltaj kapılı potasyum kanalı, HCC için erken biyobelirteç potansiyeli olduğu belirtilmiştir. Eag1 geninin fare modelinde HCC gelişiminden önceki sirozlu ve preneoplastik lezyonlardan itibaren aşırı eksprese edildiği ve aynı zamanda insan HCC’inde de aşırı eksprese edildiği saptanmıştır (259). Diğer önemli moleküler işlev sınıfları ise DNA bağlanma (ing. DNA binding) aktivitesidir, örneğin bu sınıfta cis-düzenleyici bölgeye özgül DNA bağlanma, RNA polimeraz II cis-düzenleyici bölgeye özgül DNA bağlanma, Transkripsiyon cis-düzenleyici bölge bağlanma, Transkripsiyon düzenleyici bölge nükleik asit bağlanma, DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörü aktivitesi, RNA polimeraz II özgülüğünde dizi özgül DNA bağlanma, Dizi özgülüğünde çift sarmallı DNA bağlanma, RNA polimeraz II transkripsiyon düzenleyici bölge dizi özgül DNA bağlanması gibi moleküler işlevler yer almaktadır. DBPA (DNA binding protein A), inflamasyon kaynaklı hepatokarsinogenezin hızlandırabilecek aday molekül olduğu bildirilmiştir. DBPA gen ekspresyon düzeyinin HCC’nin ileri evreleriyle ilişkilendirilmiştir (260). Diğer bir çalışmada HCC örneklerinin %37.7’sinde DBPA promotör bölgesinin metile edilmiş olduğu ve promotör metilasyonunun virüsle ilişkili olmayan HCC’lerle DBPA düşük ekspresyonu ile önemli derecede ilişkili olduğu ancak virüsle ilişkili HCC’lerde bu ilişki görülmedi belirlenmiştir (261). Gerek voltaj kapılı iyon kanalları gerekse DNA bağlanması ile ilişkili gen işlevleri olsun söz konusu

genlerin metilasyonu, gen ekspresyon düzeyinde değişime neden olacağı için HCC'nin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında önem taşımaktadır. MeDIP-Seq analizi ile HCC ve kanserli olmayan karaciğer dokusu metilasyon profili açısından karşılaştırılmıştır. MeDIP-Seq yönteminde antikör aracılı metilasyon profili tanımlandığı için muhtemelen hiper- ve hipometile olan bölgelerde protein-kodlayan genler belirlenmiştir. Metilasyona uğrayan ve protein kodlayan genomik lokasyonlara içeren bölgelerin moleküler işlev zenginleştirme analizinde peroksizom, mTOR sinyal yolağı, Fokal adhezyon, RAP1 sinyal yolağı, Fosfolipaz D sinyal yolağı, Ras sinyal yolağı ve PI3K/AKT sinyal iletim yolağında rol oynadığı belirlenmiştir. TCGA kanser veri tabanında yer alan (<https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA>) verileri ile gerçekleştirilen gen ekspresyon temelli gen seti zenginleştirme analizi sonucunda peroksizomla ilişkili gen veya genelerin ekspresyonları ve HCC'nin evresine (TNM evresi) dayalı geliştirilen nomogram modeli sayesinde her bir hastanın verileri kullanılarak kişiselleştirilmiş tahmini genel sağkalım analizleri yapılabileceği (262). Yine TCGA kanser veri tabanı ile gerçekleştirilen diğer bir araştırmaya göre; PRGs (Peroxisome-related genes: : peroksizomla ilişkili genler)'in lipid sentezini etkileyerek tümöröjenez ve tümör progresyonunda önemli düzenleyiciler olarak görev yaptığı tespit edilmiştir. Ayrıca, PRG'ler metabolizma ve bağışıklık arasında kritik bir bağlantı aracı olarak gördüğü böylece tümöral bağışıklık direncini artırdığı gösterilmiştir (263). In vitro ve in vivo deneysel sonuçlar PPAR γ agonistlerinin, tümör hücrelerinin büyümesini, göçünü ve invazyonunu inhibe edici bir rol sergilediğini göstermektedir. Ayrıca, PPAR γ aktivasyonunun HCC büyümesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini yine bu çalışmalarda gösterilmiştir. Tiyazolidinedionlar tarafından PPAR γ aktivasyonunun veya virüs aracılı gen transferi ile PPAR γ aşırı gen ekspresyonu hepatoma hücrelerinde büyüme inhibisyonu etkileri gösterdiği bildirilmiştir, bu bilgilere rağmen PPAR γ gen ekspresyon düzeyi ise HCC dokularında hala tam olarak aydınlatılamamıştır (264). Mekanistik olarak gerçekleştirilen bir çalışmada, CMTM3 geninin genomdan çıkarılması sonucu (ing.knockout) Ppar γ gen ekspresyonunun oldukça düşürdüğü ve Dietilnitrozamin (DEN) muamelesi sonucunda ayrıca bununla ilişkili lipid metabolizma genlerinin de inaktive ettiği belirtilmiştir (265). RNA-Seq, Kromatin immunoprecipitation (ChIP) ve luciferaz reporter deneyi sonucunda mTOR prteinin HCC'de lncRNA transkriptomunu düzenlediği Neat1 geninin ise mTOR'un ana hedefi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu bulgular mTOR'un HCC'nin metabolizması ve gelişimi için önemli olan 'Warburg Etkisi'ni etkisini arttırmak için kullandığı bir

moleküler mekanizmayı açığa çıkarmaktadır ve mTOR hedefli tedavinin antikanser yanıtının değerlendirilmesi açısından da önemli olduğu belirtilmiştir (266). Son yıllarda TCGA kanser veri tabanında yer alan verileri ile gerçekleştirilen gen seti zenginleştirme analizi sonucunda HCC hücrelerinde PSME4 gen ekspresyonunun oldukça yüksek olduğu ve HCC hücrelerinin çoğalmasını mTOR sinyal yolağı ile düzenlediği bulunmuştur (267). Güncel diğer bir çalışmada ise, EYA4 geninin NF- κ B/RAP1 sinyal yolunun aktivasyonunu engellediği böylece HCC büyümesine ve invazyonuna fizyolojik bir engel oluşturarak tümör baskılayıcı işlev gördüğü tespit edilmiştir (268). RAP1 ile yürütülen diğer bir çalışmada; RAP1 geninin miRNA'lar ile inhibisyonu sonucunda HepG2 hücrelerinde apoptozu ve 5-fluorouracil (5-FU) kemoterapi duyarlılığını önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır (269). HCC ve PI3K/AKT sinyal yolu ile ilişkili diğer bir araştırmada CD73 (bir AMP hidroliz enzimi), PI3K/AKT sinyal yolunu aktive ederek metastazı indüklediğini ve bunun HCC prognozu için biyobelirteç olabileceğini göstermişlerdir (270). Tüm bu biyolojik süreçler ve moleküler işlevler, metilasyona uğrayan genlerin ekspresyon düzeyinin değişmesi ve bu değişimin HCC hücrelerinde çeşitli metabolik yolları etkileyerek hastalığın seyri ve moleküler mekanizmasını etkilediğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak HCC hastalığının teşhisi, prognozu ve metastazına yönelik moleküler düzeyde bilgi saylayan transkriptomik ve metilasyon çalışmalarının ayrıntılı analizi ve irdelenmesi, HCC tedavisine yönelik geliştirilecek potansiyel ilaçlar için aday genleri ortaya koyabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada iki set transkriptom üzerinde önce GWAS ve daha sonra da iki farklı yöntemle metilasyon analizi yapılmıştır.
- İki mikrodizi temelli transkriptom veri seti analizi sonucunda HCC’li karaciğer dokularındaki bazı genlerin ekspresyonunda artış ve bazılarında ise azalma saptanmıştır. Çalışma sonuçları güncel literatür ile uyumlu olup, çok detaylı bir biçimde raporlanmış ve literatürdeki birçok sonucu kapsayıp yeni bir takım veriler de ortaya koymaktadır.
- Aynı zamanda metilasyon çalışmalarımız birçok genin ekspresyonundaki değişikliğin epigenetik mekanizmalar ile gerçekleştirildiğini göstermektedir.
- Saptanan genetik değişiklikler tanı ve prognozunu belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır.
- Bunu yanında bazı saptanan hedef genler aynı zamanda ileride geliştirilecek potansiyel tedaviler için birer hedef oluşturmaktadır.
- Gelecekteki daha kapsamlı analizlerle keşfedilen genlerin güvenilirliği değerlendirilebilir, bu genlere dayalı olarak terapi teknikleri tasarlanabilir ve klinik kullanımları detaylandırılabilir.

KAYNAKLAR

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144(5): 646-74.
2. Carbone M, Arron ST, Beutler B, Bononi A, Cavenee W, Cleaver JE, Croce CM, D'Andrea A, Foulkes WD, Gaudino G, Groden JL, Henske EP, Hicks ID, Hwang PM, Kolodner RD, Mak TW, Malkin D, Monnat RJ, Jr., Novelli F, Pass HI, Petrini JH, Schmidt LS, Yang H. Tumour predisposition and cancer syndromes as models to study gene-environment interactions. *Nat Rev Cancer* 2020, 20(9): 533-49.
3. Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell* 2014, 54(5): 716-27.
4. Ni J, Bucci J, Malouf D, Knox M, Graham P, Li Y. Exosomes in Cancer Radioresistance. *Front Oncol* 2019, 9: 869.
5. Vessoni AT, Filippi-Chiela EC, Lenz G, Batista LFZ. Tumor propagating cells: drivers of tumor plasticity, heterogeneity, and recurrence. *Oncogene* 2020, 39(10): 2055-68.
6. Chaffer CL, Weinberg RA. How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discov* 2015, 5(1): 22-4.
7. Shen H, Laird PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* 2013, 153(1): 38-55.
8. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015, 136(5): E359-86.
9. Bardakçı M, Ergün Y, Yalçın K. Retrospective Analysis of Demographic and Laboratory Data of Patients with Hepatocellular Carcinoma: Single Center Experience. *Acta Oncologica Turcica* 2019, 52(1): 64-72.
10. Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu MA, Allen C, Al-Raddadi R, Alvis-Guzman N, Amoako Y, Artaman A, Ayele TA, Barac A, Bensenor I, Berhane A, Bhutta Z, Castillo-Rivas J, Chitheer A, Choi JY, Cowie B, Dandona L, Dandona R, Dey S, Dicker D, Phuc H, Ekwueme DU, Zaki MS, Fischer F, Furst T, Hancock J, Hay SI, Hotez P, Jee SH, Kasaeian A, Khader Y, Khang YH, Kumar A, Kutz M, Larson H, Lopez A, Lunevicius R, Malekzadeh R, McAlinden C, Meier T, Mendoza W, Mokdad A, Moradi-Lakeh M, Nagel G, Nguyen Q, Nguyen G, Ogbo

- F, Patton G, Pereira DM, Pourmalek F, Qorbani M, Radfar A, Roshandel G, Salomon JA, Sanabria J, Sartorius B, Satpathy M, Sawhney M, Sepanlou S, Shackelford K, Shore H, Sun J, Mengistu DT, Topor-Madry R, Tran B, Ukwaja KN, Vlassov V, Vollset SE, Vos T, Wakayo T, Weiderpass E, Werdecker A, Yonemoto N, Younis M, Yu C, Zaidi Z, Zhu L, Murray CJL, Naghavi M, Fitzmaurice C. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. *JAMA Oncol* 2017, 3(12): 1683-91.
11. McGlynn KA, Petrick JL, London WT. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liver Dis* 2015, 19(2): 223-38.
 12. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021, 71(3): 209-49.
 13. Vo Quang E, Shimakawa Y, Nahon P. Epidemiological projections of viral-induced hepatocellular carcinoma in the perspective of WHO global hepatitis elimination. *Liver Int* 2021, 41(5): 915-27.
 14. Garuti F, Neri A, Avanzato F, Gramenzi A, Rampoldi D, Rucci P, Farinati F, Giannini EG, Piscaglia F, Rapaccini GL, Di Marco M, Caturelli E, Zoli M, Sacco R, Cabibbo G, Marra F, Mega A, Morisco F, Gasbarrini A, Svegliati-Baroni G, Foschi FG, Missale G, Masotto A, Nardone G, Raimondo G, Azzaroli F, Vidili G, Brunetto MR, Trevisani F, group ILCs. The changing scenario of hepatocellular carcinoma in Italy: an update. *Liver Int* 2021, 41(3): 585-97.
 15. Kim E, Viatour P. Hepatocellular carcinoma: old friends and new tricks. *Exp Mol Med* 2020, 52(12): 1898-907.
 16. Nguyen PHD, Ma S, Phua CZJ, Kaya NA, Lai HLH, Lim CJ, Lim JQ, Wasser M, Lai L, Tam WL, Lim TKH, Wan WK, Loh T, Leow WQ, Pang YH, Chan CY, Lee SY, Cheow PC, Toh HC, Ginhoux F, Iyer S, Kow AWC, Young Dan Y, Chung A, Bonney GK, Goh BKP, Albani S, Chow PKH, Zhai W, Chew V. Intratumoural immune heterogeneity as a hallmark of tumour evolution and progression in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 2021, 12(1): 227.

17. Fernandez-Barrena MG, Arechederra M, Colyn L, Berasain C, Avila MA. Epigenetics in hepatocellular carcinoma development and therapy: The tip of the iceberg. *JHEP Rep* 2020, 2(6): 100167.
18. Samant H, Amiri HS, Zibari GB. Addressing the worldwide hepatocellular carcinoma: epidemiology, prevention and management. *J Gastrointest Oncol*. 2021, 12(Suppl 2):361-73.
19. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2021, 73 Suppl 1 (Suppl 1): 4-13.
20. Tian BW, Yan LJ, Ding ZN, Liu H, Han CL, Meng GX, Xue JS, Dong ZR, Yan YC, Hong JG, Chen ZQ, Wang DX, Li T. Evaluating liver function and the impact of immune checkpoint inhibitors in the prognosis of hepatocellular carcinoma patients: A systemic review and meta-analysis. *Int Immunopharmacol* 2023, 114: 109519.
21. Memon A, Pyao Y, Jung Y, Lee JI, Lee WK. A Modified Protocol of Diethylnitrosamine Administration in Mice to Model Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2020, 21(15): 5461.
22. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019, 69(1): 7-34.
23. White DL, Thrift AP, Kanwal F, Davila J, El-Serag HB. Incidence of Hepatocellular Carcinoma in All 50 United States, From 2000 Through 2012. *Gastroenterology* 2017, 152(4): 812-20
24. Yang JD, Mohamed EA, Aziz AO, Shousha HI, Hashem MB, Nabeel MM, Abdelmaksoud AH, Elbaz TM, Afihene MY, Duduyemi BM, Ayawin JP, Gyedu A, Lohoues-Kouacou MJ, Ndam AW, Moustafa EF, Hassany SM, Moussa AM, Ugiagbe RA, Omuemue CE, Anthony R, Palmer D, Nyanga AF, Malu AO, Obekpa S, Abdo AE, Siddig AI, Mudawi HM, Okonkwo U, Kooffreh-Ada M, Awuku YA, Nartey YA, Abbew ET, Awuku NA, Otegbayo JA, Akande KO, Desalegn HM, Omonisi AE, Ajayi AO, Okeke EN, Duguru MJ, Davwar PM, Okorie MC, Mustapha S, Debes JD, Ocamo P, Lesi OA, Odeghe E, Bello R, Onyekwere C, Ekere F, Igetei R, Mah'moud MA, Addissie B, Ali HM, Gores GJ, Topazian MD, Roberts LR, Africa Network for G, Liver D. Characteristics, management, and outcomes of patients with hepatocellular carcinoma in Africa: a multicountry observational study from the Africa Liver Cancer Consortium. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2017, 2(2): 103-11

25. Yuen VW, Wong CC. Hypoxia-inducible factors and innate immunity in liver cancer. *J Clin Invest* 2020, 130(10): 5052-62.
26. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2018, 391(10127): 1301-14.
27. Chidambaranathan-Reghupaty S, Fisher PB, Sarkar D. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. *Adv Cancer Res* 2021, 149: 1-61.
28. Nault JC, Datta S, Imbeaud S, Franconi A, Mallet M, Couchy G, Letouze E, Pilati C, Verret B, Blanc JF, Balabaud C, Calderaro J, Laurent A, Letexier M, Bioulac-Sage P, Calvo F, Zucman-Rossi J. Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 2015, 47(10): 1187-93.
29. Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2016, 64(1 Suppl): S84-S101.
30. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007, 132(7): 2557-76.
31. Venook AP, Papandreou C, Furuse J, de Guevara LL. The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective. *Oncologist* 2010, 15 (Suppl 4): 5-13.
32. Bharadwaj M, Roy G, Dutta K, Misbah M, Husain M, Hussain S. Tackling hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma--the future is now. *Cancer Metastasis Rev* 2013, 32(1-2): 229-68.
33. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004, 127(5 Suppl 1): S35-50.
34. Sherman M. Risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B and prevention through treatment. *Cleve Clin J Med* 2009, 76 Suppl 3: S6-9.
35. Donato F, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C, Porru S, Nardi G. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002, 155(4): 323-31.
36. Ming L, Thorgeirsson SS, Gail MH, Lu P, Harris CC, Wang N, Shao Y, Wu Z, Liu G, Wang X, Sun Z. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. *Hepatology* 2002, 36(5): 1214-20.

37. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH, Group R-HS. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006, 295(1): 65-73.
38. Di Bisceglie AM. Hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009, 49(5 Suppl): S56-60.
39. Seto WK, Lo YR, Pawlotsky JM, Yuen MF. Chronic hepatitis B virus infection. *Lancet* 2018, 392(10161): 2313-24.
40. World Health Organization. Hepatitis B vaccines: WHO position paper, July 2017 - Recommendations. *Vaccine* 2019, 37(2): 223-5.
41. An P, Xu J, Yu Y, Winkler CA. Host and Viral Genetic Variation in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. *Front Genet* 2018, 9: 261.
42. Dash S, Aydin Y, Widmer KE, Nayak L. Hepatocellular Carcinoma Mechanisms Associated with Chronic HCV Infection and the Impact of Direct-Acting Antiviral Treatment. *J Hepatocell Carcinoma* 2020, 7: 45-76.
43. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2014, 61(1 Suppl): S45-57.
44. Desai A, Sandhu S, Lai JP, Sandhu DS. Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A comprehensive review. *World J Hepatol* 2019, 11(1): 1-18.
45. Lok AS, Everhart JE, Wright EC, Di Bisceglie AM, Kim HY, Sterling RK, Everson GT, Lindsay KL, Lee WM, Bonkovsky HL, Dienstag JL, Ghany MG, Morishima C, Morgan TR, Group H-CT. Maintenance peginterferon therapy and other factors associated with hepatocellular carcinoma in patients with advanced hepatitis C. *Gastroenterology* 2011, 140(3): 840-9.
46. Axley P, Ahmed Z, Ravi S, Singal AK. Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: A Narrative Review. *J Clin Transl Hepatol* 2018, 6(1): 79-84.
47. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012, 142(6): 1264-73.
48. Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010, 7(8): 448-58.
49. Kruse RL, Kramer JR, Tyson GL, Duan Z, Chen L, El-Serag HB, Kanwal F. Clinical outcomes of hepatitis B virus coinfection in a United States cohort of hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology* 2014, 60(6): 1871-8.

50. Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013, 10(9): 553-62.
51. Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002, 36 (5 Suppl 1): S35-46.
52. Craig AJ, von Felden J, Garcia-Lezana T, Sarcognato S, Villanueva A. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020, 17(3): 139-52.,
53. Kanwal F, Kramer J, Asch SM, Chayanupatkul M, Cao Y, El-Serag HB. Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Gastroenterology* 2017, 153(4): 996-1005.e1001.
54. Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, Lencioni R, Koike K, Zucman-Rossi J, Finn RS. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2021, 7(1): 6.
55. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, Gores G. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016, 2: 16018.
56. Chiang DY, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, LeBlanc AC, Donovan DJ, Thung SN, Sole M, Tovar V, Alsinet C, Ramos AH, Barretina J, Roayaie S, Schwartz M, Waxman S, Bruix J, Mazzaferro V, Ligon AH, Najfeld V, Friedman SL, Sellers WR, Meyerson M, Llovet JM. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008, 68(16): 6779-88.
57. Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Nakagawa H, Koike K, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2011, 43(5): 455-8.
58. Lee MH, Huang YH, Chen HY, Khor SS, Chang YH, Lin YJ, Jen CL, Lu SN, Yang HI, Nishida N, Sugiyama M, Mizokami M, Yuan Y, L'Italien G, Tokunaga K, Chen CJ, Group R-HCS. Human leukocyte antigen variants and risk of hepatocellular carcinoma modified by hepatitis C virus genotypes: A genome-wide association study. *Hepatology* 2018, 67(2): 651-61.
59. Li S, Qian J, Yang Y, Zhao W, Dai J, Bei JX, Foo JN, McLaren PJ, Li Z, Yang J, Shen F, Liu L, Yang J, Li S, Pan S, Wang Y, Li W, Zhai X, Zhou B, Shi L, Chen X, Chu M, Yan Y, Wang J, Cheng S, Shen J, Jia W, Liu J, Yang J, Wen Z, Li A, Zhang Y, Zhang G, Luo X, Qin H, Chen M, Wang H, Jin L, Lin D, Shen H, He L,

- de Bakker PI, Wang H, Zeng YX, Wu M, Hu Z, Shi Y, Liu J, Zhou W. GWAS identifies novel susceptibility loci on 6p21.32 and 21q21.3 for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *PLoS Genet* 2012, 8(7): e1002791.
60. Lin YY, Yu MW, Lin SM, Lee SD, Chen CL, Chen DS, Chen PJ. Genome-wide association analysis identifies a GLUL haplotype for familial hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2017, 123(20): 3966-76.
 61. Miki D, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Yoshima T, Aikata H, Ikeda K, Kumada H, Toyota J, Morizono T, Tsunoda T, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. *Nat Genet* 2011, 43(8): 797-800.
 62. Yang HI, Yuen MF, Chan HL, Han KH, Chen PJ, Kim DY, Ahn SH, Chen CJ, Wong VW, Seto WK, Group R-BW. Risk estimation for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B (REACH-B): development and validation of a predictive score. *Lancet Oncol* 2011, 12(6): 568-74.
 63. Jin F, Xiong WJ, Jing JC, Feng Z, Qu LS, Shen XZ. Evaluation of the association studies of single nucleotide polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a systematic review. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011, 137(7): 1095-104.
 64. Zhang H, Zhai Y, Hu Z, Wu C, Qian J, Jia W, Ma F, Huang W, Yu L, Yue W, Wang Z, Li P, Zhang Y, Liang R, Wei Z, Cui Y, Xie W, Cai M, Yu X, Yuan Y, Xia X, Zhang X, Yang H, Qiu W, Yang J, Gong F, Chen M, Shen H, Lin D, Zeng YX, He F, Zhou G. Genome-wide association study identifies 1p36.22 as a new susceptibility locus for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *Nat Genet* 2010, 42(9): 755-8.
 65. Dai G, Liu P, Li X, Zhou X, He S. Association between PNPLA3 rs738409 polymorphism and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) susceptibility and severity: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2019, 98(7): e14324.
 66. Buch S, Stickel F, Trepo E, Way M, Herrmann A, Nischalke HD, Brosch M, Rosendahl J, Berg T, Ridinger M, Rietschel M, McQuillin A, Frank J, Kiefer F, Schreiber S, Lieb W, Soyka M, Semmo N, Aigner E, Datz C, Schmelz R, Bruckner S, Zeissig S, Stephan AM, Wodarz N, Deviere J, Clumeck N, Sarrazin C, Lammert F, Gustot T, Deltenre P, Volzke H, Lerch MM, Mayerle J, Eyer F, Schafmayer C, Cichon S, Nothen MM, Nothnagel M, Ellinghaus D, Huse K, Franke A, Zopf S, Hellerbrand C, Moreno C, Franchimont D, Morgan MY, Hampe J. A genome-wide

- association study confirms PNPLA3 and identifies TM6SF2 and MBOAT7 as risk loci for alcohol-related cirrhosis. *Nat Genet* 2015, 47(12): 1443-8.
67. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008, 40(12): 1461-5.
 68. Wang B, Huang G, Wang D, Li A, Xu Z, Dong R, Zhang D, Zhou W. Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis. *J Hepatol* 2010, 53(3): 508-18.
 69. Jiang HY, Chen J, Xia CC, Cao LK, Duan T, Song B. Noninvasive imaging of hepatocellular carcinoma: From diagnosis to prognosis. *World J Gastroenterol* 2018, 24(22): 2348-62.
 70. Lee TK, Guan XY, Ma S. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma - from origin to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2022, 19(1): 26-44.
 71. Malato Y, Naqvi S, Schurmann N, Ng R, Wang B, Zape J, Kay MA, Grimm D, Willenbring H. Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest* 2011, 121(12): 4850-60.
 72. Miltiadous O, Sia D, Hoshida Y, Fiel MI, Harrington AN, Thung SN, Tan PS, Dong H, Revill K, Chang CY, Roayaie S, Byrne TJ, Mazzaferro V, Rakela J, Florman S, Schwartz M, Llovet JM. Progenitor cell markers predict outcome of patients with hepatocellular carcinoma beyond Milan criteria undergoing liver transplantation. *J Hepatol* 2015, 63(6): 1368-77.
 73. Yang XR, Xu Y, Yu B, Zhou J, Qiu SJ, Shi GM, Zhang BH, Wu WZ, Shi YH, Wu B, Yang GH, Ji Y, Fan J. High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cell biomarkers related to tumour angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2010, 59(7): 953-62.
 74. Visscher PM, Montgomery GW. Genome-wide association studies and human disease: from trickle to flood. *JAMA* 2009, 302(18): 2028-9.
 75. Ngamruengphong S, Patel T. Molecular evolution of genetic susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2014, 59(5): 986-91.
 76. Munirajan AK, Ando K, Mukai A, Takahashi M, Suenaga Y, Ohira M, Koda T, Hirota T, Ozaki T, Nakagawara A. KIF1Bbeta functions as a haploinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death. *J Biol Chem* 2008, 283(36): 24426-34.

77. Yeh IT, Lenci RE, Qin Y, Buddavarapu K, Ligon AH, Leteurtre E, Do Cao C, Cardot-Bauters C, Pigny P, Dahia PL. A germline mutation of the KIF1B beta gene on 1p36 in a family with neural and nonneural tumors. *Hum Genet* 2008, 124(3): 279-85.
78. Schlisio S, Kenchappa RS, Vredevelde LC, George RE, Stewart R, Greulich H, Shahriari K, Nguyen NV, Pigny P, Dahia PL, Pomeroy SL, Maris JM, Look AT, Meyerson M, Peeper DS, Carter BD, Kaelin WG, Jr. The kinesin KIF1Bbeta acts downstream from EglN3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. *Genes Dev* 2008, 22(7): 884-93.
79. Abbas Z, Yakoob J, Umer MA, Abbas M, Hamid S. Interferon lambda-3 polymorphism and response to pegylated interferon in patients with hepatitis D. *Antivir Ther* 2015, 20(5): 529-33.
80. Karatayli SC, Ulger ZE, Ergul AA, Keskin O, Karatayli E, Albayrak R, Ozkan M, Idilman R, Yalcin K, Bozkaya H, Uzunalimoglu O, Yurdaydin C, Bozdayi AM. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with chronic hepatitis delta. *J Viral Hepat* 2014, 21(4): 297-304.
81. Yilmaz E, Baran B, Soyer OM, Onel M, Onel D, Ormeci AC, Gokturk S, Evirgen S, Akyuz F, Demir K, Besisik F, Kaymakoglu S, Karaca C. Effects of polymorphisms in interferon lambda 3 (interleukin 28B) on sustained virologic response to therapy in patients with chronic hepatitis D virus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014, 12(10): 1753-8.
82. Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet* 2012, 13: 47.
83. Yang SZ, Wang JT, Yu WW, Liu Q, Wu YF, Chen SG. Downregulation of KIF1B mRNA in hepatocellular carcinoma tissues correlates with poor prognosis. *World J Gastroenterol* 2015, 21(27): 8418-24.

84. Su C, Lin Y, Niu J, Cai L. Association between polymorphisms in tumor suppressor genes and oncogenes and risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in an HCC epidemic area within the Han Chinese population. *Med Oncol* 2014, 31(12): 356.
85. Seo JY, Park YJ, Yi YA, Hwang JY, Lee IB, Cho BH, Son HH, Seo DG. Epigenetics: general characteristics and implications for oral health. *Restor Dent Endod* 2015, 40(1): 14-22.
86. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005, 6(8): 597-610.
87. Choi JD, Lee JS. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. *Genomics Inform* 2013, 11(4): 164-73.
88. Sawan C, Vaissiere T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res* 2008, 642(1-2): 1-13.
89. Coolen MW, Statham AL, Qu W, Campbell MJ, Henders AK, Montgomery GW, Martin NG, Clark SJ. Impact of the genome on the epigenome is manifested in DNA methylation patterns of imprinted regions in monozygotic and dizygotic twins. *PLoS One* 2011, 6(10): e25590.
90. Hamilton JP. Epigenetics: principles and practice. *Dig Dis* 2011, 29(2): 130-5.
91. Jiang YH, Bressler J, Beaudet AL. Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004, 5: 479-510.
92. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, Slagboom PE, Lumey LH. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(44): 17046-9.
93. Cooper DN. Eukaryotic DNA methylation. *Hum Genet* 1983, 64(4): 315-33.
94. Jurkowski TP, Jeltsch A. On the evolutionary origin of eukaryotic DNA methyltransferases and Dnmt2. *PLoS One* 2011, 6(11): e28104.
95. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet* 2012, 81(4): 303-11.
96. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010, 31(1): 27-36.
97. Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 2005, 10(4): 631-47.
98. Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S. DNA methylation regulates MicroRNA expression. *Cancer Biol Ther* 2007, 6(8): 1284-8.

99. Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 1980, 8(7): 1499-504.
100. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012, 13(7): 484-92.
101. De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol* 1999, 19(11): 7327-35.
102. Toparslan E, Mercan L, Kuran M. [DNA Methylation Patterns in Epigenetic Context of Inheritance]. *J Anim Prod* 2015, 56(2): 38-42
103. Carrio E, Suelves M. DNA methylation dynamics in muscle development and disease. *Front Aging Neurosci* 2015, 7: 19.
104. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983, 301(5895): 89-92.
105. Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci* 2009, 66(4): 596-612.
106. Sato N, Maitra A, Fukushima N, van Heek NT, Matsubayashi H, Iacobuzio-Donahue CA, Rosty C, Goggins M. Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2003, 63(14): 4158-66.
107. Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubreva J, Berdasco M, Fraga MF, O'Hanlon TP, Rider LG, Jacinto FV, Lopez-Longo FJ, Dopazo J, Forn M, Peinado MA, Carreno L, Sawalha AH, Harley JB, Siebert R, Esteller M, Miller FW, Ballestar E. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res* 2010, 20(2): 170-9.
108. Absher DM, Li X, Waite LL, Gibson A, Roberts K, Edberg J, Chatham WW, Kimberly RP. Genome-wide DNA methylation analysis of systemic lupus erythematosus reveals persistent hypomethylation of interferon genes and compositional changes to CD4⁺ T-cell populations. *PLoS Genet* 2013, 9(8): e1003678.
109. Jeffries MA, Dozmorov M, Tang Y, Merrill JT, Wren JD, Sawalha AH. Genome-wide DNA methylation patterns in CD4⁺ T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Epigenetics* 2011, 6(5): 593-601.

110. Kaneto H, Sasaki S, Yamamoto H, Itoh F, Toyota M, Suzuki H, Ozeki I, Iwata N, Ohmura T, Satoh T, Karino Y, Satoh T, Toyota J, Satoh M, Endo T, Omata M, Imai K. Detection of hypermethylation of the p16(INK4A) gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. *Gut* 2001, 48(3): 372-7.
111. Sceusi EL, Loose DS, Wray CJ. Clinical implications of DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)* 2011, 13(6): 369-76.
112. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006, 6(9): 674-87.
113. Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther* 2009, 8(6): 1409-20,
114. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 2012, 150(1): 12-27.
115. Chen Z, Wang L, Wang Q, Li W. Histone modifications and chromatin organization in prostate cancer. *Epigenomics* 2010, 2(4): 551-60.
116. Mottamal M, Zheng S, Huang TL, Wang G. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. *Molecules* 2015, 20(3): 3898-941.
117. Chen QW, Zhu XY, Li YY, Meng ZQ. Epigenetic regulation and cancer (review). *Oncol Rep* 2014, 31(2): 523-32.
118. Brait M, Sidransky D. Cancer epigenetics: above and beyond. *Toxicol Mech Methods* 2011, 21(4): 275-88.
119. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol* 2007, 1(1): 19-25.
120. Lakshmaiah KC, Jacob LA, Aparna S, Lokanatha D, Saldanha SC. Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. *J Cancer Res Ther* 2014, 10(3): 469-78.
121. Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol* 2012, 6(6): 579-89.
122. Rajendran P, Williams DE, Ho E, Dashwood RH. Metabolism as a key to histone deacetylase inhibition. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2011, 46(3): 181-99.
123. Virani S, Colacino JA, Kim JH, Rozek LS. Cancer epigenetics: a brief review. *ILAR J* 2012, 53(3-4): 359-69.

124. Kim TY, Bang YJ, Robertson KD. Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. *Epigenetics* 2006, 1(1): 14-23.
125. Mishra N, Reilly CM, Brown DR, Ruiz P, Gilkeson GS. Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse. *J Clin Invest* 2003, 111(4): 539-52.
126. Kawabata T, Nishida K, Takasugi K, Ogawa H, Sada K, Kadota Y, Inagaki J, Hirohata S, Ninomiya Y, Makino H. Increased activity and expression of histone deacetylase 1 in relation to tumor necrosis factor-alpha in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010, 12(4): R133.
127. Gillespie J, Savic S, Wong C, Hempshall A, Inman M, Emery P, Grigg R, McDermott MF. Histone deacetylases are dysregulated in rheumatoid arthritis and a novel histone deacetylase 3-selective inhibitor reduces interleukin-6 production by peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2012, 64(2): 418-22.
128. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007, 128(4): 693-705.
129. Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* 2003, 17(15): 1870-81.
130. Pray-Grant MG, Daniel JA, Schieltz D, Yates JR, 3rd, Grant PA. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 2005, 433(7024): 434-8.
131. Glant TT, Besenyei T, Kadar A, Kurko J, Trynieszewska B, Gal J, Soos G, Szekanecz Z, Hoffmann G, Block JA, Katz RS, Mikecz K, Rauch TA. Differentially expressed epigenome modifiers, including aurora kinases A and B, in immune cells in rheumatoid arthritis in humans and mouse models. *Arthritis Rheum* 2013, 65(7): 1725-35.
132. Audia JE, Campbell RM. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016, 8(4): a019521.
133. Yan H, Bu P. Non-coding RNA in cancer. *Essays Biochem* 2021, 65(4): 625-39.
134. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003, 115(7): 787-98.

135. Vos PD, Leedman PJ, Filipovska A, Rackham O. Modulation of miRNA function by natural and synthetic RNA-binding proteins in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2019, 76(19): 3745-52.
136. Kwek KY, Murphy S, Furger A, Thomas B, O'Gorman W, Kimura H, Proudfoot NJ, Akoulitchiev A. U1 snRNA associates with TFIIF and regulates transcriptional initiation. *Nat Struct Biol* 2002, 9(11): 800-5.
137. Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, Munoz P, Gonzalez S, Schoeftner S, Murchison E, Andl T, Chen T, Klatt P, Li E, Serrano M, Millar S, Hannon G, Blasco MA. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol* 2008, 15(9): 998.
138. Yan S, Yim LY, Lu L, Lau CS, Chan VS. MicroRNA Regulation in Systemic Lupus Erythematosus Pathogenesis. *Immune Netw* 2014, 14(3): 138-48.
139. Wei Y, Yang J, Yi L, Wang Y, Dong Z, Liu Z, Ou-yang S, Wu H, Zhong Z, Yin Z, Zhou K, Gao Y, Yan B, Wang Z. MiR-223-3p targeting SEPT6 promotes the biological behavior of prostate cancer. *Sci Rep* 2014, 4: 7546.
140. Wang H, Peng W, Ouyang X, Li W, Dai Y. Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res* 2012, 160(3): 198-206.
141. Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2008, 10(4): R101.
142. Lechman ER, Gentner B, Ng SW, Schoof EM, van Galen P, Kennedy JA, Nucera S, Ciceri F, Kaufmann KB, Takayama N, Dobson SM, Trotman-Grant A, Krivdova G, Elzinga J, Mitchell A, Nilsson B, Hermans KG, Eppert K, Marke R, Isserlin R, Voisin V, Bader GD, Zandstra PW, Golub TR, Ebert BL, Lu J, Minden M, Wang JC, Naldini L, Dick JE. miR-126 Regulates Distinct Self-Renewal Outcomes in Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells. *Cancer Cell* 2016, 29(2): 214-28.
143. Na Y, Hall A, Choi K, Hu L, Rose J, Coover RA, Miller A, Hennigan RF, Dombi E, Kim MO, Subramanian S, Ratner N, Wu J. MicroRNA-155 contributes to plexiform neurofibroma growth downstream of MEK. *Oncogene* 2021, 40(5): 951-63.

144. You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell* 2012, 22(1): 9-20.
145. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee JS, Conner EA, Schroeder I, Factor VM, Thorgeirsson SS. Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 2007, 117(9): 2713-22.
146. Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. *Liver Int* 2005, 25(1): 16-27.
147. Bird AP. The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer Surv* 1996, 28: 87-101.
148. Bestor TH, Ingram VM. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, 80(18): 5559-63.
149. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999, 99(3): 247-57.
150. Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 2000, 405(6785): 482-5.
151. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990, 1(5): 228-37.
152. Lu SC, Mato JM. Role of methionine adenosyltransferase and S-adenosylmethionine in alcohol-associated liver cancer. *Alcohol* 2005, 35(3): 227-34.
153. Pascale RM, Simile MM, De Miglio MR, Nufri A, Daino L, Seddaiu MA, Rao PM, Rajalakshmi S, Sarma DS, Feo F. Chemoprevention by S-adenosyl-L-methionine of rat liver carcinogenesis initiated by 1,2-dimethylhydrazine and promoted by orotic acid. *Carcinogenesis* 1995, 16(2): 427-30.
154. Yang B, Guo M, Herman JG, Clark DP. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2003, 163(3): 1101-7.
155. Zhong S, Tang MW, Yeo W, Liu C, Lo YM, Johnson PJ. Silencing of GSTP1 gene by CpG island DNA hypermethylation in HBV-associated hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 2002, 8(4): 1087-92.

156. Jicai Z, Zongtao Y, Jun L, Haiping L, Jianmin W, Lihua H. Persistent infection of hepatitis B virus is involved in high rate of p16 methylation in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2006, 45(7): 530-6.
157. Lambert MP, Paliwal A, Vaissiere T, Chemin I, Zoulim F, Tommasino M, Hainaut P, Sylla B, Scoazec JY, Tost J, Herceg Z. Aberrant DNA methylation distinguishes hepatocellular carcinoma associated with HBV and HCV infection and alcohol intake. *J Hepatol* 2011, 54(4): 705-15.
158. Zhang YJ, Ahsan H, Chen Y, Lunn RM, Wang LY, Chen SY, Lee PH, Chen CJ, Santella RM. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A and p16 and its relationship to aflatoxin B1-DNA adduct levels in human hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 2002, 35(2): 85-92.
159. Lin CH, Hsieh SY, Sheen IS, Lee WC, Chen TC, Shyu WC, Liaw YF. Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 2001, 61(10): 4238-43.
160. Karpen GH, Hawley RS, Allis C, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros M. Epigenetic regulation of chromosome inheritance. *Epigenetics* 2007, 2007: 265-89.
161. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002, 3(6): 415-28.
162. Herceg Z, Paliwal A. Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome. *Mutat Res* 2011, 727(3): 55-61.
163. Schneider R, Grosschedl R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev* 2007, 21(23): 3027-43.
164. He C, Xu J, Zhang J, Xie D, Ye H, Xiao Z, Cai M, Xu K, Zeng Y, Li H, Wang J. High expression of trimethylated histone H3 lysine 4 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2012, 43(9): 1425-35.
165. Cai MY, Hou JH, Rao HL, Luo RZ, Li M, Pei XQ, Lin MC, Guan XY, Kung HF, Zeng YX, Xie D. High expression of H3K27me3 in human hepatocellular carcinomas correlates closely with vascular invasion and predicts worse prognosis in patients. *Mol Med* 2011, 17(1-2): 12-20.
166. Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima N, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JP, Sekido Y. Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 2007, 37(11): 974-83.

167. Sistayanarain A, Tsuneyama K, Zheng H, Takahashi H, Nomoto K, Cheng C, Murai Y, Tanaka A, Takano Y. Expression of Aurora-B kinase and phosphorylated histone H3 in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2006, 26(5A): 3585-93.
168. Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* 2006, 15 Spec No 1: R17-29.
169. Negrini M, Gramantieri L, Sabbioni S, Croce CM. microRNA involvement in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Agents Med Chem* 2011, 11(6): 500-21.
170. Abbastabar M, Sarfi M, Golestani A, Khalili E. lncRNA involvement in hepatocellular carcinoma metastasis and prognosis. *EXCLI J* 2018, 17: 900-13.
171. Geng YJ, Xie SL, Li Q, Ma J, Wang GY. Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression. *J Int Med Res* 2011, 39(6): 2119-28.
172. Hou Z, Xu X, Fu X, Tao S, Zhou J, Liu S, Tan D. HBx-related long non-coding RNA MALAT1 promotes cell metastasis via up-regulating LTBP3 in hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res* 2017, 7(4): 845-56.
173. Li C, Miao R, Liu S, Wan Y, Zhang S, Deng Y, Bi J, Qu K, Zhang J, Liu C. Down-regulation of miR-146b-5p by long noncoding RNA MALAT1 in hepatocellular carcinoma promotes cancer growth and metastasis. *Oncotarget* 2017, 8(17): 28683-95.
174. Ng KW, Anderson C, Marshall EA, Minatel BC, Enfield KS, Saprunoff HL, Lam WL, Martinez VD. Piwi-interacting RNAs in cancer: emerging functions and clinical utility. *Mol Cancer* 2016, 15: 5.
175. Kojima K, April C, Canasto-Chibuque C, Chen X, Deshmukh M, Venkatesh A, Tan PS, Kobayashi M, Kumada H, Fan JB, Hoshida Y. Transcriptome profiling of archived sectioned formalin-fixed paraffin-embedded (AS-FFPE) tissue for disease classification. *PLoS One* 2014, 9(1): e86961.
176. Villanueva A, Portela A, Sayols S, Battiston C, Hoshida Y, Méndez-González J, Imbeaud S, Letouzé E, Hernandez-Gea V, Cornella H, Pinyol R, Solé M, Fuster J, Zucman-Rossi J, Mazzaferro V, Esteller M, Llovet JM. DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2015, 61(6): 1945-56.
177. Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc* 2009, 4(8): 1184-91.

178. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 2004, 20(3): 307-15.
179. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015, 43(7): e47.
180. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res* 2015, 43(W1): 566-70.
181. Reimand J, Isserlin R, Voisin V, Kucera M, Tannus-Lopes C, Rostamianfar A, Wadi L, Meyer M, Wong J, Xu C, Merico D, Bader GD. Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap. *Nat Protoc* 2019, 14(2): 482-517.
182. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 2015, 43(Database issue): 447-52.
183. Garcia-Moreno A, López-Domínguez R, Villatoro-García JA, Ramirez-Mena A, Aparicio-Puerta E, Hackenberg M, Pascual-Montano A, Carmona-Saez P. Functional Enrichment Analysis of Regulatory Elements. *Biomedicines* 2022, 10(3): 590.
184. García-Ruiz S, Gil-Martínez AL, Cisterna A, Jurado-Ruiz F, Reynolds RH, Cookson MR, Hardy J, Ryten M, Botía JA. CoExp: A Web Tool for the Exploitation of Co-expression Networks. *Front Genet* 2021, 12: 630187.
185. Cardozo LE, Russo PST, Gomes-Correia B, Araujo-Pereira M, Sepúlveda-Hermosilla G, Maracaja-Coutinho V, Nakaya HI. webCEMiTool: Co-expression Modular Analysis Made Easy. *Front Genet* 2019, 10: 146.
186. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014, 30(15): 2114-20.
187. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 2018, 34(17): 884-90.
188. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 2016, 32(19): 3047-8.

189. Shen W, Le S, Li Y, Hu F. SeqKit: A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation. *PLoS One* 2016, 11(10): e0163962.
190. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 2012, 9(4): 357-9.
191. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009, 25(16): 2078-9.
192. Krueger F, Andrews SR. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics* 2011, 27(11): 1571-2.
193. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 2010, 26(6): 841-2.
194. Ge SX, Jung D, Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics* 2020, 36(8): 2628-9.
195. <https://www.creativebiomart.net/epigenetics/services/dna-methylation-analysis-service/medip-based-service/medip-seq-service/> Son Erişim Tarihi 20.06.2023
196. Lienhard M, Grasse S, Rolff J, Frese S, Schirmer U, Becker M, Börno S, Timmermann B, Chavez L, Sülthmann H, Leschber G, Fichtner I, Schweiger MR, Herwig R. QSEA-modelling of genome-wide DNA methylation from sequencing enrichment experiments. *Nucleic Acids Res* 2017, 45(6): e44.
197. Cavalcante RG, Sartor MA. annotatr: genomic regions in context. *Bioinformatics* 2017, 33(15): 2381-3.
198. Balogh J, Victor D, 3rd, Asham EH, Burroughs SG, Boktour M, Saharia A, Li X, Ghobrial RM, Monsour HP, Jr. Hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocell Carcinoma* 2016, 3: 41-53.
199. Villanueva A, Minguez B, Forner A, Reig M, Llovet JM. Hepatocellular carcinoma: novel molecular approaches for diagnosis, prognosis, and therapy. *Annu Rev Med* 2010, 61: 317-28.
200. Chen J, Ding C, Chen Y, Hu W, Lu Y, Wu W, Zhang Y, Yang B, Wu H, Peng C, Xie H, Zhou L, Wu J, Zheng S. ACSL4 promotes hepatocellular carcinoma progression via c-Myc stability mediated by ERK/FBW7/c-Myc axis. *Oncogenesis* 2020, 9(4): 42.
201. Liu G, Dong C, Liu L. Integrated Multiple "-omics" Data Reveal Subtypes of Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* 2016, 11(11): e0165457i.

202. Liu J, Lichtenberg T, Hoadley KA, Poisson LM, Lazar AJ, Cherniack AD, Kovatich AJ, Benz CC, Levine DA, Lee AV, Omberg L, Wolf DM, Shriver CD, Thorsson V, Hu H. An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell* 2018, 173(2): 400-416.e411.
203. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman PM, Holko M, Yefanov A, Lee H, Zhang N, Robertson CL, Serova N, Davis S, Soboleva A. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res* 2013, 41(Database issue): 991-5.
204. Karczewski KJ, Snyder MP. Integrative omics for health and disease. *Nat Rev Genet* 2018, 19(5): 299-310.
205. Beck D, Ben Maamar M, Skinner MK. Genome-wide CpG density and DNA methylation analysis method (MeDIP, RRBS, and WGBS) comparisons. *Epigenetics* 2022, 17(5): 518-30.
206. Stirzaker C, Taberlay PC, Statham AL, Clark SJ. Mining cancer methylomes: prospects and challenges. *Trends Genet* 2014, 30(2): 75-84.
207. Yong WS, Hsu FM, Chen PY. Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics Chromatin* 2016, 9: 26.
208. Ilango S, Paital B, Jayachandran P, Padma PR, Nirmaladevi R. Epigenetic alterations in cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2020, 25(6): 1058-109.
209. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010, 28(10): 1057-68.
210. Lin KT, Shann YJ, Chau GY, Hsu CN, Huang CY. Identification of latent biomarkers in hepatocellular carcinoma by ultra-deep whole-transcriptome sequencing. *Oncogene* 2014, 33(39): 4786-94.
211. Gurnett CA, Alaee F, Kruse LM, Desruisseau DM, Hecht JT, Wise CA, Bowcock AM, Dobbs MB. Asymmetric lower-limb malformations in individuals with homeobox PITX1 gene mutation. *Am J Hum Genet* 2008, 83(5): 616-22.
212. Wang Q, Zhao S, Gan L, Zhuang Z. Bioinformatics analysis of prognostic value of PITX1 gene in breast cancer. *Biosci Rep* 2020, 40(9): BSR20202537
213. Eun JW, Jang JW, Yang HD, Kim J, Kim SY, Na MJ, Shin E, Ha JW, Jeon S, Ahn YM, Park WS, Nam SW. Serum Proteins, HMMR, NXPH4, PITX1 and THBS4, A Panel of Biomarkers for Early Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Med* 2022, 11(8): 2128

214. Tai WT, Chen YL, Chu PY, Chen LJ, Hung MH, Shiau CW, Huang JW, Tsai MH, Chen KF. Protein tyrosine phosphatase 1B dephosphorylates PITX1 and regulates p120RasGAP in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2016, 63(5): 1528-43.
215. Marshall A, Lukk M, Kutter C, Davies S, Alexander G, Odom DT. Global gene expression profiling reveals SPINK1 as a potential hepatocellular carcinoma marker. *PLoS One* 2013, 8(3): e59459.
216. Huang K, Xie W, Wang S, Li Q, Wei X, Chen B, Hua Y, Li S, Peng B, Shen S. High SPINK1 Expression Predicts Poor Prognosis and Promotes Cell Proliferation and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. *J Invest Surg* 2021, 34(9): 1011-20.
217. Wang F, Liu H, Bai Y, Li H, Wang Z, Xu X. Performance of SPINK1 and SPINK1-based diagnostic model in detection of hepatocellular carcinoma. *J Clin Lab Anal* 2021, 35(11): e24025.
218. Li F, Liu T, Xiao CY, Yu JX, Lu LG, Xu MY. FOXP1 and SPINK1 reflect the risk of cirrhosis progression to HCC with HBV infection. *Biomed Pharmacother* 2015, 72: 103-8.
219. Holah NS, El-Azab DS, Aiad HAE, Sweed DMM. The Diagnostic Role of SPINK1 in Differentiating Hepatocellular Carcinoma From Nonmalignant Lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2017, 25(10): 703-11.
220. Feng J, Lu PZ, Zhu GZ, Hooi SC, Wu Y, Huang XW, Dai HQ, Chen PH, Li ZJ, Su WJ, Han CY, Ye XP, Peng T, Zhou J, Lu GD. ACSL4 is a predictive biomarker of sorafenib sensitivity in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacol Sin* 2021, 42(1): 160-70.
221. Ndiaye H, Liu JY, Hall A, Minogue S, Morgan MY, Waugh MG. Immunohistochemical staining reveals differential expression of ACSL3 and ACSL4 in hepatocellular carcinoma and hepatic gastrointestinal metastases. *Biosci Rep* 2020, 40(4): BSR20200219
222. Chen J, Ding C, Chen Y, Hu W, Yu C, Peng C, Feng X, Cheng Q, Wu W, Lu Y, Xie H, Zhou L, Wu J, Zheng S. ACSL4 reprograms fatty acid metabolism in hepatocellular carcinoma via c-Myc/SREBP1 pathway. *Cancer Lett* 2021, 502: 154-65.
223. Cao J, Wang P, Chen J, He X. Systemic characterization of the SLC family genes reveals SLC26A6 as a novel oncogene in hepatocellular carcinoma. *Transl Cancer Res* 2021, 10(6): 2882-94.

224. Zhu Y, Huang Y, Chen L, Guo L, Wang L, Li M, Liang Y. Up-Regulation of SLC26A6 in Hepatocellular Carcinoma and Its Diagnostic and Prognostic Significance. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2021, 31(5): 79-94.
225. Csepregi A, Ebert MP, Röcken C, Schneider-Stock R, Hoffmann J, Schulz HU, Roessner A, Malfertheiner P. Promoter methylation of CDKN2A and lack of p16 expression characterize patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2010, 10: 317.
226. Luo JP, Wang J, Huang JH. CDKN2A is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in hepatocellular carcinoma. *Biosci Rep* 2021, 41(10): BSR20211103
227. Xu X, Chan AKN, Li M, Liu Q, Mattson N, Pangen Pokharel S, Chang WH, Yuan YC, Wang J, Moore RE, Pirrotte P, Wu J, Su R, Müschen M, Rosen ST, Chen J, Yang L, Chen CW. ACTR5 controls CDKN2A and tumor progression in an INO80-independent manner. *Sci Adv* 2022, 8(51): eadc8911.
228. Chen J, Xia H, Zhang X, Karthik S, Pratap SV, Ooi LL, Hong W, Hui KM. ECT2 regulates the Rho/ERK signalling axis to promote early recurrence in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2015, 62(6): 1287-95.
229. Xu D, Wang Y, Wu J, Zhang Z, Chen J, Xie M, Tang R, Chen C, Chen L, Lin S, Luo X, Zheng J. ECT2 overexpression promotes the polarization of tumor-associated macrophages in hepatocellular carcinoma via the ECT2/PLK1/PTEN pathway. *Cell Death Dis* 2021, 12(2): 162.
230. Yu Y, Cai O, Wu P, Tan S. MiR-490-5p inhibits the stemness of hepatocellular carcinoma cells by targeting ECT2. *J Cell Biochem* 2019, 120(1): 967-76.
231. Zhang Y, Wang W, Wang Y, Huang X, Zhang Z, Chen B, Xie W, Li S, Shen S, Peng B. NEK2 promotes hepatocellular carcinoma migration and invasion through modulation of the epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Rep* 2018, 39(3): 1023-33.
232. Lin S, Zhou S, Jiang S, Liu X, Wang Y, Zheng X, Zhou H, Li X, Cai X. NEK2 regulates stem-like properties and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2016, 36(2): 853-62.
233. Fu J, Li M, Wu DC, Liu LL, Chen SL, Yun JP. Increased Expression of CAP2 Indicates Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Transl Oncol* 2015, 8(5): 400-6.

234. Sakamoto M, Mori T, Masugi Y, Effendi K, Rie I, Du W. Candidate molecular markers for histological diagnosis of early hepatocellular carcinoma. *Intervirology* 2008, 51(Suppl 1): 42-45.
235. Cai H, Shao B, Zhou Y, Chen Z. High expression of TOP2A in hepatocellular carcinoma is associated with disease progression and poor prognosis. *Oncol Lett* 2020, 20(5): 232.
236. Panvichian R, Tantiwetrueangdet A, Angkathunyakul N, Leelaudomlipi S. TOP2A amplification and overexpression in hepatocellular carcinoma tissues. *Biomed Res Int* 2015, 2015: 381602.
237. Wong N, Yeo W, Wong WL, Wong NL, Chan KY, Mo FK, Koh J, Chan SL, Chan AT, Lai PB, Ching AK, Tong JH, Ng HK, Johnson PJ, To KF. TOP2A overexpression in hepatocellular carcinoma correlates with early age onset, shorter patients survival and chemoresistance. *Int J Cancer* 2009, 124(3): 644-52.
238. Wang T, Lu J, Wang R, Cao W, Xu J. TOP2A promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma regulated by miR-144-3p. *J Cancer* 2022, 13(2): 589-601.
239. Meng J, Wei Y, Deng Q, Li L, Li X. Study on the expression of TOP2A in hepatocellular carcinoma and its relationship with patient prognosis. *Cancer Cell Int* 2022, 22(1): 29.
240. Dong Y, Sun X, Zhang K, He X, Zhang Q, Song H, Xu M, Lu H, Ren R. Type IIA topoisomerase (TOP2A) triggers epithelial-mesenchymal transition and facilitates HCC progression by regulating Snail expression. *Bioengineered* 2021, 12(2): 12967-79.
241. Lin SY, Pan HW, Liu SH, Jeng YM, Hu FC, Peng SY, Lai PL, Hsu HC. ASPM is a novel marker for vascular invasion, early recurrence, and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008, 14(15): 4814-20.
242. Zhang H, Yang X, Zhu L, Li Z, Zuo P, Wang P, Feng J, Mi Y, Zhang C, Xu Y, Jin G, Zhang J, Ye H. ASPM promotes hepatocellular carcinoma progression by activating Wnt/ β -catenin signaling through antagonizing autophagy-mediated Dvl2 degradation. *FEBS Open Bio* 2021, 11(10): 2784-99.
243. Zeng Y, He H, Zhang Y, Wang X, Yang L, An Z. CCNB2, TOP2A, and ASPM Reflect the Prognosis of Hepatocellular Carcinoma, as Determined by Weighted Gene Coexpression Network Analysis. *Biomed Res Int* 2020, 2020: 4612158.

244. Wu B, Hu C, Kong L. ASPM combined with KIF11 promotes the malignant progression of hepatocellular carcinoma via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Exp Ther Med* 2021, 22(4): 1154.
245. Wang A, Chen X, Li D, Yang L, Jiang J. METTL3-mediated m6A methylation of ASPM drives hepatocellular carcinoma cells growth and metastasis. *J Clin Lab Anal* 2021, 35(9): e23931.
246. Qian EN, Han SY, Ding SZ, Lv X. Expression and diagnostic value of CCT3 and IQGAP3 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int* 2016, 16: 55.
247. Zhang Y, Wang Y, Wei Y, Wu J, Zhang P, Shen S, Saiyin H, Wumaier R, Yang X, Wang C, Yu L. Molecular chaperone CCT3 supports proper mitotic progression and cell proliferation in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2016, 372(1): 101-9.
248. Gu Y, Chen B, Guo D, Pan L, Luo X, Tang J, Yang W, Zhang Y, Zhang L, Huang J, Duan R, Wang Z. Up-Regulation of RACGAP1 Promotes Progressions of Hepatocellular Carcinoma Regulated by GABPA via PI3K/AKT Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2022, 2022: 3034150.
249. Pu J, Wang J, Wei H, Lu T, Wu X, Wu Y, Shao Z, Luo C, Lu Y. lncRNA MAGI2-AS3 Prevents the Development of HCC via Recruiting KDM1A and Promoting H3K4me2 Demethylation of the RACGAP1 Promoter. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019, 18: 351-62.
250. Wang MY, Chen DP, Qi B, Li MY, Zhu YY, Yin WJ, He L, Yu Y, Li ZY, Lin L, Yang F, Lin ZR, Liu JQ. Pseudogene RACGAP1P activates RACGAP1/Rho/ERK signalling axis as a competing endogenous RNA to promote hepatocellular carcinoma early recurrence. *Cell Death Dis* 2019, 10(6): 426.
251. Ma W, Zhang X, Ma C, Liu P. Highly expressed FAM189B predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2022, 28: 1610674.
252. Liu A, Wu Q, Peng D, Ares I, Anadón A, Lopez-Torres B, Martínez-Larrañaga MR, Wang X, Martínez MA. A novel strategy for the diagnosis, prognosis, treatment, and chemoresistance of hepatocellular carcinoma: DNA methylation. *Med Res Rev* 2020, 40(5): 1973-2018.
253. Long J, Chen P, Lin J, Bai Y, Yang X, Bian J, Lin Y, Wang D, Yang X, Zheng Y, Sang X, Zhao H. DNA methylation-driven genes for constructing diagnostic, prognostic, and recurrence models for hepatocellular carcinoma. *Theranostics* 2019, 9(24): 7251-67.

254. Zhou T, Li S, Xiang D, Liu J, Sun W, Cui X, Ning B, Li X, Cheng Z, Jiang W, Zhang C, Liang X, Li L, Cheng X, Hui L, Wang H, Ding J. m6A RNA methylation-mediated HNF3 γ reduction renders hepatocellular carcinoma dedifferentiation and sorafenib resistance. *Signal Transduct Target Ther* 2020, 5(1): 296.
255. Wang K, Luo L, Fu S, Wang M, Wang Z, Dong L, Wu X, Dai L, Peng Y, Shen G, Chen HN, Nice EC, Wei X, Huang C. PHGDH arginine methylation by PRMT1 promotes serine synthesis and represents a therapeutic vulnerability in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 2023, 14(1): 1011.
256. Patil V, Ward RL, Hesson LB. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics* 2014, 9(6): 823-8.
257. Li S, Han J, Guo G, Sun Y, Zhang T, Zhao M, Xu Y, Cui Y, Liu Y, Zhang J. Voltage-gated sodium channels β 3 subunit promotes tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by facilitating p53 degradation. *FEBS Lett* 2020, 594(3): 497-508
258. Wei H, Wang J, Xu Z, Lu Y, Wu X, Zhuo C, Tan C, Tang Q, Pu J. miR-584-5p regulates hepatocellular carcinoma cell migration and invasion through targeting KCNE2. *Mol Genet Genomic Med* 2019, 7(6): e702.
259. Chávez-López MG, Zúñiga-García V, Pérez-Carreón JI, Avalos-Fuentes A, Escobar Y, Camacho J. Eag1 channels as potential early-stage biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Biologics* 2016, 10: 139-48.
260. Yasen M, Kajino K, Kano S, Tobita H, Yamamoto J, Uchiumi T, Kon S, Maeda M, Obulhasim G, Arii S, Hino O. The up-regulation of Y-box binding proteins (DNA binding protein A and Y-box binding protein-1) as prognostic markers of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005, 11(20): 7354-61.
261. Yasen M, Obulhasim G, Kajino K, Mogushi K, Mizushima H, Tanaka S, Tanaka H, Hino O, Arii S. DNA binding protein A expression and methylation status in hepatocellular carcinoma and the adjacent tissue. *Int J Oncol* 2012, 40(3): 789-97.
262. Qiu L, Zhan K, Malale K, Wu X, Mei Z. Transcriptomic profiling of peroxisome-related genes reveals a novel prognostic signature in hepatocellular carcinoma. *Genes Dis* 2022, 9(1): 116-27.
263. Liu T, Yuan Z, Wang H, Wang J, Xue L. Peroxisome-related genes in hepatocellular carcinoma correlated with tumor metabolism and overall survival. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2022, 46(10): 101835.

264. Hsu HT, Chi CW. Emerging role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in hepatocellular carcinoma. *J Hepatocell Carcinoma* 2014, 1: 127-35.
265. Wang J, Chu H, Wang Z, Wang X, Liu X, Song Z, Liu F. In vivo study revealed pro-tumorigenic effect of CMTM3 in hepatocellular carcinoma involving the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). *Cell Oncol (Dordr)* 2023, 46(1): 49-64.
266. Zhang H, Su X, Burley SK, Zheng XFS. mTOR regulates aerobic glycolysis through NEAT1 and nuclear paraspeckle-mediated mechanism in hepatocellular carcinoma. *Theranostics* 2022, 12(7): 3518-33.
267. Ge S, Huang H, Huang W, Ji R, Chen J, Wu S, Wang L, Huang T, Sheng Y, Yan H, Lu C, Ma L. PSME4 Activates mTOR Signaling and Promotes the Malignant Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Int J Gen Med* 2022, 15: 885-95.
268. Mo SJ, Hou X, Hao XY, Cai JP, Liu X, Chen W, Chen D, Yin XY. EYA4 inhibits hepatocellular carcinoma growth and invasion by suppressing NF- κ B-dependent RAP1 transactivation. *Cancer Commun (Lond)* 2018, 38(1): 9.
269. Zha Y, Gan P, Yao Q, Ran FM, Tan J. Downregulation of Rap1 promotes 5-fluorouracil-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Oncol Rep* 2014, 31(4): 1691-8.
270. Bedoui Y, Guillot X, Sélambarom J, Guiraud P, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, Ralandison S, Gasque P. Methotrexate an old drug with new tricks. *Int J Mol Sci* 2019, 20(20): 5023.

EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul Onayı

