

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELÜLER KARSİNOM GELİŞİMİNDE
HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ VE HEPARAN
SÜLFAT PROTEOGLİKANLAR ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ROLÜ**

Evin Özen

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELÜLER KARSİNOM GELİŞİMİNDE
HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ VE HEPARAN
SÜLFAT PROTEOGLİKANLAR ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ROLÜ**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

EVİN ÖZEN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Neşe Atabey

Bu Araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2008.KB.SAG.02 numaralı proje ile desteklenmiştir.

“Hepatoselüler Karsinom Gelişiminde Heparan Sülfat Proteoglikanlar ve Hepatosit Büyüme Faktörü Arasındaki İlişkinin Rolü” isimli bu tez 23.01.09 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Neşe ATABEY
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Meral Sakızlı
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Gülgün Oktay
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Esra Erdal
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ogün Sercan
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

SAYFA

Tablo Listesi	vii
Şekil Listesi	viii
Kısaltmalar	x
Teşekkür	xii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Early Growth Response-1 (Egr1)'in Normal Hücrelerde ve Kanser Hücrelerinde Biyolojik Süreçlerdeki Rolü	5
2.1.1. Egr1'in Genel Özellikleri	5
2.1.2. Egr1 Proteinin Yapısı ve Özellikleri	7
2.1.3.Egr1'in Kanser İle İlişkisi	7
2.2. Heparan Sülfat Proteoglikanların Kanserdeki Rolü	10
2.2.1. Heparan Sülfat Proteoglikanların Genel Özellikleri ve Kanserdeki Rollerini	10
2.2.2. Heparan Sülfat Proteoglikanların Büyüme Faktörleri ile İlişkisi	11
2.2.3. Heparan Sülfat Proteoglikanların Sınıflandırılması	11
2.2.4. Heparinin Genel Özellikleri	12
2.2.2.5. Heparinin Büyüme Faktörleri ile İlişkisi	12
2.2.2.6. Heparinin HGF/SF-c-Met Sinyal Yolağı ile İlişkisi	13
2.3. HGF-c-Met Sinyal İletim Yolu	14
2.3.1.c-Met'in Hücre Dışı Kısmı	15
2.3.2.c-MET'in Hücre İçi Kısmı	16
2.4.Hepatoselüler Karsinoma	17
2.4.1.Hepatoselüler Karsinoma Aşamaları ve	19

Genetik Mekanizması	
2.4.2.Egr1'in HCC Gelişiminde ve Oluşumundaki Rolü	19
2.4.3. Heparinin Kansere İlişkisi	20
3.MATERYAL ve METOD	21
3.1.HÜCRE KÜLTÜRÜ	21
3.2.Hepatosellüler Karsinoma Hücre Hatlarında EGR1 ekspresyonunun m-RNA düzeyinde Belirlenmesi	21
3.2.1.Total RNA Eldesi	22
3.2.1.1. Trizol Yöntemi ile Total RNA İzolasyonu	23
3.2.2. EGR'in HGF ve Heparin Varlığında Zamana ve Doza Bağımlı Değişiminin m-RNA Düzeyinde Gösterilmesi	23
3.2.2.1.Promega SV Total RNA Isolation System Z3100	24
3.2.3. Total RNA'lardan cDNA Sentezlenmesi	26
3.2.4. cDNA Kalıplarından Spesifik Primerler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	26
3.3. Heparinin HGF ile Aktive Olan Proteinlerin Ekspresyonuna Etkisinin Belirlenmesi Amacı ile SKHep1 Hücre Hattından Protein İzole Edilmesi	28
3.3.1 Hücrelerden Total Protein İzole Edilmesi	29
3.3.2 Protein Miktarlarının BCA Yöntemiyle Belirlenmesi	29
3.3.3. Proteinlerin "SDS-Page" Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi	30
3.3.4. Poliakrilamid Jelde Yürütülen Proteinlerin PVDF Membranlara Transferi ve Membranın Bloklanması	31
3.3.5.MMP'lerin Aktivitesinin Değerlendirilmesi Zimografi	33
3.3.5.1 SKHep1 Hücre Hattında Jelatin Zimografisi	33
3.3.6."Lusiferaz Reporter Assay"	36
3.3.6.1.Transformasyon Deneyi	36
3.3.6.1.1. Miniprep	39
3.3.6.1.2. Maxi-prep,	40
3.3.6.1.3. Transfeksiyon	41

3.3.6.1.4. Lusiferaz Deneyi	42
3.4. İnvazyon ve Motilite Deneyi	42
3.4.1. DiffQuik (Dade-Bahring) İle Boyama	44
4. BULGULAR	45
4.1 Hepatosellüler Karsinoma Hücrelerinde Egr1 Ekspresyonu	45
4.2. SK-Hep1 hücrelerinde HGF ve/veya Heparin uygulamasının Egr1 transkripsiyonuna etkisi	46
4.3. Heparin Dozunun HGF ile Uyarılan Egr1 Ekspresyonuna Etkisi	47
4.4. HGF ve/veya Heparin' in Egr1 Transaktivasyonuna Etkisi	50
4.5. SKHep1 Hücrelerinde Heparin'in c-MET fosforilasyonuna etkisi	51
4.6. SKHep1 Hücrelerinde Heparin'in MAPK fosforilasyonuna etkisi	52
4.7. SKHep1 Hücre Dizisinde Heparinin HGF ile Aktive Olan Hücre İnvazyon ve Motilitesine Etkisi	52
4.8. HGF ve/veya Heparin uygulamasının MMP-9 ekspresyonuna etkisi	54
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ ve ÖNERİ	60
7. KAYNAKLAR	61

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1: Egr1 ile aktive olan bazı hedef genler	7
Tablo 2: Heparan sülfat proteoglikanlara bağlanabilen büyüme faktörleri	11
Tablo 3: Heparin ile ilişkili tümör mikroçevresi proteinleri	13
Tablo 4: PCR’da kullanılan primerler	27
Tablo 5: Poliakrilamid jel içeriği	30
Tablo 6: Western-blottingde kullanılan antikorlar	32
Tablo 7: Jelatin zimografi jelinin içeriği	33
Tablo 8: Zimografide kullanılan solusyon ve tamponları hazırlanması	35
Tablo 9: Transfeksiyon deneyi için kullanılan ortamlar ve içerikleri	38
Tablo 10: Miniprep için kullanılan solusyonlar,	40

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: Egr1 hücre dışından gelen birçok sinyal ile uyarılmaktadır	5
Şekil 2: HGF ile uyarılan hücre saçılması olayı Egr1 üzerinden gerçekleşmektedir	6
Şekil 3: Çeşitli sinyaller tarafından Egr1 ekspresyonunun uyarılması sonrasında, farklı hücre tiplerindeki farklı yanıtlar ortaya çıkabilmektedir	8
Şekil 4: Egr1 ve Egr1'in iki hedef geni olan PTEN ve fibronektin ile uyarılan Egr1'in hücre sağkalımındaki rolü, koşullara bağlı olarak Egr1 apoptoz yolağını veya hücrede sağkalım yolağını aktive edebilmektedir.	9
Şekil 5: Hücre yüzeyinde ve hücre dışı matrisde yer alan heparan sülfat proteoglikanlar	10
Şekil 6: Heparan sülfat proteoglikanların sınıflandırılması	12
Şekil 7:a) Heparin NK1'nin konformasyonel değişimine etkisi b) Heparin NK1 domainin oluşumunu sağlamaktadır.	14
Şekil 8: HGF/SF'nin yapısı	14
Şekil 9: MET proteininin yapısı	16
Şekil 10: c-MET sinyal iletim yolağının hücrenin biyolojik davranışlarındaki rolü	18
Şekil 11: HCC'nin oluşumunda ve gelişiminde rol alan etiyolojik faktörler	22
Şekil 12: RNA eldesinin şematik gösterimi	28
Şekil 13: Protein eldesinin şematik gösterimi	34
Şekil 14: Transfeksiyon ve miniprep şematik gösterimi	43

Şekil 15: İnvazyon ve motilite kuyularına farklı yoğunlukta heparin ve HGF eklenmesi,	44
Şekil 16: İnvazyon kuyuları	45
Şekil 17: RT-PCR ile HCC hücre dizilerinde bazal Koşullarda Egr1 transkripsiyonu	46
Şekil 18: Egr1' in HCC hücre dizilerinde bazal düzeyde protein ekspresyonununun western-blotting yöntemi ile gösterilmesi,	47
Şekil 19: Heparin, Heparin+HGF varlığındaki Egr1 transkripsiyonundaki değişimi,	47
Şekil 20: HGF' nin m-RNA düzeyinde Egr1 ekspresyonuna etkisi	48
Şekil 21: Heparin dozunun Egr1 ekspresyonuna Etkisi	48
Şekil 22: Heparinin HGF ile uyarılan EGR1 ekspresyonuna etkisi	49
Şekil 23: HGF ve heparin varlığında Egr1 promotorunun Aktivitesi	50
Şekil 24: HGF ve heparin Avarlığında c-MET fosforilasyonu	51
Şekil 25: HGF ve/veya heparinin MAPK fosforilasyonuna etkisi,	52
Şekil 26: a) SKHep1 hücre dizisinde HGF, HGF+heparinin hücre invazyonu davranışlarına etkisi, b) SKHep1 hücre HGF, heparinin hücre motilitesine etkisi	53
Şekil 27: HGF heparin varlığında MMP-9 aktivasyonununun jelatin zimografi yöntemi ile gösterilmesi,	54

KISALTMALAR

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Reseptor)

PDGF: Platelet Türevli Büyüme Faktörü (Platelet –Derived Growth Factor)

PDGFR: Platelet Türevli Büyüme Faktörü Reseptörü (Platelet –Derived Growth Factor Reseptor)

EGR1: Early Growth Response-1

HCC: Hepatosellüler Karsinoma (Hepatocellular Carcinoma)

HBV: Hepatit B Virusü (Hepatitis B Virus)

HCV: Hepatit C Virusü (Hepatitis C Virus)

HSPG: Heparan Sülfat Proteoglikanlar

PKA: Protein Kinaz A (Protein Kinase A)

PKC: Protein Kinaz C (Protein Kinase C)

TGF: Transforme-edici Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)

TNF: Tümör Nekrozis Faktörü (Tumour Necrosis Factor)

NGF: Sinir-hücreyi Büyüme Faktörü (Nerve Growth Factor)

HGF/SF: Hepatosit Büyüme Faktörü/Saçılım Faktörü (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor)

SPH: Serin Proteinaz Homoloji (Serine Proteinase Homology)

MSP: Makrofaj Uyarıcı Protein (Macrophage Stimulating Protein)

PLC: Fosfolipaz C (Phospholipase C)

pRB: Retinoblastom Proteini (Retinoblastoma proteini)

CDK: Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin Dependent Kinase)

AFP: Alfa Fetoprotein (Alpha-feto protein)

VEGF: Vaskular Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGFR: Vaskular Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü (Vascular Endothelial Growth Factor Reseptor)

MMP: Matriks Metalloproteinaz (Matrix-Metalloproteinase)
FBS: Fötal Sıgır Serumı (Fetal Bovine Serum)
DMEM: Dulbecco'nun Modifiye Ortamı (Dulbecco's Modified Eagles Medium)
IGF: İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü (Insulin Like Growth Factor)
uPAR: Ürokinaz-tipi Plazminojen Aktivatör Reseptörü (Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor)
MAPK: Mitojen Aktive Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase)
Grb2: Büyüme Faktörü Reseptörü Bağlı Protein 2 (Growth-factor Receptor Binding Protein 2)
Gab1: Grb2 ile ilişkili Bağlanma Proteini 1 (Grb2-associated binding protein 1)
ERK: Ekstrasellüler Olarak Düzenlenen Kinaz (Extracellular Regulated Kinase)
FAK: Fokal Adezyon Kinaz (Focal Adhesion Kinase)
PBS: Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffered Saline)
PI3K: Fosfatidil-inositol 3 Kinaz (Phosphatidyl-inositol 3 kinase)
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
M-MuLV: Moloney Murine Leukemia Virus
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat (Sodium Dodesyl Sulphate)
NaF: Sodyum Florid (Sodium Floride)
Na₃VO₄: Sodyum Orto-vanadat (Sodium Ortho-vanadate)
NaCl: Sodyum Klorid (Sodium Chloride)
PMSF: Fenil-metil-sülfonil (Phenyl-methyl-sulphonyl)
BSA: Sıgır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin)
BCA: Bi-sinkronik Asit (Bi-cincronic acid)
PVDF: Poliviniliden Diflorid (Poly-vinylidene floride)
NAB2: NGFI-A 2 Bağlanma proteini
NAB1: NGFI-A 1 Bağlanma proteini

TEŐEKKÖR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca yaptığı her türlü katkıdan dolayı başta danışmanım Prof. Dr. Neşe Atabey'e ve Doç. Dr. Esra Erdal'a, laboratuardaki desteklerinden dolayı Aslı Toylu, İmge Kunter, Murat Çokaklı, Emine Çelik ve Peyda Korhan Bakıcı'ya teşekkürü bir borç biliyorum.

ÖZET

Hepatoselüler Karsinom Gelişiminde Hepatosit Büyüme Faktörü ve Heparan Sülfat Protoglikanlar Arasındaki İlişkinin Rolü

Evin Özen, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Balçova-İzmir, Türkiye

Hepatosit proliferasyonunun gerçekleşmesinde önemli rolü olan sinyal ileti yollarından birisi de HGF-SF/c-Met sinyal yolağıdır. Birçok tümör tipinde bu yolakta bozukluklar olduğu ve bu bozuklukların hücre proliferasyonu, invazyonu ve metastazındaki artış ile sonuçlandığı bildirilmektedir. Birçok büyüme faktörü gibi HGF/SF'in biyolojik etkilerini gerçekleştirilmesinde ko-reseptör gibi çalışan ve büyüme faktörlerini modüle eden Heparan Sülfat Proteoglikanların (HSPG) önemli rolü olduğu bilinmektedir. Birçok kanser tipinde heparininin HGF ile uyarılan hücre invazyonunu, hücre proliferasyonunu ve hücre hareketliliğini arttırdığı bilinmektedir. Buna karşın heparinin HCC'de hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir.

Daha önceki çalışmamızda heparin, HGF ile uyarılan hücre proliferasyonunu, hücre invazyonunu ve hücre hareketliliğini baskıladığı belirlenmişti. Bu etkinin mekanizmasının anlaşılması için yapılan mikroarray çalışması sonrasında aday genlerden birinin Egr1 olabileceği belirlenmiştir. HCC'de HGF ile uyarılan biyolojik yanıtların düzenlenmesinde Egr-1 in rolünü incelemek amacıyla önce heparinin ve HGF uygulamasının HGF-bağımlı olan hücre invazyonuna etkisi incelendi. Egr1 ekspresyonundaki ve transkripsiyonel aktivitesindeki değişim sırası ile RT-PCR ve pGL2-luc-B-Egr1 vektörü kullanılarak lusiferaz deneyi ile gösterildi. HGF ve heparin varlığında Egr1 değişiminin hangi moleküler mekanizma ile gerçekleştiğinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen immüno blotlamalar sonrasında, heparinin, HGF ile uyarılan Egr1 aktivasyonunu, p-Met ve p-MAPK fosforilasyonu baskıladığı, ancak c-Met ve MAPK fosforile olmayan formları değişmediği saptandı.

Çalışmamız sonuç olarak HGF ile uyarılan Egr1 ekspresyonunun heparin varlığında baskılanmasında MAPK yolağının önemli olduğunu ve bu sürecin hücre invazyonunun baskılanmasına neden olduğunu gösterdi. Bu bulgular HCC'nin moleküler mekanizmasının anlaşılmasında ve HCC'yi hedef alan yeni ilaçların üretiminde önemli olabilir.

Anahtar Sözcükler; Egr1, Heparin, HGF, HCC

ABSTRACT

The Role of Interaction Between Hepatocyte Growth Factor and Heparan Sulfate Proteoglycan In The Progression of Hepatocellular Carcinoma

Evin Ozen, Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics, Balçova-Izmir, Turkey

HGF-SF/c-Met is the most potent proliferative signaling pathway for hepatocytes and its aberrancies are very important to explain proliferative and metastatic characteristics of hepatocarcinogenesis. Additionally, it is known that Heparan Sulphate Proteoglycans (HSPGs) works as a co-receptor for HGF/SF and this interaction to modulate signaling. In particular carcinomas, heparin has been found to be increased HGF-induced cell invasion, cell motility and cell proliferation. Contradictorily, increased in HSPG expression has been reported to have negative effect on cell proliferation in HCC. We previously showed that heparin inhibits HGF-induced cell proliferation, cell invasion and cell motility and further microarray analysis was performed to determine molecular mechanism behind heparin induced HGF-SF/c-Met signaling in HCC. One of the gene that disregulate heparin and/or HGF-SF induction was Egr-1 in SKHep1. Therefore Egr-1 may contribute heparin and/or HGF-SF induced in biological consequences in HCC. First we investigated the dose dependent effects of heparin on HGF-SF induced invasion, motility and proliferation of SK-Hep1 cells with boyden chamber, invasion assay . Alteration in Egr-1 expression level and its transcriptional activity were determined by RT-PCR, and luciferase reporter assay with pGL2-luc-B-Egr1 vector, respectively. In order to define molecular mechanisms of altered Egr-1 expression, phosphorylated and unphosphorylated forms of MAPK, levels were analyzed by western blotting. We showed that heparin inhibits HGF-induced cell invasion and also HGF- induced Egr-1 expression was found to be inhibited by heparin in SKHep1 cell line as a dose dependent manner. Moreover, it is found that heparin inhibits HGF-induced transcriptional activity of Egr-1 and HGF-induced p-MET, p-MAPK in a dose dependent manner while did not affect unphosphorylated ones.

Our data concluded that heparin induced Egr-1 downregulation inhibits cell invasion and induced by HGF-SF in HCC cell lines. It may be a new aspect for the understanding molecular mechanism in HCC and good target to improve new drugs.

Key Words : Egr1, Heparin, HGF, HCC

1.GİRİŞ AMAÇ

Hepatoselüler karsinom bir primer karaciğer kanseri tipidir. HCC dünyada görülme sıklığı bakımından 5. sırada yer alıp ölüme yol açma sıklığı bakımından 3. sırada yer almaktadır^{1,2}. HCC'nin moleküler patogeneziyle ilgili birçok bilinmeyen vardır. Bu bilinmeyenlerin temelinde ise HCC'nin oldukça heterojen bir kanser türü olması yatmaktadır. HCC'nin erken tanısı ve tedavisi için, bu kanser türünün gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması son derece önem taşımaktadır. HCC gelişiminde birçok büyüme faktörü sinyal ileti yollarında bozuklukların rol oynadığı bilinmektedir³.

Hepatosit büyüme, çoğalma ve farklılaşmasında önemli rolü olan Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF/SF) ve tirozin kinaz aktivitesine sahip, reseptörü (c-Met)'den oluşan HGF/SF-c-Met sinyal ileti yolağı bunlardan birisidir⁴. Bu yolaktaki bozukluk tümör hücrelerindeki invazif metastatik karakterlerle ilişkilendirilmektedir. Heparan sülfat proteoglikanların bazı diğer büyüme faktörlerinde olduğu gibi, HGF'nin reseptörü c-Met'e bağlanmasında ve HGF'nin uyardığı biyolojik yanıtların oluşumunda önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Heparin bir heparan sülfat proteoglikandır. Oldukça yüksek düzeyde sülfat grupları içermektedir. Heparin daha ucuz ve kullanım kolaylığı nedeni ile genellikle heparan sülfat proteoglikanlar ile ilgili yapılan *in vivo* çalışmalarda kullanılmaktadır. Aynı zamanda heparin uzun seneler kanser hastalarında antikoagülan özelliği nedeni ile kullanılmıştır. Ancak heparin antikoagülan özelliğinin yanında metastaz, hücre proliferasyonun azalmasına yol açtığı da gösterilmiştir⁵. Heparinin baskılayıcı özelliğinin moleküler mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır. Heparin varlığında bazı hücre dizilerinde HGF'nin oluşturduğu yanıtın arttığı gösterilmiştir. Özellikle HGF'nin varyantlarından olan NK1'in heparin yokluğunda c-Met'e bağlanmadığı kaydedilmiştir⁶. NK1 heparin varlığında ise c-Met reseptör tirozin kinaza bağlanarak hücre proliferasyonunda artışa yol açtığı gösterilmiştir⁶. Ancak bu etkinin moleküler mekanizması henüz bilinmemektedir. Ayrıca HGF ve heparinin HCC hücrelerinde hangi biyolojik süreçleri etkilediği de tanımlanmamıştır. HGF ve heparin varlığında HCC hücre dizilerinde gen ekspresyon değişimlerini incelemek için SKHep1 hücre dizisinde mikroarray çalışmaları yapıldı. Bu nedenle daha sonraki çalışmalar SKHep1 hücre dizisinde yürütüldü. Bu konulara açıklık getirmek amacıyla gerçekleştirdiğimiz daha önceki çalışmalarımızda heparin varlığında HCC hücre dizilerinden SKHep1'da heparin varlığında HGF ile uyarılan hücre adezyonu ve proliferasyonu gibi biyolojik yanıtların etkilendiğini göstermiştik.⁷ Bu çalışma kapsamında heparinin HGF tarafından uyarılan hücre invazyonunu baskıladığını göstermiş bulunmaktayız.

Heparinin HCC hücre dizilerindeki HGF tarafından uyarılan biyolojik yanıtları baskılayıcı özelliğinin moleküler mekanizmasının anlaşılması için Heparin, Heparin+HGF koşullarında SKHep1 hücrelerinden elde edilen RNA'lardan yapılan mikroarray sonucunda ekspresyonu anlamlı derecede değişen genlerin biyoinformatik ve literatür verileri doğrultusunda analizi sonrasında Early Growth Response 1 (Egr1) geni aday olarak seçildi.

Egr1, hücre dışından gelen birçok sinyal ile uyarılan bir transkripsiyon faktörüdür. Birçok tümör baskılayıcı genin transaktivasyonunu sağladığı için tümör baskılayıcı gen olarak adlandırılmaktadır.⁷ Ancak prostat kanserinde yüksek düzeyde ekspresyonu söz konusu olup, prostat kanserinin gelişiminde rol alan en önemli onkogenlerden birisi olarak gösterilmektedir.^{7,8} Son yıllarda, normal karaciğer ve hepatoselüler karsinom (HCC)'da ekspresyonunun çok az veya hiç olmadığı, ancak parakanseroz dokuda ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir⁹. Buna ek olarak Egr1'in c-Met'in hedef genlerinden biri olduğu, HGF varlığında ekspresyonunun arttığı ve HGF ile uyarılan hücre saçılımında rol aldığı bildirilmiştir¹⁰.

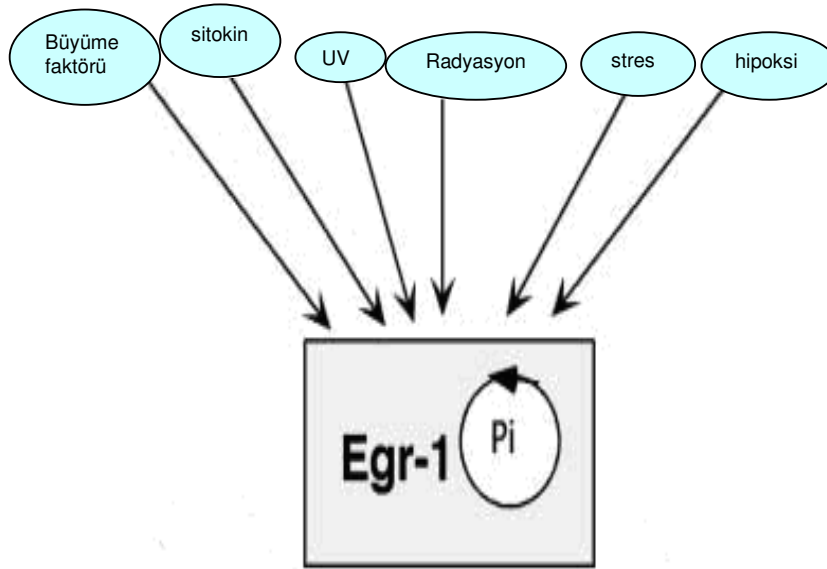
Bu çalışmada mikroarray ile elde edilen Egr-1 ekspresyon artışının RT-PCR ile doğrulanması ve HGF ve/veya heparin uyarımının Egr-1 ekspresyonuna etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca heparinin, HGF ile uyarılan biyolojik yanıtları baskılamasında Egr-1'in rolünün açıklanması hedeflenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Early Growth Response-1 (Egr1)'in Normal Hücrelerde ve Kanser Hücrelerinde Biyolojik Süreçlerdeki Rolü

2.1.1. Egr1'in Genel Özellikleri

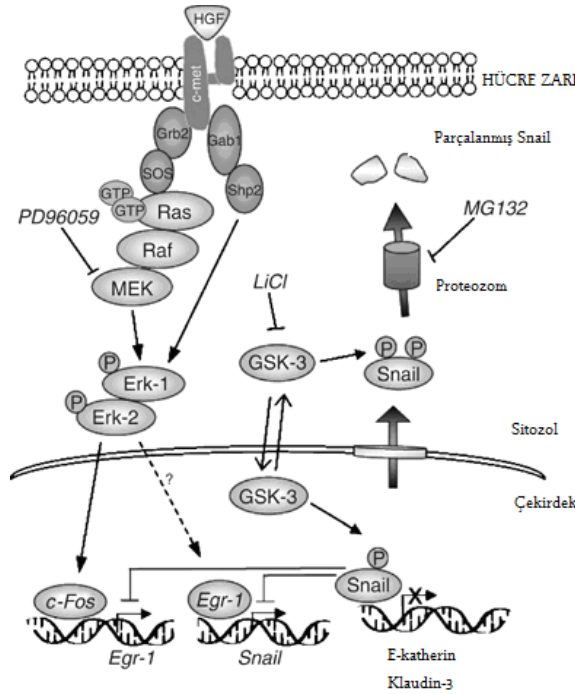
Egr1 geni, erken büyüme yanıtı faktörü olarak bilinmektedir. *NGFI-A*, *Zif268*, *Krox 24* ve *Tis8* olarak da adlandırılmaktadır. Kromozom 5q31 kolunda yer almaktadır.⁸ Egr1 hücre farklılaşması ve hücre proliferasyonunda rol oynamaktadır. Egr1 geni tarafından kodlanan Egr1 proteini C2H2-tip çinko parmak proteinlerinden Egr ailesinin üyesidir⁹. Egr gen ailesi dört üyeden oluşmaktadır. Bunlar, Egr1, Egr2, Egr3 ve Egr4 genlerinden oluşmaktadır. Egr gen ailesinin DNA'ya bağlanan bölgeleri homoloji gösterip, diğer bölgeleri çok az homoloji göstermektedir. Genellikle Egr gen ailesinin bütün üyeleri büyüme faktörleri ile uyarılmaktadır. Egr1 diğer Egr ailesinin üyelerini kontrol etmektedir¹⁰. Egr1 hücre çekirdeğinde yer alan bir protein olup bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapmaktadır^{7,8}. Egr gen ailesinden en çok Egr1 çalışılmaktadır. Egr1 hücre dışından gelen bir çok sinyal ile uyarılmaktadır (Şekil-1)⁷.



Şekil 1: Egr1 hücre dışından gelen birçok sinyal ile uyarılmaktadır.

Egr1'i uyaran faktörler arasında büyüme faktörleri önemli bir yer tutmaktadır. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) Egr1 uyarımında rol alan önemli büyüme faktörlerindedir.^{11, 12}

Egr1 HGF tarafından indüklenmektedir. Egr1'in HGF ile indüksiyonu m-RNA düzeyinde 30. dakikada başlayıp 1. saatte en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. 2. saatten sonra Egr1 m-RNA ve protein düzeyinde yıkımı başlamaktadır.¹⁰ Egr1, HGF tarafından indüklenen anjiyogenez olayında önemli rol aldığı belirtilmiştir.¹³ HGF ile indüklenen Egr1 PDGF, VEGF, IL-8'in promotor bölgelerine bağlanarak ekspresyonlarını arttırdığı bulunmuştur.¹⁰ Egr1 HGF ile uyarılan hücre saçılımı olayında rol almaktadır. Egr1, HGF varlığında uyarıldığında ekspresyonu artış gösterip ve Snail geninin promotor bölgesine bağlanarak Snail ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Snail E-kaderinin promotor bölgesine bağlanarak, E-kaderinlerin ekspresyonunu baskıladığı belirtilmiştir.^{8,9}(Şekil 2.)



Şekil 2. HGF ile uyarılan hücre saçılması olayı Egr1 üzerinden gerçekleşmektedir.

2.1.2. Egr1 Proteinin Yapısı ve Özellikleri

Egr1 yaklaşık olarak 80 kDa büyüklüğünde bir proteindir. Egr1 hücre çekirdeğinde yer almaktadır. Egr1 proteini birçok fosforilasyon bölgesi içermektedir. Egr1 iki tane güçlü bir şekilde aktive olan bölge, 2 tane daha düşük aktivasyon gösteren bölge ve 2 tane Egr1 represörlerinin (NAB1 ve NAB2)'nin bağlandığı bölgeler içermektedir.¹⁴ Egr1 GC içeriği yüksek olan ve promotor bölgesinde 9 bp'lik GCGG/TGGGCG bölgeyi içeren genlere bağlanarak aktivitelerini kontrol etmektedir¹⁵. Egr1 hedef genlerinin bir kısmı Tablo 1.'de gösterilmektedir.

Tablo 1: Egr1 tarafın

dan aktive olan bazı hedef genler⁸

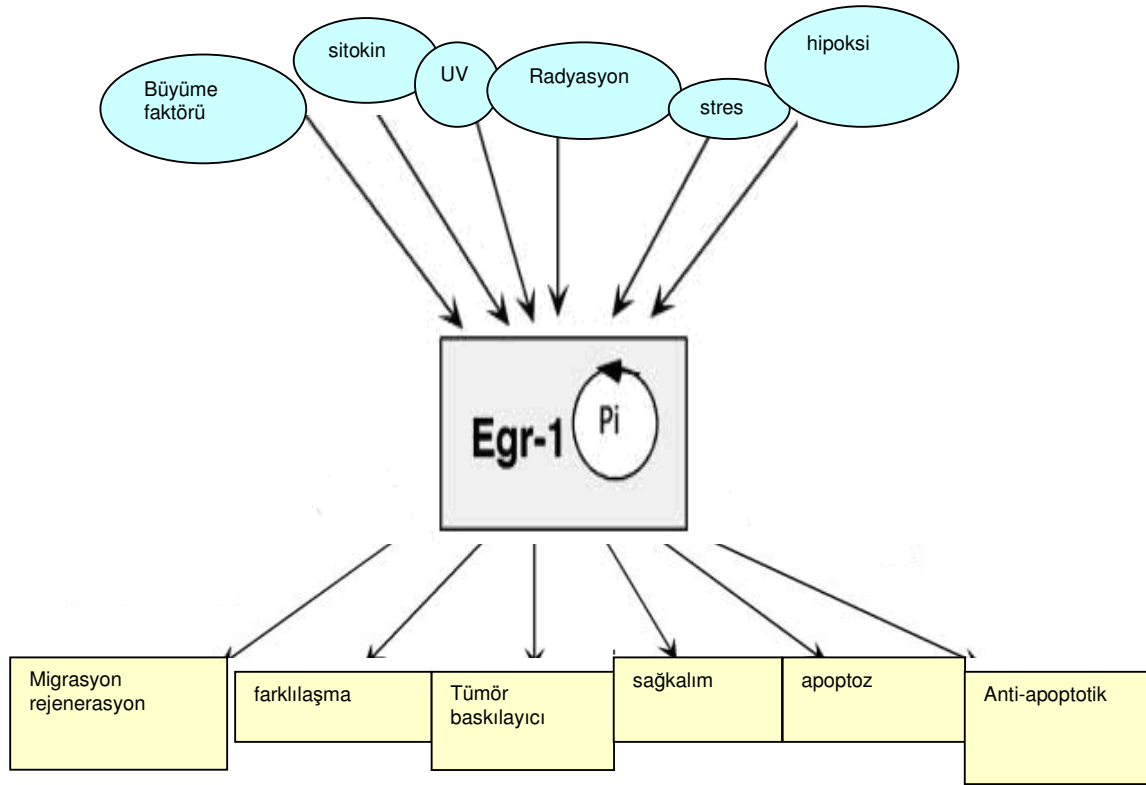
<ul style="list-style-type: none">• Transforme-edici büyüme faktörü-β1• PTEN• BCL-2• p53• p73• Fibronektin• Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)	<ul style="list-style-type: none">• İnterlükin-8• İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-II• Beta Aktin• Platelet Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF)• HIF-1α• TNF-α
--	---

2.1.3. Egr1'in Kansere İlişkisi

Egr1, hücre dışından gelen birçok uyarana ile uyarılabilir (Şekil 1.). Bu uyarılma normalde hızlı ve geçici süre ile gerçekleşmektedir. Ancak prostat kanserinde Egr1'in sürekli bir ekspresyonu söz konusudur. Egr1 overekspresyonunun prostat kanserinin oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir. Buna karşın meme, akciğer ve beyin tümörlerinde Egr1 ekspresyonu ya hiç yoktur ya da çok az rastlanmaktadır^{8,9}. Meme ve akciğer kanserlerinde Egr1 geni yeniden eksprese ettirildiğinde tümör oluşumunda azalma olduğu gösterilmiştir¹⁶. Egr1'in birçok kanser

tipinde normal dokuya göre ekspresyonunun azalması veya hiç gözlenmemesi nedeni ile genellikle tümör baskılayıcı gen olarak kabul görmektedir. Ancak prostat gibi bazı kanser türlerinde, özellikle metastatik fenotiple ilişkili olarak Egr1 ekspresyonunda bir artış görülmektedir.^{8,9}

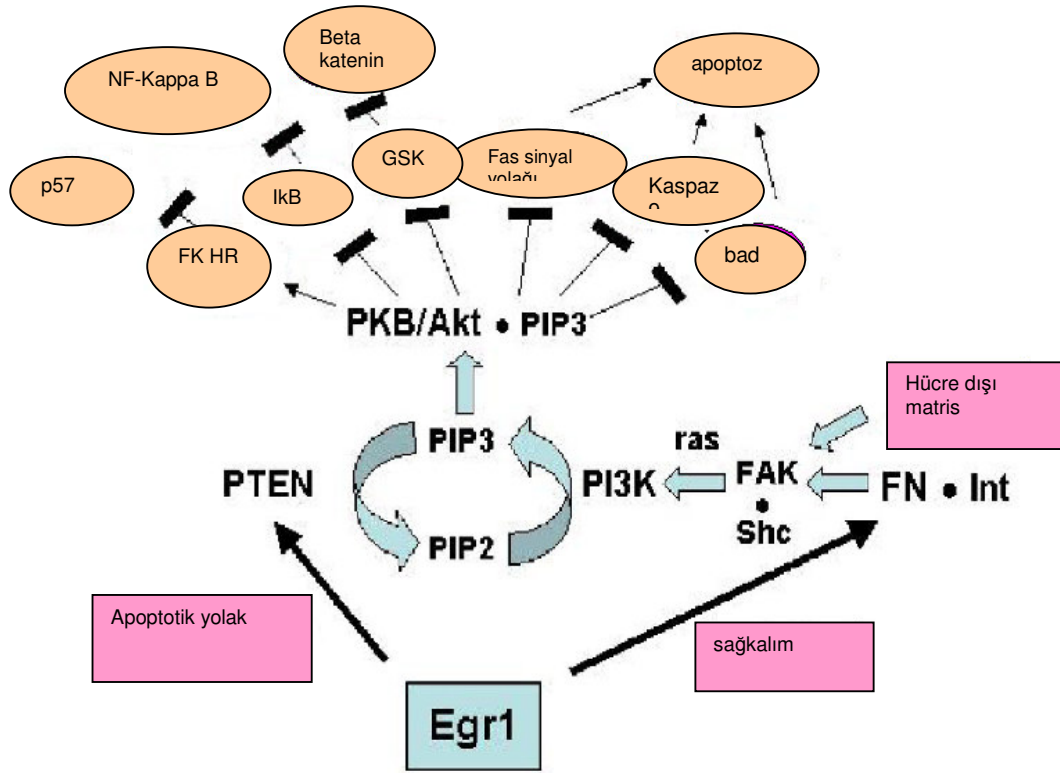
Egr1 bazı kanser tiplerinde hücre sağ kalımını uyarılmaktadır. Ancak Egr1 aynı zamanda stres ile uyarıldığında normal hücrelerde ve bazı kanser hücrelerinde ise apoptozu uyarılmaktadır⁷ (Şekil 3.)



Şekil 3. Çeşitli sinyaller tarafından Egr1 ekspresyonunun uyarılması sonrasında, farklı hücre tiplerinde farklı biyolojik yanıtlar ortaya çıkabilmektedir.⁸

Egr1'in PTEN aktivasyonunu sağlayarak Akt yolağının çalışmasını engellediği ve böylece hücrenin apoptozu gitmesini sağladığı gösterilmiştir⁷(Şekil 3.). Egr1 aynı zamanda fibronektin ekspresyonunda artışa yol açmaktadır. Fibronektin aracılığı ile hücrelerin hücre dışı matris

elemanlarına tutunduğu gerçekleşir ve böylece hücrenin “anoikis”den korunmasını sağladığı gösterilmiştir.¹⁷ (Şekil 4.)



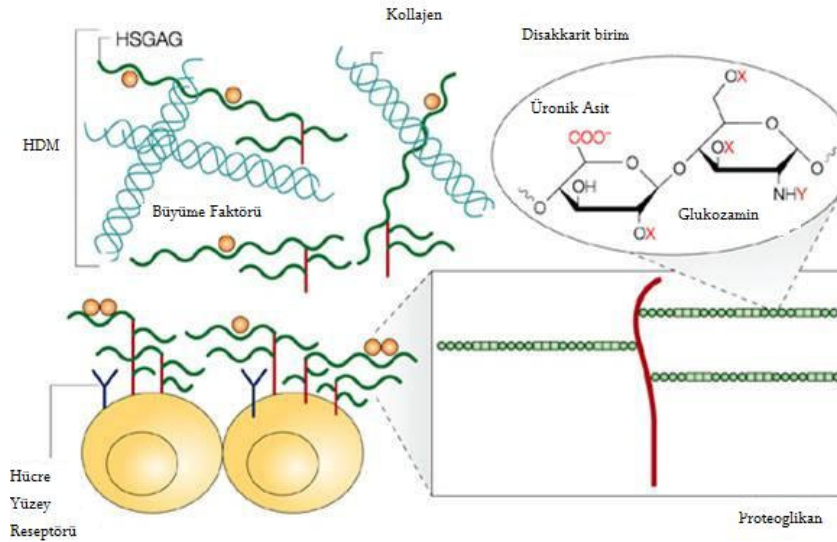
Şekil 4. Egr1 ve Egr1’in iki hedef geni olan, PTEN ve fibronektin aracılığı ile uyarılan Egr1’in hücre sağ kalımındaki rolü, koşullara bağlı olarak Egr1 apoptoz yolağını veya hücrede sağ kalım yolağını aktive edebilmektedir.⁷

Egr1, hücre dışı matrisin parçalanmasında görev almakta olan proteazların ve onların inhibitörlerinin (uPA, MMP-9, TIMP’ler) ekspresyonunda rol almaktadır. Böylece hücre dışı matrisin parçalanmasını sağlayarak tümör hücrelerinin metastazında önemli rol almaktadır.¹⁸

2.2. Heparan Sülfat Proteoglikanların Kanserdeki Rolü

2.2.1. Heparan Sülfat Proteoglikanların Genel Özellikleri ve Kanserdeki Rollerini

Heparan sülfat proteoglikanlar (HSPG) önemli hücre dışı matris elemanlarıdır. Heparan sülfat proteoglikanlar, hücre dışı matrisde ve hücrelerin yüzeyinde yer almaktadır (Şekil 5). HSPG'lar hücre migrasyonu, hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Hücre dışı matrisde yer alan HSPG'lar birçok moleküle fibronektin, kollajen, laminine bağlanabilmektedir. Hücre yüzeyinde yer alan HSPG'lar bir çok büyüme faktörüne bağlanarak aktivitelerini kontrol etmekte ve böylece metastaz, hücre göçü ve hücre proliferasyonu gibi birçok biyolojik süreçte rol almaktadırlar.¹⁹



Şekil 5: Hücre yüzeyinde ve hücre dışı matrisde yer alan heparan sülfat proteoglikanlar,

HSPG'lar embriyogenez ve doku rejenerasyonu sırasında önemli rol oynamaktadır. HSPG sentezindeki bir bozukluk hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, organogenez ve kemik oluşumunda anormalliklere yol açmaktadır. Bazı kanser tiplerinde de HSPG sentezindeki bozukluklara rastlanmaktadır. Kanserde hücre dışı matrisin yeniden yapılanması söz konusudur. Hücre dışı matrisde yer alan HSPG'ların heparanazlar tarafından parçalanması sonucunda kanser hücrelerinin invazyon yeteneği artmaktadır. Hücre dışı matrisde HSPG'lar tarafından tutulan

büyüme faktörlerinin serbest kalması sonucu hücrelerin proliferasyonu artmaktadır. Kanser hücrelerinde bir HSPG olan hücre yüzeyine bağlı glipikan ekspresyonunda pankreas kanserinde artış gözlenmektedir. Perlekan, fibroblast büyüme faktörü (FGF)'ne bağlanarak, FGF'nün oluşturduğu yanıtın artmasını sağladığı, böylece kanser hücrelerinin özellikle metastaz ve invazyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir.²⁰

2.2.2. Heparan Sülfat Proteoglikanların Büyüme Faktörleri ile İlişkisi

Hücre dışı matrisde yer alan heparan sülfat proteoglikanlar büyüme faktörlerine bağlanarak stabilizasyonlarını sağlamaktadır. HSPG'lar büyüme faktörlerinin reseptörlerine sunumunu sağlamaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan HSPG'lar doğrudan reseptöre bağlanarak reseptörün aktivasyonunu sağlamaktadır (Örneğin, CD44). Ayrıca HSPG'lar büyüme faktörlerine bağlanarak konformasyonlarının değiştirmekte ve böylece reseptörlerine tutunmalarını sağlamaktadır²¹. Heparan sülfat proteoglikanlara bağlanabilen büyüme faktörleri Tablo 2.'de gösterilmektedir.

Tablo 2. Heparan sülfat proteoglikanlara bağlanabilen büyüme faktörleri¹⁶

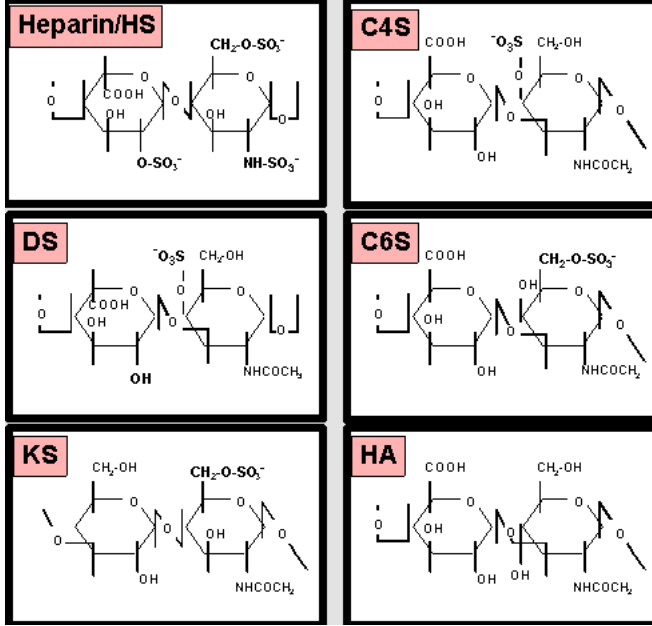
<ul style="list-style-type: none">• Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)• Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)• Plasental Büyüme Faktörü (PGF)• Heparine Bağlanabilen EGF-Benzeri Büyüme Faktörleri• Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)• Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF-beta-1)• Platelet-Türevli Kökenli Faktörü (PDGF)
--

2.2.3. Heparan Sülfat Proteoglikanların Sınıflandırılması

Heparan sülfatlar glikozaminglikan ailesinin üyelerinden olup heparin ile yapısal olarak oldukça benzerlik göstermektedirler. Heparin ve heparan sülfatlar disakkarit birimlerden oluşmaktadır. Heparan sülfat proteoglikanları oluşturan disakkaritlerin %50'si N-

asetilglukozamine bağı glukoronik asitten oluşurken, heparinin %85'i bu disakkarit birimlerinden oluşmaktadır.²²

Heparin ve hiyalüronik asit (HA) glikozaminglikan sınıfını oluşturmaktadır. Kondrotin-4-sülfat (C4S), kondrotin-6-sülfat (C6S) galaktozaminglikanlar sınıfını oluşturmaktadır. Keratan sülfat (KS), sülfatlanmış poliaktozaminler sınıfını oluşturmaktadır (Şekil 6)²³.



Şekil 6: Heparan sülfat proteoglikanlarının sınıflandırılması,

2.2.4. Heparinin Genel Özellikleri

Heparin yüksek bir şekilde sülfatlanmış bir heparan sülfat proteoglikandır. Mast hücreleri ve endotel hücreler tarafından sentezlenmektedir. Heparin negatif yükü nedeni ile hücre dışı matrisde yer alan bir çok moleküle bağlanabilmektedir. Özellikle büyüme faktörlerine bağlanabilmesi nedeni ile kanser gelişiminde son derece önemli bir rol oynamaktadır. Heparin büyüme faktörlerinin reseptörlerine sunulmasını sağlayarak, büyüme faktörlerinin oluşturduğu yanıtın artmasına yol açabilmektedir¹³.

2.2.5. Heparinin Büyüme Faktörleri ile İlişkisi

Heparin yüksek negatif yükü nedeni ile hücre dışı matrisde ve hücre yüzeyinde yer alan birçok proteine bağlanabilmektedir. Heparan sülfat proteoglikanlar ile ilgili yapılan çalışmalarda heparin kullanılmaktadır.²⁴ Tümör mikroçevresinde bulunup heparin ile ilişkiye giren proteinler Tablo-3’de gösterilmektedir¹⁵.

Tablo 3. Heparin ile ilişkili tümör mikroçevresi proteinleri

Antitrombin III
Kollajen
Elastaz
Endostatin
Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF)
Fibrin
Fibronektin
Granulosit-Makrofaj Koloni Stimule Edici Faktör (GM-CSF)
Hepatosit Büyüme Faktörü/Saçılma Faktörü (HGF/SF)
Heparin-bağlı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF)
Hiyalorinidaz
İnsülin-benzeri büyüme faktörleri (IGF)
İnterferon- γ
İnterlökin 3,8
Laminin
L-selectin
Midkine
Nöral hücre adezyon molekülleri (NCAM)
Platelet-derive büyüme faktörleri (PDGF)
Platelet faktor 4
Superoksit dismutaz
Thrombospondin
Transforme edici büyüme faktörü β 1 (TGF- β 1)
Tümör nekrozis faktör (TNF- α)
Ürokinaz
Vasküler endotelial hücre büyüme faktörü (VEGF)

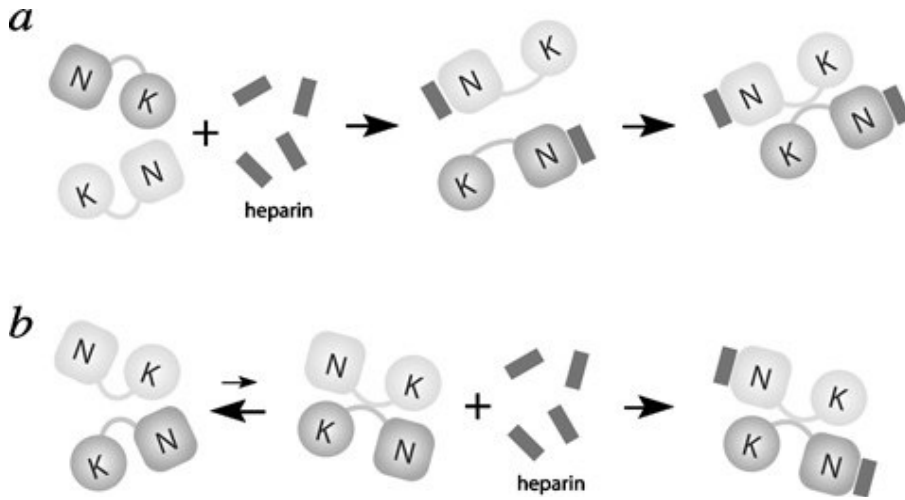
2.2.6. Heparinin HGF/SF-c-Met Sinyal Yolağı ile İlişkisi

Heparinin HGF/SF-c-Met sinyal yolağında ko-reseptör olarak rol aldığı gösterilmiştir.¹⁸ Heparinin HGF/SF-c-Met ile olan fiziksel bağlantısı tanımlanmıştır. Ancak bu ilişkinin moleküler mekanizması çok fazla tanımlanmamıştır.

Heparinin yapılan çalışmalarda c-Met ve HGF/SF birlikteliği için gerekli olmadığı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir.¹⁸ Heparin varlığında c-Met ve HGF/SF birlikteliğinin daha kararlı olduğu gösterilmiştir.²⁵

Ancak heparin varlığında HGF varyantlarından NK1 ile uyarılan biyolojik yanıtların arttığı gösterilmiştir.^{18, 19}

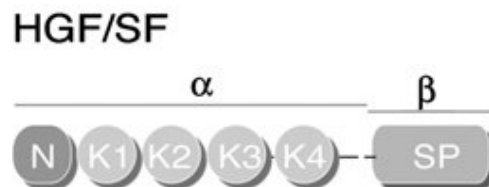
Heparinin HGF'nin N bölgesine, c-Met'in sema bölgesine bağlandığı gösterilmiştir.¹⁸ Heparinin HGF'nin N ve K bölgeleri ile olan ilişkisi Şekil 7.'de gösterilmektedir.



Şekil 7: a) Heparin NK1'nin konformasyonel değişimini sağlamaktadır. b) Heparin NK1 dimerininin oluşumunu sağlamaktadır.¹⁸

2.3. HGF-c-Met Sinyal İletim Yolu

HGF biyolojik olarak aktif olmayan 728 amino asitlik bir zincir olarak hücre yüzeyinde ve hücre dışı matrisde yer almaktadır.^{26, 27} HGF'nin aktif olmayan formu proteolitik kesim sonucu 69 kDa'lık α alt birimi (4 tane kringle ve N bölgesi içermektedir) ve 34 kDa β alt birimini (Sema bölgesi), c-Met bağlanma bölgesini içermektedir) oluşturmaktadır (Şekil 6.).^{22, 23}

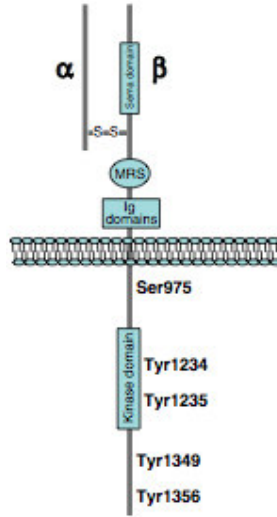


Şekil 8: HGF/SF'nin yapısı,

Hepatosit büyüme faktörü (HGF), iki farklı araştırmada hepatositler için büyüme faktörü, fibroblastlar için saçılma faktörü olmak üzere iki farklı şekilde tanımlanmıştır (HGF/SF).^{28, 29} HGF reseptörü c-Met reseptör tirozin kinaz ile etkileşime geçtiğinde reseptörün aktivasyonu gerçekleşiyor. c-Met geni kromozom 7 üzerinde 7q31 lokusunda yer almaktadır ve 982 bp uzunluğundadır. MET 6 641 bp m-RNA'ya transkribe olmaktadır.³⁰

Bu transkriptten sentezlenen MET proteini bir reseptör tirozin kinaz olup tek bir zincir halinde sentezlenmektedir. Daha sonra MET furin bölgesinden kesilerek 2 bölgeye ayrılmaktadır;

- 1) Alfa alt birimi; hücre dışında yer alıp yüksek bir şekilde glikozillenmiştir.
- 2) Beta alt birimi transmembran bölge olup alfa alt birimine disülfid bağları ile bağlıdır.^{29,31}



Şekil 9: MET proteininin yapısı²⁷

2.3.1.c-Met'in Hücre Dışı Kısmı

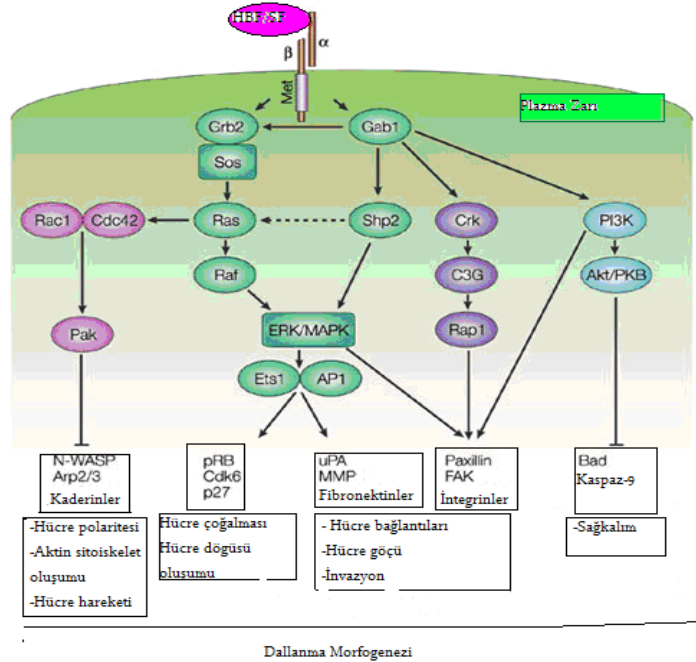
Semaforine homoloji gösteren bölge (sema bölgesi), alfa bölgesini ve beta bölgesinin N-bölgesini içermektedir. HGF'nin bağlanma bölgesi, sistince zengin ve MET ilişkili bölgesi

(MRS), glisin-prolin tekrarlarınca zengin bölge, dört immüoglobulin benzeri bölge (Ig bölgesi) ve tipik protein-protein bağlanmaları bölgeleri içermektedir.²⁴

2.3.2.c-Met'in Hücre İçi Kısmı

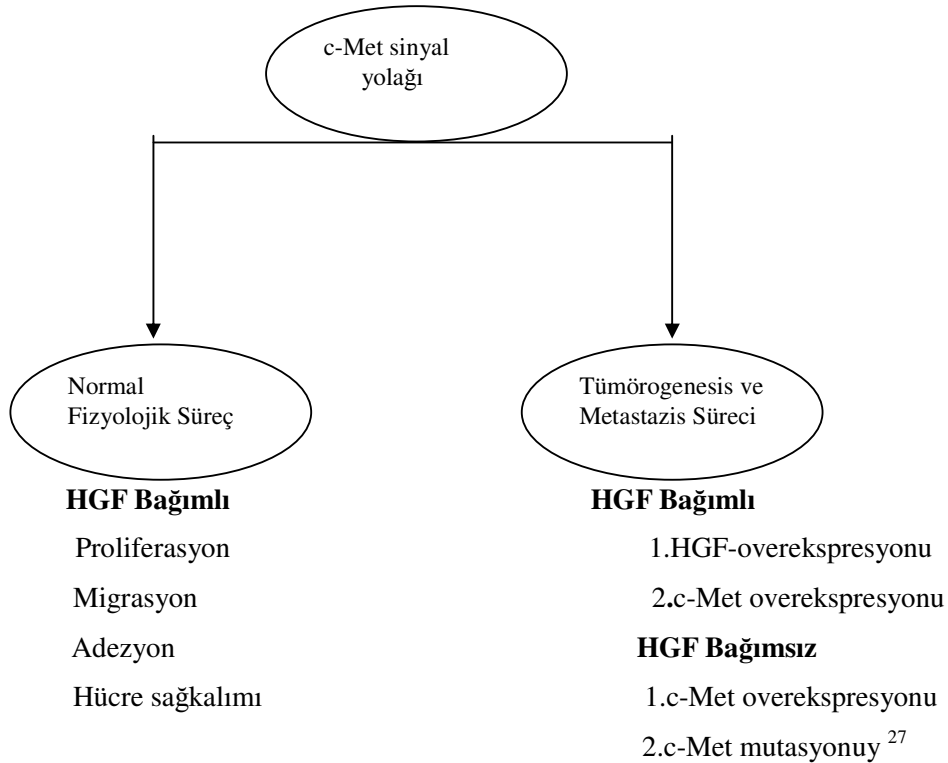
Jukstramembran kısmı; serin residüleri, (Ser985), reseptörün kinaz aktivitesini düzenleyen bölge²⁹, trozin (1003) bölgesi, MET'in poliubikütilenmesinden sorumlu bölge²⁸, trozin kinaz bölgesi; MET'in biyolojik aktivitelerini gerçekleştiren bölgelerinden oluşmaktadır. MET aktive olduktan sonra Tyr 1234, Tyr 1235 bölgeleri fosforillenmektedir. C-terminal bölgesi ise Tyr1349 ve Tyr1356'den oluşmaktadır. Bu bölgeye "multisubstrat docking" bölgesi de denilmektedir. Adaptör proteinlerin bağlandığı bölgeyi içermektedir.^{21,27, 30}

c-Met'in aktive olması ile hücre içi kısmında yer alan "multi-docking-site" bölgesine adaptör proteinler bağlanmaktadır. Ve adaptör protein aracılığıyla olarak c-Met, hücre invazyonu, hücre hareketliliği ve hücre göçünün oluşumunda görev almaktadır (Şekil 7)⁴.



Şekil 10: c-Met sinyal iletim yolağının hücrenin biyolojik davranışlarındaki rolü

HGF ile muameleden sonra epitelyum hücrelerde Met aktivasyonunun birçok biyolojik olayın gerçekleşmesinde rol aldığı *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir. Met aktivasyonundan sonra; -hücre saçılması, - hücre-hücre ayrılması, -hareketli fenotip gibi invaziv büyüme karakteri ile ilişkili olan biyolojik davranışlar gözlenmektedir. Met tarafından tetiklenen invaziv büyüme olayı embriyogenezde önemli bir rol oynamaktadır. Ancak bu sinyal yolağındaki düzensizlik birçok kanser tipinde tanımlanmıştır. Anormal c-Met aktivasyonunda birçok farklı mekanizmanın rol aldığı düşünülmektedir. Bu mekanizmalardan bazıları c-Met veya HGF mutasyonlarını içermektedir³².



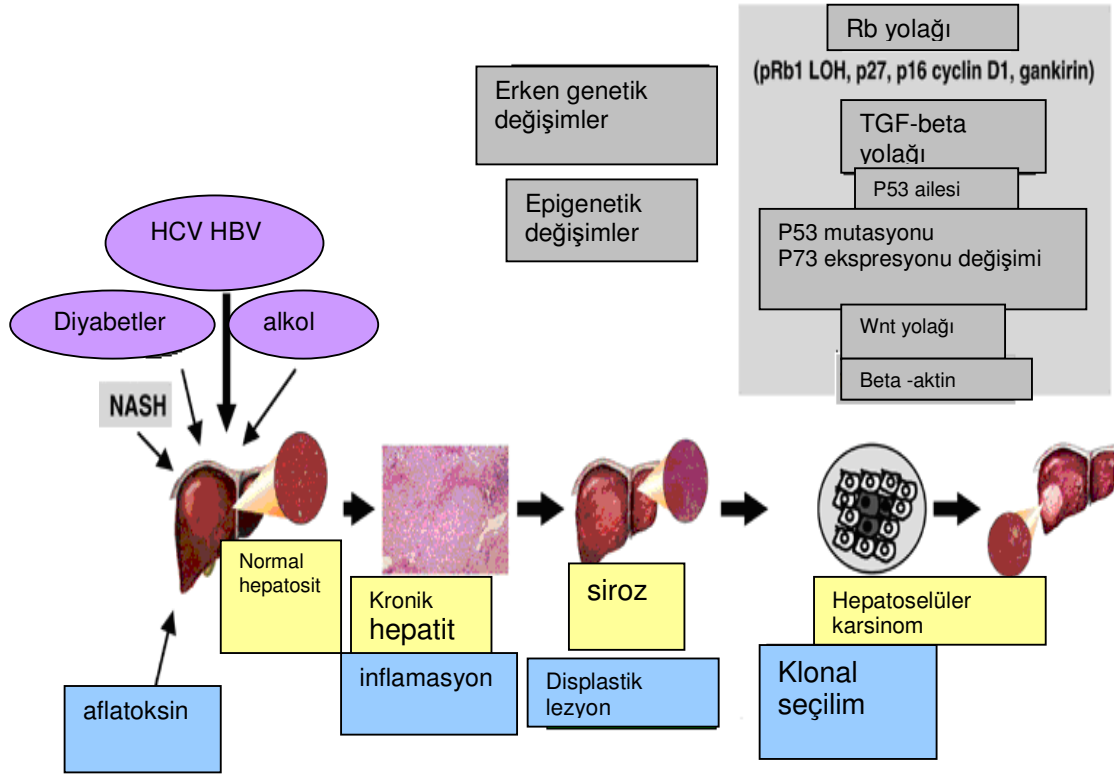
HGF normal dokuya oranla HCC dokularında oldukça yüksek gözlenmektedir. Ancak genellikle, HCC hücreleri kendi kendilerine HGF sentezlememektedirler. Bunun yerine stellat hücreler ve miyofibroblastlar HCC hücrelerinin HGF sentezlenmesini indüklerler.³³

HCC'de c-Met ekspresyon düzeyi ile tümör büyüklüğü ve invazyon ile ilişkili bulunmamıştır. Ancak hastaların sağ-kalımı ile ilişkili bulunmuştur. Serum HGF seviyesi ile hastaların sağ kalımı arasında negatif bir korelasyon söz konusu olduğu belirtilmiştir.²⁸

2.4.Hepatoselüler Karsinom

Hepatoselüler karsinom (HCC) dünyada görülme sıklığı bakımından 5. sırada, ölüme yol açma sıklığı bakımından 3. sırada yer almakta olan primer karaciğer kanseridir¹. HCC Hepatit B, Hepatit C, alkol ve aflotoksinler ile ilişkilendirilmektedir.³⁴ Hepatit B, Hepatit C ve aflotoksinler kronik bir karaciğer zedelenmesine yol açmaktadır². Kronik karaciğer zedelenmeleri siroz gelişimine zemin hazırlamaktadır. Kronik karaciğer zedelenmelerinde portal fibroblastlar, hepatositler sürekli çoğalarak fibrogenik bir ortamın oluşumuna ve ortama hipoksik koşulların hakim olmasına yol açmaktadır.³⁵ Ortama bol miktarda büyüme faktörü, sitokinler ve proteinler sentezlenir.³⁴ Ortamda yer alan önemli büyüme faktörlerinden önemli büyüme faktörlerinden birisi de Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)'dir. HGF emgriyogenez, doku yenilenmesinde süreçlerinde rol almaktadır. HGF/SF-c-Met sinyal yolağındaki bozukluklar tümör hücrelerinin invazyonunda, hareketliliğinde, çoğalmasında ve hücre sağ kalımında önemli rol oynamaktadır.^{33,}

34



şekil 11: HCC'nin oluşumunda ve gelişiminde rol oynayan etiyolojik faktörler,³⁶

2.4.1. Hepatoselüler Karsinom Aşamaları ve Genetik Mekanizması

HCC etiyolojisi en iyi tanımlanabilen kanser tiplerinden biridir. Genellikle kronik hepatit ve kronik siroz zemininden köken almaktadır. Kronik hepatit ve kronik sirozda sürekli bir inflamasyon oluşup hepatositlerin rejenerasyonu söz konusudur (şekil 11).^{37, 38} Hepatosit çoğalmasının gerçekleşmesi ve monoklonal hepatosit populasyonlarının oluşumu sürecini tetikleyen genomik değişimler rastgele gerçekleşebilmektedir veya bazı etiyolojik faktörlerle bazı moleküler mekanizmalar ilişkili olabilmektedir. Örneğin: Hepatit B, hepatit C ile indüklenmiş hepatokarsinogenezde, Rb1(retinoblastoma 1), p53 ve Wnt ailesi mutasyonlarına rastlanmıştır.^{39, 40,41} Hepatoselüler karsinomun oluşum mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Birçok solid tümörde olduğu HCC gelişiminde de mutasyonların birikimi ve kanser ile ilişkili gen ekspresyonlarının değişimi söz konusudur.⁴² Hepatokarsinogenez sürecinde aşağıdaki moleküllerin ve yolaklardaki değişikliklerin rol oynadığı düşünölmektedir.³⁹

-DNA hasarında görev yapan p53 yolağı,

- Hücre döngüsünde görev alan Rb yolağı,
- Büyümede görev alan transforme edici büyüme faktörü beta (TGF β) yolağı,
- Hücre-hücre adezyonunda ve sinyal iletiminde rol alan Wnt yolağı HCC gelişiminde ve oluşumunda yol önemli rol oynamaktadır.⁴¹

2.4.2. Egr1'in HCC Gelişiminde ve Oluşumundaki Rolü

Yapılan çalışmalarda normal karaciğer dokusunda ve HCC dokularında Egr1 ekspresyonuna rastlanmadığı ancak hepatik parakanseroz dokuda Egr1 ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir.⁴³

Egr1 ekspresyonu olmayan iki tane hücre dizisine HHCC ve SMMC7721'ye Egr1 geni aktarıldığında, HHCC-Egr1 hücre dizisinin tümör oluşturma hızında atasal olan hücre dizisine göre azalma gözlemlendiği gösterilmiştir. Ancak SMMC7721-Egr1 hücre dizisinde atasal hücre dizisine göre tümör oluşturma hızında değişiklik olmadığı gösterilmiştir.⁴¹

Bir diğer çalışma da ise Egr1'in etanol ile uyarılan karaciğer yağlanmasında rol oynadığı gösterilmiştir.⁴⁴ Farelerde yapılan çalışmada etanol varlığında Egr1'in TNF- α ekspresyonunu arttırdığı ve böylece karaciğer yağlanmasında Egr1'in rol aldığı gösterilmiştir.⁴²

2.4.3. Heparinin Kansere İlişkisi

Heparin birçok büyüme faktörüne bağlanıp onların yanıtlarını değiştirmesinin yanında, kanser hastalarında antikoagülan özelliği nedeni ile de kullanılmaktadır. Ancak heparinin antikoagülan özelliğinin yanında, anti-metastatik, anti-invasiv ve anti-proliferatif özellikleri de bilinmektedir. 1960 yılından beri heparinin kanser üzerindeki inhibe edici özelliği çalışılmaktadır. Heparinin bazı kanserlerdeki inhibisyon özelliğinin moleküler mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır.⁵

Yapılan çalışmada Egr1'in mezengial hücrelerin serum ile uyarılan proliferasyonlarında rol aldığı belirtilmiştir.⁴⁵ Egr1 serum ile uyarıldığında mezengial hücrelerin proliferasyonları ile korelasyon gösterecek şekilde ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiştir. Heparinin mezengial hücrelerin proliferasyonunu baskıladığı ve bununla korelasyon gösterecek şekilde Egr1 ekspresyonunu da azalttığı gösterilmiştir. Egr1 "antisens" oligolar ile sessizleştirildiğinde ise

mezengial hücrelerin proliferasyonunda azalma olduğu gösterilmiştir.⁴² Bir diğer çalışmada ise heparin varlığında glial hücre dizisi kökenli nötrofik büyüme faktörü (GDNF)'nün oluşturduğu yanıtı arttırdığı gösterilmiştir.⁴⁶ Heparin varlığında GDNF ile uyarılan Egr1'in ekspresyonunda artış olduğu bildirilmiştir.⁴³

HGF/SF-c-Met ve heparin ilişkisinin HCC'de nasıl bir rol oynadığı tanımlanmamıştır. Ancak HepG2 hücrelerinde heparin varlığında yapılan çalışmada hücreler de apoptozun uyarıldığı gösterilmiştir⁴⁷

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.HÜCRE KÜLTÜRÜ

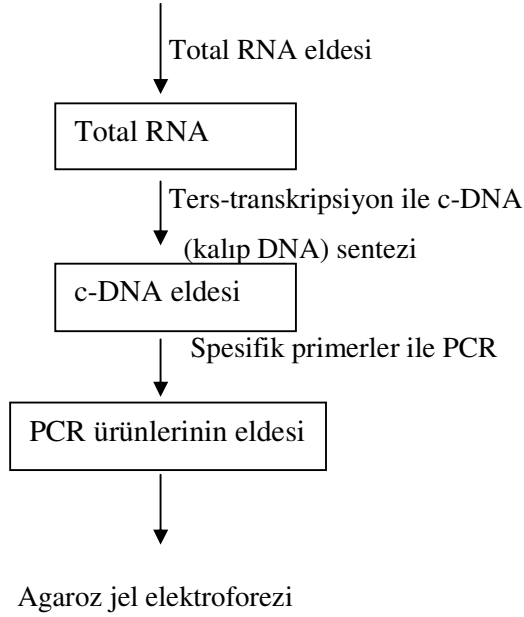
Bu çalışmada kullanılan hepatoselüler karsinom hücre dizileri (SNU-475, Huh7, HepG2, Hep3B, Mahlavu, SK-Hep1, SNU-398, SNU-449, PLC/PRF-5) Bilkent Üniversitesinden Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından sağlandı. SNU-398, SNU-449 ve SNU-475 hücre dizileri, %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom, S0125), 2 mM L-glutamin (Biological Industries, 03-020-1C), 100 u/ml penisilin (Biological Industries, 03-031-1C), 0,1 mg/ml streptomisin (Biological Industries, 03-031-1C) ve 1X esansiyel olmayan amino asit içeren RPMI-1640 (Biological Industries, 01-104-1A) içerisinde, diğer hücre hatları ise aynı miktarlarda FBS, L-Glutamin, penisilin, streptomisin ve esnasiyel olmayan amino asitleri içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biological Industries, 01-050-1A) içerisinde üretildi. Hücrelerle ilgili tüm işlemler laminar kabinet (Aura Vertical S.D.4, C5681) içerisinde gerçekleştirildi. Hücrelerin inkübasyonu ise 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde (Heal Force, HF90) yapıldı. Hücrelerin pasajlamalarında hücreleri kaldırmak için Tripsin/EDTA (%0.05/%0.02 Biological Industries) solüsyonu kullanıldı.

3.2.Hepatoselüler Karsinom Hücre Hatlarında Egr1 ekspresyonun m-RNA düzeyinde Belirlenmesi

Hepatoselüler Karsinom hücre dizilerinde Egr1 geninin bazal düzeydeki m-RNA ekspresyonunu belirlemek amacı ile tüm hücre dizilerinden aşağıda tanımlandığı şekilde RNA ve cDNA elde edildi. RT-PCR sonrası ürünler jel elektroforezi ile görüntülendi (Şekil 12).

**Hepatoselüler Hücre
Dizilerinde RNA eldesi**

- Huh7, Hep3B, HepG2,
Snu475, Snu398, Snu449,
Mahlavu, SKHep1, PLC-



Jel görüntülenmesi ve görüntülerin değerlendirilmesi,

Şekil 12. m-RNA eldesinin şematik gösterimi

3.2.1.Total RNA Eldesi

Huh7, Hep3B, HepG2, Snu475, Snu398, Snu449, Mahlavu, SKHep1, PLC-PRF, hücreleri %10 FBS, 2mM L-glutamin, 2mM penisilin/streptomisin, 1X essansiyel olmayan amino asit içeren DMEM veya RPMI içeren ortamlarda Greiner cell-star 633 171 hücre kültürü kaplarında hücreler üretildi. Hücreler daha sonra tripsinle kaldırılarak, neubauer lamı ile sayımları yapıldı. Ertesi gün %70 yoğun olacak şekilde ekildi. Ertesi gün hücrelerin ortamı tamamen uzaklaştırıldı. İki kere PBS (1X) ile yıkamaları yapıldı ve %2 FBS içeren ortamlarda inkübe edildi. Hücreler serum açlığına bırakıldı. 24 saat sonra Trizol yöntemi ile total RNA eldesi yapıldı.

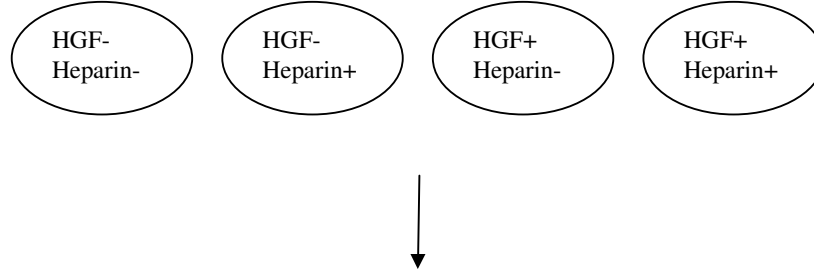
3.2.1.1. *Trizol Yöntemi ile Total RNA İzolasyonu*

1. Hücreler buz üzerine alındı ve ortamları çekilerek soğuk 1X PBS ile 2-3 kez yıkama yapıldı.
2. Hücrelerin üzerine uygun miktarda (2 ml) Trizol kimyasalı (RNAtidy G, Applichem, A2867-0200) eklendi ve bir hücre kazıyıcı ile hücreler kazındı.
3. Soğuk ependorflar içine alınan hücre solüsyonu üzerine %10 oranında kloroform (Sigma, C-2432) eklendi, organik ve sulu fazın ayrışması için 12,000 g' de santrifüj edildi (Eppendorf Centrifuge, 5415R).
4. RNA'ları içeren sulu faz yeni bir tüpe alındıktan sonra RNA'ların presipitasyonu için eşit hacimde izopropanol (Applichem, A3928) eklendi ve -20 °C'de bir gece inkübe edildi.
5. Çöken RNA'lar 7,000 g de 10 dk. santrifüjlenerek çöktürüldü, %75'lik etanol (Applichem, A3678) ile iki kez yıkama yapıldı ve son yıkamadan sonra çöktürülen RNA pelleti etanolün uzaklaşması için kurumaya bırakıldı.
6. Kuruyan RNA pelleti 50 µl RNaz'dan arındırılmış dH₂O içerisinde çözüldü. Bu RNA'ların bir kısmı spektrofotometrik ölçüm için, geri kalanı ise cDNA sentezi için kullanıldı. İzole edilen her bir RNA örneğinden 10 µl alındı ve 990 µl 10 mM Tris (pH 7.0) çözeltisi içinde 1:100 oranında dilüsyonu yapıldı. Bu dilüsyonların 260 nm'de ve 280 nm'de spektrofotometrik absorpsiyonları ölçüldü (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000).

RNA miktarlarının belirlenmesi için 260 nm'deki absorpsiyon değeri kullanıldı. RNA'ların saflık miktarlarının ölçümü için 260nm/280nm'deki değerleri standart formül ile hesaplandı⁴⁸.

3.2.2. *EGR'in HGF ve Heparin Varlığında Zamana ve Doza Bağımlı Değişiminin m-RNA Düzeyinde Gösterilmesi*

SKHep1 hücre hattında HGF ve Heparinin Egr1'in m-RNA düzeyindeki ekspresyon değişimini incelemek için Promega Total RNA izolasyon kiti (Promega SV Total RNA Isolation System Z3105) kullanılmıştır.



1. HGF ve heparin varlığında Egr1'in zamana bağlı değişimini gözlemlemek için 60 mm'lik hücre kültürü kaplarına ekildi (Greiner, cell-star). Hücreler %70 yoğunluğa ulaşınca ortamları uzaklaştırıldı. İki kere 1X PBS ile hücreler yıkandı. %0 FBS içeren ortamda hücreler serum açlığına bırakıldı. 16 saatlik serum açlığının ardından hücreler HGF ve heparin (100ug/ml, calbiochem katalog no: 375093) ile muamele edildi. 15', 30', 60', 120, 240', ve 360' sürelerinin sonunda Promega SV Total RNA Isolation System Z3100 ile RNA izole edildi.

2. Egr1'in heparinin dozuna bağımlı değişimini gözlemlemek amacı ile SKHep1 hücreleri HGF (40ng/ml), heparin (0,3µg, 3 µg, 30 µg, 300 µg) ile hücreler 2 saat muamele edildikten sonra Promega SV Total RNA Isolation System Z3105 ile RNA izole edildi.

HGF'nin hazırlanması: stok HGF konsantrasyonu 23ng/ml 1/1000 Tris-BSA içinde sulandırılarak kullanıldı.

Heparin toz halinde 1mg/ml olacak şekilde 1X PBS'in içinde çözülerek kullanıldı.

3.2.2.1.Promega SV Total RNA Isolation System Z3100

- 1.** Hücreler, hücre kültürü kaplarında (60mm'lik Greiner Cat. 628160) buzun üzerine alındı.
- 2.** Ortamları tamamen uzaklaştırıldı.
- 3.** Üç kez soğuk 1X PBS ile hücrelerin yıkaması yapıldı.
- 4.** PBS tamamen uzaklaştırıldı. En son hücre kültürü petrilere 1ml PBS eklendi, hücreler bu PBS'in içinde kazınarak 1.5ml'lik ependorf tüplerine alındı. 3000g'de 5' santrifüj (Eppendorf Centrifuge, 5415R) yapıldı.
- 5.** Supernatant atıldı.
- 6.** Hücre pelletini üzerine beta merkaptan etanol içeren 175µl RNA lizis bufferi eklendi. Vortex yapıldı (Vortex Electro-mag TB008).
- 7.** Lizatın üzerine 350µl RNA dilüsyon tamponu eklendi, tüp 2-3 kez karıştırıldı. 70°C'de 3' inkübasyona bırakıldı.
- 8.** 12.000g'de 10', 20-25°C' de santrifüj yapıldı.

9. Supernatant başka bir tüpe alındı ve üzerine 200µl %95'lik Etanol eklendi. Pipetaj yapıldıktan sonra lizat "Spin Column Assembly"e aktarıldı. 12000g'de 1' santrifüj yapıldı.
10. Kolonun üzerine 600µl "RNA wash" solusyonu (Etanol içeren) eklendi, 1' 12000g'de santrifüj yapıldı.
11. 50µl DNase, (40ul Yellow core Buffer, 5ul 0,09 M MnCl₂, 5ul DNase I karışımı) eklendi. 15' oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
12. Daha sonra membranın üzerine 200µl DNase stop solusyonu eklendi, 12000g'de 1' santrifüj yapıldı.
13. 600µl "RNA Wash Buffer" eklendi 12000g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
14. 250µl "RNA Wash Buffer" eklendi, en yüksek hızda 2 dakika santrifüj yapıldı.
15. Kolon "RNase-free" bir ependorfa alındı ve üzerine 100µl "nuclease-free" su eklendi 12000g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
16. Bu RNA'ların bir kısmı spektrofotometrik ölçüm için, geri kalanı ise cDNA sentezi için kullanıldı. İzole edilen her bir RNA örneğinden 10 µl alındı ve 990 µl 10 mM Tris (pH 7.0) çözeltisi içinde 1:100 oranında dilüsyonu yapıldı. Bu dilüsyonların 260 nm'de ve 280 nm'de spektrofotometrik absorpsiyonları ölçüldü (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000). RNA miktarlarının belirlenmesi için 260 nm'deki absorpsiyon değeri kullanıldı. RNA'ların saflık miktarlarının ölçümü için 260nm/280nm'de değerleri hesaplandı.

3.2.3. Total RNA'lardan cDNA Sentezlenmesi

Hücre dizilerinden total RNA elde edilip yoğunlukları ve kalitesi belirlendikten sonra bu RNA'lardan 2 µg kullanılarak cDNA sentezlendi. cDNA sentezinde MBI Fermentas marka cDNA sentez kiti (K1622) ve bileşenleri kullanıldı. 2 µg total RNA ve 0.2 µg/ µl "random primer", 0.2 µg/ µl " oligo dT", RNaz'dan arındırılmış dH₂O içerisinde hazırlandıktan sonra 70 °C'de 5 dk. inkübe edildi. Daha sonra karışıma 5X reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü (20 u) ve dNTP (0.5 mM) ve "M-MuLV Reverse Transcriptase" (200 u) eklendi. 25°C'de 10' ve 42 °C'de 60 dk. inkübe edilerek ilk-zincir cDNA sentezi bir termal döngüleyici (Techne TC-312) içerisinde yapıldı. Tüpler 70 °C'de 10' tutularak reaksiyon sonlandırıldı.

3.2.4. cDNA Kalıplarından Spesifik Primerler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

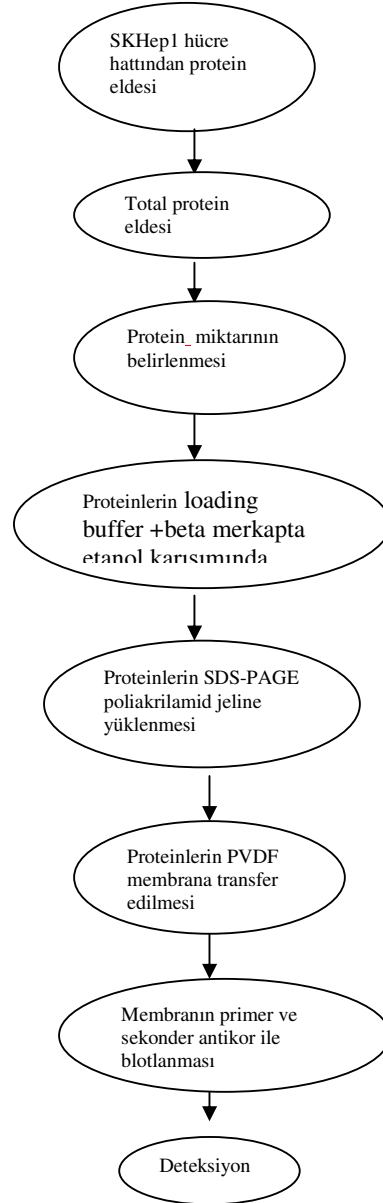
İlk-zincir cDNA sentezlendikten sonra bu cDNA'lar, her bir cDNA reaksiyonundan 2 µl kalıp olarak kullanılarak spesifik primerler aracılığıyla PCR reaksiyonu kuruldu. Egr1 (GenBank, Accession Number: ENSG00000120738 üzerindeki korunmuş bölgelerden IDT "Integrated Device Technology" programı (www.idt.com) ile primer tasarlandı ve bu primerler PCR reaksiyonlarında Egr1 genin ekspresyonunun m-RNA düzeyinde belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Ayrıca kontrol olarak da GAPDH genine spesifik primerler kullanıldı. Kullanılan primer dizileri ve PCR koşulları aşağıda Tablo 4.'de gösterilmektedir.

Tablo 4. PCR’da kullanılan primerler

Genin Adı	Genin Büyüklüğü	Genin Sekansı	Optimizasyon Koşulları	PCR koşulları
Egr1	205 bp	F5’CTCTCTGAACAACGAGAAGGTGCT3’ R5’ AGATGGTGCTGAGGACGAGGA3’	Tm :53°C Primer konsantrasyonu: 0.6µM MgCl₂ :1.5mM 30 cycles	1X Distile su: - dNTP: 0,4mM Primer R: 0,6uM Pimer F: 0,6uM MgCl₂ :1.5mM Taq Polimeraz Buffer: 1X Taq Polimeraz: 1,25u İlk Denatürasyon: 95°C 5’ Denatürasyon: 95°C 30sn Bağlanma: 55°C 40sn Uzama: 72°C 45sn Döngü Sayısı: 30 siklus Son Uzama Sıcaklığı ve süresi: 72°C 10’
GAPDH	142 bp	F5’GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT 3’ R5’ CAGCCTTCTCATGGTGGTGGTGAAGA 3’	Tm :53°C Primer konsantrasyonu: 0.25µM MgCl₂ :1.5mM 28 cycles	1X Distile su: - dNTP: 0,4mM Primer R: 0,25uM Pimer F: 0,25uM MgCl₂ :1.5mM Taq Polimeraz Buffer: 1X Taq Polimeraz: 1,25u İlk Denatürasyon: 95°C 5’ Denatürasyon: 95°C 30sn Bağlanma: 56°C 40sn Uzama: 72°C 45sn Döngü Sayısı: 28 siklus Son Uzama Sıcaklığı ve süresi: 72°C 10’

3.3. Heparinin HGF ile Aktive Olan Proteinlerin Ekspresyonuna Etkisinin Belirlenmesi Amacı ile SKHep1 Hücre Hattından Protein İzole Edilmesi

SKHep1 hücre hattında HGF ile aktive olan p-Met, p-MAPK, aktivasyonlarına heparinin etkisinin belirlenmesi amacı ile Şekil 13'deki gibi protein eldesi yapılarak western-blotting yapıldı.



Şekil 13: Protein eldesinin şematik gösterilmesi,

3.3.1 Hücrelerden Total Protein İzole Edilmesi

100 mm'lik hücre kültürü kaplarında % 70 yoğunluğa ulaşana kadar büyütülen hücreler %0 FBS içeren ortamda 16 saatlik serum açlığına bırakıldı. Daha sonra hücreler 15' HGF(40ng/ml), Heparin (1µg, 10µg, 100µg) ile muamele edildikten sonra hücreler buz üzerine alınarak 2-3 kez soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler 1 ml PBS içerisine hücre kazıyıcı ile kazındı ve 1.5 ml'lik tüpler içerisine alındı. Hücreleri çöktürmek için 1,500 g'de 5 dk santrifügasyon yapıldı (Eppendorf Centrifuge, 5415R). Süpernatandaki PBS atıldıktan sonra hücre pelleti hacminin üç katı kadar lizis tamponu (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, %1 NP-40, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1µg/ml pepstatin, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na3VO4) eklenerek tüpler buz üstünde lizis için 3-4 dakikada bir vortekslenerek 20 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda tüpler 15,000 g'de 30 dk santrifüj edildi. Proteinleri içeren süpernatan yeni bir tüpe alındı ve protein miktarının belirlenmesi aşamasına geçildi.

Aynı metod ile bütün HCC hücre hatlarında Egr1'in protein düzeyinde ekspresyonuna bakılmıştır.

3.3.2 Protein Miktarlarının BCA Yöntemiyle Belirlenmesi

Protein miktarlarının belirlenmesi için Pierce marka "BCA protein assay kit" (Pierce, 23225) kullanıldı. Standart grafiğin çizilebilmesi için 0, 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 µg BSA (Pierce, 23209) 1 ml reagen (kitin kullanım yönergesi doğrultusunda kit bileşenleri ile hazırlandı) ile spektrofotometre küvetleri (Brand, 759220) içerisinde birleştirilerek indirgenme tepkimesinin oluşması için 42°C'de 5 dk inkübe edildi. Aynı zamanda hücre dizilerinden elde edilen proteinlerden de 5 µl kullanılarak reagenle karıştırılıp inkübasyona bırakıldı. Daha sonra protein konsantrasyonu ile birlikte artan BCA/bakır kompleksi 562 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. BSA yoğunluklarına bağlı olarak çıkan ölçümler standart grafiğin çizilmesinde kullanıldı ve örneklerin bu standart grafiğe göre ne kadar protein içerdiği "Microsoft Office Excel" programında hesaplandı.

3.3.3. Proteinlerin “SDS-Page” Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

c-Met yaklaşık 140 kDa olan bir protein olup ayrılması için %8’lik poliakrilamid jelde yürütüldü. p-MAPK 42-44 kDa yaklaşık 60 kDa olup %10’luk poliakrilamid resolving jelde yürütüldü. “Stacking” olarak da %5’lik jel kullanıldı. Jellerin kalınlığı 1.5 mm’dir ve bileşimleri aşağıda Tablo 5.’de gösterilmiştir.

Tablo 5: Poliakrilamid jel içeriği

	%8’lik Jel	%10’luk Jel	%5’lik Jel
Distile su	4.6ml	4.0ml	3.4ml
%30’luk akrilamid karışımı	2.7ml	3.3ml	0.83ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	2.5ml	2.5ml	0.63ml*
%10 SDS	0.1ml	0.1ml	0.05ml
%10 APS	0.1ml	0.1ml	0.05ml
TEMED	0.006ml	0.004ml	0.005ml

*Stacking jel için 1M Tris-HCl pH 6.8

Örnekler yüklemeye hazırlanırken her bir örnekten 60 µg total protein alındı ve bu proteinlerin denaturasyonu için %5 oranında β-merkaptetanol (Sigma, M-7154)_içeren 2X yükleme tamponu (Applichem, A3484) ile eşit hacimde karıştırılarak 95°C’lik su banyosunda 5 dk. inkübe edildi. Kaynatılan protein örnekleri yükleme işlemine geçilene kadar oda sıcaklığında bekletildi. Elektroforez tankının (BioRad,) içerisine Tris-Glisin elektroforez tamponu (“running buffer”, 25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0.1 SDS) eklendi ve jeller uygun olarak yerleştirildikten sonra örnekler ince uçlu pipet tipleri ile yüklendi. Aynı zamanda protein göçünü izleyebilecek nitelikteki “marker”lardan da (MBI Fermentas, SM0441 ve SM0671) 7’şer µl yüklendi ve 70 V’luk gerilim uygulanarak 30 dk. daha sonra 110 V’luk gerilim uygulanarak “marker” bantları açılana kadar proteinler yürütüldü.

3.3.4. Poliakrilamid Jelde Yürütülen Proteinlerin PVDF Membranlara Transferi ve Membranın Bloklanması

Elektroforez işlemi bittikten sonra jeller cam aparatlardan çıkartılarak Tris-Glisin transfer tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0.02 SDS, %20 metanol) içerisine alındı. PVDF membran (Millipore, IPVH15150) 15-20 sn metanol içerisinde bekletilerek porlarının açılması sağlandı ve daha sonra da transfer tamponu içerisine alındı. Bu tampon içerisinde bir kaset içerisine sırasıyla sünger, “Whatmann” kağıdı, jel, PVDF membran, “Whatmann” kağıdı ve sünger olacak şekilde yerleştirildi. Kaset kapatıldıktan sonra transfer tankının içerisine yerleştirildi. 300 mA’lık akımda 1.5 saat transferde tutuldu ve daha sonra proteinlerin jelden üzerine geçtiği membran çıkartıldı. Çıkartılan membran blokama solüsyonu (kullanılan bütün antikorlar için %5 yağsız süt tozunda bloklandı) içerisine alındı.

Tablo 6. Western-blottingde kullanılan antikorlar

Primer Antikor	Marka Katalog No.	Dilüsyonu	Uygulama Süresi ve Sıcaklığı	Yıkama	Sekonder Antikor	Marka Katalog No.	Yıkamalar	Deteksiyon
p-MET (Tyr 1234/1235)	Cell signaling (cs) cs,3129	1/500 %3 yağsız süt tozu (Applicehm A0830)	+4°C gece boyu	Oda sıcaklığında 30'	1/1000 Antirabbit TBS-T %0.1 Oda sıcaklığında 1 saat	Pierce 1858415	1 saat Oda sıcaklığında TBS-T (%0.5)	Thermo 34076 Dura
c-Met	Upstate 05-236	1/1000 %3 yağsız süt tozu (Applicehm A0830) TBS-T %0.25	+4°C gece boyu	Oda sıcaklığında 30'	1/1000 Antimouse TBS-T %0.1 Oda sıcaklığında 1 saat	Pierce 1858415	1 saat Oda sıcaklığında TBS-T (%0.5)	Thermo 34076 Dura
p-MAPK (Thr 202/Tyr204)	Cs, 9101	1/1000 %3 yağsız süt tozu (Applicehm A0830) TBS-T %0.1	+4°C gece boyu	Oda sıcaklığında 30'	1/1000 Antirabbit TBS-T %0.1 Oda sıcaklığında 1 saat	Pierce 1858415	1 saat Oda sıcaklığında TBS-T (%0.5)	Thermo 34076 Dura
MAPK	Sc, 96	1/1000 %3 yağsız süt tozu (Applicehm A0830) TBS-T %0.1	+4°C gece boyu	Oda sıcaklığında 30'	1/1000 Antirabbit TBS-T %0.1 Oda sıcaklığında 1 saat	Pierce 1858415	1 saat Oda sıcaklığında TBS-T (%0.5)	Thermo Pico
Egr1	Cs 15F7	1/750 %3 yağsız süt tozu (Applicehm A0830) TBS-T %0.1	+4°C gece boyu	Oda sıcaklığında 30'	1/500 Antimouse TBS-T %0.1 Oda sıcaklığında 1 saat	Pierce 1858415	1 saat Oda sıcaklığında TBS-T (%0.5)	Thermo 34076 Dura

3.3.5.MMP'lerin Aktivitesinin Değerlendirilmesi “Jelatin Zimografi”

HGF ile uyarılan MMP'lerin ekspresyonuna ve aktivitesine heparinin etkisini gözlemlemek amacı ile jelatin zimografi yapıldı. Jelatin zimografi yönteminde, jelatinaz enzim grubunun substratı olan jelatin, yürütücü jeli oluşturan akrilamid ile kopolimerize edildi. MMP-2 (72 kDa) ve MMP-9 (98 kDa) indirgen-olmayan koşullar altında elektrik alanda moleküler ağırlıklarına uygun bölgeye göç etmeleri için yürütüldü. ‘Jelatin (Gelatin A sigma G9136) zimografi’ yöntemi kullanılarak MMP-2 ve MMP-9’un hem zimojen, hem de aktif formları aynı jel üzerinde saptandı.

3.3.5.1 SKHep1 Hücre Hattında Jelatin Zimografisi

SKHep1 hücreleri 10^4 /ml hücre 35mm’lik hücre kültürü kaplarına ekildiler. %70’lik hücre yoğunluğuna ulaştıklarında %10 FBS içeren ortamı tamamen uzaklaştırıldı. %0 FBS içeren DMEM ortamında hücreler 16 saat serum açlığına bırakıldı. Ardından hücreler heparin (100µg/ml) ve HGF (40ng/ml) ile muamele edildi. 24 saatin sonunda hücrelerin ortamları alındı. Ortamların içinde yer alan protein miktarı 562 nm’de ölçümleri yapıldı. Eşit miktarda protein içeren ortamlar 1:1 oranında 2X (indirgeyici olmayan) yükleme tamponu ile karıştırılarak %1 jelatin içeren SDS-page jeline örnekler yüklendi. Jelin hazırlanışı içeriği ve tamponların içeriği Tablo 7.’de belirtildi.

Tablo 7. Jelatin zimografi jelinin içeriği

Reaktif	%7.5 Ayrıcı Jel	%4 Paketleyici Jel
Bi distile su	7.7 ml	6.1ml
10mg/ml Jelatin Substratı	2.0ml	-
%30 Akrilamid	5.0ml	1.3ml
1.5M Tris-HCl pH8.8	5.0ml	-
0.5M Tris-HCl pH6.8	-	2.5ml
%10’luk SDS	200ul	100ul
%10’lul APS	200ul	100ul
TEMED	20ul	10ul

Uygulama Basamakları

1. Ayırıcı jel % 7.5 olacak şekilde hazırlandı (Tablo 7).
2. Paketleyici jel %4 olacak şekilde hazırlandı. (Tablo 7) ve ayırıcı jel üzerine döküldü. Örneklerin uygulanacağı kuyucukların oluşturulması amacıyla jel üzerine tarak yerleştirilerek polimerize olması beklendi. Polimerizasyon sonrasında tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı.
3. Hazırlanan jeller, elektroforez tankına yerleştirilir. Eşit hacimde süpernatant, indirgeyici-olmayan örnek tamponu ile karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara hedeflenen protein miktarına göre yüklendi.
4. Elektroforez “yürütme tamponu” sistemine eklendi.
5. Karşılıklı iki jel için 125 sabit voltaj, 40-60 mA/jel 5 saat uygulanarak elektroforez +4 oC soğuk oda koşullarında yapıldı.
6. Elektroforezden sonra jellerden SDS’i uzaklaştırmak için, jeller iki kez 15’şer dakika %2.5’lik Triton X-100 “renatürasyon tamponu” ile yıkandı.
7. Daha sonra jeller, enzimlerin (MMP-2 ve MMP-9) jel içindeki substratlarını (jelatin) tüketmelerini sağlamak için 18 saat 37 oC’de “aktivasyon tamponunda” enkübe edildi.
8. Jeller , %0.5’lik Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyanır ve metanol –asetik asid-distile su (4:2:5) içeren çözelti ile zemindeki boyanın fazlası giderildi.
9. Jel üzerinde MMP-9 enzimine ait pro ve aktif formlar, mavi zemin üzerinde litik alanlar şeklinde görüldü.
10. Gerekli solüsyonların hazırlanması Tablo 8.da gösterilmektedir

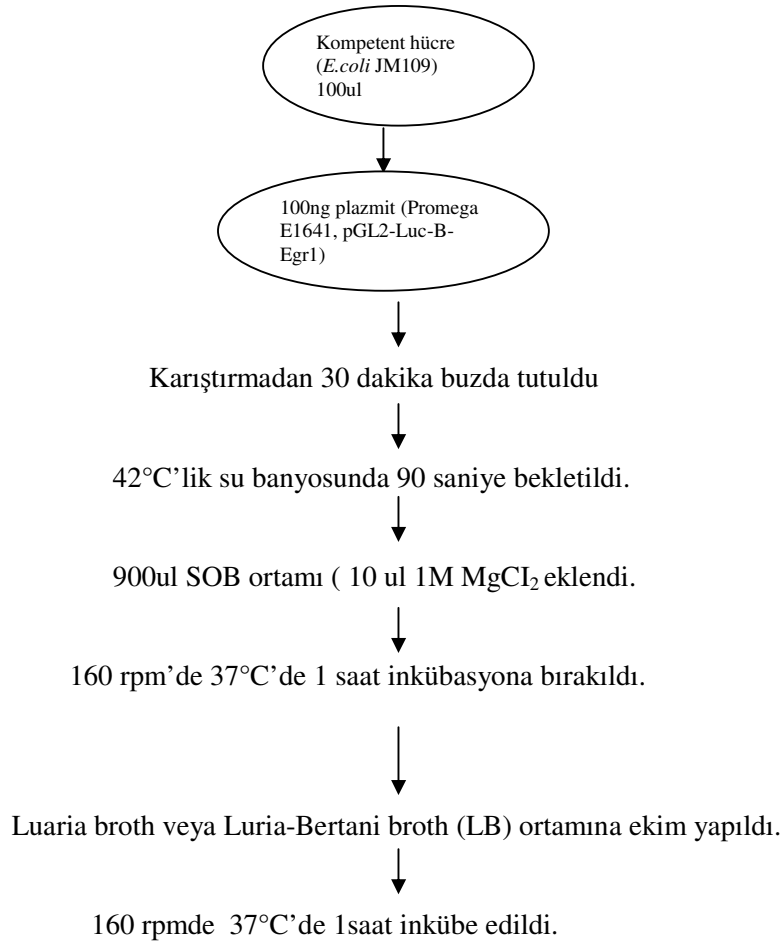
Tablo 8. Zimografide kullanılan solüsyon ve tamponların hazırlanması

Solüsyon Adı	İçeriği	Hazırlanışı
Aktivasyon Solüsyonu	50 mM Tris-HCl, pH 7.6 10 mM CaCl ₂ .2H ₂ O, 50 mM NaCl, % 0.05 Brij 35	6.06 g Tris, 1.47 g CaCl ₂ . 2,92 g NaCl, 0.5 g Brij 35 1 L d H ₂ O içinde çözülür (+4°C'de saklanır)
1X Yürütme Solüsyonu	25 mM Tris-HCl, pH 8.3 0,246 M Glisin % 0.1 SDS	15.1 g Tris, 94 g Glisin 5 g SDS 1 L d H ₂ O içinde çözülür. (+4 °C'de saklanır)
Renatürasyon Solüsyonu	% 2.5'lik Triton X-100	25 mL Triton X-100 975 mL d H ₂ O
2X İndirgeyici Olmayan Solüsyon	1.0 mL 0.5 M Tris-HCL, pH:6.8 0.8 mL Gliserol 3.2 mL %10'luk SDS 0.2 mL % 0.2'lik Bromfenol Blue 2.8 mL d H ₂ O	Oda sıcaklığında saklanır,
%30 Akrilamid Slüsyonu	29.2 g Akrilamid 0.8 g N'N'-bisakrilamid	(+4°C 'de karanlıkta saklanır)
Staining Solüsyonu	%0.5'lik Coomassie Brilliant Blue R-250 %40 metanol %10 asetik asid	Taze hazırlanır
Destaining Solüsyonu	%40 metanol %10 asetik asid	Taze hazırlanır

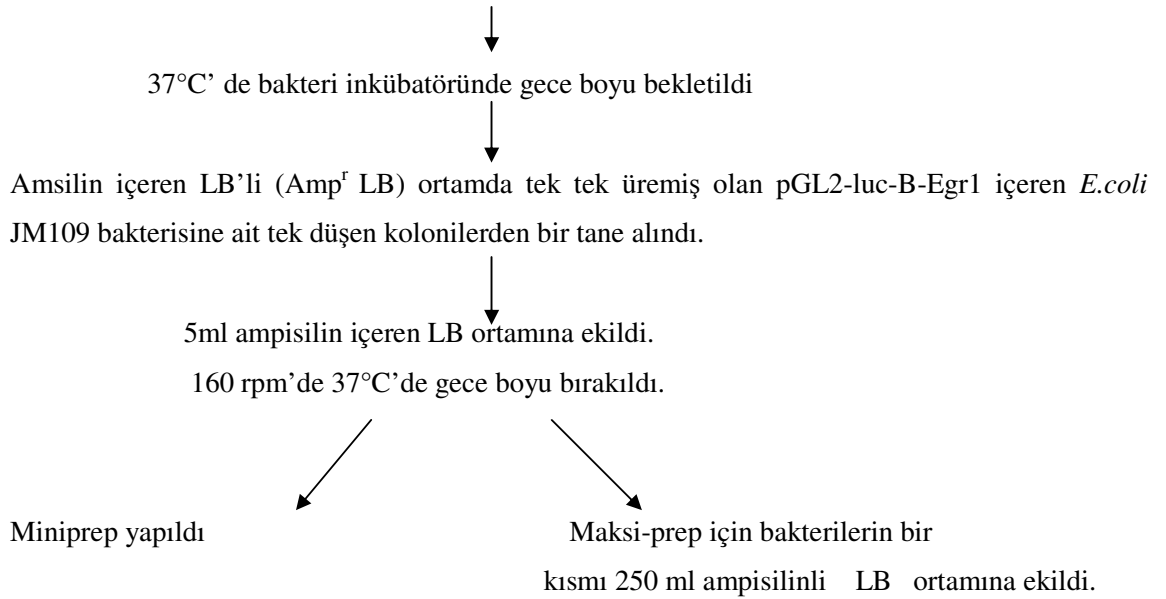
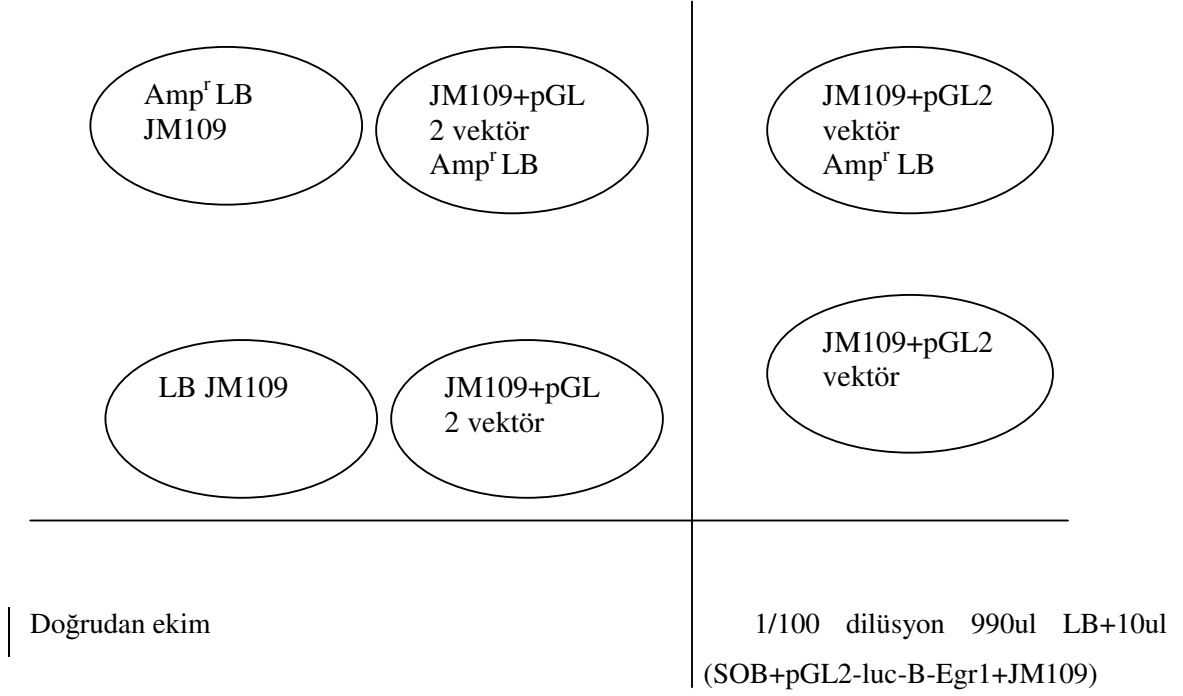
3.3.6. "Lusiferaz Reporter Assay"

3.3.6.1. Transformasyon Deneyi

Deneyde kullanılacak pGL2-luc-B Egr1 reporter vektörü kompetent hücre *E.coli* JM109 hücresine aktarıldı. Vektör+pGL2-luc-B-Egr1 Doç. Dr. Işıl Kurnaz'dan sağlandı. (Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü) Vektör agar içeren LB ortamlarına ekildi (Ortamlar ve içerikleri Tablo 9.'da gösterilmiştir). Deney aşamaları Şekil.14'de şematize edildi.



Luria broth veya Luria-Bertani broth (LB) ortamına ekim ekim yapılmıştır.



Şekil 14: Transfeksiyon ve miniprep şematik gösterimi

Tablo 9. Transfeksiyon deneyi için kullanılan ortamlar ve içerikleri

Ortam	İçeriği	Hazırlanışı
LB (Luria broth or Luria-Bertani broth)	10g tripton 5g yeast extract 10g NaCl	Kimyasallar tartılarak 1 litre distile su içinde çözüldü. pH'sı 7.5'e ayarlandı. 121°C'de 15' otoklavlandı.
Agarlı LB	10g trypton 5g yeast extract 10g NaCl 15 gr Agar	Kimyasallar tartılarak 1 litre distile su içinde çözüldü. pH'sı 7.5'e ayarlandı. 121°C'de 15' otoklavlandı.
SOB	Tripton 20gram Yeast ekstrakt 5gram NaCl0.5gram 1M KCl 2.5millilitre ddH2O to1000millilitre	Kimyasallar tartılarak 1 litre distile su içinde çözüldü.pH'sı 7.0'a ayarlandı. 121°C'de 15' otoklavlandı. Kullanmadan önce 1M MgCl ₂ 1litede 10 ml olacak şekilde kullanılır.
Ampisilinli LB	10g tripton 5g Maya Ekstraktı 10g NaCl 50µg/ml	Kimyasallar tartılarak 1 litre distile su içinde çözüldü. pH'sı 7.5'e ayarlandı. 121°C'de 15' otoklavlandı. 50-55°C'ye soğuduktan sonra 50µg/ml olacak şekilde ampisilin eklendi.

3.3.6.1.1. Miniprep

Plazmid DNA'nın izole edilmesi için miniprep yapıldı.

Protokol

1. İgün önce 160 rpm'de 37°C' de gece boyu bırakılan bakterilerden 1.5 ml ependorf tüpüne alınarak, 13000 rpm, +4°C'de 30' santrifüj yapılmıştır.
2. Supernatan atıldı ve pellet kurumaya bırakıldı.
3. 100µl ALS-1 ile pellet süspanse edildi ve iyice vortlexlendi.
4. 200µl taze hazırlanmış, ALS-2 eklendi. Tüp 3-5 kez aşağı yukarı edildi.
5. 150µl soğuk ALS-3 solusyonu eklenir. Tüp alt-üst edilir. 3-5 dakika buzda bekletildi.
6. 13000 rpm'de 5 dakika +4°C'de santrifüj edildi.
7. Supernatant yeni bir ependorf tüpüne alındı.
8. Supernatantın üzerine eşit hacimde fenol-kloroform-izoamil alkol eklendi. Vortex yapıldı ve 13000rpm'de 2' +4°C'de santrifüj edildi.
9. Üstteki daha şeffaf olan faz alındı ve yeni bir tüpe aktarıldı.
10. %70'lik Etanolden 2 volum eklendi. Vortexlenip 2' oda sıcaklığında bekletildi.
11. 13000 rpm'de 5' +4°C'de santrifüj edildi. Nükleik asitler dibe çöktü.
12. Supernatant atıldı.
13. Pelletin üzerine %70 etanolden 1ml eklendi ve alt-üst edildi. 13000 rpmde +4°C'de 10' santrifüj yapıldı.
14. Supernatant uzaklaştırıldı. Pellet kurumaya bırakıldı. Üzerine 50ul Tris-EDTA pH 8.0 (RNase içeriyor, 20µg/ml) eklendi.
15. Pellet çözüldükten sonra ölçüleri 260nm ve 280 nm'de ölçümleri yapılmıştır.
16. Restriksion enzimleri, HidIII, KpnI ile kesim yapıldı.

Tablo 10. Miniprep için kullanılan solusyonlar,

Solusyonun Adı	Solusyonun içeriği
ALS-1	- 50 mM Glukoz - 25 mM Tris-HCl - 10 mM
ALS-2	-0.2 N NaOH -%1 SDS
ALS-3	100ml ALS-3 için, -60 ml 5M Potasyum Asetat -11.5 ml Asetik Asit -28.5ml Distile Su,

3.3.6.1.2. Maxi-prep

1. 1 gece önce 160 rpm'de 50ug/ml ampisilin içeren 500ml LB'de 37°C'de hücreler inkübasyona bırakıldı.
2. 2 tane 250ml'lik tüpe alındı. Bakteri hücreleri, 5000g'de santrifüj edildi.
- 3.Supernatant atıldı.
- 4.Pelletin üzerine Qiagen buffer P1'den 4ml eklendi. Pipetaj yapılarak buffer P1 içinde pelletin iyice kaldırılması sağlandı.
- 5.Üzerine 8 ml Qiagen Buffer P2 eklendi. 2-3 yukarı aşağı şeklinde karıştırıldı. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 6.8ml Qiagen Buffer P3 eklendi. 2-3 kez karıştırıldı. 15 dakika buzun üzerinde bekletildi.
- 7.Karışım 13000g'de 15 dakika +4°C'de santrifüj yapıldı.
- 8.Qiagen tip-100'e 4ml'den buffer QBT eklenerek, kolonların kalibrasyonu sağlandı.
- 9.Daha sonra suupernatant kolonlardan geçirildi.
- 10.Kolonlar 2 kere buffer QC ile yıkandı (2x10ml), membranı tutan kontaminantların uzaklaştırılması için,
- 11.DNA eldesi için kolona 5ml buffer QF solusyonu eklendi.
- 12.Elde edilen DNA solusyonun üzerine 3.5ml izopropanol eklendi. 13000g'de 30 dakika +4 °C'de santrifüj yapıldı.

- 13.Supernatant uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 2 ml %70 Etanol eklendi. 15000g'de 15 dakika +4°C'de santrifüj yapıldı. Supernatant atıldı.
- 14.Pellet kurutuldu. Tris-EDTA pH 8.0 (20ug/ml RNase içeren) bufferında çözüldü.
- 15.DNA 260nm'de, 280nm'de ölçüldü.
- 16.Restriksiyon enzimleri ile kesim yapıldı.

Kullanılan Restriksiyon Enzimleri

HindIII: Fermentas ER0501

KpnI: Fermentas ER0521

Restriksiyon Enzimleri ile Kesim

	<u>Kesim Yok</u>	<u>HindIII</u>	<u>KpnI</u>	<u>HindIII ve KpnI</u>
Su	26µl	24 µl	24 µl	18 µl
DNA				
Miktarı	17µg	17µg	17µg	17µg
Enzim				
Tamponu	1X Tango Tamponu	1X HindIII Tamponu	1X KpnI Tamponu	1X Tango Tamponu
Enzim	-	1ünite	1 ünite	1 ünite

Karışımlar 37°C'lik su banyosunda gece boyu bekletildi ve 60°C'de 10 dakika enzimlerin inaktivasyonu sağlandı. Ürünler %0.8'lik agaroz jele yüklenerek 80 V'da 2 saat yürütüldü.

3.3.6.1.3. Transfeksiyon

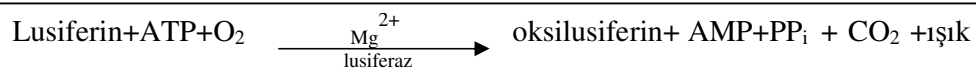
SKHep1 hücreleri 7×10^4 hücre/well ekim yapıldı. Hücreler ertesi gün pGL2-luc-B Egr1 ile transfekte edildi. Transfeksiyondan önce hücrelerin %60 civarında yoğun olması istenir. Transfeksiyon için;

1. Transfeksiyon ortamının hazırlanması, transfeksiyon için 6well-platelerde, bir well için 5µl Fugene (Transfeksiyon reagenti Roche, Katalog NO: 04709705001), 2µg DNA (pGL2-luc-B-Egr1 plazmiti) olacak şekilde transfeksiyon reagenti hazırlandı. Transfeksiyon reagenti DMEM-0 içinde hazırlandı.
2. 1 gün önce ekilmiş hücrelerin ortamı tamamen uzaklaştırıldı. Hücrelerin 2 kere 1PBS ile yıkamaları yapıldı. Hücrelerin üzerine DMEM-0 eklendi.
3. Üç saat sonra her bir wellde %10 FBS olacak şekilde DMEM'li ortam eklendi.

4. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerin ortamı tamamen uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile iki kere yıkamaları yapıldı. Hücrelerin üzerine %0 DMEM’li ortam eklendi. 16 saat sonra hücreler bir saat için HGF (40ng/ml), 100ug/ml heparin ile muamele edildi..

3.3.6.1.4. Lusiferaz Deneyi

Lusiferaz deneyinde promotor aktivitesini ölçmek için firely lusiferaz “ *Photinus pyralis* (EC 1.13.12.7)” aktivitesi ölçülüyor. Lusiferaz aktivitesi aşağıdaki gibi şematize edilmiştir.



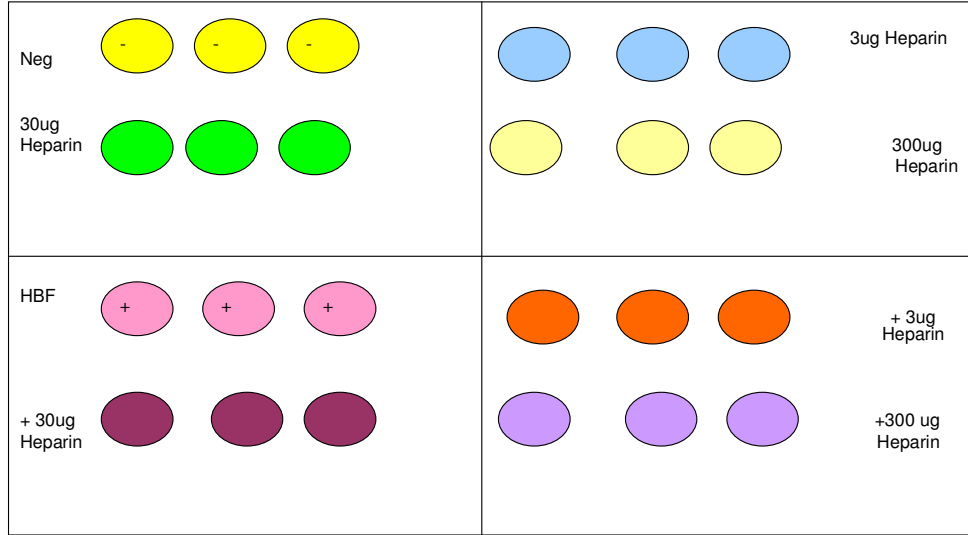
1. Belirtilen sürenin sonunda hücrelerin ortamı tamamen uzaklaştırıldı. İki kere 1X PBS ile yıkamalar yapıldı. Her bir welle 250ul Roche 1X lizis bufferi (Roche Luciferase Reporter Gene Assay, 1669893) eklendi. 30’ oda sıcaklığında bekletilerek hücrelerin iyice parçalanması sağlandı. Lizat 1.5ml’lik ependorf tüplerine aktarıldı.
2. Lusiferaz substratı, tampon içinde çözüldü.
3. Mikrofüj tüplerinin içine 25µl lizattan, 50µl lusiferaz örneğinden (substrat+buffer), eklendi.
4. “20/20ⁿ” Luminometer aleti ile ölçümler yapıldı.
5. Lizatlardan protein ölçümü yapıldı ve normalizasyon yapıldı.

3.4. İnvazyon ve Motilite Deneyi

SKHep1 hücrelerinde heparinin doz bağımlı olarak HGF ile uyarılan hücrelerin invazyon ve motilitesine olan etkisini belirlemek amacı ile invazyon deneyi yapılmıştır.

1. İnvazyon kuyularına (BD MatrigelInvasion Chmaber 24-well Plate 8.0 Mikron por çaplı) 1.5×10^4 /kuyu hücre ekildi. Motilite deneyi için (BD Kontrol insert 24-well Plate 8.0 Mikron por çaplı) 1.5×10^4 /kuyu hücre ekildi.
2. İnvazyon kuyuları -20°C’den çıkarıldı. Oda sıcaklığına gelmesi için dışarıda bekletildi.
3. Motilite kontrol kuyuları +4°C’den çıkarıldı. Oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
4. İnvazyon kuyuları oda sıcaklığına gelince, kuyuların üzerine %0 FBS olan DMEM eklendi ve inkübatöre kaldırıldı. Motilite kuyularına hiçbirşey eklemeyen aynı şekilde inkübatöre kaldırıldı.
5. 2 saatin sonunda invazyon ve kontrol kuyuları inkübatörden alındı.

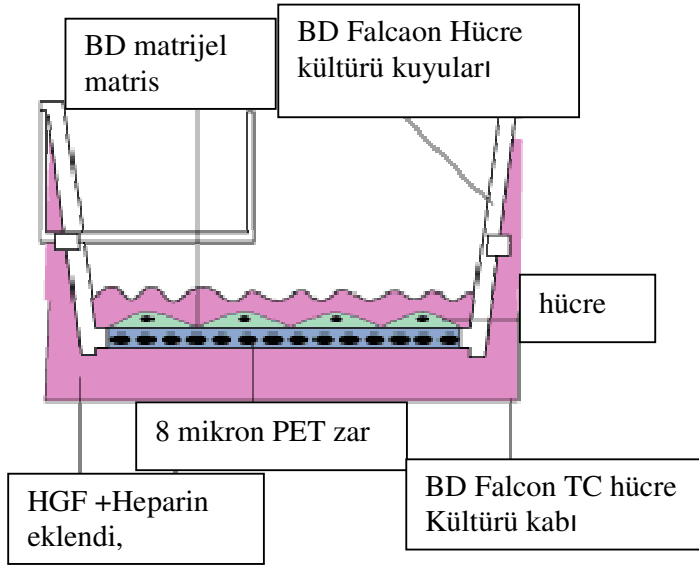
6. İnvazyon kuyularından DMEM-0 çok dikkatli bir şekilde çekildi.
7. Hücrelerin 1.5×10^4 /kuyu olacak şekilde %2 FBS içeren DMEM ortamının içinde hücre süspansiyonu hazırlandı.
8. Motilite ve invazyon kuyuları alınarak alt kısma 750ul DMEM %2 FBS, HGF ve farklı dozlarda heparin eklendi. Şekil.15’de gösterilmiştir.



Şekil 15: İnvazyon ve motilite kuyularına farklı yoğunluklarda heparin ve HGF eklenmesinin şematik gösterimi,

- 9.Yukarıda belirtildiği şekilde hücreler HGF (40ng/ml) ve farklı heparin dozları ile muamele edildi.
10. Kuyular steril pens yardımı ile yerlerine yerleştirildi. Baloncuk oluşumuna izin vermeden kuyucuklar yerleştirildi.

11. Hücre süspansiyonu hazırlandı ve 500ul'den kuyuların üzerine eklendi.
12. 24 saat için hücreler inkübatöre yerleştirildi.



Şekil 16: İnvazyon kuyuları

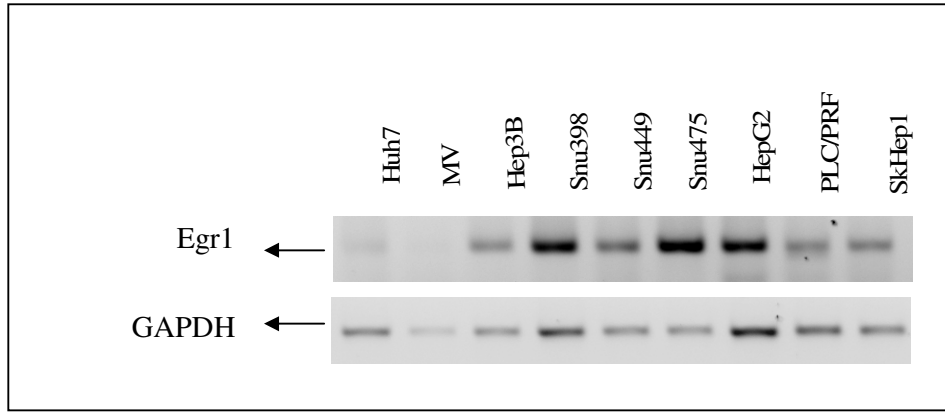
3.4.1. DiffQuik (Dade-Bahring) İle Boyama

1. 24 saatin sonunda hücreler inkübatörden alındı.
2. Kuyuların üzerindeki ortam tamamen uzaklaştırıldı.
3. Hücrelerin fiksasyonunu sağlamak için, kuyular “Diff-Quick Fixation”dan 10 saniye tutuldu.
4. Kuyular hafifçe kurutma kağıdına tutularak kurumaları sağlandı.
5. Kuyular ardından Diff-Quick Set-1 boyası (eosin, hücrenin bazik kısmının, sitoplazmanın kırmızı boyanmasını sağlar) ile 10 saniye boyandı.
6. Kuyulardan kurutma kağıdı ile fazla boyaları alındı.
7. Kuyular ardından Diff-Quick –II boya seti (hemotoksilen, hücrenin asidik kısımlarını, çekirdeğin mavi boyanmasını sağlar) ile 10 saniye boyandı,
8. Kuyulardan fazla boyanın uzaklaştırılması için kuyular kurutma kağıdına tutuldu.
9. Kuyular distile sudan geçirildi.
10. Kulak çöpü ile üstte kalan hücreler alındı.
11. 100X büyütmeli mikroskopta hücreler çekirdek mavi, sitoplazma kırmızı olarak boyanmış gözüktü.

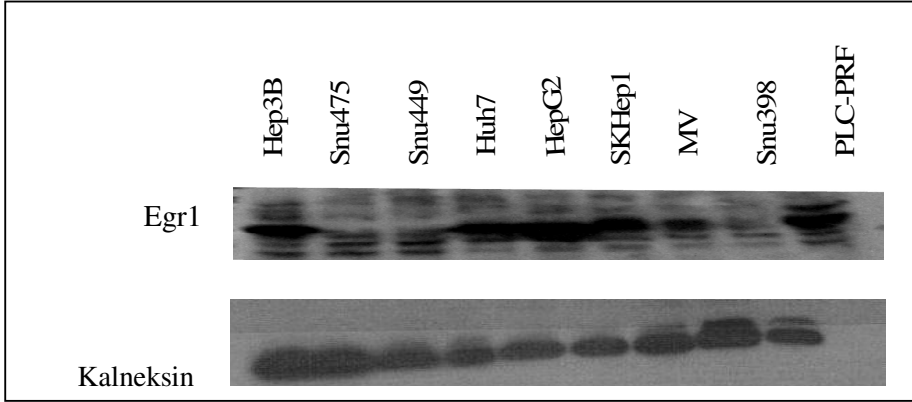
4.BULGULAR

4.1. Hepatoselüler Karsinom Hücrelerinde Egr1 Ekspresyonu

Mikroarray ile saptanan Heparin ve HGF varlığında uyarılan EGR 1 ekspresyon artışının doğrulanmasına yönelik RT-PCR analizleri öncesinde 9 HCC hücre dizisinde Egr1 ekspresyon düzeyleri incelendi. RT_PCR ile Hepatoselüler Karsinom hücre dizilerinden SNU-475, Huh-7, HepG2, Hep3B, Mahlavu, SK-Hep1, SNU-398, SNU-449 ve PLC/PRF-5'de Egr1 m-RNA düzeyinde farklı miktarlarda saptanmıştır (Şekil 17). Western Blot yöntemi ile Hep3B, Huh7, HepG2, SKHep1 ve MV hücre dizilerinde Egr1 ekspresyonu yüksek düzeyde olduğu gözlenmektedir (Şekil 18).



Şekil 17: RT-PCR ile HCC hücre dizilerinde bazal koşullarda Egr1 transkripsiyonu.

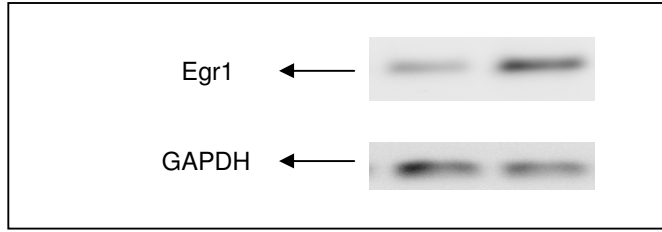


Şekil 18: Egr1'in bütün HCC hücre dizilerinde protein düzeyinde bazal koşulda ekspresyonun western blotting yöntemi ile gösterilmesi,

HCC hücre dizilerinde bazal m-RNA düzeyinde Egr1 bütün HCC hücre dizilerinde eksprese olmaktadır. Protein düzeyinde bazal Egr1 bazı HCC hücre dizilerinde (Hep3B, Huh7, HepG2, SKHep1 ve Mahlavu) ekspresyonu yüksek olmaktadır, bazı HCC hücre dizilerinde ise (Snu475, Snu449, Snu398) hücre dizisinde ise düşük düzeyde eksprese olmaktadır.

4.2. SK-Hep1 hücrelerinde HGF ve/veya Heparin uygulamasının Egr1 transkripsiyonuna etkisi

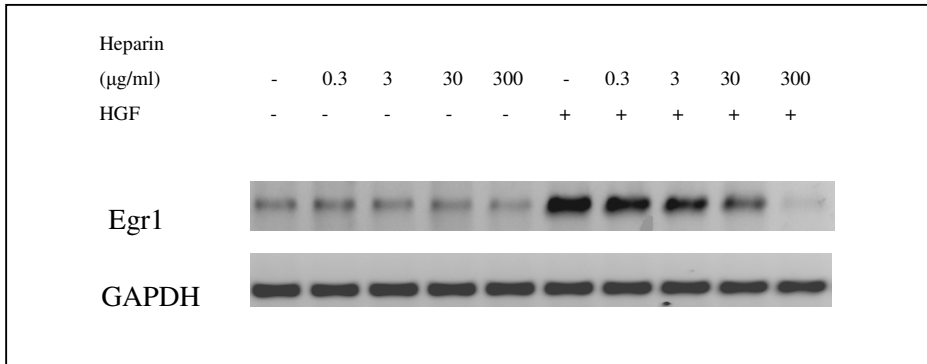
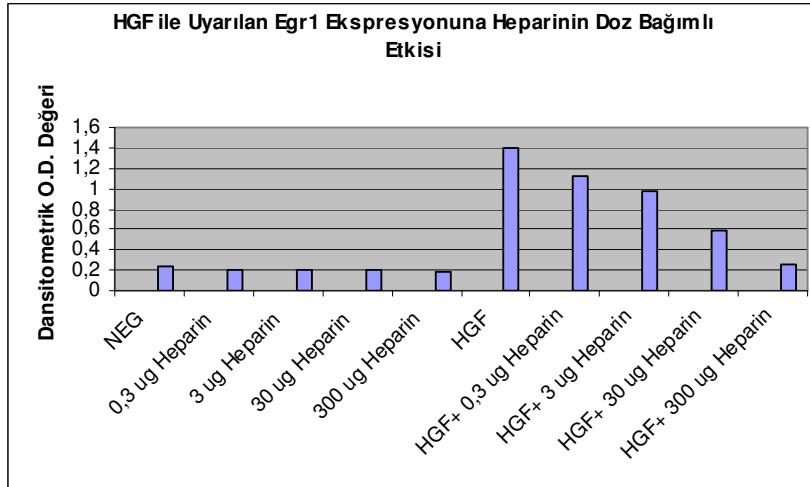
Mikroarray çalışmaları sonucunda SKHep1 hücre dizisinde HGF+Heparin olan koşulda sadece Heparin olan koşula göre Egr1 ekspresyonunda artış gözlemlendi. Mikroarray çalışmalarını doğrulamak amacı ile Heparin- HGF-, Heparin+HGF-, Heparin-HGF+ ve Heparin+HGF+ olan koşullarda Egr1 ekspresyonundaki değişim m-RNA düzeyinde incelendi. HGF+Heparin olan koşulda yalnızca heparin olan koşula göre Egr1 ekspresyonunda artış olduğu saptandı (Şekil 19). Bu bulgu mikroarray ile elde edilen veriyi doğrulamaktadır.



Şekil 19: Heparin ve Heparin +HGF varlığındaki Egr1 transkripsiyonundaki değişim ,

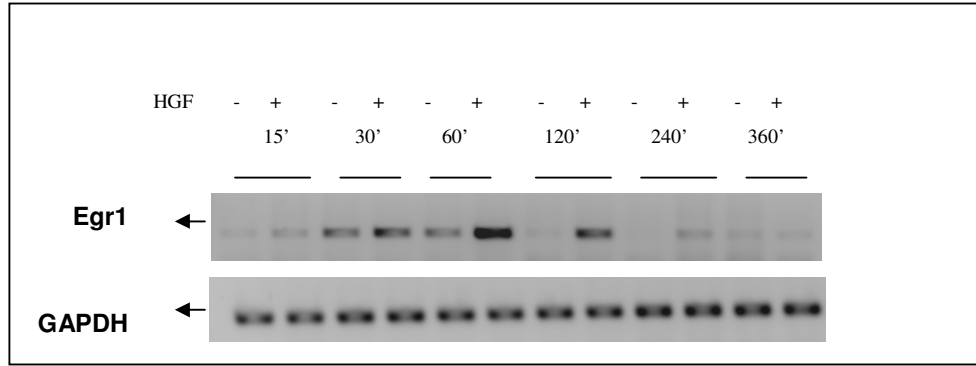
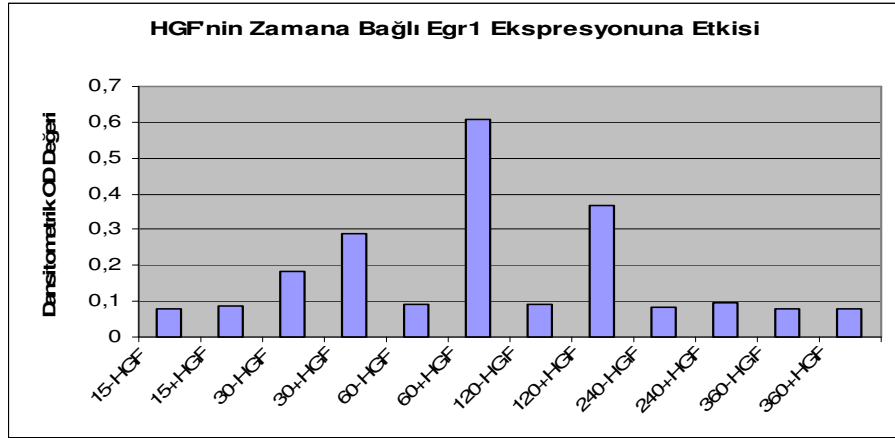
4.3. Heparin Dozunun HGF ile Uyarılan Egr1 Ekspresyonuna Etkisi

Heparin'in 0.3 µg/ml den başlayarak doz bağımlı olarak HGF tarafından uyarılan Egr1 ekspresyonunu baskıladığı saptandı. 300 µg/ ml lik dozun bazal Egr1 transkripsiyonunu baskıladığı gözlenmiş ve çalışmanın bundan sonraki bölümünde bazal Egr1 transkripsiyonunu etkilemeyen en yüksek heparin dozu olan 100 µg/ml heparin ile devam edildi(Şekil 20).



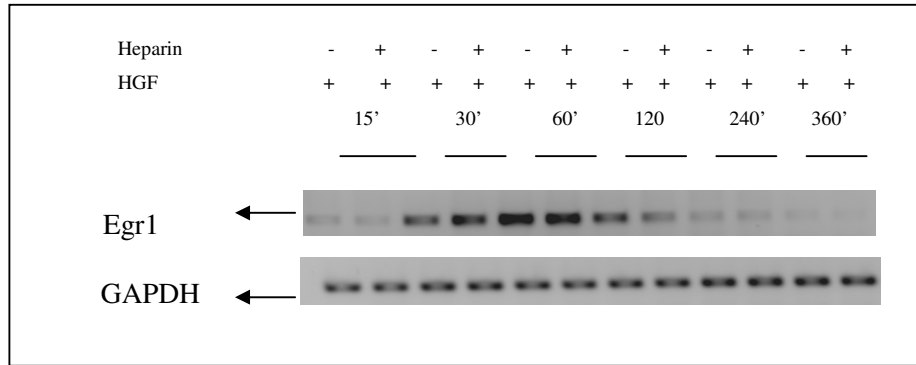
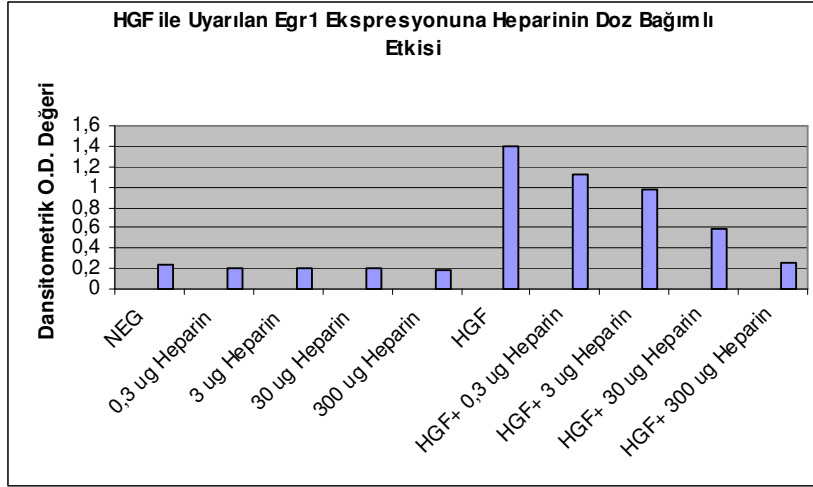
Şekil 20: Heparin dozunun Egr1 ekspresyonuna etkisi

HGF ve/veya heparin varlığında Egr1 m-RNA düzeyindeki artışın zamana bağlı nasıl değiştiğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada, SKHep1 hücre dizisinde Egr1 m-RNA düzeyinde artışın HGF uygulamasından 15 dakikadan sonra başladığı, uyarının 1.saattinde maksimum düzeye ulaştığı ve 2.saatten sonra düşmeye başladığı belirlendi (Şekil 21).



Şekil 21: HGF'nin m-RNA düzeyinde Egr1 ekspresyonuna etkisi

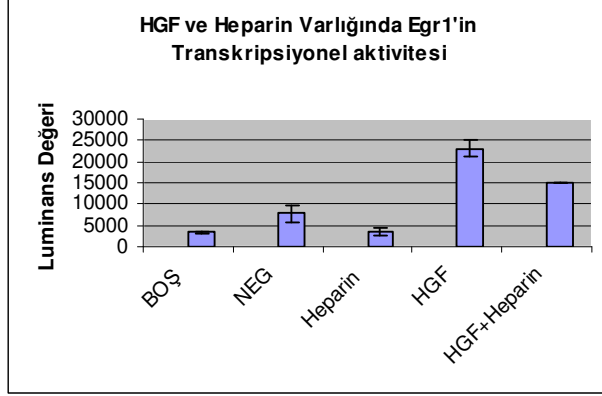
Heparinin HGF ile uyarılan ve bazal Egr1 ekspresyonuna etkisini belirlemek amacı ile zamana bağlı olarak HGF, heparin ile muamele edilen SKHep1 hücrelerinde m-RNA düzeyinde Egr1 ekspresyonuna bakıldı (Şekil 22).



Şekil 22: Heparinin HGF ile uyarılan Egr1 ekspresyonuna etkisi

4.4. HGF ve/veya Heparinin Egr1'in Transkripsiyonel Aktivitesine Etkisi

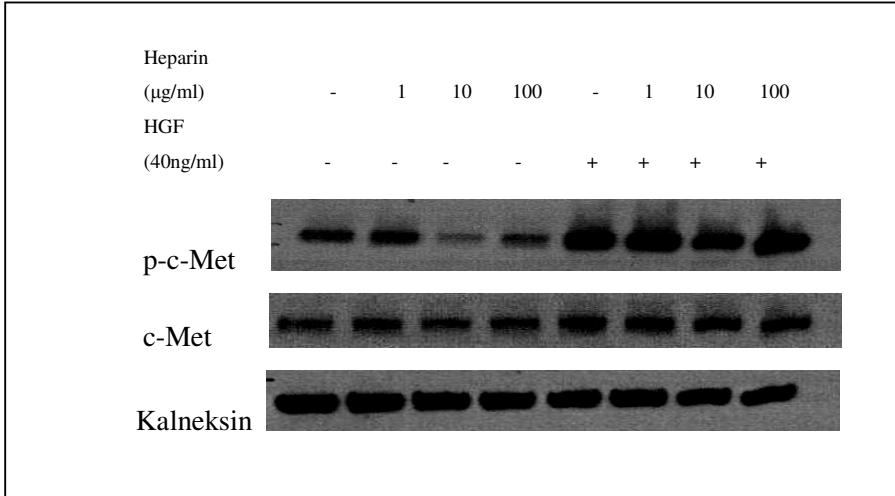
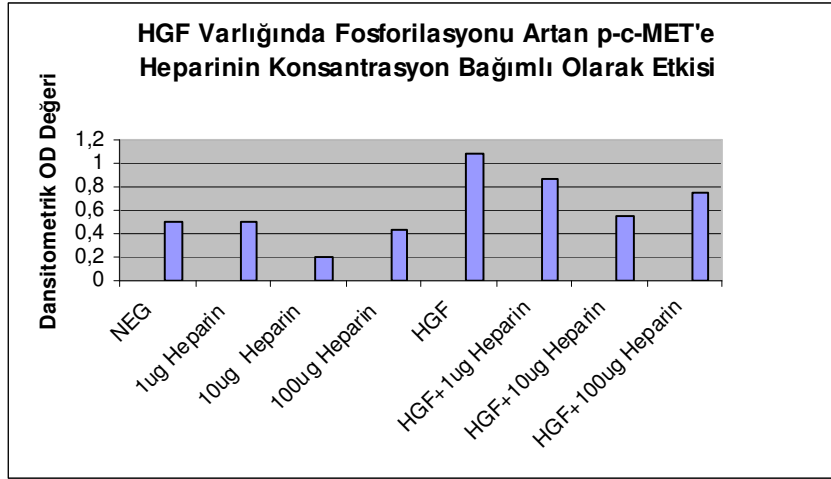
Egr1'in heparin ve HGF varlığında promotor aktivasyonuna bakmak amacı ile Egr1-lusiferaz-reporter deneyi yapıldı. HGF uygulanması sonrasında Egr1 transkripsiyonel aktivitesi yaklaşık 16 kat arttı. Heparin uygulaması HGF ile aktive olan Egr1'in transkripsiyonel aktivasyonu baskılandı (Şekil 23).



Şekil 23: HGF ve Heparin varlığında Egr1'in transkripsiyonel aktivitesi

4.5. SKHep1 Hücrelerinde Heparin'in c-Met fosforilasyonuna etkisi

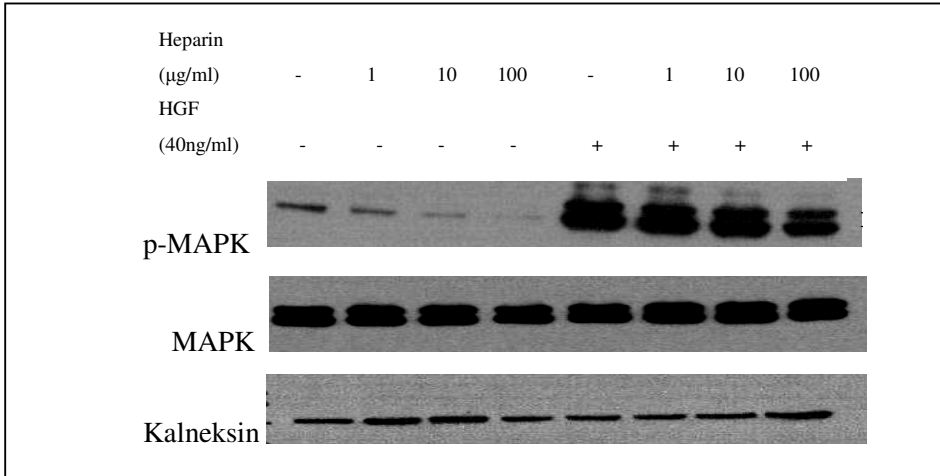
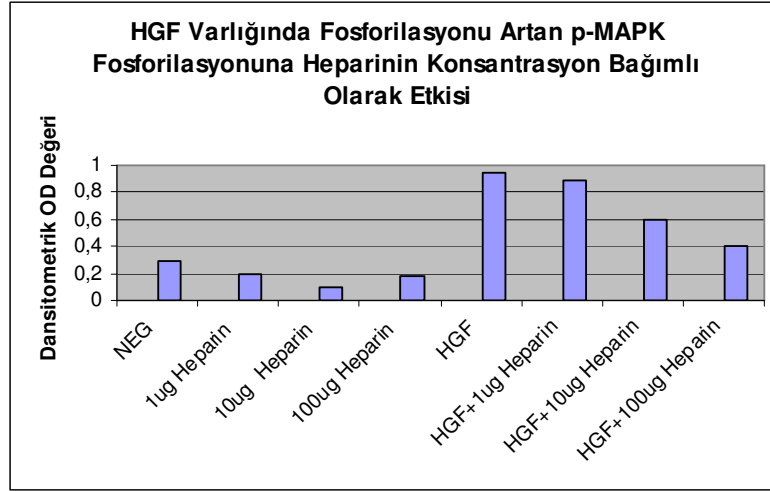
Heparin uygulamasının doz bağımlı olarak c-Met fosforilasyonunu inhibe ettiği belirlendi (Şekil 24).



Şekil 24: HGF ve heparin varlığında p-c-Met fosforilasyonu

4.6. SKHep1 Hücrelerinde Heparin'in MAPK fosforilasyonuna etkisi

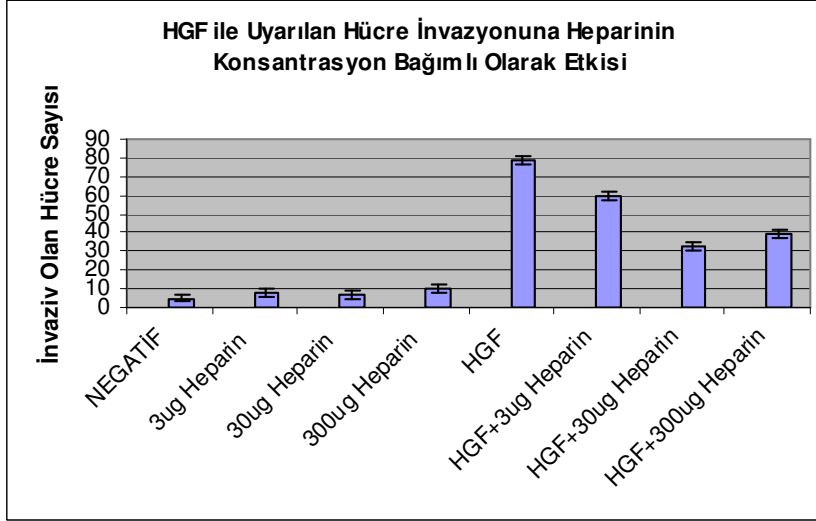
Heparin doz bağımlı olarak MAPK fosforilasyonu baskılandı.



Şekil 25: HGF ve/veya Heparin uygulamasının MAPK fosforilasyonuna etkisi

4.7. SKHep1 Hücre Dizisinde Heparinin HGF ile Aktive Olan Hücre İnvazyonuna Etkisi

SKHep1 hücre dizisinde HGF uygulanması hücre invazyonunu yaklaşık 10 kat arttırdı. Heparin ise doz bağımlı olarak HGF tarafından uyarılan hücre invazyonunu baskıladı (Şekil 26).

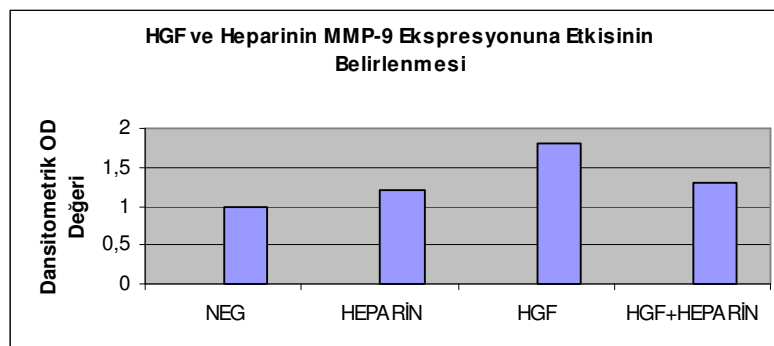


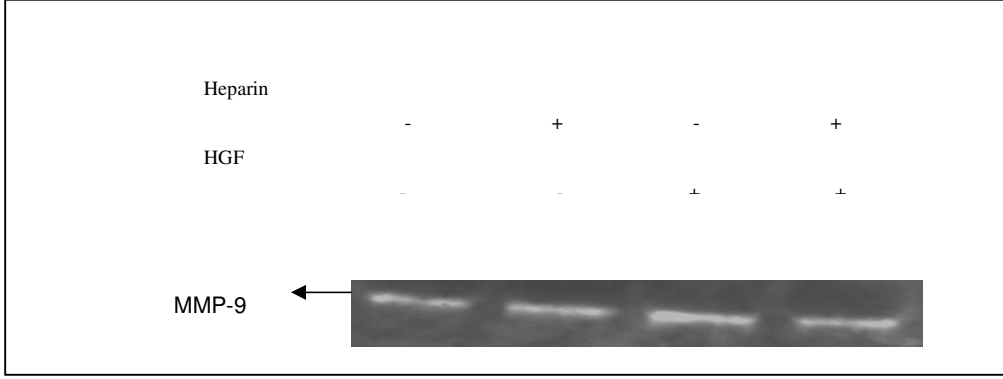
Şekil 26. SKHep1 hücre dizisinde HGF tek başına iken ve HGF+Heparin varlığında hücre invazyonu davranışlarına bakıldı

SKHep1 hücre dizisinde HGF varlığında artış gösteren hücre invazyonu heparin varlığında baskılandı.

4.8.HGF ve/veya Heparin uygulamasının MMP-9 ekspresyonuna etkisi

24 saatlik HGF uygulaması SKHep1 hücrelerinde hücre kültür ortamına salınan MMP-9 miktarını arttı. Heparin varlığında bazal MMP-9 aktivasyonu değişmez iken HGF ile aktive olan MMP-9 salınımı azaldı (Şekil 27).





Şekil 27: HGF, heparin varlığında MMP-9 aktivasyonunun jelatin zimografi yöntemi ile gösterilmesi,

5.TARTIŞMA

Hepatoselüler karsinom bir primer karaciğer kanser tipidir. Dünya da görülme sıklığı bakımından 5. sırada yer alırken ölüme yol açma sıklığı bakımından 3. sırada yer almaktadır. HCC'nin gelişimi Hepatit B, Hepatit C, alkol ve aflotoksinlerle ilişkilendirilmektedir¹. Bu faktörler karaciğerde kronik bir hasarın oluşmasına yol açmaktadır. Normal karaciğer hepatosit hücreleri, endotel hücreler, portal fibroblastlar ve stellat hücrelerinden oluşmaktadır.² ⁴² Kronik karaciğer zedelenmeleri sonucunda bu hücrelerin özellikleri değişmektedir. Portal fibroblastlar ve stellat hücreler sürekli büyüme faktörleri, sitokinler ve

proteinazlar sentezlemeye başlayıp hücre dışı matrisin değişimine yol açmaktadırlar. Hücre dışı matrisde birikim fibrozis oluşumuna yol açmaktadır. Bu arada HGF ekspresyonu artan büyüme faktörlerinden biri olup hepatositlerin büyüme, çoğalma ve farklılaşmasında önemli rol almaktadır. Heparin, hücre dışı matrisde en çok birikmeye başlayan proteinlerden biri olmaktadır. Heparin bir heparan sülfat proteoglikandır. Heparin FGF, PDGF ve gibi HGF için ko-reseptör olarak tanımlanmaktadır. Heparin büyüme faktörlerinin reseptörlerine bağlanarak oluşturdukları biyolojik yanıtlarda önemli rol oynamaktadırlar. Heparin, HGF varyantı olan NK1'a bağlanmaktadır. Ortamda heparin bulunması durumunda NK1 tarafından oluşturulan yanıtın arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Heparinin c-Met reseptör tirozin kinazın sema bölgesine, HGF'nin ise N bölgesine bağlandığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu fiziksel birlikteliğin HGF/SF-c-Met sinyal yolağının aktivasyonunda nasıl bir rol aldığı tanımlanmamıştır. Çalışmamızda heparinin HGF birlikteliğinin HCC'de nasıl bir rol aldığını belirlemeye çalıştık. Daha önce yapılan çalışmamızda HGF ile uyarılan hücre adezyonu, hücre proliferasyonu ve hücre hareketliliği heparin varlığında baskılandı. Heparinin bazı kanserlerdeki baskılayıcı özelliği bilinmektedir. Heparin varlığında kanser hücrelerinin metastaz, invazyon ve proliferasyon özelliklerinde baskılanma olduğu gösterilmiştir.⁷ HCC hücre dizisi olan HepG2 hücre dizisinde heparin varlığında hücrenin apoptoza gittiği gösterilmiştir. Ancak moleküler mekanizması tanımlanmamıştır.⁵⁰ Çalışmamızda öncelikle HCC'de heparinin HGF bağımlı olan biyolojik yanıtların baskılamasının moleküler mekanizmasının anlaşılmasına yönelik analizler yapıldı. Bu amaçla öncelikle SKHep1 hücreleri Heparin, HGF+Heparin ile muamele edildikten sonra elde edilen RNA'lardan mikroarray çalışıldı. Mikroarray sonucunda ekspresyonu anlamlı derecede değişen genlerin biyoinformatik ve literatür verileri doğrultusunda analizi sonrasında Early Growth Response 1 (Egr1) geni aday gen olarak seçildi. Hücre çekirdeğinde yer alan bir transkripsiyon faktörü olan Egr1, hücre dışından gelen birçok sinyal ile uyarılarak hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşmasında rol oynamaktadır. Egr1'in çeşitli dokularda inflamasyon oluşumunda ve fibroziste rol aldığı da gösterilmiştir².

Çalışmamızda önce farklı HCC hücre dizilerinde Egr1'in mRNA ve protein düzeyinde eksprese olup olmadığını belirlemeyi hedefledik. Çalışmamıza dahil ettiğimiz 9 HCC hücre dizisinin tamamında m-RNA düzeyinde farklı miktarlarda Egr1 ekspresyonu olduğu belirlendi (Şekil 17.). Protein düzeyinde yapılan ekspresyon analizinde ise genellikle

epitelial kökenli olan HCC hücre dizilerinde Egr1 ekspresyonu gözlenirken mezenşimal kökenli HCC hücre dizilerinde Egr1 ekspresyonunun çok düşük veya hiç olmadığı saptandı (Şekil 18.). Bu veri Egr1'in HCC'de epitelial-mezenşimal geçişte önemli rol oynayabileceğini ve aynı zamanda hücre farklılaşmasında rolü olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde Egr1'in HCC hücre dizilerinde ekspresyon düzeylerini ve bunun önemini gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak primer hasta dokularında yapılan bir çalışmada Egr1 ekspresyonunun normal karaciğer ve HCC dokularında çok az olduğu veya hiç olmadığı, buna karşın parakanseroz dokularda ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir⁴³. Ayrıca bir başka çalışmada Egr1'in birtakım uyaranlar ile yarılarak karaciğer yenilenmesinde önemli bir rol aldığı gösterilmiştir⁵¹. Egr1'in kemokinlerin salınmasında rol oynayarak inflamasyon ve fibrosis aşamalarında önemli rol alabileceğini gösteren çalışmalarda bulunmaktadır². Bir diğer çalışmada ise etanol varlığında Egr1 ekspresyonunun arttığı ve Egr1 ekspresyonundaki bu artışın karaciğer yağlanmasında rol aldığı belirtilmiştir.⁵² Bu bilgiler Egr1'in karaciğerde alkol gibi bazı etyolojik faktörler tarafından uyarılabileceğini göstermektedir. Bu faktörlerin EMT fenotipi ile ilişkisi düşünüldüğünde çalışmamızda farklı HCC hücre dizilerinden elde edilen Egr1 ekspresyondaki farklılıkların biyolojik öneminin incelenmesinin gerekliliğini göstermektedir.

Mikroarray çalışmasında kullanılan SK-Hep1 hücre dizisinin Egr-1 eksprese ettiği belirlendikten sonra Heparin ve HGF+Heparin uygulamasının Egr1 transkripsiyonunu nasıl etkilediği RT-PCR ile incelendi. Elde edilen sonuçlara göre mikroarray çalışmasında kullanılan 24 saatlik HGF ve HGF+Heparin uygulanan koşullarda gerçekleştirilen çalışmada, mikroarray sonuçları ile uyumlu olarak HGF+Heparin uygulamasının sadece heparin uygulamasına göre Egr-1 transkripsiyonunun 2 kattan fazla artırdığı belirlendi.

HGF ve heparinin birlikte veya ayrı ayrı Egr1 ekspresyonunu nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile yapılan çalışmada HGF uygulamasının 15. dakikasından başlayarak Egr-1 transkripsiyonu artmaya başladığı, 1. saatte maksimum seviyeye ulaşmış 2. saatten sonra azalmaya başladığı belirlendi(Şekil 21). Heparin dozunun Egr-1 transkripsiyonuna etkisi incelendiğinde 300µg ve üzerindeki Heparin konsantrasyonlarının Egr1 ekspresyonunu azalttığı saptandı (Şekil 20). Bu nedenle heparinin, HGF'nin Egr-1 transkripsiyonuna etkisinin incelendiği deneylerde 100µg heparin dozu kullanıldı. Heparinin doz bağımlı olarak

HGF ile uyarılan Egr-1 transkripsiyonunu azalttığı belirlenmiştir²³. Bu veriler Egr1-luisferaz-reporter deneyi ile de doğrulandı. Egr1'in HGF ile uyarıldığı ve uyarımın zamana bağlı olduğu gösterildi.¹² Çalışmamız da Egr1'in HGF ile uyarımının zamana bağlı olduğu gözlemlendi. Egr1'in HGF uygulaması ile zamana bağlı artışını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Egr1'in HGF bağlı uyarımının heparin ile baskılandığına yönelik çalışmaya rastlanmamıştır. HGF'nin karaciğerde oluşan inflamasyon sonucunda ekspresyonu artan büyüme faktörlerinden biri olduğu bilinmektedir. HGF varlığında Egr1 ekspresyonu artıp karaciğer inflamasyonunda fibrosis oluşumunda önemli rol oynuyor olabilir ve Egr1'in bu etkisi heparin varlığında baskılanıyor olabilir.

Egr1 GC içeriği yüksek olan genlerin promotorlarında 9 bp'lik GCG(G/T)GGGCG bölgelerine bağlanarak birçok genin ekspresyonunu kontrolünü sağlamaktadır.¹⁰ Tümör hücrelerinde ve tümör dokularında Egr1'in genellikle tümör baskılayıcı olarak fonksiyon gösterdiği belirtilmiştir¹¹. Normal doku ile kıyaslandığında küçük hücreli akciğer kanseri tümörlerinde, meme tümörlerinde ve gliomalarda Egr1 ekspresyonu çok az veya hiç olmadığı gösterilmiştir (5). Egr1'in yeniden eksprese ettirilmesi durumunda bu kanserlerde hücre transformasyonun baskılandığı gösterilmiştir¹⁰. TGF- β 1 ve plazminojen aktivatör inhibitörlerinin Egr1'in hedef genleri olması nedeni ile Egr1 tümör baskılayıcı gibi rol alıyor olabilir. PTEN, p53 gibi proapoptotik moleküler Egr1 hedef genler olup Egr1'in apoptoz da önemli bir rol oynamasını sağlamaktadır.¹⁷

Egr1'in tümör baskılayıcı özelliği dokuya özgü gibi gözlenmektedir. Çünkü birçok kanser tipinde, özellikle prostat kanserinde Egr1'in overekspresyonu söz konusu olup, prostat kanserindeki metastatik karakter ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir¹⁸. Egr1'in tümör tetikleyici özelliğinin temelinde VEGF'in Egr1 hedef genlerden biri olması nedeni ile Egr1'in anjiyogenez oluşumunda önemli rol alıyor olmasından kaynaklanıyor olabilir. MT1-MMP'nin, MMP-9'un Egr1 hedef genler olabilmesi nedeni ile Egr1 hücre kanser hücrelerinin invazyonunda önemli rol almaktadır. Egr1'in VEGF'in üzerinden HCC'de hipoksi koşullarda anjiyogenez sürecinde rol oynayabileceği bildirilmiştir.² Bizim çalışmamızda elde edilen heparinin, HGF tarafından uyarılan hücre invazyonunu, Egr-1 ekspresyonunu azaltıyor olduğu verisi Egr-1'in hücre invazyonunda rol oynuyor olabileceği bilgisi ile uyumludur. Hücre invazyonunda hücre dışı matrisi parçalayan enzimlerin önemli rolü olduğu bilinmektedir. Özellikle kanser hücrelerinin invazyonunda ve metastazda MMP-2 ve MMP-9'un çok önemli

rol oynadığı bilinmektedir. HCC hücrelerinin invazyonunda MMP-2, MMP-9, MT1-MMP'nin önemli rol aldığı bilinmektedir.⁵³ Heparin tarafından oluşan hücre invazyonu inhibisyonunun, MMP 2 ve MMP 9 heparin varlığında baskılanmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu hipotezi test etmek amacı ile SKHep1 hücre dizisinde HGF ve heparin uygulamasının MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonuna ve aktivasyonuna olan etkisini belirlemek amacı ile jelatin zimografi deneyi yapıldı. Bu deney sonucunda heparinin HGF tarafından uyarılan hücre kültürü ortamına salınan MMP-9'un proformundaki artışın baskılandığı belirlendi. Bu literatürde tanımlanan MMP-9'un HGF varlığında aktive olduğu bilgisi ile uyumludur.⁵⁴ Heparin varlığındaki bu artışın inhibe olduğu ilk kez çalışmamızda tanımlanmamıştır. Zimografi çalışmamızda MMP-9'a ait aktif formunun gözlenmesi de bekliyorduk. Ancak sadece MMP-9'a ait aktif form saptanamadı. Kullandığımız hücre ortamının serum içermediği ve MMP'lerin aktivasyonunda serum içeriğinde yer alan plazminlerin rol aldığı düşünüldüğünde, MMP-9' a ait aktif formun saptanamamasının nedeni tüm deneylerin serumsuz ortamda gerçekleştirilmesi olabilir.^{55,56}

MMP9' un HGF hedef genlerinden birisi olduğu ve aktivasyonunun c-Met fosforilasyonu ile başladığı bilgisinden yola çıkarak, Heparin varlığındaki HGF ile uyarılan invazyonun ve Egr1 aktivasyonunun bloklanmasında c-Met fosforilasyon değişimlerinin önemini incelemeye karar verdik. Bu çalışmanın sonucunda heparinin gerek bazal gerekse HGF tarafından uyarılan c-Met fosforilasyonunu baskıladığı gözlemlendi. Bunun ardından heparin varlığında HGF-bağımlı Egr1 uyarımında önemli hedef moleküllerinden biri olup MAPK yolağı incelendi. Heparinin c-Met fosforilasyon inhibisyonuna paralel olarak ERK1/2 fosforilasyonunu da baskılandığı saptandı. c-Met'in HGF varlığında fosforile olduğu ve bu fosforilasyonunun HGF/SF-c-Met sinyal yolağının aktivasyonunu sağladığı göz önüne alındığında, verilerimiz bize HGF tarafından uyarılan Egr1 aktivasyonunun c-Met fosforilasyonu sonrasında uyarılan MAPK yolağı aktivasyonu ile gerçekleştiğini ve heparinin bu yolağı baskıladığını gösterdi. Literatürde Egr-1 aktivasyonunun MAPK aracılıklı olabileceğine ilişkin bazı bilgiler mevcuttur. Ancak bilgilerimiz dahilinde c-Met fosforilasyonunun heparin varlığındaki baskılandığı ve bunun MAPK yolağı üzerinden Egr1'i blokladığı ilk kez çalışmamızda tanımlanmış bir bulgudur.

HGF/SF-c-Met sinyal yolağının aktivasyonu birçok kanser tipinde hücre invazyonu, hücre proliferasyonu ve metastaz sürecinde rol oynadığı bilinmektedir. HCC oluşumunda ve gelişiminde HGF/SFc-Met sinyal yolağının aktivasyonun rolü bilinmektedir. Heparinin bu

aktivasyonu baskılaması HCC oluşumunu veya ilerlemesi sürecinde önemli rol oynuyor olabilir. Heparinin bu etkiyi hangi mekanizma ile gerçekleştirdiği ayrı bir çalışma konusu olabilir. Literatür bilgileri doğrultusunda birkaç hipotez oluşturmak mümkündür. Bunlardan ilki heparinin c-Met reseptör tirozin kinaza bağlanarak antagonist gibi davranarak HGF'nin reseptörüne bağlanmasını engelliyor olabileceği hipotezidir. İkincisi ise HGF'ye bağlanarak HGF'nin reseptörüne bağlanmasını engelliyor olabileceğidir. Bu hipotezlerin uygun deney sistemleri ile ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir. Yaptığımız çalışmalarda heparin'in düşük dozlarda c-Met fosforilasyonunu baskıladığı, buna karşın 100µg'dan daha yüksek dozlarda bu baskılayıcı özelliğin azaldığı belirlenmiştir. Bu gözlem doğrultusunda incelenmesi gereken bir diğer konu da heparinin yoğunluğundaki artışın heparin tarafından uyarılan inhibitör etkiyi nasıl ortadan kaldırdığıdır. Burada hipotezimiz heparinin reseptöre bağlanarak reseptörün dimer oluşturmaya ve buna bağlı reseptör fosforilasyonuna yol açıyor olabileceğidir. Bir heparan sülfat proteoglikan CD44'ün hücre yüzeyinde yer alıp büyüme faktörü reseptörlerine bağlanarak reseptörlerin aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyondaki heparin de benzer bir mekanizma ile c-Met fosforilasyonuna yol açıyor olabilir. Bu konunun ayrıntılı olarak incelenmesi gerekmektedir.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda HGF-SF/c-Met aracılıklı hücre proliferasyonu ve hücre invazyonu gibi biyolojik süreçlerde, büyüme faktörleri ile kombine çalışan heparan sülfat proteoglikanlar ve heparin arasındaki ilişkinin önemini, HCC modelinde inceledik.

İlk olarak SKHep1 hücre dizisinde heparinin HGF ile uyarılan hücre proliferasyonunu ve invazyonunu doz bağımlı olarak baskıladığı belirlendi.

Bu inhibitör etkinin mekanizmasının belirlenmesi amacı ile mikroarray çalışması yapıldı. Mikroarray çalışmasının sonucunda gerçekleştirdiğimiz biyoinformatik analizler ve literatür çalışmaları sonrasında ekspresyonu anlamlı değişen genlerden Egr1 geni aday olarak seçildi.

HGF ile uyarılan Egr1 ekspresyonunun heparin varlığında baskılandığı, Egr1'in c-Met hedef genlerinden biri olup c-Met fosforilasyonu sonrası uyarılan ERK1/2 fosforilasyonu ile aktive olduğu belirlendi.

Heparinin HGF tarafından uyarılan MMP9 sekresyonunu blokladığı saptandı. Bu veri MMP9 un heparinin hücre invazyonunu baskılayıcı etkisinden sorumlu olabileceği düşündürdü.

Dokuz HCC hücre dizisinde Egr-1 ekspresyonlarını incelediğimizde, verilerimiz Egr1 ekspresyonunun HCC'deki epitelyal-mezenşimal geçişte (EMT) rol alabileceğini destekledi.

Bu veriler gelecekte yapmayı planladığımız Egr-1 in sessizleştirilmesi ve overeksprese edilmesine yönelik çalışmalarımız doğrultusunda değerlendirilecek ve heparinin ve Egr-1 in HCC gelişimindeki rolü incelenecektir.

7.KAYNAKLAR

- ¹ Farazi P.A., DePinho RA., Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment , Nature Reviews Cancer 2006; 6: 674-687.
- ² Ozturk M., Cetin-Atalay R. Biology of Hepatocellular Cancer. In: Gastrointestinal Cancers: Biology, Diagnosis and Therapy, 2 nd Edition New York, Lippincott-Raven Press, 2003, 575-596,
- ³ Breuhahn K. , Longerich T., Schirmacher P., Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. Oncogene, 2006;26:3787-800
- ⁴ Furge K. A., Zhang Y. W., Vande Woude G. F. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. Oncogene, 2000;19: 5582-5589
- ⁵ Smorenburg S. M., Noorden V., C., The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies . Pharmacological Reviews , 2001;53:93-105
- ⁶ Rubin, J. S., Day, R. M., Breckenridge, D., Atabey N., and et all., Dissociation of Heparan Sulfate and Receptor Binding Domains of Hepatocyte Growth Factor Reveals That Heparan Sulfate-c-Met Interaction Facilitates Signaling. J. Biol. Chem. 2001; 276: 32977-32983
- ⁷ Ciglidag D, Cokakli M, Atabey N, Cell-extracellular matrix interactions modulate HGF induced adhesion, proliferation, motility and invasion of HCC cells, FEBS JOURNAL, 2006;273: 103-104 Suppl. 1,
- ⁸ Adamson E.D., Mercola D. Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival Tumor Biol., 2002; 23:93–102
- ⁹ Entrez Gene, www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene
- ¹⁰ Kawai-Kowase K, Kurabayashi M, Hoshino Y, Ohyama Y, Nagai R. Transcriptional activation of the zinc finger transcription factor BTEB2 gene by Egr-1 through mitogen-

activated protein kinase pathways in vascular smooth muscle cells *Circ Res.*, 1999;85:787–795

¹¹ Houston P, Campbell CJ, Svaren J, Milbrandt J, Braddock M: The transcriptional corepressor NAB2 blocks Egr-1-mediated growth factor activation and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:480–486.

¹² Grotegut S., Schweinitz von D., Christofori G., Lehembre F., Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1 mediated upregulation of snail, *The EMBO Journal*, 2006;25:3534-3545.

¹³ Szabo I.L., Pai R., Soreghan B., Jones M.K., and et all., NSAIDs inhibit the activation of egr-1 gene in microvascular endothelial cells. A key to inhibition of angiogenesis? *Journal of Physiology-Paris*, 2001;95: 379-383

¹⁴ Svaren J, Severson BR, Apel ED, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J: NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol*, 1996;16:3545–3553.

¹⁵ Eid MA, Kumar MV, Iczkowski KA, Bostwick DG, Tindall DJ: Expression of early growth response genes in human prostate cancer. *Cancer Res*, 1998;58:2461–2468.

¹⁶ Huang RP, Fan Y, de Belle I, Niemeyer C, Gottardis MM, Mercola D, Adamson ED: Decreased Egr-1 expression In human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int J Cancer*, 1997;72:102–109.

¹⁷ Liu C., Rangnekar V. M., Adamson E., Mercola D. Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1. *Cancer Gene Ther.*,1998; 5: 3-28

¹⁸ Garabedian EM, Humphrey PA, Gordon JI: Atransgenic mouse model of metastatic prostate cancer originating from neuroendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15382– 15387.

¹⁹ Blackhall F.H., Merry C.L.R. Davies E.J., and Jayson G.C., Heparan sulfate proteoglycan and cancer. *British Journal of Cancer* , 2001;85:1094-1098

²⁰ Iozzo, R. V, Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function". *Annu. Rev. Biochem.*1998;67:609-52

²¹ Bernfield M., Götte M., Park P.W., Reizes O., Lincecum J., and at all. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual Review of Biochemistry* 1999 ;68:729-77

²² Götte M., Park P.W., Reizes O., Lincecum J., and at all. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual Review of Biochemistry* 1999 ;68:729-77

²³ www.med.unibs.it/~airc/hspgs.

²⁴ Kemp L.E., Mulloy B., and Gherardi E., Signalling by HGF/SF and Met: the role of heparan sulphate co-receptors. *Biochemical Society Transactions* ,2006; 34:414–417

²⁵ Tolbert WD, Daugherty J, Gao C, Xie Q, Miranti C and et all. A mechanistic basis for converting a receptor tyrosine kinase agonist to an antagonist. *PNAS*, 2007;104: 14592–14597

²⁶ Nakamura T., Structure and function of HGF. *Prog. Growth Factor Res.*, 1991;3:67-85

²⁷ Mizuno T., Takehara T., Nakamura T., Proteolytic activation of a single chain precursor of hepatocyte roth factor by extracellular serine-protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1991;189:1631-1638

-
- ²⁸ Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, VandeWoude GF and Aaronson SA. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-Met proto-oncogene product, *Science*, 1991; 251:802–804.
- ²⁹ Tahereh K., Birunthi T., Andrew W., Nigel H. and et all. Down-regulation of scatter factor in MRC 5 fibroblasts by epithelial-derived cells *Journal of Cell. Science*, 1992; 101:323-332
- ³⁰ Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., Vande Woude, G. F. Met, metastasis, motility and more. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2003; 4:915-925,
- ³¹ Peschard P., Fournier T.M., Lamorte L., Naujokas M.A. and et all. Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Molecular Cell*,2001;8:995 – 1004
- ³² Gentile A, Trusolino L, Comoglio PM.. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Reviews* , 2008;27: 85-94
- ³³ Breuhahn K. , Longerich T., Schirmacher P., Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2006;26:3787-800
- ³⁴ Levrero M . Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C *Oncogene* 2006, 26;25:3834-47.
- ³⁵ Wu X.Z., Xie G.R., Chen D., Hypoxia and Hepatocellular Carcinoma: The Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma *J. Gastroenterology and Hepatology* 2007;22:1178-1182,
- ³⁶ Levrero M., Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene*, 2006;24: 3834–3847
- ³⁷ Wang XW, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, and et all.,Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology*, 2002;_181–182: 43-47

³⁸ Suriawinata A, Xu R An update on the molecular genetics of hepatocellular carcinoma Seminars in liver disease. 2004;24: 77-88

³⁹Wang XW, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, and et all.,Molecular pathogenesis of human hep atocellular carcinoma. Toxicology, 2002; 181–182: 43-47

⁴⁰ Suriawinata A, Xu R An update on the molecular genetics of hepatocellular carcinoma Seminars in liver disease. 2004;24: 77-88

⁴¹ Morgan T.R., Mandayam S., Jamal M.M. Alcohol and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, 2004;127:87 - 96

⁴² Saffroy R., Lemoine A, Debuire B. Mechanisms of hepatocarcinogenesis. Atlas Genetics, 2006; 8: 373–383.

⁴³ Hao M.W., Liang Y.R., Liu Y.F., Liu L., and et all. Transcription factor Egr1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cell lines. World J. Gastroenterol 2002;8(2):203-207

⁴⁴ McMullen M.R., Pritchard M.T., Wang Q., Millward C.A., and et all., Early growth response1 factor is essential for ethanol-induced fatty liver injury in mice. Gastroenterology, 2005;128:2066-2076

⁴⁵ Hoefler G., Grimmer C., Sukhatme P.V., Sterzel B.R. and et all. Transcription Factor Egr-1 Regulates Glomerular Mesangial Cell Proliferation, JBC, 1996;271: 28306-28310

⁴⁶ Tanaka M, Xiao H, Kiuchi K., Heparin facilitates glial cell line-derived neurotrophic factor signal transduction, Neuroreport. 2002;15:1913-1916

⁴⁷ Gandino L, Longati P, Medico E, Prat M. and et all., Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. J Biol Chem, 1994; 269:1815-1820

⁴⁸ Sambrook and Russel, Molecular cloning a laboratory manuel Volume 3Third Edition Chill Pres, 2001

⁴⁹<http://web.deu.edu.tr/arlab/arlab/calisma/protokoller/jz.pdf>

⁵⁰ Karti SS, Ovali E, Ozgur O, Yilmaz M., and et all., [Induction of apoptosis and inhibition of growth of human hepatoma HepG2 cells by heparin.](#) Hepatogastroenterology; 2003;54:1864-1866

⁵¹ Cho S.J., Kang M.J., Homer J.R., Knag R.H and et all., Role of Early Growth Response 1 (Egr1) in Interleukin-13 induced Inflammation and Remodeling, Journal of Biological Chemistry, 2001;281:8161-8168

⁵² Pritchard M., Nagy L.E., Ethanol-Induced Liver Injury: Potential Roles for Egr1. Alcohol Clin. Exp. Res. 2005;29; 146S-151S

⁵³ Giannelli G., Bergamini C., Fransvea E., Marinosci F., Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) Cells Require Both $\alpha 3 \beta 1$ Integrin and Matrix Metalloproteinases Activity for Migration and Invasion. Laboratory Investigation, 2001;81:613-627

⁵⁴ Wang S.W., Pan S.L., Peng C.Y., Huang D.Y., CHM-1 inhibits hepatocyte growth factor-induced invasion of SK-Hep-1 human hepatocellular carcinoma cells by suppressing matrix metalloproteinase-9 expression, Cancer letters. 2007;257:87-96

⁵⁵ Hahn-Dantona E, Ramos-DeSimone N, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP. Activation of proMMP-9 by a plasmin/MMP-3 cascade in a tumor cell model. Regulation by tissue inhibitors of metalloproteinases. Ann N Y Acad Sci., 1999;878:372-387

⁵⁶ Ramos-DeSimone N., Hahn-Dantona E. , Siple J., Nagase H., Activation of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) via a Converging Plasmin/Stromelysin-1 Cascade Enhances Tumor Cell Invasion, 1999;274: 13066–13076