

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE
MOTİLİTESİNDE PKB/AKT/mTOR SİNYAL
YOLAĞININ ÖNEMİ**

EMİNE ÇELİK

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2008

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE
MOTİLİTESİNDE PKB/AKT/mTOR SİNYAL
YOLAĞININ ÖNEMİ**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

EMİNE ÇELİK

Danışman Öğretim Üyesi: Yrd. Doç. Dr. ESRA ERDAL

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü
tarafından DEU 2007.KB.SAG.27 sayı ile desteklenmiştir.

“Hepatoselüler Karsinoma Hücre Motilitesinde PKB/AKT/mTOR Sinyal Yolağının Önemi” isimli bu tez 21.08.2008 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı

Yrd. Doç. Dr. Esra ERDAL

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Meral SAKIZLI

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Neşe ATABEY

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp

Tıbbi Biyoloji Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Mukaddes GÜMÜŞTEKİN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Farmakoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Genetik Anabilim Dalı

Yedek Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Zeynep SERCAN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Genetik Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
Teşekkürler.....	iv
Tablo Listesi.....	v
Şekil Listesi.....	vi
Kısaltmalar.....	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
GİRİŞ VE AMAÇ	1

BÖLÜM 1.GENEL BİLGİLER	2
1.1. Hepatosellüler Karsinoma	2
1.2 PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı	6
1.3 Ekstrasellüler Matriks (ECM) ve Komponentleri	10
1.4 İntegrinler	12

BÖLÜM 2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
2.1. HCC Hücre Dizileri	15
2.2 Yara İyileşmesi Testi İle Hücre Hareketliğinin İncelenmesi.....	15
2.2.1 Hücrelerin %0.2 Kristal Viole İle Boyanması.....	16
2.3. Western Blotlama.....	16
2.3.1. Kültür Hücrelerinden Total Protein İzolasyonu	16
2.3.2. Protein Miktar Tayini.....	17
2.3.3. SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	17
2.3.4. Proteinlerin Katı Bir Yüzeğe Transferi	18
2.3.5. İmmüno blotlama.....	19
2.4. RNA İzolasyonu.....	20
2.4.1. RNA Miktar Tayini.....	21
2.4.2. c DNA eldesi.....	21
2.4.3. Transkript Düzeyinde Gen Ekspresyonu Analizleri.....	22
2.4.4. RT-PCR.....	23
2.4.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elktroforezi ile Görüntülenmesi.....	24
2.5 Motilite	24

BÖLÜM 3. BULGULAR.....	25
3.1 HCC Hücrelerinde Hareketliliği Değiştiren Etmenler.....	25
3.1.1 HCC hücre hatlarında PI3K/Akt Yolağının Hücre Hareketliliğine Etkisi.....	25
3.1.2. PI3K/Akt sinyal yolağı inhibisyonunun SNU449 hücre motilitesine etkileri....	27
3.1.3. HCC hücre hatlarında ECM' nin Hücre Hareketliliği Üzerindeki Etkisi.....	28
3.1.4 ECM' nin SNU449 Hücrelerinde Hücre Yapışması Üzerindeki Etkisi.....	29
3.2. PI3K/Akt Sinyal Yolağının SNU 449 Hücrelerinde İntegrin Ekspresyonunun Etkisi.....	29
3.3. Kollajen I' in SNU 449 Hücrelerinde İntegrin Ekspresyonunun Etkisi.....	33
3.4. HCC hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağının, ECM bağımlı hücre hareketlilik değişimlerdeki rolü.....	35
3.5. SNU449 hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağının, kollajen1 bağımlı hücre hareketliliği üzerine etkileri.....	37
BÖLÜM 4. TARTIŞMA.....	38
BÖLÜM 5 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
BÖLÜM 6 KAYNAKLAR.....	44
Ek1.....	48

TEŞEKKÜRLER

Öncelikle haklarını ödeyemeyeceğim anne ve babama hiçbir zaman desteklerini benden esirgemedikleri, okumanın ve eğitimin ne kadar önemli olduğunu gösterdikleri, eğitim için her türlü fedakarlığın yapılması gerektiğini bana öğrettikleri, bana yoğun zamanlarımda sabrettikleri ve buraya sığdıramayacağım birçok nedenden dolayı; hayatımı biçimlendirirken örnek aldığım ve bana her zaman güçlü olmam gerektiğini ifade eden ablama; benim ders çalışmam için eve her gelişimde ‘sen dinlen ben sana hemen yemek hazırlayayım’ diyerek hemen mutfığa koşan, uykum gelmesin diye içtiğim kahveleri hazırlayıp bana eşlik eden ve sırdaşım olan babanneme; hayatına girme şansını bana verdiği için Attitom’ a;

Akademik hayata ilk adımlarımı kendisiyle attığım ve yaptığım her işte en iyi olmak için gayret göstermem gerektiğini bana öğrettiği için danışmanım Yrd. Doç. Dr. Esra Erdal’ a,

Her zaman bilgi ve tecrübelerinden yararlanma şansını bana verdiği için Prof. Dr. Neşe Atabey’ e,

Benim için çok değerli ve bir o kadar da önemli olan İmge Kunter ve Sanem Tercan Avcı’ ya,

Desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen Murat Çokaklı’ ya,

Sıkıştığım anda yanına koşup yardım istediğimde her zaman yardımcı olan Dr. Aslı Toylu’ ya,

Ve gülümsemeleri ile beni rahatlatıp hep yanımda olan Peyda Korhan’ a ve Evin Özen’ e,

Beni dinlemekten hiç bıkmayan Dr. Ataç Sönmez’ e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

TABLO LİSTESİ**Sayfa No**

Tablo 1.1: İntegrinlerin ligand özellikleri (41).....	13
Tablo 2.1. Tezde kullanılan hücre dizileri	15
Tablo 2.2. Kullanılan antikolar, dilüsyonları inkübasyonları koşulları.....	19
Tablo 2.3: SDS-PAGE ayırlama jel bileşenleri.....	49
Tablo 2.4. SDS-PAGE istifleme jeli bileşenleri.....	49
Tablo 2.5. SDS-PAGE ayırlama etkinliği	49
Tablo 2.6. İntegrin genlerine özgül olan primer dizileri ve özellikleri.....	22
Tablo 2.7. RT-PCR’ da kullanılan solüsyonlar	23
Tablo 2.8. RT-PCR reaksiyon koşulları	23

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Hepatokarsinogenez sürecinin oluşmasında etkin olan çeşitli risk faktörleri	3
Şekil 1.2. HCC' nin histopatolojik ilerleyişi ve moleküler özellikleri	4
Şekil 1.3. Gelişimde görevli olan sinyal yolları ile onkogenik olduğu bilinen sinyal yollarının HCC ile olan ilişkileri.....	5
Şekil 1.4. Hepatokarsinogenez sürecinde rolü olduğu düşünülen sinyal yolları ve Akt' nin rol aldığı hücresel olaylar	7
Şekil 1.5. İntegrin molekülünün yapısı.....	12
Şekil 2.1. Hücre hareketlilik özelliklerinin değerlendirildiği insört şekli	24
Şekil 3.1. Bazal koşullarda Huh-7, Mahlavu ve SNU-449 hücrelerinde 30µM LY294002' nin yara iyileşmesini üzerine etkisi.....	26
Şekil 3.2. Mahlavu, SNU449, Huh7 hücrelerinde serum varlığında LY294002' nin P-Akt üzerine etkisi.....	27
Şekil 3.3. a. Kontrol b. Kontrol insörtlerde LY294002' nin SNU449 hücreleri üzerine etkisi c. Kontrol insörtlerde LY294002' nin SNU449 hücrelerinde hücre motilitesi üzerine etkisi.....	28
Şekil 3.4 Huh7, Mahlavu ve SNU449 hücre hatlarında ECM bileşenlerinin in vitro koşullarda meydana getirilen yaranın iyileşmesi üzerine etkisi.....	29
Şekil 3.5. ECM bileşenlerinden olan kollajen I' in SNU449 hücrelerinin yapışma özelliği üzerindeki etkisi.....	30
Şekil 3.6 LY294002' nin kollajen I varlığında integrin ekspresyonu üzerine etkisi.....	32
Şekil 3.7. Zamana bağlı olarak SNU449 hücre hatlarında kollajen I varlığında değişen integrin profili.....	34
Şekil 3.8 Mahlavu, SNU449 ve Huh7 hücre hatlarında LY294002 inhibitörünün PI3K/Akt sinyal yolu üzerinde farklı ECM bileşenlerindeki etkisi.....	36
Şekil 3.9. LY294002 inhibitörünün ECM bileşenlerinden kollajen I varlığındaki etkisi.....	37

KISALTMALAR

HCC: Hepatocellular carcinoma (Hepatosellüler Karsinoma)

PI3K: fosfotidilinositol-3-kinaz (phosphoinositol-3 kinase)

PKB: Protein Kinaz B

ECM: Hücre dışı matriksi (Ekstrasellüler matriks)

HBV: Hepatitis B Virus (Hepatit B Virüsü)

HCV: Hepatitis C Virus (Hepatit C Virüsü)

AFB1: Aflatoksin B1

PKB: Protein Kinaz B

PTEN: Fosfataz ve tensin homolog (phosphatase and tensin homolog)

IGFR: Insulin Like Growth Factor (İnsülin benzeri büyüme faktörü)

EGFR: Epidermal Growth Factor (Epidermal büyüme faktörü)

HGF: hepatosit growth factor (hepatosit büyüme faktörü)

FKBP12: FK506 Binding Protein 12 (FK506 bağlama proteini 12)

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

FOX: Forkhead Box

NF_κB: Nuclear Factor Kappa B (Nükleer Faktör Kapa B)

SCLC: Small Cell Lung Carcinoma (Küçük hücreli akciğer kanseri)

HSC: Hepatic Stellate Cell (Hepatik stelat hücreleri)

MFB: Myofibroblast (Miyofibroblast)

PKC: protein kinase C (protein kinaz C)

RTK: receptor tirosine kinase (reseptör tirozin kinaz)

TGF- β: transforming büyüme faktörü β (transforming growth factor)

BSA: Bovine Serum Albumine (Dana Serumu Albumini)

SDS: Sodium Dodesil Sulphate (Sodyum Dodesil Sülfat)

NaF: Sodium Floride (Sodyum Florid)

Na₃VO₄: Sodium ortho-vanadate (Sodyum Orto vanadat)

BCA: Bi-cincronic acid (Bi Sinkronik Asid)

OD: Optik densite

NaCl: Sodium Chloride (Sodyum Klorür)

PMSF: Phenyl-methyl-Sulphonyl (Fenil metil sülfonil)

PBS: Phosphate Buffer Saline (Fosfat Saline Tamponu)

FCS: Fetal Calf Serum (Fötal Sığır Serumu)

TEMED: N,N,N,N Tetramethyl-1,2 diaminoethane

HRP: Horse Reddish Peroksidase

SDS-PAGE: SDS Poliacrilamide Gel Electrophoresis (SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

DMSO: Dimethyl Sulfoxide (dimetil sülfoksit)

PVDF: Polyvinylidene fluoride (Polivinil diflorür)

TBS: Tris-buffered saline (Tris tuz tamponu)

RT-PCR: Reverse-Transcriptase polymerase chain reaction

ÖZET

Hepatosellüler Karsinoma Hücre Motilitesinde PKB/Akt/mTOR Sinyal Yolağının Önemi

Emine Çelik, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 35340, Balcova-Izmir, Türkiye, emine.celik@deu.edu.tr

Karaciğer kanseri, bilinen kanser türleri içinde görülme sıklığı olarak beşinci, ölüm oranı olarak üçüncü sırada yer almaktadır. Oldukça agresif bir tümör olan ve karaciğer kanserlerinin %83' ünü oluşturan hepatosellüler karsinoma (HCC) karaciğer kanserleri arasında en önemli olanıdır. Çeşitli hücre tiplerinde başlıca proliferasyon, apoptoz ve otofaji yanıtlarında önemi bilinmekte olan PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının HCC' de görevli olduğu ve HCC gelişiminde çok önemli bir rol üstlendiği bilinmektedir. Birçok kanser çeşidinde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı, hücrelerin integrin aracılığıyla hücre dışı matrikse (ECM)' e bağlantı kurmaları sonucunda uyarılabilmekte olup ECM bileşenleri varlığında, HCC hücre hatlarının hareket etme mekanizmaları ve bu mekanizmalarda PI3K sinyal yolağının etkisi tam olarak bilinmemektedir.

Çalışmamızda farklı aktif Akt seviyesine sahip olan üç HCC hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hatlarında ECM bileşenleri varlığında PI3K'e özgül LY294002 inhibitörü kullanılarak hücre hareketliliklerine yara iyileşmesi ve/veya özel motilite/invazyon düzenekleri ile bakılmıştır. İntegrin ekspresyon profillerindeki değişiklikler RT-PCR yöntemi ile incelenmiştir.

Kullanılan hücre hatlarında ECM bileşenlerinin hücre hareketliliğini arttırdığı gözlenirken LY294002' nin bu etkiyi engellediği tespit edilmiştir. Zamana ve kollajen I varlığına bakıldığında Beta4, alfa1, alfa2, alfa4 integrinlerin ekspresyon profillerinde değişikliklerin olduğu gözlenmiştir. Kollajen I varlığında integrin alfa1 ekspresyonunun artış gösterdiği ve bu artışın LY294002 inhibitörü ile baskılandığı da bulunmuştur.

Çalışmamızda HCC hücrelerinde PI3K sinyal yolağının kollajen I uyarımlı hareketlilikte başlıca integrin alfa1 ekspresyonuna bağımlı etkisi olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hepatosellüler Karsinoma, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı, hücre dışı matriks (ECM), integrin

ABSTRACT

Importance of PKB/Akt/mTOR Signalling Pathway in Motility of Hepatocellular Carcinoma Cells

Emine Celik, Dokuz Eylul University, School of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics, 35340, Balçova-Izmir, Turkey, emine.celik@deu.edu.tr

Liver cancer is the fifth most frequent cancer and the third cause of tumor-related death in the world. Hepatocellular carcinoma (HCC) is a very aggressive tumor. Its incidence is %83 among the liver cancers. PI3K/Akt/mTOR signalling pathway controls proliferation, apoptosis and autophagy of the cells. Moreover this pathway has a role in HCC occurrence and development. Cells adhere the extracellular matrix (ECM) by their integrins and this adhesion stimulates PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. The importance of PI3K signalling on cell motility in HCC cells has not been well established.

In our experiments we used three different cell lines (Huh7, SNU449, MV) which have different activated Akt levels. We studied the effect of LY294002, which is the specific inhibitor of PI3K, on cell motility in the presence of ECM components. In order to examine the effect of LY294002 on cell motility, we used wound healing assay and motility/invasion chambers. Furthermore Reverse-Transcriptase polymerase chain reaction was performed to determine in three HCC cell lines.

ECM components increase cell motility in these three cell lines. LY294002 has an opposite effect on cell motility. It has been observed that expression profiles of beta 4, alpha 1, alpha 2 and alpha 4 integrins have changed as in time and presence of collagen I dependent manner.

Our results indicate that the presence of collagen I might increase integrin alpha 1 expression by activating PI3K signalling pathway in HCC cell lines studied.

Key words: Hepatocellular Carcinoma, PI3K/AKT/mTOR signalling pathway, extracellular matrix, integrin

GİRİŞ VE AMAC

HCC çok agresif bir tümör olmakla beraber yılda yaklaşık olarak bir milyon yeni olgunun tespit edildiği bir kanser çeşididir (3, 4, 5). Hepatokarsinogenez sürecinin başlamasında etkin olan çeşitli risk faktörleri bulunmaktadır (1,4,5). Risk faktörlerine bağlı olarak HCC' de birçok moleküler değişiklikler meydana gelmektedir. Bunlardan en önemlileri hücre sinyal yollarında meydana gelen değişikliklerdir. HCC' de görevli olduğu ve HCC gelişiminde çok önemli bir rol üstlendiği bilinen sinyal yollarından bir tanesi PI3K/Akt sinyal yoludur (10).

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının çeşitli hücre tiplerinde başlıca proliferasyon, apoptoz ve otofaji yanıtlarında önemi bilinmektedir. Bu yolağın ana oyuncularından olan Akt (aynı zamanda protein kinaz B ya da PKB olarak da bilinir), moleküler ağırlığı 59 kDa olan bir serin/treonin kinazdır (11, 12, 13). Akt' ın HCC' deki rolü henüz bir açıklık kazanmamakla beraber yapılan çalışmalarda HCC' lere fosforile Akt' nin varlığının 12 kat arttığı tespit edilmiştir (14). Birçok kanser çeşidinde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının, hücrelerin integrin aracılığıyla ECM' ye bağlantı kurmaları sonucunda uyarıldığı bilinmektedir (19).

Normal karaciğerde ECM göreceli olarak dokuda %3' lük bir alan kaplamaktadır ve yaş ağırlığın yaklaşık olarak % 0,5' ini oluşturmaktadır. Karaciğerde gözlenen değişik yapıdaki kronik karaciğer yaralanmalarına karşı bir cevap olarak fibrogenез veya ECM değişiklikleri meydana gelmektedir. Normal yapıdan fibrotik bir karaciğere geçiş için ECM' de hem miktar olarak hem de içerik olarak değişiklikler meydana gelmelidir. Yapılan çalışmalar hepatik stelat hücrelerin bu olayda rol oynadığını göstermektedir. Hepatositler ve hepatik sinusoidal hücreler gibi diğer hücre tipleri ECM üretimi için daha az katkıları bulunmaktadır (20, 21). ECM bileşenlerinden kollajen I hepatosellular karsinoma (HCC) gelişiminde dikkat çeken en önemli moleküllerden biridir (23).

Bu çalışmada yapılması hedeflenen ECM bileşenlerinden kollajen I' e bağlı olarak PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının HCC hücrelerinde motilitede meydana getirdiği

değişikliklerin tespit edilmesidir. Bu etki mekanizması HCC' de tedavi için kullanılabilir olacak önemli bir basamaktır.

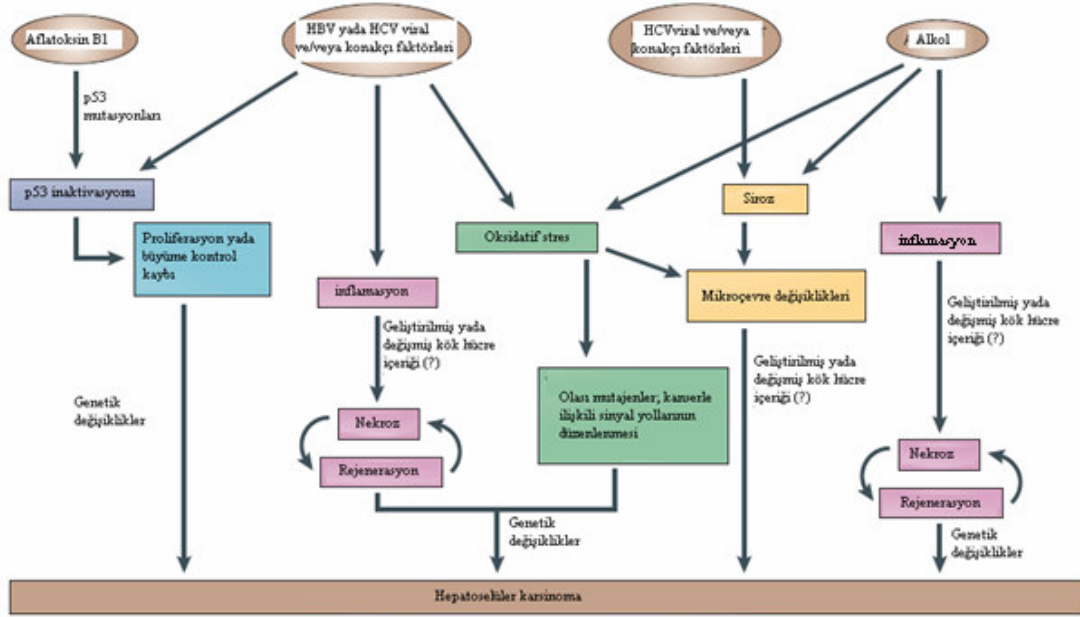
GENEL BİLGİLER

Karaciğer kanseri, bilinen kanser türleri içinde görülme sıklığı olarak beşinci, ölüm oranı olarak üçüncü sırada gösterilmektedir (1). Hepatosellüler karsinoma (HCC), kolanjiyokarsinoma, hepatoblastoma, hemangiokarsinoma, hemangioendotelyoma gibi çeşitleri olan karaciğer kanserleri içinde HCC gözlenen tüm kanserlerin % 83' ünü oluşturmaktadır ve karaciğer kanserlerinden en önemli olanıdır (2).

1.1 Hepatosellüler Karsinoma (HCC)

HCC yılda yaklaşık olarak bir milyon yeni olgunun tespit edildiği (3, 4, 5) oldukça agresif bir tümördür. HCC' nin tedavi yöntemlerinden olan cerrahi girişimler ve karaciğer nakli, ancak küçük bir oranı oluşturan ve erken dönem tümörlere sahip olan hastalara uygulanabilmektedir (3, 6, 7). HCC olgularının %70-90' ı kronik karaciğer hasarına ve sirotik zemine bağlı olarak meydana gelmektedir. HCC' nin görülme sıklığı coğrafik konuma ve cinsiyete bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (1, 5).

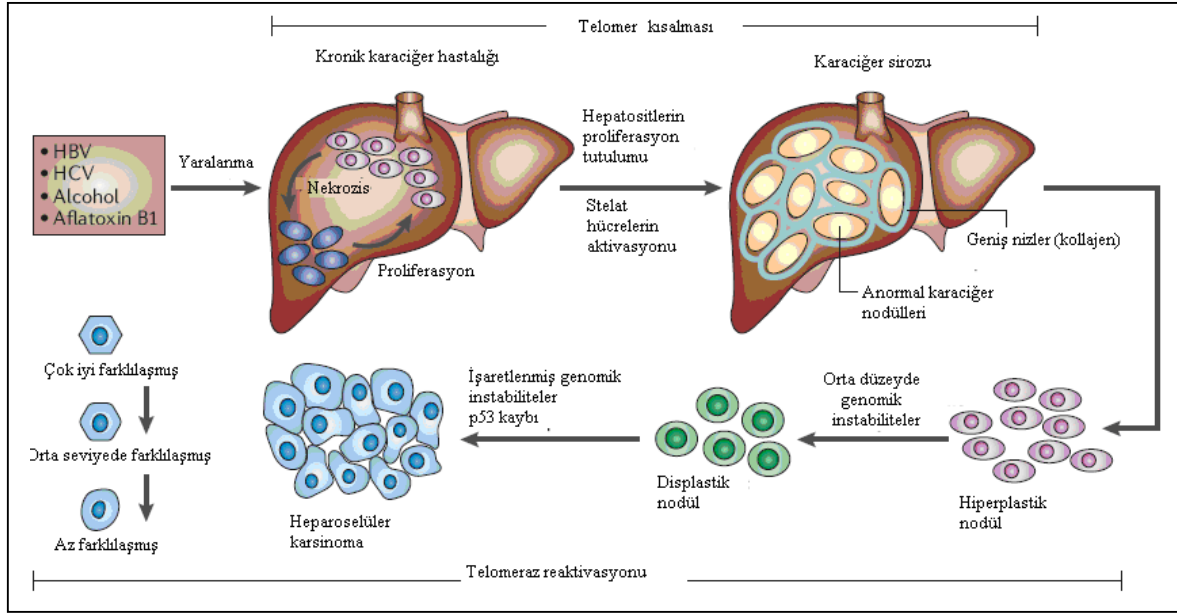
HCC oluşumunda etkin olan başlıca risk faktörleri Şekil 1.1' de gösterildiği gibi hepatit B (HBV) ve hepatit C virüsü (HCV), alkol ve aflatoksin B1 (AFB1)' dir (1,4,5). Bütün bu risk faktörlerinin karaciğerde başlıca, enflamasyon ve hücre dışı matriks (ECM) yapısının değişimine sebep oldukları ve böylelikle hepatosellüler karsinogenez sürecine zemin hazırladıkları düşünülmektedir. Yine bu risk faktörlerinin normal hücre çoğalmasını arttırıcı yönde görev alan önemli bazı genlerin mutasyonunu tetiklediği gösterilmiştir (2, 8). Örneğin aflatoksine bağlı olan HCC olgularında, tümör baskılayıcı bir gen olarak görev alan p53' ün 249. kodonunda bulunan arjinin aminoasidinin serine dönüşmesine sebep olan bir mutasyon tanımlanmıştır (9). Farklı etiyolojik faktörlere bağlı olan ve tanımlanan önemli moleküler değişiklikler ilaç endüstrisi için önemli olabilmektedir.



Şekil 1.1. Hepatokarsinogenez sürecinin oluşmasında etkin olan çeşitli risk faktörleri

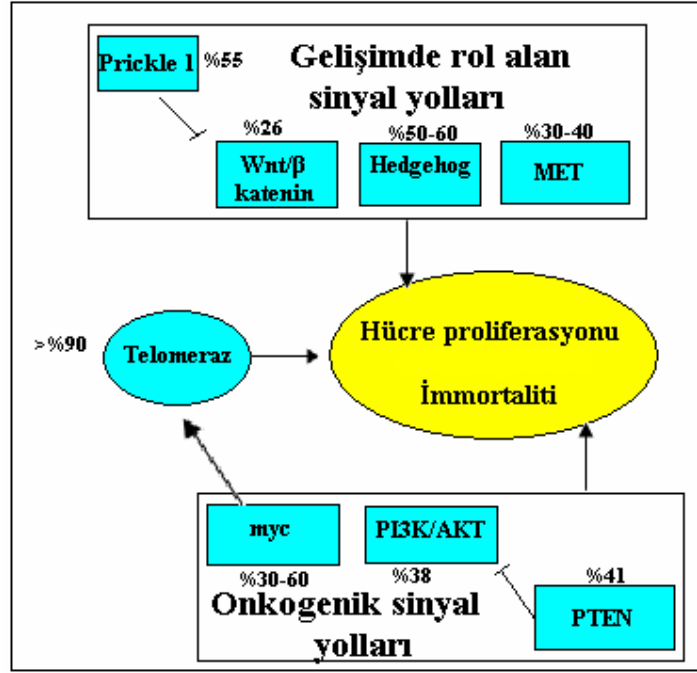
(2)

HCC'nin neoplastik gelişimi histolojik açıdan birçok olayla ilişkilidir. Risk faktörlerine bağlı hücre ölümlerine yanıt olarak karaciğerde gözlenen hepatosit rejenerasyonunda oluşan hiperplastik nodüller sitolojik olarak normal bulgulardır ve HCC oluşumunda ilk basamakta yer almaktadır. Bu lezyonlar pre-malignant displastik nodüllere dönüşebilmekte ve sitolojik olarak iyi tespit edilebilen hücre değişiklikleri ile çekirdek yığılımına sebep olmaktadır. HCC'lerde yapılan moleküler analizler sonucunda çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler tespit edilmiştir (Şekil 1.2) (2).



Şekil 1.2. HCC' nin histopatolojik ilerleyişi ve moleküler özellikleri (2)

Hepatokarsinogenez sürecinin geç evrelerinde gözlenen moleküler değişikliklerden telomer kısalması ve hücre döngüsü kontrolünün ortadan kalkması sonucunda onkogenlerin aktif hale geçtiği ve hücrede önemli olan birçok olayda rol alan sinyal yollarının da sürekli aktif halde bulunduğu bilinmektedir (1). Somatik mutasyonlara bağlı olarak, karaciğer gelişiminde rol oynayan Wnt/ β katenin sinyal yolu HCC' de sıklıkla aktif halde bulunmaktadır. Bununla beraber hedgehog ve c-met protoonkogen/ hepatosit büyüme faktörü reseptörü (MET) sinyal yolu olarak bilinen ve gelişim sürecinde görev alan sinyal yolları da HCC gelişiminde çok önemli rol oynamaktadır. Tümör büyüklüğü ve prognozuyla ilişkisinin olduğu bilinen ve aynı zamanda bir onkogen olan myc de HCC' de mutasyonu sık rastlanan bir moleküldür (Şekil 1.3) (10).



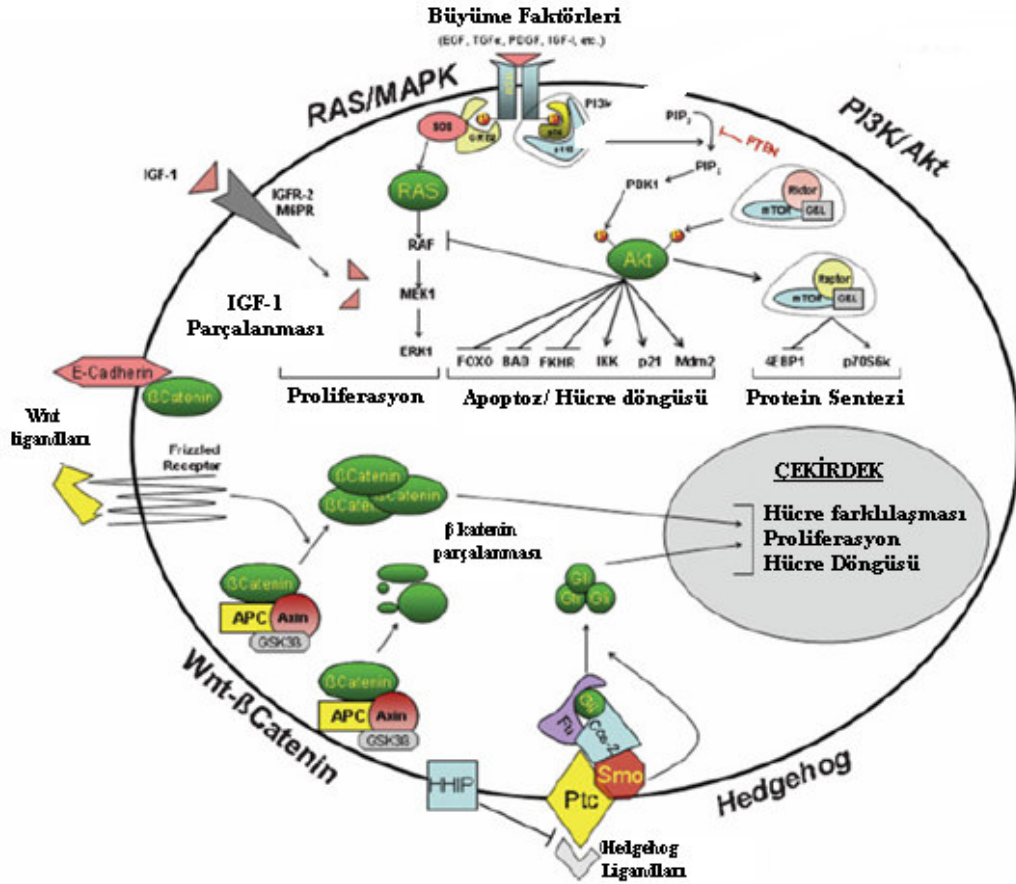
Şekil 1.3. Gelişimde görevli olan sinyal yolları ile onkogenik olduğu bilinen sinyal yollarının HCC ile olan ilişkileri (10)

HCC’ de görevli olduğu ve HCC gelişiminde çok önemli bir rol üstlendiği bilinen diğer sinyal yolu da PI3K/Akt sinyal yoludur. PI3K/Akt sinyal yolunun aktif olması ve Akt’ nin negatif düzenleyicisi olan PTEN molekülünün ekspresyonundaki azalma HCC olgularının %40-60’ ında rapor edilmiştir. Akt sinyal yolunun aktiflenmesiyle beraber apoptozdan sorumlu olan TGF β (transforming büyüme faktörü β) yolu baskılanmakta ve β katenin sinyal yolunun da aktif hale geçtiği bilinmektedir (10).

1.2 PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı

PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının çeşitli hücre tiplerinde başlıca proliferasyon, apoptoz ve otofaji yanıtlarında önemi bilinmektedir. Bu yolağın ana oyuncularından olan Akt (aynı zamanda protein kinaz B ya da PKB olarak da bilinir), moleküler ağırlığı 59 kDa olan bir serin/treonin kinazdır (11, 12, 13).

PI3K/AKT sinyal yolunda PI3K' nın altında yer alan Akt molekölü, hücre içinde PI3K (fosfotidilinositol 3 kinaz) tarafından iki farklı şekilde aktive edilebilmektedir. Birinci uyarım; IGFR, EGFR, HGF gibi herhangi bir tirozin kinaz reseptörünün ligand bağımlı aktivasyonu, ikinci uyarım ise; PI3K molekölünün sürekli aktivasyonu veya fizyolojik olarak PIP3 sentezinin inhibitörü ve aynı zamanda bir tümör baskılayıcı fonksiyona sahip olan PTEN molekölünün fonksiyonunun kaybı sonucunda meydana gelen uyarımdır. PTEN molekölü birçok kanserde somatik delesyonlarla ve mutasyonlarla tespit edilmiş olan bir tümör baskılayıcı gendir. Yapılan çalışmalarda sirotik zemine bağlı olarak meydana gelen HCC' lerde PTEN mRNA düzeyinin düştüğü gösterilmiştir (14).



Şekil 1.4. Hepatokarsinogenez sürecinde rolü olduğu düşünülen sinyal yollarını ve Akt' nin rol aldığı hücresel olaylar (14)

Hücre içinde Akt aktivasyonunu sağlayan PI3K molekülü katalitik alt birim (p110 α , p110 β ya da p110 γ) ve düzenleyici alt birim (p85 α , p85 β ya da p55 γ) olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. Durağan fazda olan hücrelerde p85, p110 α ' ya bağlanarak p110 α ' nın stabilizasyonunu sağlamakta ve kinaz aktivitesini inaktive etmektedir. Büyüme faktörü uyarısı geldiği anda p85 alt biriminin SH2 domaini (Reus-sarcoma-oncogene homology-2 domain) reseptör tirozin kinazın ya da onların substratı olan adaptör proteinlerin YxxM motifine bağlanarak, p110 α ' nın inhibisyonunu ortadan kaldırarak plazma membranına katalitik alt birimin yerleşmesini ve fosfotidilinositol 4,5 bifosfat (PIP₂)' ı fosforilleyerek 3,4,5-trifosfat (PIP₃) haline dönüşmesini sağlamaktadır. Sonrasında PIP₃, PDK gibi Plecstrin homoloji domaini içeren proteinleri hücre membranına toplamaktadır (14, 15, 16).

Akt' ın HCC' deki rolü henüz bir açıklık kazanmamakla beraber yapılan çalışmalarda HCC' lerde fosforile Akt' nin varlığının 12 kat arttığı tespit edilmiştir (14). Akt yolunun aktiflenmesi apoptozdan sorumlu olan TGF- β ' nın ve büyüme inhibitör aktivitesine sahip olan CCAAT/enhancer bağlanma proteini α ' nın baskılanmasına sebep olmaktadır (1).

PI3K/Akt sinyal yolunun önemli bir düzenleyicisi olan mTOR, besin düzeyini kontrol etmekte ve G1 fazından S fazına geçişi sağlamaktadır. mTOR proliferasyonda ve hücre büyümesinde merkezi bir düzenleyici role sahiptir. Besin yokluğu durumunda mTOR aktivitesi baskılanmaktadır. HCC' lerin bir kısmında mTOR aktivasyonunun çok yüksek olduğu tespit edilmiştir. mTOR sinyal yolağının rapamisin ile bloke edilmesi sonucunda HCC hücre hatlarının büyümesinde inhibe ettiği gösterilmiştir (14). Rapamisin bir makrolid antibiyotiktir ve küçük bir hücre protein olan FKBP12 (FK506 binding protein 12) ile etkileşime girmektedir. Rapamisin- FKBP12 kompleksi kinaz TOR' a bağlanarak TOR-Raptor bağlanmasına ve TOR-Raptor hedeflerinin fosforillenmesine engel olmaktadır. TOR protein sentezini kontrol eden birçok ve çeşitli fonksiyona sahiptir. TOR, POLI ve POLIII bağımlı transkripsiyonu düzenlemektedir. Aynı zamanda kısa süreli S6K ve 4EBP ailesi proteinlerini de fosforilleyerek protein sentezini düzenlemektedir. S6K protein sentezi ve hücre büyüklüğünün kontrolü için pozitif bir düzenleyicidir. 4EBP proteinleri ise protein sentezinde negatif düzenleyiciler olarak görev almaktadır (15).

PI3K/AKT sinyal yolağı hücre büyümesinden sorumlu olan transkripsiyon faktörlerinin bir kısmını da kontrol etmektedir. İki önemli örnek forkhead box (FOX) proteinleri ve nükleer faktör κ B (NF κ B) proteindir (15). PI3K/Akt sinyal yolunun etkilediği diğer bir molekül de aktin organizasyonu, gen ekspresyonu ve hücre proliferasyonu gibi biyolojik olayları düzenleyen Rac proteindir. Akt; Rac' ı, PTEN' i inaktive ederek aktif hale getirmektedir ve bu inaktivasyonun fibroblastlarda migrasyonun düzenlenmesinde etkin olduğu bilinmektedir (17, 18).

Rho ailesine ait olan Rho, Rac ve Cdc-42 molekülleri hücre için önemli olan çeşitli sinyal yollarında rol alır. RhoA aktivitesi stres fiberlerin ve fokal adezyonların yapılımasını düzenlemektedir. Rac molekülü ise lamellipodyumları ve membran hareketini düzenlemektedir. Bu yapıların düzenlenmesi hücre göçü için önemlidir. Rho GTPaz' ları ve

PIP2 molekülleri, aktin dinamiklerinin düzenlenmesinde önemlidir ve bir hipotez olmakla beraber Rho proteinlerinin etkilerini PIP metabolizması ile yaptığı düşünülmektedir. PI3K 'nın moleküler inhibitörü olan LY294002' nin hücrelere uygulanması sonucunda Rac aktivasyonunun ve lamellipod yapısıyla membran hareketlerinin arttığı gözlenmektedir. Aynı zamanda inhibitörün uygulanması sonucunda hücrelerde proliferasyonun ve transformasyonun arttığı gösterilmiştir (17).

Birçok kanser çeşidinde PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının, hücrelerin integrin aracılığıyla ECM' ye bağlantı kurmaları sonucunda uyarıldığı bilinmektedir. Örneğin; kolon kanseri hücreleriyle yapılan bir çalışmada integrin $\alpha 5$ ve P-Akt seviyeleri arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ve kolon kanseri hücrelerinde, P-Akt ve integrin $\alpha 5$ ekspresyonunun yüksek olduğu bilinmektedir. İntegrin $\alpha 5$ ' in ekspresyonunda bir baskılanma söz konusu olduğunda hem integrin $\alpha 5$ ekspresyonu azalmakta hem de P-Akt protein miktarında azalma gözlenmektedir. Buna bağlı olarak integrin $\alpha 5$ in baskılanması sonucunda kolon kanseri hücrelerinin hücre adezyon özelliklerinde azalma, apoptoza gitmelerinde ise artış olduğu saptanmıştır. Azalan integrin ekspresyonu ve buna bağlı olarak azalma gösteren PI3K/Akt sinyal yolu aktivasyonu hücrelerin integrin bağımlı hareket etme özelliklerini PI3K/Akt sinyal yolu üzerinden gösterdiği tespit edilmiştir (19). Benzer çalışmalar küçük hücreli akciğer kanserine (SCLC) ait hücrelerle de yapılmış ve aynı sonuçlara ulaşılmıştır.

Normal karaciğerde ECM göreceli olarak dokuda %3' lük bir alan kaplamaktadır ve yaş ağırlığının yaklaşık olarak % 0,5' ini oluşturmaktadır. Karaciğerde gözlenen değişik yapıdaki kronik karaciğer yaralanmalarına karşı bir cevap olarak fibrojenез veya ECM değişiklikleri meydana gelmektedir. Normal yapıdan fibrotik bir karaciğere geçiş için ECM' de hem miktar olarak hem de içerik olarak değişiklikler meydana gelmelidir. Yapılan çalışmalar hepatik stelata hücrelerin bu olayda rol oynadığını göstermektedir. Hepatositler ve hepatik sinusoidal hücreler gibi diğer hücre tipleri ECM üretimi için daha az katkıları bulunmaktadır (20, 21).

1.3. ECM ve Komponentleri

ECM; proteinlerle, glikozaminoglikanlarla ve diğer makromoleküllerle iletişim kurabilen üç boyutlu bir yapıya sahiptir. Temel görevleri; hücre adhezyonunu, migrasyonunu, proliferasyonunu ve canlılığını sağlamaktır. Ekstrasellüler matriks vücutta bütün dokularda bulunan hücreleri çevreleyen karmaşık bir yapıdır. Biyokimyasal yapısı dokudan dokuya farklılık göstermektedir (22).

Karaciğerdeki ECM komponentleri, kollajen, kollajen olmayan glikoproteinler, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar, matrikse bağlanan büyüme faktörleri ve matriselüler proteinleridir. 20 farklı kollajenden tip I, III ve V normal bulunan ECM' nin gerçek bileşenleridir (23). Normal ve sirotik karaciğerde ECM üreten hücreler hepatik stelat hücreleri (HSC) ve miyofibroblastlardır (MFB). Normal karaciğer parankimasında ECM üç ana bölümde bulunur; portal sistemde, santral ven/venüllerde ve sinoizoidler çevresindeki Disse boşluğunda. Karaciğerde bulunan destek doku daha çok fibriler kollajenleri (en çok I ve III), düşük miktarda kollajen V, VI, XIV, fibronektin, elastin, dekorin, tenaskin-C içermektedir. Fibriller kollajen olan tip I, III ve V çok önemli ECM bileşenleridir. Tip IV kollajen ise tipik olarak subendotelial lokasyonda bulunmaktadır. Burada bazal membran glikoproteinleri olan laminin, nidojen/entaktin ve fibulin ile ilişki içerisindedir. Bu durumun tersi olarak, sinoizoidler çevresindeki Disse boşluğunda yapısal ve moleküler karakter açısından karaciğer için eşsizdir (23).

Hepatositler ve sinusoidal endotelial hücreler arasında gevşek bir yapıya sahip ECM bileşenleri bulunmaktadır. Bu bileşenlerden; kollajen IV ve laminin, perlekan, nidojen/entaktin gibi diğer bazal membran proteinleri diğer organlarda gözlenmeyen bir şekilde kılcal damarları kaplamaktadır. Bu kollajenler tarafından oluşturulan gevşek yapı, sürekli olmayan endotelium ile ilişki içerisindedir. Bu durum da makromoleküllerin sinusoidal kan ve hepatositler arasında kolayca geçişlerini sağlamaktadır (23).

Karaciğer fibrozu, kronik uyarılara bir cevap olarak yara iyileşmesi sürecinde meydana gelmektedir. Fibrozis, ECM bileşenlerinden olan kollajen tip I' in aşırı miktarda depolanmasıyla karakterizedir. Sağlıklı bir karaciğerde kollajen total karaciğer proteinlerinin

sadece % 5- 10' unu oluşturmaktadır. Siroz sırasında, daha çok fibriller kollajenler (I ve III) olmak üzere bu oran %50' lere ulaşmaktadır. Işık mikroskopunda bakıldığı zaman damarlanma oluşumu sırasında kollajen I ve bazal membran bileşeni olan kollajen IV ve laminin oranında sinoizoidler çevresindeki Disse boşluğunda artış gözlenmektedir. Kollajen I invaziv davranışı yönlendirmekte ve artan kollajen I siroz için büyük önem taşımaktadır. Böylece siroz zemininin artışıyla sağlayarak HCC' nin invaziv özelliğinin artmasını sağlamaktadır (23).

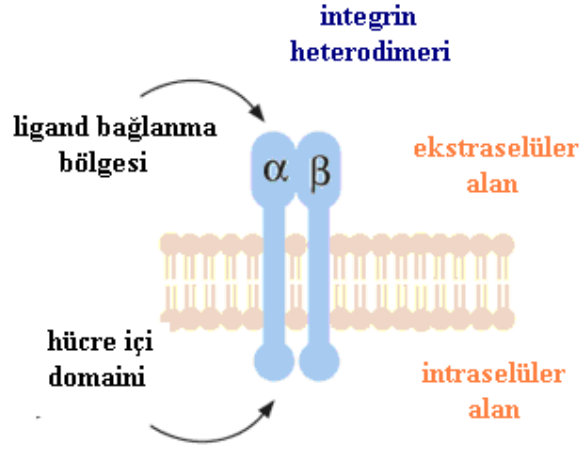
ECM bileşenleri içerisinde önemli olan diğer bileşen fibronektin, çeşitli görevleri olan bir glikoproteindir ve de normal ve fibrotik hepatik ECM' nin en önemli bileşenidir. Fibronektin tekrarlayan dizileri ile kollajen, heparin, fibrin ve integrin gibi çeşitli ligandlara bağlanabilme özelliğine sahiptir. Karaciğerde bir yaralanma söz konusu olduğunda sinusoidal endotel hücreleri fibronektin eksprese etmektedirler (24). Fibronektin HCC' lerde diğer tümörlerden farklı olarak stroma ile çevrelenmemiştir ve tümör hücreleri ile ilişki içerisindedir. Fibronektin normal hepatosit hücreleri tarafından sentezlenmekle beraber iyi diferansiye olmuş tümör hücrelerinde daha çok eksprese edilmektedir. Fibronektin, meydana gelen yaralanma iyileşme sürecinde ve HCC' nin ilerlemesinde önemli bir moleküldür (23).

Tümör hücreleri ve konakçı stroması arasındaki ilişki, HCC' de tümör davranışının belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. İn vitro koşullarda polistren üzerinde kültüre edilen hepatositler yüzeye yapışarak zayıf büyüme özelliği göstermekte ve birkaç gün içerisinde apoptoza gitmektedirler. Eğer kültür yüzeyi kollajen I ile kaplanırsa hepatositler yüzeye çok iyi yapışıp hızlı proliferasyon göstermektedirler. Ama albümin ekspresyonu ve diğer karaciğere spesifik olan proteinler hızlı bir şekilde kaybolmaktadırlar. Bu proteinlerin hücre kültürü ortamındaki ekspresyonu hücrelerin yapıştığı membranda bulunan ECM komponentinin tipine bağlıdır (23).

ECM hücrelerle; hücre membranında bulunan, iyi karakterize edilmiş olan ve matriks reseptörü olarak görev alan integrinlerle etkileşim kurarak iletişim sağlamaktadır (23). Hepatik yaralanmalarda kontraktıl filamentlerin ekspresyonu meydana gelmektedir ve ECM sentezi (özellikle kollajen) artış göstermektedir. ECM bileşenlerinden olan kollajen I integrin gibi bir substrata bağlandığında tümör hücrelerinde invaziv özelliğe sebep olmaktadır (23).

1.4 İntegrinler

İntegrinler, ECM moleküllerinin heterodimerik reseptörleridir, kovalent olmayan bir şekilde birbirine bağlanmış α ve β alt birimlerinden oluşan bir transmembran glikoproteinidir ve her alt birim büyük bir ekstraselüler domaine, membranı bir kez geçen bir domaine ve kısa katalitik olmayan sitoplazmik bir kuyruğa sahiptir (Şekil 1.5) (25).



Şekil 1.5. İntegrin molekülünün yapısı

18 α ve 8 β zincirinin kombinasyonu integrin heterodimerlerini meydana getirmektedir ve en az 25 farklı kombinasyon meydana gelmektedir. (26, 25).

Tablo 1.1: İntegrinlerin ligand özellikleri (27)

İntegrinler	Ligandlar
$\beta 1$ $\alpha 1$	Kollajen, laminin
$\alpha 2$	Kollajen, laminin
$\alpha 3$	Fibronektin, laminin, kollajen
$\alpha 4$	Fibronektin (kesilen domainine)
$\alpha 5$	Fibronektin (RGD-içeren domainine)
$\alpha 6$	Laminin
$\alpha 7$	Laminin
$\alpha 8$	Fibronektin, vitronektin
$\alpha 9$	Tenaskin
$\alpha 10$	Kollajen
$\alpha 11$	Kollajen
αv	Vitronektin, fibronektin, osteopontin
$\beta 2$ αL	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
αM	C3b, fibrinojen, ICAM-1, VCAM-1
αX	C3b
αD	ICAM-3, VCAM-1
$\beta 3$ αIIb	Fibrinojen, fibronektin, von Willebrand faktörü, vitronektin, trombospondin
αv	Vitronektin, denatüre kollajen, von Willebrand faktörü, fibrinojen, trombospondin, fibulin, osteopontin Laminin, desmin
$\beta 4$ $\alpha 6$	Vitronektin
$\beta 5$ αv	Fibronektin
$\beta 6$ αv	Fibronektin (kesilen domaini), VCAM-1, MAdCAM-1
$\beta 7$ $\alpha 4$	E-kaderin
αE	Vitronektin
$\beta 8$ αv	

Metastaz yapan kanser hücreleri ve anjiyogenez yapan endotelial hücrelerde ECM' ye karşı bağlantı kurma eğilimi ve birleşme yeteneği artışı gözlenmektedir. Fenotipik değişiklikler integrinlerin ekspresyonlarında meydana gelen değişikliklerden, ECM' nin yapısında değişiklik meydana getiren proteazların salınımından ve yeni ECM moleküllerinin

depolanmasından kaynaklanmaktadır. Bu değişiklikler gen ekspresyonlarının düzenlenmesi, hücre içi iskelet organizasyonu, hücre adezyonu ve hücre sağkalımı ile ilgili olan sinyal yollarını aktif hale getirmektedir (25).

Serin/treonin protein kinaz C (PKC) ailesinde integrine bağımlı sinyal meydana gelmektedir. İntegrinlere fibronektinlerin bağlanmasıyla PKC plazma membran bölgesine yerleşmektedir. Plazma membranına PKC' nin yerleşmesi ile beraber fokal adezyon formasyonu, FAK fosforilasyonu, hücre saçılımı meydana gelmektedir. PKC integrin $\beta 1$ alt birimine bağlanınca enzim ve $\beta 1$ ' in sitoplazmik domaini arasında köprü görevi gören tetraspaninleri tetiklemektedir. Bununla beraber, PKC hücre yüzeyinde integrin $\beta 1$ ekspresyonunu, endositozlarını ve hücre içine geçmelerini, hücre göçünün artmasını sağlamaktadır (27).

İntegrinler matriksle etkileşime girince PI3K sinyal yolağı aktif hale geçmektedir. PI3K' nın SH-2 domaininin FAK ve Src fosfotirozinleri ile etkileşime girmesi sonucunda PI3K plazma membranına gelir ve PI3K yolağı aktiflenir. PI3K sinyal yolağı inhibe edildiğinde hepatik stelat hücrelerin motiliteleri de inhibe edildiğı gözlemlenmiştir. PI3K aktivasyonu kollajen I mRNA' sı ve protein ekspresyonu için önemlidir (27).

HCC' lerde ECM bileşenine bağılı olarak integrin ekspresyonunda değişiklikler meydana gelmektedir. ECM ile integrin arasında ilişki meydana gelmesi sonucunda PI3K/AKT sinyal yolağı aktif hale gelmektedir. Örneğin HCC' lerde değişen ECM yapısına bağılı olarak normal karaciğerde bulunmayan, HCC' de bulunan $\alpha 2\beta 1$ ve $\alpha 3\beta 1$ integrinlerin eksprese edildiğı bilinmektedir (28).

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. HCC Hücre Dizileri

Tezde kullanılacak olan hücreler tablo 2.1' e göre serumlu ortamda P-Akt proteini düzeylerine ve hücre motilite özelliklerine göre seçilmiştir. Bu tabloya göre serumlu ortamda P-Akt protein miktarı ve motilite özelliklerine göre Mahlavu, SNU-449 ve Huh7 hücre hatları seçilmiştir.

Tezde kullanılmış olan hücre dizilerine ait bilgiler Tablo 2.1'de yer almaktadır. Daha önce yapılan çalışmalara göre Mahlavu, Huh7, SNU-449 hücrelerinin serumlu ortamda P-Akt protein miktarı ve hücre motilitesi özellikleri de tabloda yer almaktadır (İmge Kunter, yayınlanmamış veri). Kullanılan HCC hücre dizileri Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından temin edilmiştir.

Tablo 2.1. Tezde kullanılan hücre dizileri

Hücre dizisi	Yaş¹	Tümör Tipi	HBV²	Farklılaşma derecesi	Serumlu ortam P-Akt proteini	Hücre motilitesi
Mahlavu	?	HCC	-	Farklılaşmamış	++++	++++
SNU-449	52	HCC	+	Farklılaşmamış	+	+
Huh7	57	HCC	-	Farklılaşmış	+/-	-

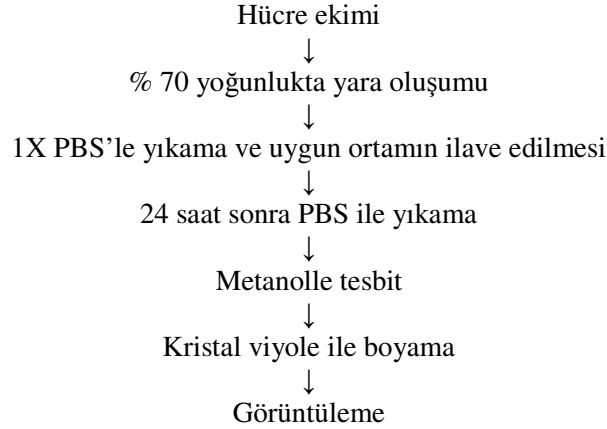
¹ Tümör cerrahisi yapıldığında hastaların yaşı

² HBV DNA'sı varlığı

2.2 Yara İyileşmesi Testi İle Hücre Hareketliğinin İncelenmesi

Hücre çeşidine bağlı olarak hücreler farklı sayıda 35mm ve 60 mm çapındaki ekstraselüler matriks bileşeni ile kaplı olmayan, fibronektin, kollajen-I ve kollajen IV ile kaplı olan hücre kültürü kaplarına % 10 FCS'li ortamda ekilip, % 70 yoğunluğa ulaştıkları anda sarı pipet ucuyla yara oluşturulmuş ve yüzeyden kalkan hücreler steril 1X PBS ile yıkanmıştır. Kalkan hücreler uzaklaştırıldıktan sonra hücre kültür kaplarına üç farklı koşul uygulanmıştır. Koşullardan bir tanesi kontrol amacıyla kullanılan ve %2 FCS içeren ortam, ikinci koşul %2 FCS' li ortam içine PI3K inhibitörü olan ve stok konsantrasyonu 16,3 mM olan LY294002 (Calbiochem, 440202)' den son konsantrasyonu 30 µM olacak şekilde hazırlanan ortam, üçüncü koşul ise LY294002' nin

içinde çözüldüğü DMSO (dimetil sülfoksit)' yu içeren ortamdır. 24 saat sonunda hücre kültür kapları soğuk 1X PBS ile yıkayıp soğuk metanol ile -20 C^0 ' de 5 dakika fikse edilmiş ve % 0,2'lik kristal viyole ile boyanmıştır. Boyanan hücrelerin faz kontrast mikroskopunda fotoğrafları çekilip sayımları yapılmıştır. Deneyin akış şeması şöyledir:



2.2.1 Hücrelerin %0.2 Kristal Viole İle Boyanması

Soğuk metanol ile -20 C^0 ' de 5 dakika fikse edilmiş olan hücrelerin bulunduğu hücre kültür kaplarına yüzeyi tamamen kaplayacak şekilde %0,2 kristal viole eklenip oda sıcaklığında 10 dakika boyama işlemi için beklenmiştir. Ardından kristal viole uzaklaştırılıp hücre kültür kapları distile su ile iyice yıkanmıştır. Hücre kültür kaplarının kuruması beklenmiş ve ardından hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

2.3. Western Blotlama

2.3.1. Kültür Hücrelerinden Total Protein İzolasyonu

SNU449 hücre hattı ECM bileşeni ile kaplı olmayan hücre kültür kaplarına $120 \cdot 10^4$ hücre/10cm çaplı hücre kültür kabı (Greiner bio-one, 664160) olacak şekilde ekilmiştir. %70 yoğunluğa ulaşan hücrelerin ortamı uzaklaştırılıp steril 1X PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkamanın ardından deney koşulları hücrelere uygulanmıştır. Koşulların ilki kontrol olarak kullanılan %10 FCS içeren DMEM ortamı, ikincisi %10 FCS içeren DMEM ortamında hazırlanmış olan $30\ \mu\text{M}$ konsantrasyonda LY294002 içeren DMEM ortamı, üçüncü koşulda LY294002'nin çözücüsü olan DMSO' yu içeren koşuldur. Koşullar sağlandıktan 24 saat sonra total protein izolasyonu yapılmıştır. Total protein izolasyonu için şu yöntem kullanılmıştır.

Deney süreleri dolan hücre kültür kaplarında bulunan hücreler 100 μM Na_3VO_4 içeren soğuk 1X PBS ile 3 kez yıkanıp yine 100 μM Na_3VO_4 içeren 500 μl PBS içerisinde hücre kazıyıcılarla kazınarak, 1,5 ml' lik ependorf tüplerin içine toplanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu 200 g de 5 dakika santrifüjlenip üst faz uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti üzerine, pelletin yaklaşık olarak 3-4 katı kadar buzda soğutulmuş NP-40 liziz tamponu (bkz Ek1) eklenip pipetlenmiştir. Buz üzerinde 5 dakika aralıklarla karıştırılarak 30 dakika bekletilen örnekler +4 °C' de soğutulmuş santrifüjde 15700 g de 15 dakika santrifüjlendikten sonra total hücre proteinini içeren üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve elde edilen proteinlerin protein miktarı belirlenip, daha küçük hacimlere ayrılarak -80 °C' lik buzdolabında daha sonra kullanılmak üzere dondurulmuştur.

2.3.2. Protein Miktar Tayini

Protein miktarlarının belirlenmesi için BCA Protein Assay Kiti (Pierce, 23225) kullanılmıştır. Her bir tüpte farklı miktarlarda stok BSA (Pierce, 23209), BCA ve ddH₂O bulunmaktadır. Miktar tayini yapılacak olan toplam protein lizatlarının her birinden 2 μl alınıp, ddH₂O ile önce 100 μl ' ye tamamlanıp ardından BCA ile 1ml'ye tamamlanmıştır. Reaksiyonun gerçekleşmesi için protein miktar tayininde kullanılacak BSA+BCA+ ddH₂O ile 2 μl + BCA+ ddH₂O karışımları 60 °C' de 15 dakika inkübe edilmiştir. Isı etkisiyle protein miktarlarına bağlı olarak meydana gelen reaksiyon sonucunda renk değişimlerinin optik densiteleri (OD), atılabilen plastik spektrofotometre küvetleri kullanılarak (Brand 759220) 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000) kör baz alınarak ölçülmüştür. Bilinen BSA konsantrasyonlarına karşı spektroda okunan OD değerleri kullanılarak çizilen standart doğrusal grafikten elde edilen matematiksel formül kullanılarak diğer örneklerdeki bilinmeyen protein miktarları hesaplanmıştır (bkz Ek1).

2.3.3. SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi

BioRad mini protein elektroferez sistemi (Mini-PROTEAN Electrophoresis Cell 165-3301) tarife uygun şekilde hazırlanmıştır. Kullanılacak olan jel hacmi yine kılavuza göre karar verilmiştir. Bir falkon tüp içinde Tablo 2.3' teki gibi % 10'luk ayırıcı jel (seperasyon jeli)

içerikleri karıştırılarak hazırlanmış ve iki cam arasına dökülmüştür (bkz Ek1). Jelin üzeri dH₂O'ya doyurulmuş saf izoamil alkol eklenerek havayla teması kesilmiştir ve jelin katılaşması beklenmiştir. Ayırıcı jelin içereceği poliakrilamid konsantrasyonuna Tablo 2.4' te gösterilen şekilde bakılacak olan proteinin büyüklüğüne göre karar verilmiştir (bkz Ek1). Ayırıcı jel katılaşınca üzerindeki izoamilalkol dökülmüş ve Tablo 2.5' te gösterildiği gibi % 5'lik istifleme jeli (Staking jeli) hazırlanıp camlar arasına, ayırıcı jelin üzerine dökülmüştür (bkz Ek1). Uygun kalınlığa sahip olan taraklar camların en üst kısmına uygun şekilde yerleştirilip istifleme jelinin katılaşması beklenmiştir. İstifleme jeli donduktan sonra tarak yavaşça çıkarılmış ve kuyucuklar polimerize olmayan akrilamidi uzaklaştırmak için elektroforez işleminde kullanılan yürüme tamponu ile yıkanmıştır.

Konsantrasyonları belirlenmiş örneklerden eşit miktarlardaki proteinler, % 10 β-ME (Applichem, A1108,0100) içeren 2X yükleme tamponu ile son konsantrasyon 1X olacak şekilde karıştırılıp, 95 °C' de 5 dakika kaynatılmıştır. Kaynatılan örnekler oda sıcaklığına gelince 2300 g de 5 saniye karıştırılmıştır ve tanka yerleştirilmiş tris-glisin elektroforez yürüme tamponu içerisindeki jellerin kuyularına yüklenmiştir. Bir kuyuya da proteinlerin büyüklüklerini tahmin etmek amacıyla içinde bilinen büyüklüklerde çeşitli proteinler bulunan önceden boyalı büyüklük belirteci (prestained size marker) (MBI Fermantas SM0671) yüklenmiştir. Örnekler istifleyici jelin sonuna kadar 70V'da, ayırıcı jelde ise 110 V sabit gerilimde 2-3 saat yürütülmüştür.

2.3.4. Proteinlerin Katı Bir Yüzeğe Transferi

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra eldiven giyilerek her jel başına uygun büyüklükte 1 adet PVDF membran (Sigma, P2563-10EA) ve 4 adet Whatmann kağıdı kesilmiştir. PVDF membran kullanılmadan önce 30 saniye metanol içerisinde bekletilip dH₂O ile 1-2 saniye yıkanmıştır. Membran ve whatmann kağıtları Tris-Glisin transfer tamponu içinde en az 10 dakika bekletilmiştir. Yürütme tamamlandığında jel camlar arasından çıkarılıp 1-2 dakika aynı tampona konulmuştur.

Yarı-kuru transfer cihazına (Hoefler SemiPhor- Pharmacia Biotech) sırasıyla 2 adet Whatmann, jel, PVDF membran ve 2 adet Whatmann kağıtları yerleştirilmiştir. Katmanlar

arasındaki hava kabarcıkları çıkartılmıştır. Cihaz kapatılıp, elektrotları takıldıktan sonra, jelin ³ mm 'ü başına 3.5 - 5.5 mA olacak şekilde akım geçirilerek 12 V civarında, 50 dakika transfer gerçekleştirilmiştir.

2.3.5. İmmünoblotlama

Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membran hemen TBS içerisine konulmuştur. Blotlama sırasında özgül olmayan bağlanmaların engellenmesi için membran % 0.5 Tween-20 içeren TBS-T tamponu ile hazırlanan % 6'lık süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edilerek bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. Belirlenmek istenilen proteine karşı özgün olarak üretilmiş antikolar (primer antikor), %3 süt tozu içeren TBS-T içinde optimizasyon sonrasında belirlenmiş konsantrasyonlarda olacak şekilde dilüsyonları yapılmış ve +4 °C'de gece boyunca ya da oda ısısında 1 saat yavaşça çalkalanarak inkübe edilmiştir. Bu işlemin ardından membran en az 6 kere 10'ar dakikalık aralıklarla düşük hızda yıkanmıştır. Daha sonra primer antikorun elde edildiği hayvana karşı ve ucunda HRP enzimi takılı antikorun yine %3 süt tozu içeren TBS-T kullanılarak optimize dilüsyonları yapılmış ve 1 saat oda ısısında yavaşça çalkalanarak inkübe edilmiştir. Primer antikor sonrasında yapılan yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Kullanılan antikora ait bilgiler ve optimize edilmiş dilüsyon koşulları Tablo 2.6.' da özetlenmiştir.

Tablo 2.6. Kullanılan antikolar, dilüsyonları ve inkübasyon koşulları

Firma/Katalog no	Köken	Antikor Adı	Dilüsyon	İnkübasyon Koşulları
Cell Signaling - 4051	Fare	α - P-Akt Ser 473	1/1000	+4 °C'de gece boyunca
Cell Signaling-9272	Tavşan	α -Akt	1/1000	+4 °C'de gece boyunca
Santa Cruz Sc-11397	Tavşan	α - Kalneksin	1/7500	Oda ısısı, 1 saat

Tüm yıkamaların ardından Pierce (West Dura Extended Duration Substrate, 34075) görüntüleme kiti kullanılarak bantlar görüntülenmiştir. Membran 5 dakika solüsyon karışımıyla muamele edildikten sonra naylon içerisine alınmıştır. Işımaya duyarlı Kodak (5256441) filmi naylon içerisindeki membran üzerinde, kasette kapalı şekilde, farklı antikolar için farklı sürelerde tutulup ardından da banyo edilen filmde sonuçlar

görüntülenmiştir. İkincil antikorun ucuna bağlı olan HRP enzimi Pierce kitinin içerisindeki substratı parçalayarak ışımaya sebep olmuştur.

2.4. RNA izolasyonu

SNU449 hücreleri, hiçbir şey ile kaplı olmayan ve ECM komponentlerinden kollajen I ile kaplı olan 60mm'lik (BD BioCoat Collagen I- 60 mm, Kat. No: 3544041) kültür kaplarına $5 \cdot 10^4$ hücre/ 60 mm' lik hücre kültür kabı olacak şekilde ekildi. Hücreler %70 yoğunluğa ulaştıklarında PI3K inhibitörü olan LY294002' den 30 μ M olacak şekilde %10 FCS içeren RPMI ortamı ile 24 saat boyunca 37 C ' de %5 CO2 içeren inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında RNA izolasyonu kiti (Promega SV Total RNA Isolation System, Z3100) ile RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu için şu işlemler yapıldı. 24 saat sonunda hücreleri içeren hücre kültür kapları buz üzerine alınıp 1X soğuk PBS' le yıkandı ve 500 μ l 1X PBS' le hücreler kazınıp 1.5 ml' lik ependorflara hücreler alındı. 200 g de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz atılıp hücre pelleti üzerine 175 μ l RNA lizis tamponu eklendi ve pipetaj yapıldı. Ardından hücre lizisinin üzerine 350 μ l RNA dilüsyon tamponu ilave edilip 3-4 kez tüp alt üst edilip 70 $^{\circ}$ C' de 3 dakika inkübasyon yapıldı. 15700 g de 25 $^{\circ}$ C' de 10 dakika santrifüj yapıldıktan sonra hücre lizatını içeren üst faz yeni bir tüpe aktarıldı. Hücre lizatının üzerine 200 μ l %95 etanol ilave edilip tüp 3-4 kez alt üst edildi. Karışım kolona aktarılıp 15700 g de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpüne geçen sıvı boşaltılıp kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. 600 μ l RNA yıkama solüsyonu ilave edilip 15700 g de bir dakika santrifüj yapıldı. Kolonun yerleştirildiği toplama tüpü tekrar boşaltılarak kolona hazırlanmış olan DNaz inkübasyon karışımından (40 μ l sarı Kor tamponu, 5 μ l 0.09 M MnCl₂ ve 5 μ l DNaz I enzimi) 50 μ l her bir kolona ilave edilip 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 15700 g de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolona 600 μ l RNA yıkama solüsyonu ilave edilip 15700 g de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpü tekrar boşaltılıp kolona 250 μ l RNA yıkama solüsyonu ilave edildi ve 15700 g de 2 dakika santrifüj yapıldı. Kolon toplama tüpüne aktarılıp her bir kolona 60-70 μ l nükleaz içermeyen su ilave edilip 15700 g de 1 dakika santrifüj edilerek RNA eldesi yapıldı ve elde edilen RNA' lar -80C' de saklandı.

2.4.1. RNA Miktar Tayini

İzole edilen RNA örnekleri 60 °C' de 15 dakika inkübe edildikten sonra elde edilen RNA' ların miktar tayini ve saflık derecesinin belirlenmesi amacıyla 260 nm ve 280 nm de spektrofotometrede (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000) ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonrasında $A_{260} \times \text{dilüsyon faktörü} (60) \times 40 \mu\text{g/ml} = X \mu\text{g/ml}$ RNA formülü kullanılarak her bir örnekteki toplam RNA miktarı ve " A_{260}/A_{280} " oranından yararlanarak RNA saflık derecesi belirlendi.

2.4.2. c DNA eldesi

c DNA sentezi için cDNA sentez kiti (Fermentas, Kat. No: K1622) kullanıldı. Tüm örneklerden aşağıdaki protokole göre c DNA sentezi yapıldı. Öncelikle 1 µg RNA+ 1µl random hexamer + X µl DEPC' li su = 12 µl olacak şekilde hazırlanan karışım 70 °C' de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her bir tüpe 4 µl 5X reaksiyon tamponu + 1µl RiboLock Ribonuclease inhibitor + 2 µl 10 mM dNTP karışımı ilave edilip 25 °C' de 5 dakika inkübasyon yapıldı. Her bir tüpe 1 µl M-MuLV Reverse Transcriptase ilave edilip reaksiyon 25 °C' de 10 dakika, 42 °C' de 1 saat ve 70 °C' de 10 dakika olacak şekilde kurularak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

2.4.3. Transkript Düzeyinde Gen Ekspresyonu Analizleri

Farklı koşullardaki integrin ekspresyonunda meydana gelen değişikliklere bakmak üzere RT-PCR yöntemi kullanıldı. RT-PCR yöntemiyle ekspresyon seviyelerine bakılacak integrinleri eksprese eden genlere özgül primerler kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin primer dizileri ve RT-PCR sonucunda elde edilen ürün büyüklükleri Tablo2.3.' te gösterilmiştir.

Tablo 2.6. İntegrin genlerine özgül olan primer dizileri ve özellikleri

Primer Adı	Forward Primer Dizisi (5'→3')	Reverse Primer Dizisi (5'→3')	Ürün Büyüklüğü (bp)
GAPDH	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT	CAGCCTTCTCCATGGTGGAAGA	143
İntegrin β1	TGT GAA TGC AGC ACA GAT GA	AGA CAC CAC ACT CGC AGA TG	355
İntegrin β3	AAT TTC TCC ATC CAA AGT GCG GCA G	TTG TAG CCA AAC ATG GGC AAG CAG	278
İntegrin β4	AGT GAA GAG CTG CAC GGA GT	GTT CTG CCC CAT CTT CTT GA	364
İntegrin α1	ACA GCG AAG AAC CTC CTG AA	TCT GGC ATT GGA AAA GAT CC	223
İntegrin α2	TTA CTG GTT GGT TCA CCC TGG AGT	TAC TGA TTC CCA CAT TGC TGT GCC	242
İntegrin α3	TCC AGT TCC AGA AGG AGT GC	GTT CCG TTT GAA GGG GTT C	308
İntegrin α4	TCG CCA ACG CTT CAG TGA TCA ATC C	TCT ATG CCC ACA AGT CAC GAT GGA	212
İntegrin α5	GTG GGC AGG GTC TAC GTC TA	GGA TAT CCA TTG CCA TCC AG	302
İntegrin α6	AAG CTC TCG TAG GCG AGT GA	TCT GGA AAC GTT GCA ATC AG	345
İntegrin α v	TTC TTG GTG GTC CTG GTA GC	TCC GAA ATA TGC AGC CAT CT	323

2.4.4. RT-PCR

RT-PCR yönteminde eşit yüklemenin yapılıp yapılmadığını kontrol etmek amacıyla bir house-keeping gen olan GAPDH' a özgül primerler kullanılarak tüm örneklerden amplifikasyon gerçekleştirildi.

Tablo 2.7. RT-PCR' da kullanılan solüsyonlar

	Son Konsantrasyon	1 reaksiyon için gerekli miktarlar (ul)
dH ₂ O	-	13.15
10 X PCR Tamponu	1X	2
MgCl ₂	1.5 mM	1.2
dNTP	0.2 mM	0.4
Primer-F	0.25 pmol/ul	0.5
Primer-R	0.25 pmol/ul	0.5
Taq polimeraz	1.25 U	0.25
cDNA	-	2

Tablo 2.8. RT-PCR reaksiyon koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
95 (°C)	5 dk	1
95 (°C)	30 sn	} 28
56 (°C)	40 sn	
72 (°C)	40 sn	
72 (°C)	7 dk	1

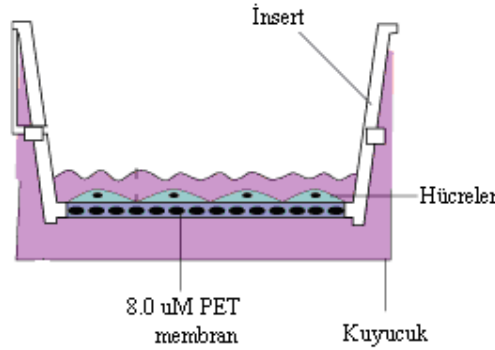
2.4.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

Tüm PCR ürünleri DNA yükleme tamponu ile 1µg/ml EtBr içeren %2 'lik agaroz jele yüklendi. 80 voltta 45 dk yürütüldü ve görüntüleme işlemi yapıldı.

2.5 Motilite

SNU449 hücre hatlarında gerçekleştirilen motilite deneyi için kontrolle beraber üç farklı koşul kullanıldı. Kontrol olarak kullanılan koşul içinde %10 FCS içeren RPMI, ikinci koşul içinde %10 FCS içeren RPMI ' da hazırlanan ve PI3K/Akt sinyal yolağının özgül inhibitörü olan LY294002' yi son konsantrasyonu 30 uM olacak şekilde içeren koşul ve üçüncü koşul da LY294002' nin çözücüsü olan DMSO' yu içeren koşuldur.

Motilite deneyi için 8 µm por büyüklüğüne sahip olan kontrol insörtlerini (BD BioCoat, 354578) içeren kuyucuklar kullanıldı. Kontrol insörtlerin (Şekil 2.1) içinde bulunduğu kuyucuğa kullanılacak olan koşulu içeren ortamdan 750 µl ilave edildi ve insörtün içine 1.10^4 hücre / insört olacak şekilde SNU449 hücreleri 500 µl koşula uygun ortam içinde ekildi. Hücreler 24 saat boyunca 37 °C' de ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildikten sonra ortamlar uzaklaştırıldı ve hücreler (Medion Diagnostics, Kat no:130832) boyandı. Göç edemeyip, insörtün içinde kalan hücreler kulak temizleme çubuğu ile membranı zedelemeyen dikkatlice uzaklaştırıldı. Göç eden hücreler mikroskopta sayılarak değerlendirme yapıldı.



Şekil 2.1. Hücre hareketlilik özelliklerinin değerlendirildiği insört şekli

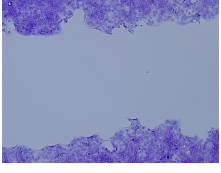
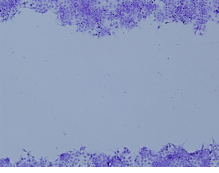
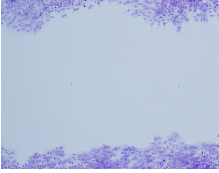
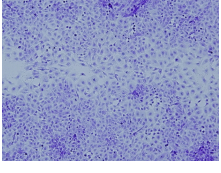
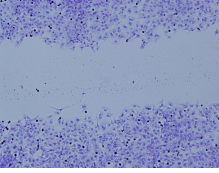
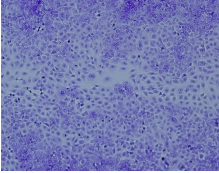
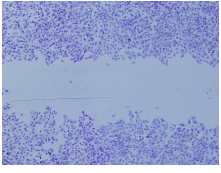
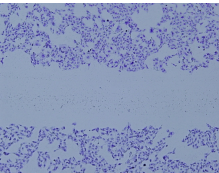
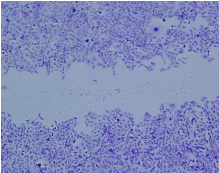
BULGULAR

3.1 HCC Hücresinde Hareketliliği Değiştiren Etmenler

3.1.1 HCC hücre hatlarında PI3K/Akt Yolağının Hücre Hareketliliğine Etkisi

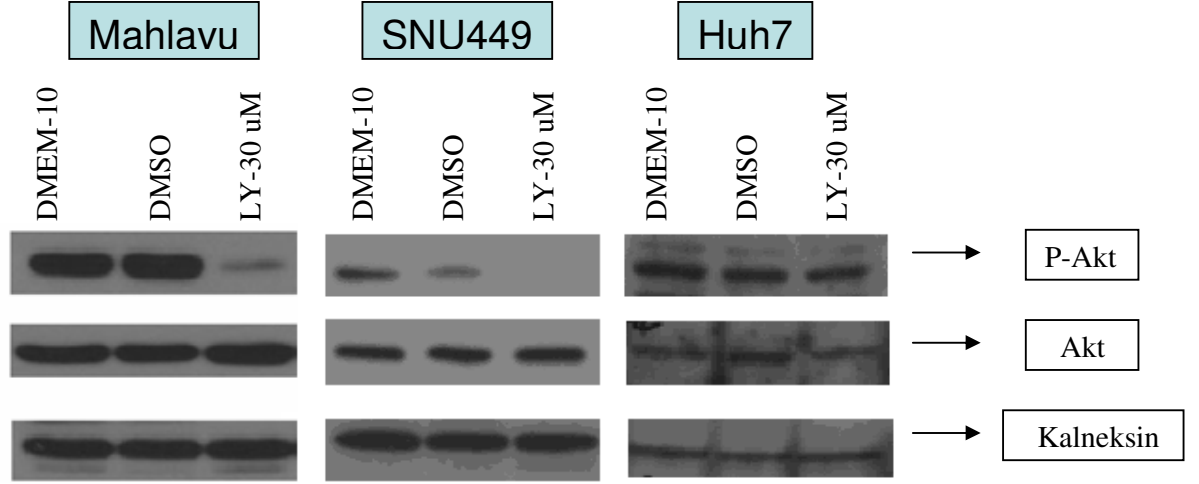
HCC hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağının hücre hareketliliği üzerine etkilerini araştırmak amacıyla; Mahlavu, SNU 449, Huh7 hücrelerinde, bu yolağın LY294002 ile özgül inhibisyonu halinde kontrolleri ile eş zamanlı olarak in vitro koşullarda yara iyileştirme ve motilite kapasiteleri karşılaştırıldı.

Önceki çalışmalarımızda, aktif Akt (ser 473'den fosforile) seviyeleri ile HCC hücrelerinin in vitro koşullardaki hareketlilikleri arasında bir ilişki olabileceği gösterilmiştir (Kunter I., yayınlanmamış veri). Buna göre, Şekil 3.1' de görüldüğü gibi, farklı düzeyde Akt yolak aktivasyonuna sahip olan Mahlavu, SNU 449, Huh7 hücrelerine, bazal koşullarda (%2 serum içeren) 24 saatlik 30 μ M LY294002 inhibisyonu uygulandığında en az Huh7 hücrelerinde hareketliliğin değişmediği, buna karşın diğer hücrelerde hareketlilikte belirgin düzeyde azalma olduğu bulunmuştur. İnhibitör çözücüsü olan DMSO'nun kontrolü amacıyla hazırlanan kontrol deneylerinde DMSO'nun hücre hareketini etkilemediği belirlenmiş olup, LY294002 ile elde edilen etkinin DMSO dan kaynaklanmadığı gösterilmiştir (Şekil 3.1).

	DMEM2	DMEM2+LY	DMEM2+DMSO
Huh7			
MV			
SNU449			

Şekil 3.1. Bazal koşullarda Huh-7, Mahlavu ve SNU-449 hücrelerinde 30µM LY294002' nin yara iyileşmesini üzerine etkisi

Aktif Akt seviyeleri farklı olan Mahlavu, SNU449 ve Huh7 hücre hatlarında PI3K/Akt sinyal yolunun moleküler inhibitörü olan LY294002 ile yapılan çalışmada Mahlavu, SNU449 hücre hatlarında kontrole göre inhibisyonun meydana geldiği western blot yöntemiyle gösterilmiştir. Huh7 hücre hattında kontrole göre çok düşük miktarda bir değişiklik saptanmıştır (Şekil 3.2).

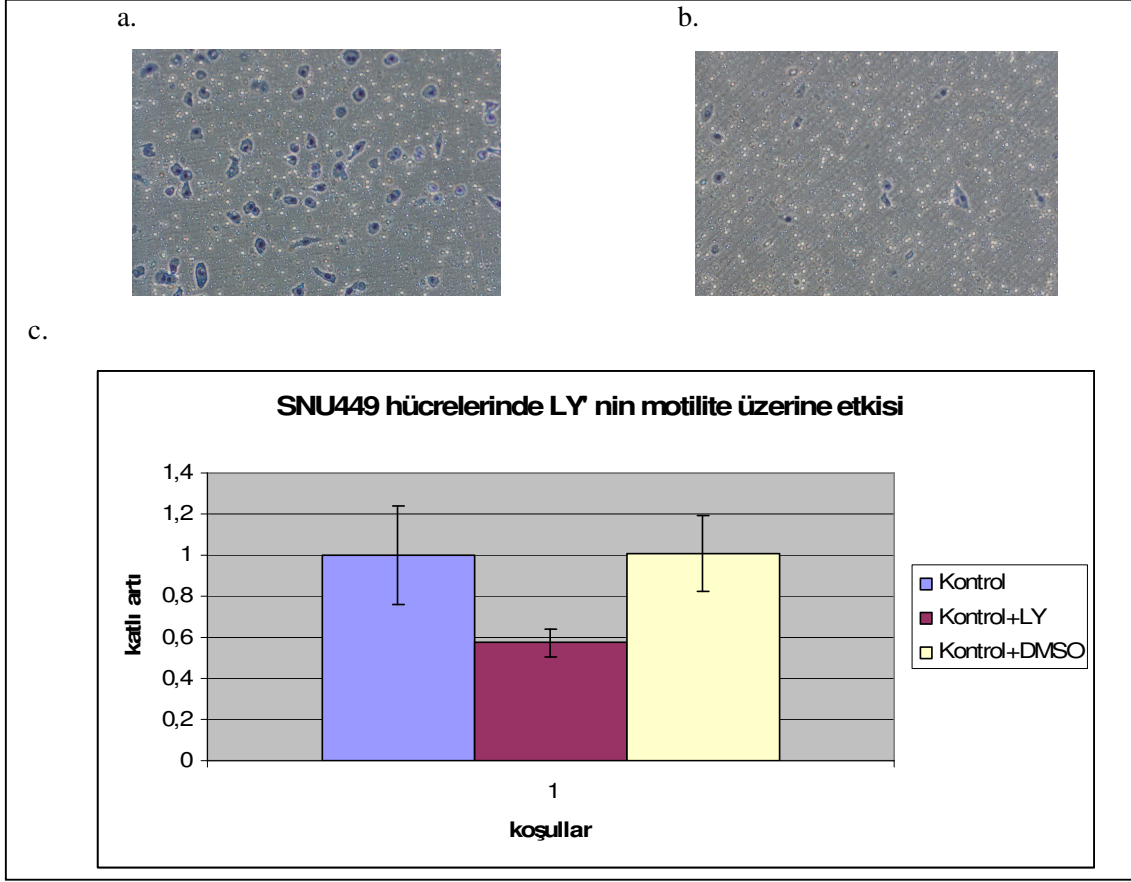


Şekil 3.2. Mahlavu, SNU449, Huh7 hücrelerinde serum varlığında LY294002' nin P-Akt üzerine etkisi

3.1.2. PI3K/Akt sinyal yolağı inhibisyonunun SNU449 hücre motilitesine etkileri

HCC hücrelerinde, PI3K/Akt sinyal yolağının inhibisyonu sonucunda bu sinyal yolunun hücre hareketliliği üzerine etkisini araştırmak amacıyla SNU449 hücrelerinde göç etme yetenekleri baskılanmıştır. Bu çalışma in vitro koşullarda kontrolleri ile eş zamanlı olarak düzenlenmiş olup SNU449 hücrelerinin LY294002 inhibitörü varlığında motilite özelliğine bakılmıştır.

SNU449 hücrelerine %10 serum varlığında 24 saatlik 30 uM LY294002 inhibisyonu uygulandığında hücrelerin göç edebilme yeteneklerinde Şekil 3.3' te de görüldüğü gibi yaklaşık olarak 2 kat kadar azalma olduğu bulunmuştur. İnhibitör çözücüsü olan DMSO'nun kontrolü amacıyla hazırlanan kontrol deneylerinde DMSO'nun hücre hareketini etkilemediği belirlenmiş olup, LY294002 ile elde edilen etkinin DMSO dan kaynaklanmadığı gösterilmiştir.



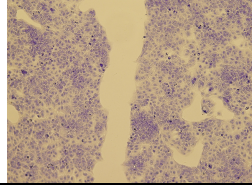
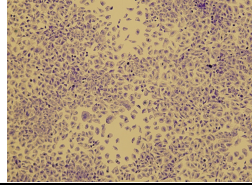
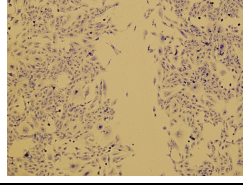
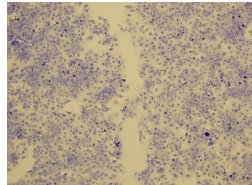
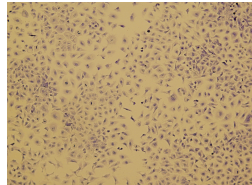
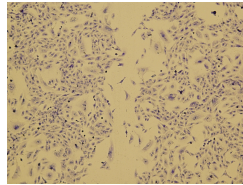
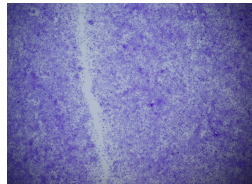
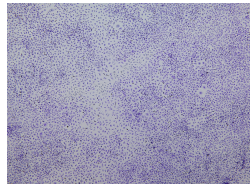
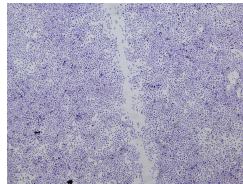
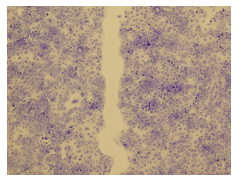
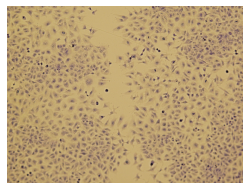
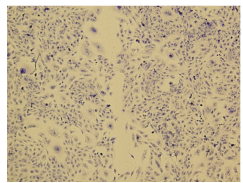
Şekil 3.3. a. Kontrol b. Kontrol insörtlerde LY294002' nin SNU449 hücreleri üzerine etkisi c. Kontrol insörtlerde LY294002' nin SNU449 hücrelerinde hücre motilitesi üzerine etkisi.

3.1.3. HCC hücre hatlarında ECM' nin Hücre Hareketliliği Üzerindeki Etkisi

HCC hücrelerinin hareket edebilme özellikleri üzerinde ECM bileşenlerinin çok önemli olduğu bilinmektedir. HCC hücrelerinin integrinleri aracılığı ile bağlandığı farklı ECM bileşenlerinin in vitro koşullarda meydana getirilen yaranın iyileşmesi üzerindeki etkilerinin farklı olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.4).

Huh7, Mahlavu ve SNU449 hücre hatlarında %2 FCS varlığında kontrol olarak kullanılan ve herhangi bir ECM bileşeni ile kaplı olmayan, fibronektin, kollajen I ve kollajen IV ile kaplı

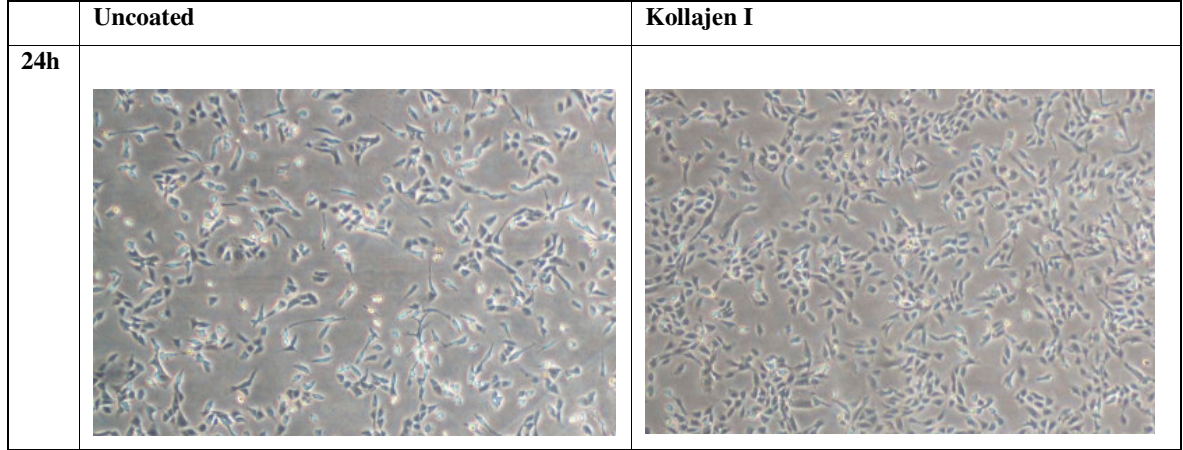
hücre kültür kaplarında gerçekleştirilen yara iyileşmesi deneyinde kontrole göre fibronektin, kollajen I, kollajen IV kaplı hücre kültür kaplarında en hareketli olan hücre hattının Mahlavu olduğu, bunu SNU-449 ve Huh7'nın izlediği gözlemlenmiştir.

HÜCRE ADI	Huh7	MV	SNU449
KONTROL			
FİBRONEKTİN			
KOLLAJEN I			
KOLLAJEN IV			

Şekil 3.4 Huh7, Mahlavu ve SNU449 hücre hatlarında ECM bileşenlerinin in vitro koşullarda meydana getirilen yaranın iyileşmesi üzerine etkisi

3.1.4 ECM' nin SNU449 Hücrelerinde Hücre Yapışması Üzerindeki Etkisi

ECM bileşenleri HCC hücrelerine buldukları ortama uyum sağlamalarında oldukça büyük kolaylık sağlamaktadır. SNU449 hücreleri ile yapılan çalışmada kontrol olarak kullanılan ve hiç bir şeyle kaplı olmayan hücre kültür kaplarına ve kollajen I ile kaplı olan hücre kültür kaplarına ekilen SNU449 hücrelerinin kollajen I kaplı hücre kültür kaplarına kontrole oranla 24 saat sonunda daha çok sayıda oldukları gözlenmiştir (Şekil 3.5).



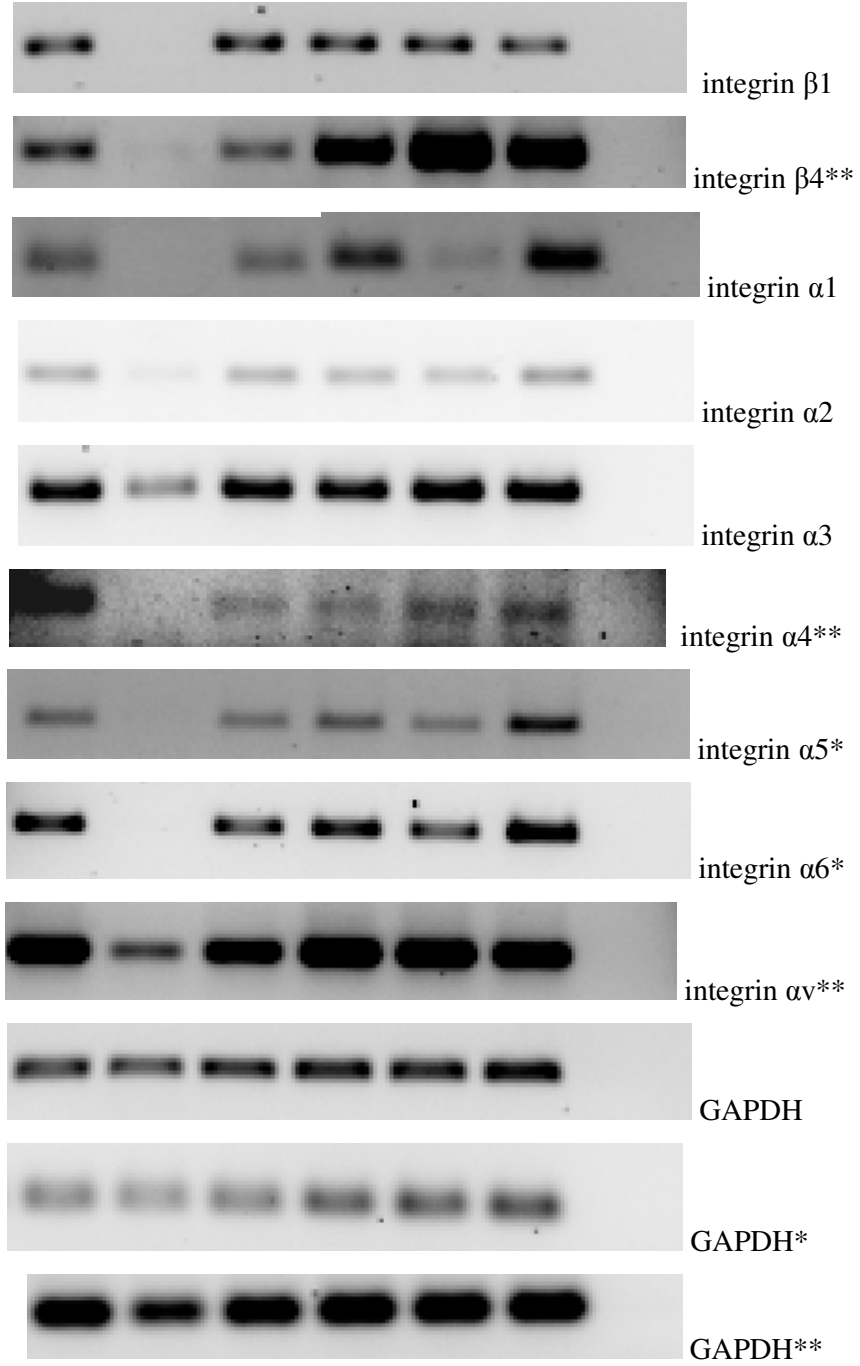
Şekil 3.5. ECM bileşenlerinden olan kollajen I' in SNU449 hücrelerinin yapışma özelliği üzerindeki etkisi

3.2. PI3K/Akt Sinyal Yolağının SNU 449 Hücrelerinde İntegrin Ekspresyonunun Etkisi

HCC hücrelerinde motilitenin kontrolünde rolü olan integrin aracılıklı sinyal yolaklarının aktivasyonunda Akt'nin önemini araştırmak üzere, PI3K/Akt sinyal yolunun inhibitörü olan LY294002 ile SNU449 hücre hattının 24 saat boyunca kontrol olarak kullanılan ve hiçbir şey ile kaplı olmayan hücre kültür kaplarında ve kollajen I ile kaplı olan hücre kültür kaplarında muamele edilmesi sonucunda elde edilen RNA' lardan yapılan RT-PCR sonuçlarına göre integrin ekspresyon profilinde değişiklikler tespit edilmiştir. İnhibitör çözücüsü olan DMSO'nun kontrolü amacıyla hazırlanan kontrol deneylerinde DMSO'nun bazı integrinlerin ekspresyonu üzerinde çok az da olsa etkisinin olduğu tespit edilmiştir. SNU449 hücre hattında yapılan RT-PCR sonuçlarına göre hiçbir ECM bileşeni ile kaplı olmayan hücre kültür kaplarında %10 FCS varlığında 30 μ M LY294002 içeren koşulda sadece %10 FCS içeren ve sadece DMSO içeren koşula göre integrin β 1 ekspresyonunda azalma olduğu, kollajen I kaplı hücre kültür kaplarında ise LY294002' nin integrin β 1 ekspresyonu üzerinde etkisinin olmadığı bulunmuştur. İntegrin α 1 ekspresyonuna bakıldığında hiçbir ECM bileşeni ile kaplı olmayan hücre kültür kaplarında sadece %10 FCS ve sadece DMSO içeren koşullara göre %10 FCS varlığında 30 μ M LY294002 içeren koşulda ekspresyonda azalma olduğu, kollajen I kaplı hücre kültür kaplarında ise LY294002' nin integrin α 2 ekspresyonunda hiçbir ECM bileşeni ile kaplı olmayan hücre kültür kaplarındaki azalma kadar olmasa da azalmaya sebep olduğu görülmüştür. İntegrin α 2, integrin α 3, integrin α 5 ve integrin α 6 ekspresyonlarının sadece hiçbir şey ile kaplı

olmayan ve %10 FCS varlığında 30 μ M LY294002 içeren koşulda azaldığı ve diğer koşullarda bir değişikliğin olmadığı tespit edilmiştir. İntegrin α 4 ekspresyonuna baktığımızda ise hiçbir şey ile kaplı olmayan ve kollajen I ile kaplı olan hücre kültür kaplarında %10 FCS varlığında 30 μ M LY294002 içeren koşulda ve kollajen I ile kaplı olan %10 FCS içeren ortamda ekspresyonda azalma tespit edilmiştir.

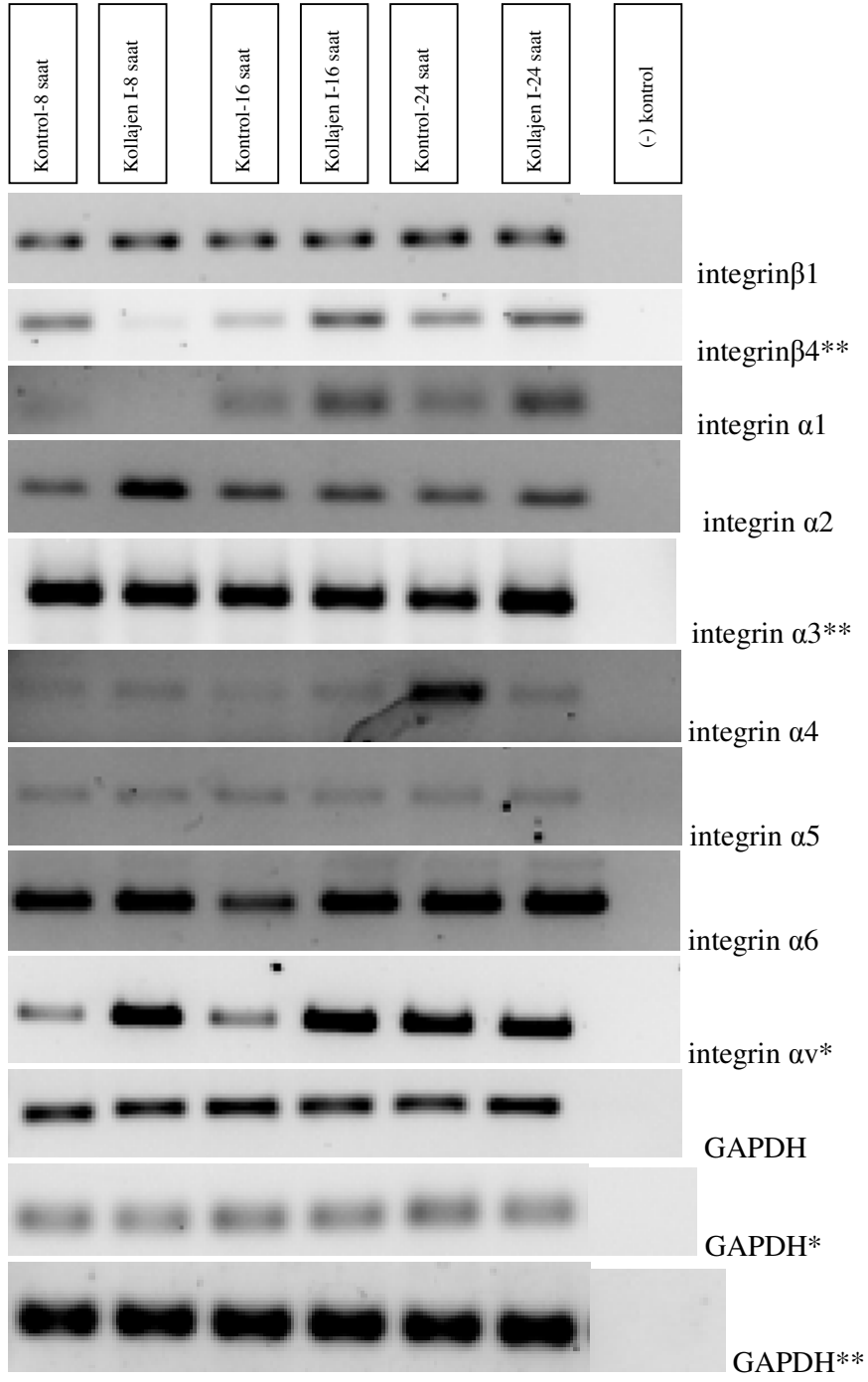
Kollajen I	-	-	-	+	+	+	-
LY294002	-	+	-	-	+	-	-
DMSO	-	-	+	-	-	+	-



Şekil 3.6 LY294002' nin kollajen I varlığında integrin ekspresyonu üzerine etkisi

3.3. Kollajen I' in SNU 449 Hücrelerinde İntegrin Ekspresyonunun Etkisi

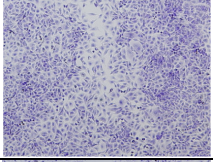
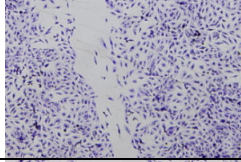
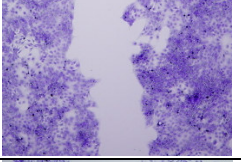
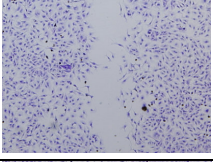
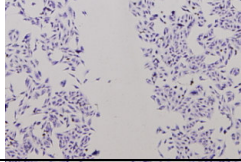
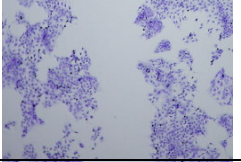
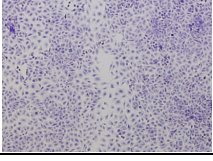
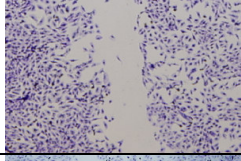
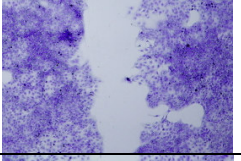

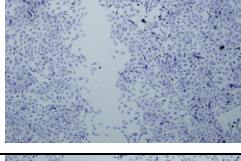
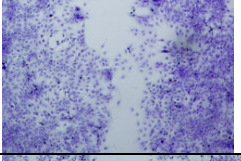

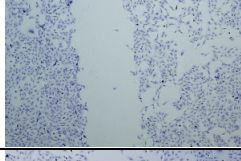
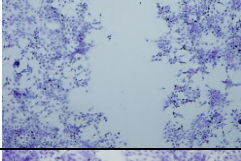

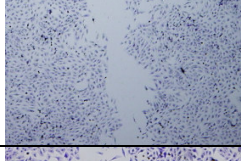
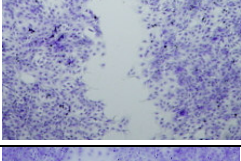
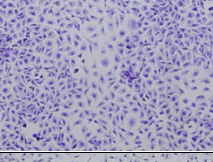
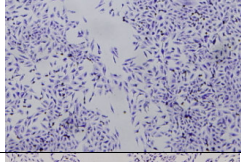
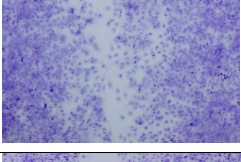
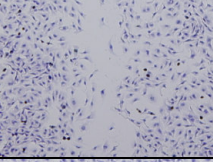
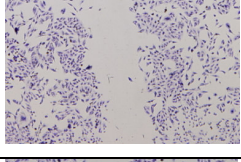
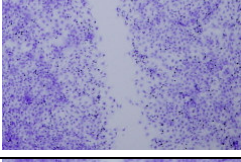
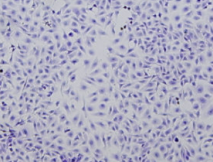
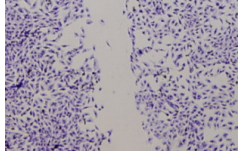
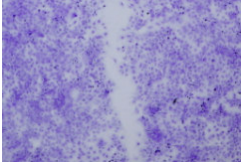
HCC hücrelerinde integrin ekspresyonu, hücrelerin bulunduğu ortamda mevcut olan ECM bileşenlerine bağlıdır. Farklı ECM bileşenlerine göre farklı integrinlerin ekspresyon seviyelerinde artış, azalış ya da değişmeme durumu söz konusudur. SNU449 hücreleri kontrol olarak kullanılan ve hiçbir şey ile kaplı olmayan hücre kültür kapları ile kollajen I kaplı olan hücre kültür kaplarına ekilmiş ve 8. saatte, 16. saatte, 24. saatte elde edilen RNA' lardan RT-PCR' ları yapılmıştır. Zamana bağlı olarak kontrol olarak kullanılan ve hiçbir ECM bileşeni ile kaplı olmayan hücre kültür kaplarına ve kollajen I kaplı hücre kültür kaplarına ekilmiş olan SNU449 hücrelerinde integrin ekspresyon profilleri incelenmiştir. SNU449 hücre hattından elde edilen RNA' larla yapılan RT-PCR sonuçlarına göre integrin $\beta 1$ ve integrin $\alpha 5$ ' in ekspresyonlarında zamana bağlı olarak değişiklik tespit edilmemiştir. İntegrin $\beta 4$ ekspresyonunda 8. saate göre 16 saatte artış olduğu ancak 24. saatte kontrolde azalma bununla beraber kollajen I' de artış olduğu, integrin $\alpha 1$ ' in 8 saatte kontrolde ve kollajen I kaplı hücre kültür kaplarında ekspresyon edilmediği; 16. ve 24. saatlerde ekspresyonun başladığı ve kollajen I kaplı hücre kültür kaplarında ekspresyonun daha fazla olduğu; tüm zaman aralıklarına bakıldığında 8. saate kollajen I kaplı hücre kültür kaplarında integrin $\alpha 2$ ekspresyonunun en yüksek seviyede olduğu; integrin $\alpha 3$ ekspresyonunun 24 saatte kontrolde azaldığı ve integrin $\alpha 4$ ' ün 24. saatte kontrolde en yüksek seviyede ekspresyona sahip olduğu, integrin $\alpha 6$ ' da kontrolde 8. saate göre 16. saatte azalma olduğu, integrin αv ' de kontrolde 8. ve 16. saatlerde ekspresyonun en düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. Zamana bağlı olarak SNU449 hücre hatlarında kollajen I varlığında değişen integrin profili

3.4. HCC hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağının, ECM bağımlı hücre hareketlilik değişimindeki rolü

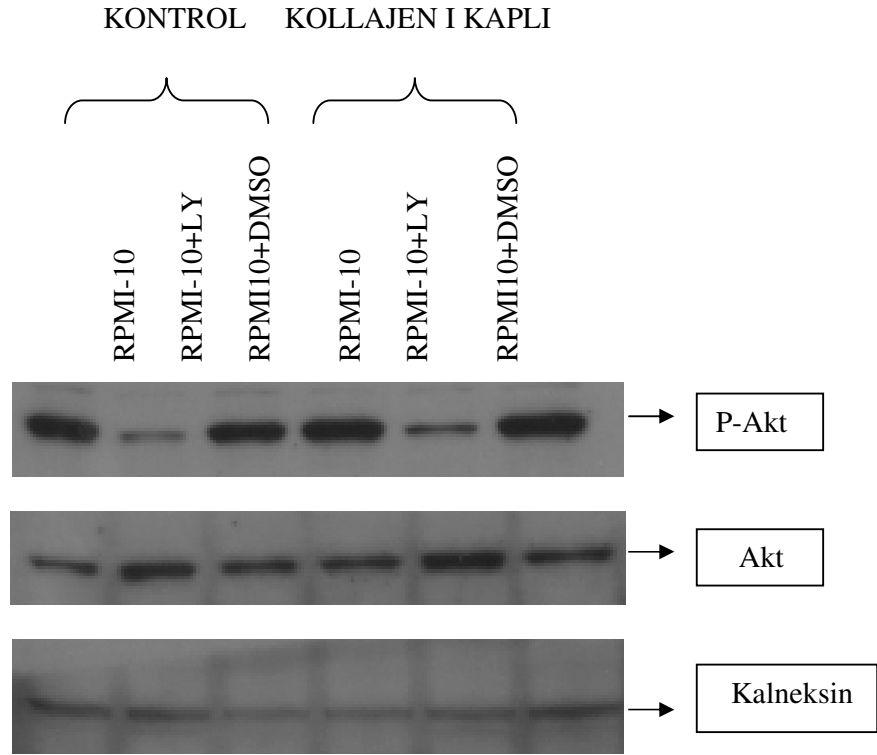
PI3K/Akt sinyal yolunun inhibitörü olan LY294002 inhibitörü ECM bileşenine ve hücrelerin aktif Akt miktarına bağı olarak inhibisyon etkisinde farklılıklar gözlenmektedir. Mahlavu, SNU449 ve Huh7 hücre hatlarında fibronektin ve kollajen I kaplı hücre kültür kaplarında yapılan çalışmada bir ECM bileşeni ile kaplı olan hücre kültür kaplarında kontrole göre inhibisyonun etkisinin düştüğü gözlenmektedir (Şekil 3.8).

	Mahlavu	SNU449	Huh7
Kaplı olmayan-kontrol			
Kaplı olmayan+LY			
Kaplı olmayan+DMSO			
Fibronektin-kontrol			
Fibronektin+LY			
Fibronektin +DMSO			
Kollajen I-kontrol			
KollajenI+LY			
Kollajen I+DMSO			

Şekil 3.8 Mahlavu, SNU449 ve Huh7 hücre hatlarında LY294002 inhibitörünün PI3K/Akt sinyal yolu üzerinde farklı ECM bileşenlerindeki etkisi

3.5. SNU449 hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağının, kollajen1 bağımlı hücre hareketliliği üzerine etkileri

SNU449 hücreleri ile yapılan çalışmada kontrol olarak kullanılan ve hiçbir şey ile kaplı olmayan hücre kültür kaplarına ve kollajen I ile kaplı olan hücre kültür kaplarına ekilen SNU449 hücrelerinin kollajen I kaplı hücre kültür kabına kontrole oranla 24 saat sonunda daha hızlı ve daha çok sayıda yapıştığı gözlenmesine rağmen LY294002 inhibitörü ile yapılan inhibisyonun kollajen I kaplı hücre kültür kaplarında üretilen SNU449 hücrelerinde kontrole göre düşük miktarda daha az olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.9. LY294002 inhibitörünün ECM bileşenlerinden kollajen I varlığındaki etkisi

TARTIŞMA

Hepatokarsinogenez sürecinde başlangıçtan itibaren konakçı dokuda bulunan ECM bileşenlerinde yapısal ve miktarsal açıdan değişiklikler meydana gelmektedir. HCC hücrelerinde meydana gelen moleküler değişiklikler sonucunda hücrelerden sentezlenen ECM bileşenleri değişmekte ve hücrelerin ECM bileşenlerine olan afiniteleri artmakta, aynı zamanda hücrelerin invazyon ve metastaz yapabilmeleri için uygun ortam sağlanmaktadır. HCC' de çeşitli integrinlerle ilişki kurulan fibronektin, laminin, kollajen I, kollajen IV gibi ECM bileşenlerinin invazyonda önemli rol oynadıkları bilinmektedir (24,23).

Hücreler, ECM bileşenleriyle olan ilişkilerini yüzeylerinde bulunan reseptörler aracılığı ile gerçekleştirmektedirler. Bu reseptörlerden bir tanesi integrin olarak bilinen ve hücredeki proliferasyon, apoptoz, diferansiyasyon gibi önemli olayları kontrol ederek invazyon sürecinde önemli bir rol üstlenen reseptördür (23). ECM-integrin ilişkisi karsinogenez sürecinin devamı açısından önemli olan birçok sinyal yolunun aktif hale gelmesini ve buna bağlı olarak karsinogenez sürecinin ilerlemesini sağlamaktadır. Bu süreçte hücre için birçok açıdan önemli olduğu bilinen PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının aktif hale geldiği ve bu aktivasyon sonucunda hücrelerin hareket edebilme özelliğine sahip oldukları bilinmektedir.

Yapılan çalışmanın temel olarak amacı; hücre sağ kalımı, apoptoz ve protein sentezi gibi biyolojik olaylarda önemli olduğu bilinen PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının HCC hücrelerinde ECM uyarımlı hareketlilikteki rolünün ve ECM bileşenlerinden kollajen I varlığında meydana gelen etkinin hücrelerdeki integrin profilinin değişimlerine bağlı olup olmadığının test edilmesidir.

Çalışmamızda kullandığımız Mahlavu, Huh7 ve SNU-449 hücre hatlarında bazal PI3K/AKT/mTOR aktivasyonu ile hücre hareketliliği arasında bir paralellik olduğunu ve en yüksek miktarda P-Akt (aktif Akt) proteinine sahip olan Mahlavu hücrelerinin normal koşullarda yani ECM bileşenlerinin olmadığı durumlarda motilite özelliklerinin diğer hücreler arasında en fazla olduğu yapılan yara iyileşmesi deneylerinde gözlenmiştir. Kullanılan üç hücre hattı içinden P-Akt seviyesi açısından orta düzeyde olan SNU449 hücreleriyle yapılan

motilite deneylerinde, PI3K/AKT yolağının özgün inhibitörü ile yolakta inhibisyon meydana getirilmesi durumunda SNU449 hücrelerinin motilite özelliklerinin azalması PI3K/AKT sinyal yolağının HCC' de motilite ile de ilişkili olduğunu düşündürmüştür. ECM bileşenleri varlığında Mahlavu, Huh7 ve SNU449 hücre hatlarıyla yapılan yara iyileşmesi deneylerinde ECM bileşenlerinin kontrollere göre yaranın kapanmasında etkili olduğunu, yani ECM' in HCC motilitesini beklediği şekilde arttırdığı gözlenmiştir.

D.S.R. Lockwood ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre HCC hücre hatlarında, ECM bileşenlerinden olan kollajen I' in motiliteyi artırıcı özelliğinin olduğu gösterilmiştir (23). HCC hücre hatlarından SNU449 hücre hattıyla yaptığımız çalışmada kollajen I' in bu hücre hattında motiliteyi artırıcı özelliğinin olduğu gösterilmiştir. SNU449 hücre hatlarında kollajen I varlığında yapılan RT-PCR sonuçlarına göre incelenen bazı integrinlerin ekspresyon seviyelerinde değişim gözlenmiştir. İntegrin $\beta 1$ ' e baktığımız zaman kollajen I varlığında LY294002' ye bağlı bir inhibisyonun gözlenmediği gösterilmiştir. İntegrin $\alpha 1\beta 1$ ve $\alpha 2\beta 1$ ' in ECM bileşenlerinden kollajen I için birer reseptör olduğu (29) ve bu integrinlerin ECM ile etkileşimleri sonucunda motilite üzerinde etkili olan PI3K/AKT sinyal yolağının aktivasyonunu sağladıkları bilinmektedir. Çalışmamızda PI3K/AKT sinyal yolağının özgül inhibitörü ile yolak baskılandığında kollajen I varlığında integrin $\alpha 1$ ekspresyonunda azalma gözlenirken integrin $\alpha 2$ ekspresyonunda değişim gözlenmemektedir. Bu durum integrin $\alpha 1$ ekspresyonunun PI3K/AKT sinyal yolağı ile ilişkili olabileceğini düşündürürken integrin $\alpha 2$ ekspresyonunun değişmemesi ise PI3K/AKT inhibisyonundan etkilenmediğini ve kollajen I varlığının integrin $\alpha 2$ ekspresyonunun inhibitör varlığında devam etmesi için bir uyarın olarak görev alabileceğini düşündürmektedir.

Fibronektin reseptörleri olan $\alpha 4$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ ve αv integrinleri (30, 31, 32) ile laminin reseptörü olan $\alpha 6$ integrininin (33) ekspresyon profillerine bakıldığında kollajen I varlığında uygulanan inhibitörden ekspresyonlarının önemli miktarda etkilenmediği gözlenmiştir. Önemli bir değişime rastlanmamasının sebebi, bu integrinlerin başka ECM bileşenlerinin reseptörleri olmasıdır. Örneğin $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$ hem kollajen hem de laminin reseptörü olarak görev almaktadırlar (28). HCC' lerde $\beta 1$ integrinle etkileşim kuran integrin $\alpha 2$, $\alpha 3$ ve $\alpha 5$ ekspresyonlarının düşük durumda olduğu buna karşılık $\alpha 6$ integrininin yüksek miktarda

eksprese olduğu bilinmektedir (31). Çalışmamızda görüldüğü gibi $\alpha 2$ ve $\alpha 5$ ekspresyonlarının $\alpha 6$ integrininin ekspresyonuna göre daha az olduğu ve LY294002 inhibisyonundan fazla etkilenmediği gösterilmiştir. İntegrin $\alpha 5$ ekspresyonunda SNU449 hücre hattında kollajen I varlığında inhibitöre bağlı bir değişiklik gözlenmemekle beraber başka bir tümör çeşidi olan kolon kanserinde integrin $\alpha 5$ ekspresyonununun değişiklik gösterdiği bilinmektedir. Kolon kanseri hücrelerinde P-Akt düzeyi ve integrin $\alpha 5$ ekspresyonu yüksektir. İntegrin $\alpha 5$, baskılandığı durumda hem integrin $\alpha 5$ ' in ekspresyonunda hem de P-Akt protein miktarında azalma meydana gelmesi integrin $\alpha 5$ ' in kolon kanseri hücrelerinde, etkisini PI3K üzerinden gösterdiğini kanıtlamaktadır. İntegrin $\alpha 5$ ' in baskılanması kolon kanseri hücrelerinin hücre adezyon özelliklerinde azalmaya apoptoza gitmelerinde ise artmaya sebep olmaktadır (19).

Zamana ve ECM bileşenlerinden kollajen I' e bağlı olarak integrin ekspresyon profiline baktığımızda integrinlerden bazılarının ekspresyonlarında değişikliğe rastlanırken bazılarında hiçbir değişim gözlenmemiştir. Örneğin $\beta 1$ ve $\alpha 5$ ekspresyonlarında bir değişiklik gözlenmemesiyle beraber integrin $\beta 4$ ekspresyonunun kontrolde en yüksek olduğu zamanın 8. saat olduğu, bununla beraber kollajen I kaplı hücre kültür kaplarında ise 16. saatte en yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir. İntegrin $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ ' nin kollajen I için birer reseptör olduğu bilinmekle beraber (29) integrin $\alpha 1$ ekspresyonunun kontrolde zamana bağlı olarak çok düşük bir değişim içermesine rağmen kollajen I varlığında 16. saatte önemli bir artış gösterdiği, integrin $\alpha 2$ ' nin ise 8. saatte kollajen I varlığında en yüksek düzeyde olduğu, kontrolde ise ekspresyon profilinde bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. İntegrin $\alpha 3$ bir fibronektin reseptörüdür (31) ve genel olarak zamana ve kollajen I' e bağlı olarak ekspresyon seviyesinde bir değişiklik gözlenmemektedir. İntegrin $\alpha 4$ ' e baktığımızda ise diğer koşullarda bir değişikliğe rastlanmamasına rağmen 24. saatte kollajen I' in olmadığı durumda integrin $\alpha 4$ ' ün ekspresyonunda önemli miktarda bir artış olduğu gözlenmiştir. İntegrin $\alpha 4$, $\alpha 5$ ve αv birer fibronektin reseptörüdür ve buna bağlı olarak squamoz hücre karsinoma hücrelerinde fibronektin varlığında yapılan bir çalışmada $\alpha 4$, $\alpha 5$ ve αv integrinlerine karşı kullanılan antikorlarla integrinlerin baskılanması sonucunda $\alpha 5$ ve αv integrinlerinin fibronektin varlığında hücre hareketliliğini azalttığı buna karşın integrin $\alpha 4$ ' ün baskılanması sonucunda hücre hareketliliğinde artış olduğu ve integrin $\alpha 4$ ' ün HSC-3 hücrelerinin hareketliliği için çok önemli olduğu gösterilmiştir. İntegrin $\alpha 4$ baskılanırken motilitede artışın meydana

gelmesinin sebebi bu baskılanmanın integrin $\alpha 5$ ve αv ' nin ekspresyonlarını arttırıyor olmasıdır. Aynı şekilde integrin $\alpha 5$ de baskılandığında $\alpha 4$ ve αv ekspresyonlarında artış gözlenmektedir ancak motilitede bir değişiklik olmamaktadır. Benzer etki integrin αv için de geçerlidir (63). Bir fibronektin reseptörü olan integrin $\alpha 5$ ' te (30) zamana bağlı olarak kontrolde ve kollajen I varlığında ekspresyon düzeyinde bir değişikliğe rastlanmamaktadır. Yine bir fibronektin reseptörü olan integrin αv ' nin ekspresyonunda (33) kollajen I varlığında değişim gözlenmemektedir. Bununla beraber kontrolde 24. saatte artış meydana gelmektedir. İntegrin $\alpha 6$, ECM bileşenlerinden laminin izoformlarına bağlanmakta (33) ve genel anlamda kontrolde ve kollajen I varlığında ekspresyon profilinde büyük bir değişikliğe rastlanmamaktadır.

Bütün bu veriler ışığında ECM bileşenlerinden kollajen I' in integrin $\alpha 1$ ' i kullanarak HCC gelişiminde PI3K sinyal yolağı üzerinden motiliteyi düzenliyor olabileceği düşünülmektedir. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda HCC hücrelerinde integrin $\alpha 1$ ekspresyonunun baskılanmasına yönelik kullanılacak bir tedavinin, hücre motilitesinde görevli olan PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağını inhibe edebileceğini ve hepatokarsinogenez sürecinin ilerlemesini durdurucu bir özelliğinin olabileceğini düşündürmektedir. Bu etkinin gerçekleştirilebilmesi durumunda hücrelerin motilitelerinin de büyük oranda azalabileceği düşüncesi akla gelmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bulgular kısmında verilen çalışmalara bağılı olarak;

1. Hiçbir şey ile kaplı olmayan hücre kültür kaplarında yapılan yara iyileşmesi deneylerinde LY294002' nin en çok Mahlavu, ardından SNU449 hücre hattı üzerinde etkili olduğu ancak Huh7 hücre hattı üzerinde etkili olmadığı gözlenmiş ve bunun aktif Akt seviyesinin varlığı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.
2. SNU449 hücreleri ile yapılan motlite deneyinde LY294002' nin hücrelerin hareketliliğini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiş olup PI3K/Akt sinyal yolunun hücre hareketliliğinde önemli olabileceği konusunda fikir sahibi olmamızı sağlamıştır.
3. ECM bileşenlerinden olan kollajen I, kollajen IV ve fibronektinde motilitedeki artışın Akt fosforilasyonunun daha fazla meydana gelmesi veya PI3K sinyal yoluna ilave olarak başka sinyal yollarının da aktive edilmesiyle bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir.
4. ECM bileşenlerinden olan fibronektin, kollajen IV ve kollajen I' in HCC hücre hatlarından Mahlavu, SNU449 ve Huh7 hücre hatlarında yapılan yara iyileşmesi deneylerinde yaranın iyileşmesi üzerinde önemli etkilerinin olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda LY294002 inhibitörü kullanıldığında ECM bileşenine ve hücrelerin aktif Akt miktarına bağılı olarak inhibisyon etkisinde farklılıklar gözlenmiştir.
5. ECM bileşenlerinde olan kollajen I' in kontrole göre SNU449 hücrelerine daha hızlı yapışabilme özelliği kazandırdığı gözlenmiş olup bunun integrinler aracılığı ile olabileceği düşünülmüştür.
6. Kollajen I varlığında PI3K/AKT sinyal yolunda meydana getirilen inhibisyon sonucunda yapılan RT-PCR sonuçlarına göre bazı integrinlerin ekspresyon seviyelerinde önemli değişiklikler gözlenirken, bazılarında daha az miktarda değişiklik meydana geldiği bir kısım integrinde ise hiçbir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir. Burada etkenin kollajen I olduğu ve değişimin hiç gözlenmediği ya da az gözlendiği integrinlerin ise başka ECM

bileşenleri için reseptör görevi yaptığı dolayısıyla kollajen I varlığından etkilenip etkilenmediği konusunda fikir vermiştir.

7. Zamana ve kollajen I varlığına bağlı integrin ekspresyon profillerine bakıldığında ise bazı integrinlerde hiçbir değişikliğin gözlenmediği ($\beta 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ αv), bazılarının ekspresyon profillerinin çok değiştiği ($\beta 4$, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$) görülmüştür.

8. Kollajen I varlığında LY294002 inhibitörü kullanıldığında da bazı integrinlerde ekspresyon düzeyinde değişikliklere rastlanırken bazılarında az ya da hiç (integrin $\beta 1$, $\beta 4$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv) değişim gözlenmemiştir. Bunun yanında kollajen I varlığında integrin $\alpha 1$ ekspresyon profiline bakıldığında konrole göre yüksek artışa rastlanırken LY294002 inhibitörünün etkisinin konrole göre azaldığı gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. El-Serag HB, Lenhard Rudolph K. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132:2557-2576
2. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nature genetics*, 2006;6: 674-687
3. Wu XZ, Chen D, Xie GR. Extracellular matrix remodeling in hepatocellular carcinoma: Effects of soil on seed?. *Medical hypotheses*, 2006; 66: 1115–1120
4. Kim KR, Moon HE, Kim KW. Hypoxia-induced angiogenesis in human hepatocellular carcinoma, *Journal of molecular medicine*, 2002; 80:703–714
5. Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet JM. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer cell*: 2004; 5: 215-219
6. Poon RTP, Fan ST, Lo CM, Ng IOL, Liu CL, Lam CM, Wong J. Improving survival results after resection of hepatocellular carcinoma: A prospective Study of 377 patients over 10 Years. 2001; 234(1): 63–70
7. Belghiti J, Cortes A, Abdalla EK, Re´gimbeau JM, Prakash K, Durand F, Sommacale D, Dondero F, Lesurtel M, Sauvanet A, Farges O, Kianmanesh R, Resection Prior to Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma, 2003;238: 885–893
8. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907–17
9. Wong N, Lai P, Pang E, Fung LF, Sheng Z, Wong V, Wang W, Hayashi Y, Perlman E, Yuna S, Lau JWY, Johnson PJ, Genomic aberrations in human hepatocellular carcinomas of differing etiologies, *Clinical Cancer Research*, 2000; 6: 4000–4009

10. Wang R, Brattain MG, AKT can be activated in the nucleus, *Cellular Signalling*, 2006; 1-10
11. Mogi M, Walsh K, Iwai M, Horiuchi M. Akt-FOXO3a signaling affects human endothelial progenitor cell differentiation. *Hypertens Res*, 2008;31: 153-159
12. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy, *Cellular Signalling* 2002;14: 381– 395
13. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma, *Seminars in Liver Disease*.2007;27:
14. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK, Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature Reviews -Cancer*, 2005;5: 921-929
15. Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *Journal of Cell Science*. 114: 1439-1445
16. Vanni C, Visco V, Mancini P, Parodi A, Ottaviano C, Ognibene M, Manazza AD, Retta SF, Varesio L, Torrisi MR, Eva A. Inhibition of PI3K induces Rac activation and membrane ruffling in proto-dbl expressing cells. *Cell cycle*, 2006;22: 2657-2665
17. Onishi K, Higuchi M, Asakura T, Masuyama N, Gotoh Y. The PI3K-Akt pathway promotes microtubule stabilization in migrating fibroblasts, *Genes to Cells*, 2007; 12: 535-546
18. Murillo CA, Rychahou PG, Evers BM, Inhibition of $\alpha 5$ integrin decreases PI3K activation and cell adhesion of human colon cancers. *Surgery*, 2004; 136:143-149
19. History GA, Heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:311–335.

20. Czaja MJ, Geerts A, Xu J, Schmiedeberg P, Ju Y. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) expression occurs in toxic rat liver injury and human liver disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 1994;55:120–126.
21. Paez-Pereda M, Kuchenbauer F, Arzt E, Stalla GK. Regulation of pituitary hormones and cell proliferation by components of the extracellular matrix. *Brazilian journal of medical and biological research*, 2005;38:1487-1494
22. Lockwood DSR, Gotley DC. Interaction of Tumour with Host Stroma in Hepatocellular Carcinoma
23. Alex YH, Friedman SL, Extracellular Matrix, Dufour J.F., Clavien P.A., Trautwein C., Graf R., *Signaling Pathways in Liver Diseases*, Springer Berlin Heidelberg, 2005, 63-71
24. Hood JD, Cheresh DA, Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature reviews*, 2002;2: 91-100
25. Felding-Habermann B, Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* 2003;20: 203–213
26. Berman AE, Kozlova NI, Morozevich GE, Integrins: structure and signaling, *Biochemistry*, 2003;68:1284-1299
27. Torimura T, Ueno T, Kin M, Sakisaka S, Tankiwa K, Sata M. β 1 integrin mediates cell adhesion, haptotaxis, and chemokinesis of hepatoma cells, *Genes to Cells*, 2007; 12: 535-546
28. Yang C, Zeisberg M, Lively JC, Nyberg P, Afdhal N, Kalluri R, Integrin α 1 β 1 and α 2 β 1 are the key regulators of hepatocarcinoma cell invasion across the fibrotic matrix microenvironment. *Cancer Research*, 2003;63: 8312–8317
29. Takagi J, Strokovich K, Springer TA, Walz T. Structure of integrin α 5 β 1 in complex with fibronectin, *The EMBO Journal*, 2003; 22: 4607-4615

30. AKIHIDE Masumoto A, Arao S, Otsuki M. Role of b1 Integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*, 1999; 29:
31. Zhang Y, Lu H, Dazin P, Kapilaa Y. Functional differences between integrin a4 and integrins a5/av in modulating the motility of human oral squamous carcinoma cells in response to the V region and heparin-binding domain of fibronectin. *Experimental Cell Research* 2004; 295: 48– 58
32. Bail BL, Faouzi S, Boussarie L, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Rosenbaum J, Extracellular matrix composition and integrin expression in early hepatocarcinogenesis in human cirrhotic liver. *Journal of pathology* , 1997; 181: 330–337

Ek1

NP-40 lizis tamponu:

50 mM pH 7.4 Tris-HCl

% 1 NP-40, % 0.25 sodyumdeoksikolat

1mM EDTA

150 mM NaCl

1 µg/ml aprotinin

1 µg/ml leupeptin

1 µg/ml pepstatin

1mM PMSF

1mM NaF

1mM Na₃VO₄

Farklı dilüsyonlarda BSA çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

Tüp numarası	BSA stok (µl)	ddH ₂ O (µl)	BCA reaktif solüsyonu (µl)
1(kör)	0	100	900
2	2,5	97,5	900
3	5	95	900
4	7,5	92,5	900
5	10	90	900
6	15	85	900
7	20	80	900
8	25	75	900

Protein örnekleri aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

Tüp numarası	Lizis tamponu(µl)	Örnek (µl)	ddH ₂ O (µl)	BCA reaktif solüsyonu (µl)
1(kör)	2	0	98	900
2	-	2	98	900
3	-	2	98	900
4	-	2	98	900

Tablo 2.3: SDS-PAGE ayırlama jel bileşenleri

Kullanılacak kimyasal	%10'luk ayırıcı jel (10ml)
-----------------------	----------------------------

dH2O	4.0
%30 akrilamid mix	3.3
1.5M Tris-HCl (pH8.8)	2.5
%10 SDS	0.1
%10 Amonyum persülfat	0.1
TEMED	0.04

Tablo 2.4. SDS-PAGE istifleme jeli bileşenleri

Kullanılacak kimyasal	%5'lik istifleme jeli(5 ml)
dH2O	3.4
%30 akrilamid mix	0.83
1.5M Tris-HCl (pH6.8)	0.63
%10 SDS	0.05
%10Amonyum persülfat	0.05
TEMED	0.005

Tablo 2.5. SDS-PAGE ayırılama etkinliği

% Akrilamid konsantrasyonu	Doğrusal ayırılama aralığı (kD)
15	12-43
10	16-68
7.5	36-94
5	57-212

%30Akrilamid-bisakrilamid

28.2 g akrilamid

0.8 g bisakrilamid

ddH₂O ile 100 ml'e tamamlanır

%10 SDS

1 g SDS

ddH₂O ile 10 ml'ye tamamlanır

%10 APS (taze hazırlanmalıdır)

0.1g APS

ddH₂O ile 1ml ye tamamlanır

Tris-Glisin Yürütme Tamponu (1X 1000 ml)

10 ml %10 SDS

3 g Tris-Baz

14.4 g Glisin

1X yükleme tamponu

62.5 mM tris ph6.8

%10 gliserol

%3 SDS

%5 Beta merak

Tris-Glisin transfer tamponu (1X 1000 ml)

3 g Tris-Baz

14.4 g Glisin

2 ml %10 SDS

200 ml Metanol