

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA
DOKULARINDA VE HÜCRE HATLARINDA
KAVEOLİN- c-Met İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

MURAT ÇOKAKLI

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2006

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA
DOKULARINDA VE HÜCRE HATLARINDA
KAVEOLİN- c-Met İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MURAT ÇOKAKLI

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Neşe ATABEY

(Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2005-346 numaralı proje ile desteklenmiştir.)

“Hepatosellüler Karsinoma Dokularında ve Hücre Hatlarında Kaveolin-c-Met İlişkisinin Belirlenmesi” isimli bu tez 28.08.2006 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı

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

Jüri Üyesi

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

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Özgül SAĞOL
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Esra ERDAL
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER	iv
Tablo Listesi	vi
Şekil Listesi	vii
Kısaltmalar	viii
Teşekkür	x
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kaveolinin Normal Hücrelerdeki Rolü ve Çeşitli Kanserlerdeki Önemi	5
2.1.1. Kaveole ve Lipid Sallarının Tanımı, Görevleri ve Önemi	5
2.1.2. Kaveole ve Kaveolinin Yapısı ve Görevleri	7
2.1.3. Kaveole ve kaveolinlerin kanserle ilişkisi	12
2.2. HGF-c-Met Sinyal İletim Yolu	17
2.3. Hepatosellüler Karsinoma	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	28
3.1. Hücre Kültürü	28
3.2. Hücre Hatlarında Kaveolin ve c-Met Ekspresyonlarının RNA Düzeyinde Belirlenmesi	28
3.2.1. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu	29
3.2.2. İzole Edilen RNA'ların Spektrofotometrik Olarak Kantitasyonu	30
3.2.3. Total RNA'ların Kalitesinin Formaldehidli Agaroz Jel Elektrofrezinde Belirlenmesi	30
3.2.4. Total RNA'lardan cDNA Sentezlenmesi	30
3.2.5. cDNA Kalıplarından Spesifik Primerler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	31
3.2.6. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi	34
3.3. Hücre Hatlarında Protein Düzeyinde c-Met ve Kaveolin Ekspresyonlarının “Western Blot” Yöntemi ile Belirlenmesi	34
3.3.1. Hücrelerden Total Protein İzolasyonu	35
3.3.2. Protein Miktarlarının BCA Yöntemi İle Belirlenmesi	35

3.3.3. Proteinlerin “SDS-Page” Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi	36
3.3.4. Poliakrilamid Jelde Yürütülen Proteinlerin PVDF Membranlara Transferi ve Membranın Bloklanması	36
3.3.5. Primer ve Sekonder Antikor Muameleleri	37
3.3.6. Proteinlerin Membran Üzerinde Deteksiyonu	38
3.4. Kaveolin ve c-Met Ekspresyon ve Lokalizasyonlarının İmmünotokimya Yöntemi İle Belirlenmesi	38
3.5. Kaveolin ve c-Met Ekspresyon ve Lokalizasyonlarının İmmünofloresans Yöntemi İle Belirlenmesi	40
3.6. HGF İndüksiyonuna Yanıt Olarak Kaveolin ve c-Met Ekspresyon Düzeylerinin Değişiminin RNA Düzeyinde Belirlenmesi	40
3.7. Kaveolin-c-Met İlişkisinin İmmüno-presipitasyon İle Belirlenmesi	42
3.8. Hepatosellüler Karsinoma Parafin Arşiv Dokularında Kaveolin ve c-Met Ekspresyonlarının Belirlenmesi	44
4. BULGULAR	46
4.1. Hepatosellüler Karsinoma Hücre Hatlarında Kaveolin-1, 2, ve c-Met Ekspresyonları	46
4.2. Patoloji Arşivindeki Hepatosellüler Karsinoma Dokularında Kaveolin ve c-Met Ekspresyonlarının Belirlenmesi	53
4.3. HCC Hücre Hatlarında Kaveolin-c-Met İlişkisinin İmmüno-presipitasyon İle Gösterilmesi	56
5. TARTIŞMA	57
6. KAYNAKLAR	63
7. EK-1: SOLÜSYONLAR	68

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1: Lipid sallarına ait geçerli nomenklatür	6
Tablo 2: Kaveoleyle ilişkili olduğu gösterilen önemli moleküller	11
Tablo 3: Farklı dokuların kanserlerinde kaveolin ekspresyonlarının değişimi	15
Tablo 4: HCC’de ekspresyonunun değiştiği RNA mikro-dizin analizleri belirlenen önemli genler	25
Tablo 5: HCC hücre hatlarının diferansiasyon durumları ve bu hücrelerdeki kaveolin c-Met ekspresyonları	47
Tablo 6: HCC ve siroz dokularında kaveolin ve c-Met ekspresyonları	53
Tablo 7: HCC ve siroz dokularındaki kaveolin ve c-Met ekspresyonlarının oranları	55
Tablo 8: HCC ve sirozda kaveolin ve c-Met ekspresyonlarının korelasyonu	55

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1: Kaveole membran yapılarının elektron mikroskobundaki görünümüleri	5
Şekil 2: Kaveolin gen ailesinin ve kaveolinin şematik gösterimi	8
Şekil 3: Kaveolinlerin oligomerize olarak kaveole yapısını oluşturması	9
Şekil 4: Kaveolin ve kaveolelerin farklı hücresel işlevlerdeki rolleri	10
Şekil 5: Kaveole ve kaveolinlerin sinyal yollarındaki ana rollerini gösteren hipotetik bir model	14
Şekil 6: Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)'nün yapısı ve içerdği bölgelerin şematik gösterimi	18
Şekil 7: HGF reseptörü c-Met'in yapısının ve bölgelerinin şematik gösterimi	19
Şekil 8: c-Met sinyal iletim yolunun özet gösterimi	20
Şekil 9: c-Met proteininde yer alan önemli bölgelerin ve amino asitlerin yerleşimi	21
Şekil 10: HCC patogenezinde kronik hepatit için önerilen rol	24
Şekil 11: Yapılan mikro-dizin çalışmaları sonucunda insan ve fare HCC'lerinin sınıflandırılması	27
Şekil 12: Kaveolin-1, 2 ve c-Met'in mRNA düzeyindeki ekspresyonlarının HCC hücre hatlarında gösterilmesi	46
Şekil 13: Kaveolin-1'in HCC hücre hatlarında protein düzeyindeki ekspresyonlarının Western-Blot ile gösterilmesi	47
Şekil 14: HCC hücre hatlarında kaveolin 1'in immunofloresans ile gösterilmesi	48
Şekil 15: HCC hücre hatlarında kaveolin 1'in immunositokimya ile gösterilmesi	50
Şekil 16: HCC hücre hatlarında c-Met'in immunositokimya ile gösterilmesi	51
Şekil 17: SNU-475'de kaveolin ve c-Met ilişkisinin immunopresipitasyon ile gösterilmesi	56

KISALTMALAR

- EGF: Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Reseptor)
PDGF: Platelet Türevli Büyüme Faktörü (Platelet –Derived Growth Factor)
PDGFR: Platelet Türevli Büyüme Faktörü Reseptörü (Platelet –Derived Growth Factor Reseptor)
eNOS: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (endothelial Nitric Oxide Synthase)
HCC: Hepatosellüler Karsinoma (Hepatocellular Carcinoma)
HBV: Hepatit B Virus (Hepatitis B Virus)
HCV: Hepatit C Virus (Hepatitis C Virus)
CSD: Kaveolin İskele Bölgesi (Caveolin Scaffolding Domain)
CBD: Kaveolin Bağlanma Bölgesi (Caveolin Binding Domain)
COD: Kaveolin Oligomerizasyon Bölgesi (Caveolin Oligomerization Domain)
IR: İnsülin Reseptörü (Insulin Reseptor)
GPI: Glikozil Fosfatidil İnositol (Glycosyl-Phosphatidyl Inositol)
VIP21: 21 kD'luk Vesiküler İntegral Membran Proteini (Vesicular Integral Membrane Protein of 21 kD)
MS: Membranı Dolanan (Membrane Spanning)
SV 40: Simian Virus 40 (Simian Virus 40)
PKA: Protein Kinaz A (Protein Kinase A)
PKC: Protein Kinaz C (Protein Kinase C)
TGF: Transforme-edici Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)
NGF: Sinir-hücreyi Büyüme Faktörü (Nerve Growth Factor)
NO: Nitrik Oksit (Nitric Oxide)
HGF/SF: Hepatosit Büyüme Faktörü/Saçılım Faktörü (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor)
SPH: Serin Proteinaz Homoloji (Serine Proteinase Homology)
MSP: Makrofaj Uyarıcı Protein (Macrophage Stimulating Protein)
PLC: Fosfolipaz C (Phospholipase C)
APC: Adenomatoz Polipozis Koli (Adenomoutos Poliposis Coli)
pRB: Retinoblastom Proteini (Retinoblastoma rotein)

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

TEŐEKKÖR

Yüksek Lisans öğrenimi boyunca yaptığı her türlü katkıdan dolayı başta danışmanım Prof. Dr. Neşe ATABEY'e ve Yrd. Doç. Dr. Esra Erdal'a, immunohistokimya analizleri için Prof. Dr. Özgöl SAĞOL'a, hücre hatları ve verilerle ilgili kritik yorumları için Prof. Dr. Mehmet ÖZTÖRK'e, doku rezeksiyonlarını yapan Prof. Dr. Sedat KARADEMİR'e, immunohistokimya boyamaları için Teknisyen Ayőe ÇAYAN'a, laboratuvardaki yardımlarından dolayı Dr. Gülay BULUT ve Dr. Aslı TOYLU'ya teşekkürü bir borç biliyorum.

ÖZET

Hepatosellüler Karsinoma Dokularında ve Hücre Hatlarında Kaveolin ve c-Met İlişkisinin Belirlenmesi

Murat ÇOKAKLI, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 35340, Balçova-İzmir, Türkiye

Kaveoleyi oluşturan ana protein olan kaveolin Ras, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), ve Platelet Türevli Büyüme Faktörü Reseptörü (PDGFR) gibi sinyal molekülleriyle ilişkiye girer. Ayrıca kaveolin, çeşitli kanser türlerinde farklı ekspresyon değişimleri göstererek önemli roller oynamaktadır. Birçok kanser türü kaveolinle ilişkilidir, fakat kaveolinin Hepatosellüler Karsinoma (HCC)'daki rolü bilinmemektedir. Kaveoleler sinyal kaskadları için uygun bölgeler olduklarından, kaveolinin Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) reseptörü olan c-Met ile de ilişkili olası muhtemeldir. Bu çalışmada, HCC hücrelerinde kaveolin-c-Met ekspresyonları ve ilişkisi araştırıldı. İlk olarak kaveolin ve c-Met ekspresyon seviyeleri HCC hücre hatlarında analiz edildi. Kaveolin ekspresyonunun az-diferansiye hücrelerde bulunurken iyi-diferansiye hücrelerde bulunmadığı, c-Met ekspresyonunun ise SNU-398 hariç tüm HCC hücre hatlarında bulunduğu görüldü. Daha sonra, SNU-475'de kaveolin ve c-Met'in HGF uyarımına bağlı olarak ko-immunopresipite olduğu belirlendi. Ayrıca, kaveolin ve c-Met ekspresyonları arşiv parafin bloklarında incelendi ve HCC dokularında kaveolin ve c-Met ekspresyonları arasında güçlü bir uyum belirlendi.

Sonuç olarak, bu çalışmada c-Met'in HGF uyarımına bağlı olarak kaveolinle ilişkiye girdiği ilk kez gösterilmiştir. Bu ilişki hepatosellüler karsinogenez sürecinde c-Met sinyal yolunun regülasyonunda önemli olabileceğinden, bu hastalığın moleküler patogenezinin belirlenmesi için yeni açılımlar sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: kaveolin, kaveole, c-Met, HGF, HCC

ABSTRACT

The Identification of Caveolin and c-Met Interaction in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines and Tissues

Murat COKAKLI, Dokuz Eylul University, School of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics, 35340, Balçova-Izmir, Turkey

Caveolin which is the main protein component of caveolae, interacts with several signaling molecules such as Ras, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), and Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGFR). Moreover, caveolin plays important roles with different expression profiles in various cancers. Many cancers are correlated with caveolin, but there is no data about the role of caveolin in Hepatocellular Carcinoma (HCC). Because of caveolae are an appropriate location for the signaling cascades, it is also possible that caveolin interacts with c-Met, which is Hepatocyte Growth Factor (HGF) receptor. In this study, we investigated the expression and interaction of caveolin and c-Met in HCC cells. Firstly, c-Met and caveolin expression levels were analyzed in several HCC cell lines. Although caveolin expressions were only found in poorly-differentiated cell lines but not well-differentiated cells, c-Met expressions were found positive in all cell lines except for SNU-398. Secondly, we showed that c-met coimmunoprecipitated with caveolin under HGF induction on SNU 475. Additionally, caveolin and c-Met expressions were determined in paraffin-embedded archive materials by immunohistochemistry, and a strong correlation was found between caveolin and c-Met expressions in HCC tissues.

As a conclusion, it was demonstrated firstly in this study that c-met interacts with caveolin under HGF induction. Since this might have a role in the regulation of c-Met signalling during hepatocarcinogenesis, this study opens new insights in the determination of molecular pathogenesis of disease.

Key Words: caveolin, caveolae, c-Met, HGF, HCC

1. GİRİŞ VE AMAC

Küçük plazma zarı girintileri olan kaveoleler (caveolae), endositoz, transsitoz, kolesterol transportunun yanı sıra sinyal iletiminde de önemli roller oynamaktadır (1). Özellikle son yıllarda birçok kanser türünün gelişim ve ilerlemesinde çeşitli roller oynadığı gösterilmiştir. Kaveolelerin spesifik protein bileşeni olan kaveolinin (caveolin), çeşitli sinyal molekülleriyle olan ilişkileri, bu ilişkilerin sinyal yollarını ve hücre davranışlarını yönlendirmesi, ve bu yönlentinin kanser gelişimi gibi süreçlere olan etkisi tanımlanmaya başlanmıştır. Kaveolinle ilişkiye girdiği bilinen moleküllere her geçen gün bir yenisi eklenmektedir ve bu ilişkilerin özellikle hücre sinyal yolları üzerindeki etkisi günümüzdeki en aktif araştırma alanlarından birisidir (2).

Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) reseptörü olan c-Met, bir tirozin kinaz reseptörüdür ve HGF uyarımıyla birlikte çeşitli hücre tiplerinde proliferasyon, migrasyon ve morfolojik değişiklikleri aktive eder (3). c-Met sinyal yolu ayrıca birçok kanser türünde önemli roller oynar. Özellikle kanser hücrelerinin invazif olması ve metastatik karakter kazanmasında oldukça etkilidir. Çeşitli kanser türlerinde HGF ve c-Met'in over-ekspresyonuna veya c-Met konstitütif aktivasyonuna rastlanmıştır (4). c-Met sinyal yolunun proliferasyon, adezyon, invazyon, morfogenez gibi birçok biyolojik yanıtları indükleyebilmesinde, farklı sinyal yollarıyla yaptığı karşılıklı haberleşme (*cross-talk*) önemli rol oynar. Bu karşılıklı haberleşmelerin bir kısmı tanımlanmıştır, ancak özellikle metastaza giden süreçte hangi sinyal yollarının ve moleküllerinin işe karıştığı tam olarak bilinmemektedir (3).

Hepatosellüler karsinoma, tüm dünyada artan insidansı ile birlikte her yıl 500.000 kişinin ölümüne neden olan bir kanser türüdür (5). HCC'nin moleküler patogeneziyle ilgili birçok bilinmeyen vardır. Bu bilinmeyenlerin temelinde ise HCC'nin oldukça heterojen bir kanser türü olması vardır. HCC'nin erken tanısı ve tedavisi için, bu kanser türünün gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir. Hepatosit büyüme faktörü olan c-Met, HCC'de dahil olmak üzere birçok kanserde türünde etkili olmaktadır (6). HCC'de özellikle metastatik karakter ve düşük sağkalımla ilişkilendirilmiştir (7). c-Met sinyal yolunun kompleks ve pleiotropik etkili bir sinyal yolu olması, ayrıca bu kompleks sinyal yolunun regülasyonu ile ilgili moleküler mekanizmaların tam olarak aydınlatılamaması, HCC

gelişiminde ve ilerlemesinde c-Met'in nasıl etkili olduğu sorusunu da cevapsız bırakmıştır. Çeşitli sinyal moleküllerini içerisinde toplayarak özelleşmiş bölgeler oluşturan kaveoleler c-Met sinyal yolunun dallanması ve regülasyonu için, kaveolin de c-Met'in regülasyonu için iyi birer aday olarak görünmektedir.

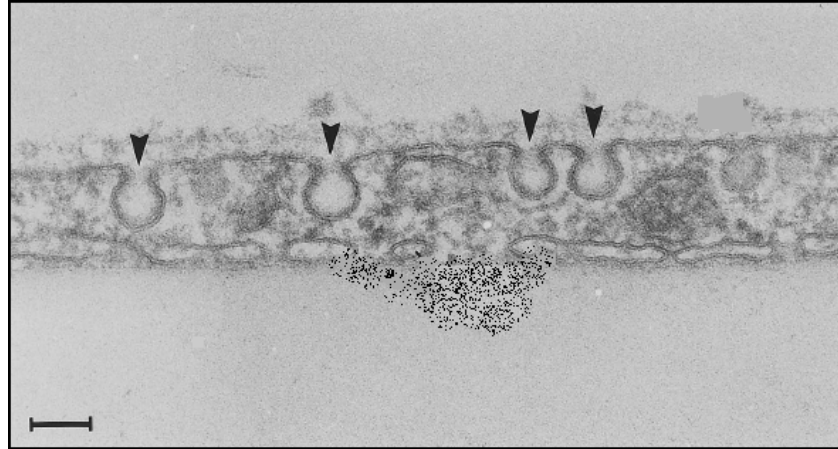
Kaveolelerin çeşitli sinyal molekülleri için özelleşmiş membran bölgeleri oluşturmaları ve kaveolinin birçok sinyal molekülü ile ilişkiye girerek onların regülasyonunda rol alması, c-Met reseptörünün ve sinyal yolunun da kaveole ve kaveolinle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotez doğrultusunda, çalışmamızda kaveolin ve c-Met arasında bir ilişki olup olmadığı ve bu moleküler etkileşimin hepatosellüler karsinoma gelişiminde ve ilerleyişinde rolü incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kaveolinin Normal Hücrelerdeki Rolü ve Çeşitli Kanserlerdeki Önemi

2.1.1 Kaveole ve Lipid Sallarının Tanımı, Görevleri ve Önemi

Küçük plazma zarı girintileri olan kaveoleler ilk olarak 1950'li yıllarda elektron mikroskobu görüntülerinde fark edilmiştir ve küçük mağaraya benzeyen yapılarından dolayı bu ismi almışlardır (1) (Şekil-1). Ancak görevleri ve önemleriyle ilgili ilk bilgiler 1990'lı yıllardan itibaren edinilmeye başlanmıştır. Özellikle kaveoleleri oluşturan spesifik protein olan kaveolin-1'in (daha sonra sırasıyla kaveolin-2 ve 3'ün) tanımlanmasıyla çeşitli hücresel işlevlerdeki önemleri anlaşılmış ve gittikçe artan bir ivmeyle çalışılan moleküller arasında yer almıştır (2, 8). Halen sinyal iletimi, endositoz, transsitoz, kolesterol transportu gibi çok farklı hücresel süreçlerle ilişkili olarak kaveolin proteini ve kaveole membran yapıları, tamamen anlaşılammış birçok süreçle ilişkilerinden dolayı en aktif çalışma alanları arasında yerini korumaktadır (2, 9).



Şekil 1: Kaveole membran yapılarının elektron mikroskobundaki görünüşleri (2).

Kaveole yapıları da bir tür lipid salıdır ve diğer lipid sallarını gibi sfingolipid, fosfolipid ve kolesterol açısından zengin, membranın diğer bölgelerine göre daha yoğun olan, Triton X-100 gibi iyonik olmayan deterjanlara karşı dirençli membran bölgelerini oluştururlar (2, 9). Lipid sallarının en belirgin özelliklerinden birisi de çeşitli proteinlerin, farklı lipid sallarında

yoğunlaşması veya hiç bulunmamasıdır. Sallara afinitesi yüksek olan proteinler arasında G-protein bağlı reseptörler, Src-ailesi tirozin kinazları, GPI-bağlı proteinler, Hedgehog gibi kolesterol bağlı ve palmitollü proteinler bulunur (9, 10). Zamanının büyük kısmını sal dışında geçiren bir protein, çapraz bağlanmayla ya da oligomerizasyonla sallara çekilebilir. Proteinin ayrı bir bölgeye çekilmesi ise kinazlar, fosfatazlar, palmitolazlar gibi değişik enzimleri içeren bir çevrede sinyal iletimini sağlayabilir. Lipid salları için değişik sınıflandırma sistemleri vardır, çünkü bu yapıları birbirinden ayırmak oldukça zordur (Tablo 1). Ayrıca sallarin canlı hücrelerde varlığını kanıtlamak çok güç olduğundan, lipid salı kavramı uzun zamandan beri tartışmalıdır. Ancak kaveole yapıları spesifik bir protein bileşeni olan kaveolinin varlığı nedeniyle tanımlanması ve çalışılması kolaydır ve bu özelliğiyle diğer sallardan ayrılmaktadır (9).

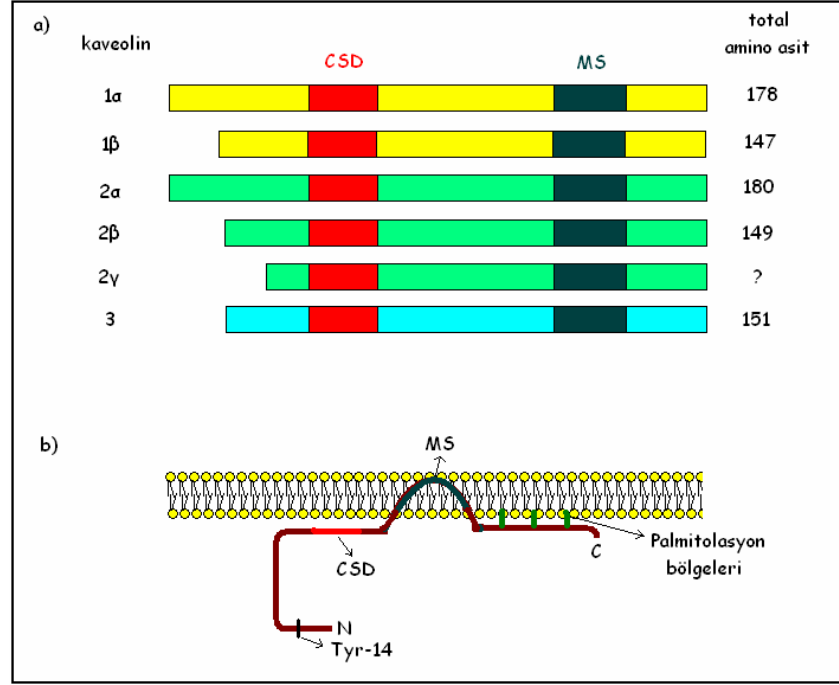
Tablo-1: Lipid sallarna ait geçerli nomenklatur (9).

	Sallar	Sal Grupları	Deterjan-Dirençli Membranlar	Kaveoleler
Bileşenler	- Glikosfingolipidler - Kolesterol - Doymuş açıl zincirleri içeren lipid modifiye proteinler * GPI-bağlı * Src-tipi	- Sal kümelenmeleri * antikor * lektin * komşu hücre proteinleri * fizyolojik çapraz-bağlı proteinler	- Triton X-100 , Brij-58, NP-40, CHAPS gibi deterjanlar ile muameleden sonra insoluble kalma	- Sal lipid ve proteinleri - Kaveolin
Özellikler	- 50 nm çapında - Hareketli ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$) - Sıvı-düzenli fazda	- Büyük, sıklıkla yüzlerce nm ile μm boyutlarında - Genellikle sitoiskelete bağlı	- Sükroz ya da optiprep yoğunluk gradiyentinde düşük yoğunlukta yayılım	- Morfolojik "cave-benzeri" hücre yüzey invaginasyonları
Yorumlar	- Doğal salları yalnızca canlı hücrelerde tesbit edilir	- Kümelenme hem yapay olarak hem de fizyolojik olarak sinyal kaskadlarını tetiklemek için kullanılır	- Doğal olmayan (agreg) sal - Çeşitli etkiler şunlara bağlı: * deterjan tipi * deterjan-lipid oranı * hücre tipi	- Sal alt-kategorisi - Son derece özelleşmiş

Salların hücre yüzeyindeki en önemli rolü, sinyal iletimindeki rolleridir (11). Tirozin kinaz sinyalinde ligand aktivasyonunun bir sonucu olarak plazma membranının sitoplazmik tarafına adaptörler, iskele (*scaffolding*) proteinleri ve enzimler çekilir. Salların buradaki rolü, ligand bağlanmasıyla aktive olan reseptör için, konsantre platformlar oluşturmaktır (2, 9, 12). Eğer reseptör aktivasyonu bir lipid salının içinde olursa, sinyal kompleksi membran fosfatazları gibi sal içerisinde bulunmayan fosfatazlardan korunur. Genellikle, sal bağlanması proteinleri yeni bir mikroçevreye getirir, burada lokal kinazlar ve fosfatazlarla fosforilasyon durumu düzenlenebilir (11). Sallarda sinyal iletiminin başlamasıyla ilgili birkaç model vardır (9). Birinci modelde, reseptörler durağan halde iken sallarla ilişkili olabilirler ve ligand bağlanmasıyla aktive olurlar. İkinci modelde, bireysel reseptörler (zayıf sal afiniteli) ligand bağlanmasıyla oligomerize olabilir ve bu sallarda bulunma süresinin artmasına öncülük eder. Son olarak, aktive reseptörler diğer sallardaki proteinlere bağlanan çapraz-bağlayıcı proteinleri devreye sokar, bu da sal birleşmesiyle sonuçlanır.

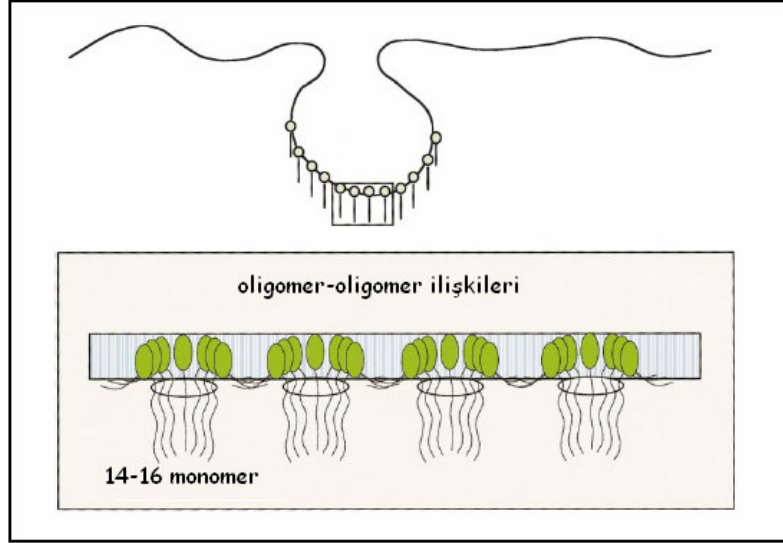
2.1.2 Kaveole ve Kaveolinin Yapısı ve Görevleri

Küçük flask benzeri hücre yüzey girintileri olan kaveolenin ana yapısal proteini kaveolindir (1). Kaveolin ilk olarak v-Src ile transforme olan tavuk embriyolarında ana bir fosfoprotein olarak keşfedilmiştir (13) (Şekil 2-a). Genom çalışmaları sonucunda bu kaveolin genlerinin, trans-golgi türevli transport veziküllerinin bir üyesi olan VIP-21 (vesicular integral protein of 21 kD)'a özdeş olduğu bulunmuştur (8). Bunların da kaveole mikrobölgelerini seçici şekilde hedef aldıkları gösterilmiştir. İnsanlarda kaveolin gen ailesi 3 üye içerir: kaveolin 1, 2, ve 3. Bu üç kaveolin proteininin ekspresyon profilleri ise farklılık gösterir. Kaveolin 1 ve 2 adipositlerde, epitelyal ve endotelyal hücrelerde, pnömositlerde ve fibroblastlarda yüksek oranda eksprese edilirken, kaveolin-3 kas hücre tiplerinde (kardiyak, iskeletel ve düz kas hücreleri) eksprese olmaktadır. Kaveolin 2'nin tek başına üretimi kaveole oluşumunu indüklemezken, kaveolin 1 veya 3'ün üretimi kaveole oluşumunu sağlayabilmektedir. Kaveolin 1 ve 2'nin de kendi aralarında farklı izoformları bulunmaktadır (1, 2) (Şekil 2-b).



Şekil 2: Kaveolin gen ailesinin ve kaveolinin şematik gösterimi. **a)** Kaveolin gen ailesi üyelerinin ve izoformlarının şematik gösterimi. **b)** Kaveolin proteininin membranı nasıl geçtiğini ve ana bölgelerini gösteren şekil. MS bölgesi membran içinde bir saç tokası yapısı oluşturuyor, fakat membrana penetre olmuyor. Ayrıca kaveolin mebrana üç adet palmitol çapası ile tutturulmuş durumda. CSD: Caveolin Scaffolding Domain, MS: Membrane Spanning domain (1).

Kaveolinlerin bir diğer önemli özelliği de daha yüksek düzende komplekslere oligomerize olma yetenekleridir. Kaveolin 1, endoplazmik retikulumdaki sentezinden sonra homo-oligomerize ya da kaveolin-2 ile hetero-oligomerize olur ve 14-16 bireysel molekülden oluşan bir birim oluşturur (2). Kaveolin-1'in 61-101'inci amino asitleri (Caveolin Oligomerization Domain = COD) homo-oligomerizasyonu gerçekleştirirken, kaveolin 1 ve 2'nin membranı geçen bölgeleri hetero-oligomerizasyonu gerçekleştirir. Plazma membranına transportun geç aşamalarında, kaveolin oligomerleri daha yüksek düzeyde bir ilişkiye girer, bu sefer kaveolin 1'in C-terminalinden düzenlenme olur (Şekil-3). Kaveolin 2, kaveolin 1 ile hetero-oligomerizasyona girerek kaveolin 1'in stabilitesine yardımcı olur. Asıl hüresel fonksiyonları gerçekleştiren, çeşitli protein-protein ilişkilerine katılan kaveolin 1'dir. Kaveolin 3 ise kas hücrelerinde kaveolin 1'in rolünü üstlenmiştir (1, 2, 13).

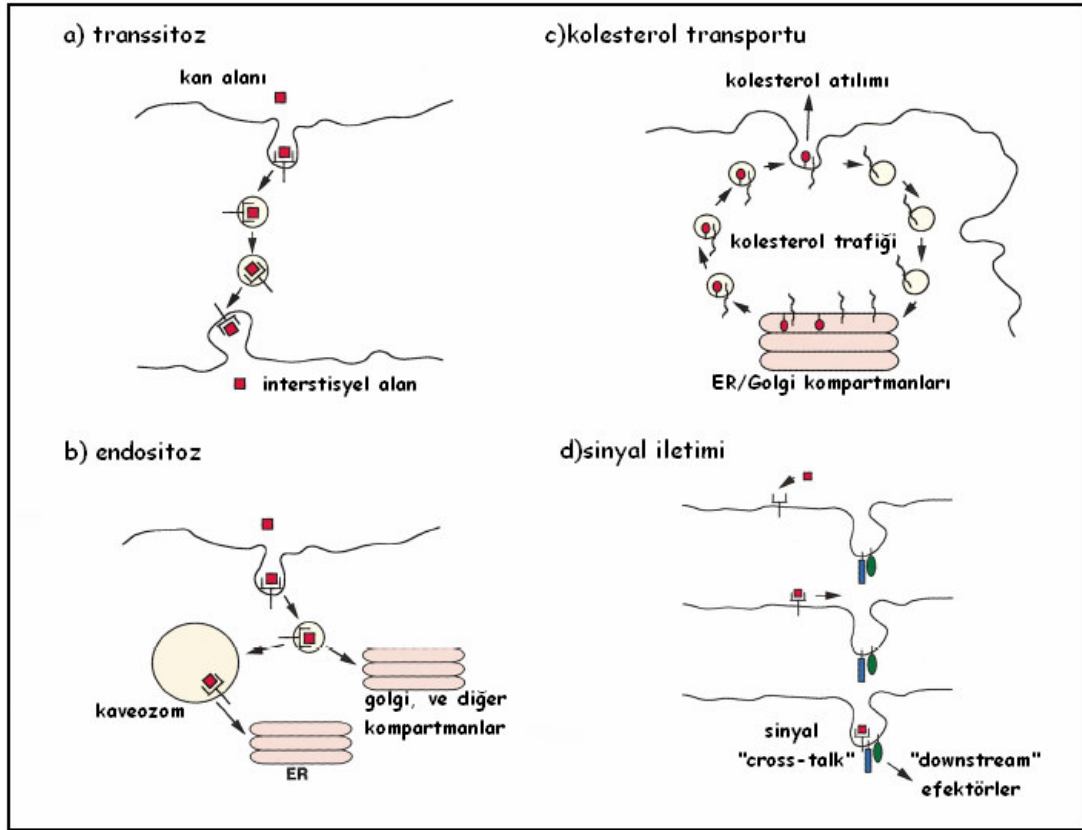


Şekil 3: Kaveolinlerin oligomerize olarak kaveole yapısını oluşturması. Kaveolinler ya homo-oligomerizasyonla (kaveolin 1 veya 3'ün kendi aralarında), ya da hetero-oligomerizasyonla (kaveolin 1 ve 2 arasında) kompleksler oluştururlar (14).

Kaveolinler çok farklı hücresel işlevin gerçekleştirilmesinde rolleri olan moleküllerdir (2). Bunların başında epitel hücrelerinde madde geçişini sağlamak için kullanılan transsitoz olayı gelir (Şekil 4-a). Hücrelerarası taşınım, endotel hücreleri için önemli bir madde alınımı mekanizmasıdır. Kaveoleler ayrıca kltrin kaplı olmayan endositozda da gösterilmiştir. Kaveolar endositoz sadece bireysel moleküllerle sınırlı değildir, SV40 ve *E. coli*'nin bazı suşlarının alınımının da kaveoledeki bazı reseptörler aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (10). Örneğin *Listeria*'nın hücre içine alınımının, InB proteininin sallaarda lokalize olan bazı reseptörler aracılığıyla olduğu gösterilmiştir. Hücre içine doğru girinti yapmış olan kaveoleler, lizozomal ve endozomal olmayan ve endoplazmik retikulumdan köken alan, kaveolin 1 içeren “kaveozom”lar ile birleşir (15)(Şekil 4-b).

Kaveolelerin bir diğer önemli hücresel fonksiyonu da kolesterol taşınımındaki rolleridir (16) (Şekil 4-c). *In-vivo* da kolesterole bağlanma yeteneği gösterilmiş olan kaveolin 1'in kolesterol azalmasına karşı duyarlılığı yüksektir. Örneğin hücrelerin kolesterol oksidazla muamelesi, bu proteinin endoplazmik retikulum – golgi kompartmanlarına yönlenmesine neden olur; kolesterol oksidazın çıkarılması ise kolesterol ve kaveolin-1'in kaveoleye tekrar dönmesini sağlar. Hücrelerin kaveolin-1 cDNA'sı ile transfeksiyonu, kaveolede yüksek

seviyede kolesterol tutulmasına öncülük eder (1, 2, 16). Radyoaktif işaretli asetat (kolesterol biyosentezinin bir öncüsü) kullanılarak “*de-novo*” sentezlenen kolesterolün kaveolin-1 bağımlı bir rotada endoplazmik retikulumdan plazma membranına gittiği görülmüştür. Ayrıca bu taşınım, kaveolin-1’in önemli bir üyesi olduğu, bir şaperon-kolesterol kompleksi oluşumunu gerektirir (2).



Şekil 4: Kaveolin ve kaveolelerin farklı hücresel işlevlerdeki rolleri. **a)** transsitoz, **b)** endositoz, **c)** kolesterol transportu, **d)** sinyal iletimi (14).

Kaveolin ve kaveolelerin belkide en önemli fonksiyonları ise sinyal iletimindeki rolleridir (13, 17). Şu ana kadar kaveolin ve kaveole ile ilişkili olduğu bilinen birçok sinyal molekülü bilinmektedir ve her geçen gün bu listeye yeni bir molekül veya sinyal yolu eklenmektedir (18, 19)(Tablo 2). Kaveoleler spesifik lipid ve protein içeriklerinden dolayı özelleşmiş membran bölgeleri oluştururlar ve sinyal moleküllerinin belli bölgelerde yoğunlaşmasına yardım ederler. Ayrıca kaveolin 1, EGFR gibi bazı tirozin kinaz reseptörleri ve Src gibi sinyal molekülleriyle ilişkiye girerek aktivasyonlarını engelleyen bir inhibitör gibi

davranırlar (20, 21, 22). Bir proteinin kaveolede bulunma yeteneğinin tam bir kriteri henüz olmasa da, bu sinyal moleküllerinin bazıları lipid modifikasyonları içerirler. H-Ras, Src-ailesi tirozin kinazları, heterotimerik G-proteinlerinin α -altbirimi, ve e-NOS gibi iyi tanımlanmış kaveole ilişkili moleküller, bir ya da birkaç palmitol, miristol ya da prenil grupları barındırırlar. Böyle moleküllerin kompartmanlara ayrılması, aşağı yöndeki sinyal moleküllerinin (downstream effectors) düzenlenmesi için bir mekanizma sağlar ve farklı sinyal yolları arasındaki karşılıklı haberleşmeyi (*cross-talk*) açıklar. Bu hipotez “Kaveole Sinyal İletimi Hipotezi” olarak bilinir (22, 23).

Tablo 2: Kaveoleyle ilişkili olduğu gösterilen önemli moleküller (1, 2, 14).

Kaveole İle İlişkiye Girdiği Bilinen Moleküller	
<ul style="list-style-type: none"> • Gαs • G-proteini-eşlikli reseptörler • PKA • PKCα • Fosfolipaz D1 • TGFβ tip-1 reseptör • EGF reseptörü • cNeu • PDGF reseptörü 	<ul style="list-style-type: none"> • p75 NGF reseptörü • TrkA • İnsülin reseptörü • H-Ras • c-Src • Fyn • İntegrinler • eNOS • nNOS

Kaveolin 1'in ilişkili olduğu moleküller CSD (Caveolin Scaffolding Domain) aracılığıyla kaveolinle ilişki kurarlar (24). CSD'ye bağlanan bölgeler ise CBD (Caveolin Binding Domain) olarak adlandırılır. Faj-görüntüleme deneyleri ile kaveolin1 CSD'sine bağlanan peptid dizileri belirlenmiştir. Buna göre $\Phi X \Phi X X X X \Phi$, $\Phi X X X X \Phi X X \Phi$, $\Phi X \Phi X X X X \Phi X X \Phi$ (Φ : hidrofobik bir amino asid, X: herhangi bir amino asid) motifleri içeren bazı peptidlerde yüksek sıklıkta bağlanma gözlenmiştir. Gerçekten de kaveolinle ilişkiye giren sinyal moleküllerinin çoğunda böyle bir dizi bulunur, ve bu dizi mutasyona uğratıldığında bağlanma ortadan kalkmaktadır (25).

Kaveolinin MS bölgesinin eNOS enzimiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Kaveolini olmayan hücrelerde nitrik oksit (NO) üretimi inhibe edilir. Artmış NO sinyali olan farelerde $\alpha 1$ -adrenerjik uyarıya yanıt olarak vazokonstriksiyon bozulması gözlenir, asetilkolin uyarılı vaskular relaksasyon ise artırılır (26).

2.1.3 Kaveole ve kaveolinlerin kanserle ilişkisi

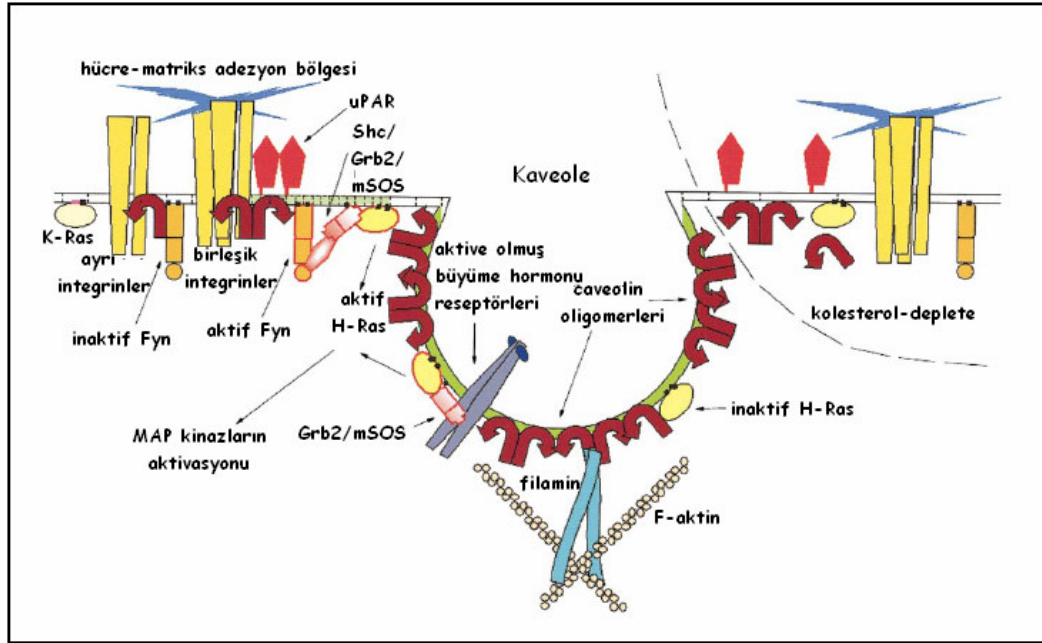
Kaveolin 1'in v-Src ile transforme tavuk embriyo fibroblastlarında ana bir fosfoprotein olarak keşfi, kaveole/kaveolin ve kanser arasındaki ilk olası bağlantıyı sağlamıştır. NIH 3T3 hücrelerinin onkogenik transformasyonunun kaveolin 1'in transkripsiyonel down-regülasyonuna ve morfolojik kaveole oluşumunun kaybına neden olduğu bulunana kadar bu ilişki tam olarak tanımlanamamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda da diğer tümör kökenli hücre hatlarında ve karsinomalarda benzer etkiler gözlenmiştir. Bu açıdan, kaveolin 1'in transforme hücre hatlarındaki heterolog ekspresyonu *de-novo* kaveole oluşumuyla ve tutunma-bağımlı büyümenin ortadan kalkmasıyla sonuçlanır (27).

Kaveolin 1'in H-Ras, v-Abl, c-Src, c-Myc, Neu tirozin kinaz ve "insan papillom virüsü erken geni E6" gibi aktive onkogenleri eksprese eden hücrelerde baskılanmış olduğu gösterilmiştir (28). Kaveolin 1'in bu onkogenleri ve aşağı yöndeki efektörlerini karşılıklı olarak düzenleme yetenekleri araştırılmıştır. Over-ekspresyon deneyleri, kaveolin 1'in gerçekten Ras-p42/44 MAP kinaz yolunun etkili bir inhibitörü olduğunu göstermiştir (2, 29). İlginç bir şekilde, *C. elegans*'da RNAi ile kaveolin 1 ekspresyonunun baskılanması, kontrolsüz Ras sinyaline çok benzeyen fenotipte mayotik hücre döngüsünün hiperaktivasyonuna öncülük etmiştir. Kaveolin 1 ve 2, birçok insan kanserinde delete olan 7q3.1 bölgesinde haritalanmıştır (30). Ayrıca, incelenen meme kanseri örneklerinin %16'sından fazlasında kaveolin 1 geni mutant olarak bulunmuştur (31). Bu mutasyonu taşıyan kaveolin 1 cDNA'sının rekombinant ekspresyonu, NIH 3T3 hücrelerini transforme etmek için yeterli olmaktadır. Kaveolin 1'in CSD'sinden türevlenen bazı peptidler meme kanserinin tedavisinde terapötik değere sahiptir. Meme kanseri hücre hatları olan MCF-7 ve T-47D'de kaveolin 1'in promotör bölgesindeki CpG adalarında metilasyon saptanmıştır ve bu kaveolin 1 ekspresyonunu baskılar. Böylece kaveolin 1 geni, yeni metilasyon inhibitörleri için de bir

adaydır (10, 28). Prostat kanserlerinde kaveolin 1 ekspresyonlarındaki artış ile metastatik karakter arasında doğrudan bir bağlantı vardır (32). Kaveolin 1, normal prostatın glandüler epitelinde yoktur, fakat yanındaki zayıf olarak farklılaşmış prostat kanser hücrelerinde vardır ve standart prostat kanserinin markerı olarak ilişkilendirilmiştir (13).

Kaveolin 1 ve 2 genlerinin bulunduğu genom bölgesinin malin tümörlerde sıklıkla kayıp olması, ayrıca kaveolin 1 ekspresyonunun birkaç insan kanserinde ve onkogenik olarak transforme hücrelerde down-regüle olması kaveolin 1'i aday bir tümör baskılayıcı gen yapmaktadır. Kaveolin 1'in hedeflenmiş down-regülasyonu, hücre transformasyonunu sürüklemek için yeterlidir (25, 33). Kanser hücrelerinde ekprese edilen rekombinant kaveolin 1, malign özelliğinin bazılarını normale döndürebilmek için yeterlidir (34). Aynı zamanda kaveolin 1 ekspresyonu, hücre döngüsü süresince azaltılmaktadır (35). Kaveolin 1'in ekspresyonundaki artış mitozu durdurur, bu da kaveolinin, hücre döngüsünün negatif regülasyonu için gerekli olduğunu gösterir. Kaveolin 1 geni olmayan fibroblastlar, yabancı tip eşleniklerinden daha hızlı proliferasyon olurlar ve daha aktif hücre döngüsü profiline sahiptirler (1, 13).

Kaveolin scaffold bölgesi (CSD), bazı sinyal molekülleri için bir tutunma bölgesi (*docking-site*) olarak rol alır (24). CSD, kaveolinin membran lokalizasyonunda olduğu kadar oligomerizasyon sürecinde de esansiyeldir. Kaveolinin, neredeyse bilinen tüm partnerleriyle olan ilişkileri bu bölge aracılığıyla. Birçok membranla ilişkili tirozin kinaz aktivitesi, kaveolar membranlarda lokalizedir (13). Src ve Src ilişkili kinazlar ilk çalışılanlardır. Daha sonra epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) , platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) ve İnsulin reseptörü (IR) sinyal yolları, şu ya da bu şekilde kaveoleyle ilişkili bulunmuştur (20, 36, 37, 38). Kaveolin v-Src ve aktive c-Src için bir fosforilasyon substratıdır (39). Diğer yandan kaveolin c-Src aktivitesini inhibe edebilir. Kaveolin c-Src'a CSD ile bağlanır. *In-vitro* koşullarda kaveolin 1'in CSD peptidleri c-Src ya da Fyn tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder (34). EGFR üzerinde de çalışıldığında aynı sonuçlar alınır (20). CSD peptidinin bu kinaz inhibitörü aktivitesi sadece tirozin kinazlara sınırlı değildir. Protein kinaz-A, C α , ve MEK1 gibi serin/treonin kinazları da kapsar. IR hariç, CSD bölgesi evrensel bir kinaz inhibitörü olarak dikkate alınır (13).



Şekil 5: Kaveole ve kaveolinlerin sinyal yollarındaki ana rollerini gösteren hipotetik bir model. Filamin-kaveolin ilişkisi kaveoleyi aktin sitoskeletonine bağlamaktadır. Kaveolede bulunan aktive büyüme hormonu reseptörleri, Grb2 ve mSOS gibi adaptör proteinleri devreye sokarlar ve kaveolede bulunan H-Ras'ı aktive ederler. Kaveole dışındaki bir kaveolin havuzu da integrinlerle ilişkiye girer ve Fyn gibi Src ailesi tirozin kinazlarını inaktif durumda tutar. Hücre-matriks adezyonuyla birlikte Fyn aktif hale geçer ve adaptör proteinler aracılığıyla H-Ras'ı aktive eder. H-Ras'ın aktivasyonu MAP kinaz kaskadını etkinleştirir. K-Ras ise kaveole dışındaki bir bölgede bulunur ve kaveolinle ilişkiye girmez. Membranda kolesterol deplesyonu yapılması ise kaveolinin ve kaveole oluşumunun kaybına neden olur (2).

Kaveole veziküllerinin hücre sinyal yollarında önemli olduğu, en azından birçok sinyal molekülüyle ayrı bir hücre lokalizasyonda yoğunlaşmasından dolayı kabul edilmektedir (40)(Şekil 5). Ancak, hala kaveolinin düzenleyici rolünün önemi ve doğası üzerinde tartışmalar vardır. Bu tartışmaların olası nedenlerinden bir tanesi, kaveolin yokluğunda bile lipid-modifiye moleküllerin düşük yoğunluklu membran bölgelerinde bulunmasıdır. Örneğin, eNOS'un sistein palmitolasyon bölgesinin mutasyonunun kaveole lokalizasyonunu engellemesi, kaveolinin gerekli olmadığını destekler (1, 2). Ancak çeşitli çalışmalar, kaveolin 1 ve 3'ün NOS enzimatik aktivitesi üzerine inhibitör etkisini destekler (41). c-Src ve Src-ilişkili kinazların lipid modifikasyonlarının uygun membran lokalizasyonu

için esansiyel olması (H-Ras hariç) kaveolinin bir “scaffolding” olarak rolünün merkezi olmadığını destekler (25). Yine de, bazı sinyal yollarının bir modülatörü olarak kaveolinin rolü kanıt olmaktadır. Örneğin, Ras-p42/44 MAP kinaz yolunda bu rol gösterilmiştir (2, 22). Bu yolun aktivasyonu kaveolin 1 gen ekspresyonunu azaltır; kaveolin 1 protein seviyesi artırıldığında ise bu yolak inhibe olur. Benzer bir durum Neu-aracılı yolda da geçerlidir. Kültür hücrelerinde kaveolin 1 ifadesinin bloklanması veya kolesterol deplesyonu, Ras bağımlı yolun aktivasyonuna neden olur. Ayrıca, Shc ve Fyn tirozin kinazla ilişkiye giren Triton-soluble bir kaveolin havuzu da tanımlanmıştır (42).

Tablo 3: Farklı dokuların kanserlerinde kaveolin ekspresyonlarının değişimi (parentez içlerindeki yıldız sayısı, o konuyla ilgili kanıtların bolluğunu göstermektedir) (13).

DOKU	ALT-TİP	Normal Dokuya göre Değişim
Safra kesesi	karsinom	Artış (***)
Beyin	astroitom	İlişki yok
Meme	adenokarsinom	Azalma (****)
Serviks	karsinom	Azalma (*)
Kolon	karsinom	Açık değil
Özofagus	skuamoz hücre karsinom	Artış (**)
Böbrek	karsinom	Açık değil
Lenfositler	T hücre lösemisi	Artış (*)
	multipl myelom	Artış (*)
Akciğer	küçük hücreli karsinom	Azalış (*)
	küçük hücreli olmayan kars.	Açık değil
Mezenşim	sarkom	Azalma (**)
Oral	karsinom	Açık değil
pankreas	karsinom	Azalma (***)
Prostat	karsinom	Artış (****)
Tiroid	papiller karsinom	Artış (*)
	foliküler karsinom	Azalma (*)
Vaskular	anjiosarkom	Azalma (*)

Kaveolin ekspresyonları farklı kanser türlerinde farklı değişim göstermektedir (43, 44)(Tablo 3). Meme gibi bazı kanser türlerinde ekspresyonu azalmaktadır ve bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilmektedir (31). Ancak prostat gibi bazı kanser türlerinde, özellikle metastatik fenotiple ilişkili olarak kaveolin ekspresyonlarında bir artış görölmektedir (13). Böyle durumlarda ise kaveolin bir onkogen gibi davranmaktadır. Bazı kanser türlerinde ise kaveolin ekspresyonlarındaki değişimle ilgili henüz kesin veriler bulunmamaktadır (45, 46). Sonuç olarak kaveolin ekspresyonunun kaybı ya da kazanılmasının, doku tipine bağlı olarak tümöröenez sürecini farklı yönlere sürüklediği görölmektedir (13).

2.2. HGF-c-Met Sinyal İletim Yolu

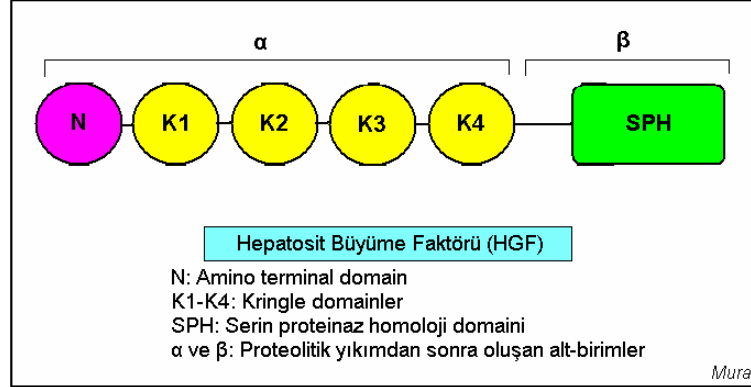
c-Met ilk olarak 1980'lerde bir onkogen olarak belirlenmiştir (3). c-Met'in bu formu tirozin kinaz domaininin bir dimerizasyon domaini ile birleşmesinden oluşan mutant formudur. Proto-onkogenin ise bir tirozin kinaz reseptörünü kodladığı bulunmuştur. c-Met'in proto-onkogen ve onkogen formlarının ilk tanımlandığı dönemlerde ligandı henüz bilinmiyordu; ancak bağımsız olarak yürütülen çalışmalarda, etkili bir motilite faktörünün (SF=Scattering Factor) ve hepatositler için mitojenik olan bir faktörün (HGF=Hepatocyte Growth Factor) c-Met'in yüksek afiniteli ligandları olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra bu iki faktörün aynı molekül olduğu bulunmuş ve HGF/SF olarak adlandırılmıştır (6).

HGF, çeşitli hücre tiplerinde proliferasyon, migrasyon ve morfolojik değişiklikleri uyaran bir salgı proteindir (3). Bu hedef hücreler arasında hepatositler ve diğer epitelyal hücreler, melanositler, endotelyal ve hematopoietik hücreler sayılabilir (3). Bu hücre tiplerinin çoğu HGF'e yanıt olarak proliferasyon olurken, endotelyal ve epitelyal hücre kültürü kolonileri proliferasyon olmadan dağılır ve bu özellik HGF'in bir SF olarak bilinmesine neden olur. HGF ayrıca kültür hücrelerinin kollajen matriks içine invazyonunu da uyartabilir; veya tübüler yapılar oluşmasına (branching morphogenesis) neden olabilir (47). Bazı sarkoma ve karsinoma hücre hatlarında ise HGF sitotoksik etkiye sahiptir. HGF'e verilen tüm bu yanıtlar reseptörü olan c-Met proto-onkogen ürünü aracılığıyla gerçekleştirilir. Genel olarak:

- Epitelyal farklılaşma programını koruyan hücreler HGF'e morfogenezle yanıt verirler.
- Epitelyal-mezenşimal dönüşüme uğrama gibi epitelyal karakteristiklerini kaybetmiş karsinom hücreleri ise HGF'e invazyon ve metastazla yanıt verirler (3).

HGF, % 38'lik ortak amino asit dizisi paylaşımı ve çeşitli yapısal motiflerin varlığıyla insan plazminojenlerine benzer (3)(Şekil 6). Her iki protein de tek zincirli bir polipeptit olarak sentezlendikten sonra proteolitik yıkımla, biyolojik olarak aktif, disülfid bağlı heterodimer oluşturur. Yine her ikisinde de dimerin ağır zinciri öncü polipeptidin N-terminal tarafından türevlenir ve bu bölgede kringle domainleri taşır (HGF'de 4, plazminojende 5). Yaklaşık 80

amino asit uzunluğundaki kringle domainler, 3 tane intramoleküler disülfid bağı ve korunmuş dizilerle karakteristik bir katlanma paterni gösterirler. HGF'in 60 kDa'luk ağır zincirinin yanındaki yaklaşık 34 kDa'luk hafif zincir, tıpkı plazminojende olduğu gibi bir serin proteaz yapısına sahiptir. Fakat bu bölge katalitik aktiviteden yoksundur (3, 6, 48).



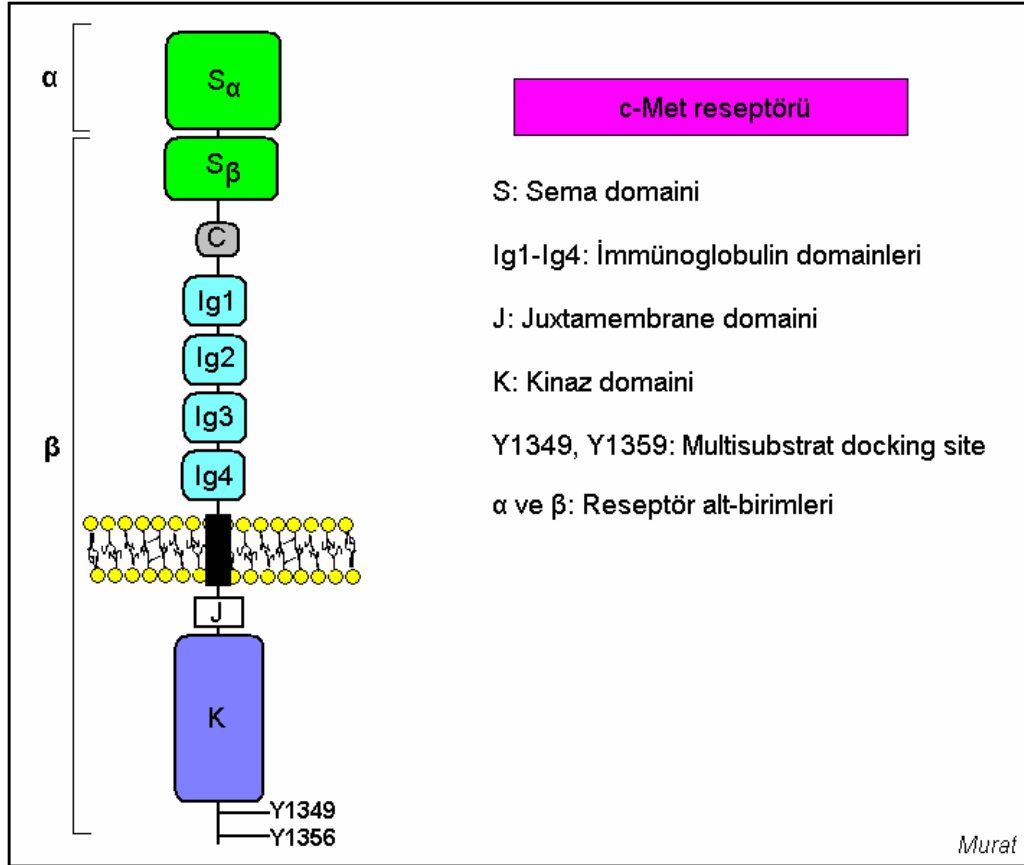
Şekil 6: Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)'nün yapısı ve içerdiği bölgelerin şematik gösterimi (3).

728 amino asitlik tam-uzunluklu HGF proteinine ilaveten, çeşitli alternatif mRNA splaylarından oluşan iki HGF izoformu daha bulunur. Her iki izoform da N-terminal domainini ve 1. kringle domaini içerdiği halde, izoformların biri NK1'de diğeri ise NK2'de sonlanır. Her iki izoform da c-Met'e bağlanabildiği halde aktive ettikleri sinyal yolları ve oluşan biyolojik yanıtlar farklı olmaktadır (3, 6).

HGF'in pleiotropik etkileri gelişim, organogenez ve doku rejenerasyonu sırasında oldukça önemlidir. Uygunsuz HGF sinyalleri birçok insan kanserlerinde bulunur ve HGF'in proteaz üretimi, hücre disosiasyonu ve motilite programlarını başlatma yeteneği tümör metastazıyla bağlantılı olarak bulunmuştur (3, 49).

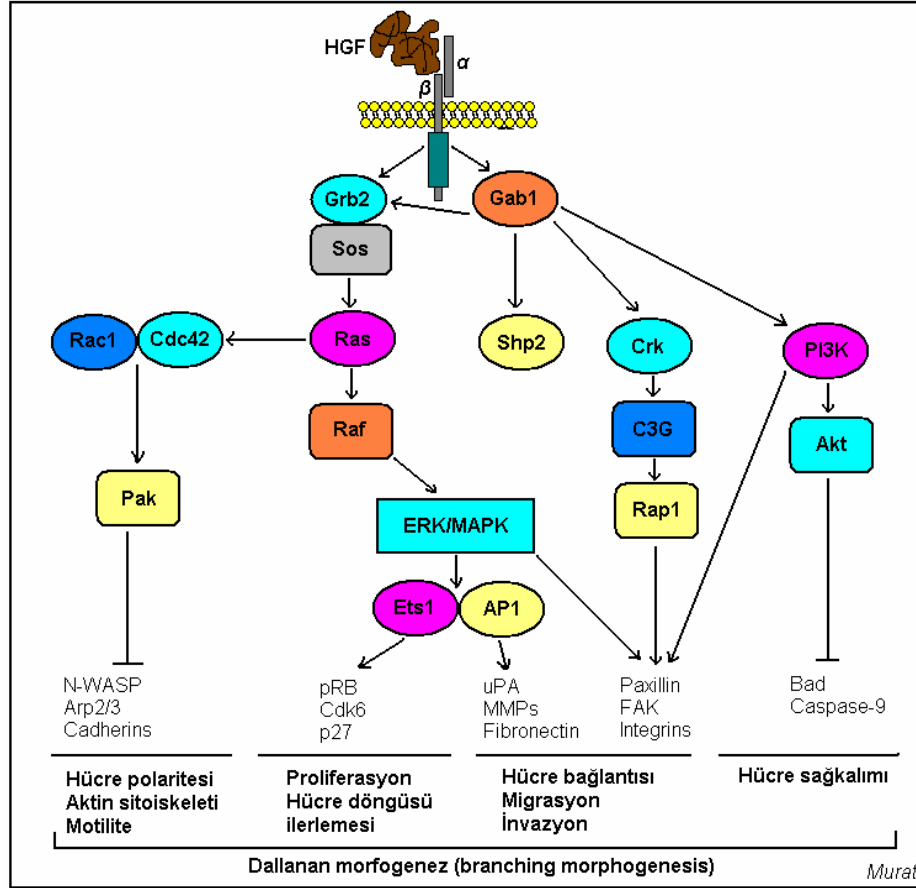
Bir tirozin kinaz reseptörü olan c-Met, tıpkı HGF gibi disülfid bağı bir heterodimer yapısındadır ve bu heterodimer öncü, tek bir polipeptidin proteolitik yıkımından oluşur (3, 6)(Şekil 7). Heterodimerin α-zinciri ekstrasellüler bölgede bulunur; β-zinciri ise ekstrasellüler bölgenin geri kalanını, transmembran bölgeyi ve intrasellüler kinaz domainini kapsar. α-zincirinin ve β-zincirinin ilk 212 rezidüsünün (Sema domainleri) ligand bağlanması için

gerekli olduğu bulunmuştur. c-Met'in ekstrasellüler bölgesinin geri kalanı ise küçük bir sisteince zengin bölge ve dört immunoglobulin domaini içerir. HGF/SF ve c-Met'in yapısal özellikleri bir diğer ligand-reseptör çifti olan MSP (Macrophage Stimulating Protein) ve Ron reseptörüne oldukça benzer (50).



Şekil 7: HGF reseptörü c-Met'in yapısının ve bölgelerinin şematik gösterimi (3).

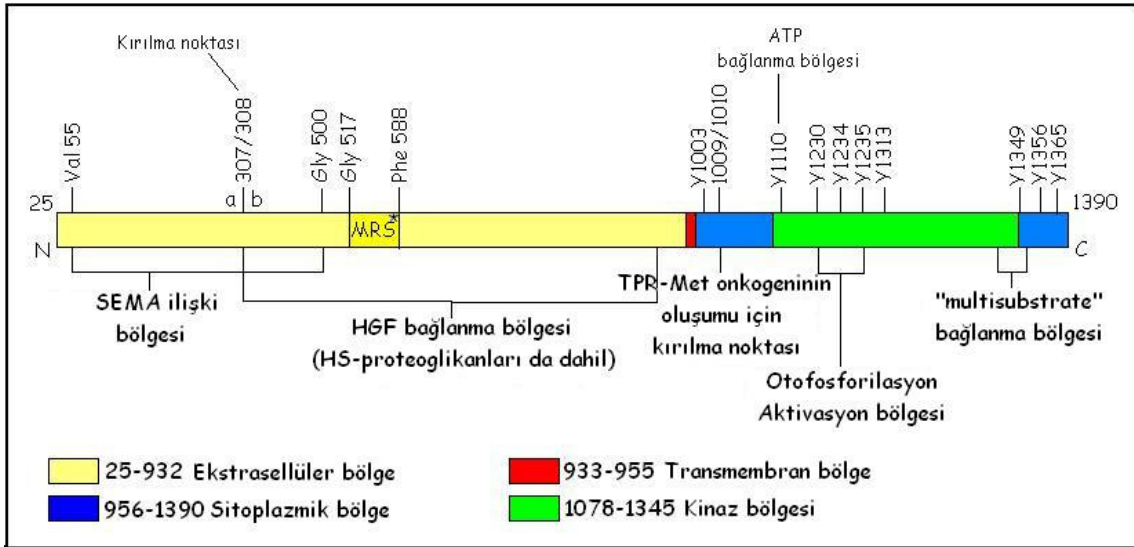
Aktif c-Met'e çekilen sinyal molekülleri arasında Grb2, Gab1, Shc ve Crk/CRKL adaptör proteinleri; PI3K, Stat3, PLC- γ , SOS, Src kinaz, SHP2 fosfataz gibi moleküller bulunmaktadır (51, 52, 53)(Şekil 8). "Multisubstrate docking site" ile yapılan mutasyonel analizler, Y¹³⁵⁶'nın Grb2, PI3K, PLC- γ ve SHP2 çağrılmasından sorumlu iken, Y¹³⁵⁶ ve Y¹³⁴⁹'un birlikteki ilişkisinin Gab1, Src ve SHC ile ilişkiyi sağladığı bulunmuştur (3, 6).



Şekil-8: c-Met sinyal iletim yolunun özet gösterimi. HGF uyarılmasıyla başlayan c-Met sinyal yolunda rol alan önemli moleküller, ve bu moleküller aracılığıyla farklı sinyal yollarına giden dallanmalar gösterilmektedir (3, 49).

c-Met sinyaline yanıt olarak, hücre tipi ve kültür şartlarına bağlı karakteristik hücresel yanıtlar ortaya çıkar. HGF/SF ve c-Met sinyalleri çeşitli hücre tiplerinde proliferatif ve anti-apoptotik yanıtları indükler (3). Özellikle MDCK hücreleri olmak üzere epitelyal hücreler HGF/SF ve c-Met sinyaline yanıt olarak koloni ayrılması ve epitelyal-mezenşimal geçiş gösterirler. Ayrıca bu hücrelerin motiliteleri artar. Böyle hücreler kollajen matrisi içine invaze olurlar. MDCK hücreleri kollajen bir matrisi içinde kültüre alındıklarında dallanan tübüller oluştururlar. Tübüler dallanma, kültürde gözlenen kompleks morfolojik bir olaydır ve hücre büyümesinin, polaritesinin, hareketinin sıkı bir koordinasyonunu gerektirir (47, 54).

Adherens bağlantıların ayrılması, hücre yayılması ve motilite için oldukça önemli olan ERK/MAPK yolağının çeşitli inhibitörlerle engellenmesi, epitelial hücrelerin dağılmasını önler. Gab1-Shp2-ERK/MAPK kaskadı hücre proliferasyonunu, bağlanmasını ve mobilitesini kontrol eden ETS/AP1 transkripsiyon faktörlerini ve adezyon moleküllerini düzenler (55). c-Met ayrıca Ras, Rac1 ve PAK bileşenlerini içeren bir sinyal yolunu da aktive ederek sitoskeletal düzenlenmeyi ve hücre adezyonunu da kontrol eder. Hücre sağkalımı ise PI3K ve Akt/PKB yoluyla kontrol edilir. Özetle c-Met sinyali kompleks, farklı dallarda ama ilişkili yolları aktive eder. Bunun yanında c-Met plazma membranında CD44, β_4 -integrin, ezrin, Fas reseptörü, semaforin reseptörleri ve E-kadherin gibi moleküllerle farklı sinyal platformları oluşturmak üzere ilişkiye girer (4, 49).



Şekil 9: c-Met proteininde yer alan önemli bölgelerin ve amino asitlerin yerleşimi (Orijinal).

HGF/SF ve c-Met'in genetik analizleri bu sinyal sisteminin özellikle embriyonik gelişim sırasında çok önemli olduğunu göstermiştir (3). HGF/SF erişkinde ve gelişim sırasında epitelial hücreler için etkili bir motilite faktörüdür ve c-Met birçok organın epitelial hücrelerinde eksprese edilir (50). Gelişimde HGF/SF ve c-Met, hepatositlerin ve plental trofoblastların sağkalımı ve proliferasyonu için esansiyel olan sinyalleri sağlar. HGF/SF - c-Met sisteminin gelişim sırasındaki bir diğer önemli etkisi de motiliteyle ilgilidir. Gelişim sırasında çeşitli hücreler uzun mesafelerde göç etmek zorunda kalırlar ve HGF/SF- c-Met

sistemi özellikle de epitelyal-mezenşimal geçişi sağlayacak şekilde hücrelerin motilitelerinin artmasını sağlayan sinyal yollarını aktive eder (56).

Erişkinde ise c-Met sinyalleri çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde gösterilmiştir (3, 57). Örneğin karaciğer, böbrek, kalp gibi dokularda oluşan yaralanmalar sonucunda plazma HGF düzeyleri artar ve HGF ifadesi sadece hasarlı dokuda değil diğer dokularda da yükselir. Bu durum HGF regülasyonunun doku hasarına karşı fizyolojik bir savunma yanıtı olduğunu gösterir. İlginç bir şekilde interlökin-1 ve 6 gibi sitokinler HGF transkripsiyonunu aktive ederler. HGF/SF etkili bir karaciğer mitojenidir, ortalama karaciğer boyutunu ve karaciğer rejenerasyonunu arttırır. HGF'in diğer bir aktivitesi de özellikle kanserde önem taşıyan anjiogenezdır (54, 55).

c-Met ve HGF/SF sinyal iletiminin bozukluğu birçok insan malignansında rastlanan bir özelliktir (3, 54). İnsan tümör hücrelerinde HGF/SF ya da c-Met'in ekspresyonunun downregülasyonu, onların tümörjenik potansiyellerini azaltır. Birçok çalışmada HGF/SF ve/veya c-Met'in sıklıkla karsinomalarda, insan solid tümörlerinin ve metastazlarının diğer tiplerinde eksprese olduğu gösterilmiştir (6).

Birçok kanserdeki c-Met aktivasyonu ligand-bağımlı otokrin ya da parakrin mekanizmalarla gerçekleşir. Örneğin, osteosarkomalar ve glioblastoma multiforme c-Met ve HGF/SF eksprese ederler (3). Ligand-bağımsız aktivasyon ise reseptörün yüksek seviyelerde aktivasyonu ile oluşur. Aktive Ras gibi diğer onkogenler de transkripsiyonel mekanizmalarla c-Met overekspresyonunu gerçekleştirebilirler. Kısacası birçok insan kanserinin gelişiminde c-Met ve HGF/SF önemli roller oynarlar, ancak kanser için tek başlarına bir gösterge değildirler (3, 6, 50).

2.3. Hepatosellüler Karsinoma

Hepatosellüler karsinoma (HCC) primer karaciğer kanserinin neredeyse tamamını oluşturur ve tüm kanserler içinde % 5.4'lük bir paya sahiptir. İnsidansı coğrafik koşullara göre değişkenlik göstermektedir; en fazla Asya ve Afrika'daki gelişmekte olan ülkelerde, daha az oranda ise gelişmiş ülkelerde. HCC genellikle viral hepatitli (HBV ve HCV), aflatoksine maruz kalmış ya da aşırı alkol tüketimi olan hastalarda gelişmektedir (58). Tüm HCC'lerin % 85'inden, gelişmekte olan ülkelerdeki HBV enfeksiyonları sorumludur. Gelişmiş ülkelerde ise HCV enfeksiyonları ve alkol kullanımı HCC gelişiminden daha fazla oranlarda sorumludur. Siroz gelişimi ise HCC gelişiminde oldukça önemli, fakat ön koşul olmayan bir süreç olarak görülmektedir. HBV enfeksiyonlarına bağlı HCC'lilerin çoğunda siroz görülmezken, HCV ve alkole bağlı HCC'lerin neredeyse tamamında siroz da görülmektedir (59).

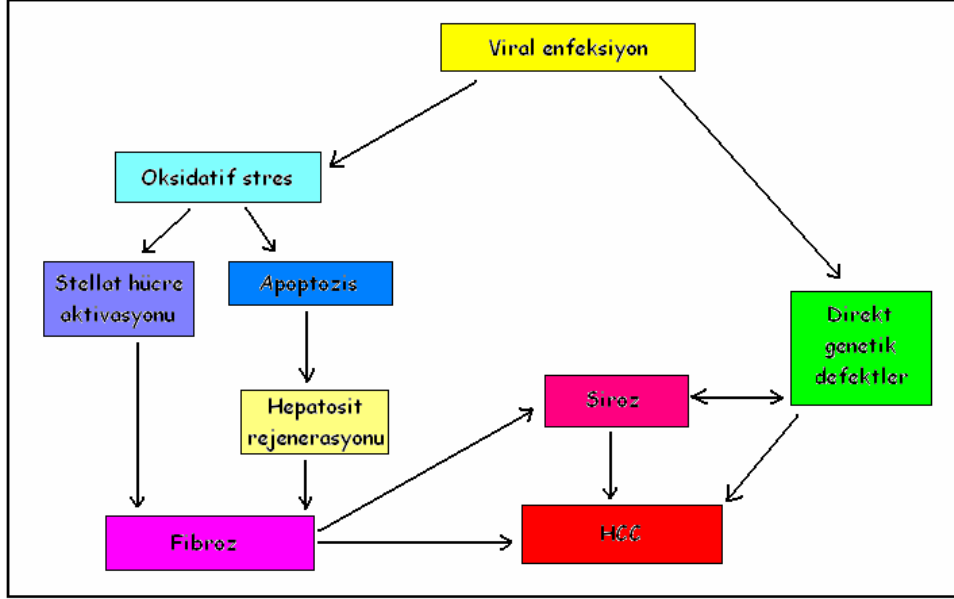
HCC'nin tedavi edilmesi ve önlenmesi için yapılan çalışmalar, hastalığın gelişimi ve moleküler patogenezinin anlaşılması üzerine yoğunlaşmıştır. Fakat HCC patogenezi, hastalar arasında oldukça heterojen görünmektedir (60). HCC patogenezinin anlaşılması şu nedenlerle önemlidir:

- Kanser için risk taşıyan hastaların belirlenmesi.
- Kanser varlığı için tarama ve tesbit yöntemlerinin geliştirilmesi.
- Klinik olarak sonucun öngörülmesi.
- Tedavi yaklaşımının seçilmesi.
- Yeni tedavi ya da önleme stratejilerinin geliştirilmesi.

Özellikle birkaç tümörögenез sürecinin (tümör baskılayıcı kaybı, onkogen aktivasyonu, direkt viral etkiler, DNA metilasyonu ve anjiyogenez) birlikte etkili olduğu bilinmektedir. Bunlardan hangisinin tümör başlangıcı, hangisinin tümör gelişimi için önemli olduğu ise açık değildir (61). RNA mikro-dizin ve proteomiks çalışmaları, bu kompleks ve yaygın hastalığın anlaşılmasında umut vaat eden yöntemler olarak görülmektedir.

HCC'nin moleküler analizleri, hepatokarsinogenez sürecinin genetik, viral ve çevresel faktörlerin bir kombinasyonuna bağlı olduğunu ve son derece kompleks ve heterojen olduğunu göstermektedir (Şekil 10). Tek bir karaciğerdeki preneoplastik nodüllerde bile

büyük bir heterojenite vardır (59). Kromozomal seviyede ise büyük değişiklikler bulunur. 1p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 13q, 16p, 17p bölgelerinde kayıplar gözlenirken, 1p, 6p, 8q, 17q bölgelerinde fazlalıklar tespit edilmiştir (62). Bu bölgelerin içinde çeşitli tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin olacağı açıktır.



Şekil 10: HCC patogenezinde kronik hepatit için önerilen rol (61).

HCC'de çeşitli tümör baskılayıcı genlerin rolü tanımlanmıştır (Tablo 4). p53 geni en fazla çalışılanıdır. HCC'li hastaların %30-60'ında p53 kaybı tespit edilmiştir. En fazla bulunan p53 değişimleri, bir allelin nokta mutasyonu ve diğer allelin delesyonu şeklindedir. Fakat çoğu durumda p53 değişimi hastalığın başlangıcına değil gelişimine etkili olmaktadır. p53 mutasyonları az-diferansiye tümörlerde bulunurken, iyi-diferansiye tümörlerde bulunmaz. HCC'deki p53 mutasyonu ile ilişkili spesifik çevresel bir etken aflatoksidir. Aflatoksin maruziyetinin yüksek olduğu Çin ve Afrikanın güneyindeki bölgelerde çalışılan HCC'lerde p53 mutasyonlarına sıklıkla rastlanmaktadır (60, 61).

p53'ün dışındaki diğer tümör baskılayıcı genlerin de HCC'de değişimi bulunmuştur (Tablo 4). APC, retinoblastoma geni (pRb) ve p16^{INK4a} bunların başında gelir. Ayrıca p16'nın birçok hastada hipermetilasyonla inaktif duruma geldiği de belirlenmiştir. Ayrıca CpG

adalarının metilasyonu, E-kadherin, p15, SOCS-1 ve GSTP gibi moleküllerin promotörlerinde de gözlenmiştir (61).

Proto-onkogenler ise HCC patogenezinde daha az kritik olarak değerlendirilmektedir. HCC’de Ras, c-fos ve c-erbB-2 mutasyonları yaygın değildir. c-Myc ise tümörlerin %30’unda gen amplifikasyonu yoluyla over-ekprese durumdadır. c-Met proto-onkogeni ise HCC’lerin %50’sinden daha azında over-ekspresedir, ancak yüksek c-Met seviyeleri intrahepatik metastaz ve düşük sağkalımla ilişkilidir (60, 61).

Tablo 4: HCC’de ekspresyonunun değiştiği RNA mikro-dizin analizleri belirlenen önemli genler (61).

Gen İşlevi	Gen	Ekspresyon
Büyüme (growth)	Myb	+
	EGFR	+
	IGF2	+
	PDGFRA/PDGFRB	+
Hücre döngüsü	CDK 8, 9, 10	+
	Siklin G1	+
	Siklin D1	-
Apoptoz	TRAIL	-
	TRAF6	-
	Survivin	+
Metastaz	MMP 1, 7	+
Sinyal iletimi	Wnt yolu	+/-
	MAPK yolu	+
Metabolizma	GST	-
	Sitokrom proteinleri	-
Diğer	AFP	+
	VEGFB	+

HCC başlangıcında HBV'nin direkt bir etkisi HBV X proteini aracılığıyla olur. 154 amino asitlik bu proteinin tam işlevi bilinmediği için X proteini olarak adlandırılır. X proteini, c-fos ve c-jun'ı da içeren çeşitli onkogenlerin promoterlerini aktive etme yeteneğindedir. Ayrıca p53 proteinini inhibe ederek apoptozisi de engelleyebilir. X proteini HCC hücre hatlarında EGFR ekspresyonunu artırır ve TGF- α üretimini indükler. Ayrıca X proteini, karaciğer fibrozisinin bir mekanizması olması muhtemel TGF- β sinyal yolunun aktivasyonunu sağlar. X proteini eksprese eden transgenik farelerin %84'ünde HCC gelişimi gözlenmiştir. X proteininin etkisine ilaveten HBV, direkt olmayan yollarla da HCC gelişimini sağlayabilir. Kronik viral hepatitis, hepatosit replikasyonunun devamlı uyarılmasına ve hepatic fibrozise yol açabilir. Bunlar ise henüz bilinmeyen mekanizmalarla HCC başlangıcını uyarmak için yeterli olabilir (61).

HCV, 9.6 kb uzunluğunda tek iplikli bir RNA virusudur. Özellikle gelişmiş ülkelerde HCC'lerin büyük kısmından sorumludur. Kronik hepatit C'li hastalarda HCC'nin moleküler patogenezi açık değildir. HCV konukçu genomuna entegre olmaz, ancak viral RNA, HCC örneklerinde tespit edilebilir. HBV'nin X proteini gibi HCV'nin de kor proteini direkt olarak HCC gelişimine öncülük edebilir. *In-vitro* olarak çeşitli onkogenleri aktive edebilir ve primer hücreleri transforme edebilir. Ayrıca kor proteini transgenik farelerde HCC gelişimine neden olur. p53 transkripsiyonunu da blokladığı bilinmektedir (61).

HCC'lerden yapılan mikro-dizin çalışmaları sonucunda hücre büyümesi ve büyüme inhibisyonu ile ilgili çeşitli genlerde değişiklikler belirlenmiştir. Ancak hastalar arasında, hatta aynı hastanın farklı nodülleri arasında bile büyük heterojenite gözlenmiştir. Bu durum HCC'nin sınıflandırılmasını ve etkenlere bağlı olarak değişen mekanizmaların tanımlanmasını zorlaştırmaktadır. Yine de bazı genlerin ve mekanizmaların değişimi ve rolü tanımlanabilmiştir. HCC'deki bu önemli mekanizmalar arasında, HCC gelişiminin erken aşamalarından itibaren etkili görünen Wnt/Beta-catenin yolu, interferon yanıtı yolu ve TGF- β /IGF2R/Smad yolu sayılabilir (60, 61, 63).

Yapılan başka bir mikro-dizin çalışmasında HCC'ler sınıflandırılabilmiştir (Şekil 11). Düşük sağkalımlı HCC sınıfında, ubiquitinasyon ve histon modifikasyonu ile ilişkili genlerde ekspresyon artışı görülmüştür. Bu bulgu, ubiquitin sisteminin genellikle kanserlerde bozulmuş

olması gerçeğiyle çelişmektedir. Ayrıca ubiquitinasyon derecesi HCC'nin rekurrensinde de muhtemel öngörücü bir marker olabilir. Ayrıca, ubiquitin aracılı protein degradasyonundaki regülasyonu bozulmuş bileşenler, HCC tedavisi için terapötik hedef olabilir (63).

İnsan HCC		Fare HCC	
	alt-sınıf A	alt-sınıf B	
Proliferasyon	Yüksek	Düşük	
Apoptozis	Düşük	Yüksek	
Ubikitinasyon	Yüksek	Düşük	
B-katenin aktivasyonu	Düşük	Y	D O
Genomik stabilite	Yüksek	Düşük	
Ubikitinasyon	Yüksek	Düşük	
Apoptozis	Düşük	Yüksek	
Proliferasyon	Yüksek	Düşük	
	Myc/Tgfa	Myc/E2f1	Myc E2f1

Şekil 11: Yapılan mikro-dizin çalışmaları sonucunda insan ve fare HCC'lerinin sınıflandırılması. Gen ekspresyon değişimlerinin incelenmesi sonucunda proliferasyon, apoptozis, ubiquitinasyon gibi mekanizmalarda yer alan genlerin iki alt-sınıf oluşturacak şekilde bir patern oluşturduğu görülmektedir (63).

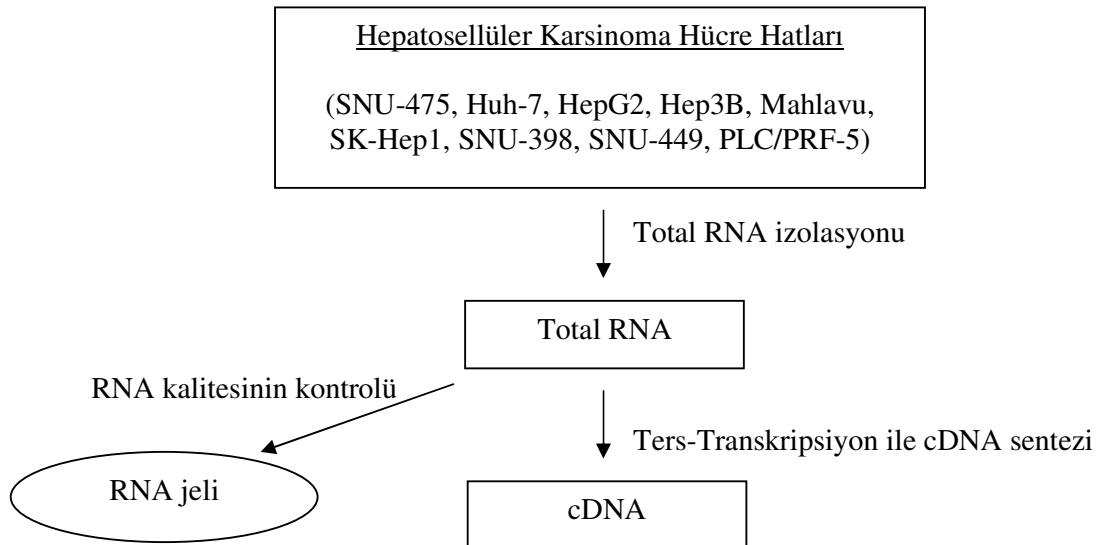
3. MATERYAL VE YÖNTEM

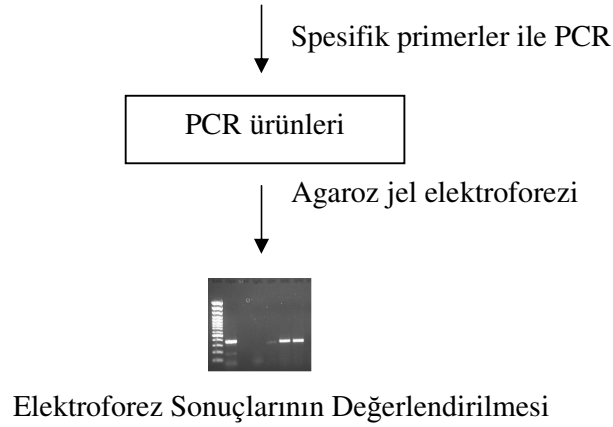
3.1. Hücre Kültürü

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

3.2. Hücre Hatlarında Kaveolin ve c-Met Ekspresyonlarının RNA Düzeyinde Belirlenmesi

Hepatosellüler karsinoma hücre hatlarında kaveolin ve c-Met genlerinin RNA düzeyindeki ekspresyonunun belirlenmesi için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.





3.2.1. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu:

Standart koşullarda 100 mm'lik hücre kültürü plaklarında (Greiner CellStar, 633 171) üretilen hücreler %70 "confluent" olduklarında total RNA izolasyonları yapıldı. Yöntem aşağıdaki gibi uygulandı:

1. Hücreler buz üzerine alındı ve ortamları çekilerek soğuk PBS ile 2-3 kez yıkama yapıldı.
2. Hücrelerin üzerine uygun miktarda (3 ml) Trizol kimyasalı (RNAtidy G, Applichem, A2867-0200) eklendi ve bir hücre kazıyıcı ile hücreler kazındı.
3. Soğuk ependorflar içine alınan hücre solüsyonu üzerine %10 oranında kloroform (Sigma, C-2432) eklendi, organik ve sulu fazın ayrışması için 12,000 g' de santrifüj edildi (Eppendorf Centrifuge, 5415R).
4. RNA'ları içeren sulu faz yeni bir tüpe alındıktan sonra RNA'ların presipitasyonu için eşit hacimde izopropanol (Applichem, A3928) eklendi ve -20 °C'de bir gece inkübe edildi.
5. Çöken RNA'lar 7,000 g de 10 dk. santrifüjlenerek çöktürüldü, %75'lik etanol (Applichem, A3678) ile 2 kez yıkama yapıldı ve son yıkamadan sonra çöktürülen RNA pelleti etanolün uzaklaşması için kurumaya bırakıldı.
6. Kuruyan RNA pelleti 50 µl RNaz'dan arındırılmış dH₂O içerisinde çözüldü. Bu RNA'ların bir kısmı spektrofotometrik ölçüm için, bir kısmı da RNA kalitesinin belirlenmesi amacıyla formaldehidli RNA jel elektroforezinde kullanıldı. Geri kalanı ise cDNA sentezi için kullanıldı.

3.2.2. İzole Edilen RNA'ların Spektrofotometrik Olarak Kantitasyonu

İzole edilen her bir RNA örneğinden 10 µl alındı ve 990 µl 10 mM Tris (pH 7.0) çözeltisi içinde 1:100 oranında dilüsyonu yapıldı. Bu dilüsyonların 260 nm'de ve 280 nm'de spektrofotometrik absorpsiyonları ölçüldü (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000). RNA miktarlarının belirlenmesi için 260 nm'deki absorpsiyon değeri kullanıldı, kontamine protein miktarının belirlenmesi için de 280 nm'deki absorpsiyon değeri kullanıldı.

3.2.3. Total RNA'ların Kalitesinin Formaldehidli Agaroz Jel Elektroforezinde Belirlenmesi

RNA izolasyonu sonucunda DNA kontaminasyonu olup olmadığını veya RNA'ların integritesinin korunup korunmadığını belirlemek amacıyla RNA'lar agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Bu jel sisteminde RNA'ları denatüre durumda tutabilmek için formaldehid kullanıldı. %1.5 agaroz (BRL, 5510UB), 2.2 M formaldehid (Applchem, A0823) ve 1X MOPS tamponu içeren bir jel döküldü. 2 µl'lik RNA örnekleri, MOPS buffer (1X), formaldehid (%20), formamid (%50, Applchem, A2156) ve etidyum bromid (0,2 µg) karıştırılarak hazırlandı ve 55 C'lik su banyosunda 60 dk. inkübe edilerek örnekler denatüre edilip yüklemeye hazır hale getirildi. Formaldehidli agaroz jel yatay elektroforez tankına yerleştirildi ve tank 1X MOPS tamponu ile dolduruldu. Hazırlanan RNA örnekleri 2x yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyulara yüklendi. Yükleme tamponundaki bromofenol mavisi yeterli uzaklığa gidene kadar (2-3 saat) 80 V'luk gerilimde yürütüldü. Daha sonra jel transillüminatör (Stratagene, Eagle Eye II) altında UV ışığı ile görüntülendi ve RNA kalitesi değerlendirildi.

3.2.4. Total RNA'lardan cDNA Sentezlenmesi

Hücre hatlarından total RNA izole edilip konsantrasyonları ve kalitesi belirlendikten sonra bu RNA'lardan 2 µg kullanılarak cDNA sentezlendi. cDNA sentezinde MBI Fermentas marka cDNA sentez kiti (K1622) ve bileşenleri kullanıldı. 2 µg total RNA ve 0.2 µg/ µl "random primer", RNaz'dan arındırılmış dH₂O içerisinde hazırlandıktan sonra 70 °C'de 5 dk. inkübe edildi. Daha sonra karışıma 5x reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü (20 u) ve

dNTP (0.5 mM) eklendi ve 37 °C’de 5 dk. inkübe edildi. En son “M-MuLV Reverse Transcriptase” (200 u) eklendi ve 42 °C’de 60 dk. inkübe edilerek ilk-zincir cDNA sentezi bir termal döngüleyici (Techne TC-312) içerisinde yapıldı. Tüpler 70 °C’de 10 dk. tutularak reaksiyon sonlandırıldı.

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

İlk-zincir cDNA sentezlendikten sonra bu cDNA’lar (her bir cDNA reaksiyonundan 2 µl) kalıp olarak kullanılarak spesifik primerler aracılığıyla PCR reaksiyonu kuruldu. Kaveolin-1 (GenBank, Accession Number: NM_001753+3), kaveolin-2 (NM_001233+3) ve c-Met (NM_000245+2) mRNA’ları üzerindeki korunmuş bölgelerden “Primer-3” programı (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) ile primer dizayn edildi ve bu primerler PCR reaksiyonlarında kaveolin ve c-Met ekspresyonlarının belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Ayrıca kontrol olarak da B-aktin genine spesifik primerler kullanıldı. Kullanılan primer dizileri aşağıdaki gibidir.

Kaveolin-1: İleri 5’ CGTAGACTCGGAGGGACATC 3’
Geri 5’ TCATCGTTGAGGTGTTTAGGG 3’
Kaveolin-2: İleri 5’ ATCCCCACCGGCTCAACT 3’
Geri 5’ CTCAGTTGCAGGCTGACAGA 3’
c-Met: İleri: 5’ CTGGGCACCGAAAGATAAACC 3’
Geri: 5’ TGGCACCAAGGAAAATGTGATG 3’
B-aktin: İleri: 5’ ATCATGTTTGAGACCTTCAA 3’
Geri: 3’ CATCTCCTGCTCGAAGTCCA 3’

Kaveolin-1’in Açık Okuma Çerçevesi ve Primerlerin Yerleşimi

atgtctggggc~~aaatac~~~~gtagactc~~~~ggaggacatc~~tctacaccgttcccatcgggaacagggcaacatctacaagcccaacaac
aaggccatggcagacgagctgagcagagaagcaagtgtacgacgcgcacaccaaggagatcgacctggtaaccgcgaccctaaa
~~cacctcaacgatgacgtggtcaagattgacttgaagatgtattgcagaaccagaagggacacacagttttgacggcatttgaaggc~~
~~cagcttcaccacctcactgtgacgaaatactggtttaccgcttctgtctgcctctttggcatcccgatggcactcatctggggcattta~~
~~cttcgccattctctcttctgcacatctgggcagttgtaccatgcattaagagcttctctgattgagattcagtgcacagccgtgtctatcc~~
~~atctacgtccaccctgtgaccactcttgaagctgtgggaaaatattcagcaatgtccgatcaactgcagaagaataataa~~

Kaveolin-2'in Açık Okuma Çerçevesi ve Primerlerin Yerleşimi

a ve b-izofomları

atggggctggagacggagaaggcggacgtacagcttcatggacgacgactcctacagccaccacagcggcctcgagtacgccg
accccgagaagttcgggactcggaccaggaccgggatccccaccggctcaactcgcattcctcaagctgggcttcgaggatgtgatcg
cagagccgggtgactacgcaactcttgacaaagtgtggatctgcagccatgccctcttgaatcagcaatacgaatgtacaagtctc
gacgggttctggcattccccctggcctcattgcgggaattctcttccaccctcagctgtctgcacatctggatttaagcctttgta
aagacctgcctaagtgtctgccttcagtcagacaatatggaagagtgtgacagatggtatcattgctccattgtgtacgagcgtaggac
gatcctctctctgcagcctgcaactgagccaggattga

c-izofomu

atggggctggagacggagaaggcggacgtacagcttcatggacgacgactcctacagccaccacagcggcctcgagtacgccg
accccgagaagttcgggactcggaccaggaccgggatccccaccggctcaactcgcattcctcaagctgggcttcgaggatgtgatcg
ctgcctaagtgtctgccttcagtcagacaatatggaagagtgtgacagatggtatcattgctccattgtgtacgagcgtaggacgatgct
tctctctgcagcctgcaactgagccaggattgaatacttgacccccaggtctggagattgggatactgtaa

c-Met'in Açık Okuma Çerçevesi ve Primerlerin Yerleşimi

cgctgtggtccttgcgccgtgacttctccactggctctgggaccgaaagataaacctctcataatgaaggccccctgtgcttgc
acctggcattcctgtgctcctgtttaccttgggtgcagaggagcaatggggagtgtaaagaggcactagcaaaagtcagatgaatgtga
atatgaagtatcagctcccaactcaccgcggaaacacccatccagaatgtcattctacatgagcatcacatttcttgggtgccaactaac
tacatttatgtttaaagaggaagacctcagaaggtgtgagtaaacactggcctgtgtggaacaccagattgttccatgtca
ggactgcagcagaaagccaattatcaggaggtgttggaaagataacatcaacatggctctagtgtgcacacctactatgatgatca
actcattagctgtggcagcgtcaacagagggacctgccagcagatgttccccacaatcatactgctgacatacagtcggaggttc
actgcatttccccacagatagaagagcccagccagtgctgactgtgtggtagcgcctgggagccaaagtcttctcatctgtaa
aggaccggtcatcaactctttaggcaataaccataaattcttatttcccagatcatccattgcattcgatagcaggaaggtctaaa
ggaaacgaaagatggtttatgttttgacggaccagtcattgatgtttacctgagttcagagattctacccattaagtatgtccat
gccttfgaaagcaacaattttacttctgacggcctcaagggaaactctagatgtcagactttcacacaagaataatcaggttctgtt
ccataaactctggattgctcctacatggaaatgctctggagtgattctcacagaaaagagaaaaagagatccacaagaaggaa
gtgttaataatactcaggtgcgtatgtcagcaagcctggggcccagcttgcagacaataaggagccagcctgaatgatgacattctt
tcgggggtgttcgacaaaagcaagccagattctgccaaacatggatcgtatgctgattccctataaataatgtcaacgactt
ctcaacaagatcgtcaacaaaaacaatgtgagatgtctccagcattttacggaccaatcatgagcactgcttaataggacactctgga
gaaatcatcaggctgtgaagcgcgccgtgatgaatcgaacagagttaccacagcttgcagcgcgttgactattcatgggtcaatt
cagcgaagtccttaacatctataccacctcattaaaggagacctccatagctaatctgggacatcagagggtcgttcatgcag
gttgggttctcagcagaccatcaacccctcattgatttctcctggactcccatcagtgctccagaagtgttggagcataca
ttaaaccaaaatggctacacactggtatcactgggaagaagatcacgaagatccattgaatggctgggctgcagacattccagtc
tgacgtcaatgcctctctgccccacccttggctcagtggtgctggtgccacgacaatgtgtgcgacggagggaatgcctgagcgggac
atggactcaacagatctgtctgcctgcaatctacaaggtttcccaaatagtgacccttgaaggagggacaaggctgaccatatgtgg
ctgggactttgatttcggagggaataataaattgatttaaagaaaactagagttctccttggaaatgagagctgcaccttgactttaagtga
gagcacgatgaatacattgaaatgcacagttggtcctgcatgaataagcatttcaatgtccataattttcaaatggccacgggaca
acacaatacagatcattctctatgtgatcctgtaataacaagtatttcgccaaatacggctctatggctgggtggcactttacttacttaa
ctgaaattacctaacagtggaattctagacacattcaattggtgaaaaacatgactttaaagtgtgtcaaacagatttctgaat
gttataccccagcccaaccatttcaactgattgtgttaattgaaaatgacttagccaaccgagagacaagcattctcagttaccgt
gaagatccattgtctatgaaatcattcaaccaaatctttattagtgggtgggagcacaataacaggtgttgggaaaaacctgaattcag
tagtgtcccagaaatggtcataaatgtgcatgaagcaggaaggaactttacagtgcatgtcaacatcgtcttaattcagagataatctgt
gtaccactcttccctgcaacagctgaatctgcaactccccgaaaaccaaagccttttcatgttagatgggatccttccaaatacttt
gatctcatttatgacataatcctgtgtttaaagcctttgaaaagccagtgatgatcctaatgggcaatgaaaatgactggaaattaaaggga
aatgatattgacctgaagcagttaaaggtaaggtgtttaaaggtggaaataagagctgtgagaatatacacttacattctgaagccgtttt

atgcacggccccaatgacctgctgaaattgaacagcagagctaaatatagagtggaagcaagcaattctcaaccgtccttggaagaat
aatagttcaaccagatcagaatttcacaggattgattgctggtgtgtctcaatataacagcactgttattactacttgggttttctgtggc
tgaaaaagagaaaagcaaattaaagctgggcagtgaattagttcgtacgatcaaggtacacactcctcatttggataggctttaa
gtgcccgaagtgaagcccaactacagaatggtttcaaatgaatctgtagactaccgagctactttccagaagatcagtttctaattca
tctcagaacggttcatgccgacaagtgcagtatcctctgacagacatgtccccatcctaactagtggggactctgatataccagttcat
tactgcaaaaactgtccacattgacctcagtgtctctaaatccagagctggtccaggcagtgcagcatgtagtgattggcccagtagcc
tgattgtcatttcaatgaagtcataagagggcatttgggtgtatcatgggacttgggacaatgatggcaagaaaattcact
gtgctgtgaaatcctgaacagaatcactgacataggagaagttccaatttctgaccgagggaatcatatgaaagatttagtcatccc
aatgtcctctcgtcctgggaatctgctgcgaagtgaagggctccgctggtgtcctaccatacatgaaacatggagatctcgaatt
tcattgaaatgagactcataatccaactgtaaaagacttattggcttggcttcaagtagccaaaggcatgaaatatcttgaagcaaa
aagtttgcacagagacttggctgcaagaaactgtatgctggatgaaaattcacagtcaaggttctgatttggcttccagagaca
tgtatgataaagaatactatagttacacaacaaaacaggtgcaaagctgccagtgaagtggatggcttggaaagtctgcaaaccaa
aagttaccaccaagtcatgtgtgctccttggcgtcctctgggagctgatgacaagaggagccccacttatctgacgtaaac
accttgatataactgttacttgttcaagggagaagactcctacaacccgaactgcccagacccttatatgaagtaagtctaaaatg
ctggcacccctaaagccgaaatgcgccatccttttgaactggtgtcccgatcagcagatcttctacttctcatttgggagcactatg
tccatgtgaacgctacttatgtgaacgtaaatgtgctcctctctctgtgtcatcagaagataacgctgatgatgaggtggac
acacgaccagcctcctctgggagacatcatag

Her dört gen için de farklı primer konsantrasyonları, farklı termal profiller gibi değişkenler uygulanarak optimizasyon yapıldı ve optimizasyon sonucunda aşağıdaki profillerde PCR reaksiyonları kuruldu.

	<u>B-aktin</u>	<u>Kaveolin-1</u>	<u>Kaveolin-2</u>	<u>c-Met</u>
Primer	5 pmol	10 pmol	10 pmol	10 pmol
MgCl	2.5 mM	2.5 mM	1.5 mM	1.5 mM
dNTP	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM
Taq polimeraz	1.25 u	1.25 u	1.25 u	1.25 u
İlk denaturasyon	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C
Denaturasyon	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C
Bağlanma	56 °C, 40 s	60 °C, 60 s	65 °C, 60 s	56 °C, 40 s
Uzama	72 °C, 40 s	72 °C, 60 s	72 °C, 60 s	72 °C, 40 s
Döngü sayısı	27	30	30	30
Son Uzama	72 °C, 5 dk	72 °C, 5 dk	72 °C, 5 dk	72 °C, 5 dk

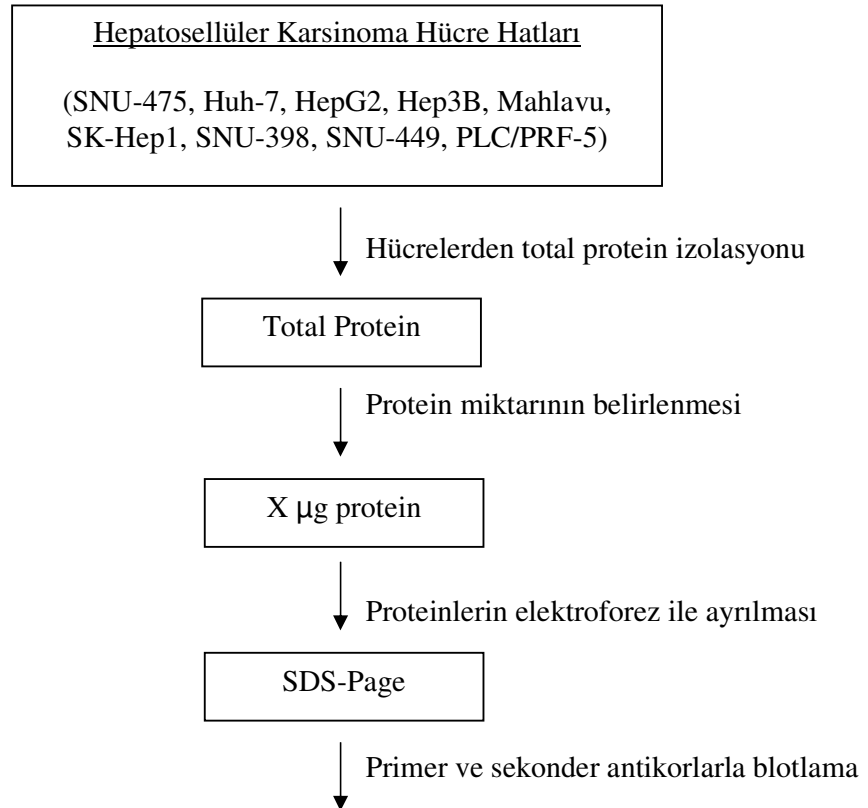
Bütün PCR reaksiyonları Techne TC-312 termal-döngüleyici ile yapıldı.

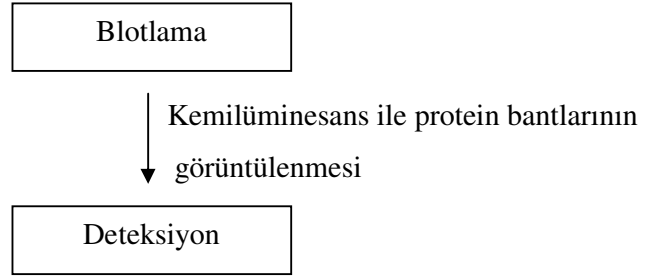
3.2.6. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

PCR ürünlerinin yürütülmesi ve analizi için 30 ml TBE tamponu içerisinde %2'lik agaroz (BRL, 5510UB) jel döküldü. Jel içerisine 0,2 µg etidyum bromür de eklendi. PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünlerin herbirinden 5'er µl alınarak 1 µl 6X yükleme-tamponu ile karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklendi. Bantlar açılana kadar (30-60 dk) 70 V'luk gerilim uygulanarak örnekler TBE ile dolu elektroforez tankında yürütüldü. Daha sonra amplifiye edilmiş olan DNA'lar transillüminatör (Stratagene, Eagle Eye II) ile UV ışığı altında DNA'ya interkale olan etidyum bromür aracılığı ile incelendi.

3.3. Hücre Hatlarında Protein Düzeyinde c-Met ve Kaveolin Ekspresyonlarının “Western Blot” Yöntemi ile Belirlenmesi

Kaveolin ve c-Met ekspresyonlarını protein düzeyinde belirlemek amacıyla western-blot yönteminden yararlanıldı. Yapılan işlemlerin kısaca şematize edilmiş hali aşağıdaki gibidir.





3.3.1. Hücrelerden Total Protein İzolasyonu

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

3.3.2. Protein Miktarlarının BCA Yöntemi İle Belirlenmesi

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

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

Kaveolin 24 kD’luk bir protein olduğundan, ayrılması için %12’lik, c-Met ise 140 kD’luk bir protein olduğundan %8’lik poliakrilamid jeller (“resolving”) kullanıldı. “Stacking” olarak da %5’lik jel kullanıldı. Jellerin kalınlığı 1.5 mm’dir ve bileşimleri aşağıdaki gibidir.

	<u>%8’lik jel</u>	<u>%12’lik jel</u>	<u>%5’lik jel</u>
dH ₂ O	4.6 ml	3.3 ml	6.8 ml
%30’luk akrilamid	2.7 ml	4 ml	1.66 ml
1.5 M Tris-Cl, pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	1.26*ml
%10 SDS	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
%10 amonyum persulfat	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
TEMED	0.006 ml	0.004 ml	0.005 ml

* %5’lik jel için 1 M Tris-Cl, pH 6.8 kullanılmıştır.

Örnekler yüklemeye hazırlanırken her bir örnekten 50 µg total protein alındı ve bu proteinlerin denaturasyonu için %5 oranında B-merkaptoetanol (Sigma, M-7154) içeren 2X yükleme tamponu (Applichem, A3484) ile eşit hacimde karıştırılarak 95 °C’lik su banyosunda 5 dk. inkübe edildi. Kaynatılan protein örnekleri yükleme işlemine geçilene kadar oda sıcaklığında bekletildi. Elektroforez tankının (BioRad,) içerisine Tris-Glisin elektroforez tamponu (“running buffer”, 25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0.1 SDS) eklendi ve jeller uygun olarak yerleştirildikten sonra örnekler ince uçlu pipet tipleri ile yüklendi. Aynı zamanda protein göçünü izleyebilecek nitelikteki marker’lardan da (MBI Fermentas, SM0441 ve SM0671) 5’er µl yüklendi ve 70 V’luk gerilim uygulanarak 30 dk, daha sonra 110 V’luk gerilim uygulanarak marker bantları açılana kadar proteinler yürütüldü.

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

Elektroforez işlemi bittikten sonra jeller cam aparatlardan çıkartılarak Tris-Glisin transfer tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0.02 SDS, %20 metanol) içerisine alındı. PVDF membran (Millipore, IPVH15150) 15-20 sn metanol içerisinde bekletilerek porlarının

açılması sağlandı ve daha sonra o da transfer tamponu içerisine alındı. Bu tampon içerisinde bir kaset içerisine sırasıyla sünger, “Whatmann” kağıdı, jel, PVDF membran, “Whatmann” kağıdı ve sünger olacak şekilde yerleştirildi. Kaset kapatıldıktan sonra transfer tankının içerisine yerleştirildi.. 300 mA’lik akımda 1.5 saat transferde tutuldu ve daha sonra proteinlerin jelden üzerine geçtiği membran çıkartıldı. Çıkartılan membran bloklama solüsyonu (c-Met için %5 BSA içeren PBS-NP40, kaveolin için %3 süt tozu=NFDMD içeren TBS-Tween) içerisine alınarak oda sıcaklığında 1 saat bloklamaya bırakıldı.

3.3.5. Primer ve Sekonder Antikor Muameleleri

Bloklama aşamasından alınan membranlar uygun dilüsyonlarda primer antikor ile muamele edildi. Kullanılan antikorlar, dilüsyonlar ve antikorların hazırlandığı solüsyonlar aşağıdaki gibidir.

Antikor	Dilüsyon	Ajan	Solüsyon
anti-kaveolin antikor (Santa Cruz, sc-894)	1:4000	%3 NFDMD	TBS-T
anti-c-Met antikor (Santa Cruz, sc-161)	1:2000	%0.1 BSA	PBS-NP40

Kaveolin membranı primer antikorda +4 °C’de bir gece inkübe edildi. c-Met membranı ise oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Primer antikor inkübasyonları bittikten sonra membranlar 5’er dakika 2 kez uygun tamponlarla (kaveolin için TBS-T, c-Met için PBS-NP40) yıkanıp bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Daha sonra sekonder antikor dilüsyonları aşağıdaki gibi hazırlandı.

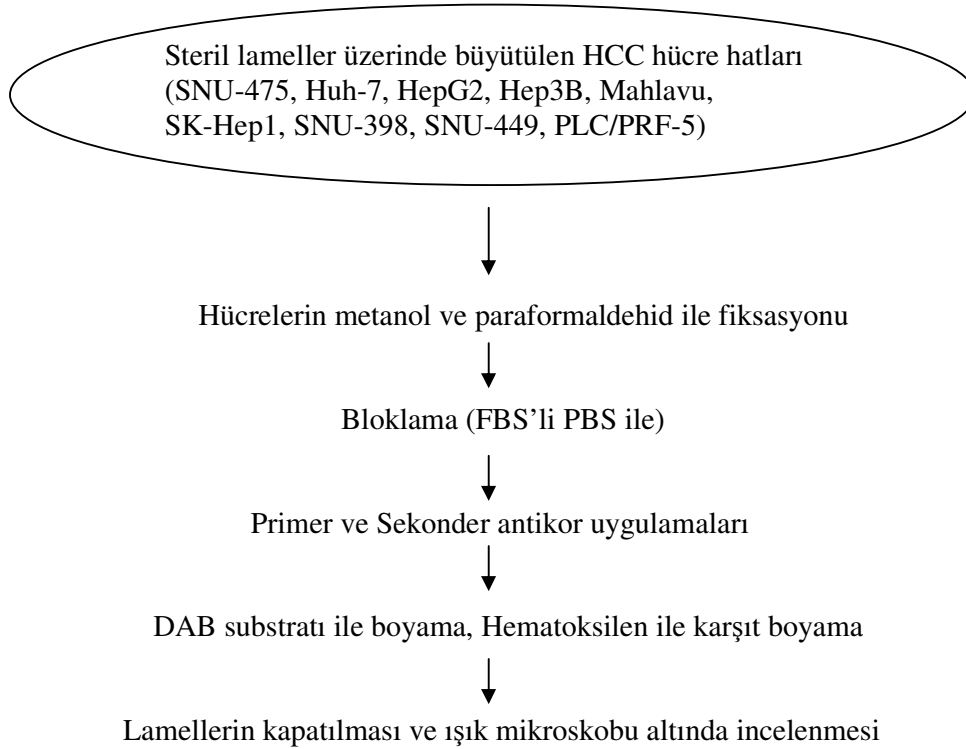
Antikor	Dilüsyon	Ajan	Solüsyon
Anti-rabbit IgG (Pierce, 1848415) (c-Met)	1:5000	%3 NFDMD	TBS-T
Anti-rabbit IgG (Pierce, 1848415) (kaveolin)	1:10000	%0.1 BSA	PBS-NP40

Kaveolin ve c-Met membranları oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. inkübasyondan sonra bağlanmayan sekonder antikorların uzaklaştırılması için uygun tamponlarla (kaveolin için TBS-T, c-Met için PBS-NP40) 10’ar dakika 6 kez tamponlar değiştirilerek yıkama yapıldı.

3.3.6. Proteinlerin Membran Üzerinde Deteksiyonu

Sekonder antikor yıkamaları bittikten sonra Amersham marka “ECL Detection Reagents” (RPN2108) kullanarak protein bantlarının deteksiyonuna geçildi. Kit direktiflerine göre hazırlanan reagent’den membranı kaplayacak miktarda membran üstüne yayılarak 2-3 dk bekletildi. Bu sürede sekonder antikorlara bağlı olan peroksidaz enzimleri reagentteki substratlarını parçalamakta ve sonuçta modifiye substrattan kimyasal bir ışığa oluşmaktadır. Membranlar bir kaset içine alındıktan sonra üzerlerine kemilüminesansa duyarlı film (Kodak, 5256441) koyulup yeterli süre beklendi ve film yıkanarak protein bantları görüntülendi.

3.4. Kaveolin ve c-Met Ekspresyon ve Lokalizasyonlarının İmmünohistokimya Yöntemi İle Belirlenmesi



Altı kuyulu hücre kültürü kapları içerisine steril lameller yerleştirildi ve bu lameller üzerine hücreler ekildi. Her bir hücre hattı için biri negatif kontrol olmak üzere iki kuyuya ekim yapıldı. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra ortamları çekilerek PBS ile 2-3 kez yıkama yapıldı. Yıkamalardan sonra kaveolin için %3'lük paraformaldehid (Applichem, A3813) ile 15 dk, c-Met için soğuk metanol ile (Merck, UN-1230) 3 dk fiksasyon yapıldı. Kaveolin için fiksasyondan sonra PBS içinde hazırlanan %0.1'lik Triton X-100 (Sigma, X-100) solüsyonu ile membran permeabilizasyonu yapıldı. Daha sonra %10 FBS içeren PBS ile hücreler 30 dk inkübe edilerek bloklama işlemi yapıldı. PBS ile 5 dk'lık bir yıkama basamağından sonra lameller üzerine primer antikor solüsyonları (100'er µl) eklenerek içi ıslak havlu yerleştirilerek nemlendirilmiş bir kap içerisinde 1 saat inkübe edildi. Kullanılan antikorlar, antikorun içinde hazırlandığı solüsyon ve antikor dilüsyonları aşağıdaki gibidir.

Antikor	Dilüsyon	Solüsyon
anti-kaveolin antikor (Upstate, 05-762-26776)	1:50	%1.5 FBS'li PBS
anti-c-Met antikor (Santa Cruz, sc-161)	1:50	%1.5 FBS'li PBS

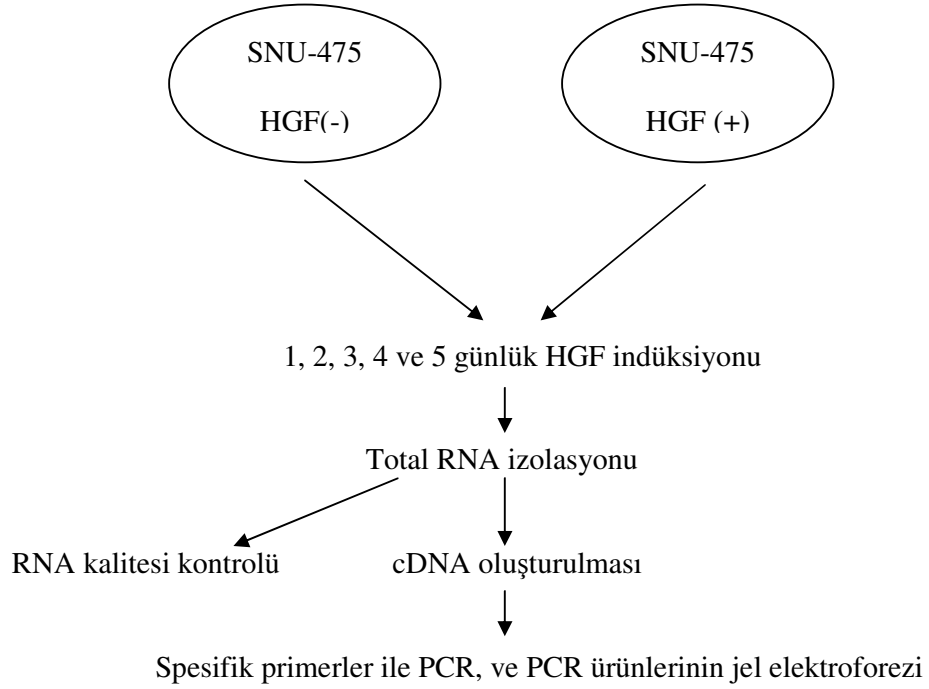
Primer antikor inkübasyonunun ardından PBS ile 10'ar dk 3 kez yıkama yapıldı. Daha sonra Dako EnVision kitinin (Dako, 4061) peroksidaz işaretli sekonder antikorundan 100'er µl lamellerin üzerine eklendi ve yine primer antikorlarda olduğu gibi nemli kap içerisinde 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 4 kez 10'ar dk'lık PBS yıkamaları yapıldı. Dako DAB-substratı (3468) kit direktiflerine göre hazırlandıktan sonra 100'er µl her bir lamel üzerine eklendi ve 5 dk bekletildi. Distile suyla 1-2 dk, 2 kez yıkama yapıldıktan sonra hematoksilin ile 5 dk karşıt boyama yapıldı. Yine PBS ile hematoksilin kalıntıları gidene kadar yıkama yapıldı ve 6-7 kez lameller ksilol (Merck, UN-1307) içine batırılıp kurumaya bırakıldı. Kuruyan lameller 1 damla "mounting medium" (Dako, S3025) ile lam üzerine yapıştırıldı ve ışık mikroskopunda analiz edildi.

3.5. Kaveolin ve c-Met Ekspresyon ve Lokalizasyonlarının İmmunofloresans Yöntemi İle Belirlenmesi

İmmunositokimya kısmında anlatıldığı gibi tüm hücreler lameller üzerine ekildi, aynı şekilde fiske edildi, bloklandı ve primer antikorla muamele edildi. Primer antikor yıkamasından sonra sekonder antikor olarak c-Met için Rhodamine-konjuge anti-rabbit sekonder antikor (Chemicon, AP307R), kaveolin için de FITC-konjuge anti-mouse sekonder antikor (Chemicon, AP124F) ile 30 dk inkübasyon yapıldı. Sekonder antikor dilüsyonları her iki antikor için de 1:250 olarak kullanıldı ve bu antikorlar yine %1.5 FBS içeren PBS solüsyonu içerisinde hazırlandı. Sekonder antikor muamelesinden sonra 10'ar dk 4'er kez PBS ile yıkamalar yapıldı. Daha sonra 0,1 µg/ml konsantrasyonunda DAPI içeren PBS solüsyonu ile 45 saniye inkübasyon yapıldı, ve yine 2-3 dk PBS ile yıkandı. Lameller 1 damla floresans "mounting medium" (Dako, S3023) ile lam üzerine kapatıldı ve floresans mikroskopta (Nikon, Y-FL) FITC ve rhodamine dalga boylarına uygun filtreler kullanılarak analiz edildi.

3.6. HGF İndüksiyonuna Yanıt Olarak Kaveolin ve c-Met Ekspresyon Düzeylerinin Değişiminin RNA Düzeyinde Belirlenmesi

Hepatosit büyüme faktörü ile indüksiyon sonrasında kaveolin ve c-Met ekspresyonlarında bir değişim olup olmadığını RNA düzeyinde belirlemek için aşağıdaki deney sistemi kurulmuştur.



60 mm'lik hücre kültürü kaplarında büyütülen SNU-475 hücreleri HGF indüksiyonundan bir gece önce ortamları çekilerek %1 serum içeren starvasyon ortamına alındı. Starvasyon sonunda farklı sürelerde HGF indüksiyonu uygulandı. Kullanılan HGF dilüsyonlarının hazırlanmasında Tris-BSA solüsyonu kullanıldı. Kullanılan konsantrasyonlar şu şekildedir:

Stok HGF: 2300 ng/μl

Çalışma konsantrasyonu: 40 ng/ml

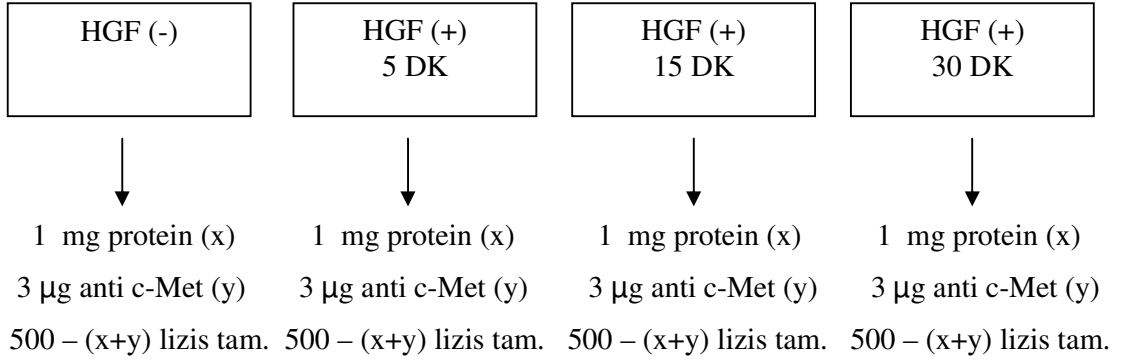
Stok HGF'den sırasıyla 1:10 ve 1:100 dilüsyonlar hazırlandı ve 1:100'lük dilüsyondan son konsantrasyon 40 ng/ml olacak şekilde hücrelerin bulunduğu ortama eklendi. Ayrıca HGF indüksiyonu yapılmayan kontrol hücreleri de kullanıldı. HGF indüksiyonları 1, 2, 3, 4 ve 5 gün yapıldı. İndüksiyonlar bittiğinde hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu sayfa 29'da yazılan protokole göre yapıldı. Total RNA'lar yine sayfa 30'da belirtilen protokole göre formaldehidli RNA-jel elektroforezinde yürütülerek integriteleri kontrol edilip, spektrofotometre ile miktarları ölçüldü. Her bir örnekten 2 μg total RNA kalıp olarak kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Hazırlanan cDNA'lardan 2 μl kalıp olarak

kullanılarak kaveolin 1, 2, c-Met ve kontrol olarak da B-aktin primerleri ve profilleri ile PCR reaksiyonu kuruldu. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülüp transillüminatörde görüntülendikten sonra farklı sürelerde HGF indüksiyonuna yanıt olarak ekspresyonların nasıl değiştiği analiz edildi.

3.7. Kaveolin-c-Met İlişkisinin İmmunopresipitasyon İle Belirlenmesi

Kaveolin ve c-Met arasında bir ilişki olup olmadığı ve bu ilişkinin HGF indüksiyonuyla nasıl değiştiğini belirlemek için immunopresipitasyon deneyi yapıldı. 100 mm'lik hücre kültürü kaplarında büyütülen SNU-475 hücreleri %70 "confluent" olduğunda, %1 serum içeren ortamla bir gece starve edildi. Starvasyon sonrası bir grup hücreye HGF indüksiyonu yapıldı. 40 ng/ml konsantrasyonda HGF, 1:100'lük dilüsyondan hücrelere eklendi ve 5, 15 ve 30 dk'lık HGF indüksiyonu yapıldı. Daha sonra hücreler buz üzerine alınarak aşağıdaki şekilde işlemler yapıldı.

- Buz üzerine alınan hücrelerin ortamları çekildikten sonra soğuk PBS ile 2-3 kez yıkama yapıldı.
- 1 ml PBS içerisinde hücreler bir hücre kazıyıcı ile kazınarak önceden soğutulmuş 1.5 ml'lik santrifüj tüpleri içerisine alındı.
- Hücreleri çöktürmek için 1500 g'de 5 dk. santrifüj edildi.
- Süpernatandaki PBS çekildi ve hücre pelleti üzerine pellet miktarının 3 katı lizis-tamponu (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, %1 NP-40, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄) eklenerek vortekslendi ve buz üzerine alındı. Buz üzerinde 25 dk. bekletilen tüpler 3-4 dk'da bir vortekslendi.
- Tüpler 30 dk. 15000 g'de santrifüj edildikten sonra süpernatandaki proteinler yeni bir soğuk santrifüj tüpüne alındı. Sayfa 35'deki gibi BCA-assay ile protein miktarları ölçüldü.
- Her bir koşul için (HGF-, 5 dk. HGF, 15 dk. HGF, 30 dk. HGF) 1 mg protein, 3 µg antikor kullanılarak immunopresipitasyon işlemi yapılacağı için gerekli miktarlar Microsoft Office Excel programında hesaplandı ve işlem aşağıdaki gibi yapıldı.



- Yukardaki şekilde immunopresipitasyon bileşenleri bir santrifüj tüpü içerisinde hazırlandıktan sonra 2 saat +4 °C'de bekletildi. Bu süre içerisinde anti-c-Met antikoruna c-Met proteinine bağlanırken, c-Met ile ilişkili moleküller de birlikte bulunmaktadır.
- İmmunopresipitasyon işlemi devam ederken gamma-bağlı protein-G sefaroza (Amersham, 17-0886-02) şu şekilde hazırlandı: sefaroza şişesi buz üzerinde alt-üst edilerek karıştırıldı ve homojenize olması sağlandı. Daha sonra örnek miktarının 1X fazlası olacak miktarda sefaroza soğuk bir santrifüj tüpü içerisine kesik uçlu pipet ile alınarak 2000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Süpernatandaki etanol uzaklaştırıldıktan sonra, etanol miktarı kadar lizis tamponu eklenip buz üzerinde alt-üst edildi ve tekrar santrifüjlenerek bu yıkamalar 3 kere tekrarlandı. En son santrifüjden sonra pellet miktarı kadar lizis tamponu eklendi, sefaroza hazır vaziyette immunopresipite olan örnekler eklenmek üzere buz üzerinde bekletildi.
- İmmunopresipite edilen örnekler, aynı yerden kesilmiş pipet uçları kullanılarak yıkanmış sefaroza'lardan 30 µl eklendi ve yatay şekilde hibridizasyon tüpü içerisine yerleştirilerek +4 °C'da 1 saat 300 rpm'de döndürülerek hibridizasyon fırınında (Hofer HB-400) inkübe edildi.
- Daha sonra örnekler 2000 rpm'de +4 °C'da santrifüj edildi.
- Süpernatant sefarozalara değmeden bir pipetle çekildikten sonra üstüne 800-850 µl lizis tamponu eklenip toplam hacim 1ml'ye getirildi. 10-15 saniye buz üzerinde alt-üst edilerek homojenize edildi. sonra tekrar 2000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve bu yıkama işlemi aynı şekilde 5 kere tekrarlandı.

- En son yıkamadan sonra süpernatant çekilerek örneklere pellet miktarı kadar (yaklaşık 70-80 µl) 2X-yükleme tamponu eklendi ve 95 °C'da 5 dk. kaynatılarak proteinlerin denatüre olması sağlandı.
- Örnekler bekletilmeden poliakrilamid jele yüklendi. Jel bileşenleri, konsantrasyonu, hazırlanması ve elektroforezi daha önce sayfa 36'da anlatıldığı gibidir.
- Elektroforez sonrası PVDF membrana aktarılan proteinler primer ve sekonder antikor muamelelerinden sonra daha önce anlatıldığı şekilde elektrokemilüminesans ile detekte edildi.

3.8. Hepatosellüler Karsinoma Parafin Arşiv Dokularında Kaveolin ve c-Met Ekspresyonlarının Belirlenmesi

İmmunohistokimya analizlerinde, Dr. Sedat Karademir tarafından takip edilen ve patolojik değerlendirmesi Dr. Özgül Sağol tarafından yapılan, prognostik verileri ve sağkalım süreleri bilinen, başka bir kronik hastalığı bulunmamakla birlikte HCC tanısı almış 34 olguya ait parafine gömülmüş arşiv materyali kullanıldı. Ayrıca olguları patoloğ tarafından ayrılan normal ve/veya sirotik dokuları da çalışmaya dahil edildi. Her olguya ait arşiv materyali tekrar değerlendirildi, makroskopik ve mikroskopik bulgular yeniden gözden geçirildi.

İmmunohistokimya boyamalarında kullanılan protokol şu şekildedir:

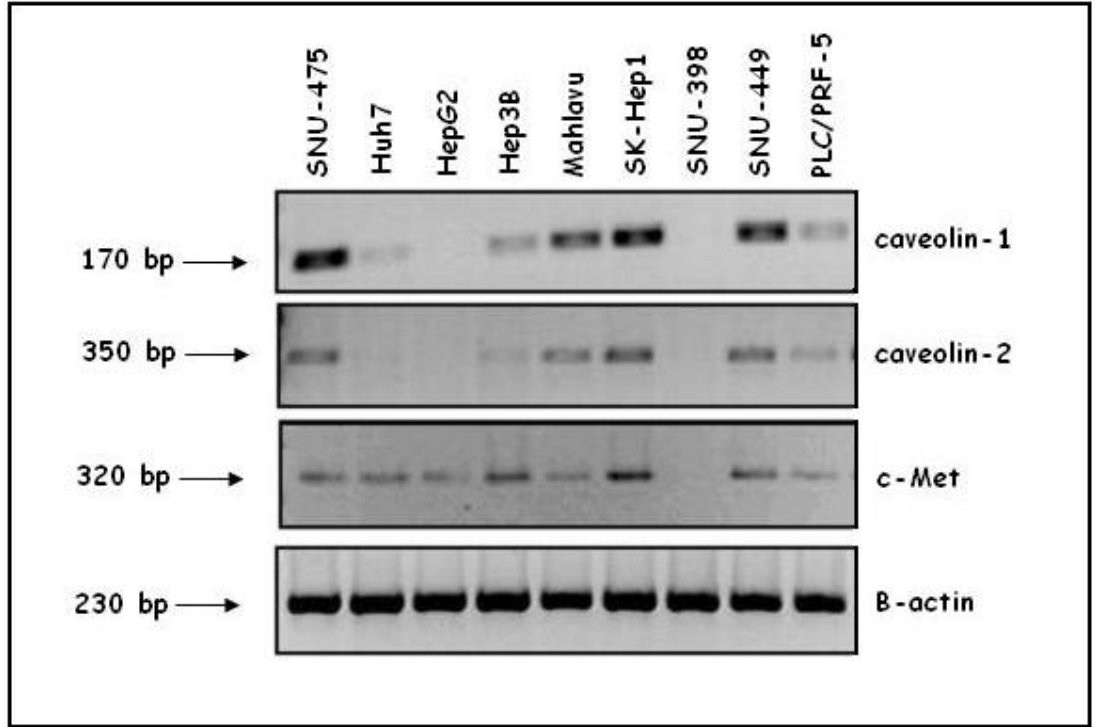
- Doku kesitleri 5 dk ksilende bekletilerek de-parafinize edildi. Bu işlem iki kere tekrarlandı.
- Kesitler iki kez %100'lük etanol ile 3 dk inkübe edildi, ardından sırasıyla %95 ve %80'lik etanol muameleleri (1 dk) ile hidrate edildi.
- Kesitlerin üzeri Proteinaz K solüsyonu (pH 8.0'luk TE-tamponu içerisinde 20 ug/ml oranında Proteinaz K) ile kaplanarak nemli bir ortamda 15 dk 37 °C'de inkübe edildi. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
- Kesitler PBS ile 2 dk, 2 kez yıkandı.
- %1.5'lük serum ile 30 dk bloklama yapıldı.

- Kesitler primer antikor dilüsyonları ile (kaveolin için 1:20, c-Met için 1:50) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- Kesitler PBS ile 2 dk, 2 kez yıkandı.
- Örnekler peroksidaz bloklama solüsyonu ile 10 dk. muamele edildi.
- PBS ile 3x2 dk yıkama yapıldı.
- ScyTek monovalent boyama kiti ile boyamalar yapıldı.

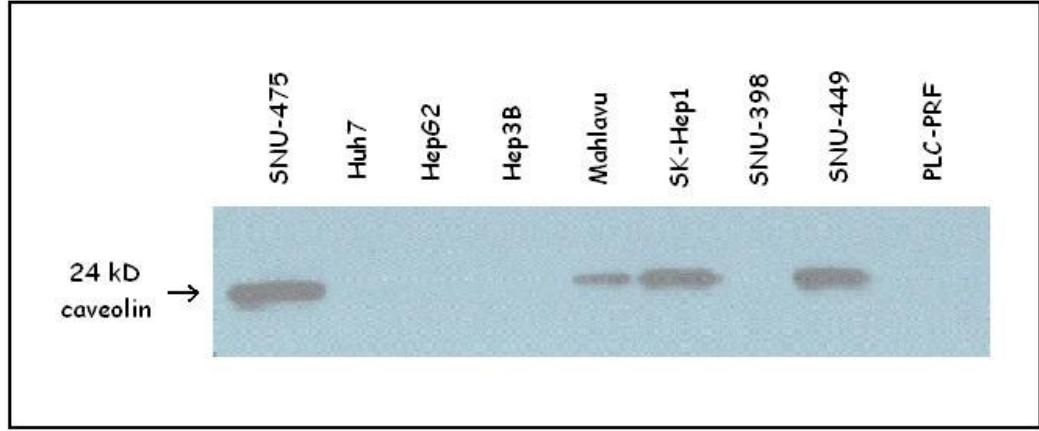
4. BULGULAR

4.1. Hepatosellüler Karsinoma Hücre Hatlarında Kaveolin-1, 2, ve c-Met Ekspresyonları

Hepatosellüler Karsinoma hücre hatlarından SNU-475, Huh-7, HepG2, Hep3B, Mahlavu, SK-Hep1, SNU-398, SNU-449 ve PLC/PRF-5’de kaveolin 1, 2 ve c-Met ekspresyonları hem RNA transkripti düzeyinde, hem de protein ürünü düzeyinde RT-PCR ve Western-blot ile incelenmiştir. Şekil 12 ve 13’de görüldüğü gibi bu hücrelerden sadece SNU-398’de c-Met ekspresyonu görülmezken, hem HepG2 hem de SNU-398’de kaveolin ekspresyonu RNA düzeyinde gözlenmemektedir. Protein düzeyinde ise HepG2 ve SNU-398’e ilaveten PLC/PRF-5, Huh-7 ve Hep3B’de de kaveolin-1 ekspresyonu gözlenmemiştir.



Şekil 12: Kaveolin-1, 2 ve c-Met’in mRNA düzeyindeki ekspresyonlarının HCC hücre hatlarında gösterilmesi.



Şekil 13: Kaveolin-1'in HCC hücre hatlarında protein düzeyindeki ekspresyonlarının western-blot ile gösterilmesi.

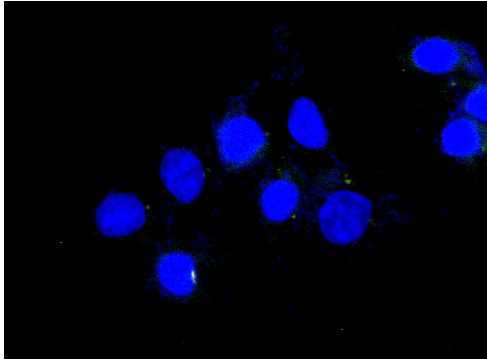
Tablo 5: HCC hücre hatlarının diferansiasyon durumları ve bu hücrelerdeki kaveolin ve c-Met ekspresyonları.

Hücre Hatları	Diferansiasyon Durumu	Kaveolin Ekspresyonu	c-Met Ekspresyonu
Huh7	İyi	-	+
Hep3B	İyi	-	+
HepG2	İyi	-	+
PLC/PRF-5	İyi	-	+
SNU-398	İyi	-	-
SNU-475	Az	+	+
SNU-449	Az	+	+
SK-Hep1	Az	+	+
Mahlavu	Az	+	+

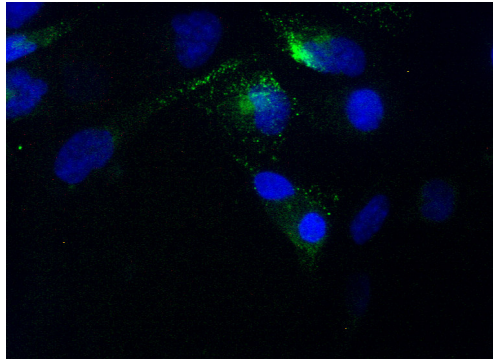
HCC hücre hatlarındaki kaveolin ekspresyonlarına bakıldığında, bu hücrelerin diferansiasyon derecesiyle ilişkili oldukları görülmektedir (Tablo 5). İyi diferansiye olan Huh7, Hep3B, HepG2 ve PLC/PRF-5 hücrelerinde kaveolin ekspresyonu yoktur. Ancak az-diferansiye olan SNU-475, Mahlavu, SNU-449 ve SK-Hep1 hücrelerinde yüksek derecede kaveolin ekspresyonu bulunmaktadır.

Kaveolin ve c-Met'in protein düzeyinde ekspresyon ve lokalizasyonlarını belirlemek için de immunofloresans ve immunositokimya yaklaşımları uygulanmıştır. Kaveolin 1 için yapılan immunofloresans sonuçları Şekil 14'de görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi kaveolin hem membranda hem de sitoplazmada lokalizedir. Membranda ise belli bölgelerde yoğunlaşmış olarak görülmektedir. Ayrıca, PLC/PRF-5 hücrelerinde western-blot ile kaveolin-1 ekspresyonu gözlenmezken, immunofloresans sonucunda düşük düzeyde kaveolin varlığı görülmektedir.

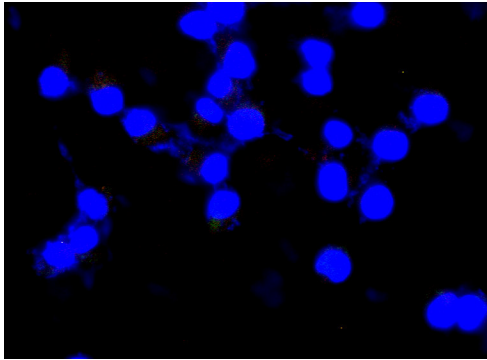
a)



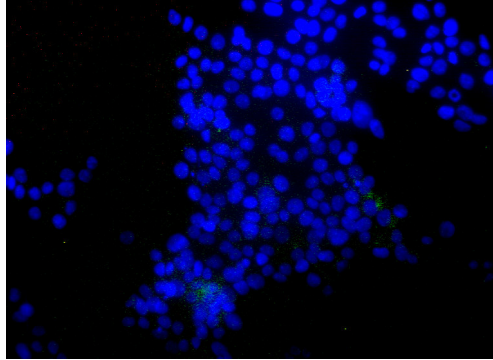
b)



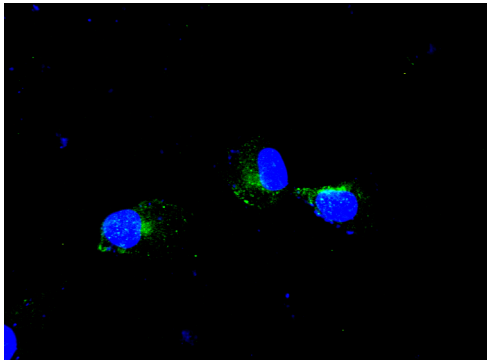
c)



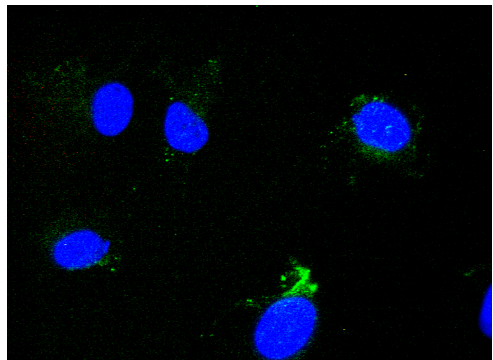
d)



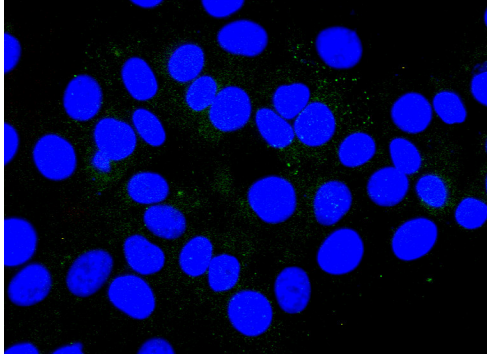
e)



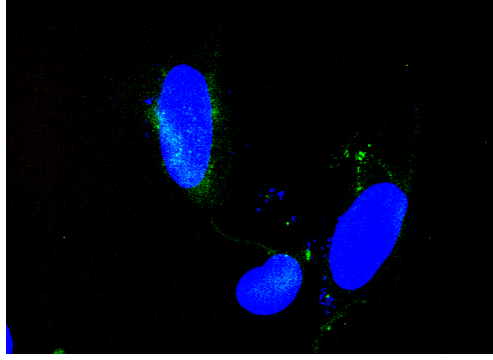
f)



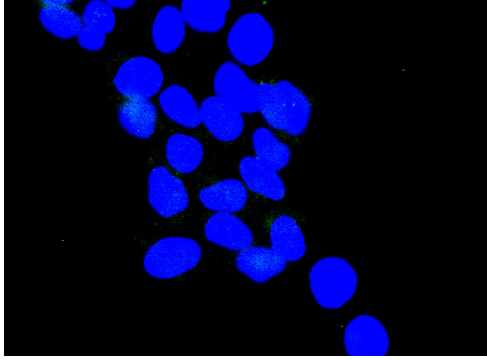
g)



h)



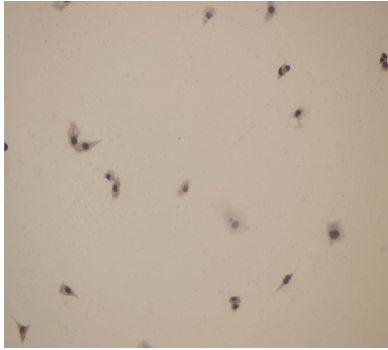
i)



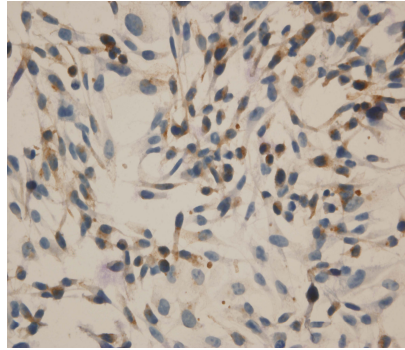
Şekil 14: HCC hücre hatlarında kaveolin 1'in immunofloresans ile gösterilmesi: a) HepG2, b) SK-Hep1, c) SNU-398, d) Hep3B, e) SNU-449, f) Mahlavu, g) PLC/PRF-5, h) SNU-475, i) Huh-7.

Kaveolin ve c-Met ekspresyon ve lokalizasyonlarına immunositokimya ile de bakılmıştır. c-Met genelde membranöz ve biraz da sitoplazmik (Şekil 15), kaveolin ise hem membranöz hem de sitoplazmik boyanmaktadır (Şekil-16). Bu yöntem, western-blot ve RT-PCR ile yapılan ekspresyon analizlerini de doğrulamaktadır.

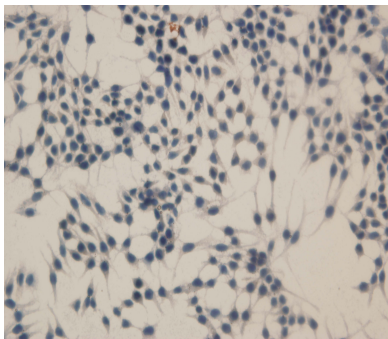
a)



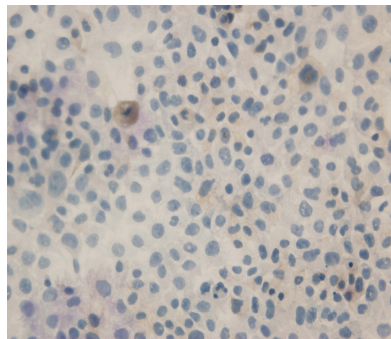
b)



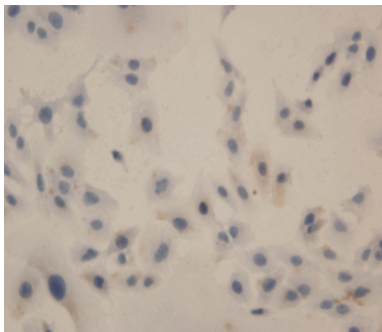
c)



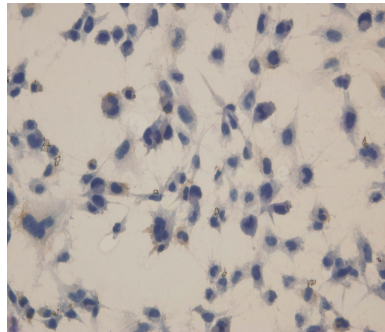
d)



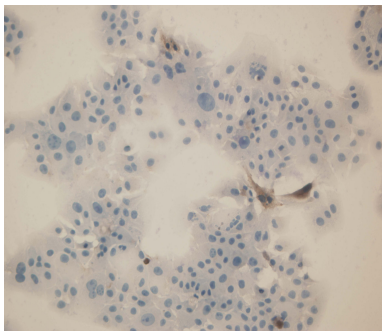
e)



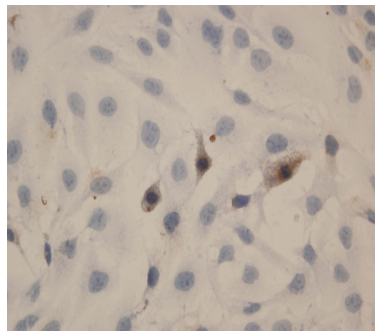
f)



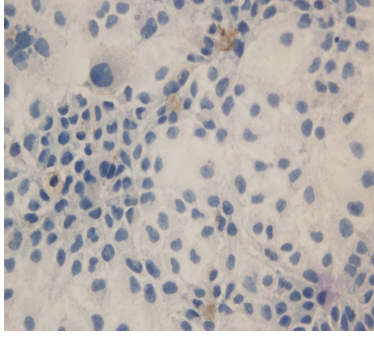
g)



h)

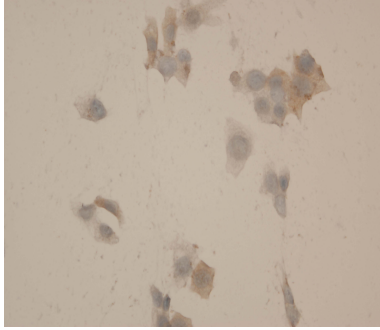


i)

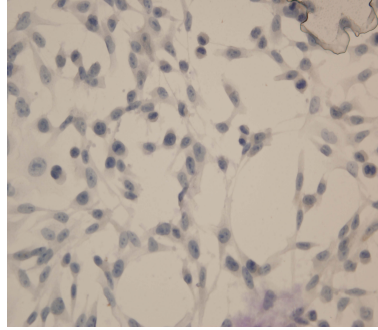


Şekil 15: HCC hücre hatlarında kaveolin 1'in immunositokimya ile gösterilmesi: a) HepG2, b) SK-Hep1, c) SNU-398, d) Hep3B, e) SNU-449, f) Mahlavu, g) PLC/PRF-5, h) SNU-475, i) Huh-7.

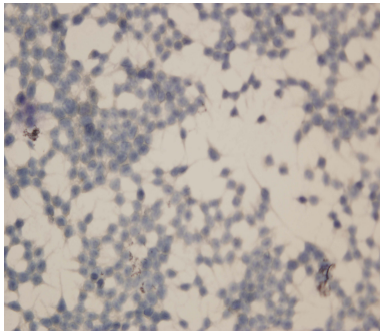
a)



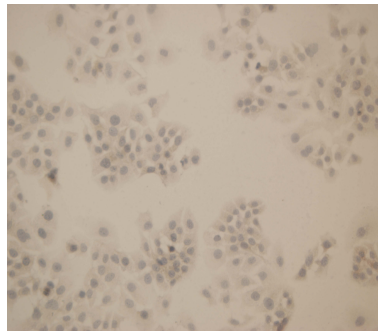
b)



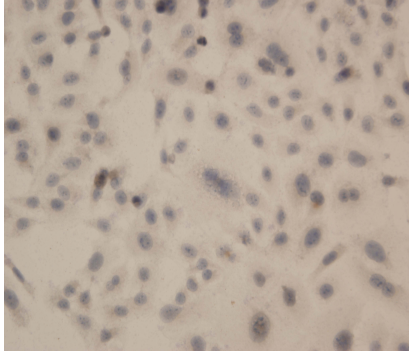
c)



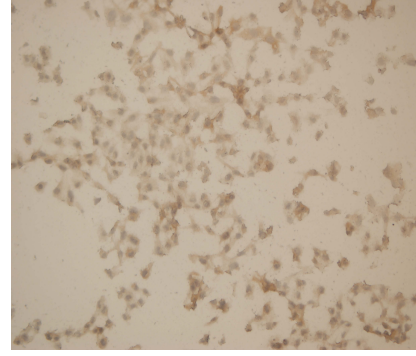
d)



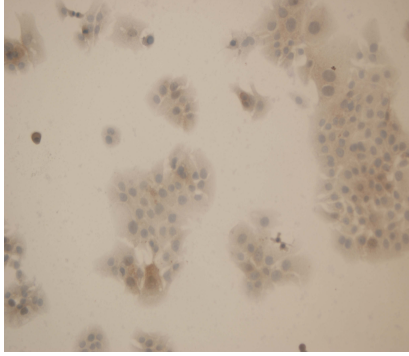
e)



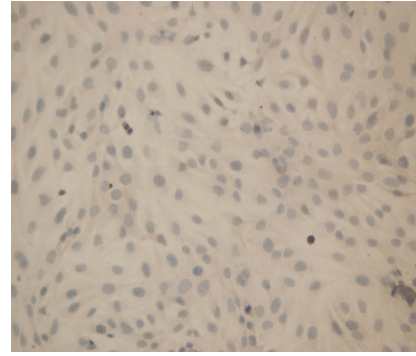
f)



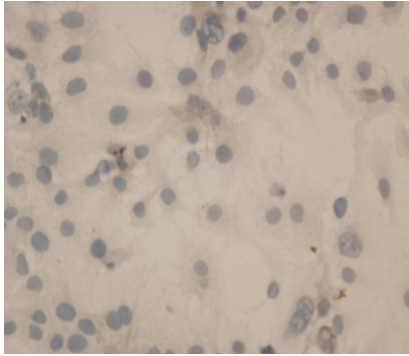
g)



h)



i)



Şekil 16: HCC hücre hatlarında c-Met'in immunositokimya ile gösterilmesi: a) HepG2, b) SK-Hep1, c) SNU-398, d) Hep3B, e) SNU-449, f) Mahlavu, g) PLC/PRF-5, h) SNU-475, i) Huh-7.

4.2. Patoloji Arşivindeki Hepatosellüler Karsinoma Dokularında Kaveolin ve c-Met Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Patoloji arşivinde bulunan HCC dokularında ve bu dokuların içerisinde yer alan sirotik dokularda kaveolin ve c-Met ekspresyonları immunohistokimya yöntemi ile belirlenmiştir. Dokulardaki ekspresyonlar Tablo 6’da, bu ekspresyonların oranları Tablo 7’de, kaveolin ve c-Met ekspresyonlarının korelasyonu ise Tablo 8’de görülmektedir.

Tablo 6: HCC ve siroz dokularında kaveolin ve c-Met ekspresyonları.

Hasta No	Doku Tipi	Kaveolin Ekspresyonu	c-Met Ekspresyonu
1	HCC, Orta-diferansiye	(-)	(-)
2	HCC, Orta-diferansiye	(-)	(-)
	Sirotik	(-)	(-)
3	HCC, Orta-diferansiye	(-)	(-)
	Sirotik	1(+)	(-)
4	HCC, İyi-diferansiye	(-)	(-)
	Sirotik	(-)	(-)
5	HCC, İyi-diferansiye (iğne biyopsi)	1(+)	(-)
6	HCC, İyi-diferansiye	(-)	(-)
7	HCC, Orta-diferansiye	1(+)	(-)
	Sirotik	(-)	(-)
8	HCC, Orta-diferansiye	(-)	(-)
	Sirotik	1(+)	(-)
9	HCC, Az-diferansiye	2(+)	(-)
10	HCC, İyi-diferansiye	(-)	(-)
	Sirotik	(-)	(-)
11	HCC, Orta-diferansiye	2(+)	1(+)
12	HCC, İyi-diferansiye (iğne biyopsi)	2(+)	2(+)
13	HCC, Orta-diferansiye	1(+)	(-)
14			
	Sirotik	1(+)	(-)
15	HCC, İyi-diferansiye	2(+)	2(+)

16	HCC, Orta-diferansiye	2(+)	2(+)
17	HCC, İyi-diferansiye	2(+)	1(+)
18	HCC, İyi-diferansiye	(-)	1(+)
19	HCC, İyi-diferansiye (iğne biyopsi)	1(+)	2(+)
20	HCC, İyi-diferansiye (iğne biyopsi)	1(+)	2(+)
21	HCC, Orta-diferansiye	(-)	(-)
22	HCC, Orta-diferansiye (iğne biyop.)	(-)	1(+)
23	HCC, Orta diferansiye	2(+)	1(+)
24	HCC, Orta-diferansiye	(-)	(-)
25	HCC, Orta-diferansiye (iğne biyop.)	(-)	(-)
26	HCC, Orta-diferansiye	1(+)	1(+)
27	HCC, Orta-diferansiye (iğne biyop.)	(-)	(-)
28	HCC, Orta-diferansiye (iğne biyop.)	(-)	(-)
29	HCC, İyi-diferansiye	(-)	(-)
30	HCC, Orta-diferansiye	1(+)	
	Sirotik	1(+)	
31	HCC, Orta-diferansiye	(-)	(-)
32	HCC, Orta-diferansiye	(-)	(-)
33	HCC, İyi-diferansiye	(-)	(-)
34	HCC, Orta-diferansiye	(-)	(-)
	Sirotik	(-)	(-)
35	HCC, İyi-diferansiye	(-)	
	HCC, Orta-diferansiye	1(+)	2(+)
	Sirotik	2(+)	2(+)

Tablo 7: HCC ve siroz dokularındaki kaveolin ve c-Met ekspresyonlarının oranları.

HCC ve Siroz Dokularında Kaveolin Ekspresyonlarının Oranları				HCC ve Siroz Dokularında c-Met Ekspresyonlarının Oranları			
Doku Tipi	Örnek Sayısı	Kaveolin pozitif	Yüzde oran	Doku Tipi	Örnek Sayısı	c-Met pozitif	Yüzde oran
İyi Diferansiye HCC	13	6	% 46	İyi Diferansiye HCC	12	6	% 50
Orta Diferansiye HCC	21	8	% 38	Orta Diferansiye HCC	20	6	% 30
Az Diferansiye HCC	1	1	% 100	Az Diferansiye HCC	1	0	% 0
Toplam HCC	35	15	% 43	Toplam HCC	33	12	% 36
Siroz	10	5	% 50	Siroz	9	2	% 22

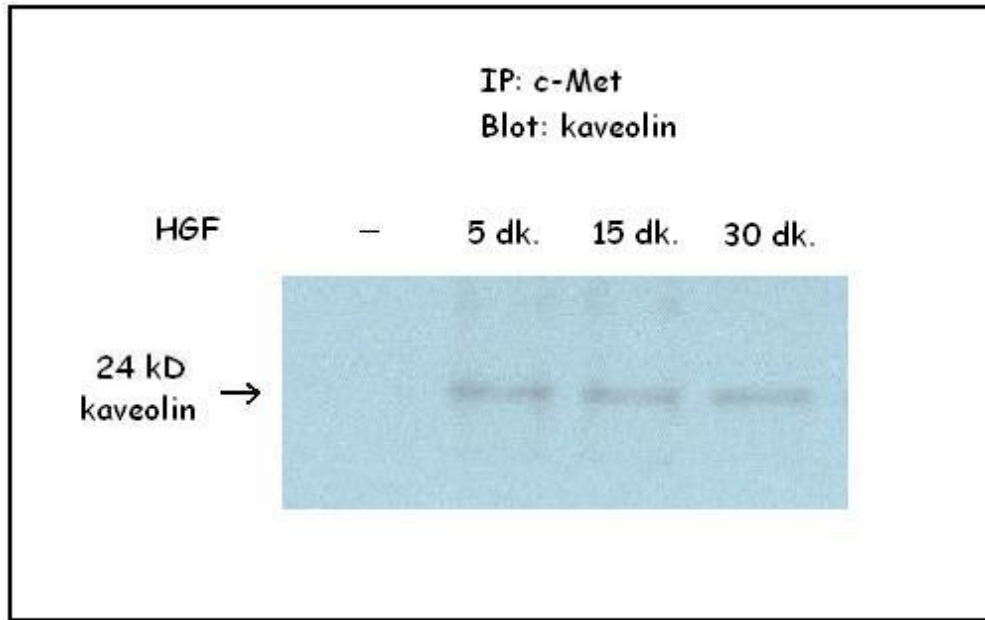
Tablo 8: HCC ve sirozda kaveolin ve c-Met ekspresyonlarının korelasyonu.

Doku Tipi	Örnek Sayısı	Kaveolin (+) c-Met (+)	Kaveolin (-) c-Met (-)	Korele Olan Toplam Örnek	Korelasyon Yüzdesi
İyi Diferansiye HCC	12	5	5	10	% 83
Orta Diferansiye HCC	20	5	12	17	% 85
Az Diferansiye HCC	1	0	0	0	% 0
Toplam HCC	33	10	17	27	% 82
Siroz	9	1	5	6	% 67

Bu sonuçlara göre kaveolin HCC dokularının %43'ünde , siroz dokularının ise %50'sinde eksprese olmaktadır. c-Met ise HCC'lerin %36'sında, sirotik dokuların ise %22'sinde eksprese olmaktadır. Kaveolin ve c-Met ekspresyonlarının dokulara göre birlikteliğine bakıldığında oldukça güçlü bir uyum görülmektedir. HCC dokularında kaveolin ve c-Met ekspresyonlarının uyumu %82, siroz dokularında ise %67'dir.

4.3. HCC Hücre Hatlarında Kaveolin-c-Met İlişkisinin İmmunopresipitasyon İle Gösterilmesi

SNU-475 ile yapılan immunopresipitasyon deneylerinde, kaveolin ve c-Met arasında bir ilişki olup olmadığına ve bu ilişkiye HGF'in etkisine bakılmıştır. Şekil 17'de de görüldüğü gibi %1 serum ile bir gece starve edilen SNU-475 hücrelerinde kaveolin ve c-Met arasında bir bağlanma bulunmamaktadır. Ancak, HGF indüksiyonuyla birlikte hızlıca kaveolin-c-Met bağlanması ortaya çıkmaktadır. Deney sistemimizdeki en uzun HGF indüksiyon süresi olan 30 dk.'da da bu bağlanma devam etmektedir.



Şekil 17: SNU-475'de kaveolin ve c-Met ilişkisinin immunopresipitasyon ile gösterilmesi. HGF (-) hücrelerde kaveolin-c-Met bağlanması olmazken, HGF indüksiyonuyla birlikte bağlanma başlamaktadır, ve bu bağlanma en azından 30 dk. devam etmektedir.

5. TARTIŞMA

Kaveole ve kaveolinler, özellikle son yıllarda sinyal molekülleriyle olan etkileşimleri ve regülatör rolleri tanımlanmaya başladıktan sonra büyük dikkat çekmiştir (10). EGFR, PDGFR, İnsülin-reseptörü, Src, eNOS gibi son derece önemli sinyal yollarına katılarak bu sinyal yollarını farklı şekillerde etkileyen kaveolinin, çeşitli kanser türlerinin gelişimi ve ilerlemesindeki rolleri de tanımlanmıştır (2, 28). Ayrıca, kaveolin bazı kanser türleri için terapötik bir hedef olarak da görülmektedir (64). Örneğin memenin adenokarsinomunda kaveolin bir tümör baskılayıcı olarak rol oynar ve ekspresyonu kayıptır. Bu kanser türünde kaveolinin tümör baskılayıcı fonksiyonlarını geri kazandırmak için, kaveolin CSD'sinden türevli peptidlerin terapötik olarak kullanımı araştırılmaktadır ve sonuçlar umut vericidir (31). Prostat karsinomasında ise kaveolin ekspresyonlarında büyük bir artış söz konusudur, ve bu artış özellikle metastatik karakter ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Bu kanser türünde ise kaveolinin onkogenik etkisini ortadan kaldırmak için, kaveolin fonksiyonunu bozacak inhibitörler üzerinde çalışılmaktadır (28). Yine benzer şekilde safra kesesi karsinomunda kaveolin over-ekspresyonu, pankreas karsinomunda ise kaveolin ekspresyonunun kaybı gözlenmektedir. Diğer birçok kanser türünde de, tümöröenez ve karsinöenez sürecinin çeşitli basamaklarında kaveolinin ekspresyonlarında farklı oranlarda değişim gözlenmektedir (13, 17).

Hepatosellüler karsinomada ise şu ana kadar kaveolin ekspresyonlarının nasıl değiştiğiyle ilgili kesin veriler bulunmamaktadır. Yalnızca birkaç mikro-dizin çalışmasından gelen ekspresyon değişimleriyle ilgili veriler bulunmaktadır (65). Ancak bu veriler oldukça çelişkilidir. Normal hepatositlerde ise kaveolin ekspresyonunun olmadığı bilinmektedir. Yalnızca sinuzoidal endotelyal hücreler, normal karaciğer dokusunda kaveolin ekspresyon etmektedirler (65, 66). HCC hücre hatlarında yaptığımız ekspresyon analizlerine göre kaveolin ekspresyonu hücrelerin diferansiyasyon düzeyiyle bağlantılıdır. İyi-diferansiye HCC hücre hatları kaveolin ekspresyon etmezken, kötü diferansiye hücreler yüksek oranda kaveolin ekspresyon etmektedirler. Bu durum oldukça ilginçtir, çünkü az diferansiye HCC hücre hatları soft-agar'da koloni oluşturabilme ve "nude" farelerde tümör oluşturabilme yeteneğine sahiptir (67). İyi-diferansiye hücreler ise soft-agar'da koloni oluşturamazlar ve "nude" farelerde tümör oluşumuna neden olmazlar. Bunlar göz önünde bulundurulduğunda kaveolin

ekspresyonundaki artışın, HCC hücrelerinin tümörjenik potansiyelleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Burada kaveolin 1 ve kaveolin 2 ekspresyonlarından özellikle kaveolin 1 ekspresyonları dikkate alınmıştır. Çünkü kaveole ve kaveolinlerin asıl düzenleyici rollerini üstlenen kaveolin 1'dir. Bilinen bütün moleküllerle olan etkileşimler kaveolin 1 aracılığıyla olmaktadır. Kaveolin 2 ise kaveolin 1'in oligomerizasyon ve stabilizasyonuna katılmaktadır. Tek başına kaveolin 1 fonksiyonel kaveole oluşumuna neden olabilirken, kaveolin 2 tek başına etkili değildir.

Patoloji arşivindeki HCC dokularında yapmış olduğumuz immunohistokimya sonuçlarına göre de kaveolin HCC'lerin %43'ünde eksprese olmaktadır. Bu sonuçlar kaveolinin HCC'de ekspresyonunun önemli bir oranda arttığını göstermektedir. Yani kaveolin, hepatosellüler karsinomada onkogenik bir etkiye sahip olabilir. Hücre hatlarında görülen diferansiyasyon derecesiyle kaveolin ekspresyonları arasındaki ilişki, HCC dokularında gözlenmemiştir. Bunun en önemli nedeni örnek sayısının yetersiz olmasıdır. Az-diferansiye HCC doku örneği yalnızca bir adet olduğundan, anlamlı bir karşılaştırma yapmak mümkün değildir. Ayrıca burada HCC'nin, patogenezi oldukça kompleks ve heterojen bir kanser türü olduğunu da dikkate almak gerekir. Aynı hastanın farklı nodüllerinde bile büyük bir heterojenite gözlenebilmektedir. Bu nedenle hücre hatlarında gözlenen diferansiyasyon derecesiyle kaveolin ekspresyonu arasındaki ilişkinin dokularda da geçerli olup olmadığını anlamak için, diferansiyasyon düzeyleri farklı olan çok sayıda örnekle çalışmak gerekmektedir.

HCC gelişiminde oldukça önemli basamaklardan biri de siroz gelişimidir. HCV ve alkol kökenli HCC'lerin neredeyse tamamında siroz da gözlenirken, HBV kökenli HCC gelişiminde siroz gelişimi genellikle görülmez (60). HBV enfeksiyonuna bağlı HCC ise, yaşam standartları ve sağlık sistemi oturmamış gelişmekte olan ülkelerde gözlenmektedir. Gelişmiş ülkelerde HCC'nin en büyük etkenleri HVC enfeksiyonları ve alkol tüketimidir. Dolayısıyla bu HCC'lerin hemen tamamında siroz da görülmektedir. Bu nedenle HCC gelişiminde bir basamak olarak da sirotik dokuları değerlendirmek önemlidir. İncelediğimiz HCC örnekleri içerisinde bulunan sirotik doku kısımlarında da kaveolin ekspresyonlarına bakılmıştır. Buna göre HCC'si olan hastaların sirotik dokularının %50'sinde kaveolin ekspresyonu bulunmaktadır. HCC dokularındaki oranla kıyaslandığında, sirotik dokularda

kaveolin ekspresyonu daha fazla görülmektedir. Ancak yalnızca sirotik dokuları da olan HCC'ler dikkate alındığında oldukça karmaşık bir tablo ortaya çıkmaktadır. Bazı örneklerde sirotik dokuda kaveolin ekspresyonu gözlenirken, tümör dokusunda gözlenmemektedir. Bazılarında sirozda ekspresyon gözlenmezken, tümörde gözlenmektedir. Bazılarında ise hem siroz hem de tümör dokusu kaveolin ekspresyonu açısından negatif veya pozitifdir. 35 numaralı örnekte ise ilginç bir durum gözlenmektedir. Bu örneğin sirotik dokusunda fazla miktarda kaveolin ekspresyonu gözlenmekte (2+), iyi-diferansiye tümöründe ekspresyon gözlenmemekte, orta-diferansiye tümöründe ise ekspresyon gözlenmektedir (1+). Bu durum hem HCC'nin heterojenitesinden kaynaklanıyor olabilir, hem de tümörögenез sürecinin farklı aşamalarında kaveolin ekspresyonlarının farklı şekillerde regüle ediliyor olabileceğini gösterir. Nitekim total olarak sirotik, iyi ve az-diferansiye dokulardaki ekspresyon profillerine bakıldığında, ayrıca kaveolinin tümörögenез sürecin farklı basamaklarında farklı şekillerde etkili olduğu hesaba katıldığında, kaveolin ekspresyonlarının sirozdan metastatik HCC'ye giden süreçte değişken olarak regüle ediliyor olması olasıdır. Tabii ki bu ekspresyon değişimlerinin tam olarak nasıl olduğunu anlayabilmek için çok fazla sayıda örneğe ihtiyaç vardır. Ancak çalışmamızın sonuçlarına göre, normal kaveolin ekspresyonları sirozda ve HCC'de oldukça önemli miktarda artmaktadır (sırasıyla %50 ve %43 oranında).

Hepatosit büyüme faktörü reseptörü olan c-Met, proliferasyon, motilite-invazyon, metastaz ve anjiogeneze yol açan farklı sinyal yollarını aktive edebilen bir tirozin kinaz reseptörüdür. İfade edildiği hücre tipine, hücrenin diferansiasyon durumuna ve bulunduğu mikroçevreye bağlı olarak c-Met bağımlı biyolojik yanıtlar farklı olabilmektedir (3). Ancak birçok kanser tipinde c-Met'in özellikle metastatik karakterle ilişkili olduğu bulunmuştur (54, 56). Hepatosellüler karsinoma da dahil olmak üzere, birçok kanserde HGF ve c-Met over-ekspresyonuna ya da konstitutif aktivasyonuna rastlanmıştır (7). HCC dokularında bizim yaptığımız immunohistokimya analizlerimizde de c-Met'in, HCC'lerin %36'sında eksprese olduğu görülmüştür. Diferansiyasyon düzeyleriyle karşılaştırdığımızda ise iyi-diferansiye dokularda, orta-diferansiye dokulara oranla daha fazla eksprese olmaktadır (sırasıyla %50 ve %30). Az-diferansiye tek örnekte ise c-Met ekspresyonu gözlenmemiştir. Ancak tek bir örnek içerdiğinden dolayı, az-diferansiye HCC'lerde c-Met'in ekspresyonuyla ilgili bir yargıya varılamaz. Bu sonuçlar literatürle de uyumludur. c-Met'in HCC dokularının %50'sinden daha azında eksprese olduğu bilinmektedir (7). Bizim bulgularımız da bu sonuçlarla uyumludur.

Sirotik dokulara baktığımızda ise, c-Met'in HCC'ye göre daha düşük bir oranda (%22) eksprese olduğu görülmektedir. Bu sonuçta yine literatürle uyumlu biçimde, c-Met ekspresyonlarının HCC gelişiminin farklı aşamalarında farklı şekillerde regüle edildiğini göstermektedir.

Hücre hatlarında yaptığımız ekspresyon analizlerinde de c-Met'in tek bir hücre hattı hariç (SNU-398) tüm hücrelerde eksprese olduğu görülmüştür. Yani kaveolin ekspresyonlarında olduğu gibi c-Met ekspresyonlarıyla diferansiyasyon derecesi arasında bir bağlantı bulunamamıştır.

c-Met, HCC dokularının %50'sinden daha azında eksprese olmasına rağmen c-Met over-ekspresyonları HCC'nin metastatik karakter kazanmasıyla ve düşük sağkalımla ilişkilendirilmiştir (7). Diğer birçok kanser türünde olduğu gibi, HCC'de de c-Met metastaz gelişimine katkıda bulunmaktadır. Ancak bu katkının moleküler mekanizmaları açık değildir. Kaveolinin tirozin kinaz reseptörleri de dahil olmak üzere birçok moleküle ilişkiye girerek bu moleküllerin katıldığı sinyal yollarını regüle etmesi, kaveole membran yapılarının çeşitli proteinlerin konsantre olduğu spesifik bölgeler oluşturması, ve c-Met sinyal yolunun son derece kompleks, pleiotropik etkili ve özel sinyal moleküllerinin lokalize olduğu bölgelere ihtiyaç duyması, c-Met'in ve c-Met sinyal yolunun da kaveole ve kaveolin tarafından regüle ediliyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotezi test etmek için yaptığımız immunopresipitasyon deneylerinin sonucunda, kaveolin ve c-Met molekülleri arasında bir bağlanma olduğu, bu bağlanmanın HGF indüksiyonuyla birlikte gerçekleştiği ve en az 30 dk süreyle devam ettiği bulunmuştur. Bu sonuç, hipotezimiz doğrultusunda kaveolin ve c-Met arasında bir ilişki olduğunu literatürde ilk kez göstermektedir. Bu ilişki HGF indüksiyonundan hemen sonra, yani reseptör aktivasyonu ile birlikte başlamaktadır ve deney sistemimizdeki en uzun süre olan 30. dakikada da devam etmektedir.

Kaveolin ve diğer tirozin kinaz reseptörleri arasındaki ilişkiye bakıldığında, c-Met ve kaveolin arasındaki bu ilişkinin PDGFR ve kaveolin arasında olan ilişkiye benzediği görülmektedir. PDGF indüksiyonundan iki dakika sonra kaveolin-PDGFR bağlanması ortaya çıkmaktadır ve bu ilişki 2 saat devam ettikten sonra sonlanmaktadır. Bu kaveolin-PDGFR bağlanması PDGF ile indüklenen yanıtların oluşmasında oldukça önemlidir (37). PDGFR

sinyal yolunun aktivasyonu ve uygun biyolojik yanıtların oluşumu kaveolin bulunmadığında bozulmaktadır. PDGF indüksiyonundan sonra reseptörün çeşitli bölgelerden fosforilasyonu ve devreye giren adaptör moleküller, kaveole yokluğunda oluşmamaktadır. Yani PDGFR sinyal yolu kaveole içerisinde başlamaktadır. Bu nedenle kaveolin-PDGFR ilişkisi, PDGFR sinyal yolu açısından son derece önemlidir (1, 2, 7).

c-Met'in de HGF indüksiyonuyla birlikte kaveolinle bağlanması, c-Met sinyal yolunun da kaveole içerisinde başladığını ve kaveolin tarafından regüle edildiğini güçlü bir şekilde göstermektedir. Ancak, bu konuyla ilgili aydınlatılması gereken önemli sorular vardır. Bunlardan ilki, c-Met'in bazal ve HGF uyarılı koşullarda kaveole içerisindeki yerleşim durumuyla ilgilidir. Bu konuyla ilişkili iki olasılık söz konusudur. c-Met normalde kaveole dışarısında lokalize olmasına rağmen reseptör aktivasyonu ile kaveole içine çekilip kaveolinle ilişkiye girebilir; veya c-Met her zaman kaveole içerisinde olmasına rağmen, kaveolinle bağlanmak için reseptör aktivasyonuna ihtiyaç duyulur. Aydınlatılması gereken bir diğer soru da c-Met kaveolin bağlanmasının ne kadar süreyle devam ettiğidir. Ayrıca, kaveolinin c-Met sinyal yolunda hangi moleküller mekanizmalarla etkili olduğu ve bu etkinin c-Met ile uyarılan biyolojik yanıtları nasıl etkilediği de ilerleyen dönemlerde araştırılacak diğer konulardır.

Kaveolin ve c-Met arasında bir ilişki olduğu, bu çalışmamızda bir HCC hücre hattı olan SNU-475'de immunopresipitasyon ile gösterilmiştir. c-Met sinyal yolunun metastatik karakter ve düşük sağkalımla ilişkili olduğu hepatosellüler karsinoma, c-Met sinyal yolunda kaveolinin etkisini çalışmak için iyi bir modeldir. Kaveolin ekspresyonlarının HCC'de nasıl değiştiği de şu ana kadar bilinmiyordu. Yaptığımız immunohistokimya analizleri sonucu kaveolinin de HCC'de ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Kaveolin-c-Met ilişkisinin HCC'de önemli olup olmadığının belirlenmesi için, her iki molekülün ekspresyonlarının aynı dokularda ne kadar korele olduğu belirlenmelidir. Kaveolin ve c-Met'in aynı dokulardaki ekspresyonlarının korelasyonunu doğru değerlendirebilmek için, kaveolin ve c-Met boyamaları ardışık kesitler üzerinde yapılmıştır. Sonuç olarak HCC örneklerinin tümünün %82 (33 örnekten 27'si)'sinde kaveolin ve c-Met ekspresyonları koreledir. Bu oran iyi-diferansiye dokularda %85 (12 örnekte 10), orta-diferansiye dokularda %83 (20 örnekte 17)'tür. Az-diferansiye tek bir örnekte ise kaveolin ve c-Met ekspresyonları korele değildir. Sirotik dokularda ise kaveolin ve c-Met ekspresyonları %67 (9 örnekte 6) oranında koreledir.

HCC örneklerindeki ekspresyon analizlerinde görüldüğü gibi kaveolin ve c-Met ekspresyonları arasında oldukça güçlü bir uyum vardır. Kaveolin ve c-Met arasında immunopresipitasyon ile bir bağlanma belirlenmesi, c-Met sinyal yolunda kaveolinin çok önemli rolü olduğunu göstermektedir. Ayrıca, HCC dokularında bulunan bu güçlü ekspresyon uyumu da gerçekten kaveolin-c-Met ilişkisinin hem c-Met sinyal yolunda, hem de HCC gelişiminde önemli rolleri olabileceğini desteklemektedir.

Hepatosellüler karsinoma, tüm dünyada artan insidansıya birlikte her yıl 500.000 kişinin ölümüne neden olan bir kanser türüdür. HCC'nin moleküler patogeneziyle ilgili birçok bilinmeyen vardır (5, 61). Bu bilinmeyenlerin temelinde ise HCC'nin oldukça heterojen bir kanser türü olması yatar. HCC'nin erken öngörüsü, tanısı ve tedavisi için, bu kanser türünün gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir. Hepatosit büyüme faktörü olan c-Met, HCC'de dahil olmak üzere birçok kanser türünde etkili olmaktadır. HCC'de özellikle metastatik karakter ve düşük sağkalımla ilişkilendirilmiştir (7). c-Met sinyal yolunun kompleks ve pleiotropik etkili bir sinyal yolu olması, ayrıca bu kompleks sinyal yolunun regülasyonu ile ilgili moleküler mekanizmaların tam olarak aydınlatılamaması, HCC gelişiminde ve ilerlemesinde c-Met'in nasıl etkili olduğu sorusunu da cevapsız bırakmıştır. Çeşitli sinyal moleküllerini içerisinde toplayarak özelleşmiş bölgeler oluşturan kaveole membran yapıları c-Met sinyal yolunun dallanması ve regülasyonu için, birçok molekül ile ilişkiye girerek onların regülasyonunu sağlayan kaveolin de c-Met'in regülasyonu için iyi birer aday olarak görünmektedir. Nitekim yaptığımız çalışmalar sonucunda kaveolin ve c-Met'in ilişkili olduğunu, reseptör aktivasyonu ile birlikte kaveolin-c-Met bağlanmasının ortaya çıktığını, ve bu iki molekülün HCC dokularındaki ekspresyonlarının oldukça yüksek oranda korele olduğunu göstermiş durumdayız. Bu sonuçlar hem hücre biyolojisi açısından yeni ve önemli bilgiler ortaya koymaktadır, hem de hepatosellüler karsinogenezde kaveolin-c-Met ilişkisinin önemini göstermesi açısından dikkat çekicidir. Bu nedenle bu konuyla ilgili yapılacak yeni çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Couet J., Belanger M. M., Roussel E., Drolet M. C. Cell biology of caveolae and caveolin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49:223-235, 2001.
2. Stahlhut M., Kirsten S., Deurs B. Caveolae: uniform structures with multiple functions in signaling, cell growth and cancer. *Experimental Cell Research*, 261:111-118, 2000.
3. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4-12:915-25, 2003.
4. Gao CF, Vande Woude GF. HGF/SF-Met signaling in tumor progression. *Cell Research*, 15-1:49-51, 2005.
5. Moradpour D., Blum H. E. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17:477-483, 2005
6. Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 53-1:35-69, 2005.
7. Schoedel KE, Tyner VZ, Kim TH, Michalopoulos GK, Mars WM. HGF, MET, and matrix-related proteases in hepatocellular carcinoma, fibrolamellar variant, cirrhotic and normal liver. *Modern Pathology*, 16-1:14-21, 2003.
8. Kurzchalia T. V., Dupree P., Patron R. G., Kellner R., Virta H., Lehnert M., Simons K., VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-golgi-network-derived transport vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 118-5:1003-1014, 1992.
9. Simons K., Toomre D. Lipid Rafts and Signal Transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1;31-39 (2000).
10. Campbell L., Gumbleton M. and Ritchie K. Caveolae and the caveolins in human disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49-3;325-335, 2001.
11. Linda J. Pike L. J. Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: An evolving story. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1746-3:260-73, 2005.
12. Roy C. L., Wrana J. L. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6;112-126, 2005.
13. Williams T. M., Lisanti M. P., Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 288:494-506, 2005.
14. Razani B., Lisanti P. Caveolae and caveolins: molecular and functional relationship. *Experimental Cell Research*, 271:36-44, 2001
15. Li N., Xiang G-S, Dokainish H., Ireton K., Elferink L. A. The *Listeria* protein internalin B mimics hepatocyte growth factor-induced receptor trafficking. *Traffic*, 6:456-473, 2005
16. Epand R. M., Sayer B. G. and Epand R. F. Caveolin Scaffolding Region and Cholesterol-rich Domains in Membranes. *Journal of Molecular Biology*, 345-2;339-350, 2005.

17. Navarro A., Anand-Apte B., Parat M. O., A role for caveolae in cell migration. *FASEB Journal*, 18:1802-1813, 2004.
18. Vainio S., Heino S., Månsson J-E., Fredman P., Kuismanen E. Dynamic association of human insulin receptor with lipid rafts in cells lacking caveolae. *EMBO Reports*, 3:95-100, 2002.
19. Nevins A. K., Thurmond D. C., Caveolin-1 functions as a novel Cdc42 guanine-nucleotide dissociation inhibitor (GDI) in pancreatic beta cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281-28:18961-72, 2006.
20. Abulrob A, Giuseppin S, Andrade MF, McDermid A, Moreno M, Stanimirovic D. Interactions of EGFR and caveolin-1 in human glioblastoma cells: evidence that tyrosine phosphorylation regulates EGFR association with caveolae. *Oncogene*, 23-41;6967-79, 2004.
21. Cao H., Sanguinetti A. R. and Mastick C. C. Oxidative stress activates both Src-kinases and their negative regulator Csk and induces phosphorylation of two targeting proteins for Csk: caveolin-1 and paxillin. *Experimental Cell Research*, 294-1;159-171, 2005.
22. Massimino M. L., Griffoni C., Spisni E., Toni M. T. and Tomasi V. Involvement of caveolae and caveolae-like domains in signalling, cell survival and angiogenesis. *Cellular Signalling*, 14-2;93-98, 2002.
23. Sternberg P. W., Schmid S. L. Caveolin, cholesterol and Ras signaling. *Nature Cell Biology*, 1;35-37, 1999.
24. Couet J., Li S., Okamoto T., Ikezu T., Lisanti M. P., Identification of peptide and protein ligands for the caveolin scaffolding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 272-10:6525-6533, 1997.
25. Roy S., Luetterforst R., Harding A., Apolloni A., Etheridge M., Stang E., Rolls B., Hancock J. F., Patron R. G. Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nature Cell Biology*, 1;98-105, 1999.
26. Schwartz E. A., Reaven E., Topper J. N., Tsao P. S., Transforming growth factor-B receptors localize to caveolae and regulate endothelial nitric oxide synthase in normal human endothelial cells. *Biochemistry Journal*, 390:199-206, 2005.
27. Engelman J. A., Wykoff C. C., Yasuhara S., Song K. S., Okamoto T., Lisanti M. P. Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 272-26:16374-16381, 1997.
28. Carver L.A., Schnitzer J. E. Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nature Reviews Cancer*, 3;571-581, 2003.
29. Wiechen K., Sers C., Agoulnik A., Arlt K., Dietel M., Schlag P. M., Schneider U. Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas. *American Journal of Pathology*, 158-3:833-840, 2001.
30. Fra A. M., Mastroianni N., Mancini M., Pasqualetto E. and Sitia R. Human Caveolin-1 and Caveolin-2 Are Closely Linked Genes Colocalized with WI-5336 in a Region of 7q31 Frequently Deleted in Tumors. *Genomics*, 56-3:355-356, 1999.
31. Bouras T, Lisanti MP, Pestell RG. Caveolin-1 in breast cancer. *Cancer Biology and Therapy*, 3-10;931-941, 2004.

32. Williams TM, Medina F, Badano I, Hazan RB, Hutchinson J, Muller WJ, Chopra NG, Scherer PE, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 279-49;51630-46, 2004.
33. Williams TM, Lee H, Cheung MW, Cohen AW, Razani B, Iyengar P, Scherer PE, Pestell RG, Lisanti MP. Combined loss of INK4a and caveolin-1 synergistically enhances cell proliferation and oncogene-induced tumorigenesis: role of INK4a/CAV-1 in mammary epithelial cell hyperplasia. *Journal of Biological Chemistry*, 279-23;24747-56, 2004.
34. Wary K. K., Mariotti A., Zurzolo C. and Giancotti F. G. A Requirement for Caveolin-1 and Associated Kinase Fyn in Integrin Signaling and Anchorage-Dependent Cell Growth. *Cell*, 94-5;625-634, 1998.
35. Ravid D, Maor S, Werner H, Liscovitch M. Caveolin-1 inhibits cell detachment-induced p53 activation and anoikis by upregulation of insulin-like growth factor-I receptors and signaling. *Oncogene*, 24-8;1338-1347, 2005.
36. Pol A., Calvo M., Lu A. and Enrich C. EGF triggers caveolin redistribution from the plasma membrane to the early/sorting endocytic compartment of hepatocytes. *Cellular Signalling*, 12-8;537-540, 2000.
37. Liu P., Ying Y., Ko Y. G., Anderson R. G. W. Localization of platelet-derived growth factor stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *Journal of Biological Chemistry*. 271-17:10299-10303, 1996.
38. Ishikawa Y., Otsu K. and Oshikawa J. Caveolin; different roles for insulin signal? *Cellular signaling*, 17-10;1175-1182, 2005.
39. Yokomori H., Oda M., Wakabayashi G., Kitajima M., Yoshimura K., Nomura M., Hibi T. High expression of caveolins on the proliferating bile ductules in primary biliary cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*, 11-24:3710-3713, 2005.
40. Pelkmans L, Zerial M. Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature*, 436-7047:128-33, 2005.
41. Yokomori H., Oda M., Yoshimura K., Nomura M., Wakabayashi G., Kitajima M., Ishii H. Elevated expression of caveolin-1 at protein and mRNA level in human cirrhotic liver: relation with nitric oxide. *Journal of Gastroenterology*, 38:854-860, 2003.
42. Meyer A, van Golen C. M., Boyanapalli M, Kim B, Soules M. E., Feldman E. L. Integrin-linked kinase complexes with caveolin-1 in human neuroblastoma cells. *Biochemistry*, 44-3:932-8, 2005.
43. Lin M, DiVito MM, Merajver SD, Boyanapalli M, van Golen KL. Regulation of pancreatic cancer cell migration and invasion by RhoC GTPase and caveolin-1. *Molecular Cancer*, 4-1:21, 2005.
44. Sunaga N, Miyajima K, Suzuki M, Sato M, White MA, Ramirez RD, Shay JW, Gazdar AF, Minna JD. Different roles for caveolin-1 in the development of non-small cell lung cancer versus small cell lung cancer. *Cancer Research*, 64-12;4277-85, 2004.
45. Malerod L., Juvet L. K., Gjoen T., Berg T., The expression of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and caveolin-1 in parenchymal and non-parenchymal liver cells. *Cell Tissue Research*, 307:173-180, 2002.

46. Yerian L. M., Anders R. A., Tretiakova M., Hart J. Caveolin and thrombospondin expression during hepatocellular carcinogenesis. *American Journal of Surgical Pathology*, 28:357-364, 2004.
47. Zhang YW, Vande Woude GF. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1;88-2:408-17, 2003.
48. Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Letters*, 225-1;1-26, 2004.
49. Furge K. A., Zhang Y. W. and Vande Woude G. F. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene*, 19;5582-89, 2000.
50. Bertotti A, Comoglio PM. Tyrosine kinase signal specificity: lessons from the HGF receptor. *Trends in Biochemical Sciences*, 28-10:527-33, 2003.
51. Gual P, Giordano S, Anguissola S, Parker PJ, Comoglio PM. Gab1 phosphorylation: a novel mechanism for negative regulation of HGF receptor signaling. *Oncogene*, 20-2:156-66, 2001.
52. Schaeper U, Gehring NH, Fuchs KP, Sachs M, Kempkes B, Birchmeier W. Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *Journal of Cell Biology*, 149-7:1419-32, 2000.
53. Garcia-Guzman M, Dolfi F, Zeh K, Vuori K. Met-induced JNK activation is mediated by the adapter protein Crk and correlates with the Gab1 - Crk signaling complex formation. *Oncogene*, 18-54:7775-86,
54. Firon M, Shaharabany M, Altstock RT, Horev J, Abramovici A, Resau JH, Vande Woude GF, Tsarfaty I. Dominant negative Met reduces tumorigenicity-metastasis and increases tubule formation in mammary cells. *Oncogene*, 1920:2386-97, 2000.
55. Furge KA, Kiewlich D, Le P, Vo MN, Faure M, Howlett AR, Lipson KE, Woude GF, Webb CP. Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 98-19:10722-7, 2001.
56. Danilkovitch-Miagkova A, Zbar B. Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *Journal of Clinical Investigations*, 109-7:863-7, 2002.
57. Wang SY, Chen B, Zhan YQ, Xu WX, Li CY, Yang RF, Zheng H, Yue PB, Larsen SH, Sun HB, Yang X. SU5416 is a potent inhibitor of hepatocyte growth factor receptor (c-Met) and blocks HGF-induced invasiveness of human HepG2 hepatoma cells. *Journal of Hepatology*, 41-2:267-73, 2004.
58. McGinn K. A., London W. T. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 19-1:3-23, 2005.
59. Marrero J. A., Hepatocellular Carcinoma. *Current Opinion in Gastroenterology*, 21:308-312, 2005.
60. Moradpour D., Blum H., E. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17:477-483, 2005.
61. Cha C., DeMatteo R., P., Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 19-1:25-37, 2005.
62. Lau S., Guan X., Cytogenetic and molecular genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26-6:659-665, 2005.
63. Thorgeirsson S. S., Lee J. S., Grisham J. W., Functional Genomics of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 43:145-150, 2006.

64. Gratton J. P., Lin M. I., Yu L., Weiss E. D., Jiang Z. L., Fairchild T. A., Iwakiri Y., Groszmann L., Claffey K. P., Cheng Y. C., Sessa W. C., Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice. *Cancer Cell*, 4:31-40, 2003.
65. Anders R. A., Yerian L. M., Tretiakova M., Davison J. M., Quiga R. J., Domer P. H., Hoberg J., Hart J., cDNA microarray analysis of macrodegenerative and dysplastic nodules in end-stage hepatitis C virus induced cirrhosis. *American Journal of Pathology*, 162-3:991-1001, 2003.
66. Yokomori H., Oda M., Wakabayashi G., Kitajima M., Yoshimura K., Nomura M., Hibi T. High expressions of caveolins on the proliferating bile ductules in primary biliary cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*, 11-24:3710-3713, 2005.
67. Zhou H., Jia L., Wang S., Wang H., Chu H., Hu Y., Cao J., Zhang J. Divergent expression and roles for caveolin-1 in Mouse hepatocarcinoma cell lines with varying invasive ability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345:486-494, 2006.

EK-1: SOLÜSYONLAR

PBS (1X, 1000 ml)

0.2 g KCl

0.2 g KH₂PO₄

8 g NaCl

1.15 g Na₂HPO₄

TBE (1X, 1000 ml)

10.8 g Tris-bazı

5.5 g Borik asit

4 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0

Protein Yükleme Tamponu (5X, 20 ml)

2 g SDS

10 ml Gliserol

0.65 g Tris-bazı

0.15 g Bromofenol mavisi

SDS-Page Tamponu (1X, 1000 ml)

10 ml %10 SDS

3 g Tris-bazı

14.4 g Glisin

Transfer Tamponu (1X, 1000 ml)

3 g Tris-bazı

14.4 g Glisin

2 ml %10 SDS

200 ml MeOH

Tris-BSA (pH 7.3)

0.5 M Tris-bazı

1.5 M NaCl

%2 BSA

MOPS Tamponu (10X)

0.2 M MOPS (pH 7.0)

20 mM Sodyum Asetat

10 mM EDTA (pH 8.0)

RNA Jel Yükleme Tamponu (10X)

%95 deiyonize formaldehid

%0.025 Bromofenol mavisi

%0.025 ksilen siyanol

5 mM EDTA (pH 8.0)

%0.025 SDS

TBS (1X, pH 7.4, 1000 ml)

8 g NaCl

0.2 g KCl

3 g Tris-bazı

Tris-EDTA (pH 8.0)

10 mM Tris-Cl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)