

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOM GELİŞİMİNDE
HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ/c-MET
YOLAĞI İLE MUSİN1 VE MUSİN20
ARASINDAKİ ETKİLEŞİMİN ROLÜ**

GİRAY BOZKAYA

**TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2009

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOM GELİŞİMİNDE
HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ/c-MET
YOLAĞI İLE MUSİN1 VE MUSİN20
ARASINDAKİ ETKİLEŞİMİN ROLÜ**

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

GİRAY BOZKAYA

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Neşe ATABEY

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2006.KB.SAG.020 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	i
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	iii
KISALTMALAR	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	1
İNGİLİZCE ÖZET	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Hepatosellüler Karsinom	6
2.2. Musinler	9
2.2.1. MUC1 ve Kanser	12
2.2.2. MUC1 ve Sinyal İletimi	13
2.3. Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) c-Met Sinyal İletim Yolu	16
2.4. Musinler ile Büyüme Faktörlerinin İlişkisi	19
2.5. β -Katenin	20
2.5.1. β -Katenin Yapısı	20
2.5.2. β -Katenin ve Kaderin Adezyon Kompleksi	21
2.5.3. Wnt- β -Katenin Yolağının HCC'de İlişkisi	24
3.GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Hücre Dizileri	26
3.2. RT-PCR ile MUC1 ve MUC 20 Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	26
3.2.1. Primer Tasarımı	26
3.2.2. Total RNA Eldesi	27
3.2.3. RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	28
3.2.4. cDNA Eldesi	28
3.3. Reverse Transkriptaz polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	29
3.3.1. Gliseraldehit 3PD Primerleri ile RT-PCR	29
3.3.2. MUC1 Geninin RT-PCR İle İncelenmesi	29
3.3.3. MUC20 Geninin RT-PCR İle İncelenmesi	29
3.4. Western Blot	30

3.4.1. Hücrelerden Total Protein İzolasyonu	30
3.4.2. Protein Miktar Tayini	30
3.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	30
3.4.4. Proteinlerin Poliviniliden Diflorid (PVDF) Membranlara Transferi	31
3.4.5. Primer ve Sekonder Antikor İşlemleri	32
3.4.6. Proteinlerin Membran Üzerinde Tespiti	32
3.4.7. Kantitasyon	33
3.5. İmmunopresipitasyon	33
3.6. İmmunohistokimya	34
3.7. Etik kurul onayı	35
3.8. İstatistik analiz	35
4. BULGULAR	36
4.1. HCC Hücre Dizilerinde MUC20 Ekspresyonları	36
4.2. HCC Hücre Dizilerinde MUC1 Ekspresyonları	37
4.3. HCC Hücre Dizilerinde c-Met Ekspresyonları	39
4.4. HCC Hücre Dizilerinde MUC1-c-Met İlişkisinin İmmunopresipitasyon İle Gösterilmesi	41
4.5. HCC Hücre Dizilerinde β-Katenin Ekspresyonları	42
4.6. Mahlavu Hücre Dizisinde MUC1 β-Katenin Arasında Fiziksel Bir Etkileşim Olup Olmadığının ve Varsa Bu Etkileşime HGF İndüksiyonunun Etkisinin Gösterilmesi	43
4.7. Patoloji Arşivindeki HCC, Siroz ve Normal Dokularda MUC1 ve c-Met Ekspresyonlarının İmmunohistokimya Yöntemi İle Belirlenmesi	44
4.7.1. Patoloji Arşivindeki HCC, Siroz ve Normal Dokularında MUC1 Ekspresyon Analizi	45
4.7.2. Patoloji Arşivindeki HCC, Siroz ve Normal Dokularında c-Met Ekspresyon Analizi	46
4.7.3. Patoloji Arşivindeki HCC, Siroz ve Normal Dokularında Diferansiyasyon Durumuna Göre MUC1 ve c-Met Ekspresyon Analizi	47
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	55
7. KAYNAKLAR	56
8. EKLER	60

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1: İnsan musin genleri	8
Tablo 2: HCC hücrelerinin E-kadherin, MUC1 ve c-Met ekspresyon düzeyleri ile hücre fenotipi arasındaki ilişki.	41
Tablo 3: HCC hastalarının klinik ve patolojik verileri	45

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: HCC gelişimindeki risk faktörleri ve basamaklar	4
Şekil 2: Siroz safhasında hepatokarsinogenezi indükleyen moleküler mekanizmalar	5
Şekil 3: Normal musin yapısı	7
Şekil 4: Tümöre dönüşen hücrede MUC1 ekspresyonunun değişimi	10
Şekil 5: MUC1'in büyüme faktör ilişkili sinyal yolağı	12
Şekil 6: MUC1 sitoplazmik kuyruk yapısı	13
Şekil 7: MUC1 ve β -katenin arası ilişkiler	14
Şekil 8: HGF yapısı	16
Şekil 9: c-Met yapısı	17
Şekil 10: HGF/SF-c-Met sinyal yolağı	18
Şekil 11: β -katenin yapısı ve ana fosforilasyon ve bağlanma bölgeleri	21
Şekil 12: Hücre-hücre adezyonunda β -kateninin rolü	22
Şekil 13: Wnt yolağı ve β -katenin degradasyonuna etkisi	23
Şekil 14: HCC hücre dizilerinde mRNA düzeyindeki MUC20 ekspresyonları.	36
Şekil 15: HCC hücre dizilerinde protein düzeyindeki MUC1 ekspresyonları	37
Şekil 16: HCC hücre dizilerinde protein düzeyindeki MUC1 ekspresyonları	38
Şekil 17: HCC hücre dizilerinde protein düzeyindeki c-Met ekspresyonları	
Şekil 18: Mahlavu hücre dizilerinin HGF ile uyarılması ile c-Met'e bağlanan MUC1 miktarının immunopresipitasyon ile gösterilmesi	39
Şekil 19: HCC hücre dizilerinde protein düzeyindeki β -katenin ekspresyonları	40
Şekil 20: Mahlavu hücre dizilerinin HGF ile uyarılmasının MUC1 β -katenin etkileşimine etkisi	43
Şekil 21: Mahlavu hücre dizilerinin HGF ile uyarılmasının β -katenin ekspresyonuna etkisi	45
Şekil 22: Normal, siroz ve HCC'de IHC ile MUC1 ekspresyonları	46
Şekil 23: Normal, siroz ve HCC'de IHC ile c-Met ekspresyonları	47
Şekil 24: Diferansiyasyon durumuna göre IHC ile MUC1 ve c-Met ekspresyonları	48

KISALTMALAR

APC:	Adenomotoz Polipozis Koli (Adenomoutos Poliposis Coli)
BCA:	Bi-sinkronik Asit (Bi-cincronic acid)
BSA:	Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin)
CDK:	Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin Dependent Kinase)
CK1:	Kazein Kinaz 1 (Casein Kinase 1)
DMEM:	Dulbecco'nun Modifiye Ortamı (Dulbecco's Modified Eagles Medium)
Dsh:	Disheveled
EGF:	Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
EGFR(Erb):	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Reseptor)
ER:	Östrojen Reseptörü (Ostrogen Receptor)
ERK:	Ekstrasellüler Olarak Düzenlenen Kinaz (Extracellular Regulated Kinase)
FAK:	Fokal Adezyon Kinaz (Focal Adhesion Kinase)
FBS:	Fötal Sığır Serumumu (Fetal Bovine Serum)
Fz:	Frizzled reseptörü
Gab1:	Grb2 ile İlişkili Bağlanma Proteini 1 (Grb2-associated binding protein 1)
GPI:	Glikozil Fosfatidil İnositol (Glycosyl-Phosphatidyl Inositol)
Grb2:	Büyüme Faktörü Reseptörü Bağlı Protein 2 (Growth-factor Reseptor Binding Protein 2)
GA3PD:	Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrojenaz (Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehidrogenase)
GSK3b:	Glikojen Sentaz Kinaz 3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β)
HBV:	Hepatit B Virusu (Hepatitis B Virus)
HCC:	Hepatosellüler Karsinom (Hepatocellular Carcinoma)
HCl:	Hidroklorik asit (Hydrochloric acid)
HCV:	Hepatit C Virusu (Hepatitis C Virus)
HGF/SF:	Hepatosit Büyüme Faktörü/Saçılım Faktörü (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor)
ICAM-1:	Hücre içi adezyon molekülü-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1)
IL:	İnterlökin (Interleukin)
LEF:	Lenfoid Artırıcı Faktör (Lymphoid Enhancing Factor)

LRP:	Düşük Dansiteli Lipoprotein Reseptör Proteini (Low Density Lipoprotein Receptor Protein)
MAPK:	Mitojen Aktive Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase)
MMP:	Matriks Metalloproteinaz (Matrix-Metalloproteinase)
MUC:	Musin (Mucin)
Na₃VO₄:	Sodyum Orto-vanadat (Sodium Ortho-vanadate)
NaCl:	Sodyum Klorid (Sodium Chloride)
NaF:	Sodyum Florid (Sodium Floride)
NFDM:	Yağsız süt tozu (Non Fat Dry Milk)
PBS:	Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffered Saline)
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PDGF:	Platelet Türevli Büyüme Faktörü (Platelet-Derived Growth Factor)
PDGFR:	Platelet Türevli Büyüme Faktörü Reseptörü (Platelet-Derived Growth Factor Reseptor)
PI3K:	Fosfatidil-inositol 3 Kinaz (Phosphatidyl-inositol 3 kinase)
PKA:	Protein Kinaz A (Protein Kinase A)
PKC:	Protein Kinaz C (Protein Kinase C)
PLC:	Fosfolipaz C (Phospholipase C)
PMSF:	Fenil-metil-sülfonil (Phenyl-methyl-sulphonyl)
PVDF:	Poliviniliden Diflorid (Poly-vinylidene floride)
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat (Sodium Dodesyl Sulphate)
Shc:	Src Homoloji 2 Bölgesi İçeren (Src Homology 2 Domain Containing)
Shp:	Src Homoloji 2 İçeren İnozitol Fosfat (SH2 Containing Inositol Phosphate)
Sos:	Son of Sevenless
TCF:	T-hücre Transkripsiyon Faktörü (T-cell Transcription Factor)
TGF:	Transforme-edici Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)
TNF:	Tümör Nekroz Faktörü (Tumor Necrosis Factor)
VNTR:	Farklı Sayıda Sıralı Tekrar (Variable Number of Tandem Repeat)

TEŞEKKÜR

Doktora öncesi 1.5 yıllık özel öğrencilik ve 6 yıllık doktora eğitimimim süresince yaptığı her türlü katkıdan dolayı başta danışmanım Prof. Dr. Neşe ATABEY olmak üzere ders aldığım ve bana yol gösteren tüm hocalarıma, doktora eğitimi almamı mümkün kılan őefim Dr. Baysal KARACA'ya, laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımını esirgemeyen başta Murat ÇOKAKLI olmak üzere tüm öğrenci arkadaşlarıma, karaciğer doku örneklerini sağlayan Prof. Dr. Sedat KARADEMİR'e, immunohistokimyasal analizleri yapan Prof. Dr. Özgöl SAĞOL'a, özellikle tatil günlerinde laboratuvara kapandığım ve kendileri ile beraber olamadığım başta sevgili eşim Özlem GİRAY BOZKAYA ve oğlum Poyraz'a sonsuz teşekkürler.

ÖZET

Hepatosellüler Karsinom Gelişiminde Hepatosit Büyüme Faktörü/c-Met Yolağı İle Musin1 ve Musin20 Arasındaki Etkileşimin Rolü

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

Farklı hücre tipleri tarafından eksprese edilen yüksek molekül ağırlıklı glikoproteinler olan Musin1 ve Musin20 membrana bağlı musinlerden olup bir yandan buldukları hücre yüzeyinde koruyucu etki gösterirken diğer yandan hücre yüzey reseptörü ve sensörü olarak görev yapar. Membrana bağlı musinlerin hücre diferansiyasyonu, proliferasyonu ve metastaz süreçlerinde rolleri olduğu, sitoplazmik parçalarının sinyal ileti yollarında çeşitli proteinlerle etkileşimleri bulunduğundan, hepatosit büyüme faktörü reseptörü olan c-Met ile de ilişkileri olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple hepatosellüler kanser hücre dizilerinde Musin1 ve Musin20 ile c-Met mRNA düzeyleri reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu, Musin1 ve c-Met protein ekspresyon düzeyleri western blot ile araştırıldı. Ayrıca, normal, sirotik ve hepatosellüler karsinomlu olgulara ait parafin bloklarda immunohistokimyasal inceleme yoluyla Musin1 ve c-Met ekspresyonundaki değişiklikler belirlendi. Epitelyal fenotipli iyi diferansiye Huh-7, Hep3B ve HepG2 hücrelerinde Musin1'in eksprese edilmediği, mezenşimal fenotipli kötü diferansiye Snu-398, Snu-449, Snu-475, Mahlavu ve SK-Hep1 hücrelerinde ise eksprese edildiği tespit edildi. Protein düzeyinde yüksek Musin1 ve c-Met ekspresyonu yüksek olan Mahlavu hücre dizisinde bazal ve hepatosit büyüme faktörü uyarımına bağlı olarak c-Met ile Musin1 ve beta katenin ile Musin1 arasında fiziksel bir etkileşim olduğu ko-immunopresipitasyon ile gösterildi. Musin1-c-Met, Musin1-beta katenin fiziksel etkileşimlerinin ve S552 fosforile beta-katenin miktarının hepatosit büyüme faktörü uyarımı sonrasında zamana bağlı olarak azaldığı belirlendi. İmmunohistokimyasal incelemelerde normal karaciğer dokusunda Musin1 ve c-Met ekspresyonu bulunmadığı belirlendi. Siroz dokularında Musin1 ekspresyon oranının %15, c-Met ekspresyon oranının %89 olduğu saptandı (sırasıyla p=0.089, p=0.001). Hepatosellüler karsinom dokularında Musin1 ekspresyonunun %45'e çıktığı, c-Met ekspresyonunun ise %88 olduğu tespit edildi (sırasıyla p=0.001, p=0.001). İyi diferansiye hepatosellüler karsinomlarda Musin1 ekspresyon oranlarının orta ve kötü diferansiye olanlara göre daha düşük olduğu

görüldü. Sitoplazmik c-Met boyaması orta ve kötü diferansiye hepatosellüler karsinom dokularında iyi diferansiye olanlara göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0.001$).

Sonuç olarak bu veriler Musin1 ekspresyon artışının sirozdan hepatosellüler karsinoma geçiş için, c-Met ekspresyon artışının ise siroz gelişim sürecinde önemli olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Musin, hepatosellüler karsinoma, hepatosit büyüme faktörü, c-Met, beta katenin

ABSTRACT

The Role of the Interaction Between Hepatocyte Growth Factor/c-Met Pathway and Mucin1 and Mucin20 in the Development of Hepatocellular Carcinoma

Giray BOZKAYA, Dokuz Eylul University, School of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics, 35340, Balcova-Izmir, Turkey

Mucin1 and 20 are high molecular weight transmembrane glycoproteins that are expressed by different cell types which have protective effects on the cell surface and on the other hand act as cell surface receptors and sensors. Transmembrane mucins are thought to have roles in the regulation of differentiation, proliferation and metastasis of cells. Since the cytoplasmic domains of transmembrane mucins interact with various proteins in signal transduction pathways, it is thought that they might have association with hepatocyte growth factor receptor, c-Met. The mRNA expression levels of transmembrane Mucin1, Mucin20 and c-Met were investigated in hepatocellular carcinoma cell lines with reverse transcriptase polymerase chain reaction and the protein expression levels of Mucin1 and c-Met were investigated with western blot analysis. Besides, Mucin1 and c-Met expression discrepancies were analyzed in paraffin embedded tissue samples of normal, cirrhosis and hepatocellular carcinoma by immunohistochemistry. While there was no Mucin1 expression in well differentiated epithelial cell lines Huh-7, Hep3B and HepG2, poorly differentiated mesenchymal cell lines Snu-398, Snu-449, Snu-475, Mahlavu and SK-Hep1 had Mucin1 expression. It was also determined that c-Met-Mucin1 and beta catenin-Mucin1 co-immunoprecipitate under hepatocyte growth factor induction in Mahlavu cell line which has high Mucin1 and c-Met expression in protein level. These physical associations decreased in a time dependent manner under hepatocyte growth factor induction. Besides, phosphorylated S552 beta catenin levels were also affected by hepatocyte growth factor and decreased time dependently. There was no Mucin1 and c-Met expression in normal liver tissues. Mucin1 and c-Met expression rates in cirrhosis were 15% and 89% and p values were 0.089 and 0.001, respectively. In hepatocellular carcinoma tissues while Mucin1 expression increased to 45%, c-Met expression rate was 88% (p=0.001). Mucin1 expression rate in well differentiated hepatocellular carcinomas were lower than moderate and poorly differentiated ones. A

statistically significant elevation was obtained in cytoplasmic c-Met in moderate and poorly differentiated hepatocellular carcinomas compared to well differentiated samples ($p=0.001$).

In conclusion, these data suggest that Mucin1 overexpression is important in transition from cirrhosis to hepatocellular carcinoma while increase in c-Met expression may have importance in the development of cirrhosis.

Key words: Mucin, hepatocellular carcinoma, hepatocyte growth factor, c-Met, beta catenin

1. GİRİŞ VE AMAC

Hepatosellüler karsinom (HCC) yaklaşık olarak tüm kanserlerin % 5.4'ünü oluşturur. Dünyada yılda en az 250 bin ölüme sebebiyet vermektedir ve günümüzde ölüme neden olma açısından en hızlı artış gösteren kanser türüdür (1,2). Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) reseptörü olan c-Met bir tirozin kinaz reseptörüdür ve çeşitli kanserler ve metastazla direkt olarak ilişkili olduğu, moleküler seviyede HGF-c-Met sinyal yolunda meydana gelen değişikliklerin HCC'lerin büyük bir kısmından sorumlu olduğu gösterilmiştir (3).

Musinler solunum sistemi, gastrointestinal sistem, karaciğer, pankreas, safra kesesi böbrek, tükrük bezleri gibi farklı hücre tipleri tarafından eksprese edilen yüksek molekül ağırlıklı glikoproteinlerdir. Şu ana kadar 20 musin (MUC) geni tarif edilmiştir. Bunlar; MUC 1-4, MUC 5B, MUC 5AC, MUC 6-20'dir. Musinler iki gruba ayrılır: sekrete edilen musinler ve membrana bağlı musinlerdir (4). Musinler bir yandan salgılandıkları hücre yüzeyinde koruyucu etki gösterirken, diğer yandan membrana bağlı oldukları hücre yüzeylerinde eksternal uyarılara cevaben hücre yüzey reseptörü ve sensörü olarak görev yapar. Kanserde musin ekspresyonunun değiştiği, tümör hücrelerinin musinleri kullanarak vücuda yayılımlarının kolaylaşmasının yanı sıra immun denetimden kaçmak için de musinleri kullandıkları bildirilmiştir (5). HCC'da musin ekspresyon düzeyi ile ilgili çalışmalarda elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Bazı çalışmalarda musin tiplerinde artış tespit edilirken diğer çalışmalarda ekspresyon düzeylerinde değişiklik saptanmamıştır. Son yıllarda büyüme faktörleri ile musinler arasındaki etkileşimlerin çeşitli sinyal yollarını aktive edebilecekleri ve bunun gerek karsinogenez gerekse hepatokarsinogenez sürecinde önemli olabileceğini düşündüren çalışmalar yayınlanmıştır.

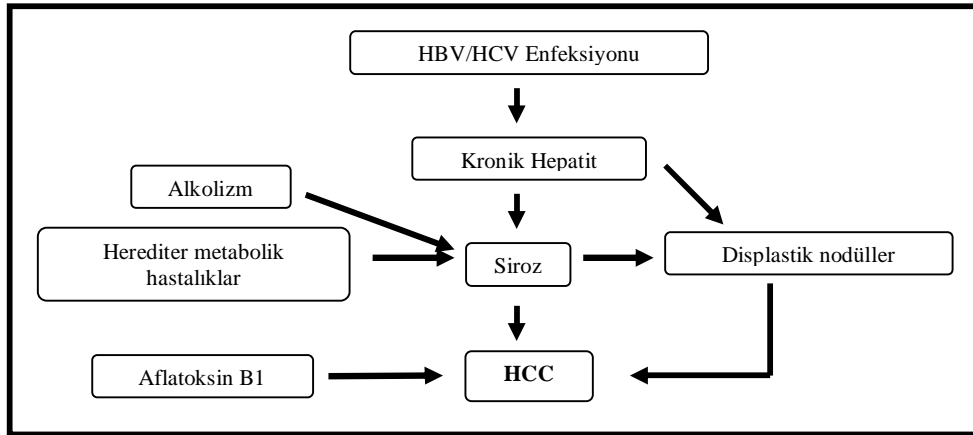
Bu projenin amacı, HCC hücre dizilerinde Musin1 ve Musin20 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi, gerek karaciğer rejenerasyonu gerekse hepatokarsinogenez sürecinde rol oynayan bir büyüme faktörü olan HGF indüksiyonunun bu ekspresyon düzeyine etkisinin araştırılmasıdır. Ayrıca normal, sirotik ve HCC'lu olgulara ait parafin bloklarda immunohistokimyasal inceleme yoluyla musin ve c-Met ekspresyonundaki değişikliklerin HCC gelişimi ve ilerleyişine etkisinin değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER:

2.1. Hepatosellüler Karsinom

Primer karaciğer kanserlerinin %85-90'ını oluşturan HCC dünyada en sık rastlanan kanserlerden olup kansere bağlı ölümlerin üçüncü en sık nedenidir (1,2). Her yıl 500 bin yeni vaka görülmekte olup bu vakaların %80'i Avrupa ve Kuzey Amerika başta olmak üzere gelişmekte olan ülkelerde ortaya çıkmaktadır. Görülme sıklığı her yıl artma eğiliminde olup, örneğin Amerika Birleşik Devletleri'nde son 20 yılda görülme sıklığı iki kat artmıştır (2).

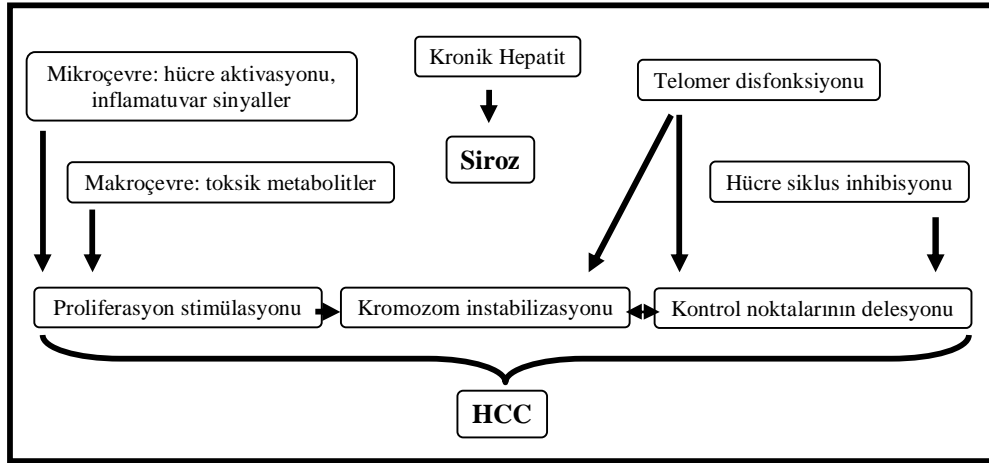
Normal karaciğerde de düşük oranda gelişebilmesine rağmen olguların çoğunluğunda kronik hepatit veya siroz gibi bir karaciğer hastalığı zemininde HCC gelişir. HCC risk faktörleri olarak en başta kronik hepatit B (HBV) ve hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonları, siroz ve aflatoksin B1 olarak belirlenmiştir (6). Karaciğer sirozuna sebep olan aşırı alkol tüketimi de HCC riskini artırır (7). Herediter hemokromatozis, alfa-1 antitripsin eksikliği, herediter tirozinemi gibi kalıtsal metabolik hastalıklar da diğer risk faktörlerindedir. Obesite ve diabetes mellitus non alkolik karaciğer yağlanması yoluyla siroza ve HCC'a yol açabileceği düşünülen etmenlerdir (Şekil 1) (2,8). HCC insidansının diyabetlilerde ikiye katlandığı ve HCC için kuvvetli bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir (9). Oral kontraseptiflerle HCC risk artışı ilişkisi için epidemiyolojik bir kanıt tam olarak ortaya konamasa da oral kontraseptiflerin östrojen ve progesteron içeriklerinin hayvanlarda karaciğer tümörlerini indükleyip artırdıkları gösterilmiştir (10). Tüm populasyonlarda erkeklerde görülen kanser oranları kadınlara göre 2-4 kat arasında daha yüksektir (1).



Şekil 1: HCC gelişimindeki risk faktörleri ve basamaklar (2)

Yetişkinlerde HCC olgularının büyük bir çoğunluğu kronik HCV, HBV enfeksiyonu veya alkol aşırı kullanımı gibi en az bir genetik olmayan risk faktörüne sahip olanlarda görülmesine karşın bunun tam tersi de olabilir; bilinen risk faktörleri ile karşı karşıya olanlarda HCC görülmeyebilir (1). İnsan genom projesinin tamamlanması, yüksek veri çıkışlı DNA mikroarraylerin geliştirilmesi ve genetik testlerin maliyetlerindeki düşüş genetik risk faktörlerini değerlendirecek geniş tabanlı epidemiyolojik çalışmaları mümkün kılmıştır (11). Bu çalışmalar, HCC riskinin siroz aşamasından sonra hızlanarak arttığını ortaya koyduğu için hepatokarsinogenezin moleküler temelini anlaşılmada siroz aşamasında karaciğerde tümör oluşumunu artıran moleküler mekanizmaların çözülmesi gerektiğini göstermiştir (1).

Bu mekanizmalardan DNA hipermetilasyonu hepatokarsinogenezin erken evrelerinde görülen olaylardan biridir (12). HCC olgularında farklı hücresel yolları düzenleyen p16/INK4A gibi çeşitli tümör baskılayıcı genlerde DNA hipermetilasyonu olduğu saptanmıştır (13). Sirozik karaciğerlerde görülen diğer bir anomali telomer kısalmasıdır. Telomer kısalmasının telomeraz-eksik farelerde karsinojenlere karşı karaciğer tümörlerinin başlamasını artırdığı gösterilmiştir (14). İnsan HCC olgularında da telomerlerin kısa olduğu saptanmıştır. Siroz aşamasındaki insan hepatositlerinde kromozomal instabiliteye yol açabilen telomer disfonksiyonunun HCC gelişimini indükleyebileceği düşünülmüştür (Şekil 2) (1,15).



Şekil 2: Hepatokarsinogenezi indükleyen moleküler mekanizmalar (1)

HCC dokularında gen mutasyonları çok sık değildir. HCC’da en sık mutasyona uğrayan genlerin p53 ve β -katenin genleri olduğu bildirilmiştir. p53 mutasyonları kromozomal instabilite ile ilişkili bulunmuşken β -katenin mutasyonlarının epigenetik değişiklikler ile ilişkili olduğu bulunmuştur (16).

HCC'da onkogenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunun sonucu olarak Wnt/ β -katenin, Ras, p14Arf/p53, p16INK4A/Rb, TGF- β , PTEN/Akt yolları gibi çeşitli sinyal yollarının regülasyonunun bozulduğu bildirilmiştir (1). Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivasyonu sıklıkla HCC gelişimi ile ilişkilidir (17). Wnt sinyallerinin yokluğunda β -katenin; adenomatöz polipozis coli (APC), Aksin ve glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β)'dan oluşan komplekse çekilerek burada fosforillenir ve degradasyona yollar. Bu sayede normal durumda sitoplazmik β -katenin düzeyi düşük bir düzeyde tutulur. Ancak Wnt ligandları membranda bulunan frizzled (Fz) ve düşük dansiteli lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein 5/6'ya (LRP5/6)'ya bağlandığında Wnt/ β -katenin sinyal iletimi tetiklenerek sitoplazmada bulunan dishevelled (Dsh) proteinini fosforile edip aktifleştirir. Aktif Dvl, β -kateninin degradasyon kompleksinden serbestleşmesini sağlar. Sitoplazmada biriken serbest β -katenin nukleusa geçerek T-hücre faktörü (TCF) ve lenfoid enhancing faktör (LEF) gibi transkripsiyon faktörleri ile etkileşir. Bu etkileşim çeşitli hedef genlerin ekspresyonuna sebep olur (18).

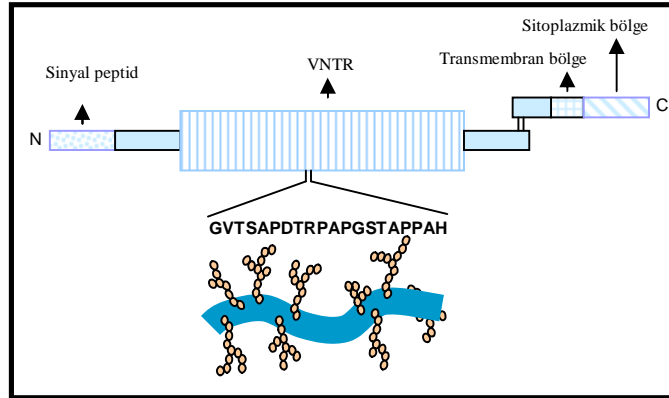
Hepatokarsinogenez; kromozomal, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi ile yakından ilişkilidir. Bu değişikliklerin bir kısmı karaciğerde kanser gelişiminin farklı basamaklarında oluşur ve hücrede önemli moleküler yolların regülasyonunun bozulması ile sonuçlanır. HCC gelişiminde altta yatan moleküler mekanizmaların tam anlamıyla çözülebilmesi HCC olgularının önlenmesi ve tedavi rejimlerinin geliştirilmesinde son derece önemlidir.

Kanser hücreleri normal hücrelere göre farklı form ve miktarlarda musin eksprese ederler. Tümör hücrelerinin transformasyonu esnasında musin çekirdek proteinlerinin deregülasyonu sonucu oluşan bu musin formları hem glikozilasyonları hem de oligosakkarit içerikleri açısından hücre yüzeyindeki çeşitli reseptörlerle etkileşime girebilir. Böylece lokal mikroçevrede tümör hücrelerini ortadan kaldıracak mekanizmalara karşı direnç sağladıkları gibi, çeşitli ligand-reseptör etkileşimleri ile tümör hücrelerinin diferansiyasyon ve proliferasyon basamaklarında da yer alırlar. Transmembran musinler hücre içi sinyal yollarında β -katenin gibi proteinlere bağlanarak hücre-hücre bağlantılarını etkiledikleri gibi, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu ile ilgili genlerin regülasyonunda da rol oynayabilirler. Adenokarsinomların invaziv ve metastatik yatkınlıklarına musinlerin katkıda bulunduğu inanılmaktadır (6). Özellikle MUC1'in sitoplazmik kuyruğunun sinyal iletileri

ile etkileşimi ve nukleusa göçü ardından meydana gelen biyolojik yanıtlar dolayısıyla HCC patogenezinde de yer almaları akla yakındır.

2.2. Musinler

Organizmadaki epitelial yüzeyler patojen ve benzer streslerden mukus sayesinde korunur. Optimal korunma için mukusun miktar, bileşim ve fonksiyonunun regülasyonu son derece önemlidir. Hücre yüzeyindeki mukus, glikozile proteinler olan musinler tarafından oluşturulur. Moleküler ağırlıklarının büyük bir kısmını *O*-bağlı oligosakkaritler oluşturur. Musinler hücre yüzeyinde buldukları yere göre ikiye ayrılır. Jel oluşturan (sekrete edilen) musinler tamamen ekstrasellüler olup hücre dışı ortam ile mukoza yüzeyi arasındaki ilk savunma hattıdır. Hücre yüzeyinde hücre zarında (transmembran) yerleşen musinler ise sitoplazmik kuyruk, transmembran bölüm ve ekstrasellüler parçalardan oluşan musinlerdir. Bunlar ikinci savunma hattını oluştururken, aynı zamanda ortamdaki herhangi bir farklılığa ait bilgileri hücre içine ileten sensörler olarak görev yapar (4). Musinlerin iki önemli yapısal özelliği; sıralı tekrar (tandem repeat) bölgeleri ve bu bölgelerdeki serin ve treonin rezidülerinde yoğun *O*-glikozilasyon bulunmasıdır (19).



Şekil 3: Normal MUC1 yapısı: Farklı sayıda sıralı tekrar (VNTR) bölgesi 20 amino asitlik sekans tekrarlarından oluşur. MUC1 üzerindeki karbonhidrat yan zincirlerindeki şeker rezidülerinin yapısı görülmektedir (20).

Sıralı tekrar bölgelerindeki amino asit ve tekrar sayısı musinler arasında değişiklik gösterir. Örneğin MUC1’de 20 amino asit 20-120 tekrar yaparken MUC4 “sıralı tekrar” bölgesi 16 amino asidin 145-395 tekrarından oluşur (Şekil 3) (20). Bu güne kadar isimlendirilmiş olan musinler tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1: İnsan musin genleri (5)

Kısa adı	Kabul edilen adı	Bulunduğu Kromozom	Gen tanımı
MUC1	Musin 1, hücre yüzeyi ile ilişkili	1q22	4582
MUC2	Musin 2, oligomerik mukus/jel oluşturan	11p15.5	4583
MUC3/17	Musin 17, hücre yüzeyi ile ilişkili	7q22	140453
MUC3A	Musin 3A, hücre yüzeyi ile ilişkili	7q22	4584
MUC3B	Musin 3B, hücre yüzeyi ile ilişkili	7q22	57876
MUC4	Musin 4, hücre yüzeyi ile ilişkili	3q29	4585
MUC5AC	Musin 5AC, oligomerik mukus/jel oluşturan	11p15.5	4586
MUC5B	Musin 5B, oligomerik mukus/jel oluşturan	11p15.5	727897
MUC6	Musin 6, oligomerik mukus/jel oluşturan	11p15.5	4588
MUC7	Musin 7, sekrete edilen	4q13.3	4589
MUC8	Musin 8	12q24.3	4590
MUC9	Musin 9, oviduktin	1p13.2	5016
MUC12	Musin 12, hücre yüzeyi ile ilişkili	7q22	10071
MUC13	Musin 13, hücre yüzeyi ile ilişkili	3q21.2	566671
MUC14	Endomusin	4q22.1	51705
MUC15	Musin 15, hücre yüzeyi ile ilişkili	11p14.3	143662
MUC16	Musin 16, hücre yüzeyi ile ilişkili	19p13.2	94025
MUC18	Melanom hücre adezyon molekülü	11q23.3	4162
MUC19	Musin 19, oligomerik	12q12	283463
MUC20	Musin 20, hücre yüzeyi ile ilişkili	3q29	200958

MUC1, musinler arasında ilk bulunan ve üzerinde en çok çalışılan musin tipidir. MUC1 tek bir polipeptid zinciri olarak endoplazmik retikulum ile ilişkili ribozomlarda sentez edilir (5). Fakat hücre yüzeyinde heterodimer olarak bulunur. MUC1'in kotranslasyonel proteolitik kesimi sonucu iki parça ortaya çıkar. Büyük alt ünite tamamiyle ekstrasellüler, yoğun glikozile farklı sayıda sıralı tekrar (VNTR) bölgesinden oluşur. 120-300kDa arası olan peptid çekirdek yapısı olgun hale geldiğinde iki katı bir büyüklüğe ulaşır. Küçük alt ünite ise, 58 rezidüden oluşan kısa bir ekstrasellüler bölge, tek geçişli transmembran domain ve 72 amino asitlik sitoplazmik kuyruktan meydana gelir. Bu parça büyük alt ünite ile membranın hemen üzerinde non-kovalent olarak bağlanmıştır (4).

MUC1'in glikozilasyonu endoplazmik retikulumda translasyonu esnasında başlar. Golgi'de glikozilasyon devam eder. Hücre tipine ve o hücrede eksprese edilen glikozil transferazlara bağlı olarak peptid çekirdek yapısına eklenen şeker zincirleri değişiklik gösterir. Yine hücre tipi ve hücrenin fizyolojik durumuna göre glikozilasyon miktarı da değişir (21).

MUC1'in N-terminalinde olgun proteini polarize epitel hücrelerinin apikal membranına yönlendiren bir sinyal peptidi bulunur. MUC1 varlığı, hücrelerin luminal hücre

popülasyonuna ait olduğunu gösterir. Böylece, öncül hücre veya kök hücre popülasyonlarına ait olduğu saptanır (20).

MUC1, meme dokusu, tükürük bezi, ösafagus, mide, pankreas, karaciğer, duodenum, akciğer, böbrek, mesane, prostat, uterus, ve testis gibi birçok organ ve doku epitel hücrelerinde eksprese edilir (5). MUC1'in hücresel lokalizasyonu normal duktus epitelinde, lumene bakan apikal yüzey ile sınırlıdır. Membrana bağlı musinlerin çoğunun ekstrasellüler domainleri hücre yüzeyinden salınır. Bu salınımın mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. İyon konsantrasyonu, pH, hidrasyon derecesi veya bir takım farklı sebepler ekstrasellüler domainin salınımına neden olabilir. Bazı spesifik proteazlar da bu salınımına katkıda bulunabilir. Örneğin uterus epitel hücreleri tarafından eksprese edilen MUC1, embriyonun implantasyonu esnasında metalloproteinazlar tarafından ortadan kaldırılır (22). Hücre yüzeyinde mukus tabakası oluşumunda veya retansiyonunda MUC1'in de rolü olduğu öne sürülmüştür (23). Mukus jelin MUC1 antikorlarla boyanması sonucu kuvvetli reaksiyon görülmesi MUC1'in ekstrasellüler parçasının mukus içinde yer aldığını ortaya koymuştur.

Hücre yüzeyine yakın mesafede sekrete edilen musin tabakası membran ile ilişkili musinlerle çeşitli etkileşimlerle temas halinde olabilir. Her iki tabaka epitel hücre yüzeyinin kötü koşullardan korunmasına katkıda bulunur. Dış musin katmanını mikroorganizmalar veya çeşitli materyal için fiziksel bir engel oluştururken, hidrasyonu, iyonik bileşimi, iyonik konsantrasyonu ayarlar ve spesifik moleküllerin içeri veya dışarı geçişini regüle eder. Örneğin, mide epitel yüzeyindeki mukus HCl için seçici bir difüzyon bariyeri oluşturur. Gastrik epitel tarafından salgılanan bikarbonat mukus tabakasında tutularak epitel üzerinde pH 2 ile pH 6-7 arasında bir gradient oluşturur. Mide lumeninde pH yükselmeye başladığında mide epiteli tarafından salgılanan HCl mukusu geçerek lumene ulaşır. Ancak, pH 4'ün altına düşünce HCl'nin epitele zarar vermesi mukus tarafından engellenir (24).

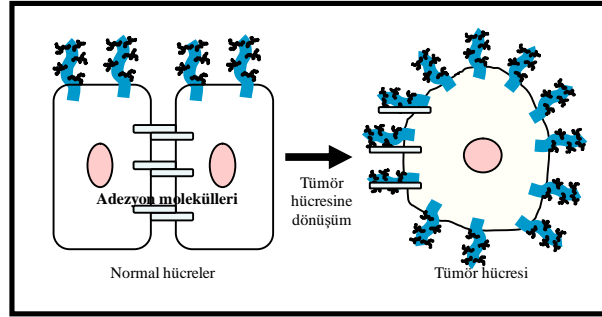
Musinler ve mukus tabakası sitokinler, büyüme ve diferansiyasyon faktörleri ve inflamasyon mediatörleri gibi molekülleri bağlar. Akciğer ve sindirim sistemi epitel hücrelerinde enflamatuar cevabı mukus tabakasındaki interlökin (IL)-1, TNF- α , IL-4, IL-6, IL-9 ve IL-13 gibi sitokinlerin oluşturduğu, tükürük bezlerinde üretilen epidermal büyüme faktörü (EGF)'nin tüm gastrointestinal sistem boyunca mukus tabakası ile ilişkili olarak tespit edildiği, aynı şekilde enterositler tarafından üretilen IGF- α 'nın mukus tabakasında bulunduğu bildirilmiştir (25).

MUC1'in geniş ve büyük konformasyonu sebebiyle anti adhesif bir protein olduğu, hücre-hücre ve hücre-matriks bileşimlerinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (26). Aynı

zamanda selektin benzeri moleküllere bağlanabilecek yapılar içerdiklerinden adhesif molekül olarak da davranabilirler (27).

2.2.1. MUC1 ve Kanser

Kanser hücreleri, özellikle adenokarsinomlar anormal formda ve miktarda musin eksprese ederler. Bu anormal form, tümör hücrelerinin transformasyonu esnasında musin çekirdek proteini ve onu modifiye eden enzimlerin regülasyonunun bozulması sebebiyle olur. Tümör hücrelerindeki MUC1 normal hücrelerde görülenden hem lokalizasyon hem de glikozilasyon açısından farklıdır. Normal epitel hücrelerinde MUC1 apikal membranda bulunurken çoğu tümör hücresinde tüm hücre yüzeyinde olmak üzere daha fazla eksprese edilir (Şekil 4) (22,28). Depolarize ekspresyona ek olarak, tümör hücresi tarafından üretilen MUC1 daha kısa karbonhidrat zincirleri içerir (29). Normal hücrelerin MUC1 sayesinde patojenlerden korunma özelliği tümör hücreleri tarafından immun hücrelerin tümöre yaklaşmasını önlemek için kullanılır (30).



Şekil 4: Tümöre dönüşen hücrede MUC1 ekspresyonunun değişimi: Normal epitel hücreleri MUC1'i apikal yüzeylerinde eksprese ederken tümör hücreleri tüm hücre yüzeylerinde eksprese ederek adezyon moleküllerinin MUC1 ile etkileşimleri ile hücre-hücre adezyonunu bloke ederler (22).

Endotelial protein intrasellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi adezyon molekülleri ile MUC1 etkileşimi tümör hücrelerinin kolayca metastaz yapabilmesine sebep olur. Endotel içine kolayca invaze olan tümör hücresi uzak bölgelere yine MUC1 sayesinde tutunup yerleşebilir.

İnsan tümörlerinde yapılan çoğu çalışmada aşırı MUC1 üretimi saptanmıştır. Meme kanserlerinin %90'ından fazlasında olmak üzere over, akciğer, kolon ve pankreas kanserlerinde MUC1 ekspresyonunda artış saptanmıştır (28). Tümör ilerledikçe MUC1 ekspresyonu da artma eğilimindedir ve örneğin meme kanserinde bu durum düşük sağ kalım ile ilişkilidir (31).

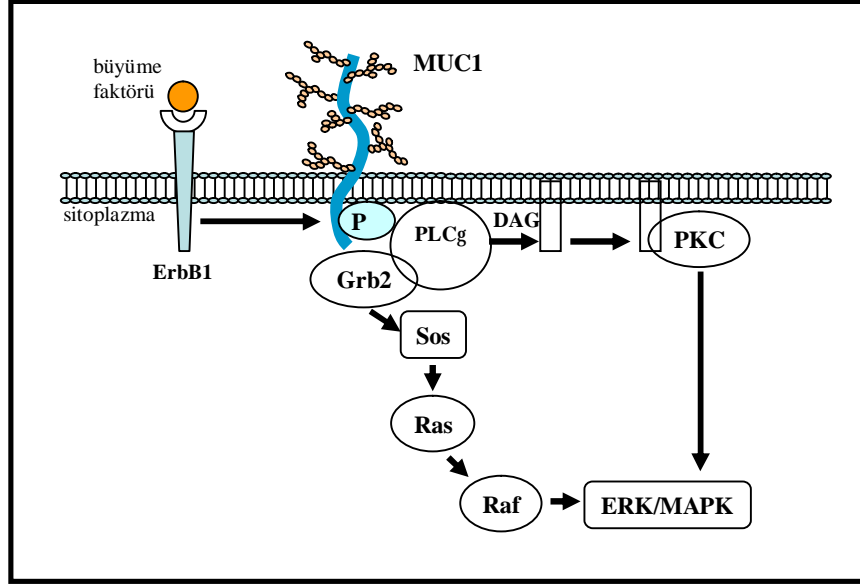
MUC1'in karaciğer kanseri ile ilgisini ortaya koymak için yapılan az sayıda immunohistokimyasal çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir (32-35). Primer karaciğer kanseri olan 96 örnekte 68 kuvvetli pozitif, 6 zayıf pozitif MUC1 ekspresyonu tespit edilirken normal karaciğer dokularında MUC1 ekspresyonuna rastlanmamış, karaciğer kanser dokularındaki MUC1 ekspresyon oranı, siroz ve normal dokularla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (32). Başka bir çalışmada, 42 HCC örneğinde %38 oranında MUC1 pozitifliği bildirilmiştir (33). Ichikawa ve ark. 186 HCC olgusunda 85 MUC1 pozitifliği bulmuş ve tümör diferansiyasyonu ve lenf nodu metastazı MUC1 ekspresyonu ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir (34). Bunların aksine, Lau ve ark. 13 HCC örneği ile çalışmış fakat MUC1 ekspresyonu bulunmadığını bildirmişlerdir (35). Karaciğer kanseri gelişiminde MUC1'in rolüne ilişkin veriler ve hangi mekanizmalar ile etkili olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir.

2.2.2. MUC1 ve Sinyal İletimi:

Koruyucu, hidrasyon sağlayıcı, kayganlaştırıcı, sekestre edici, adhesif ve antiadhesif özelliklerinin yanı sıra membrana bağlı MUC1 hem ekstrasellüler, hem de intrasellüler bölgeleri ile çeşitli sinyal olaylarında yer alır (5). Örneğin, endotel hücreleri, bazı lenfosit ve monositlerde bulunan immunoglobulin benzeri adezyon molekülü olan ICAM-1, MUC1'in peptid kor ekstrasellüler parçasına bağlanır. Bu etkileşim hücre içi kalsiyum düzeyinde hızlı bir artışa sebep olur ve Src, fosfaditil inozitol 3-kinaz (PI3K) ve fosfolipaz C (PLC) enzimlerinin etkilenecek hücre içi bazı sinyal yolları aktifleşir (36).

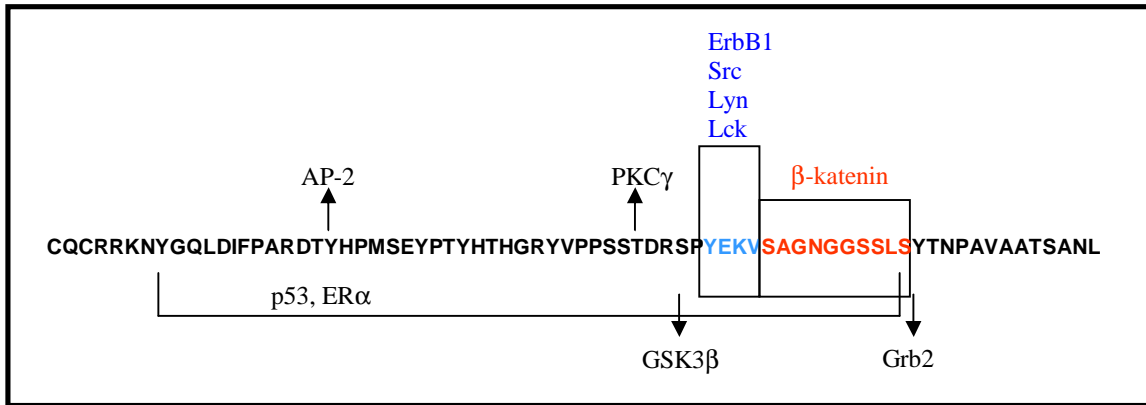
MUC1'in sitoplazmik kuyruğu, hücre iskeleti elemanları ile sitozolik adaptör proteinlerle ilişki kurarak sinyal iletiminde rol alır (37). MUC1'in hücresel sinyal iletiminde yer alabileceğinin ilk göstergesi dizi analizi çalışmaları sırasında fare ve insan MUC1 sitoplazmik kuyruk bölgesindeki amino asitlerin yüksek derecede korunmuş olduğunun saptanmasıdır (37). Sitoplazmik kuyruktaki yedi tirozin rezidüsünün fosforilasyonu sinyal yollarını başlatıcı bir takım moleküller için bağlanma bölgeleri oluşturur. MUC1 sitoplazmik kuyruğuna bağlanabilen kinazlardan bazıları; c-Src, epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR veya ErbB), GSK3- β ve protein kinaz C- γ (PKC- γ)'dir (38). Ayrıca, bir kinaz aktivitesi olmadan MUC1 sitoplazmik kuyruğu ile bağlanan p53, β -katenin, östrojen reseptör alfa (ER α), Grb2, AP2 gibi proteinler de hücre içi bir takım sinyal ileti yollarında

etkili olur. MUC1 hücre büyümesi ve diferansiyasyonunu Grb2-Sos-Ras-MEK-ERK yolu üzerinden aktive edebilir (Şekil 5) (39).



Şekil 5: MUC1'in büyüme faktör ilişkili sinyal yolu (39).

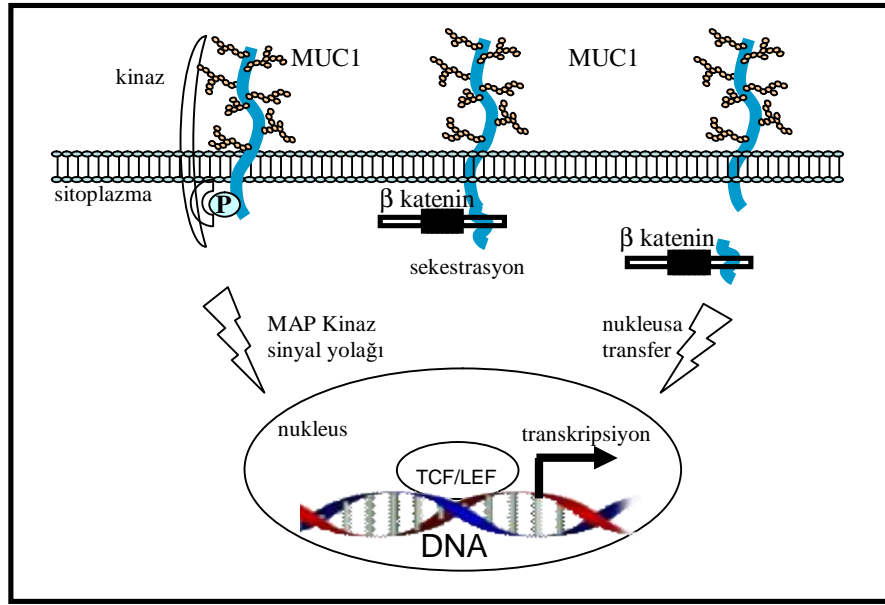
MUC1 sitoplazmik kuyruk içindeki SAGNGGSSL motifinin β -katenin ile bağlanması sinyal iletimini iki mekanizma ile etkiler: MUC1'in sitoplazmik kuyruk parçası ayrılarak β -katenin ile birlikte nükleusa gider ve TCF/LEF gibi transkripsiyon faktörleri yoluyla transkripsiyonu etkiler veya β -katenin sitoplazmada tutularak kaderinler ve diğer komplekslerle ilişkisini önleyip Wnt sinyal iletimini etkiler (Şekil 6) (20,40).



Şekil 6: MUC1 sitoplazmik kuyruk yapısı: MUC1 sitoplazmik kuyruğunda bilinen fosforilasyon bölgeleri ve bağlanan bazı aracı proteinler (20).

Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aktivasyonu, diğer kanserlerde olduğu gibi HCC gelişimi ile de ilişkilidir (2). Adenomatöz polipozis koli (APC) ve aksin proteinlerine bağlanan β -katenin fosforile edilerek 26S proteasome tarafından degrade edilir. Böylece hücre

içi serbest β -katenin seviyesi düşük tutulur. HCC'da; Wnt ligand, Fz reseptör ve Dsh aracı proteininin aşırı üretimi olurken APC inaktivasyonu, β -katenin gen mutasyonu, aksin1 mutasyonuna rastlanmaktadır. Tüm bu etkiler HCC'da β -katenin'in hücre içindeki miktarının artmasına sebep olmaktadır. MUC1'in β -katenin üzerine yukarıda bahsedilen etkileri, bu etkilerin değişik faktörlerle MUC1 üzerinden değişimi HCC gelişiminde MUC1'in de etkili olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 7).



Şekil 7: MUC1 ve b-katenin arası ilişkiler (22).

MUC1 sitoplazmik kuyruğu p53 ile de etkileşerek hücre siklusunun ilerlemesi ve apoptozun önlenmesine katkıda bulunur. TCF/LEF ve p53 gibi transkripsiyonel düzenleyicilerle olan ilişkiler MUC1'in transkripsiyonel ko-regülatör olduğu ve böylece hücrenin kaderinin belirlenmesinde etkili olduğu ileri sürülmüştür (41).

MUC1'in mitokondriye geçerek apoptotik olayları da etkilediği ileri sürülmektedir (42). MUC1 sitoplazmik kuyruğunun mitokondriye taşınmasının genotoksik ajanlara karşı apoptotik yolağı zayıflatırken apoptozu indükleyen ilaçlara karşı direnç gelişir.

MUC1 sitoplazmik parçası ErbB reseptörleriyle etkileşerek MAP kinaz yollarında yer alır (43). MUC1 sitoplazmik kuyruğu fosforile olduğunda Grb2'yi ErbB1 yakınlarına çekerek Sos proteininin de yaklaşmasını ve G-protein ile eşleşmiş reseptörler yoluyla Ras proteininin ve bu sayede MAP kinaz yolağının aktivasyonunu sağladığı düşünülmektedir (43).

Yine bir transmembran protein olan MUC20 ekstrasellüler bölgesinde serin, treonin ve pirolinden zengin tekrarlar içeren bir musindir. MUC20 mRNA'sı böbrekte yüksek oranda

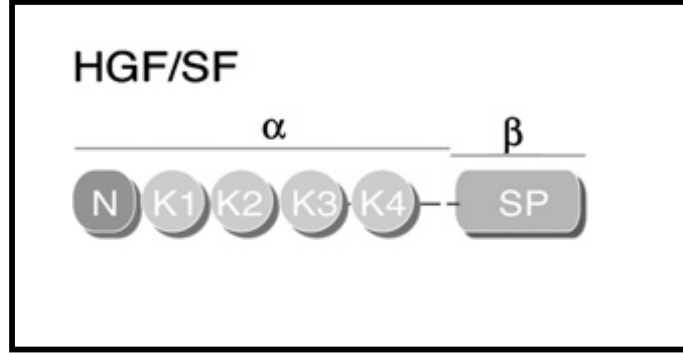
eksprese olur. monomer halde C terminal parçasıyla c-Met ile düşük düzeyde etkileşir ve Grb2 c-Met'e birikerek proliferasyona yol açan sinyal basamakları aktifleşir. Ancak, MUC20 aşırı üretimi veya bilinmeyen bir faktör etkisiyle MUC20 oligomerize olur, Met ile etkileşim artar ve Grb2 birikimi engellenir. Böylece HGF ile indüklenen Grb2-Ras yolağının aktivasyonunu azaltırken hücre proliferasyonu da ortadan kalkar (44). Buradan hareketle, MUC20'nin c-Met sinyal yolağının yeni bir düzenleyicisi olduğu sonucuna ulaşılabilir.

İlk belirlenen musin olması sebebiyle MUC 1 ile ilgili yapılan araştırmaların yanında daha sonra tespit edilmiş musinlerin kanserlerdeki rolleri hakkında da çalışmalar yoğunlaşmıştır. MUC1'in ErbB reseptörleri ile etkileşimi karaciğer rejenerasyon ve hepatokarsinogenez sürecinde önemli rolü olan sinyal ileti yolağı HGF/c-Met'i akla getirmektedir. MUC1'in c-Met ile etkileşiminin ardından MUC1 sitoplazmik kuyruk parçası ile farklı aracı moleküllerle etkileşerek rejenerasyon sürecine katkıda bulunabilir. Bu nedenle c-Met/MUC1 arasındaki karşılıklı haberleşmenin ve potansiyel etkileşimlerin incelenmesi gerek karaciğer rejenerasyonu gerekse hepatokarsinogenez mekanizmalarının saptanması açısından önemlidir. Hücre sinyal iletimindeki rolünün belirlenmesi sonrasında MUC1'in karsinogenezde rol oynayan farklı sinyal molekülleri arasındaki haberleşmede anahtar moleküllerden birisi olabileceği düşünülmektedir.

2.3. Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) c-Met Sinyal İletim Yolu

HGF, hepatositler, epitelyal hücreler, melanositler, endotelyal ve hematopoietik hücreler gibi çeşitli hücre tiplerinde proliferasyon, migrasyon ve morfolojik değişiklikleri uyaran bir proteindir (3). Bu hücre tiplerinin çoğu HGF'e yanıt olarak proliferer olur. Bazı hücreler proliferer olmadan dağılırken (scatter factor=saçılım faktörü) bazıları ise kollajen matriks içine invaze olur veya tübüler yapılar oluşturur (branching morphogenesis) (45). HGF'e verilen tüm bu yanıtlar, reseptörü olan c-Met proto-onkogen ürünü aracılığıyla gerçekleşir.

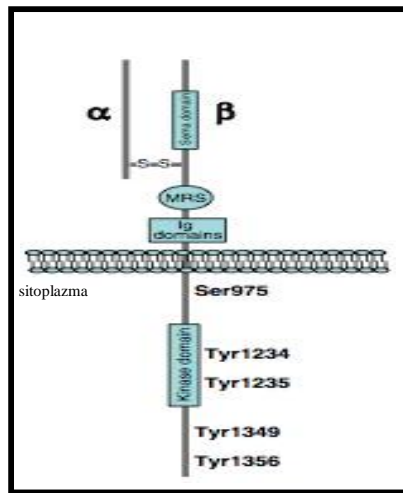
HGF proteini (3) tek zincirli bir polipeptit olarak sentezlendikten sonra proteolitik yıkımla, biyolojik olarak aktif, disülfid bağlı heterodimer oluşturur. Dimerin ağır zinciri öncü polipeptidin N-terminal tarafından türevlenir ve bu bölgede 4 krinkle domaini taşır. Yaklaşık 80 amino asit uzunluğundaki krinkle domainler, 3 tane molekül içi disülfid bağı ve korunmuş dizilerle karakteristik bir katlanma paterni gösterirler. HGF'in 60kDa'luk ağır zincirinin yanındaki yaklaşık 34 kDa'luk hafif zincir, bir serin proteaz yapısına sahip olmasına karşın katalitik aktiviteden yoksundur (Şekil 8) (3,46,47).



Şekil 8: HGF yapısı: Alfa zinciri, amino terminal bölümü (N) ve krinkle (K1-4) bölümlerden oluşurken beta zinciri serin proteaz homoloji (SP) bölümü içerir (3).

HGF'in pleiotropik etkileri gelişim, organogenez ve doku rejenerasyonu sırasında oldukça önemlidir. Uygunsuz HGF sinyalleri birçok insan kanserinde bulunur ve HGF'in proteaz üretimi, hücre disosiasyonu ve motilite programlarını başlatma yeteneği tümör metastazıyla bağlantılı olarak bulunmuştur (3, 48).

Bir tirozin kinaz reseptörü olan c-Met, tıpkı HGF gibi disülfid bağlı bir heterodimer yapısındadır. Bu heterodimer öncü, tek bir polipeptidin proteolitik yıkımından oluşur (3, 46). 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 bölgesi) ligand bağlanması için gerekli olduğu bulunmuştur. c-Met'in ekstrasellüler kısmının geri kalanı ise küçük bir sisteince zengin bölge ve dört immunoglobulin bölgesi içerir (Şekil 9).

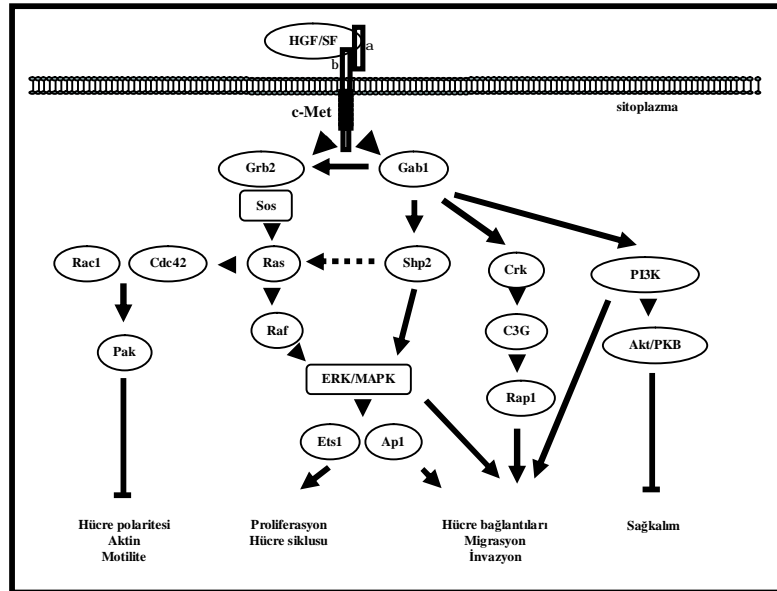


Şekil 9: c-Met yapısı: Disülfid bağlarıyla bağlanan alfa ve beta zincirlerinden oluşan reseptör tirozin kinaz yapısı. Tirozin rezidüleri 1349 ve 1356 ise fosforile olduğunda aracı moleküller için bağlanma bölgeleri oluşturur (3).

Aktif c-Met; Grb2, Gab1, Shc ve Crk/CRKL gibi adaptör proteinleri; PI3K, Stat3, PLC- γ , Sos, Src kinaz, Shp2 fosfataz gibi molekülleri kendine çeker (49). “Multisubstrate docking bölgesi” ile yapılan mutasyonel analizler, Y¹³⁵⁶,nın Grb2, PI3K, PLC- γ ve Shp2 çağrılmasından sorumlu iken, Y¹³⁵⁶ ve Y¹³⁴⁹ birlikteliğinin Gab1, Src ve Shc ile ilişkiyi sağladığı bulunmuştur (3,46).

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 antiapoptotik yanıtları indükler (3). 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 matriks içine invaze olurlar ve dallanan tübüller oluştururlar. Tübüler dallanma, kültürde gözlenen karmaşık morfolojik bir olaydır ve hücre büyümesinin, polaritesinin, hareketinin sıkı bir koordinasyonunu gerektirir (45,50).

Adherens bağlantıların ayrılması, hücre yayılması ve motilite için oldukça önemli olan ERK/MAPK yolağının çeşitli inhibitörlerle engellenmesi, epitelyal hücrelerin dağılmasını önler. Gab1-Shp2-ERK/MAPK kaskadı hücre proliferasyonunu, bağlanmasını ve mobilitesini kontrol eden ETS/API transkripsiyon faktörlerini ve adezyon moleküllerini düzenler. c-Met ayrıca Ras, Rac1 ve PAK bileşenlerini içeren bir sinyal yolunu da aktive ederek hücre iskeletinde 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 (Şekil 10) (3, 48, 51).



Şekil 10: HGF/SF-c-Met sinyal yolağı (3).

HGF/SF erişkinde ve gelişim sırasında epitelyal hücreler için etkili bir motilite faktörüdür ve c-Met birçok organın epitelyal hücrelerinde eksprese edilir. Erişkinde c-Met sinyalleri çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde gösterilmiştir (3,52). 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 IL-1 ve IL-6 gibi sitokinler HGF transkripsiyonunu aktive ederler. HGF/SF etkili bir karaciğer mitojenidir, ortalama karaciğer boyutunu ve karaciğer rejenerasyonunu artırır. HGF'in diğer bir aktivitesi de özellikle kanserde önem taşıyan anjiogenezdır (50,53).

c-Met ve HGF/SF sinyal iletiminin bozukluğu birçok insan malignansında rastlanan bir özelliktir (3,50). İnsan tümör hücrelerinde HGF/SF ya da c-Met'in ekspresyonunun downregülasyonu, onların tümörijenik potansiyellerini azaltır. Birçok çalışmada HGF/SF ve/veya c-Met'in sıklıkla karsinomalarda, insan solid tümörlerinin ve metastazlarının diğer tiplerinde eksprese olduğu gösterilmiştir (46). HGF, HCC dokularında da oldukça yüksek gözlenmektedir. HCC'de c-Met ekspresyon düzeyi ise hastaların sağ-kalımı ile ters yönde ilişkili bulunmuştur (47).

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 oynar, ancak kanser için tek başlarına bir gösterge değildirler (3,6). C-Met ekspresyonunun veya aktivasyonunun karaciğer kanseri gelişimine yönelik yeterli çalışma yoktur.

2.4. Musinler ile Büyüme Faktörlerinin İlişkisi

MUC1 sitoplazmik kuyruğuna bağlanabilen kinazlardan olan EGF reseptörleri, MUC1'in büyüme faktörleri ile olan ilişkisine en güzel örnektir (38). Zaten çoğu membran ile ilişkili musinde olduğu gibi MUC1'de de EGF ailesi ile homoloji gösteren bölgeler bulunur. Bunların fonksiyonları kesin olarak bilinmese de hücre membran musinlerinin EGFR üyeleri ile etkileşimini sağladığı düşünülmektedir (22). Bu reseptörlerin aktivasyonu Grb2/Sos ve MAP kinazlar gibi bir takım efektör proteinlerin stimülasyonuna yol açar (43). MAP kinaz

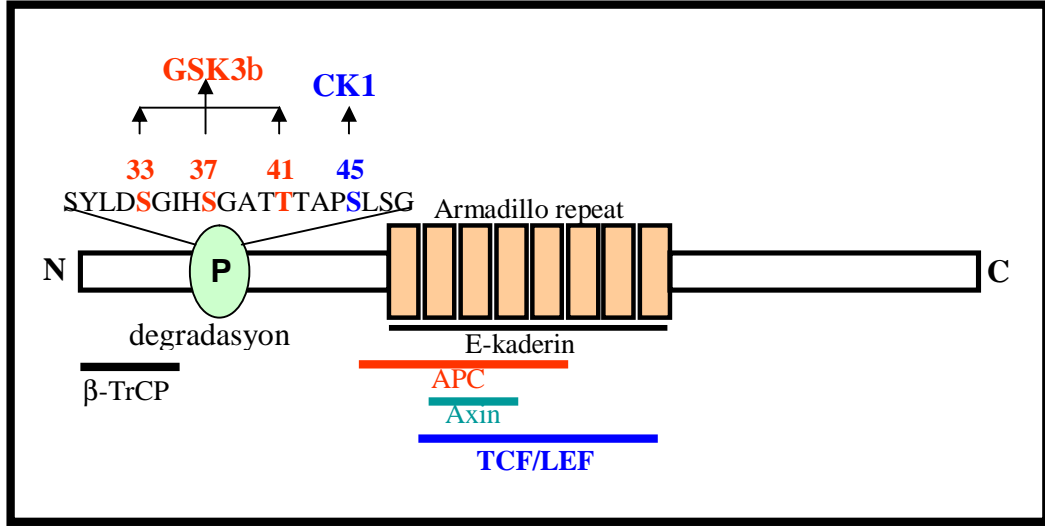
stimülasyonunun bir mekanizmasında; Grb2/Sos kompleksinin fosforile reseptöre yaklaşması yoluyla Ras aktivasyona ve Raf, MEK ve ERK1/2 fosforilasyonuna sebep olur. Aynı yolak HGF/SF etkisiyle c-Met aracılıklı indüksiyonda da aktiftir (3). İmmunopresipitasyon ve kolokalizasyon deneyleri MUC1 ve EGFR arasında MUC1'in sitoplazmik kuyruk parçası yoluyla fiziksel bir etkileşim olduğunu göstermiştir. Ayrıca, epidermal büyüme faktörü bağımlı ERK1/2 aktivasyonu yüksek MUC1 düzeylerinin varlığında meme dokusunda güçlü bir şekilde indüklendiğinden MUC1'in ErbB ailesi üyelerinin sinyalini potansiyalize ettiği ileri sürülmektedir (43). Böylece MUC1 varlığında ERK1/2 aktivasyonunun artışı kanser gelişimini hızlandırabilir.

MUC1, ErbB reseptör tirozin kinazlara bağlanarak ko-lokalize olabilir. Ligand bağlı ErbB1 MUC1 sitoplazmik kuyruğunu YEKV motifindeki tirozin rezidüsünden fosforile edebilir. Böylece, MUC1'in β -katenin'e afinitesi artar ve sitoplazmik kuyruk parçasının nukleusa transferi kolaylaşır (39). Ayrıca, non reseptör tirozin kinazlardan olan c-Src, Lyn ve Lck MUC1'e bağlanarak sitoplazmik kuyruğunu yine YEKV motifindeki tirozin rezidüsünden fosforile edebilir. Bu durumda MUC1'in β -katenin ile direk olarak bağlanması kolaylaşır. Görüldüğü gibi MUC1 çeşitli yollarla β -katenin ile etkileşime girmektedir.

2.5. Beta Katenin

2.5.1. Beta katenin yapısı:

β -katenin, proteinlerin armadillo ailesine aittir. Bu proteinler "armadillo repeat" adı verilen 42 amino asit tekrarından oluşan santral bir domain ile karakterizedir. Bu bölge, helikslerden oluşan bir süperheliks meydana getirir ve pozitif yüklü bir kanal oluşturur (54). β -katenin, adezyon reseptörü kaderin, degradasyon kompleksi aksin/APC, transkripsiyon faktörleri LEF/TCF gibi çoğu negatif yüklü ligandlarla etkileşim için bu tek bağlanma bölgesini kullanır (Şekil 11).

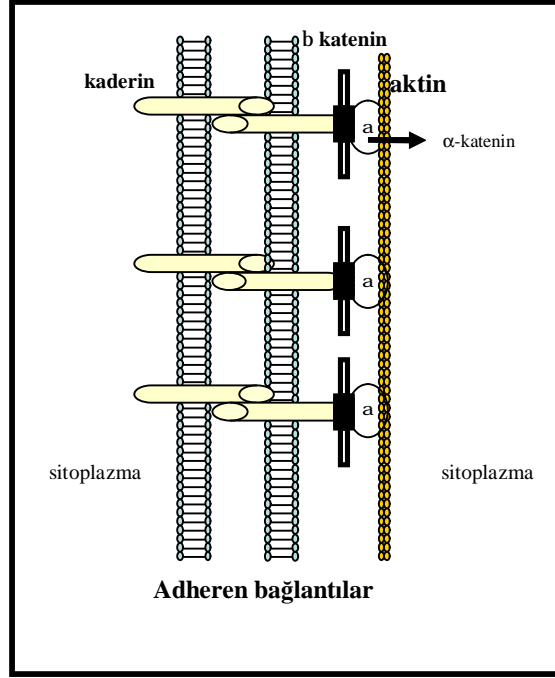


Şekil 11: b-katenin yapısı ve ana fosforilasyon ve bağlanma bölgeleri (55).

β -katenin'in fonksiyonu armadillo bölgesi ile hangi faktörün etkileştiğine bağlı olarak değişir. Genelleme olmamasına rağmen, bağlanan proteinlerin fosforilasyonu negatif yüklerle yüklenmelerine ve β -katenin'in pozitif yüklü bölgesine bağlanma afinitesini artırır. Böylece ligand fosforilasyonu β -katenin'in transkripsiyonda mı veya hücre-hücre adezyonunda mı kullanılacağını belirleyebilir. β -katenin'in kendisinin fosforilasyonu da bazı ligand etkileşimlerini etkileyebilir. β -katenin'in amino ve karboksil uçları regülatuar bölgeler olup adezyon ve sinyal iletimi için gerekli kofaktörleri buraya toplar. Bazı durumlarda, karboksil ucu β -katenin armadillo tekrar bölgesinin kaderinler veya APC için kullanılabilirliğini kısıtlayabilir (55).

2.5.2. Beta katenin ve kaderin adezyon kompleksi:

β -katenin, kaderin/katenin adezyon kompleksinin temel bileşenidir. Kaderinler, tip 1, tek transmembran geçişli glikoproteinler olup, ekstrasellüler domainleri ile hücreler arası kalsiyum bağımlı adezyonu sağlarken, sitoplazmik domainleri adezyon için gerekli yapısal ve sinyal iletimi aktivitelerine katılır (56).

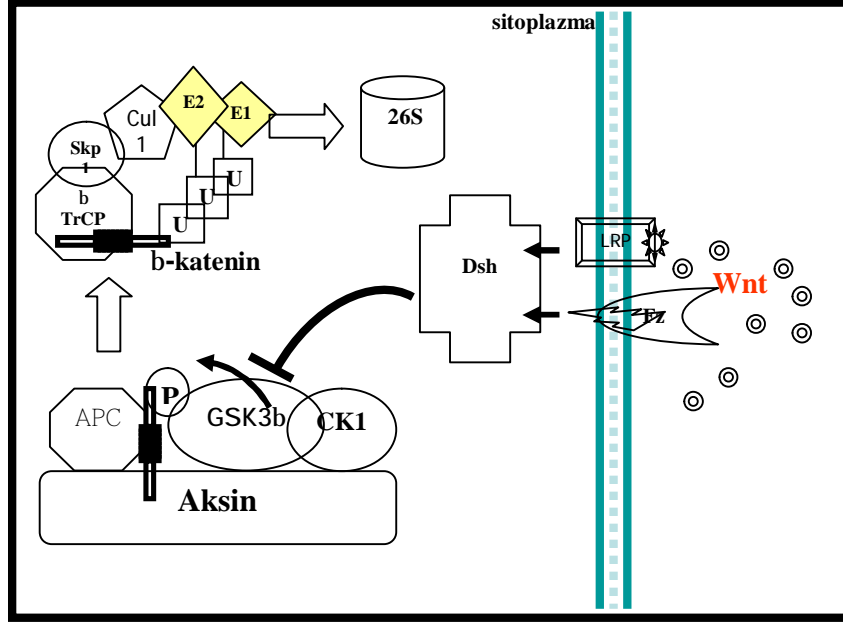


Şekil 12: Hücre-hücre adezyonunda b-kateninin rolü: β -katenin, kaderinin sitoplazmik domainine bağlanır ve α -katenin yoluyla hücre iskeleti elemanlarından aktin ile etkileşip adheren bağlantıların oluşmasını sağlar.

Alfa katenin, kaderin kompleksini aktine bağlayan “aktin bağlayıcı” bir proteindir (57). Alfa katenin, hücre-hücre adezyonunun önemli regülatörü olmasına rağmen β -katenin’in kaderine bağlanması adezyon için ilk koşuldur çünkü kaderin sitoplazmik domainini hızlı degradasyondan korur (57). Böylece, kaderin-katenin kompleksi bitişik hücrelerde moleküler köprüler kurulmasını sağlar (Şekil 12).

Kaderin ailesi reseptörlerini hücre iskeleti elemanlarından aktine bağlayan sitoplazmik plak proteini rolüne ek olarak β -katenin aynı zamanda Wnt sinyal yolağının bir bileşeni olarak nukleusta TCF/LEF ile beraber kotranskripsiyonel aktivatördür (58). β -katenin her hücre tipinde eksprese edilen bir protein olduğundan, β -kateninin transkripsiyondaki koaktivatör rolü önceleri ayrı ve ilişkisiz bir fonksiyonu olarak görüldü. Bu birbiri ile ilişkisiz gibi görünen fonksiyonlar aslında son derece düzgün bir şekilde koordine edilmiştir (59).

Sitoplazmada β -katenin APC ve aksin proteinlerine bağlanır. Bu bağlantıdan sonra GSK3 β ve kazein kinaz 1 (CK1) adlı kinazlar bu bölgeye toplanarak β -kateninin N-terminalinde serin ve treonin amino asitlerinden fosforile ederler. Böylece β -katenin poliubiquitinlenerek 26S proteasome tarafından degrade edilmek üzere işaretlenir (60) (Şekil 13).



Şekil 13: Wnt yoluğı ve b-katenin degradasyonuna etkisi (54).

β -kateninin sitoplazma havuzunun artışına yol açtığından farklı tümörlerin gelişiminde anahtar rol oynadığına inanılır (61). Hücrede β -kateninin; kaderinler, APC ve TCF gibi ilişkide bulunduğu proteinlerin hepsi “Armadillo tekrarları” adı verilen merkezi bölgesindeki kesişen dizilere bağlanır (62). Bu bölgeye bağlanacak proteinlerin arasındaki yarış β -kateninin oynadığı farklı roller arasındaki dengeyi bozarak hücrenin kaderini belirler (63). β -kateninin farklı proteinler ile olan etkileşimlerini kontrol eden moleküler mekanizmalarla ilgili yakın zamanda yapılan çalışmalarda Wnt ile muamele edilen hücrelerde β -katenin sitoplazmik havuzunun TCF ile bağlanma tercihinde olduğu gösterilmiştir. Wnt sinyalleri, aktin degradasyon kompleksini, transmembran protein Fz ve onun ko-reseptörü düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP5/6)’nın oluşturduğu reseptörler kompleksi yoluyla inhibe eder (64) (Şekil 13).

LRP5/6 ve Fz reseptörleri ile aktive edilen Dsh proteini ile beraber bir çok düzeyde aktin kompleksini antagonize edebilir. Aktive LRP aksine bağlanabilir ve scaffold kompleksini bozabilir (65). Ek olarak Dsh, GSK3 β aktivitesini inhibe ederek aktin fosforilasyonunu ve β -katenine bağlanmasını azaltır (66). Wnt etkisiyle aktin defosforilasyonu β -katenin düzeylerinin regüle edildiği en önemli basamaklardır.

C-terminalinde meydana gelen bir konformasyonel değişiklikle β -kateninin kaderine bağlanması azalır ve seçici olarak TCF’e bağlanır (67). Monomer halde TCF’e bağlanma ilgisi olan β -kateninin, α -katenin ile heterodimer halinde olması durumunda ise kaderin ile

kompleks yapar. Böylece, β -kateninin iki farklı moleküler formu adezyonda ve transkripsiyonda rol alır. β -kateninin bu fonksiyonlarının kontrolü normal hücre fonksiyonların sağlanması için son derece önemlidir. Aksine, bu sistemin kontrolünün kaybolması adezyon fonksiyonunu ortadan kaldırırken transkripsiyonel fonksiyonu artırır ve birçok malign tümör gelişir.

2.5.3. Wnt-b-katenin yolağının HCC ile ilişkisi

Wnt yolağı çoğu karsinogenez sürecinde önemli bir gelişimsel yolaktır (68). Embriyolarda doku gelişimini kontrol ederken, hücre proliferasyonu, hücrenin kaderi ve hücre ölümü ile yakından ilişkilidir. Wnt yolağının bozuk aktivasyonu kontrolsüz hücre proliferasyonuna ve kanser gelişiminin tetiklenmesine yol açar. Wnt yolağını etkileyen mutasyonların insan HCC'lerinde en sık rastlananlardan olup bu tümörlerin %26-40'ında bulunduğu bildirilmiştir. HCC'da β -katenin ve aksin'de mutasyonlar bulunduğu tarif edilmiştir (69). β -katenin aktive edici mutasyonları ana genetik olaylar olup β -kateninin degradasyonunu önlerken aksin1 gen mutasyonlarının daha nadir olduğu bildirilmiştir. β -kateninin degradasyonuna bağlı olarak Wnt yolağının aktivasyonunun bozulmasının göstergesi; non-tümöral hepatositler sadece kısıtlı bir membran boyanması gösterirken tümör hücresinde β -kateninin sitozolik ve/veya nükleer boyanmasıdır. β -katenin aktivasyonu gösteren HCC'lu olguların %90'ında β -katenin mutasyonu vardır (70). Bir tümör baskılayıcı gen olan aksin, Wnt yolağının negatif düzenleyicisidir ancak p53'ü pozitif yönde regüle eder (71). Aksin mutasyonları ise Wnt yolağında spesifik fakat zayıf bir aktivasyona neden olduğundan gerçek rolü daha tam olarak aydınlatılamamıştır ve araştırılması gerekmektedir.

Transmembran bir reseptör olan c-Met hücre yüzeyindeki diğer proteinlerle etkileşebilir. Birçok molekülün c-Met'in ortağı olduğu gösterilmiştir. İntegrin $\alpha6\beta4$, CD44, Fas ve EGFR ve ErbB2 gibi tirozin kinaz reseptörleri bunlardandır (72). İnsan HCC hücrelerinde c-Met reseptörünün G-protein ilişkili reseptörler ile de fosforile olabileceği gösterilmiştir (72). Tüm bu bilgiler ışığında, c-Met, MUC1, Wnt/ β -katenin yolaklarının etkileşerek hücre içi sinyal yolaklarını aktive edip HCC gelişiminde rol oynadığı düşünülebilir. Bu nedenle bu çalışmada önce farklı özelliklerdeki HCC hücre dizilerinde, normal karaciğer, siroz ve HCC'li hastalardan elde edilen dokularda MUC1 ve c-Met ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi hedeflendi. Bunun ardından MUC1 ile c-Met arasında

bir etkileşim olup olmadığı, varsa bu etkileşimin β -katenin-MUC1 etkileşimini ve β -katenin ekspresyonu/aktivasyonunu nasıl etkilediğinin saptanması yoluyla karaciğer kanseri gelişimindeki rollerinin ortaya konması amaçlandı.

3.GEREC VE YÖNTEM:

3.1. Hücre Dizileri

Çalışmada 8 HCC hücre dizisi; Huh7, Hep 3B, HepG2, Snu-449, Snu-475, Snu-398, Mahlavu ve SkHep1 Prof. Dr. M. Öztürk tarafından sağlandı. SNU-398, SNU-449 ve SNU-475 hücre dizileri, %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom, S0125), 2mM L-glutamin (Biological Industries, 03-020-1C), 10 mg/mL penisilin/streptomisin (Biological Industries, 03-031-1C) içeren RPMI-1640 (Biological Industries, 01-104-1A) içerisinde, diğer hücre dizileri ise aynı miktarlarda FBS, L-glutamine, penisilin ve streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biological Industries, 01-050-1A) içerisinde büyütüldü.

Musin ekspresyonu çalışmalarında pozitif kontrol olarak MUC1 eksprese edildiği bilinen ve arşivimizde bulunan MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizileri de aynı miktarlarda FBS, L-glutamine, penisilin ve streptomisin içeren DMEM içerisinde çoğaltıldı.

Hücrelerle ilgili tüm işlemler laminar kabinet (Aura Vertical S.D.4, C5681) içinde gerçekleştirildi. Hücrelerin inkübasyonu ise 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde (Heal Force, HF90) yapıldı.

3.2. RT PCR ile Hücre Dizilerinde MUC1 ve MUC 20 Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi:

3.2.1. Primer Tasarımı:

MUC1 ve MUC20 mRNA düzeylerini tespit etmek için gerekli primerlerin tasarımı için önce (www.ncbi.nih.gov) web adresinden MUC1 ve MUC20'nin DNA ve RNA dizileri elde edildi.

Tasarımı yapılacak primerlerin sadece MUC1 ve MUC20 mRNA'ları ile hibridize olmasını sağlamak için her iki musinin ekzonlarının birleşme bölgelerini içine alacak şekilde olması planlandı. Primer tasarımı için web ortamında bulunan "primer 3" programı kullanıldı.

Elde edilen primer çiftleri yine web ortamındaki “idtdna” programında analiz edildi. Analiz işleminde ayrıca primerlerin homo-dimer ve hetero-dimer analizleri yapıldı. Böylece, bir primerin kendi kendine veya diğer primer ile hibridize olmadığı tespit edildi.

Son olarak, elde edilen primerlerin MUC1 ve MUC20 dışında başka bir mRNA ile hibridizasyon ihtimalini ortaya koymak için (www.ncbi.nih.gov) web adresinde “BLAST” programı ile araştırma yapıldı. BLAST sonucuna göre primerlerin başka bir mRNA ile hibridize olmadıkları saptandı. Kullanılan primer dizileri aşağıdaki gibidir:

MUC1 İleri: 5'- AGACGTCAGCGTGAGTGATG -3'
Geri: 5'- ACCTTCTCATAGGGGCTACG -3'

MUC20 İleri: 5'-CATCACCCCGTCATGGTC-3'
Geri: 5'-CTCAACAGAGAGGGGCTGAGG-3'

3.2.2. Total RNA Eldesi:

HCC hücre dizilerinde MUC1, MUC20 ve c-Met genlerinin RNA düzeyindeki ekspresyonunun belirlenmesi için Trizol reaktifi (RNAtidy G, Applichem, A2867-0200) kullanıldı. RNA izolasyonu, standart koşullarda 10cm'lik hücre kültürü plaklarında (Greiner CellStar, 633 171) üretilen hücreler %70 yoğunlukta iken gerçekleştirildi. Fenol ve guanidine izotiyosiyanat'ın monofazik bir solusyonu olan Trizol muamelesini takiben kloroform eklenmesi ve santrifügasyon sonrasında bir aköz ve bir organik faz içeren solusyon elde edildi. RNA içeren aköz fazdan izopropil alkol ile çöktürülerek total RNA elde edildi.

Yöntem aşağıdaki şekilde uygulandı:

1. %70 yoğunluktaki hücre kültürleri inkübatörden çıkarılarak buz üzerine kondu.
2. Ortam dökülerek soğuk Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) (Ek:1) ile 2-3 kez yıkandıktan sonra PBS tamamıyla uzaklaştırıldı.
3. 10 cm'lik plate için 1.5mL trizol reaktifi eklenerek plate hücre kazıyıcı ile kazındı.
4. Lizat 2mL'lik soğuk eppendorf tüpe konarak birkaç kez pipetlendi.
5. Üzerine 200µL kloroform (Sigma, C-2432) eklendikten sonra birkaç kez yavaşça alt-üst edildikten sonra buza gömüldü ve 15 dk beklendi.

6. 12.000 rpm'de 15 dk santrifüj (Eppendorf Centrifuge, 5415R) edildikten sonra; en altta protein, ortada DNA ve en üstte RNA'dan meydana gelen solüsyon elde edildi.
7. Süpernatant (takriben 750µL) 1.5mL'lik eppendorf tüpe alındı.
8. Aynı miktarda izopropanol (Appllichem, A3928) eklenerek -20°C 'ye kaldırıldı.
9. Bir gecelik bekletme sonrası +4 derecede 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.
10. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüpün dibinde bulunan RNA pelletinin üzerine 1mL %75'lik etanol (Appllichem, A3678) eklenerek iki kez yıkama yapıldı ve son yıkamadan sonra çöktürülen RNA pelleti etanolün uzaklaşması için oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
11. Üzerine 50µL RNase içermeyen distile su ilave edildi. 60°C'de 15 dk bekletildikten sonra (-) 80°C'de saklandı.

3.2.3. RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzole edilen her bir RNA örneğinden 10µl alındı ve 990µl 10mM Tris (pH 7.0) (Ek:1) çözültisi içinde 1:100 oranında dilüsyonu yapıldı. Bu dilüsyonların 260 ve 280nm'de spektrofotometrik absorpsiyonları ölçüldü (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000). RNA miktarlarının belirlenmesi için 260nm'deki absorpsiyon değeri kullanıldı, kontamine protein miktarının belirlenmesi için de 280nm'deki absorpsiyon değeri kullanıldı (Ek:2-Tablo 1).

3.2.4. cDNA Eldesi:

HCC hücre dizilerinden elde edilen RNA'ların cDNA'ya çevrilmesi için MBI Fermentas (K1622) First Strand cDNA Sentez kiti kullanıldı. Her bir cDNA eldesi için 2µgr RNA kullanıldı. cDNA eldesi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. RNA (2µgr) + oligo d(T) + dH₂O toplam 12µL olacak şekilde bir eppendorf tüpe kondu.
2. 70°C'de 5dk termal döngüleyici (Techne TC-312) içerisinde inkübe edildi (MRTcDNA1 programı).
3. Her bir örneğe 4µL reaksiyon tamponu (5X), 1µL ribonükleaz inhibitörü, 2µL 10mM dNTP (0.5mM) eklendi.
4. 37°C'de 5 dk inkübe edildi (MRTcDNA2 programı).

5. Her örneğe 200 U Reverse transkriptaz eklendi.
6. 42°C'de 60 dk, 70°C'de 10 dk inkübe edildi (MRTcDNA3 programı).
7. Elde edilen cDNA -20°C'de saklandı.

3.3. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

3.3.1. Gliseraldehit 3Fosfat Dehidrojenaz Primerleri ile RT-PCR:

Kontrol olarak Gliseraldehit 3Fosfat Dehidrojenaz (G3PD) geni kullanıldı. Her örnek

İleri: 5'-GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT-3'

Geri: 5'-CAGCCTTCTCATGGTGGTGGTGAAGA-3'

primerleri kullanılarak Tm=53°C, 28 döngü ile amplifiye edildi.

3.3.2. MUC1 Geninin RT-PCR İle İncelenmesi

Yapılan optimizasyonlar sonucunda, MUC1 geninin RT-PCR ile incelenmesi için 10'ar pmol ileri ve geri primer, 2.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 1.25U Taq polimeraz kullanıldı. Karışım 95°C'de 5dk denatüre edildikten sonra 30sn denatürasyon, 56°C'de 30sn bağlanma, 72°C'de 30sn uzama ve 72°C'de 7dk son uzama aşamalarını içeren 28 döngü ile PCR gerçekleştirildi.

3.3.3. MUC20 Geninin RT-PCR İle İncelenmesi

Optimizasyon çalışmaları sonunda MUC20 geninin RT-PCR ile incelenmesi için 10'ar pmol ileri ve geri primer, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 1.25U Taq polimeraz kullanıldı. 95°C'de 7dk'lık denatürasyon aşamasının 5. dksında Taq polimeraz eklenerek Hot start PCR yapıldı. İlk denatürasyondan sonra 95°C'de 45sn denatürasyon, 56°C'de 45sn bağlanma, 72°C'de 60sn uzama ve 72°C'de 10dk son uzama aşamalarını içeren 33 döngü ile PCR gerçekleştirildi.

3.4. Western Blot:

3.4.1. Hücrelerden Total Protein İzolasyonu

10 cm'lik hücre kültürü kaplarında %70 yoğunluğa erişene kadar büyütülen hücreler buz üzerine alınarak 2-3 kez soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler 1mL soğuk PBS içerisinde hücre kazıyıcı ile kazındı ve 1.5mL'lik soğuk eppendorf tüpler içerisine alındı. Hücreleri çöktürmek için 2500 rpm'de 5 dk santrifügasyon yapıldı (Eppendorf Centrifuge, 5415R). Süpernatant 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 içinde hücrelerin parçalanması için 3-4 dakikada bir vortekslenerek 20 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda tüpler 13200 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Proteinleri içeren süpernatant yeni bir soğuk eppendorf tüpe alındı ve protein miktarının belirlenmesi aşamasına geçildi.

3.4.2. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini için Pierce BCA Protein Assay kiti (Pierce, 23225) kullanıldı. Standart eğri grafiğinin çizilebilmesi için 0, 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 µg bovine serum albumin (BSA) (Pierce, 23209) 1mL reaktif ile spektrofotometre küvetleri (Brand, 759220) içerisinde birleştirilerek indirgenme tepkimesinin oluşması için 42°C'de 5 dk inkübe edildi. Aynı zamanda hücre dizilerinden elde edilen proteinlerden 10µL BCA reaktifi ile karıştırılıp aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 562nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. BSA konsantrasyonlarına bağlı olarak çıkan absorbans değerleri ile standart eğri çizildi. Elde edilen standart eğriye göre örneklerin protein konsantrasyonları ve western blot esnasında ne kadar örnek kullanılacağı tespit edildi.

3.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)

MUC1 190-240 kDa arasında bir protein olduğundan, ayrılması için %10'luk, c-Met ise 140 kDa'luk bir protein olduğundan %8'lik "resolving" poliakrilamid jel ile %5'lik "stacking" jel hazırlandı. Jellerin kalınlığı 1.5 mm idi ve bileşimleri aşağıdaki gibiydi.

	Resolving jel (10mL için)		Stacking jel (5mL için)
	%10'luk (mL)	%8'lik (mL)	%5'lik (mL)
dH ₂ O	4	4.6	3.4
%30 akrilamid	3.3	2.6	0.83
1.5M Tris (pH=8.8)	2.5	2.5	0.63 (1M Tris-Cl, pH 6.8)
%10 SDS	0.1	0.1	0.05
%10 APS*	0.1	0.1	0.05
TEMED	0.004	0.004	0.005

*APS (=Amonyum peroxodisulphate, H₈N₂O₈S₂) (Fluka, Biochemica, 09913) %10'luk APS taze olarak hazırlandı.

Her bir örnekten 50 µg total protein eppendorf tüpler içine alındı ve proteinlerin denaturasyonu için %10 oranında β-merkaptotanol (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) içine Tris-Glisin elektroforez tamponu ("running buffer", 25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0.1 SDS) eklendi ve jeller uygun olarak yerleştirildikten sonra örnekler kuyucuklara yüklendi. Aynı zamanda protein göçünü izleyebilecek nitelikteki markerlardan da (MBI Fermentas, SM0671) 7'şer µL yüklendi ve 70 V'luk gerilim uygulanarak 30 dk örneklerin stacking jeli geçmesi bekledi. Daha sonra 110 V'luk gerilim uygulanarak marker bantları açılana kadar proteinler yürütüldü.

3.4.4. Proteinlerin Poliviniliden Diflorid (PVDF) Membranlara Transferi

Membrana transfer için ıslak transfer sistemi kullanıldı. Elektroforez işlemi bittikten sonra jeller cam aparatlardan çıkartılarak Tris-Glisin transfer tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0.02 SDS, %20 metanol) içine alındı. PVDF membran (Millipore, IPVH15150) 15-20 sn metanol içerisinde bekletilerek porlarının açılması sağlandıktan sonra transfer tamponu içine alındı. Hazırlanan transfer kaseti içine sırasıyla; sünger, "Whatmann" kağıdı, jel, PVDF membran, "Whatmann" kağıdı ve sünger olacak şekilde yerleştirildi. Kaset kapatıldıktan sonra transfer tankının içerisine yerleştirildi. 300 mA'lık akımda 1.5 saat transferde tutulduktan işlem tamamlandı. Çıkartılan membran bloklama solüsyonu (MUC1 için %3 süt

tozu (NFDM) içeren TBS-Tween, c-Met için %5 BSA içeren PBS-NP40) içerisine alınarak oda sıcaklığında 70rpm'de karıştırılarak 1 saat bloklamaya bırakıldı.

3.4.5. Primer ve Sekonder Antikor İşlemleri

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonrasında optimum primer ve sekonder antikor konsantrasyonları ile bloklama koşulları belirlendi. Bloklama sonrası membranlar aşağıdaki konsantrasyonlarda primer antikor ile muamele edildi.

Antikor (Ak)	Konsantrasyon	Ajan	Solüsyon
Anti-MUC1 (Santa Cruz, sc-7313)	1:500	%5 NFDM	TBS-T
Anti-c-Met (Santa Cruz, sc-161)	1:2000	%0.1 BSA	PBS-NP40

MUC1 ve c-Met membranları primer antikorda +4 °C'de bir gece inkübe edildi. Primer antikor inkübasyonları bittikten sonra membranlar 5'er dk 2 kez uygun tamponlarla (MUC1 için TBS-T, c-Met için PBS-NP40) yıkanıp bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Daha sonra sekonder antikor dilüsyonları aşağıdaki gibi hazırlandı.

Antikor	Konsantrasyon	Ajan	Solüsyon
Anti-mouse IgG (Pierce, 1858413) (MUC1)	1:5000	%5 NFDM	TBS-T
Anti-rabbit IgG (Pierce, 1848415) (c-Met)	1:5000	%0.1 BSA	PBS-NP40

MUC1 ve c-Met membranları oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bağlanmayan sekonder antikorların uzaklaştırılması için uygun tamponlarla (MUC1 için TBS-T, c-Met için PBS-NP40) 10'ar dk 6 kez tamponlar değiştirilerek yıkama yapıldı.

3.4.6. Proteinlerin Membran Üzerinde Tespiti

Yıkama işlemi bitince distile su ile yıkanan membran, hazırlanan ECL solusyonu (Pierce, Prod no: 34075, Lot no: HL106611, Super signal, west dura extended duration substrat) ile muamele edildi. Membran bir film kaseti içine alındıktan sonra üzerine kemilüminesansa duyarlı film (Kodak, 5256441) konup yeterli süre beklendi ve film banyo edilerek protein bantları görüntüldü.

3.4.7. Kantitasyon

Her membran kalneksin antikoru ile de muamele edilerek relatif kantitasyon yapıldı. Elde edilen bantlar taranarak bantların yoğunluğu belirlendi ve kalneksine göre ekspresyon miktarları tespit edildi.

3.5. İmmunopresipitasyon

MUC1-c-Met ve MUC1- β -katenin arasında bir ilişki olup olmadığı ve bu ilişkinin HGF indüksiyonuyla nasıl değiştiğini belirlemek için immunopresipitasyon deneyi yapıldı. 10 cm'lik hücre kültürü kaplarında büyütülen Mahlavu hücreleri %70 yoğunlukta olduğunda, %1 serum içeren ortamla bir gece inkübe edildi. 40ng/mL konsantrasyonda HGF'in 1:100'lük dilüsyonundan hücrelere eklendi ve 15, 30 ve 60 dk'lık HGF indüksiyonu yapıldı. İmmunopresipitasyon aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

1. Hücreler buz üzerine konarak üzerindeki ortam çekildi.
2. Soğuk PBS ile (Na_3VO_4 inhibitörlü) 3 kere yıkama yapıldı ve en son yıkamada dipte kalan tüm PBS çekildi.
3. 1mL soğuk PBS eklenerek hücreler kazındı ve elde edilen lizat 1.5 mL'lik soğuk eppendorf tüpe alındı.
4. 1000g de 5 dk. +4°C'de santrifüj ederek hücreler çöktürüldü.
5. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet miktarının 3 katı oranında lizis tamponu (50 mM Tris-Cl pH:7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA pH:8.0, %1 NP-40, 1 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, 1 μ g/mL pepstatin, 1mM PMSF, 1mM NaF, 1mM Na_3VO_4) eklendi, 30 dk buz içinde bekletildi. Bekleme süresince 2-3 dk'da bir vorteks yapıldı.
6. 20-30 dk 15000g devirde santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant yeni bir eppendorf tüpüne alındı ve protein miktar tayini yapılana kadar buz içinde bekletildi.
7. BCA protein assay ile örneklerdeki protein miktarı belirlendi. Toplam tüp içeriği 300 μ L olacak şekilde ilk önce 1 mg protein, sonra gerekli miktarda lizis tamponu, en son olarak da 4 μ g antikor kilitli kapaklı eppendorf tüpüne eklendikten sonra +4°C soğuk odada ya da buz içinde, karıştırmadan 1-2 saat inkübe edildi. Ayrıca, diğer

- bileşenleri örnek tüpleri ile aynı olan ancak protein içermeyen bir tüp negatif kontrol olarak kullanıldı.
8. Bu arada IgG bağlı protein-G sefaroze bilyeler (Amersham, 17-0886-02) yıkanarak hazırlandı (bilye miktarı IP yapılacak örnek başına 30µL olacak şekilde ayarlandı).
 9. Soğuk eppendorf içine 500µL IgG-bağlı protein-G sefaroze alındı ve 2000 rpm'de 1 dk +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatandaki etanol lizis tamponu eklenip santrifüj yapılarak uzaklaştırıldı.
 10. Santrifüj sonrası bilye (pellet) miktarı kadar (IP yapacak örnek miktarına bağlı yaklaşık 300-350µL) lizis tamponu ekleyip buz üstünde alt üst edilerek karıştırıldı.
 11. Antikorla muamele edilen her bir örneğe yaklaşık 30-40µL gamma-bilye solüsyonundan eklendi.
 12. Örnekler parafilmle kapatılıp 1 saat +4°C'de inkübe edildikten sonra 2000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
 13. Süpernatant bilyelere dokunmadan alındı ve üstüne 850µL lizis tamponu ekleyerek toplam hacim 1 mL'ye tamamlandı, 2000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
 14. Tüm inhibitörlerin 1:10 oranında olduğu 1mL'lik yıkama tamponu ile toplam 5 defa yıkandıktan sonra süpernatant alındı ve örnekler pellet miktarı kadar yükleme tamponu eklenerek 95°C'de 5 dk kaynatıldı.
 15. Örnekler jelle yüklenerek elektroforez işlemi uygulandı.
 16. Elektroforez sonrası PVDF membrana aktarılan proteinler primer ve sekonder antikor muamelelerinden sonra elektrokemilüminesans ile belirlendi.

3.6. İmmunohistokimya

Prof. Dr. Sedat Karademir tarafından takip edilen ve patolojik değerlendirmesi Prof. Dr. Özgül Sağol tarafından yapılan, prognostik verileri bilinen, bilgilendirilmiş onam formu olan HCC tanısı almış 42 olguya ait parafine gömülmüş arşiv materyali ile 26 sirotik doku da çalışmaya dahil edildi. Normal dokulardan MUC1 boyaması için DETF patoloji arşivinde bulunan 18 normal karaciğer dokusu kullanılırken c-Met boyaması için EÜTF patoloji arşivindeki 14 donör normal karaciğer doku örneği kullanıldı. Her olgu tekrar değerlendirilerek, makroskobik ve mikroskobik bulgular yeniden gözden geçirildi.

İmmunohistokimya boyamalarında aşağıdaki protokol uygulandı:

1. Doku kesitleri 5 dk ksilende bekletilerek de-parafinize edildi. Bu işlem iki kere tekrarlandı.
2. Kesitler iki kez %100'lük etanol ile 3 dk inkübe edildi, ardından sırasıyla %95 ve %80'lik etanol muameleleri ile 1'er dk hidrate edildi.
3. Kesitlerin üzeri proteinaz K solüsyonu (pH 8.0'lik TE-tamponu içerisinde 20 µg/mL oranında Proteinaz K) ile kaplanarak nemli bir ortamda 15 dk 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
4. Kesitler PBS ile 2 dk, 2 kez yıkandı.
5. %1.5'luk serum ile 30 dk bloklama yapıldı.
6. Kesitler primer antikor dilüsyonları ile (MUC1 için 1:100, c-Met için 1:100) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
7. Kesitler PBS ile 2 dk, 2 kez yıkandı.
8. Örnekler peroksidaz bloklama solüsyonu ile 10 dk muamele edildi.
9. PBS ile 3x2 dk yıkama yapıldı.
10. ScyTek monovalent boyama kiti ile boyamalar yapıldı.

Boyanma olmayan örnekler negatif, %20'ye kadar olan boyanmalar 1(+), %20-50 arası olan boyanmalar 2(+), %50'nin üzeri boyanmalar 3(+) olarak değerlendirildi.

3.7. Etik Kurul Onayı

Çalışmanın tamamı için 209/2006 protokol numarası ile DEÜTF Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu'ndan onay alındı.

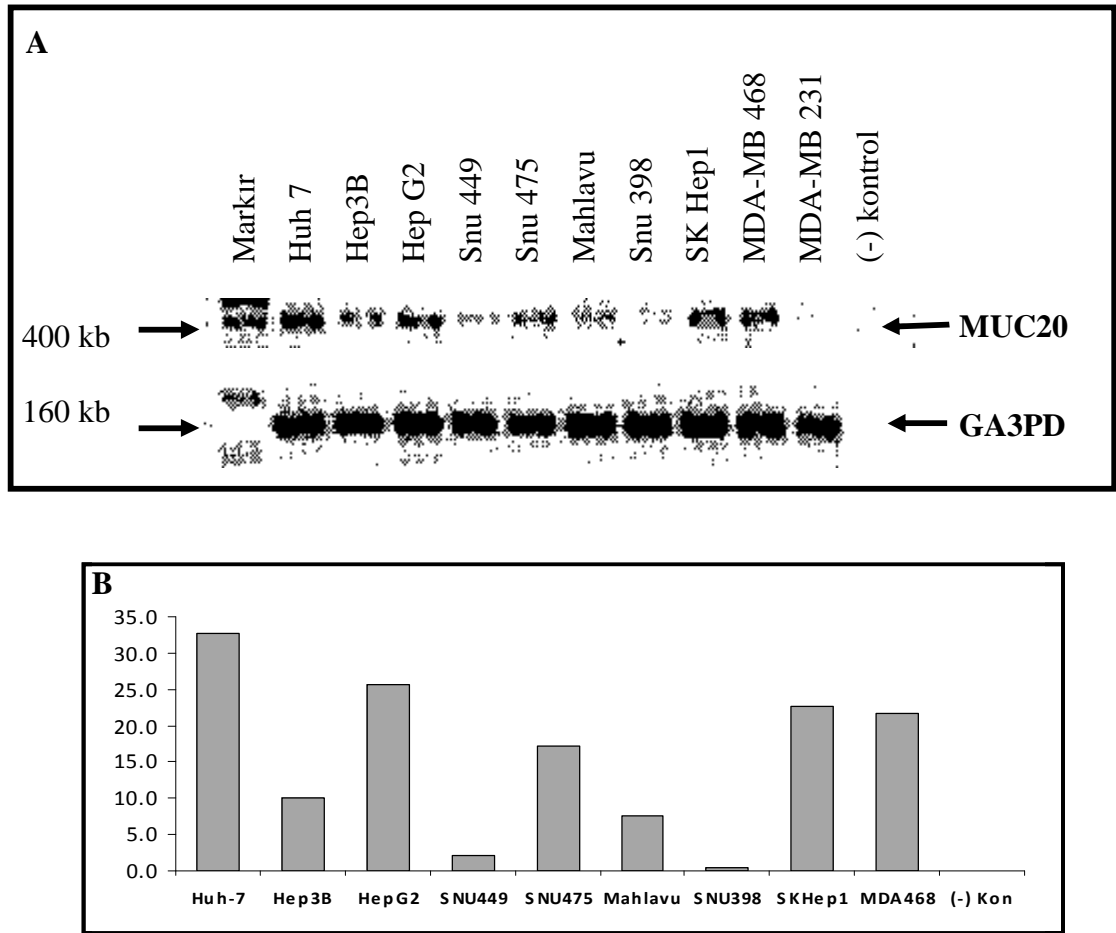
3.8. İstatistik Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesi için SPSS 15.0 istatistik programında anlamlılık testleri için ki-kare analizi ve değişkenler arası ilişkilerin tespitinde Pearson ve Spearman korelasyon analizleri kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. HCC Hücre Dizilerinde MUC20 Ekspresyonları

HCC hücre dizilerinden Huh-7, Hep3B, HepG2, Snu-449, Snu-475, Mahlavu, Snu-398, SK-Hep1, MDA-MB 468 ve MDA-MB 231’de MUC20 ekspresyonları RT-PCR ile incelendi. Bu hücrelerden Snu-449 ve Snu-398’de RNA düzeyinde MUC20 mRNA düzeylerinin çok düşük olduğu görüldü. Diğer HCC hücrelerinde farklı düzeylerde MUC20 mRNA’sı saptandı (Şekil 14).

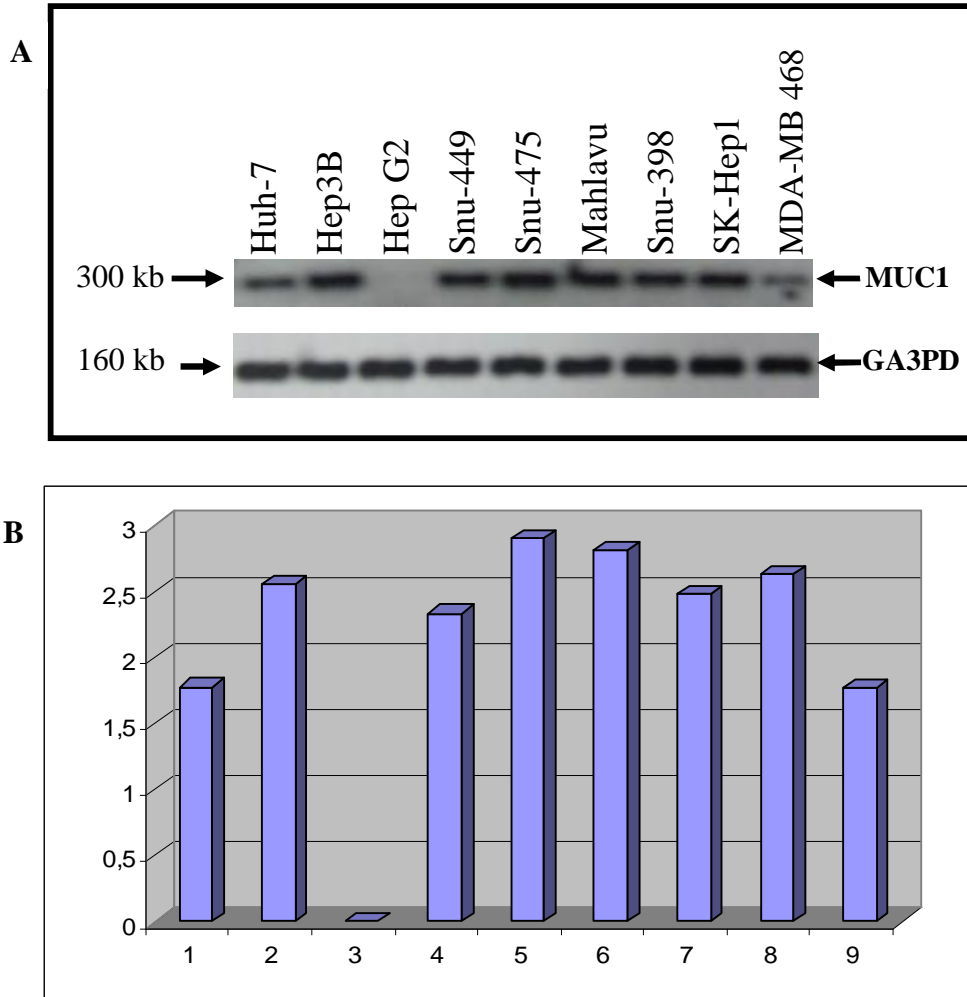


Şekil 14: HCC hücre dizilerinde mRNA düzeyindeki MUC20 ekspresyonları. A: RT PCR görüntüsü, B: GA3PD ile oranlanarak elde edilen densitometrik analiz sonuçları

MUC20 ticari antikorunun bulunmaması ve başka kaynaklardan sağlanma girişimlerinin olumsuz sonuçlanması nedeniyle çalışmamızın bundan sonraki bölümüne MUC1 üzerinden devam edildi.

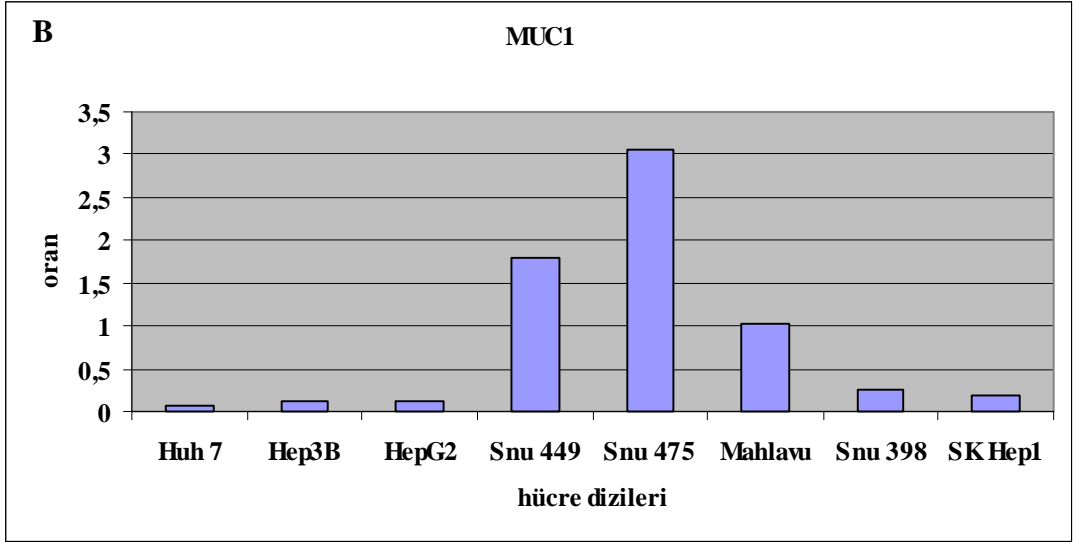
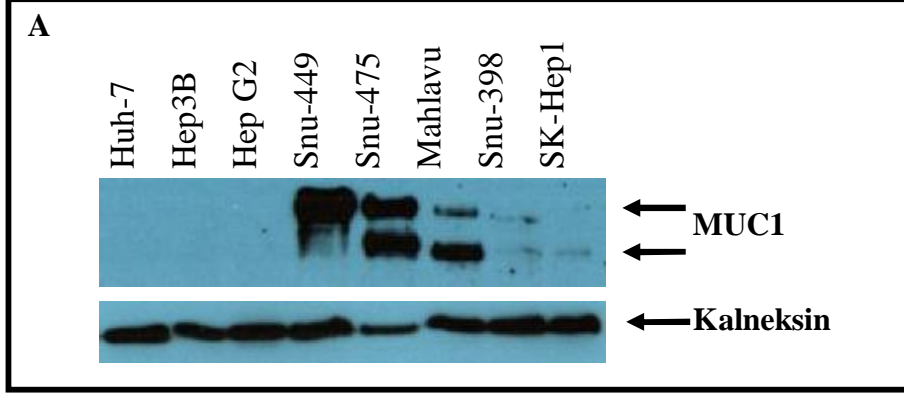
4.2. HCC Hücre Dizilerinde MUC1 Ekspresyonları

HCC hücre dizilerinden Huh-7, Hep3B, HepG2, Snu-449, Snu-475, Mahlavu, Snu-398, SK-Hep1, ve MDA-MB 468’de MUC1 ekspresyonları hem RNA transkripti düzeyinde, hem de protein ürünü düzeyinde RT-PCR ve western-blot ile incelendi. Bu hücrelerden HepG2’de RNA düzeyinde MUC1 ekspresyonu görülmezken diğer hücre dizilerinin tamamında farklı düzeylerde MUC1 mRNA’sı varlığı saptandı (Şekil 15).



Şekil 15: HCC hücre dizilerinde mRNA düzeyindeki MUC1 ekspresyonları: A: RT PCR görüntüsü, B: GA3PD ile oranlanarak elde edilen densitometrik analiz

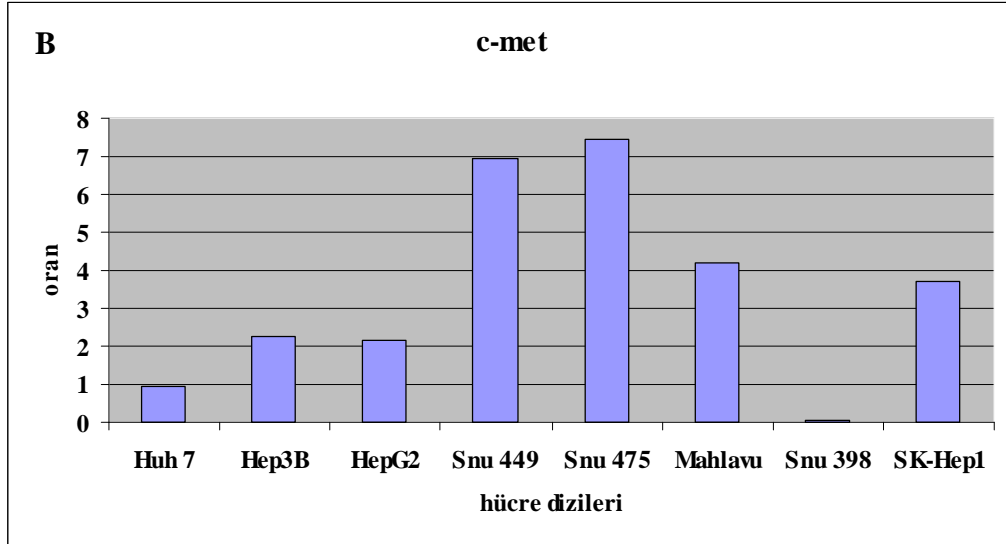
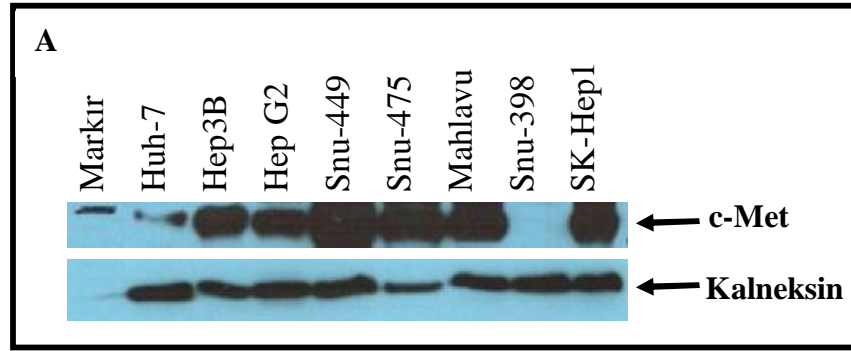
Bu hücre dizilerinde MUC1 protein düzeyinin belirlenmesi amacı ile western blot yapıldı. En fazla MUC1 eksprese eden hücre dizisinin Snu-475 olduğu belirlendi. Daha sonra sırasıyla Snu 449, Mahlavu, Snu-398 ve SK Hep1 hücre dizilerinde protein düzeyinde MUC1 ekspresyonu bulunduğu saptandı (Şekil 16).



Şekil 16: HCC hücre dizilerinde protein düzeyindeki MUC1 ekspresyonları: A: western blot görüntüsü, B: kalneksin ile oranlanarak elde edilen dansitometrik analiz

4.3. HCC Hücre Dizilerinde c-Met Ekspresyonları

Projemizde MUC1-c-Met etkileşiminin HCC gelişimi ve ilerleyişindeki rolünü tanımlamayı hedeflediğimiz için önce MUC1 ekspresyonunu incelediğimiz tüm HCC hücre dizilerinde c-Met ekspresyon düzeyi western blot ile analiz edildi. Bu hücrelerden en fazla Snu-475 hücre dizisinde olmak üzere sırasıyla Snu 449, Mahlavu, SK-Hep1, Hep3B, HepG2 ve Huh-7 hücre hatlarında protein düzeyinde c-Met ekspresyonu bulunduğu saptandı. Snu-398 hücre dizisinin c-Met eksprese etmediği gözlemlendi (Şekil 17).



Şekil 17: HCC hücre dizilerinde protein düzeyindeki c-Met ekspresyonları:
A: western blot görüntüsü, **B:** kalneksin ile oranlanarak elde edilen dansitometrik analiz

MUC1 ekspresyonu olan HCC hücreleri literatürde var olan diferansiyasyon özellikleri ve fenotiplerine, ayrıca E-kaderin ekspresyon düzeylerine göre gruplandırıldığında; MUC1 ekspresyonu olmayan, c-Met ekspresyonu olmayan veya düşük olan HCC hücrelerinin iyi diferansiye ve epitelyal fenotipte oldukları, MUC1 ve c-Met ekspresyonu yüksek olanların ise kötü diferansiye ve mezenşimal fenotipli oldukları ve E-kaderin eksprese etmedikleri buna karşın vimentin eksprese ettikleri saptanmıştır (73) (Şekil 16) (Tablo 2).

Tablo 2: HCC hücrelerinin E-kadherin, MUC1 ve c-Met ekspresyon düzeyleri ile hücre fenotipi arasındaki ilişki.

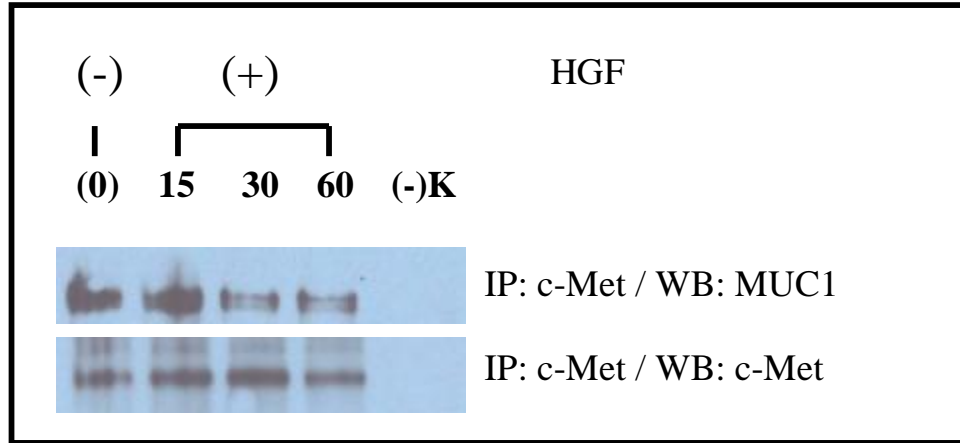
Hücre dizisi	Diferansiyasyon	Fenotip	E-kaderin*	Vimentin*	MUC1	c-Met
Huh7	İyi	Epitelyal	+	-	-	↓
HepG2	İyi	Epitelyal	+	-	-	↓
Hep3B	İyi	Epitelyal	+	-	-	↓
Snu-398	Kötü	Mezenşimal	-	+	+	-
Snu-449	Kötü	Mezenşimal	-	+	+	↑
Snu-475	Kötü	Mezenşimal	-	+	+	↑
Mahlavu	Kötü	Mezenşimal	-	+	+	↑
SK-Hep1	Kötü	Mezenşimal	-	+	+	↑

* Çokaklı M, Özen E, Erdal E, Atabey N (yayınlanmamış veri) ve Fuchs BC ve ark (73).

Bununla paralel olarak SK-Hep1 hücre dizisi dışındaki HCC hücrelerinde c-Met ekspresyon profilinin de MUC1'dekine benzer olarak hücrelerin diferansiyasyon özellikleri ile ilişkili olduğu; iyi diferansiye hücrelerde düşük, kötü diferansiye hücrelerde yüksek olduğu belirlendi (Tablo 2).

4.4. HCC Hücre Dizilerinde MUC1-c-Met İlişkinin İmmunopresipitasyon İle Gösterilmesi

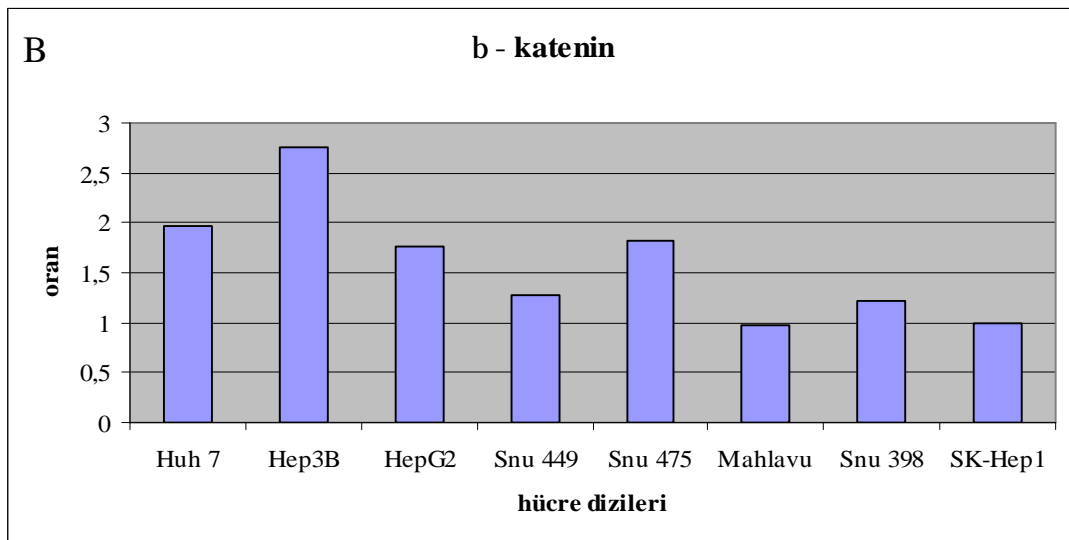
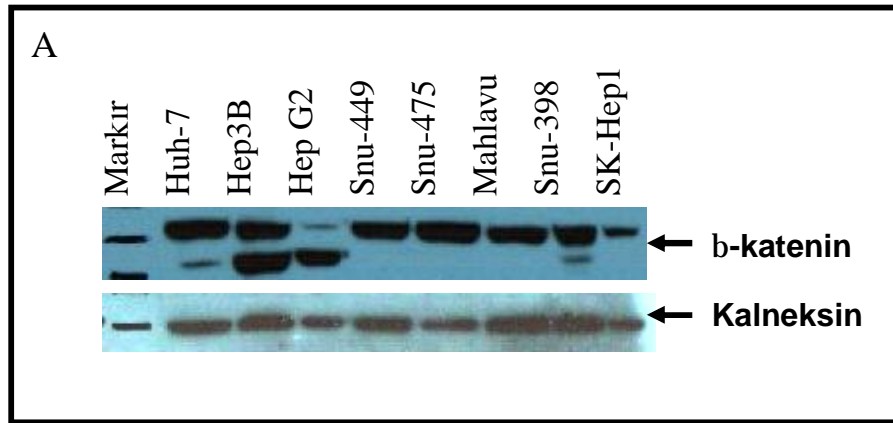
HCC hücre dizilerinde yapılan western blot analizleri ile MUC1 ve c-Met ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon gözlenmesi üzerine hem MUC1 hem de c-Met ekspresyonu pozitif olan Mahlavu hücre dizisi ile yapılan immünopresipitasyon deneylerinde, MUC1 ve c-Met arasında fiziksel bir etkileşim olup olmadığı ve HGF uyarımının bu etkileşimdeki rolü araştırıldı. Şekil 19’da görüldüğü gibi Mahlavu hücrelerinde c-Met ile MUC1 arasında bazal koşullarda fiziksel bir etkileşim olduğu saptandı. HGF’in 40ng/mL konsantrasyonundaki uyarımının c-Met/MUC1 etkileşimini zamana bağlı olarak azalttığı, 30. dakikadan sonra etkileşimin bazal düzeyin altına düştüğü belirlendi (Şekil 18).



Şekil 18: Mahlavu hücre dizilerinin HGF ile uyarılması ile c-Met’e bağlanan MUC1 miktarının immünopresipitasyon ile gösterilmesi. [HGF uyarımı 15, 30 ve 60dk süreyle yapıldı. (-)K: Negatif kontrol].

4.5. HCC Hücre Dizilerinde b-katenin Ekspresyonları

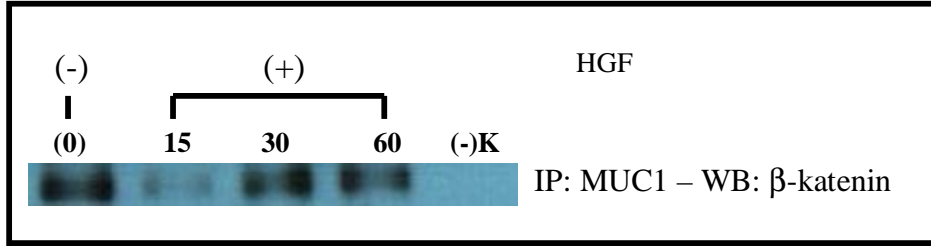
Çalışmanın bundan sonraki bölümünde, saptadığımız c-Met-MUC1 arasındaki fiziksel etkileşimin MUC1 aracılıklı sinyal iletiminde rol oynayıp oynamadığı incelendi. Bu amaçla MUC1'in sitoplazmik kuyruğunda β -katenin bağlanma motifi olması nedeniyle aday molekül olarak β -katenin seçildi. Öncelikle çalışmaya dahil edilen HCC hücre dizilerindeki bazal β -katenin ekspresyon düzeyleri western blot ile değerlendirildi. Bu hücrelerden β -katenin ekspresyonu en yüksek olanların Hep3B, Huh-7 ve HepG2 olması MUC1 ve c-Met ekspresyon profili ile β -katenin ekspresyon profilinin Snu-475 hücre dizisi dışında negatif korelasyon göstermesi nedeniyle MUC1 c-Met etkileşiminin β -katenin MUC1 etkileşimini değiştirebileceği düşünüldü (Şekil 19).



Şekil 19: HCC hücre dizilerinde protein düzeyindeki b-katenin ekspresyonları: A: western blot görüntüsü, B: kalneksin ile oranlanarak elde edilen dansitometrik analiz

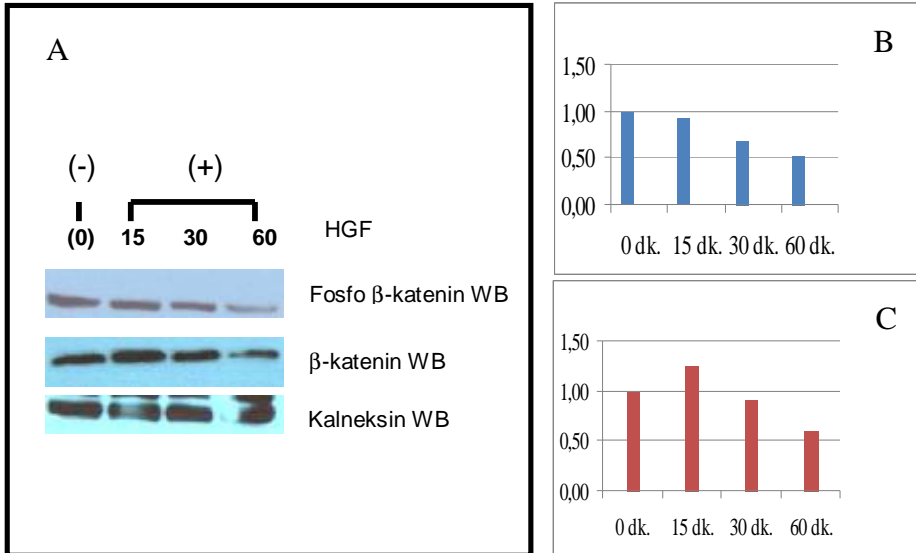
4.6. Mahlavu Hücre Dizisinde MUC1- b-katenin Arasında Fiziksel Etkileşim Olup Olmadığının ve Varsa Bu Etkileşime HGF'in Etkisinin Gösterilmesi

Mahlavu hücre dizisi ile yapılan immunopresipitasyon çalışması sonrasında MUC1 ile β -katenin arasında bazal koşullarda bir etkileşim olduğu, HGF uyarımının bu etkileşimi zamana bağlı olarak azalttığı belirlendi (Şekil 20).



Şekil 20: Mahlavu hücre dizilerinin HGF ile uyarılmasının MUC1 b-katenin etkileşimine etkisi.

HGF uyarımından sonraki MUC1-c-Met etkileşimindeki azalmanın MUC1- β -katenin bağlantısının azalmasına yol açtığı düşünüldü. HGF uyarımı sonrası MUC1'den ayrılan β -katenin miktarında değişim olup olmadığını belirlemek için yapılan western blot çalışmasında β -katenin miktarının da zamana bağlı olarak azaldığı saptandı (Şekil 21).



Şekil 21: Mahlavu hücre dizilerinin HGF ile uyarılmasının b-katenin ekspresyonuna etkisi. A: western blot görüntüsü, **B:** Fosfo β -katenin'in (S552) kalneksin ile oranlanarak elde edilen dansitometrik analizi ve **C:** β -katenin'in kalneksin ile oranlanarak elde edilen dansitometrik analizleri

β -katenin fosforilasyonunun β -katenin aktivasyonundaki önemi nedeniyle HGF uyarımının β -katenin S552 fosforilasyonuna etkisi incelendi. HGF uyarımının total hücre lizatındaki fosforile β -katenin düzeyini azalttığı saptandı (Şekil 21).

Verilerimiz, MUC1 ekspresyonu olmayan, c-Met ekspresyonu düşük ve β -katenin ekspresyonu yüksek HCC hücrelerinin Huh-7, Hep3B, ve HepG2 olduğunu, MUC1 ile c-Met ve MUC1 ile β -katenin arasında fiziksel bir etkileşim olduğunu, bu etkileşimin HGF varlığında azaldığını ve HGF uyarımının MUC1 ile β -katenin arasındaki fiziksel etkileşimi, total hücre lizatındaki β -katenin miktarını ve S552 fosfo β -katenin miktarını azalttığını göstermiştir.

HCC hücre dizilerinden elde edilen MUC1 ve c-Met ekspresyon değişimlerinin hepatokarsinogenez sürecinde rol oynayıp oynamadığını ve MUC1 ile c-Met ekspresyonu arasında bir korelasyon olup olmadığını belirlemek için parafine gömülü normal karaciğer, siroz ve HCC dokularında MUC1 ve c-Met ekspresyonları immunohistokimyasal analizler ile incelendi.

4.7. Patoloji Arşivindeki HCC, Siroz ve Normal Dokularda MUC1 ve c-Met Ekspresyonlarının İmmunohistokimya Yöntemi ile Belirlenmesi

Patoloji arşivinde bulunan 42 HCC, 26 siroz ve 18 normal karaciğer dokusunda MUC1 ve c-Met ekspresyonları immunohistokimya yöntemi ile belirlendi. Yaşları 37-64 arası değişen (ortalama \pm st.sapma: 53.7 \pm 6.3) 38 (%91) erkek ve 4 (%9) kadın hastaya ait klinik ve patolojik veriler Tablo 3'de görülmektedir. HCC gelişiminde viral nedenlerin büyük bir çoğunluğu oluşturduğu 39 (%93), alkole bağlı gelişen HCC sayısının düşük 3 (%7) olduğu belirlendi. Tümörün boyutuna göre yapılan sınıflamada 34 (%81) HCC örneğinin beş cm'den küçük olduğu ve 31 (%74) vakada nodül sayısının üçten az olduğu saptandı. İyi diferansiye 7 (%17), orta diferansiye 29 (%69) ve kötü diferansiye 6 (%14) HCC örneği bulunduğu görüldü. Yirmialtı siroz örneğinden; 16'sının (%61) etkeninin viral, 3 (%12) örneğin alkol, geri kalan 7 (%27) örneğin diğer etyolojiler olduğu belirlendi.

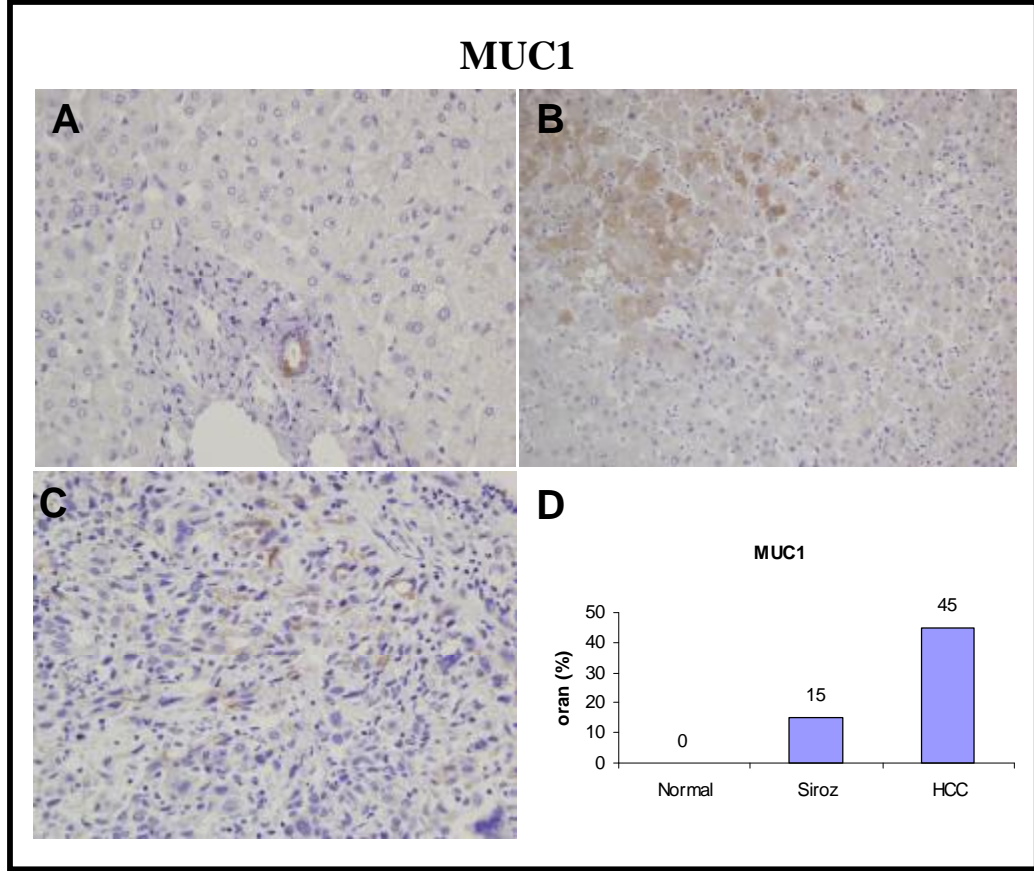
Tablo 3: HCC hastalarının klinik ve patolojik verileri

Klinikopatolojik özellik		Sayı	%
Cinsiyet	Erkek	38	91
	Kadın	4	9
Tm boyutu (cm)	<5	34	81
	>5	8	19
Etyoloji	Viral	39	93
	Alkol	3	7
Tm nodül sayısı	<3	31	74
	>3	11	26
Diferansiyasyon	İyi	7	17
	Orta	29	69
	Kötü	6	14

4.7.1. Patoloji Arşivindeki Normal, Siroz ve HCC dokularında MUC1 Ekspresyon Analizi

MUC1 antikorunu kullanılarak yapılan IHC analizleri sonrasında analiz edilen 18 normal karaciğer dokusunda MUC1 ekspresyonu olmadığı, buna karşın 26 siroz dokusunun 4'ünde (%15) ve HCC örneklerinin 19'unda (%45) MUC1 boyamasının pozitif olduğu belirlendi (Şekil 22).

Bu veriler istatistik olarak analiz edildiğinde normal karaciğer ve siroz dokuları arasında anlamlı bir fark elde edilemezken ($p=0.089$), normal karaciğer-HCC ve siroz-HCC arasındaki farkın anlamlı olduğu saptandı (sırasıyla $p=0.000$, $p=0.008$).

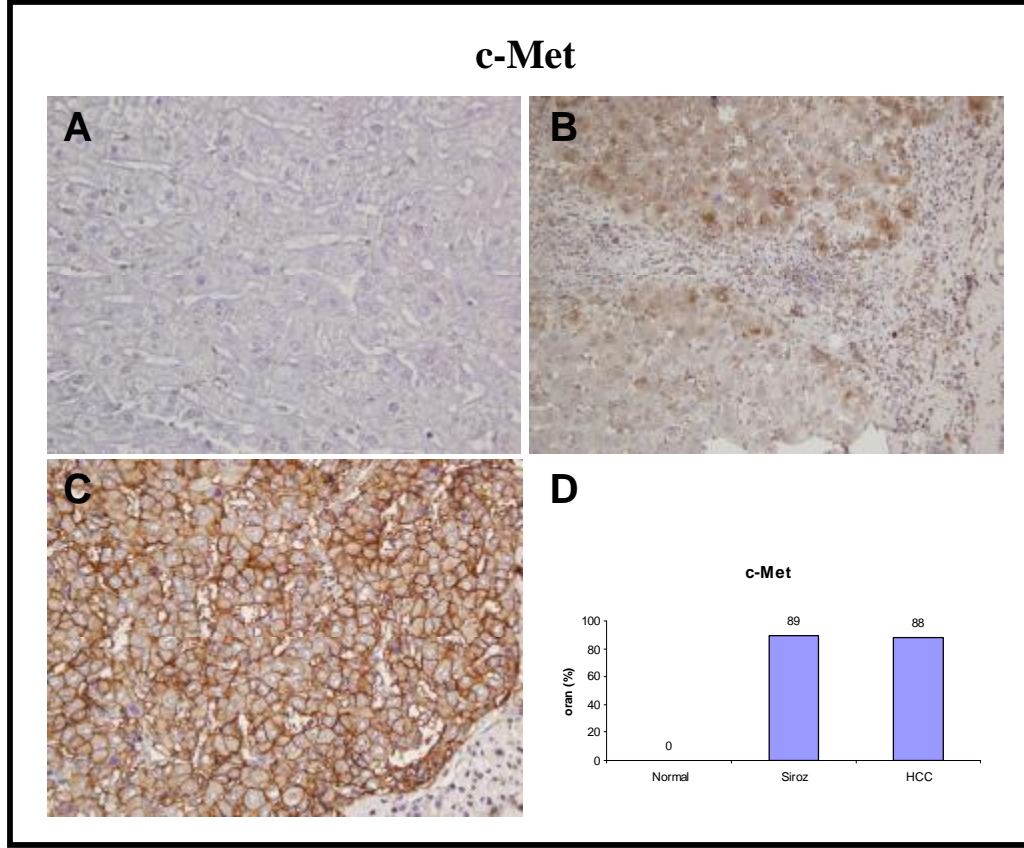


Şekil 22: Normal, siroz ve HCC’de IHC ile MUC1 ekspresyonları: A: Normal, MUC1(-), B: Siroz, MUC1(+), C: HCC, MUC1(+), D: Farklı dokulardaki MUC1 ekspresyon oranları

4.7.2. Patoloji Arşivindeki Normal, Siroz ve HCC Dokularında c-Met Ekspresyon Analizi

c-Met antikorunu kullanarak yapılan IHC analizleri sonrasında ise analiz edilen 14 normal karaciğer dokusunda c-Met ekspresyonu olmadığı, buna karşın 26 siroz dokusunun 23’ünde (%89) ve HCC örneklerinin 37’sinde (%88) c-Met boyamasının pozitif olduğu belirlendi (Şekil 23).

Bu veriler istatistik olarak analiz edildiğinde normal karaciğer ile siroz ve HCC dokuları arasında anlamlı bir fark elde edildi (sırasıyla, $p=0.001$, $p=0.001$). Siroz ve HCC arasında anlamlı bir fark yoktu.



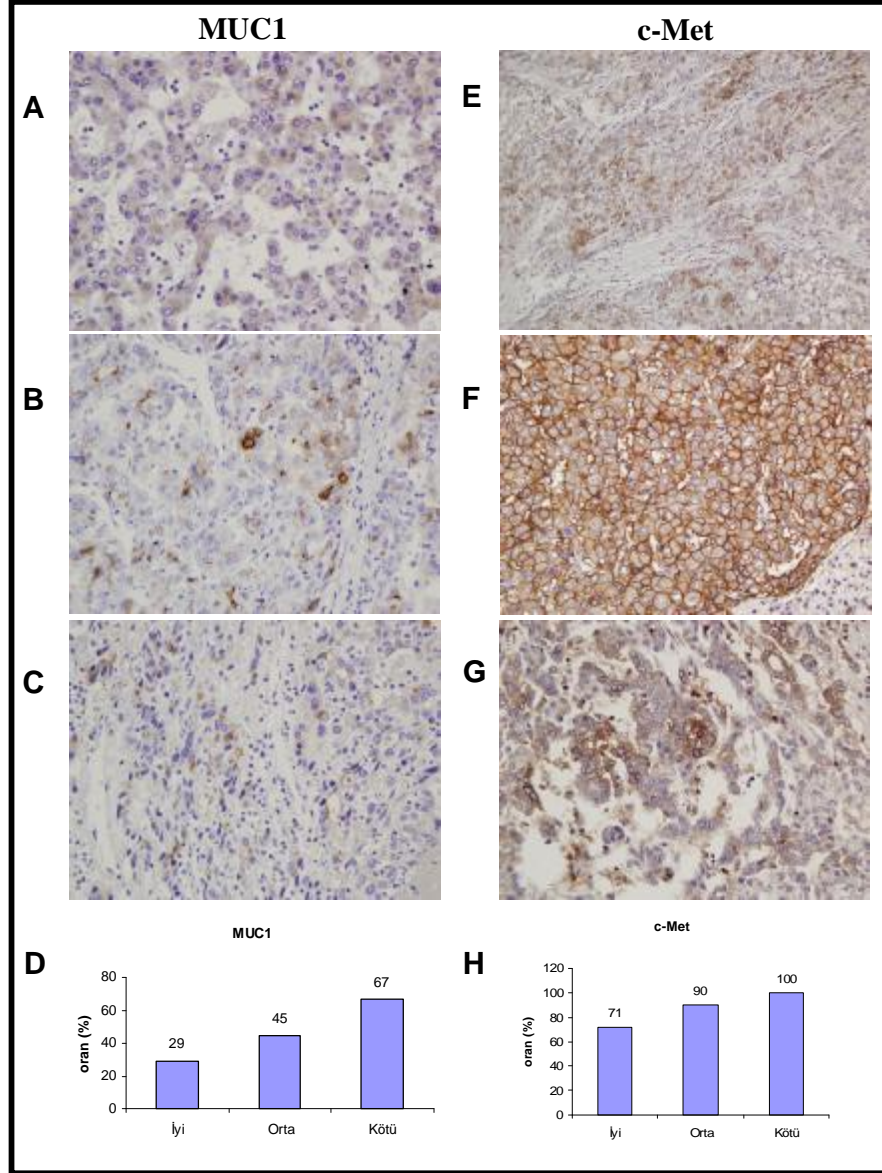
Şekil 23: Normal, siroz ve HCC'de IHC ile c-Met ekspresyonları: A: Normal, c-Met (-), B: Siroz, c-Met (+), C: HCC, c-Met (+), D: Farklı dokulardaki c-Met ekspresyon oranları

Bu veriler MUC1 ekspresyonundaki artışın sirozdan HCC'ye geçiş için, c-Met ekspresyon artışının ise siroz gelişim sürecinde önemli olduğunu düşündürmektedir.

4.7.3. Patoloji Arşivindeki Normal, Siroz ve HCC Dokularında Diferansiyasyon Durumuna Göre MUC1 ve c-Met Ekspresyon Analizi

HCC dokularındaki MUC1 ve c-Met ekspresyon düzeyleri tümörlerin diferansiyasyon durumu ile ilişkisi değerlendirildiğinde iyi diferansiye 7 örneğin 2'sinde (%29), orta diferansiye 29 örneğin 13'ünde (%45), kötü diferansiye 6 örneğin 4'ünde (%67) MUC1 ekspresyonunun pozitif olduğu belirlendi. Şekil 24 A-D'de görüldüğü gibi hücrelerin diferansiyasyon düzeyi azaldıkça MUC1 ekspresyonu artmaktadır. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.067$). Aynı şekilde iyi diferansiye 7 örneğin 5'sinde (%71), orta diferansiye 29 örneğin 26'sında (%90), kötü diferansiye 6 örneğin tamamında (%100) c-Met ekspresyonunun pozitif olduğu belirlendi. Buna karşın c-Met'in sitoplazmik olarak boyandığı

42 olgunun 35'inin (%83) orta veya kötü diferansiye olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0.001$). Bu bulgular hücre kültüründe elde ettiğimiz MUC1 ve c-Met ekspresyon düzeylerinin mezenşimal kökenli ve kötü diferansiye hücre dizilerinde arttığını gösteren verilerimiz ile (Tablo 2) uyumludur. Hücrelerin diferansiyasyon düzeyi azaldıkça c-Met ekspresyonu da artmaktadır fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.255$) (Şekil 24 E-H).



Şekil 24: Diferansiyasyon Durumuna Göre IHC ile MUC1 ve c-Met ekspresyonları:

A: Az diferansiye MUC1(+), **B:** Orta diferansiye MUC1(+), **C:** İyi diferansiye MUC1(+), **D:** Diferansiyasyon durumuna göre MUC1 ekspresyon oranları **E:** Az diferansiye c-Met (-), **F:** Orta diferansiye c-Met (+), **G:** İyi diferansiye c-Met (+), **H:** Diferansiyasyon durumuna göre c-Met ekspresyon oranları

5. TARTISMA

Karsinogenez sürecinde hücrelerin musin ekspresyonlarının ve eksprese ettikleri musin türlerinin hem glikozilasyonları ve oligosakkarit içerikleri ve hem de ekspresyon düzeyi açısından farklılaştığı bilinmektedir. Musin ekspresyon ve tiplerindeki bu değişiklikler tümör hücrelerine tümör hücrelerini ortadan kaldıracak immünolojik mekanizmalara karşı direnç kazandırdığı gibi, aynı zamanda farklı reseptörler ile etkileşime girme ve böylece hücre içi sinyal yollarındaki moleküller ile etkileşerek hücre-hücre bağlantılarını etkileme, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu ile ilgili genlerin regülasyonu değiştirme gibi özellikler kazandırabilir. Yapılan çalışmalarda birçok MUC ekspresyon düzeyi incelenmiş olsa da, en çok etkilenen musin tipinin MUC1 olduğu saptanmıştır. Meme dokusu, tükrük bezi, mide, pankreas, karaciğer, akciğer, böbrek, mesane, prostat, uterus, ve testis gibi birçok organ ve dokunun tümörlerinde ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (5).

HCC gelişiminde MUC1'in ve MUC1/c-Met etkileşimlerinin rolünü incelediğimiz bu çalışmada sekiz HCC hücre dizisinde MUC1 ekspresyonu hem mRNA düzeyinde hem de protein düzeyinde araştırılmış ve Huh7, Hep3B ve HepG2 hücrelerinde protein düzeyinde MUC1 ekspresyonuna rastlanmamıştır. Daha önceki çalışmalarımızda HCC hücrelerinin diferansiyasyon belirteçlerine göre iyi ve kötü diferansiye olarak gruplandırılabilceği tanımlanmış ve Huh-7, Hep3B ve HepG2 hücrelerinin iyi diferansiye, Snu-398, Snu-449, Snu-475, Mahlavu ve Sk-Hep1 hücrelerinin kötü diferansiye oldukları belirlenmişti (74). Buna ek olarak, literatürde HCC hücre dizilerinin vimentin, E-kaderin gibi çeşitli diferansiyasyon belirteçleri ile yapılan analizler ve mikroarray çalışmaları ile elde edilen gen ekspresyon profillerine göre mezenşimal ve epitelyal fenotipli hücreler olarak ikiye ayrılabilceği, mezenşimal fenotipli grupta invazyon ve metastaza yol açan genlerin ekspresyonunun arttığı tanımlanmıştı (73). HCC hücre dizilerinde saptadığımız MUC1 ekspresyon verileri bu bilgiler eşliğinde değerlendirildiğinde MUC1 ekspresyonu bulunmayan hücrelerin epitelyal fenotipte iyi diferansiye hücreler olduğu, MUC1 eksprese eden hücrelerin mezenşimal fenotipli kötü diferansiye oldukları görülmektedir (Tablo 2). Çalışmamızda MUC1 eksprese etmeyen hücrelerin E-kaderin eksprese ettikleri, MUC1 eksprese eden hücrelerde E-kaderin ekspresyonuna rastlanmadığı, buna karşın vimentin eksprese ettikleri bildirilmiştir (73). Bu bulgular, çalıştığımız HCC hücre dizilerinin MUC1 ekspresyon artışı ile hücre-hücre bağlantılarını kaybederek mezenşimal karakter kazandıklarını düşündürmektedir. Tümör hücreleri bu sayede motilitelerini artırarak daha kolay invazyon

yapma yeteneği kazanıyor olabilir. Anti adhesif bir protein olan MUC1'in bu hücrelerde eksprese ediliyor olması bu hücrelerin de adhesif özelliklerini kaybederek hücre-hücre etkileşimlerinin azalmasında rol oynuyor olabilir.

Bilindiği gibi hücrelerin epitelyal veya mezenşimal özellikte olması kemoterapötiklere vereceği yanıtı belirleyici faktörlerden biridir. Bu nedenle, MUC1 ekspresyonunun varlığı hücrelere invaziv ve metastatik özellik kazandırmasının yanı sıra kemoterapi direnci kazandırmada da etkili olabilir. Fuchs ve ark. (73) epitelyal fenotipteki hücrelerin erlotinib, gefitinib ve cetuximab gibi ilaçlara duyarlı olduğu buna karşın E-kaderin ekspresyonu düşük ve mezenşimal fenotipli olanların bu ilaçlara 5 kat daha dirençli olduklarını göstermişlerdir. Benzer bulgular EGFR inhibisyonu için de geçerlidir (73). Bu veriler MUC1'in büyüme faktörü reseptörleri ile birlikte çalıştığı verisini desteklemektedir.

Hücre invazyon ve metastazında önemli rol oynayan sinyal ileti yollarından birisi de HGF/c-Met yolağıdır (3). HGF ve/veya c-Met'in birçok solid tümör ve onların metastazlarında eksprese edildiği, aşırı ekspresyonlarının sıklıkla kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (3). Karaciğer kanserlerinde HGF'in rolünü tanımlayan birçok çalışma olmasına karşın c-Met'in rolünü tanımlayan pek az çalışma vardır. Biz de çalışmamızda hücre invazyon ve metastazında ve tedavi direnci gelişiminde rol oynayan bir büyüme faktörü reseptörü olan c-Met ile MUC1 etkileşimini değerlendirdik. Hücre dizilerinde yaptığımız çalışmalar c-Met ekspresyon profilinin MUC1 ekspresyon profili ile uyumlu olduğunu gösterdi. Tablo 2'de de görüldüğü gibi MUC1 eksprese eden hücre dizilerinde c-Met overekspresyonu vardır ve verilerimiz c-Met overekspresyonunun HCC hücrelerinde epitelyal-mezenşimal geçiş fenotipi kazanmalarında ve daha invaziv ve metastatik fenotipik özellik göstermelerinde rol oynayabileceği düşüncesini desteklemektedir. Saptadığımız MUC1 ekspresyonu ile c-Met overekspresyonu arasındaki bu benzerlik MUC1'in c-Met ile etkileşime girerek hücre sinyal iletimini etkilediğini düşündürmektedir.

Daha önceki çalışmalarda MUC1'in sitoplazmik kuyruğunun EGFR ile etkileşerek sitozolik adaptör proteinlerle ilişki kurup sinyal iletiminde rol aldığı, hücre büyümesi ve diferansiyasyonunu aktive ettiğinin ve ayrıca MUC20'nin de c-Met ile etkileştiğinin gösterilmesi bu düşüncemizi desteklemektedir (37, 39, 44). MUC1 ile c-Met arasında fiziksel bir etkileşim olup olmadığını belirlemek için yaptığımız immunopresipitasyon çalışmalarında c-Met ve MUC1 arasında bazal koşullarda fiziksel bir etkileşim olduğunu ve HGF uyarımının bu etkileşimi önce minimal düzeyde artırdığını, 30. dakikadan sonra ise 4 kat kadar azalttığını gösterdik (Şekil 18). Çalışmalarımız devam ederken Singh ve ark. (75) pankreas kanseri hücre

dizilerinde MUC1 ile c-Met arasında fiziksel bir etkileşim olduğunu yayınladı. Singh çalışmasında c-Met MUC1 etkileşiminin MUC1'in sitoplazmik kuyruğundaki YHPM motifinde bulunan tirozin fosforilasyonunu katalize ettiği ve HGF uyarımı sonrası MUC1'in sitoplazmik parçasının nukleusa geçişinin kolaylaştığını tanımladı. Bu çalışmada ayrıca, MUC1 overekspresyonunun HGF tarafından uyarılan hücre invazyonunu azalttığı ve MUC1'in c-Met tarafından uyarılan onkojenik sinyalleri kontrol ettiğini destekleyen veriler sunuldu. Bizim çalışmamızda MUC1 ve c-Met ekspresyonu yüksek olan hücrelerin daha invaziv karakterde olması bu veriler ile uyumludur, HCC gelişiminde de MUC1/c-Met etkileşiminin pankreas kanserindekine benzer olduğunu düşündürmektedir. Ancak bunun kanıtlanması için ek çalışmalara gerek vardır.

Çalışmamızda HCC gelişiminde de sürecin benzer olup olmadığının incelenmesi amacıyla Mahlavu hücrelerinde MUC1'in siRNA ile sessizleştirilmesinin hücre davranışları ve c-Met aktivasyonu/ekspresyonuna etkisinin incelenmesi planlandı. Ancak bu amaçla yaptığımız deneyler sonucunda değerlendirilebilir veri elde edilemedi. Bunun üzerine, Singh ve ark'nın çalışmasında MUC1-c-Met etkileşiminin YHPM motifine bağlanan p53 protein düzeyini etkilediğinin tanımlanması ve EGFR ile yapılan çalışmada MUC1 sitoplazmik kuyruğu içindeki SAGNGGSSL motifinin β -katenin ile bağlanarak sinyal iletimini etkilediğinin gösterilmesi sonrasında çalışmaya bu yönde devam etmeyi planladık. EGFR MUC1 etkileşimlerini tanımlayan çalışmalarda MUC1'in sitoplazmik kuyruk parçasının MUC1 çekirdek proteininden ayrılarak β -katenin ile birlikte nukleusa gittiği ve TCF/LEF gibi transkripsiyon faktörleri yoluyla transkripsiyonu etkilediği veya β -kateninin sitoplazmada tutularak kaderinler ve diğer komplekslerle ilişkisinin engellediği bildirilmişti (40). Biz de, MUC1 sitoplazmik kuyruğunda bulunan ve MUC1 aracılıklı sinyal iletiminde önemli role sahip olan β -katenin bağlanma bölgesinin de etkileniyor olabileceğini düşündük. Daha önce tanımlanan veriden yola çıkarak MUC1-c-Met etkileşiminin β -katenin sinyal yolağını nasıl etkilediğini inceledik. Öncelikle MUC1 ve c-Met ekspresyonunu belirlediğimiz hücre dizilerinde bazal β -katenin ekspresyonunu değerlendirdik. Bu hücrelerden β -katenin ekspresyonu en yüksek olanların epitelyal fenotipte olan Hep3B, Huh-7 ve HepG2 hücreleri olduğu saptandı (Şekil 19, Tablo 2). MUC1 ve c-Met ekspresyon profili ile β -katenin ekspresyon profilinin Snu-475 hücre dizisi dışında negatif korelasyon göstermesi nedeniyle MUC1 c-Met etkileşiminin β -katenin MUC1 etkileşimini değiştirebileceği düşünüldü. Yaptığımız immunopresipitasyon çalışması MUC1 ile β -katenin arasında bazal koşullarda bir

etkileşim olduğunu gösterdi. Bu etkileşimin HGF etkisiyle zamana bağlı olarak azaldığı belirlendi. Bilindiği gibi hücre içi serbest β -katenin düzeyi kontrol altında tutulmaktadır ve gerekmedikçe β -kateninin nukleusa geçişi veya sitoplazmadaki diğer moleküllere bağlanması ve transkripsiyon faktörleri ile birleşerek hücre proliferasyon, diferansiyasyon, motilite gibi süreçleri etkilemesi önlenir.

Çalışmamızda elde edilen MUC1- β -katenin etkileşiminin HGF aracılıklı olarak azalması iki şekilde açıklanabilir. Bunlardan birincisi, HGF uyarımıyla MUC1 sitoplazmik kuyruğunun β -katenin ile birlikte nukleusa taşınmasıdır. İkinci olasılık, HGF ile nukleusa gitmesi uyarılan MUC1'in sitoplazmik kuyruğuna bağlı β -kateninin serbestleşmesidir. Bu durumda serbest kalan β -katenin ya ubiquitin aracılıklı olarak yıkılabilir veya nukleusa transfer edilebilir. Sitoplazmadaki β -kateninin kaderinin belirlenmesinde fosforilasyonlar önemli role sahiptir (76). E-kaderinin Y860 rezidüsünden ve β -kateninin Y654 rezidüsünden fosforilasyonu E-kaderin- β -kateninin etkileşimini önlerken, β -kateninin S33, S37 ve T41 rezidülerinden fosforilasyonu, ubiquitinasyon yoluyla degradasyonuna yol açar. c-Met yoluyla Y142 fosforilasyonu veya Akt yoluyla S654 fosforilasyonu β -kateninin TCF/LEF ile etkileşime girerek transkripsiyonal aktivasyona yol açar (76). Biz HGF uyarımına bağlı β -katenin miktarında veya S552 fosforilasyonunda değişiklik olup olmadığını inceledik. Toplam hücre lizatındaki β -katenin miktarının ve fosforile S552 β -katenin miktarının HGF uyarımına bağlı olarak azaldığını belirledik. HGF tarafından uyarılan β -katenin-MUC1 ilişkisinin azalması, β -katenin miktarının ve β -kateninin karboksi ucundaki S552 fosforilasyonunun azalması HGF uyarımı sonrasında MUC1 den ayrılan β -kateninin nukleusa göç etmiş veya yıkılmış olabileceğini düşündürmektedir. Ancak mekanizmanın tam olarak belirlenmesi için ayrıca β -kateninin nukleer lokalizasyonunun belirlenmesine yönelik ek çalışmalara gerek vardır. Ayrıca bu değişimde c-Met reseptörünün rolünün ne olduğu, c-Met tarafından aktive edilen ve BCL9 bağlanmasında önemli olan Y142 fosforilasyonu ve β -kateninin degradasyonunda önemli olan S33, S37, T41 ve S45 fosforilasyonları gibi diğer β -katenin fosforilasyonlarının incelenmesi sonrasında karar verilebilir. Bilindiği gibi β -katenin-Wnt yolağının aktivasyonu kolon kanserlerinin %80'inden fazlasında başlatıcı faktör olduğunun bilinmesine karşın bu yolağın karaciğer kanserleri gelişimindeki rolü tam olarak bilinmemektedir. Bu yeni veriler doğrultusunda MUC1-c-Met etkileşiminin β -katenin aktivasyonunu ve yerleşimini nasıl etkilediğine ilişkin yeni bilgiler hepatokarsinogenez

sürecinde β -kateninin rolünü açıklamaya yardımcı olacak veriler sağlayacaktır. Bu yolağın normal karaciğer gelişiminde önemli rol oynadığı ve hücre diferansiyasyonu kontrolünde önemli olduğu belirlenmiştir (68). Bu bilgiler verilerimizle birlikte değerlendirildiğinde MUC1- β -katenin etkileşiminin c-Met reseptör aktivasyonundan nasıl etkilendiğinin belirlenmesi bu konuya önemli katkılar sağlayabilir.

Hücre kültürü çalışmalarında elde edilen verilerin HCC gelişimindeki rolünün saptanmasında primer dokularda yapılacak çalışmalar giderek daha çok önem kazanmaktadır. İnsan tümörlerinde yapılan çoğu çalışmada, meme kanserlerinin %90'ından fazlasında olmak üzere over, akciğer, kolon ve pankreas kanserlerinde MUC1 ekspresyonunda artış saptanmıştır (28). Tümör ilerledikçe MUC1 ekspresyonu da artma eğilimindedir ve örneğin meme kanserinde bu durum düşük sağ kalım ile ilişkilidir (31). HCC hücre dizilerinden elde edilen MUC1 ve c-Met ekspresyon değişimlerinin hepatokarsinogenez sürecinde rol oynayıp oynamadığını belirlemek için normal karaciğer, siroz ve HCC dokularında immunohisto-kimyasal olarak MUC1 ve c-Met ekspresyonları incelendi. IHC analizleri sonrasında analiz edilen 18 normal karaciğer dokusunda MUC1 ekspresyonu olmadığı, buna karşın 26 siroz dokusunun 4'ünde (%15) ve 42 HCC örneğinin 19'unda (%45) MUC1 boyamasının pozitif olduğu belirlendi. Literatürde prekanseröz dokularda ve normal karaciğerde MUC1 ekspresyonunu değerlendiren çok az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalardan birisinde MUC1 ekspresyonunun histolojik diferansiyasyon, metastaz ve post-op rekürrens ile yakın ilişkili olduğu, tümör eksizeyondan 3 yıl sonra metastaz oranının MUC1 pozitif olgularda negatif olgulara göre çok daha yüksek olduğu saptanmıştır (32). Bizim çalışmamızda istatistiksel anlamlı bir prognostik parametre saptanamamış olması tüm olgularımızda invazyon verisinin bulunmaması ve kötü ve iyi diferansiye olgu sayımızın düşük olmasından kaynaklanabilir.

HCC dokuları kullanılarak yapılan bir başka çalışmada HCC dokularında %38 oranında MUC1 pozitifliği saptanmıştır (33). Diferansiyasyon düzeylerine göre MUC1 pozitifliği incelendiğinde elde ettikleri; iyi diferansiye olanlarda 1/7 (%14), orta diferansiye olanlarda 13/31 (%42) ve kötü diferansiye olanlarda 2/4 (%50) oranları bizim çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle son derece uyumludur. Bizim çalışmamız sürerken yapılan bir diğer çalışmada Ichikawa ve ark. (34) 186 HCC dokusunda %46 oranında MUC1 pozitif boyama tespit etmişler ve bunların %1'inin iyi, %52'sinin orta ve %47'sinin kötü diferansiye olduğunu belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada da HCC örneklerinde %77 oranında pozitif sonuç alınmıştır (32). Ancak Lau ve ark.'nın (35) çalışması, 13 HCC örneğinin hiçbirisinde MUC1 pozitif boyanma tespit edilmemiş olmasıyla bizim çalışmamızdan ve diğerlerinden

farklıdır. Bu çalışmada olgu sayısının çok düşük olması ve olguların diferansiyasyon düzeylerinin bilinmemesi nedeniyle farklı sonuçlar elde edilmiş olabilir.

IHC analizi sonuçlarına göre c-Met ekspresyonunun siroz dokularına arttığı, analiz edilen 14 normal karaciğer dokusunda c-Met ekspresyonu olmadığı, buna karşın 26 siroz dokusunun 23'ünde (%89) ve HCC örneklerinin 37'sinde (%88) c-Met boyamasının pozitif olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızdaki hedeflerden birisi de MUC1 ekspresyonu ile c-Met ekspresyon artışı arasında bir korelasyon olup olmadığının araştırılmasıydı. Bu nedenle IHC ile MUC1 ekspresyonu analiz edilen HCC'li dokularda c-Met ve MUC1 ekspresyonu olup olmamasına göre istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmadığı belirlendi. Ancak veriler analiz edildiğinde MUC1 negatif olguların %98'inde (41/42) c-Met ekspresyonunun pozitif olduğu belirlendi.

Çalışma sonuçlarımız MUC1-c-Met etkileşiminin HCC gelişiminde β -katenin aracılıklı olarak rol oynayabileceği göstermiştir. Ancak bu bağlantının biyolojik öneminin tam olarak belirlenmesi için MUC1 ve c-Met'in overekspresyonu ya da inhibisyonu ile yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUC ve ÖNERİLER

Sonuç olarak projemiz kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar doğrultusunda:

1. HCC hücre dizilerindeki MUC1, MUC20, c-Met ve β -katenin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. MUC1 ekspresyonu olmayan, c-met ekspresyonu olmayan veya düşük olan HCC hücrelerinin iyi diferansiye ve epitelyal fenotipe oldukları, MUC1 ve c-met ekspresyonu yüksek olanların ise kötü diferansiye ve mezenşimal fenotipli oldukları saptanmıştır.
2. HCC'de MUC1-c-Met arasında fiziksel bir etkileşim olduğu, HCC hücrelerinde HGF uyarımına bağlı olarak c-Met'e bağlanan MUC1 miktarında zamana bağlı olarak azalma olduğu ko-immunopresipitasyon ile gösterilmiştir.
3. MUC1 ile β -katenin arasında fiziksel bir etkileşimin olduğu, HGF uyarımının MUC1- β -katenin bağlantısını ve β -katenin miktarı ve fosforilasyonunu zamana bağlı azalttığı sırasıyla ko-immunopresipitasyon ve western blot ile ortaya konmuştur.
4. IHC analizi sonuçlarına göre MUC1'in HCC'de, c-Met'in sirozda arttığı, analiz edilen 18 normal karaciğer dokusunda MUC1 ekspresyonu olmadığı, buna karşın 26 siroz dokusunun 4'ünde (%15) ve HCC örneklerinin 19'unda (%45) MUC1 boyamasının pozitif olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, analiz edilen 14 normal karaciğer dokusunda c-Met ekspresyonu olmadığı, buna karşın 26 siroz dokusunun 23'ünde (%89) ve HCC örneklerinin 37'sinde (%88) c-Met boyamasının pozitif olduğu tespit edilmiştir.
5. HCC örneklerinin diferansiyasyon durumu ile ilişkisi değerlendirildiğinde hücrelerin diferansiyasyon düzeyi azaldıkça MUC1 ve c-Met ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Buna karşın c-Met'in sitoplazmik olarak boyandığı 42 olgunun 35'inin (%83) orta veya kötü diferansiye olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0.001$).

Bu veriler HCC gelişiminde MUC1 ile c-Met etkileşiminin önemli olabileceğini düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2007; 132: 2557-76.
2. Wong CM, Ng IO. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2008; 28:160-74.
3. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003; 4:915-25.
4. Gendler SJ. MUC1, The renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001; 6: 339-53
5. Hanisch FG, Müller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*. 2000; 10: 439-49.
6. Anzola M. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat* 2004; 11: 383-93.
7. Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127(Suppl. 1): S87-96.
8. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *New Engl J Med* 2003; 348: 1625-38.
9. El Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126:460–468.
10. Yu MC, Yuan JM. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127(5 Suppl 1): S72–S78.
11. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet* 2005; 366:941–951.
12. Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Mizokami M ve ark. Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis—A comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 32: 970–9.
13. Pang A, Ng IO, Fan ST, Kwong YL. Clinicopathologic significance of genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 146: 8–15.
14. Farazi PA, Glickman J, Jiang S, Yu A ve ark. Differential impact of telomere dysfunction on initiation and progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 5021-27.
15. Plentz RR, Caselitz M, Bleck JS. Hepatocellular telomere shortening correlates with chromosomal instability and the development of human hepatoma. *Hepatology*. 2004; 40: 80-86.
16. Plentz RR, Park YN, Lechel A. Telomere shortening and inactivation of cell cycle checkpoints characterize human hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2007; 45:968–976.
17. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*. 2004; 5: 691–701.
18. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA ve ark. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8847–8851.
19. Theodoropoulos G, Carraway KL. Molecular signaling in the regulation of mucins. *J Cell Biochem*. 2007; 102: 1103-16.
20. Hatstrup CL, Gendler SJ. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu Rev Physiol*. 2008; 70:431-57.

21. Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T ve ark. Molecular cloning and expression of human tumour-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem.* 1990; 265: 15286-93.
22. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Rev-Cancer.* 2004; 4: 45-60.
23. Parmley RR, Gendler SJ. Cystic fibrosis mice lacking Muc1 have reduced amounts of intestinal mucus. *J Clin Invest* 1998; 102:1798–1806.
24. Bhaskar KR, Garik P, Turner BS, Bradley JD, ve ark. Viscous fingering of HCl through gastric mucin. *Nature.* 1992; 360: 458-61.
25. Kibe A, Inoue H, Fukuyama S, Machida K ve ark. Differential regulation by glucocorticoid of interleukin-13-induced eosinophilia, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in mouse airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167, 50-56.
26. Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A ve ark. Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol* 1995; 129:255-265.
27. Satoh S, Hinoda Y, Hayashi T, Burdick ve ark. Enhancement of metastatic properties of pancreatic cancer cells by MUC1 gene encoding an anti-adhesionmolecule. *Int J Cancer.* 2000; 88:507-518.
28. Thornton DJ, Sheehan JK. From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1:54–61.
29. Burchell JM, Mungul A, Taylor-Papadimitriou J. O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6: 355–64.
30. Carraway KL, Ramsauer VP, Carothers Carraway CA. Glycoprotein contributions to mammary gland and mammary tumor structure and function: roles of adherens junctions, ErbBs and membrane MUCs. *J Cell Biochem.* 2005; 96: 914–26
31. Baldus SE, Engelmann K, Hanisch F. Muc1 and the mucs: a family of human mucins with impact in cancer biology. *Crit Rev Clin Lab Science.* 2004; 41: 189-231.
32. Yuan SF, Li KZ, Wang L, Dou KF ve ark. Expression of MUC1 and its significance in hepatocellular and cholangiocarcinoma tissue. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 4661-6.
33. Cao Y, Karsten U, Otto G, Bannasch P. Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich antigen, Tn, sialosyl-Tn, and alpha2,6-linked sialic acid in hepatocellular carcinomas and preneoplastic hepatocellular lesions. *Virchows Arch.* 1999; 434: 503-9.
34. Ichikawa T, Yamamoto T, Uenishi T, Tanaka H ve ark. Clinicopathological implications of immunohistochemically demonstrated mucin core protein expression in hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2006;13: 245-51.
35. Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites. *Am J Clin Pathol.* 2004; 122: 61-9.
36. Rahn JJ, Shen Q, Mah BK, Hugh JC. MUC1 initiates a calcium signal after ligation by intercellular adhesion molecule-1. *J Biol Chem.* 2004; 279:29386–90
37. Carraway KL, Ramsauer VP, Haq B, Carraway CAC. Cell signaling through membrane mucins. *BioEssays.* 2002; 25: 66-71.
38. Li Y, Kuwahara H, Ren J, Wen G ve ark. The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3 β and β -catenin. *J Biol Chem.* 2001; 276: 6061–64
39. Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol.* 2006; 16: 467-76.
40. Wen Y, Caffrey, TC., Wheelock, MJ, Johnson, KR ve ark. Nuclear association of the cytoplasmic tail of muc1 and β -catenin. *J Biol Chem.* 2003; 278, 38029-39.

41. Wei X, Xu H, Kufe D. Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response. *Cancer Cell* 2005; 7: 167-178.
42. Ren J, Agata N, Chen D, Li Y ve ark. Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell* 2004; 5: 163-175.
43. Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, Gendler SJ. Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogenactivated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem.* 2001; 276: 13057-64.
44. Higuchi T, Orita T, Katsuya K, Yamasaki Y ve ark. Muc20 suppresses the hepatocyte growth factor-induced grb2-ras pathway by binding to a multifunctional docking site of met. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 7456-68.
45. Zhang YW, Vande Woude GF. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *Journal of Cellular Biochemistry,* 2003; 1;88 :408-17.
46. Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G ve ark. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Crit Rev Oncol Hemat.* 2005; 53:35-69.
47. Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett.* 2004; 225;1-26.
48. Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene.* 2000; 19: 5582-89.
49. Schaeper U, Gehring NH, Fuchs KP, Sachs M ve ark. Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol,* 2000; 149: 1419-32.
50. Firon M, Shaharabany M, Altstock RT, Horev J ve ark. Dominant negative Met reduces tumorigenicity-metastasis and increases tubule formation in mammary cells. *Oncogene.* 2000; 1920:2386-97.
51. Gao CF, Vande Woude GF. HGF/SF-Met signaling in tumor progression. *Cell Res.* 2005; 15: 49-51.
52. Wang SY, Chen B, Zhan YQ, Xu WX ve ark. SU5416 is a potent inhibitor of hepatocyte growth factor receptor (c-Met) and blocks HGF-induced invasiveness of human HepG2 hepatoma cells. *J Hepatology,* 2004; 41-2:267-73.
53. Furge KA, Kiewlich D, Le P, Vo MN ve ark. Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98:10722-7.
54. Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 1997; 90: 871–82.
55. Choi HJ, Huber AH, Weis WI. Thermodynamics of beta-catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. *J Biol Chem* 2006; 281: 1027-38.
56. Leckband D, Sivasankar S. Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 587–92.
57. Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ ve ark. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 2005; 123: 903-15.
58. Gavert N, Ben-Ze'ev A. β -catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 2007; 102:820–28.
59. Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of betacatenin. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16:51-9.
60. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A ve ark. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 1997; 16:3797-3804.
61. Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17:45-51.

62. Huber AH, Weis WI. The structure of the betacatenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 2001; 105:391-402.
63. Harris TJ, Peifer M. Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends Cell Biol* 2005; 15:234-7.
64. Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* 2006; 119: 395-402.
65. Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J ve ark. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* 2005; 438: 867-72.
66. Jho E, Lomvardas S, Costantini F. A GSK3beta phosphorylation site in axin modulates interaction with beta-catenin and Tcf-mediated gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 28-35.
67. Gottardi CJ, Gumbiner BM. Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol* 2004; 167:339-49.
68. Cavard C, Colnot S, Audard V, Benhamouche S ve ark. Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma pathogenesis and liver physiology. *Future Oncol.* 2008; 4: 647-60.
69. Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene* 2006; 25, 3778-86.
70. Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C. Differential effects of inactivated axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 2007; 6, 774-80.
71. Salahshor S, Woodgett JR. The links between axin and carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2005; 58, 225-36.
72. Benvenuti S, Comoglio PM. The Met receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J Cell Physiol* 2007; 213: 316-25.
73. Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, Goodwin JM, ve ark. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res* 2008; 68: 2391-99.
74. Çokaklı M, Erdal E, Nart D, Yılmaz F ve ark. Differential expression of caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion. *BMC Cancer* 2009; 9: 65-77.
75. Singh PK, Behrens ME, Eggers JP, Cerny RL ve ark. Phosphorylation of MUC1 by Met modulates interaction with p53 and MMP1 expression. *J Biol Chem* 2008; 283: 26985-95.
76. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of β -catenin adhesion and signaling functions. *Physiology* 2007; 22: 303-9.

8. EKLER

Ek 1: Kullanılan bazı tampon solusyonların hazırlanması

PBS hazırlanması (5X)

1g	KCl
40g	NaCl
5.25g	Na ₂ HPO ₄
1.2g	KH ₂ PO ₄ tartılarak distile su ile 1L'ye tamamlanır. pH: 7.4'e ayarlanır.

TBS hazırlanması (10X)

80g	NaCl
2g	KCl
30g	Tris tartılarak distile su ile 1L'ye tamamlanır. pH: 7.4'e ayarlanır.

Run Buffer hazırlanması (1X)

3,025g	Tris
14.4g	Glisin tartılır
10mL	%10 SDS ile karıştırılarak 1L'ye tamamlanır.

Transfer Buffer hazırlanması (1X)

3.025g	Tris
14.4g	Glisin tartılır
2mL	%10 SDS ile karıştırılarak 800mL'ye tamamlanır. Kullanım öncesi 200mL metanol ilave edilir.

Lizis Buffer hazırlanması (1X)

50mM	Tris-Cl (pH=7.4)
150mM	NaCl
1mM	EDTA (pH=8.0)
%1	NP-40 konsantrasyonda olacak şekilde 100mL'ye tamamlanır

Ek 2:**Tablo 1: Hücre dizilerinden elde edilen total RNA absorbans ve konsantrasyon değerleri**

	A260	A280	RNA (mgr/mL)	Gerekli volüm (µL)
1. Huh 7	2,282	1,972	0,91	2,2
2. Hep3B	2,347	1,240	0,94	2,13
3. HepG2	2,243	1,927	0,89	2,23
4. Snu-449	1,719	0,923	0,68	2,91
5. Snu-475	2,043	1,111	0,81	2,45
6. Mahlavu	2,252	1,669	0,90	2,22
7. Snu-398	2,266	1,855	0,91	2,2
8. SKHep1	2,202	1,633	0,88	2,27
9. MDA-MB-468	2,051	1,094	0,82	2,44
10. MDA-MB-231	1,979	1,031	0,79	2,53

Ek3:**Tablo 1: HCC dokularında Diferansiyasyona Göre MUC1 ve c-Met ekspresyonları.**

No:	Doku tipi (Diferansiyasyon)	MUC1 Ekspresyonu	Sitoplazmik c-Met Ekspresyonu	Membranöz c-Met Ekspresyonu
1	İyi	(-)	(-)	2(+)
2	İyi	1(+)	1(+)	1(+)
3	İyi	(-)	2(+)	1(+)
4	İyi	(-)	2(+)	2(+)
5	İyi	(-)	3(+)	2(+)
6	İyi	(-)	2(+)	2(+)
7	İyi	2(+)	2(+)	1(+)
8	Orta	(-)	2(+)	2(+)
9	Orta	(-)	(-)	1(+)
10	Orta	(-)	(-)	(-)
11	Orta	(-)	(-)	(-)
12	Orta	(-)	(-)	(-)
13	Orta	2(+)	(-)	2(+)
14	Orta	2(+)	(-)	(-)
15	Orta	(-)	1(+)	2(+)

16	Orta	(-)	2(+)	(-)
17	Orta	(-)	2(+)	2(+)
18	Orta	(-)	2(+)	1(+)
19	Orta	(-)	2(+)	1(+)
20	Orta	(-)	2(+)	1(+)
21	Orta	(-)	2(+)	2(+)
22	Orta	1(+)	2(+)	2(+)
23	Orta	1(+)	2(+)	2(+)
24	Orta	1(+)	2(+)	1(+)
25	Orta	1(+)	2(+)	(-)
26	Orta	2(+)	2(+)	3(+)
27	Orta	2(+)	2(+)	2(+)
28	Orta	2(+)	2(+)	2(+)
29	Orta	3(+)	2(+)	2(+)
30	Orta	(-)	3(+)	3(+)
31	Orta	(-)	3(+)	3(+)
32	Orta	(-)	3(+)	3(+)
33	Orta	(-)	3(+)	1(+)
34	Orta	2(+)	3(+)	2(+)
35	Orta	2(+)	3(+)	2(+)
36	Orta	2(+)	3(+)	(-)
37	Kötü	(-)	(-)	(-)
38	Kötü	3(+)	2(+)	1(+)
39	Kötü	3(+)	2(+)	2(+)
40	Kötü	(-)	3(+)	(-)
41	Kötü	1(+)	3(+)	2(+)
42	Kötü	2(+)	3(+)	2(+)