

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Hepatosellüler Karsinom Hücre Dizilerinde
HGF/c-Met Yolağının Tümör Hücresi Mikroçevre
Etkileşimlerine ve Adezyon, Proliferasyon, Motilite,
İnvazyon, Metastaz Gibi Hücre Davranışlarına
Etkisinin Belirlenmesi**

DİLAY ÇIĞLIDAĞ

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

**İZMİR
2006**

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Hepatosellüler Karsinom Hücre Dizilerinde
HGF/c-Met Yolağının Tümör Hücresi Mikroçevre
Etkileşimlerine ve Adezyon, Proliferasyon, Motilite,
İnvazyon, Metastaz Gibi Hücre Davranışlarına
Etkisinin Belirlenmesi**

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

DİLAY ÇIĞLIDAĞ

DANIŞMAN: PROF. DR. NEŞE ATABEY

DEÜAFS Proje No:02.KB.SAĞ.46

Bu proje DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 200546 sayı ile desteklenmiştir.

'Hepatosellüler Karsinom Hücre Dizilerinde HGF/c-Met Yolağının Tümör Hücresi Mikroçevre Etkileşimlerine ve Adezyon, Proliferasyon, Motilite, İnvazyon, Metastaz Gibi Hücre Davranışlarına Etkisinin Belirlenmesi' isimli bu tez 16.06.2006 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Prof. Dr. Neşe ATABEY

Jüri Başkanı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Prof.Dr.Meral SAKIZLI

Jüri Üyesi

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Prof.Dr.Gül GÜNER

Jüri Üyesi

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Yard.Doç.Dr.Çiğdem Eresen YAZICIOĞLU

Jüri Üyesi

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yard.Doç.Dr.Esra ERDAL

Jüri Üyesi

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	i
A. Tablo Listesi	iii
B. Şekil Listesi	iv
C. Kısaltmalar	v
D. Teşekkür	vii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	6-21
2.1. Hepatosellüler Karsinoma	6
2.2. Hepatosit Büyüme Faktörü	7
2.3. Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü: c-Met	9
2.4. HGF/c-Met ve karsinogenez	10
2.5. HGF/c-Met Sinyal İletimi ve Metastaz İlişkisi	11
2.6. Hücre Dışı Matris ve Bileşenleri	13
2.6.1. Fibröz (Lifsel) Proteinler	13
2.6.2. Adhesif Glikoproteinler	14
2.6.3. Proteoglikanlar	14
2.6.4. Proteoglikanların Glikozaminoglikan Bileşenleri	14
2.6.5. Heparin ve Heparan Sülfat	14
2.7. Hücre-Hücre Dışı Matris İlişkisi	15
2.8. İntegrinler	16
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	22-34
3.1. Hücre Hatları ve Hücre Kültürü	22
3.2. HGF ile Stimülasyon	22
3.3. Hücre Koloni Oluşturma Değerlendirmeleri	22
3.4. Hücre Adezyon Değerlendirmeleri	23
3.5. Hücre Hareketinin Değerlendirmeleri	24
3.6. Hücre Canlılığının ve Proliferasyonunun Değerlendirmeleri	25
3.6.1. Tripan Mavisi Canlılık Testi	25
3.6.2. Bromodeoksiüridin (BrdU) Hücre Proliferasyon Testi	25
3.7. RNA İzolasyonu	27
3.8. RNA Miktar Tayini	27

3.9. RNA'nın Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi	27
3.10. c DNA eldesi	28
3.11. Gen Ekspresyonu Analizleri	28
3.12. RT-PCR	29
3.13. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi	30
3.14. Gerçek Zamanlı PCR	30
3.15. c DNA Mikrodizin Analizi	31
3.15.1. Tek İplikli c DNA Sentezi	31
3.15.2. İkinci İplik c DNA Sentezi	32
3.15.3. Çift İplikli c DNA'nın Temizlenmesi	32
3.15.4. Biotinle İşaretlenmiş c RNA'nın Sentezi	32
3.15.5. Biotinle İşaretlenmiş c RNA'nın Temizlenmesi ve Kantifikasyonu	33
3.15.6. c RNA'nın Fragmentasyonu	33
3.15.7. Hibridizasyon	33
3.15.8. Yıkama, Boyama ve Tarama	34
3.16. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR	35-58
4.1. Uygun Hücre Dizisinin Belirlenmesi	35
4.1.1. HGF çalışılan tüm HCC hücre dizilerinde hücre adezyonunu artırmaktadır	35
4.1.2. HGF,HCC hücre dizilerinden SK Hep 1'in motilitesini artırmaktadır	36
4.2. SK Hep 1 hücrelerinin adezyonla hücre sayısı ve sürenin etkisi	36
4.2.1. Hücre Sayısı	36
4.2.2. Süre	36
4.3. ECM glikoproteinlerinin yalnız ve HGF ile birlikte kullanılmasının hücre adezyonuna etkisinin belirlenmesi	39
4.3.1. HGF, SK Hep 1 hücre dizisinin adezyonunu artırmaktadır	39
4.3.2. Heparin SK Hep 1 hücre dizisinde HGF ile ayrılmış adezyonu azaltmaktadır	39
4.3.3. Kollajen SK Hep 1 hücre dizisinin adezyonunu artırmaktadır	40
4.3.4. Fibronektin SK Hep 1 hücre dizisinin adezyonunu artırmaktadır	41
4.3.5. Laminin SK Hep 1 hücre dizisinin adezyonunu azaltmaktadır	41
4.4. Mikroçevrenin hücre migrasyonuna etkisinin belirlenmesi	41
4.4.1. HGF, SK Hep 1 hücrelerinin motilitesini artırmaktadır	41
4.4.2. Kollajen SK Hep 1 hücre dizisinin motilitesini artırmaktadır	43
4.4.3. Fibronektin SK Hep 1 hücre dizisinin motilitesini artırmaktadır	43

4.4.4. Laminin SK Hep 1 hücre dizisinin motilitesini değiştirmemektedir	43
4.4.5. Heparin SK Hep 1 hücre dizisinin motilitesini azaltmaktadır	46
4.5. Mikroçevrenin hücre proliferasyonuna etkisinin belirlenmesi	46
4.5.1. HGF ve Heparinin SK Hep 1 hücre dizisinin proliferasyonuna etkisi	46
4.5.2. ECM Glikoproteinlerinin SK Hep 1 hücre dizisinin proliferasyonuna etkisi	47
4.6. SK Hep1 HCC hücre dizisinin koloni oluşturması için ECM bileşenleri gereklidir	48
4.7. Mikroçevrenin gen ekspresyonu üzerine etkilerinin saptanması	48
4.7.1. HGF ve/veya Kollajen, Laminin, Fibronektin'in İntegrin β 1 gen ekspresyonuna etkisi	51
4.7.2. HGF ve/veya Kollajen, Laminin, Fibronektin'in İntegrin β 4 gen ekspresyonuna etkisi	51
4.7.3. HGF ve/veya Kollajen, Laminin, Fibronektin'in İntegrin α 3 gen ekspresyonuna etkisi	52
4.7.4. HGF ve/veya Kollajen, Laminin, Fibronektin'in İntegrin α 5 gen ekspresyonuna etkisi	52
4.7.5. HGF ve/veya Kollajen, Laminin, Fibronektin'in İntegrin α 6 gen ekspresyonuna etkisi	53
4.7.6. HGF ve/veya Kollajen, Laminin, Fibronektin'in İntegrin α v gen ekspresyonuna etkisi	53
4.7.7. SK Hep1 hücrelerinde E-kaderin gen ekspresyonu	54
4.7.8. HGF ve/veya Heparinin integrin gen ekspresyonlarına etkisi	54
4.8. c DNA mikrodizin analizi	55
5. TARTIşMA	59-66
6. SONUÇ	67-68
7. KAYNAKLAR	69-75
8. EKLER	76-78
EK 1. Solüsyonlar	76-77
EK 2. Hücre Dizileri	78
A. TABLOLAR	
Tablo 1: c DNA Sentezinde kullanılan Kimyasallar ve Konsantrasyonları	28
Tablo 2: Kullanılan Hedef Genlere Ait Primer Dizileri	29
Tablo 3: RT – PCR'da Kullanılan Kimyasallar ve Konsantrasyonları	29

Tablo 4: Gerçek Zamanlı PCR’da Kullanılan Kimyasallar ve Konsantrasyonları	30
Tablo 5: c DNA Birinci İplik Sentezinde Kullanılan Kimyasallar	31
Tablo 6: c DNA İkinci İplik Sentezinde Kullanılan Kimyasallar	32
Tablo 7: Biotinle İşaretlenmiş c RNA’nın Sentezi	33
Tablo 8: Yıkama, Boyama ve Taramada Kullanılan Kimyasallar	34
Tablo 9: Total RNA İzolasyonu Spektrofotometrik Analiz Sonuçları (HGF/ECM glikoproteinleri)	49
Tablo 10: Total RNA İzolasyonu Spektrofotometrik Analiz Sonuçları (HGF/Heparin)	54
Tablo 11: Total RNA İzolasyonu Spektrofotometrik Analiz Sonuçları (HGF/Heparin)	56
Tablo 12: Mikrodizin analiz sonucunda ekspresyonu azalan genler	57
Tablo 13: Mikrodizin analiz sonucunda ekspresyonu artan genler	58

B. ŞEKİLLER

Şekil 1: HGF c DNA ve olgun proteinin şematik gösterimi	8
Şekil 2: c-Met yapısında bulunan işlevsel bölgeler	10
Şekil 3: HGF/c-Met ana sinyal ileti yolları	11
Şekil 4: Metastatik süreç	12
Şekil 5: İntegrin yapısı ve sinyal oluşumu	18
Şekil 6: Bazı integrin ailesi üyeleri ve ligandları	18
Şekil 7: İntegrinler ve büyüme faktörleri arasındaki fiziksel etkileşim	19
Şekil 8: HGF/c-Met sinyali ile integrin aktivasyonu	19
Şekil 9: İntegrin ana sinyal ileti yolları	20
Şekil 10: Hep 3B, Hep G2, Huh7, SK Hep1 hücre hatlarının 15. ve 60. dakikadaki bazal adezyonları ve HGF uyarımının hücre adezyonuna etkisi	35
Şekil 11: HGF’in HCC hücre hatlarının motilitesine etkisi	37-38
Şekil 12: SK Hep1 hücrelerinin adezyon deneyi spektrofotometre ölçümleri için optimum hücre sayısının belirlenmesi	36
Şekil 13: SK Hep1 hücrelerinin adezyonu için uygun sürenin belirlenmesi	39
Şekil 14: SK Hep1 hücrelerinin adezyonuna HGF’in etkisi	39
Şekil 15: Heparinin SK Hep1 hücrelerinin adezyonuna konsantrasyonuna bağlı etkisi	40
Şekil 16: SK Hep 1 hücrelerinin adezyonuna heparinin etkisi	40

Şekil 17: SK Hep1 hücrelerinin adezyonuna kollajenin etkisi	41
Şekil 18: SK Hep1 hücrelerinin adezyonuna HGF ve ECM bileşenlerinin etkisi (60 dk)	42
Şekil 19: SK Hep1 hücrelerinin migrasyonuna HGF'in etkisi	41
Şekil 20a: SK Hep1 hücrelerinin migrasyonuna HGF ve ECM glikoproteinlerinin (kollajen, fibronektin, laminin) etkisi	43
Şekil 20b: SK Hep1 hücrelerinin migrasyonuna HGF ve ECM glikoproteinlerinin etkisi	44-45
Şekil 21: SK Hep1 hücrelerinin migrasyonuna HGF'in ve heparinin etkisi	46
Şekil 22: SK Hep1 hücrelerinin proliferasyonuna HGF'in ve heparinin etkisi	46
Şekil 23: SK Hep1 hücrelerinin proliferasyonuna ECM glikoproteinlerinin etkisi	47
Şekil 24a: SK Hep1 hücrelerinin proliferasyonuna HGF ve ECM glikoproteinlerinin etkisi (24.saat)	47
Şekil 24b: SK Hep1 hücrelerinin proliferasyonuna HGF ve ECM glikoproteinlerinin etkisi (36.saat)	48
Şekil 25: SK Hep 1 hücrelerinin koloni oluşumuna kollajenin etkisi	48
Şekil 26: Total RNA İzolasyonu Analiz Görüntüleri (HGF/ECM Glikoproteinleri, Heparin)	49
Şekil 27: Real Time PCR sonucunda gözlenen amplifikasyon grafikleri	50
Şekil 28: HGF ve ECM glikoproteinlerinin integrin $\beta 1$ gen ekspresyonuna etkisi	51
Şekil 29: HGF ve ECM glikoproteinlerinin integrin $\beta 4$ gen ekspresyonuna etkisi	51
Şekil 30: HGF ve ECM glikoproteinlerinin integrin $\alpha 3$ gen ekspresyonuna etkisi	52
Şekil 31: HGF ve ECM glikoproteinlerinin integrin $\alpha 5$ gen ekspresyonuna etkisi	52
Şekil 32: HGF ve ECM glikoproteinlerinin integrin $\alpha 6$ gen ekspresyonuna etkisi	53
Şekil 33: HGF ve ECM glikoproteinlerinin integrin αv gen ekspresyonuna etkisi	53
Şekil 34: SK Hep1 ve Hep 40 hücrelerinin E kaderin ekspresyonu	54
Şekil 35: HGF ve Heparinin İntegrin Gen Ekspresyonlarına Etkisi	55
Şekil 36: Total RNA İzolasyonu Analiz Görüntüleri (HGF/Heparin)	56

C. KISALTMALAR

bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

CHO	Chienese hamster ovary
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
DPEC	Diethyl Pyrocarbonate
EGF	Epidermal Growth Factor
FAK	Focal Adhesion Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HGF/SF	Hepatocyte Growth Factor /Scatter Factor
HS	Heparan Sulfate
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglican
IL-3	Interleukin 3
IPT	Immunoglobulin Plexin Transcription
KGF	Keratinocyte Growth Factor
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MMP	Matrix Metalloproteinase
NK1	N-terminus and first Kringle domain of HGF
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PI3K	Phosphotidyl Inositol-3-OH Kinase
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SPH	Serine Protease Homology
TBE	Tris Buffer EDTA
TE	Tris EDTA
TGF- β	Transforming Growth Factor - Beta
TK	Tyrosine Kinase
TM	TransMembrane
tPA	tissue type Plasminogen Activator
uPA	Urokinase Plasminogen Activator
uPAR	urokinase Plasminogen Activator Receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

TEŞEKKÜR

Bu tezin oluşması ve sonuçlanmasında emeğini esirgemeyen sevgili hocam ve danışmanım Prof.Dr.Neşe Atabey'e, bilimsel desteği için,

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Meral Sakızlı'ya, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof.Dr.Gül Güner'e, bu çalışmada laboratuvar olanaklarını sağladıkları için,

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Müdürü Prof.Dr.Nejat Akar'a, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı olanaklarından yararlanabilmemi sağladığı için,

Tezin mikrodizin ve Gerçek Zamanlı PCR basamaklarında, zamanını esirgmeden beni bilimsel olarak destekleyen Doç.Dr.Hilal Özdağ'a (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, GenomBilim Laboratuvarı sorumlusu) yardımları ve göstermiş olduğu sıcak ilgi için,

Özellikle çalışmanın son dönemlerinde olmak üzere beni her zaman destekleyen ve yüreklendiren Yard.Doç.Dr.Esra Erdal'a güveni ve bilimsel desteği için,

Donald P.Bottaro (National Institute of Health,NIH) ve Prof.Dr.Mehmet Öztürk (Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü)'e malzeme desteklerinden dolayı,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca dostluklarıyla ve dürüstlükleri ile her zaman yanımda olan Ömür Düngül, Uğur Akpulat ve Filiz Paralı'ya (Msc.) anlayış ve destekleri için,

Sevgili babam Muzaffer Cengiz Çığlıdağ'a, eğitim hayatım boyunca gösterdiği anlayış ve destekten dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dilay ÇIĞLIDAĞ

İzmir, 2006

Anneme ve Babama ...

ÖZET

Hepatosellüler Karsinom Hücre Dizilerinde HGF/c-Met Yolağının Tümör Hücresi Mikroçevre Etkileşimlerine ve Adhezyon, Proliferasyon, Motilite, İnvazyon, Metastaz Gibi Hücre Davranışlarına Etkisinin Belirlenmesi

Dilay ÇIĞLIDAĞ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İnciraltı, İZMİR

Karaciğer kanseri, büyüme faktörlerini, ekstrasellüler matris (ECM) proteinlerini, proteoglikanlarını ve onların ligandlarını da içeren çeşitli moleküllerindeki koordine değişikliklerle karakterizedir. Hücre adezyonu, migrasyonu ve proteolizisi gibi invazyon ve metastaz gelişiminde önemli birçok biyolojik süreçte, büyüme faktörleri ve ECM arasındaki yakın işbirliği olduğunu gösteren kanıtlar giderek artmaktadır. Bu durum karaciğer kanserinde, HCC hücrelerinin, yüksek miktarda Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF/SF) gibi büyüme faktörleri, ECM proteinleri ve proteoglikanları içeren doku ile çevrili trabeküler yapılar içerisinde büyümeleri nedeniyle özellikle önemli olabilir.

Bu çalışmada, HCC hücrelerinin HGF ile uyarılan biyolojik aktiviteleri (hücre adezyonu, proliferasyonu, motilitesi) üzerine HGF ve/veya ECM bileşenlerinin etkilerini inceledik. Sonuçlarımız, ECM adeziv glikoproteinlerinden kollajen ve fibronektinin hücre adezyonu ve motilitesini artırdığını, proliferasyonunda önemli bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir. Lamininin ise hücre adezyonu ve motilitesini etkilemezken hücre proliferasyonunu artırdığı belirlendi. HGF varlığı tüm bu biyolojik yanıtların artmasına yol açmaktadır. Heparin ise HGF varlığından bağımsız olarak hem adezyonu, hem de migrasyon ve proliferasyonu minimal düzeyde baskılamaktadır. Bu etkilerin mekanizmasının anlaşılması için gerçekleştirilen mikrodizin ile HGF ve heparinin birlikte bulunması halinde 28 genin ekspresyonunda azalma ve 47 genin ekspresyonunda artış saptanmıştır. Gerçek zamanlı RT-PCR ile fibronektin, laminin ve heparinin genelde integrin ekspresyonlarının 1.2-6 kat azaltılmaktadır, HGF ile birlikte kullanımında bu fark 2-9 kata çıkmaktadır. Kollajen ise integrin gen ekspresyonlarında 1.2-2 kat artışa yola açmakta, HGF uyarımı bu artışı 2-3 kata çıkartmaktadır. Çalışmada kullanılan SK Hep1 hücre dizisinde E-kaderin ekspresyonu olmadığı belirlenmiştir.

Bu bulgular HGF ve/veya ECM bileşenlerinin HCC hücrelerinin davranışlarındaki rolünü desteklemektedir. Ayrıca HCC hücrelerinde HGF/ c-Met sinyal ileti yolağı ile integrinler ve ligandları arasındaki ilişkiyi açıklamaya katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: HGF/c-Met, ECM, heparin, integrin, adezyon, proliferasyon, motilite

ABSTRACT

The Detection of the Effect of HGF/c-Met Pathway on Tumor Cell Microenvironment Interactions and Cell Behaviors Like Adhesion, Proliferation, Motility, Invasion, Metastasis in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines

Dilay Ciglidag

Dokuz Eylul University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics, 35340, Inciralti, Izmir, Turkiye

Liver carcinogenesis is associated with changes in the coordinated actions of several molecules including growth factors, extracellular matrix (ECM) proteins, proteoglycans, and their ligands. There is increasing amount of evidence that a close collaboration between growth factors and ECM in several biological processes such as cell adhesion, migration and proteolysis are regarded as important steps in the development of invasion and metastasis. This may be particularly important for the liver carcinogenesis, due to HCC cells mainly grow in trabecular structures that are surrounded by tissue with a high content of ECM proteins and proteoglycans as well as growth factors such as Hepatocyte Growth Factor (HGF/SF).

In this study, we examined the effects of HGF and/or ECM components on biological activities of HCC cells induced by HGF. We have shown that collagen IV and fibronectin increased cell adhesion and motility, but not cell proliferation, whereas laminin increased cell proliferation without changing cell adhesion and motility. HGF stimulation increased all of these biological effects. Heparin modestly decreased both basal and HGF induced adhesion, proliferation and motility. Microarray analysis showed that in the presence of heparin and HGF the expression of 47 genes increases whereas expression of 28 genes decreases compared to heparin alone. Treatment with fibronectin, laminin and heparin decreased integrin expressions by 1.2-6 fold. In the case of HGF treatment this decrease extend to 2-9 fold. Integrin expression was increased two fold by collagen IV treatment. Two to three fold increase in integrin expression was obtained with HGF stimulation.

These findings support the role of HGF and/or ECM components in the behaviors of HCC cells. It may also help to identify the association of HGF signaling and c-Met, integrins and their ligands in HCC cells.

Keywords: HGF/c-Met, ECM, heparin, integrin, adhesion, proliferation, motility

1.GİRİŞ ve AMAÇ:

Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF), epitelyal, endotelyal, hematopoyetik hücreler, hepatositler gibi geniş bir hücre grubunun çoğalma, hareket ve farklılaşmasında rol oynamaktadır. HGF hem embriyonel gelişimde hem de erişkinde doku rejenerasyonu süreçlerinde hücre davranışlarını etkileyen bir büyüme faktörüdür. HGF'in reseptörü olan c-Met proteinin aktivasyonu ve bu protein aracılığı ile gerçekleşen gen ekspresyonu değişiklikleri , embriyolojik gelişim, doku rejenerasyonu, angiogenez, büyüme, invazyon, morfolojik farklılaşma gibi geniş spektrumlu biyolojik olaylara sebep olur. HGF aynı zamanda hücreler için bir sağkalım faktörüdür (1,2,3). Kanser gelişim sürecinin çok basamaklı proliferatif, adhesif ve invazif süreç olduğu göz önüne alındığında, HGF/c-Met yolağının tümör oluşumundan, tümör invazyonu ve metastaza kadar tümörögenезin hemen her basamağında rol oynayabileceği düşünülmektedir (4).

Tümör gelişimi, invazyon ve metastaz süreci çok sayıda etkileşimi gerektirir. Bu etkileşimler tümör hücreleri ile tümörün mikroçevresi olarak da adlandırabileceğimiz fibroblastlar, endotel hücreleri, inflamasyon hücreleri ve hücre dışı matrisi (ECM) oluşturan birçok protein ile gerçekleşebilmektedir. Mikroçevre değişiklikleri hücreyel olayları, hücreyel olaylar da çevresel olaylara yanıtı değiştirmektedir. Değişen mikroçevrenin, tümör hücrelerinde HGF sinyal ileti sistemini aktive ederek hücre davranışlarını değiştirdiği düşünülmektedir.

Bu proje kapsamında HCC hücre dizilerinden olan SK Hep1 hücre dizisinde HGF/cMet yolağının tümör hücresi mikroçevre etkileşimleri incelendi ve mikroçevredeki değişimlerin tümör hücresi davranışlarında hangi değişikliklere, nasıl neden olduğu ve bu değişikliklere neden olan mekanizmaların belirlenmesi amaçlandı. Spesifik olarak HGF/cMet yolağı aktivasyonu ile farklı ECM bileşenlerinin hücre adezyonu, proliferasyonu, göçü üzerine etkileri ve bu bileşenlerin ligandları olan integrin gen ekspresyonlarındaki değişiklikler incelendi.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatosellüler Karsinoma:

Hepatosellüler karsinoma (HCC), bütün dünyada görülen kanserler içinde beşinci en yaygın kanserdir. Dünyada yılda 437,000 yeni olgu tanımlanmaktadır. HCC, bütün kanserlerin %5'ini oluşturmaktadır. Mortalite oranı olarak akciğer, mide ve kolon kanserlerinden sonra dördüncü sırayı almaktadır. HCC olgularının % 80'den fazlası, gelişmekte olan ülkelerde, özellikle Uzak Doğu ve Güneybatı Asya'da görülmektedir. HCC insidansı, coğrafik koşullar ve nedenlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir, Akdeniz ülkelerinde son on yılda belirgin bir şekilde arttığı bildirilmiştir(5).

HCC hepatositlerden köken alan epitel bir kanserdir. Karaciğerde en sık görülen malin tümördür. HCC gelişimi çok basamaklı bir süreçtir, biriken, genetik ve epigenetik değişiklikleri içeren çok sayıda moleküler olayı içerir. Bunların arasında kromozom amplifikasyonları, metilasyon değişiklikleri, translokasyonlar, gen regülasyonu değişiklikleri ve mutasyonlar sayılabilir (6).

Moleküler seviyede, HCC heterojen bir hastalıktır. Çoğunlukla siroz, hepatit B ve hepatit C virusu ile birlikte gelişir. HCC, karaciğerdeki önemli derecedeki fibrozis ile birliktelik gösterir. Karaciğerdeki fibrotik mikroçevre, hücrelerinin migrasyona yardımcı olacak şekilde ECM'in kompozisyonunun değişmesi ve büyüme faktörü miktarının artması ile karakterizedir (7). Kanser metastazı, malign tümörün hücre- hücre bağlantısının zayıflaması, tümör hücrelerinin bazal membranı geçmesi, stromaya invaze olması, kan damarlarıyla yayılması ile orijinal tümörden yeni neoplastik doku oluşturması olarak tanımlanır. Büyüme faktörleri ve ECM elemanları bu sürecin en önemli elemanlarıdır.

HCC hücreleri ile ECM proteinleri arasındaki bağlantının tümör gelişimi ve metastazı için gerekli olduğu bildirilmiştir (8,9). Bu durum karaciğerde, HCC hücrelerinin fazla miktarda laminin, kollajen, vitronektin, fibronektin gibi ECM proteinleri ile çevrili trabeküler yapılar içinde gelişmesi ve büyüme faktörü açısından zengin olması nedeniyle hem hepatokarsinogenez, hem de invazyon ve metastaz süreçlerinde önemlidir.

2.2. Hepatosit Büyüme Faktörü:

Hepatosit Büyüme Faktörü/ Scatter Factor (HGF/SF) mezenşimal kökenli bir sitokindir. Çok çeşitli hücrelerde proliferasyon, hücre saçılımı, invazyon, dallanma morfogenezi, transformasyon ve anjiogenez gibi biyolojik olaylarda rol oynamaktadır. Bu nedenle HGF mitojenik, motojenik ve morfojenik özelliklere sahip büyüme faktörü olarak tanımlanmaktadır HGF, hepatositler için mitojen olarak tanımlanmış bir büyüme faktörüdür HGF saçılma (scatter) faktörü olarak da bilinmektedir. Epitel ve vasküler endotelial hücrelerin ayrışmasına neden olmaktadır. HGF ayrıca epitelial morfojen olarak da tanımlanmıştır.HGF gelişim sürecinde proliferasyon , dallanma (branching) ve motiliteyi stimule eden önemli yollarda anahtar rol oynamaktadır. HGF, epitel hücrelerde tüp oluşumunda, endotel hücrelerde anjiogenezde rol oynar. Eritroid kolonilerini stimule eder, miyoblastlarının migrasyonunuda rol oynar (2).

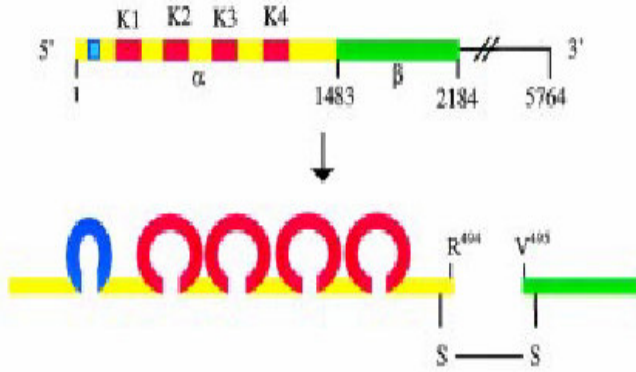
HGF geni, kromozom 7q21.1 üzerinde bulunmaktadır.18 ekson ve 17 introndan oluşmaktadır. Yaklaşık 70 kb uzunluğundaki bu dizi üzerinden elde edilen 6 kb uzunluğundaki transkriptin translasyonu ile, 728 amino asit içeren büyük bir protein meydana gelir(1). Sentez aşamasının başında büyük ölçüde inaktif, tek zincirli bir öncül iken (pro-HGF) proteolitik işlem sonucunda iki zincirli aktif heterodimer yapıya dönüşür. Pro-HGF'in kesilerek HGF yapısına dönüşümünde bazı koagülasyon faktörleri (X, XI, XII, XIIa), doku tip plasminojen aktivatörü (tPA), ürokinaz plasminojen aktivatörü (uPA) ve HGF aktivatörü (HGFA) gibi bazı serum serin proteazlar önemlidir (10,11,12). Ancak bu gibi serin proteazlar ile karşılaştırıldığında HGFA'nın HGF'e yönelik proteolitik aktivitesi daha güçlüdür (13,14). HGFA molekülü de HGF'e benzer şekilde inaktif halde sentezlenip salgılanmakta ve aktivasyonu için trombin gibi serin proteaz ya da proteazlar tarafından kesilmesi gerekmektedir.

Olgun HGF, birbirine disülfid bağları ile bağlı olan 60 kDa ağırlığında α -ağır zincir (1-494. amino asitler) ve 30 kDa ağırlığında β -hafif zincirden (495-728. amino asitler) oluşmaktadır. Ağır zincir yapısında dört kringl bölge (K1-K4) ve bir adet saç tokası yapısı bulunmaktadır ki bu bölüm, heparin bağlama bölgesi ile yüksek homoloji göstermektedir.Hafif zincir yapısında ise bazı rezidülerdeki mutasyonlara bağlı olarak enzimatik aktivitesini kaybetmiş olan serin proteaz homoloji (SPH) bölgesi yer almaktadır . HGF yapısında yer alan bölgeler Şekil 1'de gösterilmiştir.

Delesyona dayalı çalışmalar, birinci kringl bölgenin (NK1) reseptöre bağlanmadan sorumlu olduğunu ve nokta mutasyon analizleri ise bu işlemde iki amino asit grubunun

(E159, S161, E195, R197 ve D171, Q173) gerekli olduğunu göstermiştir. Yapısında yalnızca birinci kringl bölgeyi içeren NK1 varyantı ise c-Met reseptörüne bağlanabiliyor olmanın yanı sıra, fosforilasyonu indükleyebilmekte ve hücre proliferasyonu ile hücre saçılımını başlatabilmektedir. HGF yapısındaki α -zincir ya da ikinci (NK2) veya üçüncü (NK3) kringl bölge sonrası kesilmiş olan varyant proteinler c-Met reseptörüne bağlanabilmekte ancak mitogenez gibi bazı biyolojik fonksiyonlarını yerine getirememektedir. Öneğin NK2, MDCK epitel hücrelerinin ayrışmasına neden olurken, proliferasyonlarına etki edememektedir.

Bir modele göre, N bölgesi ile ikinci kringl bölge arasındaki etkileşim sonucu oluşan pozitif yüklü bölge negatif yüklü glikozaminoglikanlar için bağlanma bölgesi oluşturmaktadır. İkinci bir modele göre ise, NK1 molekülünün amino terminal bölgesi (N), farklı NK1 moleküllerinin kringl bölgeleri ile hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler aracılığıyla yakın ilişki kurmaktadır. Heparin ve heparan sülfatlar, HGF dimerizasyonunda önemli fonksiyona sahiptir. Heparin yokluğunda NK1 monomer olarak davranırken, heparin varlığında dimere çevrilmektedir. NK1, hücre yüzeyinde uygun proteoglikanların bulunması durumunda HGF agonisti olarak davranırken, glikozaminoglikanların bulunmaması durumunda antagonist olarak davranmaktadır (15,16,17).



Şekil 1: HGF c DNA ve olgun proteinin şematik gösterimi (17 no'lu kaynaktan alınmıştır).

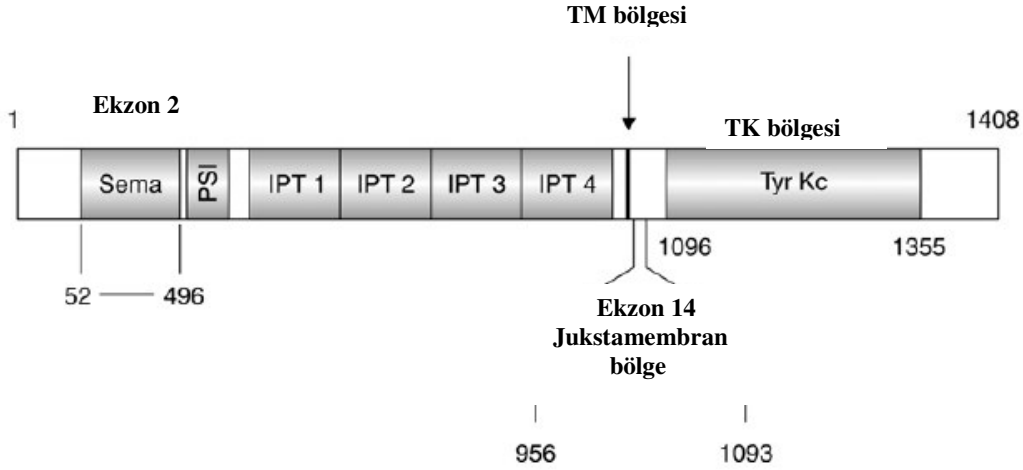
2.3. Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü: c-Met

HGF'in reseptörü tirozin kinaz olan c-Met'tir (17). Reseptör tirozin kinazlar memeli gelişiminde hücre fonksiyonu ve doku homeostazındaki anahtar işlevleri düzenlerler. Bunların arasında hücre büyümesi ve sağkalımı, organ morfogenezi, damar oluşumu, doku tamiri ve rejenerasyon sayılabilir.

c-Met, 7 numaralı kromozomun 7q21-q31 bantları arasında yerleşmiştir. 20 intron ve 21 ekzon içeren yaklaşık 120 kb uzunluğunda bir genden kodlanmaktadır (18).

c-Met, ligandı HGF ve aktivatörü HGFA'ya benzer şekilde prekürsör molekülün bir dizi modifikasyon geçirerek olgun hale dönüşmesiyle meydana gelmektedir. Normal hücrelerde, primer Met transkripti üzerinden 150 kDa'luk bir polipeptid sentezlenir. Bu yapının kısmen glikozillenmesiyle 170 kDa büyüklüğünde prekürsör protein elde edilir. Prekürsör molekülün ise yeniden glikozillenerek 307 ve 308. rezidüer arasındaki furin bölgesinden kesime uğramasıyla birbirine disülfid bağları ile bağlı 50 kDa büyüklüğünde α -zincir ve 140 kDa büyüklüğünde β -zincirden oluşan heterodimer yapı meydana gelir. α -zincir yapısında tek bir hücre dışı bölge, β -zincir yapısında ise büyük bir hücre dışı bölge, transmembranal bölge, jukstamembran bölge ve hücre içi tirozin kinaz bölgesi bulunmaktadır. c-Met yapısında bulunan fonksiyonel yapılar ile bölgeler Şekil 2'de görülmektedir. Bu yapının N ucunda Sema bölgesi, pleksin, semaforin ve integrinlerde bulunan PSI bölgesi, TIG bölgesi olarak da bilinen ve immunoglobulin, pleksin ve transkripsiyon faktörlerinde bulunan IPT tekrarları, transmembran (TM) ve jukstamembran (JM) bölgeleriyle karboksi ucunda hücre içi tirozin kinaz (TK) bölgesi yer almaktadır (20).

c-Met yapısındaki bölgelerin fonksiyonları hakkındaki bilgiler son yıllarda gerçekleştirilen mutagenез deneyleri sonucunda elde edilmiştir. Reseptörün α -zincir yapısı ile β -zincirinin ilk 212 rezidüelık bölümünün HGF/SF bağlanması için yeterli olduğu bilinmektedir. c-Met'in bu bölümü semaphorin akson yapı proteinlerinin 'SEMA' bölgesine homologdur ve spesifik bir β -tabakalı katlanma yapısına sahiptir. Benzer katlanma integrinlerin α zincirinin amino ucunda da bulunmaktadır ve protein-protein etkileşimlerinde önem taşımaktadır (21).

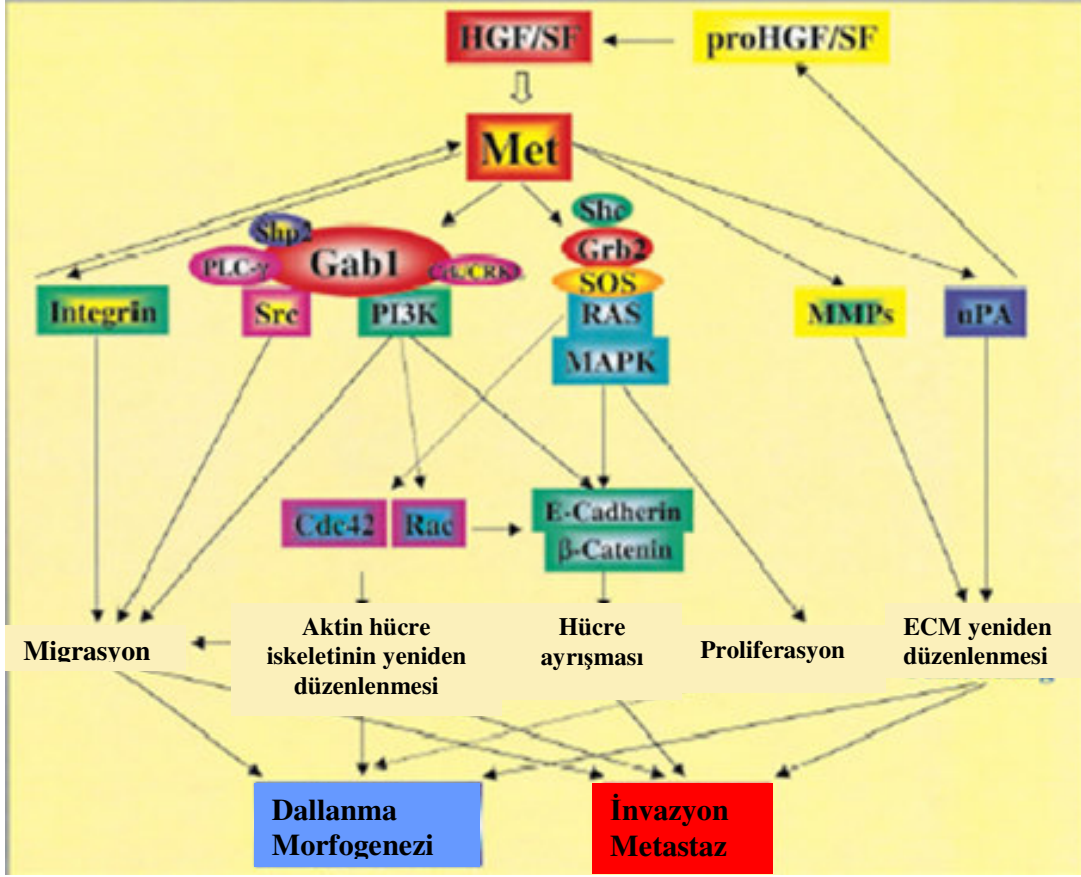


Şekil 2: c-Met yapısında bulunan işlevsel bölgeler (20 no'lu kaynaktan modifiye edilmiştir).

2.4. HGF/c-Met ve Karsinogenez:

HGF/c-Met sinyal ileti yolağının kontrolü birçok kanser gelişiminde önem taşımaktadır. HGF ve/veya *c-MET*'in karsinomalarda, solid insan tümörleri ve metastazlarında ekspresyonunun artmış olduğu gözlenmektedir. Ekspresyon artışı ise çoğu zaman kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir. Çoğu neoplazmda özellikle melanomlarda hem HGF/SF'ün hem de *c-Met*'in ekspresyonları artmıştır(22). Tümör hücrelerinde *c-MET* ya da HGF ekspresyonunun baskılanması ise hücrelerin tümörojenik potansiyelini azaltmaktadır (23). HGF sinyal yolu başta kolon, meme, akciğer, tiroid ve renal karsinomalar, melanoma, sarkomalar ve glioblastoma olmak üzere çeşitli kanser tipleri ile yakından ilişkilidir (24). Örneğin, insan renal papiller karsinomasında *c-MET*'in hem sporadik hem de kalıtsal mutasyonları HGF sinyal yolunun konstitütif olarak aktif olmasına neden olmaktadır (25). Papiller renal karsinomalı hastaların genetik olarak incelenmesi sonucu *c-MET* geninde missense mutasyon olduğu ve bu sekiz farklı bölgedeki mutasyonun *c-Met* reseptörünün tirozin kinaz bölgesinde olduğu saptanmıştır (26). Reseptörün kinaz bölgesini etkileyen bu mutasyonlar diğer kanser tiplerinde ve metastatik lezyonlarda da saptanmıştır (27).

HGF/SF ve *c-MET*'in proliferasyon, anjiogenez, invazyon ve metastaz gibi tümör oluşumunda etkili olan olaylarda rolü oldukça iyi tanımlanmıştır (Şekil 3).



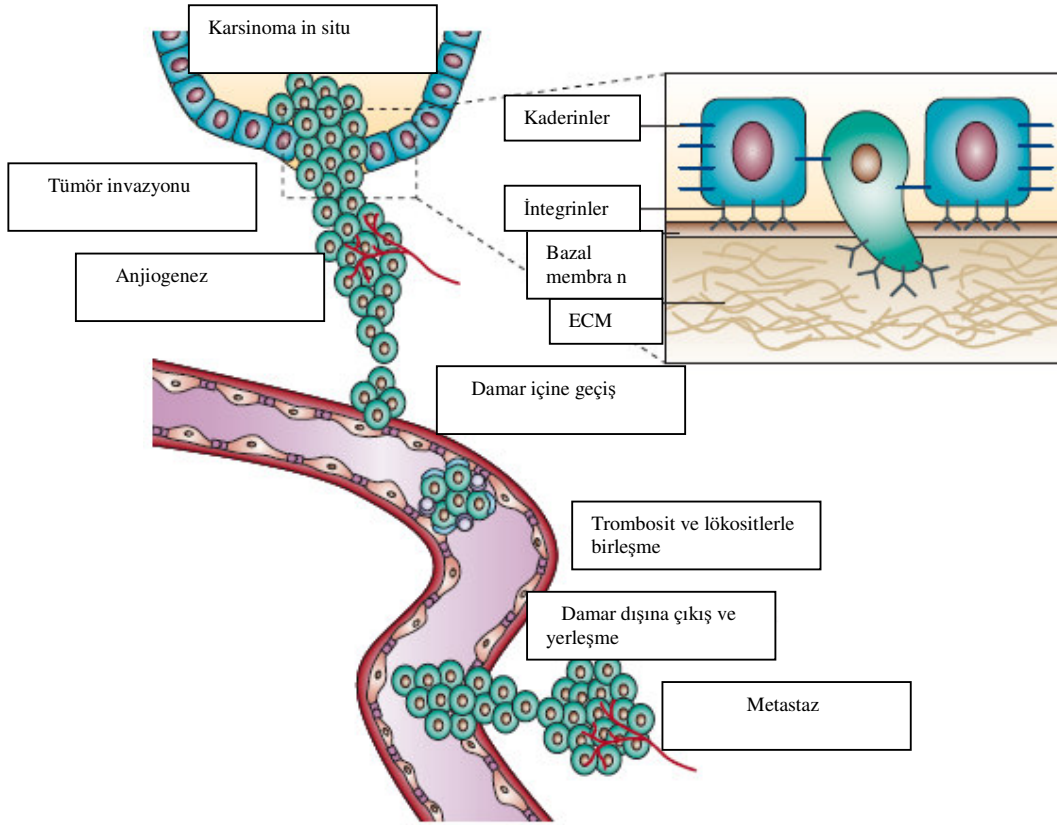
Şekil 3: HGF/c-Met ana sinyal ileti yolları (28 no'lu kaynaktan modifiye edilmiştir).

2.5. HGF/c-Met Sinyal İletimi ve Metastaz İlişkisi

Tümör hücre metastazı için ECM'in proteolizisi, kanser hücrelerinin E-kaderin bağımlı hücre içi adezyonlarının (hücre-hücre bağlantılarının) bozulması, hücre motilitesinde artış ve neoplastik hücrenin ECM içine invaze olarak dolaşıma katılması gerekmektedir (Şekil 4). HGF/c-Met sinyal yolu hücre motilitesi ve proteaz üretiminde artış ile birlikte hücre ayrışmasını uyarmakta, bunun sonucunda ise hücre dışı matris içerisine invazyon ve *in vivo* koşullarda tümör metastazına neden olmaktadır (29).

Tümör invazyonundaki en önemli basamaklardan bir tanesi neoplastik hücrenin ECM ile etkileşimidir. ECM'in temel bileşenleri arasında kollajen, laminin ve heparan sülfat proteoglikanlar bulunmaktadır. ECM degradasyonu, plazminojen aktivatörü (uPA) ve matris metalloproteinaz (MMP) gibi proteinazların üretimini gerektiren oldukça dinamik bir olaydır (30).

HGF/c-Met ve integrin sinyal iletimi bazı solid tümörlerde HGF/c-Met stimülasyonu MAPK1/2 üzerinden serin proteaz ürokinaz (uPA) ve reseptörü (uPAR)'ın ekspresyonunu artırmakta ve hücre yüzeyinde uPA artışına neden olmaktadır. uPA ise plazmin proteazına dönüştürmek üzere plazminojeni keserek bazı ECM ve bazal membran bileşenlerinin degradasyonuna etki etmektedir (31). Motilite, saçılım ve invazyondaki artış tümör hücresinin ECM'e invazyonunu sağlayarak dolaşıma geçen tümör hücresinin beyin, karaciğer, kemik ve kemik iliği gibi uzak dokulara metastaz yapmasına yol açmaktadır. Tümör-konakçı mikroçevresinde, tümör hücreleri tarafından VEGF, bFGF salgılanırken, konakçı stromal hücreleri tarafından HGF, uPA ve MMP'lar salgılanmaktadır. HGF'in kanser hücrelerinden MMP2, MMP7, MMP9 ve uPA gibi proteolitik enzimlerin ekspresyonunu veya sekresyonunu artırdığı bildirilmiştir. HGF'in VEGF'in ekspresyonunu azalttığı da belirtilmiştir. Ayrıca HGF'in E-kaderin - β -katenin birlikteliğinin kaybına neden olarak hücre- hücre bağlantılarını bozulmasını desteklediği de bilinmektedir (19).



Şekil 4: Metastatik süreç (46 no'lu kaynaktan modifiye edilmiştir).

2.6. Hücre Dışı Matris ve Bileşenleri:

ECM, hücreler tarafından matrisi oluşturmak üzere salgılanan, fibronektin, kollajen, laminin, hiyaluronat, heparan sülfat, elastin gibi çeşitli protein ve polisakkaritleri içeren kompleks bir ağdır. Her hücre tipi, oluşturdukları dokunun fonksiyonel gerekliliğine bağlı olarak belirli kombinasyonlarda ECM bileşenlerini üretirler (32). Çok hücreli organizmalardaki çoğu hücre, ECM'i oluşturan bileşenlerle, hücre dışı kollajenler, proteoglikanlar, adhezyon proteinleri ile büyüme faktörleri, kemokinler ve sitokinler ile olduğu gibi sıkı bir ilişki içindedir. Birçok ECM proteinleri, 30 gen ile tanımlanan kollajenler ve 12 gen ile tanımlanan lamininlerle geniş bir aile oluşturur (33).

ECM bileşenleri, yapısal olarak, iskelet oluşturma, esneyebilen destek sağlama, farklı doku tipleri arasında bağ oluşturma, büyüme faktörleri, sitokin ve kemokinler için depo yeri oluşturma gibi işlevleri vardır. Biyolojik olarak ise hücre polaritesinin belirlenmesi, hücre adhezyonu, morfogenez/diferansiyasyon, migrasyon, proliferasyon ve apoptoz gibi biyolojik olaylarda da önemli role sahiptir (34,36).

ECM, fibröz (lifsel) proteinler, adeziv glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşmaktadır.

2.6.1. Fibröz (Lifsel) Proteinler:

ECM' de bulunan başlıca lifsel proteinler kollajen ve elastindir. Çeşitli ECM'lerin özellikleri, kollajen ve elastinin doku bileşimindeki oranlarına göre değişmektedir.

Kollajen, insan vücudunun en yaygın olarak bulunan proteindir. Toplam proteinlerin %30'unu, toplam vücut ağırlığının %6'sını oluşturur. Temel fonksiyonu, vücut organ ve dokuları şekillendirmek, yapısal kuvvet sağlamaktır. Kollajen karaciğer dokusunun %12-24'ünü, kıkırdağın %50'sini, korneanın %68'ini, derinin %72'sini oluşturur. Kollajenin biyomedikal önemi, ateroskleroz, karaciğer sirozu, romatoid artrit gibi patolojilerde ortaya çıkmıştır. Değişik kollajen zincirlerinin kombinasyonu ile değişik tiplerde kollajenler ortaya çıkmıştır. Tüm bazal membranlarda bulunan kollajen tipi fibrilsiz ağ yapısıyla kollajen IV ($\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$)' tür.

Elastin de kollajen gibi mezenşimal kaynaklı bir proteindir. Ancak, kollajen liflerden farklı olarak elastik lifler, uzunluklarının birkaç katı kadar uzayabilirler ve eski durumlarına geri dönebilirler. Ayrıca elastin, yine kollajen de farklı olarak karaciğer ve korneada bulunmamaktadır (35).

2.6.2. Adhesif Glikoproteinler:

Liflerin arasını dolduran temel maddenin moleküler bileşenleri olarak adhesif glikoproteinler önem taşırlar.

En iyi tanımlanmış ve en eski bilinen adeziv özellikli matriks proteinleri fibronektin ve kollajendir. Daha sonra laminin, trombospondin, tenasin, von Willebrand faktör, vitronektin, entaktin de tanımlanmıştır. Adhesif glikoproteinlerinin tümü multifoksiyoneldir. Her biri, hem hücreler, hem de diğer matriks proteinleri için, birbirinden ayrı, bağımsız yapısal bölgeler içerir. Birçok glikoproteinler, arjinin-glisin-aspartat (RGD) dizilimini, hücre tanıma yüzeyi olarak içerirler. Bu proteinlerin hücrelerle etkileşimi, bir transmembran reseptör ailesi olan integrinler aracılığıyla gerçekleşir (35).

2.6.3. Proteoglikanlar:

Proteoglikanların özellikleri, proteinlerden çok polisakkaritleri andırmaktadır. Bileşimlerinin %95 ya da fazlası karbonhidrattan kalan kısmı proteinlerden oluşan kompleks makromoleküllerdir. Proteoglikanlar, yüksek molekül ağırlıklı ve polianyonik bileşiklerdir. Yapılarında, kor proteine kovalent bağlı en az bir glikozaminoglikan (GAG) içerirler. (35).

2.6.4. Proteoglikanların Glikozaminoglikan Bileşenleri:

Glikozaminoglikanlar, vücutta en fazla bulunan heteropolisakkarit grubudur. Bağ dokunun ve ECM'in yapısal bileşenleri gibi davrandıkları gibi, hücre yüzeyi ve çevresi arasında spesifik ligandlar olarak da davranırlar. Bunlar arasında, hiyaluronik asit, kondroitin sülfatlar, dermatan sülfatlar, heparin ve heparan sülfatlar, keratan sülfatlar sayılabilir

Altı değişik tür glikozaminoglikan bulunmakla birlikte, bunların bazı ortak yönleri vardır. Uzun heteropolisakkarit zincirler, disakkarit tekrarlayan birimlerden oluşmaktadır. Bu disakkaritteki şekerin biri heksozamin, diğeri üronik asittir. Glikozaminoglikanların ortak bileşenlerinden biri sülfat gruplarıdır. Fakat hiyaluronik asit istisna olarak sülfat içermez.

GAG zincirleri değişik por çaplı ve yüklü jeller oluşturur; moleküllerin giriş-çıkışını kontrol ederler (35).

2.6.5. Heparin ve Heparan Sülfat:

Heparini diğer glikozaminoglikanlardan birçok yönleriyle ayırır. Temel maddedeki diğer glikozaminlerden farklı olarak, alfa glikozidik bağ içerir. Heparin, mast hücrelerinin hücre içi bileşenidir.

Heparan sülfat, heparine benzer bir disakkarit tekrarlayan ünitesi içermekle birlikte, daha çok N-asetil daha az N-sülfat grupları ve daha düşük oranda O-sülfat grupları içerir. Heparan sülfat hücre dışı bir yerleşim göstermesi ile heparinden ayrılmaktadır. Heparin gibi antikoagülan aktivite göstermez (35).

Sağlıklı bir karaciğerdeki GAG'ların oranı incelendiğinde, heparin sülfat ve heparin (yaklaşık 65%), dermatan sülfat (yaklaşık 13.5%) hiyaluronik asit (yaklaşık 13%) ve az miktarda kondroitin sülfat olduğu görülmektedir. Hepatik karsinomlarda, özellikle kondroitin sülfat ve hiyaluronik asit miktarları belirgin bir şekilde artmaktadır.

HSPG'lar hem hücre yüzeyinde hem de ECM'de bulunurlar. HSPG'lar yerleşimlerine bağlı olarak (hücre yüzeyinde bağlı olarak, soluble olarak), tümörögenezi uyarabilir veya baskılayabilir. Hücre yüzeyinde bulunan HSPG'lar tümörögenezi, kontrolsüz hücre büyümesine neden olan otokrin sinyalleri düzenleyerek düzenlerler. Fonksiyonlarında ayrıca bağlantılı oldukları sinyal molekülleri ve yapıları önemlidir (36).

Heparin ve heparin sülfatlar, büyüme faktörlerine bağlanarak büyüme faktörlerinin biyolojik etkilerini düzenlerler (37). Bu büyüme faktörleri arasında FGF, KGF ve HGF sayılabilir. HGF ve HSPG'lar arasındaki etkileşim, HGF aktivitesinin düzenlenmesinde *in vivo* ve *in vitro* olarak kritik rol oynamaktadır. Heparin eklenmesi, heparan sülfatı (HS) eksik CHO hücrelerinin liganda bağlanabilmesini ve ayrıca ligand bağımlı c-Met aktivasyonunu ve *c-fos* ekspresyonunu artışına neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca K1 ile uyarılan hücre yüzeyi HS 'ı olmayan 32D/c-Met hücrelerinin heparin eklendiğinde, HGF oligomerizasyonunun artması yoluyla HGF sinyal iletiminin gerçekleştiği de gösterilmiştir (38, 39).

Heparinin sadece *c-MET* eksprese eden hücrelerde DNA sentezini artırarak, hücre proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir (40). HGF, heparin ve diğer heparin sülfat proteoglikanlara karşı yüksek affiniteye sahiptir. Heparinin ayrıca insanda ve çeşitli hayvan modellerinde sitoplazmadaki HGF ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (41).

Heparin ve heparan sülfatlar birçok büyüme faktöründe olduğu gibi HGF'in de bölgesel konsantrasyonunu ve biyolojik aktivitesini etkilediklerinden, HGF/c-Met sinyal ileti yolağı ile HSPG'ların, HCC gelişimi ve metastazı açısından çok kritik bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir.

2.7. Hücre - Hücre Dışı Matris İlişkisi:

Tümör çevresi, malign hücrenin davranışının belirlenmesinde önemli bir faktördür. Kanser hücreleri ile mikro ve makroçevresi arasındaki etkileşim tümörün büyümesine olanak sağlayacak ve tümörü immün saldırıdan koruyacak bir ortam oluşturur. Kanser hücreleri ile

çevrelerindeki dokuların fonksiyonel birleşmesi malignansi gelişimini değiştirir. Lokal tümör invazyonu ve metastaz oluşumu için gerekli olan hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimindeki moleküllerin ekspresyonlarının değişmesi ile ECM yeniden düzenlenir. Hücrenin, ECM ve komşu hücrelerle etkileşimi, davranışlarının kontrolünde rol oynayan birçok önemli yanıtı başlatır.

ECM, hücrelerin yaşaması için fiziksel ortam sağlarken, hücrenin yerleşmesi, tutunması, migrasyonu, yara iyileşmesi, morfonegez gibi birçok hücrenel olayın gerçekleşmesinde önemli role sahiptir. Ayrıca ECM, hücrenin yaşamını etkileyecek, proliferasyonu, differansiyasyonu ve ölümü ile ilgili çevresel sinyallerin hücrelere iletilmesinden sorumludur Bu nedenle kültüre edilen hücreler için uygun matrisin seçilmesi hücrenin cevabı açısından çok önemlidir. Hücrenin yaşamı matrisi ile yoğun ve kompleks bir bağlantıyı içerir (42).

Son yıllarda , *in vitro* koşullarda, çeşitli normal ve kanser hücre tiplerinin sağkalımı ile, ECM 'e adhezyon arasında yakın bir bağlantı olduğu gösterilmiştir. Bu bağlantılarda rol oynayan moleküller arasında integrinler yer almaktadır. İntegrinler, hücre –ECM bağlantısının kurulmasını sağlayan en önemli moleküllerdir. Hücre- ECM etkileşimindeki değişiklikler tümör hücrelerinin invazyon ve metastazında önemli rol oynar (7).

2.8. İntegrinler:

Birbiri ile kovalent bağlı alfa ve beta heterodimerinden oluşan transmembran glikoproteinlerdir. İntegrinlerin moleküler yapıları alfa ve beta olmak üzere iki alt üniteden oluşmaktadır (Şekil 5). İntegrinlerin hücre dışında kalan ve ligandlara bağlanan bölümünde her iki alt birim görev almaktadır ve bu birimlerin sitoplazmik uçları hücre iskeleti ile birleşmiş durumdadır. Bu yapısal özellikleri nedeniyle integrinler hücre iskeleti ile ECM arasında çok sağlam bir bağ kurabilmektedir. Bugüne kadar 18α ve 8β alt ünitesiyle 24 integrin tanımlanmıştır (43). İntegrinlerin çoğu RGD sekans veya peptid olarak bilinen, spesifik 3 amino asit sekansına (arjinin-glisin-aspartat) bağlanabilir.

Hücre yüzeyinde bulunan integrinler açık veya kapalı konformasyonda bulunabilirler. Aktivasyon, ligand bağlanması veya sitoplazmik bölgeler aracılığı ile hücre içinden gelen sinyallerle olabilir (44).

Hücreleri apoptozdan korumada yardım etmelerinin yanında, integrinlerle oluşturulan adezyonun, hücre büyümesi, motilitesi, aktin hücre iskeletinin organizasyonu gibi birçok sinyal yolağını stimule ettiği gösterilmiştir. İntegrinler, migrasyon, proliferasyon, sağkalım ve

apoptoz ile ilgili yollarda rol oynamaktadır (Şekil 9). İntegrin bağımlı sinyal yolları Ca, potasyum kanalı aktivasyonu ve sitoplazmik proteinlerin tirozin fosforilasyonunu da içerir. İntegrinler hücre dışında vitronektin, fibronektin, kollajen ve laminin gibi ECM bileşenleri ile, sitoplazmik bölgede ise aktin filamentler gibi hücre iskeleti elemanları ile etkileşim içindedirler (45). Belirli integrinler belirli ECM bileşenleri ile ilişkilidir (Şekil 6) (46).

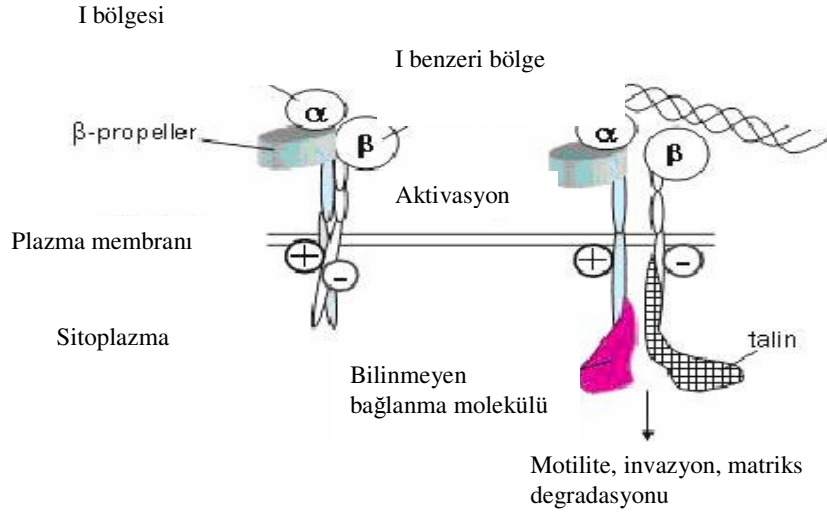
Hücre yüzeyinde ekspresyonları hücrelerin birbirleriyle ve ECM'deki fibronektin, laminin gibi proteinlerle bağlanmasını kolaylaştırır. İntegrinler ECM proteinlerinin yapılanmasını ve ECM'in koşullara göre değişmesini sağlamaktadırlar. İntegrin ekspresyonlarındaki değişikliklerin fonksiyonu tam olarak açık değildir, ama olasılıkla hücrenin adhesif davranışını değiştirirler ve ECM'den gelen farklı sinyalleri iletirler. İntegrinler reseptör tirozin kinazların (RTK) aktivasyonlarının kontrolünde spesifik rol oynarlar ve sağkalımla ilgili ve mitojenik yollarda RTK lar ile birlikte çalışırlar (47). İntegrinler, bazal membranı degrade eden proteolitik enzimlerin aktivitelerini düzenlemede de görev alırlar.

Büyüme faktörleri ile ECM arasındaki yakın kollaborasyonun çeşitli biyolojik süreçte önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Hücrelerin büyüme faktörlerine cevabı integrinlerin spesifik ECM glikoproteinlerine bağlanması ile gerçekleşir (48). İntegrinler ve büyüme faktörü reseptörleri arasındaki fiziksel etkileşim, farklı sinyallerle sonlanır. Sinyal büyüme faktörü reseptörü ile başlatılır ve bundan etkilenen integrin birleşmesi gerçekleşebilir (Şekil 7a), integrinlerin ECM bileşenlerine bağlanması adezyon-bağımlı, ligand bağımsız aktivasyonu integrin bağımlı büyüme faktörü reseptör aktivasyonuna neden olabilir (Şekil 7b) veya integrinler adhesif özelliklerinden bağımsız olarak büyüme faktörü bağımlı sinyal iletimine katılabilirler (Şekil 7c) .

HGF'in reseptörü Met ile integrin $\alpha 6\beta 4$ ile oluşan kompleks, Met'in aktivasyonu, $\beta 4$ sitoplazmik kuyruğunun fosforillenmesi ve diğer sinyal moleküllerinin uyarılması ve Met sinyalinin genişlemesi ile sonlanır (Şekil 7c). Çeşitli hücre tiplerinde yapılan çalışmalarda, HGF uyarısı ile aktive olan veya olmayan çeşitli integrin tipleri tanımlanmıştır (Şekil 8).

Kanser hücreleri metastatik olduğunda ECM'e affinite ve aviditelerinde değişiklik meydana gelir. Bu değişikliklerden bazıları integrinlerin ekspresyonlarındaki farklılıklarından kaynaklanır. Birçok çalışmada aynı tip malign hücreler ve preneoplastik tümörler arasında integrinlerin yüzeydeki ekspresyonları ve dağılımları açısından önemli farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Kanser hücreleri sağkalmak ve çoğalmak için ECM'e adezyona daha az bağımlı olsalar da tümör başlangıcında ve progresyonunda integrin sinyallerinden

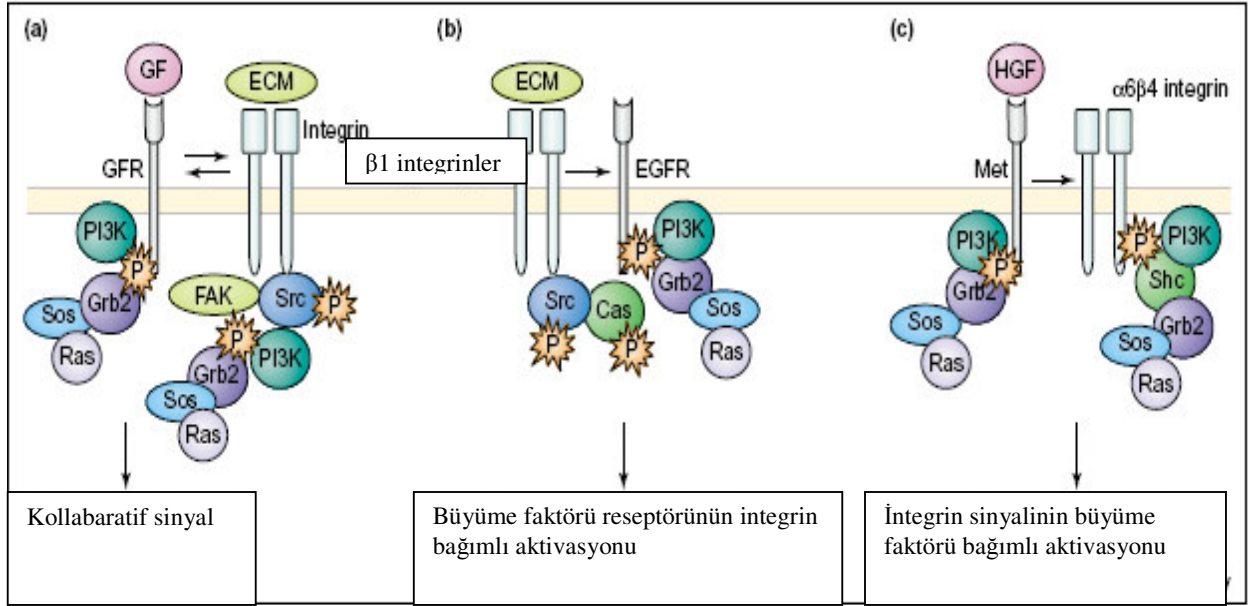
yararlanırlar. Birçok çalışmada adhesif özellikleri değişmiş tümör ve transforme hücrelerin ekspresyon paternlerinin ve integrinlerine affinitelerinin değiştiği gösterilmiştir (49).



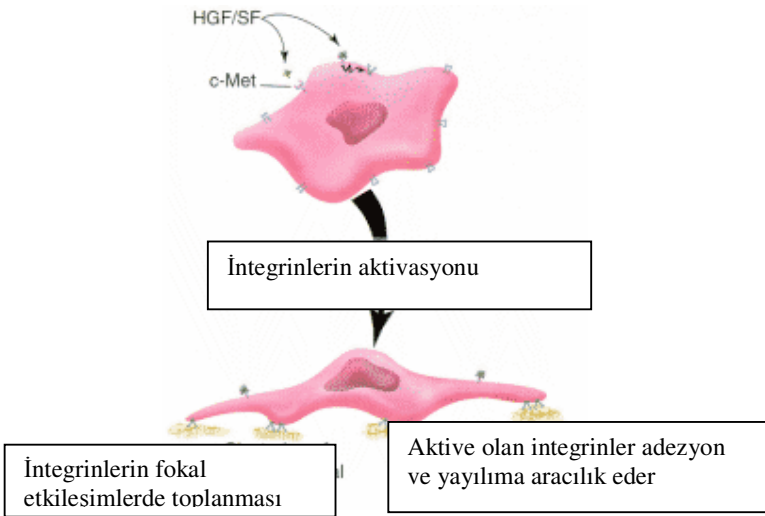
Şekil 5: İntegrin yapısı ve sinyal oluşumu (50 no'lu kaynaktan modifiye edilmiştir).

İntegrin $\alpha 1\beta 1$	Laminin, kollajen
İntegrin $\alpha 2\beta 1$	Laminin, kollajen
İntegrin $\alpha 3\beta 1$	Laminin, kollajen, fibronektin, epiligrin, entaktin
İntegrin $\alpha 4\beta 1$	Fibronektin
İntegrin $\alpha 5\beta 1$	Fibronektin
İntegrin $\alpha 6\beta 1$	Laminin, merosin, kalinin
İntegrin $\alpha 7\beta 1$	Laminin
İntegrin $\alpha 8\beta 1$	Fibronektin
İntegrin $\alpha 9\beta 1$	Tenaskin
İntegrin $\alpha v\beta 1$	Fibronektin, vitronektin
İntegrin $\alpha 6\beta 4$	Laminin
İntegrin $\alpha 4\beta 7$	Fibronektin
İntegrin $\alpha v\beta 3$	Fibronektin, fibronojen, von Willebrand faktör, vitronektin, denatüre kollajen
İntegrin $\alpha v\beta 1$	Fibronektin, vitronektin
İntegrin $\alpha v\beta 5$	Vitronektin, osteopontin
İntegrin $\alpha v\beta 6$	Fibronektin
İntegrin $\alpha v\beta 8$	Fibronektin

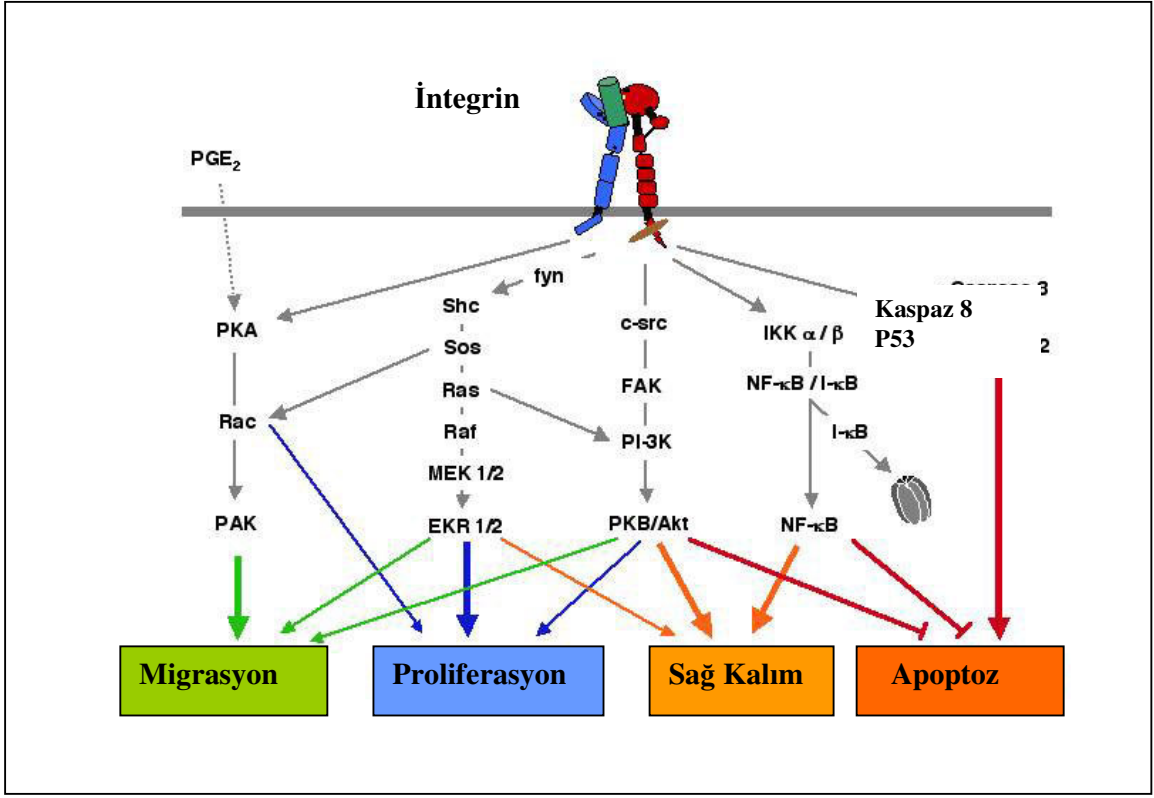
Şekil 6: Bazı integrin ailesi üyeleri ve ligandları (46 no'lu kaynaktan modifiye edilmiştir).



Şekil 7: İntegrinler ve büyüme faktörü reseptörleri arasındaki fiziksel etkileşim (51 no'lu kaynaktan modifiye edilmiştir).



Şekil 8: HGF/c-Met sinyali ile integrin aktivasyonu (52 no'lu kaynaktan modifiye edilmiştir).



Şekil 9: İntegrin ana sinyal ileti yollarları (50 no'lu kaynaktan modifiye edilmiştir).

İntegrinlerin bazı hücre içi sinyal ileti yollarını düzenleyebilmesi için hücre-hücre bağlantısının kurulmasındaki en önemli moleküllerden biri olan kaderinler ile arasında bir etkileşim vardır (Şekil 4) (53).

E-kaderin, hücre adezyonunun ve doku bütünlüğünün kurulmasından sorumlu transmembran bir glikoproteindir. E-kaderin doku bütünlüğünü α , β , γ kateninlerle birlikte sağlar. E-kaderin/katenin kompleksleri, çeşitli insan karsinoma hücrelerinin gelişiminde ve invazif fenotip kazanmalarında anahtar rol oynamaktadırlar (54).

HGF indüksiyonundan hemen sonra, migrasyon önceki olaylardan birinin E-kaderin bağlantılarının bozulması olduğu da belirlenmiştir (55).

Yapılan araştırmalar, epitel kanser hücrelerinin oluşumuna neden olan hücre adezyon moleküllerinden E-kaderinin kaybolduğunu göstermiştir. E-kaderin ekspresyonundaki değişikliklerin, sadece tümör hücre adezyonunu modüle etmediği, sinyal iletimini de etkileyerek tümör malignansisinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (53). E-kaderinin invazyon ve metastazı baskılayıcı özelliği olduğu da bildirilmiştir (56).

Adezyon moleküllerinin yapı ve işlevleri, ECM ile ilişkilerini inceleyen çok sayıda çalışma olmakla birlikte, büyüme faktörleri ile ECM elemanlarının hücre davranışlarını ve

integrin gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonlarını nasıl etkilediğine yönelik yeterli bilgi yoktur. ECM bileşenlerinin ve HGF'in HCC gelişimi ve progresyonundaki rolü tam olarak tanımlanmamıştır. Bu çalışma ile kollajen, laminin, fibronektin gibi adeziv ECM glikoproteinlerin, heparin ve HGF in adezyon, motilite ve proliferasyon gibi hücre davranışlarına ve integrin ekspresyonuna etkisi incelenmiştir. Heparinin HGF'e bağlı biyolojik yanıtları etkilemesinden sorumlu mekanizmanın tanımlanabilmesi amacıyla HGF ile uyarılmış SK-Hep1 HCC hücre dizilerinde heparin uygulamasına bağlı gen ekspresyonu değişiklikleri ise cDNA mikrodizin yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER:

3.1. Hücre Hatları ve Hücre Kültürü:

Çalışma sırasında kullanılan farklı özelliklerdeki HCC hücre hatları (SK Hep1, Huh7, HepG2) Prof. Dr. Mehmet Öztürk, Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ankara, tarafından hediye edildi. Hücreler %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom, S0115), %1 penisilin/streptomisin (Biological Industries, 03-031-1C) ve %1 L-Glutamin (Biochrom, K0283) içeren Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM, Sigma, D5546) besi ortamı içerisinde, 37⁰ C'de ve %5 CO₂ varlığında hücre kültürü inkübatöründe (Heal Force, HF90) üretildi. Faz kontrast mikroskobu (Nikon, Phase Contrast-2, LWD 052, 202086) ile düzenli aralıklarla kontrol edilen hücreler yeterli sayıya ulaştığında bir bölümü çalışmada kullanılırken bir kısmı pasajlanarak donduruldu ve -80 °C'de saklandı. Bütün hücre kültürü basamakları steril kabinet (Aura Vertical S.D.4, C5681) içerisinde ve steril malzeme kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2. HGF ile Stimülasyon:

Tüm deneylerde 40 ng/ml olacak şekilde HGF (MY 111, Dr. Donald P. Bottaro, NIH, NCI tarafından sağlandı) kullanılarak stimülasyon yapıldı (38). HGF dilüsyonları için Tris-BSA* kullanıldı. Stimülasyon adezyon deneyleri için deney sırasında ve 15 ve 60 dk süre ile, diğer deneylerde ise 24 saat süre ile uygulandı.

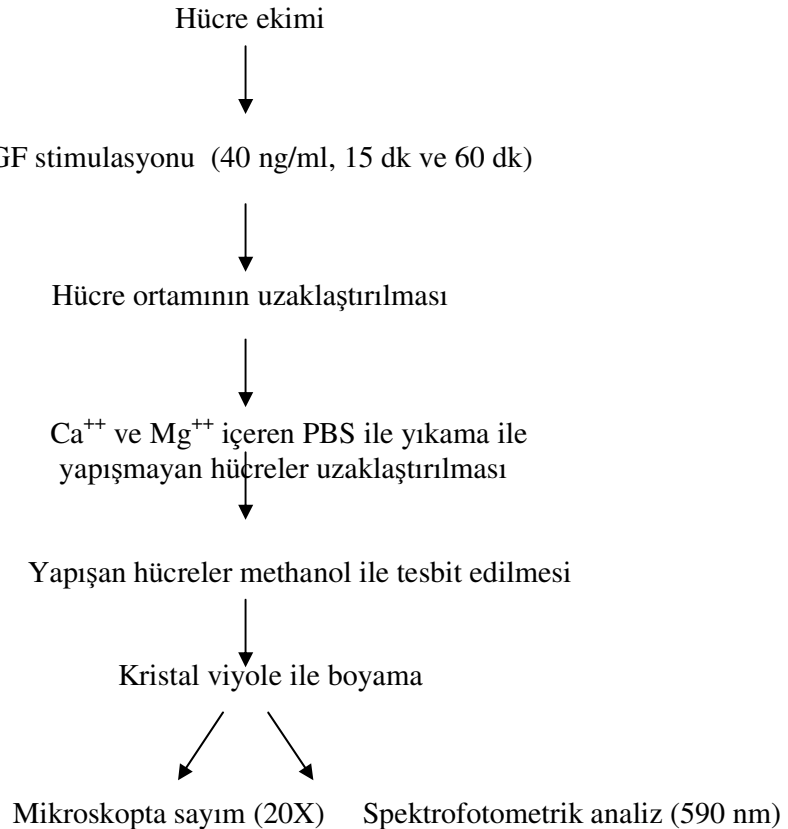
3.3. Hücre Koloni Oluşturma Deneyleri:

SK Hep1 hücreleri 1000 hücre/hücre kültür kabı (kollajen kaplı, PDL kaplı, standart) olacak şekilde ekim yapıldı. İki hafta süresince hücreler incelendi ve koloni oluşturmaları beklendi. 14 gün sonunda yaklaşık 30-50 hücreden oluşan koloniler Giemsa boyası ile boyanarak sayılabilir hale getirildi. Hücre kültür kapları içindeki ortam uzaklaştırıldı ve 3 kere 1xPBS* ile yıkandı. 5ml/25 cm² olacak şekilde PBS: metanol (1:1) solusyonu eklendi ve 5 dakika bekletildi. 5 dakikanın sonunda solusyonun %50 si uzaklaştırıldı ve uzaklaştırılan miktar kadar metanol eklenip 15 dakika bekletildi. Tüm solusyon uzaklaştırılıp 5ml/25 cm² olacak şekilde taze saf etanol eklenip 3 dakika bekletilip hemen uzaklaştırıldı. 3ml/25 cm² olacak şekilde taze hazırlanmış Giemsa* boyası eklenip 10 dakika bekletildikten sonra hücre kültür kabı çok iyi bir şekilde yıkandı. Hücre koloni oluşturma değerlendirmeleri için her deney üçlü olarak çalışıldı ve deneyler en az üç kez tekrarlandı. Koloniler ışık mikroskobu ile

10X büyütme ile değerlendirildi. Koloni sayımı en az 50 hücre içeren koloniler sayılarak belirlendi (57).

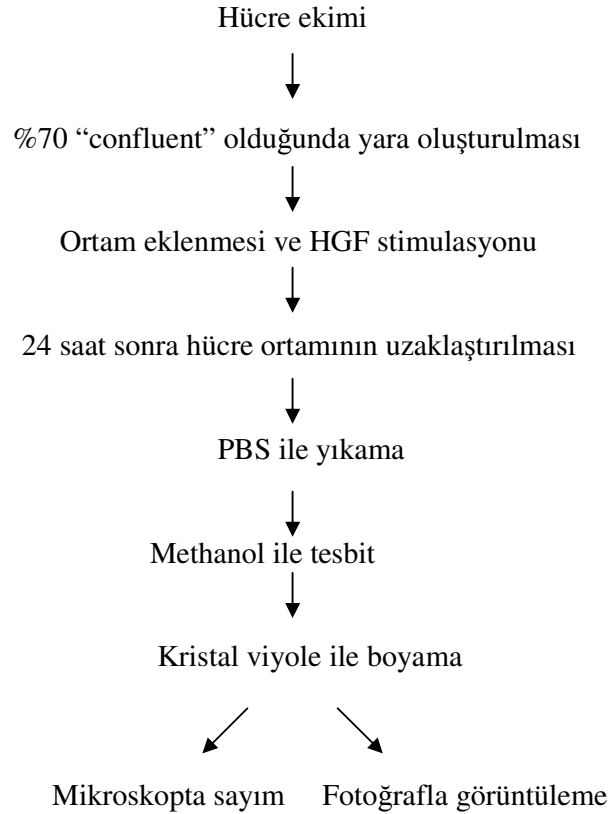
3.4. Hücre Adezyon Değerlendirmeleri:

Hücreler, (hücre tipine göre 1000-100,000 hücre/ml olacak şekilde) ECM bileşenleri olan kollajen, fibronektin, laminin ile kaplı kültür kaplarına (BD BioCoat Cellware) ekildi. Kontrol olarak hiçbir ECM bileşeni ile kaplanmamış standart hücre kültür kapları kullanıldı. Belirli zaman aralıklarında (15, 30, 45, 60. dk 2.4.8. saatler) yüzeye yapışmayan hücreler Ca^{++} ve Mg^{++} içeren PBS* (Biochrom) ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırıldı. Yüzeye yapışan hücreler 500 μ l soğuk metanol ile tesbit edildi. Farklı koşulların hücre adezyonuna etkisi kültür kaplarıdaki hücrelerin, faz kontrast mikroskobu (Nikon, Phase Contrast-2, LWD 052, 202086) 20' lık büyütmede 12 farklı alan sayılması ile belirlendi. Ayrıca % 0.2'lik kristal viyole* ile boyanmış hücrelerin SDS* ile yıkanması ile oluşan renk değişiminin spektrofotometrik analizi (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000) 590 nm'de absorbans ölçümü ile değerlendirildi (8,9). Deneyin akış şeması aşağıda görülmektedir. Hücre adezyon değerlendirmeleri için en az üç kez, üçlü olarak çalışıldı.



3.5. Hücre Hareketinin Değerlendirmeleri:

Hücreler 2×10^5 /ml olacak şekilde, ECM bileşenlerinden kollajen, laminin, fibronektin bileşenleri ile kaplı (BD BioCoat Cellware) 35mm'lik hücre kültür kaplarına ekildi ve % 70 "confluent" olduklarında yaklaşık 16-17 saat %2 Fetal Calf Serum (FCS)'lu ortama alındılar. Starvasyon sonrası, ortam uzaklaştırıldı. Pipet ucu ile yara oluşturulduktan sonra taze ortam (%2 FCS'lu DMEM) eklendikten ve HGF stimülasyonu yapıldıktan sonra 0.,12.,24.,36.,48.,60.saatlerde hücreler soğuk metanol ile tesbit edildi kristal viyole (% 0,2)* ile boyandı , 20'lik büyütmede faz kontrast mikroskopunda (Nikon, Phase Contrast-2, LWD 052, 202086) Nikon D100 fotoğraf makinesi ile görüntüledi. Ayrıca yara alanına göç eden hücreler yine aynı mikroskopta 40'lık büyütme ile sayılarak da değerlendirme yapıldı (53,56). Deneyin akış şeması aşağıda görülmektedir. Hücre göçü değerlendirmeleri için, en az üç kez, üçlü olarak çalışıldı.



3.6. Hücre Canlılığının ve Proliferasyonunun Değerlendirmeleri:

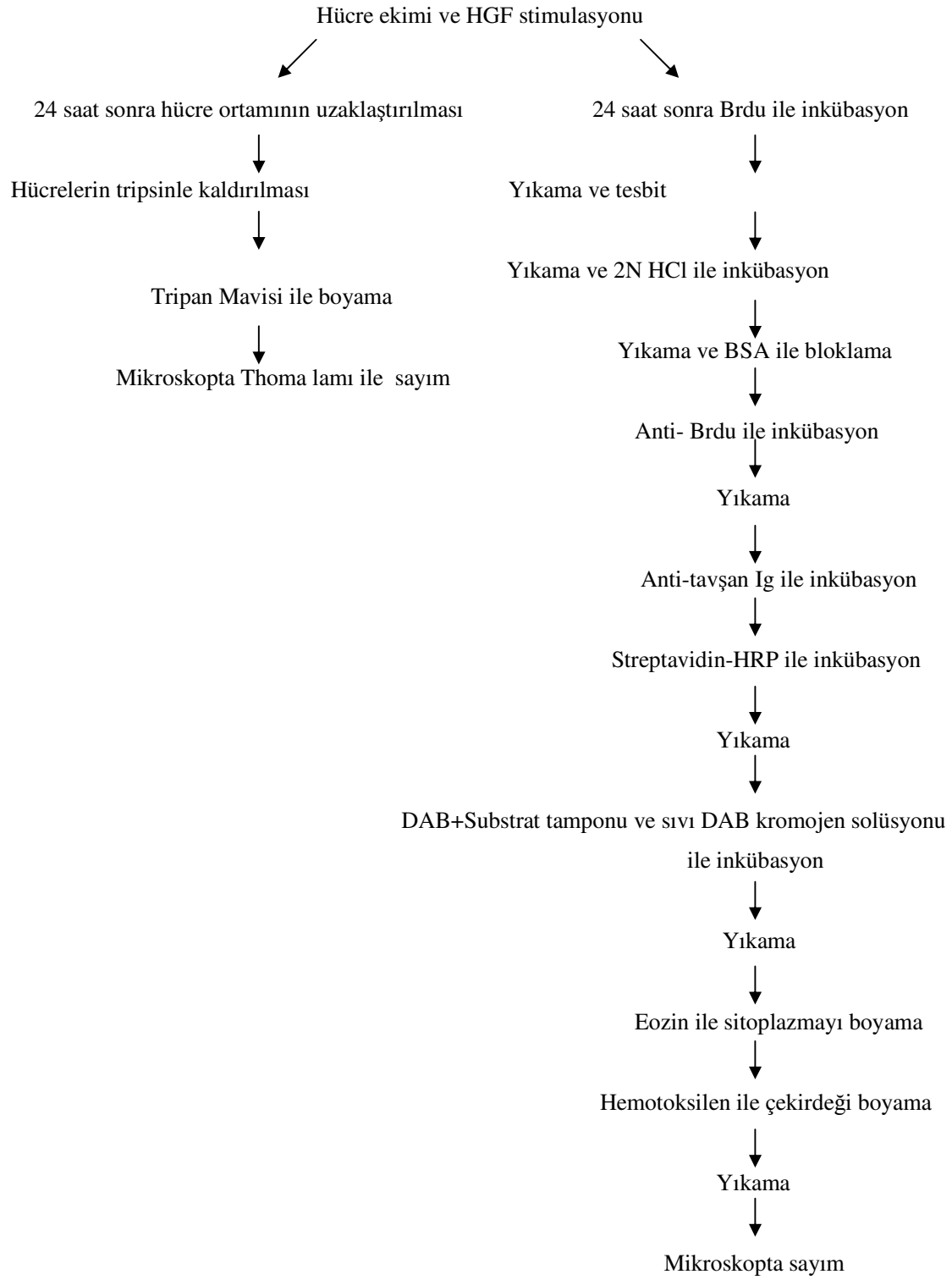
3.6.1. Tripan Mavisi Canlılık Testi:

Hücreler, 20,000 hücre/kuyu olacak şekilde, ECM bileşenlerinden kollajen, laminin, fibronektin ile kaplı (BD BioCoat Cellware) , heparin (3ng/ml) içeren ve standart 48 kuyulu hücre kültür kaplarına %5 FCS içeren hücre kültür ortamı ile ekildi. HGF stimülasyonu yapıldı (40ng/ml). Hücreler ekildikten sonra, 24., 36., 48., 72., 96.,120.saatlerde, tripsinle (Trypsin-EDTA Biochrom) kaldırdı, tripan mavisi (Biochrom) ile boyandı, ve thoma lamında (Neubauer, ILDAM) sayıldı (56).

Canlı hücre sayısı = Ortalama hücre sayısı (sayılan 10 alan) x dilüsyon faktörü x 10⁴ formülü ile hesaplandı.

3.6.2. Bromodeoksiüridin (BrdU) Hücre Proliferasyon Testi:

BrdU yöntemine göre; 20 000 hücre/well olacak şekilde, ECM bileşenlerinden kollajen, laminin, fibronektin ile kaplı ve standart 48 well hücre kültür kaplarına %5 FCS içeren hücre kültür ortamı ile ekildi. 24. ve 36.saatlerde BrdU 30Mm (Applichem) antikoru eklendi ve 37⁰ C de 4 saat inkübe edildi. Hücreler 1x PBS ile 2 kere yıkandı ve %70 soğuk etanol ile tesbit edildi. Tekrar 1x PBS ile 2 kere yıkandı. Taze hazırlanmış 2N HCl* ile 20 dakika inkübe edildikten sonra 3 kere 1x PBS ile yıkandı. 1%BSA* ile 15 dakika bloklandı. Biotin bağlı anti fare Brdu ile 1 saat inkübe edildikten sonra PBS-T* ile 3 kere yıkandı. Anti-tavşan Ig ile 10 dakika inkübe edildi ve PBS-T ile 2 kere yıkandı. Streptavidin-HRP (Dako) ile 10 dakika inkübe edildi. PBS-T ile 2 kere yıkandı. Taze hazırlanmış DAB+Substrat tamponu ve sıvı DAB kromojen solüsyonu (Dako) ile 2 dakika inkübe edildi. Distile su ile yıkandıktan sonra, önce eozin ile 10 dakika, sonra hemotoksilen ile 5 dk boyandı. Mikroskopta proliferen olan ve olmayan hücreler çekirdeklerinin renklerine göre (prolifere olan hücrelerin çekirdekleri daha koyu renkte görünür) sayılarak % proliferasyon oranı belirlendi (58). Deneyin akış şeması aşağıda görülmektedir. Hücre canlılığının ve proliferasyonunun değerlendirilmesi için, en az üç kez, üçlü olarak çalışıldı.



3.7. RNA İzolasyonu:

Hücreler 2.10^5 /ml olacak şekilde, ECM bileşenlerinden olan kollajen, fibronektin, laminin ile kaplı ve standart 60mm'lik hücre kültür kaplarına (BD BioCoat Cellware) ekildi. Hücreler %70 confluent olduklarında bir gece (16 saat) %2 FCS'lu DMEM ile starvasyon yapıldı. 40 ng/ml konsantrasyonda HGF ile 15 dk stimülasyon yapıldı. Stimülasyon sonrası Asit Guanidyum Tiosiyanat Fenol Kloroform yöntemi ile RNA izolasyonu yapıldı (59). Hücrelere 2ml RNAtidy G (AppliChem) eklendi. Hücre lizatı birkaç defa pipetten geçirildi. Lizat iki ayrı ependorf tüpüne alındı. Her bir homojenata 200µl kloroform eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Örnekler buz üzerinde 15 dk bekletildi. 12,000 rpm'de 4^0 C'de 15 dk santrifugasyon yapıldı. Oluşan süpernatandan 750µl'si yeni bir tüpe alındı ve eşit hacimde izopropanol eklendi. Örnekler 4^0 C'de 1 gün bekletildi. 12,000 rpm'de 4^0 C'de 15 dk santrifugasyon yapıldı. Süpernatantı atıldı ve RNA pelleti %75'lik etanol* ile vorteksenerek iki kere yıkandı. 7500g'de 4^0 C'de 8 dk santrifugasyon yapıldı. Pellet vakum altında 10-15 dk kurutuldu. RNA pelleti 50µl DEPC*'li su içinde çözüldü. Örnekler 10-15 dk 60^0 C'de inkübe edildi.

3.8. RNA Miktar Tayini:

İzole edilen RNA örneklerinden miktar tayini ve saflık derecesinin belirlenmesi amacıyla spektrofotometre kullanılarak(Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000) 260 nm ve 280 nm de ölçüm gerçekleştirildi. Ölçüm sonrasında $A_{260} \times$ dilüsyon faktörü (60) \times 40 µg/ml = X µg/ml RNA formülü kullanılarak her bir örnekteki toplam RNA miktarı ve " A_{260}/A_{280} " oranından yararlanarak RNA saflık derecesi belirlendi (60).

3.9. RNA'nın Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi:

Total RNA örnekleri, spektrofotometre ölçümü sonrasında 0.750 gr agaroz üzerine 36 ml Dietil pirokarbonat (DPEC, Sigma, D5758) ile muamele edilmiş dH₂O eklenerek mikrodalga (Arçelik) fırınında çözüldürüldü. Jel solüsyonu 55^0 C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine 5 ml 10X MOPS tamponu* (Quality Biological, Inc.) ve 9 ml formaldehit (%37, AppliChem) eklendi. %1.5-%2 nondenatüre formaldehit agaroz jeli yaklaşık 1 saat kadar donduktan sonra RNA örneklerinin içinde bulunduğu jel yükleme karışımı da 60^0 C'de 1 saat denatüre edildikten sonra, 2 µl RNA jel yükleme solüsyonu* ile (2 µl, 10X, Quality Biological, Inc.), (10X MOPS 2µl, formaldehit 4µl, formamid (AppliChem)10 µl, EtBr 1µl (Sigma, 200 µg/ml),RNA 2 µl) jelde, 50 V'luk akımda yaklaşık 2 saat yürütüldü (60). RNA kalitesi 28 S ve 18 S rRNA bantları gösterilerek kontrol edildi (60). Elektrofrez, Hoefler

HE33 yatay elektroforez aparatı ve ve Hoefer Scientific Instruments, PS500XT DC güç kaynağı kullanılarak yapıldı.

3.10. c DNA eldesi:

c DNA sentezi için random hexamer yöntemi kullanıldı (60). Tüm örneklerden aşağıdaki protokole göre c DNA sentezi yapıldı.

Tablo 1: c DNA Sentezinde Kullanılan Kimyasallar ve Konsantrasyonları

Kimyasal	Firma	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Eklenen Miktar
Random hexamer	Gibco BRL	50ng/ µl	25ng	0,5 µl
5XReaksiyon Tamponu	Promega	5X	1X	4 µl
dNTP	MBI Fermentas	10 mM	5mM	0,5 µl
M-MLV Revers Transkriptaz	Promega	200u/ µl	100	0,5 µl
Kalıp			2µg	değişken
Distile su				Toplam 20µl 'ye tamamlayacak şekilde

Tabloda belirtilen koşullarda hazırlanan örnekler 37⁰ C derecede 2 saat ve 65⁰ C derecede 5 dakika bekletildi.

3.11. Gen Ekspresyonu Analizleri:

ECM bileşenlerinden kollajen, fibronektin, laminin ve heparin varlığının ve bu bileşenlere ek olarak HGF ile uyarımın integrin tiplerinin ve E-kaderin ekspresyonlarına etkisini belirlemek amacıyla RT PCR , Real Time PCR kullanıldı (61,62). Heparinin HGF varlığında gen ekspresyonunu nasıl etkilediği ise mikrodizin yöntemi ile belirlendi. RT-PCR yöntemi ile spesifik gen ekspresyon paternlerindeki değişim belirlemek için spesifik hedef genler belirlendi ve bu genlere özgül primerler, primer 3 programı kullanılarak, ekson intron kesişme bölgelerine yerleşecek şekilde tasarlandı ve sentezletirildi (VBCBiotech). Kullanılan hedef genlere ait primer dizileri ve her bir primer için kullanılam optimum koşullar tablo 2 de verilmiştir.

Tablo 2: Kullanılan Hedef Genlere Ait Primer Dizileri

İntegrin β 1 F	5'-TGT GAA TGC AGC ACA GAT GA-3'	R	5'-AGA CAC CAC ACT CGC AGA TG-3'
İntegrin β 4 F	5'-AGT GAA GAG CTG CAC GGA GT-3'	R	5'-GTT CTG CCC CAT CTT CTT GA-3'
İntegrin α 3 F	5'-TCC AGT TCC AGA AGG AGT GC-3'	R	5'-GTT CCG TTT GAA GGG GTT C-3'
İntegrin α 5 F	5'-GTG GGC AGG GTC TAC GTC TA-3'	R	5'-GGA TAT CCA TTG CCA TCC AG-3'
İntegrin α 6 F	5'-AAG CTC TCG TAG GCG AGT GA-3'	R	5'-TCT GGA AAC GTT GCA ATC AG-3'
İntegrin α v F	5'-TTC TTG GTG GTC CTG GTA GC-3'	R	5'-TCC GAA ATA TGC AGC CAT CT-3'
E-Kaderin F	5'-AAC CTC TGT GAT GGA GGT CA-3'	R	5'-GTG GTG GGA TTG AAG ATC G-3'

3.12. RT-PCR:

RT-PCR kontrolü olarak GAPDH primerleri ile tüm örneklerden tablo 3'e göre amplikasyon gerçekleştirildi. RT-PCR gen ekspresyon analizleri için, en az üç kez, üçlü olarak çalışıldı.

Tablo 3: RT-PCR 'da Kullanılan Kimyasallar ve Konsantrasyonları

Kimyasal	Firma	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Eklenen Miktar
5XReaksiyon Tamponu	Promega Flexi Go Taq Tamponu	5X	1X	5 μ l
dNTP	MBI Fermantas	10mM	5mM	0,5 μ l
Primer F	VBC Biotech	100pmol	10pmol	0,5 μ l
Primer R	VBC Biotech	100pmol	10pmol	0,5 μ l
Taq DNA Polimeraz	Promega Flexi Go Taq	5u/ μ l	1,25 u	0,25 μ l
Kalıp				1,5 μ l
Distile su				Toplam 25 μ l'ye tamamlayacak miktarda

Tabloda belirtilen koşullarda hazırlanan örnekler, 94⁰ C’de 7 dk (ilk denatürasyon) , 94⁰ C’de 5 dakika (denatürasyon), 50⁰ C de 1 dk (primer bağlanması), 72⁰ C’de 1 dakika (uzama) ve 72⁰ C’de 7 dakika (son uzama) olmak üzere 30 döngü reaksiyon yapıldı.

3.13. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi:

Tüm PCR ürünleri DNA yükleme tamponu ile 1µg/ml EtBr içeren %2 ‘lik agaroz jele yüklendi. 80 volta 45 dk yürütüldü. Elektroforez, Hoefer HE33 yatay elektroforez sistemi ve ve Hoefer Scientific Instruments, PS500XT DC güç kaynağı kullanılarak yapıldı. Elektroforez sonuçları EagleSight Software (Stratagene) ve Bio Imaging Systems (Synegene) kullanılarak değerlendirildi.

3.14. Gerçek Zamanlı (Real Time) PCR:

Tüm gerçek zamanlı PCR reaksiyonları Roche 480 kullanılarak yapıldı (62). Reaksiyonlar AÜ Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında gerçekleştirildi. İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri NanoDrop ND 1000 ve analizleri Agilent 2100 Bioanalyzer kullanılarak yapıldı. Syber Green yöntemi ile önce tüm primer çiftlerinin erime sıcaklığı eğrileri çıkarıldı. Tüm primerlerin referans CP ve E değerleri hesaplandı (62).

$$\text{Ekspresyon Oranı} = \frac{(E_{\text{Hedef}})^{\Delta CP_{\text{hedef}}(\text{kontrol-örnek})}}{(E_{\text{Referans}})^{\Delta CP_{\text{referans}}(\text{kontrol-örnek})}}$$

formülünden yararlanarak

ekspresyon analizleri yapıldı. Referans gen olarak GAPDH kullanıldı.

Tablo 4: Gerçek Zamanlı PCR ‘da Kullanılan Kimyasallar ve Konsantrasyonları

Kimyasal	Firma	Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Eklenen Miktar
SYBR Green reaksiyon karışımı	Roche	2X	2X	5µl
Primer F	VBC Biotech	100pmol	10pmol	0,5µl
Primer R	VBC Biotech	100pmol	10pmol	0,5µl
Kalıp				2µl
Distile su	Roche			2µl /Toplam hacim 10 µl

Tabloda belirtilen koşullarda hazırlanan örnekler, 324 kuyulu plakların içinde 95⁰ C’de 5 dk (ilk denatürasyon) , 95⁰ C’de 10 sn (denatürasyon), 60⁰ C veya 62⁰ C de 25sn dk (primer bağlanması), 72⁰ C’de 25sn olmak üzere 40 döngü reaksiyon yapıldı ve erime eğrilerinin çıkarılması için 95⁰ C’de 10 sn, 65⁰ C’de 1 dk koşullarında 1 döngü reaksiyon yapıldı.

3.15. c DNA Mikrodizin Analizi:

Mikrodizin çalışmaları AÜ Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında gerçekleştirildi. c DNA mikrodizin gen ekspresyon analizi için seçilen koşullardan trizol yöntemi ile üçlü RNA izolasyonu yapıldı (59). İzole edilen RNA örneklerinin mikrodizin için uygun olup olmadığı, saflığı ve kalitesi, Agilent 2100 Bioanalyzer kullanılarak belirlendi. RNA örnekleri (2,5 µg), önce tek iplikli sonra çift iplikli c DNA ya çevrildi.(Affymetrix) Çift iplikli c DNA purifiye edildi (Affymetrix GeneChip Sample Cleanup Module). Biotin işaretli c RNA sentezi yapıldı. Biotin işaretli c RNA’nın purifikasyonu yapıldı. Sentezlenen c RNA’nın miktarı belirlendi (NanoDrop ND 1000). 20 µg c RNA fragmente edildi. Fragmente edilmiş 15 µg c RNA, insan çiplerine (Affimatrix HG-U133 Plus 2) 16 saat hibridize edildi (Affymetrix GeneChip Hibridizasyon Fırını 640). Çipler yıkandı, boyandı ve tarandı (Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450, GeneChip Scanner 3000 (63).

3.15.1. Tek İplikli c DNA Sentezi:

Tablo 5’de belirtilen koşullarda hazırlanan örnekler, 70⁰ C’de 10 dk 4⁰ C’de 2 dk, 42⁰ C de 2 dk bekletildi, 42⁰ C de 1 saat ve 4⁰ C de 2 dk inkübe edildi (63).

Tablo 5: c DNA Birinci İplik Sentezinde Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal	Eklene Miktar
Örnek RNA	değişken
Dilüe edilmiş polyA RNA kontrolleri	2µl
T7 oligo dT primer	2µl
RNaz sız su	değişken
5x 1.iplik reaksiyon karışımı	4 ul
DTT,0.1M	2µl
Super scriptII	1µl

3.15.2. İkinci İplik c DNA Sentezi:

Tablo 6’da belirtilen koşullarda hazırlanan örnekler, 16⁰ C de 2 saat inkübe edildi (63).

Tablo 6: c DNA İkinci İplik Sentezinde Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal	Eklenen Miktar
RNaz sız su	91µl
5x 2.iplik reaksiyon karışımı	30µl
dNTP 10 mM	3 ul
E.coli DNA ligaz	1 ul
E.coli DNA polimerase I	4 ul
RNase H	1 ul
T4 DNA polimeraz	1 ul
EDTA	10 ul

3.15.3. Çift İplikli cDNA’nın Temizlenmesi:

Sentezlenen çift iplikli cDNA’ya, cDNA bağlama tamponu 600µL eklendi ve 3 sn vortekslendi. 2µL lik toplama tüpü içine cDNA purifikasyon kolonu yerleştirildi ve kolon içine 500µL örnek aktarıldı, ve 1 dakika 8000g de santrifüj edildi. Kalan karışım kolona tekrar yüklendi. Yeni bir 2µL lik toplama tüpü, kolona transfer edildi ve üzerine 750 µL cDNA yıkama tamponu eklendi. 1 dakika 8000g de santrifüj edildi. Kolonun kapağı açıldı ve 5 dakika maksimum hızda santrifüj edildi. 1.5mL’lik toplama tüpü içine kolon transfer edildi ve kolon membranı üzerine direkt olarak, 14µL cDNA elüsyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilirdi ve 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi (63).

3.15.4. Biotinle İşaretlenmiş cRNA’nın Sentezi:

Tablo 7’de belirtilen koşullarda hazırlanan örnekler, 16 saat 37°C’de inkübe edildi (63).

Tablo 7: Biotinle İşaretlenmiş cRNA'nın Sentezinde Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal	Eklenecek miktar
Kalıp cDNA	Değişken
RNaz sız su	Değişken
10X IVT İşaretleme tamponu	4µL
IVT İşaretleme NTP karışımı	12µL
IVT İşaretleme Enzim karışımı	4µL

3.15.5. Biotinle İşaretlenmiş cRNA'nın Temizlenmesi ve Kantifikasyonu:

IVT reaksiyonuna, 60µL RNaz sız su eklendi ve 3 dak vortexlendi. Örneğe, IVT cRNA bağlama tamponundan 350µL eklendi ve 3 dak vortexlendi. Lizata %96-100 lük etanolden 250µL eklendi, 2 mL'lik toplama tüpü içine IVT cRNA pürifikasyon kolonu yerleştirildi ve 700µL örnek uygulandı. 15 dak 8000g de santrifüj edildi. Yeni bir 2mL'lik toplama tüpü içine spin kolon transfer edildi. Kolonun üzerine 500µL IVT cRNA yıkama tamponu eklendi. 15 dak 8000g'de santrifüj edildi. Kolon üzerine %80'lik etanolden 500µL eklendi ve 15 dak santrifüj edildi. Kolonun kapağı açıldı ve 5 dak maksimum hızda santrifüj edildi. Yeni bir 1,5 mL'lik toplama tüpüne kolon aktarıldı ve kolonun membranının üzerine direkt olarak 11µL RNaz sız su eklendi. 1 dak maksimum hızda santrifüj edildi. Kolon üzerine direkt olarak 10µL RNaz sız su eklendi ve 1 dak maksimum hızda santrifüj edildi. Örnek konsantrasyonu ve saflığı kontrol edildi (Nanodrop NT1000) (63).

3.15.6. cRNA'nın Fragmentasyonu:

35 dakika 94°C'de inkübe edildi ve agaroz jelde yürütüldü (63).

3.15.7. Hibridizasyon:

Prob dizinleri kullanılmadan önce oda sıcaklığında kalibre olması için bırakıldı. Sıcak bir blok içinde 5 dakika, 99 °C'de hibridizasyon karışımı ısıtıldı. Bu arada uygun uçlar ve mikropipetler kullanılarak 1X hibridizasyon tamponu'nun uygun hacmi ile septumun içi doldurularak dizin ısıtıldı. Rotasyonla 10 dak 45°C'de 1X hibridizasyon tamponu ile prob dizin dolduruldu. 5 dakika sıcak blokta 45°C'de 3. basamakta 99 °C'de ısıtılmış olan hibridizasyon karışımı transfer edildi. Hibridizasyon karışımı maksimum hızda 5 dakika santrifüj edildi. Prob dizin kartuşundan tampon solüsyon temizlendi ve uygun hacimle

dolduruldu. Prob dizin hibridizasyon fırınına yerleştirildi ve 45°C’de 16 saat hibridize edildi (63).

3.15.8. Yıkama, Boyama ve Tarama:

Tablo 8’de belirtilen koşullarda hazırlanan karışımlarla, çipler, Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 de yaklaşık 1 saat yıkandı ve boyandı. Yıkanan ve boyanan çipler GeneChip Scanner 3000 ile yaklaşık 15 dk tarandı (63).

Tablo 8: Yıkama, Boyama ve Taramada Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal	Eklene miktar
2X boyama tamponu	600µL
50mg/mL BSA	48µL
1 mg/mL SAPE	12µL
Distile su	540µL

Kimyasal	Eklene miktar
2X boyama tamponu	300µL
50mg/mL BSA	24µL
10mg/mL Keçi IgG stok	6µL
0,5mg/mL biotinlenmiş antikor	3,6µL
Distile su	266,4 µL

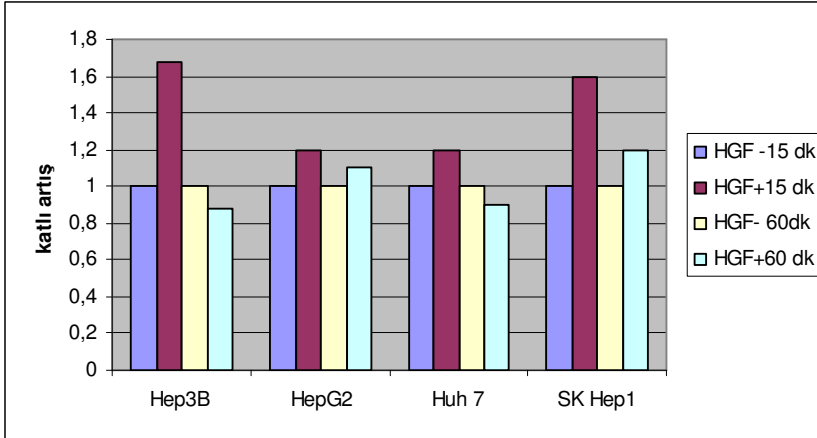
3.16. İstatistiksel Analiz: Mikrodizin sonuçlarının analizi ikili olarak yapılan örnekler (biyolojik tekrarlar) RMA (robust microarray analysis) ön işleme algoritmasından geçirilmek suretiyle normalize edilerek, ortalama değerleri kullanılarak R (istatistiksel analiz programı) ile istatistik analizi yapıldı.

4.BULGULAR:

4.1. Uygun Hücre Dizisinin Belirlenmesi

4.1.1. HGF çalışılan tüm HCC hücre dizilerinde hücre adezyonunu artırmaktadır

SK Hep1, Huh7, HepG2, Hep 3B hücre hatlarının bazal ve HGF ile uyarılmış adezyonu 15. ve 60. dakikalarda değerlendirildiğinde 15. dakikada bazal koşullarda en adhezif HCC hücre dizisinin Hep 3B olduğu, bunu çok yakın bir değerle ikinci sırada SK Hep 1 hücre dizisinin izlediği ve son sırada Hep G2 ve Huh7'nin de birbirine eşit olarak izlediği gözlemlendi. 60. dakikada ise bazal adezyonu en fazla olan hücre dizisinin SK-Hep1 olduğu, bunu Hep G2 hücre hattının izlediği gözlemlendi. HGF ile uyarının, çalışmaya alınan tüm hücre dizilerinin adezyonunu 15. dakikada 1,2- 1,7 kat artırdığı, artışın SK Hep1 ve Hep3B dizilerinde en belirgin olduğu belirlendi. HGF ile uyarının, çalışmaya alınan Hep 3B ve Huh7 hücre dizilerinin adezyonunu 60. dakikada azalttığı, SK Hep1 ve HepG2 hücre dizilerinde ise 1,1-1,2 kat artırdığı belirlendi (Şekil 10).



Şekil 10: Hep 3B, Hep G2, Huh7, SK Hep1 hücre hatlarının 15. ve 60. dakikalardaki bazal adezyonları ve HGF uyarımının hücre adezyonuna etkisi (Grafikteki sonuçlar her hücre dizisi için en az üç kez, üçlü olarak çalışılmış, sonuçlar ışık mikroskobisi ile 20X büyütme ile yapışan hücrelerin sayılması ve yapışan hücrelerin spektrofotometrik ölçümü ile bulunan değerler kullanılarak elde edilmiştir).

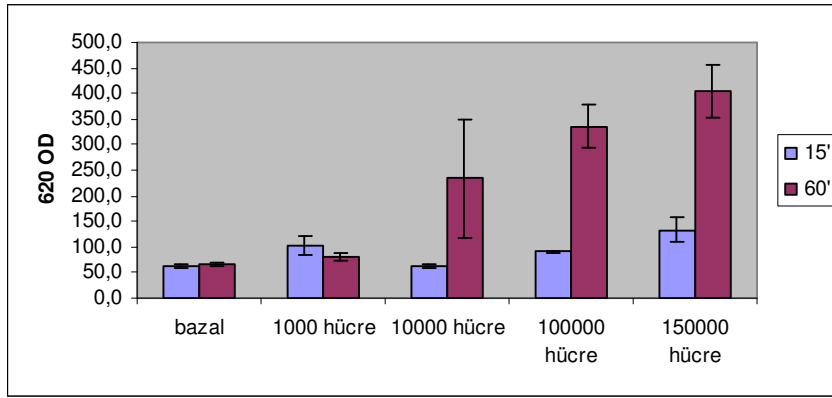
4.1.2. HGF, HCC hücre dizilerinden SK Hep1'in motilitesini artırmaktadır

Hücre migrasyon deneyleri HGF ile uyarılan adezyona yanıt gözönüne alınarak SK Hep1, Huh7, HepG2 hücre hatları ile sürdürüldü.Çalışılan hücre dizileri arasında HGF ile uyarılan hücre motilitesi artışı SK Hep1 hücre dizilerinde en belirgin olduğu , ECM glikoproteinlerine de HGF uyarısı olmasa da en iyi yanıt veren hücre dizisi olduğu belirlendi (Şekil 11).Tekrarlanan deneylerde gerek bazal gerekse HGF ile uyarılan adezyon ve motilite deneylerindeki fark gözönüne alınarak daha sonraki çalışmalarda SK Hep1 hücre dizisi ile sürdürülmesine karar verildi.

4.2. SK Hep 1 hücrelerinin adezyonuna hücre sayısı ve sürenin etkisi

4.2.1. Hücre Sayısı:

Sonuçların değerlendirilmesi SK Hep 1 hücrelerinin adezyonun hücre sayısına ve zamana bağlı arttığı, ancak hem mikroskopik hem de spektrofotometrik değerlendirme için optimum sayının 100,000 hücre / 24 kuyulu hücre kültür kabı olduğu gözlemlendi (Şekil 12).

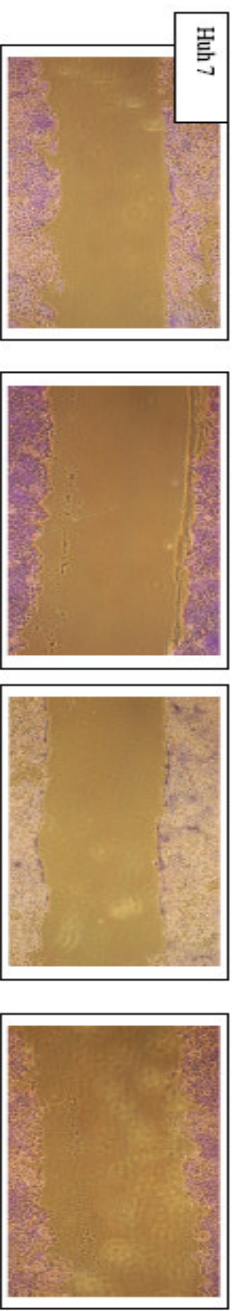
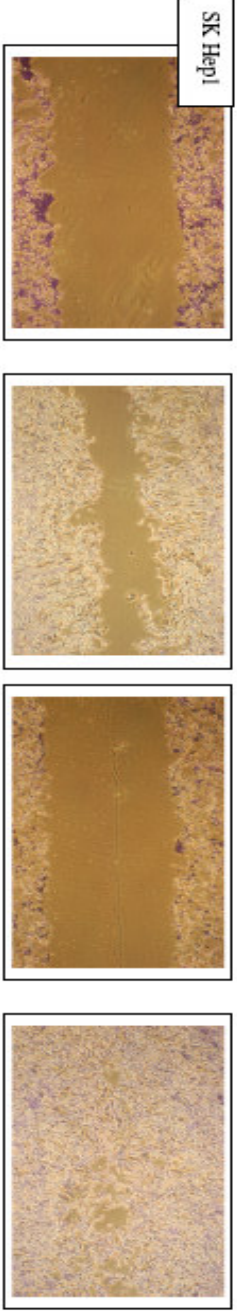


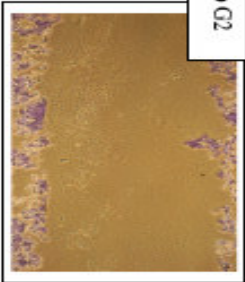
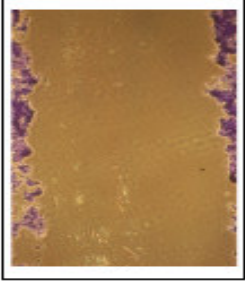
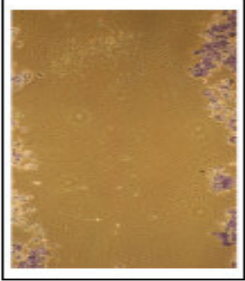
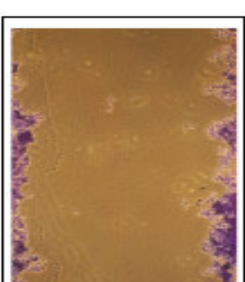
Şekil 12: SK Hep1 hücrelerinin adezyon deneyi spektrofotometre ölçümleri için optimum hücre sayısının belirlenmesi

4.2.2. Süre:

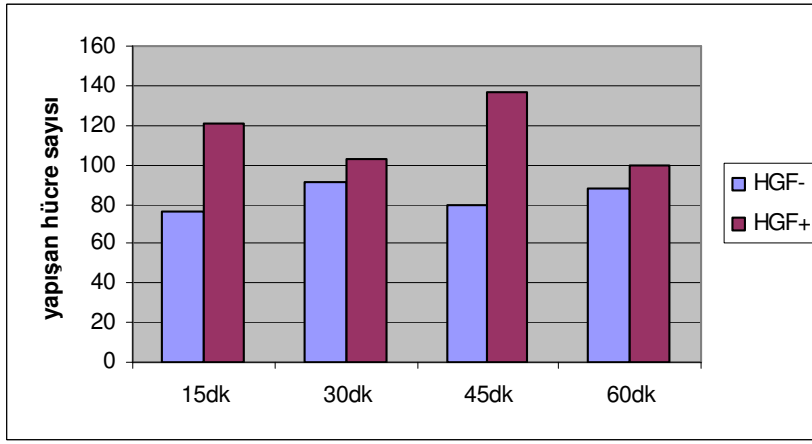
Hücre adezyonun genelde zamana bağlı olarak arttığı, HGF uyarısına bağlı adezyonun 1.2-1.5 kat artışı gözlemlendi. HGF uyarımına bağlı artışın en belirgin olarak 15 dk lık sürede olduğu gözlemlendi. Tekrarlayan deneylerde en tutarlı ve belirgin farkın 15 dk lık sürede elde edilmesi nedeniyle adezyon deneylerinde 15 dk'lık sürenin kullanılmasına karar verildi (Şekil 13).

HGF -		HGF +	
0. saat	24. saat	0. saat	24. saat



	HGF -		HGF +	
	0 saat	24 saat	0 saat	24 saat
Hep G2				

Şekil 11: HGF'in HCC hücre halkarının motilitesine etkisi (Fotoğrafları görüntüler tüm hücre dizileri için en az üç kez, uygun olarak çalşılmış deneyler sonucunda elde edilmiştir).

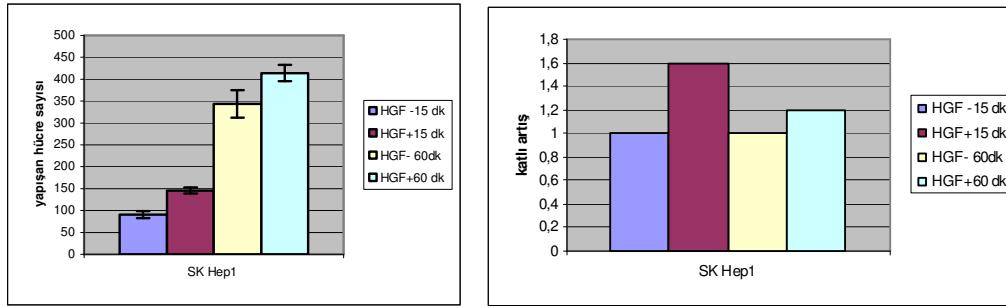


Şekil 13: SK Hep1 hücrelerinin adezyonu için uygun sürenin belirlenmesi

4.3. ECM glikoproteinlerinin yalnız ve HGF ile birlikte kullanılmasının hücre adezyonuna etkisinin belirlenmesi

4.3.1. HGF, SK Hep1'in hücre dizisinin adezyonunu artırmaktadır

SK Hep1 hücrelerinde, HGF'in hücre adezyonununun 1,6 kat artırdığı saptandı (Şekil 14).

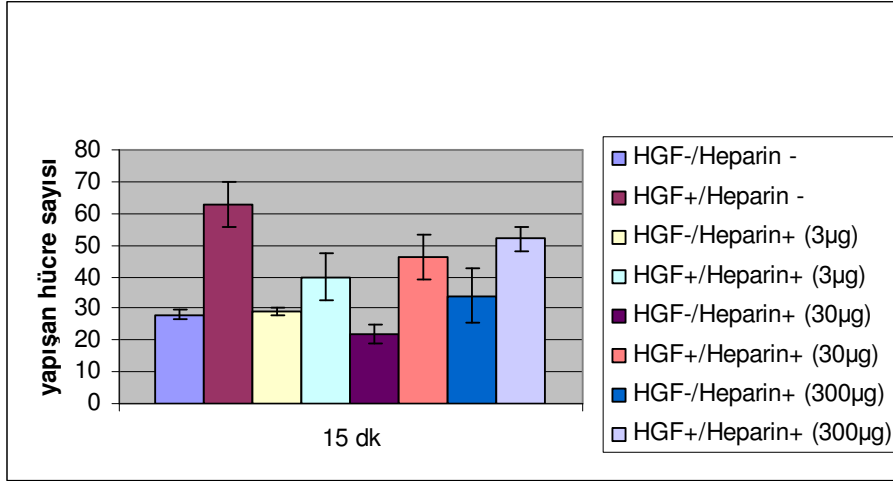


Şekil 14: SK Hep1 hücrelerinin adezyonuna HGF'in etkisi (Grafikteki sonuçlar her hücre dizisi için en az üç kez, üçlü olarak çalışılmış , sonuçlar ışık mikroskobisi ile 20X büyütme ile yapışan hücrelerin sayılması ve yapışan hücrelerin spektrofotometrik ölçümü ile bulunan değerler kullanılarak elde edilmiştir)

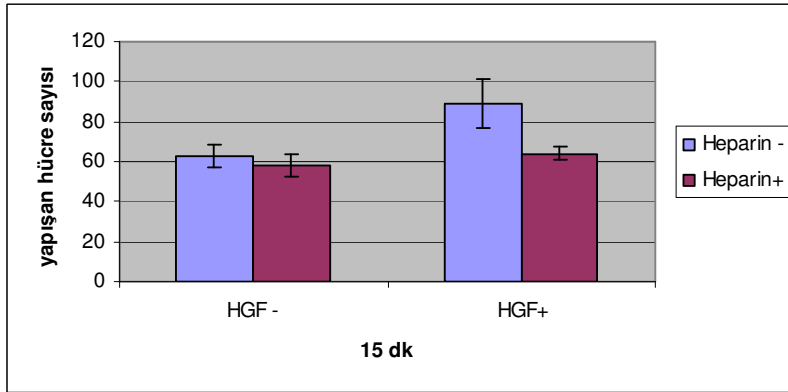
4.3.2. Heparin, SK Hep1 hücre dizisinde HGF ile uyarılmış adezyonu azaltmaktadır

Heparinin SK Hep1 hücre adezyonuna etkisini belirlemek için gerçekleştirilen çalışmada HGF ve heparinin 3, 30, 300 µg/ml heparin konsantrasyonlarının etkisi Şekil 15 de görülmektedir. Heparinin 3 µg/ml'lik konsantrasyonda eklenmesinin SK Hep1 hücrelerinde HGF ile uyarılan adezyonu, 30, 300 µg/ml 'lık konsantrasyonlarının ise hem bazal hem de HGF ile uyarılan adezyonu minimal olarak azalttığı saptandı (Şekil 16).

Deneyley heparinin bazal adezyonu etkilemediği ancak HGF ile uyarılan adezyonu etkilediği 3 µg/ml'lik heparin konsantrasyonu kullanılarak sürdürüldü.



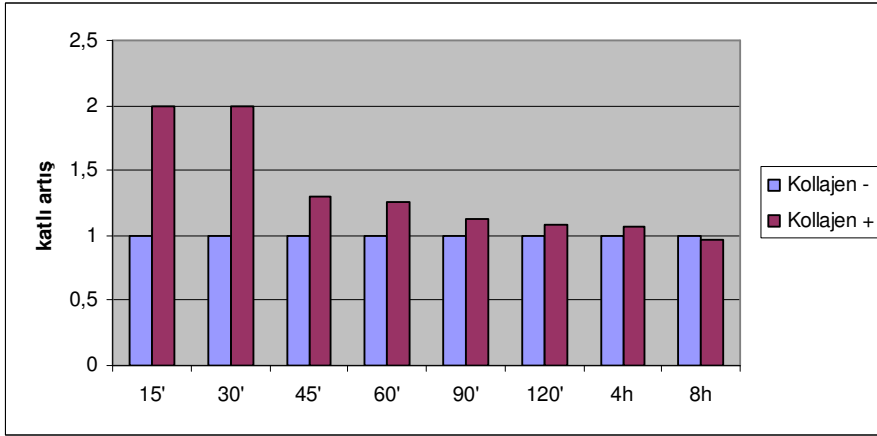
Şekil 15: Heparinin SK Hep1 hücrelerinin adezyonuna konsantrasyonuna bağlı etkisi



Şekil 16: SK Hep 1 hücrelerinin adezyonuna heparinin etkisi (Grafikteki sonuçlar hücre dizisi için en az üç kez, üçlü olarak çalışılmış, bulunan değerler kullanılarak elde edilmiştir).

4.3.3. Kollajen SK Hep1 hücre dizisinin adezyonunu artırmaktadır

ECM bileşenlerinden kollajenin, SK Hep 1 hücrelerin adhezyonuna, zamana bağlı etkisi incelendi. Kollajenin ilk 30 dk'lık süreçte 2 kat,60 dakikalık süreçte hücre adhezyonunu 1,2 kat artırdığı saptandı. İlerleyen zaman aralıklarında ise bu etkinin ortadan kaybolduğu saptandı (Şekil 17).



Şekil 17: SK Hep1 hücrelerinin adezyonuna kollajenin etkisi (Grafikteki sonuçlar üç kez, üçlü olarak çalışılmış , sonuçlar ışık mikroskobisi ile 20X büyütme ile yapışan hücrelerin sayılması ile bulunan değerler kullanılarak elde edilmiştir)

4.3.4. Fibronektin SK Hep1 hücre dizisinin adezyonunu artırmaktadır

Fibronektinin SK Hep 1 hücre dizilerinde hücre adezyonunu artırdığı saptandı (Şekil 18).

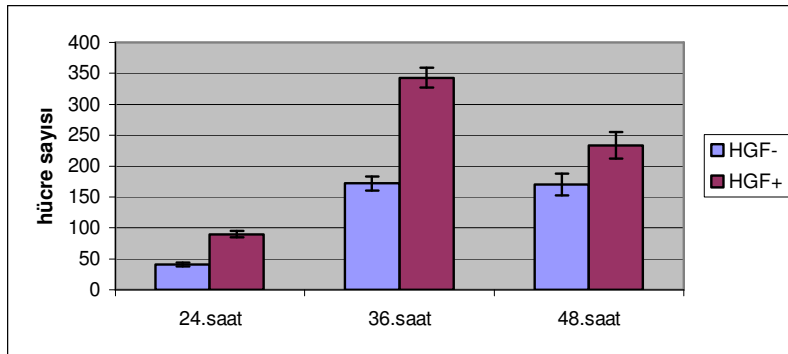
4.3.5. Laminin SK Hep1 hücre dizisinin adezyonunu azaltmaktadır

Lamininin SK Hep 1 hücre dizilerinde hücre adezyonunu azalttığı saptandı (Şekil 18).

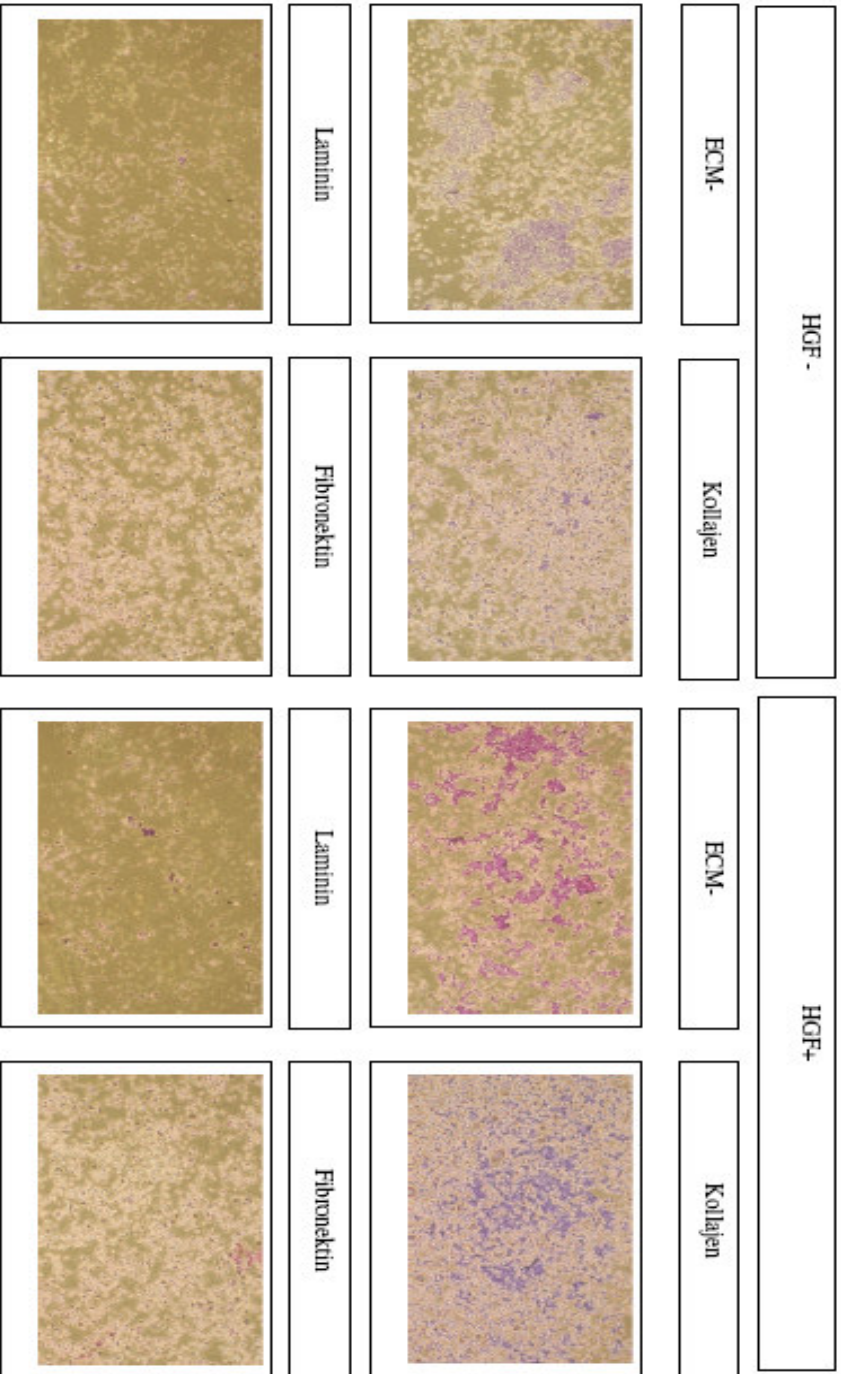
4.4. Mikroçevrenin hücre migrasyonuna etkisinin belirlenmesi

4.4.1. HGF, SK Hep1 hücrelerinin motilitesini artırmaktadır

HGF'in SK Hep1 hücrelerinde hücre motilitesini özellikle 24.saat ve 36.saatte iki kat artırdığı saptandı (Şekil 19).



Şekil 19: SK Hep1 hücrelerinin migrasyonuna HGF'in etkisi (Grafikteki sonuçlar hücre dizisi için en az üç kez, üçlü olarak çalışılmış, bulunan değerler kullanılarak elde edilmiştir).



Şekil 18: SK Hep1 hücrelerinin adezyonuna HGF ve ECM bileşenlerinin etkisi (60 dk)

4.4.2. Kollajen SK Hep1 hücre dizisinin motilitesini artırmaktadır

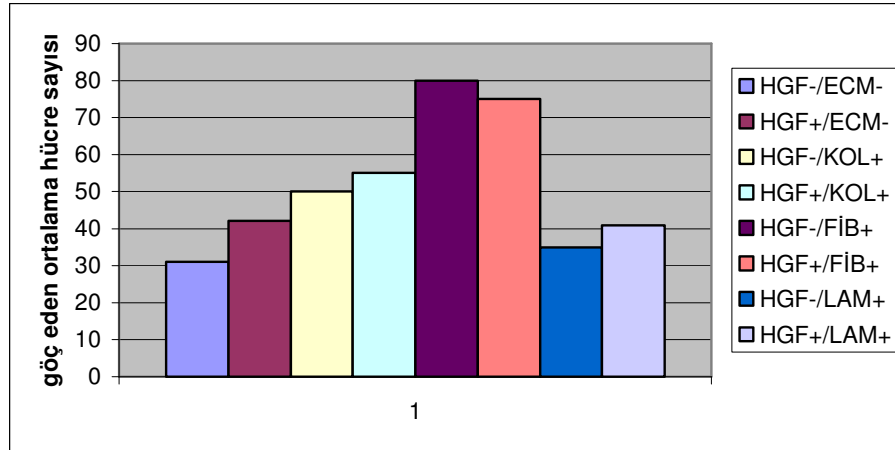
Kollajenin SK Hep1 hücre dizisinin motilitesini artırdığı gözlemlendi (Şekil 20a, 20b).

4.4.3. Fibronektin SK Hep1 hücre dizisinin motilitesini artırmaktadır

Fibronektinin SK Hep1 hücre dizisinin motilitesini artırdığı gözlemlendi (Şekil 20a, 20b).

4.4.4. Laminin SK Hep1 hücre dizisinin motilitesini değiştirmemektedir

Lamininin SK Hep1 hücre dizisinin motilitesini değiştirmedığı gözlemlendi (Şekil 20a, 20b).



Şekil 20a: SK Hep1 hücrelerinin migrasyonuna HGF ve ECM glikoproteinlerinin (kollajen, fibronektin, laminin) etkisi (Grafikteki sonuçlar hücre dizisi için en az üç kez, üçlü olarak çalışılmış, bulunan değerler kullanılarak elde edilmiştir).

HGF -

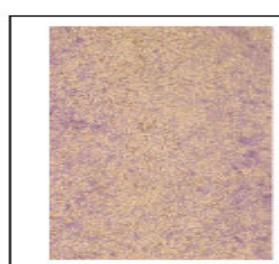
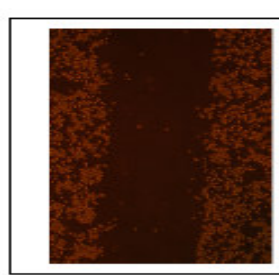
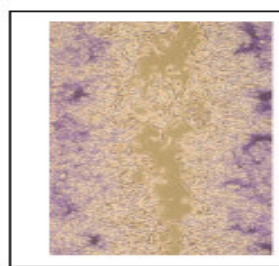
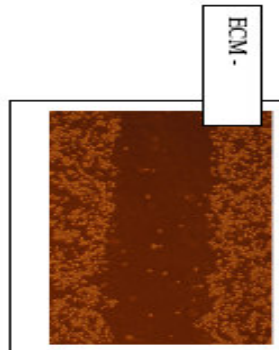
HGF+

0. saat

1.5. saat

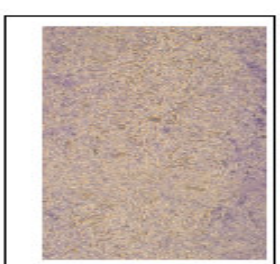
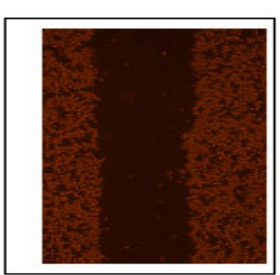
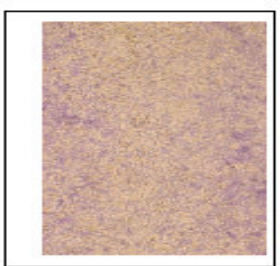
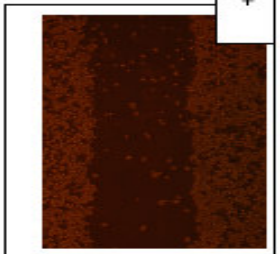
0. saat

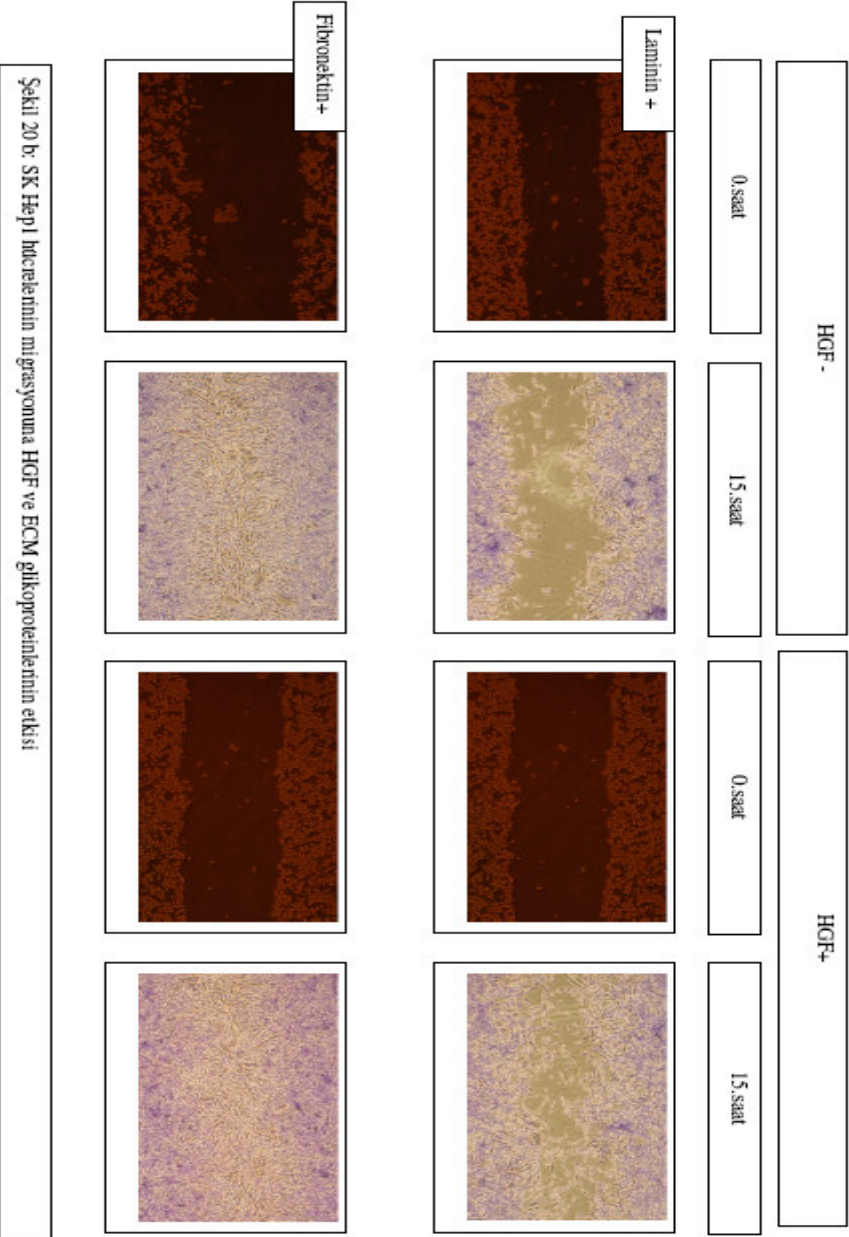
1.5. saat



ECM -

Kollagen+

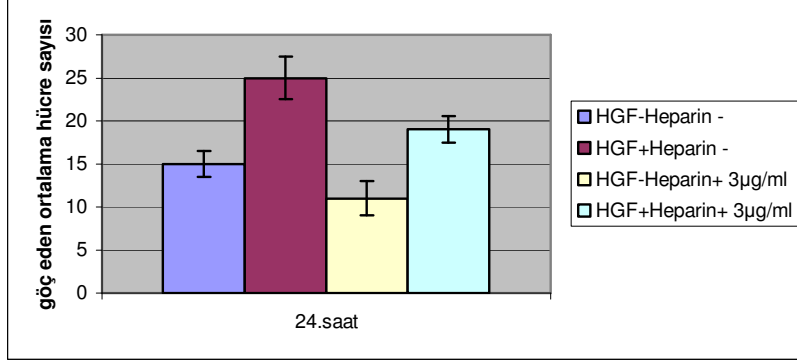




Şekil 20 b: SK Hep1 hücrelerinin migrasyonuna HGF ve ECM glikoproteinlerinin etkisi

4.4.5. Heparin SK Hep1 hücre dizisinin motilitesini azaltmaktadır

HGF'in SK Hep1 hücrelerinde hücre migrasyonunu artırdığı, heparinin ise hem bazal hem de HGF stimule hücre motilitesini minimal düzeyde azalttığı saptandı (Şekil 21).

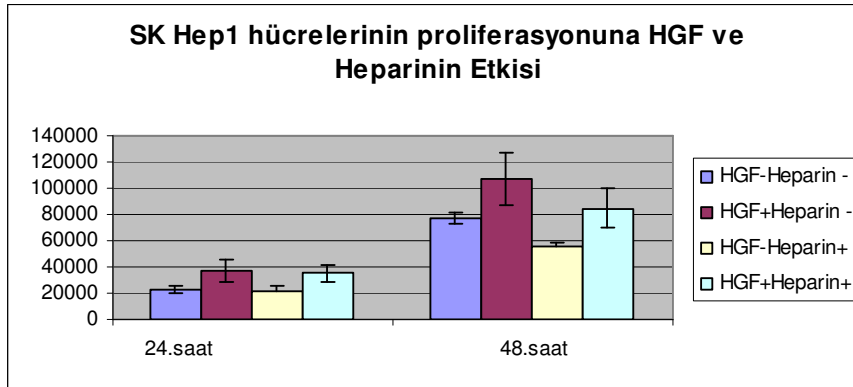


Şekil 21: SK Hep1 hücrelerinin migrasyonuna HGF'in ve heparinin etkisi (Grafikteki sonuçlar hücre dizisi için en az üç kez, üçlü olarak çalışılmış, bulunan değerler kullanılarak elde edilmiştir).

4.5. Mikroçevrenin hücre proliferasyonuna etkisinin belirlenmesi

4.5.1. HGF ve Heparinin SK Hep1 hücre dizisinin proliferasyonuna etkisi

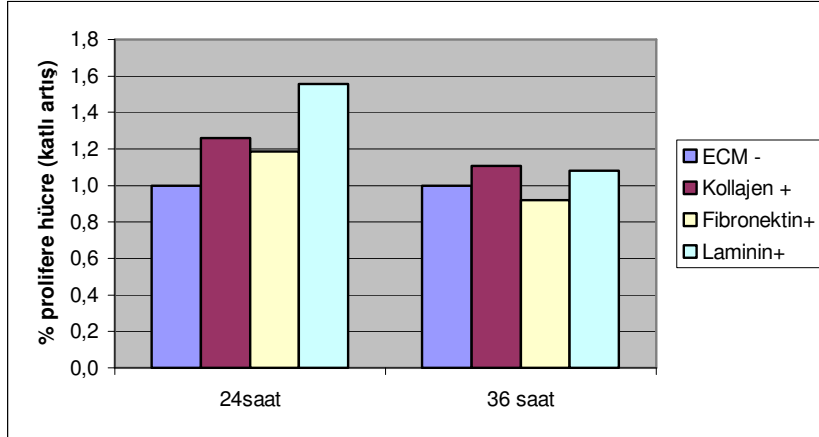
HGF'in SK Hep1 hücrelerinde hücre proliferasyonunu minimal düzeyde artırdığı, heparinin ise hem bazal hem de HGF stimule hücre proliferasyonunu minimal düzeyde azalttığı saptandı (Şekil 22).



Şekil 22: SK Hep1 hücrelerinin proliferasyonuna HGF'in ve heparinin etkisi (Grafikteki sonuçlar hücre dizisi için en az üç kez, üçlü olarak çalışılmış, bulunan değerler kullanılarak elde edilmiştir).

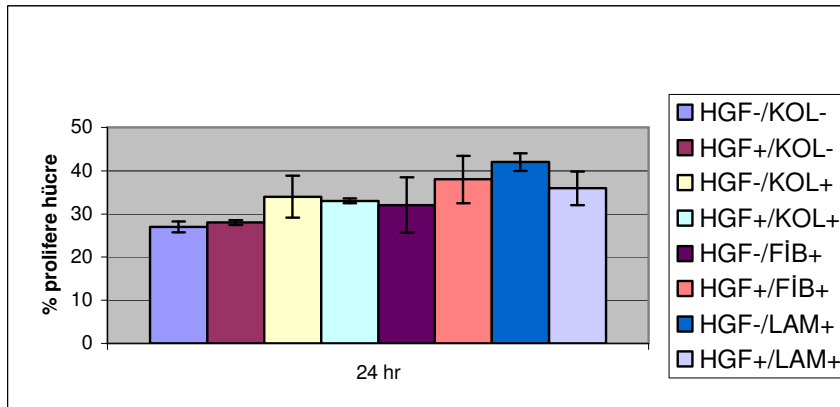
4.5.2. ECM Glikoproteinlerinin SK Hep1 hücre dizisinin proliferasyonuna etkisi

ECM bileşenlerinden lamininin SK Hep1 hücre dizisinin proliferasyonunu 24 .saatte yaklaşık 1,6 kat artırdığı, kollajen ve fibronektinin ise yaklaşık 1,2 kat artırdığı saptanmıştır. 36.saatte ise ECM bileşenlerinin hiçbirinin SK Hep1 hücre dizisinin proliferasyonuna etkisi saptanmamıştır (Şekil 23).

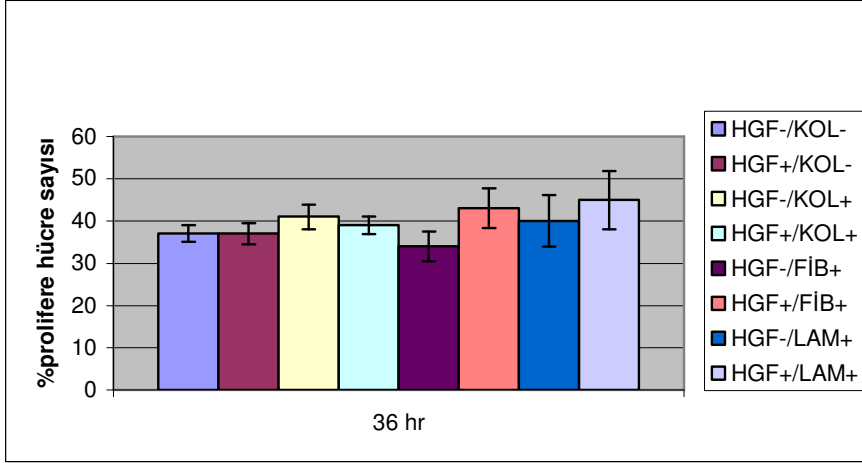


Şekil 23: SK Hep1 hücrelerinin proliferasyonuna ECM glikoproteinlerinin etkisi (Grafikteki sonuçlar hücre dizisi için en az üç kez, üçlü olarak çalışılmış, bulunan değerler kullanılarak elde edilmiştir).

HGF in ECM glikoproteinleri ile birlikte olmasının hücre proliferasyonunu etkilemediği belirlenmiştir (Şekil 24a, Şekil 24b)



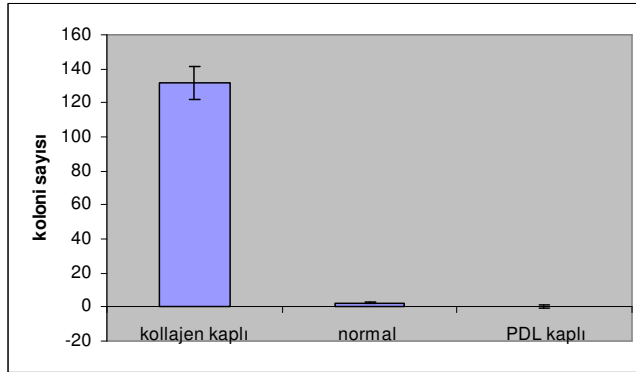
Şekil 24a: SK Hep1 hücrelerinin proliferasyonuna HGF ve ECM glikoproteinlerinin etkisi (24.saat)



Şekil 24b: SK Hep1 hücrelerinin proliferasyonuna HGF ve ECM glikoproteinlerinin etkisi (36.saat)

4.6. SK Hep1 HCC hücre dizisinin koloni oluşturması için ECM bileşenleri gereklidir

Sayım sonrasında SK Hep1 hücrelerinin ECM bileşenleri olmadan koloni oluşturmadığı görüldü (Şekil 25).



Şekil 25: SK Hep 1 hücrelerinin koloni oluşumuna kollajenin etkisi (Grafikteki sonuçlar hücre dizisi için en az üç kez, üçlü olarak çalışılmış, bulunan değerler kullanılarak elde edilmiştir).

4.7. Mikroçevrenin gen ekspresyonu üzerine etkilerinin saptanması

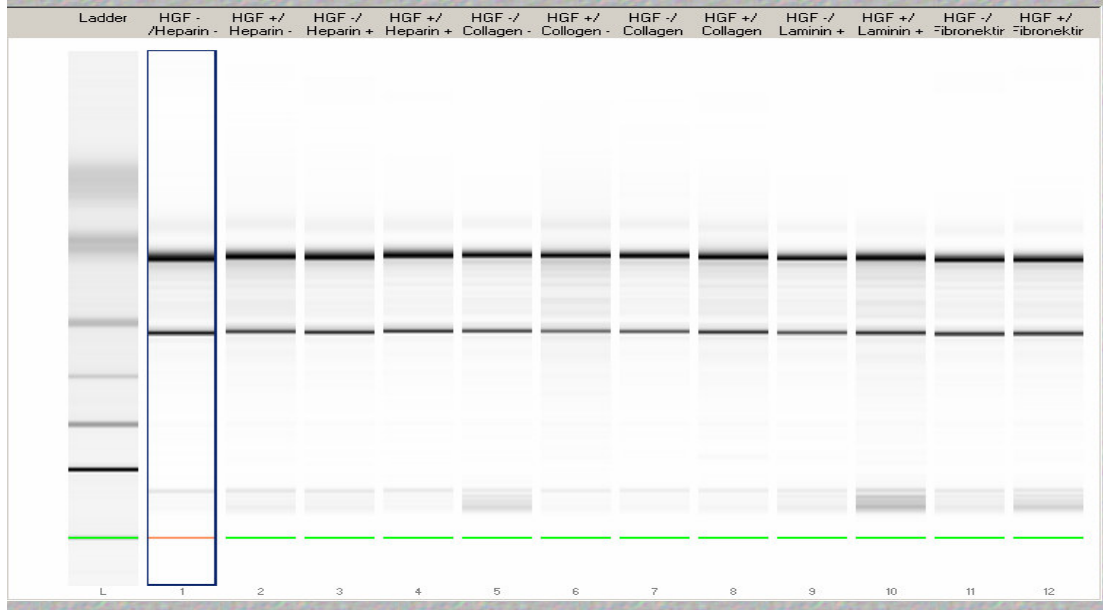
Değişen mikroçevre koşullarında, ekspresyonları değişen genleri belirlemek amacıyla çalışmamıza spesifik hedef genler belirlendi (integrin $\beta 1$, $\beta 4$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , E-kaderin)

Seçilen hücre hattından, belirlenen spesifik genlerin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması için RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri NanoDrop ND 1000 (Tablo 9) ve analizleri Agilent 2100 Bioanalyzer kullanılarak yapıldı

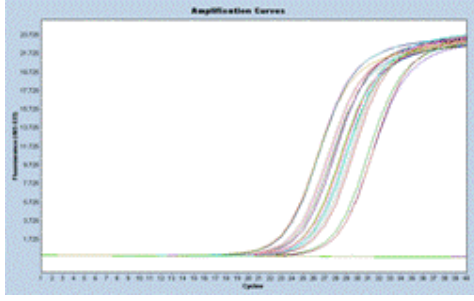
(Şekil 26). Real time PCR (Roche 480)optimizasyon çalışmaları sonucunda, E kaderin primeri haricinde tüm primerlerin 60⁰ C veya 62⁰ C de amplifiye olduğu belirlendi (Şekil 27).

Tablo 9: Total RNA İzolasyonu Spektrofotometrik Analiz Sonuçları (HGF/ECM glikoproteinleri)

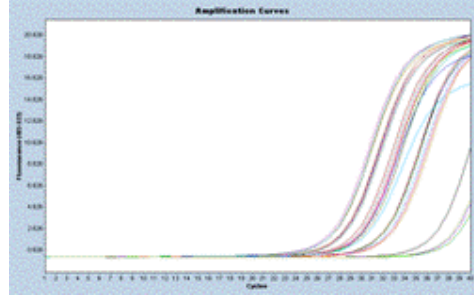
Örnek	Abs/260	Abs/280	Safılık	Kons (µg/ml)
HGF(-) / ECM (-)	27.700	12.989	2.13	1107.98
HGF(+) / ECM (-)	10.850	5.186	2.09	434.1
HGF(-) / KOLLAJEN (+)	12.768	6.048	2.11	510.72
HGF(+) / KOLLAJEN (+)	13.930	6.682	2.08	557.21
HGF(-) / LAMİNİN (+)	22.187	10.573	2.1	887.49
HGF(+) / LAMİNİN (+)	17.736	8.898	1.99	709.45
HGF(-) / FİBRONEKTİN(+)	22.441	10.703	2.1	897.66
HGF(+) / FİBRONEKTİN (+)	25.559	11.947	2.14	1022.37



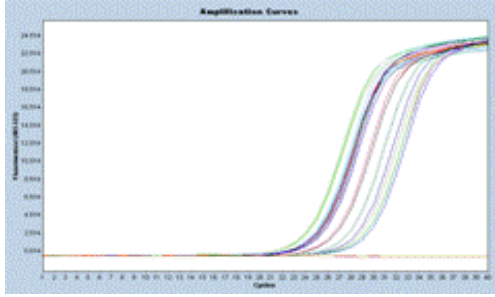
Şekil 26: Total RNA İzolasyonu Analiz Görüntüleri (HGF/ECM Glikoproteinleri, Heparin)



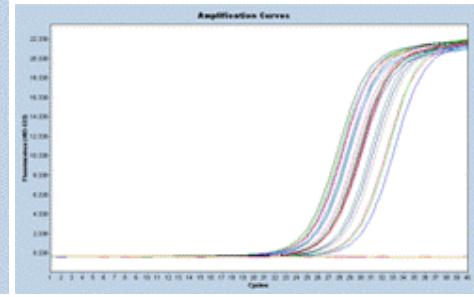
İntegrin $\alpha 3$



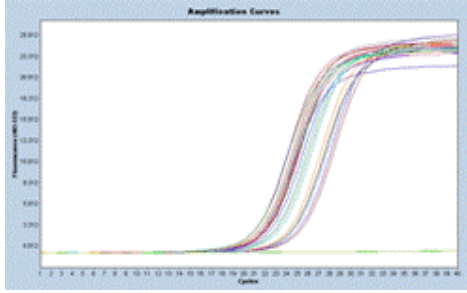
İntegrin $\alpha 5$



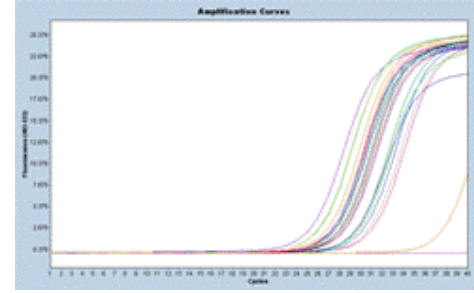
İntegrin $\alpha 6$



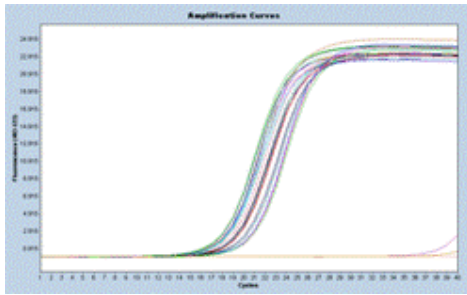
İntegrin αv



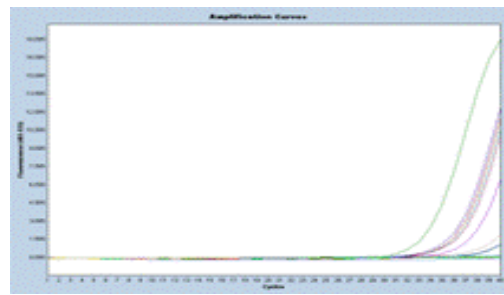
İntegrin $\beta 1$



İntegrin $\beta 4$



GAPDH



E kaderin

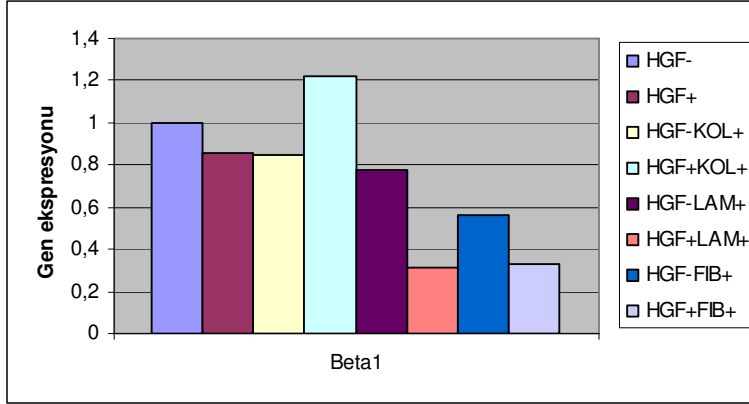
Şekil 27: Real Time PCR sonucunda gözlenen amplifikasyon grafikleri

4.7.1. HGF ve/veya Kollajen, Laminin ve Fibronektin'in İntegrin $\beta 1$ gen ekspresyonuna etkisi

Real time PCR sonuçlarına göre, integrin $\beta 1$ gen ekspresyonuna HGF'in 1,22 kat azalttığı kollajenin 1,4 kat azalttığı, HGF ile birlikte ise ekspresyonu 1,2 kat artırdığı saptandı.

HGF'in laminin ve fibronektin ile birlikte iken ekspresyonu 2-3 kat azalttığı belirlendi.

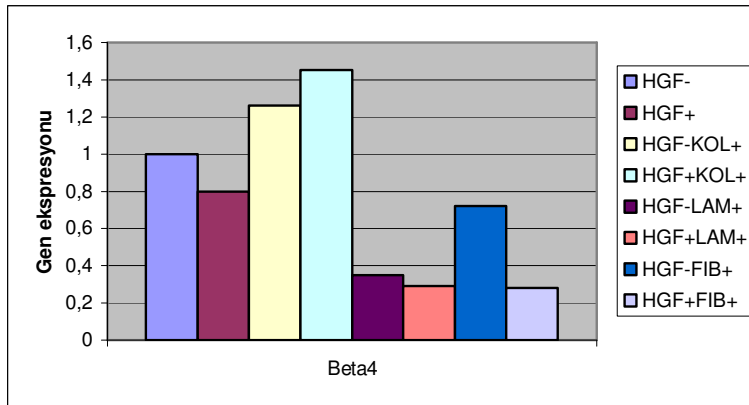
(Şekil 27, 28).



Şekil 28: HGF ve ECM glikoproteinlerinin integrin $\beta 1$ gen ekspresyonuna etkisi

4.7.2 HGF ve/veya Kollajen, Laminin ve Fibronektin'in İntegrin $\beta 4$ gen ekspresyonuna etkisi

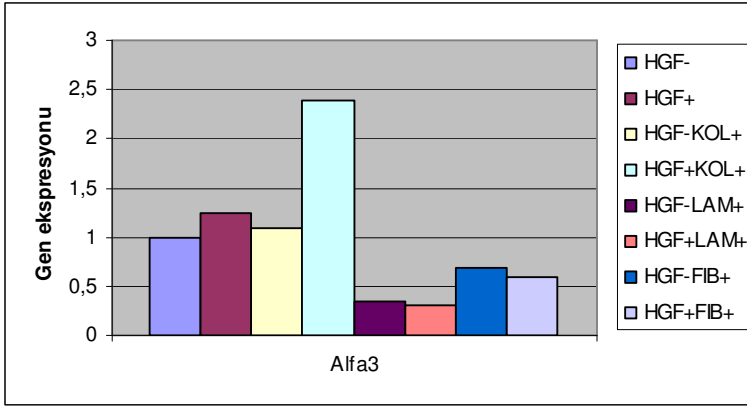
Real time PCR sonuçlarına göre, integrin $\beta 4$ gen ekspresyonunu HGF'in 1,25 kat azalttığı, kollajenin 1,26 kat artırdığı, HGF ile birlikte ise 1,45 kat artırdığı saptandı. Lamininin ekspresyonu 2,85 kat azalttığı, HGF ile birlikte ise 3,45 kat azalttığı belirlendi. Fibronektinin ekspresyonu 1,38 kat azalttığı, HGF ile birlikte ise 3,57 kat azalttığı saptandı (Şekil 27, 29).



Şekil 29: HGF ve ECM glikoproteinlerinin integrin $\beta 4$ gen ekspresyonuna etkisi

4.7.3. HGF ve/veya Kollajen, Laminin ve Fibronektin'in İntegrin $\alpha 3$ gen ekspresyonuna etkisi

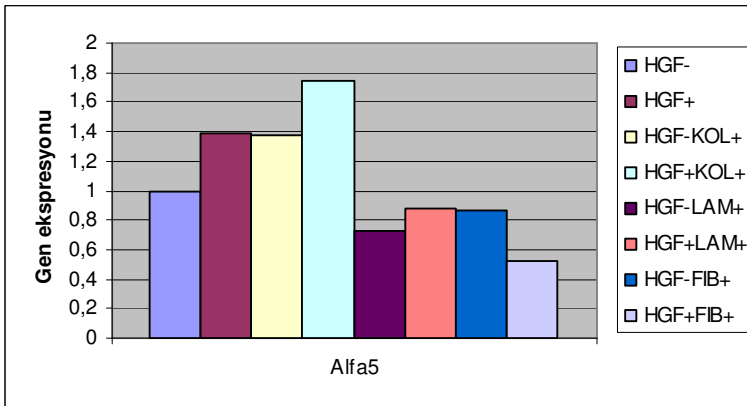
Real time PCR sonuçlarına göre, HGF'in integrin $\alpha 3$ gen ekspresyonunu 1,25 kat artırdığı, kollajen ile birlikte ise 2,4 kat artırdığı belirlendi. Kollajenin yalnız başına ekspresyonu değıştirmedeği saptandı. Laminin integrin $\alpha 3$ gen ekspresyonunu 2,85 kat azalttığı, HGF ile birlikte ise 3,22 kat azalttığı saptandı. Fibronektinin ekspresyonu 1,45 kat azalttığı, HGF ile birlikte ise 1,69 kat azalttığı saptandı (Şekil 27,30).



Şekil 30: HGF ve ECM glikoproteinlerinin integrin $\alpha 3$ gen ekspresyonuna etkisi

4.7.4. HGF ve/veya Kollajen, Laminin ve Fibronektin'in İntegrin $\alpha 5$ gen ekspresyonuna etkisi

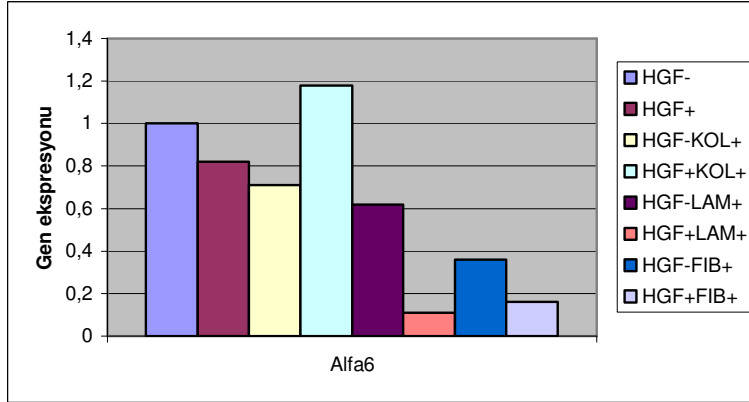
Real time PCR sonuçlarına göre, integrin $\alpha 5$ gen ekspresyonunu HGF'in 1,39 kat artırdığı, kollajenin 1,38 kat artırdığı, HGF ile birlikte ise 1,74 kat artırdığı saptandı. Lamininin ekspresyonu 1,38 kat azalttığı, HGF ile birlikte ise 1,13 kat azalttığı belirlendi. Fibronektinin ekspresyonu 1,16 kat azalttığı, HGF ile birlikte ise 1,92 kat azalttığı saptandı (Şekil 27, 31).



Şekil 31: HGF ve ECM glikoproteinlerinin integrin $\alpha 5$ gen ekspresyonuna etkisi

4.7.5 HGF ve/veya Kollajen, Laminin ve Fibronektin'in İntegrin $\alpha 6$ gen ekspresyonuna etkisi

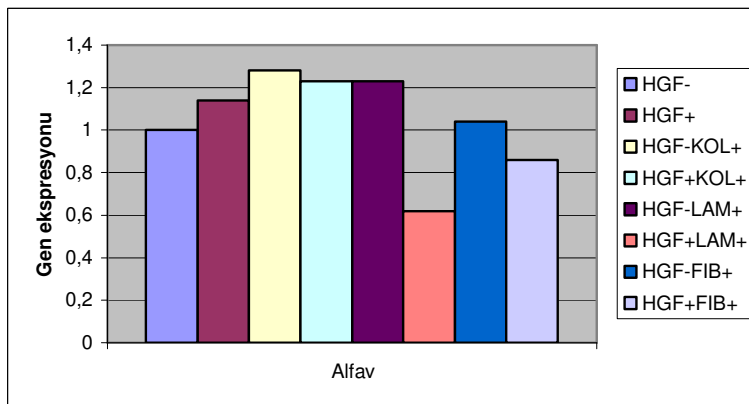
Real time PCR sonuçlarına göre, integrin $\alpha 6$ gen ekspresyonunu HGF'in 1,2 kat azalttığı, kollajenin 1,4 kat azalttığı, HGF ile birlikte ise 1,18 kat artırdığı saptandı. Lamininin ekspresyonu 1,61 kat azalttığı, HGF ile birlikte ise 9 kat azalttığı belirlendi. Fibronektinin ekspresyonu 2,77 kat azalttığı, HGF ile birlikte ise 6,25 kat azalttığı saptandı (Şekil 27, 32).



Şekil 32: HGF ve ECM glikoproteinlerinin integrin $\alpha 6$ gen ekspresyonuna etkisi

4.7.6. HGF ve/veya Kollajen, Laminin ve Fibronektin'in İntegrin αv gen ekspresyonuna etkisi

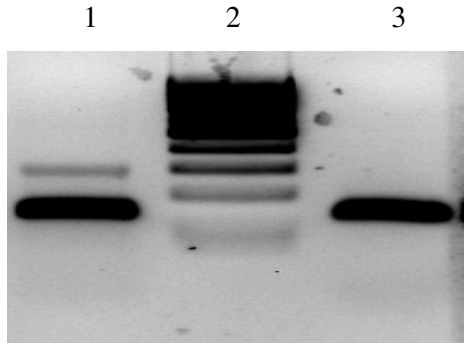
Real time PCR sonuçlarına göre, integrin αv gen ekspresyonunu HGF'in 1,14 kat artırdığı, kollajenin 1,28 kat artırdığı, HGF ile birlikte ise 1,23 kat artırdığı saptandı. Lamininin ekspresyonu 1,23 kat artırdığı, HGF ile birlikte ise 1,6 kat azalttığı belirlendi. Fibronektinin ekspresyonu değıştirmedığı, HGF ile birlikte ise 1,16 kat azalttığı saptandı (Şekil 27, 33).



Şekil 33: HGF ve ECM glikoproteinlerinin integrin αv gen ekspresyonuna etkisi

4.7.7. SK Hep1 hücrelerinde E-kaderin gen ekspresyonu

SK Hep1 hücrelerinde E-kaderin ekspresyonu gerçek zamanlı PCR yöntemi ile (Şekil 27) ve RT- PCR yöntemi ile de saptanamadı (Şekil 27, 34). Kontrol olarak kullanılan Hep40 hücre dizisinde E kaderin saptanırken bu hücre dizisinde saptanamaması, buna karşılık internal kontrol olarak kullanılan GAPDH bandının pozitif olması SKHep1 hücrelerinde E kaderin ekspresyonu olmadığını gösterdi.



Şekil 34: SK Hep1 ve Hep 40 hücrelerinin E kaderin ekspresyonu

(1.kuyu E-kaderin eksprese eden HCC hücre hattı, 2.kuyu 100bp marker, 3.kuyu SK Hep1 hücre hattı, 1. ve 3. kuyuda altta görülen bant GAPDH (yaklaşık 100 bp), 1.kuyuda üstte görülen bant E-kaderin bandı (303 bp))

4.7.8. HGF ve/veya Heparinin integrin gen ekspresyonlarına etkisi

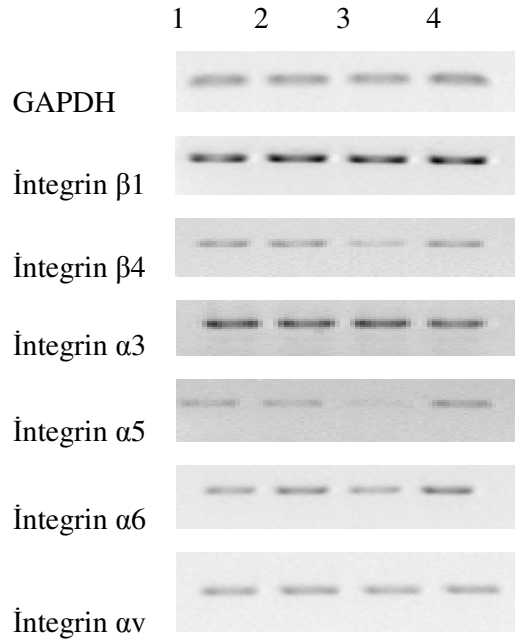
HGF ve/veya Heparinin integrin gen ekspresyonlarına etkisini incelemek için izole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri NanoDrop ND 1000 (Tablo 10) ve analizleri Agilent 2100 Bioanalizer kullanılarak yapıldı (Şekil 26).

RT PCR sonuçlarına göre; HGF'in integrin $\alpha 6$ ekspresyonunu artırdığı, ekspresyonuna bakılan diğer integrin genlerinin ise ekspresyonlarına herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi.

Heparinin integrin $\beta 1$, integrin $\alpha 3$, integrin $\alpha 6$ ve integrin αv gen ekspresyonlarına herhangi bir etkisinin olmadığı, integrin $\beta 4$, integrin $\alpha 5$ genlerinin ise ekspresyonlarını azalttığı belirlendi (Şekil 35).

Tablo 10: Total RNA İzolasyonu Spektrofotometrik Analiz Sonuçları (HGF/Heparin)

Örnek	Abs/260	Abs/280	Safılık	Kons (µg/ml)
HGF (-) / Heparin (-)	0,421	0,204	2,06	1263
HGF (+) / Heparin (-)	0,576	0,320	1,80	1728
HGF (-) / Heparin (+)	0,347	0,164	2,11	1041
HGF (+) / Heparin (+)	0,313	0,169	1,85	939



Şekil 35: HGF ve Heparinin İntegrin Gen Ekspresyonlarına Etkisi

1.kuyu HGF-/Heparin-, 2.kuyu HGF+/Heparin-, 3.kuyu HGF-/Heparin+, 4.kuyu HGF+/Heparin+ (Şekildeki jel sonuçları, SK Hep1 hücre dizisi için üç kez çalışılmış , elde edilen değerler kullanılarak elde edilmiştir).

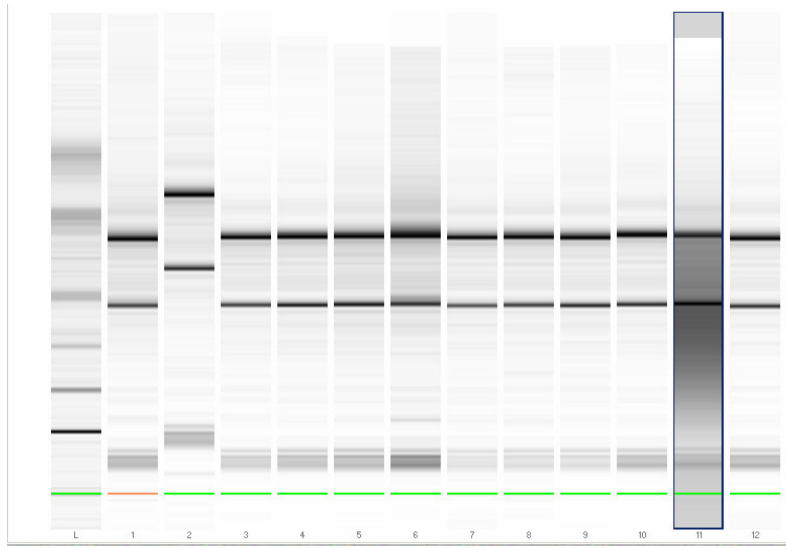
4.8. c DNA mikrodizin analizi

c DNA mikroarray gen ekspresyon analizi için seçilen koşullardan üçlü RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri NanoDrop ND 1000 (Tablo 11) ve analizleri Agilent 2100 Bioanalyzer kullanılarak yapıldı (Şekil 36).

Mikrodizin sonuçlarının analizi ikili olarak yapılan örnekler (biyolojik tekrarlar) RMA (robust microarray analysis) ön işleme algoritmasından geçirilmek suretiyle normalize edilerek, ortalama değerleri kullanılarak R (istatistiksel analiz programı) ile istatistik analizi yapıldı. Ekspresyon farkının en az 2 kat olduğu koşullar değerlendirmeye alınarak ekspresyonu artan ve azalan genler belirlendi.Heparin varlığında HGF uyarısı ile ekspresyonu artan ve azalan genler saptandı (Tablo12,13).

Tablo 11: Total RNA İzolasyonu Spektrofotometrik Analiz Sonuçları (HGF/Heparin)

Örnek	Abs/260	Abs/280	Safılık	Kons (µg/ml)
HGF (-) / Heparin (-) 1	0,248	0,132	1,87	744
HGF (-) / Heparin (-) 2	0,497	0,259	1,91	1491
HGF (-) / Heparin (-) 3	0,421	0,204	2,06	1263
HGF (+) / Heparin (-) 1	0,968	0,471	2,05	2904
HGF (+) / Heparin (-) 2	0,473	0,266	1,77	1419
HGF (+) / Heparin (-) 3	0,576	0,320	1,80	1728
HGF (-) / Heparin (+) 1	0,186	0,096	1,93	558
HGF (-) / Heparin (+) 2	0,347	0,164	2,11	1041
HGF (-) / Heparin (+) 3	0,205	0,096	2,13	615
HGF (+) / Heparin (+) 1	0,701	0,38	1,84	2103
HGF (+) / Heparin (+) 2	0,313	0,169	1,85	939
HGF (+) / Heparin (+) 3	0,246	0,137	1,79	738



Şekil 36: Total RNA İzolasyonu Analiz Görüntüleri (HGF/Heparin) (RNA örneklerinin analiz görüntüleri Tablo 11'deki sıra gibidir)

Heparin ve HGF in birlikte bulunduğu koşullarda yalnızca heparin bulunan koşullara göre hücre motilitesi, hücre döngüsü arresti , DNA bağımlı transkripsiyon regülasyonu, proteoliz, hücre içi bağlantılarının oluşması ve hücre haberleşmesi ile ilgili genlerin ekspresyonunda artış olduğu, transkripsiyonun negatif regülasyonunu, hücre adezyonu, hücre matriks adezyonu,sinyal iletimi, hücre döngüsü regülasyonu, kromozom organizasyonu ve protein ubiquitinasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonunda ise iki kat ve üstünde azalma olduğu belirlenmiştir (Tablo12 ve 13)

Tablo 12: Mikrodizin analiz sonucunda ekspresyonu azalan genler

Gen Tanımı	Gen Sembolü	Biyolojik İşlev Tanımı
Kalmodulin regüle spectrin-bağlı protein 1- benzeri 1	CAMSAP1L1	Bilinmiyor
Varsayılan protein FLJ40629	FLJ40629	Bilinmiyor
Pinin, desmozom bağlı protein	PNN	DNA bağımlı transkripsiyon regülasyonu
DNA bağlama 2 inhibitörü, dominant negatif heliks-loop-heliks protein	ID2	Negatif transkripsiyon regülasyonu
CDC5 hücre bölünme döngüsü 5-benzeri (S. pombe)	CDC5L	DNA bağımlı transkripsiyon regülasyonu, m RNA işlenmesi ve kesip çıkarılması
PHD parmak protein 3	PHF3	DNA bağımlı transkripsiyon regülasyonu
Erken büyüme cevabı 1	EGR1	DNA bağımlı transkripsiyon regülasyonu
Ökaryotik translasyon başlama faktörü 5B	EIF5B	Translasyon regülasyonu, protein biyosentezi
PRP4 pre-mRNA işlenmesi faktörü 4 homolog B (yeast)	PRPF4B	RNA işlenmesi, m RNA çekip çıkarılması
U2-bağlı SR140 protein	SR140	RNA işlenmesi
Kollajen, tip VI, alfa 3	COL6A3	Hücre adezyonu,gelişim
Integrin, beta 8	ITGB8	Hücre adezyonu,hücre matriks adezyonu,sinyal iletimi
Kullin 2	CUL2	Hücre döngüsü arresti, hücre proliferasyonu, apoptoz
Monoklonal antibody Ki-67 tarafından tanınan antijen	MKI67	Hücre döngüsü, proliferasyonu regülasyonu
DEP bölgesi içeren 1	DEPDC1	Hücre içi sinyal iletimi
GTP bağlanma protein hücre iskelet kaslarında yüksek oranda eksprese edilir	GEM	Hücre yüzeyi reseptörü bağlı sinyal iletimi
SMC4 yapısal kromozom bakımı 4-benzeri 1 (yeast)	SMC4L1	Kromozom organizasyonu
Tetratricopeptid tekrarı bölge 3	TTC3	Protein ubiquitinasyonu
Çözünmüş taşıyıcı aile 7	SLC7A11	Protein kompleks oluşumu,taşıma
Mitojen aktive protein kinaz kinaz5	MAP4K5	Protein, amino asit fosforilasyonu
Kemokin (C-X-C motif) ligandı 2	CXCL2	İmmun cevap
Uveal otoantijen	UACA	Viral yaşam döngüsü

Tablo 12: Mikrodizin analiz sonucunda ekspresyonu artan genler

Gen tanımı	Gen sembolü	Biyolojik İşlev Tanımı
Varsayılan protein LOC144871	LOC144871	Bilinmiyor
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) polipeptid 6	DDX6	Bilinmiyor
Plekstrin homoloji bölgesi içeren B ailesi (evectins) üyesi 2	PLEKHB2	Bilinmiyor
Rho-ilişkili BTB bölgesi içeren 3	RHOBTB3	Bilinmiyor
Varsayılan LOC401394 Varsayılan LOC402578	LOC401394 LOC402578	Bilinmiyor
Kromozom1 açık okuma çerçevesi 121	C1orf121	Bilinmiyor
Ovaryum spesifik asidik protein	OSAP	Bilinmiyor
Nipsnap homoloğu 3A (C. elegans) Nipsnap homoloğu3A (C. elegans)	NIPSNAP3A	Bilinmiyor
Metastaz bağımlı akciğer adenokarsinom transkripti 1	MALAT1	Bilinmiyor
AK091718 tarafından desteklenen varsayılan gen	LOC401504	Bilinmiyor
Trophoblast-kökenli	TncRNA	Bilinmiyor
Varsayılan protein MGC16121	MGC16121	Bilinmiyor
Nükleer reseptör koaktivatörü 6 ilişkili protein	NCOA6IP	Bilinmiyor
Serpin peptidaz inhibitörü, B (ovalbumin), üye 9	SERPINB9	Anti apoptoz sinyal iletimi
Myristoylated alanine-zengin protein kinase C substratı	MARCKS	Hücre motilitesi
Lenfosit antijen 6 kompleks, bölge E	LY6E	Hücre yüzeyi reseptörü bağlı sinyal iletimi
ERBB2 ileticisi, 2	TOB2	Hücre döngüsü kontrolü, hücre proliferasyonun negatif regülasyonu
U2AF homoloji motif (UHM) kinaz 1	UHMK1	Hücre döngüsü arresti
Tripartit motif-içeren 22	TRIM22	DNA bağımlı transkripsiyon regülasyonu, protein,immün cevap, protein ubiquitinasyonu
PPAR bağlanma proteini	PPARBP	DNA bağımlı transkripsiyon regülasyonu,gelişim
RNA-bağlanma bölgesi içeren (RNPI, RRM) 2	RNPC2	DNA bağımlı transkripsiyon regülasyonu,m RNA ve RNA işlenmesi, m RNA kesilip çıkarılması
Tubi benzeri protein 4	TULP4	DNA bağımlı transkripsiyon regülasyonu
Kesip çıkarma faktörü, arjinin/serin zengin 7, 35kDa	SFRS7	RNA ve m RNA işlenmesi, kesip çıkarılması
Düşük yoğunlukta lipoprotein reseptör-ilişkili protein 8, apolipoprotein reseptörü	LRP8	Proteolizis,lipid metabolizması
Dynein, sitoplazmik, ağır polipeptid 1	DNCH1	Proteolizis,mikrotübül temelli hareket,
Ektodermal-nöral korteks (BTB-benzeri bölge ile)	ENC1	Gelişim,sinir sistemi gelişimi
Miyelin bazik protein	MBP	Merkezi sinir sistemi gelişimi,immün cevap
Spindlin	SPIN	Gelişim, gametogenez,hücre döngüsü
Seroid-lipofuskinosis, nöral 8	CLN8	Sinir sistemi gelişimi
Çözülmüş taşıyıcı aile 25, üye 37	SLC25A37	Taşıma
Gap junction protein, alfa7(connexin 45)	GJA7	Taşıma, hücre içi bağlantılarının oluşması, hücre haberleşmesi
RAB3B, RAS onkogen ailesi üyesi	RAB3B	Hücre içi protein taşınması
Kromobox homoloğu 5	CBX5	Kromatin birliği ve dağılması

5.TARTIŞMA

Kanser günümüzde hala, insan morbidite ve mortalitesinin ciddi nedenlerinden biridir. Kanser ölümlerinin %90'ı metastaz oluşumundan kaynaklanır. Tümör gelişimini içeren bütün süreçler, lokal invazyon ve tümör metastazının klinik olarak oluşumu ile çok ilgili olmalarına karşın moleküler seviyede, yeterli düzeyde anlaşılammışlardır (66). Kanser metastazı, hücrenin primer tümörden ayrılması, damar veya lenfatik sistem yoluna girmesi, dolaşım ile yayılması, hedef organa yerleşmesi ve orada çoğalmasını içeren çok basamaklı bir süreçtir (47,58). Yani metastaz tümör hücresi- konak hücre, tümör hücresi-matriks etkileşimlerini gerektiren bir biyolojik olaydır. İnvazyon için de sadece hücre-hücre etkileşimi değil, hücre ve ECM arasındaki etkileşimde gereklidir. ECM, HGF gibi birçok büyüme faktörlerinin depolanmasında ve biyolojik aktivitesinde önemli rol oynamaktadır. ECM hücrelerin hareket etmesi için gerekli ortamı sağlamakla kalmaz, HGF'in kesilmesi yani aktivasyonu için gerekli uPA ve tPA gibi faktörleri de içerir (31,44). Bu süreç karaciğer kanseri gelişimi ve ilerlemesi için de çok önemlidir..

ECM elemanları ve büyüme faktörlerinin, adezyon motilite ve proliferasyon gibi *in vivo* tümör metastazında önemli hücre davranışlarına etkisinin incelenmesi ve bu faktörlerin etkilerini hangi mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştiğinin belirlenmesi günümüzde en aktif araştırma alanlarından birisidir. ECM hepatositleri bir kapsül olarak çevreler ve hepatositler için kalıcı bir toprak gibi görev yapar (68). Hepatositlerin malign transformasyonu genelde kronik karaciğer hasarı, rejenerasyon, ve siroz zemininde gerçekleştiği için ECM yeniden düzenlenmesi HCC gelişiminde çok önemli rol oynar. Yaralanma ve hasara yanıt olarak hepatositlerin proliferasyonu ve ECM komponentlerinin üretimi gerçekleşir. Hasar kalıcı olduğunda ECM komponentlerinin net birikimi ve siroz oluşur ve bu süreç neoplazi gelişimi ile sonuçlanabilir. HCC hücreleri kollajen IV gibi ECM bileşenlerini sentezleyebilirler.HCC da kollajen IV dışında laminin ve fibronektin ekspresyonunda artış olduğu da bildirilmiştir (68). Ana laminin reseptörü olan integrinlerin de HCC hücrelerinin migrasyon ve invazyonunda rolü olduğu düşünülmektedir. Ancak HCC dokularında kollajen IV, laminin ve fibronektin düzeylerindeki bu artışın HCC hücrelerinin davranışlarını ve gen ekspresyonunu nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir. HCC'da saptanan bir diğer önemli değişiklik ise glikozaminoglikanlardadır. Özellikle heparin ve HSPG'ların varlığının tümör gelişimi, dediferansiyasyonu ve metastazı artırdığı ve bunların inhibisyonunun önemli olabileceği varsayılmaktadır (68). Heparin ve HSPG'ların en önemli rolünün HGF gibi büyüme

faktörlerinin salınımı ve aktivasyonu üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Ancak bu etkinin nasıl gerçekleştiği henüz tanımlanmamıştır.

Bu nedenle çalışmamızda HCC hücre dizilerinde HGF'ün ve ECM adezif glikoproteinlerden kollajen, laminin, fibronektinin, heparin gibi bileşenlerinin adezyon, motilite ve proliferasyon gibi hücre davranışlarına ve integrin ekspresyonundaki rolleri incelenmiştir.

HCC hücre dizilerinden SK Hep1, Huh7, HepG2, Hep3B hücrelerinin adezyonu ve adezyonda HGF'nin ve kollajen, laminin, fibronektin, heparin gibi ECM elemanlarının rolleri incelenmiştir. HGF'in 15 dk süre ile uygulanmasının bu hücre dizilerinin tamamında hücre adezyonunu artırdığı, bu artışın SK Hep 1 hücre dizisinde daha belirgin olduğu belirlenmiştir. Tümör metastazında ilk basamak neoplastik hücrenin primer tümör kitlesinden ayrılmasıdır. Bu basamakta epitelial kökenli tümörlerde E-kaderin kaybının önemli olduğu bilinmektedir (54). Bu çalışmada SK Hep1 hücre dizilerinde E-kaderin ekspresyonunun olmadığı saptanmıştır. SK-Hep1 hücrelerinde E kaderin ekspresyonu RT-PCR ile incelendiğinde kontrol olarak kullanılan hücrelerde E-kaderin gen ürününün gözlemlendiği, ancak SK-Hep1 hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunun olmadığı saptanmıştır. İnternal kontrol olarak kullanılan GAPDH ile amplifikasyonda SK Hep 1 hücreleri ve Hep 40 hücrelerinde aynı yoğunlukta band elde edilirken ve pozitif kontrol olarak kullanılan Hep 40 hücrelerinde E kaderin ekspresyonu saptanırken, SK Hep1 de E kaderine özgü bandın gözlenmemesi deneysel bir hata olmadığını göstermektedir. (Şekil 34). Bu da SK-Hep1 hücrelerinin diğer hücrelere göre daha hızla adezyon yapmasını ve daha invazif fenotip göstermesini kısmen açıklamaktadır.

Yakın geçmişte E-kaderinin tümör gelişimi sırasındaki fonksiyonunun, sıklıkla yerine mezenşimal kaderinlerden N-kaderin veya kaderin-11 gibi kaderinlerin geçmesi ile geçersiz kılındığı gözlenmiştir. E-kaderin/katenin kompleksleri, çeşitli insan karsinoma hücrelerinin gelişiminde ve invazif fenotip kazanmalarında anahtar rol oynamaktadırlar (54). Kaderin ekspresyonundaki değişikliklerin, sadece tümör hücre adezyonunu modüle etmediği, sinyal iletimini de etkileyerek tümör malignansisinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (53).

Araştırmalar, HGF uygulamasından 24-48 saat sonra metalloproteinaz, osteopontin veya integrin ekspresyonu olduğunu tanımlamışlardır. Bu genlerin kanser spesifik olmaması şaşırtıcı değildir. HGF indüksiyonundan hemen sonra, migrasyon önceki olaylardan birinin E-kaderin bağlantılarının bozulması olduğu da belirlenmiştir (55).

Primer tümör kitlesinden ayrılan tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz yapabilmesi için öncelikle ECM adezif glikoproteinleri ile adezif ilişkiler kurması gerekmektedir. Tümör

hücreleri *in vivo* koşullarda hem komşu hücreler ile hem de ECM elemanları ile adezif ilişkiler kurmaktadır. Bu değişikliklerin tümör hücrelerini, tümör hücrelerinin ise ECM deki yapıyı etkiledikleri bilinmektedir (31,34,44). Bu tip adezif ilişkilerde kollajen, fibronektin ve laminin gibi ECM adezif glikoproteinleri önemlidir. Dolayısıyla kanser gelişimi, sadece malign hücrelerde yüksek frekansta meydana gelen genetik değişikliklerden değil, tümör mikroçevresinde meydana gelen değişikliklerden de etkilenir. Çalışmamızda ECM adezif glikoproteinlerinin varlığının SK Hep1 hücrelerinin adezyonuna etkisi incelendiğinde, kollajen ve fibronektinin adezyonu artırdığı, lamininin ise hücre adezyonunu bazal adezyona göre azalttığı belirlenmiştir. HGF ile ECM elemanlarının birarada bulunmasının bu hücrelerin bu ECM komponentlerinin tümüne adezyonunu artırdığı da saptanmıştır.

HGF hepatosit büyümesi ve DNA sentezinde bilinen en potent uyarandır; aynı molekül bir saçılım (*scatter*) faktörüdür ve birçok hücre tipinin motilitesini artırır. Örneğin epitel hücreleri HGF yokluğunda hücreler polarize, sıkı bağlantılı yapılar halindeyken, HGF varlığında ayrışır, şekil değiştirir, mezenşimal morfoloji kazanır ve hareketli hale geçerler, kollajen jel içine invaze olabilirler (69). Hücrelerin hareketi için yüzeye adezyon yapmasının gerekli olduğu gözönüne alındığında, bizim gözlediğimiz HGF'e bağlı adezyon artışı beklenebilir. Bu artışın hücre motilite ve invazyonundaki değişikliğe zemin hazırlaması olasıdır.

Birçok kanser tipi gibi, HCC gelişimi ve metastazında, hücre motilitesi önemli faktördür. İnvazyon ve metastaz HCC gelişiminde önemli belirleyicilerdir. Kanser hücrelerinin motilitesi, hücrelerin mikroçevreleri ile etkileşimine bağlıdır (7). Biz de adezyon değişikliklerinin hücre motilitesinde bir değişime neden olup olmadığını saptamak için hem HGF'in hem de ECM bileşenlerinin SK Hep1 hücre dizisinin motilitesine olan etkisini araştırdık. Adezyon deneylerindeki sonuca benzer olarak kollajen ve fibronektinin motiliteyi artırdığı, lamininin ise hücre motilitesini bazal motiliteye göre değiştirmedeği, HGF'in hücre motilitesini tüm koşullarda artırdığı saptanmıştır. Hepatositler, diğer çoğu epitel hücrelerden farklı olarak, organize olmuş bir bazal membrandan yoksundur. Hemen hemen hiç laminin olmayan ve kollajenlerin, fibronektin ve tenaskinin çok miktarda bulunduğu perisinözoidal matrisle ilişki içindedirler. Bu da HCC kökenli SK Hep1 hücrelerinin kollajen ve fibronektine adezyonlarının fazla olması ve bu moleküllerle bağlanmanın hücre motilitesini artırmasına karşın, lamininin hücre adezyonu azaltıcı ve motiliteyi değiştirmemesinin nedeni olabilir.

ECM komponentlerinin ve HGF' in SK Hep1 hücre dizisinin proliferasyonuna olan etkisi incelendiğinde HGF'in SK-Hep1 hücrelerinde proliferasyonu minimal düzeyde

artırdığı, lamininin proliferasyonu artırdığı, kollajen ve fibronektinin ise proliferasyonu değiştirmediği belirlenmiştir. Bu sonuç hücre adezyon ve motilitesi ile hücre proliferasyon sürecinin farklı mekanizmalar ile gerçekleştiği, SK-Hep1 hücrelerinin kollajen ve fibronektin ile kurduğu adeziv ilişkilerin hücre motilite ve invazyonunu tetikleyen sinyal ileti yolaklarını, laminin ile gerçekleştirdiği bağlantıların ise hücre proliferasyon yolağını aktive ettiğini düşündürmektedir. Daha önceki çalışmalarımızda HGF e bağlı c-Met aktivasyonu sonrası örn Grb2 gibi bazı sinyal ileti moleküllerinin bloklanması halinde motilite ve invazyonun bloklanmasına karşın, mitojenitenin bundan etkilenmiyor olması da hücre proliferasyonu ve motilite, invazyon sürecinin farklı sinyal iletimi yolakları ile uyarılıyor olabileceği görüşünü desteklemektedir (38).

Hücrelerin ECM ve büyüme faktörleri ile etkileşimlerinin molekülleri hücre davranışını biraç yolla düzenlediği düşünölmektedir (51). Bu etkileşimlerden birisi büyüme faktörünün ECM'e bağlanmasıdır ve bu durum büyüme faktörünün bölgesel konsantrasyonunu ve biyolojik aktivitesini etkilemektedir. İkinci tip etkileşim ise büyüme faktörlerinin ve ECM-hücre bağlantılarının gen ekspresyonlarını düzenlenmesini ile sonuçlanır. Örneğin bazı büyüme faktörleri ECM proteinlerinin ve onların reseptörlerinin ekspresyonunu değiştirir. Sirotik karaciğerde, tip1 kollajen ve tip 4 kollajen ECM'in önemli bileşenlerindedir, oysa bazal membran proteinlerinden laminin fibriler kollajen ile yer değiştirmiştir. Bazal membranın bileşenleri kullanılarak yapılan motilite deneylerinde, integrin $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha v\beta1$, $\alpha v\beta5$ HCC hücre invazyonunda önemli olduğu tanımlanmıştır (7). Hücrelerin, ECM'e integrinler aracılığıyla tutunma ve ayrılmaları hücre migrasyonunda önemli rol oynamaktadır. Kanser gelişimi sırasında çok değişik integrinlerin ekspresyon seviyeleri artmaktadır. Normal hepatositlerde $\alpha5\beta1$ ve $\alpha6\beta1$ ana integrinler iken , hepatositlerin karsinogenezinde $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$ ve $\alpha3\beta1$ çok miktarda eksprese olmaktadır. Bu integrin ekspresyon değişiklikleri hücrelerin migrasyon kapasitesinin artmasına neden olmaktadır. Bundan başka, sirotik tümör mikroçevresinde çok miktarda eksprese olan çeşitli büyüme faktörleri integrin ekspresyonunun nedeni olarak tanımlanmıştır (7). Ancak tümörlerin ECM ve büyüme faktörlerinin birarada bulunduğu bir ortamda bulunduğu gözönüne alındığında, büyüme faktörleri ve ECM elemanlarını varlığının integrin gen ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi integrin ekspresyon değişimlerinin hepatoselüler karsinogenez sürecine etkisini belirleyebilmek için önemlidir.

Bu biyolojik etkilerin moleküler mekanizmalarının belirlenmesine yönelik olarak gerçekleştirdiğimiz gen ekspresyonu analizleri ile ECM elemanları ve HGF in yalnız olarak

uygulamalarının integrin zincirlerinin ekspresyonlarını değiştirdiği, ancak birlikte uygulamalarının tek olarak gösterdikleri ekspresyon paternini değiştirdiği belirlenmiştir.

Real time PCR sonuçlarına göre, HGF'in tek başına uygulanması durumunda integrin $\beta 1$, $\beta 4$ ve $\alpha 6$ gen ekspresyonu minimal düzeyde azalttığı, sırasıyla 1.22 , 1.25 ve 1.2 kat, integrin $\alpha 3$, $\alpha 5$ ve αv gen ekspresyonu minimal düzeyde artırdığı, sırasıyla 1.25 , 1.39 ve 1.14 kat belirlenmiştir. Kollajenin tek başına kullanımı halinde ise integrin $\beta 1$ ve $\alpha 6$ gen ekspresyonlarını 1.4 kat azalttığı, $\beta 4$, $\alpha 5$ ve αv gen ekspresyonlarını ise sırasıyla 1.26, 1.38 ve 1.28 kat artırdığı, $\alpha 3$ gen ekspresyonunu ise değiştirmediği belirlendi. Bu durum HGF'in ve kollajenin integrin ekspresyonunda çok önemli değişikliklere neden olmadığını, adezyonu ve motiliteyi artırıcı etkisinin diğer integrin tiplerinden veya integrin ekspresyonu değişikliklerinden çok, integrin lokalizasyon değişikliklerinden kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Fibronektin ve laminin ile kaplanmış ortamda 24 saat süre ile üretilen hücrelerde ise kaplı olmayan standart ortamda üretilenlere göre hem integrin $\beta 1$ ve $\beta 4$, hem de integrin $\alpha 3$, $\alpha 5$ ve $\alpha 6$ integrin gen ekspresyonlarını 1.5-3 kat azalttığı, yalnızca integrin αv ekspresyonunu 1.23 kat artırdığı belirlendi. $\alpha 3\beta 1$ integrinin, laminin kollajen ve fibronektine bağlanmada $\alpha 5\beta 1$ ve $\alpha v\beta 1$ nin fibronektine, $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$ 'un ise laminine bağlanmada önemi düşünüldüğünde $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$ gen ekspresyonudaki azalmanın fibronektin ve lamininli ortamda elde edilen davranış değişikliklerinde rolü olabilir. Bu sonuç fibronektinli ortamda çoğalan SK Hep1 hücrelerindeki motilite artışında $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ integrin ekspresyonundaki azalmanın rol oynayabileceğini ; lamininli ortamda çoğalmaya bağlı azalan $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$ ekspresyon değişimlerinin ise hücre proliferasyonundaki artışta önemli olabileceğini duşunulduğundur.

ECM adeziv glikoproteinleri ile HGF in birlikte kültür ortamında bulunması halinde genelde, incelenen ve değiştiği saptanan tüm integrin tiplerinin ekspresyonlarının değişikliklerini (artma ve azalmayı) artırdığı saptanmıştır. Bu artış kollajen ve HGF in birlikte kullanımında 1.45-2.4 arasında gerçekleşmektedir. HGF laminin ile birlikte iken gen ekspresyonlarındaki azalma 3.45-9 kat veya fibronektin 1.7- 6.25 kat olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç HGF'in kollajen, laminin veya fibronektin ile birlikte bulunması integrin gen ekspresyonlarında önemli değişikliklere neden olmaktadır. özellikle laminin ve HGF birlikte iken $\beta 1$, $\beta 4$ ve $\alpha 6$ ekspresyonlarındaki sırasıyla 3.22, 3.45, ve 9 katlık azalma, HGF ve laminin ile uyarılan proliferasyon artışının bu integrinler ile modüle ediliyor olabileceğini desteklemektedir. Çalışmamızda fibronektinin hem bazal hem de HGF ile uyarılan hücre adezyonunu ve motilitesini belirgin bir şekilde artırdığını belirlemiştik. Gerçek zamanlı PCR

sonuçları 24 saatlik fibronektin ve HGF uygulamasının integrin $\beta 1$, $\beta 4$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ ve $\alpha 6$ gen ekspresyonlarının sırasıyla 3, 3.57, 1.7, 1.9 ve 6.25 kat azalttığını gösterdi. Hücre motilitesinin gerçekleşebilmesi için hücrelerin ECM deki adeziv glikoproteinlere tutunmaları ve daha sonra bu etkileşimleri ortadan kaldırarak hareket etmeleri gerekmektedir. Bu dinamik süreç motilite ve invazyonun sürecinde önemlidir. Bu nedenle SKHep1 hücrelerinde fibronektin ve HGF uyarımına bağlı $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$ integrin ekspresyonundaki azalma, motilite ve invazyon artışında rol oynuyor olabilir.

HGF'in miyeloma hücrelerinin fibronektine adezyonunu stimüle ettiği ve bu durumun $\alpha 4$ ve $\beta 1$ integrin ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada HGF'in bu tip integrinlerin ekspresyonunu artırmadığı da bildirilmiştir. HGF'in miyeloma hücrelerinin adezyonunu, Akt bağımsız olarak PI3K yolağının aktivasyonu ile stimüle ettiği sonucuna varılmıştır (66). HGF, c-Met aracılığı ile B-lenfoma hücrelerinin, fibronektin ve kollajene adezyonunu $\beta 1$ integrinler ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$) aracılığıyla artırarak migrasyonu ve invazyonu da artırdığı, laminine adezyonu ise değiştirmedeği belirtilmiştir. Laminin reseptörü olan $\alpha 6\beta 1$ 'in HGF ile aktive olmadığı gösterilmiştir (61).

HCC hücrelerinin migrasyonunun, hücrelerinin yüzeyinde bulunan integrin $\alpha 6\beta 1$ ekspresyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir. İntegrin aktivasyonunun neoplastik hücrelerle mikroçevreleri arasındaki yapısal ve fonksiyonel etkileşimlerin sağlanmasından sorumlu olduğu söylenmektedir (56). Bizim çalışmamızda HGF uygulamasının kollajen varlığında $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha 3\beta 1$ integrin ekspresyonunda artışa neden olsa da, çalışılan diğer integrinler için 24 saatlik sürede integrin gen ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır.

Büyüme faktörleri ECM'e belirli matris moleküllerinin kor proteinlerinden veya glikozaminoglikan zincirlerinden bağlanabilirler. Birçok büyüme faktörü, negatif yüklü heparan sülfat proteoglikanların zincirlerine bağlanabilen motifleri içerir. Bunların arasında FGF, KGF, IL-3, HGF/SF, TGF- β , PDGF, Schwan hücresi büyüme faktörü sayılabilir (67).

Çeşitli büyüme faktörleri yüksek affinite ile tirozin,serin/threonin kinaz aktiviteli reseptörlere bağlanırlarken düşük affinite ile de proteoglikanlara bağlanırlar. Bu bağlanma büyüme faktörlerinin yüksek affiniteli sinyal reseptörlerine sunulması için gereklidir. Proteoglikanlar sinyali tek başına iletemezler ama büyüme faktörünü modüle ederler (65).

Büyüme faktörlerinin aktivasyonlarının düzenlenmesinde proteoglikanların rolü ile ilgili yapılan araştırmaların sayısı gittikçe artmaktadır. HGF, heparin ve diğer heparin sülfat proteoglikanlara karşı yüksek affiniteye sahiptir. Heparinin ayrıca insanda ve çeşitli hayvan modellerinde sitoplazmadaki HGF ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (41). HSPG' ların bağlanması HGF sinyal yolağının aktivasyonu için gerekli olmamasına rağmen olasılıkla,

hücrelerin normal veya anormal davranışlarının belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (28). Bu çalışmada 3 µg/ml heparin varlığının SK Hep1 hücre dizisinin adezyonunu, motilitesini ve proliferasyonunu hem bazal olarak, hem de HGF ile uyarıldığında minimal derecede azalttığı saptanmıştır. Çalışmamızda heparin dozuna bağlı bir değişim saptanamamıştır.

Glikozaminoglikanlar ve onların heparine bağlanabilen çeşitli büyüme faktörlerinin biyolojik aktivitelerinin düzenlenmesindeki rolleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, deneyde kullanılan, çözünebilir heparin konsantrasyonunun biyolojik etkinin sonucu açısından çok önemli olduğu belirtilmektedir. Örneğin 0.1-10µg/ml gibi düşük konsantrasyonlarda heparinin, primer rat hepatositlerinde HGF nedenli mitogenezi artırdığı, 100µg/ml gibi yüksek konsantrasyonlarda ise hiçbir etkisi olmadığı veya inhibe edici etki gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada heparinin veya heparan sülfatların c-Met reseptör dimerizasyonunu, fosforilasyonunu sağlayarak proliferasyonu artırdığı da gösterilmiştir (40). Başka bir çalışmada ise heparinin hepatositlerin yüzeyinde bağlı HGF'in serbest kalmasına neden olduğu bildirilmiştir (41).

HGF ve heparinin insan keratinosit hücrelerinde proliferasyonu 5 kat artırdığı gösterilmiştir (54). Heparinin proliferasyon üzerine etkisini HCC hücre dizilerinden HepG2 hücrelerinde inceleyen bir çalışmada ise heparinin anti proliferatif etki gösterdiği gösterilmiştir (64). Ancak bu etkilerin mekanizması tam olarak tanımlanmamıştır. Bu değişikliklerde integrinlerin rol oynayıp oynamadığı incelendiğinde, heparinin integrin β1, integrin α3, integrin α6 ve integrin αv gen ekspresyonlarına herhangi bir etkisinin olmadığı, integrin β4, integrin α5 genlerinin ise ekspresyonlarını ise azalttığı belirlendi. HGF eklenmesinin ise heparin tarafından indüklenen bu azalmayı artıran kaldırdığı gözlemlenmiştir. Heparin hücrelerden HGF salınımını artırarak hücreleri yaralanma, iskemi gibi durumlarda koruyucu etki yapabileceği düşünülmektedir (41). Heparinin bu etkiyi nasıl oluşturduğu açık değildir. Ancak HGF ile heparinin birlikte bulunması halinde SK Hep1 hücrelerinin gen ekspresyonu paternlerinin değiştiği açıktır. Bu konunun daha ayrıntılı olarak incelenmesi büyüme faktörleri ile heparinin etkileşimlerinin hangi genler aracılığı ile gerçekleştiğinin açıklanmasında çok önemlidir.

Heparin ve HSPG'lerin HCC gelişiminde, özellikle proliferasyon ve diferansiyasyon arasındaki dengeyi koruyarak rol oynayabileceği, heparinaz ile heparin ve HSPG'lerin ortadan kaldırılması halinde tümör büyümesi ve metastazının önlenebileceği düşünülmektedir (68).

Biz de bu amaçla HGF'in yalnız ve heparin ile birlikte uygulandığı SK Hep1 hücrelerinden elde edilen c DNA ları kullanılarak mikrodizin analizi ile bu iki koşulda

eksprese edilen genler arasında farklılık olup olmadığını araştırmayı planladık. Mikrodizin çalışmalarımızın analizleri henüz sürmektedir. Ön analizler heparin ve HGF in birlikte bulunduğu koşullarda hücre motilitesi, hücre döngüsü arresti , DNA bağımlı transkripsiyon regülasyonu, proteoliz, hücre içi bağlantılarının oluşması ve hücre haberleşmesi ile ilgili genlerin ekspresyonunda artış olduğu, transkripsiyonun negatif regülasyonunu, hücre adezyonu, hücre matris adezyonu, sinyal iletimi, hücre döngüsü regülasyonu, kromozom organizasyonu ve protein ubiquitinasyonu ile ilgili genlerin ekspresyonunda ise iki kat ve üstünde azalma olduğu belirlenmiştir. Bu veriler heparinin hücre proliferasyonu ve motilitesini baskıladığına yönelik verilerimiz ile uyum göstermektedir. Mikrodizin yöntemi ile saptanan gen ekspresyonu değişimlerinin RT-PCR gibi bir yöntemle doğrulanması sonrasında, heparinin hücre adezyon ve proliferasyonunu azaltıcı etkisinin mekanizmasının açıklanmasına katkı sağlayabilir.

Sonuçlarımız ECM adeziv glikoproteinlerinden kollajen ve fibronektinin hücre adezyonu ve motilitesini artırdığını, proliferasyonunda önemli bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir. Laminin ise hücre motilitesini etkilemezken hücre proliferasyonunu artırmaktadır. HGF varlığının tüm bu biyolojik yanıtların artmasına yol açtığı belirlenmiştir. Heparin ise HGF varlığından bağımsız olarak hem adezyonu, hemde migrasyon ve proliferasyonu minimal düzeyde baskılamaktadır. HGF'in ve kollajenin integrin ekspresyonunda çok önemli değişikliklere neden olmadığı, adezyonu ve motiliteyi artırıcı etkisinin hücre içinde integrin yerleşim değişikliklerinden kaynaklanıyor olabileceğini düşünülmektedir. SKHep1 hücrelerinde fibronektin ve HGF uyarımına bağlı $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$ integrin ekspresyonundaki azalmanın, motilite ve invazyon artışında; lamininli ortamda çoğalmaya bağlı azalan $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$ ekspresyon değişimlerinin ise hücre proliferasyonundaki artışta rol oynuyor olabilir.

HCC gelişiminde ve ilerlemesinde integrinlerin ve ECM adeziv glikoproteinlerinin rolünü araştıran yeterli çalışma yoktur. Özellikle glikozaminoglikanların rolüne yönelik yalnızca birkaç çalışma bulunmaktadır.

Özetle çalışmamız HCC hücrelerinin kollajen, laminin, fibronektin ve heparin varlığında standart ortamdaki hücrelere göre; integrin gen ekspresyonlarının, hücre adezyon, motilite ve proliferasyonlarının değiştiğini göstermiştir. Bu da tümör gelişiminde invazyon ve metastaz gelişiminde tümör hücreleri kadar, tümör mikroçevresinin incelenmesinin de ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Bu da kanserli hücrenin davranışlarını ya da tedaviye yanıtını öngörmeye yönelik çalışmalarda ECM adeziv glikoproteinleri ve proteoglikanlarda önemli aday moleküller olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUC

Bu çalışmada HGF/c-Met sinyal ileti yolağı ve tümör mikroçevresinin tümörün biyolojik davranışlarına olan etkisi ve bu etkilere neden olabilecek gen ekspresyonu değişikliklerin tanımlanması amaçlandı. HGF ve ECM bileşenlerinin, HGF ile uyarılan hücre adezyonu, hücre proliferasyonu, motilite ve invazyon gibi hücre davranışlarına etkileri incelendi. Çalışmada, ECM adeziv proteinlerinin ve proteoglikanlarının, HCC hücrelerinin HGF'e yanıtını modüle ettiği ve bu hücrelerin gen ekspresyon paternlerinde değişikliklere neden olduğu gösterildi.

Heparin, SK Hep1 hücrelerinde adezyon, proliferasyon, motilesini, hem bazalda hem de HGF ile uyarıldığında minimal düzeyde azaltmaktadır. Kollajen ve fibronektin ise hem bazal hem de HGF ile uyarıldığında hücre adezyonu ve motilitesini artırmaktadır. Fakat aynı etki laminin varlığında gözlenmemektedir. Laminin hücre adezyonu azaltmakta, hücre migrasyonunu değiştirmemekte ve hücre proliferasyonunu ise artırmaktadır.

Bu biyolojik etkilerin moleküler mekanizmalarının belirlenmesine yönelik olarak gerçekleştirdiğimiz gen ekspresyonu analizleri HGF ve kollajenin tek başına veya birlikte kullanımları halinde integrin gen ekspresyonlarında önemli bir değişikliğe neden olmadığı, ancak birlikte kullanımları halinde 1.2-2.4 kat artışa yol açtığı belirlenmiştir. Bu durum HGF'in ve kollajenin tek başlarına kullanımlarının integrin ekspresyonunda çok önemli değişikliklere neden olmadığını, adezyonu ve motiliteyi artırıcı etkisinin integrin ekspresyonu değişikliklerinden çok, integrin lokalizasyon değişikliklerinden kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Fibronektinin tek başına uygulanması halinde integrin $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ ve $\beta 1$ gen ekspresyonunu 1.2-3 kat azalttığı, HGF ile birlikte kullanımında bu farkın 2-6 kata çıktığı belirlenmiştir. Ayrıca fibronektinin yalnız başına $\beta 4$ ekspresyonu değiştirmedeği halde, HGF e yanıt olarak $\beta 4$ gen ekspresyonunu 4 kat azalttığı gözlenmiştir.

Lamininin integrin $\alpha 3$ gen ekspresyonunu 3 kat azalttığı, HGF in bu azalmayı minimal düzeyde artırdığı belirlendi. Lamininli ortamda çoğalan hücrelerde integrin $\alpha 6$ gen ekspresyonunu 1.6 kat azaldığı HGF uyulamasında bu farkın 9 kata çıktığı belirlendi. Lamininin integrin $\beta 4$ gen ekspresyonunu 3 kat azalttığı, $\alpha 3\beta 1$ integrinin, laminin kollajen ve fibronektine bağlanmada $\alpha 5\beta 1$ ve $\alpha v\beta 1$ nin fibronektine, $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$ 'ün ise laminine bağlanmada önemi düşünüldüğünde $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$ gen ekspresyonudaki azalmanın fibronektin ve lamininli ortamda elde edilen davranış değişikliklerinde rolü olabilir. Bu sonuç fibronektinli ortamda çoğalan SKHep1 hücrelerindeki motilite artışında

$\alpha3\beta1$, $\alpha5\beta1$ integrin ekspresyonundaki azalmanın rol oynayabileceğini ; lamininli ortamda çoğalmaya bağlı azalan $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$ ve $\alpha6\beta4$ ekspresyon değişimlerinin ise hücre proliferasyonundaki artışta önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca ECM proteoglikanlarından heparinin ise integrin $\beta1$, integrin $\alpha3$, integrin $\alpha6$ ve integrin αv gen ekspresyonlarına herhangi bir etkisinin olmadığı, integrin $\beta4$, integrin $\alpha5$ genlerinin ise ekspresyonlarını azalttığı belirlendi. Çalışmada kullanılan SK Hep1 hücre dizisinde E-kaderin ekspresyonu olmadığı da gözlemlendi.

Sonuçlarımız, ECM adeziv glikoproteinlerinden kollajen ve fibronektinin hücre adezyonu ve motilitesini artırdığını, proliferasyonunda önemli bir değişikliğe neden olmadığını göstermiştir. Laminin ise hücre motilitesini etkilemezken hücre proliferasyonunu artırmaktadır. HGF varlığının tüm bu biyolojik yanıtların artmasına yol açtığı belirlenmiştir. Heparin ise HGF varlığından bağımsız olarak hem adezyonu, hemde migrasyon ve proliferasyonu minimal düzeyde baskılamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Birchmeier C, Gherardi E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *trends in Cell Biology* 1998;8:404-410
2. Kermorgant S, Zicha D, Parker PJ. PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *The EMBO Journal* 2004;23:3721–3734
3. Birchmeier C, Gherardi E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *trends in Cell Biology* 1998;8:404-410
4. Ma PC, Maulik G, Christensen J ve ark. c-Met: Structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer and Metastasis Reviews* 2003;22:309–325
5. David Semela, Jean-François Dufour. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* (2004) 1-17
6. Mark A Feitelson, Bill Sun ve ark. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 21 (2002) 2593-2604
7. Changqing Yang, Michael Zeisberg ve ark. Integrin $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ Are the Key Regulators of Hepatocarcinoma Cell Invasion Across the Fibrotic Matrix Microenvironment. *Cancer Research* 2003;63:8312-8317
8. Gianluigi Giannelli , Amalia Azzariti ve ark. ZD6474 inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical pharmacology* 71 (2006) 479– 485
9. Gianluigi Gianelli, Carlo Bergamini ve ark. Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) Require Both $\alpha 3\beta 1$ Integrin and Matrix Metalloproteinases Activity for Migration and Invasion. *Laboratory Investigation* (2001)
10. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL ve ark. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992;70:401–10.

11. Schwall RH, Chang LY, Godowski PJ ve ark. Heparin induces dimerization and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK1 and NK2. *J Cell Biol* 1996;133:709–718
12. Yoshioka K, Nakamori S, Itoh K. Overexpression of small GTPbinding protein RhoA promotes invasion of tumor cells. *Cancer Res* 1999;59:2004–10
13. Okazaki H, Matsumoto K, Nakamura T. Partial purification and characterization of ‘injurin-like’ factor which stimulates production of hepatocyte growth factor. *Biochim Biophys Acta* 1994;1220(3):291–8
14. Shimomura T, Miyazawa K, Komiyama Y ve ark. Activation of hepatocyte growth-factor by 2 homologous proteases, blood-coagulation factor-xiia and hepatocyte growth-factor activator. *Eur J Biochem* 1995;229:257–61
15. Zhou H, Mazzulla MJ, Kaufman JD ve ark. The solution structure of the N-terminal domain of hepatocyte growth factor reveals a potential heparin-binding site. *Structure* 1998; 6(1):109-116
16. Lokker NA, Mark MR, Luis EA ve ark. Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *EMBO J* 1992; 11(7):2503-2510
17. Maria Cristina Stella ve Paolo M.Comoglio. HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1999; 31: 1357-1362
18. Duh FM, Scherer SW, Tsui LC ve ark. Gene structure of the human MET protooncogene. *Oncogene* 1997;15: 1583–1586
19. Wen G. Jiang, Tracey A. Martin ve ark. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 53 (2005) 35-69

20. Longati P, Comoglio PM, Bardelli A. Receptor tyrosine kinases as therapeutic targets: The model of the MET oncogene. *Curr Drug Targets* 2001;2:41–55
21. Xiong JP, Stehle T, Zhang R ve ark. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha V\beta 3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 2002;296:151–155
22. Harrison G, Davies G ve ark. Distrubution and expression of CD 44 isoforms and ezrin during prostate cancer- endothelium interaction. *Int J.Oncol* 2002; 21:935-940
23. Abounader R, Lal B, Luddy C ve ark. In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. *FASEB J* 2002;16:108–110
24. Vande Woude GF, Jeffers M, Cortner J ve ark. Met-HGF/SF: tumorigenesis, invasion and metastasis. *Ciba Found Symp* 1997; 212:119–130
25. Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N. Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene* 1999;18:2343–2350
26. Jeffers M, Schmidt L ve ark. Activating mutations for Met tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 11445-11450
27. Wang R, Ferrell LD, Faouzi S, Maher JJ ve ark. Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J. Cell Biol* 2001;153:1023–1034
28. Yu- Wen Zhang ve George F.Vande Woude. HGF/SF Signaling in the Control of Branching Morphogenesis and Invasion. *Journal of Cellular Biochemistry* 2003; 88:408-417
29. Vande Woude GF, Jeffers M, Cortner J ve ark. Met-HGF/SF: tumorigenesis, invasion and metastasis. *Ciba Found Symp* 1997; 212:119–130
30. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2000;36:1621–30

31. Hotary K, Allen E, Punturieri A ve ark. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol* 2000;149:1309–23
32. Maria Teresa Santini, Gabriella Rainaldi, Pietro Luigi Indovina. Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Critical Reviews in Oncology:Hematology* 36 (2000) 75–87
33. Hynda K Kleinman, Deborah Philp and Matthew P Hoffman. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Current Opinion in Biotechnology* 2003, 14:526–532
34. Xiong Zhi Wu, Dan Chen, Guang Ru Xie. Extracellular matrix remodeling in hepatocellular carcinoma: Effects of soil on seed? *Medical Hypotheses* 2006
35. Onat Taner , Emerk Kaya, Sözmen Eser Y. İnsan Biyokimyası, Ankara, Palme Yayıncılık, 2002
36. Roles of Heparan-Sulphate Glycosaminoglycans in Cancer. *Nature Reviews, Cancer*, Volume 2; July 2002
37. Andrew K.Powell, Edwin A.Yates ve ark. Interactions of heparin/heparan sulfate with proteins: Appraisal of structural factors and experimental approaches. *Glycobiology* vol.14 no.4 pp. 17R-30R, 2004
38. Jeffrey S. Rubin, Regina M. Day, Diane Breckenridge, Nese Atabey ve ark. Dissociation of Heparan Sulfate and Receptor Binding Domains of Hepatocyte Growth Factor Reveals That Heparan Sulfate-c-Met Interaction Facilitates Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276, No. 35, Issue of August 31, pp. 32977–32983, 2001
39. Thomas F. Zioncheck, Louise Richardson ve ark. Sulfated Oligosaccharides Promote Hepatocyte Growth Factor Association and Govern Its Mitogenic Activity. *The Journal of Biological Chemistry*. Volume 270; 1995

40. Ralph H.Schwall, Ling Y.Chang ve ark. Heparin Induces Dimerization and Confers Proliferative Activity onto the Hepatocyte Growth Factor Antagonists NK1 and NK2. *The Journal of Cell Biology*, Volume 133, Number 3, May 1996
41. Peter Bernhard Salbach, Martina Brückmann ve ark. Heparin-mediated selective release of hepatocyte growth factor in humans. *J Clin Pharmacol* 2000; 50. 221-226
42. Benjamin Geiger, Alexander Bershadsky ve ark. Transmembrane Extracellular Matrix-Cytoskeleton Crosstalk. *Molecular Cell Biology* 2001; Volume 2
43. Filippo G.Giancotti. Complexity and specificity of integrin signalling. *Nature Cell Biology* 2000; Volume 2
44. Ivaska, J. and Heino, J. (2000) Adhesion receptors and cell invasion – mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *CMLS* 57:16-24
45. Cindy K. Miranti, Joan S. Brugge. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nature Cell Biology* 2002; Volume 4
46. H.Jin, J.Varner. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *British Journal of Cancer* 2004;90:561-565
47. Wenjun Guo, Filippo G.Giancotti. Integrin Signaling During Tumour Progression. *Nature* 2004; Volume 5
48. Salman Rahman, Yatin Patel ve ark. Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells. *BMC Cell Biology* 2005
49. John D. Hood and David A.Chersesh. Role of Integrins in Cell Invasion and Migration. *Nature Reviews Cancer*. 2002; Volume 2
50. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic strategies. www.chuv.ch/cpo_research/integrins

51. Paolo M Comoglio, Carla Boccaccio ve Livio Trusolino. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules. *Current Opinion in Cell Biology* 2003, 15:565–571
52. HGF/SF Activation of Integrins. Fall, 1998
53. Gerhard Christofori. Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *The EMBO Journal* Vol. 22 No. 10 pp. 2318-2323, 2003
54. Qinghui Meng, James M. Mason ve ark. Hepatocyte Growth Factor Decreases Sensitivity to Chemotherapeutic Agents and Stimulates Cell Adhesion, Invasion, and Migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 274, 772–779 (2000)
55. Jin-Zhang Zeng, Hong-Yang Wang ve ark. Molecular cloning and characterization of a novel gene which is highly expressed in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* (2002)
56. <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm736/cancer.htm>
57. Mei Chung Moh, Lay Hoon Lee, Shali Shen. Cloning and characterization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 42 (2005) 833–841
58. Kojiro S, Yano H. Antiproliferative effects of 5-fluorouracil and interferon-alpha in combination on a hepatocellular carcinoma cell line in vitro and in vivo. *J.Gastroenterol Hepatol.* 2006
59. Piotr Chomczynski ve Nicoletta Sacchi. Single Step Method of RNA isolation by Acid Guanidium Thiocyanate- Phenol- Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* (1987)
60. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Joseph Sambrook, David W. Russell

61. Iris S. Weimar, Daphne de Jong ve ark. Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Promotes Adhesion of Lymphoma Cells to Extracellular Matrix Molecules Via $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ Integrins. *Blood*, Vol 89, No 3 (February 1), 1997: pp 990-1000
62. Djin- Ye Oh ve ark. High -throughput Genotyping for TLR-8 SNPs, *Biochemica* No:2, 2006
63. Gene Expression Monitoring, GeneChip Expression Analysis Technical Manual, Section 2
64. Karti SS, Ovali E ve ark. Induction of apoptosis and inhibition of growth of human hepatoma HepG2 cells by heparin. *Hepatogastroenterology* 2003 Nov-Dec;50(54):1864-6
65. Schlessinger J, Lax I, Lemmon M. Regulation of growth factor activation by proteoglycans: What is the role of the low affinity receptors?. *Cell* 1995 Nov 3; 83(3)357-60
66. Qian Xie, Kang-Da Liu ve ark. SF/HGF-c-Met autocrine and paracrine promote metastasis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7(6):816-820
67. Josephine C. Adams ve Fiona M. Watt. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117, 1183-1198 (1993)
68. Xiong Zhi Wu , Dan Chen, Guang Ru Xie. Extracellular matrix remodeling in hepatocellular carcinoma: Effects of soil on seed? *Medical Hypotheses* (2006) Baskıda
69. Birchmeier C, Birchmeier W ve ark. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2003 Dec;4(12):915-25

8. EKLER

EK 1:*

BSA (%1)

1 g BSA

PBS-T ile 100 ml'ye tamamlanır.

DEPC'li su, 1lt (Dietilpirokarbonatlı su)

1ml DEPC

999 ml distile su

%75 Etanol, 50ml

%96'lık etanolden 37,5 ml alınır

12,5 ml DEPC'li su ile 50 ml'ye tamamlanır.

Giemsa Boyası , pH = 6,8

5 ml stok boya

pH =6,8 olan Gurr Tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

2N HCl, 100ml

62 ml HCl

38 ml distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Kristal Viyole, %0,2'lik

15 ml boya için;

%0,5 olan stoktan 6 ml alınır

%20 (3ml) metanol ve

6 ml 1x PBS eklenir.

10 x MOPS, 1lt (3(N-Morpholino) Propan Sulfonik Asit

0,2 M MOPS (pH 7) 41,8 gr alınır

1M Sodyum asetat 20 ml alınır

0,5 M EDTA 20 ml alınır

2N NaOH ile pH:7 'ye ayarlanır.

1X PBS, 1 lt

0,2 g KCl

0,2 g KH₂PO₄

8 g NaCl

2,17 g Na₂HPO₄·7H₂O

pH'ı 7,4'e ayarlanır.

ddH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

PBS-T, 50 ml

% 0.05 Tween (250µl)

49,75 ml PBS ile tamamlanır.

RNA Yükleme Tamponu

%50 Gliserol

1m M Sodyum EDTA

%0,4 Bromfenol Mavisi

%1 SDS

1 g SDS

ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

Tris BSA

0,5 M Tris

1,5 M NaCl

% 2 BSA pH:7,3'e ayarlanır.

EK 2: Hücre Dizileri

HuH-7

Profil: İnsan hepatoma hücre dizisi

Doku: Karaciğer (karaciğer kanseri)

Genetiği: Differansiye

Sınıflandırma:Tümör

Morfoloji: Epitelyal

Özellikleri: c-Met+

HEP-3B

Profil: İnsan hepatokarsinom hücre dizisi

Doku: Karaciğer (karaciğer kanseri)

Genetiği: Differansiye

Sınıflandırma:Tümör

Morfoloji: Epitelyal-benzeri

Özellikleri: c-Met+

SK Hep1

Profil: İnsan adenokarsinom hücre dizisi

Doku: Karaciğer (karaciğer kanseri)

Genetiği: İyi differansiye değil

Sınıflandırma:Tümör

Morfoloji: Endotelyal

Özellikleri: c-Met+

HEP G2

Profil: İnsan hepatokarsinom hücre dizisi

Doku: Karaciğer (karaciğer kanseri)

Genetiği: Differansiye

Sınıflandırma:Tümör

Morfoloji: Epitelyal

Özellikleri: c-Met+