

T.C.  
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA PLEXİN C1'İN ETKİLEŞİM  
PARTNERLERİNİN BELİRLENMESİ

MELİKE BİNNUR BAHÇEKAPILI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE  
2023

**T.C.**  
**GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA PLEXİN C1'İN**  
**ETKİLEŞİM PARTNERLERİNİN BELİRLENMESİ**

**MELİKE BİNNUR BAHÇEKAPILI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI**  
**PROF. DR. TAMER YAĞCI**

**GEBZE**

**2023**

**T.R.**  
**GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY**  
**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**IDENTIFICATION OF PLEXIN C1 INTERACTION  
PARTNERS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA**

**MELİKE BİNNUR BAHÇEKAPILI**  
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF**  
**MASTER OF SCIENCE**  
**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

THESIS SUPERVISOR  
PROF. DR. TAMER YAĞCI

**GEBZE**  
**2023**



## YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 02/02/2023 tarih ve 2023/09 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 01/03/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Melike Binnur Bahçekapılı'nın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

### JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Doç. Dr. Ceren ÇIRACI

### ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA / MÜHÜR

## ÖZET

Karaciğer kanseri tanılarının ve ölümlerinin çoğunluğundan sorumlu olan Hepatoselüler karsinoma (HCC), dünyada en sık görülen altıncı, ölümle sonuçlanan kanserler içerisinde üçüncü sırada yer almaktadır. Bu da kötü prognoza ve sınırlı mevcut tedavilere işaret etmektedir. Plexin C1 (PLXNC1), sinir siteminde hücre yüzey molekülleri olarak keşfedilmiştir. PLXNC1'in ifade düzeyi HCC dahil farklı kanser türleri özelinde araştırılmıştır. Ancak PLXNC1'in etkileşim partnerleri ve HCC hücrelerinde aktin dinamiklerine etkisi bilinmemektedir. PLXNC1 biyolojisini, etkileşimde bulunduğu partnerleri ve bunlar sayesinde etkileşimde bulunduğu yolları anlamak önemli bir araştırma konusudur.

Bu amaçla iki farklı HCC hücre hattı kullanılarak PLXNC1 ifadesi baskılanmış hücreler oluşturuldu. Ardından hücre klonlarına PLXNC1'in bilinen ligandı Semaforin 7A (SEMA7A) verilerek PLXNC1-SEMA7A etkileşiminin aktin dinamiklerine etkisi araştırılmıştır. Gözlemlendiğimiz sonuçlara göre, PLXNC1 varlığında SEMA7A Kofilin fosforilasyonuna yol açmakta ve Kofilin inaktivasyonu üzerinden F-aktin birikimine neden olmaktadır. Hep3B-shPLXNC1 ve PLC/PRF/5-shPLXNC1 hücrelerinde azalmış PLXNC1 ifadesi SEMA7A uygulamasına bağlı Kofilin fosforilasyonunu baskılamakta ve böylelikle aktif kalan Kofilin aktin depolimerizasyonuna neden olmaktadır. PLXNC1'in etkileşim partnerlerini bulmak amacıyla birlikte immün çöktürme (CO-IP) yöntemiyle proteinler çöktürüldü ve Kütle Spektroskopisine gönderildi. Analiz sonucunda edilen proteinlerden birkaçı aday proteinler olarak seçildi. Bu aday proteinlerden MUC13, NALP2, Alix ve IPO5 deneysel olarak doğrulamak için western blot yöntemi ile kontrol edildi. Sonucu pozitif olarak değerlendirilebilir olan NALP2 ve MUC13 aday olarak netleşti. Bu tez çalışmasındaki bulgular PLXNC1 tarafından düzenlenen EMT, sitoskelet modellenmesi ve çoklu-kinaz inhibitörlerine yanıtın olası düzenleyici moleküllerinin tanımlanmasında yol gösterici katkısı olacaktır.

**Anahtar Kelimeler: Hepatoselüler Karsinoma, Plexin C1, SEMA7A, Aktin Dinamikleri, Etkileşim Partnerleri.**

## SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC), which is accountable for the majority of liver cancer diagnoses and deaths, is the sixth most common cancer in the world and the third among the cancers that result in death. This indicates a poor prognosis and limited available treatments. Plexin C1 (PLXNC1) has been discovered as cell surface molecules in the nervous system. The expression level of PLXNC1 has been investigated in different types of cancer, including HCC. However, the effect of PLXNC1 on actin dynamics in interaction partners and HCC cells is unknown. Understanding the biology of PLXNC1, the partners it interacts with, and the pathways through which it interacts is an important research topic.

For this purpose, cells with suppressed PLXNC1 expression were created using two different HCC cell lines. Then, the effect of PLXNC1-SEMA7A interaction on actin dynamics was investigated by giving the known ligand of PLXNC1 Semaphorin 7A (SEMA7A) to cell clones. Hence, in the presence of PLXNC1, SEMA7A causes Cofilin phosphorylation and causes F-actin accumulation through Cofilin inactivation. Decreased PLXNC1 expression in Hep3B-shPLXNC1 and PLC/PRF/5-shPLXNC1 cells suppresses Cofilin phosphorylation due to SEMA7A administration, thus causing actin depolymerization of Cofilin, which remains active. To find interaction partners for PLXNC1, the proteins were precipitated by co-immunoprecipitation (CO-IP) and submitted to Mass Spectroscopy. Given the analysis few candidate proteins were selected. Of these candidate proteins, MUC13, NALP2, Alix and IPO5 were checked by western blot to experimentally confirm. NALP2 and MUC13, whose results could be evaluated as positive, were clarified as candidates. The findings in this thesis study will contribute to the identification of possible regulatory molecules of EMT regulated by PLXNC1, cytoskeleton modelling and response to multi-kinase inhibitors.

**Keywords:** Hepatocellular Carcinoma, Plexin C1, SEMA7A, Actin dynamics, Interaction partners.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisi ve deneyimiyle bana rehber olan, güvenip bütün imkanlarını paylaşan, yanındayken hergün yeni bir şey öğrendiğim sevgili tez danışmanım Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya

Tez çalışmam süresince her türlü desteğini, bilgisini, tecrübesini benimle paylaşan ve bunun için bana zaman ayıran başta Dr. Görkem ODABAŞ'a, Doç. Dr. A. Emre SAYAN'a ve Dr. Metin ÇETİN'e

Aklımı kurcalayan tüm sorulara ve sorunlara çözüm bulmada bana yardımcı olan Dr. Merve TUZLAKOĞLU ÖZTÜRK'e ve Dr. İrem YALIM CAMCI'ya

Lisansta başlayan yolculuğumuza yüksek lisansıda eklediğimiz, her zaman destekçim ve yardımcım, lab partnerim, yoğun deneylerin, imkânsız denilen projelerin aranan yoldaşı canım arkadaşım Maide ŞEKER'e; yollarımızın iyi ki kesiştiği pozitifliği ve enerjisiyle her zaman bizi yukarı taşıyan ikimizin de yüksek lisans ortağı canım arkadaşım Şevval DİK'e

Aynı laboratuvarı paylaştığımız birer çalışma arkadaşı olmaktan öte olan sevgili TY Lab üyeleri Şule ERDEMİR SAYAN, Arzu AYSAN, Nazlı SALIK, Esmâ ERCİYAS BAYKAL, Gamze GÜNGÖR TOPCU, Nurşah ERSEZEN, Durmuş AKDOĞAN'a; çalışmalardaki desteği ve bana katkılarından dolayı Leyla DİKMEDAŞ'a; desteği ve yardım severliği ile Hilal CİVELEK'e

Lisansta başlayan dostluğumuzla yüksek lisansta da her zaman desteklerini hissettiğim, bilimin sonsuz dünyasında birlikte yürüyüp geliştireceğimize inandığım sevgili arkadaşlarım Sema Tuğçe AYDIN, Sinem KURT KASIM, İrem SERBEST'e

Koşulsuz sevgileri ve güvenleriyle her zaman arkamda duran, maddi manevi destekçilerim annem Emine BAHÇEKAPILI, babam Hikmet BAHÇEKAPILI, abim İlker BAHÇEKAPILI ve ablam İlknur BAHÇEKAPILI'ya

"ATATÜRK demek aydınlanma demek" en büyük teşekkürüm bizi bilim ışığıyla aydınlatan Ulu Önder Mustafa Kemal ATATÜRK'e

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 1001 119S412 projesi tarafından desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1. Hepatoselüler Karsinoma	2
2.2 Plexin Ailesi ve Ligandları Semaforinler	3
2.2.1. Plexin C1 ve Semaforin 7A	3
2.2.2. Plexin C1 ve Kanser İlişkisi	5
2.2.3. Plexin C1'in Hücre Hareketine Etkisi	6
2.2.4. Plexin C1 Etkileşim Partnerleri	8
3. GEREÇLER	10
3.1. Cihazlar	10
3.2. Genel Kimyasallar	10
3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler	11
3.4. Hücre Hatları	11
3.5. Çözelti ve Tamponlar	11
3.6. Bakteriler ve Besiyerleri	13
3.7. Vektörler	14
3.8. Antikorlar	14
3.9. Kitler	14
4. YÖNTEMLER	15
4.1. Hücre Hatlarının Kültürü	15

4.2. Transformasyon ve Plazmitlerin Çoğaltılması	15
4.3. Plexin C1 Hücre Klonlarının Oluşturulması	16
4.3.1. Viral Partiküllerin Üretilmesi	16
4.3.2. Plexin C1 İfadesi Baskılanmış ve Kontrol Klonlarının Geliştirilmesi	16
4.3.3. Plexin C1 aşırı İfadesinin sağlanması	17
4.4. Protein Pürifikasyon	17
4.5. Protein Konsantrasyon	18
4.6. ELISA	18
4.7. F-aktin/G-aktin oranı için lizat hazırlama	19
4.8. Endojen Birlikte İmmün Çöktürme	19
4.9. Kütle Spektroskopisi İçin Eksojen İmmün Çöktürme	20
4.9.1. Western için hazırlanan örnekler	21
4.9.2. Kütle Spektroskopisi İçin hazırlanan örnekler	21
4.10. Western Blotlama	22
4.11. Kütle Spektroskopisi Analiz	22
5. BULGULAR	23
5.1. HCC Hücre Hatlarında shPLXNC1 ve PLKO Klonlarının Geliştirilmesi	23
5.2. PLC/PRF/5 Hücre Hattında Plexin C1 Aşırı İfadesinin Sağlanması	23
5.3. PE4 Antikorumunun Saflaştırılması ve Konsantrasyonu	24
5.4. Hücre Klonlarında SEMA7A Bağımlı ve Bağımsız Plexin C1'in Aktin Dinamikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi	25
5.5. Plexin C1 Birlikte İmmün Çöktürme	26
5.6. Kütle Spektroskopisi Sonuçları	28
5.7. Kütle Spektroskopisi Sonuçlarına Göre Seçilen Proteinlerle Birlikte İmmün Çöktürme	31
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	33
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	45
EKLER	46

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler ve

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{l}$	: Mikrolitre
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
dk	: Dakika
g	: Gram
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
M	: Molar
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
rpm	: Dakika Başına Dönüş
xg	: Yerçekimi
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ALIX	: Programmed Cell Death 6 Interacting Protein
APS	: Amonyum Persülfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
BSA	: Sığır Serum Albumin
Cof	: Kofilin
CO-IP	: Birlikte İmmun Çöktürme
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
<i>E. Coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
EGTA	: N, N, N',N' -Tetraasetik asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FBS	: Fötal Dana Serumu
GAP	: GTPaz Aktivite Edici Proteinler

GAPDH	: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GDP	: Guanozin Difosfat
GEF	: Guanin Nükleotit Değişim Faktörleri
GTP	: Guanozin Trifosfat
HCC	: Hepatoselüler Karsinoma
HCl	: Hidroklorik Asit
IPO5	: Importin 5
IP	: İmmun Çöktürme
LB	: Luria-Bertani
LIMK	: Lim Kinaz
MUC13	: Mucin-13
MRCK	: Miyotonik Distrofi Kinaz ile İlişkili Cdc42 Bağlayıcı Kinaz
NaCl	: Sodyum Klorür
NALP2	: NLR Family Pyrin Domain Containing 2
NEAA	: Esansiyel Olmayan Aminoasitler
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PDGFR	: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü
PEI	: Polyethylenimine
PLXNC1	: Plexin C1
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SEMA7A	: Semaforin 7A
SFM	: Serum İçermeyen Besiyeri
shRNA	: Kısa Saç Tokası-Rna
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGF- $\beta$	: Transforme-Edici Büyüme Faktörü $\beta$
Tris	: Tris (Hidroksimetil) Aminometan
VEGFR	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Şekil No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1: SEMA7A ve reseptörlerinin yapıları ve etkileşimleri.	4
2.2: Aktin filamentlerinin oluşumu.	7
2.3: Hücre zarı boyunca küçük GTPaz Rho, Rac ve Cdc42'nin aktivasyon durumu kontrolünde akış aşağı sinyal yollarının uyarımı.	9
5.1: Western blot yöntemi ile Plexin C1 ifadesinin baskılandığı hücre klonlarının doğrulanması.	23
5.2: Plexin C1 aşırı ifadesinin sağlandığı PLC/PRF/5 hücrelerinin Western blot ile doğrulanması.	24
5.3: PE4 Antikorumunun Saflaştırma ve Konsantrasyon ELISA değerleri.	24
5.4: PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarında G aktin ve çözümlü F aktin dinamiklerinin incelenmesi.	25
5.5: PLC/PRF/5 hücrelerinden Plexin C1'in Etkileşim Partnerlerini Bulmak Amacıyla Yapılan Birlikte İmmün Çöktürme (CO-IP).	27
5.6: PCA analizi sonuçları.	29
5.7: Scaffold programı sonuçları.	30
5.8: Plexin C1'in aday etkileşim partnerleri western blot gösterimi.	32

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
3.1: Çözelti ve kimyasal listesi.	11

# 1. GİRİŞ

Karaciğer kanserinin başlıca histolojik türü olan Hepatoselüler karsinom (HCC), karaciğer kanseri tanılarının ve ölümlerinin büyük çoğunluğundan sorumludur. Plexin C1, ilk olarak sinir siteminde hücre yüzey molekülleri olarak keşfedilmiştir. Literatürde melanoma ve akciğer kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmalarda; Plexin C1-Semaforin etkileşiminin aktin hücre iskeletini LIMK2'nin ifadesini arttırarak, Kofilinin fosforilasyonuna yani inaktivasyonuna neden olduğu buna bağlı olarak inaktive Kofilin'nin aktin depolimerizasyonunu gerçekleştiremediği gösterilmiştir. Aktin depolimerizasyonu hücre motilitesi açısından önemlidir. Plexin C1 reseptör proteininin HCC hücrelerinde ifade edildiği ve normal karaciğer dokusuna kıyasla HCC'de anlamlı olarak artmış olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak Plexin C1'in HCC hücrelerinde aktin düzenlenmesine etkisi detaylı olarak araştırılmamıştır. Ayrıca Plexin C1 biyolojisini, etkileşimde bulunduğu partnerleri ve bunlar sayesinde etkileşimde bulunduğu yolları anlamak önemli bir araştırma konusudur.

## 1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Plexin C1'in etkileşimde bulunduğu partnerler geniş anlamıyla henüz bilinmemektedir. Yapılan bu çalışmada, SEMA7A bağımlı/bağımsız durumda Plexin C1 sinyal yolağındaki aktin dinamiklerini irdelemek ve SEMA7A ile etkileşimi sonrasında Plexin C1'e bağlanan proteinlerin tanımlanması amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasından elde edilecek veriler, Hepatoselüler Karsinoma hücre hattında Plexin C1 tarafından düzenlenen EMT, hücre iskeleti modellenmesi ve çoklu-kinaz inhibitörlerine yanıtın olası üst ve alt-düzenleyici moleküllerinin tanımlanmasında yol gösterici olacaktır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Hepatoselüler Karsinoma

Karaciğer kanserinin başlıca histolojik türü olan Hepatoselüler karsinom (HCC), karaciğer kanseri tanılarının ve ölümlerinin büyük çoğunluğundan sorumludur. Hepatoselüler karsinom dünyada en sık görülen altıncı, ölümlerle sonuçlanan kanserler içerisinde üçüncü sırada yer almaktadır [1], [2]. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlardan daha yüksektir. Erkeklerde en sık görülen beşinci, kadınlarda yedinci kanserdir. En yüksek insidans yaşı 50-70'tir. Kronik karaciğer hasarı, Hepatit B (HBV) ve C (HCV) virüs enfeksiyonları, alkolle ilişkili hastalıklar ve aflatoksin zehirlenmeleri HCC gelişiminin önde gelen nedenleridir [3].

Cerrahi tedavi, immünoterapi, hedefe yönelik tedavi veya kombinasyon tedavisi dahil olmak üzere tedavi stratejilerindeki kademeli artışa rağmen; etkili popülasyonun oranı ve etkili ilaçların mevcudiyeti ve etkinlik süresi nedeniyle HCC hastalarının genel sağkalımı hala sınırlıdır [4]. Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminine göre HCC'nin 5 yıllık hayatta kalma oranı %18'dir, bu da kötü prognoza ve sınırlı mevcut tedavilere işaret etmektedir [5].

HCC tedavisi için FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanan dört tane çoklu-kinaz inhibitörü vardır. Bunlar Sorafenib, Lenvatinib, Regorafenib ve Cabozantinib'tir. Birinci basamak tedavi seçeneği olarak Sorafenib ve Lenvatinib; ikinci basamak tedavisi olarak diğer çoklu-kinaz inhibitörleri Regorafenib ve Cabozantinib uygulanmaktadır. 2020'den bu yana, immün kontrol noktası inhibitörleri HCC tedavi rejimlerine dahil edilmiştir ve hedefe yönelik tedavilerin immünoterapi ile kombinasyonu, HCC için en umut verici klinik tedavi seçeneği olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, HCC hasta prognozundaki iyileşme sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle, bu hastalığa sahip hastaların hayatta kalma sonuçlarını iyileştirmek için HCC için yeni terapötik biyobelirteçlerin ve güvenilir prognostik biyobelirteçlerin araştırılması ve tanımlanması gerekmektedir [6].

## 2.2. Plexin Ailesi ve Ligandları Semaforinler

Plexinler ilk olarak sinir sisteminde hücre yüzey molekülleri olarak keşfedilmiştir [7]. Sistein aminoasidince zengin hücre dışı bölgeleri içeren büyük tek geçişli transmembran proteinlerdir. Omurgalılarda 4 alt sınıfa (A1-4, B1-3, C1 ve D1) ayrılmış olarak dokuz, omurgasızlarda ise iki adet bulunur. Ligand bağımlı dimerizasyon ve konformasyonel değişiklikler gibi çeşitli aktivasyon mekanizmaları gösterirler [8], [9], [10].

Plexin reseptörleri, hücre dışı SEMA (Semaforin), PSI (Plexin, Semaforin ve Integrin) ve GP (Glisin-Prolin) alanlarıyla, hücre içinde ise Rho ve Ras ailesi küçük GTPazların bağlanabileceği alanlarıyla karakterize edilir [11].

Plexin reseptörleri ve onların ligandları Semaforinler, sinir sisteminde akson yönelimine kılavuzluk eden, vasküler modelleme, hücre proliferasyonu, göç ve immün hücre düzenlemesinde bir dizi kritik fonksiyona sahip olan bir transmembran protein ailesi olarak tanımlanmışlardır [12].

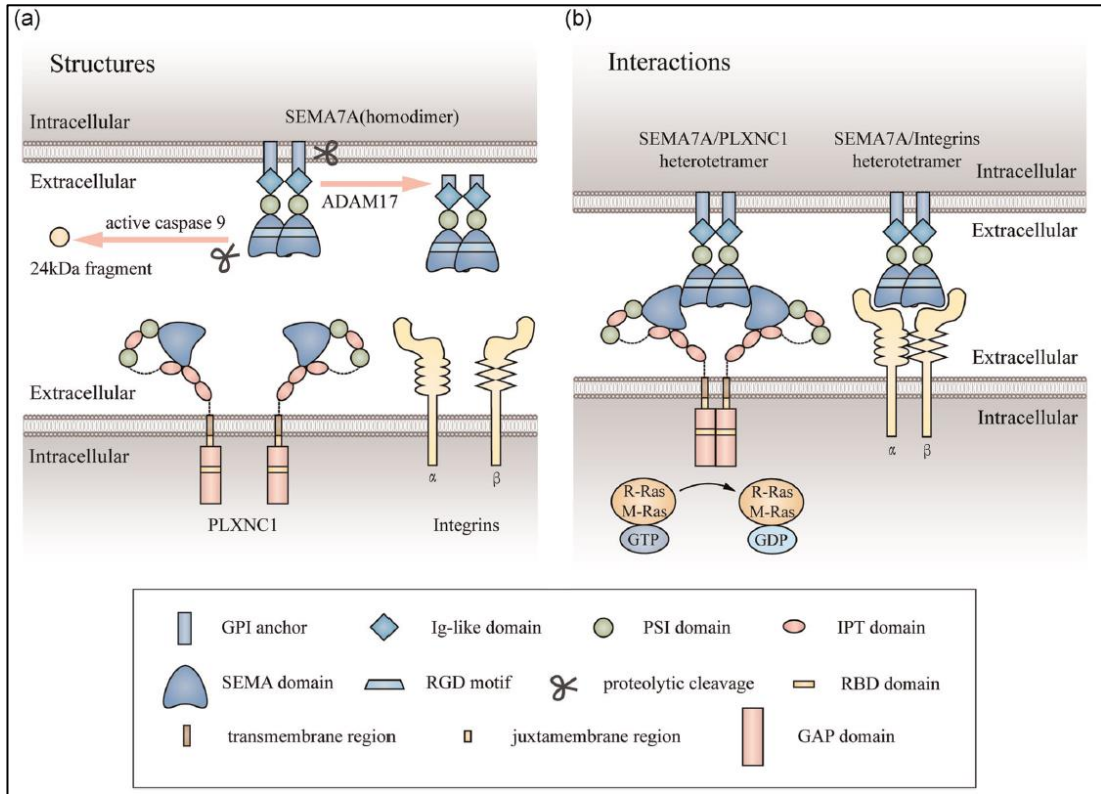
Semaforinler, dokuların çoğunda eksprese edilen yüksek düzeyde korunmuş sinyal proteinlerinin geniş bir ailesini oluşturur. Korunmuş bir amino-terminal Sema alanı ile karakterize edilen salgı ve zar proteinleridir. Omurgasızlarda iki, omurgalılarda beş Sema sınıfı tanımlanmıştır. Üçüncü sınıfa ait semalar salgılanır; yedinci sınıfın üyeleri zara bir GPI kuyruğu ile bağlanır; dört, beş ve altıncı sınıfın üyeleri transmembran proteinlerdir ve hücre dışı olarak salınır [13].

### 2.2.1. Plexin C1 ve Semaforin 7A

Semaphorin 7A (SEMA7A), zarla ilişkili bir GPI (glükosil fosfatidilinositol) bağlı semaforindir ve ilk olarak lenfositler üzerindeki ekspresyonu için tanımlanmış olsada nöronal gelişimde, hücre farklılaşmasında, ECM birikmesinde, immün sistemin çeşitli bileşenlerinde farklı roller sergilediği gösterilmiştir [14]. SEMA7A, periapikal lezyonlardaki işlevi belirsizliğini koruyan güçlü bir immünomodülatör düzenleyici olarak kabul edilmiştir [15]. İltihaplanma, nöral bozulma ve kanser ilerlemesinin düzenlenmesinde çok sayıda işlevi olan zara bağlı veya salgılayıcı bir proteindir

[16]. SEMA7A'nın reseptör Plexin C1 ve  $\beta$ 1-integrin ile etkileşim yoluyla işlev gördüğü yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Şekil 2.1) [17], [18].

Plexin C1, ilk olarak, SEMA7A'nin homologu olan viral kökenli Semaforin A39R'nin reseptörü olarak keşfedilmiş ve VESPR (Virus Encoded Semaphorin Protein Receptor) olarak isimlendirilmiştir. Plexin C1 ifade eden monositlerin viral semaforinler A39R veya AHVsema ile uyarılmaları kısa zamanda büyük hücresel agregatların oluşumuna, uzun dönemde ise IL-6 ve IL-8 üretimine sebep olmuştur [19]. Dendritik hücreler ile gerçekleştirilen çalışmalar, A39R-Plexin C1 etkileşiminin, bu hücrelerin integrin-temelli adezyon ve kemokin-araçlı migrasyonlarını engelleyip fagositoz kapasitelerini düşürdüğünü ortaya koymuştur [20]. Sema7A, Plexin C1'den bağımsız şekilde bir diğer reseptörü  $\beta$ 1-Integrine bağlanarak nöral gelişim [21], immün yanıt düzenlenmesi [22] ve kanser invazyon ve metastazında görev almaktadır [23].



Şekil 2.1: SEMA7A ve reseptörlerinin yapıları ve etkileşimleri. SEMA7A, sinyalleri PLXNC1 ve integrinler aracılığıyla iletir. (a) PLXNC1 ve integrinler, SEMA7A sinyal iletimi için en yaygın reseptörlerdir ve bağlanmamış hallerinde oligomerler olarak

bulunurlar. (b) Dimerik SEMA7A'ya bağlanma, PLXNC1'in homodimerizasyonunu ve integrin alt birimlerinin heterodimerizasyonunu indükler. SEMA7A-PLXNC1 etkileşiminin bağlanma arayüzü, PLXNC1 hücre içi bölgesinin aktif dimerizasyonunu indükleyen ilgili SEMA alanlarını içerir. PLXNC1'in GAP aktivitesi, iki R-Ras alt ailesi GTPazlar, R Ras ve M-Ras için GTPaz aktivitesini aktive ederek onları GDP'ye bağlı inaktif duruma dönüştürür. Benzer şekilde, p1 integrin alt biriminden ve farklı a integrin alt birimlerinden oluşan aktif bir integrin heterodimer de RGD motifini tanıyarak SEMA7A'nın SEMA alanı ile etkileşime girer. PLXNC1'in bu konformasyonel değişiklikleri ve ligand bağlanması üzerine integrinler daha sonra sitoplazmik bölgeye iletilir ve aşağı akış sinyalini aktive eder.

### 2.2.2. Plexin C1 ve Kanseri İlişkisi

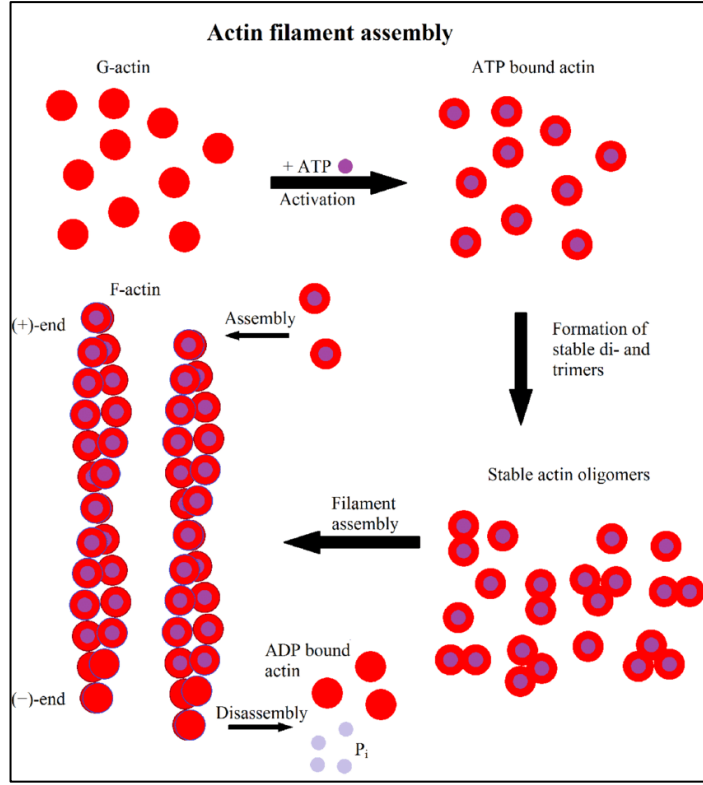
Plexin C1'in ifade düzeyi, melanom, akciğer kanseri, lösemiler ve mide kanseri gibi farklı kanser türleri özelinde araştırılmıştır. Melanom dokularında gerçekleştirilen immünohistokimya çalışmaları ile Plexin C1 ifadesinin melanomun metastaz düzeyi ile ters orantılı olduğu tespit edilmiş, normal melanositler ve tümörsüz çevre dokularda gözlenen orta ya da yüksek seviyedeki Plexin C1 ifadesine karşın metastatik melanomların %66'sında Plexin C1 ifadesine neredeyse hiç rastlanmamıştır [24]. Plexin C1'in melanom hücrelerinin invazyon ve migrasyon kapasitelerini engelleyici bir faktör olduğu ve PI3-Kinaz/Akt yolu üzerinden bu hücrelerinin sağkalımlarını desteklediği fakat ilginç şekilde tüm bu etkilerin Sema7A'dan bağımsız gerçekleştiği belirlenmiştir [25]. Mide kanseri hücreleri ile yapılan çalışmada; PLXNC1'in baskılanması, mide kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü azalttığı ve PLXNC1'in aşırı ekspresyonun ise arttırdığı gösterilmiştir [26]. Prof. Dr. Tamer Yağcı ve ekibinin, HCC tümörlerini kullanarak yapmış olduğu çalışmada, Plexin C1 reseptör proteininin HCC hücrelerinde ifade edildiği ve normal karaciğer dokusuna kıyasla HCC'da anlamlı olarak artmış olduğu gösterilmiştir. Ayrıca tümörlerin farklılaşma düzeyinin (tumor grade) PLXNC1 ifadesi ile ters orantılı olduğu gözlemlenmiştir. Erken evredeki tümörlerin, daha ileri evredekilere göre daha fazla miktarda PLXNC1 ifade ettiği bildirilmiştir [27], [28].

### 2.2.3. Plexin C1'in Hücre Hareketine Etkisi

PLXNC1'in SEMA7A ile etkileşimi sonrası tetiklenen sinyal yolları hakkında literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır.

Hücre iskeleti, hücrelerin hareket etmesi, polarize olması, şekil değiştirmesi, parçacıkları yutması veya diğer hücrelerle etkileşime girmesi için gereklidir. Hücre iskeletinin yeniden şekillenmesine neden olan farklı protein aileleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında, çok çeşitli nöronlar üzerinde itici veya çekici rehberlik sinyalleri sağlayabilen, büyük bir çözünür ve zara bağlı protein ailesine ait olan semaforinler vardır [29].

Aktin molekülleri, deterjan ile çözünebilen monomerik formu (G-aktin) ile deterjana dayanıklı ve sitoiskelet yapısına katılmış polimerize formu (F-aktin) arasında dinamik bir denge halindedir (Şekil 2.2) [30]. G-aktin, sarmal F-aktin oluşturmak için baştan kuyruğa polimerize olur ve G-aktin ile F-aktin arasındaki denge, LIMK2 dahil olmak üzere aktin ile ilişkili proteinler tarafından düzenlenir [31]. Plexin C1-semaforin etkileşimi LIMK2'nin ifade artışı/fosforilasyonuna yol açar. Aktif LIMK2 Kofilini fosforilliyerek inaktivasyonunu sağlar ardından inaktive Kofilin aktin depolimerizasyonunu gerçekleştirmez. Aktin depolimerizasyonu hücre motilitesi açısından önemlidir. Rho, Rac, Cdc42 gibi küçük-GTPaz'lar aktin polimerizasyonu sayesinde hücrenin dışına doğru lamellipodia ve filopodia oluşumlarını sağlayarak hücrenin motilitesini artırır. Ancak, hücredeki aktin havuzu sınırlıdır ve bu mevcut aktin filamentlerinin depolimerize edilerek polimerizasyonda kullanılacak aktin monomerlerini sağlaması gerekir. Bu depolimerizasyon işlemi Aktin bağlayıcı bir protein olan Kofilin tarafından gerçekleştirilir [31] - [35].



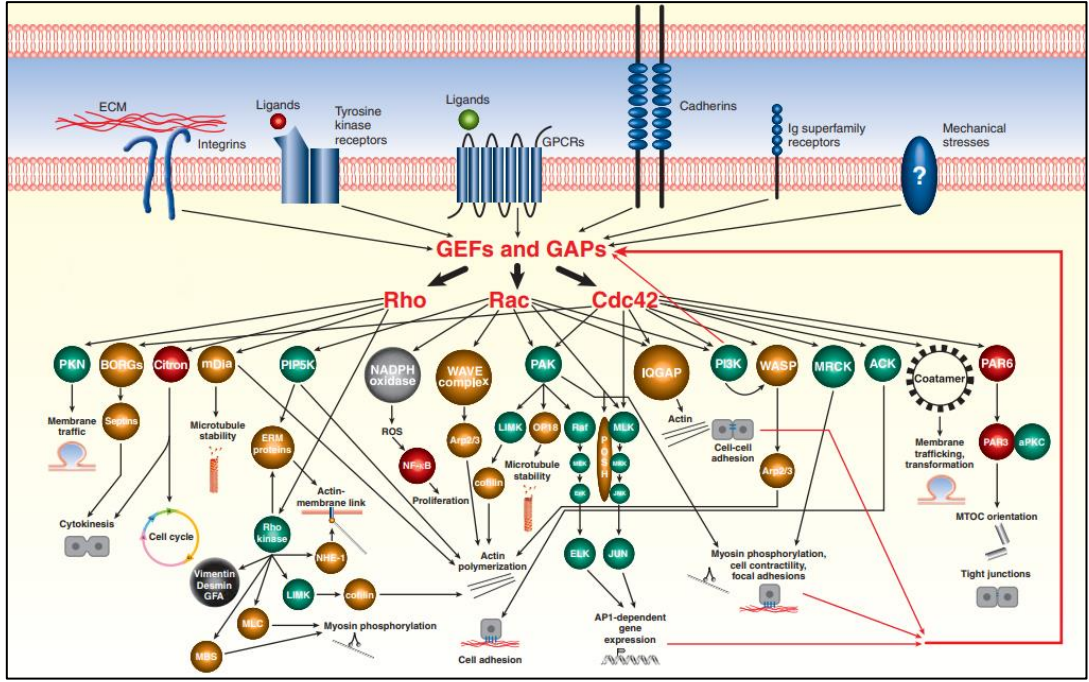
Şekil 2.2: Aktin filamentlerinin oluşumu. Aktin monomerleri (G aktin), aktin filamentleri (F aktin) oluşturmak üzere polimerleşir. İlk G-aktin ATP'ye bağlanır. Daha sonra kararlı di- veya trimerler oluşturur ve son olarak monomerlerin eklenmesiyle filamentler uzar. ATP'nin ADP'ye hidrolizi, hızlı büyüyen (+)-uç ile daha yavaş büyüyen veya ayrışan (-)-uç arasında bir ayrıma yol açar.

Kofilin, konsantrasyona bağlı olarak aktin ayrılmasını ve stabilizasyonunu düzenler. Hareketli hücrelerin ön kenarındaki aktin filamentlerinin Kofilin aracılı olarak kesilmesi, T hücresi göçü ve kanser hücresi metastazı için gerekli olan lamellipodia oluşumunu kontrol eder [36]. Kofilin aktivitesi, hücre içinde, Ser3'ün fosforilasyonu ile onu etkisiz hale getiren LIM kinaz (LIMK) dahil kinazların aktivitesi ile düzenlenir ve aktin filamentlerinin stabilizasyonu ile sonuçlanır [32], [37]. Spesifik (slingshot, chronophin) ve genel fosfatazlar (PP2A) tarafından gerçekleştirilen Kofilin reaktivasyonu, F-aktin kopmasına ve depolimerizasyona neden olur [38].

#### 2.2.4. Plexin C1 Etkileşim Partnerleri

Bilginin hücre zarları boyunca nasıl iletildiği, biyolojide tamamen netleşmemiş önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Hücreler, hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanan çözünür moleküller (büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar) şeklinde hücre dışı uyarınları alırlar (Şekil 2.3) [39]. Tek geçişli transmembran (TM) reseptörleri, sinyalleri lipid çift katmanları boyunca sarmal birleşmesi veya önceden oluşturulmuş dimerler içindeki konfigürasyon değişiklikleri ile iletir [40]. Bu tür TM bölgeleri için yapı tespiti zordur ve çoğunlukla NMR spektroskopisi ile başarılmıştır. Son zamanlarda, TM dimer yapılarının hesaplamalı tahmini, reseptör düzenlemesi için önemli olan alternatif konformasyonel durumlar da dahil olmak üzere modeller sağlamak için moleküler modelleme ve simülasyon çalışmaları yapılmaktadır [41], [42].

Plexinler, küçük GTPazlar ile çeşitli şekillerde doğrudan etkileşime girmeleri bakımından benzersiz TM reseptörleridir. Bu, Plexin bir GTPaz Aktive Edici Protein (GAP) olarak işlev gördüğünden, Rho GTPazlar ile doğrudan etkileşimleri ve Ras GTPazlar ile geçici/katalitik etkileşimleri içerir [43]. Plexinin Rho GTPaz Bağlama Alanı (RBD) karakterize edilmiş ve bazı Plexin fonksiyonlarının düzenlenmesinde Rho GTPazların doğrudan katılımını öne süren bir model geliştirilmiştir [44], [45]. Daha önce, Plexin sinyalleşmesinin içten dışa olduğu kadar dıştan içe olduğu gösterilmiş. Bu sinerjistik iletişim modu diğer birkaç sistemde (örneğin Integrin [46]) görülürken, Plexinler için moleküler mekanizma henüz ortaya çıkarılmamıştır. Yapılan çalışmalar sonucu TM bölgesinin insan Plexin ailesinin 9 üyesi boyunca düşük sekans benzerliği göz önüne alındığında, sinyal mekanizmalarının Plexin ailesinin üyeleri arasında farklı olması muhtemeldir [47].



Şekil 2.3: Hücre zarı boyunca küçük GTPaz Rho, Rac ve Cdc42'nin aktivasyon durumu kontrolünde akış aşağı sinyal yollarının uyarımı. Hücreler, hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanan çözünür moleküller şeklinde hücre dışı uyarımları alırlar. Bu uyarımlarla, küçük GTPaz Rho, Rac ve Cdc42'nin aktivasyon durumunun kontrolüne göre akış aşağı sinyal yollarının uyarımı gerçekleşir. GTPazların aktiviteleri GEF'ler ve GAP'ler tarafından düzenlenir. Bu pozitif ve negatif düzenleyici döngüler, hücre hareketliliği ve belki de diğer süreçler için önemli görünmektedir.

Plexin C1'in etkileşimde bulunduğu partnerler geniş anlamıyla henüz bilinmemektedir. Biyoinformatik alanda çalışmalar yapılsada bunlar netleştirilememiş ve deneysel anlamda bir çalışma bulunmamaktadır.

## 3. GEREÇLER

### 3.1. Cihazlar

Laminar akış kabini class II (Esco), Karbondioksit inkübatörü (Euroclone), sıvı azot tankı (Arpege 140), -80°C derin dondurucu (Thermo Scientific), -20°C derin dondurucu (Bosch), +4°C buzdolabı (Ariston), buz makinesi (BAR-LINE BF85), su banyosu (Nüve), soğutmalı santrifüj (Labogene, Scanspeed 1580R), santrifüj (Nüve, NF400), ters ışık mikroskobu (Leica), vortex (DragonLabs, MX-S), orbital çalkalayıcı (Denville Scientific), rotatör (Revolver), hassas terazi (Sartorius BL210S), ısıtıcılı blok (Denville Scientific), mini western blot sistem ve transfer tankı (BioRad), otoklav (Hriyama), jel/membran görüntüleme sistemi (Biorad ChemiDOC XRS), Varioskan LUX (Thermo Scientific), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Denville Scientific), şarjlı pipetleyici (Thermo Scientific), Nanodrop (Thermo Scientific).

### 3.2. Genel Kimyasallar

Tris (Sigma Aldrich), Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP; Sigma-Aldrich, ABD), SDS (Calbiochem), Np40, Chloroacetamide (CAA; Sigma-Aldrich, ABD),  $\beta$ -Mercaptoetanol (Fischer Scientific), Amonyum bikarbonat (Sigma-Aldrich, ABD), Metanol (Merck), Gliserol (Fischer Scientific), Sükröz, Sodyum asetat, Guanidin hidroklorür, CaCl<sub>2</sub>, ATP, NaCl, MgCl, HCl (Fischer Scientific), APS (Fischer Scientific), Tripsin (Promega, ABD), DMSO (NeoFroxx), TEMED (Fisher Scientific), Acrilamid/Bisacrilamid (NeoFroxx), Tripsin (Promega, ABD), Trifluoroacetic acid (TFA; Sigma-Aldrich, ABD), 2-Propanol (Merck), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, DTT, Western Blot ECL (Advansta), EGTA, EDTA, PEI (Sigma Aldrich), NaF, Complete Proteaz İnhibitör Kokteyl Tabletleri (Roche), Jelatin, KCL, Puromisin (InVivoGen).

### 3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

Hücreler için besiyeri olarak yüksek-glukoz içerikli DMEM (Gibco), 1X esansiyel olmayan amino asitler (NEAA, Gibco), %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco), %10 fetal dana serumu (FBS, Gibco), 10X Tripsin (Gibco) ve 10X fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS, Gibco) kullanıldı. Farklı deney prosedürlerine göre hücrelere Plexin C1 ve İntegrin  $\beta 1$ 'in ligandı olan SEMA7A (R&D Systems, ABD) uygun süre ve dozda verildi.

### 3.4. Hücre Hatları

İnsan HCC hücre hatları PLC/PRF/5 ve Hep3B, Plexin C1 antikoru üreten PE4 hibridoma hücreleri ve HEK293T hücre hattı Gebze Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü hücre stoğundan temin edildi. Tüm hücreler, yüksek glikoz içerikli, %1 Penisilin-Streptomisin, %1 esansiyel olmayan aminoasitler ve %10 FBS içeren DMEM besiyerinde büyütüldü.

### 3.5. Çözelti ve Tamponlar

Tez çalışması süresince kullanılan solüsyonların kullanım amaçları ve içerikleri tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Çözelti ve kimyasal listesi.

Çözelti-Kimyasal	İçeriği	Kullanım Amacı
Fosfat buffer	A- 0.02M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> B- 0.02M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> A (39ml) + B (61ml) + dH <sub>2</sub> O ile 200ml'e tamamlanır (pH:7).	Antikor saflaştırma, İmmün çöktürme
Elution Buffer	0.05 M Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> , 0.3 M NaCl (pH:3) (ProteinA)	Antikor saflaştırma
Tris Buffer	1 M Tris/HCl (pH:9)	Antikor saflaştırma
10X TBS	500 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1.5 M NaCl.	Western Blot

Tablo 3.1: Devamı.

TBS-T	%0,05 Tween-20, 1X TBS.	Western Blot
Bloklama Solüsyonu	1X TBS-T, %5 Yağsız süt tozu.	Western Blot, ELISA
Kaplama solüsyonu	0,1 M, pH= 9,6, 500 ml için: Sodyum bikarbonat: 2,88 g Sodyum karbonat: 1,666 g	ELISA
Substrat solüstonu	pH: 10.4, 100 ml 7,51 g glycine 203 mg MgCl <sub>2</sub> (hexahydrate) 136 mg ZnCl <sub>2</sub> 70ml'de çözüp NaOH pelleti ile pH'ı 10.4'e ayarladık. Üzerini 100ml'e tamamladık. 15ml'lik santrifüj tüpüne bölündü, buzdolabında (+4) saklıyoruz. Substratı hazırlarken 500 ul 10X substrat buffer'a 4500 ul otoklavlı su ekleyip içine 1 tane tablet atıyoruz.	ELISA
10X PBS	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 17,8 g, NaCl 80 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,4 g, KCl 2 g, 1 L saf su (pH:7,4).	Lizat hazırlığı, hücre kültürü
Dondurma Ortamı	%10 DMSO, %90 FBS.	Hücre dondurma
Lizis Buffer	1) 50 mM KCl, 100 mM NaF, 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.2 mM DTT, 1 mM EGTA, 1 mM sukroz, %0,5 Triton X-100, (pH 7.0) + Proteaz inhibitörü 2) 20 mM Tris-HCl, 1 mM sodyum asetat, 1.5 mM guanidin hidroklorür, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 mM ATP, (pH 7.5)	F-Aktin/G-Aktin Oranı İçin Lizat tamponu
5X Laemmli Tamponu	300 mM Tris (pH=6,8), %10 SDS, %50 Gliserol, %0,25 Bromofenol mavi, %25 β-merkaptoetanol.	Western Blot

Tablo 3.1: Devamı.

2X SDS Buffer	120 mM Tris (pH=6,8), %4 SDS, %20 Gliserol.	Total protein lizat tamponu
Bloklama Solüsyonu	%1 BSA, 1X PBS	CO-IP (Sefaroz boncuklar)
IP-Yıkama Buffer	50 mM Tris pH:7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, % 0,25 jelatin, %0.1 Np40	CO-IP
IP-Lizis Buffer	50 mM Tris pH:8, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, %10 Gliserol, %1 Triton x100 + Proteaz inhibitörü	CO-IP
%4'lük SDS-PAGE İstifleme Jeli	3,15 ml ultra saf su, 1,25 ml 0,5 M Tris (pH:6,8), 50 µl %10 SDS, 0,5 ml Ac/Bis (%40), 50 µl APS (%10), 3 µl TEMED.	SDS-PAGE jel
%12'lik SDS-PAGE Ayırma Jeli	4,4 ml ultra saf su, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH:8,8), 100 µl %10 SDS, 3 ml Ac/Bis (%40), 100 µl APS (%10), 6 µl TEMED.	SDS-PAGE jel
%8'lik SDS-PAGE Ayırma Jeli	5,5 ml ultra saf su, 2,5 ml 1,5M Tris (pH:8,8), 100 µl %10 SDS, 2 ml Ac/Bis (%40), 100 µl APS (%10), 6 µl TEMED.	SDS-PAGE jel
Elektroforez Yürütme Tamponu	190 mM glisin, 25 mM Tris, 0,1% SDS.	Western Blot
Transfer Tamponu	190 mM glisin, 25 mM Tris, %20 metanol.	Western Blot

### 3.6. Bakteriler ve Besiyerleri

*Escherichia coli* DH5α bakterileri katı LB (LB-agar) ve sıvı Luria-Bertani (LB) (Neogen, ABD) besiyerlerinde çoğaltıldı. Ticari olarak temin edilen plazmitlerdeki antibiyotik direnç genine uygun olan ampisilin antibiyotiği (Sigma Aldrich, ABD) bakterilerin transformasyonu sonrasında kullanılan besiyerine eklendi.

### 3.7. Vektörler

*Homo sapiens* Plexin C1 genini içeren Flag-etiketli pcDNA3.1\*/C-(K)-DYK (Genscript OHu14766), kontrol plazmidi olarak pcDNA3.1 (Invitrogen), Plexin C1 transkriptlerini hedefleyen lentiviral shRNA vektörü (TRCN0000060645, Sigma-Aldrich) ve pLKO.1 boş kontrol vektörü (Addgene, #8453) kullanıldı. Paketleme vektörleri pCMV-dR8.2 dvrp (Addgene, #8455) ve pCMV-VSV-G (Addgene, #8454) viral partiküllerin oluşturulması için kullanıldı.

### 3.8. Antikorlar

Western Blotta Plexin C1 (PE4 hibridoma süpernatantı 4 µg/ml olacak şekilde saflaştırılmış konsantre), NALP2 (Affinity, 1/2000), GAPDH (Cell Signaling, 1/5000), ALIX (Affinity, 1/1000), Cofilin (Cell Signaling, 1/7000), β-actin (Cell Signaling, 1/3000), Phospho-Cofilin (Cell Signaling, 1/1000), IPO5 (Affinity, 1/1000), MUC13 (Affinity, 1/1000), anti-mouse-HRP ve anti-rabbit-HRP sekonder antikorları (Advansta, 1/5000) kullanıldı.

### 3.9. Kitler

PureYield Plasmid Midiprep System (Promega, ABD), SMART BCA protein assay kit (Intron Biotechnology, ABD).

## 4. YÖNTEMLER

### 4.1. Hücre Hatlarının Kültürü

HEK293T, Plexin C1 antikoru üreten PE4 hibridoma hücreleri ve HCC hücre hatları olan PLC/PRF/5, Hep3B hücreleri %10 fetal dana serumu, %1 NEAA ve %1 penisilin-streptomisin ile yüksek glikoz içeren DMEM besiyerinde büyütüldü. Hücreler, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kültüre edildi. Süspansiyon olan hibridoma hücreleri flasklarda çoğaltılırken, adherent olan hücreler hücre kültür petrilere büyütüldü. Adherent hücreler %80-90 oranında konfluent olduklarında besiyeri aspire edilerek 1X PBS ile yıkandı, HEK293T 1X Tripsin, diğer hücreler ise 2X Tripsin ile kültür petrilere zemininden kaldırılarak yeni kültür petrilere ihtiyaca göre ekildi.

### 4.2. Transformasyon ve Plazmitlerin Çoğaltılması

Homo sapiens PlexinC1'in klonlandığı Flag-etiketli pcDNA3.1\*/C-(K)-DYK, kontrol plazmid olarak pcDNA3.1, Lentiviral PLXNC1 shRNA, pLKO.1, pCMV-VSV-G ve pCMV-dR8.2 dvrp plazmitlerinden 30'ar ng plazmit, 100 µl ultra kompetant *E. Coli* DH5α ile ayrı ayrı birleştirildi, ardından 30 dk buz üzerinde inkübe edildi. Daha sonra 42°C'de su banyosunda 1,5 dk bekletildi sonra 2 dk buz üzerinde tutuldu. Ardından üzerine 900 µl sıvı LB eklenerek 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 1 saat büyütüldü. Transformasyon karışımı 6000 xg'de 1 dk santrifüj edilip elde edilen pellet üst sıvının 900 µl'si atıldıktan sonra kalan 100 µl, 100 µg/ml seçici antibiyotik (Ampisilin) içeren katı LB (LB agar) ortamına drigalski yardımıyla ekildi ardından 37°C'de 16 saat büyütüldü. Gece boyu inkübasyon sonrasında oluşan transforme bakteri kolonileri seçilerek ampisilinli sıvı LB besiyerinde daha büyük hacimlerde büyütüldü. 16 saat inkübasyon ile büyütülen transforme bakterilerden plazmit izolasyonu, plazmit izolasyon kiti ile üreticinin protokolüne göre yapıldı. İzole edilen plazmitlerin Nanodrop cihazı ile konsantrasyonu ve OD 260/280 oranı belirlendi.

### **4.3. Plexin C1 Hücre Klonlarının Oluşturulması**

#### **4.3.1. Viral Partiküllerin Üretilmesi**

HEK293T hücreleri 6 kuyucuklu plakalara %30 yoğunlukta olacak şekilde ekildi. Sonraki gün PLKO.1 shPLXNC1 ve kontrol pLKO.1 plazmitleri, pCMV-VSV-G ve pCMV-dR8.2 dvrrp paketleme plazmitleri ile 1,5 µg: 1,5 µg: 1 µg oranında 250 µl Opti-MEM (Thermo Scientific) içerisinde bir tüpte karıştırıldı. Aynı bir tüpte, transfeksiyon aracı olarak kullanılan PEI (Polyethylenimine) 1:3 (DNA µg-ağırlık:PEI µl-hacim) oranında 250 µl Opti-MEM içerisinde hazırlandı ve 5 dk inkübe edildi. İki karışım birleştirildikten sonra 20 dk oda sıcaklığında bekletildi ardından hücrelerin üzerine yavaşça eklendi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücrelere taze besiyeri verildi. Ardından 48 saat sonra hücrelerin üst sıvıları toplandı. 1800 rpm'de 5 dk çöktürüldükten sonra üst sıvı 0.45 µm por hacimli filtreden geçirilerek -80°C'ye kaldırıldı.

#### **4.3.2. Plexin C1 İfadesi Baskılanmış ve Kontrol Klonlarının Geliştirilmesi**

PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre hatları 6 kuyucuklu plakalara kuyu başı %40 yoğunlukta olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra 8 µg/ml Polybren ile Plexin C1'i hedef alan shRNA veya pLKO.1 kontrol plazmitini içeren virüsler hücrelere verildi. Transfeksiyon olan hücrelerin seçilip olmayanların ölmesi için puromisin antibiyotiğiyle 3 pasaj boyunca seçim yapıldı. Plazmitti alan hücreler puromisin antibiyotik direnç genine sahip oldukları için hayatta kalmaya devam ettiler. Western Blot yöntemi ile bu hücrelerden hazırlanan lizatlarda hücrelerdeki azalan Plexin C1 ifadesi gösterildi.

### 4.3.3. Plexin C1 Aşırı İfadesinin Sağlanması

PLC/PRF/5 hücre hatları 100 mm petrilere %40 yoğunlukta olacak şekilde ekildi. Ertesi gün, Homo sapiens PlexinC1'in klonlandığı Flag-etiketli pcDNA3.1\*/C-(K)-DYK plazmiti ve pcDNA3.1 kontrol plazmiti ayrı ayrı plate başı 12 µg oranında 1,5 ml Opti-MEM içerisinde bir tüpte karıştırıldı. Ayrı bir tüpte, transfeksiyon aracı olarak kullanılan PEI 1:3 (DNA µg-ağırlık:PEI µl-hacim) oranında 1,5 ml Opti-MEM içerisinde hazırlandı ve 5 dk inkübe edildi. Ardından iki karışım birleştirildi ve 20 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu arada hücrelere taze besiyeri eklendi inkübasyon süresi dolduktan sonra hücrelerin üzerine yavaşça eklendi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler 6 kuyucuklu plaka ve 100 mm petrilere pasajlandı. Ertesi gün yani transfeksiyondan 48 saat sonra 6 kuyucuklu plakalardan lizat yapıldı ardından Western Blot yöntemi ile hücrelerde artan Plexin C1 ifadesi gösterildi. Sonraki gün yani transfeksiyondan 72 saat sonra hücrelere 37°C'de 15 dakika boyunca 100 ng/ml SEMA7A uygulandı. Ardından total protein lizatları hazırlandı.

### 4.4. Protein Pürifikasyon

Anti-Plexin C1 antikor üreten PE4 hibridoma hücreleri SFM besiyerine ekildikten 72 saat sonra toplanarak 1800 rpm de 5 dk çöktürüldü üst sıvı kısmı alındı hücreler atıldı. Sefaroz boncuklar yavaş bir şekilde döndürülerek, köpürtmeden karıştırıldıktan sonra 1 ml (Repligen CaptivA) 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 5 ml dH<sub>2</sub>O eklendi ve 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst sıvı döküldü, boncuklara fosfat tamponu eklenerek santrifüj işlemi tekrarlandı. Bu yıkama işlemi iki kere yapıldı. Daha sonra boncuklar 10 ml fosfat tamponu ile çözdürülerek iki tane 40 ml üst sıvı içerisine 5'er ml olmak üzere eklendi. Ardından boncuklar üst sıvı ile +4°C'de gece boyu muamele edildi. Üst sıvısına göre tüp sayısı belirlendi. 1,5 ml'lik eppendorflar önceden 50 µl Tris (Onda biri kadar olacak şekilde Tris pH:9) konularak hazırlanıp +4°C'ye kaldırıldı. Ertesi gün, Fosfat tamponu geçirilerek kolon (polypropylene columns 5 ml #34964) hazırlandı. Kolondan Üst sıvı/Antikor-Sefaroz Boncuk geçirilerek Ft1 olarak toplandı. Daha sonra fosfat tamponu geçirilerek Ft2

olarak toplandı. Ardından elution buffer eklendi. 50 µl Tris, elüsyonlu örnek ile 500 µl 'ye tamamlandı. (Bu aşamada +4°C'de işlemler gerçekleştirildi.) 10-15 ml Elution buffer geçirildi bunlar 1,5 ml'lik ependorflara 500'er µl olacak şekilde toplandıktan sonra son elution olarak 5 ml 15 ml'lik santrifüj tüpüne toplandı. Ardından sefaroz boncuklara fosfat tamponu ile yıkama işlemi gerçekleştirildi bu da son atık olarak 15 ml'lik santrifüj tüpüne toplandı. İlk önce %70 ardından %20 Etanol geçirildi ve son olarak %20 Etanol içerisinde +4°C'de kapak kısımları parafilmlelenerek 50 ml'lik santrifüj tüplerinde saklandı. Saflaştırmanın sonuçları uygun oranlarla ELISA yöntemi ile test edilmiştir.

#### **4.5. Protein Konsantrasyonu**

Saflaştırma sonucu ELISA ile test edilerek yüksek değer veren örnekler bir araya toplandı. Ardından hazır kolon kullanılarak (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units, 10 kDa, #UFC901024) konsantre edildi ve buffer değişimiyle PBS içerisine alındı. Ardından antikorlar ELISA ile test edildi, nanadrop ile ölçümü yapıldı ve -20 °C'ye kaldırıldı.

#### **4.6. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay )**

Çalışma ELISA'ya özel 96 well plate'de (immüno plate) yapıldı. İlgili antijen kuyu başına 100 ng/ul antijen olacak şekilde coating buffer (karbonat-bikarbonat buffer) ile seyreltilerek, her kuyuya 100 ul antijen olarak konuldu. Plate'in üstü tamamen kapanacak şekilde parafilmlelendi. +4°C'de geceboyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün antijen dökülüp plate dH2O ile yıkandı. Bu işlem üç kere tekrar edildi. Ardından kuyuları tam dolduracak şekilde bloklama solüsyonu eklendi ve Plate'in üstü yeni bir parafilmle kapatılıp 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 3 kere dH2O ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Primer antikor olarak Plexin C1 antikor üreten PE4 hibridoma hücrelerinin üst sıvısını, saflaştırılan ve konsantre edilen Plexin C1 antikorunu kuyulara uygun dilüsyonlarla eklendi. Ardından Plate yeni bir parafilmle kapatıp oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Primer

antikor da 3 kere dH<sub>2</sub>O ile yıkadıktan sonra bloklama solüsyonu ile 1/1000 dilüe edilen alkalın fosfatazlı sekonder antikor her kuyuya 100 ul olacak şekilde eklendi. Yine plate farklı bir parafilmle kapatıp 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Sekonder antikor da 3 kere dH<sub>2</sub>O ile yıkadıktan sonra görüntüleme için substrat hazırlandı. 1 substrat tableti 5 ml 1X substrat bufferda vortexlenerek çözüldü, ışıktan etkilendiği için alüminyum folyo ile kapatıldı. Her kuyuya 100 ul substrat eklendi ve plate hemen alüminyum folyo ile kapatıldı. 15-20 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra ELISA mikropłaka okuyucuda (Varioskan LUX, Thermo Scientific) 405 nm'de ölçüm alındı.

#### **4.7. F-Aktin/G-Aktin Oranı İçin Lizat Hazırlama**

6-kuyulu plakalarda kültüre edilen PLC/PRF/5 ve Hep3B hücrelerine 100 ng/ml konsantrasyonda 15 dakika boyunca Sema7A uygulandıktan sonra hücreler ilk aşamada liziz tamponu 1 (50mM KCl, 100 mM NaF, 10mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM DTT, 1mM EGTA, 1mM sukroz, %0,5 Triton X-100, pH 7.0) kullanılarak çözüdür G-aktini içeren üst-sıvı kesimi elde edildi. Çözüdürmez F-aktin içeren pelet, F-aktin'i çözüdür G'ye dönüştüren eşit hacimde liziz tamponu 2 (20 mM Tris-HCl, 1 mM sodyum asetat, 1.5 mM guanidin hidroklorür, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, pH 7.5) ile yeniden süspanse edildi [48]. Eşit hacimlerde F-aktin ve G-aktin içeren lizatlar SDS-PAGE'e yüklendi ve PVDF membrana transferin ardından Beta-aktin, Kofilin, p-Kofilin ve Plexin C1 antikorları ile Western blotta analiz edildi.

#### **4.8. Endojen Birlikte İmmün Çöktürme**

SEMA7A ile indüksiyonu öncesi ve sonrasında PLC/PRF/5 hücrelerinden lizat yapımı için hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra 2X Tripsin ile kültür petripleri zemininden kaldırılarak santrifüj tüpüne alındı. Ardından 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst kısım döküldü pellet kısmı soğuk 1X PBS ile çözdürüldü ve 1,5 ml'lik ependorfa alındı ve +4°C'de 4000 rpm'de 2 dk tekrar çöktürüldü. Pellete göre liziz buffer eklendi 15 dk buz üzerinde bekletildi, 5 dk bir tüpe hafifçe vurularak pelletin

çökmesi engellendi. Ardından +4°C'de 30 s vurma 30 s bekleme olmak üzere 10 tekrar şeklinde sonikasyon işlemi uygulandı ve 14.000 rpm'de 10 dk santrifüjden sonra üst kısım alındı daha önce yıkaması yapılan boncuklar ile birleştirildi 1 saat +4°C'de rotatörde döndürülerek karıştırıldı. Bir saat inkübasyonun ardından lizat-sefaroze boncuk karışımı çöktürülerek lizat kısmı alındı böylece ön yıkama işlemi gerçekleştirilmiş oldu sonrasında lizata gerekli antikor eklenerek gece boyu +4°C'de rotatörde döndürülerek karıştırıldı. Pellet kısmı ise 2X SDS buffer kullanılarak çözdürüldü ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ardından vortexlenip sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Örnekler Laemmli tamponu eklenerek 95°C'de 5 dk ısıtıldı ardından -20°C'ye kaldırıldı.

Aynı gün yeni boncuklar yavaş bir şekilde döndürülerek, köpürtmeden karıştırıldıktan sonra uygun miktarda (Repligen CaptivA) 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Üzerine ilk önce dH<sub>2</sub>O eklendi ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Üst sıvı döküldü, boncuklara yıkama tamponu eklenerek santrifüj işlemi tekrarlandı. Bu yıkama işlemi iki kere yapıldı ve %1 BSA eklenerek gece boyu +4°C'de rotatörde döndürülerek karıştırıldı. Ertesi gün boncuklar yıkama tamponu eklenerek 5 dk rotatörde döndürülerek karıştırıldı sonra 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Ardından iki kere fosfat tamponu eklenerek 5'er dk rotatörde döndürülerek santrifüj işlemi tekrarlandı. Sonrasında boncuklar fosfat tamponu içerisinde Lizat-Antikor karışımının içine atıldı ve 20 dk oda sıcaklığında ardından 2 saat +4°C'de rotatörde döndürüldü. 1500 rpm'de 5 dk lizat-antikor-boncuk karışımı çöktürüldü üst sıvı kesim atıldı, üzerlerine Laemmli tamponu eklenerek 95°C'de 5 dk ısıtıldı ve 2000 rpm de 10 dk santrifüf edildi bu sayede boncuk ile antikorların bağlantıları koparılmış oldu. Üst sıvı kısmı yeni tüplere aktarıldı ve yüklemeye hazır hale getirilmiş oldu.

#### **4.9. Kütle Spektroskopisi İçin Eksojen İmmün Çöktürme**

Plexin C1 aşırı ifadesinin sağlandığı ve sağlanmadığı PLC/PRF/5 hücrelerinden SEMA7A ile indüksiyonu öncesi ve sonrasında lizat yapımı için hücreler 3 kere soğuk 1X PBS ile yıkandı. Ardından IP lizat solüsyonu eklendi ve 15 dk buz üzerinde bekletildi sonrasında kazıyıcı yardımıyla toplandı ve 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine

aktarıldı. +4°C'de 30 s vurma 30 s bekleme olmak üzere 10 tekrar şeklinde sonikasyon işlemi uygulandı. 14.000 rpm de 10 dk santrifüjden sonra üst kısım alındı üzerine gerekli antikor eklenerek gece boyu +4°C'de rotatörde döndürülerek karıştırıldı. Pellet kısmı ise 2X SDS buffer kullanılarak çözdürüldü ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ardından vortekslenip sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Örnekler Laemmli tamponu eklenerek 95°C'de 5 dk ısıtıldı ardından -20°C'ye kaldırıldı. Ertesi gün manyetik boncuklara yıkama tamponu eklendi, 5 dk rotatörde döndürülerek karıştırıldı sonra manyetik boncuklar mıknatıs ile tüp çeperlerinde tutuldu ve üst-sıvılar uzaklaştırıldı. Fosfat tamponu ile tekrar 2 kez yıkanan manyetik boncuklar lizat-antikor karışımının içine aktarıldı ve karışım +4°C'de 2,5 saat rotatörde döndürülerek karıştırıldı. Manyetik boncuklar mıknatıs ile tüp çeperlerinde tutuldu ve üst-sıvılar uzaklaştırıldı. Manyetik boncuklara yıkama tamponu eklendi, 5 dk rotatörde döndürülerek bu işlem iki kere tekrar edildi. Ardından Tris-NaCl tamponu eklenerek tekrar 5 dk rotatörde döndürüldü ve mıknatıs ile üst sıvı uzaklaştırıldı. Bu aşama sonrasında iki farklı yöntem uygulandı;

#### **4.9.1. Western için Hazırlanan Örnekler**

Manyetik boncuk-antikor-protein kompleksleri üzerine Laemmli buffer eklendi ve 98°C'de 10 dakika inkübe edildi. Manyetik boncuklar mıknatısla tutularak sıvı kesimdeki antikor-protein kompleksleri SDS-PAGE'de yürütüldü ve proteinler PVDF membrana transfer edilerek membranlar PE4 antikoruna ile blotlandı.

#### **4.9.2. Kütle Spektroskopisi için Hazırlanan Örnekler**

Manyetik boncuklara Tris tamponu eklendi, 5 dk rotatörde döndürülerek karıştırıldı sonra manyetik boncuklar mıknatıs ile tüp çeperlerinde tutuldu ve üst-sıvılar uzaklaştırıldı. 50 mM Amonyum bikarbonat (Sigma-Aldrich, ABD) solüsyonu eklendi. Manyetik boncuklardan ayrılan proteinler sırasıyla 10 mM Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP; Sigma-Aldrich, ABD) ve 40 mM chloroacetamide (CAA; Sigma-Aldrich, ABD) solüsyonları ile indirgenme/ alkilenme

işlemlerine tabi tutulduktan sonra 1 µg Tripsin (Promega, ABD) ile küçük fragmanlara kesildi. Üzerlerine %1 Trifluoroacetic acid (TFA; Sigma-Aldrich, ABD) eklendi; örnekler önce -80°C'ye kaldırıldı, ardından kuru buz ile kütle spektroskopisine gönderildi.

#### **4.10. Western Blotlama**

Amaca yönelik olarak hücre hatlarından uygun lizis bufferlar kullanılarak hücre lizatları hazırlandı. Protein konsantrasyonları SMART BCA protein assay kit ile belirlendi. Hazırlanan örnekler kuyu başına 50 µg protein olacak şekilde SDS-PAGE jele yüklenerek yürütme tamponu içerisinde yürütüldü. Moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler, jelden PVDF membranlara ıslak transfer yöntemiyle gece boyu 22 V'ta +4 °C'de transfer edildi.

Ertesi gün transferden alınan membranlar TBS-T (%0,05 Tween-20 deterjanı içeren 1XTBS) içerisinde hazırlanmış %5 süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında bloklandı. Ardından membranlar, istenen birincil antikolar ile oda sıcaklığında 1,5 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 5 dk TBS-T ile çalkalanarak yıkama işlemi gerçekleştirildi ve bu işlem üç kere tekrar edildi. Membranlar anti-IgG-HRP bağlı ikincil antikolar (birincil antikora bağlı olarak fare ya da tavşan) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından tekrar TBS-T ile yıkandı. Membran üzerindeki protein bantları, ChemiDoc XRS system cihazında WesternBright ECL kemilüminesan HRP substratı kullanılarak görüntülendi.

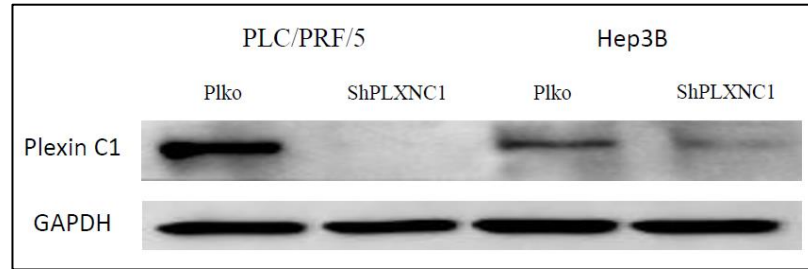
#### **4.11. Kütle Spektroskopisi Analiz**

Protein tanımlanması ve seçimi için Scaffold (Scaffold 5.1.0, Proteome Software Inc., Portland, OR) kullanıldı. Protein tanımlamaları, %95'ten daha büyük bir olasılıkla kurulabilirse ve en az 3 tanımlanmış peptit içeriyorsa kabul edildi. Önemli peptit kanıtını paylaşan proteinler, kümeler halinde gruplandırılarak şemalandırıldı.

## 5. BULGULAR

### 5.1. HCC Hücre Hatlarında shPLXNC1 ve PLKO Klonlarının Geliştirilmesi

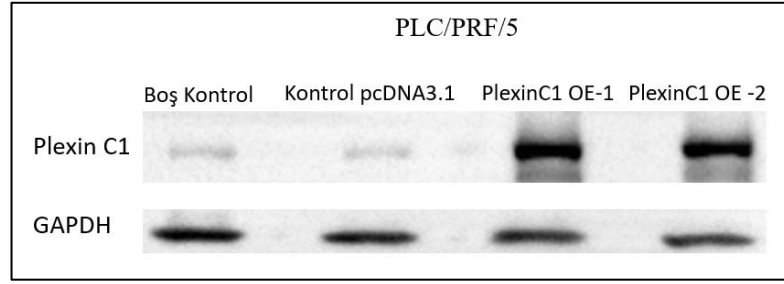
Plexin C1'in hücre hareketine etkisini incelemek amacıyla, lentiviral shRNA ile PLXNC1 proteinin ifadesi, yüksek endojen PLXNC1 ifadesine sahip PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre hatlarında baskılandı. Kontrol hücreleri PLKO olarak adlandırılırken Plexin C1 ifadesi baskılanmış hücreler shPLXNC1 olarak adlandırıldı. PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarından total protein lizatı yapıldı ve Western blot yöntemi ile hücrelerdeki Plexin C1 ifadesinin baskılanması doğrulandı. Western blot için Prof. Dr. Tamer Yağcı ve ekibi tarafından geliştirilen anti-PLXNC1 PE4 hibridomasından [28] elde edilip saflaştırılan ve konsantre edilen Plexin C1 antikoru kullanıldı (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Western blot yöntemi ile Plexin C1 ifadesinin baskılandığı hücre klonlarının doğrulanması. GAPDH eşit yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

### 5.2. PLC/PRF/5 Hücre Hattında Plexin C1 Aşırı İfadesinin Sağlanması

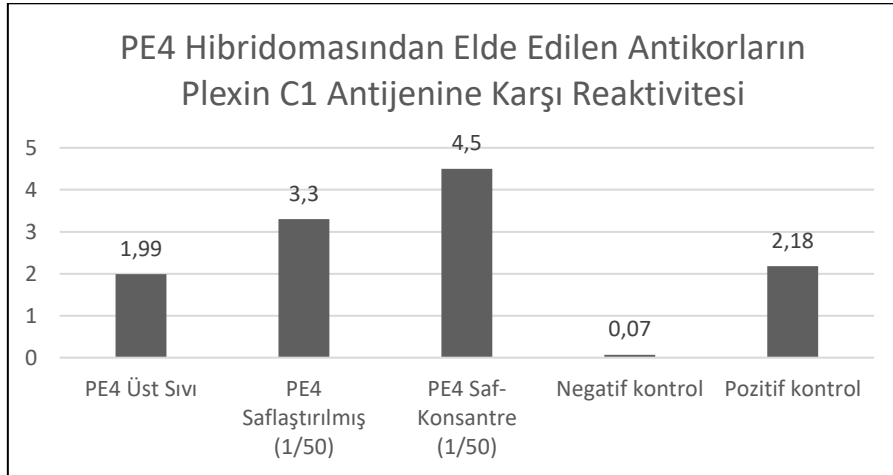
Plexin C1'in etkileşim partnerlerini bulmak amacıyla, PLC/PRF/5 hücre hattında Plexin C1'in klonlandığı Flag-etiketli pcDNA3.1\*/C-(K)-DYK plazmiti ile PLXNC1 proteinin ifadesinin artışı sağlandı. Kontrol olarak boş pcDNA3.1 kontrol plazmiti ve herhangi bir transfeksiyon işlemi uygulanmamış (Boş Kontrol) total protein lizatı kullanıldı.



Şekil 5.2: Plexin C1 aşırı ifadesinin sağlandığı PLC/PRF/5 hücrelerinin Western blot ile doğrulanması. GAPDH eşit yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

### 5.3. PE4 Antikorumun Saflaştırılması ve Konsantrasyonu

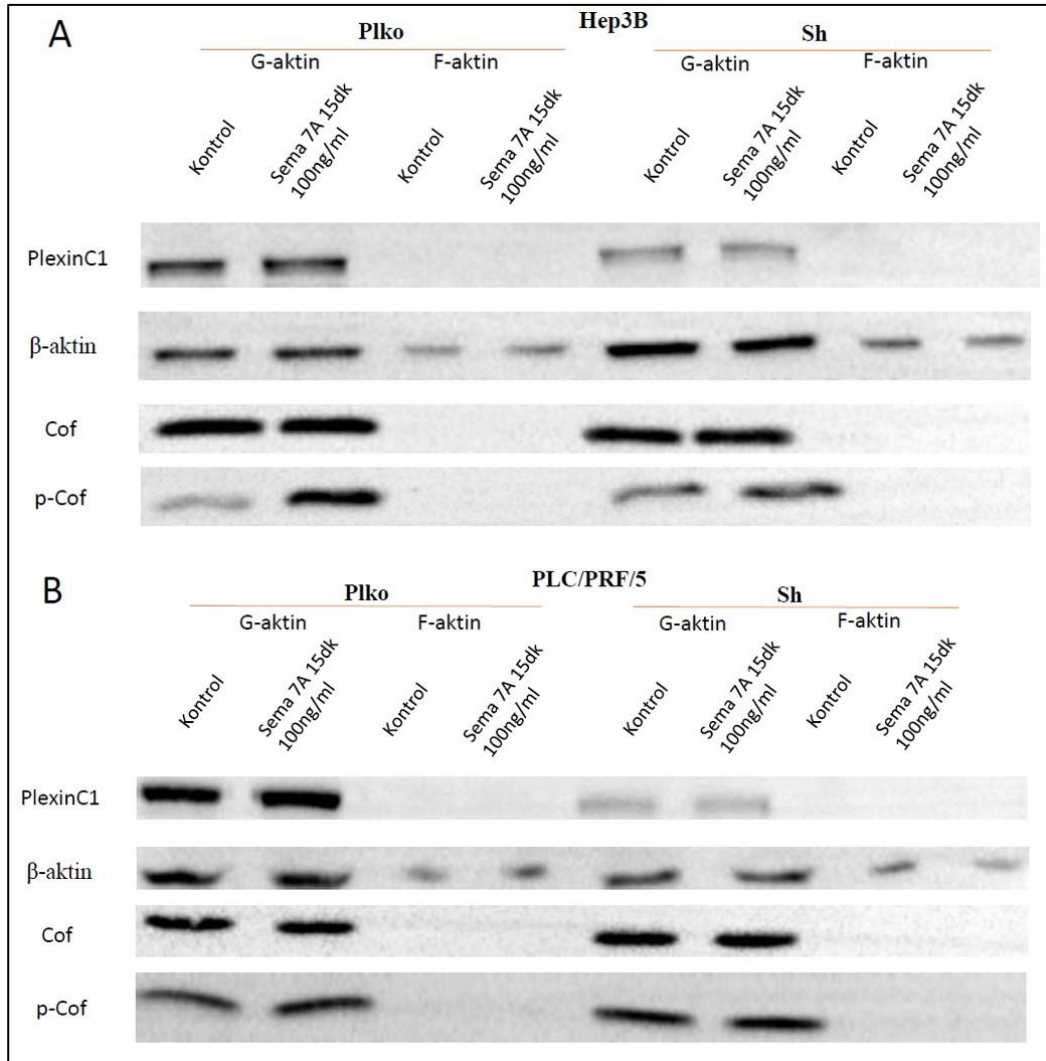
Prof. Dr. Tamer Yağcı ve ekibi tarafından geliştirilen anti-PLXNC1 PE4 hibridomasından [28] elde edilen üst sıvı kullanılarak gelecek deneyler için kullanım amacıyla antikorumların toplanması, saflaştırılması ve ardından konsantrasyonu işlemi yapıldı. Deneyde, PE4 üst sıvısı direkt girilirken saf ve konsantre edilen Plexin C1 antikorumları 1/50 seyreltilmiş şekilde girilmiştir. ELISA değerleri karşılaştırılarak antikor kalitesi doğrulandı ve gelecek deneylerde kullanıma hazır hale getirildi.



Şekil 5.3: PE4 Antikorumun Saflaştırma ve Konsantrasyon ELISA değerleri. Saflaştırılan ve konsantre edilen PE4 antikoru 100 ng Plexin C1 antijenine karşı test edildi. Negatif kontrol, anti-IgG 1:1000; Pozitif kontrol, daha önce çalıştığından emin olunan Plexin C1 antikoru üreten PE4 hibridoma hücrelerinin üst sıvısı kullanıldı.

## 5.4. Hücre Klonlarında SEMA7A Bağımlı ve Bağımsız Plexin C1'in Aktin Dinamikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Plexin C1'in HCC hücrelerinde aktin dinamikleri üzerine etkisinin G-aktin, F-Aktin dinamikleri üzerinden incelenmesi amacıyla Plexin C1'in shRNA ile susturulduğu veya kontrol PLKO plazmidi ile transfekte edilen PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarından metot kısmında açıklandığı şekilde hücre lizatları hazırlandı. Eşit hacimlerde F-aktin ve G-aktin içeren lizatlar SDS-PAGE'e yüklendi ve PVDF membrana transferin ardından Beta-aktin, Kofilin (Cof), p-Kofilin (p-Cof) ve Plexin C1 antikorları ile Western blotta analiz edildi (Şekil 5.4).



Şekil 5.4: PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarında G aktin ve çözünür F aktin dinamiklerinin incelenmesi. PlexinC1'in shRNA ile susturulduğu veya kontrol PLKO

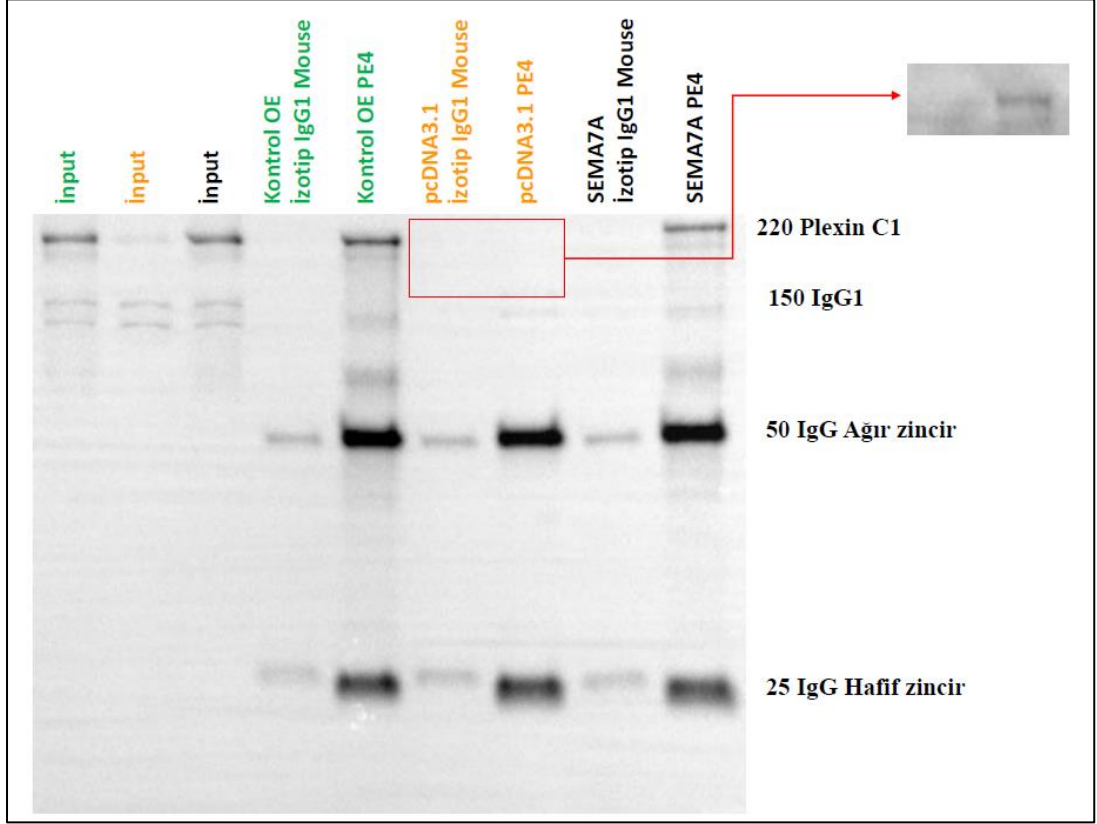
plazmidi ile transfekte edilen hücre klonlarında aktin dinamikleri incelendi. a) Hep3B hücre klonlarına belirtilen süre ve konsantrasyonda SEMA7A uygulaması yapıldı. 6-kuyulu plakalarda kültüre edilen hücrelerden elde edilen lizatlar SDS-PAGE jelde yürütülüp uygun antikolar ile blotlandı. b) PLC/PRF/5 hücre klonlarına belirtilen süre ve konsantrasyonda SEMA7A uygulaması yapıldı. 6-kuyulu plakalarda kültüre edilen hücrelerden elde edilen lizatlar SDS-PAGE jelde yürütülüp uygun antikolar ile blotlandı.

Hep3B hücrelerinde Sema7A varlığında p-Cof hem PLKO hem de shPLXNC1 klonlarında arttığı görülmektedir. Bu artışın PLXNC1 ifadesinin yüksek olduğu pLKO klonunda daha belirgin olması dikkat çekicidir (Şekil 5.4 a). Benzer bir profil PLC/PRF/5 hücrelerinde de görülmekle birlikte, PLC/PRF/5-shPLXNC1 klonunda PLXNC1 ifadesi Hep3B-shPLXNC1 göre daha fazla baskılandığından dolayı SEMA7A varlığında p-Cof artışı gözlemlenmektedir (Şekil 5.4 b). G-aktin F-aktin dinamikleri açısından bakıldığında, p-Cof artışının belirgin olduğu Hep3B-pLKO klonunda F-aktinin SEMA7A uygulandığında arttığı buna karşın, Hep3B-shPLXNC1 klonunda PLXNC1'in azalmış ifadesine rağmen p-Cof artışını engelleyemediği ancak bu ifadenin SEMA7A varlığında F-aktin artışı için yeterli olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 5.4 a). PLXNC1 ifadesinin daha fazla baskılandığı PLC/PRF/5-shPLXNC1 klonunda p-Kofilin düzeyinde SEMA7A'ya bağlı bir artış görülmemekte olup bu da F-aktinin depolimerizasyonuna yani kontrole göre azalmasına neden olmaktadır (Şekil 5.4 b). PLC/PRF/5-pLKO hücrelerinde ise SEMA7A'ya bağlı p-Cof artışı görülmekte ve bu da inaktive olan Kofilinin F-aktini depolimerize edememesine ve F-aktin düzeylerinin SEMA7A uygulaması koşullarında birikimine neden olmaktadır. Sonuç olarak, PLXNC1 varlığında SEMA7A Kofilin fosforilasyonuna yol açmakta ve Kofilin inaktivasyonu üzerinden F-aktin birikimine neden olmaktadır (Şekil 5.4 a-b).

## 5.5. Plexin C1 Birlikte İmmün Çöktürme

Plexin C1'in etkileşim partnerlerini bulmak amacıyla Kütle Spektroskopisine gönderilecek örnekler hazırlandı ve Western blot ile kontrol edildi. Plexin C1 aşırı ifadesinin sağlandığı ve sağlanmadığı PLC/PRF/5 hücrelerinden SEMA7A ile

indüksiyonu öncesi ve sonrasında lizat yapıldı. Ardından birlikte immün çöktürme (CO-IP) yöntemi gerçekleştirildi ve Western blotta Plexin C1 antikoruna ile doğrulandı.



Şekil 5.5: PLC/PRF/5 hücrelerinden Plexin C1'in Etkileşim Partnerlerini Bulmak Amacıyla Yapılan Birlikte İmmün Çöktürme (CO-IP). Üç farklı hücre grubu oluşturuldu. Plexin C1'in aşırı ifadesi sağlanmış kontrol grubu (Kontrol OE ) olan birinci gruba herhangi bir madde uygulanmadı sadece lizat yapımından 15 dk önce besiyeri değiştirildi. Boş pcDNA3.1 kontrol plazmiti içeren (pcDNA3.1 ) ikinci gruba da herhangi bir madde uygulanmadı sadece lizat yapımından 15 dk önce besiyeri değiştirildi. Üçüncü grup olan Plexin C1'in aşırı ifadesi sağlanmış hücrelere lizat yapımından 15 dk önce 100 ng/ml SEMA7A'lı besiyeri ile müdahale edildi. Tüm hücre grupları da kendi içlerinde üç grupba ayrıldı. Bunlar input olarak adlandırılan herhangi bir işlem uygulanmayan total protein lizatı, İzotip IgG1 mouse antikoruna ile CO-IP yapılan grup ve PE4 hibridomasından elde edilip saflaştırılan ve konsantre edilen Plexin C1 antikoruna ile CO-IP yapılan grup. Tüm gruplar SDS-PAGE'de yürütüldü, Plexin C1 antikoruna ile western blotlamaya tabi tutuldu.

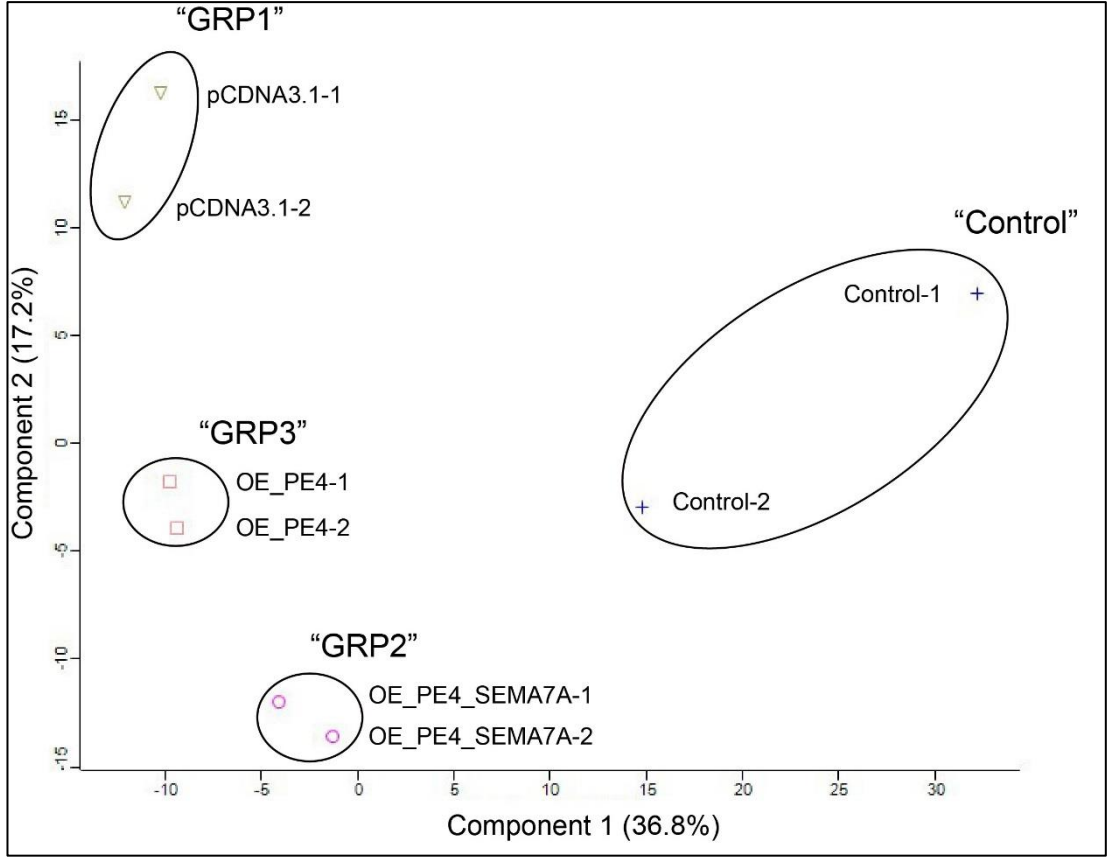
Kontrol OE ve SEMA7A uygulanmış gruplarda Plexin C1 ifadesi net olarak gözlemlenirken pcDNA3.1 Kontrol grubunda diğerlerine göre zayıf bir bant görülmektedir. Bunun nedeni endojen olarak Plexin C1'i çekmesidir. Western blotta

başarılı bir CO-IP sonucu görüldükten sonra örnekler Kütle spektroskopisi analizi için hazırlanıp, analize Warwick Scientific Service (İngiltere) merkezine gönderildi.

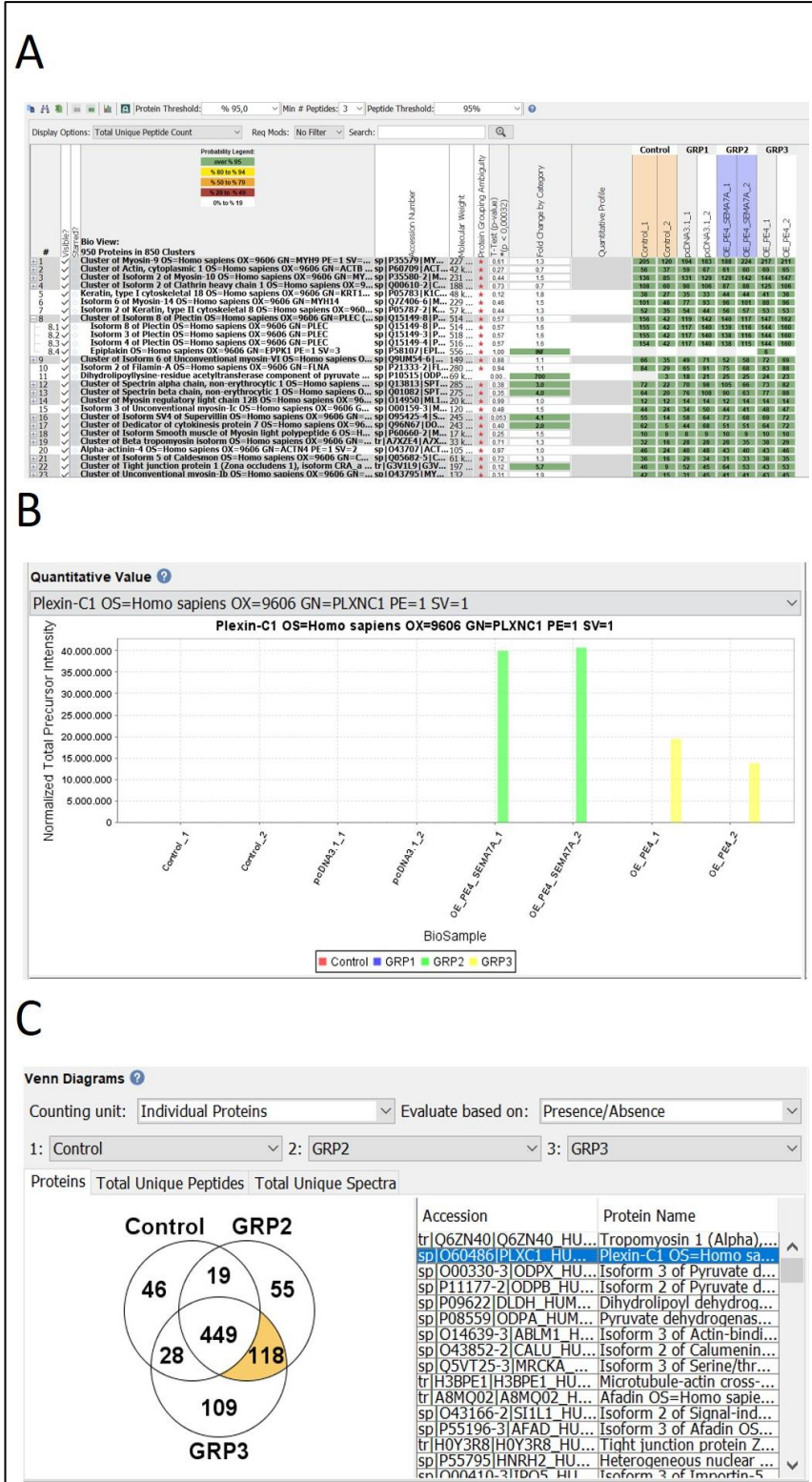
## 5.6. Kütle Spektroskopisi Sonuçları

Analizi yapılan örnekler MSFragger kullanılarak analiz edildi. Protein tanımlaması için kriterleri belirlemek, peptit ve protein tanımlamalarını doğrulamak için Scaffold kullanıldı. Peptid tanımlamaları, Percolator arka hata olasılık hesaplaması ile %95'ten daha yüksek olasılıkla belirlenebiliyorsa kabul edildi [52]. Protein tanımlamaları, %95'ten daha büyük bir olasılıkla kurulabilirse ve en az 3 tanımlanmış peptit içeriyorsa kabul edildi. Protein olasılıkları, Protein Prophet algoritması tarafından belirlendi [53]. Önemli peptit kanıtını paylaşan proteinler, kümeler halinde gruplandırıldı.

Scaffold programı ile analiz sonucunda 850 farklı kümede 950 protein tanımlandı. Bu proteinlerin Plexin C1 ile aynı profil gösterenleri ayırmak için venn diyagramı kullanıldı. Kontrol izotip IgG Mouse olanlar çıkartılmıştır. Programdaki Plexin C1'in grafiğine en çok benzeyen bu ortak kümedeki proteinlerden seçilerek ileriki çalışmalara başlandı.



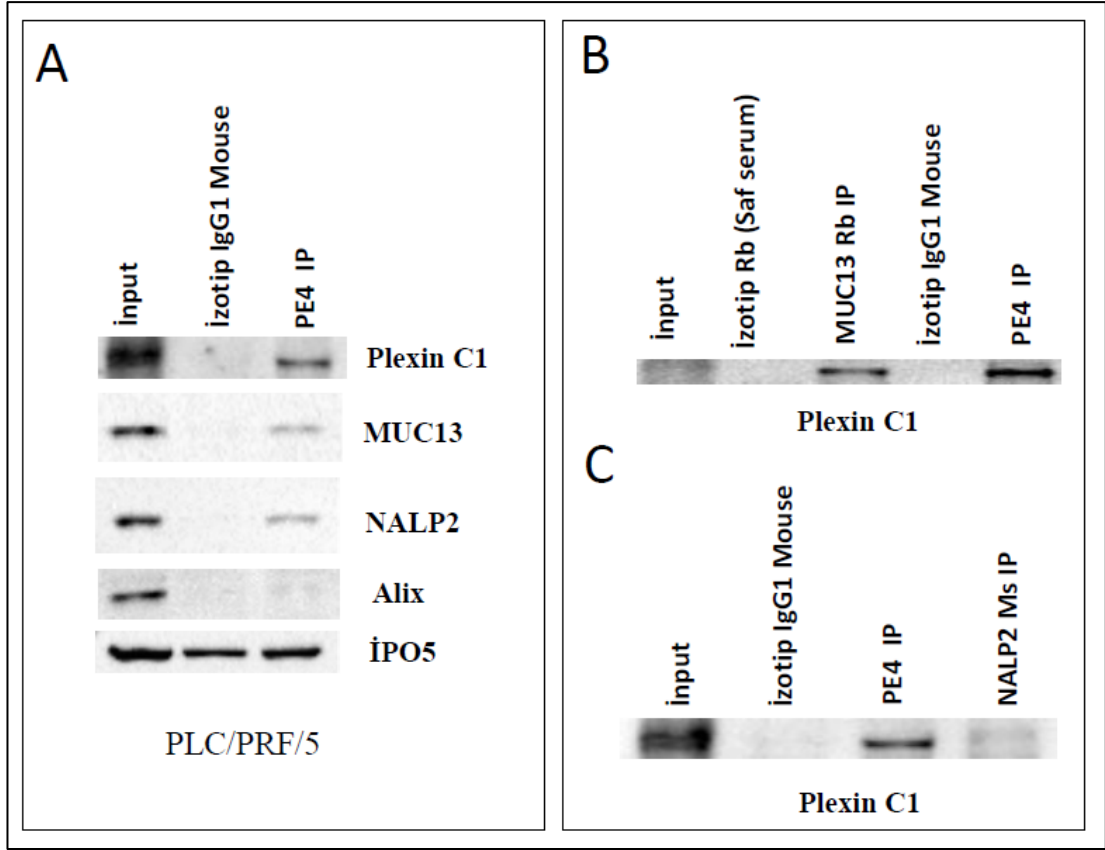
Şekil 5.6: PCA analizi sonuçları. Temel bileşen analizi (PCA), karmaşık biyolojik veri kümelerinden güçlü modelleri ortaya çıkaran bir araçtır. Benzerliklerine göre örnek kümelerini görmek amacıyla PCA grafiği yapıldı. Aykırı değer varsa görmek deney gruplarının birbirinden farkını ortaya çıkartmak, verilerin doğruluğunu tespit etmek için yapıldı. Control grubu izotip IgG1 mouse örnekleri; GRP1 pcDNA3.1 PE4 örnekleri; GRP2 SEMA7A uygulanmış OE PE4 örnekleri, GRP3 Kontrol OE PE4 örnekleri.



Şekil 5.7: Scaffold programı sonuçları. Protein tanımlaması için kriterleri belirlemek, peptit ve protein tanımlamalarını doğrulamak için Scaffold kullanıldı. Scaffold programı ile analiz sonucunda 850 farklı kümede 950 protein tanımlandı (Şekil 5.7 a). Bu proteinlerin Plexin C1 ile aynı profil gösterenleri ayırmak için Venn Diyagramı ve Plexin C1'in grafiği kullanıldı (Şekil 5.7 b / c).

## 5.7. Kütle Spektroskopisi Sonuçlarına Göre Seçilen Proteinlerle Birlikte İmmün Çöktürme

Kütle Spektroskopisi sonucunda analiz edilen proteinlerden grafiksel olarak profili Plexin C1 'e benzeyen birkaç protein aday proteinler olarak seçildi. Bunlardan dördünü; NALP2 (NLR Family Pyrin Domain Containing 2), MUC13 (Mucin 13), Alix (Programmed Cell Death 6 Interacting Protein) ve IPO5 (İmportin 5) deneysel olarak doğrulamak için Plexin C1 antikorunu, kontrol izotipi ve total protein lizatı (input) ile endojen CO-IP yapıldı ve ilgili proteinler western blot yöntemi ile kontrol edildi. NALP2 ve MUC13 için İntput ve Plexin C1 antikorunu ile yapılan CO-IP 'de ilgili proteinler gözükürken izotip kontrolde bant görülmedi. Alix için inputta bant gözükürken, Plexin C1 antikorunu ile yapılan CO-IP 'de ve izotip kontrolde bant görülmedi. IPO5 için İntput, Plexin C1 antikorunu ile yapılan CO-IP ve izotip kontrolde bantlar eşit olarak görüldü. Plexin C1 ile etkileşimini doğruladığımız NALP2 ve MUC13 için yapılan CO-IP'nin tersi yapıldı. Bu amaçla ilgili proteinlerle endojen CO-IP yapıldı MUC13 ve NALP2 antikorununun PlexinC1 proteinini indirdiğini gösterildi.



Şekil 5.8: Plexin C1'in aday etkileşim partnerleri western blot gösterimi. PlexinC1'in etkileşim partnerlerini bulmak amacıyla, kütle spektroskopisinden çıkan sonuçlara göre seçilen iki aday protein endojen CO-IP yapılarak western blot yöntemi ile incelendi. a) İnteraktif olarak adlandırılan herhangi bir işem uygulanmayan total protein lizati, İzotip IgG1 mouse antikoru ile endojen CO-IP yapılan grup ve PE4 hibridomasından elde edilip saflaştırılan ve konsantre edilen Plexin C1 antikoru ile endojen CO-IP yapılan grup. Tüm gruplar SDS-PAGE'de yürütüldü, uygun antikolar ile western blotlamaya tabi tutuldu. b) MUC13 tavşan antikoru ile PlexinC1 de PE4 antikoru ile indirildikten sonra IP çökelti proteinleri membrana yüklendi ve PE4 PlexinC1 antikoru ile problandı. c) NALP2 ve PlexinC1 uygun antikolarla çöktürüldü ve çökelti proteinlerinin transfer edildiği membran PE4 PlexinC1 antikoru ile problandı.

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Plexin C1 hücre yüzey proteinleri olarak keşfedilmiştir [7]. Literatürde melanoma ve akciğer kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmalarda Plexin C1-Semaforin etkileşiminin aktin hücre iskeletini LIMK2'nin ifadesini arttırarak Kofilinin fosforilasyonuna yani inaktivasyonuna neden olduğu buna bağlı olarak inaktive Kofilin aktin depolimerizasyonunu gerçekleştiremediği gözlemlenmiştir [17], [24]. Aktin depolimerizasyonu hücre motilitesi açısından önemlidir. Plexin C1 reseptör proteininin HCC hücrelerinde ifade edildiği ve normal karaciğer dokusuna kıyasla HCC'de ifadesinin anlamlı olarak artmış olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [27], [28]. Ancak Plexin C1'in HCC hücrelerinde aktin dinamiklerine etkisi detaylı olarak incelenmemiştir.

Aktin molekülleri, deterjan ile çözünebilen monomerik formu (G-aktin) ile deterjana dayanıklı ve sitoiskelet yapısına katılmış polimerize formu (F-aktin) arasında dinamik bir denge halindedir. G-aktin, sarmal F-aktin oluşturmak için baştan kuyruğa polimerize olur ve G-aktin ile F-aktin arasındaki denge, LIMK2 dahil olmak üzere aktin ile ilişkili proteinler tarafından düzenlenir [31]. Kısaca, iki aktin formu arasındaki fark, G-aktin çözüdür iken F-aktinin çözünmez olmasıdır. Plexin C1-Semaforin etkileşimi LIMK2'nin fosforilasyonuna yol açar. Aktif LIMK2 Kofilini fosforilliyerek inaktivasyonunu sağlar. İnaktive Kofilin aktin depolimerizasyonunu gerçekleştiremez. Aktin depolimerizasyonu hücre motilitesi açısından önemlidir [31], [49]. Rho, Rac, Cdc42 gibi küçük-GTPaz'lar aktin polimerizasyonu sayesinde hücrenin dışına doğru lamellipodia ve filopodia oluşumlarını sağlayarak hücrenin motilitesini artırır. Ancak, hücredeki aktin havuzu sınırlıdır ve bu mevcut aktin filamentlerinin depolimerize edilerek polimerizasyonda kullanılacak aktin monomerlerini sağlaması gerekir. Bu depolimerizasyon işlemi aktin-bağlı Kofilin proteini tarafından gerçekleştirilir [50], [51].

Bu bilgiler ışığında Şekil 5.4 incelendiğinde: Hep3B hücrelerinde Sema7A varlığında p-Kofilinin (p-Cof) hem PLKO hem de shPLXNC1 klonlarında arttığı görülmektedir. Bu artışın PLXNC1 ifadesinin yüksek olduğu PLKO klonunda daha belirgin olması dikkat çekicidir. Bu anlamda, SEMA7A'nın yol açtığı p-Cof artışının

PLXNC1 ifadesi üzerinden gerçekleştiği yorumu yapılabilir (şekil 5.4A). Benzer bir profil PLC/PRF/5 hücrelerinde de görülmekle birlikte, PLC/PRF/5-shPLXNC1 klonunda PLXNC1 ifadesi Hep3B-shPLXNC1 göre daha fazla baskılandığından dolayı SEMA7A varlığında p-Cof artışının gözlemlenmemesi bir önceki yorumu doğrular niteliktedir (şekil 5.4B). G-aktin F-aktin dinamikleri açısından bakıldığında, p-Cof artışının belirgin olduğu Hep3B-pLKO klonunda F-aktinin SEMA7A uygulandığında arttığı buna karşın, Hep3B-shPLXNC1 klonunda PLXNC1'in azalmış ifadesine rağmen p-Cof artışını engelleyemediği ancak bu ifadenin SEMA7A varlığında F-aktin artışı için yeterli olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır (şekil 5.4 a). PLXNC1 ifadesinin daha fazla baskılandığı PLC/PRF/5-shPLXNC1 klonunda p-Cof düzeyinde SEMA7A'ya bağlı bir artış görülmemekte olup bu da F-aktinin depolimerizasyonuna yani kontrole göre azalmasına neden olmaktadır (şekil 5.4 b). PLC/PRF/5-pLKO hücrelerinde ise SEMA7A'ya bağlı p-Cof artışı görülmekte ve bu da inaktive olan Kofilinin F-aktini depolimerize edememesine ve F-aktin düzeylerinin SEMA7A uygulaması koşullarında birikimine neden olmaktadır. Sonuç olarak, PLXNC1 varlığında SEMA7A Kofilin fosforilasyonuna yol açmakta ve Kofilin inaktivasyonu üzerinden F-aktin birikimine neden olmaktadır (şekil 5.4 a-b). Hep3B-shPLXNC1 ve PLC/PRF/5-shPLXNC1 hücrelerinde azalmış PLXNC1 ifadesi SEMA7A uygulamasına bağlı Kofilin fosforilasyonunu baskılamakta ve böylelikle aktif kalan Kofilin aktin depolimerizasyonuna (azalmış F-aktin düzeyleri) neden olmaktadır. Bu şekilde artan monomerik aktin havuzu aktin polimerizasyonu yoluyla yeni lamellipodia ve filopodia oluşumuna ve buna bağlı olarak artmış hücre motilitesine neden olabilir.

Birçok protein bağımsız olarak işlevlerini yerine getirirken, proteinlerin büyük çoğunluğu uygun biyolojik aktivite için diğer proteinlerle etkileşime girer. Hücre büyümesi, proliferasyonu, morfolojisi, hareketliliği, hücreler arası iletişim ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerin çoğu, çoklu protein komplekslerinin hareketini ve düzenlenmesini içerir. Protein-protein etkileşimleri; hücreler içindeki yapısal, işlevsel organizasyon için moleküler bir temel role sahiptir ve biyoteknolojik uygulamalar ve antikoru bazlı deneyler için önemlidir [54], [55], [56].

Plexin C1'in etkileşim partnerlerinin bulunması sinyal yollarının aydınlatılması, yeni bağlantıların keşfedilmesi ve Plexin C1 biyolojisinin HCC de yerinin ne olduğunun anlaşılması açısından çok değerlidir.

Plexin C1'in etkileşim partnerlerini bulmak amacıyla CO-IP yöntemiyle proteinler çöktürüldü ve Kütle Spektroskopisine gönderildi. Şekil 5.6.1'de görüldüğü gibi PCA analizinde duplike olacak şekilde hazırlanan örnekler birbirlerine yakın doğru deney gruplarına ayrıldı. Grupların birbirinden uzak olması aralarındaki farkı bize göstermektedir. Bu sonuçlar yapılan analizi destekler niteliktedir. Analiz sonucunda elde edilen proteinlerden grafiksel olarak profili Plexin C1 'e benzeyen birkaç protein aday proteinler olarak seçildi. Bu aday proteinlerden MUC13, NALP2, Alix ve IPO5 deneysel olarak doğrulamak için Plexin C1 antikoru, kontrol izotipi ve input ile endojen CO-IP yapıldı ve ilgili proteinler western blot yöntemi ile kontrol edildi. NALP2 ve MUC13 için Input ve Plexin C1 antikoru ile yapılan CO-IP 'de ilgili proteinler gözlemlenirken izotip kontrolde bant görülmedi. Alix için inputta bant gözükürken, Plexin C1 antikoru ile yapılan CO-IP 'de ve izotip kontrolde bant görülmedi. IPO5 için Input, Plexin C1 antikoru ile yapılan CO-IP ve izotip kontrolde bantlar eşit olarak gözlemlendi (Şekil 5.8 a). Sonuç pozitif olarak değerlendirilebilir olan NALP2 ve MUC13 için yapılan CO-IP'nin tersi yapıldı. Bu amaçla ilgili proteinlerle endojen CO-IP yapıldı. Endojen CO-IP'lerinde Plexin C1 antikoru ile kontrol edildiğinde tekrar edilen westernler sonucu MUC13'teki bant NALP2'ye göre biraz daha net olarak gözlemlendi (Şekil 5.8 b-c).

Epitelyal yüzeyler, mukus ile kaplanır ve korunur; bunun ana glikoprotein bileşenleri, büyük karbonhidrat bakımından zengin glikoproteinler olan Müsinlerdir [57]. Müsin 13, gastrointestinal ve solunum yollarındaki epitel hücrelerinin apikal yüzeylerinin korunmasında, yağlanmasında ve hidrasyonunda önemli bir rol oynayan müsin ailesinden bir glikoproteindir. Transmembran müsin olarak MUC13, fosforilasyon potansiyeline sahip sekiz serin ve iki tirozin kalıntısı içeren kısa bir sitoplazmik kuyruğa sahiptir [58]. HCC hücrelerinde yüksek oranda MUC13'ün ifade edildiği yapılan RNA dizilimi analizleri ile bilinmektedir [59], [60]. Literatürde MUC13'ün çıplak farelerde hücre büyümesini, koloni oluşumunu, hücre göçünü ve tümör oluşumunu teşvik ederek güçlü onkojenik aktiviteye sahip olduğunu gösterilmiştir [61].

Bu bilgiler ışığında, HCC de hem Plexin C1 'in hem de MUC13'ün yüksek ifadesi ve bulgularımız ışığında birbirleriyle olan etkileşimlerinin patofizyolojik anlamlılığının ortaya konması daha ileri çalışmalara muhtaç gözükmektedir.

İnflamazom, genellikle kaspaz 1, PYCARD (PYD ve CARD alanı içeren protein), NALP (NACHT, LRP ve PYD alanı içeren protein) ve diğer bazı bileşenlerden oluşan bir multiprotein oligomeridir. NALP'ler, 14 üye (NALP1-NALP14) dahil olmak üzere pirin içeren proteinlerin en büyük ailesini oluşturur ve inflamazomların bileşenleridir [62]. NALP proteinleri, bir N-terminal pirin alanı (PYD) ile karakterize edilir ve kaspaz-1'in Toll benzeri reseptörler tarafından aktivasyonunda rol oynar. Ayrıca proinflamatuvar kaspazları aktive eden protein kompleksleri ile de ilişkili olabilirler [63]. NALP2, tümör nekroz faktörü a (TNF-a) ve interleükin-1b (IL-1b) dahil olmak üzere çeşitli proinflamatuvar uyaranlar tarafından indüklenen NF-κB aktivasyonu üzerinde inhibe edici bir etki gösterir. Yapısal olarak, NALP2 proteini bir PYRIN, NACHT, NAD ve 12 LRR içerir [63]. NALP2'nin, PYRIN alanı yoluyla NF-κB indüksiyonunu inhibe ettiği literatürde gösterilmiştir [64]. NF-κB aracılı transkripsiyonun, kanser, AIDS ve enflamatuvar bozukluklar dahil olmak üzere bir dizi hastalıkta yer aldığı bilinmektedir [65], [66]. NF-κB'nin neredeyse tüm insanlardaki kanser hücrelerinde yapısal olarak aktif olduğu belirlenmiştir [67], [68]. NF-κB'nin apoptozun düzenlenmesi, hücre döngüsü, hücre çoğalması ve farklılaşması ve hücre göçü dahil olmak üzere karsinogenezde yer aldığı bilinmektedir [69]. Ek olarak, NF-κB'nin fonksiyonel inaktivasyonunun, birçok tümör hücresi tipinde apoptozu indüklediği ve onkojenisiteyi antagonize ettiği bildirilmiştir [70].

Bu anlamda, kanserde çeşitli yollarda etkinliği hala araştırma konusu olan NALP2 ve Plexin C1'in etkileşim halinde olmasının en azından hepatokarsinogenez açısından değerlendirilmesinin önemli olduğunu düşünüyoruz.

Plexin C1 ile etkileşimlerini doğruladığımız NALP2 ve MUC13 için yapılan CO-IP'nin tersi yapıldı. Bu amaçla ilgili proteinlerle endojen CO-IP yapıldı ve tekrar aynı sonuç elde edildi. Çalışma sonucunda elde edilen proteinlerin işlevselliği ve diğer etkileşim partnerlerinin CO-IP çalışmalarıyla valide edilmesi önümüzdeki dönemin hedefleri arasındadır.

Bu tez çalışmasındaki bulgular Plexin C1 tarafından düzenlenen EMT, sitoskelet modellenmesi ve çoklu-kinaz inhibitörlerine yanıtın olası düzenleyici moleküllerinin tanımlanmasında yol gösterici olacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] Forner A., Reig M., Bruix J., (2018), "Hepatocellular carcinoma", *Lancet*, 391 (10127), 1301-1314.
- [2] Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F., (2021), "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries", *CA Cancer J Clin*, 71 (3), 209-249.
- [3] Bhosale P., Szklaruk J., Silverman P. M., (2006), "Current staging of hepatocellular carcinoma: imaging implications", *Cancer Imaging*, 6 (1), 83-94.
- [4] Huang Z., Xia H., Cui Y., Yam J. W. P., Xu Y., (2023), "Ferroptosis: From Basic Research to Clinical Therapeutics in Hepatocellular Carcinoma", *J Clin Transl Hepatol*, 11 (1), 207-218.
- [5] Du G., Yang R., Qiu J., Xia J., (2023), "Multifaceted Influence of Histone Deacetylases on DNA Damage Repair: Implications for Hepatocellular Carcinoma", *J Clin Transl Hepatol*, 11 (1), 231-243.
- [6] Yuan J., Lv T., Yang J., Wu Z., Yan L., Yang J., Shi Y., (2022), "HDLBP-stabilized IncFAL inhibits ferroptosis vulnerability by diminishing Trim69-dependent FSP1 degradation in hepatocellular carcinoma", *Redox Biol*, 58, 102546.
- [7] Ohta K., Mizutani A., Kawakami A., Murakami Y., Kasuya Y., Takagi S., Tanaka H., Fujisawa H., (1995), "Plexin: a novel neuronal cell surface molecule that mediates cell adhesion via a homophilic binding mechanism in the presence of calcium ions", *Neuron*, 14 (6), 1189-1199.
- [8] Gurrapu S., Tamagnone L., (2016), "Transmembrane semaphorins: Multimodal signaling cues in development and cancer", *Cell Adh Migr*, 10 (6), 675-691.
- [9] Tamagnone L., Artigiani S., Chen H., He Z., Ming G.-l., Song H.-j., Chedotal A., Winberg M. L., Goodman C. S., Poo M.-m., Tessier-Lavigne M., Comoglio P. M., (1999), "Plexins Are a Large Family of Receptors for Transmembrane, Secreted, and GPI-Anchored Semaphorins in Vertebrates", *Cell*, 99 (1), 71-80.
- [10] Damo E., Simonetti M., (2022), "Axon Guidance Molecules and Pain", *Cells*, 11 (19).
- [11] Kumanogoh A., (2015), "Semaphorins : A Diversity of Emerging Physiological and Pathological Activities", 1st Edition, Springer.

- [12] Li J., Hu K., He D., Zhou L., Wang Z., Tao Y., (2020), "Prognostic Value of PLXND1 and TGF- $\beta$ 1 Coexpression and Its Correlation With Immune Infiltrates in Hepatocellular Carcinoma", *Front Oncol*, 10, 604131.
- [13] Browne K., Wang W., Liu R. Q., Piva M., O'Connor T. P., (2012), "Transmembrane semaphorin5B is proteolytically processed into a repulsive neural guidance cue", *J Neurochem*, 123 (1), 135-146.
- [14] Rutherford T. R., Elder A. M., Lyons T. R., (2021), "Anoikis resistance in mammary epithelial cells is mediated by semaphorin 7a", *Cell Death Dis*, 12 (10), 872.
- [15] Wang L., Song Y., Yi X., Wu C., Guo Q., Zhou X., Song D., Zhang L., Huang D., (2022), "Semaphorin 7A Accelerates the Inflammatory Osteolysis of Periapical Lesions", *J Endod*, 48 (5), 641-649.e642.
- [16] Song Y., Wang L., Li J., Yang F., Gao Y., Song D., Sun J., Ye L., Zhang L., Huang D., (2021), "The Expression of Semaphorin 7A in Human Periapical Lesions", *J Endod*, 47 (10), 1631-1639.
- [17] Zhang M., Wang H., Jin F., (2017), "The role of semaphorin 7A and its receptor plexin C1 in the migration of NSCLC cells", *RSC Advances*, 7 (89), 56280-56288.
- [18] Song Y., Wang L., Zhang L., Huang D., (2021), "The involvement of semaphorin 7A in tumorigenic and immunoinflammatory regulation", *J Cell Physiol*, 236 (9), 6235-6248.
- [19] Comeau M. R., Johnson R., DuBose R. F., Petersen M., Gearing P., VandenBos T., Park L., Farrah T., Buller R. M., Cohen J. I., Strockbine L. D., Rauch C., Spriggs M. K., (1998), "A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR", *Immunity*, 8 (4), 473-482.
- [20] Walzer T., Galibert L., Comeau M. R., De Smedt T., (2005), "Plexin C1 engagement on mouse dendritic cells by viral semaphorin A39R induces actin cytoskeleton rearrangement and inhibits integrin-mediated adhesion and chemokine-induced migration", *J Immunol*, 174 (1), 51-59.
- [21] Pasterkamp R. J., Peschon J. J., Spriggs M. K., Kolodkin A. L., (2003), "Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs", *Nature*, 424 (6947), 398-405.
- [22] Suzuki K., Okuno T., Yamamoto M., Pasterkamp R. J., Takegahara N., Takamatsu H., Kitao T., Takagi J., Rennert P. D., Kolodkin A. L., Kumanogoh A., Kikutani H., (2007), "Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated

inflammatory responses through alpha1beta1 integrin", *Nature*, 446 (7136), 680-684.

- [23] Peng X., Moore M., Mathur A., Zhou Y., Sun H., Gan Y., Herazo-Maya J. D., Kaminski N., Hu X., Pan H., Ryu C., Osafo-Addo A., Homer R. J., Feghali-Bostwick C., Fares W. H., Gulati M., Hu B., Lee C. G., Elias J. A., Herzog E. L., (2016), "Plexin C1 deficiency permits synaptotagmin 7-mediated macrophage migration and enhances mammalian lung fibrosis", *Faseb j*, 30 (12), 4056-4070.
- [24] Scott G. A., McClelland L. A., Fricke A. F., Fender A., (2009), "Plexin C1, A Receptor for Semaphorin 7A, Inactivates Cofilin and Is a Potential Tumor Suppressor for Melanoma Progression", *Journal of Investigative Dermatology*, 129 (4), 954-963.
- [25] Chen Y., Soong J., Mohanty S., Xu L., Scott G., (2013), "The neural guidance receptor Plexin C1 delays melanoma progression", *Oncogene*, 32 (41), 4941-4949.
- [26] Chen J., Liu H., Chen J., Sun B., Wu J., Du C., (2020), "PLXNC1 Enhances Carcinogenesis Through Transcriptional Activation of IL6ST in Gastric Cancer", *Frontiers in Oncology*, 10:33.
- [27] NazimTurhal S., Dogan M., Esendagli G., Artac M., Korkmaz L., Coskun H. S., Goker E., PerranYumuk F., Bilgetekin I., Kose F., Uncu D., Kavgaci H., Akyol G., Ozet A., Yagci T., (2022), "The Relationship Between Plexin C1 Overexpression and Survival in Hepatocellular Carcinoma: a Turkish Oncology Group (TOG) Study", *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 53 (2), 356-362.
- [28] Odabas G., Cetin M., Turhal S., Baloglu H., Sayan A. E., Yagci T., (2018), "Plexin C1 Marks Liver Cancer Cells with Epithelial Phenotype and Is Overexpressed in Hepatocellular Carcinoma", *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 4040787.
- [29] Walzer T., Galibert L., Comeau M. R., De Smedt T., (2005), "Plexin C1 engagement on mouse dendritic cells by viral semaphorin A39R induces actin cytoskeleton rearrangement and inhibits integrin-mediated adhesion and chemokine-induced migration", *J Immunol*, 174 (1), 51-59.
- [30] Hohmann T., Dehghani F., (2019), "The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork", *Cells*, 8 (4).
- [31] Hsu, F. F., Lin, T. Y., Chen, J. Y., & Shieh, S. Y. 2010. "p53-Mediated transactivation of LIMK2b links actin dynamics to cell cycle checkpoint control". *Oncogene*, 29(19), 2864–2876.

- [32] Scott R. W., Olson M. F., (2007), "LIM kinases: function, regulation and association with human disease", *J Mol Med (Berl)*, 85 (6), 555-568.
- [33] Manetti F., (2012), "LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators", *Medicinal Research Reviews*, 32 (5), 968-998.
- [34] Prunier C., Prudent R., Kapur R., Sadoul K., Lafanechère L., (2017), "LIM kinases: cofilin and beyond", *Oncotarget*, 8 (25), 41749-41763.
- [35] Bernstein B. W., Bamburg J. R., (2010), "ADF/cofilin: a functional node in cell biology", *Trends Cell Biol*, 20 (4), 187-195.
- [36] Burkhardt J. K., Carrizosa E., Shaffer M. H., (2008), "The actin cytoskeleton in T cell activation", *Annu Rev Immunol*, 26, 233-259.
- [37] Bernard O., (2007), "Lim kinases, regulators of actin dynamics", *Int J Biochem Cell Biol*, 39 (6), 1071-1076.
- [38] Huang T. Y., DerMardirossian C., Bokoch G. M., (2006), "Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics", *Curr Opin Cell Biol*, 18 (1), 26-31.
- [39] Schwartz M., (2004), "Rho signalling at a glance", *J Cell Sci*, 117 (Pt 23), 5457-5458.
- [40] Cymer F., Schneider D., (2010), "Transmembrane helix-helix interactions involved in ErbB receptor signaling", *Cell Adh Migr*, 4 (2), 299-312.
- [41] Braun R., Engelman D. M., Schulten K., (2004), "Molecular Dynamics Simulations of Micelle Formation around Dimeric Glycophorin A Transmembrane Helices", *Biophys J*, 87 (2), 754-763.
- [42] Aci-Sèche S., Sawma P., Hubert P., Sturgis J. N., Bagnard D., Jacob L., Genest M., Garnier N., (2014), "Transmembrane recognition of the semaphorin co-receptors neuropilin 1 and plexin A1: coarse-grained simulations", *PLoS One*, 9 (5), e97779.
- [43] Hota P. K., Buck M., (2009), "Thermodynamic characterization of two homologous protein complexes: associations of the semaphorin receptor plexin-B1 RhoGTPase binding domain with Rnd1 and active Rac1", *Protein Sci*, 18 (5), 1060-1071.
- [44] Tong Y., Chugha P., Hota P. K., Alviani R. S., Li M., Tempel W., Shen L., Park H. W., Buck M., (2007), "Binding of Rac1, Rnd1, and RhoD to a novel Rho GTPase interaction motif destabilizes dimerization of the plexin-B1 effector domain", *J Biol Chem*, 282 (51), 37215-37224.

- [45] Tong Y., Hota P. K., Penachioni J. Y., Hamaneh M. B., Kim S., Alviani R. S., Shen L., He H., Tempel W., Tamagnone L., Park H. W., Buck M., (2009), "Structure and function of the intracellular region of the plexin-b1 transmembrane receptor", *J Biol Chem*, 284 (51), 35962-35972.
- [46] Hu P., Luo B. H., (2013), "Integrin bi-directional signaling across the plasma membrane", *J Cell Physiol*, 228 (2), 306-312.
- [47] Zhang L., Polyansky A., Buck M., (2015), "Modeling transmembrane domain dimers/trimers of plexin receptors: implications for mechanisms of signal transmission across the membrane", *PLoS One*, 10 (4), e0121513.
- [48] Xu M., Wang F., Li G., Wang X., Fang X., Jin H., Chen Z., Zhang J., Fu L., (2019), "MED12 exerts an emerging role in actin-mediated cytokinesis via LIMK2/cofilin pathway in NSCLC", *Mol Cancer*, 18 (1), 93.
- [49] Kuhn T. B., Meberg P. J., Brown M. D., Bernstein B. W., Minamide L. S., Jensen J. R., Okada K., Soda E. A., Bamberg J. R., (2000), "Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases", *J Neurobiol*, 44 (2), 126-144.
- [50] Vardouli L., Moustakas A., Stournaras C., (2005), "LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta", *J Biol Chem*, 280 (12), 11448-11457.
- [51] Blanchoin L., Boujemaa-Paterski R., Sykes C., Plastino J., (2014), "Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility", *Physiol Rev*, 94 (1), 235-263.
- [52] Käll L., Storey J. D., Noble W. S., (2008), "Non-parametric estimation of posterior error probabilities associated with peptides identified by tandem mass spectrometry", *Bioinformatics*, 24 (16), i42-i48.
- [53] Nesvizhskii A. I., Keller A., Kolker E., Aebersold R., (2003), "A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry", *Anal Chem*, 75 (17), 4646-4658.
- [54] Trinkle-Mulcahy L., Boulon S., Lam Y. W., Urcia R., Boisvert F. M., Vandermoere F., Morrice N. A., Swift S., Rothbauer U., Leonhardt H., Lamond A., (2008), "Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes", *J Cell Biol*, 183 (2), 223-239.
- [55] Wienken C. J., Baaske P., Rothbauer U., Braun D., Duhr S., (2010), "Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis", *Nature Communications*, 1 (1), 100.

- [56] Van Gassen G., Annaert W., Van Broeckhoven C., (2000), "Binding partners of Alzheimer's disease proteins: are they physiologically relevant?", *Neurobiol Dis*, 7 (3), 135-151.
- [57] Byrd J. C., Bresalier R. S., (2004), "Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer", *Cancer Metastasis Rev*, 23 (1-2), 77-99.
- [58] Williams S. J., Wreschner D. H., Tran M., Eyre H. J., Sutherland G. R., McGuckin M. A., (2001), "Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells", *J Biol Chem*, 276 (21), 18327-18336.
- [59] *Chen L., Li Y., Lin C. H., Chan T. H., Chow R. K., Song Y., Liu M., Yuan Y. F., Fu L., Kong K. L., Qi L., Li Y., Zhang N., Tong A. H., Kwong D. L., Man K., Lo C. M., Lok S., Tenen D. G., Guan X. Y., (2013), "Recoding RNA editing of AZIN1 predisposes to hepatocellular carcinoma", *Nat Med*, 19 (2), 209-216.*
- [60] Song Y., Pan G., Chen L., Ma S., Zeng T., Man Chan T. H., Li L., Lian Q., Chow R., Cai X., Li Y., Li Y., Liu M., Li Y., Zhu Y., Wong N., Yuan Y. F., Pei D., Guan X. Y., (2015), "Loss of ATOH8 Increases Stem Cell Features of Hepatocellular Carcinoma Cells", *Gastroenterology*, 149 (4), 1068-1081.e1065.
- [61] Dai Y., Liu L., Zeng T., Liang J. Z., Song Y., Chen K., Li Y., Chen L., Zhu Y. H., Li J., Li Y., Xie D., Yuan Y. F., Guan X. Y., (2018), "Overexpression of MUC13, a Poor Prognostic Predictor, Promotes Cell Growth by Activating Wnt Signaling in Hepatocellular Carcinoma", *Am J Pathol*, 188 (2), 378-391.
- [62] Church L. D., Cook G. P., McDermott M. F., (2008), "Primer: inflammasomes and interleukin 1 $\beta$  in inflammatory disorders", *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 4 (1), 34-42.
- [63] Tschopp J., Martinon F., Burns K., (2003), "NALPs: a novel protein family involved in inflammation", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4 (2), 95-104.
- [64] Bruey J. M., Bruey-Sedano N., Newman R., Chandler S., Stehlik C., Reed J. C., (2004), "PAN1/NALP2/PYPAF2, an inducible inflammatory mediator that regulates NF-kappaB and caspase-1 activation in macrophages", *J Biol Chem*, 279 (50), 51897-51907.
- [65] Grenier J. M., Wang L., Manji G. A., Huang W.-J., Al-Garawi A., Kelly R., Carlson A., Merriam S., Lora J. M., Briskin M., DiStefano P. S., Bertin J., (2002), "Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF- $\kappa$ B and caspase-1", *FEBS Letters*, 530 (1), 73-78.
- [66] Maeda S., Omata M., (2008), "Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation", *Cancer Sci*, 99 (5), 836-842.

- [67] Biswas D. K., Shi Q., Baily S., Strickland I., Ghosh S., Pardee A. B., Iglehart J. D., (2004), "NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (27), 10137-10142.
- [68] Bueso-Ramos C. E., Rocha F. C., Shishodia S., Medeiros L. J., Kantarjian H. M., Vadhan-Raj S., Estrov Z., Smith T. L., Nguyen M. H., Aggarwal B. B., (2004), "Expression of constitutively active nuclear-kappa B RelA transcription factor in blasts of acute myeloid leukemia", *Hum Pathol*, 35 (2), 246-253.
- [69] Baldwin A. S., (2001), "Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB", *J Clin Invest*, 107 (3), 241-246.
- [70] Wu G.-Q., Liao Y.-J., Qin Z.-Q., He L.-R., Chen Y.-C., Zeng Y.-X., Kung H.-F., Xie D., (2010), "PYRIN domain of NALP2 inhibits cell proliferation and tumor growth of human glioblastoma", *Plasmid*, 64 (1), 41-50.

## ÖZGEÇMİŞ

Melike Binnur BAHÇEKAPILI, lisans eğitimini Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde 2019 yılında tamamladı. Aynı yıl Prof. Dr. Tamer Yağcı danışmanlığında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitimi boyunca farklı projelerde proje bursiyeri olarak çalıştı.

## EKLER

### EK A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Bahçekapılı B. M., Şeker M., Dik Ş., Odabaş G., Çetin M., Yağcı T., (2022), "Hepatoselüler Karsinomada Plexin C1'in Etkileşim Partnerlerinin Belirlenmesi", 6. GTÜ Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Kocaeli, Türkiye, 1-2 Haziran.

### EK B: Şekil Kullanım İzinleri

Tablo B1.1: Kullanılan şekiller için alınan izinler.

Şekil Numarası	Lisans Tarihi	Lisans Numarası	Hak Sahibi
Şekil 2.1	26.01.2023	5476411083690	Wiley
Şekil 2.3	26.01.2023	1316161	Company of Biologists