

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PLEXIN C1'İN HEPATOKARSİNOGENEZDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

GÖRKEM ODABAŞ
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2021

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PLEXIN C1'İN HEPATOKARSİNOGENEZDEKİ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

GÖRKEM ODABAŞ
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2021

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

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF PLEXIN C1 ON
HEPATOCARCINOGENESIS**

GÖRKEM ODABAŞ
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2021



DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/05/2021 tarih ve 2021/22 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 02/06/2021 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Görkem Odabaş'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Uygar Halis TAZEBAZ

ÜYE

: Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Prof. Dr. Ayşe ÖZER

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TOKÇAER KESKİN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararı.

İMZA / MÜHÜR

ÖZET

Hepatoselüler karsinom (HCC) karaciğer kanserinin en sık görülen alt tipi olup, dünya çapında kansere bağlı ölümler arasında 3. sıradadır. İlk olarak sinir sisteminde özellikle akson-klavuzluğunu sağlayan bir molekül olarak keşfedilen Plexin C1'in henüz HCC gelişimindeki rolleri araştırılmamıştır.

In silico taramalar sonucunda *PLXNC1* transkript seviyesinin normal karaciğer dokusuna kıyasla HCC'de daha yüksek seviyede ifadelendiğini tespit ettik. Ayrıca, Plexin C1'in epitel fenotipli HCC hücre hatlarında mezenkim karakterli olanlara göre daha yüksek seviyede ifade edildiğini gözlemledik. RT-qPCR analizleri ile *PLXNC1*'in epitel fenotipli hücrelerde çok daha yüksek seviyelerde ifade edildiğini doğruladık.

Plexin C1'e özgül bir monoklonal antikorun (PE4) üretimi hibridoma teknolojisi ile gerçekleştirildi ve spesifikliğı western blotlama, immünfloresan görüntüleme ve immün-çöktürme deneyleri ile kanıtlandı. HCC hücre hatlarında gerçekleştirilen western blotlama çalışması ile epitel fenotipli hücrelerde mezenkim karakterli olanlara göre çok daha yüksek seviyede Plexin C1 proteini ifade edildiğı ortaya konuldu. Ticari doku mikrodizinlerinde PE4 antikoruna ile gerçekleştirilen immünhistokimya çalışması ile Plexin C1 proteininin HCC dokularında normal eşlenik tümörsüz bölgelere kıyasla çok yüksek seviyede ifade edildiğı fakat ileri evre HCC vakarında ifadesinin azaldığı görüldü.

PLXNC1'in baskılandığı HCC hücre hatlarında epitel belirteçlerin azalıp mezenkim belirteçlerin arttığı western blotlama ve akım sitometresi ile gösterildi. Ayrıca devam eden fonksiyonel testler ile Plexin C1'in hücre proliferasyonunu ve doxorubisine dirençliliğı teşvik ettiği anlaşıldı.

Plexin C1'in HCC'de epitel bir belirteç olduğu ve EMT'yi negatif yönde düzenlediğı düşünüldüğünde, HCC'de ilaç uygulamalarının Plexin C1 zemininde değerlendirildiğı gelecek çalışmaların HCC'nin klinik yönetimine ışık tutması beklenmektedir.

Bu tez çalışması TÜBİTAK SBAG 119S412 projesi ve Türk Onkoloji Grubu Derneğinin TOG_2014-1 nolu yardımı ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Plexin C1, Hepatosellüler Karsinoma, Epitel-Mezenkim Geçiş (EMG), Hibridoma teknolojisi, Monoklonal Antikor, İmmünhistokimya

SUMMARY

Hepatocellular Carcinoma (HCC) is the most common type of liver cancers and is the third deathliest cancer among other types. PlexinC1, initially discovered in nervous system as an axon-guidance molecule, has not been investigated in hepatocarcinogenesis.

Insilico analyses showed PLXNC1 transcripts were much higher in HCC when compared to normal liver tissues. Additionally, higher PLXNC1 levels were observed in epithelial HCC cells compared to mesenchymal ones. These observations were confirmed with RTqPCR assays carried on HCC cells.

Anti-Plexin C1 monoclonal antibody was generated with hybridoma technology and specificity was assessed by western blotting, immunofluorescence and immunoprecipitation assays. Western blotting carried out with HCC cells indicated that PlexinC1 protein was abundant in cells with epithelial phenotype while its expression was restricted in cells with mesenchymal characteristics. Immunohistochemical studies were carried out on tissue microarrays using PE4 and found that PlexinC1 was overexpressed in HCC tumors when compared to normal adjacent tissues and that its expression was inversely correlated with the tumor grade.

Western blotting and flow cytometry analyses showed that epithelial markers were decreased while mesenchymal markers were upregulated in *PLXNC1* knocked-down HCC clones. Functional tests in these clones confirmed that Plexin C1 supports both the proliferation and doxorubicin resistance.

Because PlexinC1 acts as an epithelial marker and that it negatively regulates EMT, drug efficacy studies in HCC to be carried out on PlexinC1 background can shed light on clinical management of this cancer.

This thesis is supported by TUBITAK SBAG 119S412 and Turkish Association of Oncology Group [TOG_2014-1].

Key Words: Plexin C1, Hepatocellular Carcinoma, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, Hybridoma Technology, Monoclonal Antibody, Immunohistochemistry

TEŞEKKÜR

Gebze Teknik Üniversitesinde başladığım yüksek lisans eğitimimde beni laboratuvarına kabul ederek doktora eğitimim sonuna kadar akademik kariyerimi destekleyen, tüm laboratuvar çalışmalarım da danışmanlığından faydalandığım ve özellikle hibridoma teknolojisi konusundaki tecrübelerini benimle paylaşmış olan sayın Prof. Dr. Tamer Yağcı'ya ilk teşekkürümü sunmak isterim. Tez çalışmalarım boyunca verdikleri destek sebebiyle tez izleme üyelerim Prof. Dr. Uygur Halis Tazebay ile Prof. Dr. Ayşe Özer'e ve sunumdaki diğer jürilerim Prof. Dr. Ayten Kandilci ve Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Tokcaer Keskin'e katkıları için teşekkür ederim. Ayrıca sadece deneysel işbirliği ile değil kariyer tavsiyeleri sebebiyle de Doç. Dr. A. Emre Sayan'a teşekkür etmek isterim. Tez çalışmalarımızdaki katkıları sebebiyle Anadolu Sağlık Merkezi patoloji biriminden Prof. Dr. Hüseyin Baloğlu'na da teşekkürlerimi sunmak isterim.

Yine yüksek lisans ve doktora süreçlerimde aynı laboratuvarı paylaşmakla birlikte sadece birer çalışma arkadaşı olmaktan da öte olan Dr. Pelin Balçık Erçin, Dr. Metin Çetin, Dr. İrem Yalın Camcı ve Arzu Aysan'ın hayatım boyunca bende yeri olacaktır.

Ayrıca laboratuvarımızda stajyer, yüksek lisans öğrencisi veya doktora öğrencisi olarak çeşitli dönemlerde beraber çalışma fırsatı bulduğumuz Serhat Akın, Esmâ Erciyas ve Nazlı Salık'a, yakın dönemde halen beraber çalışıyor olduğumuz Şule Erdemir, Maide Şeker, Melike Binnur Bahçekapılı, Şevval Dik ve Gamze Güngör Topçu ile çalışmalarımızdaki en büyük yardımcılardan veteriner teknikeri Leyla Dikmedaş'a teşekkür ederim. Onlar ile aynı ortamda çalışıyor olmak büyük bir zevkti.

Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümüne başladığım andan itibaren bu ailenin bir parçası olduğumu hissettiren Dr. Merve Tuzlakoglu Öztürk, Dr. Hüseyin Balcı, Dr. Hülya Akdemir, Dr. Zeynep Girgin Ersoy, Dr. Tuba Korkmaz, Dr. Öğretim Üyesi Tuğrul Doruk ve Dr. Öğretim Üyesi Mine Gül Şeker başta olmak üzere tüm moleküler biyoloji çalışan ve araştırmacılarına teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak beni dünyaya getiren ve hayatım boyu beni her manada desteklemiş olan annem Huri Odabaş ve babam Osman Gürsel Odabaş en büyük teşekkürü hak etmektedir. Tabiki, kalbimin yarısını paylaştığım can Ezom'un desteği ise sözlerle ifade edilemez.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1. Hepatoselüler Karsinoma	2
2.2. EMT	3
2.3. Semaforin ve Plexin Aileleri	5
2.3.1. Plexin C1'in Keşfedilme Süreci ve Ligandları	7
2.3.2. Plexin C1 Hücresel Fonksiyonları ve Sinyal İletisi	7
2.3.3. Plexin C1-Kanser İlişkisi	9
3. GEREÇLER	11
3.1. Genel Kimyasallar	11
3.2. Cihazlar	11
3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Malzemeler	12
3.4. Hücre Hatları ve Besiyerleri	12
3.5. Çözelti ve Tamponlar	12
3.6. Bakteriler ve Besiyerleri	14
3.7. Vektörler ve Primerler	14
3.8. Antikorlar, Boyalar, İlaçlar	15
3.9. Kitler	15
4. YÖNTEMLER	16

4.1. Hücre Hatlarının Kültürü	16
4.2. Transformasyon ve Plazmitlerin Çoğaltılması	16
4.3. Plexin C1 İfadesinin In Silico Analizi	17
4.4. Monoklonal Antikor Üretimi	17
4.4.1. Rekombinant Protein Üretimi	17
4.4.2. İmmünizasyon Çalışmaları	18
4.4.3. Füzyon Süreci ve Hibridoma Klonlarının Geliştirilmesi	18
4.4.4. Monoklonal Antikorların Saflaştırılması	19
4.5. Plexin C1 Hücre Klonlarının Oluşturulması	20
4.5.1. Viral Partikül Üretilmesi	20
4.5.2. Plexin C1 İfadesi Baskılanmış ve Kontrol Klonlarının Geliştirilmesi	20
4.6. Hücre Klonlarında Gen İfadesi Analizleri	21
4.6.1. RNA İzolasyonu	21
4.6.2. cDNA Sentezi	21
4.6.3. RT-qPCR ile Gen İfadesi Analizi	22
4.7. Monoklonal Antikorların Validasyonu	23
4.7.1. Western Blotlama	23
4.7.2. İmmün-Çöktürme	24
4.7.3. İmmunfloresan Görüntüleme	24
4.8. Plexin C1 Protein İfadesinin HCC Doku Mikrodizinlerinde Analizi	25
4.9. Hücre Klonlarında Fonksiyonel Analizler	26
4.9.1. EMT Belirteçlerinin Moleküler Düzeyde Analizi	26
4.9.2. Hücre Proliferasyonu Analizi	26
4.9.3. Apoptoz ve Anoikise Direncin Belirlenmesi	26
4.9.4. Kök Hücre Fenotipi ile İlişkili Proteinlerin İfade Analizi	27
4.10. İstatistiksel Analizler	27
5. BULGULAR	28
5.1. HCC’de Plexin C1 Transkript Seviyesinin Analizi	28
5.2. ShPlxnC1 ve Plko.1 Klonlarının Geliştirilmesi	30
5.3. PLEXIN C1 Proteinine Özgül Monoklonal Antikor Geliştirilmesi	30
5.3.1. Rekombinant Protein Üretimi, Farelerin Bağışıklanması ve Hibridoma Hücrelerinin Oluşturulması	30

5.3.2. Anti-Plexin C1 PE4 Antikorumun Validasyonu	31
5.4. HCC’de Plexin C1 Protein Seviyesinin in vitro ve in vivo Tespit Edilmesi	33
5.4.1. HCC Hücre Hatlarında Plexin C1 Protein Seviyesinin Analizi	33
5.4.2. HCC Doku Dizinlerinde Plexin C1 Protein Seviyesinin in vivo Tespit Edilmesi	34
5.5. Plexin C1’in HCC Hücrelerinin EMT Profiline Etkisi	36
5.5.1. Plexin C1’in EMT'yi Yönlendiren Moleküllerin Değişimine Etkisi	36
5.5.2. Plexin C1 Bağımlı EMT Sürecinin Fonksiyonel Düzeyde Araştırılması	38
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	41
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	54
EKLER	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
~	: Yaklaşık
Da	: Dalton
Dk	: Dakika
L	: Litre
M	: Molar
ml	: Mililitre
Mm	: Milimolar
Nm	: Nanomolar
NaCl	: Sodyum Klorür
Ng	: Nanogram
µl	: Mikrolitre
Mm	: Mikromolar
CD	: Farklılaşma Kümesi
DAB	: 3-3'-diaminobenzidin
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
Edta	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
EMT	: Epitel-Mezenkim Dönüşümü
Erk	: Mitojen Ile Aktifleşen Olan Protein Kinaz
FBS	: Fötal Dana Serum
Gapdh	: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
HCl	: Hidroklorik Asit
HBV	: Hepatit B Virüs
HCC	: Hepatoselüler Karsinoma
HCV	: Hepatit C Virüs
HGPRT	: Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz
KKH	: Kanser Kök Hücre
NF	: Nükleaz içermeyen

OD	: Optik Yoğunluk
Pbs	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
Pcr	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pe	: Fikoeritrin
Rt-qPcr	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	: Dakika Başına Dönüş
Shrna	: Kısa Saç Tokası-Rna
TAM	: Tümör-ilışkili makrofaj
Tgf- β	: Transforme-Edici Büyüme Faktörü β
Tris	: Tris (Hidroksimetil) Aminometan
Uv	: Ultraviole

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: EMT programının şematik ana hatları.	4
2.2: Semaforinler ve karşılık gelen reseptörlerinin yapısı.	6
3.1: pLKO.1 kontrol vektör haritası.	14
5.1: PLXNC1 transkript seviyesinin HCC dokuları ve hücre hatlarında incelenmesi.	29
5.2: HCC hücre klonların PLXNC1 baskılanma seviyeleri.	30
5.3: Anti-Plexin C1 monoklonal antikoru PE4'ün validasyonu.	32
5.4: HCC hücre hatlarında Plexin C1 protein ifadesi.	33
5.5: Anti-Plexin C1 monoklonal antikoru ile boyanan HCC mikrodizin görüntüleri.	35
5.6: Plexin C1'in EMT belirteçlerine etkisi.	37
5.7: Plexin C1'in HCC hücre hatlarının proliferasyon seviyelerine etkisi.	38
5.8: HCC hücre hatlarında Plexin C1 bağımlı ilaca yanıtın değerlendirilmesi.	39
5.9: shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının anoikis direnci.	40

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Çözelti ve kimyasal listesi.	13
3.2: İleri ve geri primer listesi.	15
4.1: 2X RT master karışımı.	21
4.2: PCR döngü şartları.	22
4.3: RT-qPCR reaksiyon tablosu.	22
4.4: RT-qPCR döngü şartları.	22
5.1: Plexin C1 boyanması ile hastaların klinikopatolojik karakteristikleri arasındaki korelasyon.	35
B1.1: Kullanılan şekiller için alınan izinler.	55

1. GİRİŞ

Plexin C1 reseptör proteini sinir sisteminde akson yöneliminin sağlanmasında görevli bir protein olarak keşfedilmiş ve zaman içerisinde hücre hareketliliğinin negatif düzenleyicisi olduğu tespit edilmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda hepatokarsinogenez ile ilişkisinin bulunabileceğini düşündüğümüz Plexin C1 malign melanoma özelinde araştırılmış olsa da henüz HCC oluşumuna olası etkileri bakımından irdelenmemiştir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Hücre hareketliliğinin negatif düzenleyicisi konumundaki Plexin C1'in transkript seviyesi veri tabanlarında *in silico* incelendiğinde HCC dokularında sağlıklı dokulara kıyasla daha yüksek seviyede ifade edildiği görülmüştür. Ayrıca Plexin C1 mRNA ifadesinin epitel fenotipteki HCC hücre hatlarında mezenkim karakterli olanlara kıyasla çok daha yüksek seviyede ifade edildiği de tarafımızca tespit edilmiştir.

Bu ön verilere ek olarak, HCC oluşumunun en önemli ayaklarından birinin EMT süreci olduğu ve bu süreç sonucunda kanser hücrelerinin artan hareketliliğe sahip olduğu düşünüldüğünde, Plexin C1'in HCC oluşumunda ne tür bir rol oynadığı merak uyandırmıştır.

Bu gözlemlerimizi somutlaştırma adına bu tez çalışmasında öncelikle Plexin C1 proteinini spesifik olarak tanıyan özgül monoklonal antikorların geliştirilmesi planlandı. Bunu takiben Plexin C1 proteininin viral yöntemler ile baskılandığı HCC hücre klonlarının geliştirilmesi ve hücrelerin EMT düzeylerinin Plexin C1 zemininde değerlendirilmesi amaçlandı. Ek olarak Plexin C1 proteininin HCC vakalarında ne şekilde ifadelendiği de tarafımızca literatüre ilk defa kazandırılacaktır.

Bu deneylerden elde edilecek sonuçların ışığında ise HCC tanısının ve/veya tedavi seçeneklerinin Plexin C1 zemininde değerlendirildiği ileri çalışmaların önü açılmış olacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Hepatoselüler Karsinoma

Karaciğer kanserinin en sık görülen alt tipi olan HCC, dünyada görülme sıklığı açısından 6., kansere bağlı ölümlerde ise 3. sırada yer almaktadır [Sung et al., 2021]. Hepatit B ve C virüs enfeksiyonlarına bağlı kronik karaciğer hasarı, alkole bağlı hastalıklar ve aflatoksin intoksikasyonu HCC gelişimine neden olan temel etmenlerdir [Ramakrishna et al., 2013].

HCC patogenezi incelendiğinde özellikle tümör mikroçevresi ile ilişkili TGF- β aktivasyonu ile başlatılan ve SNAI, TWIST ve ZEB ailesi EMT transkripsiyon faktörleri yürütülen karmaşık bir süreç görülmektedir [Gianelli et al., 2016]. Bu sürecin aydınlatılabilmesi adına gerçekleştirilen moleküler ve fonksiyonel in vitro çalışmalar EMT faktörlerinin HCC gelişimindeki rollerini ortaya koymuştur. HCC hücrelerinde artan SNAI1 ve ZEB2 ifadesinin hücre dışı matriksi parçalayabilen enzimlerin üretimini arttırarak invazyonu tetiklediği gösterilmiştir [Miyoshi et al., 2004]. HGF'in ise SNAI1 ifadesini arttırarak HCC hücre hatlarında EMT'yi tetikleyebildiği [Grotegut et al., 2006], serbest dolaşan HCC tümör hücrelerinde ise HGF reseptörü c-MET'in promotor demetilasyonu ile epigenetik olarak ifadesinin arttığı tespit edilmiştir [Ogunwobi et al., 2013]. Kanser mikro çevresinde gerçekleşen değişimler de HCC oluşumuna zemin hazırlayabilmektedir. Fan ve arkadaşları HCC hücrelerinin tümör-ilişkili makrofajlar (TAM) tarafından üretilen TGF- β ile EMT sürecine girebildiklerini ortaya koymuştur [Fan et al., 2014]. HCC vakalarında gerçekleştirilen genetik incelemeler sonucunda TP53, CTNNB1, WNT/ β -Katenin, PI3K/RAS ve oksidatif stres sinyal yollarının etkilendiği pek çok mutasyon tespit edilmiştir [Özen et al., 2013].

Erken evre HCC vakalarında cerrahi müdahale ve ortotopik karaciğer nakli gibi tedavi seçenekleri sayesinde %70'e varan 5-yıllık sağ kalıma erişilebilmektedir [Raza and Sood, 2014], [Llovet et al., 2005], [Villanueva et al., 2013]. İleri evre vakalarda ise çoklu-kinaz inhibitörleri sorafenib ve regorafenib kullanılıyor olsa da hasta sağkalımını ancak 3-4,5 ay aralığında uzatabilmektedirler [Llovet et al., 2008], [Ikeda et al., 2017], [Kudo et al., 2018]. İlaça karşı direncin sıklıkla görüldüğü bu vakalarda kimi zaman

ikinci basamak tedavi olarak Regorafenib uygulanıyor olsa da iki basamaklı tedavide dahi ortalama sağkalım toplamda 10.6 ayı geçememektedir [Bruix et al., 2017].

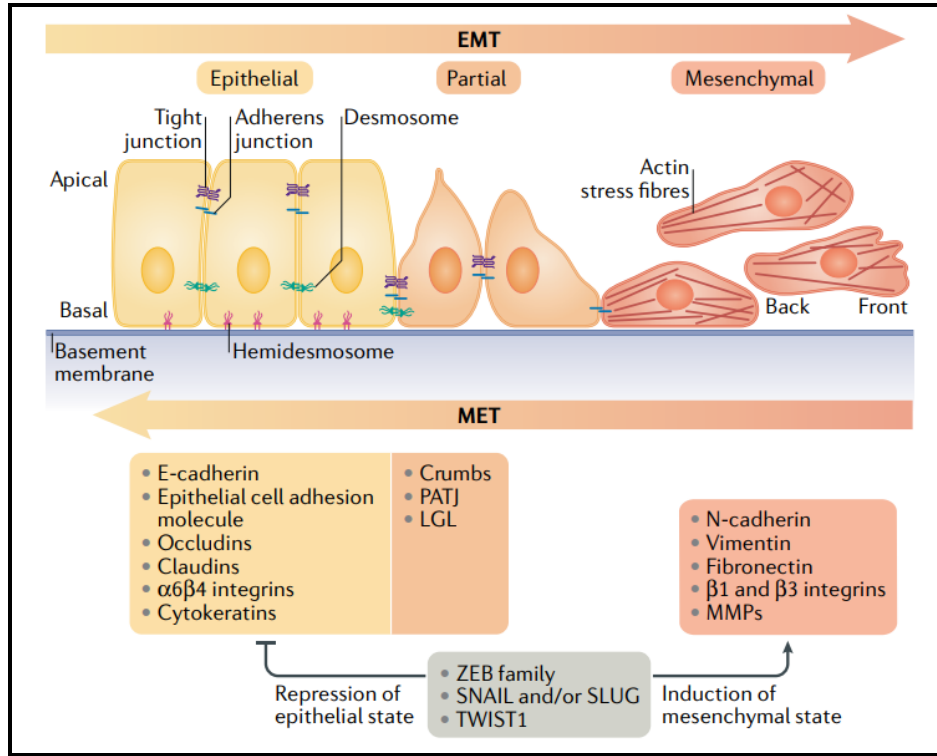
2.2. EMT

EMT, doğal hallerinde yaşadıkları dokuların bazal yüzeyleri üzerinde yerleşik halde bulunan polarize epitel hücrelerinin çok sayıdaki biyokimyasal değişimler sonucunda fibroblast benzeri ve oval şekilli hücrelere dönüşüm sürecini tanımlamaktadır. EMT biyolojisi temelde üç ana kısımda incelenmektedir. Tip 1 EMT, fibroz veya invaziv parametrelerin gözlenmediği embriyonik gelişim ve organ oluşumu süreçlerinde pek çok hücrenin mezenkim özellik kazanabilmesi için geçirdiği EMT çeşididir. Yara iyileşmesi ve doku yenilenmesi gibi süreçlerde görülen tip 2 EMT ise ilkinden farklı olarak inflamasyona bağlı organ fibrozuna sebebiyet verebilmektedir. Tip 3 EMT, sağlıklı dokuların doğal yaşam sürecinde görülmeyen ve belirli bir alt popülasyondaki neoplastik hücrelerin klonal olarak büyüyüp lokalize tümörler oluşturduğu bir süreçtir [Kalluri and Weinberg, 2009].

Tümörleşme sürecinde ele alındığında, EMT değişimi geçiren hücreler artan migrasyon ve invazyon kapasitesi ile apoptoza daha dirençli olma gibi özellikler kazanmaktadır. Bu sürecin sonunda mezenkim karaktere bürünen hücrelerde özellikle hücre dışı matriksi parçalayabilen enzimlerin üretimindeki artış ise bu hücrelerin bağlı bulundukları bazal membranlarını parçalayıp tek başlarına göç edebilmelerinin önünü açmaktadır [Guarino et al., 2007], [Friedl et al., 2003].

Moleküler düzeyde incelendiğinde, EMT sürecinin başlangıcındaki hücrelerin hücre-hücre bağlantılarını sağlayan E-kaderin seviyelerinde önemli bir azalma görülür. E-kaderin düzeyinde azalma ise temelde Twist, ZEB2 ve SNAI1 gibi transkripsiyonel baskılayıcılar tarafından yönlendirilmektedir [Peinado et al., 2007], [Comin et al., 2001], [Batlle et al., 2000]. Bu transkripsiyonel baskılayıcılar ise çoğu zaman Wnt, TGF- β , FGF, EGF, STAT3 veya NF- κ B gibi tümöre sebep olduğu bilinen sinyal yolları tarafından regüle edilmektedir [Grunert et al., 2003], [Christofori, 2006]. EMT sürecinin ilerleyen döneminde sağlıklı hücrelerde E-kaderin proteinine bağlı halde bulunan β -katenin molekülü çekirdeğe göç ederek c-Myc ve Siklin D1 gibi moleküllerin ifadelerinin artmasına ve son olarak da vimentin, fibronektin ve α -düz kas

aktini proteinlerinin artışına sebebiyet verir ki bu proteinler de EMT sürecinin moleküler belirteçleri olarak *in vitro* çalışmalarda kullanılmaktadır [Lehembre et al., 2008], [Thiery and Sleeman, 2006]. Özetle pek çok moleküler değişimin fenotipik değişime eşlik ettiği karmaşık bir süreç olan EMT'nin tümörleşme sürecinin en önemli ayağını oluşturduğu söylenebilir [Dongre and Weinberg, 2018] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: EMT programının şematik ana hatları.

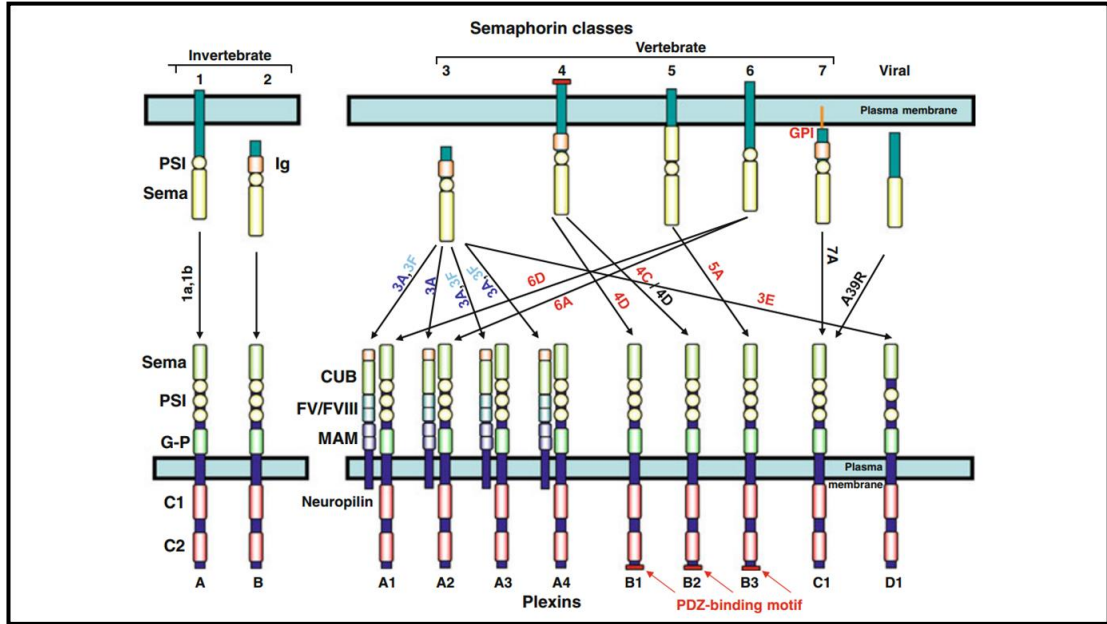
HCC özelinde incelendiğinde EMT sürecinin başlatıcısı çoğu zaman TGF- β 'dır [Reichl et al., 2012]. Kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı dokularda da ifadelenen TGF- β sitokini hücre proliferasyonundan farklılaşmaya migrasyon ve invazyondan apoptoza kadar pek çok hücre fonksiyonunda işlev görmektedir [Padua and Massague, 2009]. TGF- β , HCC hücrelerinin yüzeyinde bulunan iki farklı tip reseptöre (TGF- β RI ve TGF- β RII) bağlanıp önce heterodimer oluşturmalarına sebep olur. Bu heterodimer hücre içinde Smad'lar olarak bilinen substratlarını fosforile ederler. Fosforile Smad-4-Smad2/3 kompleksi ise çekirdeğe göç ederek Snail, ZEB ve bHLH ailesi transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonunu düzenleyerek EMT sürecini yönlendirirler [Padgett et al., 1998], [Feng and Derynck, 2005], [Shi and Massague, 2003].

Hepatokarsinogenezde görülen EMT süreci TGF- β molekülünden bağımsız olarak da başlatılabilmektedir. Mir200a baskılanmasının β -katenin yolağı üzerinden HCC hücrelerinin EMT sürecine girmesine neden olduğu ve buna bağlı migrasyon ve kanser kök hücre özelliklerinde artışa sebebiyet verdiği görülmüştür [Liu et al., 2013]. Twist1'in tek başına HCC hücrelerinde EMT sürecini başlatabildiği ve metastatik HCC dokularında ifadesinin arttığı tespit edilmiştir [Lee et al., 2006]. Heterojen nükleus ribonükleoprotein AB'nin (HNRNPAB) EMT transkripsiyon faktörü SNAIL'in transaktivasyonuna sebebiyet vererek EMT'yi tetikleyebildiği ve metastatik HCC dokularında yüksek seviyede ifadelendiği Zhou ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur [Zhou et al., 2014].

2.3. Semaforin ve Plexin Aileleri

Plexinler ilk olarak *Xenopus* iribaşlarının (tadpole) sinir sisteminde hücre yüzey molekülleri olarak keşfedilmişlerdir [Ohta et al., 1995]. Hemen ardından Met reseptör tirozin kinazlarının hücre dışı bölgeleri (domain) ile olan dizi benzerlikleri fark edilmiştir [Maestrini et al., 1996]. Plexinlere özgül Semaforin proteinleri ise ilk olarak çekirgelerin sinir sisteminde tanımlanmış [Kolodkin et al., 1992], bunu takiben insanlar da dahil olmak üzere diğer organizmalarda da keşfedilmişlerdir [Kolodkin et al., 1993]. Plexin ve Semaforin ailesi üyelerinin sinir sisteminde akson yönelimine kılavuzluk eden en temel proteinler oldukları zamanla anlaşılmıştır [Winberg et al., 1998], [Winberg et al., 2001]. Omurgasızlarda 2, omurgalılarda ise 9 adet Plexin geni mevcut olup [Gurrapu and Tamagnone, 2016], omurgalılarıdaki plexinler 4 alt sınıfa (A1-4, B1-3, C1 ve D1) ayrılırlar [Tamagnone et al., 1999]. Hücre dışı kısımlarında SEMA, PSI (Plexins, Semaphorins, and Integrins) ve G-P (Glisin-Proline zengin) domainlerini, hücre içi bölgelerinde ise küçük GTPaz bağlanma bölgelerinin de bulunduğu RAS-GAP domainini içermektedir [Negishi and Oinuma., 2015] (Şekil 2.2). Plexin reseptörlerinin yüksek afiniteli özgün ligandları olan semaforinler, tıpkı Plexinler gibi akson-kılavuzluğundan hücre adhezyonu ve motilitesine, pek çok doku ve organın gelişiminde rol oynayan, salgılanabilen veya membran-bağılı üyelerden oluşan geniş bir ailedir [Gurrapu and Tamagnone, 2016]. Omurgalılarda 21, omurgasızlarda ise 8 üyeye sahip semaforin ailesi, 8 alt sınıftan oluşmakta olup SEMA ve PSI domainleri ile

karakterizedir. 1. ve 2. sınıf semaforinler omurgasızlara, 3. sınıftan 7. sınıfa kadarki üyeler ise omurgalılara spesifiktir. Bu sınıflara ek olarak V. sınıf semaforinler ise viral-kökenlidir [Negishi and Oinuma., 2015].



Şekil 2.2: Semaforinler ve karşılık gelen reseptörlerinin yapısı. Domain kısaltmaları: PSI; plexin, semaforin ve integrin, Sema; Semaforin, Ig; immunglobilin-benzeri, G-P; glisin-proline zengin, CUB; kompleman bağlama, FV/FVIII; FV/FVIII koagülasyon faktör-benzeri, MAM; Meprin, A5 ve Mu.

Embriyonik nöral gelişimde aldıkları rollere ek olarak, plexinler erişkin dokularda da ifade edilmekte ve dokuların homeostazı ve sinir sisteminde oluşan hasarın giderilmesinde görev almaktadırlar [Shim et al., 2012]. Bu rollerine ek olarak, anjiyogenезin düzenlenmesinden kardiyovasküler gelişime [Gu and Giraudo, 2013], [Sakurai et al., 2012], immün sistem regülasyonu ve kemik homeostazından [Kang and Kumanogoh, 2013], [Takamatsu and Kumanogoh, 2012] nörolojik hastalıklar ve kansere kadar [Tamagnone, 2012], [Worzel and Offermanns, 2014] biyolojinin geniş bir alanında rol almaktadırlar.

2.3.1. Plexin C1'in Keşfedilme Süreci ve Ligandları

Viral semaforin hedeflerinin aydınlatılması için gerçekleştirilen bir çalışmada [Comeau et al., 1998], Vaccinia Virüsü kökenli semaforin A39R'ın [Kolodkin et al., 1993] etkileşim partneri, CB23 hücre hattından (insan kordon kanı kökenli ve EBV ile transforme edilmiş B hücresi) immün-çöktürme ile izole edilmiş ve bu reseptörün ~220 kDa boyutunda bir glikoprotein olduğu anlaşılmıştır. Biyoinformatik analizler sonucunda cDNA'sı tespit edilen bu reseptör VESPR (Virus Encoded Semaphorin Protein Receptor) olarak adlandırılmıştır. VESPR cDNA'sı ile transforme edilen CV-1/EBNA hücreleri, viral A39R'ın yanı sıra, bir diğer viral Semaforin olan tip 1 alselafan herpesvirüsü AHVSema [Ensser and Fleckenstein., 1995] ile de bağlanabilmektedir. Daha sonra Plexin C1 olarak adlandırılan VESPR'ın (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999), insanlardaki ligandının GPI-bağlı Semaforin 7A (Sema 7A) olduğu Tamagnone ve ark. tarafından [Tamagnone et al., 1999] keşfedilmiştir.

2.3.2. Plexin C1 Hücresel Fonksiyonları ve Sinyal İletisi

Plexin C1 hakkındaki ilk bulgular bu reseptörün viral bir Semaforin olan A39R ile etkileşimi nedeniyle ilk olarak bağışıklık sistemi hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilmiştir.

Plexin C1 ifade eden monositlerin viral semaforinler A39R veya AHVSema ile uyarıldıklarında kısa zamanda büyük hücresel agregatlar oluşturdıkları, uzun dönemde ise IL-6 ve IL-8 üretimini artırdıkları tespit edilmiştir [Comeau et al., 1998]. Plexin C1 ifade eden fare dendritik hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalar, A39R-Plexin C1 etkileşiminin, bu hücrelerin integrin-temelli adezyon ve kemokin-aracılı migrasyonlarını engelleyip fagositoz kapasitelerini düşürdüğünü ortaya koymuştur. Hücresel düzeydeki bu değişimlere fokal adhezyon kinazın (FAK) fosforilasyon (Y-397) seviyesindeki azalma da eşlik etmiştir. Buna ek olarak Plexin C1-A39R etkileşimi kofilin fosforilasyonunda (inaktivasyon) artışa sebep olmakta, buna bağlı olarak da F-aktin depolimerizasyonu ve hücre adhezyonu azalmaktadır [Walzer et al., 2005a]. Aynı grubun bir diğer çalışmasında, A39R-Plexin C1 etkileşiminin dendritik hücrelerin ve nötrofillerin fagositoz kapasitelerini düşürdüğü anlaşılmıştır [Walzer et al., 2005b].

Diğer yandan tıpkı diğer Plexin ve Semaforin ailesi üyeleri gibi Sema 7A ve Plexin C1 de kimi zaman bir arada kimi zaman ise bağımsız halde nöral gelişimde rol almaktadır [Tamagnone et al., 1999], [Pasterkamp et al., 2007]. Plexin C1, göç halindeki sıçan nöronlarının farklı alt gruplarında ve özellikle sıçanların nöral gelişimlerinin erken safhalarında yüksek seviyede ifade edilse de [Pasterkamp et al., 2007], sinir hücre aksonlarının Sema 7A bağımlı büyüme zonu (outgrowth) Plexin C1'den bağımsız şekilde β 1-Integrin üzerinden gerçekleşmektedir [Pasterkamp et al., 2003].

Sema 7A, Plexin C1'in bir ligandı olsa da Plexin C1'den bağımsız şekilde β 1-Integrine bağlanarak immün yanıt düzenlenmesi [Suzuki et al., 2007] ve kanser invazyon ve metastazında görev alabildiği zamanla tespit edilmiştir [Black et al., 2016]. İlginç olarak, Plexin C1'in ligand spesifik etkilerine ek olarak, Sema 7A- β 1 integrin etkileşimi üzerinden gerçekleşen sinyal iletimini kimi zaman inhibe edebildiği de belirlenmiştir. Sema 7A ile uyarılan melanositlerin β 1-integrin üzerinden gerçekleşen yayılma (spreading) ve dendritik özellikleri bu hücrelerde ektopik olarak ifadesi sağlanan Plexin C1 ile engellenebilmektedir [Scott et al., 2008]. Benzer şekilde, serumsuz ortamda kültüre edilen GN11 hücrelerinde (GnRH-1 salgılayan immortalize fare hücreleri) Sema 7A/ β 1-integrin etkileşimi sonrası gözlenen artmış migrasyon kapasitesi, Plexin C1 tarafından engellenmektedir [Messina et al, 2011].

Plexin-C1/Sema-7A bağlanması üzerine sinyal ileti mekanizmalarındaki değişimler kısmen aydınlatılabilmektedir. Scott ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Sema 7A ile uyarılan melanositlerde integrin üzerinden Erk1/2 fosforile olurken, Plexin C1 üzerinden fosforile FAK ve fosforile kofilin seviyesi yükselmekte, total LIMK2 protein miktarı artmaktadır. Ayrıca Plexin C1 ifadesi susturulan melanositlerde Sema 7A'dan bağımsız şekilde total LIMK2 protein ifadesi azalmaktadır. Bu bulgulara göre, Plexin C1'in LIMK2 proteininin ifadesini veya stabilitesini düzenlediği ve bunun yanı sıra, melanoma oluşumu sürecinde kofilin inaktivasyonu üzerinden tümör baskılayıcı olarak görev aldığı ileri sürülmektedir [Scott et al., 2009].

Plexin proteinlerinin sitoplazmik bölgeleri, RAS ailesine özgü bir grup GTPaz-aktif edici protein (GAP) ile benzerlik göstermektedir [Castellani and Rougon, 2002]. Oinuma ve arkadaşları ilk olarak 2004 yılında Plexin B1 proteininin Sema 4D ile

etkileşimi sonrasında R-RAS GAP aktivitesi gösterdiğini keşfetmişlerdir [Oinuma et al., 2004]. Plexin proteinlerinin sitoplazmik bölgeleri aile içerisinde korunmuş olup, benzer GAP aktivitesi Plexin C1 için de gösterilmiştir. Uesugi ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, COS-7 hücreleri Plexin C1 proteininin sitoplazmik kısmı (PlexC1-cyt) ile transfekte edilmiş ve bu hücrelerde RAS ailesi üyelerinden R-RAS, M-RAS ve TC21'in aktivasyon düzeyleri tespit edilmiştir. PlexC1-cyt'nun, R-RAS ve M-RAS için GAP aktivitesi sergilediği fakat TC21'in katalitik aktivitesini değiştirmedeği gözlenirken bu hücrelerde RAS aktivitesinin düşmesinin yanı sıra hücre dışı matrix (ECM) ile yönetilen migrasyon kapasiteleri de azalmıştır [Uesugi et al., 2009]. Benzer şekilde, Plexin C1 ifadesi shRNA ile baskılanmış insan melanositlerinde hücre içi R-RAS aktivitesi artarken, Plexin C1 ile transfekte Melanom hücrelerinin R-RAS aktivitesi azalmış ve tüm bu değişimler liganddan bağımsız şekilde gerçekleşmiştir [Chen et al., 2013].

2.3.3. Plexin C1-Kanser İlişkisi

Plexin C1'in ifade düzeyi, melanom, akciğer kanseri ve lösemiler 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 [Scott et al., 2009]. Bunu destekler biçimde, Plexin C1'in melanom hücrelerinin invazyon ve migrasyon kapasitelerini engelleyici bir faktör olduğu ve PI3-Kinaz/Akt yolağı üzerinden bu hücrelerin sağkalımlarını desteklediği fakat ilginç şekilde tüm bu etkilerin Sema7A'dan bağımsız gerçekleştiği belirlenmiştir [Chen et al., 2013]. Sema7A/Plexin C1 sinyal iletisi melanom hücrelerinin akciğere metastaz yapma kapasitelerini de düşürmüştür [Ma et al., 2015]. Mikrodizin temelli gerçekleştirilen bir analizde, Plexin C1 transkript ifadesinin akut miyeloid lösemi hücrelerinde normal hematopoetik hücrelere kıyasla düşük seviyede olduğu belirlenmiştir [Stirewalt et al., 2008]. Buna karşın, akciğer alveolar epitel hücrelerine oranla küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde (NSCLC) Plexin C1 protein ifadesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [Zhang et al., 2017].

Glioma ve melanoma dokularındaki azalmış Plexin C1 ifadesinin uzun kodlama yapmayan RNA'lerden sırasıyla GAS5 ve CASC2'nin kontrolü altında bulunduğu ve her iki RNA'nın da bu dokulardaki ifadesinin baskılanmış olduğu ortaya konmuştur [Zhao et al., 2015], [Wang et al., 2018].

3. GEREÇLER

3.1. Genel Kimyasallar

Complete Freund's Adjuvan (Sigma), Incomplete Freund's Adjuvan (Sigma), Polietilenglikol (PEG; MW: 1500, (Sigma), EDTA (Merck), MBG Etanol (Merck), β -Mercaptoetanol (Fischer Scientific), Gliserol (Fischer Scientific), Tris (Fischer Scientific), HCL (Fischer Scientific), DMSO (Fischer Scientific), Polybren (Thermo Scientific), Puromisin (InVivoGen), ECL Femto (Thermo Scientific), Dynabeads Protein G (Thermo Fisher), Paraformaldehit (PFA) (Fischer), RNase A (Sigma), Metanol (Fischer).

3.2. Cihazlar

Karbondioksit İnkübatörü (Euroclone), Su Banyosu (Nüve), Laminar Kabin, Class II Tip (Labconco, Logic), +4°C Buzdolabı (Ariston), -20°C Derin Dondurucu (Ariston), -80°C Derin Dondurucu (Thermo, Forma -86°C ULT Freezer), Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Soğutmalı Santrifüj (Labogene, Scanspeed 1580R), Vortex (DragonLabs, MX-S), PCR (Biorad, Mj Mini), Mini Western Blot Sistem ve Transfer Tankı (BioRad), Floresan ataşmanlı ters ışık mikroskobu (Nikon TMS), Yatay Mini Jel Sistemi (BioRad), Işık mikroskobu (Nikon), Floresan ataşmanlı ışık mikroskobu (Nikon), Ters ışık mikroskobu (Nikon), Hassas terazi, 0,1 mg hassasiyetli (Sartorius BL210S), Şarjlı pipetleyici (PipetAid, Biohit Midi Plus), Isıtıcı blok (Denville Scientific), Isıtıcı manyetik karıştırıcı (Denville Scientific), Sıvı Azot tankı (Arpege 140), RT-qPCR (Applied Biosystem, StepOnePlus), PCR Kabini (Lab Companion), Mikrodalga fırın (Kumtel), Mikrobiyal İzolasyon Kabin (Nüve MN090), Orbital Çalkalayıcı (Denville Scientific), Santrifüj (Nüve, NF400), Jel/membran görüntüleme sistemi (Biorad ChemiDOC XRS), Otoklav (Nüve), Accuri C6 akım sitometresi (Becton Dickinson), AKTA-Purifier Kromatografi (GE, Massachusetts), NanoDrop (Thermo Scientific), Qubit 3 (Thermo Scientific), LSM 880 Airyscan Konfokal Mikroskop (ZEISS), Xcelligence DP (ACEA), Olympus CKX41 floresan mikroskop (Olympus).

3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Malzemeler

Hücre besiyeri olarak yüksek-glukoz içerikli DMEM ve RPMI besiyeri (Gibco), %10 fetal dana serumu (FBS, Gibco), %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco), 1X non-essential amino acids (NEAA) (Gibco), 10X fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS, Gibco) ve 10X Tripsin (Gibco) kullanıldı. SP2/0 myelom hücreleri 8-Azaguanine içeren besi yerinde seçilirken, füzyon sonrası hibrid hücrelerin seçilimi önce HAT (Hypoxanthine/Aminopterin/Thymidine) sonra da HT (Hypoxanthine /Thymidine) içeren DMEM besi yerinde gerçekleştirildi. 8-Azaguanine, HAT ve HT kimyasalları SIGMA firmasından temin edildi.

3.4. Hücre Hatları ve Besiyerleri

HEP3B, HEPG2, PLC/PRF/5, HUH7, SNU387, SNU423 ve SKHEP1 insan HCC hücre hatları ile SP2/0 myeloma hücre hattı Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden, HEK293T hücre hattı ise ATCC'den temin edildi. HEP3B, HEPG2, PLC/PRF/5, HUH7, SKHEP1, SP2/0 ve anti-Plexin C1 monoklonal antikor üreten PE4 hibridoma hücre hatları yüksek-glukoz içerikli DMEM besiyerinde ve SNU387 ile SNU423 hücre hatları da RPMI besiyerinde büyütüldü. Sıvı azotta saklanan myelom ve hibridoma hücre hatları tekrar kültüre alınacakları zaman %20 FBS içeren yüksek glukoz içerikli DMEM besi yerinde çözöldü fakat devam eden pasajlar ile FBS oranı %10'a kademeli olarak düşüröldü. SP2/0 hücreleri, 132 µM 8-Azaguanine içeren %10 FBS'li yüksek-glukoz içerikli DMEM besiyerinde 10 gün boyunca seçildi fakat füzyondan bir hafta önce seçim süreci durduruldu. Füzyon işleminden sonra hibridomalar sırasıyla HAT ve HT içeren DMEM besiyerinde seçilime tabi tutuldu.

3.5. Çözelti ve Tamponlar

Tez çalışması boyunca kullanılan çözeltilerin içerikleri ve kullanım amaçları aşağıdaki tablodadır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Çözelti ve kimyasal listesi.

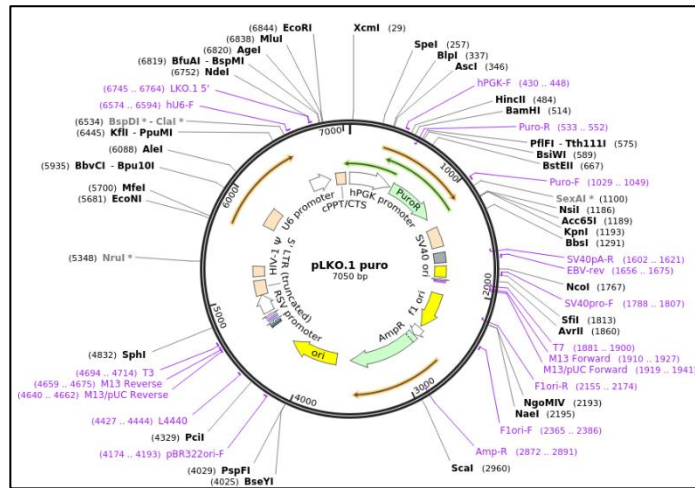
Çözelti-Kimyasal	İçeriği	Kullanım Amacı
10 X PBS	NaCl 80 g, KCl 2 g, Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O 17,8 g, KH ₂ PO ₄ 2,4 g, 1 lt saf su (pH:7.4).	Lizat hazırlığı
Dondurma Ortamı	%90 FBS, %10 DMSO	Hücre saklama işlemi
4x Laemmli buffer	%40 Gliserol, %8 SDS, 800 mM β-merkaptoetanol, 200mM Tris (pH=6.8), %0,1 Bromofenol mavi.	Western blotlama
10X TBS	500 mM Tris-Cl, pH 7.6, 1.5 M NaCl	Western blotlama
%8'lik SDS-PAGE Ayırma Jeli	2,5 ml 1,5M Tris (pH:8,8), 100µl SDS (%10), 2 ml Ac/Bis (%40), 75µl APS (%10), 5 µl TEMED ve 5.5 ml ultra saf su.	SDS-PAGE hazırlığı
4'lük SDS-PAGE İstifleme Jeli	2,5 ml 0,5M Tris (pH:6,8), 100µl SDS (%10), 1 ml Ac/Bis (%40), 75µl APS (%10), 5 µl TEMED ve 6,4 ml ultra saf su	SDS-PAGE hazırlığı
Elektroforez Yürütme Tamponu	25 mM Tris base, 190 mM glycine ve 0.1% SDS	Western blotlama
Transfer Tamponu	25 mM Tris base, 190 mM glycine, %20 metanol	Western blotlama
TBS-T	1X TBS, %5 Tween-20	Western blotlama
Triton X-100 Tamponu	50mM Tris-cl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% TritonX-100	Lizat hazırlığı
Western blot Bloklama solüsyonu	%5 Yağsız süt tozu, 1X TBS-T	Western blotlama
IF Bloklama solüsyonu	%2 BSA, 1X TBS-T	İmmünfloresan görüntüleme
10X Bağlanma Tamponu	10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl ₂	Akım sitometresi

3.6. Bakteriler ve Besiyerleri

E. coli DH5α ve DL21 bakterileri LB sıvı ve LB-agar katı besiyerlerinde çoğaltıldı ve temin edilen plazmidlerin çoğaltılmasında kullanıldı. Koloniler amfisilin antibiyotiği ile seçildi.

3.7. Vektörler ve Primerler

Kısmi-rekombinant Plexin C1 proteini pET101/D (Invitrogen, Carlsbad, Amerika Birleşik Devletleri) vektörüne klonlanarak çoğaltıldı. Plexin C1 transkriptlerini hedefleyen shRNA (TRCN0000060645, Sigma-Aldrich, MO, Amerika Birleşik Devletleri) ise pLKO.1 kontrol vektöründe (Addgene #8453) üretildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1: pLKO.1 kontrol vektör haritası.

Viral partiküllerin oluşturulmasında kullanılan plazmidler Sigma firmasından hazır halde Packaging Mix (Sigma, ABD) olarak temin edildi.

Tez çalışması boyunca kullanılan primerler İontek firmasından temin edildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.2: İleri ve geri primer listesi.

	İleri primer (5'-3')	Geri primer (5'-3')
Plexin C1	TCGTTGGCGTCTCTGTTATG	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT
GAPDH	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT	CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA

3.8. Antikorlar, Boyalar, İlaçlar

Western blotlama amacıyla Plexin C1 (1ug/ml, saflaştırılmış PE4 süpernatanı), Tubulin (Cell Signaling, 1/5000), GAPDH (Cell Signalling, 1/1000), E-cadherin (BD Transduction Laboratories, 1/1000), Vimentin (Cell Signaling, 1/1000), PARP (Cell Signaling, 1/1000), Antimouse-HRP ve antirabbit-HRP sekonder antikorları (Cell Signaling, 1/5000) kullanıldı.

Akım Sitometresi Antikorları; AnnexinV-APC (BD), CD133-APC (Miltenyi Biotech), CD44-FITC (BD), CD90-APC (SonyBiotech), CD13-PerCP (SonyBiotech), CD24-PE (SonyBiotech) ve EpCAM-APC (BD), anti mouse-Alexa488 sekonder antikor (Cell Signaling, 1/500).

Propidium Iodide (BD), DAPI (Thermo Scientific), RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (Intronbio) boyları ve Doxorubisin (Sigma-Aldrich, MO, ABD) kullanıldı.

3.9. Kitler

NucleoSpin Plazmid miniprep (Macherey-Nagel, ABD), NucleoBond Xtra Midiprep (Macherey-Nagel, ABD), Mouse mAb Isotyping Kit (Thermo Scientific, ABD), NucleoSpin RNA II izolasyon kiti (Macherey-Nagel, ABD), High-Capacity cDNA Reverse Transkriptaz (Thermo Scientific, ABD), Maxima Cybergreen Master Mix (Thermo Scientific, ABD), Qubit protein assay kit (Thermo Scientific, ABD).

4. YÖNTEMLER

4.1. Hücre Hatlarının Kültürü

HEK293T, SP2/0 fare myelom hücre hattı ve anti-Plexin C1 antikor üreten PE4 hibridoma hücreleri ile HCC hücre hatlarından HUH7, HEPG2, HEP3B, PLC/PRF/5 ve SK-HEP1 hücreleri %10 fetal dana serumu, %1 penisilin-streptomisin ve 1x NEAA ile desteklenen yüksek-glukoz içeren DMEM besiyerinde büyütüldü. HCC hücre hatlarından SNU387, SNU423, SNU182 hücre hatları ise %10 fetal dana serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI besiyerinde büyütüldü. Tüm hücreler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildi. Adherent hücreler kültür petrilерinde büyütülürken süspanse hücreler ise flasklarda çoğaltıldı. %70-80 oranında konfluent olan adherent hücreler 1X PBS ile yıkandı, 1X Tripsin ile oldukları yerden kaldırılarak yeni kültür petrilерine ihtiyaca göre oranlanarak ekildi.

4.2. Transformasyon ve Plazmitlerin Çoğaltılması

pET101/D plazmidi, lentiviral PLXNC1 shRNA ile pLKO.1 plazmidleri, pCMV-VSV-G (Addgene#8454) ve pCMV-dR8.2 dvrp (Addgene#8455) stok plazmitleri 10ng/ul'ye sulandırılıp her bir plazmitten 3'er ul, 80 ul kompetan (DH5α E. coli) ile ayrı ayrı birleştirildi. Bakteriler 30 dk. buzda, 1 dk. 42°C su banyosunda ve tekrar 3 dk. buzda inkübasyona bırakıldı. Ardından üzerlerine 800 ul LB eklenip 1 saat 37°C'de çalkalandı. Sonrasında 10000 g'de 1 dakika santrifüj edilip, elde edilen pellet LB besiyerinde süspanse edilerek seçici antibiyotik (Ampicillin) içeren LB agar petrilere ekildi. Gece boyu 37°C'de inkübasyon sonrasında koloni oluşturan transforme bakteriler seçildi. Seçilen bakteriler sıvı besiyerinde çoğaltılarak, midi-prep kiti ile yüksek yoğunlukta ve saflıkta plasmid DNA'ları izole edildi.

4.3. Plexin C1 İfadesinin *In Silico* Analizi

HCC'deki *PLXNC1* transkript seviyelerinin analizi Oncomine Veritabanında yüklü bulunan "Chen Liver" mikro dizin verilerinin "Hepatocellular Carcinoma vs. Normal" şeklinde filtrelendiği ile gerçekleştirildi [Rhodes et al., 2004]. Bu mikro dizinde 104 HCC ve 76 normal karaciğer dokusuna ait gen ifade bilgileri bulunmaktadır. Plexin C1 mRNA seviyesinin epitel ve mezenkim karakterli HCC hücre hatlarında *in silico* belirlenmesi için ise "EMBL-EBI Expression Atlas" veritabanı kullanıldı. Bu internet sitesindeki homo sapiens veri setindeki *PLXNC1*, *CDH1*, *VIM* ve *PRKCA* gen ifadeleri "Cell Line" ve "CCLE-Hepatocellular carcinoma" filtreleri kullanılarak seçildi. Gen ifade çıktıları indirilerek R (3.3.3) yardımı ile hiyerarşik kümelendirme (heatmap) haritası oluşturuldu.

4.4. Monoklonal Antikor Üretimi

4.4.1. Rekombinant Protein Üretimi

Kısmi-rekombinant protein elde edilmesi için klonlama basamaklarında pET101/D vektörü kullanıldı. *PLXNC1* geninin 66-274 amino asitlerine karşılık gelen kodlama bölgesi (196-802 nükleotid) pET101/D vektörüne klonlandı. *Escherichia coli* (BL21) hücrelerine transforme edilip üretilen rekombinant protein denatüre edici şartlarda Ni-NTA kolon yardımı ile saflaştırıldı. Saflaştırılan proteinin doğru katlanması amacıyla PBS ortamında NAP tampon değiştirme kolonları (Amersham, NJ, ABD) kullanıldı. Son olarak saf rekombinant protein Centriprep santrifüj filtreleri yardımı ile konsantre edilerek -80°C'de saklandı.

4.4.2. İmmünizasyon Çalışmaları

Bağışıklama için kullanılan BALB/c fareler TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından sağlandı ve bakımları aynı kurumun laboratuvarlarında gerçekleştirildi. 6-8 haftalık BALB/c fareler ilk olarak Complete Freund's Adjuvan ile 1:1 oranında emülsifiye edilmiş 50 ug rekombinant protein ile immünize edildi. Her iki haftada bir devam eden immünizasyonlarda kullanılan rekombinant protein ise Incomplete Freund's Adjuvan içerisinde hazırlandı. 3. ve 4. immünizasyonların ardından hem immünize hem de kontrol farelerin serumlarının Plexin C1'e karşı reaktiviteleri ELISA ile test edildi. Bu amaçla ELISA plakaları kuyu başına 100 ng rekombinant Plexin C1 proteini ile karbonat tamponu (pH:9,6) içerisinde kaplanarak +4°C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Fare serumları seri dilüsyonlara tabi tutularak antijen kaplı plakalara eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İkincil antikor olarak alkalın fosfataz ile konjuge edilmiş anti-IgG antikorlar kullanıldı (1:1000). Son olarak para-nitrofenil-fosfat substrat ile elde edilen kolorimetrik reaksiyon 405 nm dalga boyunda Varioscan Flash plaka okuyucuda ölçüldü. En yüksek immünreaktiviteye sahip fare füzyondan üç gün önce son kez bağışıklandı.

4.4.3. Füzyon Süreci ve Hibridoma Klonlarının Geliştirilmesi

Füzyon işlemine uygun HGPRT mutant Myelom hücrelerinin elde edilebilmesi için SP2/0 fare myelom hücreleri 2 hafta boyunca 132 µM 8-Azaguanine içeren besiyerinde (%10 Serum içeren DMEM) seçilime tabi tutuldu. Myelom hücrelerinin füzyon işlemi sırasında logaritmik büyüme fazında olmalarına özen gösterildi. Füzyondan 1 gün önce 10 adet 96 kuyucuklu plaka besleyici (feeder) dalak hücreleri ile kaplandı.

En yüksek bağışıklanma seviyesindeki farenin dalağı petri üzerinde 40 µm cell strainer içerisinde şırınga pistonu yardımıyla ezilerek dalak hücrelerinin dokudan ayrışması sağlandı. Dalak hücreleri ve büyüme fazındaki myelom hücreleri serumsuz besiyeri ile yıkandıktan sonra 6:1 oranında birleştirilip tekrar serumsuz DMEM içerisinde çöktürülüp pelet haline getirildi. Myelom-dalak hücre peleti 1 ml

Polietilenglikol (PEG; MW: 1500) ile 1 dk boyunca pipet ucuyla karıştırılarak yavaşça çözüldü. Ardından serumsuz besiyeri kademeli olarak eklenerek hücre hacmi 45 ml'e çıkarıldı ve 15 dk. boyunca 37°C'de inkübe edilip santrifüjlendi. Elde edilen myelomdalak füzyon hücreleri 2X HAT (Hypoxanthine/Aminopterin/Thymidine) içeren seçici besiyerinde dikkatlice çözülerek bir gün öncesinde feeder ve makrofaj besleyici hücreleri ile kaplanmış 96 kuyucuklu plakalara dağıtıldı.

7. günde ve takip eden 3 günde bir 1x HAT DMEM (%20 serum) ile besi yerleri yenilenen kuyulardaki koloni oluşumları takip edildi ve yeterli büyüklüğe sahip olanların üst sıvıları Plexin C1'e karşı reaktiviteleri açısından rekombinant Plexin C1 proteini ile kaplanmış plakalarda ELISA ile test edildi. Klonlar arasından en yüksek absorbans değerine sahip olan klon monoklonaliteyi sağlamak amacıyla alt klonlama işlemine tabi tutuldu.

Alt-klonlama işlemine tabi tutulacak hücreler sayılarak bir gün öncesinde dalak ve makrofaj hücreleri yukarıda anlatıldığı gibi kaplanan plakalara her bir kuyuda 1 hücre olacak şekilde DMEM (%20 Serum) besiyerinde dağıtıldı. Klonlar yukarıda anlatıldığı gibi takip edildi ve ELISA testinde en yüksek reaktiviteyi gösteren klon hücreleri ikinci alt klonlama işlemine tabi tutuldu.

Gerçekleştirilen sonuncu alt klonlama işlemi sonrasında test edilen tüm kolonileri ELISA testinde pozitif reaksiyon veren klonlar, monoklonal olarak değerlendirildi. En yüksek aktiviteyi gösteren kuyu geniş ölçekli antikor üretimi için aşamalı çoğaltmaya alındı. Bu hücreler önce 24 kuyulu plaklara ve en sonunda hücre kültürü şişelerine aktararak büyütüldü.

Monoklonal olarak değerlendirilen PE4 anti-Plexin C1 antikorların izotipi "Mouse mAb Isotyping Kit" (Pierce Rapid ELISA, Thermo Scientific) kullanılarak belirlendi.

4.4.4. Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

Monoklonal antikorların saflaştırılma işlemleri için hibridoma hücreleri %90 yoğunluğa ulaşınca serumsuz DMEM besiyerinde 5 gün inkübe edildi ve hibridoma üst-sıvıları toplandı. Bu amaçla, 50 ml hibridoma üst-sıvısı AKTA-Purifier Kromatografi (GE, Massachusetts, ABD) cihazında optimize edilen protokol kullanılarak Protein G

Afinite Kolonuna (HiTrap Protein G, GE, Massachusetts, ABD) yüklendi. Fosfat tamponu ile yıkama işleminden sonra elüsyon 0.1M Glisin-HCl tamponu (pH: 2,7) ile gerçekleştirildi ve elüatlar 80 tüpte 0.5 ml'lik kesimlerde toplandı. 260 nm'de en yüksek absorbans değerine sahip tüpler, Plexin C1 rekombinant proteinine karşı özgüllükleri ELISA yöntemiyle test edildi. Safılaştırılan monoklonal antikorlar -20°C'de saklandı.

4.5. Plexin C1 Hücre Klonlarının Oluşturulması

4.5.1. Viral Partikül Üretilmesi

HEK293T hücreleri 6 kuyucuklu plakalara, kuyu başı 2×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün Plexin C1 shRNA plasmidi ile birlikte paketleme için gerekli olan pCMV-dR8.2 dvrp ve pCMV-VSV-G plazmidleri 1,5ug:1,5ug:1ug oranında 250 ul Optimem içerisinde karıştırıldı (1. karışım). Transfeksiyon aracı olarak kullanılan PEI (Polyethylenimine) ise 1:3 (DNA μ g:PEI μ l) oranında 250 ul Optimem içerisinde hazırlandı (2. karışım). 1. ve 2. karışım birleştirilip 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra hücrelerin üzerine yavaşça eklendi. Transfeksiyondan 8 saat sonra besiyeri değiştirildi. Taze besiyeri eklendikten 36 saat sonra ise kültürlerin üst-sıvıları toplanıp 0.45 μ m filtreden geçirilerek -80°C'de saklandı.

4.5.2. Plexin C1 İfadesi Baskılanmış ve Kontrol Klonlarının Geliştirilmesi

PLC/PRF/5 ve HEP3B hücre hatları kuyu başı 1.5×10^5 olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilip inkübe edildi. Ertesi gün Plexin C1'i hedef alan shRNA veya pLKO.1 kontrol virüsü 8 μ g/ml Polybrene varlığında hücrelere verildi. Antibiyotik (puromisin) ile 3 pasaj boyuca seçilime tabi tutulan hücrelerde azalan Plexin C1 ifadesi RT-qPCR ile gösterildi.

4.6. Hücre Klonlarında Gen İfadesi Analizleri

4.6.1. RNA İzolasyonu

Hücrelerden RNA izolasyonu, NucleoSpin RNA II izolasyon kiti (Macharey-Nagel, Almanya) kullanılarak üretici firmanın verdiği kullanma talimatına göre gerçekleştirildi.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve OD 260/280 oranı NanoDrop (Thermo Scientific, ABD) cihazı ile ölçüldü. İzole edilen RNA'lar -80°C derin dondurucuda saklandı.

4.6.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi Protoscript M-MuLV Taq RT-PCR kiti (New England Biolabs, Massachusetts, ABD) ile üretici firmanın talimatlarına uygun olarak yapıldı. 2 µg total RNA'nın kullanıldığı sentez reaksiyonu öncelikle aşağıdaki tabloda bulunan 2X RT master karışımı hazırlandı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: 2X RT master karışımı.

10X RT tamponu	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
10X RT Random Primer	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	2 µl
dH ₂ O	4.2 µl
Toplam hacim	10 µl

10 µl 2X RT karışımı içeren her bir PCR tüpüne 10 µl total RNA örneğinden eklendi (2 µg total RNA). Son hacmi 20 µl'ye ulaşan PCR karışımı ile Tablo 4.1'de gösterilen döngü şartlarında cDNA sentezi yapıldı (Tablo 4.1). Sentezlenen cDNA'lar eksi 20°C derin dondurucuda saklandı.

Tablo 4.2: PCR döngü şartları.

	Basamak 1	Basamak 2	Basamak 3	Basamak 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre (dk)	10	120	5	∞

4.6.3. RT-qPCR ile Gen İfadesi Analizi

HCC hücre hatlarındaki Plexin C1 transkript seviyelerinin belirlenebilmesi amacıyla Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak kitin önerdiği döngü şartlarında RT-qPCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Ayrıntılı olarak Tablo 4.3’de gösterilen ve 20 µl’de hazırlanan PCR karışımı Tablo 4.4’de gösterilen döngü şartlarında reaksiyona sokuldu.

Tablo 4.3: RT-qPCR reaksiyon tablosu.

2X master mix	10 µl
İleri primer (25 mM)	0,25 µl
Geri primer (25 mM)	0,25 µl
cDNA (25 ng)	2 µl
NF dH ₂ O	7.5µl
Toplam hacim	20 µl

Tablo 4.4: RT-qPCR döngü şartları.

Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1 döngü	95	10 dk
45 döngü	95	15 sn
	60	30 sn
	72	30 sn
Erime eğrisi	55 - 95	0.1 sıcaklık değişiminde ölçüm

HCC hücre hatlarındaki *PLXNC1* mRNA düzeyi, her bir hücre hattındaki *PLXNC1* ifadesinin aynı hücrenin *GAPDH* transkript seviyesine $2^{-\Delta Ct}$ formülü ile normalizasyonu

yoluyla göreceli olarak ölçüldü [$\Delta Ct = Ct (PLXNC1) - Ct (GAPDH)$]. shRNA ile transfekte edilen hücrelerdeki *PLXNC1* düzeyindeki azalma ise $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile tespit edildi [$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{shPLXNC1} - \Delta Ct_{PLKO}$].

4.7. Monoklonal Antikorların Validasyonu

Anti-Plexin C1 monoklonal antikorların Plexin C1 proteinine karşı özgüllüğü Western blotlama, immün-çöktürme ve immünfloresan yöntemleri ile test edildi.

4.7.1. Western Blotlama

%70-80 hücre yoğunluğuna ulaşan kültür petrilere 2 kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra proteaz inhibitörü ile desteklenmiş Triton-X-100 lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH: 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 ve 1X complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)] ile buz üzerinde 15 dk. inkübe edildi. Kazıyıcı ile plakalardan kazınan lizatlar ependorf tüplerine alındı, aralıklı olarak vortekslenmek suretiyle buz üzerinde 15 dk. daha inkübe edildi. Son olarak 14000 rpm'de +4°C'de 15 dk santrifüjlenerek süpernatant kısmı protein lizatı olarak -80°C'de saklandı.

Protein konsantrasyonları Qubit protein assay kit (Thermo Scientific, ABD) ile belirlenen örneklerden 50'şer ug protein laemmlı tamponu varlığında SDS-PAGE'de yürütüldü. Ağırlıklarına göre ayrılan proteinler daha sonra yarı-kuru TransBlot (Biorad) cihazı ile PVDF membranlara transfer edildi. %0,05 Tween-20 içeren TBS (TBS-T)'de hazırlanmış %5 süt tozu ile bloklanmış membranlar gece boyunca birincil antikorlar ile +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün TBS-T ile yıkanan membranlar anti-IgG HRP-bağlı ikincil antikorlar (Cell Signaling Technology, ABD, 1:5000) ile inkübe edildi ve devamında tekrar TBS-T ile yıkandı. Membran üzerindeki protein bantları Supersignal west femto ECL (Thermo Scientific, ABD) kemilüminesan substrat varlığında ChemiDoc XRS system (Bio-Rad) cihazında görüntülendi.

4.7.2. İmmün-Çöktürme

PLC/PRF/5 hücrelerinden total protein lizatı bir önceki Western blotlama başlığında anlatıldığı gibi elde edildi. Hücre lizatı gece boyunca 5 µg anti Plexin C1 monoklonal antikorlu ile +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 2 kere TX-100 tamponu ile yıkanan 15 µl manyetik boncuk (Dynabeads Protein G, Thermo Fisher, ABD) lizat-antikor kompleksi ile 2 saat +4°C'de inkübe edildi. Devamında TX-100 tamponu ile üç kere yıkanan boncuklar, 30 µl 4x Laemmli Tamponu ile 70°C'de 10 dakika inkübe edildi ve antikorlar ile bağlı proteinlerin boncuklardan ayrılması sağlandı. Devamında SDS-PAGE jele yüklenen örnekler, PVDF membrana aktarıldı ve indirilen proteinler anti-Plexin C1 antikorlu ile problanarak Western blotlama gerçekleştirildi.

4.7.3. İmmunfloresan Görüntüleme

24-kuyucuklu plakalara steril edilmiş lameller yerleştirildikten sonra kuyu başı 5×10^4 hücre ekildi. Gece boyunca kültüre edilen hücreler ertesi gün 2 kere TBS ile yıkandıktan sonra %100 soğuk metanol ile buz üzerinde 1 saat fikse edildi. Ardından 3 kere TBS ile yıkanan hücreler %2 BSA-TBS ile 60 dakika oda sıcaklığında blokladı. Bloklama işleminin ardından, hücreler % 0,05 Tween 20 içeren bloklama solüsyonu (BSA-T) içinde hazırlanmış PE4 antikorlu (1:50) ile 1 saat inkübe edildi. Ardından 3 kere TBS ile yıkanan hücreler, BSA-T'de 1:500 oranında hazırlanan Alexa Flour 488 bağlı Anti-IgG ikincil antikorlar (Cell Signalling, ABD) ile 1 saat inkübe edildi. İkincil antikor inkübasyonunu takiben 3 kere TBS ile yıkanan örnekler Prolong Gold antifade medium (Invitrogen, ABD) sabitleme ajanı yardımıyla lam üzerine ters çevrilerek kapatıldı. Hazırlanan slaytlar Zeiss LSM 880 Airyscan Konfokal Mikroskop ile görüntülenip fotoğraflandı.

4.8. Plexin C1 Protein İfadesinin HCC Doku Mikrodizinlerinde Analizi

Plexin C1 protein seviyesi US Biomax (Rockville, MD, ABD) firmasından temin edilen 90 HCC ve eşlenik tümörsüz dokulardan oluşan HCC doku mikrodizini kullanılarak *in vivo* seviyede tespit edildi. İmmünohistokimya analizleri Anadolu Sağlık Merkezi (ASM) (Şifa-İSTANBUL) Patoloji biriminde BenchMark-XT Autostainer (Ventana Medical Technologies, Roche, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, doku mikrodizinleri önce 70°C’de sonra da ksilende inkübe edilerek deparafinize edildi. Sıralı şekilde artan seviyedeki alkolden geçirilerek nemlendirilen slaytlar 10 mM sitrat tamponunda (pH:6.0) mikrodalga fırında 20 dakika inkübe edilerek antijenlerin açığa çıkması (retrieval) sağlandı. Son olarak endojen peroksidaz aktivitesinin bloklanması slaytların %3 H₂O₂ içerisinde yarım saat bekletilmesi ile gerçekleştirildi [Oztas et al., 2010]. Boyanma için hazır hale gelen doku mikrodizinleri ilk önce PE4 antikoru (1:100) ile 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İkincil antikor, substrat (DAB) eklenmesi ve hematoksilin ile boyama işlemleri ise sistemde optimize edilmiş standart protokol çerçevesinde gerçekleştirildi.

Leica DM IL LED mikroskop (Leica Microsystems, NJ, ABD) altında incelenen boyalı dizinler mikroskoba bağlı Leica MC170 HD kamera (Leica Microsystems) ile fotoğraflandı.

İmmünohistokimya ile boyanan doku mikrodizinlerinin değerlendirilmesi ise, dokulardaki Plexin C1 boyanma şiddetine bağlı histo-skorların hesaplanması ile gerçekleştirildi.

Histo skor (H-skor); her bir vakadaki boyanma şiddeti (0= yok, 1=zayıf, 2=orta, 3=güçlü) ile pozitif boyanan hücre oranının (0=<%10, 1= %10-25, 2=%25-50, 3= %50-75, 4=>%75) çarpımı yoluyla elde edildi.

Klinikopatolojik verilerin Plexin C1 ifadesi ile ilişkisinin incelendiği Ki-kare analizleri için ise H-skorlar şu şekilde yorumlandı; 0=negatif, 1-6=zayıf, 7-12=güçlü.

4.9. Hücre Klonlarında Fonksiyonel Analizler

Plexin C1'in EMT sürecindeki anlaşılabilmesi için Plexin C1 transkriptlerinin shRNA ile baskılandığı veya kontrol HCC hücre klonlarında fonksiyonel testler gerçekleştirildi.

4.9.1. EMT Belirteçlerinin Moleküler Düzeyde Analizi

Plexin C1 ifadesinin baskılandığı HCC hücre klonlarında EMT sürecinin belirteçlerinden E-kadherin ve Vimentin protein düzeyi Western blotlama ile test edildi.

4.9.2. Hücre Proliferasyonu Analizi

PLC/PRF/5 ve HEP3B shPLXNC1 ve pLKO.1 klonları, 96 kuyucuklu mikropatlara (E-Plate) 100 µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. Hücre proliferasyonu plate yüzeyindeki elektronik sensörler tarafından algılanarak gerçek-zamanlı olarak cihaz tarafından her 30 dakikada bir 48-72 saat boyunca kaydedildi. Her bir kuyuda bulunan hücre sensörünün direnci, hücre indeksi olarak adlandırılmaktadır. Hücre indeksi, hücrenin bulunduğu kuyunun elektrotunun direncinden (R_n), yalnızca besiyeri bulunan kontrol kuyusu elektrotunun direncinin (R_b) çıkarılıp 15'e bölünmesi ile hesaplandı (Hücre indeksi = $(R_n - R_b)/15$).

4.9.3. Apoptoz ve Anoikise Direncin Belirlenmesi

Doxorubicin'nin (Sigma, ABD) Plexin C1 baskılanan hücrelerdeki pro-apoptotik etkilerini incelemek amacıyla PLC-pLKO, PLC-shPLXNC1, Hep3B-pLKO ve Hep3B-shPLXNC1 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara kuyu başı 1.5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücreler 0, 0.5, ve 2 µg/mL Doxorubicin ile 24 saat inkübe edildi. Triton temelli lizatları hazırlanan hücrelerde Western blot ile kesilmiş PARP proteini

ifadesine bakıldı. Yüzde sağ kalım, imageJ yazılımı ile kesilmiş PARP band yoğunluğunun GAPDH'a oranlanması ile belirlendi.

Anoikis direnci ise PLKO ve shPLXNC1 hücre klonlarının “ultra-low attachment” kültür plakasına ekimiyle incelendi. Hücre klonları kuyu başı 3×10^5 olacak şekilde ekildi ve 48 saat sonra hücreler kuyulardan toplanarak santrifüjlendi. Hücre pelleti 4 nM EDTA ile 37°C'de 5 dk inkübe edilerek hücre topaklarının ayrılması sağlandı. Daha sonra, hücreler PBS ile yıkandı ve 1x bağlanma tamponu ile 100 µl'de 1×10^5 hücre olacak şekilde çözüldü. 5 µl Annexin V antikor ve 5 µl 7-AAD boyası eklenerek 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 300 µl 1x bağlanma tamponu eklenerek Accuri C6 cihazında analiz edildi

4.9.4. Kök Hücre Fenotipi ile İlişkili Proteinlerin İfade Analizi

Plexin C1 ifadesi baskılanmış ve kontrol PLC/PRF/5 ve HEP3B klonlarında kanser kök hücre popülasyonlarındaki değişimler HCC kanser kök hücre belirteçleri CD133, EpCAM, CD90, CD44 ve CD24'e yönelik işaretli antikorlar (CD133-APC, CD44-FITC, CD90-APC, CD13-PerCP, CD24-PE ve EpCAM-APC) (Miltenyi Biotec, ABD) kullanılarak BD Accuri C6 cihazında analiz edildi.

PLC-pLKO ve PLC-shPLXNC1 hücreleri tripsin ile 100 mm plate'den kaldırıldıktan sonra 2 kez PBS ile yıkandı. Santrifüj işlemlerinden sonra hücre pelletleri 100 µl'de 4×10^5 hücre olacak şekilde PBS ile sulandırıldı. Hücreler boyanmak üzere 5 µl CD133, CD24, CD44, EpCAM ve CD90 antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler iki kez PBS ile yıkandı ve hücre pelleti 200 µl PBS ile çözülerek Accuri C6 akım sitometresi cihazında analiz edildi.

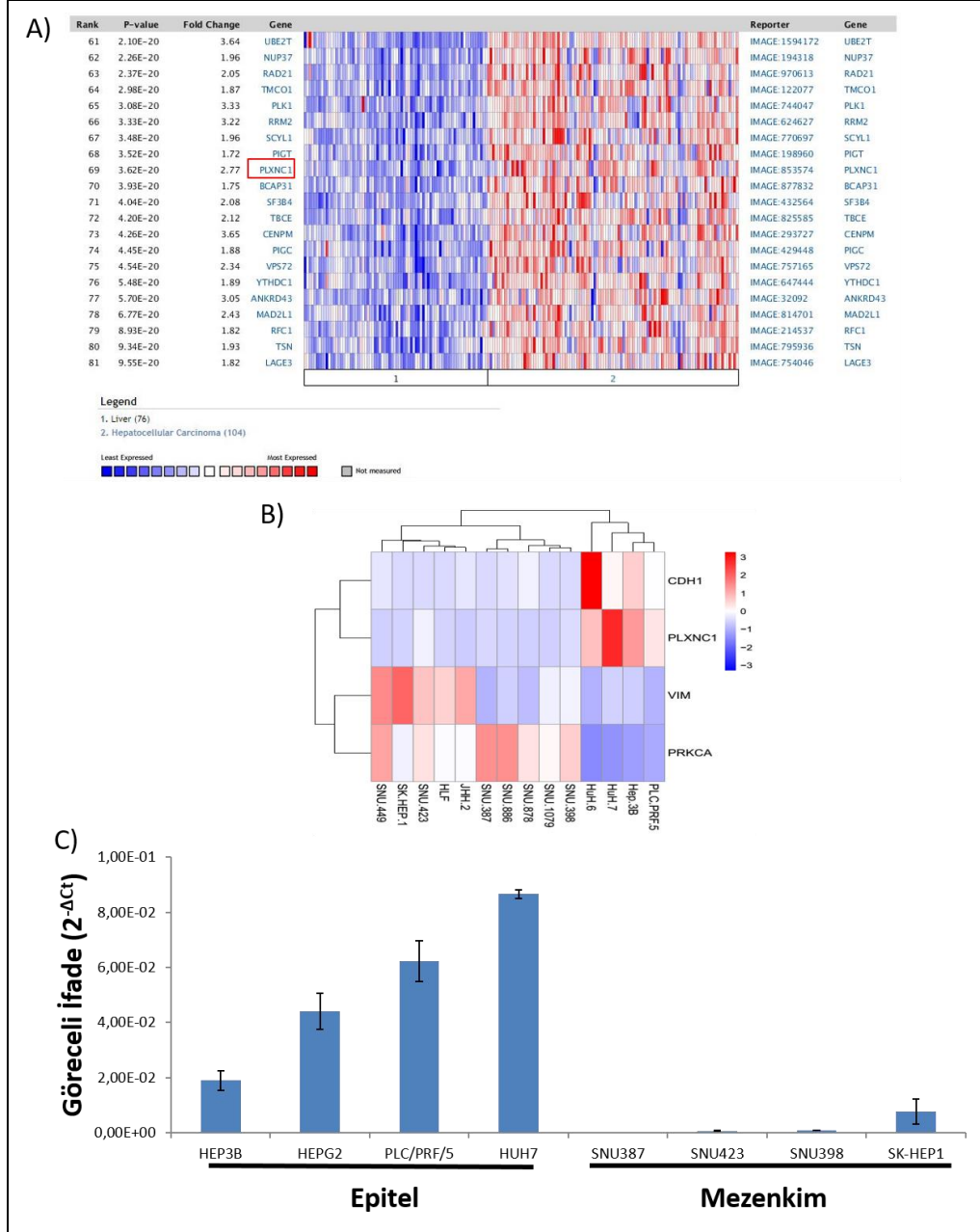
4.10. İstatistiksel Analizler

Tüm çalışmalarda görüntü analizleri ImageJ programı ile yapıldı. İstatistiksel analizler iki yollu Annova veya Student's t-test ile GraphPad Prism 6 kullanılarak gerçekleştirildi. Klinikopatolojik verilerin istatistiksel analizi için ki-kare testi uygulandı.

5. BULGULAR

5.1. HCC’de Plexin C1 Transkript Seviyesinin Analizi

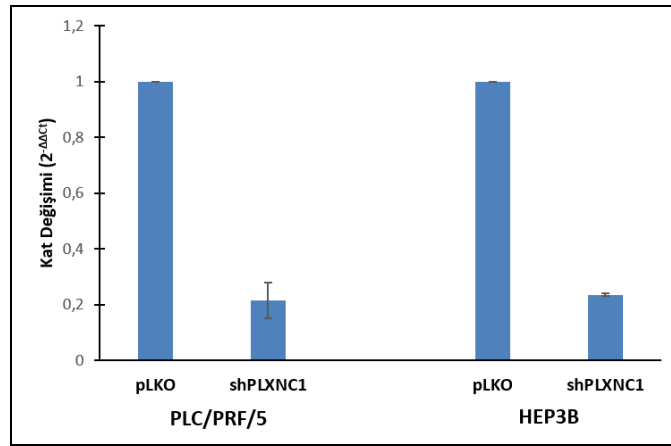
Plexin C1 gen ifadesini HCC’de araştırma amacıyla Oncomine veritabanında mevcut olan “Chen Liver” mikrodizin veri seti (10.802 adet genin 76 normal ve 104 HCC doku örneğindeki gen ifadesini barındırmaktadır) incelenmiştir. Bu veri setinde HCC dokuları eşlenik tümörsüz bölge ile kıyaslandığında *PLXNC1* mRNA ifadesinin istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edildi ($p=3.62e-20$) (Şekil 5.1a). HCC dokuları ve tümörsüz eşlenik dokular arasında *PLXNC1* ifadesindeki bu fark bizleri HCC hücre hatlarının farklılaşma statüsü ile Plexin C1 transkript seviyeleri arasında bir bağlantı olup olmadığını araştırmaya yönlendirdi. Bu amaçla, “EMBL-EBI Expression Atlas” veri tabanında HCC hücre hatlarındaki *PLXNC1* ifadeleri incelendi. HCC hücre hatlarının farklılaşma seviyelerinin tespiti için epitel belirteç *CDH1* ve mezenkim belirteçler *PRKCA* ve *VIM* transkript seviyelerinden yararlanıldı. İlginç olarak, *PLXNC1*’in bir epitel belirteç olan *CDH1* gibi epitel karakteristikteki HCC hücre hatlarını kümeleyebildiği tespit edildi. Diğer yandan mezenkim karakterli HCC hücrelerinde ise neredeyse hiç *PLXNC1* ifadesi olmadığı tespit edildi (Şekil 5.1b). HCC’de *in silico* düzeyde yapılan araştırmaların doğrulanabilmesi adına HCC hücre hatlarındaki *PLXNC1* ifadesi RT-qPCR yöntemi ile saptandı. Plexin C1 transkript seviyesinin epitel karakterli HCC hücre hatları HEP3B, HEPG2, PLC/PRF/5 ve HUH7’de yüksek olduğu, fakat mezenkim karakterli HCC hücre hatları SNU387, SNU423, SNU398 ve SK-HEP1’da nispeten daha düşük seviyede olduğu tespit edildi (Şekil 5.1c).



Şekil 5.1: *PLXNC1* transkript seviyesinin HCC dokuları ve hücre hatlarında incelenmesi. A) 10,802 adet genin 104 HCC ve 76 normal karaciğer dokusunda kıyaslandığı “Chen liver” mikrodizinin veri setinde Plexin C1 ifadesinin analizi. Normal dokular ile kıyaslandığında *PLXNC1* ifadesi HCC dokularında 2,77 kat artmaktadır. B) “EMBL-EBI Expression Atlas” veri tabanında HCC hücre hatlarının *PLXNC1*, *CDH1*, *PRKCA* ve *VIM* transkript seviyeleri baz alınarak farklılaşma düzeylerine göre kümelenmesi. PLC/PRF/5, HEP3B, HUH7 ve HUH6 hücre hatları epitel karakterli kümeyi oluştururken, SNU398, SNU1079, SNU878, SNU886, SNU37, JHH2, HLF, SNU423, SK-HEP1 ve SNU449 hücre hatları mezenkim fenotiplidir. C) Epitel karakterli HEP3B, HEPG2, PLC/PRF/5 ve HUH7 hücre hatları ile mezenkim fenotipli SNU37, SNU423, SNU398 ve SK-HEP1 hücre hatlarında *PLXNC1* transkript seviyesinin RT-qPCR ile analizi. Her bir hücredeki göreceli *PLXNC1* ifadesi aynı hücrenin GAPDH transkript seviyesine oranlanarak hesaplandı.

5.2. ShPlxnC1 ve Plko.1 Klonlarının Geliştirilmesi

Plexin C1'in HCC gelişiminde moleküler ve fonksiyonel etkilerinin tespit edilebilmesi amacıyla *PLXNC1*'i hedefleyen lentiviral shRNA partikülleri ve yüksek endojen *PLXNC1* ifadesine sahip PLC/PRF/5 ve HEP3B hücre hatları kullanılarak *PLXNC1* baskılanmış (sh*PLXNC1*) ve kontrol (pLKO) HCC hücre klonları geliştirildi. Doğrulukları RT-qPCR ile tespit edilen klonlar ayrıca anti-Plexin C1 monoklonal antikorların validasyonu amacıyla ilerleyen çalışmalarda kullanıldı (Şekil 5.2).



Şekil 5.2: HCC hücre klonların *PLXNC1* baskılanma seviyeleri. *PLXNC1*'i hedefleyen shRNA'lar veya kontrol plazmit ile transfekte edilen PLC/PRF/5 ve HEP3B hücre hatlarında hedef genin mRNA seviyesindeki azalma RT-qPCR analizi ve $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre tespit edildi.

5.3. PLEXIN C1 Proteinine Özgül Monoklonal Antikor Geliştirilmesi

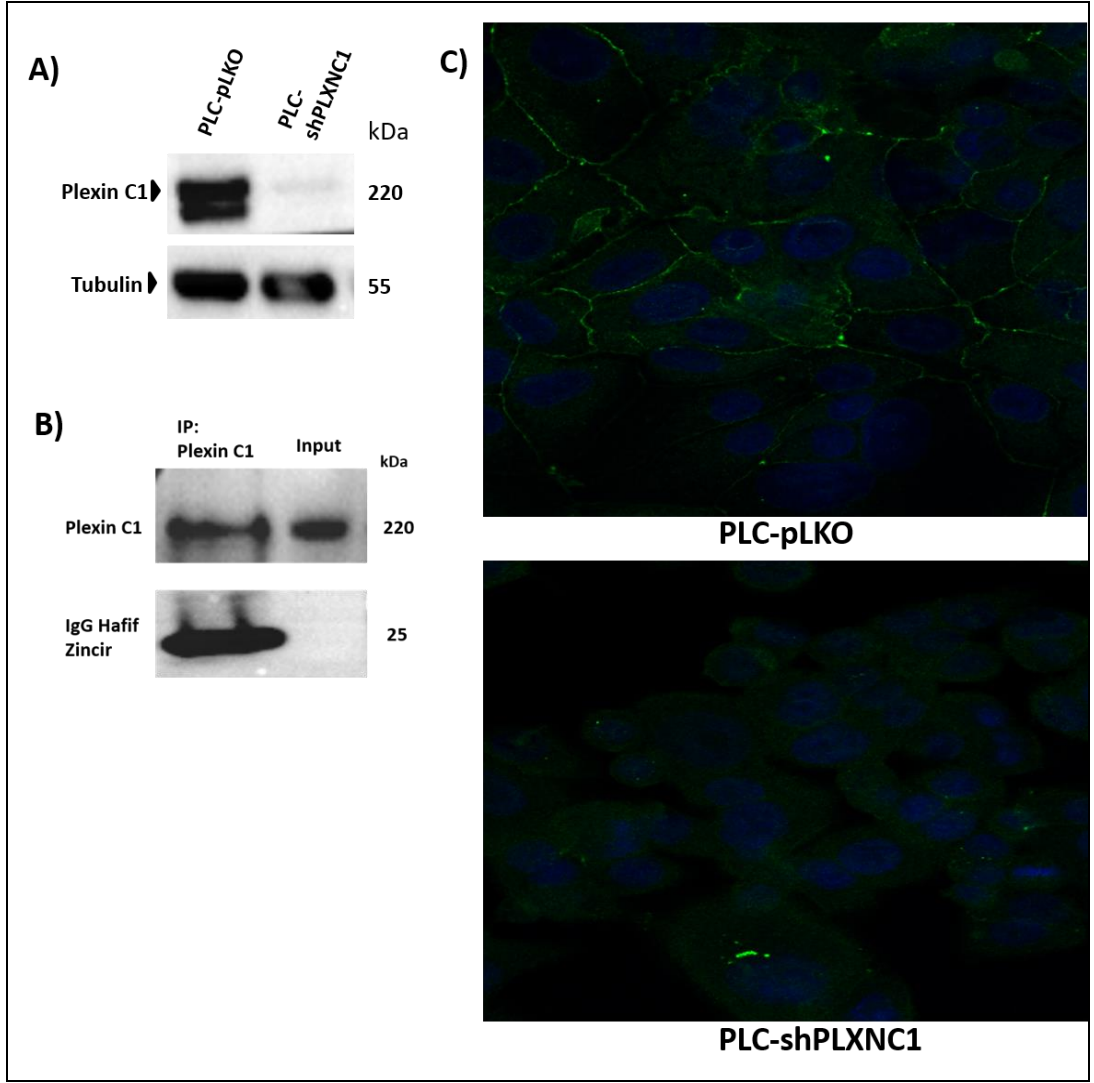
5.3.1. Rekombinant Protein Üretimi, Farelerin Bağışıklanması ve Hibridoma Hücrelerinin Oluşturulması

HCC hücre hatları ve dokularındaki Plexin C1 protein seviyelerinin analiz edilmesi amacıyla Plexin C1'in hücre dışı bölgesini hedefleyen monoklonal antikorların geliştirilmesi adımları takip edildi. Bu amaçla ilk olarak Plexin C1 proteininin hücre dışı bölgesine karşılık gelen (aa66-274) kodlama bölgesi pET101/D

vektörüne klonlanarak BL21 *Escherichia coli* suşunda üretildi. Elde edilen rekombinant protein BALB/C farelerin bağışıklanması amacıyla kullanıldı. 6-8 haftalık BALB/C fareler 2 hafta aralıklarla Freund's adjuvanı içerisinde hazırlanmış rekombinant protein ile immünize edildi. Birinci immünizasyon complete Freund's adjuvanı ile devam eden immünizasyonlar ise incomplete Freund's adjuvanı ile gerçekleştirildi. En yüksek bağışıklık seviyesindeki farenin dalak hücreleri SP2/0 fare myelom hücreleri ile birleştirilerek antikor üreten hücrelerin ölümsüleştirilmesi sağlandı. Alt klonlama işlemleri ile monoklonalitesi sağlanan hibridoma hücreleri aşamalı çoğaltma ile dondurulup saklandı. ELISA testlerinde her kuyusu pozitif reaksiyon gösteren ve izotipi IgG2a olarak belirlenen monoklonal hibridoma klonu PE4'den elde edilen hücre üst-sıvısında bulunan antikorlar Protein G afinite klon yardımı ile saflaştırılıp moleküler analizlerde kullanılmak amacıyla -20°C'de saklandı.

5.3.2. Anti-Plexin C1 PE4 Antikorumun Validasyonu

PE4 antikorumun Plexin C1 proteinine karşı olan özgüllüğü western blotlama, immunfloresan ve immün-çöktürme yöntemleri ile test edildi. PE4 antikorumun western blotlama yöntemi ile Plexin C1 proteinini beklenen boyutunda kontrol PLC-pLKO hücrelerinden elde edilen lizatta tanıdığı, buna karşın Plexin C1 ifadesinin baskılandığı PLC-shPLXNC1 hücre lizatında Plexin C1 protein sinyalinin kaybolduğu gözlemlendi (Şekil 5.3a). Benzer şekilde PE4 antikorumun Plexin C1 proteinini kontrol of PLC-pLKO hücrelerinin membranlarında tanıdığı fakat PLC-shPLXNC1 hücrelerinde herhangi bir membran proteinini tanımadığı tespit edildi (Şekil 5.3b). Diğer taraftan PLC/PRF/5 hücre hattından elde edilen lizat içeriğinde Plexin C1 proteininin PE4 antikoru ile başarılı bir şekilde çöktürülebildiği tespit edildi. Bu sonuçlar PE4 antikorumun Plexin C1 proteininin hem native (doğal) hem de lineer (reduced) formlarını tanıyabildiğini ortaya koymaktadır (Şekil 5.3c).



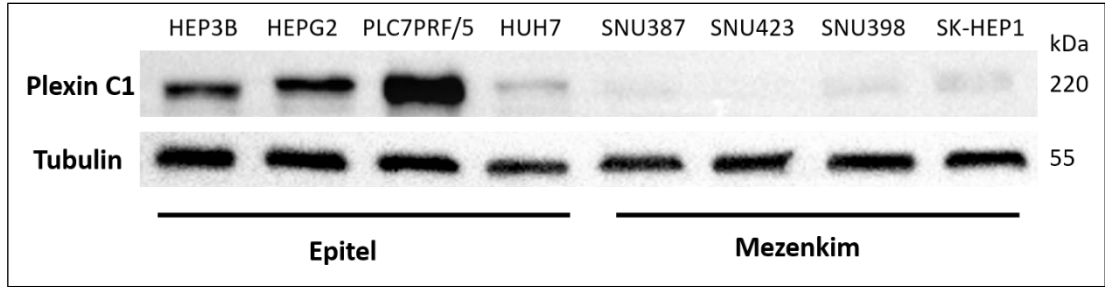
Şekil 5.3: Anti-Plexin C1 monoklonal antikor PE4'ün validasyonu. A) shPLXNC1 veya pLKO.1 kontrol lentiviral partikülleri ile transfekte edilmiş PLC/PRF/5 hücrelerinden elde edilen total proteinler SDS-PAGE'de yürütölüp PE4 ile blotlandı. Eş yükleme kontrolü için anti-tübülün monoklonal antikor kullanıldı. B) PE4 antikor ile gerçekleştirilen immün-çöktürme. Plexin C1 proteini PLC/PRF/5 hücre lizatından PE4 antikor ile çöktürölldü, SDS-PAGE'de yürütölldü, PE4 antikor ile western blotlamaya tabi tutuldu. İnput olarak aynı lizatın %5'i jele yüklendi. C) PLC-pLKO ve PLC-shPLXNC1 hücrelerinin PE4 monoklonal antikor ile immünboyanmaları sonucu elde edilen immünfloresan görüntülerine örnekler.

5.4. HCC’de Plexin C1 Protein Seviyesinin *in vitro* ve *in vivo* Tespit Edilmesi

Gerçekleştirilen *in silico* ve *in vitro* transkript analizleri sonucunda epitel karakterli HCC hücre hatlarında yüksek ifadesi tespit edilen Plexin C1’in protein seviyesindeki karşılığını inceleme amacıyla HCC hücre hatlarından elde edilen lizatlarda ve HCC dokularını içeren mikrodizinlerde Plexin C1 protein seviyesi PE4 monoklonal antikoru kullanılarak tespit edildi.

5.4.1. HCC Hücre Hatlarında Plexin C1 Protein Seviyesinin Analizi

HCC hücrelerinde gerçekleştirilen *in silico* analizin doğrulanabilmesi amacıyla PE4 antikoru kullanılarak çeşitli HCC hücre hatlarında Western blotlama yöntemi gerçekleştirildi. Hem RT-qPCR hem de biyoinformatik verileri doğrular şekilde epitel fenotip sergileyen PLC/PRF/5, HEP3B, HEPG2 ve HUH7 hücre hatlarında yüksek Plexin C1 ifadesi saptanırken, mezenkim karakterli SNU387, SNU423, SNU398 ve SK-HEP1 hücre hatlarında Plexin C1 ifadesinin düşük olduğu tespit edildi (Şekil 5.4).

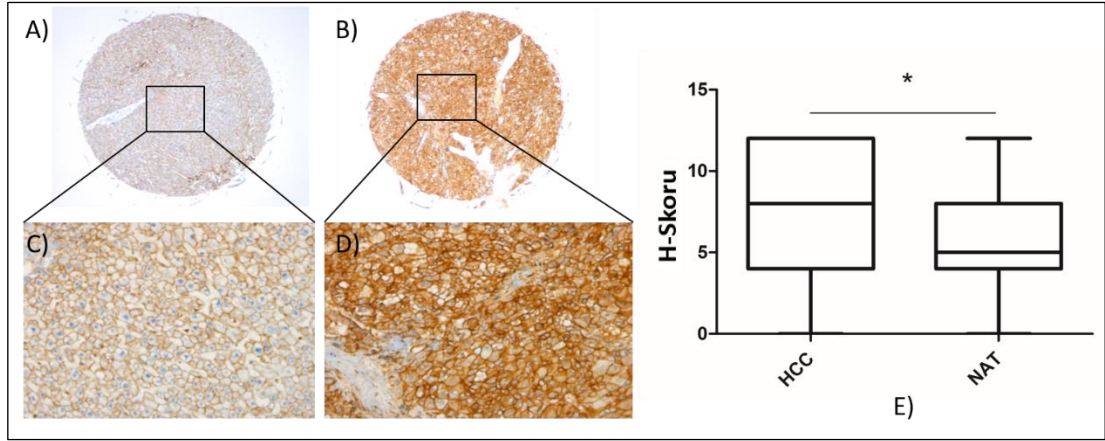


Şekil 5.4: HCC hücre hatlarında Plexin C1 protein ifadesi. Plexin C1 ifadesi epitel karakterli HEP3B, HEPG2, PLC/PRF/5 ve HUH7 ile mezenkim özellik gösteren SNU387, SNU423, SNU398 ve SK-HEP1 hücre hatlarında analiz edildi. Plexin C1 proteini geliştirdiğimiz PE4 monoklonal antikoru ile tespit edilirken eş yükleme kontrolü olarak anti-tubulin antikoru kullanıldı.

5.4.2. HCC Doku Dizinlerinde Plexin C1 Protein Seviyesinin *in vivo* Tespit Edilmesi

Plexin C1'in HCC dokusundaki protein ifadesini *in vivo* saptama amacıyla, 90 HCC ve eşlenik normal dokudan oluşan doku mikro dizinininde (HLiv-HCC180Sur-03, USBiomax, ABD) PE4 antikorunu kullanarak immünohistokimya çalışması gerçekleştirildi. Bu çalışmanın sonucunda, PE4 monoklonal antikorunun hem hepatositlerin hem de HCC'li tümör hücrelerinin membranlarını spesifik olarak tanıyabildiği gözlemlendi (Şekil 5.5a-d). Tümörlü dokularda gözlenen Plexin C1 protein seviyesinin eşlenik tümörsüz bölgelere göre anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi ($p=0.0118$) (Şekil 5.5e).

İmmünohistokimya analizi ile elde Plexin C1 skorları, hasta örneklerinin klinikopatolojik parametreleri ile kıyaslandığında, Plexin C1 seviyesinin, yaş, cinsiyet, hastalık aşaması (stage) ve sağkalım ile ilişkili olmamasına rağmen, HCC dokularının histolojik diferensiyasyonu (grade) ile korelasyon gösterdiği saptandı (Tablo 5.1). İyi farklılaşmış HCC dokularının (Grade I, I-II ve II) %66.15'i güçlü Plexin C1 sinyaline sahipken, kötü farklılaşmış HCC dokularında (Grade II-III ve III) bu oran %55 olarak tespit edildi. Buna karşılık düşük Plexin C1 sinyaline sahip vakaların sayısı, kötü farklılaşmış HCC dokularında iyi farklılaşmışlara kıyasla çok daha yüksekti (%36'ya karşı %13.85).



Şekil 5.5: Anti-Plexin C1 monoklonal antikor ile boyanan HCC mikrodizinin görüntüleri. A) Tümörsüz çevre dokulardaki (NAT) Plexin C1 boyanmasına örnek (x50 büyütme). B) HCC’li dokulardaki Plexin C1 boyanmasına örnek (x50 büyütme). C) A’daki görüntünün yakın çekimi (x200 büyütme). D) B’deki görüntünün yakın çekimi (x200 büyütme). E) HCC’li ve tümörsüz eşlenik dokuların Plexin C1 seviyelerini temsil eden Histo skorlar (H-skor) eşli t-testi ile kıyaslandı ($p < 0.05$). Her bir vakanın H-skorları “box&whisker” gösterimi ile grafiğe geçirildi. NAT: Non-associated tumor.

Tablo 5.1: Plexin C1 boyanması ile hastaların klinikopatolojik karakteristikleri arasındaki korelasyon.

		Plexin C1 Boyanması			P
	N	Negatif	Zayıf	Güçlü	
Yaş					0.67
≤60	65	10 (15,38%)	12 (18,46%)	43 (66,15%)	
>60	25	5 (20%)	6 (24%)	14 (56%)	
Cinsiyet					0.799
K	16	3 (18,75%)	4 (25%)	9 (56,25%)	
E	74	12 (16,22%)	14 (18,92%)	48 (64,86%)	
Sınıf					0.398
1&2	52	11 (21,15%)	8 (15,38%)	33 (63,46%)	
3	31	4 (12,9%)	8 (25,81%)	19 (61,29%)	
Diferansiyasyon					0.043*
İyi-Farklılaşmış	65	13 (20%)	9 (13,85%)	43 (66,15%)	
Kötü-Farklılaşmış	25	2 (8%)	9 (36%)	14 (56%)	
Patolojik Durum					0.204
Sirozlu HCC	16	5 (31,25%)	2 (12,5%)	9 (56,25%)	
HCC	74	10 (13,51%)	16 (21,62%)	48 (64,86%)	

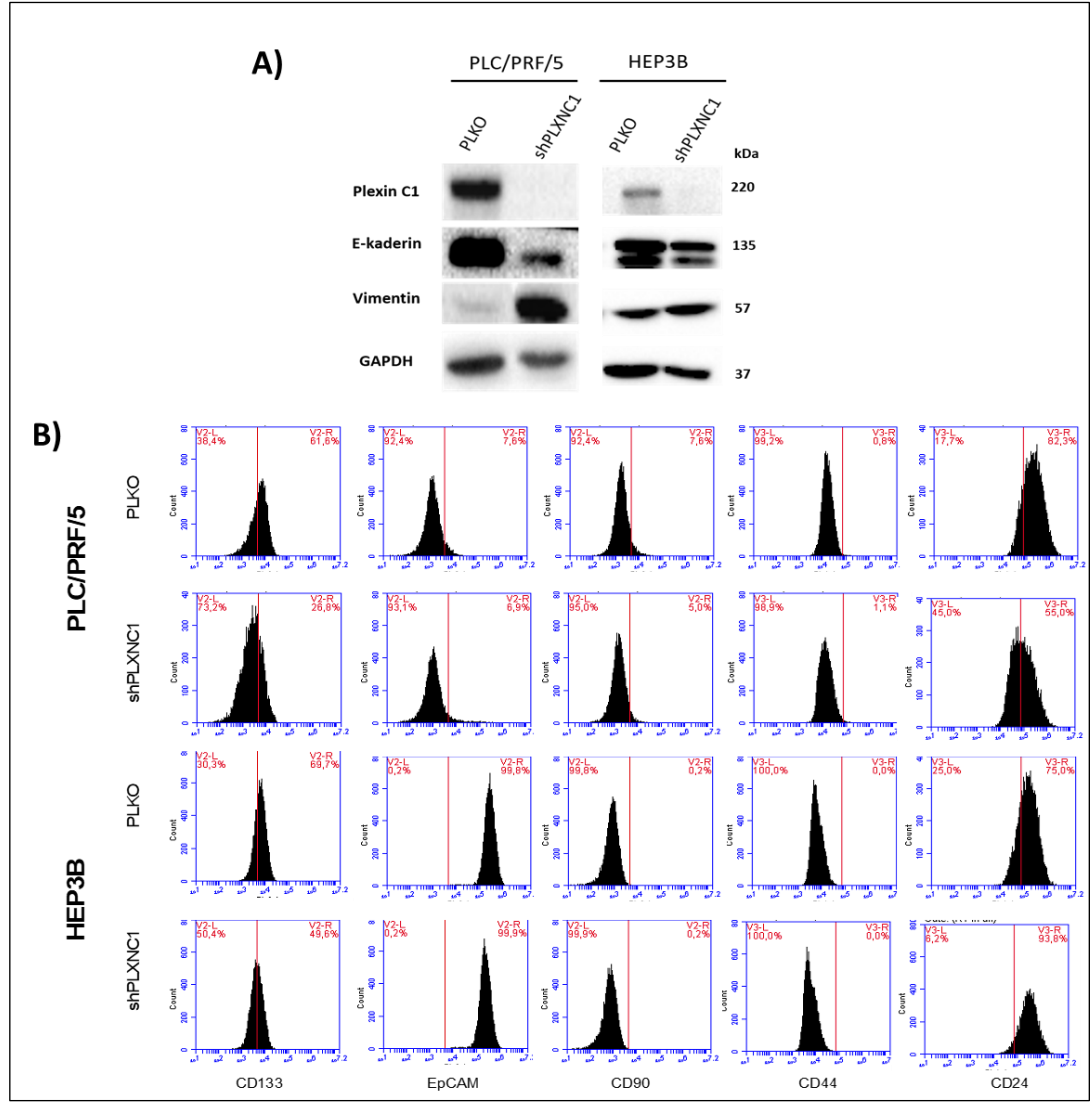
N: Vaka sayısı. Korelasyon analizleri için Ki-Kare istatistik metodu kullanılmıştır. Plexin C1 boyanmaları H-Skorları temel alınarak sınıflandırılmıştır: 0 = negatif; 1-6 = zayıf; 7-12 = güçlü.

5.5. Plexin C1'in HCC Hücrelerinin EMT Profiline Etkisi

Plexin C1 proteininin epitel fenotipli HCC hücre hatlarında mezenkim karakterli olanlara göre çok daha yüksek seviyede ifade ediliyor olması bizi Plexin C1'in hepatokarsinogenezin en önemli ayaklarından biri olan EMT sürecinde rol alabileceğini düşündürdü. Plexin C1'in EMT sürecine olan etkisi araştırabilmek için Plexin C1'in baskılandığı veya kontrol HCC hücre hatlarında EMT belirteçlerinin moleküler ve fonksiyonel düzeydeki değişimleri incelendi.

5.5.1. Plexin C1'in EMT'yi Yönlendiren Moleküllerin Değişimine Etkisi

Plexin C1 mRNA seviyesinin baskılandığı hücre klonlarında EMT belirteçlerinin değişimi kontrol klonlarına göre değerlendirildi. PLC-pLKO, PLC-shPLXNC1, HEP3B-pLKO ve HEP3B-shPLXNC1 klonları kullanılarak gerçekleştirilen Western blotlama çalışmasında Plexin C1'in baskılandığı HCC hücre klonlarında epitel belirteç E-kaderin proteininin azaldığı mezenkim belirteçlerden vimentin proteininin ise arttığı tespit edildi (Şekil 5.6a). Diğer taraftan PLC-pLKO, PLC-shPLXNC1 klonları ile gerçekleştirilen akım sitometresi çalışmasında Plexin C1 baskılanmış hücre klonlarında epitel karakteristiğinin belirteçlerinden CD133 protein seviyesi de PLC/PRF/5'de %61,6'dan %26,8'e ve Hep3B'de %69,7'den %49,6'ya düşmüştür. Buna karşın PLC/PRF/5'de CD24+ hücre yüzdesi azalırken (%82,5'ten %55'e), Hep3B'de ise artmaktadır (%75'ten %93,6'ya) (Şekil 5.6b).

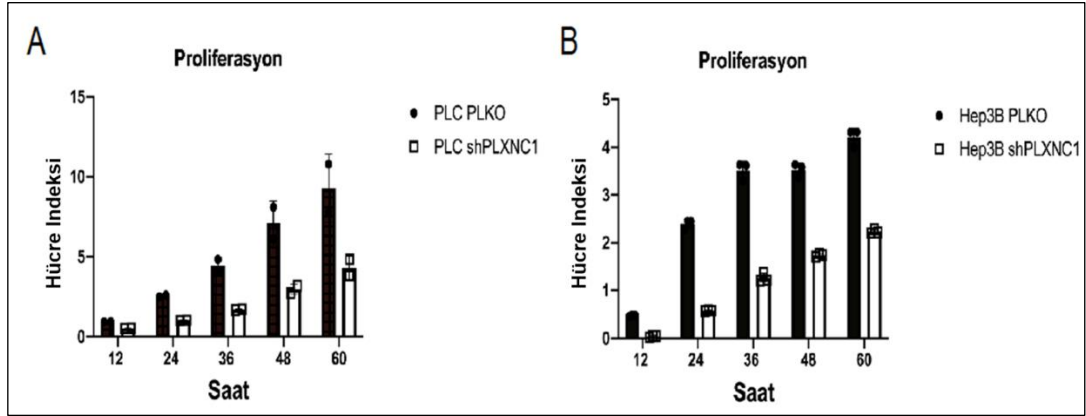


Şekil 5.6: Plexin C1'in EMT belirteçlerine etkisi. A) shPLXNC1 ve shPLKO.1 kontrol lentiviral partikülleri ile enfekte edilmiş PLC/PRF/5 ve HEP3B hücrelerinden elde edilen total proteinlerde Plexin C1, E-kaderin, Vimentin proteinlerinin ifadeleri western blotlama ile tespit edilmiştir. Eş yükleme kontrolü için anti-GAPDH antikoru kullanılmıştır. B) PLC/PRF/5 ve HEP3B klonlarında kanser kök hücre (KKH) belirteçlerinin analizi. HCC'da KKH belirteçleri olan CD133, EpCAM, CD90, CD44, ve CD24 antikorlarının yüzdeleri boyasız kontrol hücrelerine göre FACS analizi ile belirlendi.

5.5.2. Plexin C1 bağımlı EMT Sürecinin Fonksiyonel Düzeyde Araştırılması

- Plexin C1'in HCC hücre proliferasyonuna etkisi

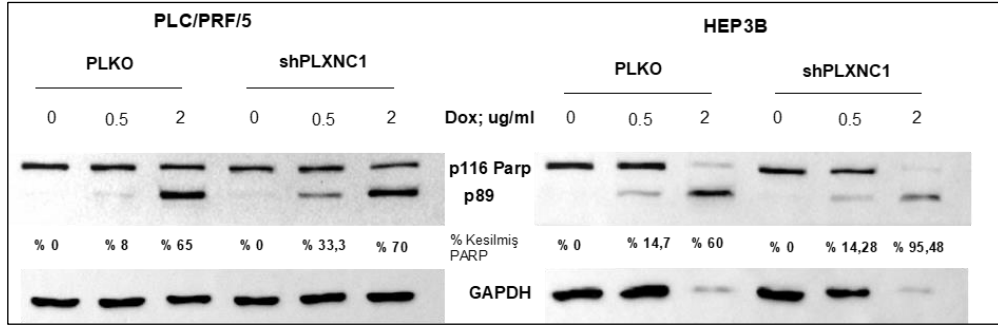
Plexin C1'in baskılandığı veya kontrol HCC hücre klonlarında Plexin C1'in hücre proliferasyonuna etkisi xCELLigence sistemi gerçek zamanlı olarak ölçülüp grafiğe döküldü. 72. saatin sonucunda Plexin C1 baskılanmasının hücre proliferasyonunu anlamlı şekilde düşürdüğü tespit edildi (Şekil 5.7).



Şekil 5.7: Plexin C1'in HCC hücre hatlarının proliferasyon seviyelerine etkisi. PLC-PLKO, PLC-shPLXNC1, HEP3B-PLKO ve HEP3B-shPLXNC1 HCC hücre klonları xCELLigence plate'lerine ekilerek 72 saat boyunca gerçek zamanlı olarak ölçüm alındı.

- Plexin C1'in HCC hücrelerinin apoptoza direnç mekanizmalarına olan etkisi

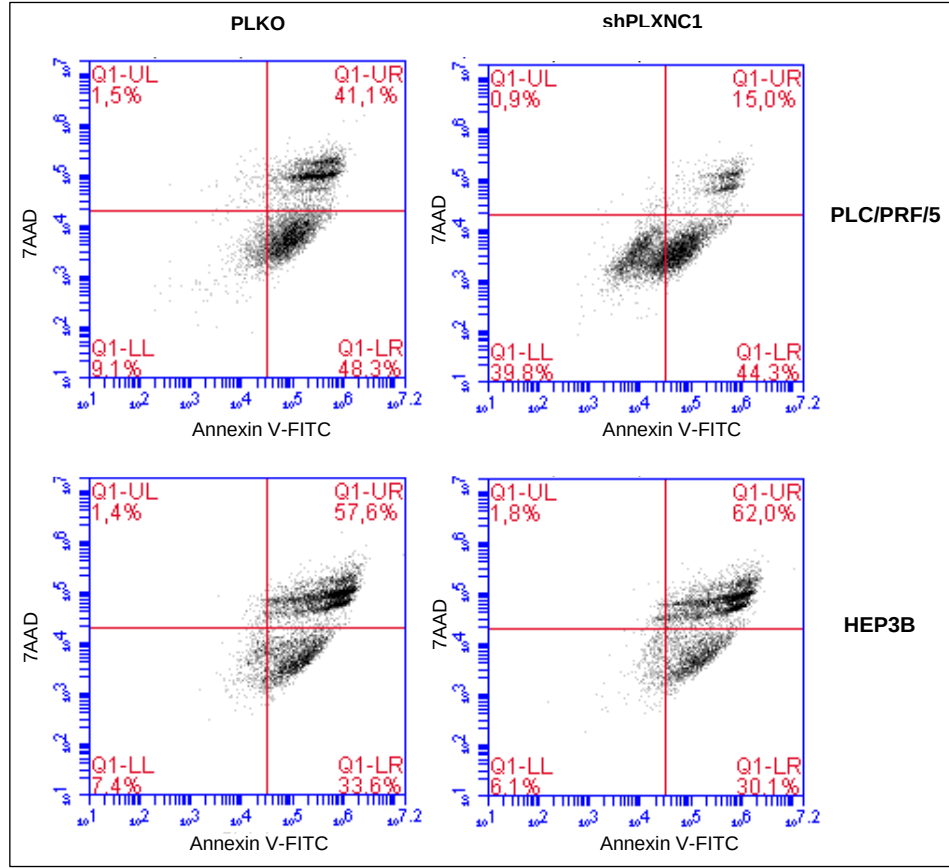
Plexin C1 bağımlı ilaç yanıtını ölçebilme amacıyla Plexin C1 baskılanmış ve kontrol HCC hücre klonları doxorubisin kemoterapötik ajanı ile gece boyunca muamele edilerek total hücre lizatlarında PARP proteininin kesilme seviyesi Western blotlama ile tespit edildi (Şekil 5.8).



Şekil 5.8: HCC hücre hatlarında Plexin C1 bağımlı ilaca yanıtın değerlendirilmesi. PLC-PLKO, PLC-shPLXNC1, HEP3B-PLKO ve HEP3B-shPLXNC1 HCC hücre klonları gece boyunca 6 kuyulu plakalarda ekildikten sonra 24 saat boyunca 0, 0.5, ve 2 µg/mL Doxorubicin ile muamale edildi. Ertesi gün total lizatları elde edilen hücrelerde kesilmiş PARP yüzdesi imageJ’de belirlenip GAPDH’a göre oranlandı. GAPDH eş-yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

HCC hücre klonlarında Doxorubicin muamelesi ile apoptoza direnç PARP kesilimi gözlemlenerek tespit edildi. PLC/PRF/5 hücre hattında düşük konsantrasyondaki (0.5 µg/ml) doxorubisin ilacına yanıtlar dikkate alındığında Plexin C1 baskılanmasının apoptoza hassasiyeti arttırdığı gözlemlendi. Diğer taraftan Plexin C1 baskılanmış ve kontrol HEP3B hücre hattında düşük konsantrasyonda apoptoza dirençte bir farklılık gözlemlenmemiş, yüksek konsantrasyonda (2 µg/ml) ise Plexin C1 baskılanmış HEP3B hücre klonunda apoptoz hassasiyetinin arttığı tespit edilmiştir.

Diğer taraftan kanser hücrelerinin yüzeye bağlanmadan yaşayabilme kapasitelerini gösteren anoikis direncinin ölçümü amacıyla HCC hücre klonları “low-attachment” plakalara ekildi ve iki gün sonra hücrelerin apoptoz oranları akımsitometresi ile ölçüldü (Şekil 5.9).



Şekil 5.9: shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının anoikis direnci. Q1-LL: Sağlıklı; Annexin V-/7AAD-, Q1-LR: Erken Apoptotik; Annexin V+/7AAD-, Q1-UR: Apoptotik, Annexin V+/7AAD+, Q1-UL: Nekrotik, Annexin V-/7AAD+.

PLC/PRF/5 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre PLXNC1'in baskılandığı durumda hücrelerde anoikis direnci görünmekte ve sağlıklı hücre miktarı (Q1-LL: %9,1'den %39,8'e) artmaktadır. Buna karşın HEP3B hücre klonlarında ise PLXNC1 ifadesine bağlı bir anoikis direnci gözlenmemiştir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

HCC karaciğer kanserinin en sık görülen alt tipi olup dünyada kansere bağlı ölümler arasında 3. sıradadır [Sung et al., 2021]. Başlangıç aşamalarında tespit edilen HCC oluşumu radio ablasyon gibi invaziv yollar ile müdahale edilirken [Llovet et al., 2005], [Villanueva et al., 2013], ileri evre HCC vakalarında geniş çaplı RTK (Reseptör Tirozin Kinaz) inhibitörü olan sorafenib veya lenvatinip ile müdahale edilmekte, sorafenibe karşı direncin geliştiği durumlarda ise regorafenib ile tedaviye devam edilmektedir [Bruix et al., 2017]. Günümüzde bu üç RTK inhibitörü ilaç klinik olarak kullanılmakta olsalar da istatistiksel olarak ortalama bir ileri evre HCC hastasının ömürünü ancak 10,6 ay kadar uzatabilmektedir [Bruix et al., 2017].

HCC de dahil olmak üzere pek çok solid tümörün klinikte kullanıma sahip RTK inhibitörlerine karşı direnç kazanmalarındaki en temel etkenlerden biri EMT sürecidir. EMT, sadece hücre morfolojisi ve moleküler düzeydeki değişimler ile sınırlı kalmayıp tümör hücrelerinin apoptoza direnç, kök hücre karakteristiğindeki değişim ve ilaca direnç gibi yeni özellikler kazanmalarını veya var olan bu özelliklerinin daha yüksek bir seviyeye erişmesini teşvik etmektedir [Guarino et al., 2007], [Friedl et al., 2003]. İşte bu sebeple hepatokarsinogenezin gelişim sürecinde ifadesi değişen ve/veya ileri evre HCC vakalarının ilaca direnç mekanizmalarının aydınlatılabilmesini sağlayacak yeni moleküler belirteçlerin keşfedilmesi HCC'nin klinik düzeyde yönetimi açısından son derece önemlidir.

Plexin ve Semaforin aileleri, akson yönelimi ve sinir sistemi gelişimde hayati roller üstlenmekte olup iki ailenin de pek çok üyesi bulunmaktadır [Tamagnone et al., 1999]. Sinir sisteminde aldıkları rollere ek olarak bu ailelerin çeşitli üyelerinin günümüzde tümör oluşumunda yaptıkları görevler yakın dönemdeki çalışmalar ile ortaya konmuştur [Tamagnone, 2012], [Worzfeld and Offermanns, 2014]. Plexin ailesi üyelerinden Plexin C1 ise özellikle Melanom kanseri özelinde detaylıca çalışılmış olsa da [Scott et al., 2009], [Chen et al., 2013] ne diğer kanser tipleri ne de HCC özelinde detaylıca ele alınmamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında daha önce HCC'de incelenmemiş olan Plexin C1 reseptör proteini HCC ve EMT bağlamında incelemeye alınmıştır. Bu amaçla öncelikle

HCC vakalarının transkriptom verilerinin bulunduğu veri tabanlarında *in silico* taramalar gerçekleştirildi. Oncomine veri tabanında yapılan incelemeler sonucunda Plexin C1 transkript seviyesinin HCC vakalarında normal karaciğer dokularına kıyasla daha yüksek seviyede seyrettiği tespit edildi. Bu durum bizlere Plexin C1 gen ifadesinin HCC oluşumu için önem teşkil ettiğini düşündürdü. Bu bulgu üzerine EMBL-EBI veri tabanında gerçekleştirilen bir diğer *in silico* analiz ile *PLXNC1* mRNA ifadesinin seçimli olarak epitel fenotipteki HCC hücre hatlarında yüksek seviyede olduğu buna karşın mezenkim karakterli HCC hücre hatlarında çok daha düşük seviyede seyrettiği tespit edildi. Bu bulgu bizlere Plexin C1 ifadesinin HCC hücre hatlarının EMT fenotipi ile ilişkili olabileceğini düşündürdü.

In silico taramalarımızın sonuçlarını valide edebilme amacı ile epitel ve mezenkim karakterli HCC hücre hatlarından oluşan bir panelde Plexin C1 transkript seviyesini RT-qPCR ile inceledik. Gerçekleştirdiğimiz bu transkript analizi ile Plexin C1'in mezenkim karakterli HCC hücre hatlarına kıyasla epitel karakterli HCC hücre hatlarında çok daha yüksek seviyede ifade edildiğini gözlemledik. Bu sayede biyoinformatik yollar ile elde ettiğimiz verilerimizi *in vitro* düzeyde doğruladık.

Transkript seviyelerinin protein düzeyine nasıl yansıdığını anlayabilme amacıyla Plexin C1 proteininin N terminal bölgesini tanıyan monoklonal antikörlerin üretimi gerçekleştirildi. Hibridoma teknolojisi ile üretilen anti-Plexin C1 monoklonal antikörlerin western blotlama, immüno floresan görüntüleme ve immün-çöktürme deneyleri ile Plexin C1 proteininin hem native (doğal) hem de denatüre halini tanıyabildiği kanıtlandı. Ardından Plexin C1 transkript seviyesinin protein seviyesindeki karşılığını anlayabilme amacıyla HCC hücre hatlarından elde edilen total proteinler ve PE4 antikoru kullanılarak western blotlama çalışması gerçekleştirildi. Plexin C1 protein ifadesinin gerçekten de HEP3B, HEPG2 ve PLC/PRF/5 gibi epitel fenotipli HCC hücre hatlarında yüksek, buna karşın SNU387, SNU423, SNU398 ve SK-HEP1 gibi mezenkimal fenotipli hücrelerde çok daha düşük seviyede olduğu görüldü.

Plexin C1 ifadesinin hem transkript hem de protein seviyesinde epitel karakteristik ile paralellik göstermesi Plexin C1'in EMT geçişinde rol alabileceği hipotezini güçlendirdi. Bu hipotezimizi doğrulayabilme amacıyla Plexin C1 ifadesinin shRNA ile baskılandığı PLC-shPLXNC1 ve HEP3B-shPLXNC1 ile kontrol PLC-pLKO ve HEP3B-pLKO hücre klonları oluşturuldu. Hipotezimizi doğrular nitelikte kontrol

hücreleri ile kıyaslandığında Plexin C1 ifadesinin baskılandığı hücre klonlarında epitel karakter belirteçlerinin azaldığı mezenkim karakter belirteçlerinin ise arttığı tespit edildi. Diğer taraftan PLC-pLKO, PLC-shPLXNC1 klonları ile gerçekleştirilen akım sitometresi çalışmasında Plexin C1 baskılanmış hücre klonlarında epitel karakteristiğinin belirteçlerinden CD133 protein seviyesi PLC/PRF/5'de %61,6'dan %26,8'e ve Hep3B'de %69,7'den %49,6'ya düşmüştür. Diğer taraftan PLC/PRF/5'de CD24+ hücre yüzdesi Plexin C1 baskılanması sonucunda azalırken (%82,5'ten %55'e), Hep3B klonlarında artmaktadır (%75'ten %93,6'ya). CD133 değişimi Plexin C1 baskılanmasının her iki HCC hücre hattında da epitel fenotipin azalmasına yol açtığına bir başka kanıtı olmuştur. Diğer taraftan daha çok mezenkim karakteristik ile ilişkilendirilen CD24 yüzey belirteci HEP3B'de Plexin C1 baskılanmasına paralel olarak artarken, PLC/PRF/5 hücre hattında tam tersi şekilde değişmiştir. Tüm bu sonuçlar HCC hücrelerinde Plexin C1 ifadesinin epitel fenotipin sürdürülebilmesi için gerekli olduğunu ortaya koymuş olup, Plexin C1 yokluğu durumunda mezenkimal yüzey reseptörlerinin değişimi hücre hatları arasında farklılık göstermiştir. Bu veriler EMT profilinin tek bir hücre yüzey molekülünün değişimi üzerinden yorumlanmaması gerektiği sonucunu çıkarmıştır.

Plexin C1'in EMT sürecindeki fonksiyonel rolleri proliferasyon ve apoptoza direnç deneyleri ile de test edilmiştir. Aktifleşen EMT programının hücrelerin proliferasyonunu azalttığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Vega vd., 2004; Mejlvang vd., 2007). Buradan yola çıkarak, PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarının proliferasyonları incelendiğinde her iki hücrenin de shPLXNC1 klonlarındaki hücre proliferasyonunun PLKO klonlarına göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Plexin C1 hücre klonlarının mezenkimal-benzeri fenotip kazandığı, proliferasyon çalışmaları ile de desteklenmiştir.

İlaca direnç mekanizmasına Plexin C1'in etkisinin incelenebilmesi adına PLC/PRF/5 ve HEP3B hücre klonları Doxorubicin ile muamele edildi ve sonrasında hücrelerin apoptoz dirençleri kesilmiş PARP bandı (p89 PARP) üzerinden incelendi. Hem HEP3B hem de PLC/PRF/5 hücrelerinin kontrol klonlarında daha az miktarda PARP bandının kesildiği gözlemlendi. Bununla birlikte PLC/PRF/5 shPLXNC1 klonunda düşük doz Doxorubicin uygulaması sonrası kesilmiş PARP yüzdesi artmış, Hep3B shPLXNC1 klonunda ise yüksek doz Doxorubicin uygulandığında PARP kesimi

artmıştır. Plexin C1'in baskılandığı durumda ortaya çıkan mezenkimal fenotip dolayısıyla apoptoza direnç olacağını düşünmüştük ancak beklenilenin aksine daha fazla apoptoza uğradıkları belirlendi. Literatürde aktif EMT programının ilaç direncini artırdığı bildirilmiş olmakla birlikte son çalışmalar EMT'nin çok evreli bir süreç olduğuna ve tüm EMT fenotip özelliklerinin aynı anda ifade edilemeyeceğine işaret etmektedir (Fischer vd., 2015; Nieto vd., 2016).

Diğer taraftan HCC hücre klonları EMT programının bir diğer özelliklerinden anoikise direnç bakımından da incelendi. Hücrelerin yapışabilme kapasitesinin düşük olduğu "low-attachment" plakalarda yapılan analizler sonucunda, PLC/PRF/5 hücre hattında Plexin C1 gen baskılanmasının anoikise direnci artırdığı tespit edildi (canlı hücre oranı; %9,1'den %39,8'e). Fakat aynı direncin HEP3B hücre hattında oluşmadığı gözlemlendi. Hem ilaca direnç hem de anoikis çalışmalarından iki sonuç çıkarabiliriz: Birincisi EMT süreci kompleks bir süreç olup moleküler düzeyde EMT programının aktifleştigi tespit edilse de fonksiyonel düzeyde her özellik beklenildiği şekilde sergilenemeyebilmektedir. İkincisi ise Plexin C1 zemininde EMT bağımlı gözlenen fonksiyonel değişimler farklı hücre hatlarında uyum gösteremeyebilmektedir. Bu farklılık, bizlere EMT sürecinin kontrolünün ve/veya mediatörlerinin hücre hatlarında değişkenlik gösterebildiğini ve tek bir genin baskılanmasının her hücre hattında aynı sonuçlar doğuramayabileceğini göstermiştir.

Tez çalışmamızın başlangıcında biyoinformatik yöntem kullanarak gerçekleştirdiğimiz taramada Plexin C1 transkript seviyesinin HCC dokularında normal karaciğer dokularına kıyasla daha yüksek seviyede ifadelendiğini tespit etmiştik. Bu gözlemimizi *in vivo* seviyede doğrulayabilme amacıyla HCC dokuları ve eşlenik tümörsüz bölgelerini içeren ticari doku mikro dizini PE4 monoklonal antikoru ile immünohistokimya yöntemiyle boyandı. PE4 antikorunun hepatositlerin ve tümör hücrelerinin membranlarında Plexin C1 proteinini tanıyabildiği gözlemlendi. HCC dokularındaki Plexin C1 ifadesinin eşlenik tümörsüz bölgelere göre istatistiksel olarak çok daha yüksek olduğu tespit edildi. Böylelikle biyoinformatik taramalardan elde ettiğimiz gözlemlerimiz, immünohistokimya boyama çalışmalarımız ile doğrulanmış oldu.

Doku dizinini oluşturan vakaların yaş, cinsiyet ve sağkalım gibi klinikopatolojik karakteristikleri ile Plexin C1 protein seviyesi arasında herhangi bir korelasyona

rastlanmadı. Fakat ilginç olarak Plexin C1 seviyesinin HCC dokularının diferensiyasyonu (grade) ile ters orantılı bir korelasyon gösterdiğini saptadık (Tablo 1). HCC dokularının Plexin C1 ifade seviyesi zayıf ve güçlü olarak kategorize edildiğinde, kötü farklılaşmış (ileri evre) vakaların %36'sının zayıf Plexin C1 düzeyine sahip olduğu tespit edildi. Buna karşın, iyi farklılaşmış (erken evre) vakaların sadece %13.85'i zayıf Plexin C1 ifadesine sahipti ($p < 0.05$). Yani, Plexin C1 protein seviyeleri erken evreden ileri evreye doğru gittikçe azalma eğilimindeydi. HCC hücre hatlarında daha önce gerçekleştirdiğimiz western blotlama analizlerinde agresif karakterli olduğu bilinen mezenkimal HCC hücre hatlarında gözlemlediğimiz düşük Plexin C1 ifadesi immünohistokimya analizleri ile elde ettiğimiz sonuçlar ile örtüşmekteydi; Plexin C1 protein seviyesi hem mezenkimal (daha agresif) karakterli HCC hücre hatlarında hem de ileri evre (daha agresif) HCC dokularında yoktu ya da azalma eğilimindeydi. Tüm bu bulgular Plexin C1'in agresif Melanom dokularında başlangıç evresindeki vakalar ile kıyaslandığında neredeyse tamamen ortadan kaybolduğu literatür bilgisi ile de paralellik göstermektedir [Scott et al., 2009].

Gerçekleştirdiğimiz western blotlama ve immünohistokimya çalışmaları göz önüne alındığında Plexin C1'in epitel karakteristiğinin bir belirteci olduğu, HCC dokularında sağlıklı dokulara kıyasla yüksek seviyede ifadelense de tümörleşmenin ileri evrelerinde azalma eğiliminde olduğu söylenebilir. Plexin C1 protein seviyesindeki bu değişim, HCC vakalarının sınıflandırılmasında diğer belirteçler ile beraber kullanılabilme olasılığını doğurmaktadır.

Bir diğer taraftan EMT sürecinin moleküler ve fonksiyonel belirteçlerinin Plexin C1 zemininde irdelendiği çalışmalar sayesinde Plexin C1 ifadesinin EMT sürecinin bir inhibitörü olduğu ileri sürülebilir.

Gelecekte Plexin C1'in görev aldığı sinyal ileti yollarının aydınlatıldığı ve Plexin C1-bağımlı ilaca direnç mekanizmalarının daha detaylı incelendiği çalışmalar Plexin C1'in hepatokarsinogenezdeki rolüne ışık tutacak ve Plexin C1'in bir biyobelirteç olarak değerliliğini ortaya koyacaktır.

Ayrıca, Plexin C1 proteininin hem doğal hem de denatüre formlarını spesifik olarak tanıyabilen monoklonal antikor üreten hibridoma hücrelerinin geliştirilmiş olması, bu alanda yapılması planlanan protein temelli ileri çalışmaların dışa bağımlı kalınmadan gerçekleştirilebilmesi adına bir avantaj yaratacaktır.

KAYNAKLAR

Batlle E., Sancho E., Franci C, Domínguez D., Monfar M., Baulida J., García De Herreros A., (2002), "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells", *Nature Cell Biology*, 2 (2), 84-89.

Black S. A., Nelson A. C., Gurule N. J., Futscher B. W., Lyons T. R., (2016), "Semaphorin 7a exerts pleiotropic effects to promote breast tumor progression", *Oncogene*, 35 (39), 5170-5178.

Bruix J., Qin S., Merle P., Granito A., Huang Y. H., Bodoky G., Pracht M., Yokosuka O., Rosmorduc O., Breder V., (2017), "Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial", *The Lancet*, 389, 56-66.

Castellani V., Rougon G., (2002), "Control of semaphorin signaling", *Current Opinion in Neurobiology*, 12, 532-541.

Chen Y., Soong J., Mohanty S., Xu L., Scott G., (2013), "The neural guidance receptor Plexin C1 delays melanoma progression", *Oncogene*, 32, 4941-4949.

Christofori G., (2006), "New signals from the invasive front", *Nature*, 441 (7092), 444-450.

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, 473-482.

Comijn J., Berx G., Vermassen P., Verschueren K., van Grunsven L., Bruyneel E., Mareel M., Huylebroeck D., van Roy F., (2001), "The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion", *Molecular Cell*, 7 (6), 1267-1278.

Dongre A., Weinberg, R. A., (2018), "New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1.

Ensser A., Fleckenstein B., (1995), "Alcelaphine herpesvirus type 1 has a semaphorin-like gene", *Journal of General Virology*, 76, 1063-1067.

Fan Q. M., Jing Y. Y., Yu G. F., Kou X. R., Ye F., Gao L., Li R., Zhao Q. D., Yang Y., Lu Z. H., Wei L.X., (2014), "Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma", *Cancer Letters*, 352, 160–168.

Feng X. H., Derynck R., (2005), "Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 659-693.

Fischer K., Durrans A., Lee S. (2015), "Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance", *Nature*, 527, 472–476.

Friedl P., Wolf K., (2003), "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms", *Nature Reviews Cancer*, 3 (5), 362-374.

Giannelli G., Koudelkova P., Dituri F., Mikulits W., (2016), "Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma", *Journal of Hepatology*, 65, 798–808.

Grotegut S., von Schweinitz D., Christofori G., Lehenbre F., (2006), "Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail", *EMBO Journal*, 25, 3534–3545.

Grunert S., Jechlinger M., Beug H., (2003), "Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4 (8), 657-665.

Gu C., Giraudo E., (2013), "The role of semaphorins and their receptors in vascular development and cancer", *Experimental Cell Research*, 319, 1306–1316.

Guarino M., Rubino B., Ballabio G., (2007), "The role of epithelialmesenchymal transition in cancer pathology", *Pathology*, 39 (3), 305-318.

Gurrapu S., Tamagnone L., (2016) "Transmembrane semaphorins: Multimodal signaling cues in development and cancer", *Cell Adhesion and Migration*, 10, 675-691.

Ikeda K., Kudo M., Kawazoe S., Osaki Y., Ikeda M., Okusaka T., Tamai T., Suzuki T., Hisai T., Hayato S., (2017), "Phase 2 study of lenvatinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma", *Journal of Gastroenterology*, 52, 512-519.

Kalluri R., Weinberg R. A., (2009), "The basics of epithelial-mesenchymal transition", *Journal of Clinical Investigations*, 119 (6), 1420–1428.

Kang S., Kumanogoh A., (2013), "Semaphorins in bone development, homeostasis, and disease", *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 24, 163–171.

Kolodkin A. L., Matthes D. J., Goodman C. S., (1993), "The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules", *Cell*, 75, 1389-1399.

Kolodkin A. L., Matthes D. J., O'Connor T. P., Patel N. H., Admon A., Bentley D., Goodman C. S., (1992), "Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo", *Neuron*, 9 (5), 831-845.

Masiakowski P., Carroll R. D., (1992), "A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain", *Journal of Biological Chemistry*, 267 (36), 26181-26190.

Kudo M., Finn R. S., Qin S., Han K. H., Ikeda K., Piscaglia F., Baron A., Park J. W., Han G., Jassem J., Blanc J. F., Vogel A., Komov D., Evans T. R. J., Lopez C., Dutcus C., Guo M., Saito K., Kraljevic S., Tamai T., Ren M., Cheng A. L., (2018), "Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial", *The Lancet*, 391, 1163-1173.

Lee T. K., Poon R. T., Yuen A. P., Ling M. T., Kwok W. K., Wang X. H., Wong Y. C., Guan X. Y., Man K., Chau K. L., Fan S. T., (2006), "Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition", *Clinical Cancer Research*, 12, 5369–5376.

Lehembre F., Yilmaz M., Wicki A., Schomber T., Strittmatter K., Ziegler D., Kren A., Went P., Derksen P. W. B., Berns A., Jonkers J., Christofori G., (2008), "NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin", *EMBO Journal*, 27 (19), 2603-2615.

Liu J., Ruan B., You N., Huang Q., Liu W., Dang Z., Xu W., Zhou T., Ji R., Cao Y., Li X., Wang D., Tao K., Dou K., (2013), "Downregulation of miR-200a induces EMT phenotypes and CSC-like signatures through targeting the beta-catenin pathway in hepatic oval cells", *PLOS ONE*, 8, e79409.

Llovet J. M., Ricci S., Mazzaferro V., Hilgard P., Gane E., Blanc J. F., (2008), "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma", *New England Journal of Medicine*, 359, 378-390.

Llovet J. M., Schwartz M., Mazzaferro V., (2005), "Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma", *Seminars in Liver Disease*, 25, 181–200.

Ma B., Herzog E. L., Lee C. G., Peng X., Lee C-M., Chen X., Rockwell S., Koo J. S., Kluger H., Herbst R. S., Szol M., Elias J. A., (2015), "Role of chitinase 3-like-1 and semaphorin 7a in pulmonary melanoma metastasis", *Cancer Research*, 75, 487–496.

Maestrini E., Tamagnone L., Longati P., Cremona O., Gulisano M., Bione S., Tamanini F., Neel B. G., Toniolo D., Comoglio P. M., (1996), "A family of transmembrane proteins with homology to the MET-hepatocyte growth factor receptor", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 674-678.

Messina A., Ferraris N., Wray S., Cagnoni G., Donohue D. E., Casoni F., Kramer P. R., Derijck A. A., Adolfs Y., Fasolo A., Pasterkamp R. J., Giacobini P. (2011), "Dysregulation of Semaphorin 7A/ β 1 integrin signalling leads to defective GnRH-1 cell migration, abnormal gonadal development and altered fertility", *Human Molecular Genetics*, 20, 4759–4774.

Miyoshi A., Kitajima Y., Sumi K., Sato K., Hagiwara A., Koga Y., Miyazaki K., (2004), "Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells", *British Journal of Cancer*, 90, 1265–1273.

Negishi M., Oinuma I., (2015), "Semaphorin Receptors and Their Signaling", In: Kumanogoh A., Editor, "Semaphorins, A Diversity of Emerging Physiological and Pathological Activities", 1st Edition, Springer Incorporated.

Nieto M. A., Huang R. Y. J., Jackson R. A., Thiery J. P., (2016), "EMT: 2016", *Cell*, 166, 21-45.

Ogunwobi O. O., Puszyk W., Dong H. J., Liu C., (2013), "Epigenetic upregulation of HGF and c-Met drives metastasis in hepatocellular carcinoma", *PLOS ONE*, 8, e63765.

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, 1189–1199.

Oinuma I., Ishikawa Y., Katoh H., Negishi M., (2004), "The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras", *Science*, 305, 862-865.

Özen Ç., Yıldız G., Dağcan A. T., Çevik D., Örs A., Keleş U., Topel H., Öztürk M., (2013), "Genetics and epigenetics of liver cancer", *New Biotechnology*, 30 (4), 381-384.

Oztas E., Avci M. E., Ozcan A., Sayan A. E., Tulchinsky E., Yagci T., (2010), "Novel monoclonal antibodies detect Smad-interacting protein 1 (SIP1) in the cytoplasm of human cells from multiple tumor tissue arrays", *Experimental and Molecular Pathology*, 89 (2), 182–189.

Padgett R. W., Das P., Krishna S., (1998), "TGF-beta signaling, Smads, and tumor suppressors", *Bioessays*, 20 (5), 382-390

Padua D., Massague J., (2009), "Roles of TGFbeta in metastasis", *Cell Research*, 19 (1), 89-102.

Pasterkamp R. J., Kolk S. M., Hellemons A. J., Kolodkin A. L. (2007), "Expression patterns of Semaphorin 7a and Plexin C1 during rat neural development suggest roles in axon guidance and neuronal migration", *BMC Developmental Biology*, 7, 98.

Pasterkamp R. J., Peschon J. J., Spriggs M. K., Kolodkin A. L., (2003), "Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs", *Nature*, 424, 398-405.

Peinado H., Olmeda D., Cano A., (2007), "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?" *Nature Reviews Cancer*, 7 (6), 415-428.

Ramakrishna G., Rastogi A., Trehanpati N., Sen B., Khosla R., Sarin S. K., (2013), "From cirrhosis to hepatocellular carcinoma: new molecular insights on inflammation and cellular senescence", *Liver Cancer*, 2, 367-383.

Raza A., Sood G. K., (2014), "Hepatocellular carcinoma review: Current treatment, and evidence-based medicine," *World Journal of Gastroenterology*, 20 (15), 4115–4127.

Reichl P., Haider C., Grubinger M., Mikulits W., (2012), "TGF-beta in epithelial to mesenchymal transition and metastasis of liver carcinoma", *Current Pharmaceutical Design*, 18, 4135–4147.

Rhodes D. R., Yu J., Shanker K., Deshpande N., Varambally R., Ghosh D., Barrette T., Pandey A., Chinnaiyan A. M., (2004), "ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform", *Neoplasia*, 6 (1), 1-6.

Sakurai A., Doci C., Gutkind J. S., (2012), "Semaphorin signaling in angiogenesis, lymphangiogenesis and cancer", *Cell Research*, 22, 23–32.

Scott G. A., McClelland L. A., Fricke A. F., (2008), "Semaphorin 7A promotes spreading and dendricity in human melanocytes through β 1-integrins", *Journal of Investigative Dermatology*, 128, 151–161.

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, 954–963.

Shi Y., Massague J., (2003), "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus", *Cell*, 113 (6), 685-700.

Shim S. O., Cafferty W. B., Schmidt E. C., Kim B. G., Fujisawa H., Strittmatter S. M., (2012), "PlexinA2 limits recovery from corticospinal axotomy by mediating oligodendrocyte-derived Sema6A growth inhibition", *Molecular and Cellular Neuroscience*, 50,193–200.

Stirewalt D. L., Meshinchi S., Kopecky K. J., Fan W., Pogossova-Agadjanyan E. L., Engel J. H., Cronk M. R., Dorcy K. S., McQuary A. R., Hockenbery D., Wood B., Heimfeld S., Radich J. P., (2008), "Genes with abnormal expression in AML", *Genes, Chromosomes & Cancer*, 47, 8-20.

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: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.

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 α 1 β 1 integrin", *Nature*, 446, 680–684

Takamatsu H., Kumanogoh A., (2012), "Diverse roles for semaphorin-plexin signaling in the immune system", *Trends in Immunology*, 33, 127–135.

Tamagnone L., (2012), "Emerging role of semaphorins as major regulatory signals and potential therapeutic targets in cancer", *Cancer Cell*, 22, 145–152.

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, 71–80.

Thiery J. P., Sleeman J. P., (2006), "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7 (2), 131-142.

Uesugi K., Oinuma I., Katoh H., Negishi M., (2009), "Different requirement for Rnd GTPases for R-Ras GAP activity of Plexin-C1 and Plexin-D1", *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 6743–6751.

Villanueva A., Virginia H-G., Llovet J. M., (2013), "Medical therapies for hepatocellular carcinoma: a critical view of the evidence", *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10 (1), 34-42.

Walzer T., Galibert L., Comeau M. R., De Smedt T., (2005a), "Plexin C1 engagement on mouse dendritic cells by viral Semaphorin A39R induces actin cytoskeleton rearrangement and inhibits integrin-mediated adhesion and chemokine-induced migration", *Journal of Immunology*, 174, 51-59

Walzer T., Galibert L., De Smedt T., (2005b), "Poxvirus semaphorin A39R inhibits phagocytosis by dendritic cells and neutrophils", *European Journal of Immunology*, 35, 391–398.

Wang Z., Wang X., Zhou H., Dan X., Jiang L., Wu Y., (2018), "Long non-coding RNA CASC2 inhibits tumorigenesis via the miR-181a/PLXNC1 axis in melanoma", *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50 (3) 1–10.

Winberg M. L., Noordermeer J. N., Tamagnone L., Comoglio P. M., Spriggs M. K., Tessier-Lavigne M., Goodman C. S., (1998) "Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance", *Cell*, 23, 903-916.

Winberg M. L., Tamagnone L., Bai J., Comogli P. M., Montell D., Goodman C. S., (2001), "The transmembrane protein Off-track associates with Plexins and functions downstream of Semaphorin signaling during axon guidance", *Neuron*, 32, 53-62.

Worzfeld T., Offermanns S., (2014), "Semaphorins and plexins as therapeutic targets", *Nature Reviews Drug Discovery*, 13, 603–621.

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, 56280-56288.

Zhao X., Wang P., Liu J., Zheng J., Liu Y., Chen J., Xue Y., (2015), "Gas5 exerts tumor-suppressive functions in human glioma cells by targeting miR-222," *Molecular Therapy*, 23, 1899–1911.

Zhou Z. J., Dai Z., Zhou S. L., Hu Z. Q., Chen Q., Zhao Y. M., Shi Y. H., Gao Q., Wu W. Z., Qiu S. J., Zhou J., Fan J., (2014), "HNRNPAB induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma by transcriptionally activating SNAIL", *Cancer Research*, 74, 2750–2762.

ÖZGEÇMİŞ

Görkem Odabaş 1988 yılında Ordu’da doğdu. Ordu Anadolu Lisesini bitirdikten sonra lisans eğitimine Ege Üniversitesi Biyokimya bölümünde devam etti. Akademik çalışmalarını 2011-2020 yılları arasında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde sürdürerek yüksek lisans ve doktora eğitimine devam etti. 2013 yılından beri aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

EKLER

EK A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayın

Odabas G., Cetin M., Turhal S., Baloglu H., Sayan A. E., ve Yagci T., “Plexin C1 Marks Liver Cancer Cells with Epithelial Phenotype and Is Overexpressed in Hepatocellular Carcinoma,” Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology, vol. 2018, Article ID 4040787, 9 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4040787>.

EK B: Şekil Kullanım İzinleri

Tablo B1.1: Kullanılan şekiller için alınan izinler.

Şekil Numarası	Lisans Tarihi	Lisans Numarası	Hak Sahibi
Şekil 2.1	08/03/2020	4784181239683	Springer Nature
Şekil 2.2	08/03/2020	4784190590211	Springer Nature