

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONKOFETAL ROR1 PROTEİNİN HEPATOKARSİNOGENEZDEKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI

METİN ÇETİN
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2019

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONKOFETAL ROR1 PROTEİNİN
HEPATOKARSİNOGENEZDEKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI

METİN ÇETİN
DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2019

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**ASSESSMENT OF THE ROLE OF ONCOFETAL ROR1
ON HEPATOCARCINOGENESIS**

METIN CETIN

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF

DOCTOR OF PHILOSOPHY

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. TAMER YAGCI

GEBZE

2019

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10/04/2019 tarih ve 2019 /18 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 02/05/2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Metin ÇETİN'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

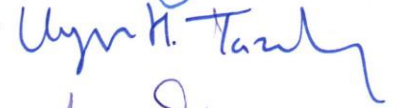
(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI



ÜYE

: Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAZ



ÜYE

: Prof. Dr. Sıdıka Ayşe ÖZER



ÜYE

: Doç. Dr. Nuri ÖZTÜRK



ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TOKÇAER KESKİN



ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

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

ÖZET

Hepatoselüler karsinoma (HCC) en sık görülen ölümcül primer karaciğer kanseri olmasına karşın, erken tanı ve tedavisindeki gelişmeler sınırlı kalmaktadır. Literatürde, reseptör tirozin kinaz ailesinden ROR1'in HCC'de ifadesi ve fonksiyonuna dair çalışma bulunmamaktadır. Bundan dolayı, bu tez çalışmasında HCC'de ROR1 ifadesi ve hepatokarsinogenez süreci ile ilişkisi araştırılmıştır.

Rekombinant ROR1 proteini bakteriyal olarak sentezlenmiş ve ROR1 monoklonal antikorlarının oluşturulması amacıyla immünojen olarak kullanılmıştır. HCC'de ROR1 ifadesi, RT-qPCR ile gen ifadesi seviyesinde ve geliştirdiğimiz monoklonal antikorlar kullanılarak western blot ile protein seviyesinde gösterilmiştir. ROR1'in hepatokarsinogenezdeki fonksiyonel katkısı, HCC hücrelerinde shRNA ile ROR1 ifadesinin baskılandığı hücre klonlarında, apoptoz, hücre siklusu, hücre göçü ve ilaç-atılımı analizleri ile belirlenmiştir. Bununla birlikte, HCC hücre hatlarından izole edilen eksozomlarda ROR1 ifadesi incelenmiş ve ROR1 bağımlı eksozomal miRNA kargo içeriğindeki değişiklikler saptanmıştır.

Yeni geliştirilen ROR1 monoklonal antikorları insan ve fare HCC hücre hatlarında endojen ROR1 proteinini özgül olarak tanımaktadır. ROR1'in baskılanması sonucunda hücre proliferasyonu ve hücre göçü azalmakta, buna karşın apoptoz ve anoikise direnç artmaktadır. ROR1 baskılanmış hücrelerdeki kemoterapiye direncin artmış ilaç transportu ve çoklu-ilâç direnç genlerinin ifadelerindeki artıştan kaynaklandığı saptandı. HCC hücre hatlarından izole edilen eksozomlarda ROR1 ifadesi gösterildi ve ROR1 ifadesinin baskılandığı hücrelerden izole edilen eksozomlarda hücre göçünü baskılayan miRNA'ların arttığı belirlendi.

ROR1, HCC'de ifade edilmekte ve hastalığın gelişimine çoklu sinyal yollarını etkileyerek katkı sağlamaktadır. HCC'de ROR1 ifadesinin incelenmesi tanı ve tedavi açısından önemli katkılar sağlayabilecektir.

Bu tez çalışması TÜBİTAK SBAG215S751 projesi ve 2214A Doktora Sırası Yurt Dışı Araştırma bursu ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: ROR1, İlaç Direnci, Hepatoselüler Karsinoma, Epitelyal-Mezenkimal Geçiş, Hibridoma, Monoklonal Antikor

SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC) is among the most frequent and deadly cancers, yet tools for its early diagnosis and treatment are limited. The expression and role of receptor tyrosine kinase ROR1 in HCC have not been elucidated so far. Thus, the expression of ROR1 in HCC and its significance in hepatocarcinogenesis were investigated in this thesis work.

Recombinant ROR1 protein was produced in bacteria and used as an immunogen for the generation of ROR1 monoclonal antibodies. The levels of ROR1 transcripts and proteins in HCC were detected by RT-qPCR and homemade monoclonal antibodies-based western blotting, respectively. The functions of ROR1 in hepatocarcinogenesis were explored through analyses of apoptosis, cell cycle, cellular migration and drug efflux in HCC cell lines, and cell clones in which the expression of ROR1 is repressed by shRNA. In addition, the expression of ROR1 was sought out in exosomes that were isolated from HCC cells lines and ROR1 dependent changes of miRNA cargo content of exosomes were analysed.

The novel ROR1 monoclonal antibodies specifically recognized endogenous ROR1 protein both in human and mouse HCC cell lines. The suppression of ROR1 expression caused a decrease in cellular proliferation and cell migration, while the cells displayed increased resistance to apoptosis and anoikis. We also found that the chemoresistance of cells with repressed ROR1 expression is due to the increased drug efflux and upregulation of multidrug resistance genes. The expression of ROR1 was detected in HCC-derived exosomes and the expression of miRNAs that inhibit cell migration increased in the exosomes that isolated from ROR1-depleted HCC cells.

ROR1 is expressed in HCC and contribute to the development of this cancer by affecting multiple signaling pathways. A detailed investigation of ROR1 in HCC will offer an insight into the diagnosis and therapy of HCC.

This thesis supported by TUBITAK SBAG215S751 and 2214A Scholarship.

Key Words: ROR1, Drug Resistance, Hepatocellular carcinoma, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, hybridoma, Monoclonal Antibody

TEŞEKKÜR

Tez çalışmama başlamamda ve deney süreçlerinde bilgisini, anlayışını ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, maddi ve manevi desteklerinden dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya; bilgisi ve deneyimi ile İngiltere'de bulunduğum süre boyunca evini ve labını açan doktora çalışmalarına istatistiksel olarak anlamlı katkı sağlayan Doç. Dr. A. Emre Sayan'a;

CRISPR/CAS9 ve lentiviral temelli çalışmalarımda her türlü soruma sıklıkla cevap veren ve plazmidlerini benimle paylaşan Doç. Dr. Nuri ÖZTÜRK'e ve her konuda yardımcı olan bölüm başkanımız Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBA'ya;

Yardım istemekten hiçbir zaman çekinmediğim ve bana destek olan, laboratuvar arkadaşlarım Uzm. Biyolog Dr. Pelin BALÇIK ERÇİN, Öğr. Gör. İrem YALIM CAMCI, Arş. Gör. Görkem ODABAŞ, Arş. Gör. Arzu AYSAN, Şule ERDEMİR, Nazlı SALIK ve Esmâ ERCİYAS'a; Tez dönemim boyunca her türlü yardımlarını esirgemeyen ve destekleri ile yanımda olan Arş. Gör. Dr. Merve TUZLAĞOĞLU ÖZTÜRK, Dr. Tuba KORKMAZ, Öğr. Gör. Dr. Hüseyin BALCI, Dr. Öğr. Üyesi Mine GÜL ŞEKER, Arş. Gör. Zeynep GİRĞİN ERSOY, Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul DORUK, Arş. Gör. Dr. Hülya AKDEMİR KOÇ, Arş. Gör. Zeynep DEMİR, Dr. Öğr. Üyesi Ümit Can Erim ve Pelin DİLSİZ'e; Tez çalışmalarının hazırlık aşamalarında yardımcı olan ve takip eden lisans öğrencilerimiz Elifcan KOÇYİĞİT, Büşra TIRYAKI, Rabia ERGİN, Mihriban AYDOĞAN, Yeşim TÜTÜNCÜ, Betül TEKELİ, İlknur MACİT ve Nurbanu TAYŞI'ye; İngiltere'de bulunduğum süre boyunca manevi olarak yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen Daina, Toni, Lena, Israel, Sasha, Pardis ve Rahul'a en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Tüm bunların yanında lisans eğitimim boyunca yanımda olan ve deneylerimde yardımcı olan ve hafta sonları bile laboratuvara sürüklediğim yanımda olan biricik eşim İlknur ÇETİN ve ÇAĞIN Ailesi ile bu günlere gelmemi sağlayan, sevgi ve desteklerini esirgemeyen Sevgili Aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu tez çalışması, 215S751 numaralı Tübitak projesi tarafından ve TÜBİTAK "2214A Doktora Sırası Yurt Dışı Araştırma Bursu" ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. Literatür Özeti	2
2.1. Hepatoselüler Karsinoma	2
2.2. EMT	3
2.3. ROR1 Proteini	5
2.3.1. Hematolojik Kanserlerde ROR1	7
2.3.2. Solid Kanserlerde ROR1	7
2.3.3. ROR1 monoklonal antikorları	9
2.4. Eksozomlar	10
2.4.1. Hepatoselüler Karsinomada Eksozomlar	11
2.4.2. ROR1 ve Eksozom İlişkisi	12
3. GEREÇLER	14
3.1. Genel Kimyasallar	14
3.2. Cihazlar	14
3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Malzemeler	15
3.4. Hücre Hatları ve Besiyerleri	15
3.5. Çözelti ve Tamponlar	16
3.6. Bakteriler ve Besiyerleri	16
3.7. Vektörler ve Primerler	17
3.8. Antikorlar, Boyalar ve İlaçlar	18

3.9. Kitler	19
4. Yöntemler	20
4.1. Hücre Stoklarının Hazırlanması	20
4.2. Hücre Kültürü	20
4.3. Transformasyon	20
4.4. ROR1 İfadesinin İn Silico Analizi	21
4.5. Monoklonal Antikor Üretimi	21
4.5.1. Rekombinant protein üretimi	21
4.5.2. İmmünizasyon çalışmaları	22
4.5.3. Hibridoma klonlarının geliştirilmesi	23
4.5.4. Monoklonal antikorların saflaştırılması	24
4.6. ROR1 Hücre Klonlarının Oluşturulması	24
4.6.1. Viral partikül üretilmesi	24
4.6.2. ROR1 ifadesi baskılanmış ve kontrol klonlarının geliştirilmesi	25
4.6.3. ROR1 aşırı ifade eden klonların geliştirilmesi	25
4.6.4. TGF- β ile EMT indüksiyonu	25
4.7. Hücre Klonlarında Gen İfadesi Analizleri	25
4.7.1. RNA İzolasyonu	25
4.7.2. cDNA sentezi	26
4.7.3. RT-qPCR ile gen ifadesi analizi	27
4.8. Hücre Klonlarında Protein İfadesi Analizleri	28
4.8.1. Western blot	28
4.8.2. İmmün-çöktürme	29
4.8.3. Akım sitometresi analizi	29
4.8.4. İmmunfloresan görüntüleme	29
4.9. Hücre Klonlarında Fonksiyonel Analizler	30
4.9.1. Hücre proliferasyonu analizi	30
4.9.2. Hücre döngüsü analizi	30
4.9.3. Apoptoz direnci	31
4.9.4. Doksorubisine tutulumu	31
4.9.5. Migrasyon analizi	31
4.9.6. Anoikis'e direnç	32

4.9.7.	İlaç-direnç ile ilişkili genlerin ifade analizi	32
4.9.8.	Kök hücre fenotipi ile ilişkili proteinlerin ifade analizi	32
4.10.	Eksozom İzolasyonu	33
4.10.1.	İzole edilen eksozomların büyüklük ve boyutunun analizi	33
4.10.2.	Eksozomlarda protein ifadesi analizi	34
4.11.	miRNA ifade analizi	34
4.11.1.	miRNA izolasyonu	34
4.11.2.	cDNA sentezi ve miRNA-qPCR dizinlerinde ifade analizi	35
4.12.	İstatistiksel Analizler	36
5.	BULGULAR	37
5.1.	HCC'de ROR1 Gen İfadesi	37
5.2.	ROR1 Proteinine Özgül Monoklonal Antikor Geliştirilmesi	37
5.2.1.	Rekombinant Protein Oluşturulması	37
5.2.2.	Farelerin Bağışıklanması ve Hibridoma Oluşturulması	38
5.3.	İnsan ve Fare HCC Hücre Hatlarında ROR1 Protein İfadesi	40
5.3.1.	shROR1 ve shpLKO Klonlarının Geliştirilmesi	40
5.3.2.	ROR1 Aşırı İfade Klonlarının Geliştirilmesi	41
5.4.	ROR1 Antikorlarının Validasyonu	42
5.4.1.	İmmün-çöktürme	42
5.4.2.	Akım Sitometresi	43
5.5.	ROR1 İfadesi ve EMT Fenotipi ile İlişkisi	44
5.5.1.	Hücre Klonlarında Proliferasyon ve Hücre Siklusu Analizi	45
5.5.2.	Hücre Klonlarında Hücre Göçü	47
5.5.3.	Hücre Klonlarında Apoptoz ve Anoikise Direncin Analizi	48
5.5.4.	Hücre Klonlarında Doxorubicine Tutulumu ve Çoklu-ilaç Direnç	
	Gen İfadelerinin Analizi	51
5.5.5.	Hücre Klonlarında Kanser Kök Hücre Belirteçlerinin Değişimi	52
5.6.	387 Hücre Klonlarından İzole Edilen Eksozomlarda ROR1 İfadesi	53
5.7.	ROR1 Baskılanmasının Eksozomal miRNA Kargo İçeriğine Etkisi	55
6.	TARTIŞMA ve SONUÇ	57
	KAYNAKLAR	60

ÖZGEÇMİŞ	69
EKLER	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve

Kısaltmalar

Açıklamalar

~	: Yaklaşık
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikromolar
µg	: Mikrogram
ALDH	: Alkalın Dehidrogenaz
BCR	: B hücre Reseptörü
bHLH	: Basit Helix Dönüş Helix
CAR-T	: Kimerik Antijen Resptörlü T hücresi
CAV1	: Kaveolin-1
CLL	: Kronik Lenfoblastik Lösemi
Da	: Dalton
Dk	: Dakika
EDTA	: N,N,N',N'-Tetrametiletilediamin
EV	: Hücre-dışı Vezikül
L	: Litre
M	: Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nM	: Nanomolar
NaCL	: Sodyum Klorür
ng	: Nanogram
CK19	: Sitokeratin 19
CSC	: Kanser Kök Hücresi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EMT	: Epitel-Mezenkim Dönüşümü
FBS	: Fötal Dana Serum

FSC	: Forward Scatter
FZD	: Frizzled Domaini
Gapdh	: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
HBV	: Hepatit B Virüs
HCC	: Hepatoselüler Karsinoma
HCV	: Hepatit C Virüs
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
IF	: İmmüfloresan
Ig	: İmmunoglobulin
IGF-1R	: İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü 1
IP	: İmmün-çöktürme
KRD	: Kringle Domaini
Met	: Mezenkim-Epitel Dönüşümü
MFI	: Mean Floresan Şiddeti
miRNA	: Mikrorna
MVB	: Multi-veziküler Badilerin
NEAA	: Gerekli Olmayan Amino Asit
NF-kB	: Nüklear Faktör Kapa B
NPT	: Nanopartükül Takip Sistemi
NRG1	: Nöregulin1
NSCLC	: Küçük Hücreli-olmayan Akciğer Kanseri
OD	: Optik Yoğunluk
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	: Polietilenglikol
PFA	: Praformaldehit
PRNP	: Membrana Bağlı Prion Proteini
PRD	: Prolin Zengin Domain
RNA-seq	: RNA Dizi Analizi
ROR1	: Reseptör Tirozin Kinaz Benzeri Orfan Reseptör 1
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute

RT-qPCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
Rpm	: Dakika Başına Dönüş
shRNA	: Kısa Saç Tokası-Rna
SSC	: Side Scatter
SSC-A	: Side Scatter-Alan
SSC-H	: Side Scatter-Yükseklik
TGF- β	: Transforme-Edici Büyüme Faktörü B
TEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
TKD	: Trozin Kinaz Domaini
TNF- α	: Tümör Nekrosis Factor Alfa
Tris	: Tris (Hidroksimetil) Aminometan
WB	: Wester Blot
ZEB	: Zinc Finger E-Box-Binding Homeobox 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: EMT sürecindeki farklı basamaklar.	4
2.2: Farklı türlere ait ROR proteinlerinin domainleri.	5
3.1: pOPINF vektör haritası.	17
3.2: pLKO.1 kontrol vektör haritası.	18
5.1: HCC'de ROR1 ifadesinin incelenmesi.	37
5.2: ROR1 kısmi-rekombinant antijenlerinin oluşturulması.	38
5.3: ROR1 proteinine karşı monoklonal antikorların geliştirilmesi.	39
5.4: İnsan ve fare HCC hücre hatlarında ROR1 protein ifadesi.	40
5.5: ROR1 ifadesinin shRNA ile baskılanması.	41
5.6: Hep3B hücresinde ROR1 proteinin aşırı ifadesi.	42
5.7: SNU387 hücre lizatlarından ROR1'in immünöktürülmesi.	43
5.8: SNU387 hücresinde akım sitometresi.	43
5.9: PLC/PRF/5 hücrelerinin TGF- β ile indüksiyonu.	44
5.10: PLC ve 387 klonlarında EMT belirteçlerinin ifadeleri.	45
5.11: PLC ve 387 hücre klonlarında proliferasyon analizi.	46
5.12: Hep3B ROR1 klonlarının proliferasyon analizi.	46
5.13: PLC ve 387 hücre klonlarında hücre siklusu analizi.	47
5.14: PLC ve 387 hücre klonlarının hücre göçü analizi.	48
5.15: PLC ve 387 hücre klonlarına Oksaliptin ve Doxorubicin uygulanması.	49
5.16: PLC ve 387 hücre klonlarında anoikis direnci.	50
5.17: PLC ve 387 hücre klonlarında Doxorubicin tutulumu.	51
5.18: PLC hücre klonlarında ilaç-direnç ile ilişkili genlerin ifade analizi.	52
5.19: PLC/PRF/5 hücre klonlarında CSC belirteçlerinin analizi.	53
5.20. İzole edilen eksozomların TEM ve NPT analizi.	54
5.21. 387-pLKO ve 387-shROR1 eksozomların WB analizi.	55
5.22. ROR1 ifadesine bağlı değişen eksozomal miRNA kargo içeriği.	56

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: İleri ve geri primer listesi.	18
4.1: 2X RT master karışımı.	26
4.2: PCR döngü şartları.	26
4.3: RT-qPCR reaksiyon tablosu.	27
4.4: RT-qPCR döngü şartları.	27
4.5: qPCR array mastermix'in hazırlanması.	35
4.6: qPCR array döngü şartları.	35

1. GİRİŞ

ROR1 (Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor 1) proteininin embriyonik ve fetal gelişim sürecinde farklı dokularda ifade edilmesine karşın sağlıklı yetişkin dokularında ifadesi kaybolmakta ya da azalmaktadır. Ancak hem hematolojik hem de solid tümörlerde ROR1 proteini artmış ifadesi ile karşımıza çıkmakta ve kanser oluşumunda ve metastaz sürecinde aktif olarak rol almaktadır.

Literatürde bilimiz dahilinde HCC tümör dokularında ya da hücre hatlarında ROR1 ifadesine dair bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte sağlıklı yetişkin dokularında ROR1 ifadesini incelen bir çalışmada karaciğer dokusu da dahil az sayıdaki dokuda ROR1 proteinin bulunmadığı gösterilmiştir [1].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

ROR1'in farklı kanserlerde artmış ifadesi ile birlikte meme, over ve akciğer kanserlerinde mezenkimal fenotiple olan ilişkisi gösterilmiştir [2-4]. Sağlıklı karaciğer dokusunda ise ROR1 ifadesi bulunmamasına karşın, HCC dokularına ait RNA-seq dataıları biyoinformatik olarak incelendiğinde *ROR1*'in gen ifadesi düzeyinde artmış olduğunu saptadık. Bu tez çalışmasında, elimizdeki biyoinformatik bulgudan yola çıkarak ROR1'in hepatokarsinogenez sürecindeki rolünü araştırmayı amaçladık.

Bu kapsamda ROR1 proteinine özgül monoklonal antikor geliştirilerek insan ve fare HCC hücre hatlarında ROR1 protein ifadesinin araştırılmasını ve ROR1 ifadesinin lentiviral shRNA tekniği baskılanması sonucunda, EMT fenotipi ile ilişkili hücre proliferasyonu, hücre göçü, apoptoz ve anoikise direnç'in incelenmesini ve ROR1-bağımlı eksozomal miRNA kargo içeriğindeki değişikliklerin saptanmasını hedefledik.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Hepatoselüler Karsinoma

Karaciğer kanseri en sık görülen yedinci kanser ve kanser ile ilişkili ölümler arasında da dördüncü sırada yer almaktadır [5]. Hepatoselüler karsinoma (HCC), hepatositlerden köken alan epiteliyal bir kanser olup en sık görülen primer karaciğer kanseridir [6]. HCC'nin başlıca risk faktörleri arasında kronik hepatit virüs enfeksiyonları (HBC ve HCV), aşırı alkol tüketimi, aflatoksinler ve obezite gelmektedir [7, 8]. HCC'nin görülme sıklığı ve etki eden risk faktörleri bölgeler arasında farklılık göstermektedir.

Asya ve sahra-altı Afrika'da hepatit enfeksiyonu ile aflatoksinden kaynaklı HCC görülme sıklığı artarken, Avrupa ve Amerika ise risk faktörü olarak alkol ile obezite karşımıza çıkmaktadır [9]. HCC, kronik hepatit zemininde gelişen karaciğer sirozuna bağlı olarak bu süreçte kazanılan mutasyonlar ve inflamasyon ile oluşmaktadır [10]. HCC'nin tanısında ve tedavisindeki araçların gelişiyor olmasına karşın, hastaların uzun süreli sağ kalımları teşhisin ileri evrelerde konması, yüksek metastaz ve/veya ameliyat sonrası nüks gibi nedenlere bağlı olarak halen çok düşük seyretmektedir [11].

HCC tedavisinde farklı yaklaşımlar kullanılmasına rağmen en etkili yöntem cerrahi müdahaledir. Ancak, ameliyat edilemeyecek hastalar için kullanılan en etkili ilaç çok-hedefli tirozin kinaz inhibitörü sorafenib olmasına karşın henüz istenilen tedavi başarısına ulaşamamıştır. Bütün tedavi girişimlerine rağmen 5-yıllık sağ kalım oranı %20'nin altındadır [12]. Sorafenib dışında birinci basamak tedavide kullanılan diğer bir ilaç Lenvatinib'dir [13]. Sorafenib kullanımı ile bu ilaça karşı direnç geliştiği çalışmalar ile gösterilmiştir. Sorafenib tedavisi görmüş hastalara ikinci basamak tedavide Regorafenib kullanımı da yakın zamanda FDA tarafından onaylanmıştır [14]. Tedavi seçeneklerinin artıyor olmasına rağmen hasta sağ kalımında istenilen düzeyde artış elde edilememiştir. Bu çoklu kinaz inhibitörleri dışında immün-kontrol noktası inhibitörleri de HCC tedavisinde kullanılabilir [15].

2.2. EMT

Embriyonik gelişim sırasında hücrelerin fenotipi çok hızlı bir şekilde değişmekte, epitel ve mezenkimal hücre fenotipi arasında dinamik bir dönüşüm görülmektedir. Hücrelerin epitel fenotipten mezenkimal fenotipe geçmesi yani epitel-mezenkim dönüşümü (EMT) hücrelerin göç etme potansiyeli kazanmasını sağlamaktadır. Bu sürecin tersinde ise yani mezenkimal-epitel dönüşümünde (MET) hücreler tekrar hücresel bağlarını kurarak epitel hücre karakteristiği kazanmaktadır [16]. EMT programı sadece embriyonik dönemde değil yaraların iyileşmesi, fibroz ve kanser hücrelerinin metastazı gibi süreçlerde de aktive olmaktadır [17].

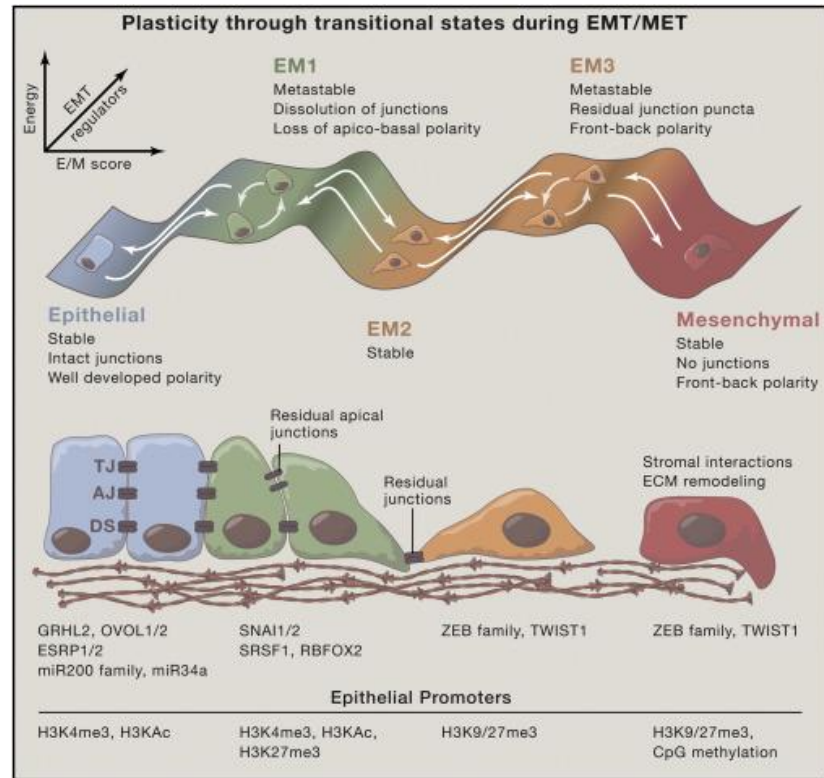
Klasik anlamda EMT dönüşümü, hücre içerisinde birçok transkripsiyon faktörü (EMT-TF'leri) ve miRNA'nın görev aldığı iki basamakta gerçekleşmekte ve hücrelerin ya epitel ya da mezenkimal fenotipe sahip olduğu düşünülmektedir. EMT-TF'lerini Snail, Slug (Snail2), ZEB1 ve ZEB2 (SIP1) bHLH faktörleri Twist1 ve Twist2 ile FOXC2 oluşturmaktadır. Epitel hücre özelliği ile ilişkili E-kaderin, okludin ve sitokeratinler ile mezenkimal hücre özelliği ile ilişkili N-kaderin ve vimentin EMT'nin ana belirteçleri olarak kullanılmaktadır.

EMT oldukça dinamik bir süreç olup tümör mikroçevresinden gelen sinyaller ile de tetiklenebilmektedir. Bu sinyaller, kolajen ve hiyalunorik asit gibi hücre-dışı matriks bileşenleri ve TGF- β , TNF- α ve HGF gibi salgılanan faktörlerden oluşmaktadır [18]. TGF- β , primer EMT indükleyicilerden olup kanser gelişiminde birbirine zıt iki rol oynamaktadır. Kanser sürecinin ilk evrelerinde hücre büyümesini inhibe ederek kanser baskılayıcı olarak rol oynamakta ancak ilerleyen evrelerde invazyon ve metastaza katkı sağlayarak tümör gelişimine katkı sağlamaktadır [19]. TGF- β 'nın tümör gelişimine katkısı EMT'yi indükleyerek E-kaderinin baskılayıcılarını aktive etmesi ile ilişkilidir. TGF- β ligandı TGF- β reseptörlerine (TGFBR1, TGFBR2) bağlandıktan sonra SMAD'ları aktive eder ve hedef genlerin ifadesini değiştirerek EMT fenotipini indüklemektedir [20].

Epitel hücreleri EMT sürecinde mezenkimal fenotip ile ilişkili farklı özellikler de kazanabilmektedir. Bu EMT belirteçleri arasında hücre siklusunda duraklama, kök hücre benzeri özellik kazanılması ve apoptoz ile anoikise direnç sayılabilmektedir [21]. Epitel karakterdeki A431 hücre hattında EMT transkripsiyon faktörlerinden SIP1

ifadesi arttırıldığı zaman hücreler mezenkimal fenotip kazandığı ve siklin D1'in baskılanması ile de hücre siklusunda G1 fazında tutuklandıkları gösterilmiştir [22]. Epitel meme hücrelerinde diğer bir EMT transkripsiyon faktörü olan Twist1'in ektopik ifadesi ya da hücrelerin TGF- β ile indüksiyonundan sonra mezenkimal fenotip ile birlikte kök hücre benzeri özellik kazandığı ve CD24⁻CD44⁺ kanser kök hücre (CSC) alt grubunun arttığı gösterilmiştir [23]. Yine meme kanserinde EGFR ile EMT indüklendiği zaman hücrelerin invazyon yeteneklerinin arttığı ve kemoterapötik ajan olan tamoksifen'e karşı direnç kazandıkları saptanmıştır [24].

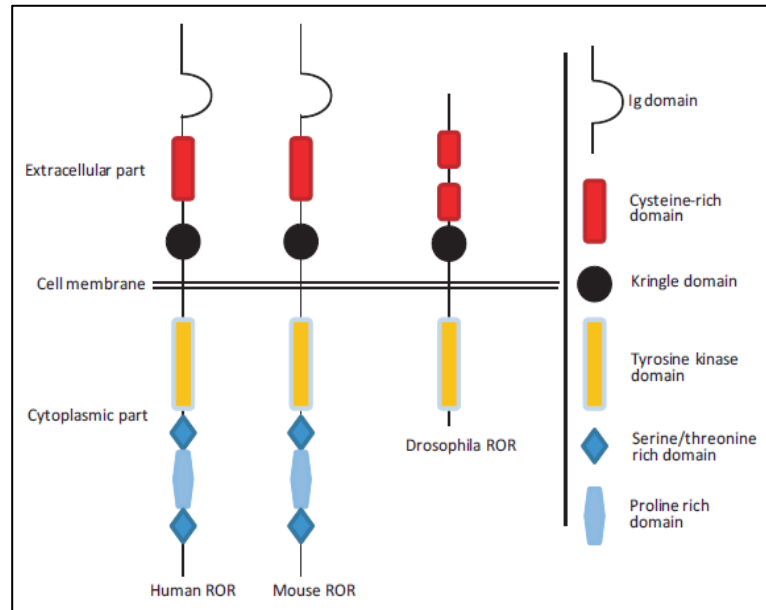
Klasik anlamda EMT tanımının kanser gelişimi ve metastaz süreci ile tümör nüksünü açıklamakta yetersiz kaldığı görülmektedir. Ayrıca sonra son elde edilen bulgular ışığında yeni önerilen EMT hipotezinde; EMT sürecinin sadece epitel ve mezenkimal olmak üzere iki basamaktan oluşmadığı, EMT'nin bu iki ana basamak dışında farklı ara basamaklarının da olduğunu ve kısmi-EMT olarak adlandırılan süreçte hücrelerin hem epitel hem de mezenkimal özellikte bulunabildiği önerilmektedir [25] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: EMT sürecindeki farklı basamaklar.

2.3. ROR1 Proteinini

ROR1 ve ROR2 proteinleri reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesi olan ROR (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor) ailesini oluşturmaktadır. ROR1 ile %58 amino asit benzerliği gösterdiği ROR2 genleri insan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücre hattında PCR temelli taranmışlar ve nörotrofik tirozin kinaz ile ilişkili (NTRKR1/2) protein olarak tanımlanmışlardır [26]. Bu ve takip eden diğer bir çalışmada, ROR proteinlerinin hücre dışında Ig-benzeri (Ig-like), sisteinden zengin Frizzled (FZD) ve diğer reseptör proteinlerde rastlanmayan Kringle (KRD) bölgelerini içerdiği gösterilmiştir [26, 27]. Proteinin hücre içi bölümü ise sırasıyla tirozin kinaz (TKD), serin/treonin zengin (Ser/Thr), prolin zengin (PRD) ve bir diğer serin treonin zengin bölgelerden oluşmaktadır (Şekil 2.2) [28].



Şekil 2.2: Farklı türlere ait ROR proteinlerinin domainleri.

ROR1/ROR2 proteinlerinin hesaplanan moleküler ağırlığı 104 kDa'tır. Ancak ROR1 proteini posttranskripsiyonel olarak N-glikozillenme bölgelerinden, glikozillendiğinden dolayı western blotta 100, 115 ve 130 kDa boylarındaki varyantlar görünmektedir [29]. Ayrıca bu N-glikozillenme ile oluşan 130 kDa boyundaki ROR1 proteini hücre yüzeyine yerleşmekte ve sinyal iletiminde önemli rol oynamaktadır [30]. Bununla birlikte yine aynı varyant mono-ubiquitinasyona da uğramaktadır.

ROR ailesi isimlendirilerken tanımlanmış ligandlarının olmaması ve kinaz aktivitesinin olmadığı düşünüldüğünden “Receptor tyrosine kinase like Orphan Receptor” olarak isimlendirilmiştir. Ancak ROR1 proteinindeki FZD bölgesinin reseptör ligand etkileşimde rol aldığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Fukuda ve ark. tarafından Wnt5a’nın fiziksel olarak ROR1 ile etkileşerek NF-kB sinyal yolağını aktive ettiği gösterilmiştir [31]. Daha sonraki çalışmalarda ROR1’in ligandı olarak epidermal büyüme faktörü (EGF) ve Nöregulin1 (NRG1)’ de tanımlanmıştır [32, 33]. Ayrıca ROR1 ile HER3’ün NRG1 varlığında heterodimer yaparak uzun kodlama yapmayan RNA’lar (lncRNA) aracılı Hippo/YAP yolağında rol oynadığı gösterilmiştir [32]. ROR1’in psödo-kinaz olduğundan bahsedilmesine karşın, akciğer kanserinde kinaz aktivitesine bağımlı veya kinaz aktivitesinden bağımsız olarak hücre sağ kalımını uyardığı gösterilmiştir [33]. ROR1 proteinin kinaz aktivitesi göstermeden MET onkogeninin substratı gibi görev aldığı ve MET aracılı fosforilasyonu ile hücre sağ kalımına katkı sağladığı gösterilmiştir [34]. Yapılan bu çalışmalar ile hem ROR1’in ligandlarının bir kısmı tanımlanmış hem de kinaz aktivitesine sahip olduğu ve kinaz aktivitesine bağımlı/bağımsız olarak sinyal iletiminde görev aldığı gösterilmiştir.

Embriyonik gelişim farklı basamaklarında ROR1 protein ifadesi bulunmaktadır [35]. ROR1/2 proteinlerinin fare embriyo ve fetüslerinde iskelet, kalp, akciğer ve sinir sisteminde ifade edildikleri, ancak ROR1’in erken dönemde sefalik mezankim ve nöral krest hücrelerinde, geç dönemde ise kalp ve alveollerde bulunduğu bildirilmiştir [35, 36]. Yine, Matsuda’nın çalışmasında geç embriyogeneze sinir sisteminde ROR1 ifadesinin kaybolduğu, buna karşın ROR2 ifadesinin devam ettiği belirtilmiştir. Ayrıca ROR1 ve ROR2 ifadesi memelilerin merkezi sinir sistemi gelişimi sırasında gelişimsel olarak düzenlenmekte ve nöron uzaması ile sinaps oluşumunda görev aldıkları saptanmıştır [37].

ROR1 proteininin embriyogeneze ve fetal hayattaki ifadesi ve önemine karşın sağlıklı erişkin dokularında ROR1 ifadesi ya çok az miktarda ya da hiç bulunmamaktadır. Sağlıklı dokulardaki bu düşük anlatımına karşın, ROR1’in hem hematolojik maligniteler hem de solid tümörlerde artmış ifadesi birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bu sebeple ROR1 proteinine onkofetal protein de denilmektedir.

2.3.1. Hematolojik Kanserlerde ROR1

ROR1 proteinin kanser ile olan ilişkisine dair ilk çalışmalar kronik lenfositik lösemide (CLL) ifadesinin saptanması ile gösterilmiştir [38, 39]. ROR1'in aşırı ifadesinin ilk olarak tanımlandığı B-hücreli kronik lenfositik lösemide (BCLL) anti-ROR1 antikorların lösemi hücrelerini tanıdığı ancak periferik kan hücreleri ile etkileşmedikleri bildirilmiştir [39]. Aynı çalışmada ROR1'in normal dokulardaki ifadeleri de araştırılmış ve yağ dokusunda beklenenden daha yüksek moleküler ağırlıkta bir proteinin güçlü anlatımı dışında testis, uterus, mesane, akciğer ve kolonda beklenen büyüklükte ancak çok zayıf ROR1 protein ifadesi saptanmıştır. İlginç olarak, yaklaşık 50 kDa büyüklüğünde bir protein anlatımı hem lösemi hücrelerinde hem de normal erişkin dokularında gösterilmiştir. Ancak, ne bu 50 kDa'luk ne de tam-uzunluktaki (full length) ROR1 izoformlarına normal karaciğer dokusunda rastlanılmamıştır [39].

ROR1'in promotor bölgesinden STAT3 bağlanma elementinin bulunması ve CLL'de yüksek STAT3 fosforilasyonu birlikte değerlendirildiğinde, CLL'de ROR1 ifadesinin IL6 tarafından STAT3-aracılı olarak arttırıldığı gösterilmiştir [40]. Takip eden çalışmalar, ROR1'in sadece CLL'de değil non-Hodgkin lenfomalar ve myeloid lösemilerde de yüksek oranda ifade edildiğini göstermiştir [41, 42].

ROR1'in B hücre gelişimi sürecindeki geçici ifadesi ise ilginç gözlemlere yol açmıştır. B hücre öncül reseptörünün (pre-BCR) olduğu ara aşamada pre-BCR'nin shRNA veya kinaz inhibitörü dasatinib ile baskılanması beklenmedik ROR1 ifade artışına yol açmıştır. Bu durum hem pre-BCR sinyal kompleksi ve hem de ROR1'in Akt aktivasyonuna yol açması ve pre-BCR baskılanmasına bir sağ kalım yanıtı olarak hücrelerin ROR1 anlatımını arttırdığı şeklinde açıklanmıştır [43].

2.3.2. Solid Kanserlerde ROR1

Solid tümörler mikro dizinlerinde yapılan çalışmada ise ROR1 ifadesine normal dokularda rastlanmamış, buna karşın pankreas, mesane, akciğer, prostat, kolon ve cilt kanserlerinde güçlü ROR1 anlatımı tespit edilmiştir [44]. Bununla birlikte farklı kanserlerde ROR1 ifadesinin mezenkimal fenotip ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

Meme kanseri primer tümör dokularında ROR1 ifadesinin agresif fenotip ile ilişkili ve hasta sağ kalımında negatif prognoz olduğu gösterilmiştir [45]. Aynı araştırmacılar kanser hücre hatlarında ROR1 ifadesini shRNA ile baskıladıklarında AKT ve CREB transkripsiyon faktörlerinin aktif fosforillenmiş (p-AKT, p-CREB) formlarında azalma gözlemlenmiştir. Bunun üzerine, ROR1-pozitif tümör dokularını incelemişler ve ROR1 anlatımı gösteren tümörlerde p-AKT ve p-CREB düzeylerinin yüksek, ROR1-negatif normal doku ve tümörlerde ise düşük olduğunu saptamışlardır. ROR1 ifadesinin olduğu meme kanseri hücre hatlarına Wnt5a uygulandığında hücre proliferasyonlarını arttırdığı belirlenmiştir. Bu hücre sağ kalımının ligandın tipinden bağımsız olarak ROR1'in kazein kinaz-epsilon aracılı PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının aktivasyonu üzerinden gerçekleşmektedir [45]. Elde edilen sonuçlar ile ROR1'in hücre sağ kalımı ile ilişkili olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışmayı destekler nitelikte, HeLa hücrelerinde RNAi ile kinaz ve fosfatazların baskılandığı bir tarama çalışmasında ROR1'in apoptoz regülasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur [46].

Meme kanserindeki bir diğer araştırmada, ROR1 ifadesi bulunan hastalarda EMT ile ilişkili ZEB1 ve Vimentin de artmakta ve bu profil kötü prognoza işaret etmektedir. ROR1 ifadesinin susturulduğu invaziv meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücrelerinde ZEB1, SNAI1, SNAI2 ve Vimentin azalmakta, hücreler invaziv karakterlerini yitirerek nude farede tümör oluşumu da baskılanmaktadır [2].

Akciğer adenokarsinomasında ise, TTF transkripsiyon faktörü ROR1 ifadesini arttırmakta ve bu da EGF ligandına bağlı EGFR sinyal aktivasyonuna ve ligand-bağımsız olarak da Src fosforilasyonuna yol açmaktadır [33]. Yine hücre sağ kalımı ile ilişkili olarak ROR1 Src tarafından fosforillenebilmektedir. ROR1 ile transfekte edilen COS-7 hücrelerinde Src, ROR1'in tirozin kinaz residüellerini fosforillemekte ve bunun da hücre sağkalımı ile invazyon için önemli olduğu gösterilmiştir. Src ile birlikte Met onkogeni de ROR1'i fosforilleyebilmektedir. Bu fosforillenme, ROR1'in prolin-zengin bölgesinde gerçekleşmekte ve Src'nin bu bölgeye bağlanarak ROR1'i aktive etmektedir [47]. Ayrıca bu çalışmada, Src-spesifik kinaz inhibitörü Saracatinib uygulanan hücrelerin invazyon yeteneğinde azalma gözlenirken, hücre proliferasyonunun değişmediği bulunmuştur. Dolayısıyla, MET-bağımlı fosforilasyonun anti-apoptotik yanıtta, SRC-bağımlı fosforilasyonun ise hücre invazyonunda rol almaktadır.

ROR1'in embriyogenezdeki ifadesinden dolayı kök hücre benzeri özellik ile ilişkisi over kanserinde incelenmiştir. Primer over kanseri ile oluşturulan fare ksenograft tümörlerinden ROR1-pozitif hücre popülasyonu akım sitometresi ile ayrıştırılmış ve hücrelerin CSC belirteci aldehid dehidrogenazı (ALDH) yüksek oranda ifade ettiği bulunmuştur [3]. Aynı çalışmada, ROR1-anlatımlı kanser kök hücrelerinde hem embriyonik kök hücre belirteçleri NANOG, OCT, SOX2 ifadelerinin zenginleştiği, hem de EMT ile ilişkili SNAI1, SNAI2, BMI ve Vimentin anlatımlarının arttığı tespit edilmiştir. Yine benzer bir şekilde glioblastomada CSC hücre grubunda ROR1 ifadesinin yüksek olduğu belirlenmiştir [48]. Bununla birlikte ROR1 ifadesinin baskılanması sonucunda CSC oluşturma potansiyelinin düştüğü ve EMT ile ilişkili genlerin ifadesinin de azaldığı saptanmıştır.

2.3.3. ROR1 monoklonal antikoları

ROR1 ifadesinin beyin, kalp, akciğer ve karaciğer dahil yetişkin organlar ile sağlıklı kan hücrelerinde bulunmamasına karşın hematolojik maligniteler ve solid tümörlerde artmış ifadesinden dolayı ROR1'i hedef alan özgül antikolar geliştirilmektedir [1, 39]. Yine bu geliştirilmekte olan antikoların in vitro ve in vivo terapötik etkinlikleri çeşitli çalışmalar ile gösterilmektedir. Widhopf ve ark. tarafından üretilen D10 monoklonal ROR1 antikoları ile fare CLL modelinde özgül olarak ROR1'i downregule ettiği gösterilmiştir. [49]. Bu antikor ROR1'in kringle domainine karşı geliştirilmiştir. Yine aynı antikorun, insan CLL'de apoptozu indüklediği, buna karşılık ROR1'in immünoglobulin benzeri domainine karşı geliştirilen antikorun ise doğrudan hücre ölümüne etkisinin olmadığı saptanmıştır [50].

Choi ve ark. tarafından insanlaştırılmış ROR1 monoklonal antikor (UC-961) geliştirilmiştir. Bu antikorun ROR1⁺ kanser hücrelerini tanıdığı ve prelinik çalışmalar ile de toksisite göstermediği belirlenmiştir [51]. Prelinik olarak güvenli olduğunun gösterilmesinden sonra CLL hastaları ile gerçekleştirilen Faz 1 klinik araştırmada da başarılı sonuçlar elde edilmiştir [52].

Yine ROR1⁺ CLL tedavisinde kullanılmak üzere ROR1'e özgül CAR-T hücreleri geliştirilmiş ve prelinik olarak güvenliliği kanıtlanmıştır [53]. Faz 1 çalışmaları için de çalışmalar devam etmektedir.

2.4. Eksozomlar

Hücrelerin birbirleri ile olan iletişimleri doğrudan hücre-hücre teması ile olabileceği gibi lipid, protein ve nükleotid gibi moleküllerin ilgili hücrelere taşınmasıyla da gerçekleşebilmektedir. Bu moleküllerin taşınması ise hücre-dışı veziküller (extracellular vesicles: EV) aracılığıyla olmaktadır. EV'lerin salgılanması prokaryotik hücrelerden bütün ökaryotlara kadar korunmuş olan evrimsel bir süreçtir. Bu veziküller tükürük, kan, süt, idrar gibi vücut sıvılarında bulunabilmekte ve hücrel kökenine, boyutuna ve özelliklerine göre eksozom, mikropartiküll, apoptotik cisimcik (apoptotic bodies), proteozom, onkozom gibi isimler ile anılmaktadır [54]. Eksozomlar boyut (40-100 nm çapında), yoğunluk (1.13-1.19 g/ml), morfoloji (tabak veya fincan şeklinde) ve protein belirteçleri gibi çeşitli ortak özellikler ile tanımlanabilmektedir. Eksozomlar, istenmeyen materyalin uzaklaştırılmasında kullanılan bir mekanizma olarak tanımlanmış, ancak immün yanıt sürecinde antijen sunma fonksiyonları zamanla anlaşılmıştır [55]. Daha sonraki çalışmalarda ise, eksozom aracılığıyla ilgili alıcı hücrelere lipid, protein, mRNA ve miRNA'ların aktarıldığı gösterilmiştir [56].

EV'lerin hücreye alınmasında da salgılanmasında da kaveolin-1 (CAV1) ya da kaveoleler görev almaktadır [57]. Membrana bağlı prion proteini (PRNP) CAV1'i lipid raft içerisinde organize eder ve CAV1'in internalize olmasına izin verir. Hücre içine alınan CAV1, multi-veziküler badilerin (MVB) lizozom ile birleşmesini inhibe ederek yıkımlarını engeller ve bu sayede membran ile birleşen MVB'ler eksozom olarak salgılanmaktadır [58].

Eksozomlar stres ve normal koşullar altındaki hücrelerden izole edilerek karakterize edilmiştir. Eksozom izolasyonu için ultrasantrifüj, sükröz gradyent ile birlikte ultrasantrifüj, immün-boncuklar ve jel filtrasyon ile izolasyon gibi teknikler kullanılmaktadır [56]. İzole edilmiş eksozomların karakterizasyonu TEM (Transmission Electron Microscopy), western blot ve akım sitometresi gibi teknikler ile biyokimyasal özelliklerine (morfoloji, boyut, eksozomal marker'lar gibi) dayalı olarak gerçekleştirilmektedir [59]. Gerçekleştirilen çalışmalar ile kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelere göre daha fazla eksozom salgıladıkları gösterilmiştir ve bu eksozomların otokrin, parakrin ve endokrin mekanizmalar aracılığıyla hücre adaptasyonuna katkı

sağladığı düşünülmektedir [60]. Tümörden köken alan eksozomların metastaz sürecine EMT indükleyici faktörler (Notch-1 ve Hif1 α) ve birçok matrix metalloproteaz taşıyarak katkı sağladığı gösterilmiştir [61, 62]. Prostat kanserinden salgılanan eksozomların adipoz dokusundan kökenlenen kök hücreleri kanser hücrelerine transforme ettiği gösterilmiştir [63].

2.4.1. Hepatoselüler Karsinomada Eksozomlar

HCC hücrelerinden izole edilen eksozomlar CD9 ve CD63 yüzey belirteçlerini taşımaktadır. Bu eksozomlar in vitro'da hücrelere verildiklerinde HGF/c-Met/Akt sinyal yolağını aktive ederek sorafenib'e karşı direnci indüklemektedir [64]. Benzer şekilde, kanser hücrelerine docetaxel ve cisplatin uygulandığında eksozom sekresyonunun arttığı ve mRNA ile miRNA taşıyan bu eksozomların komşu hücrelerde ilaca karşı direnci arttırdığı gösterilmiştir [65, 66].

He ve ark. 3 farklı metastatik HCC hücre hattından elde edilen eksozomlardaki kargoyu proteomik ve tüm RNA dizileme (RNA-seq) yaklaşımları ile analiz etmişler ve birçok onkojenik miRNA ile bazı onkoproteinlerin (MET, S100 ailesi üyeleri ve CAV1/2) eksozomlarda çok yüksek miktarda bulunduğunu göstermişlerdir [67]. Yine aynı çalışmada, bu eksozomların normal hepatosit hücrelerine aktarılması ile PI3K/Akt ve MAPK yolaklarının aktive olduklarını bulmuşlar ve bunun bir sonucu olarak da eksozom aktarılmış hepatositlerin migrasyon ve invazyon kapasitesi kazandığını saptamışlardır.

miRNA ve mRNA'ların eksozomlar aracılığıyla aktarıldığının 2007 yılında gösterilmesinden sonra eksozomları kullanarak diagnostik biomarker'ların belirlenebileceği fikri ortaya çıkmıştır [68]. Eksozomlar bazı ortak miRNA'ları taşıyabildikleri gibi köken aldıkları hücreye göre farklı miRNA'ları da taşıyabilmektedir. Bununla birlikte eksozomların taşıdıkları miRNA'lar köken aldığı hücre içerisindeki miRNA repertuarından da farklı olabilmektedir [60].

HCC hücre hattı olan SMMC-7721'nin ve salgıladıkları eksozomların miRNA içeriği incelendiği zaman hücre içerisinde düşük miktarda bulunan miR-486-5p ve miR-10b-5b gibi bazı miRNA'ların eksozom içerisinde yüksek miktarda bulunduğu

buna karşın hücre içerisinde yüksek miktarda bulunan let-7d-5p, let-7b-5p, ve let-7c-5p gibi miRNA'ların eksozomlarda düşük miktarda bulunduğu saptanmıştır [69].

Kanser hücrelerinde metabolizmanın düzenlenmesi, artmış glikoz alımı ve glikoliz ile gerçekleşmekte ve kanserin ayırıcı özelliklerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanser hücreleri miR-122 taşıyan eksozomların salgılanması sonucunda çevredeki sağlıklı hücrelerin glikoz alımını baskılamaktadır. miR-122, PKM2 (Pyruvate kinase isozymes M2) enzimini hedef alarak tümör mikroçevresindeki normal hücrelerin glikolitik metabolizma ve glikoz tüketimini baskılamakta ve böylece çoğalan kanser hücreleri için glikoz varlığını arttırmaktadır [70]. Bununla birlikte, HuH7 hücrelerinden salgılanan eksozomlarda miR-122 ifadesi bulunmuştur. Bu eksozomlar HepG2 hücresine aktarıldığında siklin G1 ve IGF-1R (Insulin-like growth factor-1 receptor) gibi miR-122 hedef genlerinin ifadesini değiştirerek hücre büyümesi ve proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir [71].

2.4.2. ROR1 ve Eksozom İlişkisi

ROR1'in eksozomlardaki ifadesi ile ilgili çalışmalar sınırlı kalmakta ve izole edilen eksozomların protein içeriğinin analizine dayanmaktadır. Webber ve ark. prostat kanser hücre hattı olan DU145 hücrelerinden eksozom izole etmişler ve bu eksozomlardaki protein içeriğini, hücrelerdeki protein içeriği ile karşılaştırmışlardır. İzole edilen eksozomlarda eksozom ile ilişkisi bilinen MFG-E8, integrin ve MET ile birlikte ilişkisi daha önce gösterilmemiş olan ROR1 ve ITIH4 proteinlerini belirlemişlerdir (Webber vd., 2014). Bunun yanında, kolorektal ve over kanseri hücre hatlarından izole edilen eksozomlarda da ROR1 proteini tanımlanmıştır (http://exocarta.org/gene_summary?gene_id=4919).

ROR1 ile eksozom biyogenezi arasında, kaveole yapısı üzerinden dolaylı bir etkileşim olasılığı bulunmaktadır. Küçük hücreli-olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) ROR1 proteininin, kaveole yapısının plazma membranında toplanmasından sorumlu olan CAV1 ve cavin-1 proteinleri ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir [72]. ROR1 ifadesinin baskılanması ile kaveole yapısının oluşmadığı ve ROR1'in CAV1'in lizozomal degradasyonunu inhibe ederek kaveole yapısının devamlılığını sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca nöroblastoma hücre hattı olan Lan-6 hücrelerinden farklı

membran bölgeleri izole edildiğinde lipid raft olarak tanımlanan membran bölgelerinde ROR1 proteinin zenginleştiğini göstermişlerdir [73].

3. GEREÇLER

3.1. Genel Kimyasallar

EDTA (Merck), MBG Etanol (Riedel de Haen), L-Glutamin (Lonza). B-Mercaptoetanol (Fischer Scientific), Gliserol (Fischer Scientific), Tris (Fischer Scientific), HCL (Fischer Scientific), RNase-ExitusPlus (AmpliChem), DMSO (Fischer Scientific), Complete Freund's Adjuvan (Sigma), Polietilenglikol (PEG; MW: 1500, (Sigma), Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific), Polybren (Thermo Scientific), Puromisin (InVivoGen), Amersham ECL Select (GE Healthcare), Dynabeads Protein G (Thermo Fisher), Paraformaldehit (PFA) (Fischer), RNase A (Sigma), Aseton (Fischer), Metanol (Fischer).

3.2. Cihazlar

+4°C Buzdolabı (Ariston), -20°C Derin Dondurucu (Ariston), -80°C Derin Dondurucu (Thermo, Forma -86°C ULT Freezer), Buz Makinesi (BAR-LINE BF85), Laminar Akım Kabini (Labconco, Logic), Karbondioksit İnkübatörü (Labogene, Scancell), Otoklav (Hirayama, Hiclave HVE-50), RT-qPCR (Applied Biosystem, StepOnePlus), PCR Kabini (Lab Companion), Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette). Santrifüj (Nüve, NF400), Soğurmali Santrifüj (Labogene, Scanspeed 1580R), Vortex (DragonLabs, MX-S), PCR (Biorad, Mj Mini). ; Laminar Kabin, Class II Tip (PMV Clean Air), Soğutmalı santrifüj (Heraeus Instruments Function Line), Soğutmalı Mikrosantrifuj (Beckman Coulter microfuge 22R), Minisantrifüj 96 kuyulu mikroplak rotorlu (Labogene), Derin dondurucu, -80 °C (ESCO), CO2 İnkübatör (Labogene, Benchtop 6400-4), 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), Su Banyosu (Lauda AL12), 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), Soğutmalı

İnkübatör (B. Braun Biotech Int. Certomat BS-T), Mikrodalga fırın (Kumtel), Mikrobiyal İzolasyon Kabin (Nüve MN090), Orbital Çalkalayıcı (Denville Scientific), Termal-döngü cihazı (Biometra), Real-Time PCR cihazı (Agilent Technologies Stratagene Mx3000P), Elektroforez güç kaynağı (BioRad), Jel/membran görüntüleme sistemi (Biorad ChemiDOC XRS), Otoklav (Nüve), FACS JAZZ (Becton Dickinson), Accuri C6 (Becton Dickinson), AKTA-Purifier Kromatografi (GE, Massachusetts), NanoDrop (Thermo Scientific), Bioruptur Pico (Diagenode), Qubit 3 (Thermo Scientific), LSM 880 Airyscan Konfokal Mikroskop (ZEISS), Xcelligence DP (ACEA), FACS Calibur (Becton Dickinson), 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 Aminoasit (NEAA) (Gibco), 10X fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS, Gibco), 10X Tripsin (Gibco) ve HAT (Hypoxanthine/Aminopterin/Thymidine) (Sigma).

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 temin edilmiştir. Hep3B, HepG2, PLC/PRF/5, HuH7 ve SKHEP1 hücre hatları yüksek-glukoz içerikli DMEM besiyerinde ve SNU387 ile SNU423 hücre hatları da RPMI besiyerinde büyütüldü. SP2/0 hücreleri, 132 μ M 8-Azaguanine içeren %20 FBS'li yüksek-glukoz içerikli DMEM besiyerinde seçildi. Füzyon işleminden sonra hibridomalar HAT DMEM besiyerinde seçilime tabi tutuldu.

Hepa1-6, S6-1B ve S6-1D fare HCC hücre hatları ile HEK293T hücre hattı ATCC'den temin edildi ve yüksek-glukoz içerikli DMEM besiyerinde büyütüldü.

3.5. Çözelti ve Tamponlar

- 10X PBS: NaCl 80 g, KCl 2 g, Na₂HPO₄·2H₂O 17,8 g, KH₂PO₄ 2,4 g, 1 lt (pH:7.4).
- Hücre Dondurma Besiyeri: %90 FBS, %10 DMSO.
- 2x Laemmli buffer: 4% SDS, 20% glycerol, 0.125 M Tris HCl.
- 10X TBS: 500 mM Tris-Cl, pH 7.6, 1.5 M NaCl.
- TBS-T: 1X TBS, %5 Tween-20.
- Elüsyon Tamponu: 0.1M Glisin-HCl tamponu (pH: 2,7).
- Triton-X100 buffer: 50mM Tris-cl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% TritonX-100 ve proteaz inhibitörü.
- 4x Yükleme Tamponu: %40 Gliserol, %20 SDS, 800 mM β-merkaptöetanol, 200mM Tris (pH=6.8), %0,1 Bromofenol mavi.
- %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.
- %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.
- Elektroforez Yürütme Tamponu: 25 mM Tris base, 190 mM glycine, 0.1% SDS ve Tampon pH'ı 8,3 civarına getirildi.
- Transfer Tamponu: 25 mM Tris base, 190 mM glycine, 0.1% SDS ve %10 metanol.
- Blocking Solüsyonu WB: %5 Yağsız süt tozu, 1X TBS-T.
- Blockin Solüsyonu IF: %2 BSA, 1X TBS-T.
- 10X Bağlanma Tamponu: 10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂.

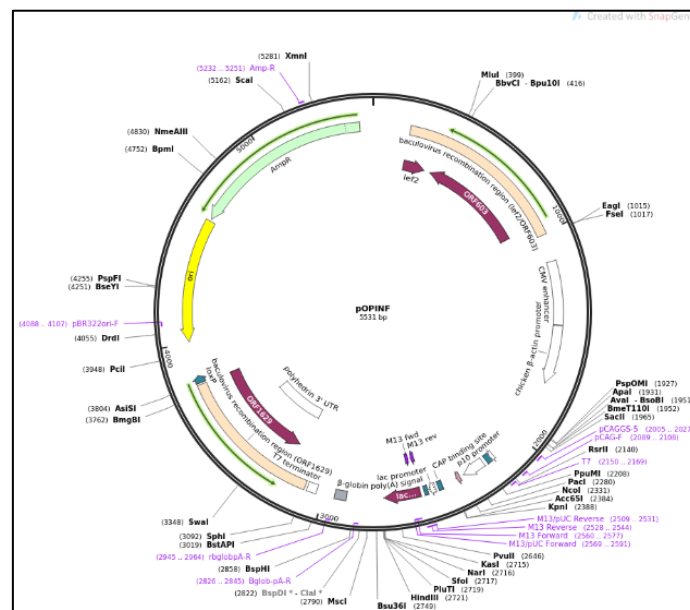
3.6. Bakteriler ve Besiyerleri

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

Rosetta(D3) pLacI bakterileri de ampicilin, chloramphenol ve %1 glukoz içeren katı ve sıvı besiyerinde çoğaltıldı ve pOPINF vektörünün çoğaltılması amacıyla kullanıldı.

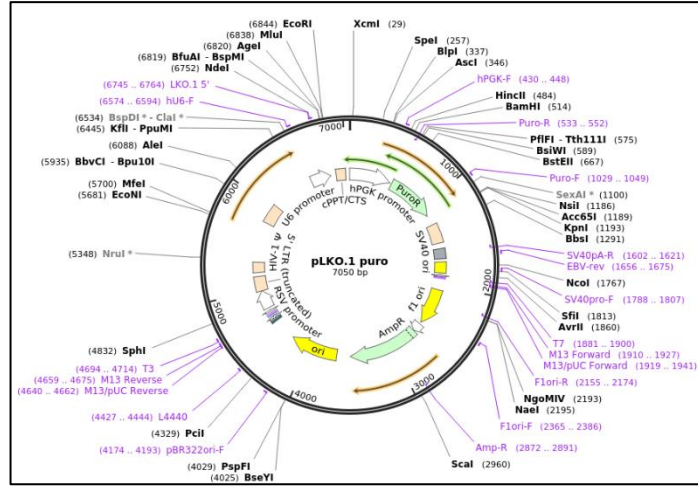
3.7. Vektörler ve Primerler

Kısmi-rekombinant ROR1 proteini pOPIN (26042) vektörüne klonlanarak çoğaltıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: pOPINF vektör haritası.

ROR1 ifadesinin baskılandığı çalışmalarda lentiviral formattaki ROR1 shRNA (TRCN0000002026) plazmidi Sigma firmasından ve pLKO.1 (#8453) Addgene'den temin edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: 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 edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: İleri ve geri primer listesi.

	ileri primer (5'-3')	geri primer (5'-3')
hROR1_ab	AAGTTCTGTTTCAGGGCCCGAACCT CGACACCACAGACAC	ATGGTCTAGAAAGCTTTAATTGCGAG CTGCAAGGTCCTT
ROR1	GTTTCCCAGAGCTGAATGGA	GGATGTCACACAGATCAGACTT
GAPDH	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT	CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA
ABCG1	CTACCACAACCCAGCAGATT	AGGTCTCTCTTGTGGTCTGA
ABCC6	CCCAGGCTGATTGGATCATAG	GGTTCTGTTTCTCCTTCTCCTC
ABCB1	GGTGAGTCAGGAACCTGTATTG	AGTCATAGGCATTGGCTTCC

3.8. Antikorlar, Boyalar ve İlaçlar

Western blot antikorları; ROR1 (1/500, monoklonal hibridoma; IC5 ve 5B3 klonları), β -actin (Cell Signaling, 1/5000), E-cadherin (BD Transduction Laboratories, 1/1000), Vimentin (ell Signaling, 1/1000), PARP (Cell Signaling, 1/1000), CK19 (Santa Cruz Biotechnology, 1/1000), His-tag (Qiagen, 1/3000), CD63 (Abcam, 1/1000),

TSG101 (Cell Signaling, 1/1000), GM130 (Cell Signaling, 1/1000) Antimouse-HRP ve antirabbit-HRP sekonder antikorlar (Cell Signaling, 1/4000).

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), antimouse-Alexa488 sekonder antikor (Cell Signaling, 1/500).

Boyalar, Propidium Iodide (BD), Eozin (Sigma), DAPI (Thermo Scientific) , Vybrant DiO (Thermo Scientific), , RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (Intronbio).

İlaçlar; Oksaliptatin (Hospira) ve Doksorubisin (Sigma).

3.9. Kitler

NucleoSpin Plazmid miniprep (Macherey-Nagel, ABD), QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, 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), Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer, ABD), miRNeasy Micro Kit (Qiagen, ABD), Quantimir cDNA sentez kiti (System Biosciences, ABD), Cancer MicroRNA qPCR Array (System BioScience, ABD).

4. YÖNTEMLER

4.1. Hücre Stoklarının Hazırlanması

Kullanılan hücre hatları sıvı azot tankından çıkartılıp oda sıcaklığında eriyince, üzerlerine yavaşça %10 Fötal dana serumu, %1 penisilin-streptomisin ve 8mM L-Glutamin ile desteklenen düşük-glukoz içeren DMEM/RPMI besiyeri eklendi ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı aspire edildi ve hücre pelleti besiyeri ile çözüldükten sonra 60mm'lik kültür petri kabınlarına ekim yapılarak 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre yerleştirildi.

4.2. Hücre Kültürü

Hücreler 100 mm kültür petri kabında haftada iki kez pasajlanarak çoğaltıldı. Petri kabının %80-90'ını kapladıklarında hücre besiyeri aspire edildi. Hücrelere 1X PBS eklenerek yıkandı ve aspire edilerek 3X tripsin eklendi. Inkübatörde 3 dk tutularak hücrelerin kültür petri kabının yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. Hücre pasajı ihtiyaca bağlı olarak 1/2 - 1/6 dilüsyonlarında yapıldı.

4.3. Transformasyon

Lentiviral ROR1 shRNA ile pLKO.1 plazmidleri E. coli DH5 α 'ya ve pOPINP plazmidleri de Rosetta(D3) pLacI bakterisine transforme edilmiştir.

30 ng plazmid 100 μ l DH5 α kompetan hücrelerine eklendi ve 30 dk buzda inkübe edildi. 42°C'de 2 dk ısı şokunun ardından bakterilerin üzerine 700 ml antibiyotik içermeyen LB sıvı besiyeri eklendi. Bakteriler 37°C'de 1 saat çoğaltıldı. 1 saatin sonunda bakteriler santrifüj edilerek çöktürüldü ve yaklaşık olarak 50 μ l LB içerisindeki bakteriler antibiyotik içeren 10 mL LB-agar dökülmüş plate'e dikkatlice yayıldı. Plate'ler 37°C'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün büyüyen tek kolonilerden biri antibiyotik içeren 5 mL LB besiyerine inoküle edildi ve 37°C'de gece boyu bakteriler büyütüldü.

Bakterilerden plazmid izolasyonu NucleoSpin Plazmid miniprep (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi.

4.4. ROR1 İfadesinin *In Silico* Analizi

HCC'deki ROR1 ifadesinin belirlenmesi amacıyla Avrupa Biyoinformatik Enstitüsünün Ekspresyon Atlası (European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) Expression Atlas-<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) internet sitesindeki Homo sapiens dataseti ile “disease” ve “pan-cancer analysis of whole genomes-liver” fitleri kullanıldı. 99 HCC ve 52 normal karaciğer örneğine ait veriler indirildi ve istatistiksel analiz olarak student t-testi kullanıldı ve Microsoft Excel (Office 10) ile grafikler oluşturuldu.

4.5. Monoklonal Antikor Üretimi

ROR1 proteinine karşı monoklonal ROR1 antikorunu geliştirmek amacıyla ROR1'in hücre-dışı bölgesi ile hücre-içi bölgesinin bir kısmını kapsayan (aa120-aa620) kısmi-rekombinant protein bakteride üretildi ve saflaştırıldı. İmmünizasyon aşamalarından sonra hibridoma klonları seçildi ve ROR1 proteinine özgü geliştirilen monoklonal antikor elde edildi.

4.5.1. Rekombinant protein üretimi

Kısmi-rekombinant protein elde edilmesi için klonlama basamaklarında pOPINF vektörü kullanıldı. ROR1 proteinin aa120 ile aa620 arasındaki bölge HuH7 Hepatoselüler Karsinoma hücre hattının cDNA'sından çoğaltıldı. Klonlama basamağında homoloji temeline dayanan Sequence- and Ligation-Independent Cloning (SLIC) metodu kullanıldı [74]. pOPINF vektörü NheI enzim kesimi ile lineer hale getirildikten sonra hem PCR ürünü hem de kesilmiş vektör agaroz jelden saflaştırıldı. Vektör-insert oranı 1:3 olacak şekilde SLIC reaksiyonu hazırlandı; 100 ng insert/ 50 ng plazmid/ 1 µl NEB 2.1/ 0.5 µl T4 DNA polimeraz/ ddH₂O ile 10 µl toplam hacim. Hazırlanan SLIC reaksiyonu 25°C'de 2.5 dk inkübe edildikten sonra 30

dk da buzda tutuldu. Daha sonra reaksiyon hacminden 5 ul alınarak DH5 α 'ya transforme edildi. Oluşan kolonilerden en az 5 tanesi seçilerek sekansa gönderildi. Sekansı doğrulanan plazmid Rosetta(D3) pLacI bakterisine aktarıldı ve ampicilin, chloramphenol ve %1 glukoz içeren agara yayıldı. Büyüyen kolonilerden, tek koloni alınıp sıvı kültürde OD600 değeri 0.6-0.8 arasına gelince bakteriler IPTG ile indüklendi. İndüksiyondan yaklaşık olarak 3 saat sonra (OD600 değeri 2.1 iken) bakteri pelleti toplandı ve nikel kolon kullanılarak rekombinant ROR1 proteini saflaştırıldı.

ROR1'in hücre-dışı kısmına denk gelen (aa120-aa400) kısmi-rekombinant ROR1 proteini Site-directed mutagenez (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent) yöntemi ile oluşturuldu ve Rosetta(D3) pLacI bakterilerinde ifade ettirildi.

4.5.2. İmmünizasyon çalışmaları

Bağışıklama için kullanılacak BALB/c fareler TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından sağlandı ve tüm süreç boyunca fareler bu laboratuvarında tutuldu. Çalışmada 6-8 haftalık BALB/c fareler kullanıldı ve 30 μ g rekombinant ROR1 proteini Complete Freund's Adjuvan ile 1:1 oranında karıştırılıp farelerin peritonundan enjekte edildi.

Bağışıklama işlemine, 2 hafta aralıklar ile devam edildi ve 3. ve 4. Enjeksiyonların ardından bağışıklanmış ve kontrol farelerin serum antikor seviyeleri farklı seyreltmelerde 100 ng rekombinant ROR1 proteini ile kaplanmış ELISA plaklarında indirekt-ELISA yöntemiyle test edildi. 2 hafta aralıklarla gerçekleştirilen ve rekombinant proteinin incomplete Freund's adjuvanı ile 1:1 oranında karıştırılarak periton içine enjeksiyonu ile devam edildi. 4. Bağışıklama sonucunda en yüksek aktivite gösteren fare, füzyon işleminden 3 gün önce son kez hem periton içi hem de kuyruk veninden enjeksiyon yoluyla bağışıklandı.

4.5.3. Hibridoma klonlarının geliştirilmesi

Füzyon işleminden önce Myelom hücreleri, 132 μ M 8-Azaguanine içeren besiyerinde (%20 Serum içeren DMEM) 1 hafta inkübe edilerek seçildi. Myelom hücrelerinin füzyon işlemi sırasında logaritmik büyüme fazında olmalarına özen gösterildi. Füzyondan 1 gün önce 10 adet 96 kuyucuklu plaka besleyici (feeder) dalak hücreleri ve makrofaj hücreleri ile kaplandı.

Seçilen farenin dalağı petri üzerinde 100 μ m cell strainer içerisinde ezilerek hücreler ayrıştırıldı. Ardından strainer üzerinden 10 ml besiyeri geçirilerek kalan hücrelerin de petriye düşmesi sağlandı. Petride toplanan dalak hücreleri ve büyüme fazındaki myelom hücreleri ayrı ayrı 50 ml santrifüj tüplerine aktararak 2 kez serumsuz besiyeri ile yıkandı. 18×10^6 dalak hücresi 6:1 oranında myelom hücreleri ile karıştırıldı ve 1,5 ml Polietilenglikol (PEG; MW: 1500), ve ardından da %20 serumlu besiyeri eklenerek füzyon tüpü 5 dk. 37°C'de bekletildikten sonra santrifüjlendi. Hücreler HAT (Hypoxanthine/Aminopterin/Thymidine) içeren seçici besiyerinde çözülerek 96 kuyucuklu plakalara dağıtıldı.

Haftada 2 kez besiyeri değiştirilerek koloni oluşumları takip edildi. ROR1-antikoru salgılayan hibrit hücrelerin belirlenmesi amacıyla kuyu üst-sıvıları rekombinant ROR1 antijeni kaplanmış ELISA plaklarında tarandı. ELISA testi sonucunda pozitif reaksiyon veren klonlar (absorbans değerleri negatif örneğin en az 3 katı olan kuyular) tespit edildi. Klonlar arasından en yüksek absorbans değerine sahip olan 4 klon monoklonaliteyi sağlamak amacıyla alt klonlama işlemine tabi tutuldu.

Benzer şekilde 96 kuyucuklu plakalar dalak ve makrofaj hücreleri ile kaplanarak kuyu başı 1 hücre düşecek şekilde dağıtıldı. Hücrelerin seçim sürecini sürdürmek için kültürler HAT DMEM (%20 Serum) besiyeri ile devam edildi. Yine pozitif kuyular ELISA testi ile incelendi ve en güçlü sinyal veren kuyudaki hücreler ikinci alt klonlama işlemine tabi tutuldu.

Birinci ve ikinci alt klonlama işlemlerinde, test edilen tüm kolonileri ELISA testinde pozitif reaksiyon veren klonlar, monoklonal olarak değerlendirildi. En yüksek aktiviteyi gösteren kuyu geniş ölçekli antikör üretimi için aşamalı çoğaltmaya alındı.

Bu hücreler önce 96 kuyu, sonra 24 kuyulu plaklarda çoğaltılacak ve en sonunda hücre kültürü şişelerine aktarılarak büyütüldü.

ELISA ve western blotta ROR1'e karşı güçlü reaktivite gösteren 3 farklı klon-kökenli antikorların izotipleri "Mouse mAb Isotyping Kit" (Pierce Rapid ELISA, Thermo Scientific) kullanılarak belirlendi.

4.5.4. Monoklonal antikorların saflaştırılması

Monoklonal antikorların saflaştırılma işlemleri için hibridoma hücreleri %90 yoğunluğa ulaşınca serumsuz DMEM besiyerinde 3 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 Afinité Kolonuna (HiTrap Protein G, GE, Massachusetts, ABD) yüklendi. 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, ROR1 peptidine karşı özgüllükleri ELISA yöntemiyle test edildi ROR1-pozitif monoklonal antikorlar -20°C'de saklandı.

4.6. ROR1 Hücre Klonlarının Oluşturulması

ROR1 ifadesi baskılandığı (PLC/PRF/5 ve SNU387) ve ROR1'in aşırı ifade edildiği (HEP3B) hücre klonları elde edildi.

4.6.1. Viral partikül üretilmesi

HEK293T hücreleri kullanılarak lentiviral partiküller elde edildi. Bu amaçla, kuyu başı 2×10^5 hücre 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Ertesi gün Lipofectamine 3000 kimyasalı kullanılarak 1 µg plazmid (shROR1, shpLKO.1 ve ROR1-OE) ile 5 µl lentiviral paketleme karışımı (Packaging Mix, Sigma) hücrelere verildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler 100 mm petriye alındı ve taze besiyeri eklendikten 48 saat sonra hücre üst-sıvıları toplandı ve -80°C'de saklandı.

4.6.2. ROR1 ifadesi baskılanmış ve kontrol klonlarının geliştirilmesi

PLC/PRF/5 and SNU387 hücreleri %40 dolulukta 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Ertesi gün, hücreler 8 µg/mL Polybren (Thermo Scientific, ABD) varlığında 1 mL viral partikül ile enfekte edildi. 24 saat sonra, hücreler 60 mm petriye pasajlanarak 2 µg/mL Puromisin (InVivoGen, USA) ile klon seçilimine başlandı. 2 hafta antibiyotik seçiminden sonra kalımlı heterojen ROR1-baskılanmış ve kontrol hücre klonları oluşturuldu. Kontrol hücrelere göre shROR1 klonlarındaki ROR1 baskılanması gen ifadesi seviyesinde RT-qPCR ile ve protein seviyesinde de western blot ile gösterildi.

4.6.3. ROR1 aşırı ifade eden klonların geliştirilmesi

ROR1 ekspresyon ve kontrol virüsleri ile yukarıda anlatıldığı şekilde Hep3B hücreleri transfekte edildi. 2 haftalık puromisin seçiminden sonra ROR1 aşırı ifadesi gen seviyesinde RT-qPCR ile ve protein seviyesinde de western blot ile gösterildi.

4.6.4. TGF-β ile EMT indüksiyonu

5x10⁵ PLC/PRF/5 hücresi 60 mm petriye ekildi ve 24 saat sonra 4 µg/mL TGF-β ile 36 ve 96 saat muamele edildi. Kontrol petrisine 0 µg/mL TGF-β verildi. Daha sonra 2x SDS buffer kullanılarak hücre lizati elde edildi ve WB ile protein ifadesi incelendi.

4.7. Hücre Klonlarında Gen İfadesi Analizleri

4.7.1. RNA İzolasyonu

Gen ifadesi çalışmaları için RNA izolasyonu NucleoSpin RNA II izolasyon kiti (Macharey-Nagel, ABD) kullanılarak, üretici firmanın verdiği kullanma talimatına uygun bir şekilde yapıldı. Kısaca, hücre pelleti lizis tamponu ile lizis edildi ve filtrelendi. Daha sonra sıvının üzerine RNA-bağlama solüsyonu eklenerek total RNA'yı tutacak olan kolona uygulandı. Daha sonra kolon yıkandı ve yüksek saflıkta RNA'nın elüsyonu 30 µl dH₂O kullanılarak yapıldı.

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.

4.7.2. cDNA sentezi

cDNA sentezi High-Capacity cDNA Reverse Transkriptaz (Thermo Scientific, ABD) kiti ile üretici firmanın talimatlarına uygun olarak yapıldı. Kısaca, her 20 ul reaksiyon için 2 µg total RNA kullanıldı. Öncelikle 2X RT master karışımı hazırlandı ve 10 µl hacimde PCR tüpüne alındı (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

Her bir PCR tüpüne 10 µl total RNA örneğinden eklendi (2 µg total RNA). Hacmi 20 ul olan cDNA sentez karışımı PCR cihazına yerleştirildi ve tablo.. gösterilen döngü şartlarında cDNA sentezi yapıldı (Tablo 4.2).

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	∞

Sentezlenen cDNA'lar, -20°C derin dondurucuda saklandı.

4.7.3. RT-qPCR ile gen ifadesi analizi

Gen ifadesi değişimlerinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla 20 µl reak Reaksiyon hacmi hazırlandı ve 40 ng cDNA kalıp olarak kullanıldı (Tablo 4.3). Maxima Cybergreen Master Mix (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak Kitin önerdiği döngü şartlarında RT-qPCR reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.3: RT-qPCR reaksiyon tablosu.

2X master mix	10 µl
İleri primer (125 mM)	0,25 µl
Geri primer (125 mM)	0,25 µl
cDNA (40 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	20 sn
	60	30 sn
	72	30 sn
Erime eğrisi	55 - 95	0.1 sıcaklık değişiminde ölçüm

Gen ifadesi analizi ise *ddCt* formülü ile *GAPDH*'a göre normalize edilerek hesaplandı.

$$ddCt = E_{gen}^{dCt_{gen}(kalibratör-örnek)} / E_{norm.}^{dCt_{norm.}(kalibratör-örnek)} \quad (4.1)$$

$$\text{Relative ekspresyon} = \text{Log}_2(ddCt) \quad (4.2)$$

qRT-PCR reaksiyonu triplike yapılmış ve denemeler 3'er kez tekrarlanmıştır.

4.8. Hücre Klonlarında Protein İfadesi Analizleri

Hücre klonlarındaki protein ifadesi çalışmalarında western blot, immünoçöktürme, akım sitometresi ve immünfloresan yöntemleri kullanılmıştır.

4.8.1. Western blot

Hepatosellüler karsinoma hücre hatlarında ve hücre klonlarında protein ifadesinin belirlenmesi amacıyla total protein lizatları elde edildi. Hücreler 10 cm'lik petrilerde büyütüldü ve %70-80 doluluğa ulaştığında 2 kez soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra PBS ile kazınarak tüpe alındı ve 4000 rpm'de +4 derecede 2 dk santrifüjlenerek hücre pelleti elde edildi.

Pellet hacmine uygun olarak 2x Laemmli buffer veya 1x Triton-X100 buffer eklenerek vortexlendi. Buzda 20 dk inkübe edildikten sonra Bioruptur Pico (Diagenode) ile 30-sec-on/30-sec-off olacak şekilde 6 döngü sonike edildi. 14000 rpm'de +4 derecede 15 dk santrifüjlenerek süpernatant kısmı protein lizatı olarak -20°C'de saklandı.

Qubit protein assay kit (Thermo Scientific, ABD) ile protein miktarı belirlendi ve 50 ug proteine karşılık gelen hacim 4x yükleme tamponu ile karıştırılarak %10'luk SDS-PAGE jele yüklendi. Protein örnekleri üst jelden geçene kadar 80 V'ta , daha sonra da 120 V'ta yürütüldü. Proteinlerin PVDF membrana aktarımı TransBlot (Biorad) cihazı ile gerçekleştirildi (Yüksek moleküler ağırlık programında, 30 dk). Membranlar 1 saat oda sıcaklığında %5 Tween-20 içeren yağsız süt tozu ile bloklandı. Daha sonra primer antikorlar ile +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Membranlar 3 kez 5 dk TBS-T ile yıkandıktan sonra uygun HRP-bağlı sekonder antikorlar ile 1,5 saat muamele edildi. Membranlar tekrar 3 kez 5 dk TBS-T ile yıkandı. Amersham ECL Select (GE Healthcare) kemilüminesan substratı uygulanan membrandan protein görüntüleri Görüntü Analiz Sisteminde (Biorad) fotoğraflanarak dosyalandı.

4.8.2. İmmün-çöktürme

Triton-X100 buffer ile SNU387 hücrelerinden total protein lizatı elde edildi. 50 µl manyetik boncuk (Dynabeads Protein G, Thermo Fisher, ABD) 2 kere TX100 tamponu ile yıkandı. Boncuklar, 25 µg anti ROR1 5B3/1C5 monoklonal antikoru ile TX100 tamponu içerisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Devamında TX100 tamponu ile iki kere yıkanan boncuklar, hücre lizatı ile gece boyunca +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün TX100 tamponu ile 3 kere yıkanan boncuklar, 30 µl 4x Laemmli Tamponu ile 70°C'de inkübe edildi ve antikorlar ile bağlı proteinlerin boncuklardan ayrılması sağlandı. Devamında SDS-PAGE jele yüklenen örnekler, PVDF membrana aktarıldı ve 5B3 ile indirilen proteinlere anti-ROR1 5B3 monoklonal antikoru ve 1C5 ile indirilen proteinlere de anti-ROR1 1C5 antikoru ile western blot yapıldı.

4.8.3. Akım sitometresi analizi

Hücreler 100 mm petrilerde %70-80 yoğunluğa ulaştınca 1 kez PBS ile yıkandıktan sonra 4 mM EDTA solüsyonuyla 10 dk inkübe edilerek petrinin yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. Hücreler PBS ile yıkanarak 300 G'de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra, hücreler 100 µl'sinde 1×10^6 hücre olacak şekilde PBS içerisinde çözüldü ve 10 µg 5B3 antikoru ile 1 saat +4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda PBS ile yıkandı ve Alexa 488 floresan konjuge antikoru ile birlikte 1 saat +4°C'de tutuldu. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 400 µl PBS içerisinde Accuri C6 akım sitometresi (BD) ile analiz edildi.

4.8.4. İmmunfloresan görüntüleme

6-kuyucuklu plakalara steril edilmiş edilmiş lameller yerleştirildikten sonra kuyu başı 3×10^5 hücre ekildi. Ertesi gün hücrelere 2 kere PBS ile yıkandıktan sonra %2 Paraformaldehit (PFA) ile 15 dakika fikse edildi. Ardından 3 kere PBS ile yıkanan hücreler %2 BSA-PBS ile 60 dakika oda sıcaklığında blokladı. Bloklama işleminin ardından, hücreler 2.5 µg anti-ROR1 5B3/1C5/9F10 antikoru ile 1 saat inkübe edildi.

Ardından 3 kere PBS ile yıkanan hücreler, 1:500 oranında hazırlanan Alexa Flour 488 bağlı Anti-IgG ikincil antikorlar ile 1 saat inkübe edildi. İkincil antikor inkübasyonunu takiben 3 kere PBS ile yıkanan örnekler 30 dakika DAPI (1:1000) solüsyonu içerisinde inkübe edildi. Son olarak sırasıyla birer kere PBS ve distile su ile yıkanan örnekler sabitleme ajanı (%80 gliserol) yardımıyla lam üzerine ters çevrilerek kapatıldı. Hazırlanan slaytlar Zeiss LSM 880 Airyscan Konfokal Mikroskop ile görüntülenip fotoğraflandı.

4.9. Hücre Klonlarında Fonksiyonel Analizler

ROR1'in hepatokarsinogenezdeki rolünün daha iyi anlaşılması için ROR1 ifadesi baskılanmış ve kontrol hücrelerinde fonksiyonel çalışmalar yapıldı.

4.9.1. Hücre proliferasyonu analizi

ROR1 baskılanmış ve kontrol hücre klonlarının proliferasyonları Xcelligence cihazı ile gerçek zamanlı olarak incelenmiştir. PLC-pLKO, PLC-shROR1, SNU387-pLKO, SNU387-shROR1, HEP3B-ROR1 ve HEP3B-RED hücreleri kuyu başı 1×10^4 olacak şekilde ekilerek 72 saat boyunca kaydedildi. Farklı zaman aralıklarındaki "normalize hücre indeksi" değerleri kullanılarak proliferasyon yeteneklerindeki değişikliklerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism6 programı ile "iki yönlü Anova" testi kullanılarak yapıldı ve grafikler elde edildi.

4.9.2. Hücre döngüsü analizi

Hücre döngüsü analizi için PLC-pLKO, PLC-shROR1, SNU387-pLKO ve SNU387-shROR1 hücreleri 2×10^5 hücre 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve 48 saat sonra tripsinle kaldırılarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de %70 etanol ile gece boyu fikse edildi. Ertesi gün, fikse edilmiş hücreler 100 μL RNase A (0.260 Knudson U) ve 400 μL PI (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ile 37°C 'de 1 saat inkübe edildi. Fazla boya santrifüj ile uzaklaştırıldı ve hücreler 400 μL soğuk PBS ile çözülerek FACS Calibur (BD, ABD) akım sitometresi cihazı ile analiz edildi.

4.9.3. Apoptoz direnci

Oksaliplatin (Hospira, UK) ve Doksorubisin'nin (Sigma, ABD) ROR1 baskılanan hücrelerdeki pro-apoptotik etkilerini incelemek amacıyla PLC-pLKO, PLC-shROR1, SNU387-pLKO ve SNU387-shROR1 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara kuyu başı 1.5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücreler 0, 200, and 400 μM Oksaliplatin ile 48 saat ve 0, 0.5, and 3 $\mu\text{g/mL}$ Doksorubisin ile de 24 saat inkübe edildi. Hücreler daha sonra tripsin ile kaldırılarak western blot ile kesilmiş PARP proteini ifadesine bakıldı. Yüzde sağ kalım, imageJ yazılımı ile kesilmemiş PARP (p116-PARP) band yoğunluğunun aktin bandının yoğunluğuna oranlanması ile belirlendi.

4.9.4. Doksorubisine tutulumu

ROR1 baskılanmasına bağlı olarak hücrelerden ilaç atılımındaki değişiklikler, floresan özellikteki Doksorubisin'in hücre içerisinde tutulumunun ölçülmesi ile belirlendi. PLC-pLKO, PLC-shROR1, SNU387-pLKO ve SNU387-shROR1 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara kuyu başı 1.5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücreler 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Doksorubisin ile 1 saat muamele edildi ve PBS ile yıkandıktan sonra taze besiyeri eklenerek 4 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, hücreler tripsin ile kaldırıldı ve FACS Calibur (BD) akım sitometresi cihazı ile analiz edildi. Mean Floresan Şiddeti (MFI) değeri hücre içerisinde tutunmuş Doxorubicin'in kuantifikasyonu için kullanıldı.

4.9.5. Migrasyon analizi

ROR1 baskılanmış ve kontrol klonlarının migrasyon kapasiteleri transwell insertleri ile test edilmiştir. PLC-pLKO, PLC-shROR1, SNU387-pLKO ve SNU387-shROR1 hücreleri 8 mm por çapındaki 24 well Transwell insertlerine (BD Falcon) 2.5×10^5 hücre olarak ekilmiştir. 2 saat sonra, üst-bölmedeki hücreler aspire edildi ve yerine serumsuz-besiyeri eklendi. Hücreler, 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra alt ve üst-bölmeler Aseton:Metanol (%50:%50) ile fikse edildi. Üst-bölme eozin solüsyonu ile ve alt-bölmede DAPI solüsyonu ile boyandı. Üst-bölmedeki hücreler

pamuklu-çubuk ile güzelce temizlendi. Daha sonra her bir insertn alt-bölmesi Olympus CKX41 floresan mikroskopun UV filtresi ile fotoğraflandı ve g eden hücrelerin nükleusları imageJ yazılımı ile sayıldı.

4.9.6. Anoikis'e direnç

PLC-pLKO, PLC-shROR1, SNU387-pLKO ve SNU387-shROR1 hücreleri 6 kuyucuklu ultralow-attachment plakalara (Corning) kuyu başı 1.5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra hücreler toplandı ve santrifüj işleminin ardından 4 mM EDTA solüsyonu ile 10 dk inkübe edilerek hücre kümelerinin birbirinden ayrılması sağlandı. Daha sonra hücreler PBS ile yıkanarak 300 G'de 5 dk santirjlendi. Hücreler mL'sinde 1×10^6 hücre olacak şekilde 1X bağlanma tamponunda çözüldü ve 100 l hücre 5 l AnnexinV-APC (BD, ABD) ve 5 l PI (BD, ABD) ile oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Anoikis direnci apoptotik hücre yüzdesinin Accuri C6 akım sitometresi cihazı ile analiziyle incelendi.

4.9.7. İlaç-direnç ile ilişkili genlerin ifade analizi

PLC-pLKO, PLC-shROR1, SNU387-pLKO ve SNU387-shROR1 hücrelerindeki ilaç direnci ile ilişkili genlerin ifade değişimleri RT-qPCR ile analiz edildi.

4.9.8. Kök hücre fenotipi ile ilişkili proteinlerin ifade analizi

ROR1'e bağlı CSC belirteçlerinin ifadesindeki değişikliklerin saptanması için HCC'da kullanılan CD133-APC, CD44-FITC, CD90-APC, CD13-PerCP, CD24-PE ve EpCAM-APC antikorları ile akım sitometresi çalışmaları yapıldı. Bu alışmalarda CSC popülasyonuna sahip olduğu literatürde gösterilmiş olan PLC/PRF/5 hücre klonları kullanıldı.

PLC-pLKO ve PLC-shROR1 hücreleri tripsin ile 100 mm plate'den kaldırıldıktan sonra 2 kez PBS ile yıkandı. Santrifüj işlemlerinden sonra hücre pelletleri 100 l'de 4×10^5 hücre olacak şekilde PBS ile sulandırıldı. Hücreler boyanmak üzere beş tüpe bölündü; boyasız kontrol, CD133-CD24, CD90-CD44, EpCAM ve CD13. Her bir

antikordan 1 µl eklenerek hücreler +4°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler iki kez PBS ile yıkandı ve hücre pelleti 300 µl PBS ile çözülerek Accuri C6 akım sitometresi cihazında analiz edildi.

4.10. Eksozom İzolasyonu

FBS'ler ultrasantrifüjde 100,000 G'de +4°C'de 16 saat santrifüjlendi. Santrifüj sonunda FBS'ler dikkatlice eksozom pelleti bozulmadan yeni 50 ml tüpe alındı ve eksozom izolasyonunda kullanmak üzere eksozomsuz-FBS elde edildi. 387-pLKO ve 387-shROR1 hücreleri 6 adet T175 flaska ekildi ve %80-90 doluluğa ulaşınca besiyeri 20 mL eksozomsuz-FBS içeren besiyeri ile değiştirilerek 3 gün inkübe edildi. Bütün flakslardaki besiyerleri 50 mL falkonlara toplandı ve sırasıyla 500 G'de 5 dk ve 2000 G'de 10 dk santrifüjlenerek ölü hücreler/debriler çöktürüldü. Daha sonra 10,000 G'de +4°C'de 30 dk santrifüjlenerek makro partiküllerde çöktürüldü 10 dk +4°C'de santrifüj edilerek hücrelerin çöktürülmesi sağlanacaktır. Hücre üst-sıvıları ultrasantrifüj tüplerine bölünerek dengelendi ve ultrasantrifüjde +4°C'de 100,000 G'de 75 dk santrifüjlendi. Eksozom pelletine dikkat ederek üst-sıvı uzaklaştırıldı ve eksozomlar 2 mL FBS ile çözüldü. Eksozomları görünür hale getirmek için 2 µl Vybrant DiO (Thermo Scientific, ABD) eklenip 37°C'de 20 dk inkübe edildi. Toplanan eksozom pelleti üzerine tüp hacmini tamamlayacak kadar PBS eklenerek tekrar ultrasantrifüjde +4°C'de 100,000 G'de 75 dk santrifüjlendi. Eksozomun kullanılacağı deneye bağlı olarak 2X Laemmli Buffer (Western Blot), Qiazol lizis buffer (RNA izolasyonu) veya dH₂O (TEM, NPT) ile sulandırıldı ve -80°C'de saklandı.

4.10.1. İzole edilen eksozomların büyüklük ve boyutunun analizi

İzole edilen eksozomların büyüklükleri nanoparticle tracking analizi (NPT) ve boyutu da elektron mikroskobu (TEM) analizi ile saptandı.

4.10.2. Eksozomlarda protein ifadesi analizi

Eksozom pelletine 200 µl 2x Laemmli tamponu eklendi sonike edildikten sonra total protein lizatı elde edildi. Protein konsantrasyonu Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fischer, ABD) ile belirlendi ve 20 µg total protein SDS-PAGE jeline yüklendi. Eksozomlardaki ROR1 ifadesinin belirlenmesi amacıyla ROR1 antikorları 1C5 ile 5B3 (1.5 µg/mL) ve eksozom belirteçlerinin ifadesini göstermek için de CD63 (Abcam, ABD; 1/1000), TSG101 (Cell Signaling, ABD; 1/1000) ve GM130 (Cell Signaling, ABD; 1/1000) antikorları ile problandı. Daha sonra uygun HRP-konjuge sekonder antikorlar ile inkübe edildikten sonra membranlara Amersham ECL Select (GE Healthcare) kemilüminesan substratı uygulandı ve ChemiDoc görüntüleme sistemi ile fotoğraflandı.

4.11. miRNA ifade analizi

Eksozomlardaki miRNA içeriğinin ROR1 ifadesine bağlı olarak değişimi Cancer MicroRNA qPCR Array (System BioScience, ABD) ile araştırıldı.

4.11.1. miRNA izolasyonu

Elde edilen eksozomlardan ve parental hücrelerden miRNA izolasyonu miRNeasy Micro Kit (Qiagen, ABD) kullanılarak ve üretici firmanın talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. Kısaca, 387-pPLKO ile 387-shROR1'den izole edilen eksozomlar ve 387-pPLKO ile 387-shROR1 hücre pelletleri 700 µl Qiazol lizis buffer ile çözüldü ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Bu basamaktan sonra -80°C derin donduruda saklanabilir ya da miRNA izolasyonuna devam edilebilir. Kloroform ve etanol eklenerek 5 dk inkübe edildikten sonra örnekler santrifüjlendi ve su-fazı kolona yüklenerek RNA'lar 20 µl dH₂O ile kolondan geri kazanıldı. RNA konsantrasyonu Nanodrop (Thermo Scientific, ABD) ile ölçüldü ve -80°C'de saklandı.

4.11.2. cDNA sentezi ve miRNA-qPCR dizinlerinde ifade analizi

İzole edilen total RNA'lardan cDNA sentezi için Quantimir cDNA sentez kiti (System Biosciences, ABD) kullanıldı. Üretici firmanın talimatlarına göre 200 ng RNA ile Quantimir reverse transkripsiyon reaksiyonu kuruldu; poliA kuyruğunun eklenmesi, dT adaptorlerin anneal edilmesi ve cDNA sentezini içeren üç basamakta cDNA sentezi gerçekleştirildi. Toplam hacim 20.5 µl olarak cDNA elde edildi. cDNA sentezinin ardından qPCR array için mastermix hazırlandı (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: qPCR array mastermix'in hazırlanması.

2x SYBR Green qPCR mix	1.750 µl
Evrensel Geri Primer (10 µM)	60 µl
Quantimir cDNA	20 µl
dH ₂ O	1.670 µl
Toplam hacim	3.500 µl

Cancer MicroRNA qPCR Array kitinde bulunan primer plakası buz üzerine alındı ve plakadaki ileri primerler kuyu başı 12.5 µl su ile sulandırıldı. 96 kuyucuklu qPCR plakalarına mastermix'den 29 µl dağıtıldı. Daha sonra sulandırılmış primer plakasından 1 ul primer qPCR plakasına aktarıldı (primer plakası A1 kuyusundan qPCR plakasındaki A1 kuyusuna) ve seal ile kapatıldı. Üretici firmanın talimatlarına göre qPCR döngüsü ayarlandı (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: qPCR array döngü şartları.

Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1 döngü	50	2 dk
1 döngü	95	10 dk
45 döngü	95	15 sn
	60	60 sn (Ölç.)

Normalizasyon için plakada bulunan U6 transkripti kullanıldı ve ddCt metoduna göre 387-shROR1 eksozomlarındaki miRNA değişimi belirlendi.

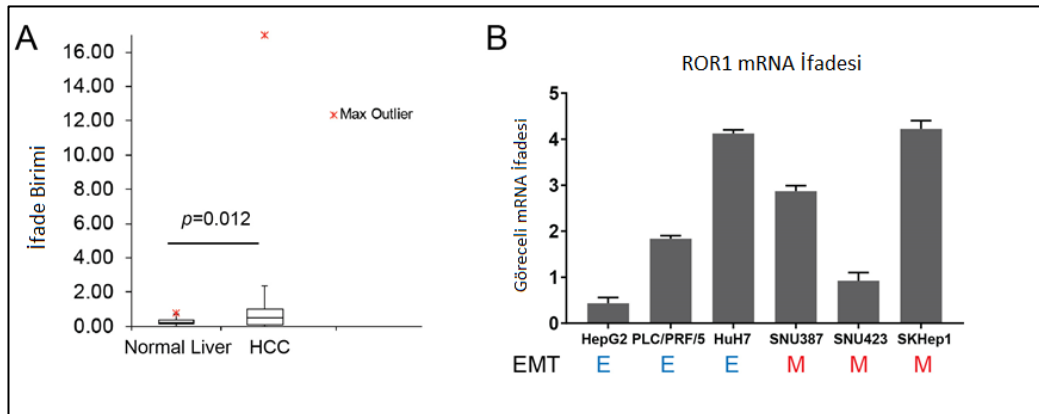
4.12. İstatistiksel Analizler

Tüm çalışmalarda görüntü analizleri ImageJ programı ile yapıldı. İstatistiksel analizler iki yollu Annova ve Student's t-test ile GraphPad Prism 6 kullanılarak gerçekleştirildi.

5. BULGULAR

5.1. HCC'de ROR1 Gen İfadesi

HCC'de ROR1 ifadesine dair literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. HCC dokularındaki ROR1 gen ifadesi biyoinformatik analiz ile incelendi. RNA-seq sonuçlarının bulunduğu "EMBL-EBI Expression Atlas" veri tabanından ROR1 ekspresyon değerleri indirilerek analiz edildi. Bu analiz sonucunda, normal karaciğer dokusuna göre HCC'de artmış ROR1 ifadesi saptandı (Şekil 5.1a). HCC hücre hatlarındaki ROR1 gen ifadesi RT-qPCR yöntemi ile incelendi. Epitel/mezenkimal karakterleri bilinen 6 HCC hücre hattından oluşan bir panel kullanıldı. RT-qPCR sonucunda HCC hücre hatları arasında farklı seviyelerde ROR1 ifadesi belirlendi (Şekil 5.1b).



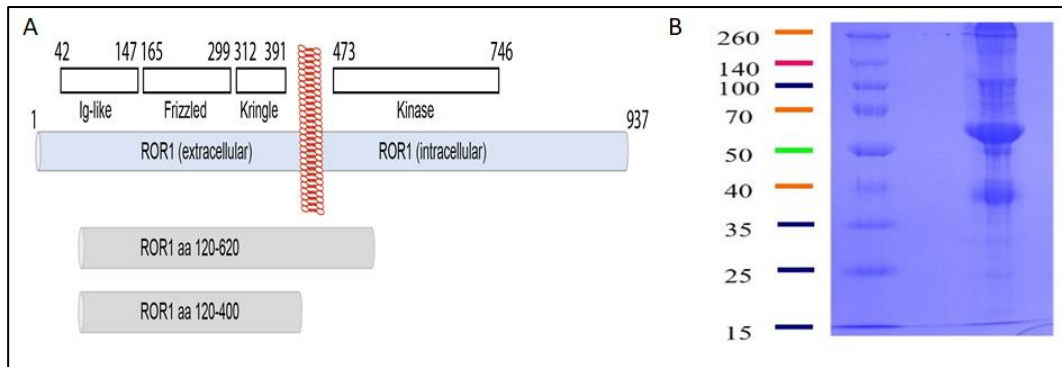
Şekil 5.1: HCC'de ROR1 ifadesinin incelenmesi. A) HCC ve normal karaciğer dokularına ait RNA-seq datalarında ROR1 ifadesi B) HCC hücre hatlarındaki ROR1 gen ifadesinin RT-qPCR ile belirlenmesi. GAPDH'a göre normalize edilmiş görece mRNA seviyeleri. E: Epitel Hücre. M: Mezenkimal hücre

5.2. ROR1 Proteinine Özgül Monoklonal Antikor Geliştirilmesi

5.2.1. Rekombinant Protein Oluşturulması

Literatürde normal karaciğer dokusunda ROR1 ifadesinin bulunmadığı ve biyoinformatik olarak HCC'de ROR1 ifadesi tarafımızdan gösterildiğinden

hepatokarsinoma sürecinde ROR1'in rol oynayabileceği düşünüldü. Bununla birlikte RTK antikorları, özellikle de hücre-dışı epitopu tanıyan antikorların terapötik olarak kullanılabilirliği ile ticari olarak satılmakta olan antikorların özgüllük açısından sınırlı olması ve yeni yapılacak antikorların farklı epitopları tanıma potansiyeli de düşünüldüğünde ROR1 proteinine karşı monoklonal antikor geliştirilmesine karar verildi. Antikor yapımında kullanılacak antijen seçimi için hidrofobisite analizi yapıldı. Bu analiz sonucunda ROR1 proteininde antijen olmaya uygun bir kısmın (aa120-620) belirlendi. Belirlenen segment, tasarlanan primerler ile HuH7 HCC hücre hattının cDNA'sından çoğaltıldı. Kesilmiş pOPIN vektörü ve PCR ürünü jelden saflaştırıldı ve SLIC metodu ile klonlandı (Şekil 5.2a). Elde edilen klonlar sekans ile doğrulandı ve Rosetta(D3) pLacI bakterisine transforme edilerek kısmi-rekombinant ROR1 proteini ifade ettirildi ve Nikel kolon ile saflaştırıldı (Şekil 5.2b). Bununla birlikte side-directed mutagenesis tekniği ile ROR1 proteinin hücre-dışı kısmına tekabül eden (aa120-400) kısmını içeren vektör de oluşturuldu (Şekil 5.2a).

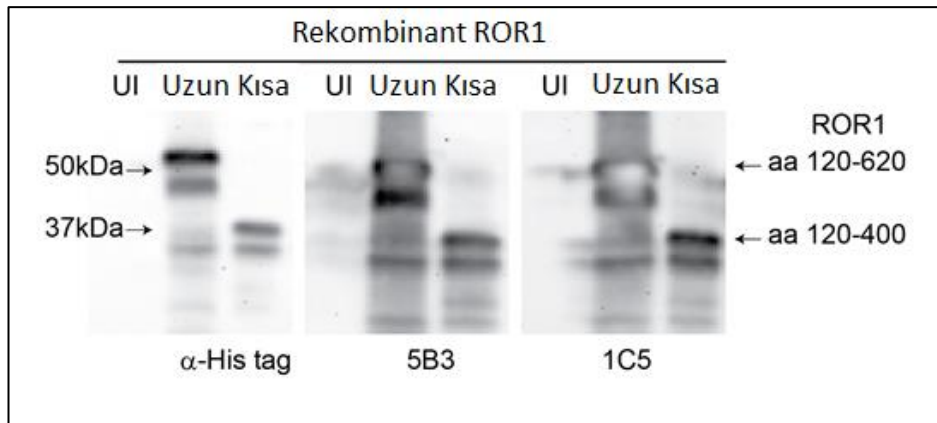


Şekil 5.2: ROR1 kısmi-rekombinant antijenlerinin oluşturulması. A) Tasarlanan ROR1 kısmi-rekombinant proteinler. Tam boy aa120-600 ve kısa rekombinant protein (hücre yüzeyi) aa120-400. B) Bakteride ifade edilen ve saflaştırılan tam boydaki kısmi-rekombinant ROR1 proteini.

5.2.2. Farelerin Bağışıklanması ve Hibridoma Oluşturulması

Bağışıklama çalışmaları TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsünde gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan tam boydaki kısmi-rekombinant ROR1 proteini antijen olarak BALB/c farelere verildi. 2'şer hafta aralıklar ile bağışıklama işlemi tekrar edildi ve 3. ve 4. bağışıklamadan sonra farelerin kanındaki ROR1 antikor

seviyesi ELISA ile test edildi. ELISA’da kısmi-rekombinant ROR1 proteinine karşı en yüksek reaktivite gösteren fare seçildi ve son kez bağışıklandıktan 3 gün sonra farenin dalağı çıkartıldı ve hücreler ayrıştırıldıktan sonra SP2/0 hücre ile füzyon işlemine tabi tutuldu. Elde edilen tek hücre klonlarında ROR1 antikorları ELISA yöntemi ile incelendi. Geliştirilen klonlar arasından absorbands değeri en yüksek olan iki hibridoma klonu (5B3 ve 1C5) ileri analizler için seçildi. Hibridoma klonlarının ROR1 antijenine özgüllükleri, kısmi-rekombinant ROR1 proteinleri (aa120-620 ve aa120-400) kullanılarak WB yöntemi ile test edildi (Şekil 5.3). 5B3 ve 1C5 ROR1 monoklonal antikorları hem tam boydaki ROR1 rekombinant proteinini (aa120-620) hem de kısa versiyonu (aa120-400) His-tag antikorları kadar güçlü bir şekilde tanıdı. Kısa-rekombinant ROR1 proteinin bu antikorlar tarafından tanınması epitoplarının, ROR1’in hücre-dışı kısmına karşılık geldiğini göstermektedir.

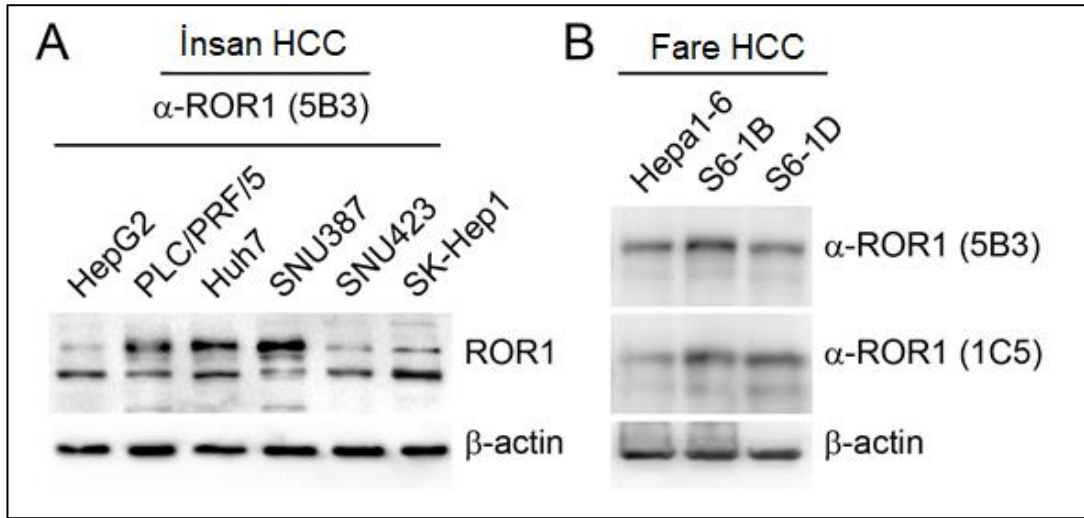


Şekil 5.3: ROR1 proteinine karşı monoklonal antikorların geliştirilmesi. ROR1 antikorları (5B3 ve 1C5) ile His-tag antikorları ile yapılan western blot. ROR1 antikorları hem tam boydaki hem de kısa rekombinant ROR1 proteinini tanımaktadır. UI: İndüklenmemiş bakteri, kontrol.

Geliştirilen hibridoma klonları serumsuz-DMEM’de büyütüldü ve üst-sıvı toplanarak protein-G kolonu ile saflaştırıldı. Farklı fraksiyonların antikor yoğunluğu Qubit ile ölçüldü ve rekombinant ROR1 proteinine karşı ELİSA testi ile özgüllükleri doğrulandı. Daha sonra saflaştırılan antikorların izotipi kit kullanılarak ELİSA temelli olarak saptandı. Geliştirilen her 2 monoklonal ROR1 antikorunun izotipi IgG1 olarak belirlendi.

5.3. İnsan ve Fare HCC Hücre Hatlarında ROR1 Protein İfadesi

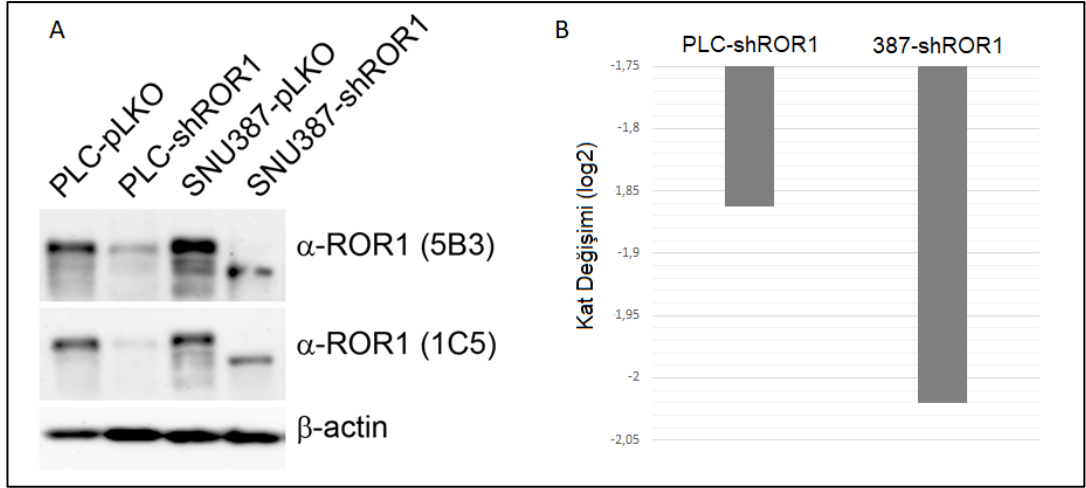
HepG2, PLC/PRF/5, HuH7, SNU387, SNU423 ve SK-Hep1 insan HCC hücre hatlarında ROR1 protein ifadesi 5B3-monoklonal antikoru ile belirlendi (**Şekil 5.4a**). RT-qPCR sonuçları ile uyumlu olarak incelenen hücrelerde farklı seviyelerde hem 130 kDa hem de 100 kDa'daki iki farklı ROR1 varyantı gösterildi. Geliştirilen ROR1 monoklonal antikollarının fare-ROR1 proteinini de tanıdığı Hepa1-6, S6-1B ve S6-1D fare HCC hücre hatlarında gösterildi. İnsan HCC hücre hatlarına benzer şekilde her iki ROR1 varyantı da farklı ifade seviyelerinde saptandı (**Şekil 5.4b**).



Şekil 5.4: İnsan ve fare HCC hücre hatlarında ROR1 protein ifadesi. A) İnsan HCC hücre hatlarındaki ROR1 ifadesinin western blot ile gösterilmesi. B) Fare HCC hücre hatlarındaki ROR1 ifadesinin western blot ile gösterilmesi.

5.3.1. shROR1 ve shPLKO Klonlarının Geliştirilmesi

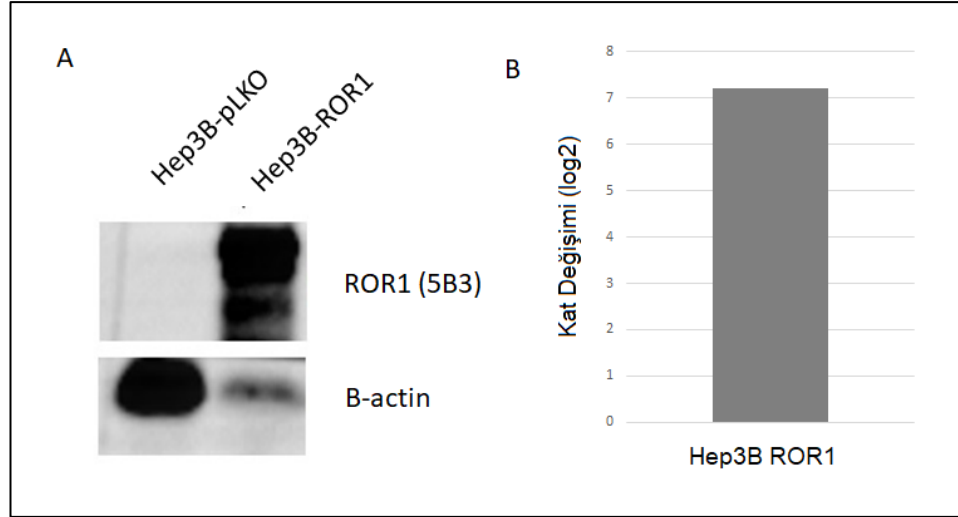
Epitel hücre karakterindeki PLC/PRF/5 ve mezenkimal karakterdeki SNU387 hücrelerinde ROR1 ifadesi lentiviral shRNA tekniği ile baskılandı. ROR1 ifadesinin baskılandığı PLC-shROR1 ve 387-shROR1 ile kontrol PLC-pLKO ve 387-pLKO hücre klonları elde edildi. ROR1 ifadesinin baskılanması RT-qPCR ile gen seviyesinde ve WB ile de protein seviyesinde gösterildi (**Şekil 5.5**). Ayrıca elde edilen hücre klonları ile de ROR1 monoklonal antikollarının özgüllüğü gösterilmiş oldu.



Şekil 5.5: ROR1 ifadesinin shRNA ile baskılanması. A) ROR1 antikorlarının özgüllüğü, ROR1 ifadesi baskılanmış PLC/PRF/5 ve SNU387 hücrelerinde gösterildi. β -actin yükleme kontrolü olarak kullanılmaktadır. B) RT-qPCR ile gen ifadesi düzeyinde ROR1 baskılanması. Kat azalışı GAPDH'a göre normalize edilerek ddCT metodu ile hesaplandı.

5.3.2. ROR1 Aşırı İfade Klonlarının Geliştirilmesi

ROR1 ifadesinin bulunmadığı epitel hücre karakterindeki Hep3B HCC hücresinde ROR1 aşırı ifade ettirildi. ROR1 aşırı ifade eden Hep3B-ROR1 ve kontrol Hep3B-pLKO hücre klonları elde edildi. Elde edilen hücre klonlarında ROR1 ifadesi gen seviyesinde RT-qPCR ile ve protein seviyesinde de WB ile gösterildi (Şekil 5.6). Yine ROR1 monoklonal antikorlarının özgüllüğü de aşırı ifade eden hücre klonlarında test edildi.



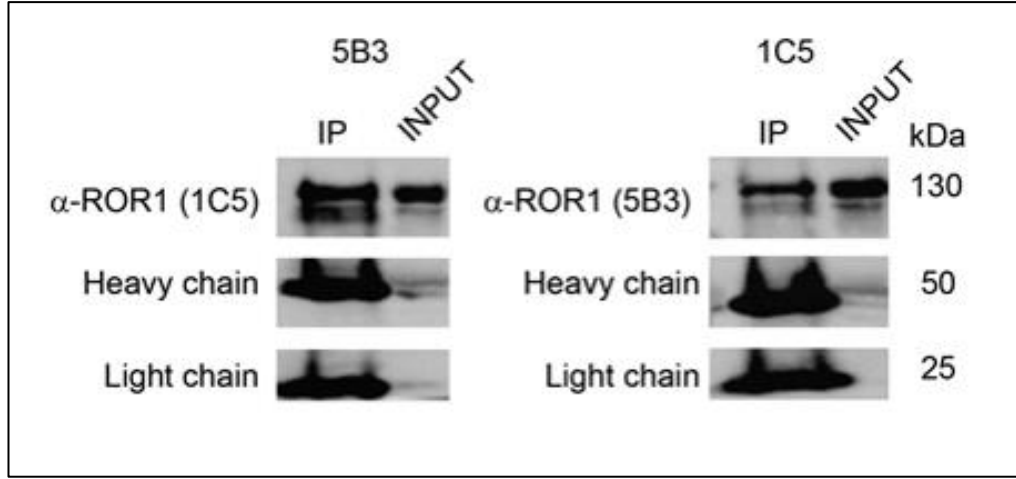
Şekil 5.6: Hep3B hücrelerinde ROR1 proteininin aşırı ifadesi. A) ROR1 antikorlarının özgüllüğü ROR1 aşırı ifade eden Hep3B hücrelerinde western blot ile gösterildi. β -actin yükleme kontrolü olarak kullanılmaktadır. B) RT-qPCR ile gen ifadesi düzeyinde ROR1 aşırı ifadesi. Kat azalışı GAPDH'ya göre normalize edilerek ddCT metodu ile hesaplandı.

5.4. ROR1 Antikorlarının Validasyonu

Geliştirdiğimiz monoklonal antikorlarının hem insan hem de fare HCC hücre hatlarında denatüre haldeki ROR1 antikorunu tanıdığı WB ile gösterildi. Native (doğal) formdaki ROR1 proteinini de tanıyıp tanımadıkları immün-çöktürme (IP) ve akım sitometresi metodları ile test edildi.

5.4.1. İmmün-çöktürme

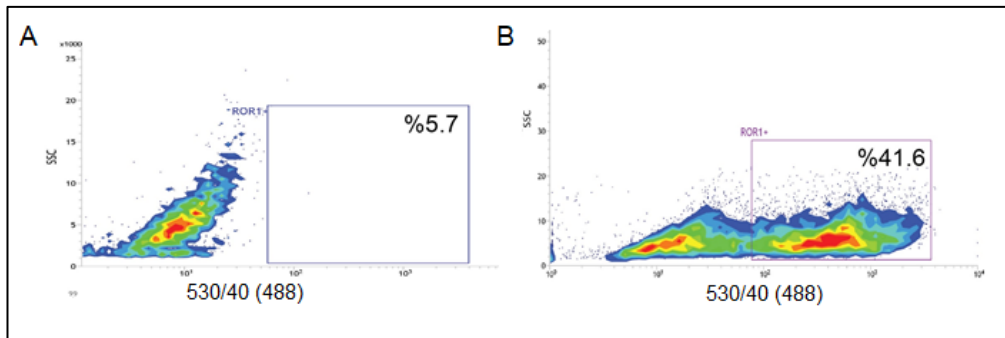
Geliştirilen antikorlar denatüre haldeki ROR1 proteinini başarı ile tanımaktadır. Denatüre olmayan ROR1 proteinini yani native ROR1 proteini de tanıdığı immün-çöktürme yöntemi ile gösterildi (Şekil 5.7). SNU387 hücrelerinden Tx100 buffer ile lizat yapıldı ve elde edilen lizatlar ROR1 antikorları 5B3 ve 1C5 ile inkübe edildi. Daha sonra bu karışıma IgG-manyetik boncuklar eklenerek oluşan protein-antikor kompleksi karışımdan çekildi ve Laemmli buffer eklenerek detanüre edildi. Daha sonra örnekler ile WB yapıldı. 5B3'ün indirdiği lizat 1C5 ile, 1C5'in indirdiği lizat da 5B3 ile problandı. Her iki antikorun da native ROR1 proteinini tanıyarak çöktürdüğü gösterildi.



Şekil 5.7: SNU387 hücre lizatlarından ROR1'in immünçöktürülmesi. SNU387 hücrelerinden ROR1 proteini 5B3 ile 1C5 kullanılarak indirildi ve western blotta karşılıklı antikolar kullanılarak problandı.

5.4.2. Akım Sitometresi

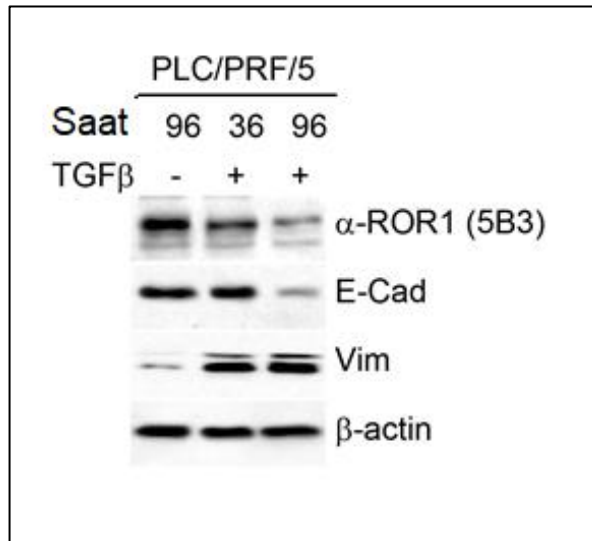
SNU387 hücrelerindeki ROR1 ifadesi, ROR1-5B3 antikoruna ile akım sitometresinde gösterildi (Şekil 5.8). Hücreler tripsin ile kaldırıktan sonra iki kere yıkandı ve PBS içerisinde 5B3 antikorları ile inkübe edildi. Daha sonra Alexa-488 işaretli sekonder antikorlar ile inkübe edilerek akım sitometresi ile analiz edildi. Bu analiz sonucunda SNU387 hücrelerinin %40'ının yüzeyinde ROR1 proteini olduğu saptandı.



Şekil 5.8: SNU387 hücrelerinde akım sitometresi. A) Boyasız kontrol SNU387 hücreleri. B) SNU387 hücreleri primer antikor olarak 5B3-ROR1 antikoruna ve sekonder antikor Alexa 488 ile problandı. Hücre yüzeyindeki ROR1 ifadesi FACS JAZZ akım sitometresi ile incelendi.

5.5. ROR1 İfadesi ve EMT Fenotipi ile İlişkisi

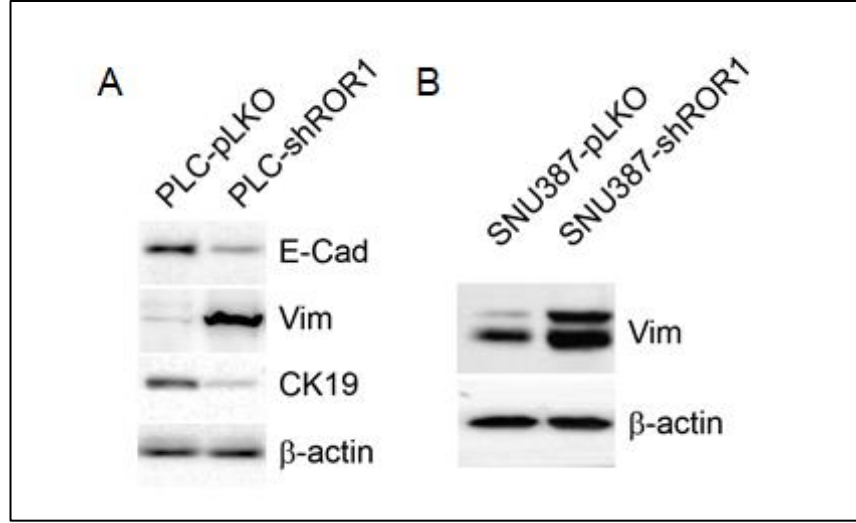
Literatürde ROR1 ifadesi ile mezenkimal fenotip arasındaki ilişkiye dair çalışmalar bulunmaktadır. Ancak HCC’de hem epitel hem de mezenkimal karakterdeki hücrelerde farklı seviyelerde ROR1 ifadesi bu tez çalışmaları kapsamında gösterildi. Daha sonra ROR1 ifadesinin EMT sürecindeki değişimin incelenmesi amacıyla HCC’da EMT modeli oluşturuldu. PLC/PRF/5 hücreleri TGF- β ile 36 ve 96 saat indüklenerek EMT geçirmeleri sağlandı (Şekil 5.9). EMT’nin TGF- β ile indüksiyonundan sonra PLC/PRF/5 hücrelerinde kanonikal EMT belirteçleri olan artmış vimentin ifadesi ve azalmış E-kaderin ifadesi gösterildi. Bunlarla birlikte, ROR1 ifadesinin de azaldığı saptandı.



Şekil 5.9: PLC/PRF/5 hücrelerinin TGF- β ile indüksiyonu. PLC/PRF/5 hücreleri 4 ng/mL TGF- β ile 36 ve 96 saat indüklendi. İndüklenmiş ve kontrol hücrelerinde ROR1, E-Kaderin ve Vimentin ifadesinin western blot ile gösterilmesi. β -actin yükleme kontrolü olarak kullanılmaktadır.

Bu bulgular, ROR1 ifadesinin mezenkimal fenotipten ziyade epitel karakter ile ilişkili olduğunu düşündürdü ve shROR ile shpPLKO hücre klonlarında kanonikal EMT markerlarının değişimi incelendi (Şekil 5.10). PLC-shROR1 ve 387-shROR1 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre mezenkimal özellik ile ilişkili vimentin ifadesinde artış ve PLC-shROR1 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre epitel hücre fenotipi ile ilişkili E-kaderin ve CK19 ifadelerinde azalma gösterildi. Ancak ROR1’in

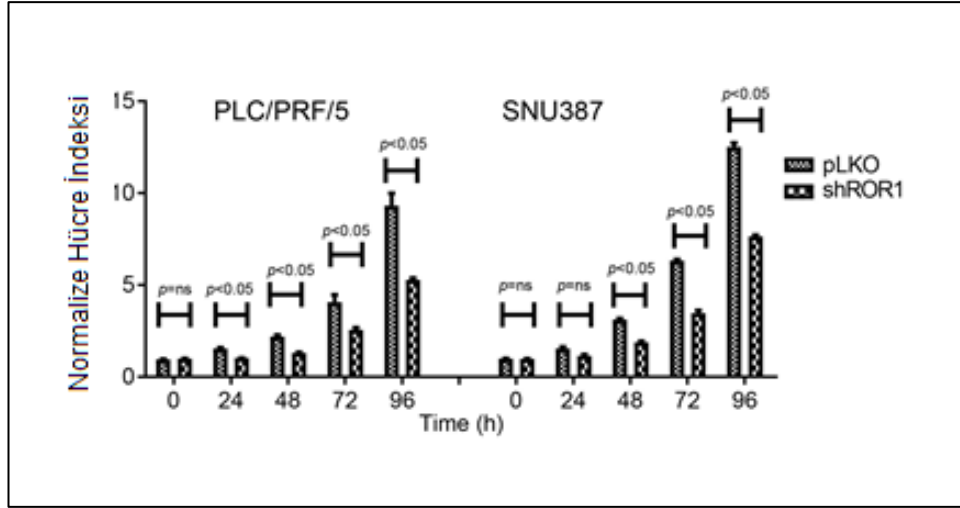
aşırı ifade ettirildiği Hep3B hücrelerinde ise EMT ile ilişkili protelerin ifadesi açısından bir farklılık gözlenmedi.



Şekil 5.10: PLC ve 387 klonlarında EMT belirteçlerinin ifadeleri. A) E-Kaderini Vimentin ve CK 19 ifadesinin ROR1 ifadesi baskılanmış ve kontrol PLC/PRF/5 klonlarında western blot ile gösterilmesi. B) Vimentin ifadesinin ROR1 ifadesi baskılanmış ve kontrol SNU387 klonlarında wester blot ile gösterilmesi. β-actin yükleme kontrolü olarak kullanılmaktadır.

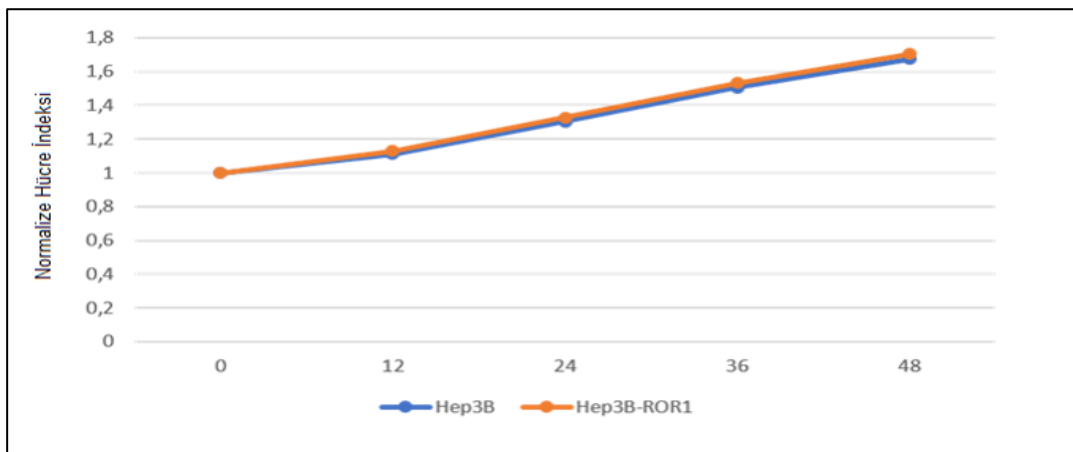
5.5.1. Hücre Klonlarında Proliferasyon ve Hücre Siklusu Analizi

ROR1'in baskılandığı şartlarda hücre proliferasyonu Xcelligence cihazı ile gerçek zamanlı olarak incelendi (Şekil 5.11). Eşit sayıda PLC-shROR1, PLC-pLKO, 387-shROR1 ve 387-pLKO hücreleri xcelligence plakalarına ekildi. Hücrelerin plakalara tutunmasına izin verildi ve 4. saatteki hücre indeks değerleri ile normalize edilerek hücre proliferasyonları 96 saat boyunca izlendi. ROR1 aşırı ifade edildiği Hep3B-ROR1 hücrelerinde Hep3B-pLKO hücrelerine göre proliferasyon açısından bir farklılığa rastlanmamışken, ROR1 ifadesinin baskılandığı PLC-shROR1 ve 387-shROR1 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre hücre proliferasyonunun anlamlı bir şekilde azaldığı gösterildi.



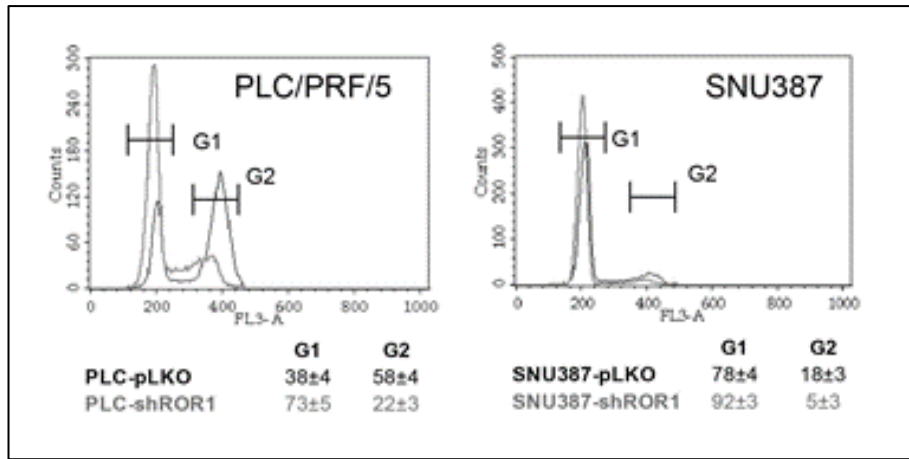
Şekil 5.11: PLC ve 387 hücre klonlarında proliferasyon analizi. Hücre proliferasyonunun, ROR1 ifadesi baskılanmış ve kontrol hücre klonlarında Xcelligence ile gerçek zamanlı analizi. İstatistiksel analiz normalize hücre indeksi değerleri ile GraphPad Prism 6’da iki yollu anova testi ile yapıldı.

ROR1’in aşırı-ifade edildiği hücre proliferasyonu Xcelligence cihazı ile gerçek zamanlı olarak incelendi (Şekil 5.12). Eşit sayıda Hep3B-ROR1 ve Hep3B-pLKO hücreleri xcelligence plakalarına ekildi. Hücrelerin plakalara tutunmasına izin verildi ve 4. saatteki hücre indeksi değerleri ile normalize edilerek hücre proliferasyonları 96 saat boyunca izlendi. ROR1 aşırı ifade edildiği Hep3B-ROR1 hücrelerinde Hep3B-pLKO hücrelerine göre proliferasyon açısından anlamlı bir farka rastlanmadı.



Şekil 5.12: Hep3B ROR1 klonlarının proliferasyon analizi. Hücre proliferasyonunun, ROR1 ifadesi artırılmış ve kontrol hücre klonlarında Xcelligence ile gerçek zamanlı analizi. Normalize hücre indeksi değerleri kullanıldı.

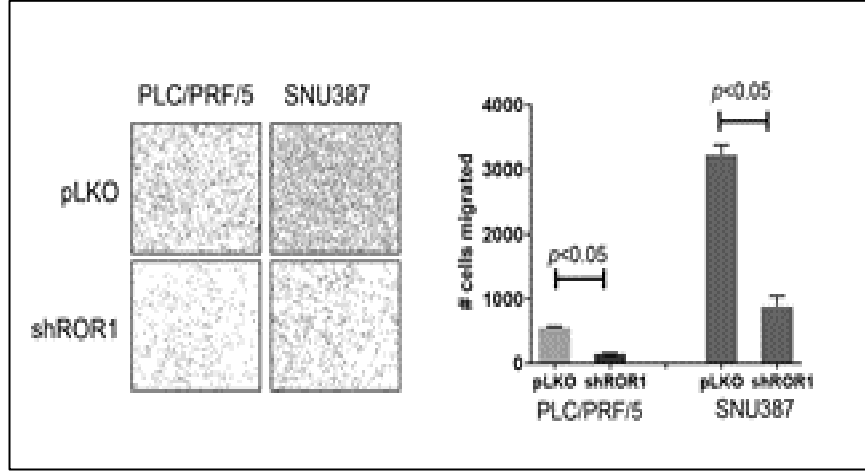
PLC-shROR1, PLC-pLKO, 387-shROR1 ve 387-pLKO hücrelerinin hücre siklusu durumları akım sitometresi ile analiz edildi (Şekil 5.13). Hücreler etanol ile fiks edildikten sonra Propidium Iodide (PI) boyası ile hücrelerin DNA'sı boyandı ve hücre siklusu akım sitometresi ile analiz edildi. PLC-shROR1 ve 387-shROR1 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre G1 fazında daha fazla hücre olduğu gösterildi. EMT fenotipi ilişkili özelliklerden olan proliferasyonun azalması ve hücre siklusunda durakma ROR1 ifadesinin baskılandığı HCC hücrelerinde gözlemlendi.



Şekil 5.13: PLC ve 387 hücre klonlarında hücre siklusu analizi. Hücre döngüsünün, ROR1 ifadesi baskılanmış ve kontrol hücre klonlarında akım sitometresi ile analizi.

5.5.2. Hücre Klonlarında Hücre Göçü

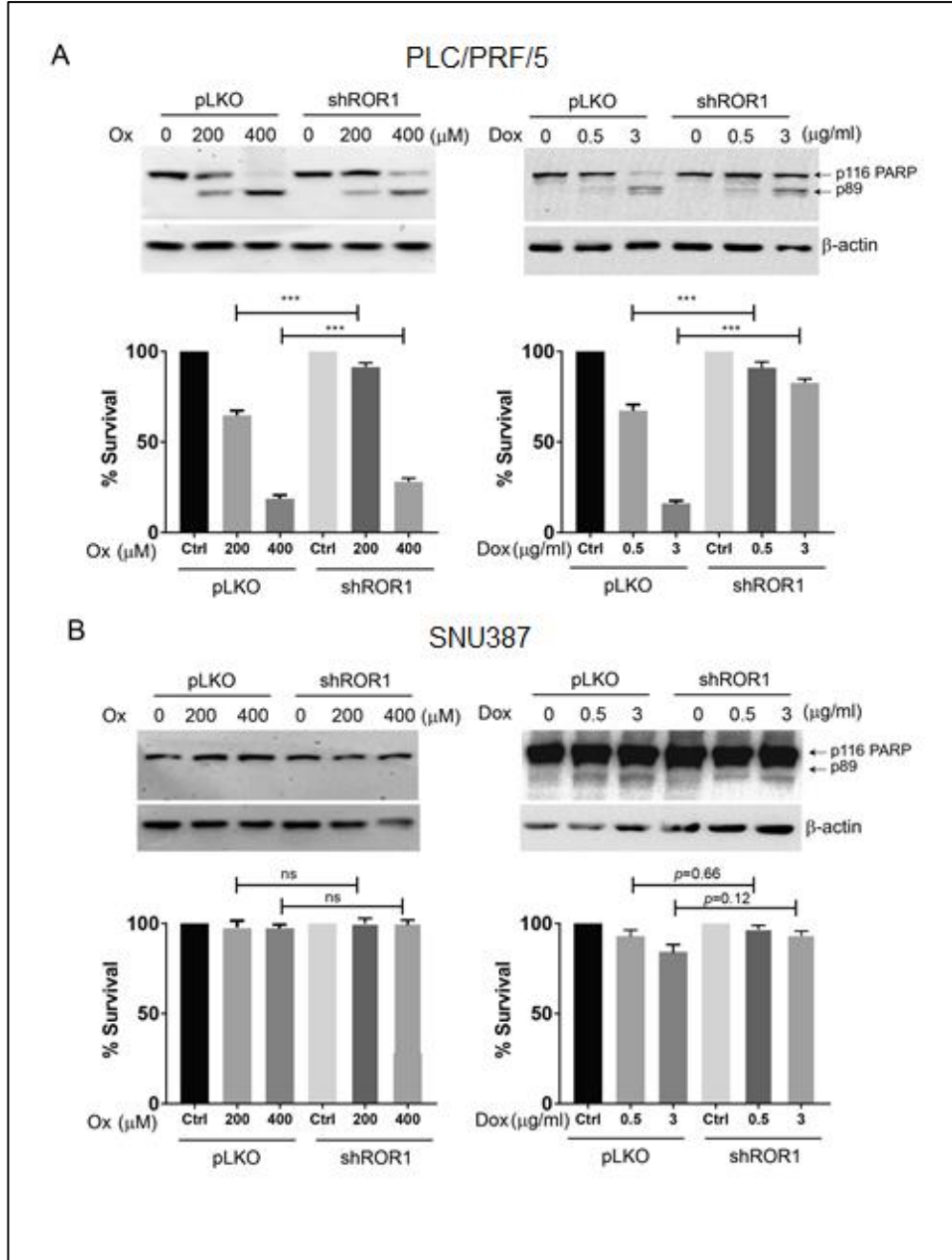
EMT sürecinde hücreler hareket kabiliyetleri arttırarak metastaz kapasitesi kazanmaktadır. Geliştirilen shROR1 ve shpLKO hücre klonlarında hücrelerin göç kabiliyetleri analiz edildi (Şekil 5.14). Eşit sayıda PLC-shROR1, PLC-pLKO, 387-shROR1 ve 387-pLKO hücreleri serumlu besiyeri içerisinde transwell kuyucuklarına ekildi. Hücrelerin gradient oluşturmaları için beklendi (~3 saat) ve besiyeri serumsuz besiyeri ile değiştirildi. PLC hücrelerinin 48 saat ve 387 hücrelerinin de 24 saat serumlu besiyeri olan tarafa doğru göç etmelerine izin verildi. İlginç bir şekilde, ROR1 baskılanması sonucunda hem PLC/PRF/5 hem de SNU387 hücrelerinin, kontrol hücrelerine göre anlamlı olarak daha az hareket ettikleri saptandı.



Şekil 5.14: PLC ve 387 hücre klonlarının hücre göçü analizi. Hücre göçünün, ROR1 ifadesi baskılanmış ve kontrol hücre klonlarında transwell migrasyon testi ile analizi. PLC/PRF/5 hücre klonları 48 saat ve SNU387 hücre klonları da 24 saat göçe tabi tutuldu. Göç eden hücre miktarı, ImageJ’de DAPI ile boyanan nükleusların sayılması ile hesaplandı.

5.5.3. Hücre Klonlarında Apoptoz ve Anoikise Direncin Analizi

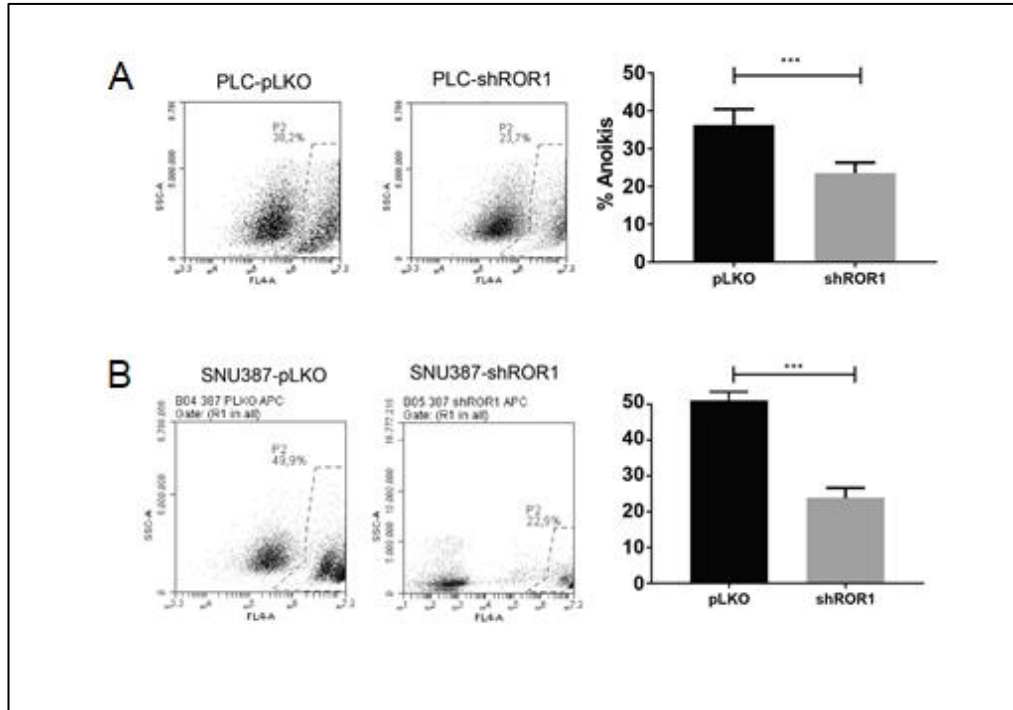
Hücreler EMT süreci ile birlikte mezenkimal hücre fenotip ile birlikte kemoterapötik ajanlara karşı ve anoikise karşı da direnç kazanmaktadır. ROR1 ifadesinin kemoterapiye yani apoptoza karşı direnç ile ilişkisinin incelenmesi amacıyla PLC-shROR1, PLC-pLKO, 387-shROR1 ve 387-pLKO hücrelerine artan dozlarda Doxorubicin ve Oksaliplatin uygulandı (Şekil 5.15). Hücrelerin sağ kalımı, kesilmemiş PARP (p116) bandının β -aktin bandına oranlanması ile hesaplandı. PLC hücrelerinde ROR1 ifadesinin baskılanması (PLC-shROR1) sonucunda pro-apoptotik uyarılara karşı hücre ölümünün anlamlı olarak daha az olduğu saptandı. Bununla beraber, PLC hücrelerinde etkili olan Oksaliplatin dozuna karşı hem 387-pLKO hem de 387-shROR1 hücrelerinin dirençli olduğunu gördük. Ancak, Kemoterapiye direnç açısından benzer bir trend, Doxorubicin uygulanan 387 hücre klonlarında da saptandı.



Şekil 5.15: PLC ve 387 hücre klonlarına Oksaliplatin ve Doxorubucin uygulanması. A) PLC-pLKO ve PLC-shROR1 hücrelerine 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda Oksaliplatin (sol taraf) ve Doxorubucin (sağ taraf) uygulandı. B) 387-pLKO ve 387-shROR1 hücrelerine 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda Oksaliplatin (sol taraf) ve Doxorubucin (sağ taraf) uygulandı. PARP antikoru kullanılarak apoptoz belirlendi. ImageJ ile kesilmemiş PARP (p116 PARP) bandının kalınlığı ölçülerek oranlandı ve ilaç uygulamasının ardından hücre canlılığı hesaplandı. İstatistiksel analiz GraphPad Prism 6 ile yapıldı.

İnvazyon sürecinde hücreler diğer hücrelerden bağlarını kopartarak kan dolaşımına girmektedir. Diğer hücrelerden bağını koparmış ve kan dolaşımındaki

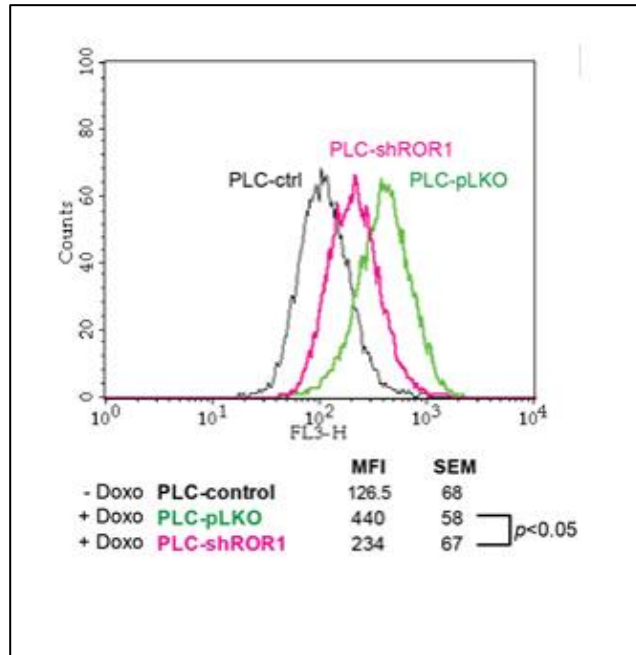
hücrelerin sağ kalımları invaz süreci için oldukça önemlidir. Ayrıca kanser kök hücre özelliği ile de ilişkilendirilmektedir. Anoikis direnci, hücrelerin kültür plakasına yapışamadığı durumda apoptoza uğrayan hücre miktarının tayini ile belirlenmektedir. PLC-shROR1, PLC-pLKO, 387-shROR1 ve 387-pLKO hücreleri hücrelerin yapışmalarına olanak vermeyen plakalara ekildikten 24 saat sonra hücre gruplarının apoptoz yüzdeleri akım sitometresi ile analiz edildi (Şekil 5.16). ROR1 ifadesi baskılanan hücre klonlarında anoikise karşı direnç olduğu Annexin V⁺ apoptotik hücre yüzdelерinin karşılaştırılması ile incelendi. ROR1 ifadesinin baskılandığı PLC ve SNU387 hücrelerinde anlamlı olarak apoptozun düştüğü saptandı; PLC/PRF/5 hücre klonlarında %38'den %23'e ve SNU387 hücre klonlarında da %50'den %22'ye.



Şekil 5.16: PLC ve 387 hücre klonlarında anoikis direnci. A) PLC-pLKO ve PLC-shROR1 ultra-low attachment plakalarda 24 saat inkübe edildi. B) 387-pLKO ve 387-shROR1 hücreleri ultra-low attachment plakalarda 24 saat inkübe edildi. Apoptotik hücre yüzdesi Annexin V boyaması ile akım sitometresinde analiz edildi. İstatistiksel analiz GraphPad Prism 6 ile yapıldı.

5.5.4. Hücre Klonlarında Doxorubucine Tutulumu ve Çoklu-ilaç Direnç Gen İfadelerinin Analizi

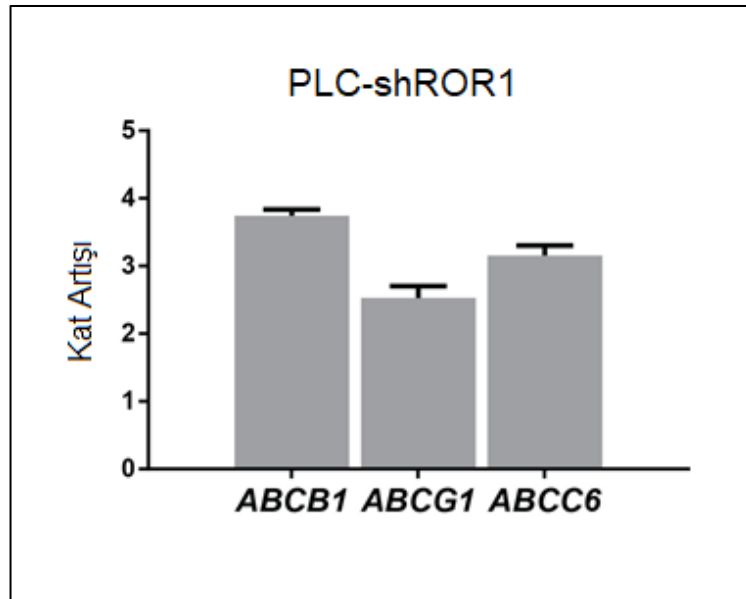
PLC/PRF/5 hücrelerinin ROR1 yokluğundan Oksaliptatin ve Doksorubisin ile indüklenen hücre ölümüne karşı anlamlı olarak dirençli olmasından dolayı bu hücrelerin ilaçları dışarı atma kapasiteleri Doksorubisine tutulumu deneyleri ile test edildi (Şekil 5.17). PLC-shROR1 ve PLC-pLKO hücreleri 0.5 µg/mL Doksorubisin ile 1 saat inkübe edildikten sonra hücelere taze besiyeri eklendi ve 4 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin içerisinde kalan Doksorubisin miktarı akım sitometresi ile mean floresan şiddeti (MFI) belirlenerek karşılaştırıldı. Analiz sonucunda, PLC-shROR1 hücrelerinin içerisinde PLC-pLKO hücrelerine göre anlamlı olarak daha az miktarda Doxorubucin kaldığı gösterildi.



Şekil 5.17: PLC ve 387 hücre klonlarında Doxorubucin tutulumu. PLC-pLKO ve PLC-shROR1 hücrelerinin ilacı dışarı atma kapasitelerinin analizi. Hücreler 0.5 ug/mL Doxorubucin ile 1 saat muamele edildi ve 4 saat sonra ortalama floresan şiddeti (MFI) akım sitometresi ile saptandı. SEM: Standart Hata. İstatistiksel analiz GraphPad Prism 6 ile yapıldı.

ROR1'in yokluğunda PLC/PRF/5 hücrelerinde daha az Doksorubisin tutulduğunun gösterilmesinden sonra PLC-shROR1 ve PLC-pLKO hücrelerinde ilaçların hücre dışına atılması ile ilişkili çoklu-ilaç direnç genlerin ifadeleri RT-qPCR ile

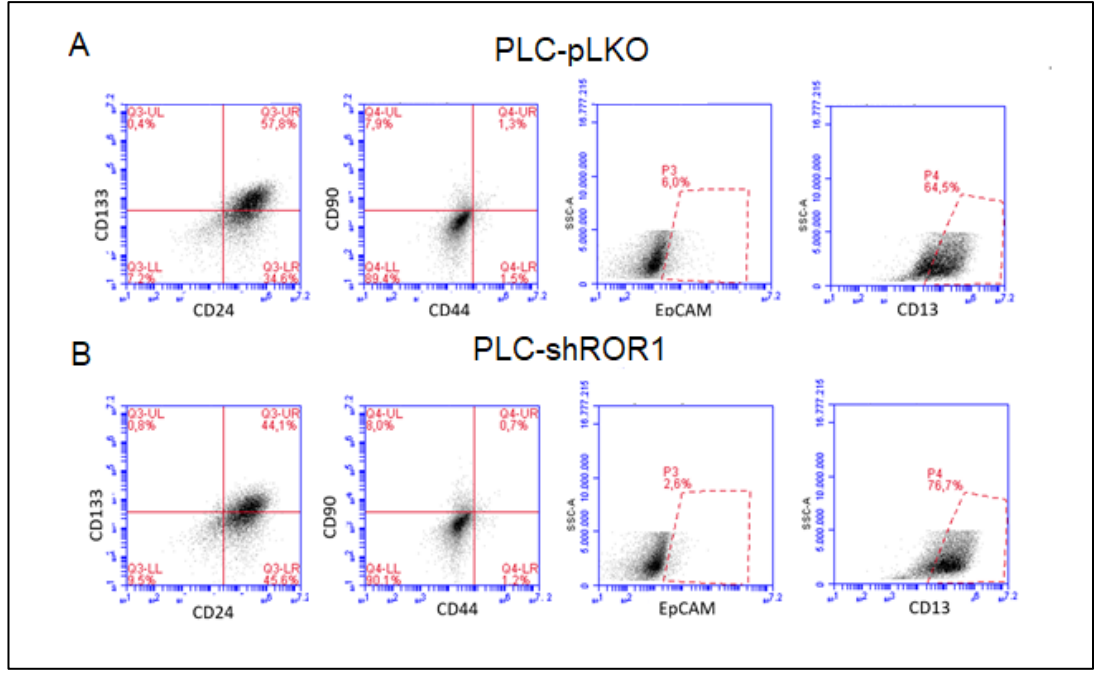
karşılaştırılarak *ABCB1*, *ABCG1* ve *ABCC6*'nin ROR1 ifadesinin baskılandığı durumda arttığı gösterildi. (Şekil 5.18).



Şekil 5.18: PLC hücre klonlarında ilaç-direnç ile ilişkili genlerin ifade analizi. PLC-shROR1 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre ABC ailesi genlerinin ifade değişimleri RT-qPCR ile analiz edildi. Kat artışı (log2) hesabında GAPDH'a göre normalize edilerek ddCT yöntemi kullanıldı.

5.5.5. Hücre Klonlarında Kanser Kök Hücre Belirteçlerinin Değişimi

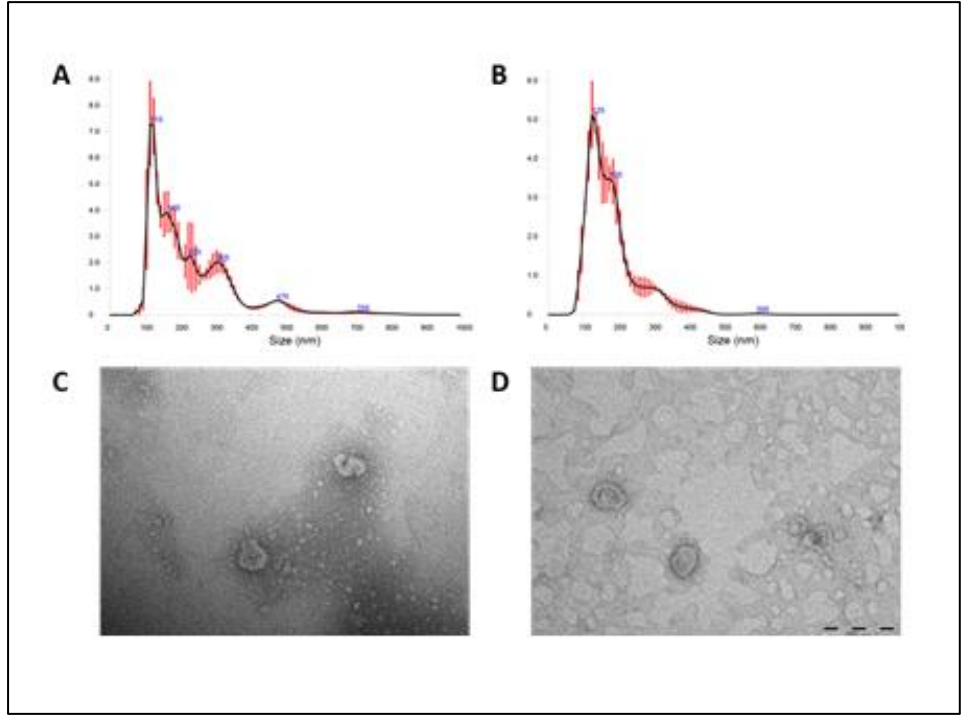
EMT sürecinde kanser hücreleri mezenkimal hücre karakterinin yanında kanser kök hücre (CSC) fenotipine benzer özellikler de kazanmaktadır. Bu CSC'leri farklı yüzey belirteçleri ile karakterize edilmektedir. HCC'de CSC'lerin tanımlanması amacıyla CD133, CD13, CD24, EpCAM ve CD90 yüzey proteinleri kullanılmaktadır. Bu yüzey proteinleri bazen tek başına bazen de farklı kombinasyonlarda kullanılmaktadır. CSC benzeri hücre-alt grubuna sahip olduğu bilinen PLC/PRF/5 hücre klonlarında ROR1 baskılanmasının ardından CSC belirteçlerinin ifade değişimleri akım sitometresi ile analiz edildi (Şekil 5.19). ROR1 ifadesi baskılandığında CD133/CD24 ikili pozitif hücrelerin oranı %57'den %44'e; CD90/CD44 ikili pozitif hücre popülasyonu %1.3'den %0.7'ye ve EpCAM ifadesi de %6'dan %2.6'ya düşmektedir. Buna karşın CD13 ifadesi %64'den %76'ya çıkmaktadır.



Şekil 5.19: PLC/PRF/5 hücre klonlarında CSC belirteçlerinin analizi. PLC-pLKO ve PLC-shROR1 hücrelerinde; CD133, CD13, CD24, EpCAM ve CD90 proteinin hücre yüzey ifadeleri akım sitometresi ile incelendi.

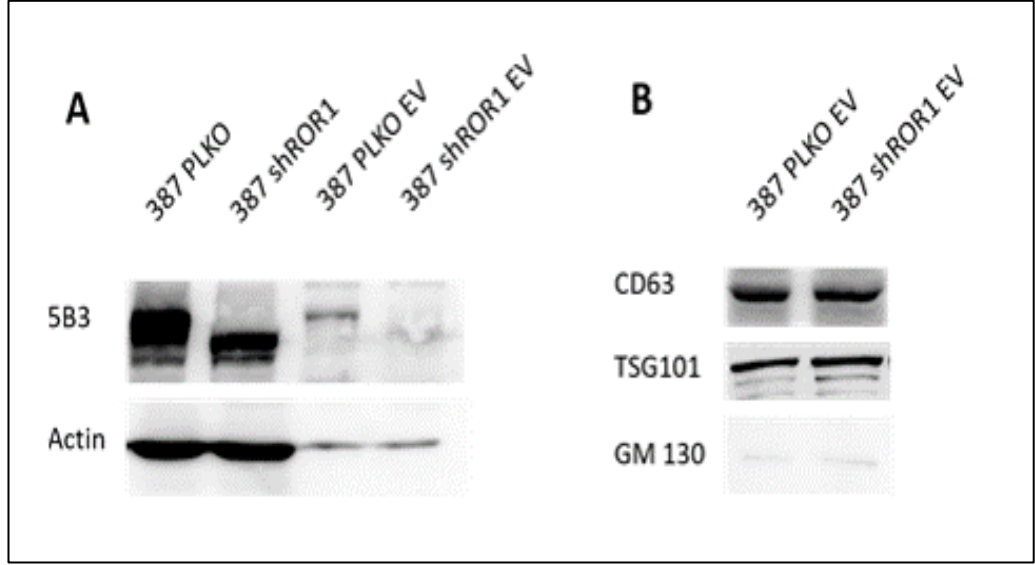
5.6. 387 Hücre Klonlarından İzole Edilen Eksozomlarda ROR1 İfadesi

SNU387-pLKO ve 387-shROR1 hücreleri 6 adet T175 flaska ekildi ve %70 yoğunluğa gelince eksozomsuz-FBS'li besiyeri eklendi ve 3 gün inkübe edildi. Daha sonra seri santrifüj işleminden sonra ultrasantrifüj ile eksozom pelleti elde edildi. Eksozom pelleti, kalite kontrolü amacıyla dH₂O ile çözülerek TEM ve PBS ile çözülerek de NPT analizine gönderildi (Şekil 5.20). TEM ve NPT analizleri sonucunda uygun büyüklükte ve şekilde eksozomların her iki hücre klonundan izole edildiği saptandı.



Şekil 5.20. İzole edilen eksozomların TEM ve NPT analizi. A-C) 387-pLKO hücrelerinden izole edilen eksozomların TEM ve NPT analizi. B-D) 387-shROR1 hücrelerinden izole edilen eksozomların TEM ve NPT analizi.

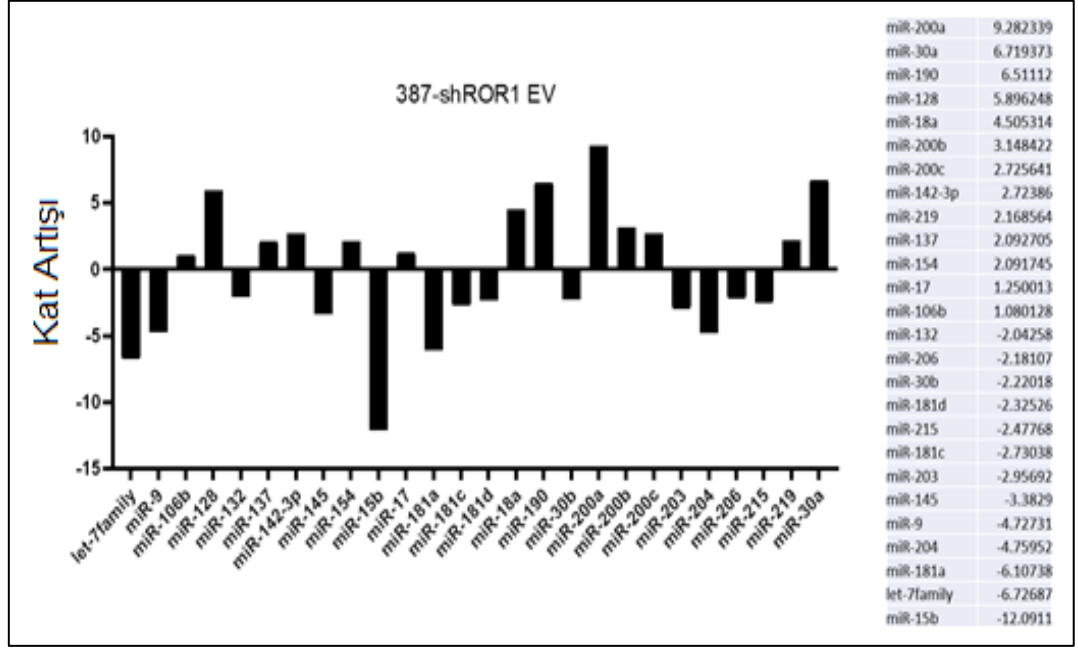
387-pLKO ve 387-shROR1 hücre klonlarından izole edilen eksozomlardaki ROR1 ifadesi incelendi (Şekil 5.21a). 387-pLKO hücrelerinden izole edilen eksozomlarda 130 kDa boyundaki ROR1 ifadesi saptandı buna karşılık ROR1 ifadesinin baskılandığı hücrelerden izole edilen eksozomlarda ise ROR1 ifadesine rastlanmadı. Ayrıca SNU387 hücre klonlarından eksozomların başarı ile izole edildiği eksozomal belirteçlerin ifadeleri ile gösterildi (Şekil 5.21b). Eksozomal belirteçlerden CD63 ve TSG101 ifadesi her iki hücreden izole edilen eksozomlarda bulunmakta buna karşın negatif belirteç olan GM130 ifadesi ise bulunmamaktadır.



Şekil 5.21. 387-pLKO ve 387-shROR1 eksozomların WB analizi. A) Her iki hücreden de izole edilen eksozomlarda ROR1 ifadesi western blotta 5B3 antikoru ile analiz edildi. β -actin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. B) Her iki hücreden izole edilen eksozomlarda eksozomal belirteçlerden CD63, TSG101 ve GM130 ifadesi western blot ile gösterildi.

5.7. ROR1 Baskılanmasının Eksozomal miRNA Kargo İçeriğine Etkisi

SNU387 hücre klonlarından izole edilen eksozomlar Qiazol ile lizis edildi ve miRnaeasy micro kit ile miRNA'lar izole edildi. Quantimir cDNA sentez kiti ile üç basamakta miRNA'lar cDNA'ya dönüştürüldü. 387-pLKO ve 387-shROR1 hücrelerinden izole edilen eksozomların ROR1 ifadesine bağlı değişen miRNA kargo içeriği, Cancer MicroRNA qPCR dizinleri ile incelenerek ddCt metodu ile analiz edildi (Şekil 5.22).



Şekil 5.22. ROR1 ifadesine bağlı değişen eksozomal miRNA kargo içeriği. 387-shROR1 hücrelerinden izole edilen eksozomlardaki miRNA ifadesi 387-pLKO'ya göre kalibre edildi ve U6 snRNA'ya normalize edildikten sonra ddCt metoduna göre hesaplandı.

RT-qPCR sonucuna göre, hücre göçü ve invazyon ile ilişkili miRNA ifadelerinin 387-shROR1 hücrelerinden izole edilen eksozomlarda anlamlı olarak değiştirdiği saptandı. Hücre göçü ve invazyonu baskılayan miRNA'lardan miR-200a, miR-200b ve miR-200c ifadesi artarken [75]; hücre göçünü arttıran miRNA'lardan miR-20b, miR-181c ve miR-9 ifadesi azalmaktadır [76-78]. Buna ek olarak, immün-baskılama ile ilişkilendirilen miRNA'lardan miR-203, miR-9 ve let-7 ailesinin ifadesi de ROR1 ifadesinin baskılanması ile düşmektedir [79-81].

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

HCC tanısının ileri evrelerde konuyor olması ve tedavi seçeneklerinin sınırlı olmasından dolayı önümüzdeki yıllarda HCC'ye bağlı ölüm oranlarının artacağı düşünülmektedir. HCC ile ilişkili risk faktörlerinin iyi tanımlanmış olmasından dolayı "teoride" hastalık tanısının kolaylıkla koyulabilmesi gerekmektedir. Ancak, tüm hastalarda HCC kronik karaciğer hasarı neticesinde gelişen fibroz ve siroz zemininde gelişmekte ve bu da hastalığının tanısının konulmasını zorlaştırmaktadır [82]. Tüm bu sebeplerden dolayı, HCC'nin diğer karaciğer hastalıklarından erken evrede tanımlanması ve ayrılabilmesi yüksek önem arz etmektedir. Literatürde bulunan çalışmalarda, karaciğerde veya kandaki sağlıklı hücrelerde ROR1 ifadesi bulunmadığı gösterilmişti [1, 83]. Biyoinformatik analiz sonucunda, HCC dokularından elde edilen RNA-seq datalarında artmış *ROR1* ifadesi gösterildi. Ancak, HCC hücrelerinin EMT durumları da göz önüne alındığında, HCC'de ROR1 ifadesinin epitel ya da mezenkimal fenotip ile doğrudan bir ilişkisi saptanamadı. Bu sonuçlar, ROR1'in ne tam epitel hücre karakteristiği ne de EMT'nin tüm mezenkimal özellikleri ile ilişkili olduğu göstermektedir. Bundan dolayı ROR1 ifadesinin apoptoza ve anoikise direç, azalmış proliferasyon ve hücre göçü gibi EMT'nin farklı özellikleri ile olan ilişkisi incelendi. Bununla birlikte ROR1 ifadesine bağlı olarak değişen eksozomal miRNA kargo içeriği de tez konusu kapsamında değerlendirildi.

Bu tez çalışmasında, ROR1 proteini yüksek özgüllük ile tanıyan ve epitopu hücre-dışı kısmına tekabül eden ROR1 monoklonal antikorları geliştirildi. Bu antikorlar kullanılarak ROR1 proteinin ifadesini insan ve fare HCC hücre hatları panellerinde kolaylıkla belirlendi. Böylece, kanda ROR1 ifade eden sağlıklı kan hücrelerinin bulunmadığı da düşünüldüğünde, ROR1 proteini HCC'nin diğer malignant olmayan karaciğer patolojilerinden ayrılmasında belirteç olarak değerliliği bulunmaktadır. Bununla birlikte, hem insan hem de fare HCC hücre hatlarında ROR1'in artmış ifadesi gösterildi. Bu yönüyle, pankreas kanserindeki gibi neredeyse tüm hücrelerde farklı ifade seviyelerinde ROR1 proteini bulunmaktadır [84]. Diğer yandan ise, meme, over ve akciğer kanserinde, ROR1 ifadesi metastatik/mezenkimal özellikteki hücrelerde bulunmaktadır [2-4].

Şaşırtıcı olarak, TGF- β ile indüklenen EMT'de ROR1 ifadesinin azalması ve ROR1 ifadesinin baskılanması ile kanonikal EMT belirteçlerindeki değişiklikler ROR1'in fonksiyonel olarak EMT fenotipine katkı sağladığını düşündürmektedir. ROR1'in baskılandığı koşullarda PLC/PRF/5 hücrelerinde EMT'nin belirteçlerinden sayılan E-kaderin ifadesinin azaldığı ve vimentin ifadesinin arttığı gösterildi. Bununla birlikte, diğer bir epitel belirteç olan Sitokeratin 19 (CK19) ifadesinin de azaldığı belirlendi. Yine mezenkimal HCC hücre hattı SNU387'de de ROR1'in baskılanması ile vimentin ifadesinin daha da arttığı gösterildi. PLC-shROR1 ve 387-shROR1 hücre klonlarında ortaya çıkan mezenkimal fenotipten dolayı EMT süreci ile ilişki; hücre siklusundaki duraklama, apoptoza direnç ve kanser kök hücre fenotipi gibi özelliklerdeki değişimler incelendi. ROR1 ifadesinin baskılanması hücre göçündeki azalma dışında EMT özelliklerinin çoğuyla uyumlu bir tablo ortaya çıkardı. Yine kanser kök hücre özelliği ile ilişkili belirteçlerin ifadelerinde de değişiklikler saptandı. Hücre klonlarında EMT özelliklerinden bir çoğunun gözlenmesine karşın, hücre göçünün azalmış olması ya da artmış hücre hareketi özelliğini daha kazanmış olması ilk defa tarafımızdan tanımlanmaktadır. Bu sonuçlar, yakın zamanda EMT sürecinin kesin sınırları olmayan bir program olarak tanımlandığı ve içerisinde birden fazla süreç ile karakterize edilen kısmi-EMT tanımı ile uyumlu bulunmaktadır [25]. Malignant melanoma gelişiminde, melanomanın metastatik olmayan ilk evrelerinde ROR1 ifadesi bulunmasına karşın, ileri evrelerde hücreler metastatik özellikler kazanırken hücre proliferasyonu azalmakta ve ROR1 ifadesi de kaybolmaktadır [85]. HCC'deki durum ile ROR1'in melanomada EMT sürecine katkısı düşünüldüğünde, karsinogenez sürecinde ROR1'in belirleyici bir fonksiyonu olduğu hipotezi kurulabilir. Ayrıca, ROR1 ifadesinin baskılanması sonucunda HCC'de konvansiyonel tedavide kullanılan Oksaliptin ve Doxorubicin gibi ajanlara karşı direnç oluşmaktadır [86, 87]. Bu kemoterapötik ajanlara karşı direncin, en azından kısmen, çoklu-ilaç direnç gen ifadelerinin artması sonucunda ilaçların dışarı atılmasıyla olduğunu gösterilmektedir.

Eksozomlar stromal fibroblastların aktivasyonu, hücre-dışı matriks ile etkileşim, metastaz-öncesi niş oluşumu, immün cevabın baskılanması ve anjiyogenezin indüklenmesi aracılığıyla tümör başlangıcı, büyümesi, ilerlemesi ve kemoterapiye direnç gibi süreçlerde önemli roller oynayabilmektedir [88]. SNU387 hücre klonlarından izole edilen eksozomlarda ROR1 ifadesi ve ROR1 ifadesine bağlı olarak

kanser ile ilişkili miRNA kargo içeriğindeki değişiklikler analiz edildi. 387-shROR1 hücrelerinden izole edilen eksozomlarda, 387-pLKO'ya göre hücre göçü ve invazyonu baskılayan miRNA'ların ifadelerinde artış buna karşılık hücre göçü ve invazyona katkı sağlayan miRNA'ların ifadelerinde ise azalma saptandı. ROR1 ifadesi baskılanan hücrelerinin hareket kabiliyetlerindeki azalma da dikkate alındığında, 387-shROR1 hücrelerinden salgının eksozomların otokrin sinyal iletimi ile hücre hareketini baskılandığı düşünülmektedir.

Tez çalışmasının sonucunda, ROR1 ifadesinin baskılanması ile EMT benzeri bir fenotip ortaya çıkmakta ve hücrelerin kemoterapiye yanıtı değişmektedir. Bu yeni bulgular ışığında, HCC'deki metastaz sürecinin karmaşıklığına yeni bir katman eklenmekte olup, klinik uygulamada kemoterapinin etkinliği ROR1 ifadesi bağlamında değerlendirilebilecektir.

KAYNAKLAR

- [1] Balakrishnan A., Goodpaster T., Randolph-Habecker J., Hoffstrom B. G., Jalikis F. G., Koch L. K., Berger C., Kosasih P. L., Rajan A., Sommermeyer D., (2017), "Analysis of ROR1 protein expression in human cancer and normal tissues", *Clinical Cancer Research*, 23 (12), 3061-3071.
- [2] Cui B., Zhang S., Chen L., Yu J., Widhopf G. F., Fecteau J.-F., Rassenti L. Z., Kipps T. J., (2013), "Targeting ROR1 inhibits epithelial–mesenchymal transition and metastasis", *Cancer research*, 73 (12), 3649-3660.
- [3] Zhang H., Qiu J., Ye C., Yang D., Gao L., Su Y., Tang X., Xu N., Zhang D., Xiong L., (2014), "ROR1 expression correlated with poor clinical outcome in human ovarian cancer", *Scientific reports*, 4, 5811.
- [4] Zheng Y.-Z., Ma R., Zhou J.-K., Guo C.-L., Wang Y.-S., Li Z.-G., Liu L.-X., Peng Y., (2016), "ROR1 is a novel prognostic biomarker in patients with lung adenocarcinoma", *Scientific reports*, 6, 36447.
- [5] Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A., (2018), "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries", *CA: a cancer journal for clinicians*, 68 (6), 394-424.
- [6] Farazi P. A., DePinho R. A., (2006), "Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment", *Nature Reviews Cancer*, 6 (9), 674.
- [7] Gomaa A. I., Khan S. A., Toledano M. B., Waked I., Taylor-Robinson S. D., (2008), "Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis", *World journal of gastroenterology: WJG*, 14 (27), 4300.
- [8] Ozen C., Yildiz G., Dagcan A. T., Cevik D., Ors A., Keles U., Topel H., Ozturk M., (2013), "Genetics and epigenetics of liver cancer", *New biotechnology*, 30 (4), 381-384.
- [9] El-Serag H. B., (2012), "Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma", *Gastroenterology*, 142 (6), 1264-1273. e1261.
- [10] Chan H. L.-Y., Sung J. J.-Y., (2006). "Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus", *Seminars in liver disease*, 153-161.
- [11] Villanueva A., Minguez B., Forner A., Reig M., Llovet J. M., (2010), "Hepatocellular carcinoma: novel molecular approaches for diagnosis, prognosis, and therapy", *Annual review of medicine*, 61, 317-328.

- [12] Ellis L. M., Hicklin D. J., (2008), "VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity", *Nature Reviews Cancer*, 8 (8), 579.
- [13] Kudo M., Finn R. S., Qin S., Han K.-H., Ikeda K., Piscaglia F., Baron A., Park J.-W., Han G., Jassem J., (2018), "Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial", *The Lancet*, 391 (10126), 1163-1173.
- [14] 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 (10064), 56-66.
- [15] El-Khoueiry A. B., Melero I., Crocenzi T. S., Welling T. H., Yau T. C., Yeo W., Chopra A., Grosso J., Lang L., Anderson J., Phase I/II safety and antitumor activity of nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC): CA209-040, in: (Ed.)^(Eds.), *American Society of Clinical Oncology*, 2015, pp.
- [16] Thiery J. P., Acloque H., Huang R. Y., Nieto M. A., (2009), "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease", *cell*, 139 (5), 871-890.
- [17] Thiery J. P., (2002), "Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression", *Nature Reviews Cancer*, 2 (6), 442.
- [18] Gavert N., Ben-Ze'ev A., (2008), "Epithelial–mesenchymal transition and the invasive potential of tumors", *Trends in molecular medicine*, 14 (5), 199-209.
- [19] Heldin C.-H., Landström M., Moustakas A., (2009), "Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial–mesenchymal transition", *Current opinion in cell biology*, 21 (2), 166-176.
- [20] Zavadil J., Cermak L., Soto-Nieves N., Böttinger E. P., (2004), "Integration of TGF- β /Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition", *The EMBO journal*, 23 (5), 1155-1165.
- [21] Singh A., Settleman J., (2010), "EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer", *Oncogene*, 29 (34), 4741.
- [22] Mejlvang J., Kriajevska M., Vandewalle C., Chernova T., Sayan A. E., Berx G., Mellon J. K., Tulchinsky E., (2007), "Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition", *Molecular biology of the cell*, 18 (11), 4615-4624.
- [23] Mani S. A., Guo W., Liao M.-J., Eaton E. N., Ayyanan A., Zhou A. Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C. C., Shipitsin M., (2008), "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells", *cell*, 133 (4), 704-715.

- [24] Hiscox S., Jiang W. G., Obermeier K., Taylor K., Morgan L., Burmi R., Barrow D., Nicholson R. I., (2006), "Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of β -catenin phosphorylation", *International journal of cancer*, 118 (2), 290-301.
- [25] Nieto M. A., Huang R. Y.-J., Jackson R. A., Thiery J. P., (2016), "EMT: 2016", *cell*, 166 (1), 21-45.
- [26] 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.
- [27] Forrester W. C., Dell M., Perens E., Garriga G., (1999), "A *C. elegans* Ror receptor tyrosine kinase regulates cell motility and asymmetric cell division", *Nature*, 400 (6747), 881.
- [28] Borchering N., Kusner D., Liu G.-H., Zhang W., (2014), "ROR1, an embryonic protein with an emerging role in cancer biology", *Protein & cell*, 5 (7), 496-502.
- [29] Oishi I., Takeuchi S., Hashimoto R., Nagabukuro A., Ueda T., Liu Z. J., Hatta T., Akira S., Matsuda Y., Yamamura H., (1999), "Spatio-temporally regulated expression of receptor tyrosine kinases, mRor1, mRor2, during mouse development: implications in development and function of the nervous system", *Genes to Cells*, 4 (1), 41-56.
- [30] Kaucka M., Krejčí P., Plevova K., Pavlová Š., Prochazkova J., Janovska P., Valnohová J., Kozubík A., Pospíšilová Š., Bryja V., (2011), "Post-translational modifications regulate signalling by Ror1", *Acta physiologica*, 203 (3), 351-362.
- [31] Fukuda T., Chen L., Endo T., Tang L., Lu D., Castro J. E., Widhopf G. F., Rassenti L. Z., Cantwell M. J., Prussak C. E., (2008), "Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (8), 3047-3052.
- [32] Li C., Wang S., Xing Z., Lin A., Liang K., Song J., Hu Q., Yao J., Chen Z., Park P. K., (2017), "A ROR1–HER3–lncRNA signalling axis modulates the Hippo–YAP pathway to regulate bone metastasis", *Nature cell biology*, 19 (2), 106.
- [33] Yamaguchi T., Yanagisawa K., Sugiyama R., Hosono Y., Shimada Y., Arima C., Kato S., Tomida S., Suzuki M., Osada H., (2012), "NKX2-1/TTF1/TTF-1-Induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma", *Cancer cell*, 21 (3), 348-361.
- [34] Gentile A., Lazzari L., Benvenuti S., Trusolino L., Comoglio P. M., (2011), "Ror1 is a pseudokinase that is crucial for Met-driven tumorigenesis", *Cancer research*, 71 (8), 3132-3141.

- [35] Matsuda T., Nomi M., Ikeya M., Kani S., Oishi I., Terashima T., Takada S., Minami Y., (2001), "Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development", *Mechanisms of development*, 105 (1-2), 153-156.
- [36] Al-Shawi R., Ashton S. V., Underwood C., Simons J. P., (2001), "Expression of the Ror1 and Ror2 receptor tyrosine kinase genes during mouse development", *Development Genes & Evolution*, 211 (4).
- [37] Paganoni S., Ferreira A., (2003), "Expression and subcellular localization of Ror tyrosine kinase receptors are developmentally regulated in cultured hippocampal neurons", *Journal of neuroscience research*, 73 (4), 429-440.
- [38] DaneshManesh A. H., Mikaelsson E., Jeddi-Tehrani M., Bayat A. A., Ghods R., Ostadkarampour M., Akhondi M., Lagercrantz S., Larsson C., Österborg A., (2008), "Ror1, a cell surface receptor tyrosine kinase is expressed in chronic lymphocytic leukemia and may serve as a putative target for therapy", *International journal of cancer*, 123 (5), 1190-1195.
- [39] Baskar S., Kwong K. Y., Hofer T., Levy J. M., Kennedy M. G., Lee E., Staudt L. M., Wilson W. H., Wiestner A., Rader C., (2008), "Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia", *Clinical Cancer Research*, 14 (2), 396-404.
- [40] Li P., Harris D., Liu Z., Liu J., Keating M., Estrov Z., (2010), "Stat3 activates the receptor tyrosine kinase like orphan receptor-1 gene in chronic lymphocytic leukemia cells", *PLoS One*, 5 (7), e11859.
- [41] Barna G., Mihalik R., Timár B., Tömböl J., Csende Z., Sebestyén A., Bödör C., Csernus B., Reiniger L., Peták I., (2011), "ROR1 expression is not a unique marker of CLL", *Hematological oncology*, 29 (1), 17-21.
- [42] Daneshmanesh A. H., Porwit A., Hojjat-Farsangi M., Jeddi-Tehrani M., Tamm K. P., Grandér D., Lehmann S., Norin S., Shokri F., Rabbani H., (2013), "Orphan receptor tyrosine kinases ROR1 and ROR2 in hematological malignancies", *Leukemia & lymphoma*, 54 (4), 843-850.
- [43] Bicocca V. T., Chang B. H., Masouleh B. K., Muschen M., Loriaux M. M., Druker B. J., Tyner J. W., (2012), "Crosstalk between ROR1 and the Pre-B cell receptor promotes survival of t (1; 19) acute lymphoblastic leukemia", *Cancer cell*, 22 (5), 656-667.
- [44] Zhang S., Chen L., Wang-Rodriguez J., Zhang L., Cui B., Frankel W., Wu R., Kipps T. J., (2012), "The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers", *The American journal of pathology*, 181 (6), 1903-1910.

- [45] Zhang S., Chen L., Cui B., Chuang H.-Y., Yu J., Wang-Rodriguez J., Tang L., Chen G., Basak G. W., Kipps T. J., (2012), "ROR1 is expressed in human breast cancer and associated with enhanced tumor-cell growth", *PLoS One*, 7 (3), e31127.
- [46] MacKeigan J. P., Murphy L. O., Blenis J., (2005), "Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance", *Nature cell biology*, 7 (6), 591.
- [47] Gentile A., Lazzari L., Benvenuti S., Trusolino L., Comoglio P. M., (2014), "The ROR1 pseudokinase diversifies signaling outputs in MET-addicted cancer cells", *International journal of cancer*, 135 (10), 2305-2316.
- [48] Jung E. H., Lee H. N., Han G. Y., Kim M. J., Kim C. W., (2016), "Targeting ROR1 inhibits the self-renewal and invasive ability of glioblastoma stem cells", *Cell biochemistry and function*, 34 (3), 149-157.
- [49] Widhopf G. F., Cui B., Ghia E. M., Chen L., Messer K., Shen Z., Briggs S. P., Croce C. M., Kipps T. J., (2014), "ROR1 can interact with TCL1 and enhance leukemogenesis in E μ -TCL1 transgenic mice", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (2), 793-798.
- [50] Daneshmanesh A. H., Hojjat-Farsangi M., Moshfegh A., Khan A. S., Mikaelsson E., Österborg A., Mellstedt H., (2015), "The PI3K/AKT/mTOR pathway is involved in direct apoptosis of CLL cells induced by ROR1 monoclonal antibodies", *British journal of haematology*, 169 (3), 455-458.
- [51] Choi M. Y., Widhopf II G. F., Wu C. C., Cui B., Lao F., Sadarangani A., Cavagnaro J., Prussak C., Carson D. A., Jamieson C., (2015), "Pre-clinical specificity and safety of UC-961, a first-in-class monoclonal antibody targeting ROR1", *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 15, S167-S169.
- [52] Choi M. Y., Widhopf G. F., Ghia E. M., Kidwell R. L., Hasan M. K., Yu J., Rassenti L. Z., Chen L., Chen Y., Pittman E., (2018), "Phase I trial: Cirmtuzumab inhibits ROR1 signaling and stemness signatures in patients with chronic lymphocytic leukemia", *Cell Stem Cell*, 22 (6), 951-959. e953.
- [53] Deniger D. C., Yu J., Huls M. H., Figliola M. J., Mi T., Maiti S. N., Widhopf 2nd G. F., Hurton L. V., Thokala R., Singh H., (2015), "Sleeping beauty transposition of chimeric antigen receptors targeting receptor tyrosine kinase-like orphan receptor-1 (ROR1) into diverse memory T-cell populations", *PLoS One*, 10 (6), e0128151.
- [54] Lakhter A. J., Sims E. K., (2015), "Minireview: emerging roles for extracellular vesicles in diabetes and related metabolic disorders", *Molecular endocrinology*, 29 (11), 1535-1548.
- [55] Raposo G., Nijman H. W., Stoorvogel W., Liejendekker R., Harding C. V., Melief C., Geuze H. J., (1996), "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles", *Journal of Experimental Medicine*, 183 (3), 1161-1172.

- [56] Zhang X., Yuan X., Shi H., Wu L., Qian H., Xu W., (2015), "Exosomes in cancer: small particle, big player", *Journal of hematology & oncology*, 8 (1), 83.
- [57] Svensson K. J., Christianson H. C., Wittrup A., Bourseau-Guilmain E., Lindqvist E., Svensson L. M., Mörgelin M., Belting M., (2013), "Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1", *Journal of Biological Chemistry*, 288 (24), 17713-17724.
- [58] Dias M. V., Teixeira B. L., Rodrigues B. R., Sinigaglia-Coimbra R., Porto-Carreiro I., Roffé M., Hajj G. N., Martins V. R., (2016), "PRNP/prion protein regulates the secretion of exosomes modulating CAV1/caveolin-1-suppressed autophagy", *Autophagy*, 12 (11), 2113-2128.
- [59] Lötvall J., Hill A. F., Hochberg F., Buzás E. I., Di Vizio D., Gardiner C., Ghossein Y. S., Kurochkin I. V., Mathivanan S., Quesenberry P., Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles, in: (Ed.)[^](Eds.), Taylor & Francis, 2014, pp.
- [60] Bhome R., Goh R., Pickard K., Mellone M., Sayan A. E., Mirnezami A. (2017), "Profiling the microRNA payload of exosomes derived from ex vivo primary colorectal fibroblasts". "MicroRNA Profiling", Springer.
- [61] Aga M., Bentz G. L., Raffa S., Torrisi M. R., Kondo S., Wakisaka N., Yoshizaki T., Pagano J. S., Shackelford J., (2014), "Exosomal HIF1 α supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes", *Oncogene*, 33 (37), 4613.
- [62] You Y., Shan Y., Chen J., Yue H., You B., Shi S., Li X., Cao X., (2015), "Matrix metalloproteinase 13-containing exosomes promote nasopharyngeal carcinoma metastasis", *Cancer science*, 106 (12), 1669-1677.
- [63] Abd Elmageed Z. Y., Yang Y., Thomas R., Ranjan M., Mondal D., Moroz K., Fang Z., Rezk B. M., Moparty K., Sikka S. C., (2014), "Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes", *Stem cells*, 32 (4), 983-997.
- [64] Qu Z., Wu J., Wu J., Luo D., Jiang C., Ding Y., (2016), "Exosomes derived from HCC cells induce sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma both in vivo and in vitro", *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35 (1), 159.
- [65] Corcoran C., Rani S., O'Brien K., O'Neill A., Prencipe M., Sheikh R., Webb G., McDermott R., Watson W., Crown J., (2012), "Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes", *PLoS One*, 7 (12), e50999.

- [66] Xiao X., Yu S., Li S., Wu J., Ma R., Cao H., Zhu Y., Feng J., (2014), "Exosomes: decreased sensitivity of lung cancer A549 cells to cisplatin", *PLoS One*, 9 (2), e89534.
- [67] He M., Qin H., Poon T. C., Sze S.-C., Ding X., Co N. N., Ngai S.-M., Chan T.-F., Wong N., (2015), "Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs", *Carcinogenesis*, 36 (9), 1008-1018.
- [68] Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J. J., Lötvall J. O., (2007), "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells", *Nature cell biology*, 9 (6), 654.
- [69] Wei J. x., Lv L. h., Wan Y. l., Cao Y., Li G. l., Lin H. m., Zhou R., Shang C. z., Cao J., He H., (2015), "Vps4A functions as a tumor suppressor by regulating the secretion and uptake of exosomal microRNAs in human hepatoma cells", *Hepatology*, 61 (4), 1284-1294.
- [70] Basu S., Bhattacharyya S. N., (2014), "Insulin-like growth factor-1 prevents miR-122 production in neighbouring cells to curtail its intercellular transfer to ensure proliferation of human hepatoma cells", *Nucleic acids research*, 42 (11), 7170-7185.
- [71] Lou G., Song X., Yang F., Wu S., Wang J., Chen Z., Liu Y., (2015), "Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma", *Journal of hematology & oncology*, 8 (1), 122.
- [72] Yamaguchi T., Lu C., Ida L., Yanagisawa K., Usukura J., Cheng J., Hotta N., Shimada Y., Isomura H., Suzuki M., (2016), "ROR1 sustains caveolae and survival signalling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1", *Nature communications*, 7, 10060.
- [73] Palacios-Moreno J., Foltz L., Guo A., Stokes M. P., Kuehn E. D., George L., Comb M., Grimes M. L., (2015), "Neuroblastoma tyrosine kinase signaling networks involve FYN and LYN in endosomes and lipid rafts", *PLoS computational biology*, 11 (4), e1004130.
- [74] Li M. Z., Elledge S. J. (2012), "SLIC: a method for sequence-and ligation-independent cloning". "Gene synthesis", Springer.
- [75] Korpai M., Lee E. S., Hu G., Kang Y., (2008), "The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2", *Journal of Biological Chemistry*, 283 (22), 14910-14914.

- [76] Cascio S., D'Andrea A., Ferla R., Surmacz E., Gulotta E., Amodeo V., Bazan V., Gebbia N., Russo A., (2010), "miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 α and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells", *Journal of cellular physiology*, 224 (1), 242-249.
- [77] He X., Liu Z., Peng Y., Yu C., (2016), "MicroRNA-181c inhibits glioblastoma cell invasion, migration and mesenchymal transition by targeting TGF- β pathway", *Biochemical and biophysical research communications*, 469 (4), 1041-1048.
- [78] Ma L., Young J., Prabhala H., Pan E., Mestdagh P., Muth D., Teruya-Feldstein J., Reinhardt F., Onder T. T., Valastyan S., (2010), "miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis", *Nature cell biology*, 12 (3), 247.
- [79] Zhou M., Chen J., Zhou L., Chen W., Ding G., Cao L., (2014), "Pancreatic cancer derived exosomes regulate the expression of TLR4 in dendritic cells via miR-203", *Cellular immunology*, 292 (1-2), 65-69.
- [80] Taylor M. A., Schiemann W. P., (2014), "Therapeutic opportunities for targeting microRNAs in cancer", *Molecular and cellular therapies*, 2 (1), 30.
- [81] Gao F., Zhao Z.-L., Zhao W.-T., Fan Q.-R., Wang S.-C., Li J., Zhang Y.-Q., Shi J.-W., Lin X.-L., Yang S., (2013), "miR-9 modulates the expression of interferon-regulated genes and MHC class I molecules in human nasopharyngeal carcinoma cells", *Biochemical and biophysical research communications*, 431 (3), 610-616.
- [82] 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 (3-4), 367-383.
- [83] Hudecek M., Schmitt T. M., Baskar S., Lupo-Stanghellini M. T., Nishida T., Yamamoto T. N., Bleakley M., Turtle C. J., Chang W.-C., Greisman H. A., (2010), "The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor", *Blood*, 116 (22), 4532-4541.
- [84] Daneshmanesh A. H., Hojjat-Farsangi M., Ghaderi A., Moshfegh A., Hansson L., Schultz J., Vågberg J., Byström S., Olsson E., Olin T., (2018), "A receptor tyrosine kinase ROR1 inhibitor (KAN0439834) induced significant apoptosis of pancreatic cells which was enhanced by erlotinib and ibrutinib", *PLoS One*, 13 (6), e0198038.
- [85] O'Connell M. P., Marchbank K., Webster M. R., Valiga A. A., Kaur A., Vultur A., Li L., Herlyn M., Villanueva J., Liu Q., (2013), "Hypoxia induces phenotypic plasticity and therapy resistance in melanoma via the tyrosine kinase receptors ROR1 and ROR2", *Cancer discovery*, 3 (12), 1378-1393.
- [86] Lammer J., Malagari K., Vogl T., Pilleul F., Denys A., Watkinson A., Pitton M., Sergent G., Pfammatter T., Terraz S., (2010), "Prospective randomized study of

Doksorubisin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study", Cardiovascular and interventional radiology, 33 (1), 41-52.

[87] Beaugrand M., Sala M., Degos E., Sherman M., Bolondi L., Evans T., Trinchet J., N'Kontchou G., Llovet J., Hedegaard K., (2005). "Treatment of advanced hepatocellular carcinoma (HCC) by seocalcitol (a Vit D analogue): An international randomized double-blind", JOURNAL OF HEPATOLOGY, 17-17.

[88] Raposo G., Stoorvogel W., (2013), "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends", J Cell Biol, 200 (4), 373-383.

ÖZGEÇMİŞ

Metin Çetin, 18 Ekim 1987’de Bulgaristan’ın Şumen kentinde doğdu. 2005 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2009 yılında tamamladıktan sonra 2011 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans eğitimini 2013 yılında tamamladı. 2013 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı. Halen doktora eğitimine devam eden Metin ÇETİN, 2011-2016 yılları arasında Gebze Teknik Üniversitesinde Araştırma görevli olarak çalışmış ve 2016 yılından beri de Öğretim Görevlisi (Uzman) olarak çalışmaya devam etmektedir.

EKLER

EK A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayın

Cetin M., Odabas G., Douglas LR., et al., “ROR1 Expression and Its Functional Significance in Hepatocellular Carcinoma Cells “, Cells 2019, 8(3), 210.

EK B: Şekil Kullanım İzinleri

Ek B1.1: Kullanılan şekiller için alınan izinler

Şekil Numarası	Lisans Tarihi	Lisans Numarası	Hak Sahibi
Şekil 2.1	19/04/2019	4572470920099	Elsevier
Şekil 2.2	19/04/209	-	Springer Nature