

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE PLEXİNC1
İFADESİNİN ÇOKLU-KİNAZ İNHİBİTÖR YANITINA
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ŞEVVAL DİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2022

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE
PLEXİNC1 İFADESİNİN ÇOKLU-KİNAZ
İNHİBİTÖR YANITINA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

ŞEVVAL DİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2022

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

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF
PLEXINC1 EXPRESSION ON MULTI-
KINASE INHIBITORY RESPONSE IN
LIVER CANCER CELLS**

ŞEVVAL DİK

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

**THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. TAMER YAĞCI**

**GEBZE
2022**



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/07/2022 tarih ve 2022/34 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 20/07/2022 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Şevval DİK'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Doç. Dr. Ceren ÇIRACI

ONAY

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

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Hepatoselüler karsinom (HCC), yetişkinlerde en sık görülen birincil karaciğer kanser türüdür. HCC’de de diğer tüm kanserlerde olduğu gibi, hücrel mekanizmayı etkileyen epigenetik değişiklikler ve mutasyonlar, hücrenin daha yüksek bir hızda çoğalmasına ve hücrenin apoptozdan kaçınmasına neden olduğu durumlarda gelişmektedir. HCC için cerrahi rezeksiyon ve karaciğer transplantasyonu iki etkili terapötik yaklaşım olmasına rağmen, her hasta için uygun değildir. Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalar, özellikle HCC’nin tedavisinde sinyal yollarının hedef alınmasının tedavinin etkinliğini arttırdığını göstermektedir. HCC patogeneğinde birçok sinyal yolağı rol oynamaktadır. Bunlar arasında Reseptör Tirozin Kinaz (RTK) yolağı, RAF/ERK/MAPK yolağı, PI3K/Akt/mTOR yolağı, Wnt/ β -catenin yolağı, ubiquitin/proteozom yolağı, Hedgehog yolağı, Ras ve Jak/STAT yolağı yer almaktadır. Birden fazla sinyal yolağını hedef alan ve ileri evre HCC hastalarının ilk basamak tedavisinde Sorafenib ve Lenvatinib ile ikinci basamak tedavide de Regorafenib kullanılmaktadır. Hücre yüzey proteinlerinden olan Plexin ailesi doku homeostazında, sinir sisteminde oluşan hasarların giderilmesinde, anjiyogenezin düzenlenmesinde, immün sistem regülasyonunda ve birçok hastalıkta (kanser gibi) rol almaktadırlar.

Bu tez çalışması kapsamında, PLXNC1’in baskılandığı ve kontrol HCC hücre hatlarında çoklu-kinaz inhibitörlerinin etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Plexin C1 baskılanmış (shPLXNC1) ve kontrol (shPLKO) HCC hücre klonlarında ileri evre HCC tedavisinde uygulamaları onaylanmış sorafenib, lenvatinib ve regorafenibin etkinliği her bir hücre klonunda farklı dozlar uygulanarak WST-1 yöntemiyle incelenmiştir. IC_{50} değerlerinden hareketle ilaç dozları belirlenmiş ve hücre klonlarına uygulanarak apoptotik etki PARP kesimi, Western blotlama ve AnnexinV/7AAD boyama ile akım sitometresinde incelenerek belirlenmiştir. Bu tez çalışması sonucunda, HCC’de Plexin C1’in baskılanmış hücre klonlarında çoklu-kinaz inhibitörlerine karşı yanıtında apoptoza direnç oluşturduğu gözlemlendiğinden moleküler belirteç olarak değerliliğinin ön verileri oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: PLXNC1, İnhibisyon Konsantrasyonu (IC_{50}), Sorafenib, Regorafenib, Lenvatinib, PARP.

SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primarily liver cancer. In HCC, as in all other cancers, these epigenetic changes and mutations affect the cellular mechanism, so the cell reproduces at a higher rate and avoids apoptosis. Although surgical resection and liver transplantation are two effective therapeutic approaches for HCC, they are not suitable for every patient. For this reason, studies conducted in recent years, especially targeting signaling pathways in the treatment of HCC, increase the effectiveness of the treatment. Many signaling pathways play a role in the pathogenesis of HCC. These include the Receptor Tyrosine Kinase (RTK) pathway, the RAF/ERK/MAPK pathway, the PI3K/Akt/mTOR pathway, the Wnt/ β -catenin pathway, the ubiquitin/proteasome pathway, the hedgehog pathway, the RAS, and the Jak/STAT pathway. Sorafenib and Lenvatinib are used in the first-line treatment of patients with advanced HCC that target more than one signaling pathway, and Regorafenib is used in the second-line treatment. The Plexin family, play a role in tissue homeostasis, elimination of damage to the nervous system, regulation of angiogenesis, immune system regulation and many diseases (such as cancer.)

In this thesis, it was aimed to investigate the efficacy of multi-kinase inhibitors in PLXNC1 suppressed and control HCC cell lines. The efficacy of multi-kinase inhibitors sorafenib, lenvatinib and regorafenib, which have been approved for the treatment of advanced HCC in Plexin C1 suppressed (shPLXNC1) and control (shPLKO) HCC cell clones, was investigated using WST-1 method by applying different doses to each cell clone. Then the doses were determined by calculating the IC_{50} values, and the apoptotic effect was investigated by applying to the cell clones, using western blotting over PARP cut and AnnexinV/7AAD staining using flow cytometry. As a result of this thesis, preliminary data on the valence of Plexin C1 as a molecular marker have been established, since it has been observed that Plexin C1 induces resistance to apoptosis in response to multi-kinase inhibitors in suppressed cell clones in HCC.

Key Words: PLXNC1, Inhibition Concentration (IC_{50}), Sorafenib, Regorafenib, Lenvatinib, PARP.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında bana danışmanlığıyla destek veren, bilgi ve yorumlarını benimle paylaşan saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımın yürütülmesindeki yardımlarından ve desteklerinden dolayı başta Dr. Görkem ODABAŞ'a ve Dr. Metin ÇETİN'e, bilgi birikimlerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, her zaman yardım ve desteklerini hissettiğim Dr. İrem YALIM CAMCI ve Arş. Gör. Arzu AYSAN'a teşekkür ederim.

Sevgili laboratuvar arkadaşlarım, Şule ERDERMİR SAYAN, Esma ERCİYAS BAYKAL, Gamze GÜNGÖR TOPCU, Nurşah ERSEZEN, Durmuş AKDOĞAN ve hem proje hem laboratuvar hem de canım arkadaşlarım Maide ŞEKER ile Melike BAHÇEKAPILI'ya en içten sevgilerimi sunuyorum.

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan, hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan sonsuz sevgi ve anlayışlarıyla her türlü duygu durumunu benimle göğüsleyen sevgili annem Ebru Zeynep DİK'e, babam Kemal DİK, canım ağabeyim Gökhan HATİPOĞLU'na ve canım kardeşim Selin DİK'e varlıkları ve sonsuz sevgileri için çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından Prof. Dr. Tamer YAGCI yürütücülüğünde gerçekleştirilen 119S412 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Kanserin Ayırt Edici Özellikleri	4
2.2. Hepatoselüler Karsinom	5
2.2.1. HCC’de Rol Oynayan Sinyal Yolakları	7
2.2.2. HCC’de Rol Oynayan Genetik Değişiklikler	9
2.2.3. Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT)	11
2.2.4. Anoikis Direnci	12
2.3. Reseptör Tirozin Kinazlar	14
2.4. Reseptör Tirozin Kinaz İnhibitörleri	16
2.5. Plexin Ailesi	21
2.5.1. PLEXINC1	21
3. GEREÇLER	23
3.1. Genel Kimyasallar	23
3.2. Cihazlar	23
3.3. Hücre Kültürü Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler	24
3.4. Çözelti ve Tamponlar	24
3.5. Antikorlar ve Boyalar	25
4. YÖNTEMLER	26
4.1. Hücre Kültürü ve Koşulları	26

4.2. Hücre Proliferasyonu Analizi	26
4.3. Hücre Migrasyon ve İnvazyon Analizi	27
4.3.1. Hücre Migrasyonu	27
4.3.2. Hücre İnvazyonu	27
4.4. Hücre Döngüsü Analizi	28
4.5. Anoikise Direnç Analizi	28
4.6. PLEXINC1 Ekseninde HCC Hücrelerinin Çoklu-Kinaz İnhibitörlerine Yanıtının Belirlenmesi	28
4.6.1. Çoklu-Kinaz İnhibitörlerinin PLEXINC1 Hücre Klonlarında Hücre Proliferasyonuna etkisi	28
4.6.2. Çoklu-Kinaz İnhibitörlerinin PLEXINC1 Hücre Klonlarında Hücre Apoptoz Yanıtına Etkisi	29
4.7. İstatistiksel Analizler	30
5. BULGULAR	31
5.1. Hücre Proliferasyon Aktivitesi	31
5.2. Hücre Migrasyon ve İnvazyon Analizi	32
5.2.1. Hücre Migrasyon Aktivitesi	32
5.2.2. Hücre İnvazyon Aktivitesi	33
5.3. Hücre Döngüsü Analizi	34
5.4. Klonların Anoikise Direnç Analizi	35
5.5. PLEXINC1 Ekseninde HCC Hücrelerinde Çoklu-Kinaz İnhibitörlerine Yanıtının Belirlenmesi	36
5.5.1. Çoklu-Kinaz İnhibitörlerinin PLEXINC1 Hücre Klonlarında Hücre Proliferasyon Etkisi	36
5.5.2. Çoklu-Kinaz İnhibitörlerinin PLEXINC1 Hücre Klonlarında Apoptoz Yanıtına Etkisi	38
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	44
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	53
EKLER	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Acıklamalar</u>
<u>Kisaltmalar</u>	
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikro Molar
dk	: Dakika
L	: Litre
M	: Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
7-AAD	: 7-Aminoaktinomisin D
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
AR	: Androjen Reseptör
BSA	: Bovine Serum Albumin
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	: N, N, N', N'-Tetrametiletilediamin
FADD	: Fas ile İlişkili Ölüm Domaini
FBS	: Fetal Dana Serumu
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
IC ₅₀	: Hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri
Kaderin-1	: Epitelyal Kaderin Geni
NaCl	: Sodyum Klorür
PARP	Poli (ADP-riboz) Polimeraz
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PLXNC1	Plexin C1
PS	: Fosfolipid Fosfatidilserin
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homolog

ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	:	Dakika Başına Dönüş
SEMA7A		Semaphorin 7A
SFM	:	Serum İçermeyen Besiyeri
Tris	:	Tris (Hidroksimetil) Aminometan
VEGF	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Hepatokarsinogenez oluşumu.	6
2.2: Viral enfeksiyon ve diğer çevresel faktörlerin etkisiyle Wnt sinyal yolağı aktivasyonu çeşitli proto-onkogenlerin ekspresyonuna sebep olur.	7
2.3: Ras Sinyal Yolağı.	8
2.4: PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı.	9
2.5: Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) hücre dışı matrisi (ECM) parçalar ve çeşitli sitokinleri aktive ederek HCC hücrelerinin bazal membran (BM) ve Disse boşluğu yoluyla lokal invazyonu kolaylaştırır.	10
2.6: Yüksek düzeyde aktif RhoC/ROCK2 sonucu VE-kadherin ve MMP2 ifadesini artırır. Böylece ERK/MMP sinyalleşmesini aktive ederek EMT (epitelyal mezenkimal geçiş) oluşumunu artırır.	11
2.7 Epitel hücrelerin mezenkimal hücrelere dönüşümü.	11
2.8: EMT'nin kanser ilerlemesine katkısı.	12
2.9: Anoikis mekanizmasını değişmesine yol açan faktörler.	13
2.10: Anoikis direnç mekanizmasında yer alan metabolik ve sinyal ağları.	14
2.11: Reseptör Tirozin Kinazın ve ona bağlı sinyal yollarının gösterimi.	15
2.12: Sorafenib'in moleküler mekanizması.	17
2.13: Lenvatinib'in etki ettiği moleküler mekanizma.	18
2.14: Regorafenib'in etki mekanizması.	19
2.15: Cabozantinib etki mekanizması.	20
2.16: Semaforin protein ailesi üyeleri domain yapılarına göre 8 sınıfa ayrılırlar.	21
5.1: Hücre İndeksi hesaplama formülü.	31
5.2: shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının proliferasyon analizi. Kuyulardan kaydedilen cell indeksi değerleri ile grafik oluşturuldu.	31
5.3: shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının migrasyon analizi.	32
5.4: shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının invazyon analizi.	33

5.5:	shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının hücre döngüsü analizi.	34
5.6:	shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının anoikis direnci.	35
5.7:	Kontrol ve shPLXNC1 PLC/PRF/5 hücre klonlarına Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib uygulanması ve hücre canlılığı.	37
5.8:	Kontrol ve shPLXNC1 Hep3B hücre klonlarına Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib uygulanması ve hücre canlılığı.	37
5.9:	shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının çoklu-kinaz inhibitörlerine karşı apoptoz yanıtı.	39
5.10:	shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının çoklu-kinaz inhibitörlerine karşı apoptoz yanıtı.	40
5.11:	shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının çoklu-kinaz inhibitörlerine karşı apoptoz yanıtı.	41
5.12:	Hücre ölümü, mitokondriyal membran depolarizasyonuna bağlı olarak apoptotik hücrelerde azalan TMRE boyaması ile PLC/PRF/5 hücrelerinin kontrol pLKO ve shPLXNC1 klonlarında akım sitometrisi ile incelenmiştir.	42
5.13:	Hücre ölümü, mitokondriyal membran depolarizasyonuna bağlı olarak apoptotik hücrelerde azalan TMRE boyaması ile Hep3B hücrelerinin kontrol pLKO ve shPLXNC1 klonlarında akım sitometrisi ile incelenmiştir.	43

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: FDA tarafından onaylanmış kanser tedavisi için RTK'lara karşı geliştirilen küçük molekül inhibitörleri ve monoklonal antikorlardan bazıları gösterilmektedir.	16
2.2: Kontrol ve shPLXNC1 Hep3B ve PLC/PRF/5 hücre klonlarına Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib uygulanması sonucu hesaplanan IC50 değerleri.	38

1. GİRİŞ

Kanser, 2020'de yaklaşık 10 milyondan fazla insanın ölümüne sebep olan kanser hastalığı en önemli sağlık sorunlarından biridir [1]. Karaciğer kanseri en yaygın beşinci kanser türü olup dünya çapında kansere bağlı ölümlerde dördüncü sırada yer almaktadır. Erkeklerde en sık görülen dördüncü kanser türüdür ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer alır. Erkeklerde karaciğer kanseri gelişme riski kadınlara kıyasla daha yüksektir. Kadınlarda dokuzuncu en yaygın kanser türü olmasına rağmen, kansere bağlı ölümlerde yüksek ölüm oranıyla dördüncüdür. Erkeklerin kadınlara küresel HCC insidans oranı 2,8:1'dir. HCC'ye yol açan başlıca etmenler arasında Hepatit B ve C virüsleri, nemli ortamda stoklanan besinler aracılığıyla aflatoksin intoksikasyonuna maruz kalma, alkolik olmayan karaciğer yağlanması (NASH) ve aşırı alkol tüketimi yer almaktadır. Bu etmenlerin yol açtığı inflamasyon ile bunun zemininde gelişen hücre proliferasyonu ve ölümü döngüsü hepatositlerde mutasyonların birikimine yol açarak HCC gelişimine zemin hazırlamaktadır [2]. TERT promotor mutasyonları, genoma entegre viral antijenler, kromozom translokasyonları ve gen amplifikasyonları HCC vakalarının %80'inde görülmektedir. Aynı zamanda, vasküler invazyon fenotipine sahip HCC örneklerinde hücre hareketini düzenleyen MMP'ler ve RhoC gibi genlerde ekspresyon seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Bu yöndeki çalışmalarda, yüksek düzeyde aktive edilmiş RhoC/ROCK2'nin MMP-2 ekspresyonunu arttırarak ERK/MMP sinyalleşmesini aktive ettiği ve böylece EMT oluşumunu arttırdığı saptanmıştır [3]. Plexin sinyal yolundaki anormallikler, nörolojik hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere birçok hastalık gelişiminde rol oynar. Plexin C1'in ifade düzeyi, lösemiler, akciğer kanseri ve melanom üzerinde çalışılmıştır. Örneğin, tümör hücre büyümesi, EMT, akciğer metastazı ve anjiyogenez fare modellerinde Plexin C1 ligandı SEMA7A'nın artmış ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. SEMA7A ekspresyonu, cilt kanseri hastalarında kötü prognoz ile ilişkilidir ancak metastatik melanomların %66'sında Plexin C1 ifadesine rastlanılmamıştır. Bununla birlikte ileri evre HCC hücrelerinde Plexin C1'in, normal hücrelere göre çok daha az ifade edildiği gösterilmiştir [4].

Reseptör tirozin kinazlar ise birçok polipeptit büyüme faktörü, sitokin ve hormon için yüksek afiniteye sahip hücre yüzey reseptörleridir. Dolayısıyla bu

reseptörler birçok kanser türünün gelişmesinde ve ilerlemesinde kritik bir role sahiptir [5]. HCC’de gelişen moleküler anormalliklerden dolayı HCC’yi hedefleyen monoklonal antikorlar ve çoklu kinaz inhibitörleri gibi spesifik küçük molekül inhibitörleri klinik kullanım için araştırmaların odak noktasıdır. HCC’de ilk basamak tedavisinde kullanılan çoklu-kinaz inhibitörleri sorafenib ve lenvatinib’tir. İkinci basamakta ise regorafenib ve 2019’da FDA tarafından onaylanan cobazantinib yer almaktadır [6].

Bu bilgiler doğrultusunda, bu tez kapsamında PLXNC1 ifadesinin HCC hücrelerinin çoklu kinaz inhibitörlerine yanıtındaki etkisi hücre döngüsü, proliferasyon, apoptoz, hücre migrasyon ve invazyon deneyleri ile araştırıldı.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Önerilen bu tez çalışması kapsamında, Prof. Dr. Tamer YAĞCI yürütücülüğünde karaciğer kanseri hücrelerinde PLEXINC1 ifadesinin çoklu-kinaz inhibitör yanıtına etkisinin *in vitro* araştırılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında, hepatoselüler karsinomadan geliştirilen ve epitel fenotipe sahip PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre hatlarının Plexin C1’in susturulduğu shPLXNC1 ve kontrol shPLKO hücre klonları kullanıldı. İlk olarak xCELLigence RTCA MP sistemi kullanıldığı hücre proliferasyon deneyleri gerçekleştirilerek klonların proliferasyon düzeyleri karşılaştırıldı. Aynı klonlarda hücre döngüsü Plexin C1 varlığı ve yokluğunda PI kullanılarak akım sitometrisinde incelendi. Ardından, klonların migrasyon ve invazyon kapasitelerini test etmek için Trans-well migrasyon-invazyon assay yöntemi kullanıldı. Plexin C1’in hücrelerin anoikise direnci üzerindeki etkisi ise düşük yapışma kapasiteli plaklarda büyütülen hücreler AnnexinV-7AAD ile boyanarak akım sitometrisinde saptandı.

PLEXINC1’in HCC hücrelerinde çoklu-kinaz inhibitörlerine yanıtındaki etkisi, Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib uygulanan hücre klonlarında proliferasyon çalışmaları ile gerçekleştirildi ve IC₅₀ değerleri belirlendi. Bu inhibitörlerin kontrol pLKO klonları için belirlenen IC₅₀ değerleri PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarına uygulanarak hücrelerin apoptoz yanıtı Western blot analizi ile PARP kesimi üzerinden incelendi. Apoptoz yanıtı PARP kesimi analizinin yanında akım sitometresi kullanılarak mitokondriyal membran geçirgenliğini gösteren TMRE

(tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate) ve AnnexinV-7AAD boyamaları ile de değerdendirildi.

Bu tez çalışması sonucunda, Plexin C1'in baskılandığı HCC hücrelerinin çoklu-kinaz inhibitörlerine karşı direnç gösterdiği saptandığından, Plexin C1'in HCC'de kinaz inhibitörlerinin uygulanmasında potansiyel bir moleküler belirteç olarak kullanılabilmesinin ön verileri oluşturulmuştur.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Kanser

Kanser, 2020'de yaklaşık 10 milyondan fazla insanın ölümüne sebep olan ölüme sebep olan en önemli sağlık problemlerinden biridir. Kanser tanımıyla ilgili özelliklerinden biri, olağan sınırlarının ötesinde büyüyen ve daha sonra vücudun diğer doku ve organlarına yayılabilen anormal hücrelerin hızlı bir şekilde çoğalmasıdır; ikinci süreç metastaz olarak adlandırılır. Özellikle yaygın metastazlar kanserde ölümün birincil nedenidir [1].

Kanser, genellikle kanser öncesi bir lezyondan kötü huylu bir tümöre ilerleyen çok aşamalı bir süreçte normal hücrelerin tümör hücrelerine dönüşmesiyle ortaya çıkar. Bu değişiklikler, kişinin genetik faktörleri ile ultraviyole ve iyonlaştırıcı radyasyon gibi fiziksel kanserojenler, tütün dumanı bileşenleri, alkol, afla toksin, arsenik gibi kimyasal kanserojenler ve belirli virüs, bakteri veya parazitler gibi biyolojik kanserojenlerden dolayı olmaktadır [7].

100'den fazla kanser türü vardır ve meydana geldikleri organa veya doku türüne göre kategoriler halinde gruplandırılıp adlandırılır. Bunlardan en yaygınları karsinoma (epitel dokusundan köken alır), sarkoma (bağ dokusundan köken alır), lösemi (kemik iliği gibi kan hücrelerini oluşturan dokularda ortaya çıkar ve çok sayıda kan hücresinin üretilip kan dolaşımına girmesine neden olur), lenfoma ile miyelom (kökenleri bağışıklık sistemi hücrelerindedir) ve merkezi sinir sistemi kanserleridir (beyin ve omurilik dokularında başlar) [1, 7].

2.1.1. Kanserinin Ayırt Edici Özellikleri

Kanser hücreleri, altı benzersiz özellik ile normal hücrelerden ayırt edilebilir. Bunlar;

- H-Ras gibi ongenlerin aktive edici mutasyonları nedeniyle kalıcı büyüme sinyali oluşur [8].
- Retinoblastoma gibi tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar nedeniyle hücre bölünmesinin kontrolü ortadan kalkar. Retinoblastoma proteini, neoplazm ilerlemesini baskılar, böylece bu protein yokluğunda tümör sürekli olarak büyümeye devam eder [9].

- İnsülin-benzeri büyüme faktörleri (IGF'ler) üreterek programlanmış hücre ölümüne (apoptoz) karşı direnç kazanır [10].
- Kanser hücreleri telomeraz aktivitesini uyararak sonsuz replikasyon yeteneğini artırır ve sürekli olarak çoğalırlar [11].
- Vasküler endotelyal büyüme faktörünü (VEGF) uyararak kan damarı oluşumunu sağlarlar. Böylece yeni kan damarı, hücrenin sürekli bölünmesi için gereken besinleri ve uygun faktörleri sağlar [12].
- Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) programını aktive ederek hücreler arası kadherin bağlarının devre dışı kalmasını ve bu şekilde vücuttaki komşu dokuların istilasını ile uzak organlarda metastaza neden olur [13, 14].

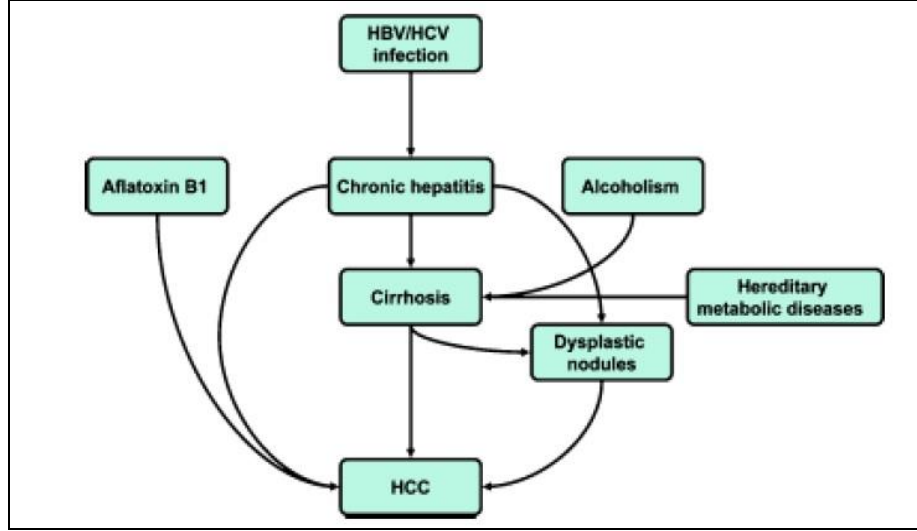
2.2. Hepatosellüler Karsinom

Karaciğer kanseri en yaygın beşinci kanser türüdür ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerde dördüncü önde gelen kanserdir. Erkeklerde en sık görülen dördüncü kanser ve erkeklerde ikinci kansere bağlı ölüm nedenidir. Erkeklerde karaciğer kanseri gelişme riski kadınlara kıyasla daha yüksektir. Kadınlarda dokuzuncu en yaygın kanser türü olmasına rağmen, kansere bağlı ölümlerde yüksek ölüm oranıyla dördüncüdür. Erkeklerin kadınlara küresel HCC insidans oranı 2,8:1'dir [15].

İki ana birincil karaciğer kanser türü vardır. Daha az sıklıkta görülen intrahepatik kolanjiokarsinom (ICC), anjiyosarkom, hemanjiyosarkom ve hepatoblastom dışında parankimal hepatositlerden kaynaklanan hepatosellüler karsinoma (HCC) dünya çapında birincil karaciğer kanseri vakalarının %80'inden fazlasını oluşturmaktadır.

İkincil karaciğer kanseri ise vücudun başka bir bölümünde çıkan tümörün karaciğere metastaz yapması ile oluşmaktadır. Meme, yemek borusu, mide, pankreas, böbrek, akciğer ve diğer bazı kanserler karaciğere metastaz yapabilir. Ancak, genellikle çoğu ikincil karaciğer kanserlerinin %70'i kolorektal kanserden kaynaklanmaktadır [16].

HCC'ye yol açan başlıca etmenler arasında Hepatit B ve C virüsleri, nemli ortamda stoklanan besinler aracılığıyla aflatoksin intoksikasyonuna maruz kalma, alkolik olmayan karaciğer yağlanması (NASH) ve aşırı alkol tüketimi yer almaktadır (Şekil 2.1). Bu etmenlerin yol açtığı inflamasyon ve bunun zemininde gelişen hücre proliferasyonu ve ölümü döngüsü hepatositlerde mutasyonların birikimine yol açarak HCC gelişimine zemin hazırlamaktadır [2, 17].



Şekil 2.1: Hepatokarsinogenez oluşumu.

Belirtilen etmenler dışında primer (hereditör) veya sekonder hemokromatozis gibi kronik karaciğer hasarına bir yanıt olarak gelişen karaciğer sirozu da HCC gelişimi için oldukça elverişli bir ortam yaratmaktadır. HCC BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) evrelendirme sistemine göre 5 evrede ele alınmaktadır.

- Evre 0: Çok erken evre
- Evre A: Erken evre
- Evre B: Orta evre
- Evre C: İleri evre
- Evre D: Terminal evre, ağır karaciğer hasarı

0-B evrelerindeki HCC hastaları için tümör rezeksiyonu, karaciğer transplantasyonu, trans-arteriyel kemoembolizasyonu (TACE), trans-arteriyel radyoembolizasyonu, radyofrekans ablasyonu gibi tedavi seçenekleri bulunmakta ve bu hastalarda 5 yıllık sağkalım %70'lere ulaşabilmektedir. Ne var ki, HCC olgularının büyük çoğunluğu kanserin ileri evresinde (Evre C) teşhis edilmekte ve tümör boyutu ve damar invazyonu gibi nedenlere bağlı olarak belirtilen erken tedavi seçenekleri uygulanamamaktadır [18, 19].

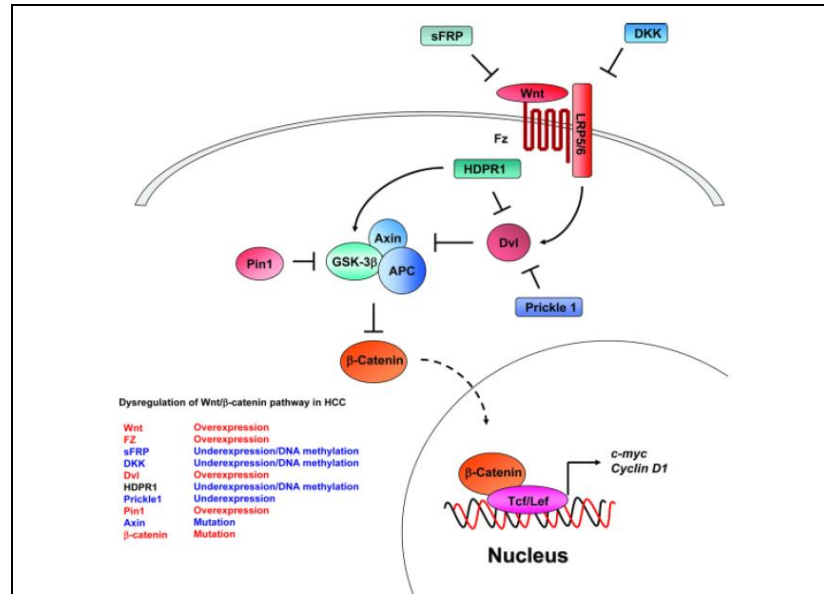
HCC'deki genetik değişikliklerle ilgili de çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, hastalığın tanısı genellikle ileri evrelerde konulabilmekte ve tedavi

seçeneklerinin sınırlılığı nedeniyle ileri evre HCC hastaları ortalama 8 aylık sağkalım değerleri ile kötü bir prognoz göstermektedir [15].

2.2.1. HCC’de Rol Oynayan Sinyal Yolakları

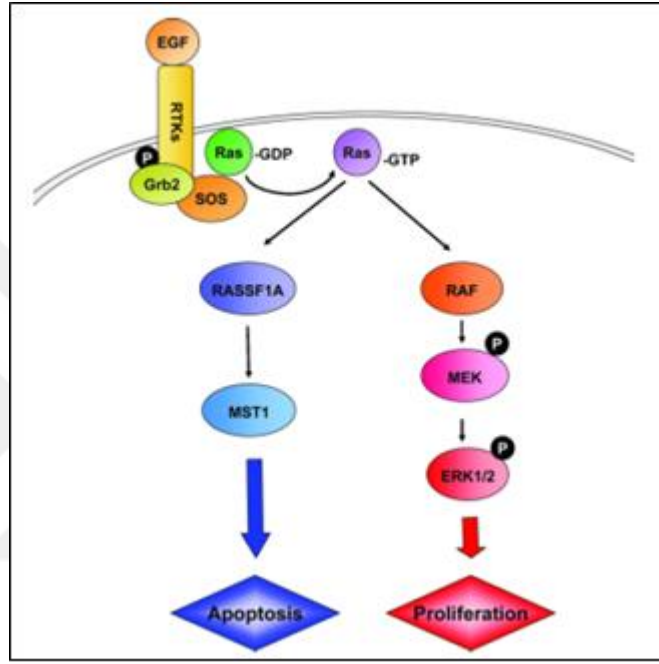
Wnt/ β -katenin, Akt/mTOR, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü ve endotelial büyüme faktörü reseptörü/RAS/MAPK yolakları dahil olmak üzere birçok moleküler yolak HCC karsinogenezinde rol oynar. Hüresel onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu bu sinyal yolaklarının dereglasyonuna sebep olur. Bu yolakların uyarılması başlıca olarak, ligand bağlanması üzerine aktive olan reseptör tirozin kinazlara (RTK’ler) bağlıdır [20] .

Wnt/ β -katenin sinyal yolakları embriyonik gelişimde, hücre proliferasyonunda, hücre morfolojisinde ve hareketinde önemli role sahiptir. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivasyonu hem HCC hem de diğer kanser türleriyle ilişkilidir. HCC vakalarında Wnt ligandının aşırı ifadesi görülmektedir. Bu sinyal yolağının aktivasyonu c-Myc ve siklin D1’in ekspresyonuna sebep olmaktadır (şekil 2.2) [2, 20].



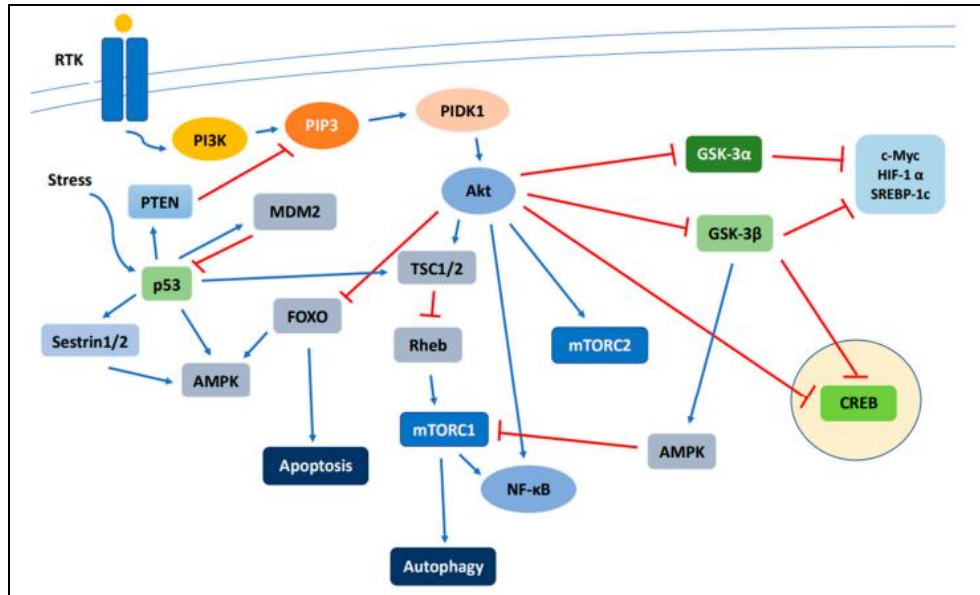
şekil 2.2: Viral enfeksiyon ve diğer çevresel faktörlerin etkisiyle Wnt sinyal yolağı aktivasyonu çeşitli proto-onkogenlerin ekspresyonuna sebep olur [2].

N-Ras, H-Ras ve K-Ras'dan oluşan Ras proteinleri insan kanser türlerinde en iyi karakterize edilmiş proto-onkogenlerdir. HCC olgularında aşırı ifade edilen Ras onko-genine bağlı sinyal iletiminin hücre büyümesi, hücre sağkalımı ve göçü gibi birçok hücresel fonksiyonda rol aldığı bilinmektedir (Şekil 2.3). Aynı zamanda bazı çalışmalarda, Ras sinyalinin hücre yaşlanmasını ve ölümünü de indüklediği göstermiştir [2, 21]



Şekil 2.3: Ras Sinyal Yolağı. Ras yolağının aktivasyonu hem proliferasyonu hem de apoptozu düzenler. EGF, epidermal büyüme faktörü: RTK'lar, reseptör tirozin kinazlar: Grb2, büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2: RASFF1, Ras-ilişkili ailesi 1 proteinleri: MTS1, memeli steril 20-benzeri kinaz 1 [2, 20]

PI3K/Akt/mTOR bir hücre içi sinyal iletim yoludur ve birçok kanser türünde reseptör tirozin kinazların etkisiyle yukarı ve aşağı moleküllerle iletişim kurarak hücre döngüsü, hücre proliferasyonu, apoptoz, metabolizma ve anjiyogenezin düzenlenmesinde rol oynar (Şekil 2.4). HCC vakalarının yaklaşık %50'sinde PI3K/Akt/mTOR yolağının anormal şekilde aktive olduğu çalışmalarda belirtilmiştir [22].

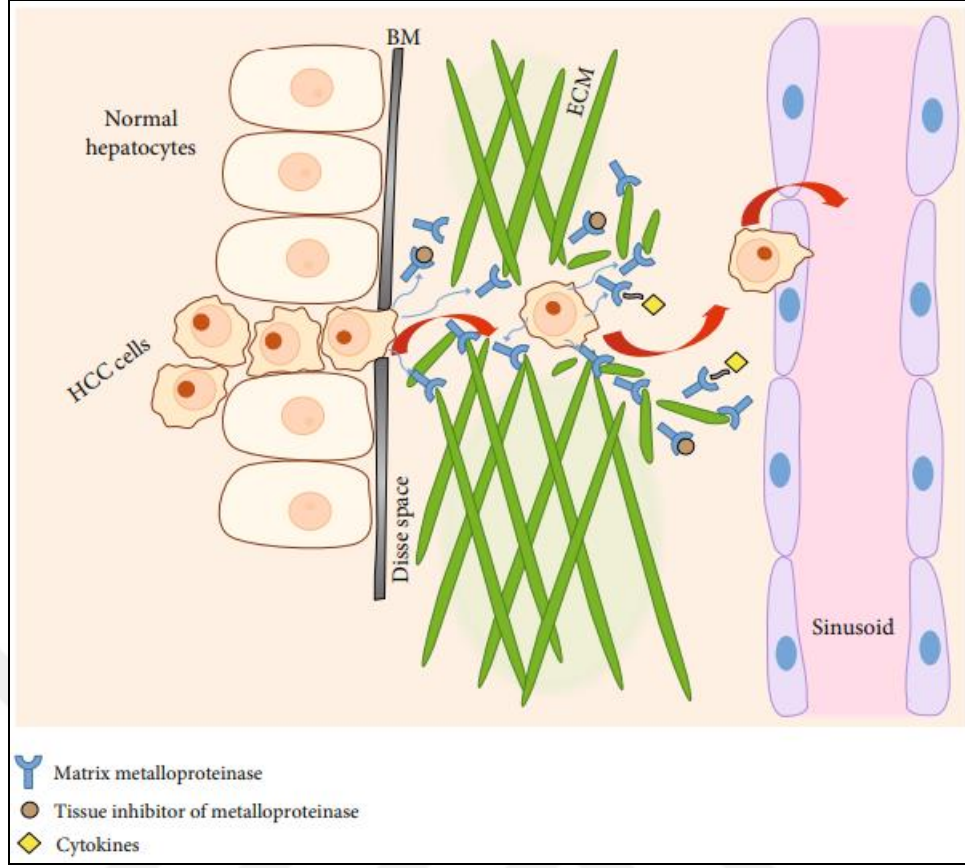


Şekil 2.4: PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı. RTK'nın bir ligand tarafından aktivasyonu PI3K yolağını aktive eder. PI3K, fosfatidilinositol 3-kinaz: PIP3, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat: PDK1, 3-fosfoinositide bağımlı protein kinaz 1: Akt, Akt protein kinaz B: GSK-3, glikojen sentaz kinaz-3: c-Myc, hücresel Myc: PTEN, fosfataz ve tensin homoloğu [5].

2.2.2. HCC’de Rol Oynayan Genetik Değişiklikler

hTERT promotörü, p53 ve β -katenin gibi genlerin mutasyonları HCC’de en sık rastlanılan genetik değişikliklerdir. Bazı çalışmalar, HCC örneklerinde, hücre proliferasyon ve mitoz ile ilgili genlerin ekspresyonunun arttığını ancak karaciğere özgü farklılaşmış hepatositlerde bulunan gen ifadelerinin ise ekspresyonunun azaldığını göstermiştir. Aynı zamanda, vasküler invazyon fenotipine sahip HCC örneklerinde hücre hareketini düzenleyen MMP’ler ve RhoC gibi genlerde de ekspresyon seviyelerinin arttığı gözlenmiştir [23].

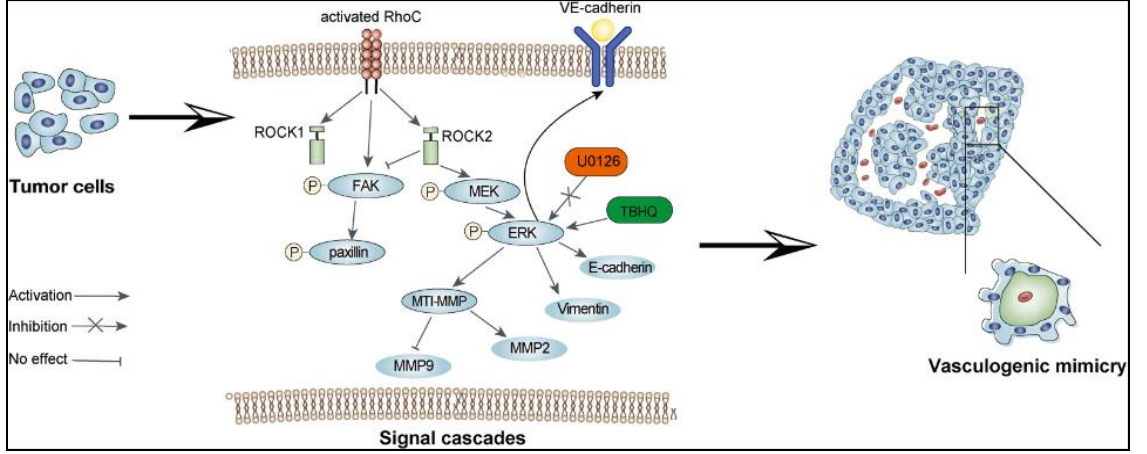
Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) hücre dışı matriksi (ECM) parçalayarak kanserli hücrelerin invazyonunda rol oynamaktadır (Şekil 2.5). Hücre yapışma moleküllerinin (E-cadherin, CD44, α v integrin) veya büyüme faktörü reseptörlerinin (FGF reseptörü 1, EGF reseptör ailesi HER2 ve HER4, c-met) MMP'ye bağlı proteolizi gerçekleşir ve ECM parçalanır [24] .



Şekil 2.5: Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) hücre dışı matrisi (ECM) parçalar ve çeşitli sitokinleri aktive ederek HCC hücrelerinin bazal membran (BM) ve Disse boşluğu yoluyla lokal invazyonu kolaylaştırır.

Çok sayıda tümöral ve tümöral olmayan in vitro sistemlerde ve ayrıca tümör biyopsilerinde ve gelişim modellerinde in vivo olarak gösterildiği gibi, MMP'lerin (ve özellikle MT1-MMP'nin) ifadesi açıkça epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) sürecinin bir parçasıdır [3].

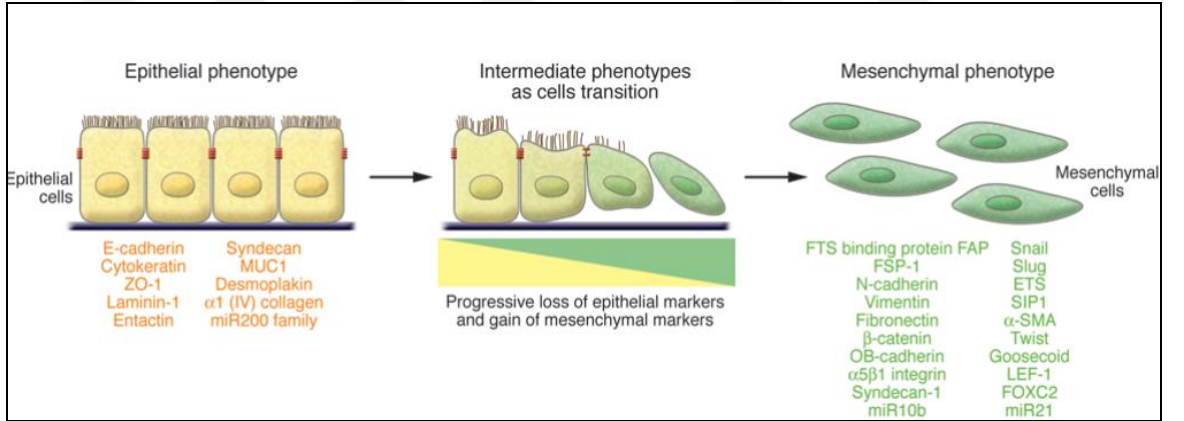
RhoC proteinleri ise HCC vakalarındaki aşırı ifadesinden dolayı tümör invazyonunu ve metastazını arttırmaktadır. Diğer çalışmalarda, yüksek düzeyde aktive edilmiş RhoC/ROCK2'nin MMP-2 ekspresyonunu arttırarak ERK/MMP sinyallini tetiklediği ve böylece EMT aktivasyonunu sağladığı bildirilmiştir (Şekil 2.6) [3, 25].



Şekil 2.6: Yüksek düzeyde aktif RhoC/ROCK2 sonucu VE-kadherin ve MMP2 ifadesini artırır. Böylece ERK/MMP sinyalleşmesini aktive ederek EMT (epitelyal mezenkimal geçiş) oluşumunu artırır.

2.2.3. Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMT)

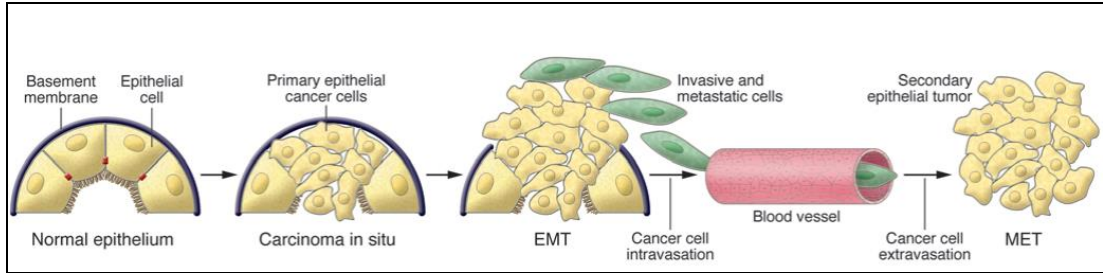
Epitelden-mezenkimal geçiş (EMT), epitelyal özelliklerin kaybı ve hücrelerinde mezenkimal özellikleri kazanması ile tanımlanmaktadır (Şekil 2.7) [3].



Şekil 2.7: Epitel hücrelerin mezenkimal hücrelere dönüşümü.

EMT, embriyolojik ve yetişkin gelişiminde fizyolojik bir role sahiptir. Ancak, buna ek olarak, EMT sürecinin metastaz, epitelyal tümör hücrelerinin göç etme özelliği kazanması ve ikincil organlara yayılma gibi durumlarda etkili olduğu gösterildi (Şekil 2.8). MMP'lerin düzenlenmesinde yer alan bazı transkripsiyon faktörleri (SNAIL, ETS, β-katenin) EMT aktivasyonunu düzenlemektedir. Aynı

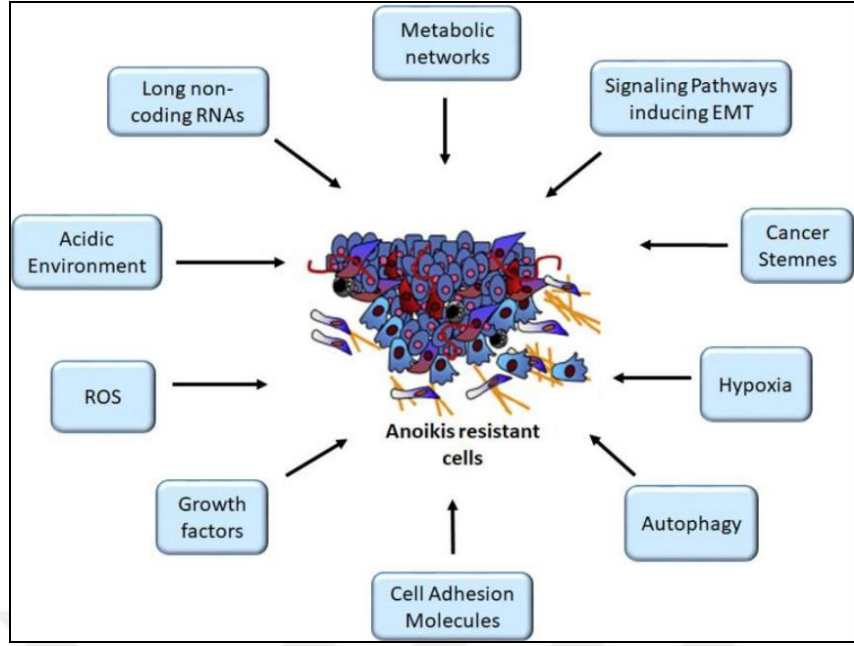
zamanda, EMT kontrolünde ve EMT hedef genlerinin düzenlenmesinde Ras, MAPK, PIP3K, Rho, Rac ve Src gibi sinyal yolları görev almaktadır [3, 26].



Şekil 2.8: EMT'nin kanser ilerlemesine katkısı. İnvaziv karsinom aşaması, epitel hücrelerinin polaritelerini kaybetmesi ve bazal membrandan ayrılmasını içerir. Bazal membranın içeriği de değişir. Böylece hücre-ECM etkileşimlerini ve sinyal ağlarını değiştirerek kanser hücrelerinin dolaşıma girmesini ve metastazını kolaylaştırır.

2.2.4. Anoikis Direnci

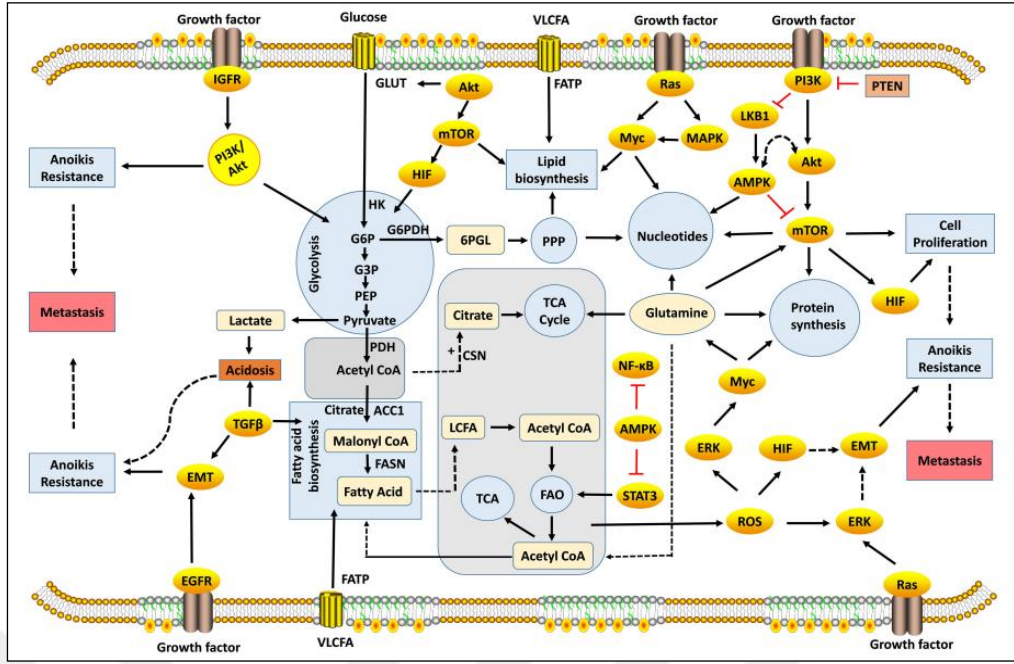
Hücre-hücre veya hücre-ECM bağlanmasındaki bozulma, 'anoikis' olarak adlandırılan bir tür programlı hücre ölümüdür. Anoikis, fizyolojik veya patolojik koşullar altında yanlış yerleşmiş veya ayrılmış hücrelerin ortadan kaldırılması için doku homeostazını destekleyen bir mekanizmadır. Kanser hücrelerindeki anoikis, hücrelerin diğer bölgelere metastazını geciktirir ancak genellikle kanser hücreleri anoikise direnç kazanır ve invaziv hale gelirler. Kanser hücreleri, anoikisi ortadan kaldırmak için çeşitli mekanizmalar kullanırlar (Şekil 2.9). Bu değişiklikler hücre göçünü etki eden mekanizmaları destekler. Hücresel asidoz ve kanser hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumundaki değişiklikler anoikis direncini arttırmaktadır. Bu değişiklikler, proliferasyon ve göç etmeye yol açan hayatta kalma yollarını indükleyen onkojenik sinyalleri çoğaltır [27].



Şekil 2.9: Anoikis mekanizmasının değişmesine yol açan faktörler.

Literatürdeki bir çalışmada, PI3K/Akt'nin yüksek aktivitesinin kanser invazivliğini arttırdığı ve osteosarkomda anoikis direnci ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Başka bir çalışmada ise, caveolin 1 ile PI3K/Akt yolunun ve RAF/MEK/ERK aktivasyonu nedeniyle IGF1R'ın aşırı ifade edilerek HCC'de anoikis direncini sağladığı gösterilmiştir [22, 27].

Hücrelerin ECM'den ayrılması metabolik değişikliklere de bağlıdır (Şekil 2.10). Kanser hücreleri, piruvat elde etmek için normal glikoz oksidasyon yolunu birleştirebilir ve aerobik glikoz kullanabilir, bu sayede laktat üretimi için glikoz alımında artış olur. Bu duruma da 'Warburg Etkisi' denir. Her iki yoldan da glikoz oksidasyonu, kanser hücreleri tarafından ROS üretimini en aza indirmek için ATP sağlar. Böylece PPP yoluyla artan glikoz alımı ve artan ATP üretimi kanserli hücrenin anoikis direnci kazanmasını ve hayatta kalmasını sağlamaktadır. Glikoza ek olarak, hücre büyümesi ve anoikis direnci için önemli değere sahip diğer biyomoleküller arasında proteinler, lipidler ve nükleotidler bulunur [27-29].

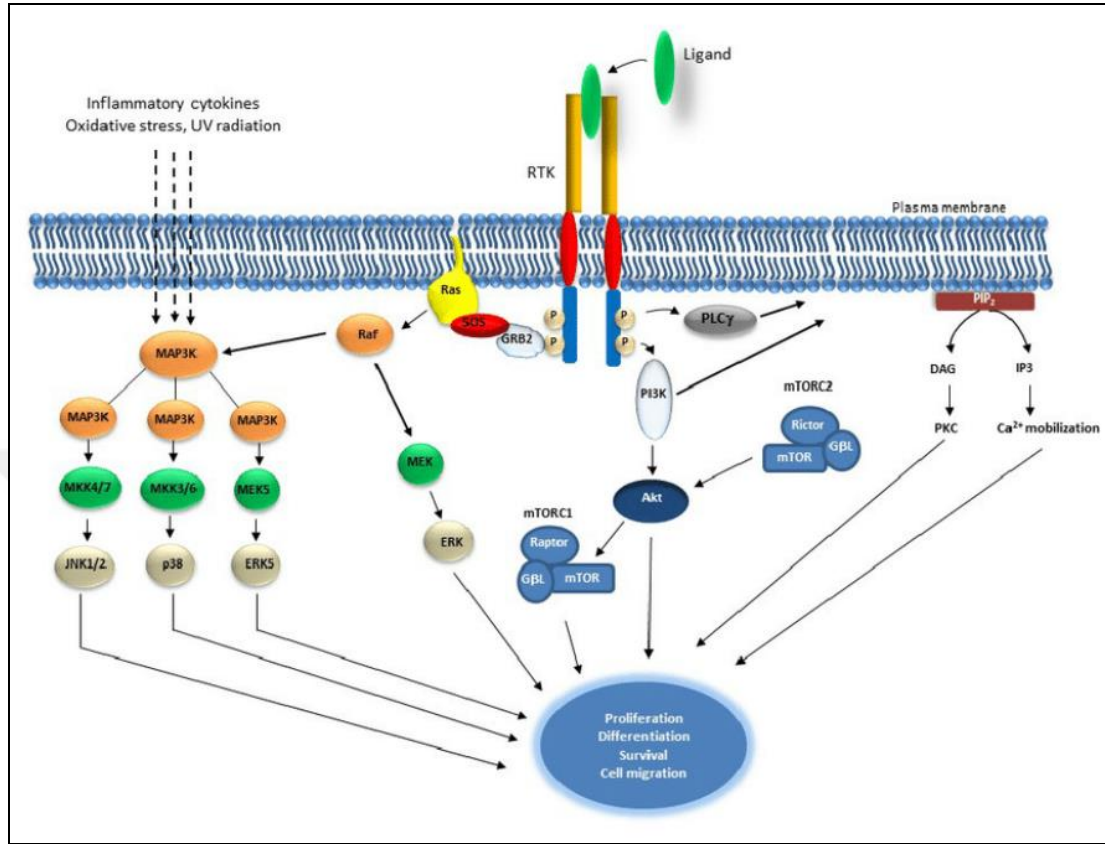


Şekil 2.10: Anoikis direnç mekanizmasında yer alan metabolik ve sinyal ağları.

2.3. Reseptör Tirozin Kinazlar

Reseptör tirozin kinazlar birçok polipeptit büyüme faktörü, sitokin ve hormon için yüksek afiniteye sahip hücre yüzey reseptörleridir. İnsan genomunda tanımlanan 90 tirozin kinaz geninin 58 tanesi reseptör tirozin kinaz proteinlerini kodlar. RTK'lar birkaç alt aile içerir; epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR), fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR), insülin ve insülin benzeri büyüme faktörleri reseptörü (IGFR), trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleri (VEGFR), hepatosit büyüme faktörü reseptörleri (HGFR) ve sinir büyüme faktörü reseptörleri (NGFR). Reseptör tirozin kinazlar, hücre büyümesi, hareketi ve farklılaşması gibi birçok süreçte önemli rol oynayan reseptör tirozin kinazlar birçok kanser türünün gelişmesinde ve ilerlemesinde kritik bir role sahiptir [5, 30]. Çeşitli yollarla, hücre dışı ligand bağlanması reseptör dimerizasyonuna ve stabilizasyonuna neden olur. Bu, her reseptör monomerinin sitoplazmik kısmındaki bir tirozinin, partneri tarafından tarafından *trans*- fosforile edilmesini ve plazma zarı boyunca bir sinyalin yayılmasını sağlar. Aktive edilmiş reseptör içindeki spesifik tirozin fosforilasyonu, Src homoloji 2 (SH2) alanı ve fosfotirozin bağlayıcı (PTB) alanı içeren proteinler için bağlanma bölgeleri oluşturur. Bu alanları içeren spesifik proteinler arasında Src ve fosfolipaz

C bulunur. Bu iki proteinin reseptöre bağlanarak fosforilasyonu ve aktivasyonu, sinyal iletim yollarının başlamasına yol açar[31].



Şekil 2.11: Reseptör Tirozin Kinazın ve ona bağlı sinyal yollarının gösterimi. RTK'lar, ligand bağlanması üzerine oto-fosforile edilir, bu da Ras aktivasyonu serin/treonin kinaz Raf indüksiyonu ile sonuçlanır. Bunun gibi diğer sinyal yollarının aktivasyonuna sebep olarak çoğalma, farklılaşma, hayatta kalma ve hücre göçünde önemli bir rol oynar.

Özellikle kanser türlerinde gerçekleşen anormal RTK aktivasyonuna dört ana mekanizma aracılık eder; fonksiyon kazanımı mutasyonları (gain-of-functions mutations), genomik amplifikasyonlar, kromozomal yeniden düzenlemeler ve otokrin aktivasyonu. Bu nedenle, RTK'lar, kanserle beraber dejeneratif hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hücresel anormalliklerdeki etkileri nedeniyle ilaç tedavisi için çekici bir hedef haline gelmiştir. ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından RTK'ların rol aldığı kanser, dejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar için geliştirilen bazı ilaçlar onaylanmıştır (Tablo 2.1). Hücre dışı alanı veya katalitik alanı hedeflemek için geliştirilen ilaçlar, ligand bağlanmasını ve reseptör oligomerizasyonunu inhibe eder (Şekil 2.11) [5, 8].

Tablo 2.1: FDA tarafından onaylanmış kanser tedavisi için RTK'lara karşı geliştirilen küçük molekül inhibitörleri ve monoklonal antikorlardan bazıları gösterilmektedir.

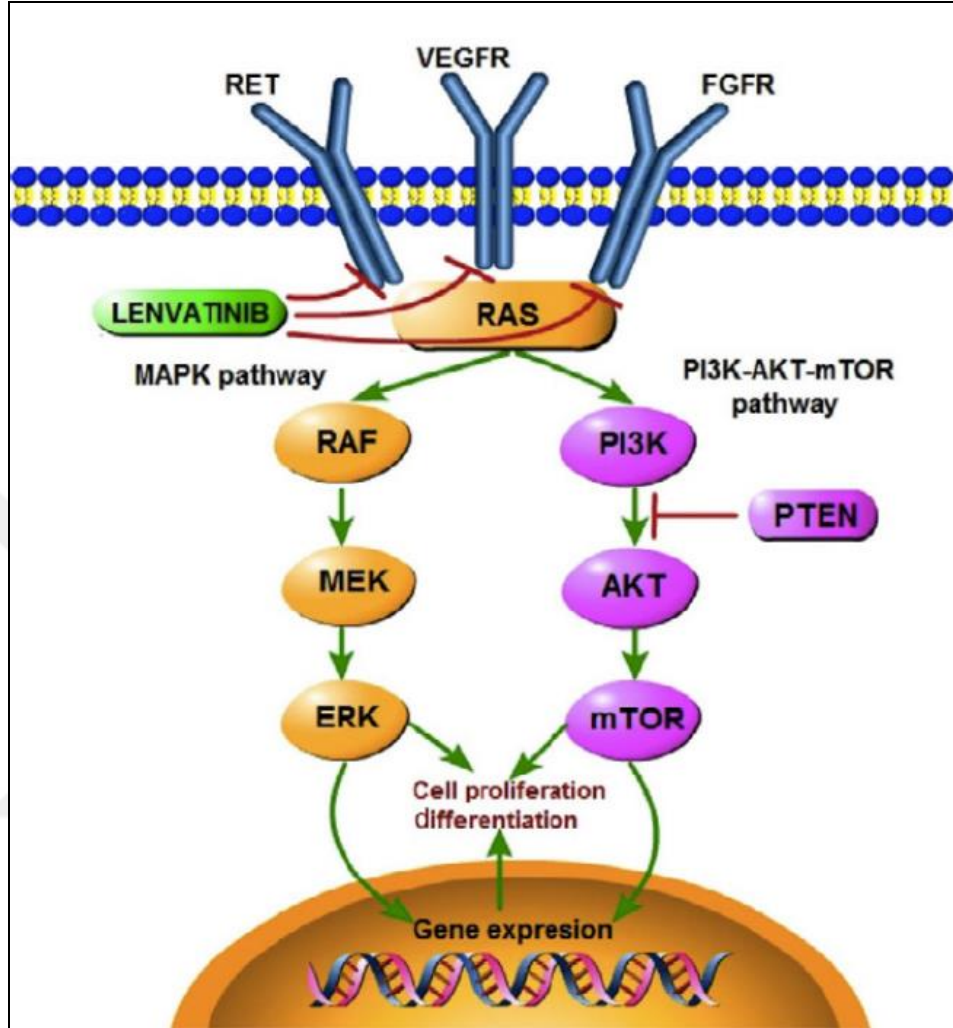
Small Molecule	Mab	Target	Disease	Year of approval
Imatinib (Gleevec)		PDGFR, KIT, Abl, Arg	CML, GIST	2001
Gefitinib (Iressa)		EGFR	Esophageal cancer, Glioma	2003
Erlotinib (Tarceva)		EGFR	Esophageal cancer, Glioma	2004
Sorafenib (Nexavar)		Raf, VEGFR, PDGFR, Flt3, KIT	Renal cell carcinoma	2005
Sunitinib (Sutent)		KIT, VEGFR, PDGFR, Flt3	Renal cell carcinoma, GIST, Endocrine pancreatic cancer	2006
Dasatinib (Sprycel)		Abl, Arg, KIT, PDGFR, Src	Gleevec-resistant CML	2007
Nilotinib (Tasigna)		Abl, Arg, KIT, PDGFR	Gleevec-resistant CML	2007
Lapatinib (Tykerb)		EGFR, ErbB2	Mammary carcinoma	2007
Trastuzumab (Herceptin)		ErbB2	Mammary carcinoma	1998
Cetuximab (Erbix)		EGFR	Colorectal cancer, Head and neck cancer	2004
Bevacizumab (Avastin)		VEGF	Lung cancer, Colorectal cancer	2004
Panitumumab (Vectibix)		EGFR	Colorectal cancer	2006

2.4. Reseptör Tirozin Kinaz İnhibitörleri

HCC'de gelişen moleküler anormalliklerden dolayı HCC büyümesini kısıtlamak için spesifik küçük molekül inhibitörleri klinik kullanım için araştırmaların odak noktasıdır [6].

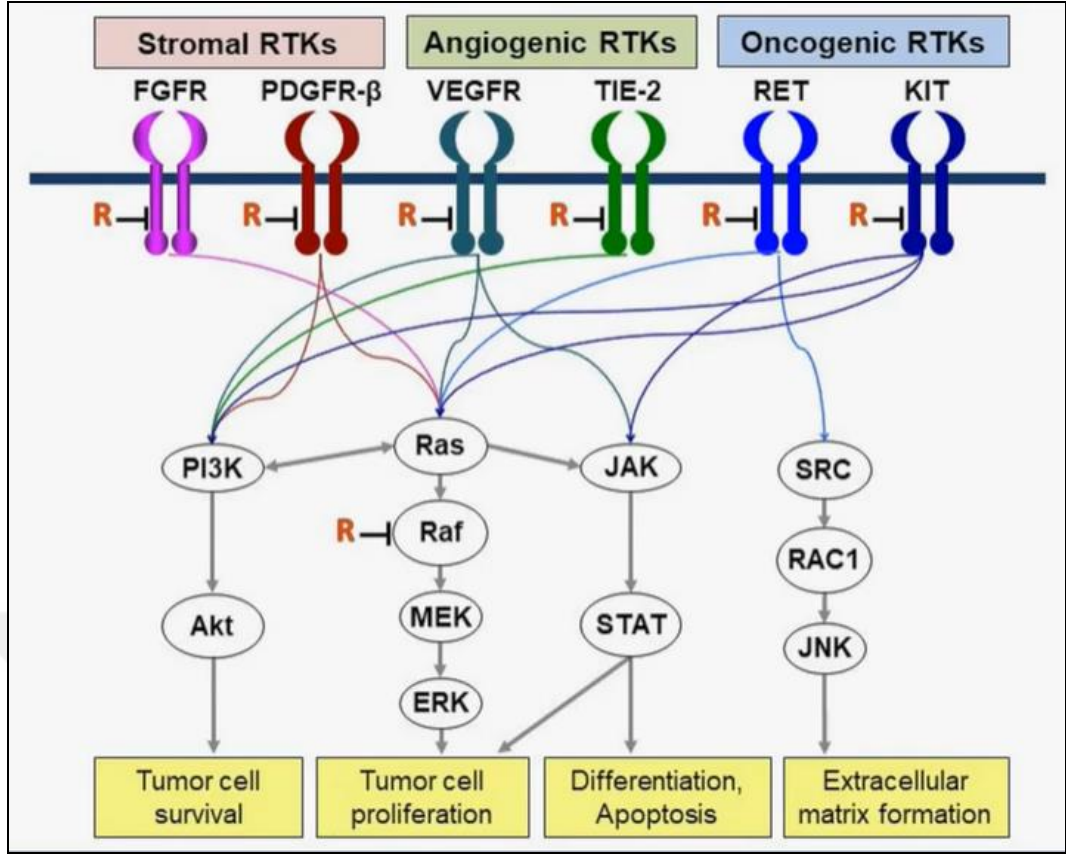
İlk olarak 2008 yılında onaylanan ve uygulanan çoklu-kinaz inhibitörü Sorafenib, hücre yüzey reseptörleri PDGFR, VEGFR, c-KIT, Flt3 ve MAPK/Erk yolağının kilit molekülü olan Raf-1' hedef almaktadır (Şekil 2.12). Sorafenib tedavisi, B-raf'ı hedef alarak tümör büyümesini baskılayan otofajiye neden olur ve hastalardaki sağkalım süresini ortalama 3 ay uzatarak ileri evre kanserde 9 aylık bir sağkalımı sağlamıştır [32, 33].

Tedavi seçenekleri arasına katılmış lenvatinib sorafenibe oranla ortalama 1,5 ay daha fazla sağkalım elde edilmiştir [34].



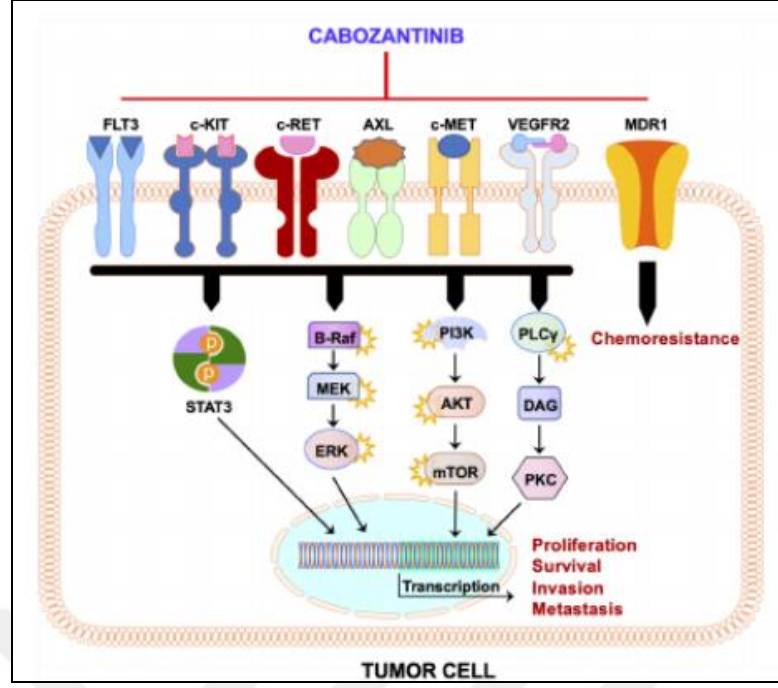
Şekil 2.13: Lenvatinib'in etki ettiği moleküler mekanizma [35].

Ancak, ileri evre olguları için birinci tedavi seçeneği olarak ele alınan sorafenib ve lenvatinib'e karşı hastalarda direnç geliştiği saptanmış ve bu olgularda ikinci basamak tedavisi olarak VEGFR (1-3), PDGFR- β , FGFR1, c-Kit, RET, c-RAF, BRAF, BRAFV600E ve TIE-2'i hedef alan bir diğer çoklu-kinaz inhibitörü Regorafenib uygulanmaktadır (Şekil 2.14). 1. ve 2. basamak tedavilerinin bileşkesi olarak ileri evre olgularda ortalama 3 ay daha fazla (7.8'den 10.6'ya) sağkalım değerlerine ulaşılabilmektedir [36].



Şekil 2.14: Regorafenib'in etki mekanizması.

İkinci basamak tedavisi olarak HCC'de kullanılan 2019'da FDA tarafından onaylanmış cabozantinib, MET (hepatosit büyüme faktörü reseptör proteini) ve VEGF reseptörlerinin inhibitörüdür. Ayrıca cabozantinib, GAS6 reseptörü (AXL), RET, ROS1, TYRO3, MER, kök hücre faktör reseptörü (KIT), TRKB, Fms benzeri tirozin kinaz-3 (FLT3) ve TIE-2 dahil olmak üzere diğer tirozin kinazları inhibe eder (Şekil 2.15) [37].

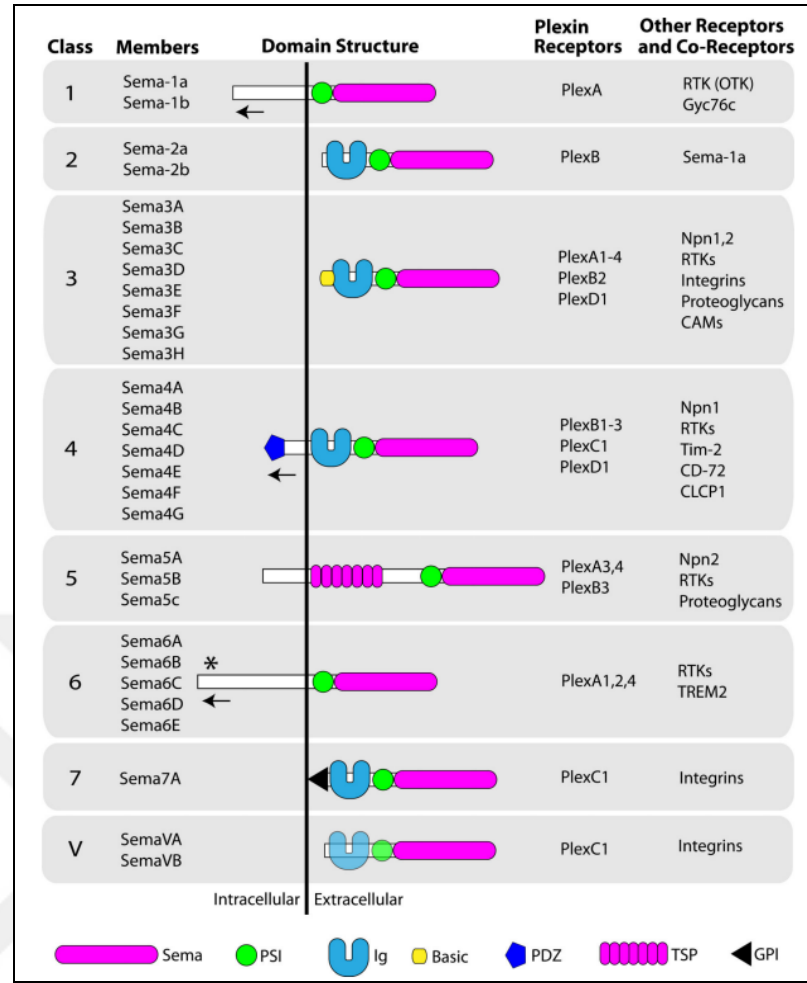


Şekil 2.15: Cabozantinib etki mekanizması.

2.5. PLEXIN AİLESİ

Plexinler semaforin sinyal proteinleri ailesi için reseptör görevi gören proteinlerdir. Pleksinler farklı doku tiplerindeki ifadelerine bağlı olarak gelişim üzerinde değişen etkilere sahiptir. Pleksin reseptörlerinin nöral gelişim ve akson büyümesi, anjiyogenez ve kalp gelişimi, iskelet ve böbrek morfogenezi ve bağışıklık sisteminde etkileri vardır. Pleksin sinyal yolundaki anormallikler nörolojik hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere birçok hastalık gelişiminde rol oynar. Pleksinler yapı ve homolojiye göre dört alt sınıfa ayrılırlar (Şekil 2.16) [38, 39].

- A Sınıfı: PLXNA1 , PLXNA2 , PLXNA3 , PLXNA4A
- B Sınıfı: PLXNB1 , PLXNB2 , PLXNB3
- C Sınıfı: *PLXNC1*
- D Sınıfı: PLXND1



Şekil 2.16: Semaforin protein ailesi üyeleri domain yapılarına göre 8 sınıfa ayrılırlar. Farklı plexin reseptörleri farklı semaforin sınıfları ile etkileşim kurarak sinyalleşmeyi başlatırlar. Bir dizi zarla ilişkili reseptörler (membrane-associated receptors) ve yardımcı reseptörler (co-receptors) de sema sinyal transdüksiyonu için önemlidir. Bu proteinler doğrudan semaya bağlanır ve sinyalleşmeyi başlatırlar (örn., integrinler).

Ligand bağlayıcı yardımcı reseptörler olarak işlev görür (örn., Npn1,2) veya multimerik reseptör kompleksinin bir parçası olarak çalışır (örn., RTK'lar). Sema (semaphorin domain), PSI (plexin-semaphorin-integrin domain), Ig (immunoglobulin domain), Basic (basic domain), PDZ (PDZ domain), TSP (Thrombospondin domain), GPI (glycosylphosphatidylinositol linkage), RTK (receptor tyrosine kinase), Npn1 (Neuropilin 1), Npn2 (Neuropilin 2), CAM (cell adhesion molecule) Tim-2 (T-cell Ig and mucin domain containing protein 2), CD72 (B cell differentiation antigen CD72), CLCP1 (CUB, LCCL-homology, Coagulation factor V/VIII homology domains protein 1), TREM2 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2).

2.5.1. PLXNC1

PLXNC1 ise ilk olarak Vaccinia Virüsü kökenli viral semaforin A39R'nin reseptörü olarak keşfedilmiştir ve VESPR (Virus encoded Semaphorin Protein

Receptor) olarak adlandırılmıştır. GPI-bağlı bir semaforin olan SEMA7A, Plexin C1'in viral olmayan ligandı olup her iki protein bir arada nöral gelişimde rol almaktadır. Bunun yanı sıra SEMA7A, Plexin C1'den bağımsız olarak β 1-integrine bağlanarak nöral gelişim, immün yanıt düzenlenmesi ve kanser invazyon ve metastazında görev almaktadır. Pleksinlerin hücre içi alanı, içsel bir Ras-GTPaz aktive edici (GAP) alanı içerir, bu da M-Ras ve R-Ras üzerinde GDP için GTP değişimine neden olur. Yakın dönemdeki çalışmalar, Plexin reseptörlerinin özellikle Plexin C1'in yüksek seviyelerde Rap1-GAP aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir. Böylece plexin reseptörleri, Rho ve Rac aktivitesinin düzenlenmesi yoluyla hücre göçü ve nörit büyümesi üzerindeki pleiotropik etkilere aracılık ederler. Plexin C1'in ifade düzeyi, lösemiler, akciğer kanseri ve melanom üzerinde çalışılmıştır. Örneğin, tümör hücre büyümesi, EMT, akciğer metastazı ve anjiyogenez, fare modellerinde artmış SEMA7A ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Artmış SEMA7A ekspresyonu, cilt kanseri hastalarında kötü prognoz ile ilişkilidir ancak metastatik melanomların %66'sında Plexin C1 ifadesine rastlanılmamıştır. Bununla birlikte ileri evre HCC hücrelerinde Plexin C1'in, normal hücrelere göre çok daha az ifade edildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda Plexin C1 baskılanmış HCC hücre hatlarında E-kaderin ifadesinin azalırken, N-kaderin ve Vimentin ifadesinin artarak hücrenin epitel karakterden mezenkimal karaktere geçiş yaptığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir [4, 40].

Bu bilgiler ışığında ve bu tez kapsamında Plexin C1'in RAS-GAP aktivitesi HCC'de çoklu kinaz inhibitör tedavisinin seçimine yeni bir boyut kazandırabilir. Diğer yandan Plexin C1'in EMT ile ilişkisi hücre proliferasyonu, migrasyon, invazyon, ilaç direnci, apoptoz ve anoikis yanıtı gibi kanserde önemli biyolojik süreçlerde Plexin C1 ifadesi kapsamında aydınlatılacaktır.

3. GEREÇLER

3.1. Genel Kimyasallar

- EDTA (Merck)
- DMSO (Merck)
- Etanol (Riedel de Haen)
- RNaz A Çözültisi (Promega), Metanol (Fischer)
- Gliserol (Fischer Scientific)
- Tris (Fischer Scientific)
- HCL (Fischer Scientific)
- NaCl (Fischer Scientific)

3.2. Cihazlar

- Sıvı Azot tankı (Arpege 140)
- Laminar Kabin, Class II Tip (PMV Clean Air)
- Soğutmalı Mikrosantrifüj (Beckman Coulter microfuge 22R)
- Santrifüj (Nüve, NF400)
- -80°C Derin Dondurucu (Thermo, Forma -86°C ULT Freezer)
- Buharlı sterilizatör (Otoklav) (Hirayama, Hiclave HVE-50)
- +4°C Buzdolabı (Ariston)
- -20°C Derin Dondurucu (Bosch)
- Buz Makinesi (BAR-LINE BF85)
- Soğutmalı santrifüj (Heraeus Instruments Function Line)
- Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette)
- Karbondioksit İnkübatörü (Labogene, Scancell)
- Vortex (DragonLabs, MX-S)
- LSM 880 Airyscan Konfokal Mikroskop (ZEISS)
- Accuri C6 (Becton Dickinson)
- Şarjlı pipetleyici (Thermo Fisher Scientific)
- Floresan ataşmanlı ışık mikroskobu (Nikon)

- Soğurmalı Santrifüj (Labogene, Scanspeed 1580R)
- Hassas terazi, 0,1 mg hassasiyetli (Sartorius BL210S)
- Manyetik karıştırıcı (Denville Scientific)
- Mikrodalga fırın (Kumtel)
- Inverted mikroskop (Olympus CKX41)

3.3. Hücre Kültürü Malzemeleri ve Kimyasal Maddeler

- Dulbecco's Modification of Eagle's Medium Mix with L-glutamine, Gibco, New York, ABD
- Fötal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS), Gibco, New York, ABD
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (100X), Gibco, New York, ABD
- Non-essential amino acid (100X) Gibco, New York, ABD
- Epidermal büyüme faktörü Sigma, St. Louis, MO, ABD
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Sigma, ABD
- Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, New York, ABD
- Dimetil sülfoksit (DMSO), AMRESCO, Solon, ABD
- Annexin V-PE (BD Biosciences)
- 7-AAD-APC Viability Staining Solution (Biolegend)
- RNaz A Çözeltisi (Promega)
- E-PLATE VIEW (ACEA)
- Matrigel (CORNING)
- Bovine Serum Albumin (BSA) (Merck)

3.4. Çözelti ve Tamponlar

- 10X PBS:
 - 80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na₂HPO₄.2H₂O, 2,4 g KH₂PO₄ bir litreden az miktarda ddH₂O içerisinde çözülür. Daha sonra pH:7.4'ye ayarlanır ve sonra hacim ddH₂O ile bir litreye tamamlanır.

- 10X TBS:
 - 30g Tris, 88g NaCl, 2g KCl belirli miktarda ddH₂O içerisinde çözünlöp pH:7.5'ye ayarlandıktan sonra hacim ddH₂O ile bir litreye tamamlanır.
- TBS-T:
 - 1X TBS ve %5 Tween-20.
- 10X Bağlanma Tamponu:
 - 10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl ve 2.5 mM CaCl₂.
- Hücre Dondurma Solüsyonu:
 - %90 FBS ve %10 DMSO.

3.5. Antikorlar ve Boyalar

Annexin V-PE (BD Biosciences), 7-AAD-APC Viability Staining Solution (Biolegend)

4. YÖNTEMLER

4.1. Hücre Kültürü ve Koşulları

Çalışmalar için PLC/PRF/5 ve Hep3B HCC hücre hatlarından geliştirilen klonlar kullanıldı. Plexin C1'in baskılandığı klonlar shPLXNC1 ve kontrol klonları ise shPLKO olarak adlandırıldı. Tüm hücreler rutin olarak nemlendirilmiş, %5 CO₂ ile zenginleştirilmiş bir ortamda tek tabakalı kültürler olarak 37° C'de tutuldu. %10 fetal dana serumu, %1 penisilin-streptomisin ve %1 non-essential aminoasit ile zenginleştirilmiş yüksek glukoz içeren DMEM besiyerinde kültüre edildi. Tüm deneyler, sınıf II laminar hava akış kabini (PMV Clean Air) aseptik bir ortamda gerçekleştirildi.

Kültüre edilen hücreler hücre büyüme kaplarında (petri) %80-90'a ulaştıktan sonra kültürün devamı için pasajlandı. Hücrelerdeki eski besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X DPBS ile hücreler yıkandı. Yüzeye tutunan hücreleri kaldırmak için Tripsin-EDTA (2X) uygulandı. İnkübatörde 2-3 dakika bekletip hücrelerin kalkması sağlandı. Farklı pasaj oranlarına uygun miktarda dilüsyon yaparak taze besiyeri ilave edildi ve yeni petri kabına alındı. Hücre gelişimi için hücreler 37°C'de %5 CO₂ koşullarında inkübasyona bırakıldı.

4.2. Hücre Proliferasyonu Analizi

PLC/PRF/5 shPLXNC1, PLC/PRF/5 shPLKO, Hep3B shPLKO, Hep3B shPLXNC1 hücre klonları E-Plate 96'ya (Acea Biosciences, San Diego, CA) hücrelerin türüne göre kuyu başı 100 µL'lik bir hacimde 5x10³ olacak şekilde sayılıp ekildi. Hücreler çoğaldıkça, kuyuda bulunan elektronik sensörler tarafından algılandı ve veriler gerçek-zamanlı olarak cihaz tarafından her 30 dakikada bir 72 saat boyunca kaydedildi. Tüm inkübasyonlar 100 µl hacimde, 37° C'de ve %5 CO₂'de bir hücre kültürü inkübatöründe tutulurken xCELLigence RTCA MP sisteminde (Acea BioSciences) gerçekleştirildi. Sonuçlar hücrelerin ekildiği başlangıç noktasından itibaren hücre indeksine normalize edildi.

4.3. Hücre Migrasyon ve İnvazyon Analizi

4.3.1. Hücre Migrasyonu

Migrasyon, shPLXNC1 ve shPLKO hücreler arasında fonksiyonel farklılıkları test etmek için Trans-well migrasyon assay yöntemi kullanılarak değerlendirildi. %10 FBS ile desteklenmiş 500 µL besiyeri içeren 24 kuyulu plakalara, 2 saat öncesinden besiyeri ile ıslatılmış 8 µM por çapına sahip polycarbonat membran ile kaplı Transwell insertler (CBA-100-C, CytoSelect™, 24-Well Cell Migration Assay, Cellbiolabs, ABD) yerleştirildi. Ardından insertlerin içerisine 300 µL besi yeri içerisinde $2,5 \times 10^5$ hücre ekildi ve 2 saat hücrelerin yapışması beklendikten sonra serumsuz besi yeri verildi. 48 saat sonunda insertün altı ve üstü PBS ile yıkandı. Hücreler 1:1 aseton-methanol karışımı ile 5 dakika fiks edildi ve tekrar fiksasyon sonunda PBS ile yıkandı. İntertün altı 1/1000 oranında PBS içinde hazırlanmış DAPI ile üstü ise eozin ile boyandı. Göç eden hücreler Zeiss LSM880 Airyscan konfokal mikroskop ile 10x objektif kullanılarak görüntüledi.

4.3.2. Hücre İnvazyonu

İnvazyon ise, shPLXNC1 ve shPLKO hücreler arasında fonksiyonel farklılıkları test etmek için Trans-well invazyon assay yöntemi kullanılarak değerlendirildi. %10 FBS ile desteklenmiş 500 µL besiyeri içeren 24 kuyulu plakalara, 2 saat öncesinden besiyeri ile ıslatılmış 8 µM por çapına sahip matrijel membran ile kaplı Transwell insertler (Corning BioCoat Matrigel Invasion Chambers, Corning, ABD) yerleştirildi. Ardından insertlerin içerisine 300 µL serumsuz besiyeri içerisinde $2,5 \times 10^5$ hücre ekildi. 48 saat inkübasyon sonunda insertün altı ve üstü PBS ile yıkandı. İntertün altı 1/1000 oranında PBS içinde hazırlanmış DAPI ile üstü ise eozin ile yıkandı. Göç eden hücreler Zeiss LSM880 Airyscan konfokal mikroskop ile 10X objektif kullanılarak görüntüledi.

4.4. Hücre Döngüsü Analizi

Hücrelerde PLXNC1'in hücre döngüsü üzerindeki etkisi PI boyama kullanılarak akım sitometri cihazı ile analizi ile gerçekleştirildi. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara kuyu başı 2×10^5 olacak şekilde ekildi. 48 saat sonra her bir hücre toplandı ve soğuk PBS ile yıkandı. Ardından gece boyunca -20°C 'de bekletilmiş 1 ml %70 etanol ile hücreler 2 saat fikse edildi. Analizden önce hücreler, 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek alkol uzaklaştırıldı. Hücre pelletleri 0,1% TritonX-100, 3 μl RNase A, 5 μl PI (Propidium iyodür) içeren solüsyon içinde 90 dakika 37°C 'de inkübe edildi. Sonuçlar Accuri C6 akım sitometresi cihazı ile analiz edildi.

4.5. Anoiikise Direnç Analizi

Hücrelerde PLXNC1'in anoiikise direnç üzerindeki etkisi AnnexinV-7AAD boyama kullanılarak akım sitometri cihazı ile analizi ile gerçekleştirildi. Hücreler 6 kuyucuklu low-attachment plakalara kuyu başı 3×10^5 olacak şekilde ekildi. 48 saat sonra her bir hücre toplandı ve 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından pelletler 4nM EDTA ile 37°C 'de 5 dakika inkübe edilerek hücre topaklarının ayrılması sağlandı. Daha sonra, hücreler PBS ile yıkandı ve 1X binding buffer ile 100 μL 'de 1×10^5 hücre olacak şekilde çözüldü. 5 μL AnnexinV ve 5 μL 7AAD boyası eklenip 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 300 μL daha 1X binding buffer eklenip sonuçlar Accuri C6 akım sitometresi cihazı ile analiz edildi.

4.6. PLXNC1 Ekseninde HCC Hücrelerinin Çoklu-kinaz İnhibitörlerine Yanıtının Belirlenmesi

4.6.1. Çoklu-kinaz İnhibitörlerinin PLXNC1 Hücre Klonlarında Hücre Proliferasyon Etkisi

LC Laboratories firmasından (ABD) temin edilen Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib ile hücre klonlarında proliferasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarına farklı dozlarda Sorafenib (0, 2.5, 5, 7.5 ve 10 μ M), Regorafenib (0, 1.25, 2.5, 5, 10 μ M) ve Lenvatinib (0, 1.25, 2.5, 5, 10 μ M) uygulandı ve hücre canlılığı 72 saat sonra WST-1 yöntemiyle araştırıldı. Kısaca, hücre klonları 96 kuyucuklu plakalara kuyu başı 8×10^3 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra, besiyeri yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib içeren besiyeri ile değiştirildi. 72 saat sonunda kuyulara 10 μ L WST-1 eklendi ve 2 saat 37C'de inkübe edildikten sonra 96 kuyucuklu plakalar 440 nm dalga boyunda Varioscan plaka okuyucusu ile okutuldu. Elde edilen Absorbans 440 değerleri kullanılarak DMSO uygulanan kontrol hücrelerine göre yüzde canlılık (IC₅₀) hesaplandı.

4.6.2.Çoklu-kinaz İnhibitörlerinin PLXNC1 Hücre Klonlarında Hücre Apoptoz Yanıtına Etkisi

Sorafenib, Lenvatinib ve Regorafenib'in PLKO klonları için belirlenen IC₅₀ değerleri PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarına 72 saat uygulandı ve hücrelerin apoptoz yanıtı Western blot analizi ile PARP kesimi üzerinden incelendi. Hücreler 60 mm hücre kültürü plakalarına 2.5×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün, hücreler için hesaplanan IC₅₀ değerlerine göre ilaç dozları uygulandı ve 72 saat sonra hücreler toplanarak total protein lizatı SDS liziz tamponu (0.5M Tris pH: 6.8, %4 Gliserol, %1 SDS) kullanılarak elde edildi. Western blot ile PARP antikoru kullanılarak total (p116) ve kesilmiş (p89) PARP miktarı görüntülendi.

Hücrelerdeki apoptoz yanıtı PARP kesimi dışında akım sitometresi kullanılarak mitokondriyal membran geçirgenliğini gösteren TMRE (tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate) ve AnnexinV-7AAD boyamaları ile değerlendirildi. 60 mm kültür kaplarına 2×10^5 hücre ekildi. Bir gün sonra, Sorafenib, Lenvatinib ve Regorafenib'in pLKO kontrol klonları için belirlenen IC₅₀ değerleri PLC/PRF/5 ve HEP3B hücre klonlarına 72 saat uygulandı ve hücrelerin apoptoz yanıtı AnnexinV-7AAD ve TMRE boyamaları kullanılarak Accuri C6 akım sitometresi cihazı ile gösterildi.

- Canlı hücre popülasyonu: Anneksin V (-) ve 7- AAD (-)
- Erken apoptotik hücre popülasyonu: Anneksin V (+) ve 7- AAD (-)
- Geç apoptotik hücre popülasyonu: Anneksin V (+) ve 7- AAD (+)

- Nekrotik hücre popölasyonu: Anneksin V (-) ve 7- AAD (+)

4.7. İstatistiksel Analizler

Proliferasyon ve apoptoz yanıtı için istatistiksel analizler Graphpad Prism Yazılımı (Sürüm 5) Two-way Anova kullanılarak yapıldı. İnvazyon ve migrasyon analizleri için nukleuslar ImageJ'de sayıldı ve Graphpad Prism Yazılımı (Sürüm 9) student t-test kullanılarak sonuçlar karşılaştırmalı analiz edildi. 0.05'in altındaki *P* değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm deneyler üç tekrar halinde yapıldı.



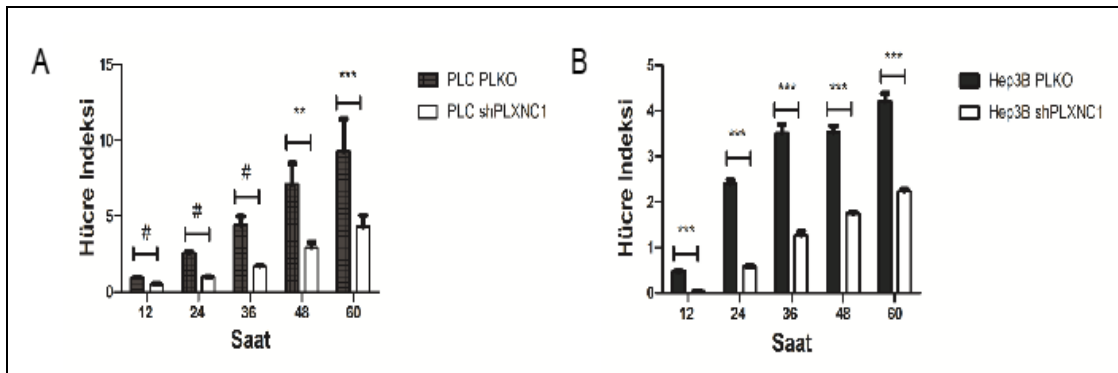
5. BULGULAR

5.1. Hücre Proliferasyon Aktivitesi

Gerçek zamanlı olarak shPLXNC1 ve shPLKO hücre klonlarında proliferasyon analizi xCELLigence RTCA MP sisteminde (Acea BioSciences) empedansa dayalı olarak gerçekleştirildi. E-platelere kuyu başı 100 μ L'lik bir hacimde 5×10^3 olacak şekilde hücre ekildi ve hücreler çoğaldıkça kuyuda bulunan elektronik sensörler tarafından her 30 dakikada bir 72 saat boyunca hücrelerin empedans değerleri ölçüldü. Her bir kuyuda bulunan hücre sensörünün direnci, hücre indeksi olarak adlandırılmaktadır. Hücre indeksi, hücrenin bulunduğu kuyunun elektrotunun direncinden (R_n), yalnızca besiyeri bulunan kontrol kuyusu elektrotunun direncinin (R_b) çıkarılıp 15'e bölünmesi ile hesaplanmaktadır.

$$\text{Hücre İndeksi} = (R_n - R_b) / 15 \quad (5.1)$$

Daha önceki çalışmalar hücrelerde PLXNC1 baskılanmasının epitel fenotipten mezenkimal fenotipe geçişe (EMT) neden olduğu gösterilmiştir. Yine literatürde EMT geçiren hücrelerin proliferasyonunda azalma olduğuna dair bilgilerde mevcuttur [4]. Çalışmamızda kullandığımız karaciğer kanser hücre hattı olan PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarında 72 saat boyunca proliferasyon düzeyleri incelendiğinde, her iki hücrenin de shPLXNC1 klonlarında hücre proliferasyonunun PLKO klonlarına göre anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. (Şekil 5.2)

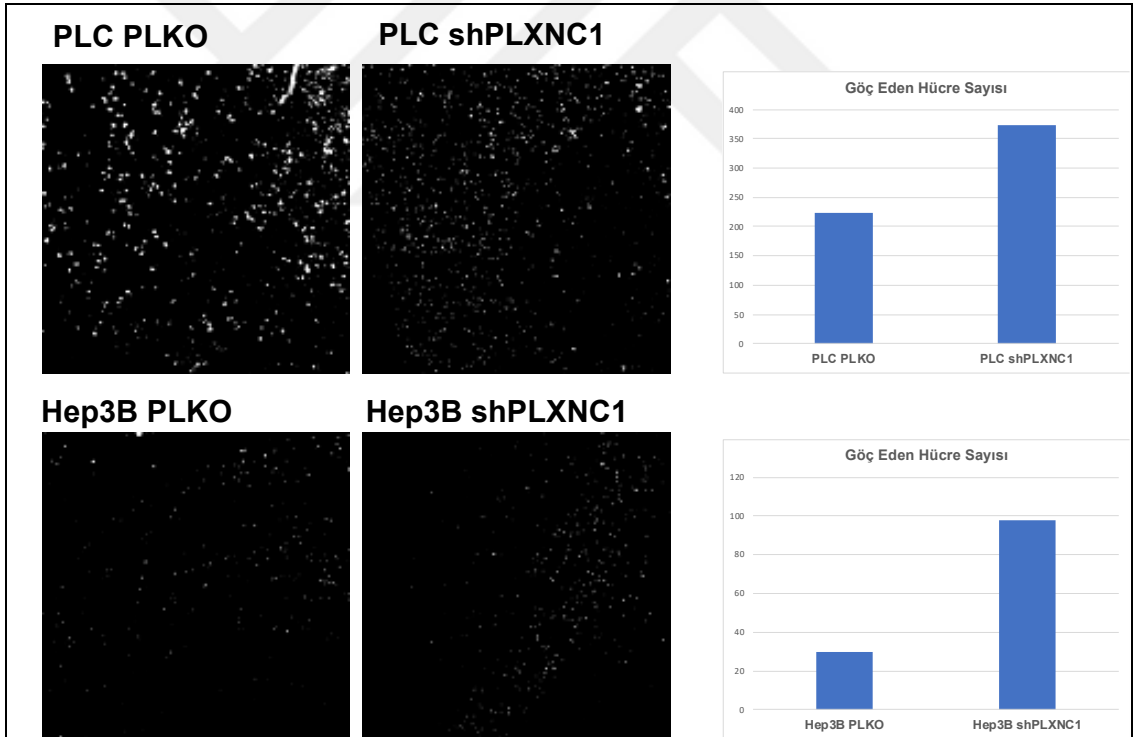


Şekil 5.2: shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının proliferasyon analizi. Kuyulardan kaydedilen hücre indeksi değerleri ile grafik oluşturuldu.

5.2. Hücre Migrasyon ve İnvazyon Analizi

5.2.1. Hücre Migrasyon Analizi

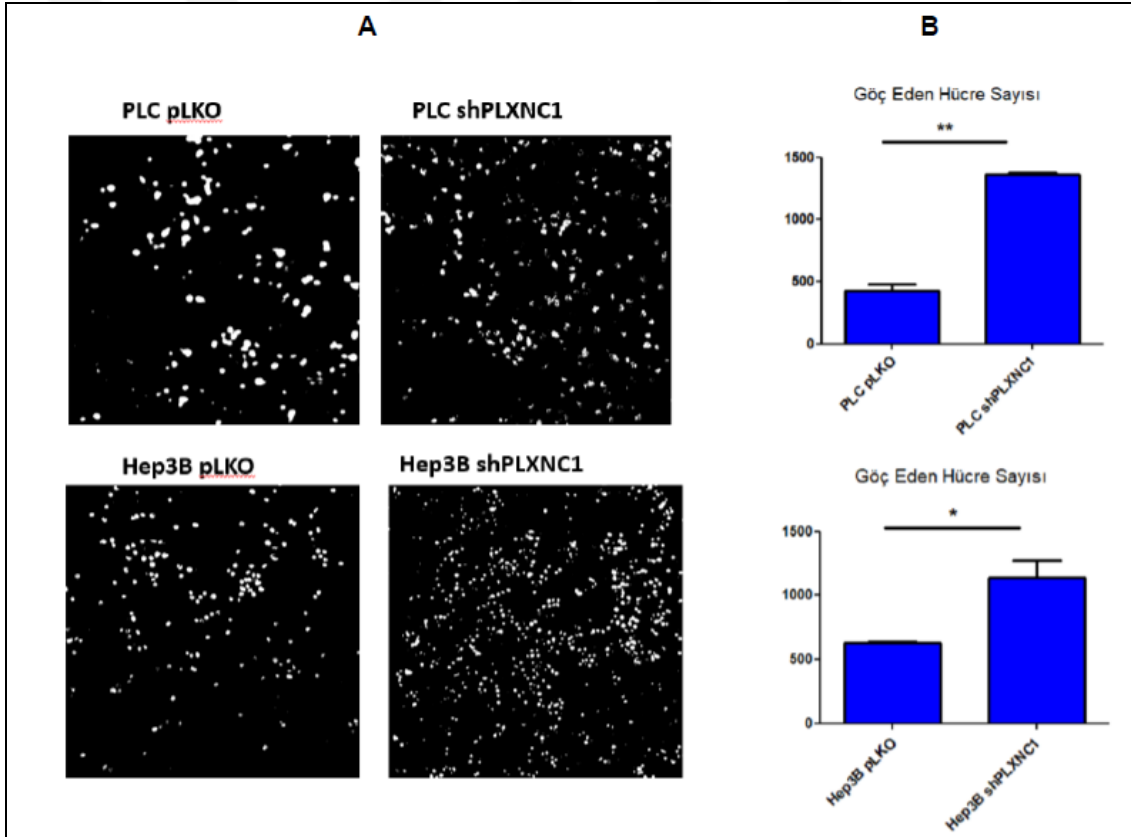
shPLKO ve shPLXNC1 hücre klonlarının migrasyon kapasitelerindeki fark Transwell migrasyon deneyi ile gerçekleştirildi. Göç eden hücreler DAPI ile boyanarak Zeiss LSM880 Airyscan konfokal mikroskop ile 10X objektif kullanılarak görüntülendi. Image J programı kullanılarak nükleuslar sayıldı. Pleksin C1'in baskılanması ile hücrelerin 48 saat sonunda migrasyon kapasitelerinin hem shPLXNC1 PLC/PRF/5 ($p<0.05$) hemde shPLXNC1 Hep3B($p<0.001$) anlamlı olarak arttığı saptanmıştır (Şekil 5.3). Elde edilen bu bulgu, Pleksin C1 ifadesinin baskılanması ile hücrelerin mezenkimal fenotip benzeri özellikler kazanıyor hipotezi ile uyumlu bulunmuştur.



Şekil 5.3: shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının migrasyon analizi. A) insert membranlarının alt yüzeyleri DAPI ile boyandıktan sonra konfokal mikroskopta görüntülenmiştir. B) invazyon gösteren hücreler ImageJ'de sayılarak analiz edilmiştir. Klonlar arasındaki karşılaştırma Graphpad'de student t-test ile gerçekleştirilmiştir.

5.2.2. Hücrelerin İnvazyon Aktivitesi

shPLKO ve shPLXNC1 hücre klonlarının invazyon kapasitelerindeki fark Transwell invazyon deneyi ile gerçekleştirildi.. İnsertün altına geçen, invazyon yapmış olan hücreler DAPI ile boyanarak Zeiss LSM880 Airyscan konfokal mikroskop ile 10X objektif kullanılarak görüntülendi. Image J programı kullanılarak nükleuslar sayıldı. İnvazyon deneyleri sonucunda PlexinC1 ifadesinin baskılandığı PLC/PRF/5 ve Hep3B hücrelerinde invazyon gösteren hücrelerin kontrol hücre klonlarına göre anlamlı derecede arttığı saptandı (Şekil 5.4). Bu bulgu, PlexinC1'in baskılandığı hücrelerde gelişen mezenkimal fenotip ile örtüşmektedir. Ayrıca, shPLXNC1 klonlarının artmış migrasyon davranışı ile de uyum içindedir.

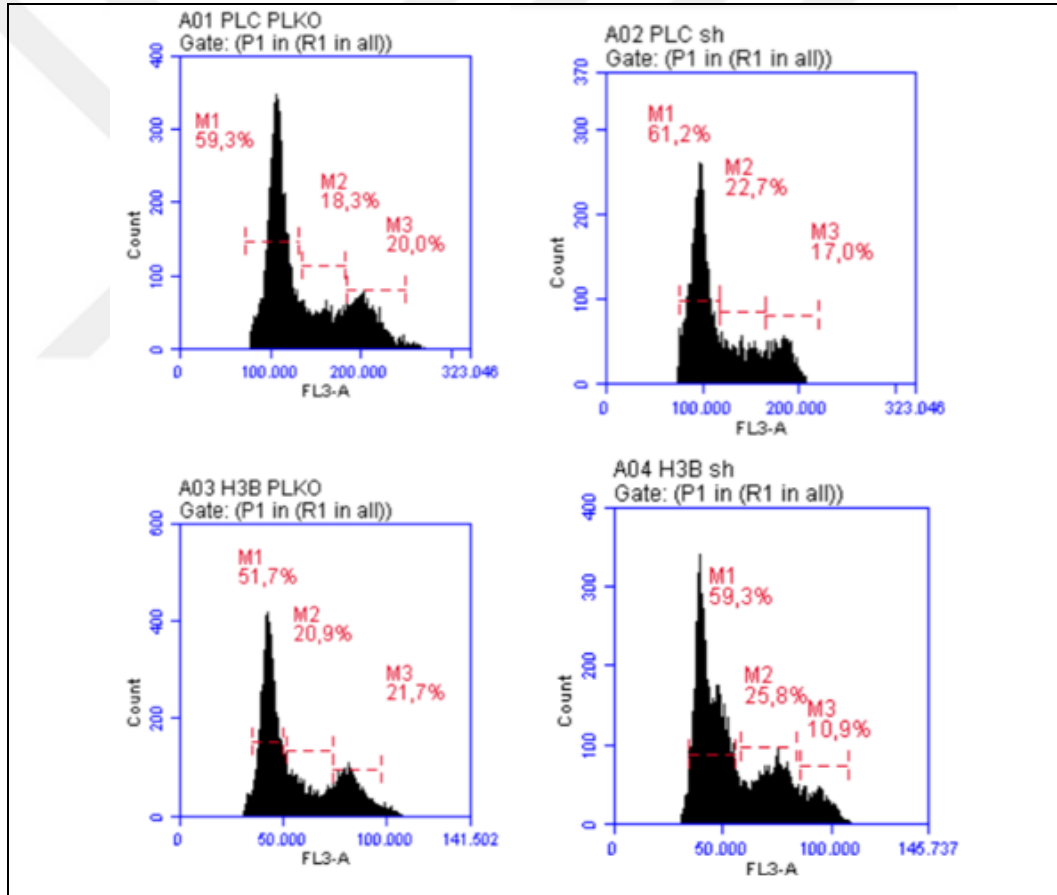


Şekil 5.4: shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının invazyon analizi. PLC/PRF/5 ve Hep3B hücrelerinin pLKO ve shPLXNC1 klonları matrijel kaplı insertlere ekilerek invazyon testi uygulanmıştır. A) insert membranlarının alt yüzeyleri DAPI ile boyandıktan sonra konfokal mikroskopta görüntülenmiştir. B) invazyon gösteren hücreler ImageJ’de sayılarak analiz edilmiştir. Deneyler 3 kez tekrarlanmış olup, klonlar arasındaki karşılaştırma Graphpad’de student t-test ile gerçekleştirilmiştir. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

5.3. Hücre Döngüsü Analizi

PLC/PRF/5 ve Hep3B shPLXNC1 klonlarında PLXNC1 yokluğunda hücrede değişen durumları açıklamak için proliferasyon, migrasyon ve invazyon deneyleri dışında akım sitometrisi ile hücre döngüsü analizi gerçekleştirildi. PI (propidium iyodür) boya ile boyanan hücre klonları BD Accuri C6 FACS ile analiz edildi.

Özellikle Hep3B hücrelerinde daha çarpıcı bir şekilde görüldüğü gibi shPLXNC1 klonları (PLC sh ve H3B sh olarak belirtilmiştir) kontrol PLKO klonlarına göre G1 ve S fazlarında duraksamaya uğramakta ve G2/M fazına çok daha az hücre ilerleyebilmektedir. (Şekil 5.5)

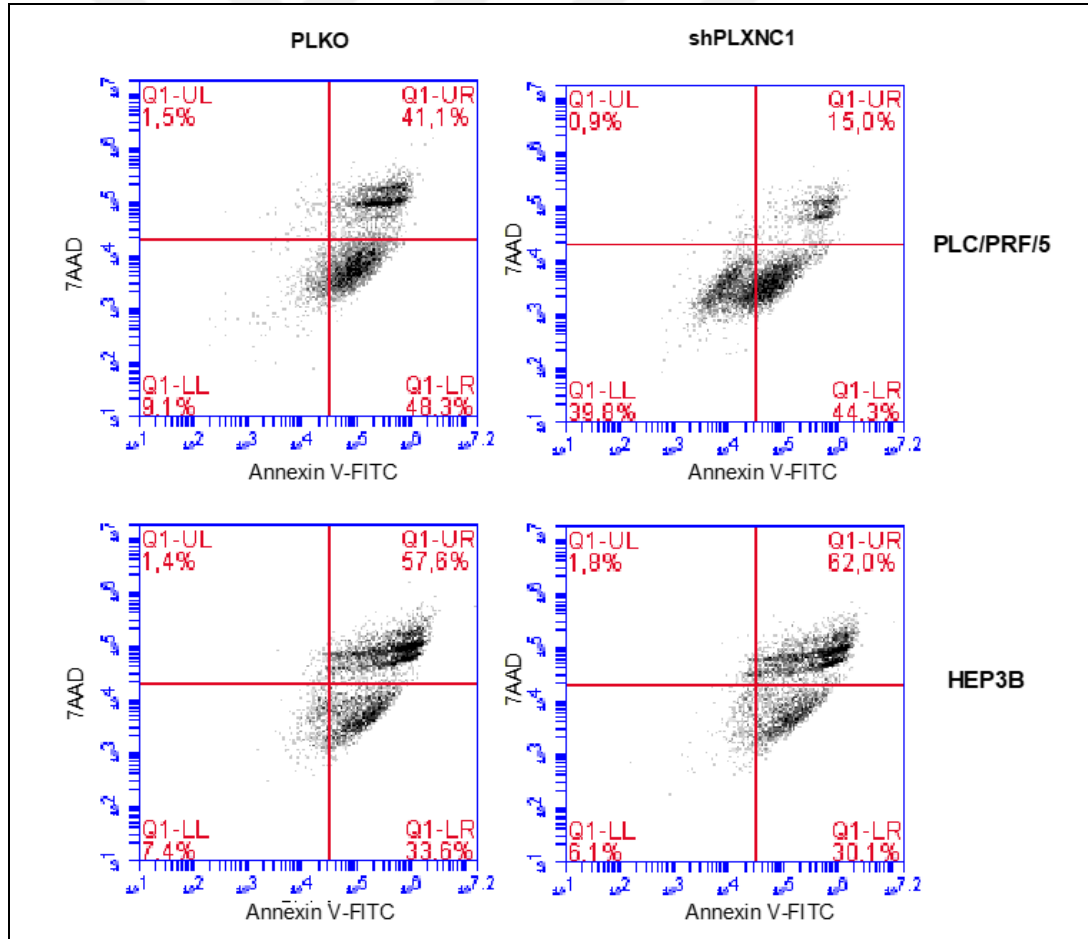


Şekil 5.5: shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının hücre döngüsü analizi M1 G1, M2 S ve M3 G2/S fazlarını göstermektedir.

5.4. Klonların Anoikise Direnç Analizi

Anoikise direncin belirlenmesi amacıyla düşük bağlanma kapasiteli plakalara ekilen hücreler AnnexinV/7AAD ile boyandı ve BD Accuri C6 FACS ile analiz edildi.

Literatürde EMT programı aktif olan metastatik hücrelerde apoptoza ve anoikise direnç görülmektedir. Plexin C1 baskılanmış hücre klonlarının EMT geçirdiği daha önceki çalışmalarda gösterildi. Buna bağlı olarak, akım sitometrisi ile yapılan analizde PLC/PRF/5 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre PLXNC1'in baskılandığı durumda hücrelerde anoikis direnci görülmekte ve sağlıklı hücre miktarı %9,1'den %39,8'e (Q1-LL) yükselmektedir. Buna karşın Hep3B hücre klonlarında ise PLXNC1 ifadesine bağlı bir anoikis direnci gözlenmemiştir.

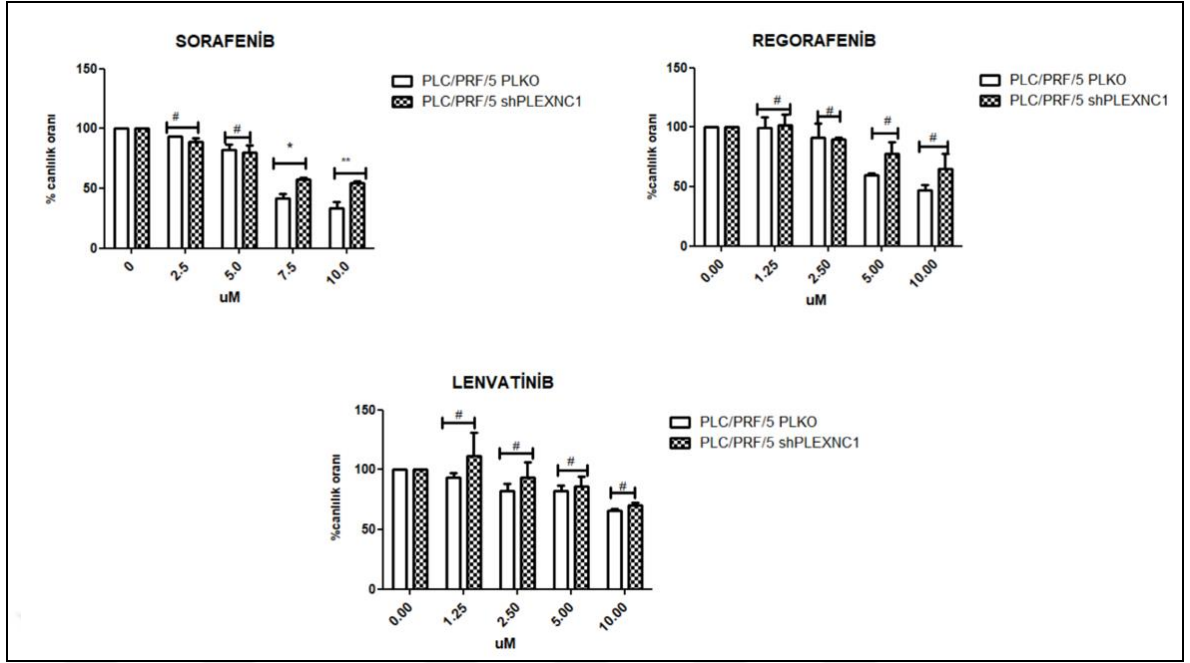


Şekil 5.6: shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının anoikis direnci. Q1-LL: Sağlıklı; Annexin V-7AAD-, Q1-LR: Erken Apoptotik; Annexin V+7AAD-, Q1-UR: Apoptotik, Annexin V+7AAD+, Q1-UL: Nekrotik, Annexin V-7AAD+.

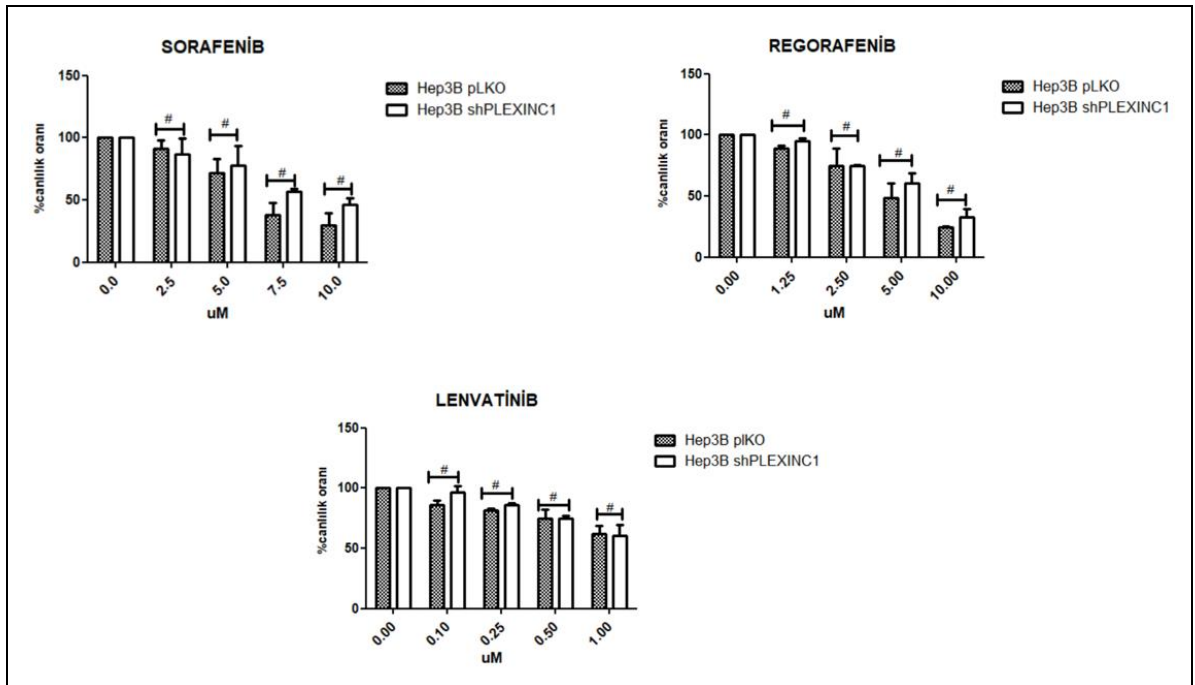
5.5. PLXNC1 Ekseninde HCC Hücrelerinin Çoklu-kinaz İnhibitörlerine Yanıtının Belirlenmesi

5.5.1.Çoklu-kinaz İnhibitörlerinin PLXNC1 Hücre Klonlarında Hücre Proliferasyonuna Etkisi

PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarına farklı dozlarda Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib uygulandı ve hücre canlılığı 72 saat sonra WST-1 yöntemiyle araştırıldı. 440 nm dalga boyunda Varioscan plaka okuyucusunda absorbans ölçümü yapıldı. Elde edilen değerler kullanılarak DMSO uygulanan kontrol hücrelerine göre yüzde canlılık (IC_{50}) Graphpad prism 5 ile Two-way Anova kullanılarak hesaplandı. 72 saat boyunca çoklu kinaz inhibitörlerinin farklı dozlarına maruz bırakılan PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarından sadece PLC/PRF/5 hücre klonlarının sorafenib yanıtındaki fark anlamlı bulundu. Bunun dışındaki ilaçlar için saptanan değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunamamakla birlikte regorafenibin shPLXNC1 klonlarında daha yüksek IC_{50} değeri göstermiş olması önemlidir. Aslında, tüm ilaçlar her iki hücrenin klonlarında anti-proliferatif etkiye sahip olup, sadece sorafenib shPLXNC1 ve PLKO klonları arasında anlamlı bir fark göstermektedir. Lenvatinibte ise klonlar arasında IC_{50} değerleri açısından bir fark bulunmamaktadır. Bu durum lenvatinibin uygulanan dozlarda en düşük anti-proliferatif etki göstermiş olmasıyla da uyumludur. Ayrıca, ilaç direncinin epigenetik değişiklikler, tümör çevresi, hücre ölümünün düzenlenmesi ve hücre içi transport sistemi gibi birçok faktöre bağlı karmaşık bir süreç olduğu göz önüne alındığında, özellikle sorafenib ve regorafenibe karşı shPLXNC1 klonlarının daha dirençli bir eğilim göstermeleri önümüzdeki dönemlerde bu ilaçlarla yapılacak çalışmalar açısından umut verici bir bulgu olarak değerlendirilmiştir [41].



Şekil 5.7: Kontrol ve shPLXNC1 PLC/PRF/5 hücre klonlarına Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib uygulanması ve hücre canlılığı. Taşıyıcı kontrol (DMSO) ve Şekilde belirtilen dozlarda sorafenib, regorafenib ve lenvatinib ile 72 saat boyunca inkübe edilen hücrelerde WST-1 analizi sonrası elde edilen absorbans değerleri kıyaslanmıştır. İstatistiksel analiz Graphpad prism 5 ile Two-way Anova kullanılarak yapıldı. #; anlamlı değil, *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$



Şekil 5.8: Kontrol ve shPLXNC1 Hep3B hücre klonlarına Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib uygulanması ve hücre canlılığı. Taşıyıcı kontrol (DMSO) ve Şekilde belirtilen dozlarda sorafenib, regorafenib ve lenvatinib ile 72 saat boyunca inkübe edilen hücrelerde WST-1 analizi sonrası elde edilen absorbans değerleri

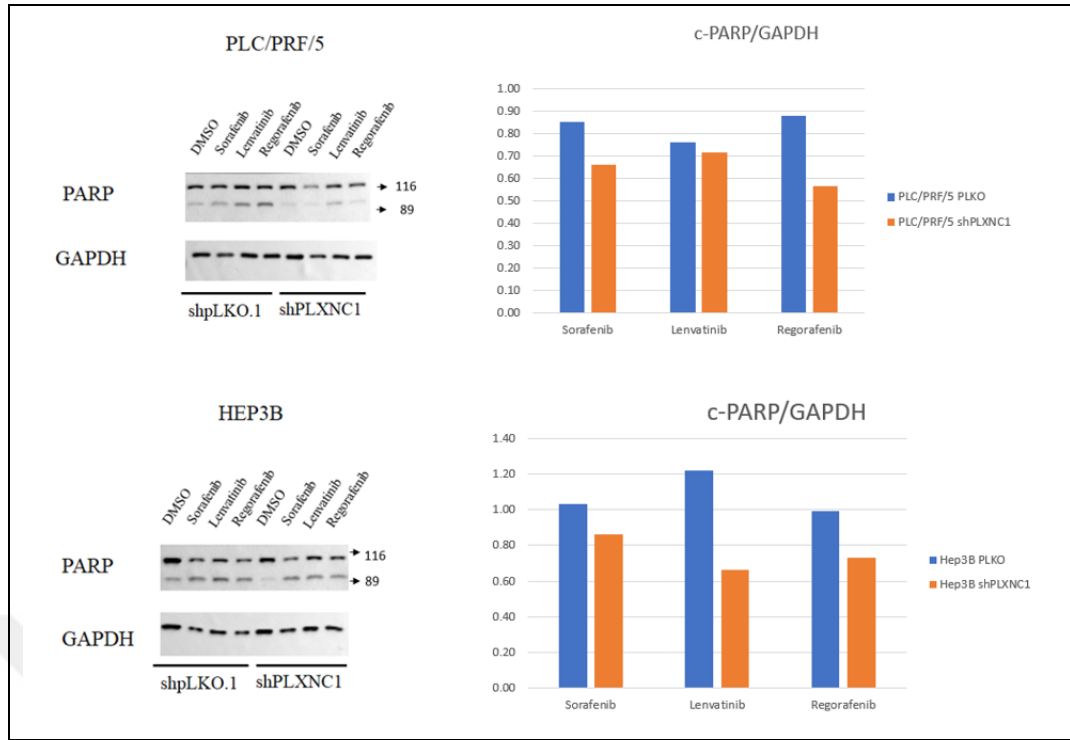
kıyaslanmıştır. İstatistiksel analiz Graphpad prism 5 ile Two-way Annova kullanılarak yapıldı. #; anlamlı değil, *, p<0.05, **, p<0.01; ***, p<0.001.

Tablo 2.2: Kontrol ve shPLXNC1 Hep3B ve PLC/PRF/5 hücre klonlarına Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib uygulanması sonucu hesaplanan IC50 değerleri.

Klonlar	Sorafenib IC50	Regorafenib IC50	Lenvatinib IC50
PLC/PRF/5 PLKO	7.7	8.8	13.9
PLC/PRF/5 shPLXNC1	10	12.29	12.5
Hep3B PLKO	7	5.73	1.35
Hep3B shPLXNC1	9.12	7.13	1.16

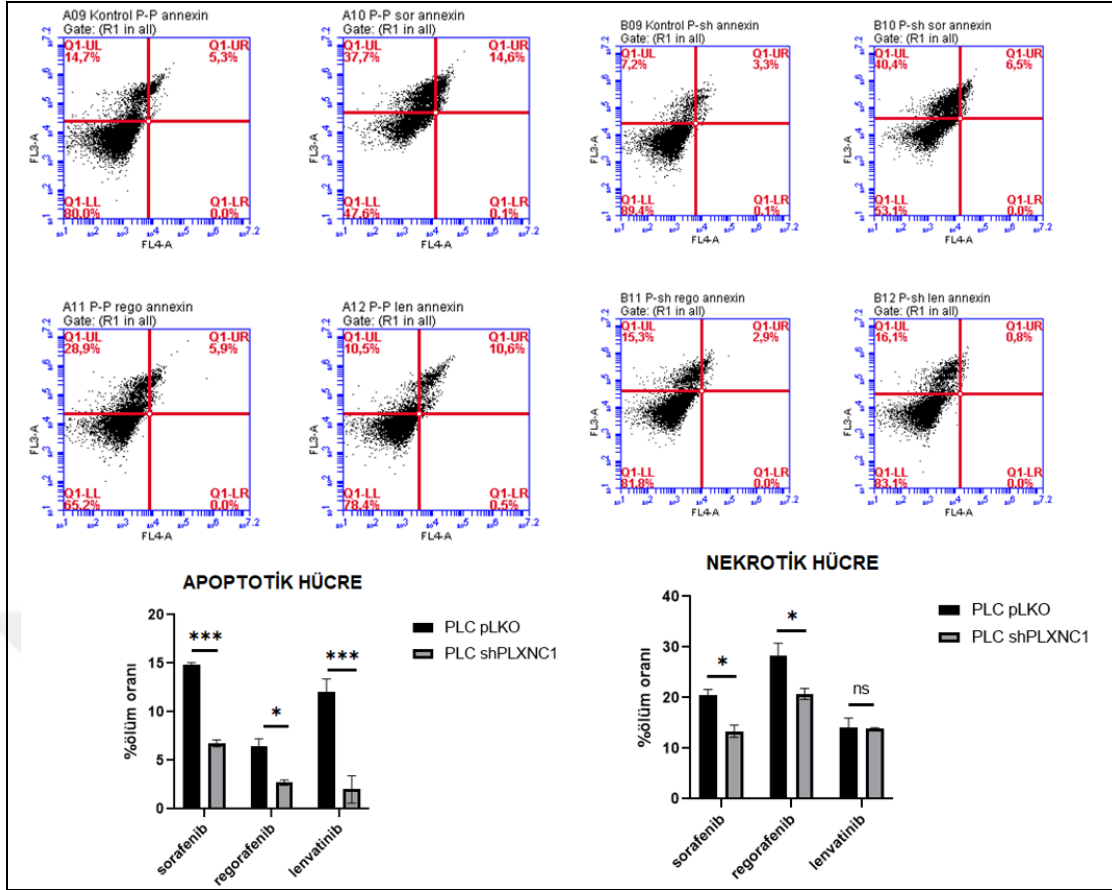
5.5.2.Çoklu-kinaz İnhibitörlerinin PLXNC1 Hücre Klonlarında Hücre Apoptoz Yanıtına Etkisi

PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarına belirlenen IC₅₀ değerlerine göre Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib uygulandıktan sonra hücrelerin apoptoz dirençleri kesilmiş PARP bandı (p89 PARP) üzerinden incelendi. PLXNC1'in baskılandığı durumda hem PLC/PRF/5 hem de Hep3B hücre klonlarında daha az PARP kesimi yani apoptoza karşı direnç saptandı. Bu durumun da PLXNC1'in baskılandığı hücre klonlarının gösterdiği mezenkimal fenotipten kaynaklandığı değerlendirildi. Literatürde aktif EMT programının ilaç direncini artırdığı bildirilmiştir; ancak tek başına EMT programı veya PLEXINC1'in hücrede baskılanmış olması ilaç direnci oluşmasında yeterli değildir [42, 43]. Bu nedenle, apoptoz yanıtına direnç olup olmadığını belirleyebilmek için AnnexinV/7AAD ve TMRE boyaması yapılarak BD Accuri C6 FACS ile analiz edildi.

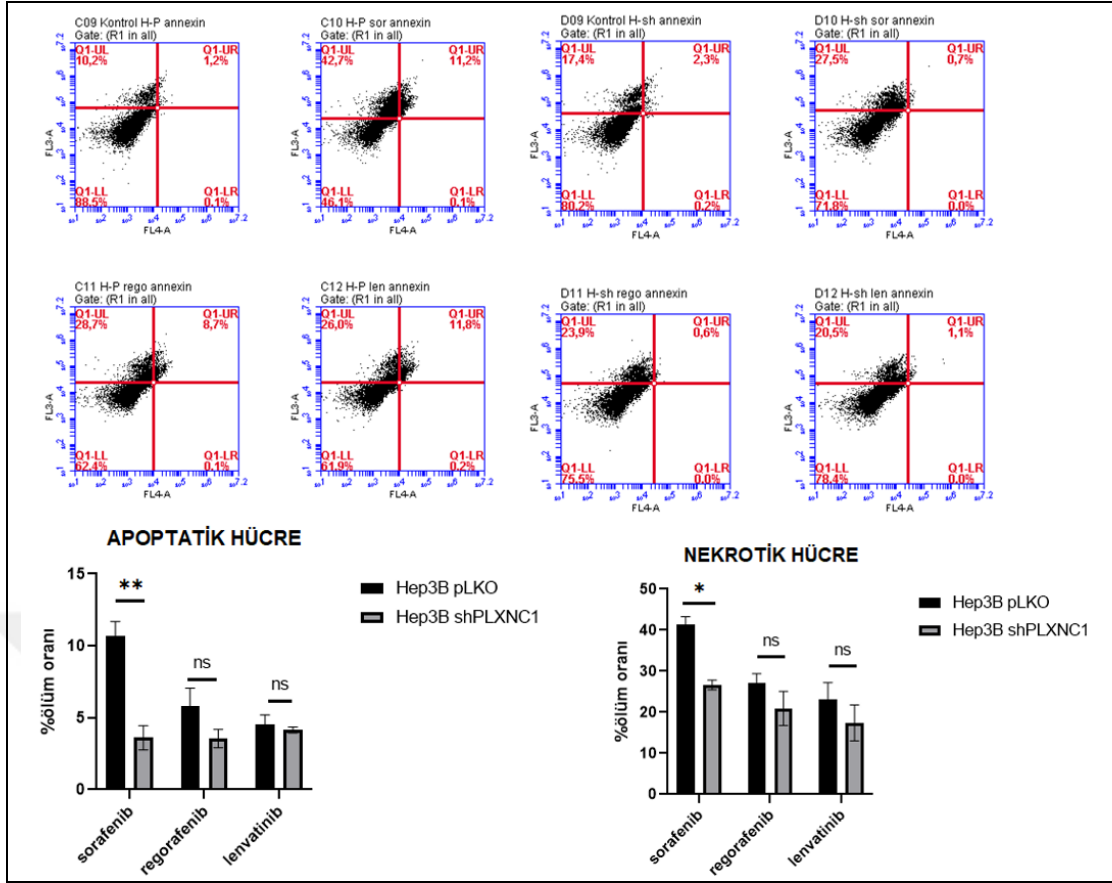


Şekil 5.9: shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının çoklu-kinaz inhibitörlerine karşı apoptoz yanıtı. İlaç uygulanan ve kontrol (DMSO) hücre lizatları Westren blotta PARP antikoru ile problandı. Kesilmiş PARP yüzdesi hesaplanırken kesilmiş PARP bandının (cPARP; 89 kDa) miktarları ImageJ programında hesaplandı ve eş-yükleme kontrolü GAPDH bantlarına oranlanarak c-PARP/GAPDH grafikleri oluşturuldu.

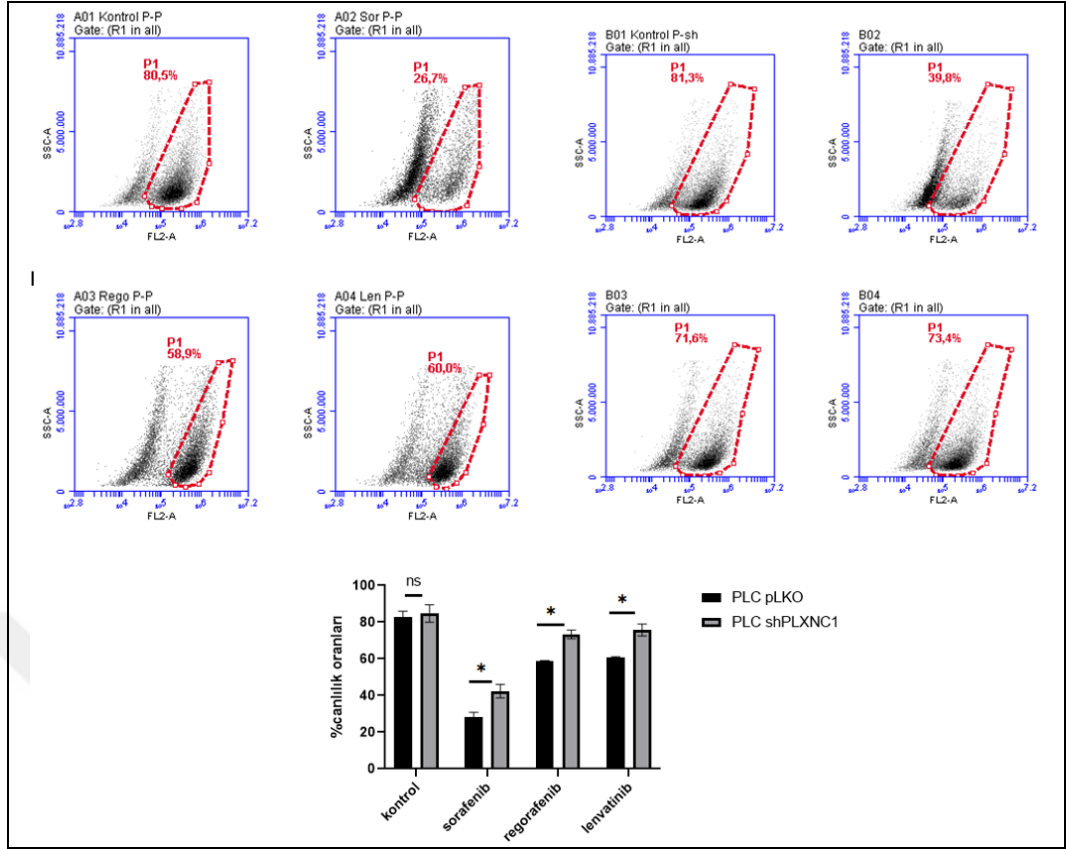
PLC/PRF/5 shPLXNC1 ve Hep3B shPLXNC1 hücre klonlarında apoptotik hücre oranı pLKO klonlarına göre hem Annexin V/7-AAD hem de TMRE boyamasında daha düşük bulunmuş ve PlexinC1 baskılanmasının hücrelerde apoptoza karşı direnç sağladığı gösterilmiştir. (TMRE sinyalindeki azalma artmış apoptotik yanıtı işaret etmektedir). Bu durumun da PLXNC1'in baskılandığı hücre klonlarının gösterdiği mezenkimal fenotipten kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Tüm analizlerin sonucunda PLEXINC1'in baskılanmasının ilaç direncine neden olduğu saptanmıştır.



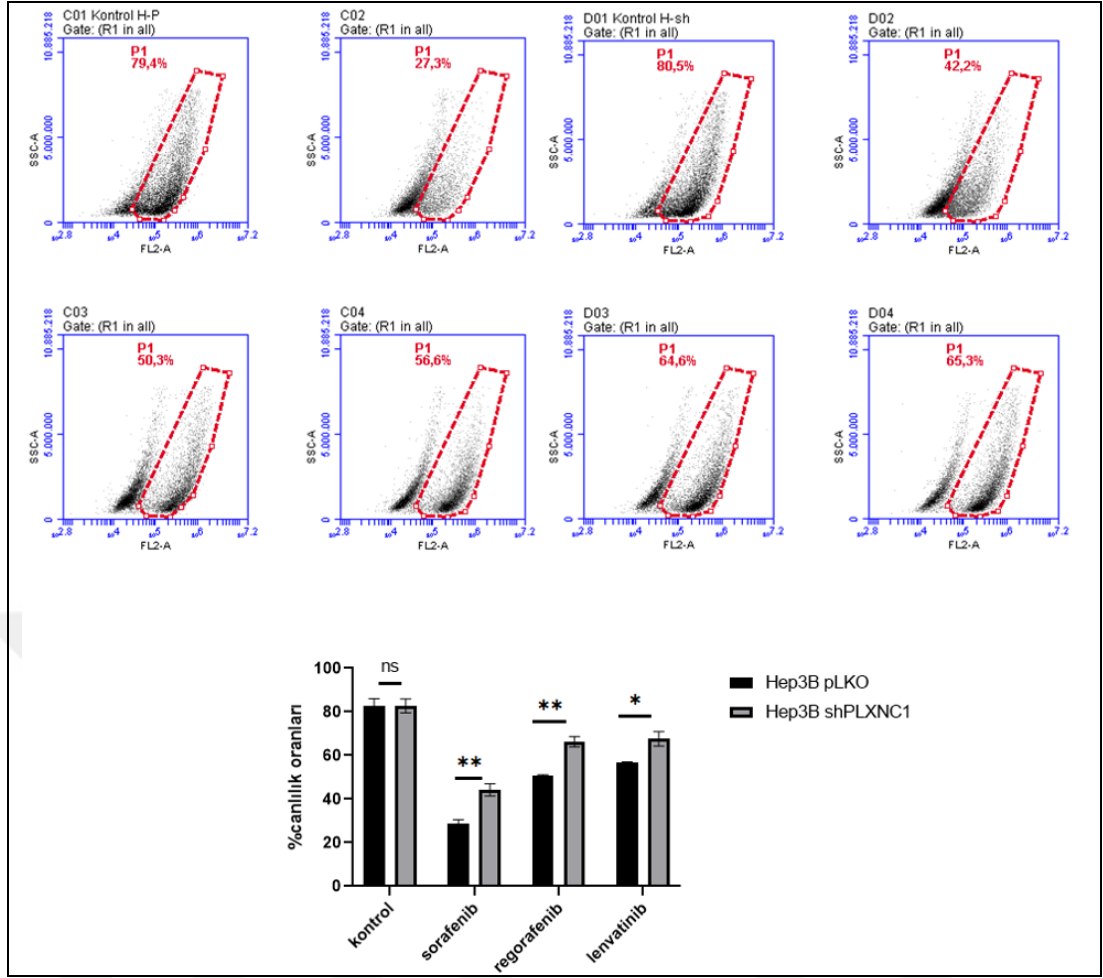
Şekil 5.10: shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının çoklu-kinaz inhibitörlerine karşı apoptoz yanıtı. Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib ile 72 saat boyunca inkübe edilen PLC/PRF/5 hücrelerinin apoptoz direnci Annexin V/7-AAD boyamasının ardından akış sitometrisi ile incelenmiş ve kontrol pLKO ve shPLXNC1 klonlarının apoptotik ve nekrotik hücre ölüm oranları karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analiz Graphpad prism 9 ile Two-way Anova kullanılarak yapıldı. (ns; anlamlı değil, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$)



Şekil 5.11: shPLXNC1 ve PLKO hücre klonlarının çoklu-kinaz inhibitörlerine karşı apoptoz yanıtı. Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib ile 72 saat boyunca inkübe edilen Hep3B hücrelerinin apoptoz direnci Annexin V/7-AAD boyamasının ardından akış sitometrisi ile incelenmiş ve kontrol pLKO ve shPLXNC1 klonlarının apoptotik ve nekrotik hücre ölüm oranları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar “% ölüm oranı” olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analiz Graphpad prism 9 ile Two-way Anova kullanılarak yapıldı. (ns; anlamlı değil, *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$)



Şekil 5.12: Hücre ölümü, mitokondriyal membran depolarizasyonuna bağlı olarak apoptotik hücrelerde azalan TMRE boyaması ile PLC/PRF/5 hücrelerinin kontrol pLKO ve shPLXNC1 klonlarında akım sitometrisi ile incelenmiştir. Sonuçlar “% canlılık oranı” olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analiz Graphpad prism 9 ile Two-way Annova kullanılarak yapıldı. (ns; anlamlı değil, *, $p < 0.05$)



Şekil 5.13: Hücre ölümü, mitokondriyal membran depolarizasyonuna bağlı olarak apoptotik hücrelerde azalan TMRE boyaması ile Hep3B hücrelerinin kontrol pLKO ve shPLXNC1 klonlarında akım sitometrisi ile incelenmiştir. Sonuçlar “% canlılık oranı” olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analiz Graphpad prism 9 ile Two-way Anova kullanılarak yapıldı. (ns; anlamlı değil, *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$)

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanser, Türkiye’de ve dünyada kalp damar hastalıklarından sonra en çok ölüme sebep olan hastalıkların başında gelmektedir. 100’den fazla kanser türü vardır ve karaciğer kanseri en yaygın beşinci kanser türüdür. Dünya çapında kansere bağlı ölümlerde ise karaciğer kanseri dördüncü sırada yer almaktadır. Cinsiyetler arası karşılaştırma yapıldığında da erkeklerde karaciğer kanseri gelişme riski kadınlara kıyasla çok daha yüksektir. İki ana birincil karaciğer kanser türü vardır. Bunlardan parankimal hücreler olan hepatositlerden kaynaklanan hepatoselüler karsinoma (HCC), dünya çapında birincil karaciğer kanseri vakalarının %80’inden fazlasını oluşturmaktadır. HCC’ye yol başlıca etmenler arasında Hepatit B ve C virüsleri, nemli ortamda stoklanan besinler aracılığıyla aflatoksin intoksikasyonuna maruz kalma, alkolik olmayan karaciğer yağlanması (NASH) ve aşırı alkol tüketimi yer almaktadır. Bu etmenlerin yol açtığı inflamasyon ve bunun zemininde gelişen hücre proliferasyonu ve ölümü döngüsü hepatositlerde mutasyonların birikimine yol açarak HCC gelişimine zemin hazırlamaktadır [1, 7] .

HCC BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) evrelendirme sistemine göre 5 evrede ele alınmaktadır (Evre 0: Çok erken evre, Evre A: Erken evre, Evre B: Orta evre, Evre C: İleri evre, Evre D: Terminal evre, ağır karaciğer hasarı). Ancak, HCC olgularının büyük çoğunluğu ileri evresinde (Evre C) teşhis edilmekte ve tümör boyutu ve damar invazyonu gibi nedenlere bağlı olarak erken tedavi seçenekleri uygulanamamaktadır. HCC’deki genetik değişikliklerle ilgili de çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, hastalığın tanısı genellikle ileri evrelerde konulabilmekte ve tedavi seçeneklerinin sınırlılığı nedeniyle ileri evre HCC hastalarında ortalama 8 aylık sağkalım değerleri ile kötü bir prognoz seyretmektedir [19].

HCC’nin patofizyolojisi karmaşık, çok aşamalı bir süreçtir. Çeşitli faktörlerin etkileşimi, hepatosit malign transformasyonuna ve HCC gelişiminin erken aşamalarına etki eder. Bu faktörler arasında genetik yatkınlık, viral antijenlerin genoma entegrasyonu, hücresel mikroçevre, çeşitli bağışıklık hücreleri ve altta yatan kronik karaciğer hastalıkları yer almaktadır [17].

TERT promotor mutasyonları, viral antijenlerin genoma entegrasyonu, kromozom translokasyonları ve gen amplifikasyonları HCC vakalarının %80’inde görülmektedir. Özellikle çalışmalar, vakaların %30-50’sinde CTNNB1, AXIN1 veya

APC (Wnt yolunun inhibitörleri) inaktivasyonunda mutasyon olduğunu göstermiştir. Bu durum da HCC’de Wnt- β -katenin sinyal yolağının aktive olduğunu göstermektedir. Diğer mutasyonlar ve genetik değişiklikler ise hücre döngüsü kontrolünü değiştiren TP53, RB1, CCNA2, CCNE1, PTEN, ARID1A, ARID2, RPS6KA3 ve NFE2L2 genlerini içermektedir. Ek olarak, HCC’de epigenetik düzenleme, oksidatif stres ve AKT-mTOR ile MAPK sinyal yollarında görev alan genlerdeki değişimlerde yer almaktadır. CCND1, FGF19, VEGFA, MYC ve MET’de aşırı ekspresyona yol açan tekrarlayan fokal kromozom amplifikasyonları, reseptör tirozin kinazlar olmak üzere çeşitli onkojenik sinyal yollarının aktivasyonuna sebep olmaktadır. Reseptör tirozin kinazlar ligand bağlanması ile oto-fosforile olurlar ve bir dizi sinyal yolağını aktifleştirirler. Ras aktivasyonu Raf indüksiyonu ile sonuçlanır. Raf sırasıyla Erk1/2’yi fosforile eden Mek1/2’yi aktifleştirir. Raf aynı zamanda MAP3 kinazları, JNK1/2, p38 ve ERK5’i ardışık olarak aktive eder. RTK oto-fosforilasyonu ile PI3K-Akt yolağı aktifleşir ve bu olaylar çoğalma, farklılaşma, hayatta kalma ve hücre göçünde önemli bir rol oynar [20, 23]. Aynı zamanda, vasküler invazyon fenotipine sahip HCC örneklerinde hücre hareketini düzenleyen MMP’ler ve RhoC gibi genlerde de ekspresyon seviyelerinin arttığı gözlenmiştir. Diğer çalışmalarda, yüksek düzeyde aktive olmuş RhoC/ROCK2’nin MMP-2 ekspresyonunu arttırarak ERK/MMP sinyalleşmesini etkinleştirdiği ve böylece EMT oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir [25]. Plexin C1 baskılanmış HCC hücre hatlarında E-kaderin ifadesi azalırken, N-kaderin ve Vimentin ifadesinin artarak hücrenin epitel karakterden mezenkimal karaktere geçiş (EMT) yaptığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [4].

Bu tez kapsamında da Plexin C1’in kanserli hücrelerde ekspresyonunun azalmasının hücre proliferasyonunu, hücre döngüsünü, migrasyonunu ve invazyonu ne yönde etkilediği ortaya çıkarılmıştır. Gerçek zamanlı olarak shPLXNC1 ve shPLKO hücre klonlarında proliferasyon analizi xCELLigence RTCA MP sisteminde (Acea BioSciences) empedansa dayalı olarak gerçekleştirildi. Çalışmamızda kullandığımız karaciğer kanser hücre hattı olan PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarında 72 saat boyunca proliferasyon düzeyleri incelendiğinde, her iki hücrenin de shPLXNC1 klonlarında hücre proliferasyonunun PLKO klonlarına göre anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçta, literatürde EMT geçiren hücrelerin proliferasyonunda azalma olduğunu gösteren bilgilerle eşleşmektedir [44]. shPLKO ve shPLXNC1 hücre klonlarının migrasyon kapasitelerindeki fark Transwell

migrasyon deneyi ile gerçekleştirildi. Göç eden hücreler DAPI ile boyanarak Zeiss LSM880 Airyscan konfokal mikroskop ile 10X objektif kullanılarak görüntülendi. Image J programı kullanılarak nükleuslar sayıldı. PLC/PRF/5 ve Hep3B hücrelerinde Plexin C1'in baskılanması ile hücrelerin 48 saat sonunda migrasyon kapasitelerinin arttığı saptanmıştır. Elde edilen bu bulgu, Plexin C1 ifadesinin baskılanması ile hücrelerin mezenkimal fenotip benzeri özellikler kazanıyor hipotezi ile uyumlu bulunmuştur. Mezenkimal fenotip kazanan hücreler hücre polaritesini ve hücre-hücre yapışmasını kaybederek göç ve invaziv özellikler kazanır. shPLKO ve shPLXNC1 hücre klonlarının invazyon kapasitelerindeki fark Transwell invazyon deneyi ile gerçekleştirildi. İnvazyon yapmış olan hücreler DAPI ile boyanarak Zeiss LSM880 Airyscan konfokal mikroskop ile 10X objektif kullanılarak görüntülendi. Image J programı kullanılarak nükleuslar sayıldı. İnvazyon deneyleri sonucunda Plexin C1 ifadesinin baskılandığı PLC/PRF/5 ve Hep3B hücrelerinde invazyon gösteren hücrelerin kontrol hücre klonlarına göre anlamlı derecede arttığı saptandı.

Bu bulgu, PlexinC1'in baskılandığı hücrelerde gelişen mezenkimal fenotip ile örtüşmektedir. Ayrıca, shPLXNC1 klonlarının artmış migrasyon davranışı ile de uyum içindedir. PLC/PRF/5 ve Hep3B shPLXNC1 klonlarında PLXNC1 yokluğunda hücrede değişen durumları açıklamak için proliferasyon, migrasyon ve invazyon deneyleri dışında akım sitometrisi ile hücre döngüsü analizi gerçekleştirildi. PI (propidium iyodür) ile boyanan hücre klonları BD Accuri C6 FACS ile analiz edildi. Özellikle Hep3B hücrelerinde daha çarpıcı bir şekilde görüldüğü gibi shPLXNC1 klonları kontrol shPLKO klonlarına göre G1 ve S fazlarında duraksamaya uğramakta ve G2/M fazına çok daha az hücre ilerleyebilmektedir. İnsan kanserlerinin genetik analizi, olgularının çoğunda G1/S kontrol noktasında yer alan proteinlerin inaktive olduğunu göstermektedir. p16 ve pRb inaktivasyonu (G1 fazında görev alırlar.), Cdk/siklin inhibitörlerinin yüksek ekspresyonu hücre döngüsünün durmasına neden olur. Cdk1 aktivasyonuna eşlik eden proinflatuar sitokin TNFa'nın etkisi ile ECM bozulur ve hücre invaziv özellik kazanır [45]. Bu literatür bilgileri kapsamında, elde ettiğimiz hücre döngüsü analizi sonucunun proliferasyon migrasyon ve invazyon deneyleri ile tutarlı olduğu gözlemlenmektedir.

Hücre-hücre veya hücre-ECM bağlanmasındaki bozulma, 'anoikis' olarak adlandırılan bir tür programlı hücre ölümüne yol açar. Anoikis, fizyolojik veya patolojik koşullar altında yanlış yerleşmiş veya ayrılmış hücrelerin ortadan kaldırılması için doku homeostazını sağlayan bir mekanizmadır. Kanser

hücrelerindeki anoikis, hücrelerin diğer bölgelere metastazını geciktirir; ancak genellikle kanser hücreleri anoikise direnç kazanır ve invaziv hale gelirler [27]. Bu tez kapsamında, Plexin C1 yokluğunda karaciğer kanser hücrelerinde anoikise direnç gelişimi incelendi. Anoikise direncin belirlenmesi amacıyla düşük bağlanma kapasiteli plakalara ekilen hücreler AnnexinV/7AAD ile boyandı ve BD Accuri C6 FACS ile analiz edildi.

Literatürde EMT programı aktif olan metastatik hücrelerde apoptoza ve anoikise direnç görülmektedir. Plexin C1 baskılanmış hücre klonlarının da EMT geçirdiği daha önceki çalışmalarda gösterildi. Buna bağlı olarak, akım sitometrisi ile yapılan analizde PLC/PRF/5 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre PLXNC1'in baskılandığı durumda hücrelerde anoikis direnci görünmekte ve sağlıklı hücre düzeyi %9,1'den %39,8'e yükselmektedir. Buna karşın, Hep3B hücre klonlarında PLXNC1 ifadesine bağlı bir anoikis direnci gözlenmemiştir.

PLXNC1 ifadesinin HCC hücrelerinin kinaz inhibitörlerine yanıtındaki rolünü anlayabilmek için kanser de kullanılan çoklu kinaz inhibitörleri çalıştığımız hücre klonlarına belirli dozlarda uygulandı ve hücre proliferasyonuna etkisi incelendi. Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib uygulanan PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarında hücre canlılığı 72.ci saatte WST-1 yöntemiyle araştırıldı. Elde edilen değerler kullanılarak yüzde canlılık (IC_{50}) oranları Graphpad prism 5 ile Two-way Anova kullanılarak hesaplandı. 72 saat boyunca çoklu kinaz inhibitörlerinin farklı dozlarına maruz bırakılan PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarından sadece PLC/PRF/5 hücre klonlarının Sorafenib yanıtındaki fark anlamlı bulundu. Bunun dışındaki ilaçlar için saptanan değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunamamakla birlikte Regorafenib'in shPLXNC1 klonlarında daha yüksek IC_{50} değeri göstermiş olması önemlidir. Aslında, tüm ilaçlar her iki hücrenin klonlarında anti-proliferatif etkiye sahip olup, sadece Sorafenib shPLXNC1 ve shPLKO klonları arasında anlamlı bir fark göstermektedir. Lenvatinibte ise klonlar arasında IC_{50} değerleri açısından bir fark bulunmamaktadır. Bu durum Lenvatinib'in uygulanan dozlarda en düşük anti-proliferatif etki göstermiş olmasıyla da uyumludur. Ayrıca, ilaç direncinin epigenetik değişiklikler, tümör çevresi, hücre ölümünün düzenlenmesi ve hücre içi transport sistemi gibi birçok faktöre bağlı karmaşık bir süreç olduğu göz önüne alındığında, özellikle Sorafenib ve Regorafenib'e karşı shPLXNC1 klonlarının daha dirençli bir eğilim göstermeleri önümüzdeki dönemlerde bu ilaçlarla yapılacak çalışmalar açısından umut verici bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Çoklu kinaz inhibitörlerinin PLXNC1 yokluğunda HCC hücrelerindeki apoptoz yanıtı da incelendi. PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarına belirlenen IC₅₀ değerlerine göre Sorafenib, Regorafenib ve Lenvatinib uygulandı. PLXNC1'in baskılandığı durumda hem PLC/PRF/5 hem de Hep3B hücre klonlarında daha az PARP kesimi ile apoptoza karşı direnç saptandı. Bu durumun da PLXNC1'in baskılandığı hücre klonlarının gösterdiği mezenkimal fenotipten kaynaklandığı değerlendirildi. Literatürde aktif EMT programının ilaç direncini artırdığı bildirilmiştir; ancak tek başına EMT programı veya PLXNC1'in hücrede baskılanmış olması ilaç direnci oluşmasında yeterli değildir [42]. Bu nedenle, apoptoz yanıtına direnç olup olmadığını belirleyebilmek için AnnexinV/7AAD ve TMRE boyaması yapıldı. PLC/PRF/5 shPLXNC1 ve Hep3B shPLXNC1 hücre klonlarında apoptotik hücre oranı shPLKO klonlarına göre hem Annexin V/7-AAD hem de TMRE boyamasında daha düşük bulunmuş ve PlexinC1 baskılanmasının hücrelerde apoptoza karşı direnç sağladığı gösterilmiştir. Bu bulgular, PLXNC1'in HCC'de uygulanan kinaz inhibitörleri tedavisinin yönetiminde potansiyel bir moleküler belirteç olabileceğine işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Anand P., Kunnumakkara A. B., Sundaram C., Harikumar K. B., Tharakan S. T., Lai O. S., Sung B., Aggarwal B. B., (2008), "Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes", *Pharm Res*, 25 (9), 2097-2116.
- [2] Wong C. M., Ng I. O., (2008), "Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma", *Liver Int*, 28 (2), 160-174.
- [3] Kalluri R., Weinberg R. A., (2009), "The basics of epithelial-mesenchymal transition", *J Clin Invest*, 119 (6), 1420-1428.
- [4] Odabas G., Cetin M., Turhal S., Baloglu H., Sayan A. E., Yagci T., (2018), "Plexin C1 Marks Liver Cancer Cells with Epithelial Phenotype and Is Overexpressed in Hepatocellular Carcinoma", *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 4040787.
- [5] Regad T., (2015), "Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer", *Cancers (Basel)*, 7 (3), 1758-1784.
- [6] Mirshafiey A., Ghalamfarsa G., Asghari B., Azizi G., (2014), "Receptor Tyrosine Kinase and Tyrosine Kinase Inhibitors: New Hope for Success in Multiple Sclerosis Therapy", *Innov Clin Neurosci*, 11 (7-8), 23-36.
- [7] Srivastava S., Koay E. J., Borowsky A. D., De Marzo A. M., Ghosh S., Wagner P. D., Kramer B. S., (2019), "Cancer overdiagnosis: a biological challenge and clinical dilemma", *Nat Rev Cancer*, 19 (6), 349-358.
- [8] Lemmon M. A., Schlessinger J., (2010), "Cell signaling by receptor tyrosine kinases", *Cell*, 141 (7), 1117-1134.
- [9] Burkhardt D. L., Sage J., (2008), "Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene", *Nat Rev Cancer*, 8 (9), 671-682.
- [10] Witsch E., Sela M., Yarden Y., (2010), "Roles for growth factors in cancer progression", *Physiology (Bethesda)*, 25 (2), 85-101.
- [11] Artandi S. E., DePinho R. A., (2010), "Telomeres and telomerase in cancer", *Carcinogenesis*, 31 (1), 9-18.
- [12] Ferrara N., (2009), "Vascular endothelial growth factor", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29 (6), 789-791.
- [13] Curto M., Cole B. K., Lallemand D., Liu C. H., McClatchey A. I., (2007), "Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin", *J Cell Biol*, 177 (5), 893-903.
- [14] Hanahan D., Weinberg R. A., (2011), "Hallmarks of cancer: the next generation", *Cell*, 144 (5), 646-674.

- [15] Llovet J. M., Kelley R. K., Villanueva A., Singal A. G., Pikarsky E., Roayaie S., Lencioni R., Koike K., Zucman-Rossi J., Finn R. S., (2021), "Hepatocellular carcinoma", *Nat Rev Dis Primers*, 7 (1), 6.
- [16] El-Serag H. B., Rudolph K. L., (2007), "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis", *Gastroenterology*, 132 (7), 2557-2576.
- [17] Balogh J., Victor D., 3rd, Asham E. H., Burroughs S. G., Boktour M., Saharia A., Li X., Ghobrial R. M., Monsour H. P., Jr., (2016), "Hepatocellular carcinoma: a review", *J Hepatocell Carcinoma*, 3, 41-53.
- [18] Llovet J. M., Schwartz M., Mazzaferro V., (2005), "Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma", *Semin Liver Dis*, 25 (2), 181-200.
- [19] Llovet J. M., Brú C., Bruix J., (1999), "Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification", *Semin Liver Dis*, 19 (3), 329-338.
- [20] Haq S., Michael A., Andreucci M., Bhattacharya K., Dotto P., Walters B., Woodgett J., Kilter H., Force T., (2003), "Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (8), 4610-4615.
- [21] Downward J., (1998), "Ras signalling and apoptosis", *Curr Opin Genet Dev*, 8 (1), 49-54.
- [22] Sun E. J., Wankell M., Palamuthusingam P., McFarlane C., Hebbard L., (2021), "Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Hepatocellular Carcinoma", *Biomedicines*, 9 (11).
- [23] Chen X., Cheung S. T., So S., Fan S. T., Barry C., Higgins J., Lai K. M., Ji J., Dudoit S., Ng I. O., Van De Rijn M., Botstein D., Brown P. O., (2002), "Gene expression patterns in human liver cancers", *Mol Biol Cell*, 13 (6), 1929-1939.
- [24] Scheau C., Badarau I. A., Costache R., Caruntu C., Mihai G. L., Didilescu A. C., Constantin C., Neagu M., (2019), "The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma", *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2019, 9423907.
- [25] Zhang J. G., Zhang D. D., Liu Y., Hu J. N., Zhang X., Li L., Mu W., Zhu G. H., Li Q., Liu G. L., (2019), "RhoC/ROCK2 promotes vasculogenic mimicry formation primarily through ERK/MMPs in hepatocellular carcinoma", *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1865 (6), 1113-1125.
- [26] Son H., Moon A., (2010), "Epithelial-mesenchymal Transition and Cell Invasion", *Toxicol Res*, 26 (4), 245-252.

- [27] Adeshakin F. O., Adeshakin A. O., Afolabi L. O., Yan D., Zhang G., Wan X., (2021), "Mechanisms for Modulating Anoikis Resistance in Cancer and the Relevance of Metabolic Reprogramming", *Front Oncol*, 11, 626577.
- [28] Frantz C., Stewart K. M., Weaver V. M., (2010), "The extracellular matrix at a glance", *J Cell Sci*, 123 (Pt 24), 4195-4200.
- [29] Sonbol H. S., (2018), "Extracellular Matrix Remodeling in Human Disease", *J Microsc Ultrastruct*, 6 (3), 123-128.
- [30] Du Z., Lovly C. M., (2018), "Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer", *Mol Cancer*, 17 (1), 58.
- [31] McGlade J., Cheng A., Pelicci G., Pelicci P. G., Pawson T., (1992), "Shc proteins are phosphorylated and regulated by the v-Src and v-Fps protein-tyrosine kinases", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (19), 8869-8873.
- [32] Gauthier A., Ho M., (2013), "Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update", *Hepatol Res*, 43 (2), 147-154.
- [33] He A. R., Goldenberg A. S., (2013), "Treating hepatocellular carcinoma progression following first-line sorafenib: therapeutic options and clinical observations", *Therap Adv Gastroenterol*, 6 (6), 447-458.
- [34] Fala L., (2015), "Lenvima (Lenvatinib), a Multireceptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Approved by the FDA for the Treatment of Patients with Differentiated Thyroid Cancer", *Am Health Drug Benefits*, 8 (Spec Feature), 176-179.
- [35] Stjepanovic N., Capdevila J., (2014), "Multikinase inhibitors in the treatment of thyroid cancer: specific role of lenvatinib", *Biologics*, 8, 129-139.
- [36] Goel G., (2018), "Evolution of regorafenib from bench to bedside in colorectal cancer: Is it an attractive option or merely a "me too" drug?", *Cancer Manag Res*, 10, 425-437.
- [37] Deng S., Solinas A., Calvisi D. F., (2021), "Cabozantinib for HCC Treatment, From Clinical Back to Experimental Models", *Front Oncol*, 11, 756672.
- [38] Alto L. T., Terman J. R., (2017), "Semaphorins and their Signaling Mechanisms", *Methods Mol Biol*, 1493, 1-25.
- [39] Hu S., Zhu L., (2018), "Semaphorins and Their Receptors: From Axonal Guidance to Atherosclerosis", *Front Physiol*, 9, 1236.
- [40] Scott G. A., McClelland L. A., Fricke A. F., Fender A., (2009), "Plexin C1, a receptor for semaphorin 7a, inactivates cofilin and is a potential tumor suppressor for melanoma progression", *J Invest Dermatol*, 129 (4), 954-963.

- [41] Marin J. J. G., Macias R. I. R., Monte M. J., Romero M. R., Asensio M., Sanchez-Martin A., Cives-Losada C., Temprano A. G., Espinosa-Escudero R., Reviejo M., Bohorquez L. H., Briz O., (2020), "Molecular Bases of Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma", *Cancers (Basel)*, 12 (6).
- [42] Du B., Shim J. S., (2016), "Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer", *Molecules*, 21 (7).
- [43] Song K. A., Faber A. C., (2019), "Epithelial-to-mesenchymal transition and drug resistance: transitioning away from death", *J Thorac Dis*, 11 (6), E82-e85.
- [44] Xue Y., Zhang L., Zhu Y., Ke X., Wang Q., Min H., (2019), "Regulation of Proliferation and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) of Gastric Cancer by ZEB1 via Modulating Wnt5a and Related Mechanisms", *Med Sci Monit*, 25, 1663-1670.
- [45] Corlu A., Loyer P., (2012), "Regulation of the G1/S transition in hepatocytes: involvement of the cyclin-dependent kinase cdk1 in the DNA replication", *Int J Hepatol*, 2012, 689324.

ÖZGEÇMİŞ

Şevval DİK, 2019 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden mezun oldu. Aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Tamer Yağcı danışmanlığında yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek Lisans eğitimi boyunca TÜBİTAK 1001 projesinde yüksek lisans bursiyeri ve ASELSAN Biyogüvenliğe Yönelik Teşhis Teknolojileri Geliştirilmesi başlıklı projede araştırmacı yüksek lisans öğrencisi olarak çalıştı.



EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Dik Ş., Güngör Topçu G., Şeker M., Bahçekapılı M., Yağcı T., Odabaş G., Çetin M., (2021), “Investigation of the effect of PLEXINC1 expression on multi-kinase inhibitory response in liver cancer cells”, 5. GTÜ Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Kocaeli, Türkiye, 10-11 Haziran.

