T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARACİĞER KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE SIP1 GEN İFADESİNİN ANALİZİ

METİN ÇETİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2013

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK ve FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARACİĞER KANSERİ KÖK HÜCRELERİNDE SIP1 GEN İFADESİNİN ANALİZİ

METİN ÇETİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2013

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ	YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 17.06.2013 tarih ve 2013/32 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 16/07/2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Metin ÇETİN'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. Ayşegül KARAHASAN
ÜYE	: Yrd. Doç. Dr. Nil SAYDAN

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Kanser kök hücre (CSC) kavramı, bu hücrelerintümör oluşumu, tümör kitlesinin devamlılığı, metastaz vekonvansiyonel tedavilerin ardından tümör nüksü ile ilişkili rolünden dolayı tümör biyolojisinde yoğun bir araştırma alanıdır. Metastazı düzenleyen epitel-mezankim dönüşümü (EMT) programının kanser kök hücrelerinde de etkinleştiği yakın zamandaki çalışmalarla ortaya konmuştur. Kanser kök hücrelerinde EMT-indükleyen transkripsiyon faktörlerinin gen ifadelerindeki artış meme kanserlerinde gösterilmiş, ancak diğer kanserler bağlamında böyle bir ilişki henüz net olarak tanımlanmamıştır. Bu çalışmada, hepatoselülerkarsinoma (HCC) hücre hatlarındaki CSC'lerindebaşta SIP1 olmak üzere, EMT-indükleyicilerinin davranışlarının aydınlatılması planlanmıştır.

PLC/PRF/5 HCC hücre hattındaki CD133/CD44 ikili pozitif alt-hücre grubundaEMT, kemoterapiye direnç ve karaciğer kök/öncü hücre fenotipini düzenleyen genlerin ifadeleri qRT-PCR ile parental hücre grubuna görekarşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

CSC'lerinde araştırılan EMT-indükleyici transkripsiyon faktörlerinden *SIP1* ve *ZEB1'*inparental hücrelere göre azalmış gen ifadelerine karşın *SNAIL* ve *TWIST*'in artmış gen ifadeleri bulunmuştur. Bu ikili-pozitif hücre alt-grubu, artmış *CK19*gen ifadesi ile karaciğer kök/öncü hücre karakteristiği göstermiştir. Kemoterapiye direnç ile ilişkili olan *CEACAM6* ve *BCRP1* gen ifadelerindeki artış $CD133^{+}CD44^{+}$ alt-popülasyonunun kök hücre fenotipini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler:Kanser Kök Hücresi, **Epitel-mezenkim Dönüşümü**, **SIP1**, **Akım Sitometresi.**

SUMMARY

The concept of cancer stem cells (CSCs) is an intensive area of research in tumor biology due to the role of these cells in tumorigenesis, maintainance of the tumor mass, metastasis and tumor relapse after conventional therapies. Recent investigations have revealed that epithelial to mesenchymal transition (EMT), which regulates metastasis, also is activated in cancer stem cells. Overexpression of EMT-inducing transcription factors in cancer stem cells was shown in breast cancer, but such a relationship has not been yet clearly defined in the context of other cancers. This study was planned to clarify the behavior of EMT-inducers, particularly SIP1, in CSCs from hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines.

The expression of genes that regulate EMT, resistance to chemotherapy and liver stem/progenitor cell phenotype was analyzed by qRT-PCR in CD133/CD44 double positive sub-group from PLC/PRF/5 HCC cell line with respect to parental cells.

Among studied EMT-inducing transcription factors *SIP1* and *ZEB1* were down-regulated, but *SNAIL* and *TWIST* were found to be over expressed in cells compared to parental cells. This double-positive sub-group of cells showed liver stem/progenitor cell characteristics as evidenced by the increased expression of *CK19*. Increased expression of *CEACAM6* and *BCRP1* genes, which are associated with resistance to chemotherapy, further supported the stemness phenotype of $CD133^{+}CD44^{+}$ sub-population.

Keywords:Cancer Stem Cell (CSC), **Epitelial-mesenchymal Transition (EMT)**, **SIP1**, **Flow Cytometry.**

TEŞEKKÜR

Tez çalışmama başlamamda ve deney süreçlerindebilgisini, anlayışını ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, maddi ve manevi desteklerinden dolayı tez danışmanım ve bölüm başkanımızProf. Dr. Tamer YAĞCI'ya; bilgisi ve deneyimi ile akım sitometresi çalışmalarımda yardımcı olanProf. Dr. Günnur DENİZ'e;

Akım sitometresi ile hücre izolasyonunda her türlü soruma sıkılmadan cevap veren ve cihazı kullanmadaki bilgi ve deneyimiyle çalışmamın sonuçlanmasını sağlayan Abdullah YILMAZ ve çalışmamın başında yardımcı olan Dr. Suzan ADIN ÇINAR'a;

Yardım istemekten hiçbir zaman çekinmediğim ve bana destek olan, laboratuvar arkadaşlarım Uzm. Biyolog Pelin BALÇIK ERÇİN, Uzm. İrem YALIM CAMCI, Arş. Gör. Görkem ODABAŞ ve Arş. Gör. Serhat AKIN'a;Tez dönemim boyunca her türlü yardımlarını esirgemeyen ve destekleri ile yanımda olan Arş. Gör. Dr. Mine GÜL ŞEKER,Arş. Gör. Zeynep GİRGİN ERSOY ve eşi Tolga ERSOY, Arş. Gör. Dr. Tuğrul DORUK, Arş. Gör. Meryem TOPÇU,Esra KAYA, Elif SIRMA,Aybike YEDEKÇİ, Ceyda KETENCİ, Güler TOPRAK, Şerif YILMAZ, Tuğba KORKMAZ, Zeynep DEMİR ve Zişan ASAL KILIÇile Veysel SÜZERER'een içten sevgi ve teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

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

Bu tez çalışması 2010 yılı bursiyeri olarak TÜBİTAK BİDEB-2210 Yurtiçi Yüksek Lisans Burs programı ve 111S484 numaralı Tübitak projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. HEPATOSELÜLER KARSİNOMA	3
2.1. Hepatoselüler Karsinomada Risk Faktörleri	3
2.1.1. HCV	3
2.1.2. HBV	4
2.1.3. Aflatoksinler	5
2.1.4. Alkol	5
3. KANSER OLUŞUM TEORİLERİ	7
3.1. Kanser Kök Hücreleri	8
3.1.1. Hepotoselüler Karsinomada Kanser Kök Hücre Belirteçleri	10
3.1.1.1. İmmünolojik Belirteçler	10
3.1.1.1.1.CD133	10
3.1.1.1.2. CD44	11
3.1.1.1.3. Thy-1 (CD90)	11
3.1.1.1.4. EpCAM (TACSTD1, ESA)	12
3.1.1.1.5. CD13	12
3.1.1.2. Fonksiyonel Belirteçler	13
3.1.1.2.1. İkincil Popülasyon Yaklaşımı	13
3.1.1.2.2. ALDEFLUOR-Yaklaşımı (ALDH Aktivitesi)	14
4.TGF-B SİNYAL YOLAĞI	15
4.1.Epitel-Mezenkim Dönüşümü	16
4.1.1.Kanser Kök Hücresi ve Epitel Mezenkim-Dönüşümü	18

4.2.SIP1 Transkripsiyon Faktörleri 19
4.2.1.Kanser Kök Hücrelerinde SIP1 22
4.2.2.Hepatoselüler Karsinomada SIP1 22
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER 23
5.1. Gereçler 23
5.1.1. Kullanılan Kimyasallar 23
5.1.2. Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri 23
5.1.3. Kullanılan Kitler 23
5.1.4. Kullanılan Hücre Hattı 23
5.1.5. Kullanılan Çözeltiler 24
5.1.6. Kullanılan Antikorlar ve Solüsyonlar 24
5.1.7. Kullanılan Boya ve İnhibitör 25
5.1.8. Kullanılan Cihazlar 25
5.2. Yöntemler 25
5.2.1. Hücre Çözme İşlemi 25
5.2.2. Hücre Kültürü 26
5.2.3. Hücre Dondurma İşlemi 26
5.2.4. Akım Sitometresi ile Hücre Analizi ve İzalasyonu 26
5.2.4.1. SP Hücre Analizi 26
5.2.4.2. $CD133^{+}CD44^{+}$ Hücre Analizi ve İzolasyonu 27
5.2.5. İzole Edilen Hücrelerden RNA İzolasyonu 28
5.2.6. cDNA Sentezi 28
5.2.7. qRT-PCR ile Gen İfadesi Analizi 29
6. BULGULAR 33
6.1. Akım Sitometresi ile Hücre Analizi ve İzalasyonu 33
6.1.1. SP Hücre Analizi 33
6.1.2. CD133/CD44 İkili Pozitif Hücre Analizi ve İzolasyonu 34
6.1.2.1. HuH7 Hücre Hattında $CD133^{+}CD44^{+}$ Hücre Analizi ve İzolasyonu 34
6.1.2.2. PLC/PRF/5 Hücre Hattında CD133+CD44+ Hücre Analizi ve İzolasyonu 35
6.1.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi 36
6.1.4. qRT-PCR ile Gen İfadesi Analizi 36
6.1.4.1. HuH7 Hücre Alt-Gruplarında *SIP1* İfadesinin Analizi 36

6.1.4.2. PLC/PRF/5 Hücre Alt-Gruplarında *SIP1* İfadesinin Analizi 37
6.1.4.3. PLC/PRF/5 Hücre Alt-Gruplarında *ZEB1*, *SNAIL* ve *TWIST* Gen İfadelerinin Analizi 37
6.1.4.4. PLC/PRF/5 Hücre Alt-Gruplarında *BCRP1* ve *CEACAM6* Gen İfadelerinin Analizi 38
6.1.4.5. PLC/PRF/5 Hücre Alt-Gruplarında *CK19* Gen İfadesiAnalizi 39
7. TARTIŞMA ve SONUÇ 41
8. ÖNERİLER 45

KAYNAKLAR 46
ÖZGEÇMİŞ 56

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler veAçıklamalar

Kısaltmalar

~	:Yaklaşık
Da	: Dalton
Dk	: Dakika
EDTA	: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin
L	: Litre
M	: Molar
mL	:Mililitre
mM	: Milimolar
nM	: Nanomolar
NaCl	: Sodyum Klorür
Ng	: Nanogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ALDH	: Aldehit Dehidrogenaz
APC	: Allofikosiyanin
BCRP11	: Meme Kanseri Direnç Proteini 1
bHLH	: Bazik Sarmal-Dönüş-Sarma
Bmi 1	: Polycomb Halka-Parmak Onkogen
BMP	: Kemik Morfogenetik Protein
CD	: Farklılaşma Kümesi(Cluster)
Ceacam6	: Karsinoembriyojenik Antijen ile İlişkili Hücre Adhezyon Molekülü6
ceRNA	: Yarışmacı Endojenik RNA
CK19	: Sitokeratin 19
CSC	: Kanser Kök Hücresi
CYP3a4	: Sitokrom P4503a4
DCV	: Dyecycleviolet
DMEM	: Dulbecco Modifiye Besiyeri
EMT	: Epitel-Mezenkim Dönüşümü

Erk	: Mitojen ile Active Olan Protein Kinaz
FBS	: Fötal Dana Serumu
FSC	: Forward Scatter
FTC	: Fumitrimorgin C
GAPDH	: Gliseralaldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
HCL	: Hidroklorik Asit
HBV	: Hepatit B Virüs
HBSS	: Hawk'ın Dengeli Tuz Solüsyonu
HCC	: Hepatoselüler Karsinoma
HCV	: Hepatit C Virüs
HIV	: Insan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HMLE	: Ölümsüz Insan Meme Epitel Hücreleri
HRAS	: Transforming Protein P21
KLF4	: Kruppel-Benzeri Faktör 4
MDCK	: Madin-Darby Canine Kidney
MET	: Mezenkim-Epitel Dönüşümü
miR-	: Mikrorna
miRNA	: Mikrorna
MH2	: Mad Homoloji 2
MMP	: Matriks Metalloproteazları
NOD/SCID	: Obez-Olmayan Diyabetik
NURD	: The Nucleosome Remodelling and Histone Deacetylase
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PE	: Fikoeritrin
qRT-PCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RPM	: Dakika Başına Dönüş
SBD	: Smad-Bağlanma Domaini
SIP1	: Smad İle Etkileşen Protein 1
siRNA	: Küçük-İnterferaz-Rna
shRNA	: Kısa Saç Tokası-Rna
SP	: İkincil Popülasyon
SOX2	: Sry (Sex Determining Region Y)-Box 2

SSC	: Side Scatter
SSC-A	:Side Scatter-Alan
SSC-H	: Side Scatter-Yükseklik
TGF-β	: Transforme-Edici Büyüme Faktörü Beta
TNF-α	: Tümör Nekrosis Factor Alfa
Tris	: Tris (Hidroksimetil) Aminometan
UV	: Ultraviole
ZEB	: Zinc Finger E-Box-Binding Homeobox 1
7AAD	: 7 Aminoaktinomisin D

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:	**Sayfa**
1.1: Stokastik model ile kanser kök hücre modelinin karşılaştırılması.	7
4.1:TGF-β sinyal iletimi.	16
4.2: Epitel-mezenkim dönüşümü.	17
4.3: Kanser Sürecinde EMT'nin rolü.	18
4.4: ZEB1 ve SIP1 proteinleri.	19
6.1: HuH7 hücre hattında SP hücre analizi.	33
6.2: HuH7 hücre hattında CD133/CD44 ikili boyanması.	34
6.3: PLC/PRF/5 hücre hattında CD133/CD44 ikili boyanması.	35
6.4:PLC/PRF/5 $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda SIP1 gen ifadesi.	37
6.5: PLC/PRF/5 $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda ZEB1, SNAIL ve TWIST gen ifadeleri.	38
6.6: PLC/PRF/5 $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda *BCRP1* ve *CEACAM6* gen ifadeleri.	39
6.7: PLC/PRF/5 $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda CK*19* gen ifadesi.	40

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:	**Sayfa**
1.1: Kanser Kök Hücresi ve Normal Kök Hücrenin Ortak Özellikleri.	8
1.2: Tümördeki Heterojenite ile ilgili Senaryolar.	9
5.1: Bu çalışmada kullanılan antikorlar ve floresan işaretleri.	24
5.2: RNA/Primer/dNTP karışımı.	29
5.3: RT karışımı.	29
5.4: qRT-PCR reaksiyon tablosu.	30
5.5:Çalışmada kullanılan ileri ve geri primerler.	30
5.6: qRT-PCR döngü şartları.	31
5.7: Primer etkinliği.	31

1.GİRİŞ

Kanser, fenotipik ve fonksiyonel özellikleri bakımından heterojen hücrelerden oluşmaktadır. Bu heterojeniteyi açıklayan "kanser kök hücre" teorisine göre kanser dokusu içerisindeki hücrelerden sadece küçük bir popülasyon olan kanser kök hücreleri (CSC) kendini yenileme ve kanser dokusundaki diğer hücrelere farklılaşma özellikleri ile tümör oluşumunu ve tümörün devamlılığını sağlamaktadır. Diğer yandan, kanser olgularının büyük çoğunluğunda hastalar komşu veya uzak organ metastazları nedeniyle kaybedilmekte ve metastaz süreci giderek daha iyi anlaşılan EMT programı ile düzenlenmektedir.

Weinbergve arkadaşları, kanser kök hücresi ve epitel-mezenkim dönüşümü (EMT) arasındaki ilişkiyi açıklamıştır. Bu çalışmanın ardından CSC ve EMT ile ilgili çalışmalar yapılmış ve kanser hücrelerinde EMT programının indüklenmesi ile hücrelerin CSC özelliği kazandığı gösterilmiştir. Ancak EMT-indükleyici transkripsiyon faktörlerinden olan SIP1'in kanser kök hücresindeki rolü ile ilgili çalışmalar kısıtlı kalmıştır.

Hepatoselüler karsinoma (HCC) primer karaciğer kanserleri arasında birinci sırada olup kanser ile ilişkili ölümlerde ise üçüncü sıradadır. HCC'da kanser kök hücresi ile ilgili çalışmalar ikincil popülasyon (Side Population: SP) hücre izolasyonu yaklaşımı ile başlamıştır. SP hücre izolasyonunda DNA'ya bağlanan ve UV lazer ile uyarılan Hoechst 33342 boyası kullanılmaktadır.Bu yaklaşımla izole edilen hücrelerin SP-olmayan hücrelere göre yüksek kendini yenileme kapasitesine sahip olduğu ve NOD/SCID farede düşük sayılarda bile tümör oluşturabildiği gösterilmiştir.Ancak, UV lazerin yüksek maliyetli olmasından dolayı akım sitometresi cihazlarının standart donanımında bulunmamaktadır. Bundan dolayı SP hücre izolasyonu çalışmalarında DyeCycleViolet (DCV) boyası da kullanılmaktadır. DCV boyası DNA'ya bağlanan bir boyadır ve 405 nM mor lazer ile uyarılmaktadır. Bazı çalışmalarda Hoechst 33342 boyası ile yapılan SP izolasyonlarına yakın sonuçlar elde edilmesine karşın, etkin ve yaygın kullanımı istenilen düzeyde değidir. Bunun yanında, SP izolasyonunda kullanılan kimyasalların toksik özellikleri nedeniyle hücre yüzey belirteçlerine yönelinmiş ve CD133 bir kanser kök hücre belirteci olarak birçok farklı tümör tipinde tanımlanmıştır. HUH7, Hep3B vePLC/PRF/5 gibi HCC hücre hatlarında yapılan çalışmalar $CD133^{+}$ hücrealt-

grubunun karaciğer kanserinde de bulunduğunu ortaya koymuş ve fare ksenotransplant deneylerinde bu hücrelerin CSC özelliği gösterdiği saptanmıştır. Ancak, CD133+ hücre alt-grubunun tümör oluşturma kapasitesi bakımından değişkenlik göstermeleri CSC'lerinde ifade edilen başka belirteçlerin varlığına işaret etmiştir. Yapılan gen ifadesi çalışmalarında, kök hücre özelliği ile ilişkili olan CD44 anlatımının CD133+ hücrelerde daha fazla olduğunun gösterilmesi ile HCC hücre hatlarından CD133+CD44+ hücreler izole edilmiştir. Bu hücrelerin CD133+CD44- hücrelere göre yüksek tümör oluşturma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. PLC/PRF/5 hücre hattında ise CD133 pozitifliği ile ilgili çalışmalar yapılmış olmasına karşın CD133/CD44 ikili pozitifliği ile ilgili literatürde bilgimiz dahilinde bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, ilk olarak PLC/PRF/5 hücre hattında CSC özelliği gösteren CD133/CD44 ikili pozitif hücreler araştırılmış ve akım sitometrisi ile CD133+CD44+ hücreleri ayrıştırılabilmiştir.İzole edilen CD133+CD44+ hücrelerde CSC ve EMT fenotiplerinin birlikteliği araştırılması amacıyla,*SIP1*ve diğer EMT belirteçlerinden *ZEB1*, *SNAIL*, *TWIST*, karaciğer öncü/ kök hücre belirteci *CK19* ve kemoterapiye direnç belirteçleri *BCRP1* ve *CEACAM6* genlerinin ifadeleri analiz edilmiştir.

2. HEPATOSELÜLER KARSİNOMA

Hepatoselüler Karsinoma (HCC), primer karaciğer kanserlerinin %80-90'nını oluşturmaktadır. HCC dünya genelinde en yaygın altıncıkanser olmakla birlikte kanser ile ilişkili ölümler arasında üçüncüsırada yer almaktadır [Parkin et al., 2001]. HCC'nin en yaygın olduğu yerler Doğu ve Güney-doğu Asya ile Sahra-altı Afrikadır [Kew, 2002], [Bosch et al., 2005]. Dünya genelinde görülen HCC'nin yaklaşık olarak %75-80'i hepatit B virüs ve/veya hepatit C virüs ile oluşan kronikhepatit ile ilişkilidir [Bosch et al., 2005].

Erkeklerde, kadınlara oranla HCC riskidünya genelinde değişmekle birlikte 2-7 kat fazla görülmektedir [Naugler et al., 2007]. Cinsiyetten kaynaklanan bu farklılığın; alkol ve sigara tüketimi gibi çevresel sebeplerile hepatit enfeksiyonunaerkeklerde daha sık rastlanmasından, kadınlarda östrojenin interlökin-6 aracılı inflamasyonu baskılayabilmesinden ve testosteronun erkeklerde karaciğer hücre çoğalmasını uyaran androjen reseptör sinyal yolağına etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir[Yu and Chen, 1993].

2.1. Hepatoselüler Karsinomada Risk Faktörleri

Kronik hepatit B virüs / Hepatit C virüs enfeksiyonu, aşırı alkol tüketimine bağlı karaciğer sirozu ve aflatoksin HCC gelişiminin ana risk faktörlerindendir [el-Serag and Rudolph, 2007].

2.1.1. HCV

Hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonu, Amerika Birleşik Devletleri de dahil çoğunlukla batılı ülkelerde kronik karaciğer hastalıkları ve HCC'nin ana sebebi olarak görülmektedir. HCV'nin bulaşma yöntemleri son derece karmaşıktır. Amerikadaki hepatit enfeksiyonlarının yaklaşık olarak %85'ini oluşturan HCV enfeksiyonu, genellikle damar-içi uyuşturu kullanımı ve cinsel ilişki yoluyla gerçekleşmektedir[Ali and Zein, 2005]. Asya ve Afrikada ise HCC olgularının

sadece %20'si HCV enfeksiyonu ile ilişkili olup, çoğunlukla HBV zeminindeki kronik hepatit ve sirozdan kaynaklanmaktadır[Bosch et al., 1999], [Zhu, 2003].

Hepatit C virüsü *flaviviridae* ailesinden bir RNA virüsüdür. Bu virüsün reverse transkriptaz aktivesi bulunmamakta ve konak genoma kendisini entegre edememektedir [Ikeda et al., 1993], [el-Serag, 2001], [Romeo and Colombo, 2002]. HCV'nin çekirdek proteininin (HCV core protein), proto-onkogen olan c-myc de dahil farklı genler üzerinde transkripsiyonel kontrole sahip olduğu ve normal hücre gelişiminin bozulması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [Ray et al., 1995]. Ayrıca, HCV çekirdek proteininin diğer olası karsinojenik etkisinin apoptoz indükleyicilerindenFas ve tümör nekrosis faktör-alfa'yı (TNF-α) inhibe edebilme yeteneğinden kaynaklandığı düşünülmektedir[Marusawa et al., 1999].

2.1.2. HBV

Hepatit B virüsünün (HBV) dünyada yaklaşık 350 - 400 milyon kişiyi enfekte ettiğibilinmektedir. HBV enfeksiyonu dünya genelinde HCC'nin ana etmenlerinden olup, coğrafi dağılımı itibarıyla da HCC ile uyum göstermektedir[Bosch et al., 2005]. HBV insidansının Asya, Afrika ve Batı Pasifiğin belirli bölgelerinde %8'i aşmış olmasına rağmen Batı Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralyada %2'den daha düşük olduğu bulunmuştur[Maddrey, 2000]. Tayvan'da HBV+ erkeklerde yapılmış olan çalışmalara göre,HBV taşıyıcısı olan hasta bireylerde HBV taşıyıcısı olmayan sağlıklı bireylere oranla HCC oluşma ihtimali 100 kat fazla bulunmaktadır[Beasley et al., 1981].

HCV'nin aksine, HBV *hepadnavirüs* ailesinden olup, kendi DNA'sını konak DNA'sına entegre edebilen tek-zincirli bir DNA virüsüdür. HBV DNA'sının, genomda belirli bir bölgeye entegreolduğu gösterilmemiştir. Bununla beraber HBV DNA'sının entegrasyonu ile proto-onkogenler aktive olabilmekte veya büyümeyi düzenleyen genler baskılanabilmektedir [Lok, 2009]. HBV *X* geni HCC oluşumu ve HBV enfeksiyonunda merkezi rol oynayan HBV X proteinini kodlamaktadır. Bu protein insan hepatositlerinde c-myc ve c-myb gibi onkogenler ile APC, p53 ve p21 gibi tumor-baskılayıcı genlerin anlatımını değiştiren bir transkripsiyon faktörüdür [Huo et al.,2001]. Dünya genelinde teşhisi konulan HCC'lerin %80'ninin HBV enfeksiyonundankaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak kronik HBV taşıyıcılarının

sadece küçük bir kısmında HCC görülmesi diğer faktörlerinde HCC oluşmasında ilişkili olabileceğini düşündürmektedir [McKillop et al., 2006]. Buna ek olarak,HBV'ye eklenen HIV enfeksiyonunun HCC görülmesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir [Hu and Ludgate, 2007].

2.1.3. Aflatoksinler

Aspergillus flavus ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen bir mikotoksin olan aflatoksin doğal bir karsinojen olarak kabul edilmektedir [Smela et al., 2001], [Henry *et al*., 2002]. Fındık ve tahılların sıcak ve nemli koşullarda saklanması sonucunda küf oluşması özellikle Asya ve Sahra-altı Afrika'da yaygın olarak görülmektedir. Aflatoksin B1'in hepatosit DNA'sına zarar verebilmesi için mikotoksin metabolitinhepatik sitokrom p450 tarafından ekzo-8,9-epoksidine dönüştürülmesi gerekmektedir. Dönüşüm sonrasında oluşan ekzo-8,9-epoksid hepatosit DNA'sındaki guanin nükleotidiyle etkileşerek bileşik oluşturabilmektedir. Bu eklenen bileşikler ve ikincil DNA-lezyonları kalıtımsal genetik bilgiyi değiştirerek hepatositlerin transforme olmasına neden olmaktadır [Smela et al., 2001].

Ayrıca Aflatoksin B1'in özgün p53 mutasyonu ve HRAS gibi onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [Ozturk, 1991], [Riley et al., 1997]. Aflatoksin B1 ve HBV enfeksiyonu birlikte sinerjik bir etki yapmaktadır. Her iki ajana damaruz kalan bireylerde, bu faktörlerden sadece biriyle etkilenmiş bireylere oranla HCC gelişme riski 5-10 kat artmaktadır [Kew, 2003].

2.1.4. Alkol

Alkol tüketimi önemli bir HCC risk faktörüdür. Kronik ve aşırı alkol tüketimi ile hepatik hastalıklar arasındaki güçlü korelasyon yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir[McKillop and Schrum, 2005].

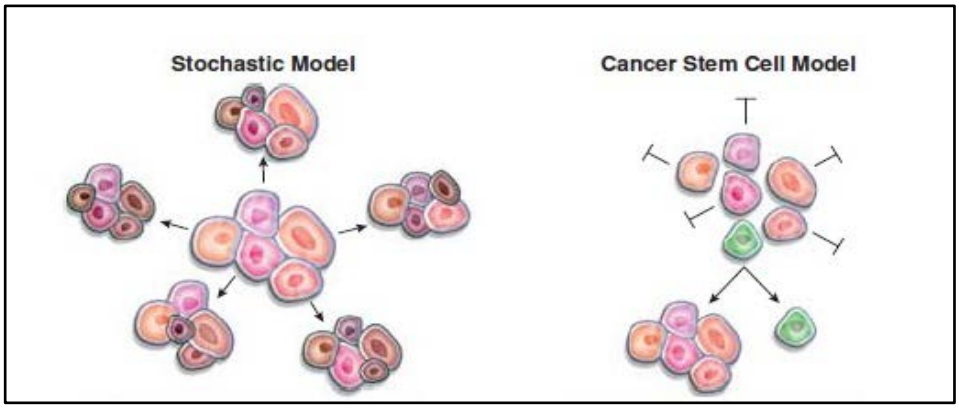
Kronik ve aşırı alkol tüketimi öncü-inflamatuar sitokinlerin üretimi aracılığıyla monosit aktivasyonuna neden olmakta ve hepatosit sağ-kalımı üzerine etkisi olan endotoksin ve aktif kupffer hücrelerinin çoğalmasınıuyarmaktadır. Bu da hepatositler

üzerinde sitotoksik etki meydana getirerek stellate hücre aktivasyonu, siroz ve HCC'ya neden olmaktadır [Farazi and DePinho, 2006].

Ayrıca alkol tüketimi karaciğere oksidatif stres mekanizması aracılığıyla da zarar vetmektedir[Morgan et al., 2004].

3. KANSER OLUŞUM TEORİLERİ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile karakterize edilen bunun sonucunda da fonksiyonel ve morfolojik olarak heterojenite görülen bir olgudur [Visvader and Lindeman, 2008]. Tümör oluşumunu açıklamak için birbirine zıt iki görüş bulunmaktadır. Klasik stokastik model ya da "Klonal Evrim Modeli" [Nowell, 1976], tek bir hücrenin rasgele ve eklenen genetik mutasyonlar ile ard arda klonal seçilimi sonucunda bir grup hücrenin tümörü oluşturduğunu öne sürülmektedir.Bu teoride, tümör dokusundaki her hücre biyolojik olarak homojendir ve eşit derecede tümör oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Buna karşın, Kanser Kök Hücre Modeli ya daTümör-Başlatıcı Hücre (Tumor-Initiating Cells) teorisine göre ise, tümör farklı hücresel hiyerarşiye sahip heterojen hücre popülasyonundan oluşmaktadır. Bu tümör hiyerarşisi içerisinde yer alan küçük bir hücre alt-grubu, yani kanser kök hücreleri kendini yenileme, öncül-hücrelere farklılaşma ile tümör oluşumunu başlatma ve devam ettirme yeteneğine sahiptir [Lobo et al., 2007].



Şekil1.1: Stokastik model ile kanser kök hücre modelinin karşılaştırılması.

Stokastik model de tümör dokusundaki her hücre tümörojenik olabilmektedir. Kanser kök hücresi modelinde ise sadece küçük bir grup hücre kendini yenileme, farklılaşma ve tümör oluşturabilme kapasitesine sahiptir (Şekil 1.1).

3.1. Kanser Kök Hücreleri

Tümör fentotipik ve fonksiyonel olarak heterojen kanser hücreleri içermektedir [Nowell, 1976]. Her ne kadar kanser kök hücre teorisinin geçmişi çok uzun yıllara [Hamburger and Salmon, 1977] dayanıyor olsada,akım sitometresinin kullanılmaya başlanması ile fenotipik olarak farklı kanser hücre alt-popülasyonlarının izole edilerek tümörojenik potansiyellerinin karşılaştırılması mümkün olmuştur.1997 yılındaDick ve arkadaşları hematolojiktümörlerde kök hücrelere dair ilk kanıtları elde etmiştir[Bonnet and Dick, 1997].

Yapılan çalışmalar ile kanser kök hücresi ve normal kök hücre arasında ortak özelliklerin bulunduğu gösterilmiştir (Tablo 1.1).

Tablo 1.1: Kanser kök hücresi ve normal kök hücrenin ortak özellikleri

Yüksek derecede kendini yenileme kapasitesi
Artmış farklılaşma ve heterojen gruplar oluşturabilme yeteneği
İlaçlara, toksinlere ve radyasyona karşı dirençli olma
Tümör başlatma ve tümörün gelişimini devam ettirebilme kapasitesi

Normal kök hücrelerden farklı olarak, kanser kök hücrelerinin öncü kök/projenitör hücrelerden kökenlenmesi gerekmemektedir. Bir başka deyimle, farklılaşmış normal doku hücreleri genetik ve epigenetik değişiklikler ile kanser kök hücresine dönüşebilmektedir (Tablo 1.2).

Kanser kök hücre teorisinde, kanser kök hücresinin ve tümör heterojenitesinin nasıl oluştuğuna dair birkaç senaryo bulunmaktadır (Tablo 1.2.), [Reya et al., 2001], [Jordan el al., 2006],[Cample and Polyak, 2007].

Tablo 1.2: Tümördeki heterojenite ile ilgili senaryolar

Yetişkin doku kök hücrelerinin ve/veya progenitor hücrelerinin farklılaşmasının gecikmesi
Olgun hücrelerin farklılaşmamış hale geri dönmesi (dedifferentiation),
Bazı doku kök hücrelerinin başka dokularda kanser kök hücresine dönüşümü (transdifferentiation)

Hematolojik tümörlerden sonra solid tümörlerde de heterojenite ve hücresel hiyerarşiyi destekleyen çalışmalar yapılmıştır. 2003 yılında, kanser kök hücrelerinin solid tümörlerde varlığı ile ilgili ilk çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmada, insan meme kanserinden izole edilen $CD44^{+}CD24^{-}$ hücre alt-grubunun çok düşük miktarlarının (100 hücre)immün-baskılanmış obez olmayan diyabetik (NOD/SCID) farede tümör oluşumunu başlatabildiği, ancak parental meme kanseri hücrelerinin yüksek sayıda verilmesine rağmen tümör oluşturmadığı gösterilmiştir[Al-Hajj et al., 2003].

Bu çalışmanın yayınlanmasının ardından benzer yaklaşımlar ile diğer insan kanserlerinde de kanser kök hücre varlığı ve izolasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Farklı yüzey belirteçleri kullanılarak kolon kanseri[Dalerba, 2007], [Ricci-Vitiani et al.,2007], pankreas kanseri [Li et al., 2007] ve karaciğer kanseri [Haraguchi et al., 2006], [Chiba et al., 2006], [Yang et al, 2008]kanser kök hücreleri elde edilmiştir. Tüm bu çalışmalartümör oluşumunun küçük bir grup olan ve fenotipik olarak diğerkanser hücrelerinden farklı olanhücreler tarafından gerçekleştiğine dair hipotezi desteklemektedir.

3.1.1.Hepotoselüler Karsinomada Kanser Kök Hücre Belirteçleri

HCC'da kanser kök hücreleri izole edilirken birçok farklı yaklaşım sergilenmiştir. CD133 [Suetsugu et al.,2006], CD44[Dalerba et al., 2007],[Li et al., 2007], CD90 [Yang et al., 2008], EpCAM [Yamashita et al., 2009] gibi hücre yüzey proteinleri,işlevsel bir belirteç olarak ALDH1 enzimi [Ginestier et al., 2007] ve ikincil popülasyon (Side popülasyon, SP) hücreleri [Haraguchi et al., 2006], [Wu et al., 2007] kullanılmıştır.

3.1.1.1. İmmünolojik Belirteçler

3.1.1.1.1. CD133

CD133(AC133) prominin ailesinin bir üyesidir. CD133 120kDa ağırlığında, kolesterol ile etkileşen5 bir membran-geçişli bir glikoproteindir. CD133-1 [Yin et al., 1997], CD133-2 [Fargeas et al., 2003] ve CD133-3 [Fargeas et al., 2004]olarak adlandırılan 3 izoformu vardır.

CD133 ilk önce hematopoietik kök hücrelerin ve öncül-hücrelerin belirteci olarak bulunmuş ve sonrasında endoteliyal öncül hücrelerin, nöral ve glial kök hücrelerin, insan fetal karaciğerinin ve kordan kanı ile periferik kandaki kök hücrelerin sınıflandırılmasında da kullanılmıştır[Yin et al., 1997]. İlk defa Suetsugu ve arkadaşları tarafından $CD133^+$ HCC hücre alt-grubunun kanser kök hücre popülasyonu olabileceğini önerilmiştir. Bu çalışmada,HuH7 hücre hattından izole edilen $CD133^+$ hücrelerin $CD133^-$'lere göre yüksek çoğalma yeteneği ve tümörojenik kapasite gösterdikleri, buna karşınolgun hepatosit belirteçlerinden glutamin sentaz ve sitokrom P450 3A4'ü daha az ifade ettikleribulunmuştur[Suetsugu et al., 2006]. Yapılmış olan başka bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş ve araştırmacılar SMMC-7721 hattından izole edilen $CD133^+$ hücre alt-grubunun*in vitro*'da artmış koloni oluşturma yeteneğinin olduğunu ve *in vivo*'da da tümör oluşturabildiklerini göstermişlerdir [Yin et al., 2007].

3.1.1.1.2. CD44

Standart CD44 molekülü 85-90 kDa büyüklüğünde ve 10 standart ekzon taşıyan membran-geçişli bir glikoproteindir. Ancak bu standart glikoproteinin dokuya-özgü çok sayıdaizoformu bulunmaktadır [Marhaba and Zoller, 2004], [Afify et al., 2009]. Doku ve izoforma bağlı olarak,CD44 hücre tutunması, hücre hareketi, hücre çoğalması ve hücre sağ-kalımı gibi farklı biyolojij davranışlarda görev almaktadır. CD44'ün kanser kök hücrelerinde tek-başına veya diğer belirteçler ile birlikte bulunması tümörde önemli rol oynadığını düşündürmektedir.Birden fazla kök hücre belirteci kullanılaraksolid tümörlerden kanser kök hücre izolasyonu ilk defa $CD44^{+}CD24^{low}$ hücreler ile meme kanserinde gerçekleşmiştir [Al-Hajj et al., 2003]. HCC'da da, CD44 diğer belirteçler ile kanser kök hücrelerinin tanımlanmasında kullanılan önemli bir belirteçtir. *CD44* anlatımının HuH7, SMMC-7721, MHCC-LM3 ve MHCC-97L hücrelerinde,çoğunlukla $CD133^{+}$ hücre alt-grubunun bulunduğu bölümde yoğunlaştığı gösterilmiştir. $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunun$CD133^{+}CD44^{-}$hücre alt-grubuna göre artmış tümör oluşturma yeteneğine sahip olduğu, kemoterapiye dirençli olduğu ve yüksek derecede kök hücre ile ilişkili genlerin anlatımına sahip olduğu gösterilmiştir [Zhu et al., 2010].

3.1.1.1.3. Thy-1 (CD90)

İnsan HCC hücre hatlarında, mezenkimal kök hücre belirteci olan CD90 oranı%0 - %2,5 arasında gösterilmiştir. Yang ve arkadaşları,inceledikleri tüm tümör örneklerinde ve bir çok kan örneğinde normal ve sirotik karaciğerde bulunmayan yüksek derecede tümörojenik $CD90^{+}CD45^{-}$ hücre popülasyonun bulunduğunu belirlemiştir. Benzer şekilde CD90 anlatımı HCC hücre hatlarında incelendiğinde sadece $CD90^{+}$ hücrelerin tümörojenik olduğu gösterilmiştir [Yang et al., 2008a], [Yang et al., 2008b]. Yüzey belirteci olan glikoprotein CD44 ile CD90'nın eş-anlatımının $CD90^{+}CD44^{+}$hücrelere, $CD90^{+}CD44^{-}$'lere göre agresif özellikler kazandırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, CD44 antikoru ile CD44 aktivitesinin inhibe edilmesi ile tümör oluşumu ve metastazın kaybolduğu,buna ek olarak$CD90^{+}$ hücrelerde apoptozun tetiklendiği de saptanmıştır [Yang et al., 2008b].

3.1.1.1.4. EpCAM (TACSTD1, ESA)

Bir yüzey antijeni olan epitel hücre adhezyon molekülü(EpCAM) çeşitli tümörlerin özgün kanser kök hücre belirteci olarak tanımlanmıştır [Went et al., 2004], [Went et al.,2006], [Yamashita et al., 2007]. EpCAM embriyonik karaciğerde, safra epitelinde, sirotik karaciğerin bölünen safra kesesi hücrelerinde bulunmaktadır. Ancak normal yetişkin hepatositlerde bulunmamaktadır [Yamashita et al., 2008]. Artmış EpCAM anlatımı tümör-öncesi hepatik dokuda görülmüştür ve böylece bu yüzey proteini HCC'nın erken biyo-belirteci olarak düşünülmüştür [Kim et al., 2004]. Ayrıca,HCC hücre hattından izole edilen 10000 $EpCAM^+$hücre*in vivo*'da tümör oluşturabiliyorken1 milyon$EpCAM^-$ hücre tümör oluşturamamaktadır[Yamashita et al., 2008].

3.1.1.1.5. CD13

Bir diğer yüzey belirteci olan CD13'ün HCC'da uyku halindeki (dormant) hücreleri tanımlayabildiği Haraguchi ve arkadaşlarının çalışmasında ortaya çıkmıştır. HuH7, PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre hatlarından izole edilen SP hücrelerinde yapılanmikroarrayanalizi sonucunda, CD13 gen anlatımının bu hücrelerde arttığı bulunmuştur. Ayrıca, CD13 anlatımı gösteren hücrelerindaha çok G_1/G_0 fazında yoğunlaşması kanser kök hücrelerinin yavaş bölünme özelliği ile birlikte değerlendirildiğinde bu molekülün bir belirteç olarak önemine işaret etmektedir[Haraguchi et al., 2010]. Aynı araştırmacılar HCC hücre hatlarında CD13'ü CD90 ve CD133 ile birlikte incelediklerinde, $CD133^+CD13^+$ve $CD13^+CD90^-$hücre alt-gruplarının sınırlı dilüsyonlarda etkili bir şekilde tümör oluşturabildiğini göstermişlerdir. Ayrıca $CD13^+$ hücrelerin kemoterapi ajanları olan doxorubicin ve 5-fluorouracil'e karşı dirençli olduğunu ve kemoterapi sonrasında da $CD13^+$ popülasyonunun sayısının arttığını göstermişlerdir[Haraguchi et al., 2010].

3.1.1.2. Fonksiyonel Belirteçler

3.1.1.2.1. İkincil Popülasyon Yaklaşımı

İkincil popülasyon(Side popülasyon, SP) yaklaşımı 1996'da Goodell ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [Goodell et al., 1996].Günümüzde de hem kanser kök hücreleri hem de normal kök hücreleri izole etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu yaklaşım,ATP aracılığıyla substratların membran boyunca taşınmasında görev alan ve bu özellikleri ile kanser kök hücrelerinin kemoterapiye dirençli olmalarını sağlayan ABC membran taşıyıcılarının aşırı aktivitesine dayanmaktadır. Hoechst 33342 ile boyanmasının ardından, ABCG2 membran taşıyıcıları aracılığıyla boyayı aktif olarak hücre dışına atan grup akım sitometresinde belirlenmektedir. Bu grup,SP hücreleri olarak tanımlanmakta ve HCC'daki oranı%0 ile %28 arasında değişmektedir [Shi et al., 2008]. Karaciğer kanserinde ilk defa SP hücreleri 2006 yılında iki bağımsız araştırmacı Haraguchive arkadaşları ile Chiba ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir. Haraguchi arkadaşları HuH7 ve Hep3B hücre hatları dahil gastrointestinal sistemdeki 15 farklı hücre hattından Hoechst 33342 boyası ile SP hücrelerini izole etmiştir. SP hücrelerinde farkılaşma ve kemoterapiye direnç ile ilişkili olan CEACAM6 ve ABCG2 gibi belirteçler tanımlanmıştır. Ayrıca bu hücrelerin hem SP hücrelerini hem de SP-olmayan hücreleri oluşturabilme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir[Haraguchi et al., 2006].

Chiba arkadaşlarıda SP uygulamasını HCC'da kanser kök hücre-benzeri hücreleri belirlemek için kullanmıştır.HCC hücre hattı olan PLC/PRF/5 ve HuH7 hücre hatlarında SP hücrelerinin oranı %1'den az olarak belirlenmiştir. İzole edilen SP hücreleri, SP olmayan hücreler ile karşılaştırıldığında yüksek çoğalma potansiyelleri, anti-apoptotik özellikleri, kök hücre genlerinin aşırı-anlatımı ve daha yüksek tümörojenik potansiyelleri ile karakterize edilmektedir.NOD/SCID farede 1000 SP hücresi tümör oluşturabilir ve seri transplantasyonlarla tümör oluşturma yeteneklerini devam ettirebilmekteyken, 1 milyon SP-olmayan hücre tümör oluşturamamaktadır[Chiba et al., 2006].

3.1.1.2.2. ALDEFLUOR-Yaklaşımı (ALDH Aktivitesi)

Aldehit dehidrogenaz(ALDH) aktivesinin ölçümüne dayanan bu yöntemhematopoietik kök/öncü hücre izolasyonundan uyarlanmıştır[Gerber et al., 2012]. ALDH1bütün hücrelerde anlatımım olan bir enzim ailesinin üyesidir ve retinol'ün retinoik aside dönüşümü ile çoğalma, farklılaşma ve sağ kalımda görev almaktadır.ALDEFLOUR analizi,ALDH'ın substratı olan BAAA'yı(BODIPY-aminoasetilaldehit) floresan bir ürün olan BAA'ya(BODIPY-aminoasetat) dönüştürmesi prensibine dayanmaktadır. Yüksek ALDH aktivitesine sahip hücreler floresan ışıma yaparlar ve akım sitometresi ile tanımlanabilirler [Ma et al., 2008].ALDH aktivitesi ve CD133 anlatımının birlikte incelenmesi ile $ALDH^{+}$ ve $CD133^{+}$ olan hücrelerin çakıştığı gösterilmiştir[Ma et al., 2008].Kolon kanserinde, $EpCAM^{yüksek}CD44^{+}$ kolon kanseri kök hücrelerinde daha yüksek ALDH aktivitesigözlemlenmiştir [Ganguly and Puri, 2007].

4.TGF-B SİNYAL YOLAĞI

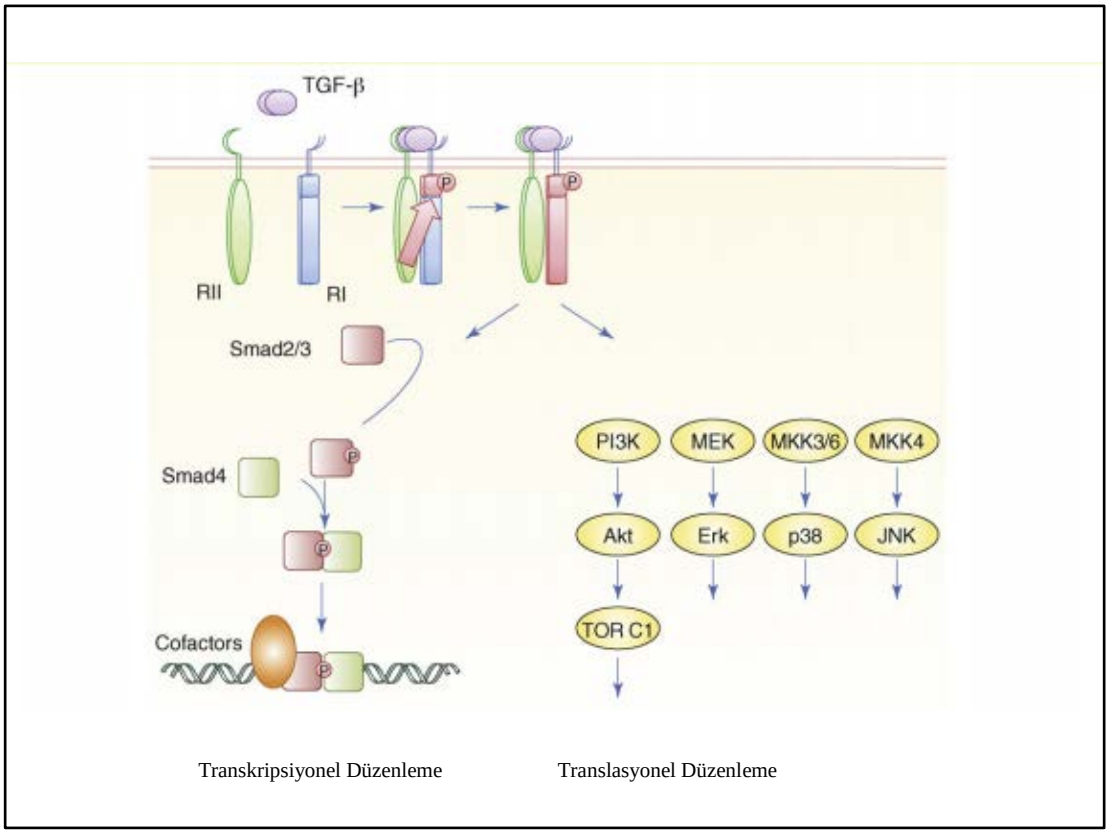
Transforme-edici büyüme faktörü-β (TGF-β) izoformları hücre büyümesinin, hücre sağ kalımının, hücre farklılaşmasının ve hücre göçünün düzenlenmesi gibi süreçlerde rol almaktadır [Moustakas and Heldin, 2009].

TGF-β'nın otoimmün, kardiyovasküler ve kanser gibi birçok hastalık ile ilişkili olduğu gösterilmiştir[Gordon and Blobe, 2008]. TGF-β'nın kanserde tümör baskılayıcı ve pro-tümörojenik olmak üzere birbirine zıt iki rolü bulunmaktadır. TGF-β tümör oluşumunun başlangıcında, hücre büyümesinin inhibisyonu ve apoptozun indüklenmesi ile tümör baskılayıcı özellik göstermektedir. Tümörün ileri evresinde ise, hücrelerdeepitel-mezenkim dönüşümü (EMT)programını uyararak invazyon ve metastazı tetikleyen pro-tümörojenik bir etki göstermektedir [Thiery et al., 2009]. Buna ek olarak, solid kanserlerde TGF-βnın pro-tümörojenik etkisinin stroma hücreleri ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Stroma hücreleri, anjiogenezin indüklenmesi, immün sistemin baskılanması ve inflamatuar hücreleri tümör dokusuna çağırarak tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz yeteneği kazanmasına yardımcı olmaktadır[Moustakas and Heldin, 2012]. TGF-β hücre içerisindeki fonksiyonunu Smad-aracılı yolak veya Smad-aracılı olmayan yolak üzerinden gerçekleştirmektedir.

Smad-aracılı yolakta TGF-β bağlanması, TGF-βR2'nin TGF-βR1'i fosforillemesine ve bunun sonucunda da iki TGF-βR2 ve iki TGF-βR1 reseptöründen oluşanaktif bir kompleks oluşmasına yol açar (Şekil 4.1). Aktive olan TGF-βR1 Smad2 ve Smad3'ü C-terminal serin'lerinden fosforillemektedir. Bu şekilde aktive olan Smad'lar ise Smad4 ile üçlü bir yapı oluşturarak hedef genlerin anlatımlarını düzenlemek üzere nükleusa geçmektedir. Diğer ko-aktivatör veya ko-represör transkripsiyon düzenleyicileri de bu Smad kompleksi ile etkileşerek Smad-aracılı transkripsiyon cevabının genliğini düzenlemektedir. Bu yol ile Smad'lar, TGF-βuyarısıyla gen anlatımını etkinleşme veya baskılanma yönünde değiştirmektedir [Feng and Derynck, 2005].

BMP ile aktive olan sinyal yolağında da aynı mekanizma geçerlidir ancak farklı tip1 ve tip2 reseptörler iş görmekte ve transkripsiyonel sinyal Smad2 ve/veya Smad3 yerine Smad1, 5 ve/veya 8 aracılığıyla gerçekleşmektedir [Daly et al., 2008], [Liu et al., 2009].

Smad-aracılı olmayan sinyal yolağında ise TGF-β, Erk, p38 ve JNK MAP kinaz aktivasyonu ile hücre iskeletini ve membran hareketini,PI3-kinaz aktivasyonuyla da protein sentezini düzenlemektedir[Derynck and Zhang, 2003], [Moustakas and Heldin, 2005].



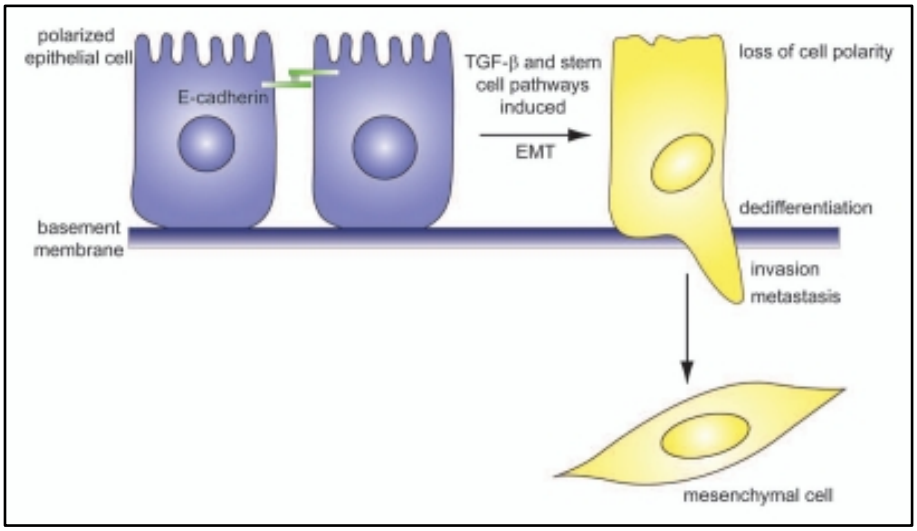
Şekil 4.1: TGF-β sinyal iletimi.

4.1. Epitel-Mezenkim Dönüşümü

Epitel-mezenkim dönüşüm(EMT) programı evrimsel olarak korunmuş bir süreçtir [Thiery, 2002]. EMT, çok hücreli organizmaların gelişimi sırasında öncü hücrelerin göçünü düzenlemek üzere etkinleşmekte ve hücrelerin yerleşimini takiben mezenkim-epitel dönüşümü (MET) olarak adlandırılan ters bir süreç ile hücreler yeniden epitelyal özelliklerini geri kazanmaktadırlar[Boyer and Thiery, 1993], [Davies, 1996]. Bunun yanında, EMT programı yaralanmaya karşı fizyolojik yanıt ve organ fibrozu gibi patolojik süreçler ile de ilişkilidir [Kalluri and Weinberg, 2009].

EMT terimi, epitel hücrelerinepitel özelliğini kaybetmesi ve mezenkimal hücre benzeri özellikler kazanması gibi hücre yapısında ve davranışında

karmaşıkdeğişiklikleri gerektiren çok-basamaklı bir süreç olarak tanımlamaktadır (Şekil 4.2). EMT sürecinde epitel hücreleri E-kaderin ve epitel hücre fenotipi ile bağlantılıdiğer bileşenlerinin anlatımını kaybetmekte, mezenkimal hücre fenotipi ve invaziv fenotipgibi özellikler kazanmaktadır [Ouyang et al., 2010].

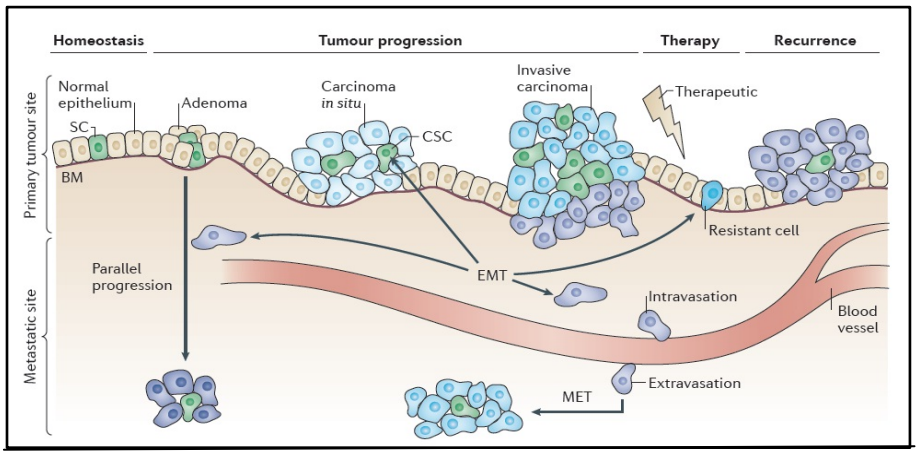


Şekil 4.2:Epitel-mezenkim dönüşümü.

EMT programı gelişim sırasında normal olarak aktif olabildiği gibi yetişkin kanser dokusunda da anormal bir şekilde aktif olabilmektedir [Yang and Weinberg, 2008]. EMT, hücre-dışı sinyaller; hücre-dışı matriks bileşenleri (ECM) ve büyüme faktörleri ile hücre-içi transkripsiyon faktörlerinden oluşan bir dizi molekül tarafından düzenlenir. EMT indükleyicileri olarak da adlandırılan bu transkripsiyon faktörlerinin başlıcaları Snail, Slug (Snail2), ZEB1 ve ZEB2 (SIP1) bHLH faktörleri Twist1 ve Twist2ile FOXC2'dir. Epitel hücreleri, hücre-dışı EMT-indükleyici sinyaller ve hücre-içi transkripsiyon faktörlerinin ortaklaşa etkileşimi ile yeniden programlanarak mezenkimal özellikler kazanmaktadır[Thiery et al., 2009].

Gelişim sürecinde görülen EMT programı ile kanser sürecinde (Şekil 4.3) görülen EMT programı EMT'yi başlatan sinyaller ve bunun sonucunda meydana gelen fenotipik değişiklikler bakımından benzerlik taşımaktadır [Huber et al., 2005], [Thiery, 2003]. Gelişimsel modellerden, EMT programı ile ilişkili ana sinyal yolaklarının TGF-β ve WNT sinyal yolakları olduğu bunun yanında Hedgehod, Notch, EGF ve IGF gibi diğer sinyal yolaklarınında etkili olduğu gösterilmiştir [DiMeoet al., 2009].

TGF-β aktivasyonuna bağlı olarakbazı epitel hücrelerinde E-kaderinin kaybı Smad-bağlı yolaktan dolayı meydana gelmektedir. Smad ile ilişkili transkripsiyon faktörleri E-kaderin anlatımını, E-kaderinin promotor bölgesindeki E-box dizilerine bağlanarak baskılamaktadır. E-box'a bağlanan transkripsiyon faktörleri Snail, Slug, Zeb1 ve SIP1 proteinleridir[Thiery et al., 2009].



Şekil 4.3: Kanser Sürecinde EMT'nin rolü.

4.1.1. Kanser Kök Hücresi ve Epitel Mezenkim-Dönüşümü

EMT ile ilişkili olan moleküler düzenlenme mekanizmaları kanser hücrelerinde, kök hücre-benzeri (stem cell-like) özellikler kazandırmaktadır [Mani et al., 2008], [Scheel et al., 2011]. Normal kök hücre dengesini düzenleyen birçok sinyalin, EMT-indükleyicisi olduğu ve bu sinyallerin kanser kök hücre (CSC) oluşumu ilekök hücre özelliğinin sürdürülmesine katkı sağladığı düşünülmektedir. Brabletz et al.,tarafından bir tümör gelişim modeli olarak"göç eden kanser kök hücre" (migrating cancer stem cell) modeli ortaya atılmıştır[Brabletz et al.,2005]. Bu hücreler EMT geçirerek mezenkimal ve kök hücre-benzeri özellikleri ile göç edebilme ve kendini yenileme kapasitesi kazanmaktadır [Magee et al., 2012].

İnsan meme epitel hücrelerinde EMT transkripsiyon faktörlerinin ektopik anlatımı sonrasında hücrelerin mezenkimal fenotip kazandığı ve kök hücre benzeri belirteçlere sahip olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, izole edilen $CD44^{yüksek}CD24^{düşük}$kök hücre alt-grubunda, $CD44^{düşük}CD24^{yüksek}$kontrol hücre alt-grubuna göre mezenkimal belirteçlerden olan N-kaderin, vimentin ve fibronektin ile EMT-indükleyici transkripsiyon faktörlerinden ZEB2, SLUG, Twist1 ve Twist2'nin

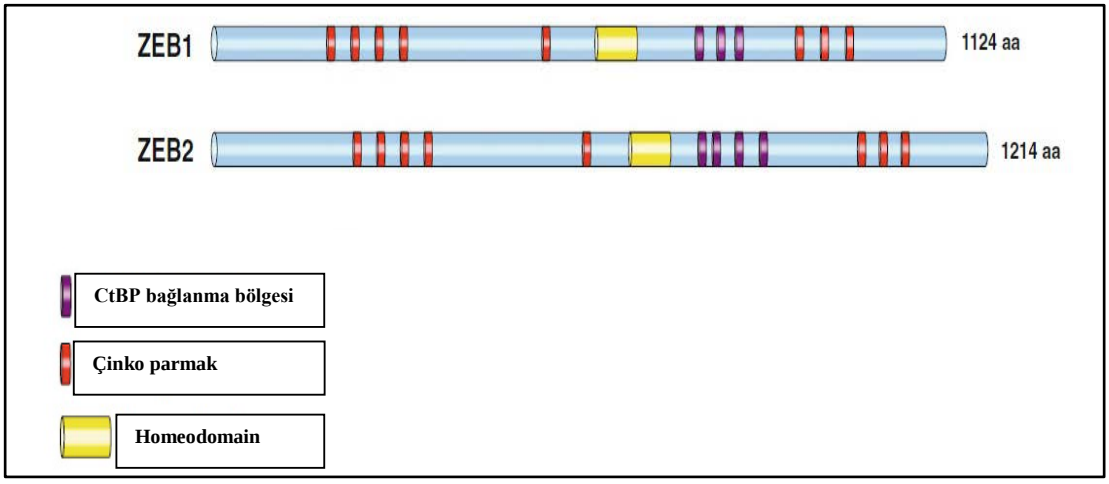
yüksek anlatımları belirlenmiştir[Mani et al., 2008]. Bir başka çalışmada ise, yine ölümsüz insan meme epitel hücrelerinde (HMLE)E-kaderinin shRNA'lar ile anlatımının baskılanması sonucunda EMT'nin indüklendiği gözlemlenmiştir.Ayrıca, bu hücrelerin mezenkimal fenotip ilekanser kök hücresi benzeri özellikler kazandığı gösterilmiştir [Onderet al., 2008].

Overkanseri hücre hatlarınınEMT-indükleyici transkripsiyon faktörlerinden Snail ve Slug ile transfeksiyonu sonucunda Nanog ve KLF4 gibi kök hücre özelliği ile ilişkili genlerin baskılanmasının kalktığı ve $CD44^{+}CD117^{+}$ kanser kök hücre popülasyonun arttığı gösterilmiştir [Kurreyet al., 2009].

4.2. SIP1Transkripsiyon Faktörleri

ZEB ailesi omurgalılarda iki homolog ZEB proteininden oluşmaktadır; ZEB1 ve ZEB2(SIP1). ZEB1 proteini lens-spesifik delta 1- kristalin enhansırı olarak tavuk lens hücrelerinde belirlenmiştir [Funahashi et al., 1993]. SIP1 1999 yılında, Verschueren ve arkadaşları tarafından TGF-β sinyal yolağı ile düzenlenen Smad proteinleri ile etkinleşerek DNA'ya bağlanan ve hedef genlerin ifadesini baskılayan bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlamıştır. [Verschueren et al.,1999].

ZEB1 ve SIP1,*ZFHX1a* ve *ZFHX1b* genleri tarafından kodlanmaktadır. ZEB1/SIP1E-box dizilerine (CAGGTA) bağlanabilen ve birbirinden ayrı iki C_2H_2-tipi çinko parmak kümesine sahip olan transkripsiyonel baskılayıcılarolarak tanımlanmıştır[Vandewalle et al., 2009].



Şekil 4.4: ZEB1 ve SIP1 proteinleri.

ZEB1/SIP1'in baskılayıcı işlevleri CtBPs, HDACs ve BRG1 gibi farklı eş-baskılayıcılara bağlanmalarıyla gerçekleşmektedir [Browne et al., 2010], [Sanchez-Tillo et al., 2012]. Ayrıca, ZEB1/SIP1 transkripsyion faktörleri pCAF ve P300 gibi transkripsiyon eş-aktivatörlerine de bağlanarak transkripsiyon aktivatörleri gibi de davranabilmektedir [Postigo et al., 2003].

ZEB proteinleri, CtBP eş-baskılayıcı kompleksinde histon deasetilaz, metiltransferaz, polycomb ve coREST ile birleşmektedir [Postigo and Dean, 1999], [Shi et al., 2003]. CtBP'ye ek olarak, ZEB2 NuRD ile de etkileşmektedir [Verstappenet al., 2008].

ZEB1 ve SIP1'in represör aktivitesi, transkripsiyon-sonrası modifikasyon ile düzenlenmektedir. Pc2 veya p300/pCAF asetilasyonu ile SUMOlasyon ZEB faktörlerinin CtBP'ye bağlanmasını bozmaktadır [Long et al., 2005], [Postigo et al., 2003].

Ayrıca, ZEB transkripsiyon faktörleri,Smad bağlanma domainleri (SBD) ile TGF-β sinyal yolağında reseptör ile aktive olan Smad'lara (R-SMAD) bağlanabilmektedir. Bu sayede,hücre içinde TGF-β hedef genlerinin promotor bölgesindeki E-box dizilerine bağlanarak TGF-β'ya yanıtın düzenlenmesine aracılık etmektedir [Browne et al., 2010]. SIP1'in, Smad-1.-2.-3'ün MH2 domaini ile doğrudan etkileşebildiği gösterilmiştir [Verschueren et al.,1999].

SIP1'in, kaderin 1 geninini (*CDH1*) [Comnijn et al., 2001], klaudin 4 geninini (*CLDN4*), siklin D1 geninini (*CCND1*) [Mikkers et al., 2002], telomeraz ters transkriptaz genini(*TERT*) [Ozturk vd., 2006], alkalen fosfataz genini(*ALPL*), miR-200b-200a-429'u ve Wnt sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olan *SFRP1* genini [Miquelajauregui et al., 2007] baskıladığı belirlenmiştir.

Epitel kökenli kanser hücrelerinde ZEB proteinlerinin anlatımları arttırıldığında epitelyal polaritenin ve hücre-hücre bağlantılarının bozulduğu gözlemlenmiştir[Sanchez-Tillo et al., 2012]. SIP1'in hedeflerinden biri epitel-adezyon proteini olan E-kaderin'i kodlayan *CDH1* genidir. SIP1,*CDH1* geninin promotor bölgesindeki E-box dizilerine bağlanmaktadır. E-kaderinin transkripsiyonel baskılanması gelişimsel süreçte ve tümör hücre invazyonu ile metastazdaki EMT'yi indüklemektedir [Comnijn et al., 2001]. Buna ek olarak, SIP1'in EMT ve invazyon ile ilişkili olan vimentin ve metalloproteaz gen ifadelerininartışına aracılık ettiği gösterilmiştir [Miyoshi et al., 2004], [Postigo et al., 2003].Normal hücrelerin bölünmesi, hücre döngüsü kontrol noktaları ile kontrol edilmektedir. Ancak kanser

hücrelerinin bölünmesinde bu kontrol noktalarında bozulma olabilmektedir.A431 hücrelerinde SIP1'in aşırı anlatımı siklin D1'in transkripsiyonel olarak baskılanması ve hücre döngüsünün G1 fazında duraklamasınayol açmıştır. Benzer bir şekilde MDCK hücrelerinde de *SIP1*'in aşırı anlatımı ile ile G1 fazındaki hücre miktarında artış gözlemlenmiştir [Browne et al., 2010].

Kanser hücrelerindeki sınırsız bölünme yeteneğinin artmış telomeraz aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Meme kanseri hücrelerindeki hTERT baskılanmasının kısmen SIP1'e bağlı olduğu ve bununda TGF-β'ya bağımlı olarak gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca, SIP1'in HCC hücrelerinde *hTERT* baskılanmasını sağlayarak hücreleri senesense yönlendirdiği belirlenmiştir [Ozturk vd., 2006].

Fare embriyolarında SIP1 yokluğunda nöral tüp kapanamaması sebebiyle ölüm meydana gelmektedir. SIP1 fare beyin kortikal hücrelerinde *SFRP1* geninin promotor bölgesine bağlanarak genin ifadesini baskılamaktadır.Bu genin ifadesindeki baskılanma da Wnt sinyal yolağındaki baskının kalkmasına sebep olmaktadır [Miquelajauregui et al., 2007]. Koopmansch ve arkadaşları KLF4 ile SIP1'in E-kaderin promotor bölgesine bağlanabildiklerini göstermiştir. Bu iki transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgelerin örtüşmesine karşın KLF4 E-kaderin ifadesini artırmakta, SIP1 ise azaltmaktadır[Koopmansch et al., 2013]. SIP1 ve ZEB1'in anlatımları miR-200 ailesi üyeleri, miR-205 ve miR-141 tarafından kontrol edilmektedir [Gregory et al., 2008], [Park et al., 2008]. Ayrıca SIP1 ve ZEB1'in de miR-200 ailesi üyelerinin transkripsyionel baskılayıcıları oldukları gösterilmiştir [Gregory et al., 2008], [Parket al., 2008]. Buna ek olarak, fare mezanjial hücrelerinde miR-192'nin de SIP1 mRNA'sını hedef aldığı gösterilmiştir [Kato et al., 2007].Buna ek olarak, Kim ve arkadaşlarıyapmış oldukları çalışma ile p53 aracılığıyla düzenlenen EMT'de miR-200 ailesi üyeleri ve miR-192'nin anlatımın arttığını ve SIP1 baskılandığını da göstermiştir[Kim et al., 2011].

Ayrıca, SIP1 mRNA'sı diğer transktiptleri hedef alan mikroRNA'ları baskılayarak yarışmacı endojenik RNA (competitive endogenous RNA, ceRNA) gibi fonksiyon görür ve böylece diğer transkriptlerin anlatımını aktive etmektedir [Karrethet al., 2011].

4.2.1. Kanser Kök Hücrelerinde SIP1

ZEB ailesinin iki üyesi olan ZEB1 ve ZEB2 çeşitli insan tümörlerinde bulunmakta ve EMT'nin önemli regülatörlerinden olup ilaç-dirençliliği ile kanser kök hücrenin, kök hücre özelliğine destek sağlamaktadır [Peinado et al., 2007]. ZEB1 kök hücre özelliğini inhibe eden mikroRNA'ları baskılayarak EMT'nin aktive olmasını ve kanser kök hücre devamlılığını sağlamaktadır. Bu da kanser kök hücre ile EMT arasında doğrudan bir ilişki olduğunu göstermektedir [Wellner et al., 2009].

Primer meme tümöründen izole edilen $CD44^{yüksek}CD24^{düşük}$ hücrelerde $CD44^{düşük}CD24^{yüksek}$ hücrelere göre mezenkimal belirteçlerden olan N-kaderin, vimentin ve fibronektin ile EMT-indükleyici transkripsiyon faktörlerinden SIP1, SLUG, Twist1 ve Twist2'nin yüksek anlatımları belirlenmiştir [Mani et al., 2008].

MCF-10 hücrelerinde yapılmış olan çalışmada $CD44^{+}CD24^{-}$ kanser kök hücre grubunda artmış ZEB2 anlatımı gösterilmiştir [Bhat-Nakshatriet al., 2010].

4.2.2. Hepatoselüler Karsinomada SIP1

SIP1 ile HCC arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik ilk çalışma 2004 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada, SIP1'in SNAIL ile birlikte matriks metalloproteazlarını (MMP-1, MMP-2, MMP-7 ve MTI-MMP) arttırdığı ve HCC hücrelerinin invazyonunu düzenlediğini göstermiştir [Miyoshi et al., 2004]. Ayrıca SIP1'in HCC hücrelerinde *hTERT* baskılanmasını sağlayarak hücreleri senesense yönlendirdiği belirlemiştir [Öztürk vd., 2006].

SIP1 ifadesinin miRNA'lar ile düzenlendiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [Gregory et al., 2008].HCC'da SIP'in negatif regülatörü miR-200c'nin normal karaciğere göre artmış anlatımının gösterilmesi ile SIP1 ve HCC arasındaki ilişki dikkat çekmektedir [Ladeiro et al., 2008].

Acun ve arkadaşları HCC'da SIP1anlatımının promotor hipermetilasyonu ile azaldığını belirlemiştir. Ayrıcaiyi-faklılaşmış (well-differentiated) HCC hücre hatlarındadüşük SIP1 anlatımı görülmesine karşın zayıf-farklılaşmış (poorly-differentiated) HCC hücre hatlarında ise güçlü SIP1 anlatımı gösterilmiştir [Acun vd., 2011].

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. Gereçler

5.1.1. Kullanılan 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).

5.1.2. Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri

Hücre besiyeri olarak düşük-glukoz içerikli DMEM besiyeri (Lonza),%10 fötal dana serumu (FBS, Lonza), %1 Penisilin-Streptomisin (Lonza),400 mM L-glutamin (Lonza) ve 1X fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS, Lonza).10X Tripsin (Lonza).

5.1.3. Kullanılan Kitler

Akım sitometresinden izole edilen hücrelerden total RNA izolasyonu için NucleoSpin RNAII izolasyon kiti (Macharey-Nagel) kullanılmıştır. İzole edilen total RNA'lardan tek zincirli cDNA sentezlemek için First Strand cDNA sentez kiti (Macharey-Nagel) kullanılmıştır. Gen ifadesi analizi için Maxima Cybergreen Master Mix (Thermo Scientific) kullanılmıştır.

5.1.4. Kullanılan Hücre Hattı

Bu çalışmada Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden elde edilen HuH7 ve PLC/PRF/5 hücre hatları kullanılmıştır.

5.1.5. Kullanılan Çözeltiler

Tris–EDTA (TE) Tamponu

- 10 mM Tris–HCl (pH 8.0)
- 1mM EDTA (pH 8.0)

Akım Sitometre Solüsyonu (Flow Solüsyonu)

- 1X PBS
- 2 mM EDTA (pH 8.0)
- %2 Fetal Bovine Serum (FBS)

Hücre Dondurma Besiyeri

- %90 FBS
- %10 DMSO

SP Solüsyonu

- 1X HBSS
- %1 Penn-Strep.
- %2 Fetal Bovine Serum (FBS)

5.1.6. Kullanılan Antikorlar ve Solüsyonlar

Çalışmada kullanılan antikorlar ve floresan işaretleri Tablo5.1'de gösterilmiştir. Fc reseptörlerinin bloklanması için FcR Blocking Solüsyonu (Miltenyi Bio.) kullanılmıştır. Akım sitometresi ile izolasyon sırasında canlı hücrelerin seçilmesi için 7AAD solüsyonu (BD Bio.) kullanılmıştır.

Tablo 5.1: Bu çalışmada kullanılan antikorlar ve floresan işaretleri.

Antikorlar	Floresan İşaret
CD133 (Miltenyi Bio.)	PE
CD44 (BD Bio.)	APC

5.1.7. Kullanılan Boya ve İnhibitör

SP hücrelerinin belirlenmesinde DyeCycleViolet (DCV)(Invitrogen) boyası kullanılmıştır. DCV DNA'ya bağlanan bir boya olup mor lazer ile uyarılmaktadır, FumitriMorgin C (FTC, Sigma Aldrich) SP hücrelerinde boyanın dışarı atılımını engellemek için ABCG2 pompa inhibitörü olarak kullanılmıştır.

5.1.8. Kullanılan 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), NanoSpec (Shcmadzu), Akım Sitometresi (Becton Dickens, FACS Aria II), Laminar Akım Kabini (Labconco, Logic), Karbondioksit İnkübatörü (Labogene, Scancell), Otoklav (Hirayama, Hiclave HVE-50), qRT-PCR (Stratagene Mx3000, Agilent), PCR Kabini (Lab Companion), Su Banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette). Santrifüj (Nüve, NF400), Soğurmali Santrifüj (Labogene, Scanspeed 1580R), Votex (DragonLabs, MX-S), PCR (Biorad, Mj Mini).

5.2. Yöntemler

5.2.1. Hücre Çözme İşlemi

Sıvı azot tankından alınan PLC/PRF/5 ve HuH7 hücre hatları oda sıcaklığında eriyince, üzerine yavaşça %10 Fötal dana serumu, %1 penisilin-stereptomisin ve 8mM L-Glutamin ile desteklenen düşük-glukoz içeren DMEM besiyeri eklendi ve 15 ml santrifüj tüpüne alındı. Hücreler 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı aspire edildi ve hücre pelleti besiyeri ile sulandırıldı ve 75 cm^2'lik kültür kabına ekim yapılarak 37˚C'de %5 CO_2'li inkübatöre yerleştirildi.

5.2.2. Hücre Kültürü

Hücreler 75 cm^2kültür kabı'nın %80-90'ını kapladıklarında besiyeri aspire edildi. Hücrelerin üzerine 1X PBS eklenerek hücreler yıkandı. 1X PBS aspire edilerek 3X tripsin ekledive hücreler kaldırıldı.Hücre pasajı ihtiyaca bağlı olarak 1/2 - 1/6 dilüsyonlarında yapıldı.

5.2.3. Hücre Dondurma İşlemi

Hücreler stok yapmak amacıyla dondurularak saklandı. Hücreler 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı aspire edildi ve hücre pelletinin üzerine %90 FBS ile %10 içeren hücre dondurma besiyeri eklendi. 2ml tüplerde hücreler önce -80˚C derin dondurucuya alındı ve takibeden gün sıvı azot tankına aktarılarak uzun süreli saklanmaları gerçekleştirildi.

5.2.4. Akım Sitometresi ile Hücre Analizi ve İzalasyonu

5.2.4.1. SP Hücre Analizi

HuH7 hücreleri %10 Fötal dana serumu, %1 penisilin-stereptomisin ve L-Glutamin ile desteklenen düşük-glukoz içeren DMEM besiyerinde 37˚C ve %5 CO_2'li inkübatördebüyütüldü. Hücreler, kültür kabının %80-90'ınıkapladığında tripsin ile kaldırılıp +4 derecede 1800 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı atıldı ve hücre pelleti SP sölüsyonu ile sulandırıldı. Sulandırılan hücreler 3 tüpe bölündü; Tüp 1(20µM DCV+20 µMFTC + PI), Tüp 2(20 µMDCV+30 µMFTC + PI), Tüp 3(20µM DCV + PI).

Karanlıkta, tüp 1'e 20 µM ve tüp 2'ye de30 µMfinal konsantrasyonu olacak şekilde FTC eklendi. Tüpler vortexlendi ve 37˚C'de 30 dakika ön-inkübasyona bırakıldı. Ön-inkübasyon ile ABCG2 membran taşıyıcılarının bloke olması amaçlandı. 30 dk'lık inkübasyonun sonucunda tüpler yeniden vortexlendi ve karanlıkta, tüp 1, 2 ve 3'e final konsantrasyonu 20µM olacak şekilde DCV eklendi. Tüpler 37˚C'de 90 dk inkübasyona bırakıldı ve her 15 dk'da bir ters-düz edilerek karıştırıldı. İnkübasyon sonunda tüplere soğuk 1X PBS eklenerek hücreleryıkandı ve

4˚C'de 1800 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı atıldı ve pelletSP buffer ile sulandırılıp analize kadar buzdolabında karanlıkta bekletildi. Analizden 5 dk önce ölü hücrelerin ayrımında kullanılan 10 µl PI solüsyonu eklendi.

Akım sitometresinde hücreler önce FSC'ye karşı SSC ile analiz edildi. Burada parçalanmamış bütünlüğü korunan hücreler kapılandı. Bu kapıdaki hücreler SSC'ye karşı PE filtresi ile incelendi. Ölü/canlı hücre ayrımı yapıldı ve canlı hücreler kapılandı. Bu kapıdaki hücreler SSC-H'ye karşı SSC-A ile analiz edildi. Birbirine yapışık olan ikili hücrelerin ayrımı yapılarak tek hücreler kapılandı. Bu kapıdaki hücreler PE-Cy7 filtresine karşı DAPI filtresi ile analiz edildi.

HuH7 hücre hattından SP hücre analizi işlemi 3'er kez tekrarlanmıştır.

5.2.4.2.CD133^{+}CD44^{+} Hücre Analizi ve İzolasyonu

HuH7 ve PLC/PRF/5 hücreleri %10 Fötal dana serumu, %1 penisilin-stereptomisin ve L-Glutamin ile desteklenen düşük-glukoz içeren DMEM besiyerinde 37˚C ve %5 CO_2'li inkübatördebüyütüldü. Hücreler, kültür kabının %80-90'ınıkapladıklarında tripsin ile kaldırılıp +4˚C'de 1800 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı atıldı ve pellet (7 - 8 x 10^6 hücre) 80 µlflowsolüsyonu ile sulandırıldı.Boyasız kontrol ve 7AAD boyalı kontrol için de yine aynı işlem yapıldı ve pellet (1 x 10^6 hücre) 80 µl flow solüsyonu ile sulandırıldı; Tüp 1 (Boyasız kontrol olan tüp), Tüp 2(7ADD boyalı kontrol olan tüp) (Ölü/Canlı ayrımı için), Tüp 3(CD133-PE, CD44-APC ve 7AAD boyalı tüp) (Hücre izolasyonu için).

Tüp 3'e 12,5 µl ve tüp 2'ye 5 µl FcR blocking solüsyonu eklendi ve buzdolabında karanlıkta 10 dk ön-inkübasyona bırakıldı. Ön-inkübasyon sonrasında tüp 3'e 25 µl CD44 APC antikoru eklendi ve vortexlenip buzdolabında 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüp 3'e 12 µl CD133 PE antikoru, 10 µl 7AAD solüsyonu ve tüp 2'ye de 5 µl 7AAD solüsyonu eklenip vortexlendi ardından da buzdolabında 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda tüm tüplere 2 ml soğuk flow solüsyonu eklenip hücreler yıkandı ve +4˚C'de1800 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Üst sıvı atıldı ve pellet 2 ml Flow solüsyonu ile sulandırılıp analize kadar buzdolabında karanlıkta bekletildi.

Akım sitometresinde kontrol olarak tüp 1 ve tüp 2 kullanılarak analiz ve izolasyon için gerekli ayarlar yapıldı. Ayarların yapılmasının ardından da tüp 3cihaza

verilerek izolasyon işlemi gerçekleştirildi. Hücreler içerisinde 500 µl FBS olan 5 ml tüplere toplandı. İzolasyon işleminin ardından hücreler 1800 rpm'de 5 dk santrifüjlendi ve üst sıvı atılıp hücre pelleti RNA izolasyonuna kadar -80˚C derin dondurucuda saklandı.

HuH7 ve PLC/PRF/5 hücre hatlarının her biri için $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre izolasyonu 3'er kez tekrarlandı.

5.2.5. İzole Edilen Hücrelerden RNA İzolasyonu

Akım sitometresinde izole edilen hücre alt-gruplarından RNA izole edilmesi, NucleoSpin RNAII izolasyon kiti (Macharey-Nagel) kullanılarak, üretici firmanın verdiği kullanma talimatına uygun bir şekilde yapıldı. Kısaca, lizis tamponu ile hücre pelleti lizis edildi. Ardından elde edilen lizat filtrelendi. Filtreden geçen sıvının üzerine RNA-bağlama solüsyonu eklendi. Bu üst sıvı kolona uygulanarak RNA'nın kolona bağlanması sağlandı. Kolondaki tuzlar MDB (Membran Desalting Buffer) eklenerek ortamdan uzaklaştırıldı. Kolondaki DNA, rDNase kullanılarak parçalandı.Kolon yıkandı ve kurutuldu. Yüksek saflıkta RNA'ın elüsyonu 40 µldH_2Okullanılarak yapıldı.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve OD 260/280 oranı NanoSpec spektrometre cihazı ile ölçüldü. İzole edilen RNA'lar -80˚C derin dondurucuda saklandı.

5.2.6. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezi First Strand cDNA sentez kiti (Macharey-Nagel) kullanılarak, üretici firmanın verdiği kullanma talimatına uygun bir şekilde yapıldı.Kısaca, -80˚C derin dondurucudan alınan RNA'lar ile pcr tüpünde RNA/Primer/dNTP karışımı (Tablo 5.2) hazırlandı. Bu karışım PCR cihazına yerleştirildi ve 70 ˚C'de 5 dk ön-inkübasyon gerçekleştirildi. Ardından tüp hemen buza alındı ve üzerine RT karışımı (Tablo 5.3) eklendi. Hacmi 20 µl olan cDNA sentez karışımı PCR cihazına yerleştirilip 42˚C'de 60 dk sentez işlemi ve 80˚C'de 5 dk enzim inaktivasyonu işlemi yapıldı.

Tablo 5.2:RNA/Primer/dNTP karışımı

RNA / Primer / dNTP karışımı	
tRNA (1 ug)	3-5 µl
Primer	2 µl
dNTP mix	4 µl
N.F. dH2O	5-7 µl
Toplam	16 µl

Tablo 5.3: RT karışımı

RT mix	
10X RT buffer	2 µl
Murine RNase inhibitör	0.5 µl
M-MulV RT	1 µl
N.F dH2O	0.5 µl
Toplam	4 µl

20 µl olan PCR hacmi reaksiyon sonunda dH_20 ile 50 µl'ye tamamlandı. cDNA konsantrasyonu ve $OD_{260/280}$ oranı NanoSpec spektrometre ile ölçüldü. Sentezlenen cDNA, -20˚C derin dondurucuda saklandı.

5.2.7.qRT-PCR ile gen ifadesi analizi

Reaksiyon hacmi 20 µl olarak hazırlandı ve 350 ng cDNA kalıp olarak kullanıldı (Tablo 5.4)SIP1, ZEB1, SNAIL, TWIST, CK19, BCRP1, CEACAM6 ve GAPDH primerleri (Tablo 5.5) ile Maxima Cybergreen Master Mix (Thermo Scientific) kullanılarak Kitin önerdiği döngü şartlarında (Tablo 5.6) qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.Gen ifadesi analizi ise *ddCt* formülü ile *GAPDH*'a göre normalize edilerek hesaplandı.

Tablo 5.4: qRT-PCR reaksiyon tablosu

20 µl Reaksiyon Hacmi	
2X master mix	10 µl
İleri primer (125 mM - 250 mM)	0.25 – 0.50 µl
Geri primer (125 mM - 250 mM)	0.25 – 0.50 µl
Template (350 ng)	1.649403 µl
NF dH2O	7 – 8.5 µl
Toplam	20 µl

Tablo 5.5:Çalışmada kullanılan ileri ve geri primerler.

Gen Adı	İleri Primer	Geri Primer
SIP1	TCCTGTCTGTCTCGCAAAAA	GCCTTGAGTGCTCGATAAGG
ZEB1	GATCAAAGACATGTGACGCAG	TGTGTGAGCTATAGGAGCCAG
SNAIL	CTCTAGGCCCTGGCTGCTAC	TGACATCTGAGTGGGTCTGG
TWIST	CCGGAGACCTAGATGTCATTG	CACGCCCTGTTTCTTTGAAT
CK19	CCGCGACTACAGCCACTACT	AGAGCCTGTTCCGTCTCAAA
BCRP1	ATGGATTTACGGCTTTGCAG	GAGATCGATGCCCTGCTTTA
CEACAM6	ATGTGCCAAGCCCATAACTC	GTCTGGTCCAATCTGCCAGT
GAPDH	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT	CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA

Tablo 5.6: qRT-PCR döngü şartları

Döngü Sayısı	Sıcaklık (ºC)	Süre
1 döngü	95	10 dakika
45 döngü	95 58-60 72	20 saniye 30 saniye (ölçüm) 30 saniye
Erime eğrisi	55 - 95	Her 0.1 sıcaklık değişiminde ölçüm

Kullanılan primerlerin etkinliği (E değeri) hesaplanırken konsantrasyonu bilinen cDNA'dan 5 farklı dilüsyon hazırlandı. Bu dilüsyonlar kalıp DNA olarak kullanıldı. Yapılan qPCR sonucunda E değeriMxPro yazılımının, Ct değerlerini kullanarak oluşturduğu 5 noktalı standart eğrinin eğimi ile hesaplandı (Tablo 5.7).

$$E=10^{-1/Eğim} \qquad (5.1)$$

Tablo 5.7: Primer etkinliği

Primer	Primer Etkinliği
SIP1	2,11
ZEB1	2,17
SNAIL	1,90
TWIST	1,70
CK19	1,90
BCRP1	1,80
CEACAM6	2.15
GAPDH	2,12

Gen ifadesi analizi ddCt yöntemi kullanılarak yapıldı.

$$ddCt = E_{gen}\text{^}dCt_{gen}(\text{kalibratör-örnek})/E_{normalizatör}\text{^}dCt_{normalizatör}(\text{kalibratör-örnek}) \quad (5.2)$$

$$\text{Relative ekspresyon} = \text{Log}_2(ddCt) \quad (5.3)$$

qRT-PCR reaksiyonu triplike yapılmış ve denemeler 2'şer kez tekrarlanmıştır.

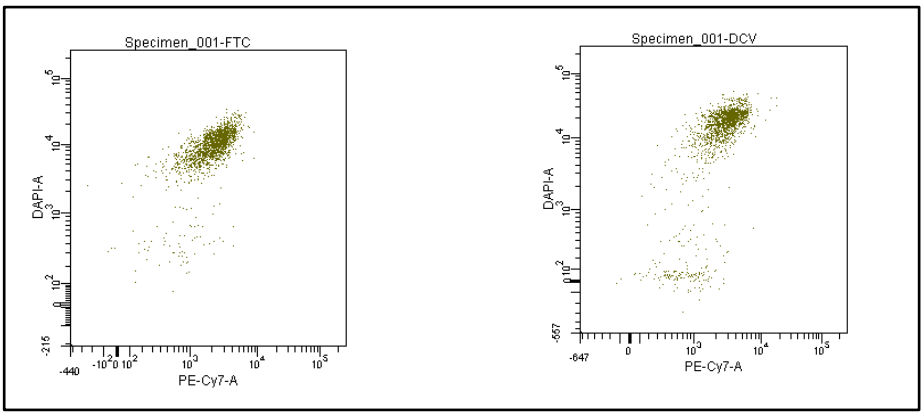
6. BULGULAR

6.1.Akım Sitometresi ile Hücre Analizi ve İzalasyonu

Huh7 ve PLC/PRF/5 hepatoselüler karsinoma (HCC) hücre hatlarında akım sitometresi ile ikincil popülasyon (Side popülasyon, SP) hücreleri ve hücre yüzey belirteci olan CD133/CD44 ikili pozitifliği analiz edilmiştir.Hücre yüzey belirteçlerine göre $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubu izole edilmiştir.

6.1.1. SP Hücre Analizi

Yaptığımız çalışma ile HuH7 hücre hattında, DCV boyanması ile akım sitometresi alt-kadranında kuyruk şeklinde olan buna karşın FTC pompa inhibitörü eklenen tüpte kaybolan SP hücreleri gözlemlenememiştir (Şekil 6.1).



Şekil 6.1:HuH7 hücre hattında SP hücre analizi.

Şekil 6.1'de görüldüğü üzere sol tarafta DCV boyası ve FTC pompa inhibitörü olan tüpün görüntüsü ve sağ tarafta ise sadece DCV boyası olan tüpün görüntüsüdürDCV ile boyanan tüpte kuyruk şeklinde görünenve inhibitörlü tüpte kaybolan SP hücreleri akım sitometresi alt-kadranında incelenmiştir.

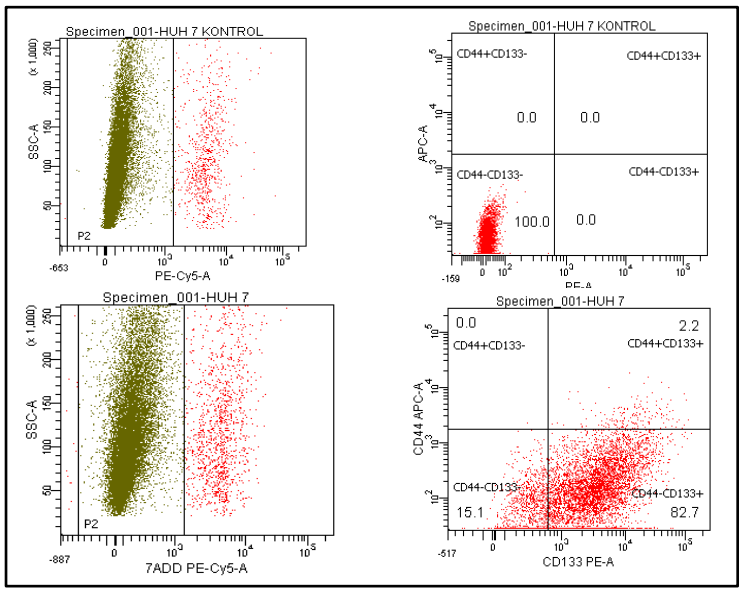
Farklı boya ve inhibitör konsantrasyonları ile filtre kombinasyonları denenmiş olmasına rağmen SP hücre izolasyonu gerçekleştirilemedi. Takip eden çalışmalarda, CD133 ve CD44 hücre yüzey proteinleri kullanılarakHCC hücre hatlarından kanser kök hücrelerinin izole edilmesive gen ifade analizlerinin değerlendirilmesi kararlaştırıldı.

6.1.2. CD133/CD44 İkili Pozitif Hücre Analizi ve İzolasyonu

HuH7 ve PLC/PRF/5 HCC hücre hatlarında kanser kök hücrelerinin belirlenmesi amacıyla CD133/CD hücre yüzey belirteçleri kullanılmıştır.

6.1.2.1. HuH7 Hücre Hattında $CD133^{+}CD44^{+}$ Hücre Analizi ve İzolasyonu

HuH7 hücreleri eş zamanlı olarak CD133-PE ve CD44-APC antikorları ile inkübe edildi.Akım sitometresi ile yapılan analizde $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubu oranı %2,2 $CD133^{+}CD44^{-}$ hücre alt-grubu oranı % 82,7 ve $CD133^{-}CD44^{-}$ hücre alt-grubu oranı %15 olarak bulundu (Şekil 6.2). Takip eden ayrıştırma işlemiyle boyanan hücrelerden $CD133^{+}CD44^{+}$, $CD133^{+}CD44^{-}$ ve $CD133^{-}CD44^{-}$ hücre alt-grupları% 98 saflıkta izole edildi.

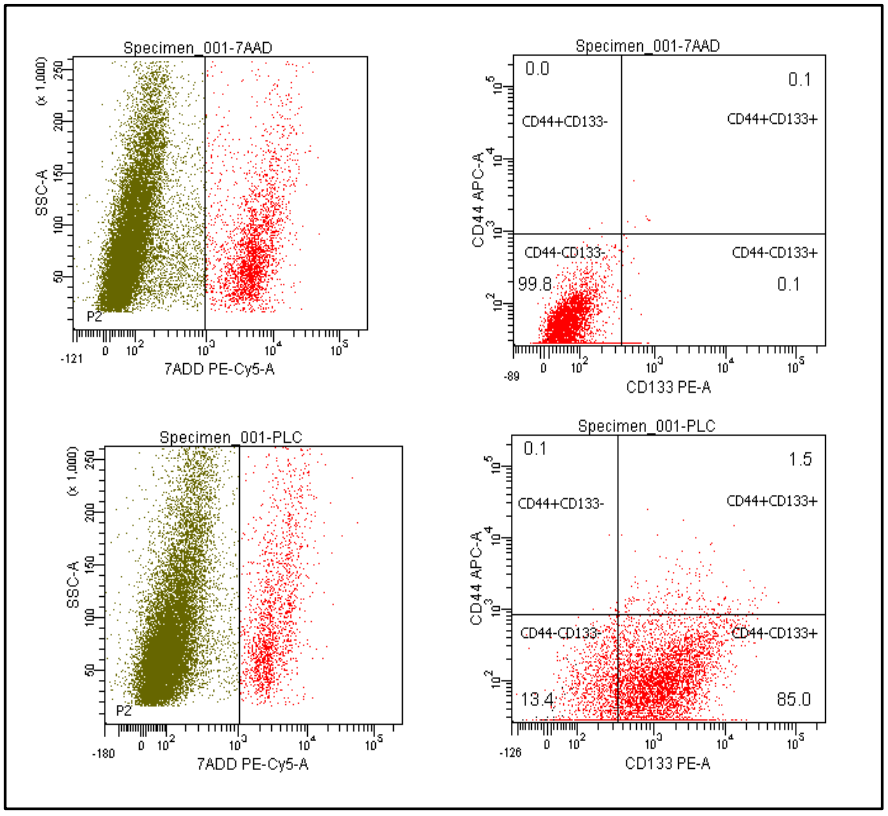


Şekil 6.2:HuH7 hücre hattında CD133/CD44 ikili boyanması.

Şekil 6.2’de kontrol tüpünün görüntüsü üst tarafta görülmektedir.7AAD solüsyonu ölü hücreleri boyamaktadır. 7AAD ile boyanmayan canlı hücreler hücreler seçilip APC ve PE filtrelerindeki floresan sinyaline göre akım sitometresinin izolasyon ayarları yapılmıştır.Yine aynı şekilde alt tarafta7AAD solüsyonu ile boyanmayanhücrelerdeki CD133-PE ve CD44-APC floresan sinyalleri incelenmiştir.

6.1.2.2. PLC/PRF/5 Hücre Hattında CD133+CD44+ Hücre Analizi ve İzolasyonu

PLC/PRF/5 hücre hattında CD133-PE ve CD44-APC ile hücre yüzey boyaması yapıldı. Boyanmalar akım sitometrisinde değerlendiridiğinde, $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubu %1,5, $CD133^{+}CD44^{-}$ hücre alt-grubu % 85 ve $CD133^{-}CD44^{-}$ hücre alt-grubu %13,4 olarak bulundu (Şekil 6.3).CD133/CD44 ikili antikor boyanmasının gerçekleştirildiği tüpten CD133+CD44+, $CD133^{+}CD44^{-}$ ve $CD133^{-}CD44^{-}$ hücre alt-grupları% 98 saflıktaizole edildi.



Şekil6.3: PLC/PRF/5 hücre hattında CD133/CD44 ikili boyanması.

Şekil 6.3'de kontrol tüpünün görüntüsü üst tarafta gösterilmektedir. 7AAD solüsyonu ile boyanmayan canlı hücreler seçilmiştir. Bu canlı hücrelerin APC ve PE filtrelerindeki sinyallerine bakılarak akım sitometresinin izolasyon ayarları yapılmıştır. Aynı şeklin alt tarafında7AAD solüsyonu ile boyanmayan hücrelerCD133-PE ve CD44-APC antikorlarından gelen floresan sinyallerine göre incelenmiştir.

6.1.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Akım sitometresi ile elde edilmiş olan hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA konsatrasyonu NanoSpec spektrometre cihazı ile ölçüldü. Ölçüm sonucunda OD 260/280 oranı 2,1 ve RNA konsantrasyonu 150 – 500 ng/ul olarak bulundu.

İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezi yapıldı. Sentezlenen cDNA miktarı NanoSpec spektrometre cihazı ile ölçüldü. Ölçüm sonucunda 260/280 OD değeri 1,80 ve tek-zincir DNA miktarı 300 – 330 ng/ul olarak bulundu.

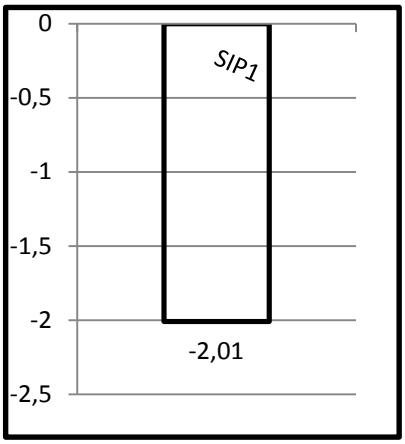
6.1.4. qRT-PCR ile gen ifadesi analizi

6.1.4.1. HuH7 Hücre Alt-Gruplarında *SIP1* İfadesinin Analizi

İzole edilmiş HuH7 hücre alt-gruplarından ve parental HuH7 hücre hattından sentezlenen cDNA'lar kullanılarakqRT-PCR ile *SIP1* geninin ifadesi araştırıldı.$CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubundaki gen ifadesi parental HuH7 hücrelerine göre değerlendirildi. Ancak epitel hücre özelliğindeki HuH7 hücrelerinde SIP1 gen ifadesi çok düşük düzeylerde olup, deneyler arası yüksek değişkenlik göstermekteydi.İzole ettiğimiz $CD133^{+}CD44^{+}$ kanser kök hücrelerinde de tutarlı bir qRT-PCR sonucu elde edemedik. Bunun üzerine, SIP1 gen ifadesi yüksek olan PLC/PRF/5 hücre hattından izole edilen $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda *SIP1* gen ifadesi incelendi.

6.1.4.2. PLC/PRF/5 Hücre Alt-Gruplarında *SIP1* İfadesinin Analizi

Burada daha direkt bir yaklaşımla,*SIP1* geninin$CD133^+CD44^+$ hücre alt-grubundakiifadesiparental PLC/PRF/5 hücrelerdekiyle karşılaştırılarak analiz edildi. (Şekil 6.4).



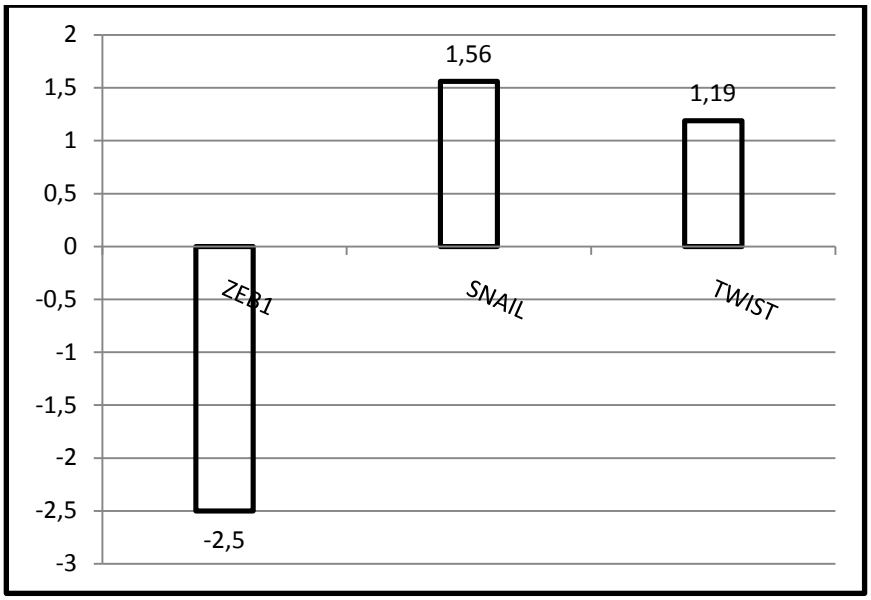
Şekil 6.4:PLC/PRF/5 $CD133^+CD44^+$ hücre alt-grubunda SIP1 gen ifadesi.

CD133+CD44+ hücrelerinde, parental hücrelere göre GAPDH ile normalize edilmiş SIP1gen ifadesi (Log2 tabanında) Şekil 6.4'te gösterilmektedir.

Beklediğimizin aksine,$CD133^+CD44^+$ hücre alt-grubunda parental hücrelere göre azalmış *SIP1* gen ifadesi bulundu. EMT-indükleyici transkripsiyon faktörlerinden herbirinin EMT ve kanser kök hücre fenotipini bağımsız olarak düzenleyebilme özellikleri göz önüne alınarak, *ZEB1*, *SNAIL* ve *TWIST* genlerinin ifadelerinin de değerlendirilmesinin yerinde olacağı düşünüldü.

6.1.4.3. PLC/PRF/5 Hücre Alt-Gruplarında *ZEB1, SNAIL* ve *TWIST* Gen İfadelerinin Analizi

İzole edilmiş $CD133^+CD44^+$ hücre alt-grubundan ve parental PLC/PRF/5 hücre hattından sentezlenen cDNA'lar kullanılarak qRT-PCR ile *ZEB1*, *SNAIL* ve *TWIST*genlerininin$CD133^+CD44^+$ hücre alt-grubunda parental PLC/PRF/5 hücrelerine göre gen ifadeleri analiz edildi (Şekil 6.5).



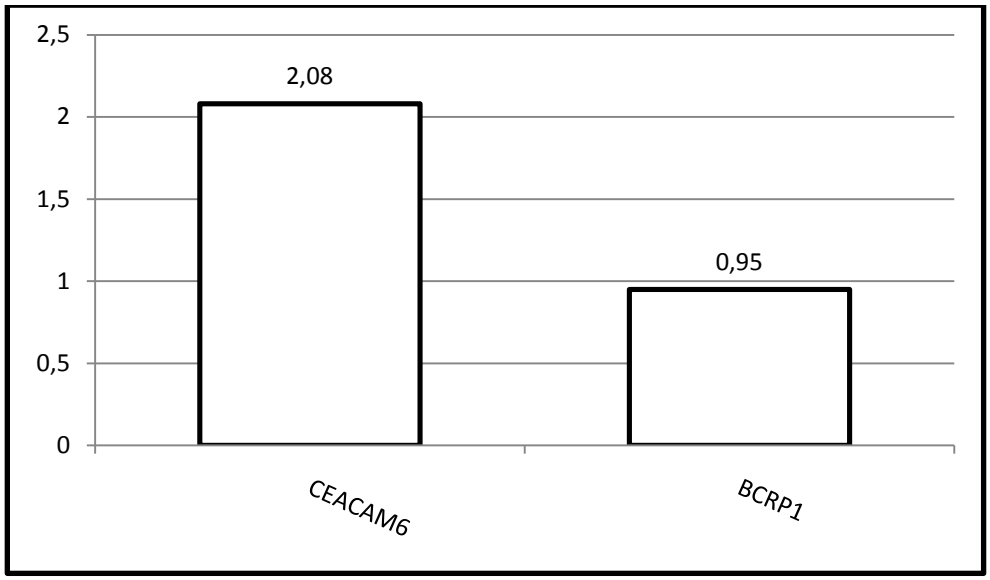
Şekil 6.5:PLC/PRF/5 $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda ZEB1, SNAIL ve TWIST gen ifadeleri.

$CD133^{+}CD44^{+}$ hücrelerinde, parental hücrelere göre *GAPDH* ile normalize edilmiş *ZEB1, SNAIL* ve *TWIST* gen ifadesi (Log_2 tabanında)Şekil 6.5'te gösterilmektedir.

$CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda diğer ZEB transkripsiyon faktörü *ZEB1*'in gen ifadesininazaldığı,buna karşın diğer EMT-indükleyici transkripsiyon faktörlerinden SNAIL ve TWIST'inarttığı saptandı. Çalışmanın devamında kemoterapiye direnç ile ilişkili olduğu belirtilen *BCRP1* (*ABCG2*) ve *CEACAM6* genlerinin ifadelerine bakıldı.

6.1.4.4. PLC/PRF/5 Hücre Alt-Gruplarında *BCRP1* ve *CEACAM6* Gen İfadelerinin Analizi

İzole edilmiş $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubundan ve parental PLC/PRF/5 hücre hattındansentezlenen cDNA'lar kullanılarak qRT-PCR ile *BCRP1* ve *CEACAM6*genlerininCD133^{+}CD44^{+} hücre alt-grubunda parental PLC/PRF/5 hücrelerine göre gen ifadeleri analiz edildi (Şekil 6.6).



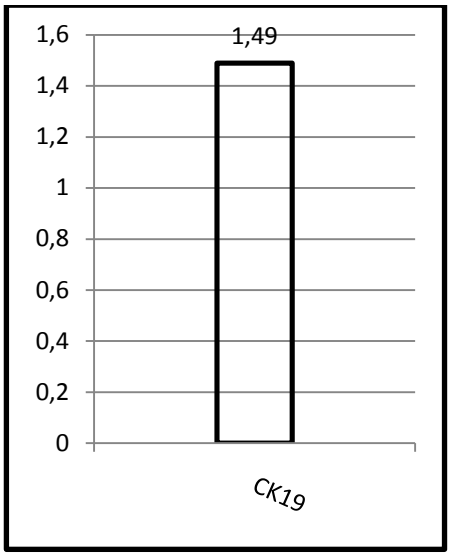
Şekil 6.6:PLC/PRF/5 $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda *BCRP1* ve *CEACAM6* gen ifadeleri.

$CD133^{+}CD44^{+}$ hücrelerinde, parental hücrelere göre *GAPDH* ile normalize edilmiş *BCRP1* ve *CECAM6* gen ifadesi (Log_2 tabanında)Şekil 6.6'da gösterilmektedir.

$CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda kanser kök hücrenin özelliklerinden olan kemoterapiye direnci ile ilişkili olan *BCRP1* ve *CEACAM6* genlerinin artmış ifadesi bulundu.Son olarak $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda karaciğer öncü/kök hücre belirteci olan *CK19* gen ifadesine bakıldı.

6.1.4.5. PLC/PRF/5 Hücre Alt-Gruplarında *CK19* Gen İfadesi Analizi

İzole edilmiş PLC/PRF/5 hücre alt-gruplarından ve parental PLC/PRF/5 hücre hattından sentezlenen cDNA'lar kullanılarak qRT-PCR ile *CK19* genininifadesi $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda parental PLC/PRF/5 hücrelerine göre incelendi (Şekil 6.7).



Şekil 6.7: PLC/PRF/5 $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda CK*19* gen ifadesi.

$CD133^{+}CD44^{+}$ hücrelerinde, parental hücrelere göre *GAPDH* ile normalize edilmiş *CK19* gen ifadesi (Log_2 tabanında)Şekil 6.7'de gösterilmektedir.

Karaciğer öncül/kök hücre belirteci olan *CK19* anlatımı $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda parental hücrelere göre artmış olarak bulundu.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

2006 yılında iki bağımsız araştırması Haraguchi ve arkadaşları ile Chiba ve arkadaşları ikincil popülasyon (Side Popülasyon: SP) hücre izolasyonu yaklaşımı ile hepatoselüler karsinomada (HCC) kanser kök hücrelerini (CSC) izole etmiştir[Haraguchi et al., 2006],[Chiba et al., 2006].Çalışmamız kapsamında, ilk olarak HuH7 hücre hattında, SP hücre izolasyonu yaklaşımı ile CSC analizi yapıldı. Farklı DCV boya konsantrasyonu, pompa inhibitörleri ve filtre kombinasyonlarına rağmen akım sitometresi alt-kadranında kuyruk şelinde SP hücreleri belirlenemedi. Bunun üzerine HCC CSC izolasyonunda kullanılan diğer hücre belirteçleri değerlendirildi. Bunlardan CD133 Suetsugu ve arkadaşları tarafından HCC'da kanser kök hücrelerini tanımlamak ve izole etmek amacıyla kullanılmıştır.Yaptıkları çalışmada $CD133^+$ hücrelerde olgun hepatosit belirteci olan glutamin sentaz ve sitokrom P450 3A4 (CYP3A4) anlatımının düşük olduğunu göstermişler ve CD133'ü bir CSC ayırıcısı olarak önermişlerdir[Suetsuguet al., 2006]. Ancak, CSC'lerinin kanser dokusundaazınlık bir popülasyon olarak tanımlanması ve $CD133^+$hücre oranınınbazı HCC hücre hatlarında %90'ların üzerinde bulunması araştırmacıları farklı belirteçleri incelemye teşvik etmiştir.

Zhu ve arkadaşları CD133 ile birlikte CD44 anlatımının, karaciğer CSC'lerinin tanımlanmasında daha kesin bir yol olabileceğini göstermiştir.ÇalışmalarındaHuH7, SMMC-7721, MHCC-LM3 ve MHCC-97L HCC hücre hatlarından izole edilen $CD133^+CD44^+$ hücre alt-grubunun $CD133^+CD44^-$ hücre alt-grubuna görefarelerde tümör oluşturmave kendini yenileme kapasitelerinindaha yüksek olduğunu bulmuşlardır [Zhu et al., 2010].

Yukarıda tartışılan veriler ışığında,HCC hücre hatlarından HUH7 ve PLC/PRF/5 hücrelerinde CSC'lerinin izolasyonuCD133 ve CD44 antikorları birlikte kullanılarak gerçekleştirildi.

HuH7 hücrelerinde$CD133^+CD44^+$ikili pozitif hücre alt-grubu oranı %2,2 olarak bulundu. Bu oran Zhu arkadaşlarının HuH7 hücre hattındaaynı hücre alt-grubu için saptadığı %1,88 oran ile uyumludur [Zhu et al., 2010]. Epitel-mezenkim dönüşümünü (EMT) indükleyen transkripsiyon faktörlerinin aşırı anlatımının, CSC özelliği ile ilişkili olduğuna dair çalışmalardan yola çıkarak, çalışmanın devamında CD133+CD44+ hücre alt-grubunda, parental HuH7 hücre hattına göre *SIP1* gen

ifadesi incelendi. Bu hücre hattında SIP1 gen ifadesi daha önceki çalışmalarda araştırılmıştır.Miyoshi ve arkadaşları*SIP1* gen ifadesinisaptayamamış veAcun arkadaşları ise ancak zayıf bir *SIP1* gen ifadesi tanımlamıştır [Miyoshi et al., 2004], [Acun vd., 2011].Bizim çalışmamızda da,HuH7 hücrelerinde SIP1 gen ifadesi çok düşük düzeylerde olup, deneyler arası yüksek değişkenlik göstermekteydi. $CD133^{+}CD44^{+}$ kanser kök hücrelerinde de ya saptanamayan ya da çok düşük gen ifadesi sonuçlarıyla karşılaştık. Amacımız parental hücreye göre CSC'lerdeki SIP1 ifadesini araştırmak olduğu için, en azından paerntal hücrede değerlendirilebilir bir SIP1 ifadesi gösteren PLC/PRF/5 hücreleriyle çalışmaya devam ettik.

PLC/PRF/5 hücre hattında$CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubu %1,5 ve $CD133^{+}CD44^{-}$ hücre alt-grubu da %85 olarak bulundu. Bu oranKohga arkadaşlarının %95,2 ve Na arkadaşlarının %79,2 olarak bulduğu $CD133^{+}$ hücre oranı ile uyumludur [Na et al., 2011]. PLC/PRF/5 hücre hattında $CD133^{+}CD44^{+}$ikili pozitif hücre alt-grubu ile ilgili bilgimiz dahilinde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Yine de,CSC özelliği gösteren $CD133^{+}CD44^{+}$ PLC/PRF/5 hücrelerinin %1,5 gibi düşük bir oranda bulunmuş olması daha önceki çalışmalarda ve farklı HCC hücre hatlarında tanımlanan CSC oranları ile uyumludur[Haraguchi et al., 2006].

PLC/PRF/5'ten izole edilen $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda*SIP1* gen ifadesiçalışılabilmiş ve parental hücrelerdeki gen ifadesi ile karşılaştırılmıştır. Ancak ifadenin CSC özelliğindeki $CD133^{+}CD44^{+}$ hücrelerde parentale göre düşük bulunmuş olması, SIP1'in en azından karaciğer kanserinde EMT ile ilişkili fakat kök hücre fenotipi ile bağlantısız olduğuna işaret etmektedir. Acun ve arkadaşları*SIP1* ifadesinin epitel hücre özelliğinde olan PLC/PRF/5 hücre hattında düşük olduğunu göstermiştir [Acun vd., 2011]. Diğer yandan,*SIP1* ifadesi bağlama bağlı (context dependent) olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Burada incelenen sadece in vitro koşullarda izole edilmiş belli bir hücre popülasyonundaki *SIP1* anlatımıdır. Oysa bu genin ifadesi TGF-beta sinyali, mikroçevre, post-transkripsiyonel düzenlemeler gibi karmaşık etkenlere bağlı olarak düzenlenmektedir. Örneğin,*SIP*1 gen ifadesinin mRNA seviyesinde miRNA'lar ile konrol edilmesinden dolayı azalmış gen ifadesi görülebilmektedir. Kim ve arkadaşları tarafından p53 aracılığıyla anlatımı artan miRNA'ların EMT'yi ZEB1/SIP1'i baskılayarak düzenlediği gösterilmiştir [Kim et al., 2011].EMT-indükleyicilerinin tek tek ve bağımsız olarak EMT programını harekete geçirebildikleri bilinmektedir. Dolayısıyla, çalışmamızın devamında PLC/PRF/5 hücrelerinden izole ettiğimiz CSC'lerinde diğer EMT-indükleyici

transkripsiyon faktörlerinden *ZEB1*, *SNAIL* ve *TWIST*'in gen ifadeleri de incelenmiştir.

Wellner ve arkadaşları pankreas kanseri hücrelerinde EMT-indükleyici transkripsiyon faktörlerindenZEB1'in miRNA'ları inhibe ederek CSC özelliğini düzenlediğini göstermişlerdir [Wellner et al., 2009]. Ancak,incelediğimiz $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda parental hücrelere göre azalmış *ZEB1* ifadesi bulunmuştur. SIP1 ve ZEB1 aynı miRNA'lar ile düzenleniyor olması, düşük SIP1 anlatımına azalmış ZEB1 ifadesi bulmamızı açıklayabilecek bir yaklaşım olsa gerektir.

Yasui ve arkadaşları troid kanseri hücrelerinde SNAIL aracılığıyla EMT indüklendiğinde hücrelerin kanser kök hücre özelliği kazandığını göstermiştir[Yasui et al., 2013]. Na ve arkadaşları ise PLCPRF/5 hücre hattından izole edilen $CD133^{+}$ hücre alt-grubunda yüksek Snail anlatımı tanımlamışlardır [Na et al., 2011].Yapmış olduğumuz çalışmada, $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda parental hücrelere göre artmış *SNAIL* ifadesi bulmuş olmamız bu iki araştırmayı doğrular nitelikte bir bulgu olarak ortaya çıkmaktadır.

Bir diğer EMT-indükleyicisi *TWIST'*in immortalize edilmiş meme epitel hücrelerinden izole edilen ve CSC özelliği gösteren $CD44^{yüksek}CD24^{düşük}$ hücrelerde yüksek anlatımı gösterilmiştir [Mani et al., 2008].*SNAIL* ifadesi kadar yüksek olmamakla birlikte, PLCPRF/5 kökenli $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda parental hücrelere göre artmış *TWIST* ifadesi bizim çalışmalarımızda ortaya çıkan bir diğer bulgudur. Dolayısıyla, ilk hedef genimiz *SIP1*'in ve bununla ilişkili ifadeleri HCC CSC bağlamında düşük olarak bulunmuş, ancak *SNAIL* ve *TWIST* anlatımlarının arttığı ortaya konmuştur.

EMT ile ilişkili olan genlerin analizinden sonra CSC'nin özelliklerinden biri olan kemoterapiye direnç ile ilişkili *BCRP1* ve *CEACAM6* gen ifadeleri de incelenmiştir.*CEACAM6* ve *BCRP1* gen ifadelerinin $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunda, parental hücrelere göre arttıkları tespit edilmiştir. Bu bulgularımız da literatürdeki çalışmalarla örtüşmektedir. Örneğin, Haraguchi ve arkadaşları HuH7 ve PLC/PRF/5 hücre hatlarından SP hücrelerini izole etmiş ve bu hücrelerde kemoterapiye direnç ile ilişkili olan *ABCG2* (*BCRP1*) ve*CEACAM6* gen ifadelerinin artmış olduğunu göstermiştir [Haraguchi et al., 2006].

Karaciğerin öncü/kök hücreleri hem hepatosit, hem de safra yolu epitelyum hücrelerine farklılaşma yeteneği gösterirler. Bu öncü hücreleri tanımlayan

belirteçlerden biri de *CK19*olup, hem normal karaciğer hemde HCC kök hücrelerinde ifade edilir. Buna karşın, olgun hepatositlerde bu belirtecin anlatımı görülmemektedir.Ayrıca, Haraguchi ve arkadaşları CSC özelliğindeki SP hücre alt-grubunda artmış *CK19* anlatımı göstermişlerdir [Haraguchi et al., 2006]. İzole ettiğimiz $CD133^{+}CD44^{+}$ hücre alt-grubunun öncü/projenitör niteliğini ortaya koymak amacıyla yapmış olduğumuz çalışmada,$CD133^{+}CD44^{+}$ hücrelerinin parental hücrelere göre artmış *CK19* gen ifadesi gösterdikleri saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada, HuH7 ve PLC/PRF/5 hücre hatlarından literatürde CSC özelliği tanımlanmış $CD133^{+}CD44^{+}$ hücreler yine literatüre uygun bir oranda elde edilebilmiş ve PLC/PRF/5 kökenli hücrelerde gen ifadesi analizleri gerçekleştirilmiştir. Akım sitometrisi ile ayrıştırılan bu hücrelerde, *SIP1* ve *ZEB1* ifadelerinin düşük, *SNAIL* ve *TWIST* ifadelerinin ise yüksek olduğu saptanmıştır. Bunlara ek olarak, izole edilen hücrelerin öncü/projenitör hücre nitelikleri CK19 ifadesi ile gösterilmiş ve bu hücre alt-grubunun bir diğer kök hücre özelliği olan ilaç-dirençliliği *BRCP1* ve *CEACAM6* gen anlatımları yoluyla saptanmıştır.

8. ÖNERİLER

$CD133^{+}CD44^{+}$ CSC'leri iki farklı hücre hattından izole edilebilmelerine karşın SIP1 gen ifadesinini düşük olması nedeniyle qRT-PCR çalışmaları sadece PLC/PRF/5 parental ve alt-grup hücrelerinde yapılmıştır. CSC'lerinde yüksek ifadelerini bulduğumuz *SNAIL* ve *TWIST* genlerinin HUH7 hücrelerinde de analiz edilmesi bu genlerin HCC'da EMT ve CSC fenotiplerinin düzenlenmesi bağlamında ilave bir doğrulama sağlayabilir. Takip eden aşamada, *SNAIL* ve *TWIST* genlerinin aşırı ifadesi ve gen susturulması yoluyla HCC hücre hatlarında yol açacakları fenotipik değişkliklerin izlenmesi hepatokarsinogenezin moleküler mekanizmaları açısından yeni bilgilerin ortaya konmasını sağlayabilir. Bu yaklaşımlarla elde edilecek in vitro bulgular doku, deney hayvanları ksenotransplantları kapsamında ileri in vivo çalışmalara taşınabilir. Konvansiyonel tedavilere direnç gösteren, tümör kitlesini sürekli yenileme ve metastaz yapabilme yeteneğindeki CSC'lerinin HCC ve diğer kanser türlerinde daha iyi anlaşılması, hem tanısal hem de terapötik değeri olan yeni moleküler hedeflerin saptanmasında yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

Acun T., Oztas E., Yagci T., Yakicier M. C., (2011), "SIP1 is downregulated in hepatocellular carcinoma by promoter hypermethylation", Biomedical Center Cancer, 6, 223-228.

Afify A., Purnell P., Nguyen L., (2009), "Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion", Experimental and Molecular Pathology, 86, 95–100.

Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., Morrison S. J., Clarke M. F., (2003), "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells", Proceedings of the National Academy of Sciences, 100, 3983–3988.

Ali A., Zein N. N., (2005), "Hepatitis C infection: a systemic disease with extrahepatic manifestations", Cleveland Clinic Journal of Medicine,72, 1005-1008.

Beasley R. P., Hwang L. Y., Lin C. C., Chien C. S., (1981), "Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan", Lancet, 5,1129-1133.

Bhat-Nakshatri P., Appaiah H., Ballas C., Pick-Franke P., Goulet R Jr., Badve S., Srour E. F., Nakshatri H., (2010), "SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype", Biomedical Center Cancer, 7,411-417.

Bonnet D., Dick J. E., (1997), "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell", Nature Medicine , 3, 730–737.

Bosch F. X., Ribes J., Borras J., (1999), "Epidemiology of primary liver Cancer", Seminars in Liver Disease,19, 271-280.

Bosch FX., Ribes J., Cleries R., Diaz M., (2005), "Epidemiology of hepatocellular carcinoma", Clinical Liver Disease, 9, 191-200.

Boyer B., Thiery J.P., (1993), "Epithelium-mesenchyme interconversion as example of epithelial plasticity", Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 101, 257–268.

Brabletz T., Jung A., Spaderna S., Hlubek F., Kirchner T., (2005), "Opinion: migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression", Nature Reviews Cancer, 5, 744–749.

Browne G., Sayan A. E., Tulchinsky E., (2010), "ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer", Cell Cycle, 9, 886-891.

Campbell L. L., Polyak K., (2007), "Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution?", Cell Cycle, 6, 2332–2338.

Chiba T., Kita K., Zheng Y. W., Yokosuka O., Saisho H., Iwama A., Nakauchi H., Taniguchi H., (2006), "Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties", Hepatology, 44, 240-251.

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

Dalerba P., Dylla S. J., Park I. K., Liu R., Wang X., Cho R. W., Hoey T., Gurney A., Huang E. H., Simeone D. M., Shelton A. A., Parmiani G., Castelli C., Clarke M. F., (2007), "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells", Proceedings of the National Academy of Sciences, 104, 10158-10163.

Daly A. C., Randall R. A., Hill C. S., (2008), "Transforming growth factor beta-induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth", Molecular and Cellular Biology, 28, 6889-6902.

Davies J.A., (1996), "Mesenchyme to epithelium transition during development of the mammalian kidney tubule", Acta Anatomica, 156, 187–201.

Derynck, R., Zhang Y.E., (2003), "Smad-dependent and Smadindependent pathways in TGF-b family signalling", Nature, 425, 577–584.

DiMeo T. A., Anderson K., Phadke P., Fan C., Perou C. M., Naber S., Kuperwasser C., (2009), "A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelialmesenchymal transition in basal-like breast cancer", Cancer Research, 69, 5364–5373.

el-Serag H. B., (2001), "Epidemiology of hepatocellular carcinoma", Clinical Liver Disease, 5, 87-92.

el-Serag H. B., Rudolph K. L., (2007), "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis", Gastroenterology, 132, 2557–2576.

Farazi P. A., DePinho R. A., (2006) "Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment", Nature Reviews Cancer, 6, 674-687.

Fargeas C. A., Florek M., Huttner W. B., Corbeil D., (2003), "Characterization of prominin-2, a new member of the prominin family of pentaspan membrane glycoproteins", The Journal of Biological Chemistry, 278, 8586–8596.

Fargeas C. A., Joester A., Missol-Kolka E., Hellwig A., Huttner W. B., Corbeil D., (2004), "Identification of novel Prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis", Journal of Cell Science, 117, 4301-4311.

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

Funahashi J., Sekido R., Murai K., Kamachi Y., Kondoh H., (1993), "Delta-crystallin enhancer binding protein delta EF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis" , Development, 119, 433-446.

Ganguly R., Puri I. K., (2007), "Mathematical model for chemotherapeutic drug efficacy in arresting tumour growth based on the cancer stem cell hypothesis", Cell Proliferation, 40, 338–354.

Gerber J. M., Smith B. D., Ngwang B., Zhang H., Vala M. S., Morsberger L., Galkin S., Collector M. I., Perkins B., Levis M. J., Griffin C. A., Sharkis S. J., Borowitz M. J., Karp J. E., Jones R. J., (2012), "A clinically relevant population of leukemic CD34(+)CD38(-) cells in acute myeloid leukemia", Blood, 119, 3571-3577.

Ginestier C., Hur M. H., Charafe-Jauffret E., Monville F., Dutcher J., Brown M., Jacquemier J., Viens P., Kleer C. G., Liu S., Schott A., Hayes D., Birnbaum D., Wicha M. S., Dontu G., (2007), "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome", Cell Stem Cell, 1, 555-567.

Goodell M. A., Brose K., Paradis G., Conner A. S., Mulligan R. C., (1996), "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo" , Journal of Experimental Medicine, 183,1797-1806.

Gordon K. J., Blobe G. C., (2008), "Role of transforming growth factor-superfamily signaling pathways in human disease", Biochimica et Biophysica Acta, 1782, 197–228.

Gregory P. A., Bert A. G., Paterson E. L., Barry S. C., Tsykin A., Farshid G., Vadas M. A., Khew-Goodall Y., Goodall G. J., (2008), "The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1", Nature Cell Biology, 10, 593-601.

Ikeda K., Saitoh S., Koida I., Arase Y., Tsubota A., Chayama K., Kumada H., Kawanishi M., (1993), "A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis", Hepatology, 18, 47-56.

Jordan C. T., Guzman M. L., Noble M., (2006), "Cancer stem cells", The New England Journal of Medicine, 355, 1253–1261.

Hamburger A.W., Salmon S.E., (1977), "Primary bioassay of human tumor stem cells", Science, 197, 461-463.

Haraguchi N., Utsunomiya T., Inoue H., Tanaka F., Mimori K., Barnard G. F., (2006), "Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system", Stem Cells, 24, 506–513.

Haraguchi N., Ishii H., Mimori K., Tanaka F., Ohkuma M., Kim H. M., Akita H., Takiuchi D., Hatano H., Nagano H., Barnard G. F., Doki Y., Mori M., (2010), "CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells", The Journal of Clinical Investigation, 120, 3326-3339.

Henry S. H., Bosch F. X., Bowers J. C., (2002), "Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks", Advances in Experimental Medicine and Biology, 504, 229-232.

Hu J., Ludgate L., (2007), "HIV-HBV and HIV-HCV coinfection and liver cancer development", Cancer Treatment Research, 133, 241-52.

Huber M.A., Kraut N., Beug H., (2005), "Molecular requirements for epithelialmesenchymal transition during tumor progression", Current Opinion in Cell Biology, 17, 548–558.

Huo T. I., Wang X. W., Forgues M., Wu C. G., Spillare E. A., Giannini C., Brechot C., Harris C. C., (2001) "Hepatitis B virus X mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate p53-induced apoptosis", Oncogene, 20, 3620-3627.

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

Karreth F. A., Tay Y., Perna D., Ala U., Tan S. M., Rust A. G., DeNicola G., Webster K. A., Weiss D., Perez-Mancera P. A., Krauthammer M., Halaban R.,Provero P., Adams D. J., Tuveson D. A., Pandolfi P. P., (2011), "In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced Mouse model of melanoma", Cell, 147, 382–395.

Kato M., Zhang J., Wang M., Lanting L., Yuan H., Rossi J. J., Natarajan R., (2007), "MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors", Proceedings of the National Academy of Sciences, 104, 3432-3437.

Kew M. C., (2002), "Epidemiology of hepatocellular carcinoma", Toxicology, 35, 181–182.

Kew M. C., (2003) "Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis", Liver International, 23, 405-409.

Kim J. W., Ye Q., Forgues M., Chen Y., Budhu A., Sime J., Hofseth L. J., Kaul R., Wang X. W., (2004), "Cancer-associated molecular signature in the tissue samples of patients with cirrhosis", Hepatology, 39, 518-527.

Kim T., Veronese A., Pichiorri F., Lee T. J., Jeon Y. J., Volinia S., Pineau P., Marchio A., Palatini J., Suh S. S., Alder H., Liu C. G., Dejean A., Croce C. M., (2011), "p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2", Journal of Experimental Medicine, 208, 875-883.

Koopmansch B., Berx G., Foidart J. M., Gilles C., Winkler R., (2013), "Interplay between KLF4 and ZEB2/SIP1 in the regulation of E-cadherin expression", Biochemical and Biophysical Research Communications, 431, 652-657.

Kurrey N. K., Jalgaonkar S. P., Joglekar A. V., Ghanate A. D., Chaskar P. D., Doiphode R. Y., Bapat S. A., (2009), "Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells", Stem Cells, 27, 2059-2068.

Ladeiro Y., Couchy G., Balabaud C., Bioulac-Sage P., Pelletier L., Rebouissou S., Zucman-Rossi J., (2008), "MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations", Hepatology, 47, 1955-1963.

Li C., Heidt D. G., Dalerba P., Burant C. F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke MF., Simeone D. M., (2007), "Identification of pancreatic cancer stem cells", Cancer Research, 67, 1030-1037.

Liu I. M., Schilling S. H., Knouse K. A., Choy L., Derynck R., Wang X. F., (2009), "TGFbeta-stimulated Smad1/5 phosphorylation requires the ALK5 L45 loop and mediates the pro-migratory TGFbeta switch", EMBO Journal, 28, 88-98.

Lobo N. A., Shimono Y., Qian D., Clarke M. F., (2007), "The biology of cancer stem cells" Annual Review of Cell and Developmental Biology, 23, 675–699.

Lok AS., (2009), "Hepatitis B infection: pathogenesis and management", Journal of Hepatology, 32, 89-93.

Long J., Zuo D., Park M., (2005), "Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin", The Journal of Biological Chemistry, 280, 35477–35489.

Ma S., Chan K. W., Lee T. K., Tang K. H., Wo J. Y., Zheng B. J., Guan X. Y., (2008), "Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations", Molecular Cancer Research, 6, 1146-1153.

Maddrey W. C., (2000), "Hepatitis B- an important public health issue", Clinical Laboratory, 47, 51-53.

Magee J. A., Piskounova E., Morrison S. J., (2012), "Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty", Cancer Cell, 21, 283-296.

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., Campbell L. L., Polyak K., Brisken C., Yang J., Weinberg R. A., (2008), "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells", Cell, 133, 704–715.

Marhaba R., Zoller M., (2004), "CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation", Journal of Molecular Histology, 35, 211–231.

Marusawa H., Hijikata M., Chiba T., Shimotohno K., (1999), “Hepatitis c virus core protein inhibits fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via nf-kappab activation” , Journal of Virology, 73, 4713-4720.

McKillop I. H., Schrum L. W., (2006), “Alcohol and liver cancer”, Alcohol, 35, 195-203.

Mikkers H., Allen J., Knipscheer P., Romeijn L., Hart A., Vink E., Berns A., (2002), “High-throughput retroviral tagging to identify components of specific signaling pathways in cancer”, Nature Genetics, 32,153-159.

Miquelajauregui A., Van de Putte T., Polyakov A., Nityanandam A., Boppana S., Seuntjens E., Karabinos A., Higashi Y., Huylebroeck D., Tarabykin V., (2007), “Smad-interacting protein-1 (Zfhx1b) acts upstream of Wnt signaling in the mouse hippocampus and controls its formation”, Proceedings of the National Academy of Sciences, 104,12919-12924.

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

Morgan T. R, Mandayam S, Jamal M. M., (2004), “Alcohol and hepatocellular carcinoma”, Gastroenterology, 127, 87-96.

Moustakas A, Heldin C. H., (2005), “Non-Smad TGF-beta signals”, Journal of Cell Science, 118, 3573-3584.

Moustakas A., Heldina C. H., (2009), “The regulation of TGFsignal transduction”, Development, 136, 3699–13714.

Moustakas A., Heldin C. H., (2012), “Induction of epithelial–mesenchymaltransition by transforming growth factor “, Seminars in Cancer Biology, 22, 446–454.

Na D. C., Lee J. E., Yoo J. E., Oh B. K., Choi G. H., Park Y. N., (2011), “Invasion and EMT-associated genes are up-regulated in B viral hepatocellular carcinoma with high expression of CD133-human and cell culture study”, Experimental Molecular Pathology, 90, 66-673.

Naugler W. E, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy A. M, Karin M., (2007), “Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production”, Science, 317, 121–124.

Nowell P. C., (1976), “The clonal evolution of tumor cell populations”, Science, 194, 23–28.

Onder T., Piyush B., GuptaS., Mani A., Yang J., Lander E.S., Weinberg R.A., (2008), “Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways”, Cancer Research, 68, 3645-3652.

Ouyang G., Wang Z., Fang X., Liu J., Yang C. J., (2010), “Molecular signaling of the epithelial to mesenchymal transition in generating and maintaining cancer stem cells”, Cellular and Molecular Life Sciences, 67, 2605-2618.

Ozturk M., (1991), “p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure” Lancet, 338, 1356-1359.

Ozturk N., Erdal E., Mumcuoglu M., Akcali K. C., Yalcin O., Senturk S., Arslan-Ergul A., Gur B., Yulug I., Cetin-Atalay R., Yakicier C., Yagci T., Tez M., Ozturk M., (2006) “Reprogramming of replicative senescence in hepatocellular carcinoma-derived cells”, Proceedings of the National Academy of Sciences,103, 2178-2183.

Park S. M., Gaur A. B., Lengyel E., Peter M. E., (2008), “The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2”, Genes and Development, 22, 894-907.

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

Postigo A. A., Dean D. C., (1999), “ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP”, Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 6683–6688.

Postigo A. A., Depp J. L., Taylor J. J., Kroll K. L., (2003), “Regulation of Smad signaling through to differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins”, EMBO Journal, 22(10), 2453–2462.

Ray R. B., Lagging L. M, Meyer K, Steele R., Ray R., (1995),“Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein”, Virus Research, 37, 209-214.

Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L., (2001), “Stem cells, cancer, and cancer stem cells”, Nature, 414, 105–111.

Ricci-Vitiani L., Lombardi D. G., Pilozzi E., Biffoni M., Todaro M., Peschle C., De Maria R., (2007), “Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells”, Nature, 445, 111-115.

Riley J., Mandel H. G., Sinha S., Judah D. J., Neal G. E., (1997), “In vitro activation of the human Harvey-ras proto-oncogene by aflatoxin B1”, Carcinogenesis, 18, 905-910.

Romeo R., Colombo M., (2002), “The natural history of hepatocellular Carcinoma”, Toxicology, 39, 181–182.

Sanchez-Tillo E., Liu Y., de Barrios O., Siles L., Fanlo L., Cuatrecasas M., Darling D. S., Dean D. C., Castells A., Postigo A., (2012), “EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness, Cellular and Molecular Life Sciences., 69, 3429–3456.

Scheel C., Eaton E. N., Li S. H., Chaffer C. L., Reinhardt F., Kah K. J., Bell G., Guo W., Rubin J., Richardson A. L., Weinberg R. A., (2011), "Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast", Cell, 145, 926–940.

Shi Y., Sawada J., Sui G., el Affar B., Whetstine J. R., Lan F., Ogawa H., Luke M. P., Nakatani Y., Shi Y., (2003), "Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex", Nature, 422, 735–738.

Shi G. M., Xu Y., Fan J., Zhou J., Yang X. R., Qiu S. J., Liao Y., Wu W. Z., Ji Y., Ke A. W., Ding Z. B., He Y. Z., Wu B., Yang G. H., Qin W. Z., Zhang W., Zhu J., Min Z. H., Wu Z. Q., (2008), "Identification of side population cells in human hepatocellular carcinoma cell lines with stepwise metastatic potentials", Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 134, 1155–1163.

Smela M. E., Currier S. S., Bailey E. A., Essigmann J. M., (2001), "The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis", Carcinogenesis, 22, 535-540.

Suetsugu A., Nagaki M., Aoki H., Motohashi T., Kunisada T., Moriwaki H., (2006), "Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells", Biochemical and Biophysical Research Communications, 351, 820-824.

Thiery J. P., (2002), "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression", Nature Reviews Cancer, 2, 442-454.

Thiery J.P., (2003), "Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies", Current Opinion in Cell Biology, 15, 740–746.

Thiery J. P., Acloque H., Huang R. Y., Nieto M. A., (2009) "Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease", Cell, 139, 871–890.

Vandewalle C., Van Roy F., Berx G., (2009) "The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease", Cellular and Molecular Life Sciences, 66, 773-787.

Verschueren K., Remacle J. E., Collart C., Kraft H., Baker B. S., Tylzanowski P., Nelles L., Wuytens G., Su M. T., Bodmer R., (1999), "SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 50-CACCT sequences in candidate target genes", The Journal of Biological Chemistry, 274, 20489-20494.

Verstappen G., van Grunsven L. A., Michiels C., Van de Putte T., Souopgui J., Van Damme J., Bellefroid E., Vandekerckhove J., Huylebroeck D (2008), "Atypical Mowat-Wilson patient confirms the importance of the novel association between ZFHX1B/SIP1 and NuRD corepressor complex", Human Molecular Genetics, 17, 1175–1183.

Visvader J. E., Lindeman G. J., (2008), "Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions", Nature Review Cancer, 8, 755-768.

Wellner U., Schubert J., Burk U. C., Schmalhofer O., Zhu F., Sonntag A., Waldvogel B., Vannier C., Darling D., zur Hausen A., Brunton V. G., Morton J., Sansom O., Schuler J., Stemmler M. P., Herzberger C., Hopt U., Keck T., Brabletz S., Brabletz T., (2009) "The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs", Nature Cell Biology, 11, 1487–1495.

Went P. T., Lugli A., Meier S., Bundi M., Mirlacher M., Sauter G., Dirnhofer S., (2004), "Frequent EpCam protein expression in human carcinomas", Hum Pathol, 35(1), 122-128.

Went P. T., (2006), "Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers", British Journal of Cancer, 94, 128-135.

Wu C., Wei Q., Utomo V., Nadesan P., Whetstone H., Kandel R., Wunder J. S., Alman B. A., (2007), "Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential", Cancer Research, 67, 8216-8222.

Yamashita T., Budhu A., Forgues M., Wang X. W., (2007) "Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma", Cancer Research, 67, 10831–10839.

Yamashita T., Forgues M., Wang W., Kim J. W., Ye Q., Jia H., Budhu A., Zanetti K. A., Chen Y., Qin L. X., Tang Z. Y., Wang X. W., (2008), "EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma", Cancer Research, 68, 1451-1461.

Yamashita T., Ji J., Budhu A., Forgues M., Yang W., Wang H. Y., Jia H., Ye Q., Qin L. X., Wauthier E., Reid L. M., Minato H., Honda M., Kaneko S., Tang Z. Y., Wang X. W., (2009), "EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features" Gastroenterology, 136, 1012-1024.

Yang J., Weinberg R.A., (2008), "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis", Developmental Cell, 14, 818–829.

Yang Z. F., Ngai P., Ho D. W., Yu W. C., Ng M. N., Lau C. K., (2008a), "Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer", Hepatology, 47, 919–928.

Yang Z. F., Ho D. W., Ng M. N., Lau C. K., Yu W. C., Ngai P., Chu P. W., Lam C. T., Poon R. T., Fan S. T., (2008b), "Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer", Cancer Cell, 13, 153-166.

Yang W., Yan H. X., Chen L., Liu Q., He Y. Q., Yu L. X., Zhang S. H., Huang D. D., Tang L., Kong X. N., Chen C., Liu S. Q., Wu M. C., Wang H. Y., (2008), "Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells", Cancer Research, 68, 4287-4295.

Yasui K., Shimamura M., Mitsutake N., Nagayama Y., (2013), "SNAIL Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell-like Properties in Aldehyde Dehydroghenase-Negative Thyroid Cancer Cells", Thyroid, 8, 290-295.

Yin A. H., Miraglia S., Zanjani E. D., Almeida-Porada G., Ogawa M., Leary A. G., Olweus J., Kearney J., Buck D. W., (1997), "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells", Blood, 90, 5002-5012.

Yin S., Li J., Hu C., Chen X., Yao M., Yan M., Jiang G., Ge C., Xie H., Wan D., Yang S., Zheng S., Gu J., (2007), "CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity", International Journal of Cancer, 120, 1444-1450.

Yu M. W., Chen C. J., (1993), "Elevated serum testosterone levels and risk of hepatocellularcarcinoma", Cancer Resarch, 53, 790–794.

Zhu A. X., (2003), "Hepatocellular carcinoma: are we making progress?", Cancer Investigation, 21, 418-420.

Zhu Z., Hao X., Yan M., Yao M., Ge C., Gu J., Li J., (2010), "Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma", International Journal of Cancer, 126, 2067-2078.

ÖZGEÇMİŞ

Metin Çetin, 18 Ekim 1987'de Şumnu'da (Bulgaristan) doğdu. 2005 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2009yılında tamamladıktan sonra 2011 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam eden Metin ÇETİN, 2011 yılından beri Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.