

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELÜLER KARSİNOMADA HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (HGF)
GEN PROMOTÖRÜNÜN 'DEOKSİ ADENOSİN'BÖLGESİNDE MEYDANA GELEN
MUTASYONLARIN VE BU MUTASYONLARIN SORAFENİB DİRENCİ
GELİŞİMİNDEKİ ROLÜNÜN TANIMLANMASI**

MESUDE ANGIN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU.HS1.MSc -2014970116

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELÜLER KARSİNOMADA HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ(HGF)
GEN PROMOTÖRÜNÜN 'DEOKSİ ADENOSİN' BÖLGESİNDE MEYDANA GELEN
MUTASYONLARIN VE BU MUTASYONLARIN SORAFENİB DİRENCİ
GELİŞİMİNDEKİ ROLÜNÜN TANIMLANMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MESUDE ANGIN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. NEŞE ATABEY

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc- 2014970116

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Mesude ANGIN "**Hepatoselüler karsinomada Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) Promotörünün 'Deoksi Adenozin' Bölgesinde Meydana Gelen Mutasyonların Sorafenib Direnci Gelişimindeki Rolünün**

Tanımlanması"konulu Yüksek Lisans tezini 30.06.2017 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof.Dr. Neşe ATABEY

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Prof.Dr. Esra ERDAL
ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Prof.Dr. Cumhuri GÜNDÜZ
ÜYE

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Yavuz OKTAY
YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Doç.Dr. Buket KOSOVA
YEDEK ÜYE

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
KISALTMALAR.....	VI
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Hastalığın epidemiyolojisi ve rol oynayan risk faktörleri.....	5
2.3 Hepatoselüler karsinomada mikroçevrenin rolü ve moleküler patogeneze.....	6
2.4.Hepatoselüler karsinomada HGF -MET sinyali.....	11
2.4.1.Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF).....	12
2.4.2 Epitelyal Mezenkimal Geçiş Faktörü(MET).....	14
2.4.4. Hepatoselüler karsinomada HGF-MET sinyalizasyonunun rolü.....	18
2.4.5.HGF-MET sinyalizasyonun kanserde aktivasyonu.....	20
2.4.6. Hepatoselüler karsinomada HGF-MET sinyaline yönelik tedavi yaklaşımları.....	23
2.5 Genomda transkribe olmayan bölgelerin kanserde önemi.....	29
2.6.HGF geninin transkripsiyonel düzenlenmesi, kanser gelişiminde rolü ve önemi.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. Araştırmanın Tipi:.....	41
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:.....	41
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	41
3.4. Çalışma materyali:.....	41

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:	42
3.6. Veri toplama araçları:	42
3.6.1. Hücre Kültürü	42
3.6.2. DNA İzolasyonu	44
3.6.3. <i>DNA miktarının ve kalitesinin belirlenmesi</i>	46
3.6.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	47
3.6.5 PCR ürünlerinin Sekanslama Analizleri	54
3.7. Araştırma planı ve Takvimi	55
3.8. Verilerin değerlendirilmesi	55
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	56
3.10. Etik Kurul Onayı	56
4. BULGULAR	57
4.1. DNA konsantrasyonu ölçüm sonuçları	57
4.2. Elde edilen genomik DNA ların agaroz jel görüntüsü	58
4.3. Tüm hücre hatlarında HGF Geni promotör bölgesinin amplifikasyonu	58
4.4. DNA Dizi Analizi Verilerine ait bulgular	59
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
7. KAYNAKLAR	69
8. EKLER	74
EK-1 ETİK KURUL RAPORU	74
EK-2 ÖZGEÇMİŞ	75

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1 : Hepatoselüler karsinomada patogeneğinde rol oynayan moleküler değişiklikler.(Trusolino, Bertotti, & Comoglio, 2010)	10
Tablo 2 : Kullanılan hepatoselüler karsinoma hücre dizileri (Yuzugullu et al., 2009).....	44
Tablo 3 : Bölgeyi çoğaltmada kullanılan olan primer dizileri.....	49
Tablo 4 : Optimizasyon öncesi 20 ul volum için reaksiyonda önerilen bileşen miktarları.....	51
Tablo 5 : HGF'nin PCR ile amplifiye edilen promotörüne ait primerlerin termal PCR profili	51
Tablo 6 : HGF geni promotörünün optimize edilen PCR bileşenleri ve termal profili.....	52
Tablo 7 :Araştırma planı ve takvimi.....	55
Tablo 8 : Hücrelerin genomik DNA konsantrasyonları.....	57
Tablo 9 : Hücre hatlarındaki DATE uzunluğu.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 :Hepatoselüler karsinoma patofizyolojisi(I Marks & S Yee, 2016).....	6
Şekil 2 :Hepatoselüler karsinoma moleküler patogenezi (Saffroy et al., 2007).....	7
Şekil 3 :Tümör mikroçevresi elemanları (Owusu et al., 2017).....	7
Şekil 4 :Mikroçevrenin hepatoselüler karsinoma gelişiminde rolü (Tu et al., 2014).....	8
Şekil 5 : Hepatoselüler karsinoma gelişiminde genetik ve moleküler değişiklikler (Niu et al., 2016).....	9
Şekil 6 : Hepatoselüler karsinoma patofizyolojisinde önemli hücre yüzey reseptörleri.(I Marks & S Yee, 2016)	11
Şekil 7 : HGF ekstraselüler matrikste iki kez degradasyona uğrar ve aktifleşir (Fajardo-Puerta et al., 2016).....	12
Şekil 8 : HGF'nin yapısı ve reseptörü ile bağlanma bölgeleri(Bradley et al., 2017).....	13
Şekil 9 : C-MET yapısı.(Garajova et al., 2015)	14
Şekil 10 : C-MET reseptörü ve sinyal iletiminde rol oynayan diğer moleküller (Press, 2005).....	15
Şekil 11 : HGF/MET sinyalinin çift yönlü fonksiyonu (I. Petrini, 2015).....	16
Şekil 12 : HGF'nin doku yenilenmesi ve kanser dokularında iki yönlü etkisi(Matsumoto et al., 2014).....	19
Şekil 13 : HGF-MET sinyali inhibitörleri ve etkileri (Finisguerra et al., 2016).....	24
Şekil 14 : Translasyon olmayan bölgelerde mutasyonlar ve etkileri (Diederichs et al., 2016).....	30
Şekil 15 : HGF'nin hücre içinde meydana getirdiği değişiklikler (Fajardo-Puerta et al., 2016).....	34
Şekil 16 : Pre-pro-HGF proteini izoform 1 (728 aminosid)(Athauda et al., 2012)	35
Şekil 17 : Şekil 21:HGF geni promotörünün şematik gösterimi(Gene).....	36
Şekil 18 :DATE bölgesi(J. Ma et al., 2009).....	37
Şekil 19 : HGF gen regülasyonunun DATE ile olduğunu destekleyen model.(Ma et al., 2009)(J. Ma et al., 2009)	38
Şekil 20 :HGF deoksiadenozin bölge elementi (DATE) (J. Ma et al., 2009)	47
Şekil 21 :HGF geninde DATE bölgesini içeren baz dizilimi.....	48
Şekil 22 : Bölgeyi çoğaltacak olan primerlerin dizilerde yerleşimi.....	49
Şekil 23 : Elde edilen genomik DNA ların agaroz jel görüntüsü.....	58
Şekil 24 : HGF geni promotörünün “annealing” optimizasyon deneyi jel görüntüsü.....	58
Şekil 25 : Örneklere ait promotör bölgesinin jel görüntüsü.....	58
Şekil 26 : Mahlavu hücresinde DATE bölgesinin kromatogramı [26Adenin].....	60
Şekil 27 : Snu 387 hücresinde DATE bölgesinin kromatogramı [30 Adenin].....	60

KISALTMALAR

HGF :Hepatosit Büyüme Faktörü

MET:Mezenkimal Epitellyal Geçiş Faktörü

DATE:Deoksi Adenozin Elementi

VEGF:, vasküler endotelyal çoğalma faktörü

PDGF: platelet çoğalma faktörü

IL:Interlökin

PSI:Pleksin-semforin-integrin

TGF:Tümör Büyüme Faktörü

PI3K:Fosfatidil Inozitol 3 Kina

TEŞEKKUR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, kendisini her zaman örnek almaya çalıştığım, öğrencisi olmaktan onur duyduğum Sayın Danışmanım Prof.Dr.Neşe ATABEY'e ,

Laboratuvar çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Ayşim GÜNEŞ ve Ezgi BAĞIRSAKÇI'ya ,ayrıca eğitimim dönemim boyunca tanıdığım ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

Tez jürisinde yer alan, yorumları ve eleştirileri ile bu teze katkıda bulunan Yrd.Doç.Dr.Yavuz OKTAY ,PROF.Dr.Cumhur GÜNDÜZ, Prof.Dr.Esra ERDAL'a teşekkür ederim.

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, hayatım boyunca hep yanımda olan en değerli varlığım SEVGİLİ AİLEM'e teşekkürlerimi sunarım.

Mesude ANGIN

İzmir,2017



Hepatoselüler Karsinoma’da Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) Gen Promotörünün ‘Deoksi Adenozin’ Bölgesinde Meydana Gelen Mutasyonların ve Bu Mutasyonların Sorafenib Direnci Gelişimindeki Rolünün Tanımlanması

Mesude Angın, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, msdangn@gmail.com

ÖZET

Amaç: Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF), diğer kanser tiplerinde olduğu gibi ekspresyonu arttığı bilinmektedir. Bu çalışmada HGF ekspresyonun transkripsiyonel düzeyde ekspresyonunu incelemeyi amaçladık. Bu nedenle HGF promötöründe 30 deoksiadenozin tekrarından oluşan bölgede hepatoselüler karsinoma hücrelerinde mutasyon varlığını inceledik ve HGF düzeylerinin yüksek olması ile ilişkisi olup olmadığını araştırdık

Yöntem: adet hücre hattı, iki adet sorafenib direnci geliştirilmiş olan iki hepatoselüler karsinoma hücre hattı ve bir adet insan genomik DNA'sı bu çalışmada kullanıldı. Genomik DNA'lar kit yardımı ile elde edildi ve bölgeye özgü primerler tasarlandı ve çoğaltıldı. Ardından promotör bölgesi için çift yönlü sekanslama yapıldı. Kromatogram verileri ile bölgedeki deoksi adenozin sayısı saptandı. Ardından bu hücrelerdeki mevcut HGF ekspresyonları verilerimiz ile karşılaştırıldı

Bulgular: HGF mutasyonları bazı hepatoselüler karsinomalı hücrelerde normal saptanırken nbazı hücre hatlarında DATE bölgesinde kısalma olduğu saptandı, otokrin HGF ekspresyonu yüksek olan hücrelerde DATE bölgesinde normal sayıda deoksidenozin sayısı olduğu belirlendi

Sonuç: HGF DATE bölgesi bazı kanser tiplerinde transkripsiyonu etlkilediği için ekspresyonun artmasına otokrin HGF aktivasyonuna neden olmaktadır. Sonuçlarımız HGF DATE bölgesinin ekspresyonda rolünün anlaşılması için DATE bölgesinin normal ve kısalmış olduğu hücre hatlarında metilasyon seviyelerinin incelenmesi gerektiği yönündedir

Anahtar Sözcükler: Hepatoselüler karsinoma, HGF, promotör, mutasyon, delesyon, deoksiadenozin tekrarı, Sorafenib direnci

Identification of the Mutations Occurring in the 'Deoxy Adenosine' Region of the Hepatocyte Growth Factor (HGF) Gene Promoter in Hepatocellular Carcinoma and the Role of These Mutations in the Development of Sorafenib Resistance

Mesude Angin, Institute of Health Sciences, msdangn@gmail.com

ABSTRACT

Objective: Hepatocyte Growth Factor (HGF) is known to increase expression as in other cancer types. This study aimed to investigate expression at the transcriptional level of HGF expression. Because of this, we examined the presence of mutation in the hepatocellular carcinoma cells in the region of 30 reprocessed deoxyadenosine in the HGF promoter and found that it was related to high HGF levels

Method: Two hepatocellular carcinoma cell lines and two human genomic DNA lines were used in this study. Genomic DNAs were obtained with the aid of kit and region specific primers were designed and amplified. Next, bi-directional Sequencing was done. Chromatogram data showed deoxyadenosine levels in the region. Subsequently, the present HGF expressions in these cells were compared with our data

Results: When HGF mutations were normal in some hepatocellular carcinoma cells, shortening in DATE region was observed in nascent cell lines, and it was determined that the number of deoxyadenine in the DATE region was normal in cells with high autocrine HGF expression

Conclusion: HGF is responsible for the activation of autocrine HGF in the DATE region due to its transcription in some cancer types. Our results suggest that methylation levels should be examined in cell lines where the DATE region is normal and shortened in order to understand the role of HGF DATE region in expression

Key Words: Hepatocellular carcinoma, HGF, promoter, mutation, deletion, deoxyadenosine repeat, Sorafenib resistance

1.GİRİŞ VE AMAC

Dünyada kanser nedeniyle görülen ölüm nedenleri arasında hepatoselüler karsinoma ikinci sırada yer alır ([Park et al., 2015](#)) Asya ve Afrika ülkelerinde daha yaygındır. Batı ülkelerinde ise son 40 yıldır morbidite ve mortalite oranları arttığı, buna karşın bu oranların Japonya’da azaldığı bildirilmiştir ([Okuma & Kondo, 2016](#))

Hepatoselüler karsinoma nedenleri arasında hepatit B, aşırı alkol tüketimi, obezite, diyabet ve alkol nedenli olmayan yağlı karaciğer hastalıkları bulunur. Hepatoselüler karsinomanın erken tanısına yönelik biyobelirteçler yeterli değildir, bu nedenle hastalarda genellikle geç tanı alınmaktadır. Hepatoselüler karsinomada geçerli tedaviler; cerrahi girişimler, karaciğer nakli ve kemoterapidir. Bu tedavilerin uygulandığı hastaların ancak yarısında beş yıllık sağkalım oranı mümkün olabilmektedir. Sorafenib; hepatoselüler karsinomalı hastalarda FDA tarafından onaylı, tedavide geçerliliği olan tek ilaçtır. Sorafenib tedavisi alan hastalarda sağkalımda on ay süre ile iyileşme olduğu gösterilmiştir([Sanoff, Chang, Lund, O'Neil, & Dusetzina, 2016](#))

Sorafenib çoklu etkileri olan bir kinaz inhibitörüdür. Mezenkimal epitelyal geçiş faktörü (MET) vasküler endotelyal çoğalma faktörü(VEGF), platelet çoğalma faktörü(PDGF) gibi hücrede etkili faktörler ile ve hücre içi kaskadları olan RAF kinaz (MAPKKK) ve ERK kinaz (MAPK) sinyalizasyonunun inhibisyonu aracılığı ile tümöre karşı etkilidir. Bu kaskadların inhibe edilmesi başarısız olduğunda ilaç direnci ortaya çıkar. ([Nishida, Kitano, Sakurai, & Kudo, 2015](#)) Sorafenibin inhibe ettiği moleküller c-RAF ve b-RAF proto onkogenleri, serin/treonin kinazlar, VEGFR, KIT ve PDGFR- β 'dir. Sorafenib tedavisine karşı hücrelerin direnç geliştirmesi ise tedavi etkinliğini sınırlamaktadır. İlaç direnci hepatoselüler karsinomada sık görülmesi nedeniyle buna sebep olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması önemlidir ([Okuma & Kondo, 2016](#)) Daha önce grubumuzca yaptığımız çalışmalarda, hem hepatoselüler karsinoma gelişimi ve ilerlemesinde, hem de Sorafenib direnci gelişimde c-Met'in aktive olduğunu ve sürekli c-Met aktivasyonunun agresif hücre fenotipi ile ilişkili olduğunu göstermiş bulunmaktayız. Sorafenib’e direnç gösteren hücre klonlarında c-Met'in sürekli aktivasyonunun moleküler mekanizmasını incelediğimizde ise, otokrin HGF'nin sekresyonunun aktive olduğunu tanımlamış bulunmaktayız ([Firtina Karagonlar, Koc, Iscan, Erdal, & Atabey, 2016](#); [Gumustekin et al., 2012](#))

Hepatoselüler karsinoma gelişiminde ve sorafenib direnci gelişiminde otokrin HGF sekresyonunun nasıl sağlandığının mekanizması henüz bilinmemektedir

2009 yılında, Ma ve arkadaşları meme kanserinde HGF gen ekspresyonunun regülasyonunda, HGF'nin promotor bölgesinden 750bp yukarısında yer alan ve “deoksiadenozin kuyruk elementi” veya DATE olarak adlandırılan bir bölgenin önemini tanımlamıştır ([J. Ma et al., 2009](#)) Sonraki çalışmada HGF geninde DATE bölgesindeki uzunluk çeşitli kanser hücre hatlarında incelenmiş, Ma ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. DATE uzunluğu incelendiğinde gastrik kanser hücresinde IM95 [poly(dA), 17 bp], akciğer kanseri hücresi H69 [poly(dA), 24 bp] nazaran m RNA ve protein düzeyinde HGF'nin daha yüksek eksprese olduğu gösterilmiştir. Çalışmada DATE bölgesi kısa olup HGF ekspresyonu normal olan hücrelerde ise bunun metilasyon seviyelerinin farklı olması nedeniyle olduğu bildirilmiştir([Sakai, Takeda, Okamoto, Nakagawa, & Nishio, 2015](#))

HGF promotöründe bulunan DATE bölgesinde çeşitli transkripsiyon faktörleri buraya gelip bağlanmakta hücre tipine bağlı olarak genin sessizleştirilmesi veya aktive olmasında bu etkileşimler önem taşımaktadır. Delesyon olması; ekspresyonunun baskılanmasından sorumlu histon proteinleri ile DNA etkileşimini bozarak HGF ekspresyonunun yeniden aktive olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle DATE elementinde gözlenen mutasyonların otokrin HGF sekresyonuna neden olan promotor mutasyonları için 'hot spot' bir bölge olduğu bildirilmiştir ([Seneviratne et al., 2015](#))

Daha önceki çalışmamızda geliştirdiğimiz Sorafenibe dirençli hepatoselüler karsinomalı hücre hatlarında saptadığımız otokrin HGF sekresyonunun, DATE bölgesindeki mutasyonlardan kaynaklanıp kaynaklanmadığını araştırmayı bu çalışmada amaçladık. Çalışmamızda ilk olarak edinsel sorafenib direnci geliştirdiğimiz HuH-7 ve Mahlavu hücre hatlarında HGF'nin promotör bölgesinde mutasyon olup olmadığını incelemeyi, daha sonra laboratuvarımızda mevcut diğer hepatoselüler karsinoma hücre hatlarında HGF ekspresyonu ile DATE bölgesinin uzunluğu arasında bir ilişki olup olmadığını incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hastalığın epidemiyolojisi ve rol oynayan risk faktörleri

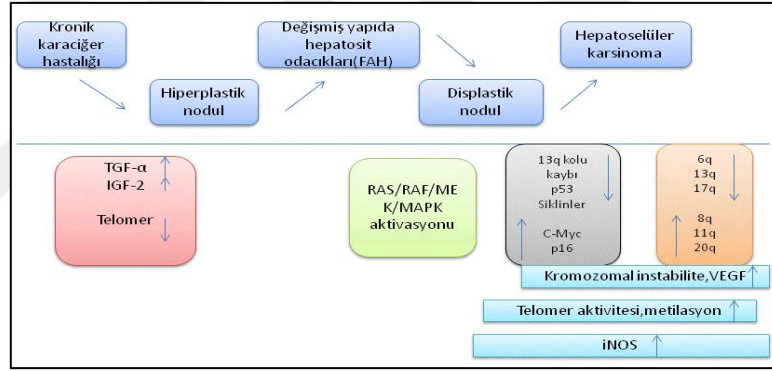
Kanser sıralamasında karaciğerde görülen kanserler 6.sırada yer alır, kansere bağlı meydana gelen ölüm nedenleri arasında 2.sıradadır ([Park et al., 2015](#)) Kronik hepatit B ve C enfeksiyonu karaciğer kanserinin en sık görülme nedenlerindendir. Dolayısı ile enfeksiyonunun önlenmesi ve etkin tedavisi ile hepatoselüler karsinoma kanserinde görülme insidansı ve mortalitenin azaltılması da mümkün olabilecektir. ([Global Burden of Disease Cancer et al., 2017](#))

Hepatoselüler karsinomada prognoz kötüdür ve kanserin görülme insidansı yüksektir. Asya ve Afrika ülkelerinde insidans ve mortalitede belirgin olarak artış gözlenmektedir. İnatçı hepatit B (HBV) ve hepatit C virus (HCV) enfeksiyonları, karaciğerde siroz ve tümör oluşumunda başlıca nedenlerdir. Aflatoksin B1 (AFB1) maruziyeti ve kronik alkol tüketimi de, hepatoselüler karsinom gelişimi için önemli risk faktörlerindendir. Hepatoselüler karsinomlu hastaların tedavisinde kullanılan cerrahi yöntemlerin oldukça ilerlemesine rağmen, sağ kalım oranı halen %18'de seyretmektedir. Sağ kalım oranının hastalarda kötü olmasının başlıca nedeni; geç tanı alınmasıdır. İleri evre hastalarda, cerrahi rezeksiyon veya karaciğer nakli mümkün olamamaktadır. Hastalığın prognozunun kötü olmasının bir diğer nedeni ise cerrahi operasyon sonrası beş yıllık dönemde %50'nin üzerinde bir oranla tekrar etmesidir ([Niu, Niu, & Wang, 2016](#))

2.2.Hepatoselüler karsinoma patofizyolojisi

Hepatoselüler karsinoma; inflamasyon, oksidatif stres, nekroz ve hepatosit rejenerasyonu süreçlerinde meydana gelir, genellikle kronik hepatit veya siroz zemininde gelişir([Saffroy et al., 2007](#))İnflamatuvar etkili sitokinlere maruziyet, hepatositleri stimule eder ve aşırı miktarda nitrik oksid sentetaz (iNOS) sentezine neden olur. Onkogenik etkili bu enzim prokanseroz lezyonların artmasına neden olur, bu lezyonlar ise daha sonra agresif tümörlerin içeriğini en iyi temsil eden neoplazi formuna dönüşür.([I Marks & S Yee, 2016](#))

Fokal odaklıklar halinde yoğun şekilde paketlenmiş, ancak bireysel olarak normal görünen hücreler sirotik karaciğer kökenlidir. Bu fokal odaklıklara veya lezyonlara 'hiperplastik nodüller' adı verilir ve hepatoselüler karsinoma prekürsörü olarak tanımlanabilen ilk oluşumdur. Hepatoselüler karsinomada nodul aşamasından bir sonraki fazı fokal görünümdeki selüler atipidir. Fokal topluluklardaki değişmiş hepatositler (FAH) başta asidofilik olup yoğun şekilde düz endoplazmik retikulum içerir, sonraları uniform olarak bazofilik hale döner. Fenotipik dönüşüm sırasında, hücre çoğalması ve anjiyogenezise aracılık eden RAS/ RAF/MEK/MAPK sinyali aktivasyonu vardır. FAH topluluklarında giderek displastik epitel nodüller görünür hale gelir. Displastik nodüller yapısal olarak genomik instabilite gösterirler ve hızlı şekilde kromozomal anormallikler birikimi gözlenir. Bunun sonucunda tümör supresor kaybı meydana gelmektedir. (I Marks & S Yee, 2016)(Şekil 1)

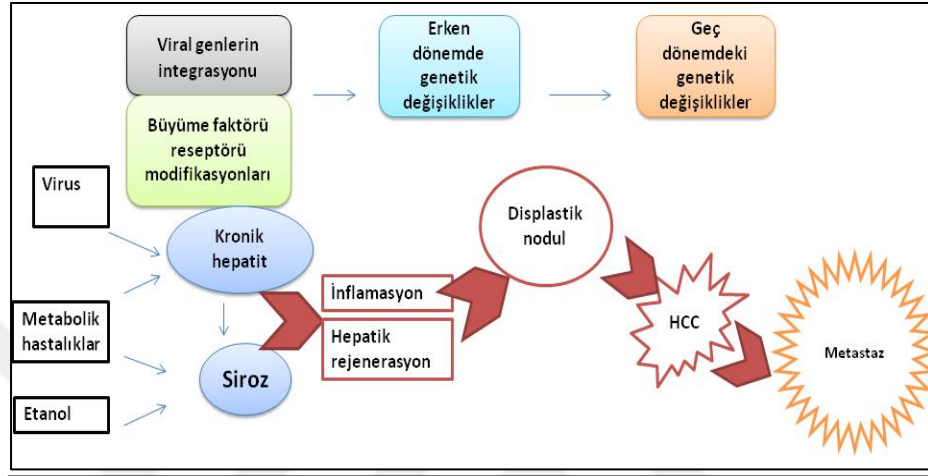


Şekil 1: Hepatoselüler karsinoma patofizyolojisi (I Marks & S Yee, 2016)

2.3 Hepatoselüler karsinomada mikroçevrenin rolü ve moleküler patogenez

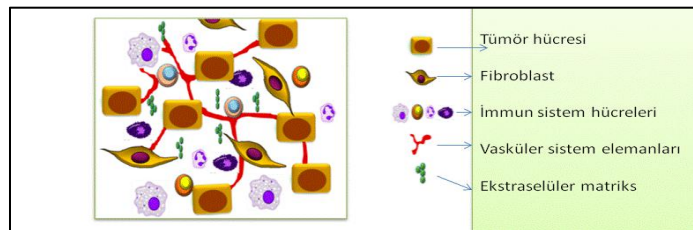
. Karaciğerde parenkimal hücreler olan hepatositler metabolik aktivitenin çoğunu üstlenmektedir. Stromal yapı elemanı olan hepatik stellat hücreler ve fibroblastlar, karaciğerde ekstraselüler matriks bileşimini oluşturur ve yapımında rol oynar. İmmün hücre elemanı olarak makrofajlar (kupffer hücreleri) ve bir dizi inflamasyonla ilişkili lökositleri bulunur. Safra kanalını döşeyen epitel hücreleri olan kolanjiyositler ve karaciğer sinüzoidlerindeki kan damarlarında bulunan endotelial hücreler yanısıra hem hepatosit hem de hepatosit dışında diğer hücrelerin öncüsü olan progenitör hücre popülasyonları (oval hücreler) bulunur (I Marks & S Yee, 2016)

Karaciğerde hepatosit ile hepatosit dışında bulunan diğer hücreler ve hepatit virusları hepatoselüler karsinoma başlaması ve ilerlemesinde etkili olabilmektedir. Bunun dışında hipoksi ve yapısı değişen ekstraselüler matriks çevredeki stromal dokuda parakrin sinyaller transformasyon sürecini başlatabilir. (I Marks & S Yee, 2016)Şekil 2)



Şekil 2:Hepatoselüler karsinoma moleküler patogenezi (Saffroy et al., 2007)

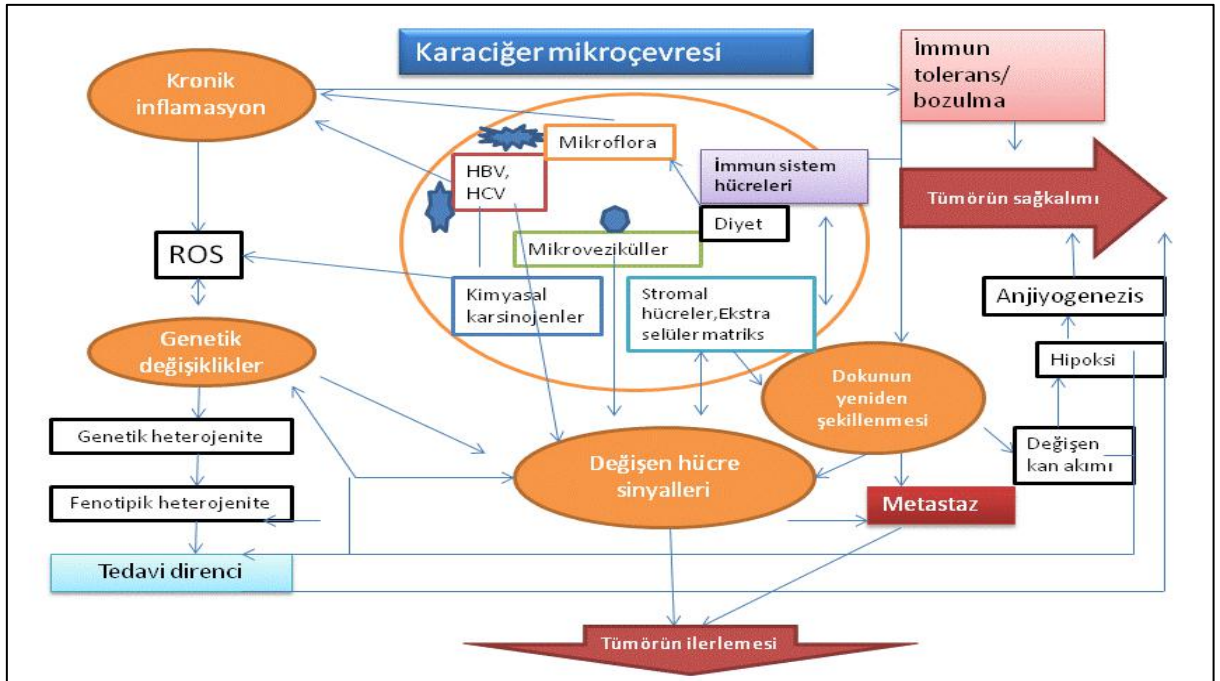
Kanser hücreleri sağkalımı için onkogenik sinyallere bağlıdır. Bu nedenle tedavi stratejisinde sinyal yollarının hedeflenmesi sık kullanılan bir yaklaşımdır. Bununla birlikte tümörler sadece malign hücrelerden oluşmaz. Tümör hücrelerinden ayrı olarak, tümör nişinde stromal hücreler olan kanserle ilişkili fibroblastlar, makrofajlar, lenfositler, nötrofiller ve mast hücreleri ekstraselüler matriks ve kan damarları, lenfatik damarlar ve perisitlerden oluşan vasküler bir ağ bulunur. Tümör mikroçevresi, tümör başlaması, ilerlemesi, metastazında ve tedavi direncinde rol oynamaktadır. Kanser hücreleri bazı spesifik onkogenlere bağımlıdır ancak tümör stroması tarafından sağlanan sağkalımda öncü olan sinyallere de ihtiyaç duyar, tümör mikroçevresi bu nedenle tedavide önemli bir hedeftir (Owusu, Galemme, Janetka, & Klampfer, 2017) (Şekil 3)



Şekil 3:Tümör mikroçevresi elemanları (Owusu et al., 2017)

Karsinogenez, çok aşamalı bir süreçtir; farklı sinyal yollarının aktivasyonu/inaktivasyonu, genetik değişikliklerin birikimi, normal hücrelerde malign hücrelere transformasyonu başlatır. Hastalığın başlaması ve ilerlemesinde altta yatan moleküler mekanizmalar, halen net değildir. Hepatoselüler karsinoma tipik olarak inflamasyon ile başlar ve hepatositlerin invazif karsinomaya dönüşmesi aşamalı şekilde meydana gelir. Bu aşamalar esnasında moleküler anormallikleri ve kromozom değişiklikleri de eşlik eder. (I Marks & S Yee, 2016)

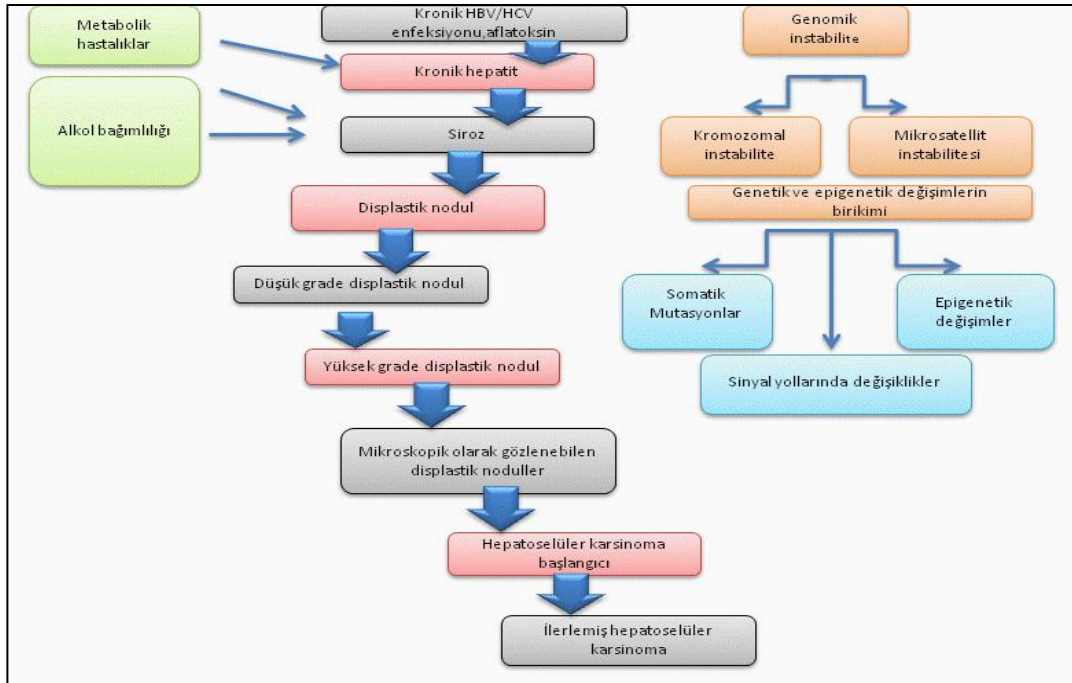
Hastaların çoğunda, erken tanı yapılamadığından tümör tamamen rezekte edilememektedir, bu nedenle tedavide kemoterapötik ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak hepatoselüler karsinoma hücreleri, kemoterapötik ilaçlara direnç göstermektedir. Diğer solid tümörlerde olduğu gibi, hepatoselüler karsinoma gelişiminde de genetik değişiklikler önemlidir. Hepatoselüler karsinomada birçok genetik değişiklik mevcuttur ve heterojenite nedenidir. Tümörde heterojenite olması karsinogenez sürecinin anlaşılmasını güçleştirir. Hastalarda genetik değişikliklerin ne olduğunun bilinmesi spesifik hedefe yönelik tedaviler için önemlidir. Tümörde öncü rol oynayan moleküler mekanizmalar oldukça kompleks; genetik ve epigenetik değişiklikler birlikte rol oynar. (Niu et al., 2016)(Şekil4)



Şekil 4: Mikroçevrenin hepatoselüler karsinoma gelişiminde rolü (Tu et al., 2014)

Genetik değişikliklerin temelinde yatan mekanizmalar, etyolojik faktörler olan HBV, HCV, diyetle AFB1 maruziyeti ve alkol alımı ile ilişkilidir. Hepatit viruslarına kronik maruziyet, alkol tüketimi veya alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması hepatositlerde hasar oluşturur. Sirozla sonuçlanan hücre ölümü ve yenilenmesi şeklinde bir siklus başlar. (Niu et al., 2016)

Hepatoselüler karsinomada ileri dönemlerde ölüm görülme olasılığı yüksektir. Tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır. Karsinogeneizde bir dizi histolojik, genetik ve moleküler değişim aslında ortaktır tümör gelişiminde rol oynayan büyüme faktörü reseptörleri, anjiyogenez mediatörleri, sinyal kaskadları ve malign davranışa neden olan tümör supresor proteinlerin çoğu aydınlatılmıştır. Ancak tümör gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmalar tam olarak netliğe kavuşmamıştır. (I Marks & S Yee, 2016) Hepatoselüler karsinomanın başlaması ve ilerlemesinde, altta yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması, erken tanı koymada ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemlidir. (Niu et al., 2016) (Şekil 5)



Şekil 5: Hepatoselüler karsinoma gelişiminde genetik ve moleküler değişiklikler (Niu et al., 2016)

Tümörler geleneksel olarak ilk olarak etyolojiye göre sınıflanır, ancak etiyolojik sınıflama dışında herhangi bir sınıflama henüz mevcut değildir. Hastalığın farklı etyolojileri olduğu gibi, genetik olarak ve moleküler düzeyde de heterojenite mevcuttur. Moleküler düzeyde meydana gelen predominant olarak oluşan gelen değişikliklerin bilinmesi ve gösterilmesine öncü mutasyonların keşfedilmesi hastalığın erken tanısı ve tedavisinde önemlidir. Aynı tümördeki hücreler arasındaki genetik heterojenite, kanserde tek gen ekspresyon profilini geçersiz kılmaktadır. Farklı gen ekspresyon paternleri ile tanımlama tanı ve tedavi duyarlılığını artırabilecektir ([I Marks & S Yee, 2016](#)) Genom dizileme, ekzom dizileme, RNA dizileme ve genom boyu metilasyon testleri gibi gelişmekte olan teknolojiler ile kanser gelişimi ve ilerlemesinde rol oynadığı belirlenen meydana gelen yaygın bir dizi genetik ve epigenetik değişiklikler Tablo 1'de olduğu gibi ortaya konmuştur. ([Dhanasekaran, Bandoh, & Roberts, 2016](#))

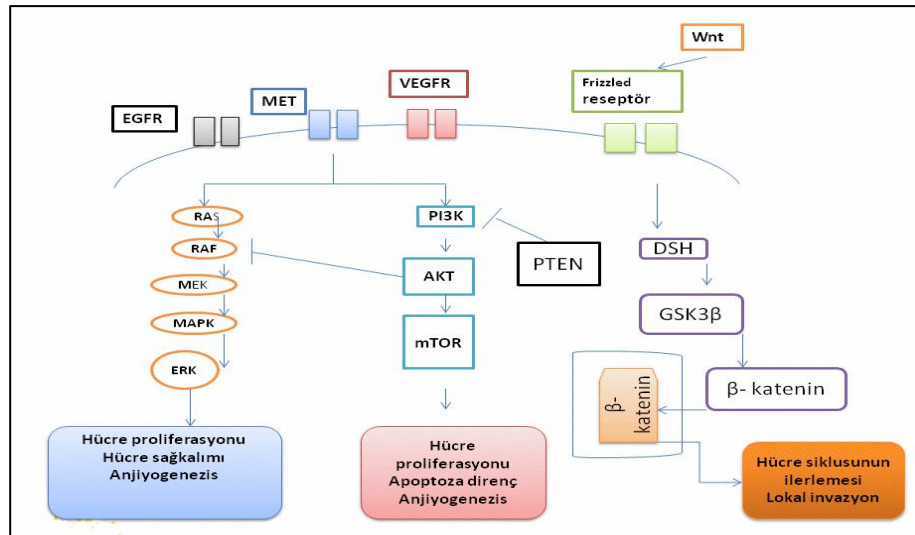
Tablo 1: Hepatoselüler karsinomada patogenezinde rol oynayan moleküler değişiklikler. ([Trusolino, Bertotti, & Comoglio, 2010](#))

Genomik değişiklikler	Gen Mutasyonları	TERT promotörü TP53 CTNNB1 AXIN1,AXIN2 ATM RPS6KA3 JAK1,IL6R,IL6ST ARID1,ARID2
	Gen amplifikasyonları/Delesyonlar	CCND1 FGF19 CDKNA2A,CDKNA2B AXIN1 IRF2 MET
Epigenetik değişimler	DNA metilasyonu	GSTP1 E-Kaderin CDKNA2 RASSF SOCS-3 MGMT
	Mikro RNA	MIR-155 MIR-122 MIR-224 MIR-1 MIR-21
	Uzun kodlanmayan RNA	HULC HEIH DREH MVIH HOTAIR MDIG LINE1
Büyüme faktörü sinyali değişiklikleri	Major sinyal yolları	Wnt-Beta katenin Tirozin kinazlar EGF HGF/c-MET FGF VEGF IGF HIF1,2 TGF-beta Hedgehog

2.4. Hepatoselüler karsinomada HGF -MET sinyali

Hücreler arasında iletişim ligand ve hücre yüzey reseptörlerinin etkileşimi sonucu sinyal yollarının aktive olur ve hücrede çeşitli biyolojik yanıtlar meydana gelir. Hepatoselüler karsinomada sinyal yollarında anormal değişikliklerin meydana gelmesi kaskadın herhangi bir seviyesinde olabilir. Diğer malignitelere olduğu gibi hücrede normalde mevcut olan süreçlerde malignite yönünde değişimler ve anormal şekilde hücre çoğalması başlar. Hücrede normal şartlarda sinyal yolları çok sıkı kontrol altındadır. EGFR, MET ve VEGFR büyüme faktörlerinin indüklenmesi; hücrelerde RAS/RAF/MEK/MAPK ve PI3K/AKT/mTOR intraselüler sinyal ağlarını aktifleştirir. Bu sinyal yolları hücrede normalde proliferasyon, sağkalım ve anjiyogenezisi stimüle eder. Düzenleyici mekanizmalarının bozulması durumunda ise konakçı hücreye sağkalım, çoğalma ve lokal invazyon gibi malign hücre özellikleri kazandırır. (I Marks & S Yee, 2016)(Şekil6)

C-MET reseptör kinaz ve ligandı olan HGF/SF aktivasyonu farklı hücresel yanıtlara neden olur. Ligand aracılı dimerizasyon c-MET fosforilasyonunu güçlendirir ve sitoplazmada bulunan efektör proteinler olan GAB1, GRB2, phospholipase C ve SRC aktive olur. C-MET RAS-MAPK, PI3K-AKT ve Wnt sinyalleri ile ilişkilidir. (Zenali, 2015)

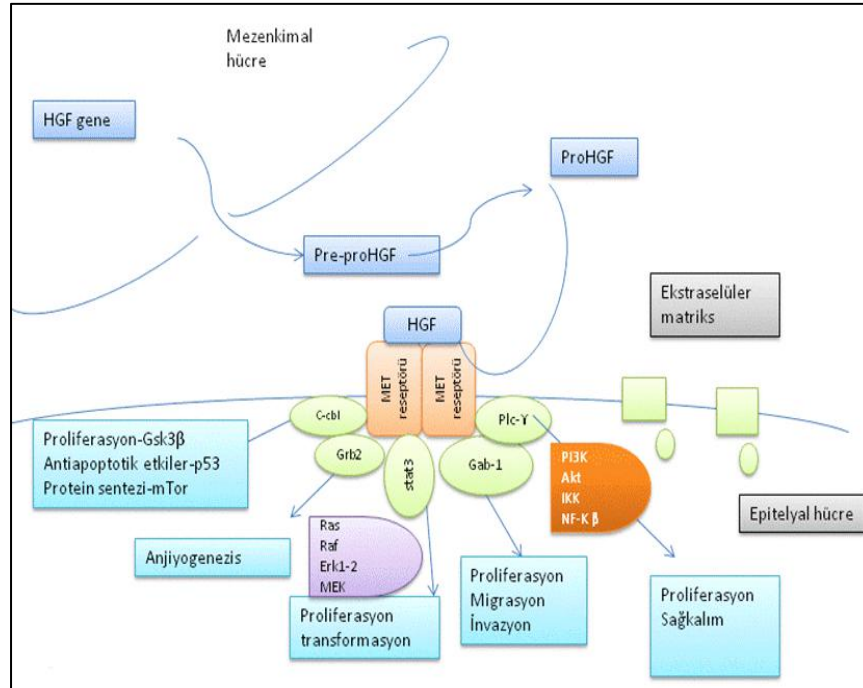


Şekil 6: Hepatoselüler karsinoma patofizyolojisinde önemli hücre yüzey reseptörleri. (I Marks & S Yee, 2016)

2.4.1. Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)

Hepatosit büyüme faktörü (HGF), 7.kromozomun uzun kolunda 7q21.1 bölgede yer alır. İnaktif formu, pre-proHGF şeklindedir ve 728 aminoasidden oluşur. Yapısında sırayla; sinyal dizisi, α ağır zinciri ve hafif β zinciri bulunur. Tek zincir halinde 83,1834 dalton(Da) büyüklüğünde bir protein olarak kodlanır. HGF'nin primer yapısı ilk kez 1989'da gösterilmiştir. Ancak alternatif kesilme keşfi ile HGF'nin çeşitli transkript varyantlarını kodlayan farklı izoformları olduğu gösterilmiştir.([Fajardo-Puerta, Mato Prado, Frampton, & Jiao, 2016](#))

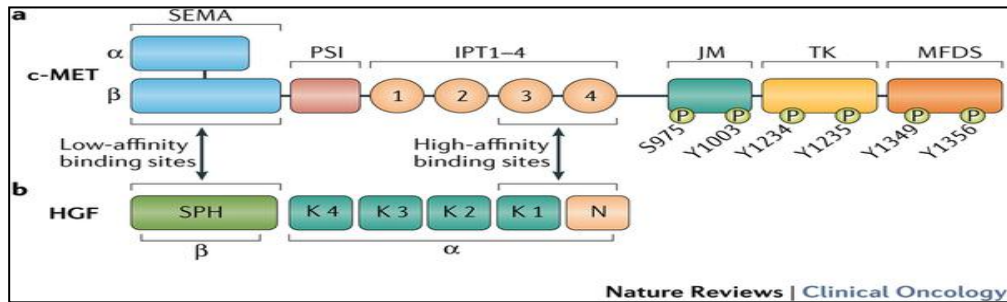
HGF; mezenkimal hücrelerce sekrete edilir. Sekrete edildiğinde biyolojik olarak inaktif ve tek zincir halinde bir proteindir İnaktif formu olan prepro- HGF, iki aşamalı bir süreçten geçerek aktif formuna kavuşur. İlk olarak; prepro-HGF yapısında bulunan sinyal dizisi degrade edilir, pro-HGF oluşur; bu işlem Arjinin44 ve Valin495 aminoasitleri arasında olur. Serum veya hücre membranında bulunan ekstraselüler proteazlar tarafından degradasyona uğrayarak aktifleştirilir. HGF-A, pro-HGF'nin serumda aktive olmasında görevli esas proteazdır([Garajova, Giovannetti, Biasco, & Peters, 2015](#)) (Şekil 7)



Şekil 7: HGF ekstraselüler matrikste iki kez degradasyona uğrar ve aktifleşir ([Fajardo-Puerta et al., 2016](#))

HGF, alfa ve beta zincirleri arasında disülfid bağı kurulması ile heterodimer yapıdaki aktif formuna kavuşur. HGF, plazminojen S1 peptidaz ailesi alt sınıfında yer alır, ancak yapısında katalizde gerekli 3 aminoasitten 2 si yer değiştirmiş haldedir, bu nedenle proteolitik aktivitesi saptanamamıştır. HGF alfa zinciri, plazmin ile %38 homoloji göstermektedir. Beta zinciri ise, yapısal olarak serin proteazların katalitik domainleri ile benzerdir, ancak katalitik kısmında aminoasit farkları bulunur. Bu nedenle HGF'nin evrimsel olarak, koagülasyon ve fibrinoliziste görevli proteazlardan evrimleştiği düşünülmektedir. Organizasyon olarak düşünüldüğünde aslında benzerdir ve kaskada ait ürünlerden biridir. HGF aktivasyonu doku yenilenmesinin düzenlenmesinde öneme sahiptir ve patolojik durumlara yatkınlıkta rolü bulunur. HGF aktivasyonundan sorumlu HGF-A proteazının hasarlı olduğu fare, normal gelişim göstermesine rağmen, mukoza hasarı sonrası doku yenilenmesi hatalı olduğu gösterilmiştir. Benzer durum idiopatik pulmoner fibrozisli hastaların fibroblastlarında gösterilmiştir, kontrol fibroblastlarına göre hastaya ait fibroblastlar daha düşük aktiviteye sahiptir. ([Fajardo-Puerta et al., 2016](#))

HGF Met reseptörünün tek ligandıdır. HGF, parakrin hücre büyümesi, motilite ve morfogenik faktörü olarak etkili olduğu için, scatter faktör olarak da adlandırılır. HGF'nin reseptörü ile iki bağlanma bölgesi vardır. Bu bölgeler HGF aktif formda olup olmamasına göre farklılık gösterir. İlki; HGF'nin aktif formuna bağımlı olmaksızın yüksek afiniteyle reseptörün IPT3 ve IPT4 domainlerinden HGF/SF'nin amino grup ucuna bağlanmasıdır. Diğeri ise; HGF'nin serin proteaz domaini ile MET reseptöründeki SEMA domaininin düşük afinite ile HGF aktif formda iken bağlanmasıdır. ([Garajova et al., 2015](#)) HGF, diğer büyüme faktörleri ve reseptörlerinden farklı olarak; spesifik olarak kromozom 7'de lokalize MET protoonkogeninin kodladığı Met reseptörüne bağlanır. ([Fajardo-Puerta et al., 2016](#)) (Şekil 8)



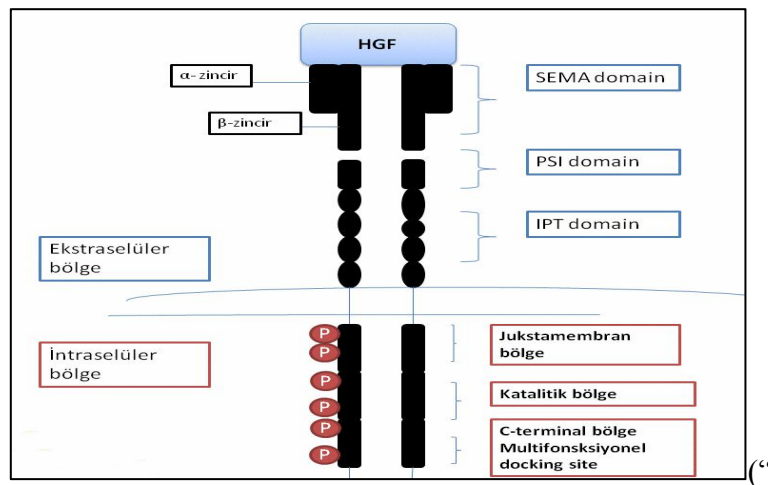
Şekil 8: HGF'nin yapısı ve reseptörü ile bağlanma bölgeleri ([Bradley et al., 2017](#))

2.4.2 Epitelyal Mezenkimal Geçiş Faktörü(MET)

Mezenkimal epitelyal geçiş faktörü (MET), bir protoonkogen üyesidir, 7.kromozomun 7q21–31 bölgesinde yer alır. MET geni reseptör tirozin kinaz özellikte bir protein olan MET' i kodlar. TPR-MET onkojenik füzyon proteini, 1984 yılında ilk kez, insan osteosarkom tümör hücrelerinde keşfedilmiştir. MET reseptörü; 190 kDa büyüklüğünde bir glikoprotein olup, heterodimer yapıdadır: α ve β subunitlerinden oluşur. ([Garajova et al., 2015](#))

MET reseptör kinaz ailesinin alt üyesi olup, bu aile üyeleri MET, RON reseptör kinaz ile Sperm protein, Enterokinaz ve Agrin (SEA) dir. Bu reseptörlerin ortak özelliği disülfid bağı ile bağlı, kısa α zinciri ve uzun bir beta zinciri içermeleridir. Alfa zinciri ekstraselüler, transmembran(TM) ve sitoplazmik bölgeleri içerir. Sitoplazmik bölgede, sinyal iletiminde görevli jukstamembran (JM), kinaz domaini, karboksi terminal kuyruğu bulunur. Farklı reseptör tirozin kinazlarda intraselüler domainler korunmuş olup, ekstraselüler domainleri yapısal olarak birçok farklılık gösterir. ([Press, 2005](#))

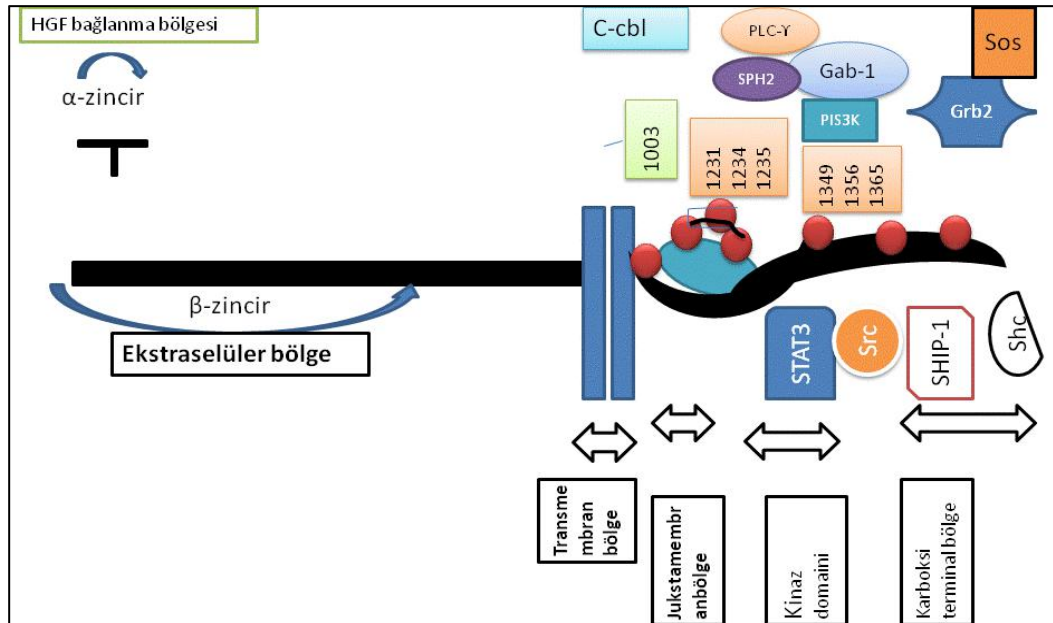
C-MET; ekstraselüler bölgesi ligand spesifitesini belirleyici, sitoplazmik bölgede ise tirozin kinaz katalitik aktivitesi olan bölgelere sahip tek geçişli transmembran glikoproteinlerden oluşur. Ekstraselüler bölgede yer alan α subuniti, transmembran bölgede yer alan β subunitine, disülfid bağı ile bağlanır. Reseptörün ekstraselüler bölgesinde, Semaforin (Sema) domain, Pleksin, Semaforin ve sisteinden zengin İntegrin domaini (PSI domain) ve 4 adet immunoglobulin benzeri plexinler, transkripsiyon faktörleri bağlanma bölgesi (IPT domaini) bulunur. ([Garajova et al., 2015](#)) (Şekil 9)



Şekil 9: C-MET yapısı. ([Garajova et al., 2015](#))

İntraselüler kısmında; jukstamembran dizisi, katalitik bölge ve karboksi terminal bölge bulunur. Jukstamembran bölgede, MET reseptörünün etkinliğini azaltmada görevli, Serin 975 ve Tirozin 1003 kalıntıları vardır. MET katalitik aktivitesi, intraselüler bölgede yer alan katalitik domaindeki 1231, 1234 ve 1235 tirozin kalıntılarının fosforilasyonu ile pozitif yönde düzenlenir. Katalitik bölgesinde, reseptörün kinaz aktivitesi pozitif yönde düzenlenir. Jukstamembran bölgedeki Y1003 tirozin kalıntısı fosforile olursa c-MET degradasyonu meydana gelir, bu nedenle bu bölge negatif düzenleyici olarak davranır. Karboksi terminalinde bulunan çoklu protein bağlanma bölgesi, hücre içinde yer alan birçok adaptör proteinin biraraya gelmesinden sorumludur, böylelikle sinyal hücre içi yanıtı dönüştürülmektedir ([Garajova et al., 2015](#); [Press, 2005](#))

HGF alfa zinciri, MET için yüksek afinite göstermektedir, ancak reseptörü aktifleyen beta zinciridir. HGF bağlanınca MET reseptörü dimerize olur, reseptör tirozin kinaz aktivasyonu, tirozin Y-1349 ve Y-1356 kalıntılarında otofosforilasyona uğrar. Bu sinyalizasyonun hücre içindeki iletiminden birçok adaptör protein sorumludur. Hücre içinde sinyal iletiminin devamında görevli kaskad sayesinde sinyal yolları proliferasyon, sağkalım, motilite, invazyon, anjiyogenez indüklenmesi söz konusudur ([Finisguerra, Prenen, & Mazzone, 2016](#))(Şekil 10)

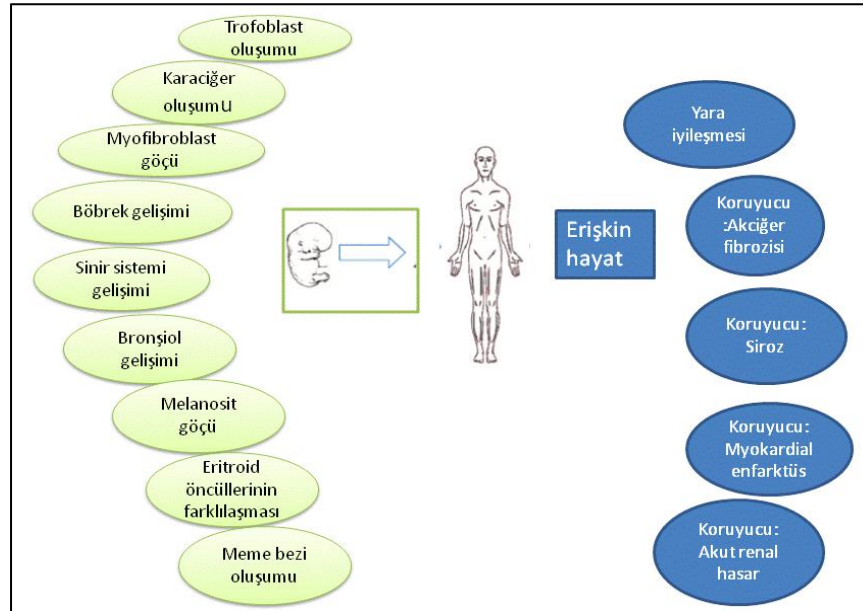


Şekil 10: C-MET reseptörü ve sinyal iletiminde rol oynayan diğer moleküller ([Press, 2005](#))

2.4.3 HGF-MET Sinyalinin biyolojik etkileri ve mekanizması

MET reseptörü, karaciğer, pankreas, prostat, böbrek, akciğer, bronş epitelinde yer alır. HGF reseptörü olan MET ile birlikte proliferasyon, sağkalım, motilite, saçılım ve farklılaşma gibi birçok etkiye aracılık eder. Mezenkimal hücrelerden sekrete olan HGF ve epitelial ve endotelial hücrelerde bulunan reseptörü MET arasında parakrin bir etkileşim vardır. Bu ikili doku tamiri ve yara iyileşmesi için gerekli kök hücrelerin göçünü ve çoğalmasını stümule ederler.([Iacopo Petrini, 2015](#))(“6189-PB1-R1.pdf,” n.d.) Doku tamirinde, hücreler arası bölgede bulunan sitokinler (IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β ,) tarafından fibroblast-makrofajlarda HGF transkripsiyonu ve epitel hücrelerde ise MET transkripsiyonu indüklenir. HGF, inflamasyon esnasında interstisyel kompartımanda böylelikle aktif ve bol miktarda bulunur ve MET ile bağlanarak doku hasarında fizyolojik savunma mekanizmasının bir parçası aktifleşir([I. Petrini, 2015](#)) ([Szturz et al., 2017](#))

HGF çift yönlü etkilere sahiptir; şekil 11' de embriyogenezde ve erişkinde biyolojik fonksiyonları, solda embriyogenezisteki fonksiyonları, sağda ise HGF'nin erişkin hayattaki etkileri görülmektedir.



Şekil 11: HGF/MET sinyalinin çift yönlü fonksiyonu ([I. Petrini, 2015](#))

HGF-MET sinyali etkilerini çeşitli hücrel geçiş kaskadlarında bulunan çeşitli anahtar proteinler ile yapar. Aynı zamanda bu sinyal Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) veya Wnt-katenin sinyal yolları ile çapraz etkileşimler içindedir. ([Tulasne & Foveau, 2008](#))

Mitojenik, motojenik veya morfojenik özelliklerinden ayrı olarak, c-MET apoptoza karşı koruyucu rol oynar. Apoptozu engelleyici rolünü, PI3K/AKT sinyalinin aracı olduğu sağkalım kaskadlarını aktive ederek gerçekleştirir Mikroçevre koşullarına bağlı olarak HGF pro-apoptotik stimülasyonunu da iletebilir, bu etki tümör büyümesini inhibe edici, sitostatik /sitotoksik rolü nedeniyle olur. ([Szturz et al., 2017](#)) Oval hücreler HGF/Met sinyalinin yenilenme sürecinde etkileri araştırıldığında Met ile desteklenen sinyal yollarının oval hücrelerde sağkalımda destekleyici rol oynadığı gösterilmiştir. ([del Castillo et al., 2008](#))

Mezenkimal hücrelerce üretilen HGF ve epitelyal hücrelerce eksprese edilen MET arasındaki etkileşim, organogenezde kritik rolü olan mezenkimal epitelyal hücre etkileşimlerinde önemlidir. Embriyonik gelişim esnasında HGF hepatosit ve labirent trofoblast progenitörlerinin sağkalımı ve çoğalmasında gereklidir, aynı zamanda plasenta oluşumunda önemi bulunur. HGF veya Met hasarlı embriyolar ölümle sonuçlanan hipomorfik karaciğer ve intrauterin fetal büyüme geriliği ile karakterizedir. HGF/MET ayrıca epitel mezenkimal geçiş ile spesifik somitlerin dermatomyotomlarından oluşan myojenik prekürsör hücrelerin dar aralıklı göçüyle meydana gelen hypaaksial kas alttipi gelişimini kontrol eder. ([Finisguerra et al., 2016](#))

Bunun dışında HGF sinir büyüme faktörü ile beraber sinir sisteminde progenitörlerin sağkalımı, farklılaşması ve süperior servikal ganglion sempatik nöronlarının aksonlarının uzamasında, invivo olarak ise dudak derisini ve toraksı inerve eden sensör nöronların gelişimi için de gereklidir. ([Finisguerra et al., 2016](#))

Erişkin dönemde, HGF, organ yenilenmesinde hepatositlerin, renal epitel hücrelerin, kardiyomyositlerin akut veya kronik hasarında, çoğalması ve sağkalımını destekleyerek bir mediatör olarak davranır, transforme edici büyüme faktörü (TGF)- β inhibisyonu ile fibrotik süreci antagonize eder. Aynı şekilde HGF plazma düzeyleri hepatektomi, renal transplantasyon, hepatik veya renal hastalıklar sonrasında artmaktadır.

Yara iyileşmesi sırasında, HGF/METSinyali yara alanında hücrelerin dermiste yeniden popülasyon yapabilmesi için keratinositlerin çoğalması, aynı zamanda doğru şekilde oryantasyon yapabilmesinde gereklidir ([Finisguerra et al., 2016](#))

2.4.4. Hepatoselüler karsinomada HGF-MET sinyalizasyonunun rolü

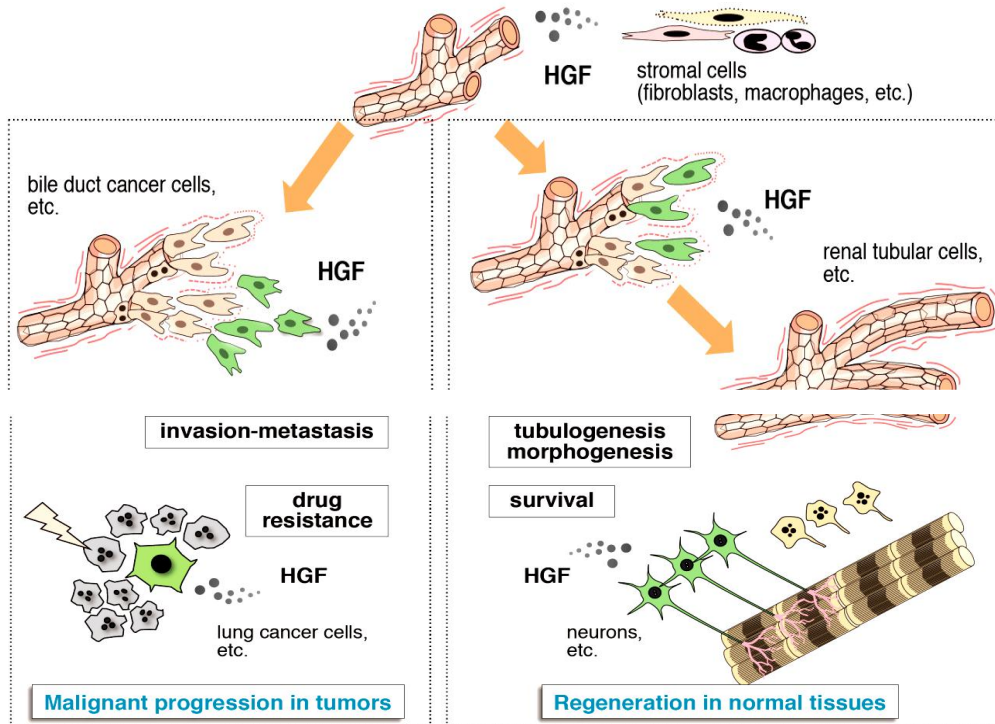
İnsanda epitel orjinli malignitelerde büyüme faktörü reseptörü sinyalinin anormal aktivasyonu tipik olup, reseptörlerin otokrin veya parakrin stimule edilmesi mevcuttur. Sebebi; büyüme faktörü reseptörü sentezi, büyüme faktörü reseptörü aşırı ekspresyonu veya büyüme faktörü reseptörlerinin kendilerinin konstitutif aktivasyonuna neden olan mutasyonları nedeniyledir. ([Fajardo-Puerta et al., 2016](#)) HGF ile aktiflenen MET sinyali, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve sağkalımında önemli bir role sahiptir. Sinyalde aşırı ekspresyon veya mutasyonlar tümöröenez ve metastaz ile ilişkilidir([Press, 2005](#))

HGF/MET sinyali embriyogenezde, organogenezde, yara iyileşmesinde doku tamirinde kritik role sahiptir, aynı zamanda epitelyal mezenkimal geçişte rol alır. HGF veya MET hasarı farede embriyonik dönemde letalite görülmektedir. HGF/METSinyali konstitutif aktif olduğunda ise kanser hücresinde sağkalım ve çoğalma kanserleşme lehine olmakta ve metastatik yayılım başlamaktadır, bu nedenle tümör hücrelerinde aktif HGF/MET sinyali varlığı kötü bir prognoz bulgusudur, tümör agresifliği ve tedavi direncine yol açar ([Owusu et al., 2017](#)) Ekstraselüler matriks iskeletin degradasyonu ve hücre göçü, mitogenezis ve morfogenezis, HGF Met sinyali aracılığı ile olur, dokunun yıkımı veya yeniden yapımı için de gereklidir. HGF hücre ölümünü baskılar ve sağkalımı destekler, bunu hasara karşı hücreyi korumak adına yapar. Ancak bu etkiler tümör hücrelerinin invazyon, metastaz ve ilaç direnci gibi malign özellikleri kazanmasında da rol oynamaktadır([Fajardo-Puerta et al., 2016](#)) HGF, epitel hücreleri için scatter faktörü olup, bundan farklı olarak fibroblast sekresyon faktörü olarak epitel hücrelerinin motilitesini de artırır. HGF ve reseptörü MET bağlandığında, reseptör dimerize hale gelir, çoğalma, sağkalım, motilite ve metastatik yayılımı destekleyen sinyal yolları aktif hale gelir. ([Owusu et al., 2017](#)) Dolaşımdaki tümör hücreleri tümör oluşturma ve metastaz yapma potansiyeli yüksektir. Hepatoselüler karsinoma metastatik farede periferik kandan dolaşımdaki tümör hücreleri izole edilmiştir ve dolaşımdaki tümör hücrelerinde HGF ve c-Met ekspresyonu primer tümör hücrelerine göre yüksek bulunmuştur. ([Ogunwobi, Puszyk, Dong, & Liu, 2013](#))

Karaciğer, rejenerasyon yeteneği yüksek bir organdır. Hepatosit büyüme faktörü (HGF), hepatositlerde epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ile birlikte hepatositlerde DNA sentezi ve mitozunu indükleyen başlıca 2 mitojendir. Karaciğerde başlıca Kupffer, stellat, sinuzoidal endotelial hücreler HGF üretir.([Matsumoto, Funakoshi, Takahashi, & Sakai, 2014](#))

HGF/MET aktivasyonu hepatositlerde hücre bölünmesinde G1-S faz geçişinde önem taşır. Karaciğerde hasar sonrası, proteinaz aktivitesi artar ve hücre içi sinyaller sayesinde HGF düzeyleri yükselir. Aktif HGF düzeyinin artmasında ürokinazların aktivasyonu mevcuttur. HGF'nin plazmada da artmasında endokrin mekanizmaların da rolü bulunmaktadır.([Matsumoto et al., 2014](#))

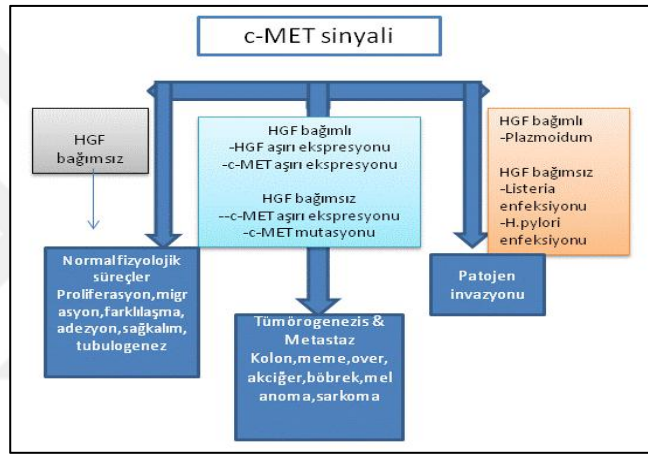
HGF esas olarak stromal hücrelerce eksprese edilir. Normal hücrelerde HGF, renal tubul hücrelerinde tubulogeneze olduğu gibi morfogenez dinamiklerinde ve nöronlarda hücre sağkalımının desteklenmesinde, doku hasarı sonrası yenilenme sürecinde Met aracılığı ile etkilerini gösterir. Kanserleşmede ise Met aktivasyonu ile dinamik hücre hareketi ve sağkalım mekanizması invazyon-metastaz, tedaviye dirençte rol oynar.([Matsumoto et al., 2014](#))(Şekil 12)



Şekil 12: HGF'nin doku yenilenmesi ve kanser dokularında iki yönlü etkisi([Matsumoto et al., 2014](#))

2.4.5. HGF-MET sinyalizasyonunun kanserde aktivasyonu

C-MET sinyalinin anormal şekilde aktivasyonu farklı mekanizmalarla meydana gelir. (Press, 2005) HGF den bağımsız aktivasyonu C-Met aşırı eksprese olduğu durumlarda söz konusu olabilir. Ligand bağımsız c-Met aktivasyonunda reseptör mutasyonu mevcuttur. (Gumustekin et al., 2012) Liganddan bağımsız yani HGF olmaksızın MET aktivasyonu ise MET aşırı ekspresyonu veya amplifikasyonu nedeniyle veya MET mutasyonu ile aktive olması nedeniyle meydana gelir ve bu durum insanda görülen tümörlerde nadirdir. MET mutasyonları sıklıkla metastatik alanlarda saptanmaktadır. (Owusu et al., 2017)



Şekil 13: HGF/c-MET sinyalizasyonunda ligand bağımlı ve bağımsız aktivasyon (Press, 2005)

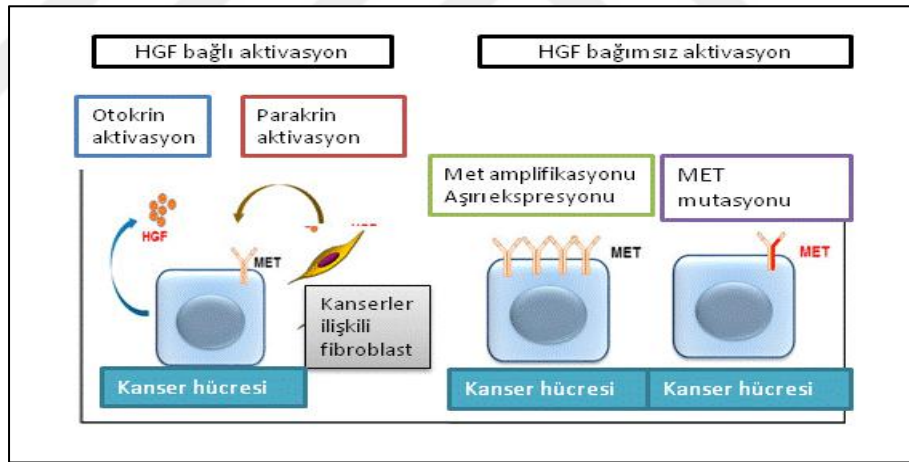
HGF-MET sinyalinin parakrin aktivasyonunun deneysel modellerde tümörögenезisi destekleyici yönde yeterli olduğu gösterilmiştir MET aşırı ekspresyonu ve bazı mutant formları kanser büyümesini arttırmaktadır. Ancak, hedefe spesifik bir tedavinin, yararlı olması için, otokrin aktivasyon, protein aşırı ekspresyonu, gen amplifikasyonu veya mutasyonların varlığı hangisinin öncelik alınması gerektiği henüz bir netliğe kavuşamamıştır. (I. Petrini, 2015)

Meme, over, prostat, gastrik, tiroid, hepatoselüler ve renal karsinomalar yanısıra osteosarkom ve myelomda HGF reseptörü aşırı eksprese olur veya artan HGF reseptörü tirozin fosforilasyonu vardır. HGF ile reseptörün aktivasyonu reseptörün tirozin kalıntılarından otofosforilasyonunu sağlar hücre içindeki sinyallerin aktivasyonuna neden olur. (Vadnais et al., 2002)

Onkojenik olarak aktive edilen Met invazif çoğalma ile kanser hücrelerine metastatik özellikler kazandırır. MET aşırı ekspresyonu karsinomaların az bir kısmında amplifikasyon nedeni ile olur ancak metastazların çoğunda vardır.([Vadnais et al., 2002](#))

Karaciğer farklı zonlar içeren heterojen bir organizasyon gösteren ve fonksiyon gören bir organdır. Bazı hepatositler hasar gördüğünde komşuluğundaki hepatositler epitelyal karakterde kalırken hasar alan hepatositler mezenkimal fenotipe dönüşmektedir. Bu dönüşüm HGF sayesinde olur. HGF stimülasyonu olmayan komşu hücrelerin de fenotipini etkilenmektedir. HGF içeren bölgelerde HGF üretimi otokrin yolla sağlanmakta, sekrete olan HGF molekülleri bu faktörden yoksun olan komşu alıcı hücrelere doğru diffüze olduğu olmaktadır. ([Patel, Haque, Gao, & Revzin, 2015](#))

Esasen kanser hücrelerinde otokrin olarak HGF üretimi sık görülen bir durum değildir, yaygın olan durum stromal hücreler olan kanser ilişkili fibroblastlarca HGF üretilmesi ve MET aktivasyonunu parakrin yolla olmasıdır. ([Owusu et al., 2017](#))



Şekil 14:Normal ve kanserli hücrede MET aktivasyonu. ([Owusu et al., 2017](#))

Akut myeloid lösemide HGF ekspresyonunun, hücre hatlarının ve klinik örneklerin yarısında, reseptör tirozin kinaz MET otokrin aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. HGF veya MET genetik hasarı olması halinde HGF eksprese eden AML hücrelerinde çoğalma ve sağkalımı inhibe olmuş bu nedenle AML hücrelerinin MET aktivasyonunda otokrin bağımlılığı gösterilmiştir ([Kentsis et al., 2012](#))

Pro-HGF, otokrin olarak MET reseptörünü aktive eder. Kanser hücreleri HGF promotörü mutasyonları veya okogenik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu ile pro HGF üretebilir. Daha yaygın olarak ise pro-HGF, fibroblast gibi stromal hücreler tarafından üretilir ve HGF reseptörü olan MET'i parakrin olarak aktive eder ([Owusu et al., 2017](#))

Darby köpek böbreği (MDCK) hücreleri ataya bağımlı hücreler olup insan siat7e geni ile transfekte edilmiş olup parental hücre ile karşılaştırılmıştır. MDCK-siat7e hücrelerinin endojen HGF üretebildiği ve bilinen HGF aracılı parakrin EMT aktivasyonundan farklı olarak otokrin yolla aktive ettiği gösterilmiştir MET reseptör kinaz fosforilasyon analizleri HGF/MET sinyalinde otokrin loop ile aktivasyon meydana geldiğini doğrulanmıştır. MET aktivitesi küçük inhibitör molekül ilaç olan PF-02.341.066 (Crizotinib) ile baskılanınca, MDCK-siat7e hücreler parental hücre morfolojisine dönüşmüştür. ([Chu, Bottaro, Betenbaugh, & Shiloach, 2016](#))

Relaps ve direnç gösteren hastalarda, HGF/cMET sinyalinin konstitutif olarak plazma hücrelerini aktive ettiği gösterilmiştir ve aynı zamanda çoklu ilaç direnci ile ilişkisi olduğu belirlenmiştir. Otokrin loop varlığının hastalıkta hücre adezyonu ve yayılımı için yeterli olabileceğine işaret edilmiş olup HGF/cMET sinyalinde otokrin loop varlığının olması multipl myelomda anjiyogenezisi desteklemektedir. Bu nedenle anjiyogenezise yönelik ilaç geliştirilmesinde hedef mekanizmalardan biri olduğu anlaşılmıştır([Ferrucci et al., 2014](#))

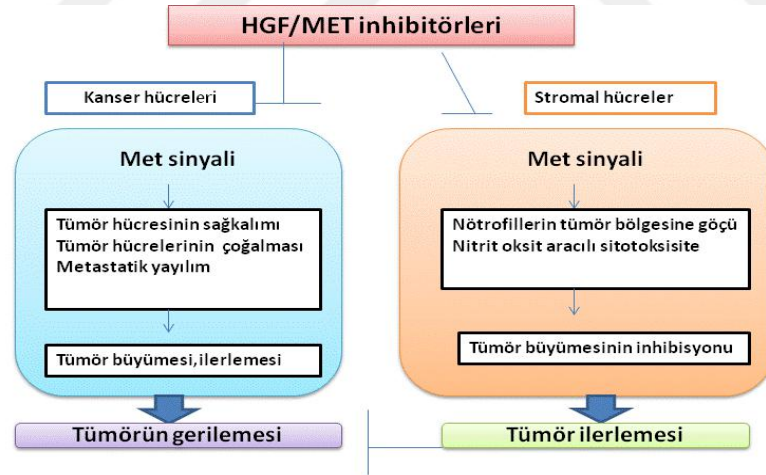
HGF ve reseptörü olan c-Met pankreas kanserinde de proliferasyon, invazyon ve kötü prognozla ilişkilidir. Çalışmada HGF ve c M-et ekspresyonunun primer pankreas kanserinde ekspresyonu ve c-met monovalent antikoru olan MetMab etkinliği in vitro ve in vivo modeller ile incelenmiştir. HGF ve Met ab muamelesi tümör çoğalmasını inhibe etmektedir. KP4 hücreleri ise HGF ve c-met otokrin yolla uyarılımı olmakta ve MetMab çok güçlü şekilde tümör çoğalmasını inhibe etmektedir. MetMab predominant etkisi KP4 otokrin modelde proliferasyonun durdurulması yönünde gözlemlenmiştir. Çalışma bu nedenle HGF/c-Met aksisinin kanserin ilerlemesinde önemli rolü olduğunu göstermiştir([Jin et al., 2008](#))

HGF otokrin aktive olduğu glioblastoma aktive MET sinyalinde rol oynamakta ve hastalarda MET inhibitörlerine duyarlılığın tahmini için değerlidir. Ayrıca serum HGF düzeyleri otokrin aktivasyon söz konusu olduğu tümörlerde bir biyomarker olması yanısıra tedavi yanıtını tahmini için bir aracı olabileceğinin altı çizilmiştir.([Xie et al., 2013](#))

2.4.6. Hepatoselüler karsinomada HGF-MET sinyaline yönelik tedavi yaklaşımları

Hepatoselüler karsinoma heterojen bir hastalık olması nedeniyle hastalığın tedavisinde multidisipliner yaklaşımlar önemlidir. Tedavide geleneksel yaklaşımlar üç başlıkta toplanır; ilki tümörün cerrahi olarak çıkarılması veya karaciğer transplantasyonu, ikincisi radyasyon tedavisi ile minimal invazif cerrahi uygulanması, üçüncüsü ise kemoembolizasyon uygulamasıdır. Organ donörünün kısıtlı olması, hastaların çok azında cerrahi tedavinin uygun oluşu, operasyonlar sonrası nüks görülme riskinin yüksek olması ve HBV, HCV enfeksiyonu ve siroz gibi altta yatan komplikasyonlar bilinen tedavilerde sınırlamalar getirmektedir. ([L. Ma, Chua, Andrisani, & So, 2014](#)) Plastisite; embriyo gelişiminde farklılaşmamış hücrelerde fonksiyonel kimliğini kazanabilmesi erişkin hayatta ise fonksiyonel bütünlüğün korunması için gereklidir. Doku dinamiklerinde rol oynayan biyolojik programlar ekstraselüler matriksten gelen uyarılar ile yönetilir ve sonucunda hücre çoğalması, sağkalımı ve aktif olarak göç etme şeklinde yanıtlar görülür. ([Garajova et al., 2015](#)) Bu olaylar genel başlık olarak, invazif çoğalmanın karakteristiğini tanımlar. İnvazif büyüme, hem fizyolojik ve hem de patolojik olaylarda merkezi bir role sahiptir. Embriyogenez sırasında, gastrulasyon ve sinir sistemi gelişiminin belirleyicisidir. Erişkin hayatta ise, inflamatuvar süreçleri ve yara iyileşmesi esnasında dokunun yeniden şekillenmesini düzenler. Patolojik durumlarda, hücredeki bu mekanizmalar lokal invazyon ve metastaz oluşmasına neden olur. Hücreler çoğalma kontrolünü, kontakt inhibisyonunu kaybeder, primer alanından çıkarak, sağkalımının mümkün olduğu ve anormal şekilde çoğalıp sekonder kolonilerini oluşturabilecekleri uzak bölgede bulunan dokuları istila edici özellik kazanırlar. Neoplastik hücrelerin primer tümör alanından uzaklaşması, yakınındaki dokuları işgal etmesi ve başka doku organlarda kolonize olup çoğalmaya devam etmesi, tümörlerde görülen malign karakterin göstergelerinden biridir ([Gentile & Comoglio, 2004](#)) Yeni nesil tedavilerde öncelik hedef hepatositleri büyümeye ve metastaz yapmaya öncülük edici moleküler bozukluklardır. Tümörlerin ayrımının daha iyi yapılmasında hepatoselüler karsinomada meydana gelen moleküler değişikliklerin tanımlanması önemlidir. Araştırmalar bu nedenle farklı gen ekspresyon paternini tanımlamaya yönelmiştir. Kanseri başlatan ve ilerleten predominant mutasyonlar ve bozuklukların saptanması hassasiyeti artırır. böylelikle tanı ve tedavi etkinliği artması ve sistemik toksisitenin azalması söz konusudur. ([I Marks & S Yee, 2016](#))

Hasta popülasyonunun bir kısmında tedaviye hemen yanıt ve ardından direnç gelişimi söz konusudur ve 'de novo direnç' olarak adlandırılır. Diğer hastalarda ise tedaviye yanıt olumlu yöndedir, ancak aylar sonra direnç gelişimi gelişebilir, bu ise 'kazanılmış direnç' olarak adlandırılır. Tedavi yaklaşımları etkinliği bakımından sınırlı olması nedeniyle, lokal veya sistemik olarak kanser tekrar etmesi sıklıkla görülür. İlaç direnci, hastalarda tedavinin başarısız olmasının en büyük nedenidir. Blue Ribbon Panel'inde kanserde altın vuruş için önerilerinden biri şudur: 'Etketif tedaviler geliştirmede esas, kanser hücrelerine direnç kazandıran mekanizmaların belirlenmesi ve direnci yenebilen ilaçların geliştirilmesinin öncelik alınmasıdır.'Tedaviye direnç, kanser hücrelerini dirençli hale getiren genetik değişikliklerin kazanılması nedeniyle meydana gelişebilmektedir. Kemoterapi ve radyasyon gibi geleneksel tedaviler normal ve kanser hücrelerini ayırmaksızın etkilidir. Hedefe yönelik ilaçlar ise, kanserle ilişkili sinyal yollarını bloke eder ve diğer tedavilere göreceli olarak yan etkileri de daha azdır. Yeni ilaçların daha akılcı yaklaşımlarla geliştirilmesi, , tedavi sürecinde, erken dönemde ve sonradan kazanılmış direnci önlemek adına kritik önem taşır ([Owusu et al., 2017](#))



Şekil 13: HGF-MET sinyali inhibitörleri ve etkileri ([Finisguerra et al., 2016](#))

Hepatoselüler karsinoma ilerleyen dönemlerinde geleneksel tedavi yöntemleri olan radyasyon ve sistemik kemoterapiler başarısız kalmaktadır. Bu nedenle yeni hedefler belirlenmesi ihtiyacı doğmuş, karsinoma oluşumunda etkili sinyal mekanizmalarına yönelik monoklonal antikorlar ve küçük inhibitör moleküller geliştirilmiştir([Garajova et al., 2015](#))

Tedavi yaklaşımlarında esas olarak spesifik bir moleküler hasar mekanizma hedef alınmaktadır. ([I Marks & S Yee, 2016](#))

Büyüme faktörü ve reseptörü arasındaki ilişkide genellikle, tek büyüme faktörünün yapısal olarak benzer birden çok reseptörü aktive etmesi ve tek reseptörün benzer yapılarda birçok liganda bağlanması geçerlidir. HGF -MET sinyalinde farklı olarak Met reseptörünün tek ligandı vardır. HGF ile birebir ilişki vardır. Bu eşsiz biyokimyasal özellik, ilaç geliştirmede HGF-Met sinyali açısından etkisi, sinyal yolağının aktivasyonu ya da inhibisyonu şeklindedir([Fajardo-Puerta et al., 2016](#)) HGF, MET reseptörü için tek ligandır. Ancak EGF ve TGF gibi büyüme faktörleri, MET aktivasyonunu, EGF reseptörü kinaz aktivitesine bağlı olarak gecikmeli olarak aktive eder. ([Owusu et al., 2017](#))

Hücreden bağımsız otonom mekanizmalar MET hedefli tedavilerde yanıtı etkilemektedir.([Finisguerra et al., 2016](#)) Kanserde HGF-MET sinyalinde bozukluklar sıklıkla mevcuttur ve bu bozukluklar metastazda, anormal çoğalmada, invazyonda ve tedavi direncine neden olmaktadır. HGF -MET sinyaline yönelik ilaçlar, HGF ligandını veya MET reseptörünü hedeflemesine göre ayrılır. HGF ligandını hedef alan ilaçlar, HGF' nin aktif formuna ulaşması için gerekli yapısal degradasyonu önleyerek indirekt etkili olurlar ve HGF aktivasyonunu inhibe ederler. HGF ligandına bağlanıp reseptörü MET ile bağlanmasını önleyen ilaçlar ise direkt etkili olurlar. MET reseptörünü hedefleyen ilaçlar ise, MET antagonistleri HGF ile MET reseptörüne bağlanmak için yarışır, MET degradasyonuna neden olur ve MET kinaz inhibe olmasına neden olur Etkili olur. Diğerleri ise MET tirozin kinazı inhibe ederek MET reseptörüne intraselüler bölgede etki eden ilaçlardır.([Garajova et al., 2015](#))

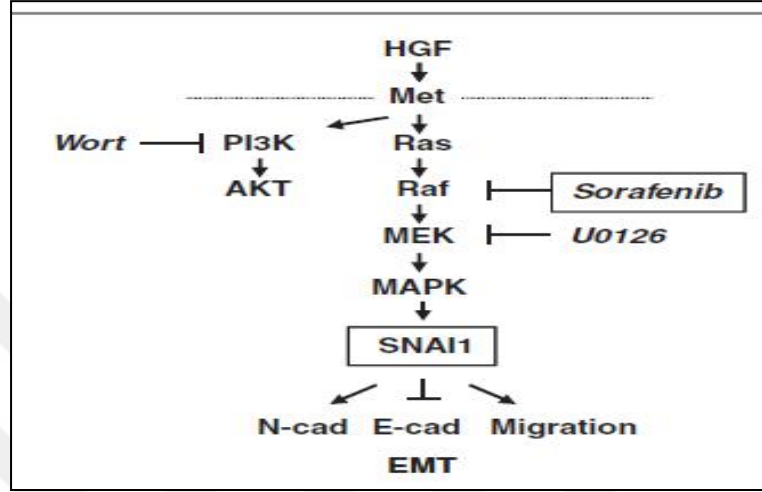
HGF-MET aktivasyonu aynı zamanda epitelyal mezenkimal geçişte (EMT) etkilidir, böylelikle primer ve kazanılmış tedavi direnci gelişmesinde rol oynar ([Owusu et al., 2017](#))Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) epitel tümör hücrelerinde migrasyon ve invazyonu ilerlemesine neden olur ve hepatosit büyüme faktörü gibi bazı faktörlerce indüklenir. Yapılan bir çalışmada HGF/c-Met sinyalinin gastrik kanser metastazları ve özellikle peritoneal yayılımı ile ilişkisi incelenmiştir. HGF ve c-Met birlikte ekspresyonunun otokrin olarak aktive edilen sinyal varlığının neden olduğu ve bu kanserde geçerli olduğu EMT ilişkili moleküllerin ekspresyonu gösterilmiştir. Mevcut otokrin aktivasyonun bloke edilmesi için kinaz inhibitörü SU11274 uygulanmıştır.

Sonuç olarak HGF/c-Met sinyalinin EMT ve anoikiste rolü saptanmıştır. Artmış HGF ve c-Met kötü prognozla ilişkili ve peritoneal yayılım olasılığına işaret ettiği gösterilmiştir. Klinik bulgular da sinyal blokajının peritoneal yayılım tedavisi için yararlı olabileceği yönündedir. ([Toiyama et al., 2012](#))

HGF/MET sinyalinin konstitutif olarak aktivasyonu kanser hücrelerinde bir marker görevi görür. Bu nedenle HGF ve MET tedavi hedefleri arasındadır Bazı kanser hücreleri HGF üreterek MET reseptörünü otokrin yolla uyarır. Yaygın olan HGF tümör mikroçevresinde tümör hücrelerinde MET reseptörünü parakrin aktivasyonudur. Böylelikle HGF kanser hücrelerinde çoğalma, göç ve sağkalımı ilerletip tedavi direncine neden olur. Genetik değişiklikler nedeniyle de direnç meydana gelir ancak tümör mikrocevresi nedeniyle oluşan direnç transient olup mikrocevreden izole olduğunda ilaca duyarlılık yeniden kazanılır. Böylelikle tümör mikroçevresinin normalize edilmesi veya tümör hücreleri ve mikroçevresinin arasında etkileşimin baskılanması tedavi stratejileri arasında yerini almıştır ([Owusu et al., 2017](#))

HGF/MET sinyali tümör mikroçevresinde ilaç direnci gelişiminde rolü nedeniyle önemlidir ve otokrin aktivasyon olduğunda hücreyi HGF/MET sinyali bağımlı hale getirmesi söz konusudur. MET inhibitörleri çeşitli kanserlerde olduğu gibi hepatoselüler karsinomada da klinik olarak denenmektedir. Ancak MET hedefli tedavilerden fayda sağlanması için biyomarkere ihtiyaç duyulmaktadır. İnsanda görülen hepatoselüler karsinomada HGF otokrin aktivasyonu ve MET gen amplifikasyonunun kombinasyonu varlığında MET inhibisyonuna duyarlılık olduğu gösterilmiştir, bu hasta seçiminde önem taşımaktadır ve MET inhibitörlerine duyarlı olmayan tümörlerde EGFR inhibitörleri ile kombinasyon alternatif bir tedavi seçeneği olabilmektedir. HGF aşırı ekspresyonu ile MET amplifikasyonunun kombinasyonu virus ile indüklenen hepatoselüler karsinomanın ilerlemesinde anahtar bir güçlendirici faktördür ve MET hedefli tedavide etkin bir biyomarker olarak kullanılmasında önemi bulunur ([Xie et al., 2013](#))Hepatoselüler karsinoma agresif karakterde kanser olması ve etkin sistemik tedavilerin olmayışı nedeniyle letalite yüksek olmaktadır.([Chuma, Terashita, & Sakamoto, 2015](#)) Tirozin kinaz reseptörleri ve downstream moleküllerini, anjiyogenez, immun sistem elemanlarını inhibe eden ilaçlar geliştirilmiş, ve klinik olarak denenmiştir, bu ajanlar arasında multikinaz bir inhibitör olan Sorafenib terapötik yararı sınırlı olmakla beraber standart sistemik tedavi ilacıdır.

Sorafenib, ilerlemiş primer hepatoselüler karsinoma tedavisinde kullanılmakta olan, 2007'de FDA tarafından onaylanmış bir multi tirozin kinaz bir inhibitörüdür.([L. Ma et al., 2014](#)) Sorafenib, serin treonin kinazları (BRaf, CRaf ve VEGFR-1, -2 ve-3), PDGFR- α ve - β , kök hücre faktörü reseptör tirozin kinazı olan c-kit'i inhibe eder. ([Chuma et al., 2015](#))



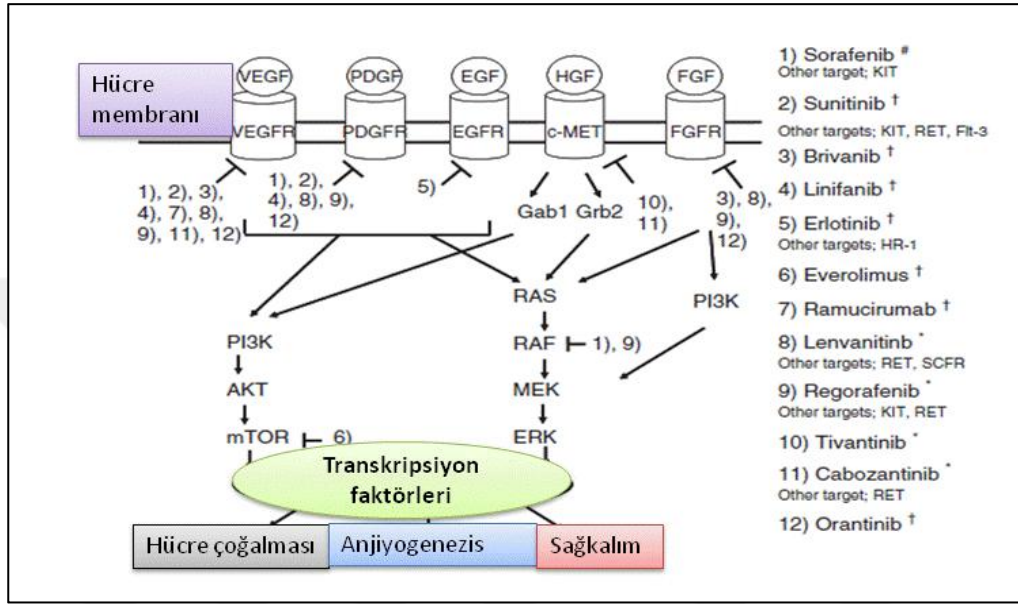
Şekil 16: Sorafenibin EMT mekanizmasını inhibe etmesinin gösterimi([Nagai et al., 2011](#))

Sorafenib HGF aracılı olarak EMT mekanizmasını inhibe eder. EMT; morfolojik değişikliklerle karakterize, kaderin değişimleri, göç edici fenotipin kazanılması olarak tanımlanır. Sorafenib EMT inhibe etmesi hepatoselüler karsinoma hücrelerinde MAPK1 fosforilasyonunun inhibisyonu ve SNAIL-1 down regülasyonu ile mümkündür ([Xie et al., 2013](#))(Şekil 16)

Sorafenibin sağkalımı iyileştirdiği bilinmektedir, ancak hastalarda intolerans geliştiği için etkileri sınırlı olmaktadır ([Lee, Chan, & Choo, 2015](#)) Klinikte sorafenib kullanımı genelde cerrahi rezeksiyonu takiben veya cerrahi tedavinin yer almadığı lokal tedavilerde, tamamlayıcı ilaç olarak verilmesi yaygındır Hepatoselüler karsinoma tanısında farklılıklar olduğu gibi, sorafenibin standart tedavi olarak kullanılabilmesi sorusunu da getirmiştir.. Klinik, biyokimyasal ve moleküler markerlar ile sorafenib tedavisine yanıtta etkin ve klinikte geçerliliği yüksek ve güvenilir biyomarkerlar geliştirilmesi gerekli olmaktadır ([Matsumoto et al., 2014](#)) Sorafenibin klinik yanıtına gelişebilecek yanıtla yönelik etkin biyomarkerlar gereklidir ([Stuart, Goldberg, Laurence, & Savarese](#))

Sorafenibin diğer ilaçlarla kombinasyonu ve etkinliği test edilmeye devam etmektedir.([L. Ma et al., 2014](#))

Sorafenib tedavisi sonrası hastalığın prognozunu devam ettiği hastalığın ilerlemiş olduğu hastalarda ikinci nesil ilaç geliştirilmesi gerekli olmaktadır. Yeni ilaç geliştirilmesinde sorafenibe gelişen dirençte rol oynayan mekanizmaların aydınlatılması yeni yaklaşımlara ışık tutacaktır. (Villanueva & Llovet, 2012)(Şekil 17)



Şekil 17: Hepatoselüler karsinomada tedavisinde kullanılan başlıca ilaçlar ve etkileri (Chuma et al., 2015)

Hepatoselüler karsinomada birçok sinyal yolunun onkogeneze, sağkalımda ve çoğalmada yer alması moleküler hedefli tedavilerin geliştirilmesine neden olmuştur. Ancak hepatoselüler karsinomada bir çok sinyal yolunun moleküler hedef potansiyeli olması sorafenib tedavisinde yanıtı yönelik spesifik biyomarker belirlenmesini zorlaştırır. (Chuma et al., 2015)

Hücresinin sağkalımı için teşvik edilmesi ve dinamik hücre göçü MET aktivasyonu ile sağlanmakta ve invazyon-metastaz ve ilaç direnci için temel oluşturmaktadır. HGF-MET sinyali kanser gelişimi ve ilerlemesinde kritik role sahip olması ve biyomarker gelişimi inhibitörlerinin geliştirilmesi ve klinikte kullanımının onaylanması açısından önemlidir. Yapılan çalışmalarda tümör kaynaklı eksozomlarda bulunan MET metastatik nişin oluşmasını ve metastazın malign melanomda kolaylaştırılmasına neden olduğu gösterilmiştir.

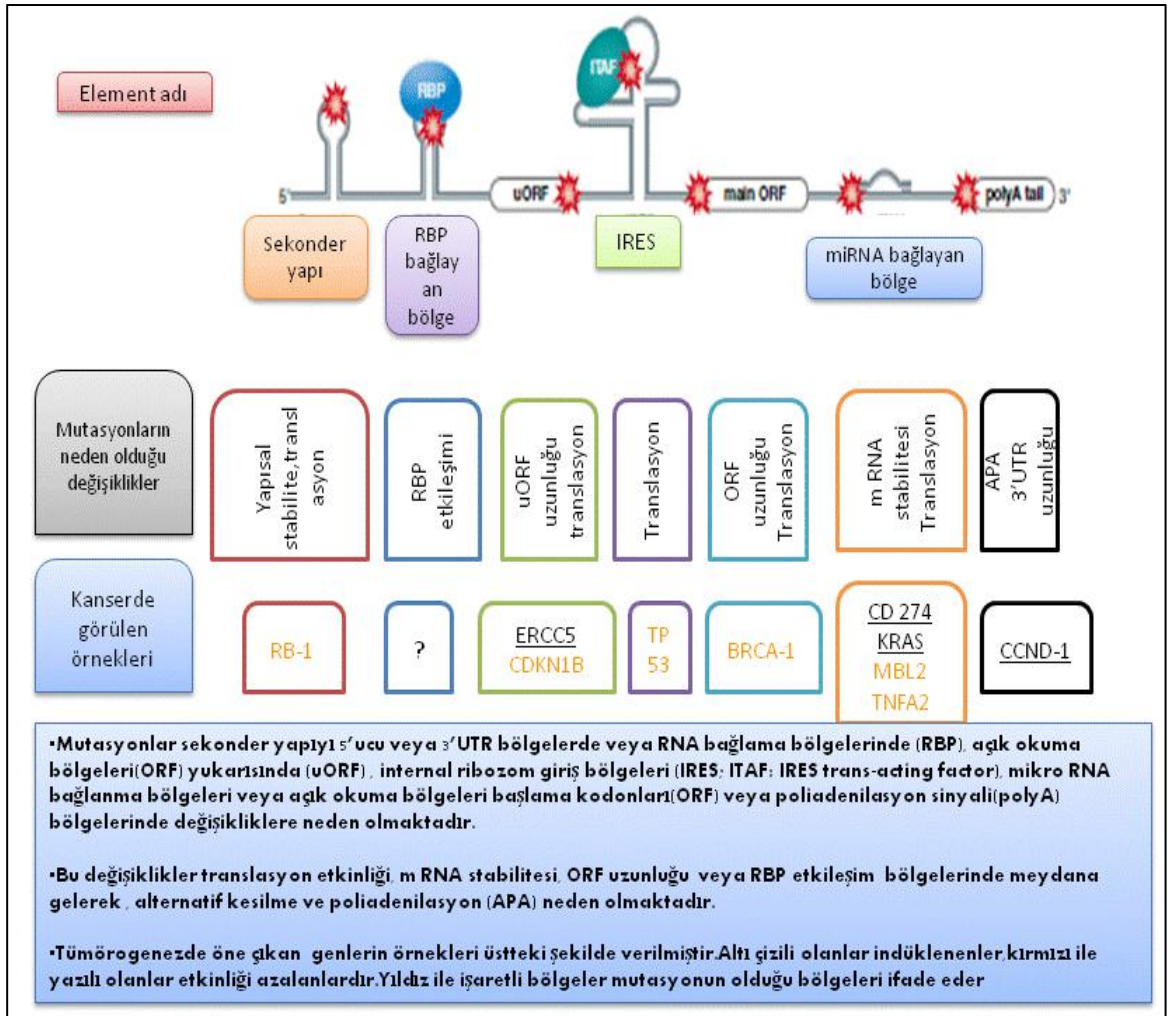
Akciğer kanserinde gen amplifikasyonu ile indüklenen MET aktivasyonu ve ligand bağımlı MET aktivasyonu otokrin veya parakrin yolla olmaktadır ve epidermal büyüme faktör reseptörü tirozin kinaz inhibitörlerine ve anaplastik lenfoma kinaz inhibitörlerine direnç nedeni olduğu gösterilmiştir. Gelecek çalışmalarda HGF-MET kompleksinin 3-D yapısının aydınlatılması ve MET aktivasyonunun iyi anlaşılması ilaçların tedavide uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi, MET ve HGF aktivasyonunun spesifik ve duyarlı olarak saptanmasına yönelik moleküler araçların keşfinde yardımcı rol oynayacaktır ([Matsumoto et al., 2014](#))

2.5 Genomda transkribe olmayan bölgelerin kanserde önemi

Kanserin meydana gelmesinde amplifikasyonlar, delesyonlar, insersiyonlar, translokasyonlar, heterozigosite kaybı, yanlış anlamlı(missense), anlamsız(nonsense) veya çerçeve kayması (frameshit) gibi bir dizi moleküler değişiklik bulunur. Bu değişiklikler onkogenlerin aktive olması veya tümör supresor genlerin inaktive olmasına neden olarak tümör oluşumunu destekler Ayrıca epigenetik mekanizmalar ve viruslar da tümör oluşumuna neden olabilmektedir. ([Diederichs et al., 2016](#)) DNA tamiri, replikasyon kontrolü ve hücre ölümü gibi normal siklus mekanizmalarda bozukluklar kansere eşlik eder. Mutasyonlar genlerde ve düzenleyici bölgelerde oluşur. Bu bölgelerde mutasyon sonucu aktivasyon veya tersi söz konusu olabilir, kontrolsüz çoğalmaya yol açabilir Mevcut değişiklikler transkriptomu da etkileyebilir. Genetik ve epigenetik değişiklikler RNA işlenmesini etkiler ve hücrede normal fonksiyonlar bozulur. Transkriptomda meydana gelen değişiklikler tümör biyolojisinin daha ileri düzeyde anlaşılması için gereklidir Tümör transkriptomlarının karakterizasyonu tümörde etkin tedavilerin uygulanabilmesi için şarttır ([Singh & Eyras, 2017](#))

Kanser genomu oldukça karmaşıktır. Kanser araştırmaları protein kodlayan dizilerde daha çok olmakla beraber, tüm genomun %2'sinden daha azı kodlayıcı bölgeleri oluşturur. Genomik dizinin geri kalan kısmı, kodlayıcı olmayan RNA'lara transkribe edilir veya düzenleyici elementlerden oluşmaktadır ([Diederichs et al., 2016](#)) Tümör gelişiminde genetik ve epigenetik değişimlerin çoğunluğu bu kodlayıcı olmayan bölgede birikmektedir. Enhancer, promotör bölgeler ve kromatin etkileşimlerinin olduğu bölgeler kodlayıcı olmayan genomu oluşturur, cis düzenleyici elementlerin kanserde anormal gen ekspresyonu ile ilişkili genetik epigenetik değişikliklerin hedefi olduğu gösterilmiştir. ([Villanueva & Llovet, 2012](#))

Promotör veya enhancer gibi düzenleyici bölgelerde fonksiyonel mutasyonlar oluşması, transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi oluşturabilmekte veya tersi olarak bağlanma bölgelerini bozabilmektedir. Bunun dışında translokasyon, delesyon, insersiyon veya duplikasyon gibi yapısal anormallikler olması durumunda düzenleyici elementler ve kontrol ettikleri kodlayıcı bölgeler arasında etkileşimler değişebilmektedir(Diederichs et al., 2016) Genomda kodlayıcı olmayan genomda fonksiyonel olmaya en yatkın olan promotör veya düzenleyici bölgeler odak noktası belirlenmiştir ve yeni tekrar edici kodlayıcı olmayan bölge mutasyonları tanımlamıştır (Piraino & Furney, 2017)(Şekil 17)



Şekil 14: Translasyon olmayan bölgelerde mutasyonlar ve etkileri (Diederichs et al., 2016)

Kanser genomunda DNA dizilerinde somatik değişikliklerin kazanılması ile meydana gelmektedir. Uluslararası Kanser Genom Konsorsiyumu(ICGC), Kanser Genom Atlas (TCGA) koordinatörlüğünde kanser örneklerinde genomdaki moleküler değişiklikler kategorize edilmiştir. Şu anda gerekli olan kanser gelişiminde bu değişikliklerin rolünün anlamak ve analiz edilmesidir. Kodlayıcı olmayan mutasyonlar da kanser gelişimine neden olabilmektedir. Kanserde rolü olan kodlayıcı olmayan bölgelerin saptanması için 'ncdDetect' isimli metod geliştirilmiştir. Metod sayesinde kanserde mutasyon sürecindeki heterojeniteler saptanabilmekte ve yeni keşfedilen mutasyonların kanser gelişiminde fonksiyonel bir aday olup olmadığı değerlendirilmektedir. ([Juul et al., 2017](#))

Regülâtör bölgelerde meydana gelen mutasyonlar bağlanma bölgesinin transkripsiyonu aktive eden veya baskılayan faktörün etkilenmesine bağlı olarak değişir. Sonuç olarak transkripsiyon baskılanır veya indüklenir. Eęer onkogen veya tümör supresor genler etkilenirse, düzenleyici bölgedeki mutasyonlar tümörojenite nedeni olayları tetikleyebilir. Melanomada tumor supresor gen promotöründe 3 kez tekrarlayan C > T değişimleri transkripsiyon hızını azaltmakta, transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerini bozmakta ve bu nedenle somatik promotör mutasyonların melanoma hastalarında sağkalım süresini kısa olması ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir ([Diederichs et al., 2016](#))

MECP2 geninin post transkripsiyonel ekspresyonunu regüle eden evrimsel olarak korunmuş cis elementlerinin rolü ve mutasyonunda mental geriliğe neden olup olmadığı araştırılmıştır MECP2 geni mutasyonları olması otizm tipi olan Rett sendromu ile ilişkilidir. Gen beyin gelişiminin erken döneminde diğer genlerin aktivitesini düzenleyen metil CpG bağlanma protein 2'i kodlar. Uzun MECP2 izoformunun değişken 3'-UTR bölgesi erken beyin gelişiminde sıkı regülasyon gerektirmektedir. Kısa izoformu erişkinde daha satbil ekspresyon gösterir ve 3'-UTR cis-regulatör elementler daha az korunmuş haldedir Korunmuş olan cis-regulatör elementler (G-quadruplexes, microRNA target sites, and AREs) analiz edilmiştir.. Evrimsel olarak korunmuş ARE ve mi-R148/152 hedef bölgeleri daha uzun olan izoform ekspresyonu ile sonuçlanan ikinci alternatif poly(A) ile ilişkilidir. ([Bagga & D'Antonio, 2013](#))

Melanomada NF-1 mutasyonları yaygın olup ekstraselüler sinyal kinaz yolunda regülasyonunun bozulmasına neden olur. Ayrıca ilaç direncinde rolü vardır. Promotör mutasyonları melanomada yaygındır, promotör aktivitesini değiştiren 4 adet somatik mutasyon tanımlanmıştır. Transkripsiyon faktörü bağlama motifi mutasyon ile bozulmaktadır.([Poulos et al., 2015](#))

İnsanda Transient Receptor Potential Vanilloid type-1 (TRPV1) ekspresyon değişiklikleri ile glioma ilerlemesine neden olur. Aynı proteini kodlayan 4 transkript varyantta da sadece 5'-transle edilmeyen bölge (5'UTR) dizisinde farklılık göstermektedir. 5'UTR dizisi, TRPV1 transkriptlerin stabilitesinde belirleyici olduğu, TRPV1 varyant 3 (TRPV1_{v3}) en stabil varyantı olup sadece glioblastoma örnekleri ve glioma benzeri kök hücrelerde eksprese olduğu gösterilmiştir ([Nabissi et al., 2016](#))

Telomeraz ters transkriptaz (TERT) geni promotörü nokta mutasyonu melanoma, glioma, karaciğer ve mesane kanserinde sıklığı yüksektir. TERT promotör mutasyonları TERT ekspresyonu ve telomeraz aktivitesinin artmasında rolü olduğu düşünülmektedir. Meme, pankreas, prostat kanserinde ise bu bölge nadiren mutasyonu gösterilmiştir. TERT mutasyonu NonHodking lenfomada mutasyon olup olmadığı incelenmiş ve onkogenik rolü olmadığı anlaşılmıştır([Lam, Xian, Li, Burns, & Beemon, 2016](#))

Promotör regülasyonunun genlerde transkripsiyon açısından rolü kritiktir. İntronla ilişkili gen loop varlığı proksimal promotör bölgeye sonlanma faktörlerinin toplanmasını kolaylaştırır ve promotöre bağlı polimeraz öncülüğünde bu faktörlerin uaRNA sentezini sonlandırır. Bu bölgede normal splicing olsa da mutasyon olması durumunda, transkripsiyonda promotördeki polyA bağlı sonlanmada görevli faktörlerinin burada yer alması tehlikeye girer ve transkripsiyonun kaybı ile eşlik edebilir([Agarwal & Ansari, 2016](#))

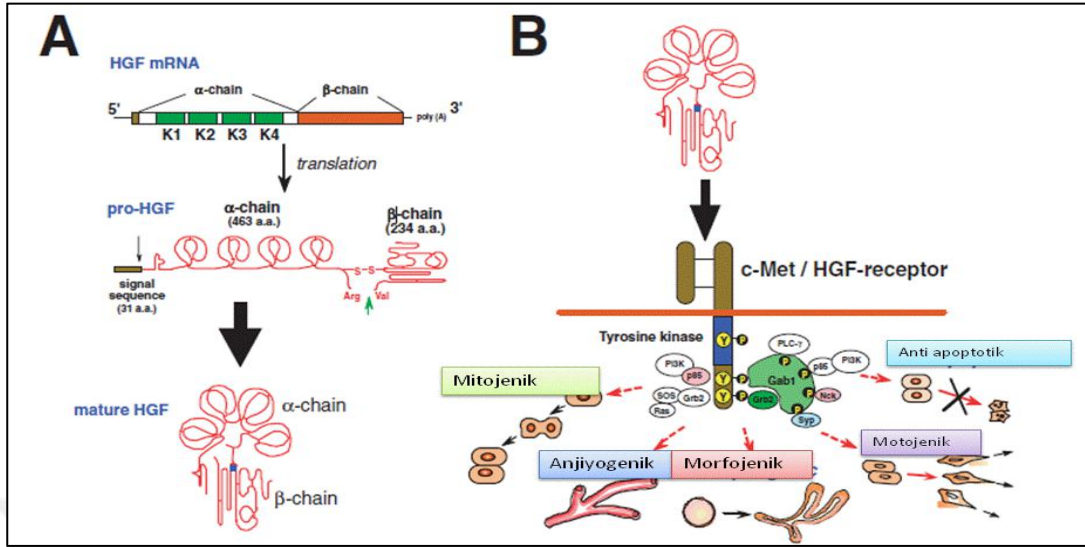
İnsan bocavirusu(HBoV) (HBoV) P5 promotöründe transkribe edilen RNA alternatif işlenmesinde kritiktir. HBoV RNA transkriptleri için düzenleyici mekanizmalar olan poliadenilasyon mekanizmasının rolü araştırılmıştır. Yeni bir poliadenilasyon bölgesi tanımlanmıştır ve enfeksiyonu sırasındaki varlığı gösterilmiştir. Alternatif poliadenilasyonun enfeksiyonda kapsid ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. ([Hao et al., 2017](#))

Regülatör bölgelerdeki mutasyonlar tümör supresorlerin baskılanmasına neden olur. Melanoma hastalarında telomerase ters transkriptaz (TERT) geninde promotör mutasyonu bulunmuştur. TERT geni telomerazın katalitik subuniti olan bir enzimi kodlar, bu enzim kromozomal bölgelerin sonlanma bölgelerini koruyucu etkilidir, herhangi bir fonksiyon bozukluğunda her hücre bölünmesinde kısılacaktır. Anormal TERT ekspresyonunda sınırsız çoğalma potansiyeli kazanılması söz konusudur. Bu mutasyonlar transkripsiyonel aktivitede artmaya neden olan TERT promotör bölgesinde ETS transkripsiyon faktörü olan GABP için yeni bir bağlanma bölgesi yaratmakta ve tümörogeneze adımda önemli bir katkıda bulunmaktadır. ([Diederichs et al., 2016](#))

2.6.HGF geninin transkripsiyonel düzenlenmesi, kanser gelişiminde rolü ve önemi

HGF geni sıkı bir regülasyon altındadır ve normal koşullarda hepatosit, safra kesesi epiteli gibi hücrelerde genelde kalıcı şekilde sessizleştirilmiştir. İto veya stellat hücreleri gibi karaciğerin stromal komponent elemanları ve endotelial hücreleri tarafından transkribe edilir. HGF ekspresyonu, mezenkimal hücrelerde, ekstraselüler uyarıcılardan olan sitokin ve hormonlarca aktifleştirilir, regülasyonu esasen transkripsiyonel seviyededir. HGF, bazı epitelyal tümörlerde ve karaciğer sirozu gibi durumlarda anormal şekilde ekprese olur ([Gene](#))

HGF geni için tek kopya geni bulunur ve 7. kromozomda kısa kolunda q21.1 yer alır. Bu bölge HGF reseptörünü de içermektedir. İnsan HGF geni 71.433 bazdan oluşur ve 18 ekzon, 17 intronu bulunur. İlk ekzonu 5' transle olmayan bölgenin m RNA sını içerir ve sinyal peptidini kodlar. Alfa zinciri 4 domain içerir ve 10 ekzon ile kodlanır. Alfa ve Beta zincirler arasındaki boşluk bölgesi 12.ekzondadır, geri kalan 6 ekzonu ise beta zincirinin, serin proteaz benzeri domainini kodlar. HGF geni için transkripsiyon başlama bölgesi translasyona başlama kodununun 76 bp gerisindedir. HGF tek zincir halinde 782 aminoasidden oluşur ve prepro HGF olarak inaktif halde kodlanır. HGF karaciğerde hem çoğalma da hem de rejenerasyon dengesinde kritik bir role sahiptir. ([Fajardo-Puerta et al., 2016](#))(Şekil19)



Şekil 15: HGF'nin hücre içinde meydana getirdiği değişiklikler ([Fajardo-Puerta et al., 2016](#))

HGF karaciğer, akciğer deri ve beyin gibi birçok dokuda mRNA ve protein düzeyinde saptanabilir. HGF gen promotörünün gelişim, çoğalma, doku tamiri ve onkogeneze regülasyonu pozitif ve negatif etkiler altındadır. Epidermal büyüme faktörü, platelet çoğalma faktörü ve fibroblast çoğalma faktörleri ekspresyonu artırıcı yönde promotöre etki eder. ([Mungunsukh, McCart, & Day, 2014](#))

HGF geni alternatif splicing sonucu beş tane mRNA transkript varyantına sahiptir: 1-31 aminoasitlerde sekresyon için gerekli bir sinyal peptidi, amino grup terminalde heparin bağlama bölgesi (N),Dört adet kringle domaini ve serine proteaz benzeri domain içerir.

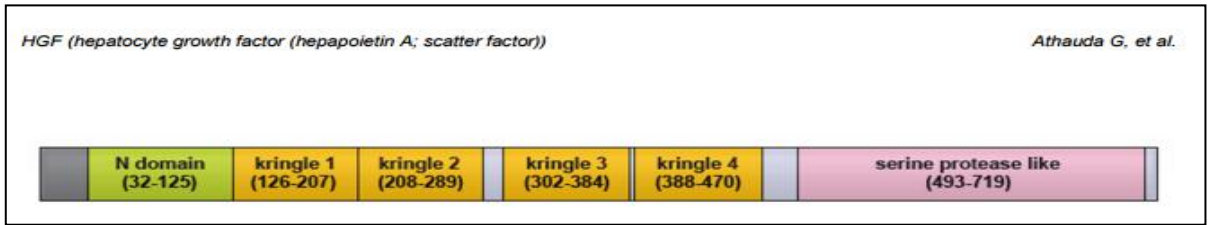
İlk varyantı (NCBI Erişim: NM_000601) en uzun izoformunu (izoform 1; NP_000592) kodlar ve 728 aminoasitten oluşur.

Varyant 2 (NM_001.010.931) varyant-1 den farklı olarak 3'ucta alternatif bir ekzon içerir. Ancak birkaç ekzon bakımından eksiktir Kodladığı protein (isoform 2; NP_001.010.931) 290 amino asit içerir ve ikinci kringle domaininden sonrası kırpılmaktadır ve izoform 1e göre farklı bir karboksi terminale sahiptir.

Varyant 3 (NM_001.010.932) izoform 1 den farklı frame kodlama segmenti eksik olmasıdır. Kodladığı protein olan izoform 3, 723 aminoasit içerir ancak izoform 1 de ilk kringle domainde bulunan 162-166 aminoasitlerdeki 5 aminoasidi delete olan 15 bp uzunlukta olan-"FLPSS" dizisi yoktur.

Varyant 4 (NM_001.010.933) varyant 2'de olduğu gibi 3' ucu bölgedeki ekzonda eksikliği ve izoform 3 deki internal delesyonu barındırır. Kodladığı protein olan izoform 4 (NP_001.010.933) 285 aminoasid içerir ve izoform 2 ile dizide eksiklik olması dışında identiktir.

Varyant 5 (NM_001.010.934) ise 3'ucunda bir çok ekzonu eksiktir ve izoform 1 ve 2 den farklı olarak alternatif bir 3' segmenti vardır. Kodladığı protein izoform 5 (NP_001010934) 210 amino asid içerir ve karboksi terminali farklılık gösterir ([Athauda et al., 2012](#)) (Şekil 20)



Şekil 16: Pre-pro-HGF proteini izoform 1 (728 aminosid)([Athauda et al., 2012](#))

HGF promotörü IL-1 alfa ve 1Beta IL-6, IL-8 ve interferon- γ ile uyarılır. Böylelikle HGF ekspresyonu doku tamirine öncülük edici inflamasyonun erken dönemlerinde artış gösterir. HGF promotörü cis elementler içerir bu elementlerin transkripsiyon faktörleri ve diğer uyarıların bağlanması ile düzenlenir ve HGF ekspresyonu artar veya azalır. ([Mungunsukh et al., 2014](#))

Promotörün -30bp bölgesinde yaklaşık 100 bp uzunluğunda TATA kutusu bulunur. Komşuluğunda ise 600 bp veya daha uzun 5-flanking diziler bulunur ve HGF geninin bazal ve indüklenebilen ekspresyonu için kritik bölgelerdir HGF promotörü ve yukarısında bulunan bölgede HGF geni ekspresyonunun hücreye spesifik olmasında önemli elementler bulunmuştur.

Fare HGF promotöründe -16 ve +11 bp bölgede cis elementi olduğu keşfedilmiştir. Bu element TNF- α , IL-1, IL-6, and EGF sitokinlerine yanıtta rol oynar.

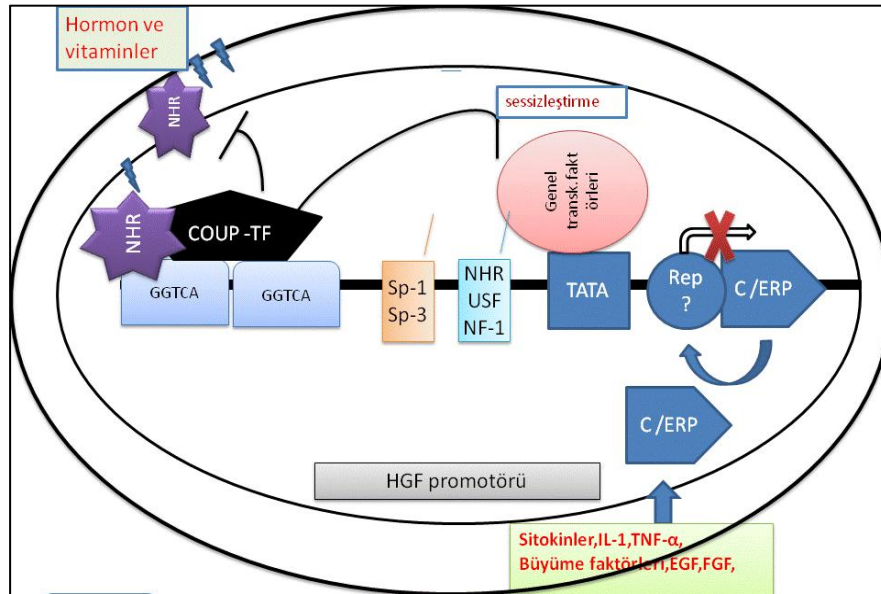
C/EBP transkripsiyon faktörleri (α , β , and δ) HGF promoter aktivitesini bu elementle uyarır. C/EBP site (TTGCAA) promotörün kor bölgesini oluşturur ve palindromik dizi (ACCGGT) ile çakışır. Palindromik dizi HGF geni promotörünün baskılanmasında rol oynadığı bilinmektedir.

HGF promotörünün –872 ve–860 bp bölgeleri arasında başka bir cis element yer alır. Bu element östrojen yanıt elementi (ERE) (an RGGTCA, IR3) olarak adlandırılmıştır ve nükleer orfan reseptörü tavuk ovalbumin upstream reseptör promotör transkripsiyon faktörü(COUP-TF) ile bağlanır. ERE elementindeki baskılayıcı mekanizmaya benzer olarak, östrojen reseptörü (ER) , COUP-TF ile yarışarak promotördeki baskılayıcı etkilerini ortadan kaldırabilir.

Diğer bir enhancer etkili element olan Sp1 bölgesi –328 ile –297 bp arasında bulunur, CTCCC motifine sahiptir, Sp1 ve Sp3 buraya bağlanarak HGF promotörünü aktive eder.

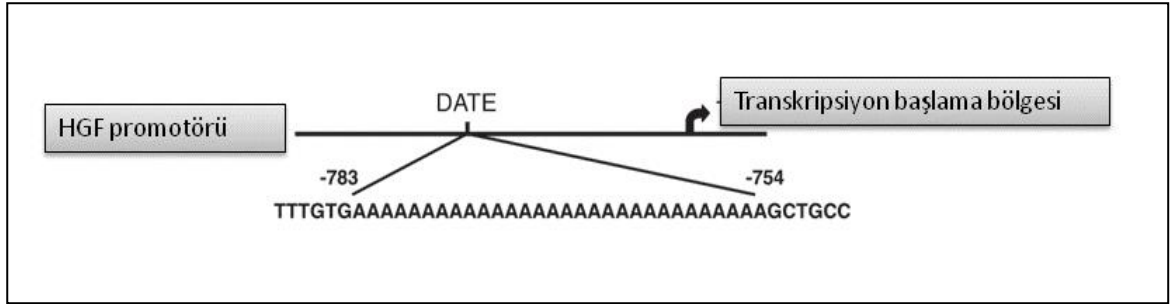
HGF promotöründe transkripsiyon başlangıcının yukarısında –260 ile –230 bp bölgede karmaşık ve çok yönlü etkili bir element daha bulunmaktadır. Bu bölgeye nükleer faktör 1 (NF1) ve upstream stimulator faktör (USF) bağlanarak HGF promotörünü ve transkripsiyonunu düzenler([Gene](#)) (Şekil 21)

Regülâtör elementler DNA-protein paterninde değişiklikler yapmaktadır. Regülâtör elementlerde mutasyon olması halinde cis elementler ile onları regüle eden faktörlerin birbiri ile etkileşimi ve düzenleyici bölgelere erişebilirliği bozulmasına neden olmaktadır.([Liu et al., 2005](#)) ([Cho et al., 2005](#); [Global Burden of Disease Cancer et al., 2017](#); [Johnston & Carroll, 2015](#); [Kellis et al., 2014](#); [Kim & Shiekhattar, 2015](#); [Sharma, Kelly, & Jones, 2010](#))



Şekil 17: Şekil 21:HGF geni promotörünün şematik gösterimi([Gene](#))

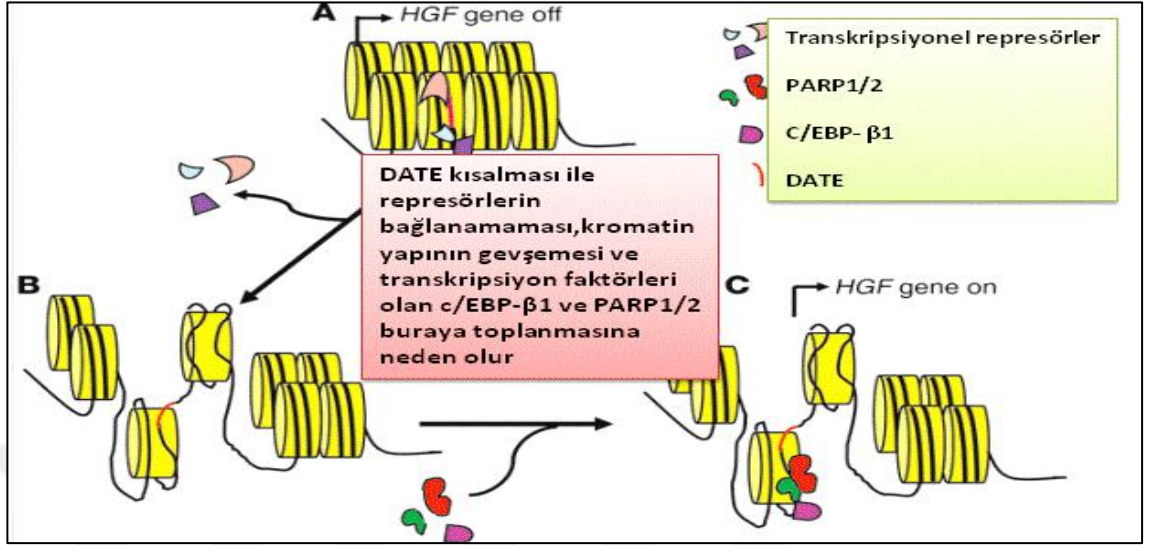
HGF ekspresyonunun regülasyonunda diğer baskılayıcı iş gören element ise HGF transkripsiyon başlama bölgesinin 750 bp yukarısında yer alan 30 adet deoksiadenozin tekrarı olan bölgedir. DATE veya deoksiadenozin kuyruk elementi olarak tanımlı bu bölgenin meme kanserinde promotör mutasyonları ve kanser gelişimi açısından kritik bölge olduğu gösterilmiştir([Mungunsukh et al., 2014](#)) (Şekil 22)



Şekil 18:DATE bölgesi([J. Ma et al., 2009](#))

2.7.HGF promotörü ve DATE bölgesi ile ilgili literatürde mevcut çalışmalar

2009 yılında Ma ve arkadaşları, normal meme epiteli hücrelerinde HGF geninin transkripsiyonel olarak susturulmuş olduğunu, ancak meme kanseri epiteli ve dokularında bu mekanizmada bozukluk olduğunu ilk kez göstermiştir. Bu bölgenin transkripsiyonda represör rol görmekte olduğu ve insanda görülen meme kanseri hücreleri ve dokularında delesyon mutasyonu görüldüğünü bildirmişlerdir. DATE bölgesinde kısaltmaya neden olan mutasyonlar işlevsel yönden etkileri incelendiğinde HGF promotör bölgede lokal ve geniş etkilere yol açabilmektedir. Bu etki kromatin yapısı ve DNA-protein etkileşimlerini, insan meme karsinom hücrelerinde HGF promotörünün konstitutif aktivasyonuna yol açarak sağlanmaktadır. Atasal tipte DATE kromatinin yüksek düzeyde konsantrasyona kalmasına neden olur ve promotör bölgeye transkripsiyon faktörlerinin ulaşmasını engel olur böylelikle gen sessizleştirilmiş haldedir. Kısaltmış DATE ise bu bölgeden represörlerin salınımına, kromatin yeniden şekillenmesine neden olur. Transkripsiyon aktivatörleri olan C/EBP- β ve PARP1/2 promotör bölgesine gelmesine ve HGF gen aktivasyonu meydana gelmesine neden olur ([J. Ma et al., 2009](#)) (Şekil 23)



Şekil 19: HGF gen regülasyonunun DATE ile olduğunu destekleyen model.(Ma et al., 2009)([J. Ma et al., 2009](#))

DATE bölgesinin kısalmış varyantları (25 veya daha az deoksiadenozin içermesi) Afrikalı Amerikalılarda meme kanserli hastaların %51 inde ve Avrupalıların %15inde bulunmuştur. Meme kanserli hastalarda kısalmış DATE varyantı normal popülasyonda görüldüğü, normal meme dokusunda yüksek HGF ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Popülasyon çalışmaları kısalmış DATE varyantının, kolon, mide, endometrium ve serviks, glioma ve sarkom gibi HGF ekspresyonunun yüksek olduğu diğer kanser türlerinde ilişkisinin belirlenmesi gerektiğini vurgulamıştır. Ayrıca normal kişilerde de kısalmış DATE yapısının varlığının polimorfik olduğuna ve hastalığa yatkınlıkta bir düzenleyici olabileceğine dikkat çekmektedir ([J. Ma et al., 2009](#))

HGF promotöründe DATE bölgesinde kısalma HGF ekspresyonunu aktive edici bir varyant oluşumuna neden olmaktadır. Gastrik kanserli hastalarda MET kopya sayısı artışı (CNG) ve HGF promotöründeki deoksiadenozin tekrar elementinde mutasyon sonucu kısalmanın rolü araştırılmıştır. Gastrik kanserli hastalarda kısalmış DATE yapısı %33 heterozigot formda %13 homozigot formda bulunduğu gösterilmiştir. Ancak MET pozitif ve negatif olan hastaların alt gruplarında veya genel popülasyona bakıldığında tanısal değeri bulunamamıştır. Homozigot olarak DATE bölgesinde kısalma taşıyıcı bireylerde MET CNG olmayan hastalarda ancak tanısal değeri gösterilebilmiştir([Graziano et al., 2011](#))

Yüksek HGF ekspresyonu kötü bir prognoz bulgusudur. HGF ekspresyonu mesane kanseri hastalarında daha yüksek olan hastalarda sağkalımı etkilediği gösterilmiştir. Mesane kanserinde HGF DATE bölgesinin etkisi incelemiştir. Mesane tümörü dokularında HGF mRNA düzeyleri DATE uzunluğuna göre karşılaştırılmıştır. HGF DATE varyantlarının HGF ekspresyonunu arttırıp arttırmadığını göstermek için hastalardan periferik kan lenfositleri (PBLs) izole edilmiştir. Kısa DATE (<28 tekrar) kanserli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu nedenle DATE yapısında değişiklik anormal HGF ekspresyonuna yol açarak karsinogeneze ve tümörün agresifliğinde rolü olabileceği bildirilmiştir.([Chiba et al., 2014](#))

Multiple myeloma (MM) hastalarında HGF düzeyleri hastaların yarısında yüksektir ve kötü prognozla ilişkilidir. HGF seviyeleri kan ve kemik iliğinde multiple myelomlu hastalarda yüksek olması malign plazma hücrelerinde HGF aşırı ekspresyonunun veya kemik iliğinde malign plazma hücre varlığının sonucu bir reaktivasyon süreci nedeniyle yükseldiği düşünülmektedir. Önceki çalışmalarda en az 5adenozin kaybının negatif düzenleyici etkisini kaybetmesi ve HGF düzeyini yükseltmesi nedeniyle DATE uzunluğu ile HGF serum konsantrasyonu/ HGF mRNA seviyeleri incelendiğinde herhangi anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Ancak araştırma çok sınırlı sayıda örnekle yapılması çalışmanın kısıtlılığını oluşturduğu belirtilmiştir. ([Rampa et al., 2014](#))

DATE bölgesi çeşitli insan kaynaklı kanser hücre hatlarında HGF ekspresyonu ile ilişkisi incelenmiştir.55 adet hücre hattında kısa DATE uzunluğu bulunmuştur. Kısa DATE uzunluğu akciğer,mide,kolorektal,pankreas ve mezotelyoma kanser tiplerindeki hücrelerde saptanmıştır Kısa DATE içeren hücreler HGF yüksek oranda eksprese ederken normal DATE bulunan hücrelerde HGF ekspresyonu normaldir.Ancak bazı hücre hatlarında kısa DATE yapısı olmasına rağmen HGF ekspresyonu düşük olduğu bulunmuştur.Bu hücre hatlarında düşük HGF ekspresyonunun nedeninin HGF promotöründe intron 1 polimorfizm veya metilasyonları nedeniyle olduğu ilk kez gösterilmiştir.([Sakai et al., 2015](#))

Kolorektal kanser genomik instabilite sık görüldüğü bir kanser türüdür. HGF geninde proksimal promotöründe represör görevi olan DATE bölgesinde DNA mismatch tamir (MMR) bozuklukların delesyon mutagenезine yol açtığı bulunmuştur. DATE (DeoxyAdenosine Tract Element) elementi HGF promotöründe kısaltmakta, normalde kolon epitelinde sessiz olan promotörün aktivasyonuna yol açmaktadır.

Bu nedenle HGF-Met sinyali otokrin şekilde meydana gelmektedir. Böylelikle kanser hücrelerini çoğalmaya yönelik desteklemekte, sağkalımını güçlendirmekte aynı zamanda programlı hücre ölümüne karşı direnç kazandırmakta olduğu gösterilmiştir([Seneviratne et al., 2015](#))

Fare hepatoselüler karsinoma modelinde periferik kanından sirküle tumor hücre hattı izole edilmiştir. Bu hücrelerde HGF ve c-Met düzeyleri, primer tümör hücrelerinden daha yüksek ekprese olduğu gösterilmiştir. Sirküle tümör hücreler, epitelyal mezenkimal geçişte rol oynamaktadır ve HGF ile indüklenebilme özelliğindedir. c-Met promotörü ve HGF promotörünün epigenetik analiz edilmiş ve bu hücrelerde DNA metilasyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir. Metilasyon miktarı ile c Met ve HGF ekspresyonlarının artışı arasında paralellik olduğu gösterilmiştir([Ogunwobi et al., 2013](#))

Hepatosit büyüme faktörü (HGF)ve paired box 2 (PAX2) proteinlerinin prostat kanseri hücre invazyonunda düzenleyici rolü mekanizması araştırılmıştır. HGF kanser hücre invazyonunda önemi iyi bilinen bir düzenleyici gen olup, PAX2 geninin direkt olarak hedefidir. PAX2, HGF geninin yukarısında olup HGF genini histon modifikasyonunu değiştirip ekspresyonun arttırabilmektedir. Bu etkisini HGF geni promotörünü histon 3 H3de asetile edip HGF geni ekspresyonunu arttırarak yapar. HGF promotöründe – 637 ve – 314 arasındaki bölge konsensus PAX2 bağlama dizilerini içerir ve bölgede delesyon nedenli mutasyon olduğunda bölgede delesyon olduğunda HGF geninin PAX2 ile promotör aktivasyonu bozulmaktadır ve HGF promotörünün aktivasyonu azalmaktadır. Bu bölgede PAX2 geni aşırı ekspresyonunda ise kanser hücresinde invazyonu artmaktadır. Böylelikle çalışmada HGF'nin transkripsiyonel regülasyonunun promotör aracılığı ise PAX2 tarafından değiştirilip invazyonu gösterilmiştir ([Ueda et al., 2015](#))

Hepatosit büyüme faktörü (HGF) multiple myelom hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilir. Sağkalım ve çoğalmadan rolü vardır. Multiple myelomda HGF promotör allellerindeki DNA mutasyonlarının HGF transkripsiyonuna etkileri incelenmiştir. Sekans analizleri ile myeloma hücrelerinde HGF transkripsiyonundan sorumlu promotörde HGF üretimini indükleyici tek nükleotid varyantları ve tek nükleotid polimorfizmleri gösterilmiştir.

Allele spesifik mutasyonlar fonksiyonel olarak yabancı tipte dizilerini yeniden düzenlemekte ve oluşturduğu motifler endojen transkripsiyon faktörleri olan NFK-B (nuclear factor kappa-B), MZF1 (myeloid zinc finger 1), NRF-2 (nükleer factor erythroid 2-related factor 2) etkileşim kolaylaşmaktadır. Ayrıca düzenleyici bölgede bulunan heterojen SNV lerin atasal tipte allelden transforme hale geçme nedeni olduğu gösterilmiştir, böylelikle bölge yeni transkripsiyon faktörleri ile bağlanma özelliği kazanır anormal transkripsiyonel sinyallerin etkileşimler meydana geldiği saptanmıştır ([Tian et al., 2015](#))

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

HGF geni mutasyonunda hepatoselüler karsinoma ortaya çıkması ve gelişimini incelemek amaçlı, tanımlayıcı ve deneysel çalışma niteliğindedir

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Araştırmamızda DNA dizi analizi ve PCR için primer (oligonükleotid) sentezi hizmet alımı yapılmıştır. Diğer tüm çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı' nda ve İzmir Biyotıp ve Genom Enstitüsü Laboratuvarlarında 07.10.2016 ila 30.05.2017 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Bu araştırma insan üzerinde yapılan bir çalışma içermemektedir. Mahlavu, Hep-3B, Snu-423, Snu-449, Snu-182, Snu-475, Snu-387, Snu-398, PLC, Sk-Hep-1, Huh-7, Focus, Hep-40, Hep-G2, THLE-2 ve sorafenibe direnç geliştirilmiş olan Huh-7 ve Mahlavu hücre dizilerinde gerçekleştirilmiştir.

3.4. Çalışma materyali:

Araştırmada HGF mutasyonu hepatoselüler karsinoma hücre dizilerinde incelenmiştir

HGF mutasyonu ve sorafenib ilişkisi ise mutasyon saptanan hücre dizileri ile daha önce laboratuvarımızda sorafenibe direnç geliştirilmiş olan Huh-7 ve Mahlavu hücre hatlarında incelenmiştir

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

Araştırmada bağımsız değişken hücre hatlarıdır, bağımlı değişken ise mutasyon değişimleridir

3.6. Veri toplama araçları

3.6.1. Hücre Kültürü

İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hatları olan Mahlavu, Hep-3B, Snu-423, Snu-449, Snu-182, Snu-475, Snu-387, Snu-398, PLC, Sk-Hep-1, Huh-7, Focus, Hep-40, Hep-G2, THLE-2 ve sorafenibe direnç geliştirilmiş olan Huh-7 ve Mahlavu hücreleri çalışmada kullanıldı. Hücreler 10% FBS, %1 penisilin/streptomisin , %1 L-glutamin ve Non esansiyel aminoasit içeren DMEM/RPMI hücre ortamında %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C de kültüre edildi. Hücrelerle ilgili tüm işlemler laminar kabinette gerçekleştirilirken, hücreler besi ortamları içerisinde 37°C’de ve %5 CO₂ varlığında hücre kültürü inkübatörü içerisinde yetiştirildi. Yetiştirilen hücrelerin yoğunlukları belli aralıklarla faz-kontrast mikroskobu ile kontrol edildi. Tüm çalışmalarda %70-80 yoğunluktaki hücreler kullanıldı. Hücreler %70 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi yapıldı ve hücreleri kaldırmak için Tripsin/EDTA solüsyonu kullanıldı

Besi Ortamı Hazırlanması:

1X 500 ml.’ RPMI ve DMEM besi ortamı içerisine 2 mM konsantrasyonda L glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve % 10 oranında FBS eklenmiştir.

Gerektiğinde kullanmak üzere +4 °C de saklanmıştır.

Hücreler 37 °C CO₂’li inkübatörde inkübe edilmiştir. 2-3 günde bir hücre yoğunluğuna göre 1/2 veya 1/3 oranında pasajlama yapılmıştır

Hücre sayımı ve canlılık testi

Kültürde üretilen hücrelerin ortamları uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile iki kere yıkandılar. 1X Tripsin-EDTA solüsyonu ile hücreler kaldırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonundan 50µl alınarak tripan mavisi (Biological industries, 03-102-1B) ile karıştırıldı ve hücreler Neubauer lamında 10 farklı alanda hemositometrik olarak sayıldı ve yaklaşık hücre sayısı bulundu.

Hücre Hatlarının Pasajlanması

Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında eski hücre ortamı vakum ile aspire edildi ve 1X PBR ile iki kez yıkandı, PBS aspire edildikten sonra flasklara tripsin/EDTA solüsyonu eklendi ve 37'inkübatörde 1-2 dakika süreyle bekletildi.İnverted mikroskopta yüzeyden ayrılan hücreler gözlemlendi ve taze hücre ortamı eklenen tripsin miktarının 3 katı miktarda eklendi ve 15 ml falkonlara hücreler homojenize edilip toplandı.1500rpm'de 6-7 dakika süreyle santrifüj edilip hücreler çöktürüldü

Supernatantı pellete değmeden uzaklaştırıldı ve pellet üzerine gerekli miktarda hücre ortamı eklendi hücre ve ortam solusyonu yeni flasklara aktarıldı, yoğunluğu mikroskopta incelenip ,inkübatöre kaldırıldı.

Hücre Pelletlerinin Hazırlanması

DNA izolasyonu için kültüre edilen hücrelerden pellet elde edildi. Bunun için hücrelerin %80 yoğunluğa ulaşması takiben hücre ortamları aspire edildi, 1X PBS ile 2 kez yıkandı. Hücreler tripsin yardımı ile flask yüzeyinden kaldırıldı ve taze ortam ilave edildi, 1500 rpm'de 5-6 dakika santrifüj ardından süpernatantı aspire edildi, hücre pelletinin üzerine 1X PBS eklendi, 1500 rpm'de kısa bir santrifüj ile yıkamanın ardından hücre pelletleri – 80 °C'ye kaldırıldı.

Tablo 2: Kullanılan hepatoselüler karsinoma hücre dizileri ([Yuzugullu et al., 2009](#))

Hücre dizisi	Hücre tipi	Farklılaşma derecesi	Otokrin HGF aktivasyonu
Focus	Epiteloid	Kötü farklılaşma gösterir.	
Hep 40	Epitelyal	İyi farklılaşma gösterir.	
Hep3B	Epitelyal	İyi farklılaşma gösterir.	+
HepG2	Epitelyal	İyi farklılaşma gösterir.	
Huh-7	Epitelyal	İyi farklılaşma gösterir.	
Mahlavu	Epiteloid	Kötü farklılaşma gösterir	
PLC	Epitelyal	Hepatoma	+++
Sk Hep-1	Endotelyal	Adenokarsinoma	
Snu 182	Epitelyal	Kötü farklılaşma gösterir	+
Snu387	Epitelyal	Kötü farklılaşma gösterir	+
Snu398	Epitelyal	Kötü farklılaşma gösterir	+++
Snu423	Epitelyal	Kötü farklılaşma gösterir	
Snu449	Epitelyal	Kötü farklılaşma gösterir	
Snu475	Epitelyal	Kötü farklılaşma gösterir	
THLE-2	Epitelyal	Primernormal karaciğer hücresi, SV40 Large T antijenile enfekte	

3.6.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda Macherey Nagel (MN) NükleoSpin DNA izolasyon kit(Katalog Numarası:740952.50) protokolü kullanıldı. Dondurulmuş haldeki hücre pelletleri oda sıcaklığında buz üstünde çözdürüldü ve genomik DNA'ları kit protokolüne göre elde edildi.

İzlenen aşamalar

Örneklerin hazırlık ve lizis aşaması

1. Örnekler -80'den çıkarılıp buz üzerine alındı ve çözülmesi sağlandı
2. Öncelikle 200 µL Buffer T1 eklendi ,
3. Ardından -20 de bekletilen 25 µL Proteinase K solusyonu eklendi
4. 200 µL Buffer B3 eklendi ve vorteks edildi
5. Örnekler bu aşamada sıcak su banyosunda 70 °C de 15 dakika süreyle bekletildi
6. 210 µL etanol (96–100 %) eklendi ve vortekslendi

Örneklerin kolona yüklenmesi ve DNA kolona bağlanması ve yıkamalar

7. Her bir örnek için NucleoSpin® Tissue kolon toplama tüplerine alındı
8. Elde edilen karışım, 2 mL'lik toplama tüplerinin içine yerleştirilen QIAamp spin kolonlarına dikkatlice aktarıldı. Oda sıcaklığında olmak üzere 1 dakika 11,000 x g de santrifüj edildi
9. Santrifüj bitiminde filtrat içeren toplama tüpleri atıldı, spin kolonlar yeni ve temiz 2 mL'lik toplama tüplerinin içine alındı. Geçen volüm miktarı kontrol edildi ve filtreden geçmeyen bazı örneklerde santrifüj tekrarlandı
10. İlk yıkama: 500 µL Buffer BW kolona eklendi ve 1 dk 11,000 x g 'de santrifüj edildi. Geçen filtrat atıldı ve spin kolon toplama tüplerine geri koyuldu
11. İkinci yıkama: 600 µL Buffer B5 kolona eklendi ve 1 dk 11,000 x g 'de santrifüj edildi. Geçen filtrat atıldı ve spin kolon toplama tüplerine geri koyuldu

Bu aşamalarda bufferın filtratı geçmemesi durumunda santrifüj 1 kez daha tekrarlandı.

Membranın kurutulması ve elusyon aşaması

12. Bu aşamada spin kolonda etanolün iyice uzaklaştırılması için 1 dakika süreyle 11,000 x g'de santrifüj edildi Spin kolon DNA/RNAaz içermeyen 1.5 mL ependorflara aktarıldı ve 70 µL Buffer BE eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika süreyle bekletildi ve 1 dakika süreyle 11,000x g 'de santrifüj edildi ve işlem tekrarlandıktan sonra elde edilen ölçülmek üzere saklanmak için +4 °C'ye kaldırıldı

3.6.3.DNA miktarının ve kalitesinin belirlenmesi

3.6.3.1 Total Genomik DNA 'larSpektrofotometrik Analizi

Hücre hatlarından elde edilen genomik DNA örneklerinin konsantrasyonu NanoDrop cihazı ile ölçüldü. Herbir örnek için aynı seyreltme oranında üç farklı ölçüm yapıldı. Elde edilen değerlerin ortalaması alınarak DNA konsantrasyonu belirlendi.

Elde edilen genomik DNA (gDNA) örneklerinden miktar tayini (1) ve saflık derecesi (2) spektrofotometrede 260 ve 280 nm absorbans değerlerinde ölçüldü.

Bazı örneklerin DNA konsantrasyonları diğer sonuçlara yüksek olduğu için dilue edildi.

Bütün dilüsyonlar ve kalibrasyonlar, steril distile su ile gerçekleştirildi.

3.6.3.2 Genomik DNA'ların Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

İzole edilen DNA'ların kalite kontrolü ve PCR reaksiyonlarında kullanılabilirliğini kontrolü için

% 2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntülendi.

1. 1X-TAE tamponu içerisinde %2 agaroz içeren jeller hazırlandı.
- 2.Örneklerin yürütülmesi için mini jel yatağı kullanılmıştır. Midi jel için 3 gr agaroz tartılarak tartılarak 500 ml'lik erlen içersine alındı. Üzerine 150ml 1 X TAE tamponu ilave edilerek mikrodalga fırın içerisinde ısı yardımıyla çözüldü.
- 3.Çözünen 150 ml'lik agaroz karışımı el yakmayacak sıcaklığa kadar soğutulduktan sonra içersine PCR ürünlerinin görüntülenebilmesini sağlayan SafeView(ABM,G108) eklendi. Erlen hafifçe çalkalanarak SafeView %2'lik jel içerisinde homojen bir şekilde karıştırılmıştır.
- 4.Hazırlanan akışkan sıvı kıvamındaki jel yatay yatağı içersine herhangi bir kabarcık oluşumuna izin verilmeyecek şekilde yavaşça döküldü. Yükleme kuyularının oluşturulması için taraklar yatağa yerleştirildikten sonra jel oda sıcaklığında donmaya bırakıldı
- 5.Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkartılarak örneklerin yüklenmesi için elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın içersine 1X TAE tamponu jelin üzerini 1 cm geçecek şekilde ilave edildi.
- 6.Elektroforez ekipmanı yürütme için hazırlandıktan sonra örnekler kuyulara yüklendi. Jeller donduktan sonra her bir DNA örneğinden 1000ng alınarak 6x-yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyulara yüklenecektir.

Örneklerin yürütme için hazırlanması aşamasında 5 µl DNA örneği ile 6X Loading Dye'dan 1 µl alınarak karıştırıldı. Hazırlanan karışım kuyu üzerinde, TAE tamponu içersinde pipet yardımıyla yavaşça bırakılarak kuyu içersine yüklendi.

7. DNA ağırlık belirtecinin kuyuya yüklenmesinde 1µl 1Kb DNA belirteci Amresco,100bp DNA MW Marker, Cat. No: K180, 2µl yükleme tamponu ve 4µl steril su ile birlikte kuyulara yüklendi.

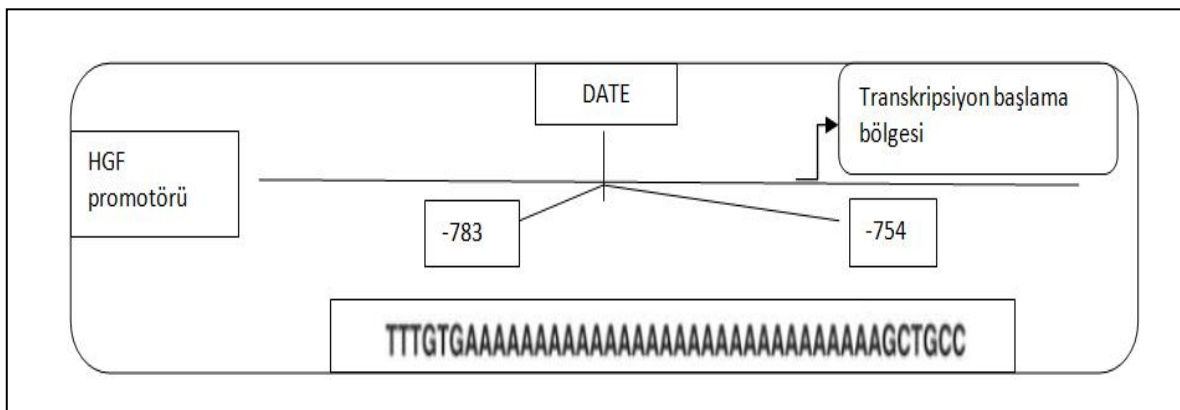
8. Jele yüklenen PCR ürünleri, jel tank sistemi güç kaynağına (Biorad PowerPac Basic) bağlandı. 80-120 V arası sabit gerilim ve 30-40mA arası akım koşullarında 100 bp DNA ağırlık belirteci ile birlikte % 2'lik Agaroz jelde ortalama 30-45 dakika süre ile jel 1x-TAE tamponu içeren elektroforez tankında negatif kutuptan (-) pozitif kutba (+) doğru yürütüldü

9. Yürütülen jeller ultraviyole ışığı altında nm'de translüminatör ile görüntülenecektir. Her bir örnek için DNA'nın tek bant şeklinde görülmesi şartıyla DNA kaliteli olarak kabul edildi

3.6.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

3.6.4.1.HGF gen promotör dizisinin eldesi

İnsan HGF geni promotörüne ait sekans dizisi Ökaryotik Promotör Databanka web sitesi epd. vital-it. ch/ 'den HGF-1 (ENSG00000019991) için esas alınmıştır.



Şekil 20:HGF deoksiadenozin bölge elementi (DATE) (J. Ma et al., 2009)

HGF promotör bölgesinde DATE bölgesi -783 ve -754 arasında yer alır.

```
>FP009727 HGF_1 :+U EU:NC; range -1500 to 100.
```

lower case upstream TSS

```
>FP009727 HGF_1 :+U EU:NC; range -1500 to 100.
```

```
ttccctgaaagtgggggtaagggagctggaggacaaatgaaggtggtatgtggaggggaag  
gctgttctgtggatgagtttaattcagccccacaatcacttctgtacagctaccaccgc  
tctagtcattcccacatttggcctgctttcttttctctgtggacaggggcaactgttctc  
tactaatatccatctcagagagatacaggggcaagtatccctcagcatccattagaaata  
aagcaggctcttgcttaaaagtaccagagcatccacctctgggtgcaaagacaaattctc  
tgaatcaagtgaaggggtctgggcaatgatctcacaaggatttgatacctaggagtgcccc  
catgccatacaagctcctcatctttccacttacactttgggaagctggctgtcgtgtac  
aggcagatgaagctggaaaagagaggcatattcagtactcacgaattcaaacagcttgag  
ggatttccggtgaaagtcagtcctaaccagtgatatacgtacatacacaccaacatgtgtg  
aatgtgttggtgtgcacgtgtgtgacctgtacaagtcacatggcataatttacctgtcaggg  
acaggctatggacaatgactgtttcttggactttctcttaaaaagtcagatcagacaagt  
ttattttgtatactttgggtaaatgtgtggtatctcgtgagtttggcagtttgtgaaaaa  
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagctgcctgctctgagcccatggggcaggggcaat  
tttttcatctgacaatctgcgtgcttttgttttgcttgcttattttggccccacaatacc  
acacccttttcttaactaacctctttctacctgggctggacgtgcctgggctctcctccc  
tggccccgctcccacctctcccaggctctctaaacccctagagaacctgtgtcagtgttt  
gaatccctcagttgctctagcaggaaaactagacagattaggagctggggcacatttggc  
tgaaagacagctcttcgctttcttcttatgctgcttccccttctcttttcccaaataga  
tatataaacacatgtattttcctgttttaaatgagcgaattgggtcccctgcctgtgcctt  
gatttagccattgggctcagccttgctcctcccttcttactcggataggagccactggg  
atctggagctccagcttccaaattgaagctggcctcaggccaggtgaccttttctttgta  
agtttctttcctaagcgtgggggttgggggggagggcggggaatggggggggttgaggatc  
tgtttgggtgctgttgaggggggggcgagtgaggaaaggagggggctggaagagagtaaag  
ggctgttggttaaacagtttcttaccgtaagaggaggttcagacctagatctttccagtta  
atcacacaacaaacttagctcatcgcaataaaaagcagctcagagccgactggctctttt  
AGGCACTGACTCCGAACAGGATTCTTTACCCAGGCATCTCCTCCAGAGGGATCCGCCAG  
CCCGTCCAGCAGCACCATGTGGGTGACCAAACCTCTGCCAG
```

Şekil 21:HGF geninde DATE bölgesini içeren baz dizilimi

3.6.4.2.Oligonükleotid Primerlerin Dizaynı ve Kontrolü

MET reseptörü olan HGF geninin ilgili promötör bölgesi deoksiadenozin element bölgesinde (DATE) DNA düzeyinde uzunlukta meydana gelen değişimlerin incelenmesinde PCR yöntemi kullanıldı. İnsan HGF geni promotöründe DATE bölgesinin çoğaltılması için primer dizaynında NCBI BLAST, Integrated DNA Technologies (IDT) Primer3 programları kullanıldı. Primer dizileri ve çoğalttığı ürün uzunluğu Tablo 3 'te gösterildiği gibidir. Bölgeyi çoğaltacak olan primerlerin dizilerde yerleşimi gösterilerek doğrulanması ise NCBI BLAST programı ve in silico PCR ile <https://genome.ucsc.edu/> sitesi kullanılarak yapıldı.

Tablo 3: Bölgeyi çoğaltmada kullanılan olan primer dizileri

Primer	5'-3'yönde Primer dizisi	bp Uzunluğu
İleri	F1:AGA GAG GCA TAT TCA GTA CTC	21
Geri	R1: AAC ACT GAC ACA GGT TCT CTA G	22

>[chr7:81770615-81771055](#) 441bp F: AAAGTCAGTCCTAACCAGTGT

R: TTTAGAGACCTGGGAGAGGT

AAAGTCAGTCCTAACCAGTGTATACGTACATACACACCAACATGTGTGAATGTGTTG
TGTCACGTGTGTGCCTGTACAAGTCCACATGGCATAATTTACCTGTCAGGGACAGGCTATGG
ACAATGACTGTTTCTTGGACTTTCTCTTAAAAAGTCAGATCAGACAAGTTTATTTTGTATACT
TTGGGTAAATGTGTGGTATTTTCGTGAGTTTGGCAGTTTGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAGCTGCCTGCTCTGAGCCCATGGGCAGGGGCAATTTTTTCATCTGACAATCTG
CGTGCTTTTGTGTTTGCTTATTTTGGCCCCACAATACCACACCCTTTTCTTAACCTAACCT
CTTTCTACCTGGGCTGGACGTGCCTGGGCTCTCCTCCCTGGCCCCGCTCCACCTCTCCC
AGGTCTCTAAA

.Şekil 22: Bölgeyi çoğaltacak olan primerlerin dizilerde yerleşimi

PCR reaksiyonu sonucunda dizayn edilen primerler dahil olmak üzere 440 bp'lık ampliconlar oluşturulacaktır.

3.6.4.3.Primerlerin eldesi ,çalışma için hazırlanması ve saklanması

- 1.Tasarlanan primerler in siliko PCR yöntemi ile kontrol edildikten sonra firmadan sipariş edildi ve sentezlenen oligonükleotidler HPLC yöntemi ile saflaştırıldıktan sonra liyofilize bir şekilde gönderildi.Çalışmada kullanılan primer dizileri Sentegen şirketi aracılığıyla elde edildi.
- 2.Liyofilize gelen tüm primerler firmanın gönderdiği konsantrasyon bilgisi doğrultusunda son konsantrasyonu 100 pmol/µl olacak şekilde firmanın önerdiği miktarda steril distile su eklenerek DNase ve RNase free steril distile su ile çözüldü.
- 3.Liyofilize primerler üzerine su eklendikten sonra iyice çözülmesini sağlamak için vortekslendi ve gece boyu +4 °C'de roller cihazında bekletildi.

4.PCR reaksiyonları için ise, 100pmol konsantrasyonundaki stok primerlerden 1:10 dilüsyon yapılarak optimizasyon sonrası uygun bulunan 10 pmol konsantrasyonunda çalışma primerleri oluşturuldu.

5.Hem stok, hem de çalışma konsantrasyonundaki primerler -20°C’de saklanarak, PCR reaksiyonundan önce primerler oda sıcaklığına getirilip çözülerek kullanıldı.

3.6.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) sıcaklık optimizasyonu

HGF geninin promotör bölgesi için sentezlenen oligonükleotid primer çifti için reaksiyonun verimliliği ve özgüllüğünü arttırmak için “annealing” sıcaklık değeri ile öncelikle optimizasyon çalışmaları yapıldı. Her bir primer çifti için firmanın önerdiği çalışma sıcaklıkları ile çoğaltmada kullanılan özelliği enzim (NEB) <http://tmcalculator.neb.com/#/> adresinden annealing bağlanma sıcaklığı hesaplayıcısı ile primerler için önerdiği teorik bağlanma sıcaklıkları göz önüne bulundurularak reaksiyon çalışma sıcaklıkları belirlendi.

Yapılacak optimizasyon deneyi için her sıcaklıkta PCR reaksiyonu 20 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Sekansa gönderilecek ikinci PCR reaksiyonlarında ise her örnek için reaksiyon 80 µl olarak kurulmuştur.

Ana-karışım içerisinde kullanılacak stok malzemeler şu şekildedir:

5x-Q5 PCR buffer(NEB)

10 mM d NTP karışımı (İnvitrogen,610277)

10 pmol gen bölgesi için spesifik primer çifti

5 unit/ul High Fidelity DNA polimeraz(NEB)

Moleküler biyolojik düzeyde dH₂O

PCR optimizasyonu reaksiyonunda örnek sayısına göre ana-karışım (mastermix) hazırlandı.

Tablo 4: Optimizasyon öncesi 20 ul volum için reaksiyonda önerilen bileşen miktarları

Komponentler	İlk Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	20 µl için enzim kitinde önerilen reaksiyon bileşenleri
Q5 Buffer	5X	1x	4ul
dNTP Karışımı	10mM	0.2 mM	0.4 ul
İleri Primer	10pmol/ul	0.5 pmol/ul	1ul
Geri Primer	10pmol/ul	0.5pmol/ul	1ul
High Fidelity DNA Polimeraz	5U/ µl	1U/ul	0.2ul
DNA		1000ng/ul	

Tablo 5: HGF'nin PCR ile amplifiye edilen promotörüne ait primerlerin termal PCR profili

HGF promotör bölgesi için enzim-primer için uygun termal profil						
Basamak	Süre	Annealing °C				
Denatürasyon	30sn	98° C				
Döngü sayısı x 35						
Denatürasyon	10sn	98° C				
Annealing	30 sn	58° C	59° C	60°C	61°C	62°C
Extension	30 sn	72° C				
Final Extension	2 dk	72° C				

3.6.4.5.Optimizasyon ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi

İnsan kaynaklı periferik kan genomik DNA'larından aynı primer çiftleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri pozitif kontrol olarak kullanıldı. PCR reaksiyon tüpleri içine genomik DNA (kalıp) konmadan elde edilen PCR ürünleri negatif kontrol olarak kullanıldı. PCR çalışmaları sıcaklık döngü düzenleyicisinde (Thermal Cyler) gerçekleştirildi. Optimizasyon reaksiyonu sonucunda “annealing” sıcaklığı en uygun şekle sokma koşulları derecelendirme yapılarak oluşturuldu.

Merkez sıcaklık 60⁰C alınarak merkezin sağında ve solunda bulunan kuyularda farklı sıcaklık koşulları oluşturuldu. Optimizasyon için PCR reaksiyonları kurulduktan sonra elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezine yüklenerek görüntülendi. PCR reaksiyonu ile elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel elektroforezinde, 100V akım altında, yaklaşık 1 saat yürütüldükten sonra görüntülendi (). Bant kalınlıkları, 100 bp'lik DNA marker (MBI Fermentas, Catalog No. SMO243, 100-bp DNA ladder) ile karşılaştırıldı Tüm denemeler sonunda tek bir keskin bant veren non-spesifik bant içermeyen PCR reaksiyon koşulları optimum olarak kabul edilip ve sonraki basamaklarda bu sıcaklık kullanıldı.

3.6.4.6. HGF promotörünün tüm hücre hatlarında çoğaltılması

HGF geninin promotörü optimize edilen içerik ve termal döngü koşulları ile çoğaltılmıştır. Her bir örnekten izole edilen uygun saflıkta ve konsantrasyonda olan kalıp DNA için HGF promotör bölgesinin reaksiyonu yapılmıştır. Optimize edilmiş sıcaklık koşulunda PCR reaksiyonu 80 µl hacimde oluşturuldu. 80 µl'lik bir PCR reaksiyonu için kullanılacak malzemelerin son konsantrasyonları Tablo 6 'daki gibidir. PCR reaksiyonu termal cyclers cihazında gerçekleştirildi

Tablo 6: HGF geni promotörünün optimize edilen PCR bileşenleri ve termal profili

Bileşenler	Miktarı	HGF promotör bölgesi için enzim-primer için uygun termal profil		
Q5 Buffer	16 ul	Basamak	Süre	Annealing ⁰ C
d NTP karışımı	1,6 ul	Denatürasyon	30sn	98 ⁰ C
İleri primer	4 ul	Döngü sayısı x 35		
Geri primer	4 ul	Denatürasyon	10sn	98 ⁰ C
High Fidelity DNA Polimeraz	0.8 ul	Annealing	30 sn	59 ⁰ C
DNA	Her örnek için farklı	Extension	30 sn	72 ⁰ C
d H2O	Her örnek için farklı	Final Extension	2 dk	72 ⁰ C
Total volüm	80 ul	Hold	∞	+4 ⁰ C

PCR reaksiyonu için 0.2 µl'lik DNase ve RNase free steril PCR tüpleri kullanıldı. Reaksiyon kurulurken kalıp ve su haricinde diğer komponentler karışım halinde hazırlanıp toplam hacimde gerekli miktarlarda dağıtıldı. PCR hazırlanışı esnasında gerekli olan komponentler soğuk blok üzerinde tutuldu.

- 1.PCR reaksiyonu kurulurken ilk olarak tüplere reaksiyonda her örnek için geçerli miktarda su dağıtıldı ardından her bir tüpe kalıp DNA eklendi.
- 2.Bu işlem tamamlandıktan sonra tabloda belirtilen miktarlarda örnek sayısı için gerekli PCR karışımı hazırlandı.Kontrol olarak DNA içermeyen dH₂O eklenmiş PCR karışımı kullanıldı
- 3.Geçerli örnek sayısı için ana-karışım hazırlandıktan sonra 0.2 ml hacimdeki PCR tüpleri içerisine eşit olarak dağıtıldı, her bileşen tüplere eklenmeden spin yapıldı.
- 4.Karışım hazırlanırken en son olarak Taq Polimeraz eklendi. Ardından yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı. Homojenize edilen PCR karışımı tüplere dağıtıldı. Her bir tüpe PCR karışımı dağıtıldıktan sonra elde edilen son karışım köpürtülmeden iyice pipetaj yapıldı.
5. Tüpler “Thermal Cycler” cihazına zaman kaybedilmeden yerleştirilerek primer çiftine göre optimize edilen koşullarda PCR reaksiyonu başlatıldı.
6. Programlanan döngü bittikten sonra tüpler cihazdan alınarak +4 °C’de saklandı.

3.6.4.7. HGF geni promotörünün DATE bölgesini içeren PCR ürününün saptanması

HGF geninin ilgili bölgesi belirlenen koşullar ile çoğaltıldıktan sonra aşağıda belirtilen şekilde % 2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve değerlendirildi.

- 1.Bunun için 12.5 µl PCR örneği 2.5 µl 6X-yükleme tamponu ile karıştırılıp ve elde edilen 15 µl'lik örnek %2 konsantrasyonda daha önceden dökülen agaroz jellerin kuyularına yüklendi.
2. Bütün örneklerin en başına da uzunlukları bilinen ticari belirteç DNA örneğinden yükleme yapıldı.
3. Agaroz jel 1X-TAE tamponu içerisinde 100 V'da 60 dk yürütülerek bantların açılması sağlandı.
4. Yürütme işleminin sonunda jeller UV-transilluminatör altında incelendi ve PCR ürünlerinin bant verip vermediği, ayrıca bandın belirteç DNA'ya göre doğru büyüklükte olup olmadığı kontrol edildi. Yürütülen PCR örnekleri UV ışık (312 nm) altında transilüminatörle (Vilber lourmat) nitel olarak incelendi.

3.6.5 PCR ürünlerinin Sekanslama Analizleri

3.6.5.1 PCR sonrası DNA dizi analizleri (sekanslama yöntemi ile nükleotid değişimlerinin belirlenmesi):

- 1.HGF geninin promotor bölgesinin taranması için DNA dizi analizi yöntemi kullanıldı. Bu genlere ait taranacak bölgeler spesifik primer çiftleri ile yukarıda PCR reaksiyonları kısmında anlatıldığı gibi çoğaltıldı. Dizi analizleri her iki yönde yapıldı ve bu amaçla PCR amplifikasyonunda kullanılan ileri ve geri primerler kullanıldı.
- 2.Örneklerin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi sonrasında intakt bantları olan örneklerin 20ul'si ileri primer 20 ul geri pimer için dizilemede kullanıldı.
3. 96 well plate kuyucukları içine örneklerden her bir kuyucukta 20 ul olacak şekilde her iki primer için eklendi. Düz kapaklı stripler yardımı ile platede örnek bulunan kuyucuklar kapatıldı.
- 4.PCR ürünleri için gerekli primerler 10m M konsantrasyonda ayrı ependorfta hazırlandı
- 5.Örnekler “Triogen” firmasının Almanya'ya ile gönderildi ve bu gönderim, saflaştırma ve dizi analizi hizmet alımı ile karşılandı. Her gönderilen PCR ürünü için firma tarafından ilk önce saflaştırılma işlemi gerçekleştirilmesi istendi.
- 6.Dizi analizleri, her iki yönde yapılmıştır ve bu amaçla PCR amplifikasyonunda kullanılan ileri ve geri primerler kullanılmıştır Her bir örneğin dizilemesi hem ileri (forward) hem de geri (reverse) yönde olmak üzere iki kez kontrollü olarak yinelendi
- 7.Örneklerin Almanya'ya gönderiminden sonra, 2 hafta süre içerisinde, firma tarafından elektronik posta yolu ile sekans sonuçları ve kromatogramlar gönderildi. Sonuçlar; ab1,fas,seq formatlarında gönderildi. Dizi analizi için sırası ile aşağıdaki yöntemler uygulandı.
- 8.Dizi analizi sonuçlarının “pik” değerleri incelenerek güvenilir olduğu kontrol edildikten sonra elde edilen dizilerin her biri referans dizileri ile karşılaştırılarak nükleotid eksikliği olup olmadığı (delesyon mutasyonu) değerlendirildi.
- 9.Değişim görülen örnekler doğrulanması için 2. Kez dizilendi. Ayrıca dizileme sonucunda tam olarak okunmayan ve kromatogramı üzerindeki piklerde karşıklık olan örnekler bulunduğu da bu örnekler yeniden dizilendi

3.7. Araştırma planı ve Takvimi

Tablo 7:Araştırma planı ve takvimi

ARASTIRMA BASAMAKLARI	1. ay	2. ay	3.ay	4. ay	5. ay	6. ay	7. ay	8.ay	9.ay	10.ay	11.ay	12.ay
Hücre kültürü	X	X										
DNA izolasyonu			X	X								
Primerlerin optimizasyonu				X	X	X						
PCR reaksiyonları						X	X	X	X			
Sekans analizi ile mutasyonların belirlenmesi ve									X	X	X	
Saptanan değişikliklerin mevcut veri tabanından araştırılması											X	X
Tez yazımı											x	x

3.8. Verilerin değerlendirilmesi

Sekanslar arasındaki homoloji, National Center for Biotechnology Information (National Institute of Health) BLAST network service kullanılarak değerlendirildi. Sekanslar, referans sekanslar ile Multalin version 5.4.1 software programı kullanılarak karşılaştırıldı (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>).

1. Her örneğin gelen sekans sonuçları, "NCBI/Blast" veritabanı kullanılarak tüm genom dizisi ile karşılaştırıldı ve istenilen bölgenin PCR ile çoğaltılıp çoğaltılmadığı doğrulandı.

2. Bu işlem için FASTA formatında gelen dizi ve www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi internet adresi kullanıldı. Nükleotid düzeyinde yapılan bu karşılaştırma işlemi ile delesyon olup olmadığının saptanması sağlandı.

3. Gelen kromotogram sonuçlarının analizleri için “Mutat ion Surveyor V3.30 (35-Day Trial)” programı kullanıldı. Programa bir seferde 40 örnek birden yüklendi ve bu işlem tüm sekans sonuçları için tekrar edildi. Analizler, program yardımıyla ve göz ile kontrol edilerek gerçekleştirildi. Gelen kromotogram sonuçlarının analizini sağlayan “ChromasPro Version 1.34” programı kullanıldı. Kromotogram görüntülerindeki piklerin göz ile tek tek kontrol edilmesi, heterozigot baz değişimlerinin bulunması sağlandı. Bu yöntem ile heterozigot baz değişimleri yakalanırken, homozigot baz değişimlerini gözden kaçırmamak için blast işlemi de mutlaka yapıldı

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

Çalışmamızda invitro tipte olduğu için HGF mutasyonu incelenmesi amacıyla hepatoselüler karsinoma, bir adet normal karaciğer hücre hattı, iki adet sorafenib direnç geliştirilmiş kanser hücre hattı kullanılmıştır. HGF'nin dokulardaki mutasyon durumunun sekresyonu ile ilişkisinin incelenmesi daha ayrıntılı bilgi verebilir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu 30.06.2016 tarih ve 2795 -GOA protokol numaralı 2016/18-19 karar ile çalışmamız etik açıdan uygun görülmüştür

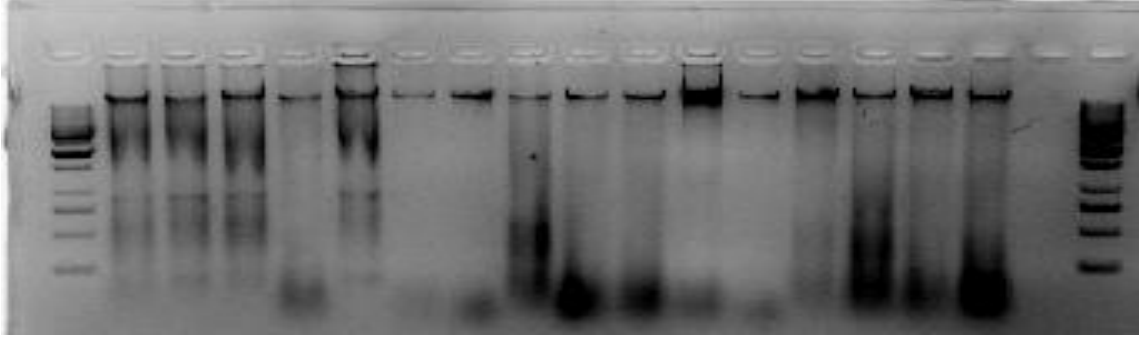
4. BULGULAR

4.1.DNA konsantrasyonu ölçüm sonuçları

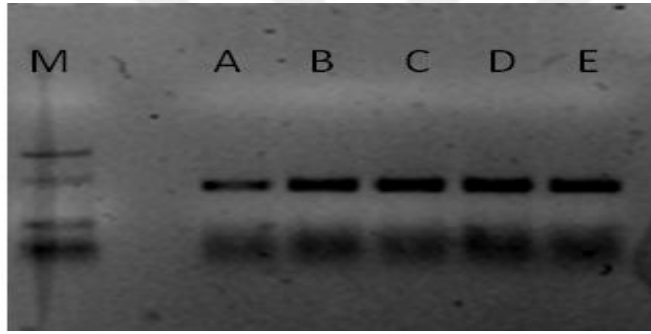
Tablo 8: Hücrelerin genomik DNA konsantrasyonları

Hücre dizisi	Konsantrasyonu
Mahlavu	353.2 ng/ul
Hep3B	340.5 ng/ul
Snu423	240.7 ng/ul
Snu449	833.3 ng/ul
Snu182	250.5 g/ul
Snu475	266.7 ng/ul
Snu387	447.5 ng/ul
Snu398	526.4 ng/ul
PLC	372.9 ng/ul
Sk Hep-1	478.3 ng/ul
Huh-7	316.3 ng/ul
Focus	660.3 ng/ul
Hep 40	301.9 ng/ul
HepG2	480.0 ng/ul
THLE-2	246.0 ng/ul
Sorafenib dirençli Huh-7	243.7 ng/ul
Sorafenib dirençli Mahlavu	510.6 ng/ul

4.2. Elde edilen genomik DNA ların agaroz jel görüntüsü



Şekil 23: Elde edilen genomik DNA ların agaroz jel görüntüsü

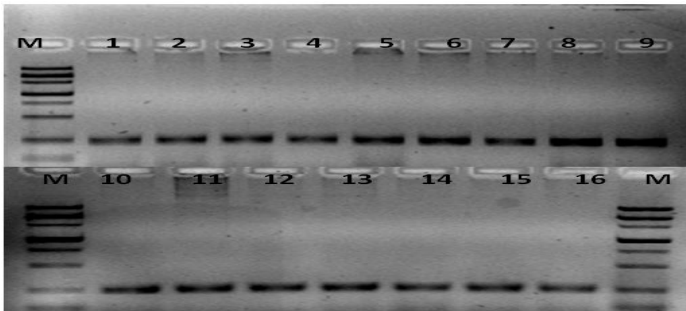


- | |
|--|
| A. Annealing Sıcaklığı 58 ⁰ C |
| B. Annealing Sıcaklığı 59 ⁰ C |
| C. Annealing Sıcaklığı 60 ⁰ C |
| D. Annealing Sıcaklığı 61 ⁰ C |
| E. Annealing Sıcaklığı 62 ⁰ C |

Şekil 24: HGF geni promotörünün “annealing” optimizasyon deneyi jel görüntüsü

. Yapılan optimizasyon çalışması ile ürünlerin sekanslama reaksiyonu sıcaklık aralığı için en uygun 58 ⁰C “annealing” belirlenmiştir.

4.3. Tüm hücre hatlarında HGF Geni promotör bölgesinin amplifikasyonu



Şekil 25: Örneklere ait promotör bölgesinin jel görüntüsü

- | |
|-----------|
| Marker |
| 1:Mahlavu |
| 2:Hep3B |
| 3.Snu 423 |
| 4.Snu 449 |
| 5.Snu 182 |
| 6.Snu 475 |
| 7.Snu 387 |
| 8.Snu 398 |
| 9.PLC |

- | |
|--------------------------|
| Marker |
| 10:SkHep-1 |
| 11:Huh-7 |
| 12:Focus |
| 13:Hep 40 |
| 14:Hep G2 |
| 15: Sor dirençli Huh 7 |
| 16: Sor dirençli Mahlavu |

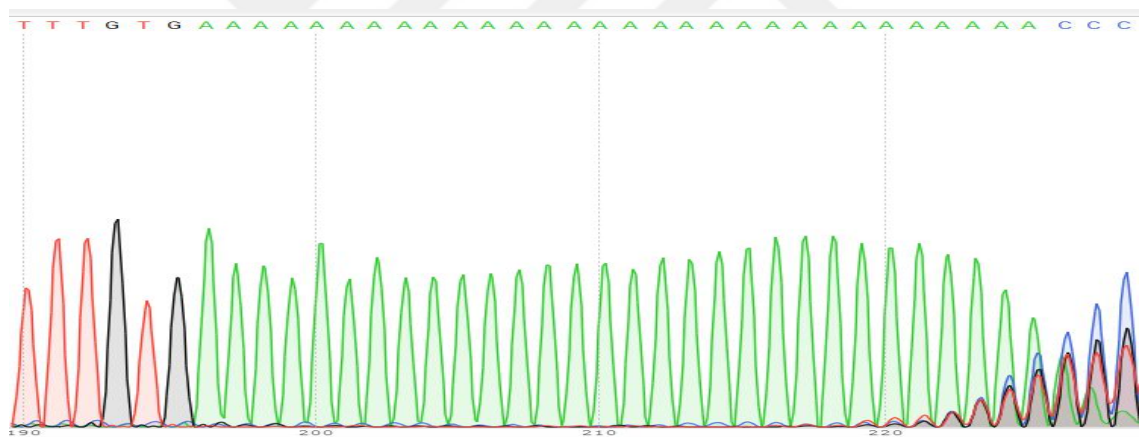
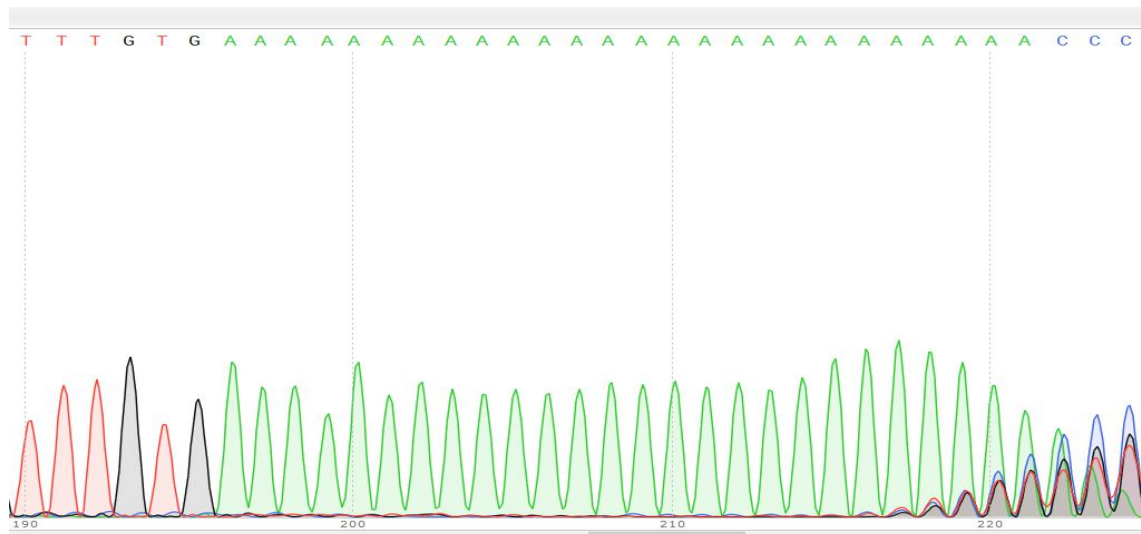
4.4. DNA Dizi Analizi Verilerine ait bulgular

4.4.1. HGF gen promotöründe bulunan DATE bölgesi insan hepatoselüler karsinoma hatlarında delesyon mutasyonu varlığının incelenmesi ve ekspresyona etkileri

Tablo 9: Hücre hatlarındaki DATE uzunluğu

<u>Hücre Adı</u>	<u>DATE</u> <u>uzunluğu</u>	<u>Hücre Adı</u>	<u>DATE</u> <u>uzunluğu</u>
Mahlavu	26	Sk-Hep-1	26
Hep3B	26	Huh -7	29
Snu423	29	Focus	27
Snu449	29	Hep 40	26
Snu182	28	HepG2	28
Snu475	27	THLE-2	26
Snu387	30	Sorafenib dirençli Huh-7	26
Snu398	29	Sorafenib dirençli Mahlavu	28
PLC	28	İnsan Genomik DNA	28

Atasal ve sorafenibe dirençli Huh-7 ve Mahlavu arasında herhangi önemli fark gözlemlenmemiştir HGF ekspresyonu bu hücrelerde yüksek olduğu gösterilmesine rağmen bölgeduzunluğu 25 Adenin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu kısa DATE varlığı ile yüksek ekspresyon seviyeleri nie neden olmadığını göstermektedir. Bu nedenle bu hücrelerde bu bölgede metilasyon seviyelerinin farklı olması ile açıklanabilir. HGF de bulunan metilasyon farklılıkları ve metilasyon seviyeleri ileride çalışılması ön görülmektedir.



5.TARTIŞMA

Hepatoselüler karsinoma tipik olarak inflamasyon ile başlar ve hepatositlerin invazif karsinomaya dönüşmesi aşamalı şekilde meydana gelir. Bu aşamalar esnasında moleküler anormallikleri ve kromozom değişiklikleri de eşlik eder.(Marks & Yee, 2016) Tümör mikroçevresi, tümör başlaması, ilerlemesi, metastazında ve tedavi direncinde rol oynamaktadır. Kanser hücreleri bazı spesifik onkogenlere bağımlıdır ancak tümör stroması tarafından sağlanan sağkalımda öncü olan sinyallere de ihtiyaç duyar, tümör mikroçevresi bu nedenle tedavide önemli bir hedeftir. Hastaların çoğunda, HCC'nin erken tanısı yapılamadığından tümör tamamen rezekte edilememektedir, bu nedenle tedavide kemoterapötik ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak hepatoselüler karsinoma hücreleri, kemoterapötik ilaçlara direnç göstermektedir. Diğer solid tümörlerde olduğu gibi, HCC gelişiminde de genetik değişiklikler önemlidir. Hepatoselüler karsinomada birçok genetik değişiklik mevcuttur ve heterojenite nedenidir. Tümörde heterojenite olması karsinogenez sürecinin anlaşılmasını güçleştirir. Hastalarda genetik değişikliklerin ne olduğunun bilinmesi spesifik hedefe yönelik tedaviler için önemlidir. Tümörde öncü rol oynayan moleküler mekanizmalar oldukça komplekstir; genetik ve epigenetik değişiklikler birlikte rol oynar.(Niu, Niu, & Wang, 2016) HGF/MET sinyali embriyogenezde, organogenezde, yara iyileşmesinde doku tamirinde kritik role sahiptir, aynı zamanda epitelyal mezenkimal geçişte rol alır. HGF veya MET hasarı farede embriyonik dönemde letalite nedenidir. HGF/METsinyali konstitutif aktif olduğunda kanser hücresinde sağkalım ve çoğalma kanserleşme lehine olur ve metastatik yayılım başlar, bu nedenle tümör hücrelerinde aktif HGF/MET sinyali varlığı kötü bir prognoz bulgusudur, tümör agresifliği ve tedavi direncine yol açar (Owusu, Galembo, Janetka, & Klampfer, 2017) Tümör gelişiminde genetik ve epigenetik değişimlerin çoğunluğu bu kodlayıcı olmayan bölgede birikmektedir. Enhancer, promotör bölgeler ve kromatin etkileşimlerinin olduğu bölgeler kodlayıcı olmayan genomu oluşturur. Cis düzenleyici elementlerin kanserde anormal gen ekspresyonu ile ilişkili genetik epigenetik değişikliklerin hedefi olduğu gösterilmiştir(Villanueva, Hernandez-Gea, & Llovet, 2012). Promotör veya enhancer gibi düzenleyici bölgelerde fonksiyonel mutasyonlar oluşması, transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi oluşturabilmekte veya tersi olarak bağlanma bölgelerini bozabilmektedir.

Bunun dışında translokasyon, delesyon, insersiyon veya duplikasyon gibi yapısal anormallikler olması halinde düzenleyici elementler ve kontrol ettikleri kodlayıcı bölgeler arasında etkileşimler değişebilmektedir. (Diederichs et al., 2016)

Çalışmamızda bu nedenle hepatoselüler karsinoma gelişiminde öneme sahip HGF/c-Met sinyalinin liganda bağımlı aktivasyonunda HGF geninin transkribe olmayan bölgesindeki yapısal değişikliklerin dolayısıyla anormal ekspresyonunun kanser gelişiminde ilgisi olabileceği fikrinden yola çıkıldı.

Poli adenin dizi tekrarı insan genomu boyunca çok miktardadır ve bir çok gende düzenleyici element olarak veya kodlayıcı dizilerin yapısal elemanı olarak mevcuttur.(Matsumoto, Funakoshi, Takahashi, & Sakai, 2014) İlk olarak 2009 yılında yapılan bir çalışmada HGF ekspresyonun regülasyonunda baskılayıcı iş gören elementi HGF transkripsiyon başlama bölgesinin 750 bp yukarısında yer alan 30 adet deoksiadenozin tekrarı olan bölgedir. DATE veya deoksiadenozin kuyruk elementi olarak tanımlı bu bölgenin meme kanserinde promotör mutasyonları ve kanser gelişimi açısından kritik bölge olduğu gösterilmiştir(Ma et al., 2009) 2011 yılında Graziano ve arkadaşları gastrik kanserde bu mutasyonun rolünü incelemiştir.MET kopya sayısında artış küçük hücreli olmayan kanserde yıkıcı etkilere sahiptir.Dolayısıyla MET inhibisyonu kansere karşı geliştirilen ilaçların hedeflerinden biri olma özelliğindedir.MET aktivasyonunun sadece gen kopya sayısı artışı nedeniyle olduğu veya HGF DATE mutasyonu birlikteliği nedeniyle daha agresif bir tümör fenotipi geliştiği ve kötü prognoz görüldüğü sorusunu akla getirmiştir.HGF promotöründeki deoksiadenozin tekrar elementinde mutasyon sonucu kısalmanın rolü olup olmadığı parafine gömülü hasta dokularından elde edilen genomik DNA aracılığıyla incelenmiştir (Graziano et al., 2011)HGF yüksek ekspresyonu olması mesane kanseri hastalarında da sağkalımı etkilediği için HGF DATE bölgesinin kanser gelişimindeki etkisi tümörlü dokularda HGF mRNA düzeyi ve DATE varyantlarının etkisi hastalardaki periferik kan lenfositlerinde incelenmiş, (Chiba et al., 2014)Multiple myeloma (MM) hastalarında HGF düzeyleri hastaların %50' sinde kan ve kemik iliğinde yüksek bulunmaktadır ve kötü prognozla ilişkili olması nedeniyle HGF aşırı ekspresyonunun yükselmesinde bu mutasyonun etkili olup olmadığı kemik iliği aspiratlarından elde edilen CD138⁺ hücrelerinde incelenmiştir (Rampa et al., 2014)

Sakai ve arkadaşları ise DATE bölgesinin mutasyonunun etkilerini insan kaynaklı küçük hücreli olmayan akciğer kanseri,mide,kolorektal,pankreas,kolon,hepatoselüler karsinoma,meme kanseri,glioma,prostat karsinoma ve mezotelyoma kökenli kanser hücre hatlarında HGF ekspresyonu ile birlikte ilişkisi incelenmiştir.(Sakai et al., 2015)

Kanser hücrelerinde otokrin olarak HGF üretimi sık görülen bir durum değildir, yaygın olan durum stromal hücreler olan kanser ilişkili fibroblastlarca HGF üretilmekte ve MET aktivasyonunu parakrin yolla aktive etmesidir.(Owusu et al., 2017) Kolorektal kanser genomik instabilite sık görüldüğü bir kanser türüdür. HGF geninde proksimal promotöründe represör görevi olan DATE bölgesinde DNA mismatch tamir (MMR) bozuklukların bir hedefi olup delesyona uğramakta dolayısıyla DATE (DeoxyAdenosine Tract Element) elementi HGF promotöründe kısalmakta, normalde kolon epitelinde sessiz olan promotörün aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu nedenle HGF-Met sinyali otokrin şekilde meydana gelmektedir. Böylelikle kanser hücrelerini çoğalmaya yönelik desteklemekte, sağkalımını güçlendirmekte aynı zamanda programlı hücre ölümüne karşı direnç kazandırmaktadır.(Seneviratne et al., 2015)

Önceki çalışmaların ışığında hepatoselüler karsinomada HGF ekspresyonu yüksek olması ve prognozu kötüleştirilmesi HGF ekspresyonunun artışında promotör bölgesinde DATE bölgesinin kısalmasının kanser gelişimi ile nasıl ilişkili olduğu dolayısıyla otokrin aktivasyona neden olup olmadığı sorularını aydınlatmak amacıyla elimizde mevcut hepatoselüler karsinoma hücre hatlarında invitro olarak mutasyonun varlığını inceledik.Hücre hatlarının bazılarında HGF otokrin aktivasyonu söz konusu iken ,ayrıca sorafenib duyarlılığına etkisi olup olmadığını da göstermek için sorafenib direnci geliştirilmiş iki hücre hattında bu mutasyon varlığını inceledik.

DATE bölgesi HGF promotöründe mekanik şekilde etkili olmaktadır.Poli Adenin (dA) bölgeleri nükleozom formasyonunu etkileyerek transkripsiyonu regüle edebilmektedir.Bu bölge normalde 30 Adenin tekrarına sahiptir.Ancak normalden daha uzun tekrarlar olan 31,41 ve 69 adenin uzunlukta olması histon oktamerlerinin daha sıkı paketlenmesine yol açmakta dolayısıyla promotör bölgelerine ulaşılabilirliği zorlaştırmaktadır.

30 Adeninden daha kısa olması(17 Adenin gibi)promotör bölgeye transkripsiyon faktörlerinin ulaşması ve etkileşimini mümkün kılması nedeniyle transkripsiyon hücrede sessiz iken aktif hale geçmesine yol açmaktadır.16 Adeninden oluşan DATE elementi histon DNA etkileşimlerini stabilizasyonunu azaltıp DHA hedef bölgelerini ulaşılabilir hale getirmektedir.(Ma et al., 2009) HGF geni sıkı bir regülasyon altındadır ve normal koşullarda hepatosit, safra kesesi epiteli gibi hücrelerde genelde kalıcı şekilde sessizleştirilmiştir. İto veya stellat hücreleri gibi karaciğerin stromal komponent elemanları ve endotelial hücreleri tarafından transkribe edilir. HGF ekspresyonu, mezenkimal hücrelerde, ekstraselüler uyarıcılardan olan sitokin ve hormonlarca aktifleştirilir, regülasyonu esasen transkripsiyonel seviyededir. HGF, bazı epitelyal tümörlerde ve karaciğer sirozu gibi durumlarda anormal şekilde ekprese olur (Role & Hepatic, n.d.) Sirküle tümör hücreler, epitelyal mezenkimal geçişte rol oynamaktadır ve HGF ile indüklenebilme özelliğindedir Fare hepatoselüler karsinoma modelinde periferik kanından sirküle tumor hücre hattında HGF ve c-Met düzeyleri incelendiğinde primer tümör hücrelerinden çok daha yüksek ekprese olduğu gösterilmiştir (Ogunwobi et al., 2013) HGF promotörü IL-1 alfa ve 1Beta IL-6, IL-8 ve interferon- γ ile uyarılması sayesinde doku tamirinde enflamasyon aracılı rol oynar. HGF promotörü cis elementler içerir bu elementlerin transkripsiyon faktörleri ve diğer uyarıların bağlanması ile düzenlenir ve HGF ekspresyonu artar veya azalır. (Mungunsukh et al., 2014)

Çalışmamızda HGF promotöründeki değişiklikleri başta otokrin HGF aktivasyonu yüksek olan PLC ,Snu 398,Hep 3B ,Snu 182 ve Snu 387 hücrelerinde ,otokrin HGF aktivasyonu bulunmayan Mahlavu, Snu-423, Snu-449, Snu-475, Sk-Hep-1, Huh-7, Focus, Hep-40, Hep-G2,normal karaciğer epitel hücresi olan THLE-2 hücrelerinde ve sorafenibe direnç geliştirilmiş olan Huh-7 ve Mahlavu hücre dizilerinde inceledik. Sorafenib direnç geliştirilmiş olan Mahlavu ve Huh-7 hücre hatlarında atasal hücre hattından farklı uzunlukta olduğunu saptadık. Otokrin HGF aktivasyonu yüksek olduğu bilinen hücrelerden PLC ve Snu 398, Hep3B, Snu 182, Snu 387 hücreleri ele alındığında hücrelerde bu bölge uzunluğu atasal DATE uzunluğu olan 30 tekrardan daha kısa bulundu.

Ma ve arkadaşları sağlıklı bireylerde kısa DATE uzunluğu olarak bildirdiği 25 Adenin veya daha az sayıda tekrarı varlığının Afrikadaki Amerikalı bireylerde sıklığını %26 olarak bildirmiştir.(Ma et al., 2009)Chiba ve arkadaşları ise HGF DATE uzunluk dağılımının etnik farklılıklar nedeniyle değiştiğini ve mesane kanserinde nasıl rolü olduğunun bilinmesi için büyük çaplı popülasyonlarda gen çevre etkileşiminin nasıl etkilendiğinin bilinmesi için epidemiyolojik çalışmalar yapılması gerekliliğini bildirmiştir(Chiba et al., 2014)Graziano ve arkadaşları ise gastrik kanserde MET kopya sayısı artışı veya HGF DATE bölgesinde kısılmanın daha agresif kanser tipine dönüşmesi ,kötü prognoz ve hastalığın ilerlemiş döneminde palyatif kemoterapi alan hastalardaki peritoneal yayılım da rolüne yönelik incelemiştir.MET aktivasyonunun DATE bölgesinde kısılma ile kooperasyon içinde peritoneal yayılıma neden olabileceğini öne sürmüştür. Ancak HGF seviyelerinde artışın multipl ve stabil sinyalleri indükleyerek tümör agresifliği ve kötü prognoza global etkili olabileceği konusunda tartışmalı olarak kalmakta olduğunu bildirmiştir (Graziano et al., 2014) Rampa ve arkadaşları ise DATE bölgesinin yüksek düzeyde polimorfik olduğunu ve delesyon mutasyonu gelişmeye eğilimli bir bölge olarak bildirmiştir.DATE uzunluğu HGF serum konsantrasyonu veya HGF m RNA seviyeleri ile ilişkisi incelendiğinde herhangi bir korelasyon gösterilememiştir.Bu nedenle önceki çalışmalarda 5 Adenozin veya daha fazla sayıda adenin delesyonu olmasının negatif regülasyona etkisini kaybetmesi bulguları ile zıtlık göstermiştir.Bununla birlikte çalışmanın güç analizi örnek sayısının kısıtlı olması nedeniyle test edilmesi gerekliliği bildirilmiştir.(Rampa et al., 2014)

Sakai ve arkadaşları ise HGF promotöründeki poli Adenin bölgedeki delesyon polimorfizmine akciğer ,mide ,kolorektal,pankreas ve mezotelyoma hücrelerinde saptamıştır. Kısa DATE içeren hücreler HGF yüksek oranda eksprese ederken normal DATE bulunan hücrelerde HGF ekspresyonu normaldir.Bu veriler Ma ve arkadaşlarının meme kanseri çalışmasındaki bulguları ile uyumlu olmakla birlikte bazı hücre hatlarında bunun tersi durum söz konusudur.Bazı hücre hatlarında kısa DATE yapısı olmasına rağmen HGF ekspresyonu düşük olduğu bulunmuştur(Sakai, Takeda, & Okamoto, 2015). Sirküle tümör hücreler, epitelyal mezenkimal geçişte rol oynamaktadır ve HGF ile indüklenebilme özelliğindedir. Fare hepatoselüler karsinoma modelinde periferik kanından sirküle tumor hücre hatları izole edilmiş ve bu hücrelerdeki HGF ve c-Met düzeylerinin, primer tümör hücrelerinden daha yüksek ekprese olduğu gösterilmiştir.

C-Met promotörü ve HGF promotörünün epigenetik analiz edilmiş ve bu hücrelerde DNA metilasyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir. Metilasyon miktarı ile c Met ve HGF ekspresyonlarının artışı arasında paralellik olduğu gösterilmiştir(Ogunwobi et al., 2013)Bu çalışmayı destekleyici olarak hücre hatlarında düşük HGF ekspresyonunun nedeninin HGF promotöründe intron 1 polimorfizm veya metilasyonları nedeniyle olduğu ilk kez gösterilmesi nedeniyle kritik önem taşımaktadır.(Sakai et al., 2015)

Ueda ve arkadaşları da prostat kanserinde benzer bulguları ortaya koymuştur. PAX2, HGF geninin yukarısında olup HGF geni promotörünü histon 3 H3de asetile edip HGF geni ekspresyonunu arttırarak yapar. HGF promotöründe – 637 ve – 314 arasındaki bölge konsensus PAX2 bağlama dizilerini içerir ve bölgede delesyon nedenli mutasyon olduğunda bölgede delesyon olduğunda HGF geninin PAX2 ile promotör aktivasyonu bozulmaktadır ve HGF promotörünün aktivasyonu azalmaktadır. Bu bölgede PAX2 geni aşırı ekspresyonunda ise kanser hücresinde invazyonu artmaktadır. (Ueda et al., 2015) Tian ve arkadaşları da multiple myelom hücrelerinde HGF yüksek düzeyde eksprese edilmesi nedeniyle HGF promotör allellerindeki DNA mutasyonlarının HGF transkripsiyonuna etkilerini incelediğinde HGF transkripsiyonundan sorumlu promotörde HGF üretimini indükleyici tek nükleotid varyantları ve tek nükleotid polimorfizmleri gösterilmiştir. Allele spesifik mutasyonlar fonksiyonel olarak yabancı tipte dizilerini yeniden düzenlemekte ve oluşturduğu motifler endojen transkripsiyon faktörleri olan NFK-B (nuclear factor kappa-B), MZF1 (myeloid zinc finger 1), NRF-2 (nüklear faktör eritroid 2 ilişkili nüklear faktör 2erythroid 2-related factor 2) etkileşim kolaylaşmaktadır. Düzenleyici bölgede bulunan heterojen SNV lerin atasal tipte allelden transforme hale geçme nedeni olduğu gösterilmiştir, böylelikle bölge yeni transkripsiyon faktörleri ile bağlanma özelliği kazanır anormal transkripsiyonel sinyallerin etkileşimler meydana geldiği göstermiştir (Tian et al., 2015) Kolorektal kanser genomik instabilite sık olduğu bir kanser türü olup instabilite nedeniyle DATE(DeoxyAdenosine Tract Element) elementi HGF promotöründe kısalmakta, normalde kolon epitelinde sessiz olan promotörün aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu nedenle HGF-Met sinyali otokrin şekilde meydana gelmektedir. Böylelikle kanser hücrelerini çoğalmaya yönelik desteklemekte, sağkalımını güçlendirmekte aynı zamanda programlı hücre ölümüne karşı direnç kazandırmaktadır.Yapısı gereği DATE bölgesinin polimorfik olduğu, normal popülasyonda germline olarak atasal ve mutasyonlu DATE bölgesi olduğunu gösterilmiştir.

DATE bölgesi dokularda incelendiğinde kısalmış formlarının insidansı etnik farklılıktan ekilenmektedir ve bazı ırklarda daha yüksektir. Afrikalı Amerikanlarda daha genç yaşta kolon kanseri gelişmekte mortalite ve kötü prognoz görülmektedir. DATE kısalması insidansı arttıkça daha erken ve daha agresif kanser gelişme riski de oluşmakta olduğu söylenmektedir. Bu nedenle DATE bölgesinin kansere yatkınlıkta predispozan olabileceği ve marker olarak kullanılabileceği görüşündedir. (Seneviratne et al., 2015)

Çalışmamızda literatürde belirtildiği gibi kısa DATE uzunluğu olarak bildirilen 25 adenin ve altında uzunlukta DATE hücrelerimizde saptanmadı. Bazı hücre hatlarında HGF otokrin aktivasyon olmasına rağmen DATE bölgesi normal sayıda (30 Adenin) tekrar bulundu.

Daha önceki çalışmalarda 25 ve daha tekrar sayısı sağlıklı kontrollerde sıklık olarak %1 olduğu için, medyan olarak 28 adenozin varlığı saptanması nedeniyle, 27 ve daha az deoksiadenozin tekrarı kısa DATE olarak belirlenmiştir. Japonlarda sağlıklı kontrol gruplarında kısa DATE varlığı sıklığı %24,2 bulunmuştur. Epidemiyolojik çalışmaların gen çevre etkileşimini de içine alması gerekliliğini bildirmişlerdir. Atasal ve sorafenibe dirençli Huh-7 ve Mahlavu arasında herhangi önemli fark gözlemlenmemiştir HGF ekspresyonu bu hücrelerde yüksek olduğu gösterilmesine rağmen bölge uzunluğu 25 Adenin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle bu hücrelerde bu bölgede metilasyon seviyelerinin farklı olmasını literatürde gösterildiği gibi hepatoselüler karsinomada da epigenetik mekanizmalarla açıklanabileceğini ön görüyoruz. Bu nedenle HGF de bulunan metilasyon farklılıkları ve metilasyon seviyeleri ileride çalışılması planlanmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Meme, mide, mesane kanseri, multiple myelomda ve kolon kanserinde HGF promotöründe mutasyon varlığı ve tümörogeneze katkısı incelenmiş olup hepatoselüler karsinomada herhangi bir değişiklik olup olmadığı henüz mevcut değildir

Çalışmamızda, insan hepatoselüler hücre hatlarında HGF geni promotöründe mutasyon sonucu değişiklikler PCR ve sekanslama yöntemleri ile incelenmiş, mutasyon sonucu kısalma olan hücrelerin HGF ekspresyon seviyeleri ile ilişkileri incelenmiştir. Bunun dışında Sorafenib'e dirençli iki hücre hattında mutasyon varlığında ekspresyon artışı dolayısıyla otokrin aktivasyon sonucu direnç gelişiminde rolü araştırılmıştır. Mutasyon sonucu promotör bölgesinde transkripsiyon etkilenmekte ve genin sessiz halden aktive hala geçmesine neden olmaktadır

Çalışmamızda hepatoselüler karsinoma hücre hatları kullanılmıştır. Sonraki çalışmalarda doku örneklerinde inceleme yapılabilir ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşimlerin ne şekilde değiştiği incelenebilir

İzmir Biyotıp ve Genom Enstitüsü ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarları'na yapılan katkı olarak değerlendirildiğinde; HGF geninin transkripsiyonel düzeyde değişikliğin hepatoselüler hücre karsinoma hücre hatlarının çoğunda incelenmesi ve değişimin ortaya koyulması bu kanser tipinde ilk kez denenmiştir

Ayrıca sonra yapılacak olan çalışmalarda her bir hücre hattı için elde edilen DATE bölge uzunlukları ile doku örneklerinde tümör ve tümör mikro çevresinden elde edilen DNA örneklerinde örnekler için kıyaslamada kullanılacaktır

7.KAYNAKLAR

- Agarwal, N., & Ansari, A. (2016). Enhancement of Transcription by a Splicing-Competent Intron Is Dependent on Promoter Directionality. *PLoS Genet*, 12(5), e1006047. doi: 10.1371/journal.pgen.1006047
- Athauda, G., Cecchi, F., Ito, T., Giubellino, A., Rabe, D., Raffensperger, K., . . . Bottaro, D. P. (2012). HGF (hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*(12). doi: 10.4267/2042/46082
- Bagga, J. S., & D'Antonio, L. A. (2013). Role of conserved cis-regulatory elements in the post-transcriptional regulation of the human MECP2 gene involved in autism. *Hum Genomics*, 7, 19. doi: 10.1186/1479-7364-7-19
- Bradley, C. A., Salto-Tellez, M., Laurent-Puig, P., Bardelli, A., Rolfo, C., Tabernero, J., . . . Van Schaeybroeck, S. (2017). Targeting c-MET in gastrointestinal tumours: rationale, opportunities and challenges. *Nature Reviews Clinical Oncology*.
- Chiba, S., Tsuchiya, N., Horikawa, Y., Narita, S., Inoue, T., Akihama, S., . . . Habuchi, T. (2014). Functional mononucleotide repeat polymorphism in the promoter region of HGF is associated with risk and malignant aggressiveness of bladder cancer. *Int J Oncol*, 44(3), 678-684. doi: 10.3892/ijo.2013.2221
- Cho, Y.-Y., He, Z., Zhang, Y., Choi, H. S., Zhu, F., Choi, B. Y., . . . Dong, Z. (2005). The p53 protein is a novel substrate of ribosomal S6 kinase 2 and a critical intermediary for ribosomal S6 kinase 2 and histone H3 interaction. *Cancer research*, 65(9), 3596-3603.
- Chu, C., Bottaro, D. P., Betenbaugh, M. J., & Shiloach, J. (2016). Stable Ectopic Expression of ST6GALNAC5 Induces Autocrine MET Activation and Anchorage-Independence in MDCK Cells. *PLoS One*, 11(2), e0148075. doi: 10.1371/journal.pone.0148075
- Chuma, M., Terashita, K., & Sakamoto, N. (2015). New molecularly targeted therapies against advanced hepatocellular carcinoma: From molecular pathogenesis to clinical trials and future directions. *Hepatol Res*, 45(10), E1-E11. doi: 10.1111/hepr.12459
- del Castillo, G., Factor, V. M., Fernandez, M., Alvarez-Barrientos, A., Fabregat, I., Thorgeirsson, S. S., & Sanchez, A. (2008). Deletion of the Met tyrosine kinase in liver progenitor oval cells increases sensitivity to apoptosis in vitro. *Am J Pathol*, 172(5), 1238-1247. doi: 10.2353/ajpath.2008.070793
- Dhanasekaran, R., Bandoh, S., & Roberts, L. R. (2016). Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Research*, 5.
- Diederichs, S., Bartsch, L., Berkmann, J. C., Froese, K., Heitmann, J., Hoppe, C., . . . Wullenkord, R. (2016). The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations. *EMBO Mol Med*, 8(5), 442-457. doi: 10.15252/emmm.201506055
- Fajardo-Puerta, A. B., Mato Prado, M., Frampton, A. E., & Jiao, L. R. (2016). Gene of the month: HGF. *J Clin Pathol*, 69(7), 575-579. doi: 10.1136/jclinpath-2015-203575
- Ferrucci, A., Moschetta, M., Frassanito, M. A., Berardi, S., Catacchio, I., Ria, R., . . . Vergara, D. (2014). A HGF/cMET autocrine loop is operative in multiple myeloma bone marrow endothelial cells and may represent a novel therapeutic target. *Clinical Cancer Research*, 20(22), 5796-5807.

- Finisguerra, V., Prenen, H., & Mazzone, M. (2016). Preclinical and clinical evaluation of MET functions in cancer cells and in the tumor stroma. *Oncogene*, 35(42), 5457-5467. doi: 10.1038/onc.2016.36
- Firtina Karagonlar, Z., Koc, D., Iscan, E., Erdal, E., & Atabey, N. (2016). Elevated hepatocyte growth factor expression as an autocrine c-Met activation mechanism in acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci*, 107(4), 407-416. doi: 10.1111/cas.12891
- Garajova, I., Giovannetti, E., Biasco, G., & Peters, G. J. (2015). c-Met as a Target for Personalized Therapy. *Transl Oncogenomics*, 7(Suppl 1), 13-31. doi: 10.4137/TOG.S30534
- Gene, H. G. F. HEPATOCYTE GROWTH FACTOR: ITS ROLE IN HEPATIC GROWTH AND PATHOBIOLOGY.
- Gentile, A., & Comoglio, P. M. (2004). Invasive growth: a genetic program. *International Journal of Developmental Biology*, 48(5-6), 451-456.
- Global Burden of Disease Cancer, C., Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R. M., Barregard, L., Bhutta, Z. A., . . . Naghavi, M. (2017). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*, 3(4), 524-548. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.5688
- Graziano, F., Galluccio, N., Lorenzini, P., Ruzzo, A., Canestrari, E., D'Emidio, S., . . . Magnani, M. (2011). Genetic activation of the MET pathway and prognosis of patients with high-risk, radically resected gastric cancer. *J Clin Oncol*, 29(36), 4789-4795. doi: 10.1200/JCO.2011.36.7706
- Gumustekin, M., Kargi, A., Bulut, G., Gozukizil, A., Ulukus, C., Oztop, I., & Atabey, N. (2012). HGF/c-Met overexpressions, but not met mutation, correlates with progression of non-small cell lung cancer. *Pathol Oncol Res*, 18(2), 209-218. doi: 10.1007/s12253-011-9430-7
- Hao, S., Zhang, J., Chen, Z., Xu, H., Wang, H., & Guan, W. (2017). Alternative Polyadenylation of Human Bocavirus at Its 3' End Is Regulated by Multiple Elements and Affects Capsid Expression. *J Virol*, 91(3). doi: 10.1128/JVI.02026-16
- I Marks, E., & S Yee, N. (2016). Molecular genetics and targeted therapy in hepatocellular carcinoma. *Current cancer drug targets*, 16(1), 53-70.
- Jin, H., Yang, R., Zheng, Z., Romero, M., Ross, J., Bou-Reslan, H., . . . Young, J. (2008). MetMab, the one-armed 5D5 anti-c-Met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumor growth and improves survival. *Cancer research*, 68(11), 4360-4368.
- Johnston, S. J., & Carroll, J. S. (2015). Transcription factors and chromatin proteins as therapeutic targets in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1855(2), 183-192.
- Juul, M., Bertl, J., Guo, Q., Nielsen, M. M., Świtnicki, M., Hornshøj, H., . . . Pedersen, J. S. (2017). Non-coding cancer driver candidates identified with a sample-and position-specific model of the somatic mutation rate. *eLife*, 6, e21778.
- Kellis, M., Wold, B., Snyder, M. P., Bernstein, B. E., Kundaje, A., Marinov, G. K., . . . Dekker, J. (2014). Defining functional DNA elements in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), 6131-6138.

- Kentsis, A., Reed, C., Rice, K. L., Sanda, T., Rodig, S. J., Tholouli, E., . . . Ngo, V. (2012). Autocrine activation of the MET receptor tyrosine kinase in acute myeloid leukemia. *Nat Med*, 18(7), 1118-1122.
- Kim, T.-K., & Shiekhatter, R. (2015). Architectural and functional commonalities between enhancers and promoters. *Cell*, 162(5), 948-959.
- Lam, G., Xian, R. R., Li, Y., Burns, K. H., & Beemon, K. L. (2016). Lack of TERT Promoter Mutations in Human B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Genes (Basel)*, 7(11). doi: 10.3390/genes7110093
- Lee, J. J., Chan, J. J., & Choo, S. P. (2015). Clinical development of c-Met inhibition in hepatocellular carcinoma. *Diseases*, 3(4), 306-324.
- Liu, W., Innocenti, F., Wu, M. H., Desai, A. A., Dolan, M. E., Cook, E. H., & Ratain, M. J. (2005). A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer research*, 65(1), 46-53.
- Ma, J., DeFrances, M. C., Zou, C., Johnson, C., Ferrell, R., & Zarnegar, R. (2009). Somatic mutation and functional polymorphism of a novel regulatory element in the HGF gene promoter causes its aberrant expression in human breast cancer. *J Clin Invest*, 119(3), 478-491. doi: 10.1172/JCI36640
- Ma, L., Chua, M. S., Andrisani, O., & So, S. (2014). Epigenetics in hepatocellular carcinoma: an update and future therapy perspectives. *World J Gastroenterol*, 20(2), 333-345. doi: 10.3748/wjg.v20.i2.333
- Matsumoto, K., Funakoshi, H., Takahashi, H., & Sakai, K. (2014). HGF-Met Pathway in Regeneration and Drug Discovery. *Biomedicines*, 2(4), 275-300. doi: 10.3390/biomedicines2040275
- Mungunsukh, O., McCart, E. A., & Day, R. M. (2014). Hepatocyte Growth Factor Isoforms in Tissue Repair, Cancer, and Fibrotic Remodeling. *Biomedicines*, 2(4), 301-326. doi: 10.3390/biomedicines2040301
- Nabissi, M., Morelli, M. B., Arcella, A., Cardinali, C., Santoni, M., Bernardini, G., . . . Amantini, C. (2016). Post-transcriptional regulation of 5'-untranslated regions of human Transient Receptor Potential Vanilloid type-1 (TRPV-1) channels: role in the survival of glioma patients. *Oncotarget*.
- Nagai, T., Arao, T., Furuta, K., Sakai, K., Kudo, K., Kaneda, H., . . . Nishio, K. (2011). Sorafenib inhibits the hepatocyte growth factor-mediated epithelial mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther*, 10(1), 169-177. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0544
- Nishida, N., Kitano, M., Sakurai, T., & Kudo, M. (2015). Molecular Mechanism and Prediction of Sorafenib Chemoresistance in Human Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis*, 33(6), 771-779. doi: 10.1159/000439102
- Niu, Z. S., Niu, X. J., & Wang, W. H. (2016). Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: An update. *World J Gastroenterol*, 22(41), 9069-9095. doi: 10.3748/wjg.v22.i41.9069
- Ogunwobi, O. O., Puszyk, W., Dong, H.-J., & Liu, C. (2013). Epigenetic upregulation of HGF and c-Met drives metastasis in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 8(5), e63765.
- Okuma, H. S., & Kondo, S. (2016). Trends in the development of MET inhibitors for hepatocellular carcinoma. *Future Oncology*, 12(10), 1275-1286.

- Owusu, B. Y., Galembo, R., Janetka, J., & Klampfer, L. (2017). Hepatocyte Growth Factor, a Key Tumor-Promoting Factor in the Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*, 9(4). doi: 10.3390/cancers9040035
- Park, J. W., Chen, M., Colombo, M., Roberts, L. R., Schwartz, M., Chen, P. J., . . . Sherman, M. (2015). Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver Int*, 35(9), 2155-2166. doi: 10.1111/liv.12818
- Patel, D., Haque, A., Gao, Y., & Revzin, A. (2015). Using reconfigurable microfluidics to study the role of HGF in autocrine and paracrine signaling of hepatocytes. *Integr Biol (Camb)*, 7(7), 815-824. doi: 10.1039/c5ib00105f
- Petrini, I. (2015). Biology of MET: a double life between normal tissue repair and tumor progression. *Ann Transl Med*, 3(6).
- Petrini, I. (2015). Biology of MET: a double life between normal tissue repair and tumor progression. *Ann Transl Med*, 3(6), 82. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.58
- Piraino, S. W., & Furney, S. J. (2017). Identification of coding and non-coding mutational hotspots in cancer genomes. *BMC genomics*, 18(1), 17.
- Poulos, R. C., Thoms, J. A., Shah, A., Beck, D., Pimanda, J. E., & Wong, J. W. (2015). Systematic Screening of Promoter Regions Pinpoints Functional Cis-Regulatory Mutations in a Cutaneous Melanoma Genome. *Mol Cancer Res*, 13(8), 1218-1226. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0146
- Press, G. T. (2005). Biochemical ground-rules regulating c-MET receptor tyrosine kinase activation and signaling.
- Rampa, C., Tian, E., Vatsveen, T. K., Buene, G., Slordahl, T. S., Borset, M., . . . Sundan, A. (2014). Identification of the source of elevated hepatocyte growth factor levels in multiple myeloma patients. *Biomark Res*, 2(1), 8. doi: 10.1186/2050-7771-2-8
- Saffroy, R., Pham, P., Reffas, M., Takka, M., Lemoine, A., & Debuire, B. (2007). New perspectives and strategy research biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Clin Chem Lab Med*, 45(9), 1169-1179. doi: 10.1515/CCLM.2007.262
- Sakai, K., Takeda, M., Okamoto, I., Nakagawa, K., & Nishio, K. (2015). Multiple regulatory mechanisms of hepatocyte growth factor expression in malignant cells with a short poly(dA) sequence in the HGF gene promoter. *Oncol Lett*, 9(1), 405-410. doi: 10.3892/ol.2014.2702
- Sanoff, H. K., Chang, Y., Lund, J. L., O'Neil, B. H., & Dusetzina, S. B. (2016). Sorafenib Effectiveness in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Oncologist*, 21(9), 1113-1120. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0478
- Seneviratne, D., Ma, J., Tan, X., Kwon, Y. K., Muhammad, E., Melhem, M., . . . Zarnegar, R. (2015). Genomic instability causes HGF gene activation in colon cancer cells, promoting their resistance to necroptosis. *Gastroenterology*, 148(1), 181-191 e117. doi: 10.1053/j.gastro.2014.09.019
- Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36.
- Singh, B., & Eyras, E. (2017). The role of alternative splicing in cancer. *Transcription*, 8(2), 91-98. doi: 10.1080/21541264.2016.1268245
- Stuart, K. E., Goldberg, R. M., Laurence, S., & Savarese, D. M. Systemic treatment for advanced hepatocellular carcinoma.

- Szturz, P., Raymond, E., Abitbol, C., Albert, S., de Gramont, A., & Faivre, S. (2017). Understanding c-MET signalling in squamous cell carcinoma of the head & neck. *Crit Rev Oncol Hematol*, 111, 39-51. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.01.004
- Tian, E., Borset, M., Sawyer, J. R., Brede, G., Vatsveen, T. K., Hov, H., . . . Sundan, A. (2015). Allelic mutations in noncoding genomic sequences construct novel transcription factor binding sites that promote gene overexpression. *Genes Chromosomes Cancer*, 54(11), 692-701. doi: 10.1002/gcc.22280
- Toiyama, Y., Yasuda, H., Saigusa, S., Matsushita, K., Fujikawa, H., Tanaka, K., . . . Kusunoki, M. (2012). Co-expression of hepatocyte growth factor and c-Met predicts peritoneal dissemination established by autocrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling in gastric cancer. *Int J Cancer*, 130(12), 2912-2921. doi: 10.1002/ijc.26330
- Trusolino, L., Bertotti, A., & Comoglio, P. M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(12), 834-848. doi: 10.1038/nrm3012
- Tu, T., Budzinska, M. A., Maczurek, A. E., Cheng, R., Di Bartolomeo, A., Warner, F. J., . . . Shackel, N. A. (2014). Novel aspects of the liver microenvironment in hepatocellular carcinoma pathogenesis and development. *Int J Mol Sci*, 15(6), 9422-9458. doi: 10.3390/ijms15069422
- Tulasne, D., & Foveau, B. (2008). The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ*, 15(3), 427-434. doi: 10.1038/sj.cdd.4402229
- Ueda, T., Ito, S., Shiraishi, T., Taniguchi, H., Kayukawa, N., Nakanishi, H., . . . Kamoi, K. (2015). PAX2 promoted prostate cancer cell invasion through transcriptional regulation of HGF in an in vitro model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1852(11), 2467-2473.
- Vadnais, J., Nault, G., Daher, Z., Amraei, M., Dodier, Y., Nabi, I. R., & Noël, J. (2002). Autocrine activation of the hepatocyte growth factor receptor/met tyrosine kinase induces tumor cell motility by regulating pseudopodial protrusion. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 48342-48350.
- Villanueva, A., & Llovet, J. M. (2012). Second-line therapies in hepatocellular carcinoma: emergence of resistance to sorafenib. *Clin Cancer Res*, 18(7), 1824-1826. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0151
- Xie, Q., Su, Y., Dykema, K., Johnson, J., Koeman, J., De Giorgi, V., . . . Kang, L. (2013). Overexpression of HGF promotes HBV-induced hepatocellular carcinoma progression and is an effective indicator for Met-targeting therapy. *Genes & cancer*, 4(7-8), 247-260.
- Yuzugullu, H., Benhaj, K., Ozturk, N., Senturk, S., Celik, E., Toyulu, A., . . . Ozturk, M. (2009). Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer*, 8, 90. doi: 10.1186/1476-4598-8-90
- Zenali, M. (2015). Retrospective review of MET gene mutations. *Oncoscience*, 2(5), 533.

8.EKLER

EK-1 ETİK KURUL RAPORU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/18-19	Tarih:30.06.2016			
	Prof.Dr.Neşe ATABEY'in sorumlusu olduğu "Hepatoselüler Karsinoma'da Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) Gen Promotörünün "Deoksi-Adenozin Bölgesinde Meydana Gelen Mutasyonların ve Bu Mutasyonların Sorafenib Direnci Gelişimindeki Rolünün Tanımlanması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Reyhan</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Katlandı</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Ece</i>
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEÜ Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Vesile</i>
Prof.Dr.Sevine ERASLAN	Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Sevine</i>
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katlandı</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Ayşe</i>
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katlandı</i>
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Müge</i>
Doç.Dr.Şeyda SEREN (TEPELER)	Hemşirelik Yönetimi	DEÜ Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katlandı</i>
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Sefa</i>
Prof.Dr.Seval ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katlandı</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEÜ Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Ahmet</i>
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Mehmet</i>

EK-2 ÖZGEÇMİŞ

TC/Kimlik No:	145666*****
Doğum Yılı	1984
Yazışma Adresi:	Dokuzeylül Üniversitesi İnciraltı Yerleşkesi, 35340, İZMİR/TÜRKİYE
Telefon:	02324122222
e-mail:	msd@gmail.com

EGİTİM BİLGİLERİ

ÜLKE	ÜNİVERSİTE	FAKÜLTE/ENSTİTÜ	ÖĞRENİM ALANI	DERECE	MEZUNİYET YILI
TÜRKİYE	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ	CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ	TIBBİ BİYOLOJİK BİLİMLER	LİSANS	2006
TÜRKİYE	DOKUZEYLÜL ÜNİVERSİTESİ	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	TIBBİ BİYOLOJİ	YÜKSEK LİSANS	2017

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

KURUM/KURULUŞ	ÜLKE	ŞEHİR	BÖLÜM/BİRİM	GÖREV TÜRÜ	GÖREV DÖNEMİ
DOKUZEYLÜL ÜNİVERSİTESİ	TÜRKİYE	İZMİR	TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİMDALI	ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ	2014-2017

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Moleküler Biyoloji

