

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PLEXIN C1'İN RAS-GAP AKTİVİTESİNİN VE ETKİLEDİĞİ SİNYAL
YOLAKLARININ HEPATOSELÜLER KARSİNOMADA ARAŞTIRILMASI

MAİDE ŞEKER
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2022

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PLEXIN C1'İN RAS-GAP AKTİVİTESİNİN VE
ETKİLEDİĞİ SİNYAL YOLAKLARININ
HEPATOSELÜLER KARSİNOMADA ARAŞTIRILMASI

MAİDE ŞEKER
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2022

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

**INVESTIGATION OF PLEXIN C1'S SIGNALING
PATHWAYS AND RAS-GAP ACTIVITY IN
HEPATOCELLULAR CARCINOMA**

MAİDE ŞEKER

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

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE

2022



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 30/06/2022 tarih ve 2022/33 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 20/07/2022 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Maide Şeker'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Ayten KANDİLCİ

ÜYE

: Doç. Dr. Ceren ÇIRACI

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

../../2022 tarih ve 2022/.. sayılı kararı.

İMZA / MÜHÜR

ÖZET

Hepatoselüler Karsinoma (HCC), en sık görülen ve agresif olan bir primer karaciğer kanseri türüdür. İlk olarak, sinir hücrelerinde akson kılavuzluğunda görevli bir hücre yüzey reseptörü olarak tanımlanan Plexin C1 (PLXNC1) proteininin, sonraki çalışmalarda HCC dokuları dahil farklı doku ve hücrelerdeki ifadesi gösterilmiş, çok çeşitli hücresel süreçlerde yer aldığı görülmüştür. Ancak, Plexin C1'in görev aldığı hücresel süreçlerdeki sinyal mekanizmaları hakkındaki bilgiler sınırlı olup HCC özelinde ise herhangi bir çalışmanın literatürde bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasının amacı, Plexin C1'in etkilediği sinyal yollarını HCC'de araştırarak Plexin C1'in kanserdeki rolünü anlamaya yönelik bir adım daha atmak ve literatüre Plexin C1 ile ilgili katkı sağlamaktır.

Plexin C1'in iki farklı HCC hücre hattında etkisini araştırmak için öncelikle PLXNC1 ifadesi baskılanmış hücreler oluşturuldu. Plexin C1'in bilinen ligandı Semaforin 7A (SEMA7A) hücre klonlarına verilerek PLXNC1-SEMA7A etkileşiminin Lim Kinaz/Kofilin yolağı üzerindeki etkisi incelendi ve bu yolağın fosforillenmesini sağlayan olası kinazların belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı. Plexin C1'in, hücrelerdeki protein tirozin kinazların fosforillenmesi ile ilişkisi ve hücre içi sinyal iletiminde en çok bilinen MAPK, AKT, JAK/STAT, NF- κ B, ve TGF- β yolları ile bağlantısı araştırıldı. Ek olarak, Plexin C1'in Ras-GAP aktivitesi de aynı hücre klonlarında incelendi. Ayrıca, SEMA7A'nın bir diğer reseptörü olan İntegrin β 1 ile ilişkisi ve PLXNC1-SEMA7A-İntegrin β 1 üçgeni araştırıldı.

Yapılan bu çalışma sonucunda, literatüre Plexin C1 ile ilgili hem HCC özelinde hem de genel anlamda katkı sağlanacağı düşünülmektedir. İşlevi ve önemi yavaş yavaş kavranan bir reseptör olan PLXNC1'in tam olarak anlaşılmasının kansere yaklaşım açısından önemli olacağı öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hepatoselüler Karsinoma, Plexin C1, SEMA7A, Ras-GAP, Sinyal Yolları, Kofilin.

SUMMARY

Hepatocellular Carcinoma (HCC) is the most common and aggressive type of primary liver cancer. Plexin C1 (PLXNC1) protein, which was first identified as a cell surface receptor responsible for axon guidance in nerve cells, is expressed in different tissues, including HCC, and is involved in numerous cellular processes. However, the information about the signalling mechanisms in the cellular processes in which Plexin C1 is involved is limited, and it has been determined that there is no study in the literature regarding HCC. This thesis study aims to take another step toward understanding the role of Plexin C1 in HCC by investigating the signalling pathways affected by it and contributing to the literature about it.

To investigate the effect of Plexin C1 on two different HCC cell lines, cells with suppressed PLXNC1 expression were first created. The known ligand of Plexin C1, Semaphorin 7A (SEMA7A), was given to cell clones and the effect of PLXNC1-SEMA7A interaction on the Lim Kinase/Kofilin pathway was examined. Studies were carried out to determine possible kinases that phosphorylate this pathway. The relationship of Plexin C1 with phosphorylation of protein tyrosine kinases in cells and its connection with the most well-known MAPK, AKT, JAK/STAT, NF- κ B, and TGF- β pathways in intracellular signal transduction were investigated. In addition, the Ras-GAP activity of Plexin C1 was examined in the same cell clones. Also, the relationship of SEMA7A with its other receptor, Integrin β 1, and the PLXNC1-SEMA7A-Integrin β 1 triangle was investigated.

It is thought that the results of this study will contribute to the literature about Plexin C1 both specific to HCC and in general. It is predicted that a full understanding of PLXNC1, a receptor whose function and importance are gradually being understood, will be important for the approach to cancer.

Keywords: Hepatocellular Carcinoma, Plexin C1, SEMA7A, Ras-GAP, Signalling Pathways, Cofilin.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca benden bilgi, tecrübe ve desteklerini hiç esirgemeyen, her zaman bana güvenini hissettiğim, sevgili danışmanım Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya en içten samimiyetimle çok teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimime başladığımda girdiğim yabancı dünyayı bana tanıtan ve sevdiren, yolda defalarca tökezlediğimde hatta düştüğümde her seferinde sabırla elimden tutan, tekrar kalkmam için beni motive eden, tüm bilgisini, tecrübesini cömertçe paylaşan, farklı düşünme tarzını örnek aldığı canım hocam Dr. Görkem ODABAŞ'a; uzun deney ve güzel yemek günlerinin aranan ismi, her zaman omzumda destek elini hissettiğim değerli hocam Dr. Metin ÇETİN'e; birebir çalışmaktan keyif aldığı, bana her zaman güvenen ve beni cesaretlendiren kıymetli hocam Dr. İrem YALIM CAMCI'ya; her sorunum için güvendiğim bilgi ve tecrübesine başvurduğum, her zaman bana çok yardımcı olan, birlikte çalışmanın çok eğlenceli olduğu hem canım hocam hem de arkadaşım Arş. Gör. Arzu AYSAN'a çok teşekkür ederim.

Lisanstan beri bilim dünyasında birlikte yolculuk ettiğim, birlikte mutlu olup birlikte hüznlendiğim, uzun deneylerin, imkânsız projelerin aranan yoldaşı, varlığına, desteğine minnettar olduğum lab partnerim, canım dostum, kardeşim Melike Binnur BAHÇEKAPILI'ya; ikimizin de yüksek lisans ortağı, pozitifliğiyle modumu yükselten, her zaman yardım edeceğini bildiğim, iyi ki yollarımızın kesiştiği canım Şevval DİK'e; birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum canım TY Lab üyeleri; Şule ERDERMİR SAYAN, Nazlı SALIK, Esmâ ERCİYAS BAYKAL, Gamze GÜNGÖR TOPCU, Nurşah ERSEZEN, Durmuş AKDOĞAN'a ve her zaman yardıma koşan Leyla DİKMEDAŞ'a bilimsel etkileşimimizin yanında kurduğumuz sıkı arkadaşlıklar için çok teşekkür ederim.

Lisansta başlayan arkadaşlığımızın yıllar içinde katlanarak güçlendiği, beni yüksek lisans hayatımda da yalnız bırakmayan, bilim sevdalıları olarak çıktığımız bu yolda birbirimizi destekleyerek ilerlediğimiz, varlıkları için her zaman minnettar olacağım canım dostlarım, kardeşlerim Sinem KURT KASIM ve Sema Tuğçe AYDIN'a çok teşekkür ederim.

Son olarak, en büyük teşekkürü bugünlere gelmemi sağlayan, en büyük destekçilerim, her zaman yanımda olan biricik aileme atfediyorum.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 1001 119S412 projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1. Hepatoselüler Karsinoma	2
2.2. Plexin Ailesi ve Ligandları Semaforinler	3
2.2.1. Plexin C1 ve Semaforin 7A	4
2.2.2. Plexin C1 ve Kanser İlişkisi	4
2.2.3. Plexin C1'in Etkilediği Sinyal Yolakları	5
2.2.3.1. Plexin C1'in RAS-GAP Aktivitesi	6
2.2.3.2. Lim Kinaz-Kofilin İlişkisi	7
2.3. İntegrin β 1	8
3. GEREÇLER	10
3.1. Cihazlar	10
3.2. Genel Kimyasallar	10
3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler	10
3.4. Hücre Hatları	11
3.5. Çözelti ve Tamponlar	11
3.6. Bakteriler ve Besiyerleri	12
3.7. Vektörler	12
3.8. Antikorlar	13

3.9. Kitler	13
4. YÖNTEMLER	14
4.1. Hücre Hatlarının Kültürü	14
4.2. Transformasyon ve Plazmitlerin Çoğaltılması	14
4.3. Plexin C1 Hücre Klonlarının Oluşturulması	15
4.3.1. Viral Partiküllerin Üretilmesi	15
4.3.2. Plexin C1 İfadesi Baskılanmış ve Kontrol Klonlarının Geliştirilmesi	15
4.4. Western Blotlama	15
4.5. Hücrelere SEMA7A Uygulanması	16
4.6. Hücrelere ROCK1/2 ve PAK1 İnhibitörü Uygulanması	17
4.7. Human RTK Phosphorylation Antibody Array C1	17
4.8. Human Phosphorylation Pathway Profiling Array C55	19
4.9. Ras Aktivasyon ELISA Kiti	20
4.10. İstatiksel Analizler	21
5. BULGULAR	22
5.1. HCC Hücre Hatlarında shPLXNC1 ve PLKO Klonlarının Geliştirilmesi	22
5.2. Hücre Klonlarında SEMA7A Bağımlı ve Bağımsız Sinyal Yolaklarının İncelenmesi	22
5.3. Hücrelere ROCK1/2 ve PAK1 İnhibitörü Uygulanması	25
5.4. Plexin C1-Bağımlı Tirozin Kinaz Fosforilasyonlarının Tespit Edilmesi	28
5.5. Hücre İçi Sinyal Yolaklarındaki Protein Fosforilasyonlarının Tespit Edilmesi	30
5.6. Hücrelerdeki Ras-GTP İfadesinin Tespit Edilmesi	32
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	34
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	54
EKLER	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve

Kısaltmalar Açıklamalar

μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
dk	: Dakika
g	: Gram
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
M	: Molar
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
rpm	: Dakika Başına Dönüş
xg	: Yerçekimi
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AKT	: Protein Kinaz B
APS	: Amonyum Persülfat
ATF2	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 2
ATP	: Adenozin Trifosfat
Cof	: Kofilin
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
<i>E. Coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMT	: Epitel Mezenkimal Geçiş
Eph	: Eritropoetin Üreten Hepatoselüler Karsinom
ERK	: Mitojen Ile Aktifleşen Olan Protein Kinaz
FAK	: Fokal Adhezyon Kinaz
FBS	: Fötal Dana Serumu
FGFR	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
GAP	: GTPaz Aktivite Edici Proteinler
GAPDH	: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GDP	: Guanozin Difosfat
GEF	: Guanin Nükleotit Değişim Faktörleri
GTP	: Guanozin Trifosfat
HCC	: Hepatoselüler Karsinoma
HCl	: Hidroklorik Asit
HGFR	: Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü
IGFR	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
JAK/STAT	: Janus Kinaz/ Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
LB	: Luria-Bertani
LIMK	: Lim Kinaz
MAPK	: Mitojenle Etkileşen Protein Kinaz
MET	: Mezenkimal Epitel Geçiş
MRCK	: Miyotonik Distrofi Kinaz ile İlişkili Cdc42 Bağlayıcı Kinaz
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin
NaCl	: Sodyum Klorür
NEAA	: Esansiyel Olmayan Aminoasitler
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
NSCLC	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
OD	: Optik Yoğunluk
PAK1	: p21 ile Aktive Olan Kinaz 1
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PDGFR	: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü
PEI	: Polyethylenimine

PI3K	: Fosfoinositid-3 Kinaz
PLXNC1	: Plexin C1
ROCK1/2	: Rho İlişkili Protein Kinaz 1/2
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
SCFR	: Kök Hücre Büyüme Faktörü Reseptörü
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SEMA7A	: Semaforin 7A
shRNA	: Kısa Saç Tokası-Rna
TCR	: T Hücresi Reseptörü
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGF- β	: Transforme-Edici Büyüme Faktörü β
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
ZAP70	: Zeta Zinciriyle İlişkili Protein Kinaz 70

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Sema7A'nın hücre dışı organizasyonu ve Plexin C1-İntegrin β 1 reseptörleri ile etkileşimi.	4
2.2: Ras-GTP/GDP döngüsü.	7
2.3: LIMK-Kofilin sinyal yolağı.	8
4.1: Protein tirozin kinaz fosforilasyon array haritası.	18
4.2: Sinyal yollarının array haritası.	20
5.1: Plexin C1 ifadesi baskılanmış hücre klonlarının Western blot ile doğrulanması.	22
5.2: PLXNC1 ifadesi baskılanmış PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarında ligand bağımsız durumda Plexin C1 ve İntegrin β 1 sinyal yollarındaki değişimin incelenmesi.	23
5.3: PLC/PRF/5 ve Hep3B hücrelerinin PLKO klonlarında SEMA7A optimizasyonu.	24
5.4: PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre hatlarının PLKO ve shPLXNC1 klonlarına 100 ng/ml, 15 dk SEMA7A uygulanması sonucu PLXNC1 ve İntegrin β 1 yolağının incelenmesi.	25
5.5: HCC hücre hatlarında ROCK1/2 inhibitörü Y-27632'nin 50 μ M sabit konsantrasyon ile süre denemesi.	26
5.6: HCC hücre hatlarında ROCK1/2 inhibitörü Y-27632'nin 30 dk sabit süre ile konsantrasyon denemesi.	26
5.7: HCC hücre hatlarının PLKO ve shPLXNC1 klonlarında ROCK1/2 inhibitörü Y-27632'nin LIMK2/Kofilin yolağına etkisi.	27
5.8: HCC hücre hatlarında PAK1 inhibitörü IPA-3'ün 50 μ M sabit konsantrasyon ile süre denemesi.	27
5.9: HCC hücre hatlarının PLKO ve shPLXNC1 klonlarında PAK1 inhibitörü IPA-3'ün LIMK2/Kofilin yolağına etkisi.	28
5.10: "Human RTK Phosphorylation Antibody Array C1" membran görüntüleri.	29

- 5.11: “Human Phosphorylation Pathway Profiling Array C55” membran görüntüleri. 31
- 5.12: PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarında Ras-GTP ifadesinin incelenmesi. 33



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Çözelti ve kimyasal listesi.	11
5.1: PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarında ortak olarak fosforilasyonu artan veya azalan tirozin kinazlar.	29
5.2: PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarında 5 farklı hücre içi sinyal yolağında ortak olarak fosforilasyonu artan veya azalan proteinler.	32



1. GİRİŞ

Plexin C1, ilk olarak sinir hücrelerinde hücre yüzey reseptörü olarak tanımlanmış, akson kılavuzluğunda görevli olduğu saptanmış bir proteindir. Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda, Plexin C1'in çeşitli dokulardaki ifadesi ve farklı görevleri gösterilmiş ancak işlevi derinlemesine incelenmemiştir. Karaciğer kanseri türlerinden biri olan Hepatoselüler Karsinomada da Plexin C1'in ifadesi gösterilmiş ancak detaylı olarak araştırılmamıştır. Plexin C1 biyolojisini tam olarak anlamak için başta etkilediği sinyal yollarının incelenmesi önemli bir araştırma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında, bir hücre yüzey reseptörü olan Plexin C1'in etkilediği sinyal yollarının iki farklı Hepatoselüler Karsinoma hücre hattında aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, Plexin C1'in ligandı Semaforin 7A varlığında hücredeki aktin sitoiskeletinin düzenlenmesine yol açan Lim Kinaz/Kofilin yolağının, Plexin C1'in Ras-GAP aktivitesinin, protein tirozin kinazlarla ilişkisinin ve hücre içi sinyal yollarıyla olan bağlantılarının araştırılması hedeflenmiştir. Buna ek olarak, Lim Kinaz/Kofilin yolağının üst-düzenleyicileri ROCK1/2 ve PAK1 etkinliği ile Plexin C1 ligandı Semaforin 7A'nın bir diğer reseptörü olan İntegrin β 1 üzerindeki etkisi ve Plexin C1-İntegrin β 1 ilişkisi de ele alınmıştır.

HCC'de Plexin C1'in sinyal yolağını aydınlatmak üzere, epitel karakterli HCC hücre hatlarından PLC/PRF/5 ve Hep3B üzerinde yapılan bu çalışmalar, literatürde olmayıp elde edilecek çıktılarının literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Hepatoselüler Karsinoma

Karaciğer kanseri, en sık görülen primer kanserler arasında 6. sırada olmasına rağmen, dünya çapında görülen, kansere bağlı ölümler arasında 4. sırada yer almaktadır. Primer karaciğer kanserlerinin %80-90 gibi büyük bir bölümünü hepatoselüler karsinoma (HCC) oluşturmaktadır [1]. HCC'nin oluşmasının temel sebepleri arasında; hepatit B ve hepatit C virüsü, aşırı alkol tüketimi, diyabet, aflatoksin gibi bazı toksinlere maruziyet ve alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması gösterilmektedir [2].

Birçok kanser türünde olduğu gibi, HCC'de de büyüme faktörlerinin ve onların reseptörlerinin aşırı ifadesi veya yanlış düzenlenmelerine bağlı sinyal yollarındaki değişimlerin kanser gelişimine sebep olduğu görülmektedir. Hepatokarsinogenezi destekleyen en kritik sinyal yollarının reseptör tirozin kinazlarla aktive olan yollar olduğu bilinmektedir. Ras/Raf/MEK/ERK, JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR, TGF- β , NF- κ B bu bağlamda öne çıkan hücre içi sinyal yollarıdır [3]. Bu yolların aktifleşmesini sağlayan reseptör tirozin kinazlar ise EGFR (Epidermal growth factor receptor), IGFR (Insulin-like growth factor receptor), VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor), HGFR (Hepatocyte growth factor receptor, diğer adıyla c-MET), PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor), FGFR (Fibroblast growth factor receptor)'dır. Bu yollar dışında; Wnt/ β -catenin, Hedgehog, Notch gibi sinyal yollarının da HCC gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [3] - [6].

HCC tedavisinde ilaçlı ve ilaçsız olmak üzere iki yol izlenmektedir. İlaçsız tedavide karaciğerin bir kısmının alınması, karaciğer nakli gibi çeşitli ameliyatlara tercih edilir ancak bu tedavilerin uygulanabilmesi için HCC'nin erken veya orta safhada teşhis edilmesi gerekir. İlaçlı tedavide ise çeşitli sinyal yollarını inhibe edici küçük moleküller ve antikolar kullanılmaktadır. Yeni ilaç geliştirme çalışmaları günümüzde halen devam ederken HCC tedavisinde FDA (Food and Drug Administration) tarafından klinikte kullanımı onaylanmış 4 tane çoklu-kinaz inhibitörü bulunmaktadır. Bu ilaçlar, HCC'nin oluşumuna ve gelişimine neden olan reseptör tirozin kinazları

hedeflemektedir. Bu çoklu-kinaz inhibitörleri Sorafenib, Lenvatinib, Regorafenib ve Cabozantinib'tir. Regorafenib ve Cabozantinib, sadece Sorafenib uygulanıp istenen klinik fayda sağlanamamış olgularda ikincil tedavi olarak kullanılmaktadır [7], [8]. İlaçların inhibe ettikleri moleküllerin listesi aşağıdaki gibidir:

- Sorafenib: c-Raf, B-Raf, MEK, ERK, VEGFR-2/3, PDGFR- β , KIT ve Flt3 [9].
- Lenvatinib: VEGFR1/2/3, PDGFR- α , FGFR1/2/3/4, KIT ve RET [10].
- Regorafenib: VEGFR1/2/3, TIE2, PDGFR- β , FGFR, KIT, RET ve Raf [11].
- Cabozantinib: VEGFR1/2/3, MET, AXL [12].

2.2. Plexin Ailesi ve Ligandları Semaforinler

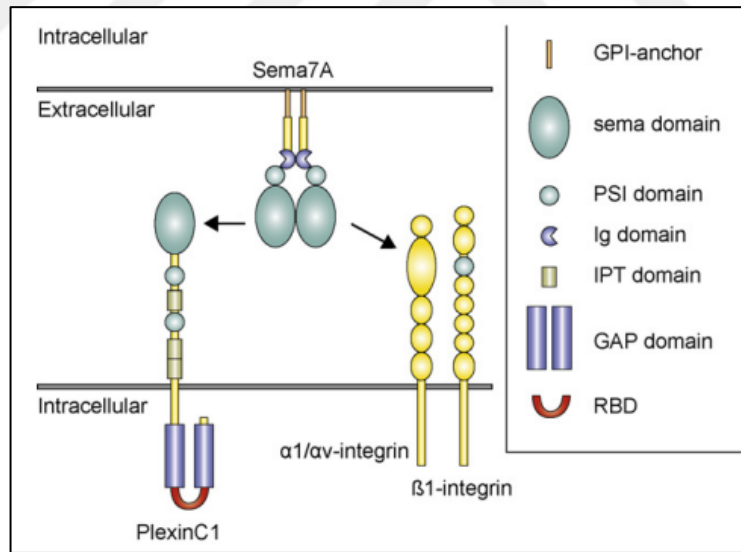
Plexinler, ilk olarak *Xenopus* (kurbağa) iribaşlarının sinir hücrelerinde hücre yüzey reseptörü olarak keşfedilmiş proteinlerdir [13]. Bu aile üyeleri, hücre dışı bölgelerinde sistein aminoasidince zengin bölgeler içeren, tek geçişli transmembran proteinlerden oluşur [14]. Hücre dışındaki bölgelerinde SEMA (Semaphorin) domaini, PSI (Plexin-Semaphorin-İntegrin) domaini, G-P (Glisin-Prolin) aminoasitlerince zengin motifler bulunur. Hücre içi bölgelerinde ise Ras ve Rho ailesi küçük GTPazların bağlanabileceği bölgeler bulunmaktadır [15]. Omurgalılarda bulunan 9 tane Plexin proteini, yapısal özelliklerine bakılarak kendi içlerinde 4 alt sınıfa ayrılmıştır: Plexin A (1-4), Plexin B (1-3), Plexin C1 ve Plexin D1 [16]. Plexinlerin; hücre proliferasyonu, hücre hareketliliği, hücrenin invaziv davranışı gibi birçok hücreyel olaya etkisi olduğu bilinmektedir [17].

Plexinlerin ligandları olan Semaforinler salgılanan, transmembran veya membrana bağlı olan, sistein aminoasitlerince zengin SEMA domainlerine göre tanımlanan geniş bir protein ailesidir. İnsanlarda 20 farklı Semaforin bulunmaktadır. Semaforinler ilk olarak sinir sisteminde, sinir sisteminin gelişimini etkileyen ve akson kılavuzluğunu sağlayan moleküller olarak tanımlansa da daha sonra hemen hemen tüm dokularda ifade olan ve farklı görevler üstlenen proteinler oldukları gösterilmiştir. Semaforinlerin sadece Plexinlerin ligandları olmayıp Nöropilinler

(Npn), İntegrinler gibi başka reseptörlerin ligandları oldukları da tespit edilmiştir [18], [19].

2.2.1. Plexin C1 ve Semaforin 7A

Plexin C1 (PLXNC1), ilk olarak, Semaforin 7A (SEMA7A)'nın viral homoloğu olan, virüs kökenli semaforin A39R'nin reseptörü olarak keşfedilmiş ve VESPR (Virus Encoded Semaphorin Protein Receptor) olarak adlandırılmıştır. Yaklaşık 220 kDa moleküler ağırlığında bir proteindir [14], [20]. SEMA7A, ilk olarak immün sistem hücrelerinde keşfedilmiş ve CDw108 olarak adlandırılmıştır [21], [22]. Semaforin ailesinin membrana GPI (Glikozil fosfatidilinositol) çapa ile bağlı tek üyesidir. Hem PLXNC1'in hem de İntegrin $\beta 1$ 'in ligandı olduğu gösterilmiştir [14], [23]. Molekülün hücre dışı bölgesinde GPI çapa, SEMA domaini, PSI domaini ve Immunoglobulin (Ig) domaini bulunmaktadır (Şekil 2.1) [24].



Şekil 2.1: Sema7A'nın hücre dışı organizasyonu ve Plexin C1-İntegrin $\beta 1$ reseptörleri ile etkileşimi.

2.2.2. Plexin C1 ve Kanser İlişkisi

Plexin C1 şimdiye kadar farklı kanser türlerinde çalışılmıştır. Melanom ile yapılan çalışmalarda, PLXNC1'in metastatik hücrelerde kaybolduğu ve bunun da

hücrelerin metastaz kapasitesini arttırdığı gözlemlenmiştir [25], [26]. Akciğer kanser hücre hatlarıyla yapılan bir diğer çalışmada, PLXNC1 ifadesinin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde (NSCLC/non-small cell lung cancer), sağlıklı akciğer alveolar epitel hücrelerine göre daha yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada, PLXNC1-SEMA7A etkileşiminin akciğer kanseri hücrelerinde migrasyonu arttığı gösterilmiştir [27]. Gastrik kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, PLXNC1'in baskılanması kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyon yeteneğini azaltırken, reseptörün aşırı ifadesinde ise tam tersi olarak hücre proliferasyonunun ve migrasyonun arttığı bildirilmiştir. Ayrıca Plexin C1'in baskılandığı hücreler nude fareye verildiğinde, reseptörün baskılanmadığı kontrol hücreleriyle oluşturulan tümöre göre daha küçük tümör oluştuğu gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda, Plexin C1'in kanser gelişimini desteklediği yönünde çıkarım yapılmıştır [28]. Prof. Dr. Tamer Yağcı ve ekibinin, hastalardan alınan HCC tümörleri üzerinde yaptığı çalışmalarda, HCC tümörlerinin PLXNC1 ifadesi ile tümörlerin farklılaşma düzeyi (tumor grade) arasında ters orantı olduğu gösterilmiştir. İleri evredeki kötü farklılaşmış tümörlerin, daha erken evredeki tümörlere göre daha az miktarda PLXNC1 ifade ettiği bildirilmiştir [29], [30].

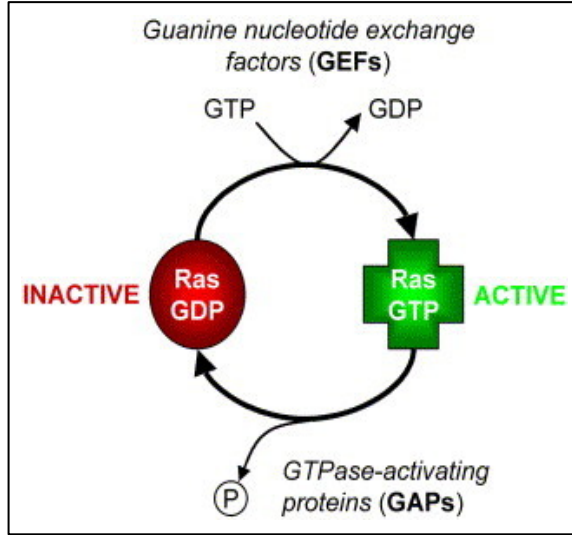
2.2.3. Plexin C1'in Etkilediği Sinyal Yolakları

Literatürde PLXNC1'in SEMA7A ile etkileşimi sonrası tetiklediği sinyal yolaklarını aydınlatma üzerine çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Melanom hücre hatlarıyla yapılan çalışmada, çeşitli doz ve sürelerde denenen SEMA7A uygulamasının, PLXNC1 üzerinden kofilin fosforilasyonunda artışa yol açtığı tespit edilmiştir. PLXNC1 baskılandığında SEMA7A bağımlı ve bağımsız durumların her ikisinde de total LIMK2 düzeyinin azaldığı gösterilmiştir. Bu bulgu, PLXNC1'in LIMK2 ifadesini ya da stabilitesini düzenlediği şeklinde yorumlanmıştır. Çalışmada ayrıca, SEMA7A ile aktif olan İntegrin $\beta 1$ aracılığıyla FAK ve ERK1/2'nin fosforile olduğu da gösterilmiştir [26]. Akciğer kanseri (NSCLC tipli) hücre hatlarıyla yapılan çalışmada ise benzer sonuçlara ulaşılarak PLXNC1'in SEMA7A ile etkileşimi sonrası kofilin fosforilasyonunda ve LIMK2 ifadesinde artış olduğu saptanmıştır. Bu bulguyla uyumlu olarak, PLXNC1'in baskılandığı durumda kofilin fosforilasyonunun ve LIMK2 ifadesinin azaldığı

bulunmuştur. Ancak ilginç bir biçimde, PLXNC1 yokluğunda FAK fosforilasyonunun azaldığı bildirilmiştir [27]. FAK'ın İntegrin $\beta 1$ yolağı ile ilişkili bir protein olup, bu yolak üzerinden fosforillendiği birçok çalışmada gösterildiği [24], [31] - [34] için akciğer kanseri hücrelerinde elde edilen bu sonuç şaşırtıcıdır. Plexin C1 ile İntegrin $\beta 1$ 'in ilişkisini anlamaya yönelik yapılan bir çalışmada, hücrelere SEMA7A verildiğinde melanositlerin yayılmasının ve dendritik uzantı oluşturmasının İntegrin $\beta 1$ üzerinden arttığı gösterildikten sonra, aynı hücrelerde PLXNC1 baskılanarak fonksiyonel deney tekrarlanmıştır. PLXNC1 baskılanmış hücrelere SEMA7A uygulandığında, melanositlerin yayılmasının ve dendritik uzantı oluşturmasının önceki deneye oranla çok daha fazla arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, melanositlerde PLXNC1'in İntegrin $\beta 1$ 'in fonksiyonlarını baskılayıcı yönde görev aldığı şeklinde yorumlanmıştır [35].

2.2.3.1. Plexin C1'in Ras-GAP Aktivitesi

Plexin ailesindeki proteinlerin hücre içinde bulunan "GTPase-Activating Protein" (GAP) domainlerinden dolayı Ras-GAP aktiviteleri araştırılmıştır [36]. Hücre zarındaki sinyallerin efektör moleküller aracılığıyla hücre içine taşınmasında görevli, Ras GTP-GDP dönüşümünü sağlayan GAP ve GEF'ler, sinyal yolaklarının açma-kapama anahtarları olarak görev yaparlar (Şekil 2.2) [37]. Plexin A1-B1 ve D1 proteinlerinin Rnd GTPaz proteinlerine bağımlı olarak R-Ras GAP aktivitesi gösterdiği bulunurken Plexin C1'in Rnd GTPaz proteinlerine ihtiyaç duymadan R-Ras GAP aktivitesi sergilediği bildirilmiştir [38], [39], [40]. Melanomada yapılan bir çalışmada ise Plexin C1'in R-Ras GAP aktivitesi aracılığıyla hücre migrasyonunu baskıladığı ve deney ortamına SEMA7A eklenmesinin migrasyon üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir [41].



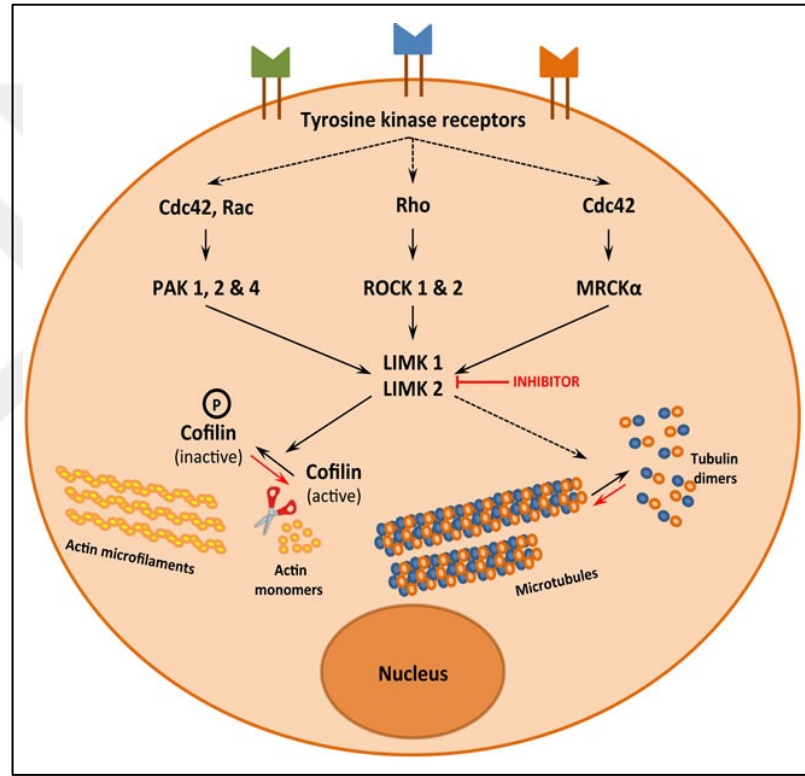
Şekil 2.2: Ras-GTP/GDP döngüsü.

2.2.3.2. Lim Kinaz-Kofilin İlişkisi

Lim Kinaz (LIMK) ailesi, birbiriyle oldukça benzer LIMK1 ve LIMK2 protein kinazlarından oluşmaktadır. İkisi de amino terminal bölgesinde 2 adet LIM domaini, bunu takip eden PDZ domaini, prolin-serin aminoasitlerince zengin bölgeler ve protein kinaz domainlerinden oluşmaktadır. LIMK'lerin proteinlerde farklı aminoasitleri fosforilleyebildikleri gösterildiğinden "dual-specificity" kinazlar sınıfında yer almışlardır [42], [43]. LIMK'lerin en çok bilinen substratları kofilinler ve destrinlerdir. Bu proteinler aktin sitoskeletonini düzenleyerek aktin mikrofilamentlerin oluşmasını ve yıkılmasını katalizlerler. LIMK'ler bu proteinleri fosforilleyerek aktin sitoskeletonini düzenleyici proteinlerin aktif ve inaktif durumları arasındaki geçişini sağlarlar. Ayrıca, LIMK'lerin mikrotübül dinamiğine de etki ettiği bilinse de bu etkileşimin detaylı mekanizması henüz çözülememiştir [42].

Plexin C1'in, ligandı SEMA7A ile aktifleştğinde LIMK2 ve buna bağlı olarak kofilin fosforilasyonuna sebep olduğu melanom hücre hatlarında Scott ve arkadaşları tarafından [26] gösterilmiştir. Melanom hücre hatlarında LIMK1 ifadesinin olmadığı tespit edildiğinden melanomlarda kofilin fosforilasyonuna LIMK2'nin sebep olduğu düşünülmüştür [26]. LIMK'lerin fosforillenmesini sağlayarak aktifleşmesine neden olan 3 farklı kinaz grubu tespit edilmiştir. Bu kinazlar; ROCK (Rho-associated protein kinase) ailesi, PAK (p21-activated kinase) ailesi ve MRCK (Myotonic dystrophy kinase-

related Cdc42-binding kinase) ailesidir. LIMK'lerin aktifleşme yolları farklı dokularda farklı şekilde gerçekleşebilmektedir. Aktifleşen LIMK'ler kofilin fosforilasyonuna, bu fosforilasyon ise kofilin inaktivasyonuna sebep olarak aktin mikrofilamentlerinin (F-Aktin) oluşmasına neden olur. Kofilinler fosforillenmedikleri durumda aktiftirler ve aktin mikrofilamentlerine bağlanıp onları ayırarak aktin monomerleri (G-Aktin) oluşmasına neden olurlar. Bu şekilde hücre hareketliliğini sağlayan aktin sitoskeleti düzenlenmiş olur (Şekil 2.3) [42] - [44]. Plexin C1'in hangi yollar üzerinden LIMK fosforillenmesine neden olduğu ile ilgili bir çalışma literatürde bulunamamıştır.



Şekil 2.3: LIMK-Kofilin sinyal yolağı.

2.3. İntegrin $\beta 1$

İntegrinler α/β heterodimerik yapıda ve glikoprotein tabiatında transmembran hücre yüzey reseptörleridir. Hücrelerin diğer hücrelerle ve hücre dışıyla etkileşimini sağlayan adezyon molekülleri olarak bilinirler. İntegrinler, hücre dışındaki ECM (extracellular matrix) elemanlarından gelen sinyallerle aktifleşebileceği gibi hücre içindeki sinyallerle de aktifleşebilirler. Hücre göçü, fagositoz, hücrenin büyüme ve

gelişimi gibi birçok hücrel süreçte görev almaktadırlar. İnsanlarda bilinen 18 α ve 8 β İntegrin alt birimi vardır. Bunlardan 24 farklı heterodimer İntegrin reseptörü oluşmaktadır [45] - [47]. En yaygın İntegrin alt birimi $\beta 1$ İntegrin olup 12 farklı heterodimerde bulunmaktadır [48].

SEMA7A'daki SEMA domaininin bilinen İntegrin bağlanma motifi RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) içerdiği görüldüğünde İntegrin $\beta 1$ 'in ligandı olup olmadığı test edilmiştir. Yapılan bu çalışmaya göre, SEMA7A'nın Plexin C1'den bağımsız olarak İntegrin $\beta 1$ 'in ligandı olduğu gösterilmiştir [23]. İntegrin $\beta 1$ 'in aktifleştğinde FAK ve ERK1/2 fosforilasyonuna sebep olduğu birçok çalışmada saptanmıştır [49] - [51]. Buna paralel olarak, hücrelere SEMA7A verildiğinde artan FAK ve ERK1/2 fosforilasyonu birçok farklı çalışma tarafından bildirilmiştir [23], [26], [27].

3. GEREÇLER

3.1. Cihazlar

Karbondiyoksit inkübatörü (Euroclone), su banyosu (Nüve), class II tip laminar akış kabini (Esco), +4°C buzdolabı (Vestel), -20°C derin dondurucu (Bosch), -80°C derin dondurucu (Thermo Scientific), buz makinesi (BAR-LINE BF85), soğutmalı santrifüj (Labogene, Scanspeed 1580R), vortex (DragonLabs, MX-S), mini western blot sistem ve transfer tankı (BioRad), ters ışık mikroskobu (Leica), hassas terazi (Sartorius BL210S), şarjlı pipetleyici (Thermo Scientific), ısıtıcı blok (Denville Scientific), ısıtıcı manyetik karıştırıcı (Denville Scientific), sıvı azot tankı (Arpege 140), orbital çalkalayıcı (Denville Scientific), santrifüj (Nüve, NF400), jel/membran görüntüleme sistemi (Biorad ChemiDOC XRS), otoklav (Hriyama), Nanodrop (Thermo Scientific), Varioskan LUX (Thermo Scientific).

3.2. Genel Kimyasallar

β -Mercaptoetanol (Fischer Scientific), Gliserol (Fischer Scientific), Tris (Sigma Aldrich), HCl (Fischer Scientific), DMSO (NeoFroxx), Western Blot ECL Sirius (Advansta), Metanol (Merck), Acrilamid/Bisacrilamid (NeoFroxx), 2-Propanol (Merck), SDS (Calbiochem), APS (Fischer Scientific), TEMED (Fisher Scientific), Complete Proteaz İnhibitör Kokteyl Tabletleri (Roche), PhosSTOP Fosfataz İnhibitör Kokteyl Tabletleri (Roche), Polybren (Thermo Scientific), Puromisin (InVivoGen), PEI (Sigma Aldrich).

3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Kimyasal Maddeler

Hücre besiyeri olarak yüksek-glukoz içerikli DMEM (Gibco), %10 fötal dana serumu (FBS, Gibco), %1 Penisilin-Streptomisin (Gibco), 1X esansiyel olmayan amino

asitler (NEAA, Gibco), 10X fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS, Gibco) ve 10X Tripsin (Gibco) kullanıldı.

Hücrelere çeşitli deneyler için Plexin C1 ve İntegrin $\beta 1$ 'in ligandı olan SEMA7A (R&D Systems, ABD) uygulandı. Ayrıca, hücrelere PAK1 inhibitörü olarak IPA-3 (Cayman Chemical, ABD), ROCK1/2 inhibitörü olarak Y-27632 (LC Laboratories, ABD) verildi.

3.4. Hücre Hatları

PLC/PRF/5 ve Hep3B insan HCC hücre hatları Gebze Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü hücre stoğundan, HEK293T hücre hattı ise ATCC'den temin edildi. Tüm hücreler, yüksek glikoz içerikli, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 esansiyel olmayan aminoasitler içeren DMEM besiyerinde büyütüldü.

3.5. Çözelti ve Tamponlar

Tez çalışması için kullanılan solüsyonların içerikleri ve kullanım amaçları tablodaki gibidir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Çözelti ve kimyasal listesi.

Çözelti-Kimyasal	İçeriği	Kullanım Amacı
10X PBS	NaCl 80 g, KCl 2 g, Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O 17,8 g, KH ₂ PO ₄ 2,4 g, 1 L saf su (pH:7,4).	Lizat hazırlığı, hücre kültürü
Dondurma Ortamı	%90 FBS, %10 DMSO.	Hücre dondurma
5X Laemmli Tamponu	%50 Gliserol, %10 SDS, %25 β -merkaptoetanol, 300mM Tris (pH=6,8), %0,25 Bromofenol mavi.	Western Blot
%12'lik SDS-PAGE Ayırma Jeli	4,4 ml ultra saf su, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH:8,8), 100 μ l %10 SDS, 3 ml Ac/Bis (%40), 100 μ l %10 APS, 6 μ l TEMED.	SDS-PAGE jeli

Tablo 3.1: Devamı.

%8'lik SDS-PAGE Ayırma Jeli	5,5 ml ultra saf su, 2,5 ml 1,5M Tris (pH:8,8), 100 µl %10 SDS, 2 ml %40 Ac/Bis, 100 µl %10 APS, 6 µl TEMED.	SDS-PAGE jeli
%4'lük SDS-PAGE İstifleme Jeli	3,15 ml ultra saf su, 1,25 ml 0,5 M Tris (pH:6,8), 50 µl %10 SDS, 0,5 ml %40 Ac/Bis, 50 µl %10 APS, 3 µl TEMED.	SDS-PAGE jeli
Elektroforez Yürütme Tamponu	25 mM Tris, 190 mM glisin, 0,1% SDS.	Western Blot
Transfer Tamponu	25 mM Tris, 190 mM glisin, %20 metanol.	Western Blot
10X TBS	500 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1.5 M NaCl.	Western Blot
TBS-T	1X TBS, %0,05 Tween-20.	Western Blot
SDS Liziz Tamponu	%50 Gliserol, %10 SDS, %25 β-merkaptoetanol, 300mM Tris (pH=6,8).	Total protein lizat tamponu
Bloklama Solüsyonu	%5 Yağsız süt tozu, 1X TBS-T.	Western Blot

3.6. Bakteriler ve Besiyerleri

Escherichia coli DH5α, sıvı Luria-Bertani (LB) (Neogen, ABD) ve katı LB (LB-agar) besiyerlerinde çoğaltıldı. Ticari olarak temin edilen plazmitlerle bakterilerin transformasyonu sonrasında kullanılan besiyerine, plazmitlerdeki antibiyotik direnç genine uygun olarak ampisilin antibiyotiği (Sigma Aldrich, ABD) eklendi.

3.7. Vektörler

Lentiviral sistem için pLKO.1 boş kontrol vektörü (Addgene, #8453) ve Plexin C1 transkriptlerini hedefleyen lentiviral shRNA vektörü (TRCN0000060645, Sigma-

Aldrich) kullanıldı. Viral partiküllerin oluşturulması için pCMV-dR8.2 dvrp (Addgene, #8455) ve pCMV-VSV-G (Addgene, #8454) paketleme vektörleri kullanıldı.

3.8. Antikorlar

Western Blotta Plexin C1 (1 µg/ml, saflaştırılmış PE4 hibridoma süpernatanı), GAPDH (Cell Signaling, 1/5000), cofilin (Cell Signaling, 1/7000), phospho-cofilin (Cell Signaling, 1/1000), LIMK1 (Cell Signaling, 1/1000), LIMK2 (Cell Signaling, 1/1000), phospho-LIMK1/phospho-LIMK2 (Cell Signaling, 1/1000), İntegrin-β1 (Cell Signaling, 1/2000), ERK1/2 (Cell Signaling, 1/4500), phospho-ERK1/2 (Cell Signaling, 1/4500), FAK (Cell Signaling, 1/1500), phospho-FAK (Cell Signaling, 1/1500), anti-mouse-HRP ve anti-rabbit-HRP sekonder antikorları (Advansta, 1/5000) kullanıldı.

3.9. Kitler

SMART BCA protein assay kit (Intron Biotechnology, ABD), Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Almanya), Human RTK Phosphorylation Antibody Array C1 (RayBiotech, ABD), Human Phosphorylation Pathway Profiling Array C55 (RayBiotech, ABD), 96-Well Ras Activation ELISA Kit (Mybiosource, ABD).

4. YÖNTEMLER

4.1. Hücre Hatlarının Kültürü

PLC/PRF/5, Hep3B ve HEK293T hücreleri %10 fetal dana serumu, %1 penisilin-streptomisin ve %1 NEAA ile yüksek glikoz içeren DMEM besiyerinde büyütüldü. Hücreler kültür petrilerinde, 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildi. %80-90 oranında konfluent olan adherent hücreler 1X PBS ile yıkandı, HEK293T 1X Tripsin, diğer hücreler ise 2X Tripsin ile kültür kapları zemininden kaldırılarak yeni kültür petrilerine ihtiyaca göre oranlanarak ekildi.

4.2. Transformasyon ve Plazmitlerin Çoğaltılması

Lentiviral PLXNC1 shRNA, pLKO.1, pCMV-VSV-G (Addgene #8454) ve pCMV-dR8.2 dvrp (Addgene #8455) plazmitlerinden 10'ar ng plazmit, 50 µl ultra kompetant *E. Coli* DH5α ile ayrı ayrı karıştırıldı ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Daha sonra 42°C'de 1,5 dakika tutulduktan sonra 2 dakika buz üzerinde bekletildi. Üzerine 900 µl sıvı LB ilave edilerek 37°C, 180 rpm hızındaki çalkalamalı inkübatörde 1 saat büyütüldü. Transformasyon karışımı 6000 xg'de 1 dakika santrifüj edilerek üst sıvının 900 µl'si atıldı. Kalan 100 µl, 100 µg/ml ampisilin içeren katı LB (LB agar) ortamına drigalski yardımıyla ekildi, 37°C'de 16 saat büyütüldü. Gece boyu inkübasyonun ardından oluşan transforme bakteri kolonileri seçilerek ampisilin içeren sıvı LB besiyerinde daha büyük hacimlerde büyütüldü. Yine gece boyu inkübasyon ile büyütülen transforme bakterilerden plazmit izolasyonu, plazmit izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) ile üreticinin protokolüne uygun biçimde yapıldı. İzole edilen plazmitlerin konsantrasyonu ve OD 260/280 oranı, Nanodrop (Thermo Scientific, ABD) cihazı ile ölçüldü.

4.3. Plexin C1 Hücre Klonlarının Oluşturulması

4.3.1. Viral Partiküllerin Üretilmesi

HEK293T hücreleri, 60 mm petrilere %30 yoğunlukta olacak şekilde ekildi. Ertesi gün PLKO.1 shPLXNC1 ve kontrol pLKO.1 plazmitleri, pCMV-dR8.2 dvrp ve pCMV-VSV-G paketlenme plazmitleri ile 1,5µg:1,5µg:1µg oranında 250 µl Opti-MEM (Thermo Scientific) içerisinde bir tüpte karıştırıldı. Aynı bir tüpte, transfeksiyon aracı olarak kullanılan PEI (Polyethylenimine) 1:3 (DNA µg-ağırlık:PEI µl-hacim) oranında 250 µl Opti-MEM içerisinde hazırlandı. İki karışım birleştirilip 20 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra hücrelerin üzerine yavaşça eklendi. Transfeksiyondan 24 saat sonra besiyeri tazelenildi. Besiyeri değişiminden 48 saat sonra ise hücrelerin üst sıvıları toplandı. 1800 rpm'de 5 dk çöktürülüp üst sıvı 0.45 µm por hacimli filtreden geçirilerek -80°C'de saklandı.

4.3.2. Plexin C1 İfadesi Baskılanmış ve Kontrol Klonlarının Geliştirilmesi

PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre hatları kuyu başı %40 yoğunlukta olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Ertesi gün, Plexin C1'i hedef alan shRNA veya pLKO.1 kontrol plazmitini içeren virüsler, 8 µg/ml Polybren varlığında hücrelere verildi. Transfeksiyon olmayan hücrelerin ölmesi için hücreler plazmitte bulunan antibiyotik direnç genine uygun olan puromisin antibiyotiğiyle 3 pasaj boyunca seçildi. Hücrelerde azalan Plexin C1 ifadesi, Western Blot yöntemi ile gösterildi.

4.4. Western Blotlama

%80-90 hücre yoğunluğuna ulaşan kültür petrilere, 2 kez soğuk PBS ile yıkandıktan sonra 1X fosfataz ve proteaz inhibitörü eklenmiş SDS lizis tamponu ile buz üzerinde 5 dk inkübe edildi. Kazıyıcı ile plakalardan kazınan lizatlar ependorf tüplerine alındı, buz üzerinde 5 dk daha inkübe edildi. Daha sonra lizatlar sonike edilerek

genomik DNA'nın kırılması sağlandı. Son olarak 16.000 xg'de, +4°C'de, 15 dk santrifüjlenerek üst sıvı kısmı protein lizatı olarak -20°C'de saklandı.

Protein konsantrasyonları SMART BCA protein assay kit (Intron Biotechnology, ABD) ile belirlendi. Örnekler Laemmli tamponu eklenerek her birinden 50 µg protein SDS-PAGE jeline yüklenerek yürütme tamponu içerisinde yürütüldü. Moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler, jelden PVDF membranlara (Merck) yarı-kuru transfer yöntemiyle TransBlot (Biorad) cihazı kullanılarak transfer edildi. %0,05 Tween-20 deterjanı içeren TBS (TBS-T)'de hazırlanmış %5 süt tozu ile 1 saat oda sıcaklığında bloklanan membranlar, gece boyunca istenen birincil antikolar ile +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, 3'er kere 5 dk TBS-T ile çalkalanarak yıkanan membranlar, anti-IgG-HRP bağlı ikincil antikolar (birincil antikora bağlı olarak fare ya da tavşan) ile 1 saat boyunca inkübe edildi ve devamında tekrar TBS-T ile yıkandı. Membran üzerindeki protein bantları, WesternBright Sirius ECL (Advansta, ABD) kemilüminesan HRP substrat varlığında ChemiDoc XRS system (Bio-Rad) cihazında görüntülendi.

4.5. Hücrelere SEMA7A Uygulanması

PLC/PRF/5 ve Hep3B hücrelerine ve hücrelerin Plexin C1 baskılanmış shPLXNC1 ve baskılanmamış kontrol PLKO klonlarına, Plexin C1 ve İntegrin β1'in ligandı olan SEMA7A, farklı doz ve sürelerde uygulanarak hücrelerdeki ilgili sinyal yollarının değişimi incelenmiştir.

Hücrelere etki eden uygun SEMA7A dozunun ve süresinin belirlenmesi için yapılan optimizasyonlarda; süre olarak 1 dakikadan 3 saate kadar, konsantrasyon olarak 1 ng/ml'den 200ng/ml'ye kadar SEMA7A uygulandı. Çıkan sonuçlara göre ve literatür de dikkate alınarak daha çok 100 ng/ml konsantrasyon ile 5-10-15 dk boyunca SEMA7A uygulanması üzerine yoğunlaşıldı. İki hücre hattının da PLKO ve shPLXNC1 klonlarında denenecek tek süre ve konsantrasyonun 15 dakika boyunca 100 ng/ml SEMA7A olmasına karar verildi. Çeşitli doz ve sürelerde SEMA7A uygulanan hücrelerden total protein lizatları elde edilerek PLXNC1 ve İntegrin β1 yollarındaki proteinlerin antikolarıyla Western blotta incelendi.

4.6. Hücrelere ROCK1/2 ve PAK1 İnhibitörü Uygulanması

Hücrelere ROCK1/2 inhibitörü olarak Y-27632, PAK1 inhibitörü olarak IPA-3 uygulandı. Hücrelere etki eden doz ve sürelerin belirlenmesi amacıyla doz ve süre optimizasyonu yapıldı. Hücreler inhibitör uygulaması yapılacağı güne %80-85 yoğunlukta olacak şekilde ekildi. ROCK1/2 inhibitörü için konsantrasyon olarak; 10-20-50-100 μ M, süre olarak; 30dk, 1-2-3-6 saat denendi. Uygulamalardan sonra hücrelerden total protein lizatı elde edildi. PAK1 inhibitörü için ise 50 μ M sabit konsantrasyonda 30dk, 1-2-3-6 saat süreleri denendi. PLXNC1'in baskılanmadığı kontrol PLKO hücrelerinde yapılan optimizasyonların ardından inhibitörler için seçilen doz ve süre PLXNC1 baskılanmış hücre klonlarına da uygulandı. Buna göre, ROCK1/2 inhibisyonu için 50 μ M, 30 dk Y-27632, PAK1 inhibisyonu için ise 50 μ M, 6 saat IPA-3 uygulamaları gerçekleştirildi. Bu uygulamalar sonucu hücrelerden elde edilen total protein lizatları, LIMK/Kofilin yolağındaki proteinlerin uygun antikoları kullanılarak Western blot ile analiz edildi. Her iki inhibitör için de kontrol koşulu olarak hücrelere inhibitörlerin çözücü maddesi olan DMSO verildi.

4.7. Human RTK Phosphorylation Antibody Array C1

Reseptör tirozin kinazların (RTK) ve bazı reseptör olmayan tirozin kinazların (non-RTK) fosforilasyonlarını tespit etmek için kullanılan kit, üreticinin talimatları doğrultusunda kullanıldı (Şekil 4.1).

PLC PLKO, PLC shPLXNC1, Hep3B PLKO ve Hep3B shPLXNC1 hücreleri, 100 mm kültür petrilere ekilerek %85-90 yoğunluğa ulaştıklarında kitin içinde bulunan liziz tamponu ile protein lizatı işlemine başlandı. Hücreler iki kez soğuk 1X PBS ile yıkandıktan sonra, taze olarak proteaz ve fosfataz inhibitörü eklenmiş liziz tamponu, petrilereki hücrelerin üstüne verildi. Liziz tamponu ile hücreler pipetlenerek petriden ayrılmalari sağlandı. Petrilere +4°C'de çalkalayıcı üzerinde hafifçe sallanarak 30 dk inkübe edildi. Daha sonra hücreler, hücre kazıyıcıların yardımıyla toplanarak santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler +4°C'de, 14.000 xg'de, 10 dk santrifüj edilerek hücrenin total proteinlerini içeren üst sıvı yeni tüplere aktarıldı. Total protein

konsantrasyonu, SMART BCA protein assay kit ile belirlendi. Protein lizatları, küçük hacimlere bölünerek -80°C’de saklandı.

Kit içinde tirozin kinazların emdirildiği spotları içeren membranlar, öncelikle 1 saat oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde, kitteki bloklama solüsyonu ile inkübe edildi. Her bir hücreden, kitin istediği protein aralığı (50-1000 µg) içerisine girecek şekilde, eşit miktarda protein kullanıldı. Proteinler bloklama solüsyonu ile seyreltilerek membranların üzerine eklendi. Membranlar +4°C’de, 45 rpm hız ile çalkalanarak gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün membranlar 3 kez “Wash buffer I”, 3 kez “Wash buffer II” solüsyonuyla, her yıkama 5 dakika sürecek şekilde, oda sıcaklığında çalkalanarak yıkandı. Yıkamanın ardından membranlar, biotinlenmiş antikor kokteyli ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. Membranlar tekrar yıkanarak 1/1000 streptavidin-HRP ile oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından tekrar yıkama işlemi yapılarak görüntüleme işlemine geçildi. Membranlar kitin HRP substrat solüsyonlarıyla inkübe edildikten sonra oluşan kemilüminesans reaksiyon, Biorad ChemiDoc XRS cihazında görüntülendi.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS1	POS1	POS2	POS2	POS3	POS3	ABL1	ABL1	ACK1	ACK1	ALK	ALK
2	NEG	NEG	NEG	NEG	Axl	Axl	Blk	Blk	BMX	BMX	Btk	Btk
3	Csk	Csk	Dtk	Dtk	EGFR	EGFR	EphA1	EphA1	EphA2	EphA2	EphA3	EphA3
4	EphA4	EphA4	EphA5	EphA5	EphA6	EphA6	EphA7	EphA7	EphA8	EphA8	EphB1	EphB1
5	EphB2	EphB2	EphB3	EphB3	EphB4	EphB4	EphB6	EphB6	ErbB2	ErbB2	ErbB3	ErbB3
6	ErbB4	ErbB4	FAK	FAK	FER	FER	FGFR1	FGFR1	FGFR2	FGFR2	FGFR2 (α isoform)	FGFR2 (α isoform)
7	Fgr	Fgr	FRK	FRK	Fyn	Fyn	Hck	Hck	HGFR	HGFR	IGF-IR	IGF-IR
8	Insulin R	Insulin R	Itk	Itk	JAK1	JAK1	JAK2	JAK2	JAK3	JAK3	LCK	LCK
9	LTK	LTK	Lyn	Lyn	MATK	MATK	M-CSFR	M-CSFR	MUSK	MUSK	NGFR	NGFR
10	PDGFR-α	PDGFR-α	PDGFR-β	PDGFR-β	PYK2	PYK2	RET	RET	ROR1	ROR1	ROR2	ROR2
11	ROS	ROS	RYK	RYK	SCFR	SCFR	SRMS	SRMS	SYK	SYK	Tec	Tec
12	Tie-1	Tie-1	Tie-2	Tie-2	TNK1	TNK1	TRKB	TRKB	TXK	TXK	NEG	NEG
13	Tyk2	Tyk2	TYRO10	TYRO10	VEGFR2	VEGFR2	VEGFR3	VEGFR3	ZAP70	ZAP70	POS4	POS4

Şekil 4.1: Protein tirozin kinaz fosforilasyon array haritası.

4.8. Human Phosphorylation Pathway Profiling Array C55

Hücrelerdeki bilinen 5 farklı sinyal yolağında (MAPK, AKT, JAK/STAT, NF- κ B, ve TGF- β) yer alan proteinlerin fosforilasyon düzeylerini tespit etmek için kullanılan kit, üreticinin talimatları doğrultusunda kullanıldı (Şekil 4.2).

PLC PLKO, PLC shPLXNC1, Hep3B PLKO ve Hep3B shPLXNC1 hücreleri, 100 mm kültür petrilere ekilerek %85-90 yoğunluğa ulaştıklarında kitin içinde bulunan liziz tamponu ile protein lizatı işlemine başlandı. Hücreler iki kez soğuk 1X PBS ile yıkandıktan sonra, taze olarak proteaz ve fosfataz inhibitörü eklenmiş liziz tamponu, petrilere hücrelerin üstüne verildi. Liziz tamponu ile hücreler pipetlenerek petriden ayrılmalari sağlandı. Petrilere +4°C'de çalkalayıcı üzerinde hafifçe sallanarak 30 dk inkübe edildi. Daha sonra hücreler, hücre kazıyıcıların yardımıyla toplanarak santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler +4°C'de, 14.000 xg'de, 10 dk santrifüj edilerek hücrenin total proteinlerini içeren üst sıvı yeni tüplere aktarıldı. Total protein konsantrasyonu, SMART BCA protein assay kit ile belirlendi. Protein lizatları, küçük hacimlere bölünerek -80°C'de saklandı.

Kit içinde sinyal yollarındaki proteinlerin emdirildiği spotları içeren membranlar (her sinyal yolağı için ayrı bir membran), öncelikle 1 saat oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde, kitteki bloklama solüsyonu ile inkübe edildi. Her bir hücreden, kitin istediği protein aralığı (50-1000 μ g) içerisine girecek şekilde, eşit miktarda protein kullanıldı. Proteinler bloklama solüsyonu ile seyreltilerek membranların üzerine eklendi. Membranlar +4°C'de, 45 rpm hız ile çalkalanarak gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün membranlar 3 kez "Wash buffer I", 3 kez "Wash buffer II" solüsyonuyla, her yıkama 5 dakika sürecek şekilde, oda sıcaklığında çalkalanarak yıkandı. Yıkamanın ardından membranlar, "detection antibody cocktail" ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. Membranlar tekrar yıkanarak 1/1000 anti-Rabbit IgG-HRP ile oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından tekrar yıkama işlemi yapılarak görüntüleme işlemine geçildi. Membranlar kitin HRP substrat solüsyonlarıyla inkübe edildikten sonra oluşan kemilüminesans reaksiyon, Biorad ChemiDoc XRS cihazında görüntülendi.

ARRAY 1 (MAPK Pathway)

Each antibody is spotted in duplicate vertically		A	B	C	D	E	F	G	H
	1	POS	POS	NEG	NEG	IC	CREB (S133)	ERK1 (T202/Y204)	IC
	2							ERK2 (Y185/Y187)	
	3	IC	HSP27 (S82)	JNK (T183)	MEK (S217/221)	MKK3 (S189)	MMK6 (S207)	MSK2 (S360)	IC
	4								
	5	p38 (T180/Y182)	P53 (S15)	IC	RSK1 (S380)	RSK2 (S386)	NEG	NEG	POS
6									

ARRAY 2 (AKT Pathway)

Each antibody is spotted in duplicate vertically		A	B	C	D	E	F	G	H
	1	POS	POS	NEG	NEG	AKT (S473)	AMPKa (T172)	BAD (S112)	4E-BP1 (T36)
	2								
	3	IC	GSK3a (S21)	GSK3b (S9)	mTOR (S2448)	p27 (T198)	IC	P70S6K (T421/S424)	PDK1 (S241)
	4								
	5	PRAS40 (T246)	PTEN (S380)	RAF-1 (S301)	RPS6 (S235/236)	IC	IC	NEG	POS
6									

ARRAY 3 (JAK/STAT Pathway)

Each antibody is spotted in duplicate vertically		A	B	C	D	E	F	G	H
	1	POS	POS	NEG	EGFR (Ser1070)	JAK1 (Tyr1022)	JAK2 (Tyr1007/1008)	SHP1 (Ser591)	SHP2 (Tyr542)
	2								
	3	Src (Tyr419)	Stat1 (Ser727)	Stat2 (Tyr689)	Stat3 (Tyr705)	Stat5 (Tyr694)	Stat6 (Tyr641)	TYK2 (Tyr1054)	POS
4									

ARRAY 4 (NFkB Pathway)

Each antibody is spotted in duplicate vertically		A	B	C	D	E	F	G	H
	1	POS	POS	NEG	NEG	ATM (S1981)	eIF2a (S51)	HDAC2 (S394)	HDAC4 (S632)
	2								
	3	IkBa (S32)	MSK1 (S376)	NFkB (S536)	IC	TAK1 (S412)	TBK1 (S172)	ZAP70 (Y292)	POS
4									

ARRAY 5 (TGfB Pathway)

Each antibody is spotted in duplicate vertically		A	B	C	D	E	F	G	H
	1	POS	POS	NEG	NEG	ATF2 (T69/71)	C-Fos (T232)	c-Jun (S73)	SMAD1 (S463/465)
	2								
	3	SMAD2 (S245/250/255)	SMAD4 (T277)	SMAD5 (S463/465)	IC	NEG	NEG	NEG	POS
4									

Şekil 4.2: Sinyal yollarının array haritası.

4.9. Ras Aktivasyon ELISA Kiti

Hücrelerdeki aktif Ras (Ras-GTP) düzeyini belirlemek için kullanılan kit, üreticinin talimatları doğrultusunda kullanıldı.

PLC PLKO, PLC shPLXNC1, Hep3B PLKO ve Hep3B shPLXNC1 hücreleri, duplike olacak şekilde 100 mm kültür petrilere ekilerek %85-90 yoğunluğa ulaştıklarında,

kültürlerden birine 100 ng/ml konsantrasyonda 15 dk SEMA7A uygulandı. Uygulama yapılan ve yapılmayan hücrelerden, kitin içinde bulunan liziz tamponu kullanılarak protein lizatı hazırlama işlemlerine başlandı. Hücreler iki kez soğuk 1X PBS ile yıkandıktan sonra, taze olarak proteaz ve fosfataz inhibitörü eklenmiş liziz tamponu, petriplerdeki hücrelerin üstüne eklendi. Hücreler buz üzerinde 20 dk inkübe edildikten sonra, hücre kazıyıcı yardımıyla petriplerden toplanarak santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler +4°C'de, 14.000 xg'de, 10 dk santrifüj edilerek hücrenin total proteinlerini içeren üst sıvı yeni tüplere aktarıldı. Total protein konsantrasyonu, SMART BCA protein assay kit ile belirlendi. Protein lizatları, küçük hacimlere bölündükten sonra sıvı azota batırılıp şok dondurma yapıldıktan sonra -80°C'ye kaldırıldı.

Raf-1 RBD proteini kaplama solüsyonu içinde hazırlanarak kitteki ELISA plakasına 1 saat oda sıcaklığında kaplandı. Bekleme süresinde kuyulara eklenecek örnekler ile pozitif ve negatif kontroller hazırlandı. Kontroller için ayrılan lizatlara 0,5 M EDTA eklendikten sonra; pozitif kontrollere GTPγS, negatif kontrollere GDP ilave edildi. Tüpler 30 dk boyunca 30°C'de çalkalanarak inkübe edildikten sonra, reaksiyon 1 M MgCl₂ ile durduruldu. Her örnek için pozitif ve negatif kontrol ile örnekten 50 µg ELISA plakasının kuyucuklarına eklendi. 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildikten sonra kuyular 5 kere yıkandı. Daha sonra, kuyulara anti-pan-Ras antikoru eklenerek tekrar 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Süre sonunda, tekrar 5 kez yıkamanın ardından kuyulara HRP bağlı sekonder antikor eklenerek 1 saat daha beklendi. Son olarak, tekrar yıkamanın ardından kuyulara kemilüminesans substrat ilave edilerek 5 dk beklendi. Ardından oluşan lüminesans ışımaya, Thermo Scientific Varioskan LUX ile görüntülendi.

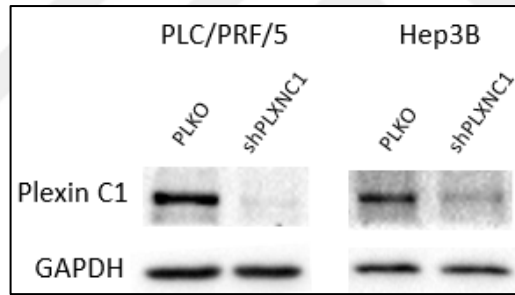
4.10. İstatistiksel Analizler

Western blot bantlarının ve array'deki noktaların yoğunlukları ImageJ programı ile analiz edildi. Tirozin kinazlar ve sinyal yollarıyla ilgili kitlerin detaylı analizleri üreticinin hazırladığı analiz programı ile yapıldı. İstatistiksel analizler ise GraphPad Prism 6 programı kullanılarak "Student's t-test" ile gerçekleştirildi.

5. BULGULAR

5.1. HCC Hücre Hatlarında shPLXNC1 ve PLKO Klonlarının Geliştirilmesi

Plexin C1 proteininin hücre içindeki sinyal yollarını nasıl etkilediğini incelemek amacıyla, endojen PLXNC1 ifadesine sahip PLC/PRF/5 ve Hep3B HCC hücre hatlarında, lentiviral shRNA kullanılarak PLXNC1 proteinin ifadesi baskılandı. Plexin C1 ifadesi baskılanmış hücreler shPLXNC1 olarak adlandırılırken ifadesi baskılanmamış kontrol hücreleri PLKO olarak adlandırıldı. Hücrelerdeki baskılamanın doğrulanması, PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarından izole edilen total protein lizatları kullanılarak, Western blotta Prof. Dr. Tamer Yağcı ve ekibi tarafından geliştirilen anti-PLXNC1 PE4 hibridomasından [30] elde edilen antikor ile yapıldı (Şekil 5.1).

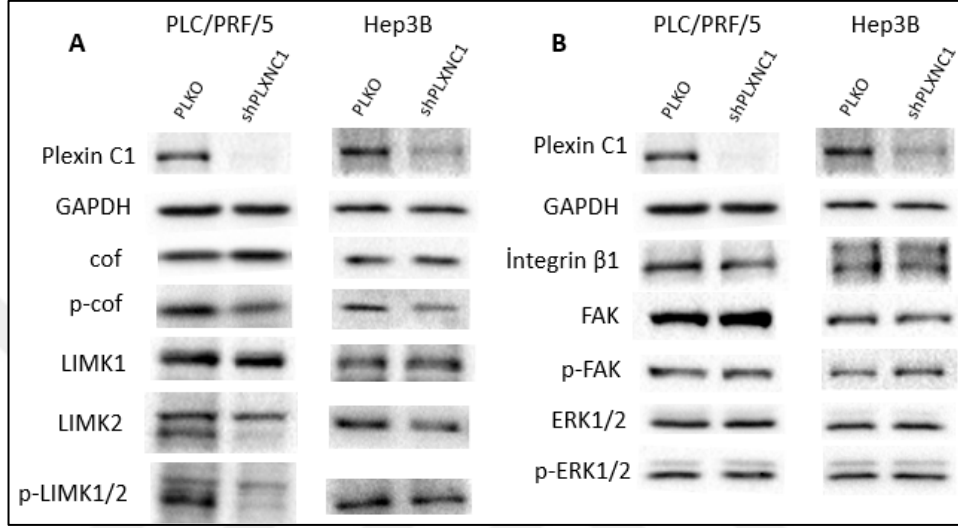


Şekil 5.1: Plexin C1 ifadesi baskılanmış hücre klonlarının Western blot ile doğrulanması. Eş yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanılmıştır.

5.2. Hücre Klonlarında SEMA7A Bağımlı ve Bağımsız Sinyal Yollarının İncelenmesi

PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre hatlarında Plexin C1'in etkilediği sinyal yollarını araştırmak için bu hücrelerden PLXNC1 ifadesinin baskılandığı hücre klonları oluşturuldu. PLXNC1'in baskılandığı shPLXNC1 ve baskılanmadığı PLKO kontrol hücre klonlarından elde edilen total protein lizatları, PLXNC1 ve İntegrin β 1 yolağı açısından Western blot ile incelendi (Şekil 5.2). Her iki hücre hattında da shPLXNC1 durumunda Plexin C1 yolağında farklı düzeylerde total LIMK1 ve LIMK2 ifadesi görülürken,

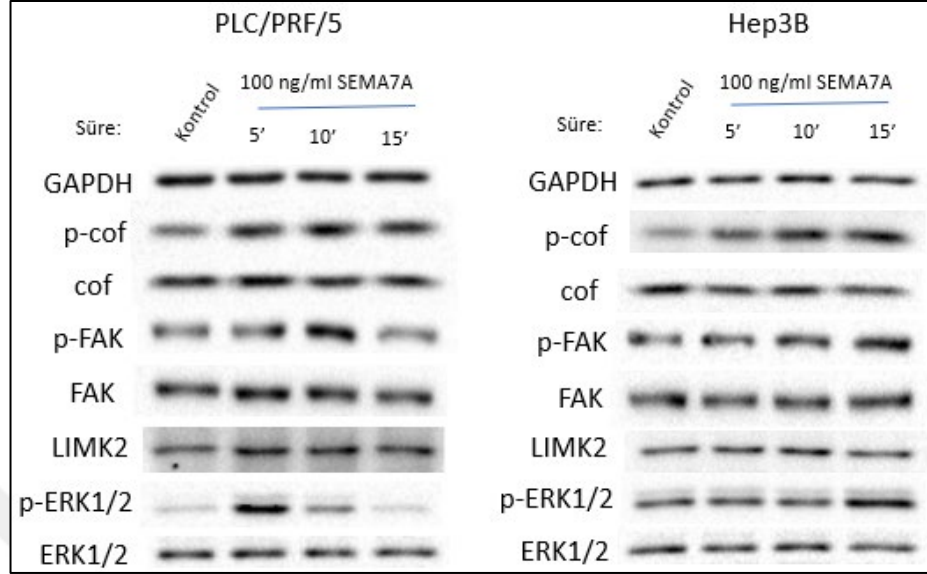
LIMK'lerin fosforillenme seviyelerinde ise azalma olduğu saptandı. Her iki hücrenin shPLXNC1 klonlarında kofilin fosforilasyonunda da azalma tespit edildi. Plexin C1'in İntegrin $\beta 1$ ile olan ilişkisini incelemek için hücre klonlarında İntegrin $\beta 1$ yolağı elemanlarının fosforilasyon düzeyleri incelendi. Ancak, hücre klonları arasında FAK ve ERK1/2 fosforilasyonunda belirgin bir değişim görülmedi.



Şekil 5.2: PLXNC1 ifadesi baskılanmış PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarında ligand bağımsız durumda Plexin C1 ve İntegrin $\beta 1$ sinyal yollarındaki değişimin incelenmesi. A) Plexin C1 sinyal yolağındaki değişim. Eş yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanılmıştır. B) İntegrin $\beta 1$ sinyal yolağındaki değişim. Eş yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanılmıştır.

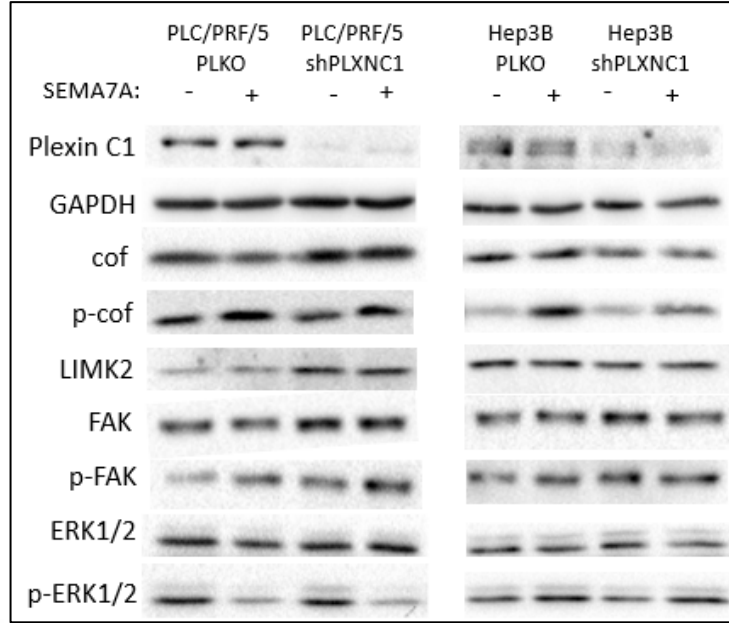
Hücre klonlarındaki Plexin C1 ve İntegrin $\beta 1$ sinyal yolları, iki reseptörün de ligandı olan SEMA7A varlığında da incelendi. HCC hücreleri PLC/PRF/5 ve Hep3B için SEMA7A uyarısının uygun doz ve süre uygulama koşulları bilinmediğinden, öncelikle optimizasyon için PLKO hücrelerine farklı konsantrasyon ve sürelerde rekombinant SEMA7A uygulandı. Ligand uygulanmayan kontrol hücrelerine oranla ligand uygulanmış hücrelerde PLXNC1'e bağlı kofilin fosforilasyonundaki değişime bakılarak uygun doz ve süre seçildi. İlk optimizasyonun ardından belirlenen 100 ng/ml konsantrasyon ile 5-10-15 dk süreleri tekrar denendi (Şekil 5.3). İki hücre hattında da SEMA7A uygulanmasının 5. dakikasından itibaren kofilin fosforilasyonunda artış görüldü. PLC/PRF/5 hücresinde 10. dk'da FAK fosforilasyonunda artış tespit edilirken

ERK1/2 fosforilasyonu 5. dk'da artarak ilerleyen dakikalarda azaldı. Hep3B hücre hattında ise FAK ve ERK1/2 fosforilasyonunun 15. dakikada artış gösterdiği saptandı.



Şekil 5.3: PLC/PRF/5 ve Hep3B hücrelerinin PLKO klonlarında SEMA7A optimizasyonu. PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre hatlarına 5-10-15 dk değişen sürelerde 100 ng/ml SEMA7A uygulanmış, kontrol hücrelerine SEMA7A uygulanmamıştır. Eş yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanılmıştır.

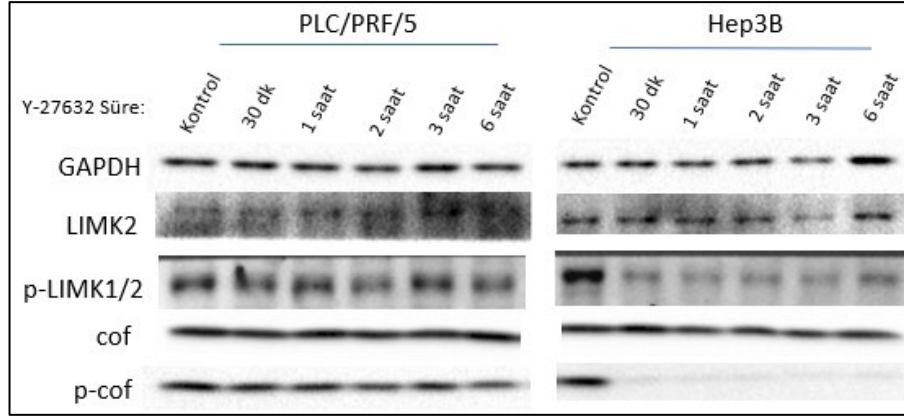
Optimizasyonlar sonrası seçilen süre (15 dk) ve doz (100 ng/ml), her iki hücre hattının PLKO ve shPLXNC1 klonlarına uygulandı (Şekil 5.4). Her iki hücrede de PLXNC1 varlığında ve yokluğunda, ortama ligand SEMA7A eklendiğinde elde edilen total protein lizatlarında kofilin fosforilasyonunun ligand olmayan duruma göre bir miktar arttığı görüldü. İntegrin $\beta 1$ yolağında ise, PLC PLKO ve shPLXNC1'de 15 dk ligand ile muamelenin ardından ligand olmayan duruma göre ERK1/2 fosforilasyonunun azaldığı görülürken, Hep3B'de tam tersi olarak ERK1/2 fosforilasyonunda artış gözlemlendi. FAK fosforilasyonunun her iki hücre için de ligand varlığında kısmi olarak arttığı görüldü.



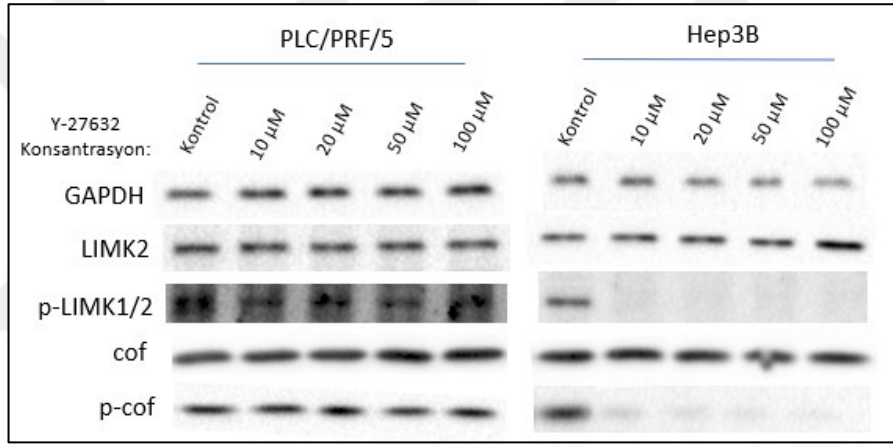
Şekil 5.4: PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre hatlarının PLKO ve shPLXNC1 klonlarına 100 ng/ml, 15 dk SEMA7A uygulanması sonucu PLXNC1 ve İntegrin β 1 yolağının incelenmesi. Eş yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanılmıştır.

5.3. Hücrelere ROCK1/2 ve PAK1 İnhibitörü Uygulanması

PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre hatlarındaki kofilin fosforilasyonunun, Rho-GTP/ROCK1-2 veya Rac-GTP/PAK1 yolakları üzerinden olup olmadığını tespit etmek için hücrelere ilgili kinazların inhibitörleri uygulandı. Bu yolakların PLXNC1 ile olan ilişkisini göstermek için inhibitörler aynı zamanda PLXNC1 baskılanmış hücre klonlarına da verildi. Hücrelerdeki kofilin fosforilasyonunun değişimi Western blot ile incelenerek analiz edildi. Önce, ROCK1/2 inhibitörü Y-27632'nin optimizasyonu için kontrol PLKO hücrelerinde farklı süre ve konsantrasyonlarda inhibitör denendi (Şekil 5.5 ve Şekil 5.6). İlk olarak, hücrelere 50 μ M sabit konsantrasyonda 30 dk'dan 6 saate kadar Y-27632 uygulandı. Hep3B hücrelerinde 30 dakikadan itibaren LIMK fosforilasyonu ve buna bağlı olarak kofilin fosforilasyonunda ciddi bir azalma tespit edilirken PLC/PRF/5 hücrelerinde belirgin bir azalma görülmedi. Devamında, hücrelere 30 dk sabit süre ile 10 μ M'dan 100 μ M'a kadar değişen konsantrasyonlarda Y-27632 uygulandı. Yine Hep3B'de 10 μ M'dan itibaren LIMK ve kofilin fosforilasyonu kaybolurken PLC/PRF/5'te fosforilasyon düzeylerinde anlamlı bir değişim görülmedi.

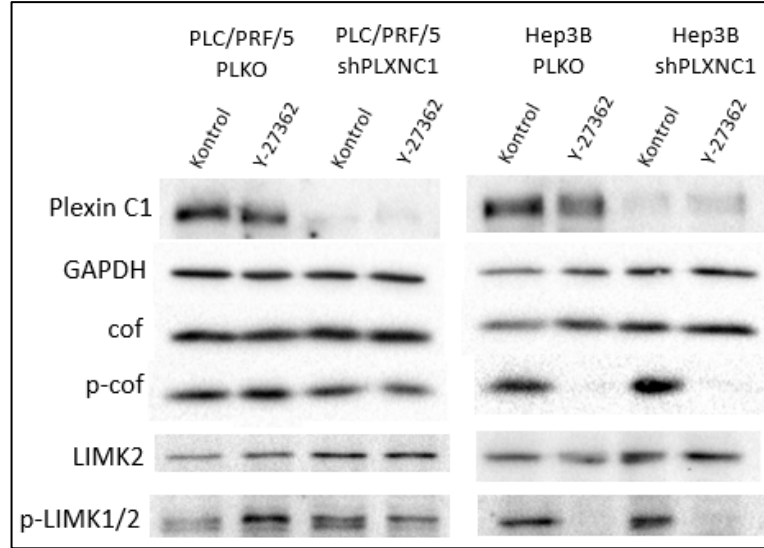


Şekil 5.5: HCC hücre hatlarında ROCK1/2 inhibitörü Y-27632'nin 50 µM sabit konsantrasyon ile süre denemesi. Kontrol hücrelerine inhibitörün çözücüsü olan DMSO verilmiştir. Eş yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanılmıştır.



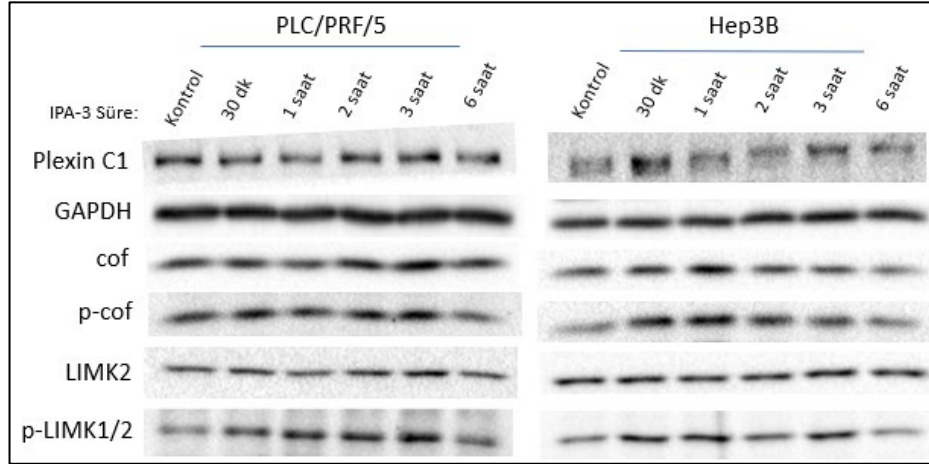
Şekil 5.6: HCC hücre hatlarında ROCK1/2 inhibitörü Y-27632'nin 30 dk sabit süre ile konsantrasyon denemesi. Kontrol hücrelerine inhibitörün çözücüsü olan DMSO verilmiştir. Eş yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanılmıştır.

Hep3B hücreleri için belirlenen 30 dk, 50 µM Y-27632 koşulları, ROCK1/2 kinazlarının PLXNC1 ile olan ilişkisini araştırmak için shPLXNC1 klonlarına da uygulandı. Her ne kadar PLC/PRF/5 hücrelerindeki LIMK ve kofilin fosforilasyon düzeylerinde belirgin bir değişim görülmemiş olsa da aynı koşullar PLC/PRF/5 shPLXNC1 hücrelerinde de test edildi (Şekil 5.7). Hep3B hücrelerinin shPLXNC1 klonlarında da inhibitör verildiğinde LIMK ve kofilin fosforilasyonunun kaybolduğu görüldü. PLC/PRF/5 hücrelerinde ise PLXNC1'in baskılandığı durumda da fosforilasyon düzeylerinde herhangi bir değişim görülmedi.



Şekil 5.7: HCC hücre hatlarının PLKO ve shPLXNC1 klonlarında ROCK1/2 inhibitörü Y-27362'nin LIMK2/Kofilin yolağına etkisi. Kontrol hücrelerine inhibitörün çözücüsü olan DMSO verilmiştir. Eş yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanılmıştır.

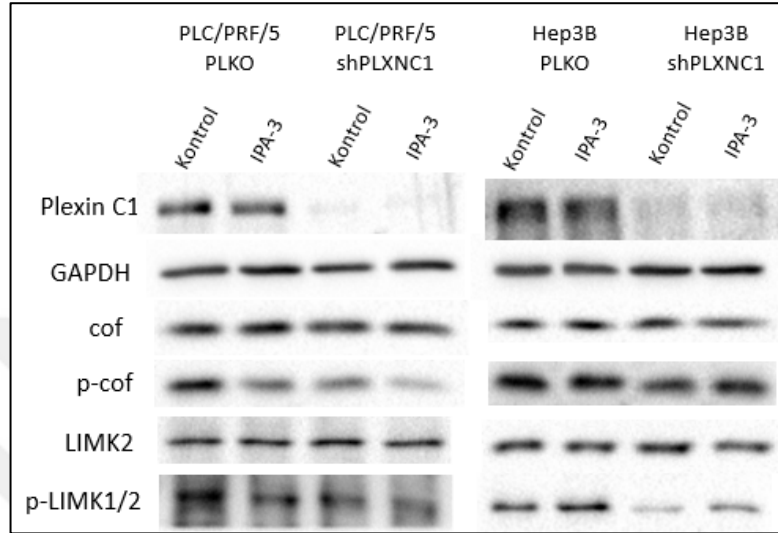
PAK1 inhibitörü IPA-3 için 50 μ M sabit konsantrasyonda 30 dk'dan 6 saate kadar süre optimizasyonu yapıldı (Şekil 5.8). PLC/PRF/5 hücrelerinde 6. saatte kofilin fosforilasyonunda kısmi bir azalma görülürken Hep3B hücrelerindeki fosforilasyon düzeylerinde belirgin bir değişim görülmedi.



Şekil 5.8: HCC hücre hatlarında PAK1 inhibitörü IPA-3'ün 50 μ M sabit konsantrasyon ile süre denemesi. Kontrol hücrelerine inhibitörün çözücüsü olan DMSO verilmiştir. Eş yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanılmıştır.

PLC/PRF/5 hücrelerinde kısmen etkili olduğu görülen 50 μ M, 6 saat IPA-3 koşulları, PAK1'in PLXNC1 ile olan ilişkisini araştırmak için her iki her hücre hattının

shPLXNC1 klonuna uygulandı (Şekil 5.9). PLC/PRF/5 hücrelerinde shPLXNC1 durumunda da PAK1 inhibitörü uygulandığında kofilin fosforilasyonunda kısmi bir azalma gözlemlenirken, Hep3B hücre klonlarında inhibitöre bağlı herhangi bir fosforilasyon değişimi tespit edilemedi.

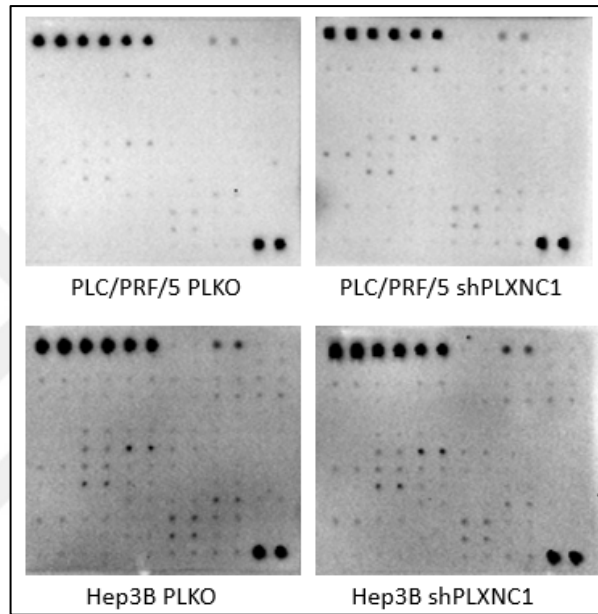


Şekil 5.9: HCC hücre hatlarının PLKO ve shPLXNC1 klonlarında PAK1 inhibitörü IPA-3'ün LIMK2/Kofilin yolağına etkisi. Kontrol hücrelerine inhibitörün çözücüsü olan DMSO verilmiştir. Eş yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanılmıştır.

5.4. Plexin C1-Bağımlı Tirozin Kinaz Fosforilasyonlarının Tespit Edilmesi

Hücrelerde Plexin C1'e bağlı olarak değişen reseptör tirozin kinaz (RTK) ve bazı reseptör olmayan tirozin kinazların (non-RTK) fosforilasyon düzeylerini tespit etmek amacıyla çeşitli tirozin kinazların fosforilasyon seviyelerini tespit edebilen ticari bir kit kullanıldı. Bunun için, PLXNC1'in baskılandığı ve baskılanmadığı kontrol hücre klonlarından elde edilen total protein lizatları kullanılarak kitin talimatları izlendi. Kit sonucu elde edilen membran görüntüleri (Şekil 5.10), ImageJ programının "Protein Array Analyzer" eklentisi ile sayısal değerlere çevrildikten sonra, kitin sağladığı analiz aracı ile değerlendirildi. PLC PLKO-shPLXNC1 ve Hep3B PLKO-shPLXNC1 kendi aralarında değerlendirildikten sonra iki hücre için de ortak olarak fosforilasyonu artan ve azalan proteinler belirlendi.

Kit, 71 farklı tirozin kinazın fosforilasyon düzeyini tespit etmeye olanak sağlamaktadır. PLC/PRF/5 hücre hattında, shPLXNC1 durumunda PLKO'ya göre 34 tirozin kinazın fosforilasyonu artarken, 11 tirozin kinazın fosforilasyonu azalmıştır. Hep3B hücre hattında ise shPLXNC1 durumunda PLKO'ya göre 15 tirozin kinazın fosforilasyonu artarken, 26 tirozin kinazın fosforilasyonu azalmıştır. İki hücre hattında da shPLXNC1 durumunda ortak olarak fosforilasyonu artan 9 tirozin kinaz tespit edilirken, fosforilasyonu azalan 8 tirozin kinaz bulunmuştur (Tablo 5.1).



Şekil 5.10: “Human RTK Phosphorylation Antibody Array C1” membran görüntüleri.

Tablo 5.1: PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarında ortak olarak fosforilasyonu artan veya azalan tirozin kinazlar.

PLXNC1 baskılandığında iki hücre hattında da fosforilasyonu artan tirozin kinazlar	PLXNC1 baskılandığında iki hücre hattında da fosforilasyonu azalan tirozin kinazlar
BMX	EphA4
ErbB3	EphB2
FGFR2/FGFR2 (α isoform)	EphB4
IGF-1R	ErbB4
JAK2	FAK
NGFR	Fgr
PDGFR- α	Tie-1
SCFR	Tie-2
TXK	

5.5. Hücre İçi Sinyal Yolaklarındaki Protein Fosforilasyonlarının Tespit Edilmesi

Plexin C1'e bağlı olarak hücre içinde bilinen 5 farklı sinyal yolağındaki proteinlerin değişen fosforilasyon düzeylerini tespit etmek amacıyla MAPK, AKT, JAK/STAT, NF-κB, ve TGF-β sinyal yolaklarındaki proteinlerin fosforilasyonunu tespit edebilen bir kit kullanıldı. Bunun için, PLXNC1'in baskılandığı ve baskılanmadığı kontrol hücre klonlarından elde edilen total protein lizatları kullanılarak kitin talimatları izlendi. Kit sonucu elde edilen membran görüntüleri (Şekil 5.11), ImageJ programının "Protein Array Analyzer" eklentisi ile sayısal değerlere çevrildikten sonra, kitin sağladığı analiz aracı ile değerlendirildi. PLC PLKO-shPLXNC1 ve Hep3B PLKO-shPLXNC1 kendi aralarında değerlendirildikten sonra her sinyal yolağında iki hücre için de ortak olarak fosforilasyonu artan ve azalan proteinler belirlendi.

Kit, totalde 56 farklı proteinin fosforilasyon düzeyini tespit etmeye olanak sağlamaktadır. MAPK yolağından 13, AKT yolağından 14, JAK/STAT yolağından 12, NF-κB yolağından 10 ve TGF-β yolağından 7 protein bulunmaktadır.

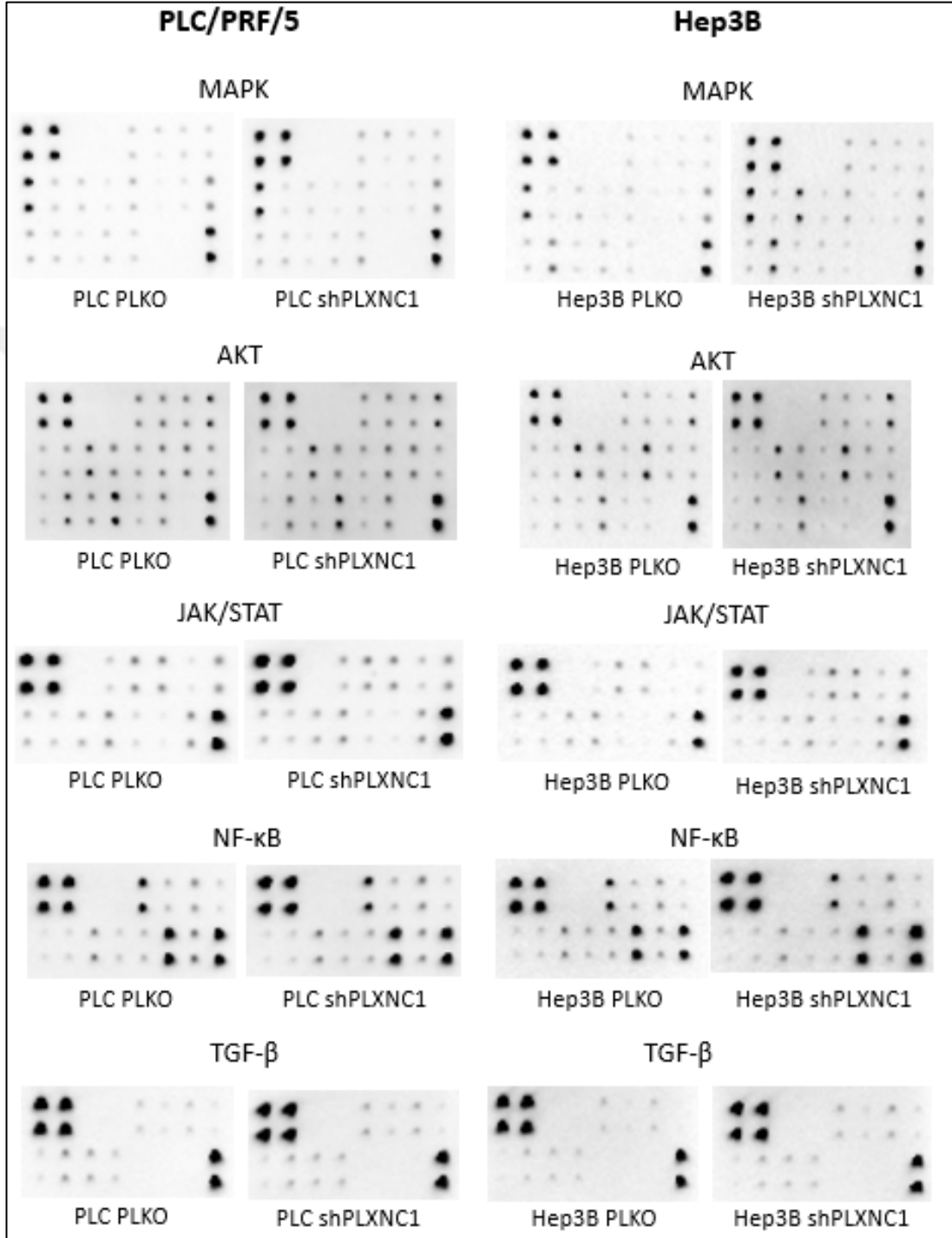
PLC/PRF/5 hücre hattının, shPLXNC1 klonunda PLKO klonuna göre:

- MAPK yolağında fosforilasyonu artan 3, fosforilasyonu azalan 2,
- AKT yolağında fosforilasyonu azalan 8,
- JAK/STAT yolağında fosforilasyonu artan 2,
- NF-κB yolağında fosforilasyonu azalan 1,
- TGF-β yolağında fosforilasyonu artan 3, fosforilasyonu azalan 2 protein tespit edilmiştir.

Hep3B hücre hattının, shPLXNC1 klonunda PLKO klonuna göre:

- MAPK yolağında fosforilasyonu artan 8,
- AKT yolağında fosforilasyonu azalan 6,
- JAK/STAT yolağında fosforilasyonu artan 8,
- NF-κB yolağında fosforilasyonu azalan 8,
- TGF-β yolağında fosforilasyonu artan 6 protein tespit edilmiştir.

İki hücre hattının shPLXNC1 klonlarında incelenen 5 sinyal yolağında ortak olarak fosforilasyonu artan veya azalan 6'şar protein bulunmuştur. Ortak proteinlerin sinyal yollarına göre dağılımı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 5.2).



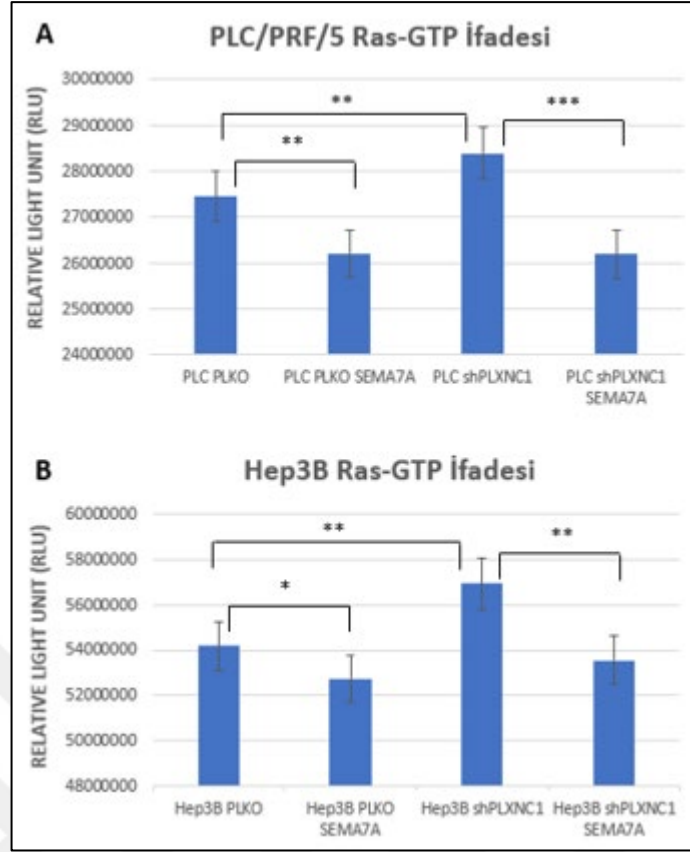
Şekil 5.11: “Human Phosphorylation Pathway Profiling Array C55” membran görüntüleri.

Tablo 5.2: PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarında 5 farklı hücre içi sinyal yolağında ortak olarak fosforilasyonu artan veya azalan proteinler.

Sinyal Yolakları	PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre hatlarında ortak olarak fosforilasyon düzeyleri artan veya azalan proteinler	PLXNC1 baskılandığında hücredeki fosforilasyon düzeyi
MAPK	CREB	PLXNC1 baskılandığında fosforilasyon artmış
AKT	Raf-1, PRAS40, Gsk3a, mTor, p27	PLXNC1 baskılandığında fosforilasyon azalmış
JAK/STAT	SHP1 (Ser591), EGFR (Ser1070)	PLXNC1 baskılandığında fosforilasyon artmış
NF-κB	ZAP70 (Y292)	PLXNC1 baskılandığında fosforilasyon azalmış
TGF-β	ATF2, c-Jun, c-Fos	PLXNC1 baskılandığında fosforilasyon artmış

5.6. Hücrelerdeki Ras-GTP İfadesinin Tespit Edilmesi

HCC hücre klonlarında PLXNC1'in Ras-GAP aktivitesini (Ras-GTP'nin Ras-GDP'ye dönüşümü) incelemek için hücrelerdeki Ras-GTP ifadesini ölçen ticari bir kit kullanıldı. Bu kit, Ras'ın aktifleştiği durumda (Ras-GTP hali) Raf-1 proteininin "Ras-Binding Domain" (RBD) bölgesine bağlanması prensibine dayanmaktadır. PLXNC1'in baskılandığı ve baskılanmadığı hücre klonlarında, SEMA7A bağımlı ve bağımsız durumlarda elde edilen total protein lizatlarındaki Ras-GTP'ler (H-, K-, N-Ras formları), ELISA plakasındaki Raf-1 RBD proteinine bağlanarak anti-Pan-Ras ve sekonder antikolar yardımıyla kemilüminesans olarak görüntülendi. Sonuçlar, GraphPad Prism programı kullanılarak "Student's t-test" ile analiz edildi (Şekil 5.12). İki hücre hattında da PLXNC1 baskılanmamış kontrol hücrelerine (PLKO) 100 ng/ml konsantrasyonda 15 dk SEMA7A uygulandığında hücrelerdeki Ras-GTP ifadesinde azalma görüldü. Hücrelerde PLXNC1 baskılanmış hücre klonlarında (shPLXNC1) kontrol hücrelerine (PLKO) göre Ras-GTP ifadesinin arttığı gözlemlendi. Hücrelerde PLXNC1 ifadesinin baskılandığı durumda hücrelere ligand SEMA7A uygulandığında ise Ras-GTP ifadesi azaldı.



Şekil 5.12: PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre klonlarında Ras-GTP ifadesinin incelenmesi. A) 15 dakika, 100ng/ml SEMA7A uygulanmış ve uygulanmamış PLC/PRF/5 hücre klonlarından elde edilen total protein lizatlarında Ras-GTP ifadesinin incelenmesi. SEMA7A uygulanan örnekler kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). B) 15 dakika, 100ng/ml SEMA7A uygulanmış ve uygulanmamış Hep3B hücre klonlarından elde edilen total protein lizatlarında Ras-GTP ifadesinin incelenmesi. SEMA7A uygulanan örnekler kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

HCC, primer karaciğer kanserinin en yaygın alt tipi olup kansere bağlı ölümler sıralamasında 4. sırada yer almaktadır [1]. HCC oluşumunun çevresel sebepleri arasında Hepatit B/C virüsü, aşırı alkol tüketimi, diyabet, aflatoksinler, karaciğer yağlanması gibi nedenler yer alırken biyolojik temelinde hücredeki onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin işlevleri dışında çalışmaları, bunlarla ilişkili olarak hücre döngüsü kontrolünün kaybı, hücre içi sinyal yollarının değişmesi ve fonksiyonlarını kaybetmeleri gibi sebepler gösterilebilir [52]. Hepatokarsinogeneze neden olan sinyal yollarını araştıran birçok çalışma bulunsa da HCC'nin heterojenitesinden dolayı etkili sinyal yolları tam olarak belirlenememiş olmakla birlikte kilit noktasını büyüme faktörlerinin reseptörleri olan reseptör tirozin kinazların (RTK) ve bunlarla ilişkili hücre içi sinyal yollarının oluşturduğu düşünülmektedir. Başta HGFR, VEGFR, EGFR, PDGFR gibi RTK'lar ve bunlarla ilişkili JAK/STAT, NF-κB, TGF-β, MAPK, PI3K/AKT gibi sinyal yollarının öne çıktığı görülmektedir [53], [54].

Plexin C1, Plexin ailesinin bir üyesi olan, ilk olarak sinir hücrelerinde akson kılavuzu olarak tanımlanmış hücre yüzey reseptörüdür [13]. Ligandı SEMA7A, akson kılavuzluğunda önemli rollere sahip olduğu bilinen, geniş bir aile olan Semaforinlerin membrana GPI (Glikozil fosfatidilinositol) çapa ile bağlı tek üyesidir [55]. Plexin C1 ve SEMA7A ile ilgili yapılan daha sonraki çalışmalarda, farklı hücrelerde farklı görevler üstlendikleri görülmüştür. İlk olarak sinir hücrelerinde ifadesi gösterilen Plexin C1'in dendritik hücreler, monositler, melanositler, akciğer hücreleri gibi birçok farklı dokudaki ifadesi belirlenmiştir [35], [56] - [58]. PLXNC1'in HCC dokularında da ifadesi görülmüş [30] ancak detaylı çalışılmamıştır. Günümüze kadar Plexin C1'in hücrelerdeki fonksiyonel etkilerini anlamaya yönelik birçok çalışma yapılmış olsa da etkilediği sinyal yollarını araştıran çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu tez çalışmasında, HCC hücre hatlarında Plexin C1'in hücredeki işlevselliği, özellikle de sinyal yolağı geniş bir çerçevede incelenmiştir.

Çalışmamızda ilk olarak PLXNC1'in hücrelerdeki sinyal yollarında yol açtığı değişimleri incelemek için PLXNC1 ifadesi baskılanmış hücre klonları oluşturuldu. Tez çalışmasında kullanılan HCC hücre hatlarından epitel karakterli PLC/PRF/5 ve Hep3B

hücrelerinde, lentiviral shRNA temelli sistem kullanılarak PLXNC1 ifadesi baskılandı. PLXNC1 ifadesinin baskılandığı Western blot analiziyle doğrulandı. Hücrelerde PLXNC1 varlığında ve yokluğunda PLXNC1'e bağlı olarak etkilenmesi öngörülen sinyal yolları incelendi. Literatürde PLXNC1'in LIMK2'yi ve bunun üzerinden kofilin fosforilasyonunu etkilediği gösterilmiştir. Malign melanom hücrelerinde yapılan bu çalışmada, melanom hücrelerinde LIMK1 ifadesinin olmadığı saptanmış ve PLXNC1'e bağlı kofilin fosforilasyonunun sadece LIMK2 üzerinden gerçekleştiği düşünülmüştür [26]. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleriyle yapılan bir diğer çalışmada, LIMK1 ifadesiyle ilgili herhangi bir açıklama belirtilmeden doğrudan LIMK2 üzerinden kofilin fosforilasyonu çalışılmıştır [27]. Çalışmamızda, HCC hücre hatlarından epitel karakterli PLC/PRF/5 ve Hep3B'de hem LIMK1 hem de LIMK2 ifadesi görüldü. PLC/PRF/5 hücre hattında LIMK1 ifadesinin daha yüksek, LIMK2 ifadesinin daha düşük olduğu görülürken, Hep3B'de tam tersi olarak LIMK1 ifadesinin daha düşük, LIMK2 ifadesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Hücrelerdeki LIMK1 ve LIMK2 fosforilasyonu, birbiriyle yakından ilişkili ve moleküler ağırlıkları çok benzer olan bu iki protein kinazın [43] fosforillenmiş halini birlikte tanıyan poliklonal antikor ile incelendi. Buna göre, hücrelerde PLXNC1'in ifadesinin baskılandığı durumda total LIMK fosforilasyonunun ve buna bağlı olarak kofilin fosforilasyonunun azaldığı görüldü. Hücredeki LIMK ve kofilin fosforilasyonunun tamamen kaybolmamasının, hücrelerde ifadesi tamamen baskılanamayan PLXNC1'den ve hücrelerde LIMK ve kofilin fosforilasyonuna neden olabilecek diğer sinyal yollarından kaynaklanabileceği düşünüldü [42], [43]. SEMA7A'nın bir diğer reseptörü olan İntegrin $\beta 1$ 'in PLXNC1 ile olan ilişkisini inceleyen bir çalışmada, PLXNC1 ifadesi baskılanmış melanositlere SEMA7A verilmesi sonucu melanositlerin yassılaşıp dendritik uzantı oluşturmalarındaki artışın, PLXNC1 ifadesi baskılanmayan hücrelere SEMA7A verildiğinde görülen artışa göre çok daha fazla olduğu bildirilmiştir. Çalışmada, bu gözlemden hareketle Plexin C1'in İntegrin $\beta 1$ 'in fonksiyonlarını baskılayıcı etkisinin olduğu öne sürülmüştür [35]. Literatürdeki bu çalışma temel alınarak, çalışmamızda PLXNC1 ifadesi baskılanan hücrelerde PLXNC1-İntegrin $\beta 1$ ilişkisi, aktifleşen İntegrin $\beta 1$ 'in fosforillediği FAK ve ERK1/2 üzerinden incelendi. Hücrelerde PLXNC1 baskılamasının, baskılanmayan kontrol hücrelerine göre FAK ve ERK1/2 fosforilasyonunda herhangi bir değişime yol açmadığı saptandı. Elde edilen

bu sonuçlardan dolayı, HCC hücre hatlarından PLC/PRF/5 ve Hep3B'de PLXNC1'in İntegrin $\beta 1$ üzerinde baskılayıcı bir etkisinin olmadığı söylenebilir. Ancak, bu sonuca literatürden farklı olarak fonksiyonel bir deney düzeneği yerine aktif İntegrin $\beta 1$ 'in etkilediği sinyal yolları incelenerek ulaşılmıştır. Bu yüzden, PLXNC1'in yokluğu durumunda, FAK ve ERK1/2 fosforillenmesini gerektirmeyen bir yolla hücrelerde SEMA7A-İntegrin $\beta 1$ etkileşimi fonksiyonel bir değişime neden olabilir. Literatürde, sinir hücrelerinde SEMA7A aracılığıyla aktiveleşen İntegrin $\beta 1$ 'in hücre fonksiyonlarının görülmesi için FAK ve ERK1/2 fosforilasyonunun kesinlikle gerçekleşmesi gerektiği gösterilse de [23], [33] karaciğer hücrelerinde böyle bir çalışma yapılmamıştır.

Plexin C1'in ligandı olan SEMA7A, 100 ng/ml konsantrasyonda HCC hücrelerine 5, 10 ve 15. dakika süre ile uygulandığında bütün zaman noktalarında kofilin fosforilasyonunda artış görüldü. Dolayısıyla, melanom hücreleriyle yapılan çalışmada [26] gösterilen bu değişim, HCC'de de doğrulanmıştır. SEMA7A, İntegrin $\beta 1$ 'in ligandı da olduğu için İntegrin $\beta 1$ yolağına bağlı FAK ve ERK1/2 fosforilasyonu incelendi. Hücrelere belirtilen doz ve sürelerde uygulanan SEMA7A sonucu PLC/PRF/5 hücre hattında 5. dakikada ERK1/2 fosforilasyonu belirgin miktarda artarken, uygulamanın 10. ve 15. dakikalarında ERK1/2 fosforilasyonunun kademeli olarak düştüğü hatta 15. dakikada SEMA7A uygulanmamış kontrol hücreesindeki fosforile ERK1/2 miktarının altında kaldığı görüldü. FAK fosforilasyonunun ise 10. dakikada arttığı ve 15. dakikada düşmeye başladığı görüldü. Hep3B'de ise ERK1/2 ve FAK fosforilasyonunun 15. dakikada arttığı gözlemlendi. Böylelikle HCC hücre hatlarında SEMA7A'nın İntegrin $\beta 1$ 'i aktive ederek FAK ve ERK1/2 fosforilasyonuna neden olduğu gösterilmiştir.

PLXNC1 ifadesi baskılanmış klonlarda kofilin fosforilasyonunun azaldığı gösterilmişti. Bu klonlara optimizasyon çalışmaları sonrası seçilen 100 ng/ml konsantrasyonda 15 dk süre ile SEMA7A verildiğinde ise kofilin fosforilasyonunda kontrol hücrelerine göre kısmi bir artış görüldü. Bu artışın, hücrelerde PLXNC1 ifadesinin tam olarak baskılanamadığından kaynaklandığı söylenebileceği gibi, literatürde aktif İntegrin $\beta 1$ 'in LIMK1 üzerinden kofilin fosforilasyonuna neden olabileceğini açıklayan bir çalışma da bulunmaktadır [59]. Bu ikincisinin kanıtlanması için SEMA7A ile aktiveleşen İntegrin $\beta 1$ 'in, PLXNC1'den bağımsız olarak kofilin fosforilasyonuna neden olduğunu gösterecek bir deney düzeneğine ihtiyaç olup,

böyle bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. PLXNC1 ifadesi baskılanmış klonlara, seçilen doz ve sürede SEMA7A verildiğinde İntegrin $\beta 1$ yolağında görülen sonuçlar, PLXNC1 ifadesi varken hücelere SEMA7A verilmesiyle paralellik göstermektedir. PLC/PRF/5 shPLXNC1 hücrelerinde SEMA7A'nın 15 dk uygulanmasından dolayı ERK1/2 fosforilasyonu kontrole göre azalmış görünürken FAK fosforilasyonunda kısmi bir artış görüldü. Hep3B shPLXNC1 hücrelerine 15 dk SEMA7A uygulandığında ise hem ERK1/2 hem de FAK fosforilasyonunun, bir önceki sonuçlarla tutarlı şekilde, ortama SEMA7A ilave edilmeyen duruma göre arttığı görüldü.

Literatürde, LIMK ve buna bağlı olarak kofilin fosforilasyonunun Rho-GTP/ROCK1/2, Rac-GTP/PAK1 ve Cdc42/MRCK α olmak üzere 3 farklı yolak üzerinden olabileceği belirtilmiştir [43]. Hangi dokularda ve hücrelerde hangi yolakların aktif olduğu üzerine çalışmalar bulunsa da HCC dokularında ve hücrelerinde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, HCC hücre hatlarından epitel karakterli PLC/PRF/5 ve Hep3B'de, ROCK1/2 inhibitörü Y-27632 ve PAK1 inhibitörü IPA-3 kullanılarak kofilin fosforilasyonu üzerinden ilgili yolaklar incelendi. İnhibitörlerle doz ve süre optimizasyonu yapıldıktan sonra belirlenen koşullar, PLXNC1 ifadesi baskılanmış hücrelerde de denendi. İnhibitör uygulandıktan sonra elde edilen total protein lizatları, Western blotta incelendi. Hep3B hücrelerinde kofilin fosforilasyonunun şüpheye yer bırakmayacak şekilde ROCK1/2 üzerinden olduğu görüldü. Hücelere ROCK1/2 inhibitörü Y-27632 uygulandığında hücrelerdeki LIMK ve kofilin fosforilasyonu kayboldu. Hep3B shPLXNC1 hücrelerine Y-27632 verildiğinde ise yine LIMK ve kofilin fosforilasyonunda aynı şekilde düşme görüldü. PLXNC1 yokken hücrelerdeki LIMK ve kofilin fosforilasyonu kaybolmadığı için inhibitörün bu durumda da beklenen şekilde PLXNC1'den bağımsız olarak çalıştığı gösterilmiştir. ROCK1/2 inhibitörü, PLC/PRF/5 hücrelerinde denenen doz ve sürelerin hiçbirinde LIMK ve kofilin fosforilasyon düzeylerinde belirgin bir değişime neden olmadı. Hep3B'de çalışan doz ve süre PLC/PRF/5 shPLXNC1 hücrelerine de uygulandı ancak farklı bir sonuç alınmadı. ROCK1/2 inhibitöründen elde edilen sonuçlar, Hep3B hücrelerinde Rho-GTP/ROCK1/2 kaskadının aktif olduğuna işaret ederken PLC/PRF/5 hücrelerinde bu yolağın etkisi LIMK/Kofilin fosforilasyonu bağlamında saptanmadı. PAK1 inhibitörü IPA-3, PLC/PRF/5 hücrelerine 50 μ M dozda, 6 saat koşullarında uygulandığında kofilin fosforilasyonunda kısmi bir azalma görülürken Hep3B hücrelerinde belirgin bir etki

tespit edilmedi. Dolayısıyla, Hep3B hücrelerinde Rac-GTP/PAK1 kaskadının LIMK/Kofilin fosforilasyonu üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlendi. PLC/PRF/5 hücrelerinde belirli bir koşulda kofilin fosforilasyonunun kısmi olarak azalması ancak tamamen kaybolmaması, bu hücre hattında PAK1 dışında başka bir yolağın daha LIMK/Kofilin fosforilasyonu üzerinde etkili olabileceğini düşündürdü. Literatürde, PAK ailesinden PAK2 ve PAK4'ün de LIMK/Kofilin fosforilasyonuna sebep olduğu az da olsa birkaç çalışmada gösterilmiştir [60], [61]. Ayrıca, bu hücrelerde ROCK1/2 inhibitörü Y-27632'nin etkisiz olduğu gösterildiği için bir diğer yolak olan Cdc42/MRCK α kaskadının da aktif olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada diğer PAK ailesi elemanları ve MRCK yolağı incelenmemiştir. Kofilin fosforilasyonunun kısmen azalmasının olası nedenleri arasında, bu kinazların diğer inhibitörlerinin [62], [63], PLC/PRF/5 hücre hattında daha etkili olma olasılığı değerlendirilmelidir. Ayrıca, inhibitörlerin hücrelerdeki çalışma etkinliğini tam olarak belirlemek için onların direkt hedefleri olan kinazların fosforilasyonlarının incelenmesi yerinde olacaktır.

HCC oluşumunda büyük role sahip reseptör tirozin kinazların (RTK), bazı reseptör olmayan tirozin kinazların (non-RTK) ve bilinen 5 farklı hücre içi sinyal yolağının (MAPK, AKT, JAK/STAT, NF- κ B, ve TGF- β) PLXNC1'e bağlı olarak fosforilasyon düzeylerindeki değişimi, kitler yardımıyla incelendi. PLXNC1 ifadesi baskılanmış ve baskılanmamış kontrol hücrelerinden elde edilen total protein lizatları, kitlerin talimatları doğrultusunda kullanılarak hücre içindeki PLXNC1'e bağımlı değişimler görüldü. HCC hücre hatlarından PLC/PRF/5 ve Hep3B'de yapılan bu çalışmalar sonucunda çıkan verilerin, HCC'yi daha doğru temsil edeceği düşünüldüğünden, iki hücrede de ortak olarak değişen proteinler üzerinden yorumlanması gerektiği düşünülmüştür. 71 farklı tirozin kinazın fosforilasyon düzeylerini tespit etmeye olanak sağlayan kitte; PLC/PRF/5 hücre hattında shPLNXC1 durumunda PLKO'ya göre 34 tirozin kinazın fosforilasyonu artarken, 11 tirozin kinazın fosforilasyonu azaldı. Hep3B'de ise 15 tirozin kinazın fosforilasyonu artarken, 26 tirozin kinazın fosforilasyonunun azaldığı görüldü. İki hücre hattında da PLXNC1 ifadesi baskılandığında, ortak olarak fosforilasyonu artan 9 tirozin kinaz tespit edilirken, fosforilasyonu azalan 8 tirozin kinaz olduğu tespit edildi.

- Fosforilasyonu artan tirozin kinazlar: BMX, ErbB3, FGFR2/FGFR2- α , IGF-1R, JAK2, NGFR, PDGFR- α , SCFR, TXK.
- Fosforilasyonu azalan kinazlar: EphA4, EphB2, EphB4, ErbB4, FAK, Fgr, Tie-1, Tie-2.

Protein tirozin kinazlar, hücre yüzeyinde bulunan reseptör tirozin kinazlar (RTK) ve sitozolde ya da çekirdekte bir yere bağlı olmadan bulunan reseptör olmayan tirozin kinazlar (non-RTK) olarak ikiye ayrılırlar. ATP molekülünden aldıkları fosfatı, proteinlerin tirozin aminoasitlerine aktararak proteinleri tirozin aminoasitlerinden fosforilleyip aktivitelerini düzenlerler. İnsanlarda toplamda 90 tirozin kinaz bulunup bunların 58'i RTK, 32'si ise non-RTK'dır [64].

İki HCC hücre hattında da ortak olarak fosforilasyonu artan tirozin kinazlar hakkında aşağıda verilen bilgilerin sonuçlarımızın değerlendirilmesinde katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Bir non-RTK olan BMX (diğer adıyla ETK), TNF ile indüklenen anjiyogenez, aktinin düzenlenmesi, hücre migrasyonu, hücre proliferasyon ve sağ kalımı, hücre adezyonu ve apoptoz gibi birçok hücre sel süreçte rol almaktadır. BMX'in işlevselliği, büyüme faktörü reseptörleri ve sitokin reseptörleri tarafından düzenlenir. Aktifleşen BMX'in PAK1, STAT3, BAK, FAK gibi proteinleri fosforilleyerek düzenlediği bildirilmiştir [65]. Kit sonuçlarında PLXNC1 baskılandığında FAK fosforilasyonunda azalma görüldüğü için aynı durumda BMX fosforilasyonunun artması ilginçtir. Öte yandan, yapılan Western blot analizlerinde ise shPLXNC1 durumunda FAK fosforilasyonunda belirgin bir değişim görülmedi. Kit sonuçlarının güvenilirliğinin kanıtlanabilmesi için sonuçların başka moleküler tekniklerle de doğrulanması gerekmektedir. FAK fosforilasyonu durumunda Western blotta değişim görülmemesinin bir nedeni olarak birden fazla rezidüden fosforillenebilen FAK'ın başka bir bölgesindeki fosforilasyon düzeyinin değişmiş olabileceği de düşünülmektedir. Bu ihtimalin elenmesi için farklı bölgelerden fosforile olan FAK'ları tanıyabilen antikolar kullanılarak Western blot çalışmaları yapılmalıdır. Bir RTK olan ErbB3 (diğer adıyla HER3), EGF reseptörlerinden biridir. Hücre büyümesi, farklılaşması ve hücre ölümünün baskılanmasında görev alırlar. PI3K/AKT ve MAPK yollarını aktive edebildiği gösterilmiştir [66]. Bir RTK olan FGFR2 (diğer adıyla KGFR), fibroblast büyüme faktörü reseptörüdür. Ras/MAPK ve

AKT yolağını aktive ettiği bilinmektedir [67]. FGFR2, IIIb ve IIIc (alpha) olmak üzere iki izoformdan oluşmaktadır [68]. Bir RTK olan IGF-1R, insülin benzeri büyüme faktörlerinin reseptörüdür. Hücre bölünmesi ve sağ kalımında görevlidir. Ras/MAPK ve AKT yolağını aktive ettiği bilinmektedir [69]. Bir non-RTK olan JAK2, sitokin reseptörleri tarafından aktive olup STAT transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Hücre büyümesi, gelişmesi, farklılaşması, histon modifikasyonları gibi birçok hücreyel süreçte görev alır [70]. Bir RTK olan NGFR (diğer adıyla TNFRSF16), sinir hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasını sağlayan reseptör olarak keşfedilse de ilerleyen çalışmalarda diğer dokularda da bulunduğu ve hücrelerin proliferasyonunu durdurucu, tümör baskılayıcı gen olarak davrandığı görülmüştür [71]. Bir RTK olan PDGFR- α , hücre proliferasyonunda, yara iyileşmesinde hücre göçü ve kemotaksiste görev alır. PI3K/AKT ve MAPK yolaklarını aktive ettiği bildirilmiştir [72]. Bir RTK olan SCFR (diğer adıyla c-KIT), bir proto-onkogen olup, PDGFR ailesine mensuptur. PI3K/AKT, MAPK yolaklarını ve STAT transkripsiyon faktörlerini aktive eder. HCC özelinde çok çalışılan bir reseptör olan c-KIT'in HCC dokularında yüksek ifadesi görülmüştür. Aynı zamanda hasarlı karaciğer hücrelerinin yenilenerek tamirini sağlayan c-KIT'in, yarar-zarar dengesi konusunda tartışmalar bulunmaktadır [73], [74]. Bir non-RTK olan TXK, Tec tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olup T hücrelerinde ifadesi ve fonksiyonları gösterilmiştir. PLC/PRF/5 hücrelerinde PLKO klonunda hiç ifadesi görülmezken shPLXNC1 klonunda ifadesi artmaktadır. Hep3B hücrelerinde ise PLKO klonunda az da olsa ifadesi varken shPLXNC1 klonunda bu ifadenin arttığı saptanmıştır. Sadece T hücresi spesifik bir non-RTK olarak bildirilen TXK'nin HCC hücrelerindeki bu ifadesi ilginç bulunmuştur.

İki HCC hücre hattında da ortak olarak fosforilasyonu azalan tirozin kinazlar hakkında aşağıda verilen bilgilerin sonuçlarımızın değerlendirilmesinde katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Bir RTK ailesi olan Eph ilk olarak HCC hücresinde keşfedilmiş ve bu yüzden adına "Erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma" (Eph) denilmiştir. Bu aile, EphA ve EphB olarak iki alt sınıftan oluşurlar, EphA'nın 9 üyesi, EphB'nin 5 üyesi bulunmaktadır. Gelişimde ve yetişkin hücre dokularının homeostazının sağlanmasında rol alırlar. EphA2 ve B4'ün ifadesinin artması birçok kanser dokusunda tümörün kötü huylu karakteri ile ilişkilendirilmiştir. Ancak bazı EphB reseptörlerinin

ifadesinin azalmasının tam tersi etki yarattığı da gösterilmiştir. Eph üyelerinin ayrı ayrı farklı fonksiyonları bulunmaktadır [75]. Hücrelerin shPLXNC1 klonlarında PLKO klonlarına göre EphA4-B2-B4 fosforilasyonunun azaldığı görüldü. Bu sonuçların doğrulandıktan sonra hücredeki işlevselliği hakkındaki çalışmalar aydınlatıcı olacaktır. Bir RTK olan ErbB4 (diğer adıyla HER4), bulunduğu ailedeki büyüme inhibe edici özelliği olan tek reseptördür. Agresif tümörlerde ifadesinin azaldığı gösterilmiş olup tümör baskılayıcı olarak işlev yapar [76]. Bir non-RTK olan FAK (diğer adıyla PTK2), büyüme hormonu reseptörleri veya İntegrinler tarafından aktive edilen, hücre göçü, adezyonu, yayılması, gelişimi, proliferasyonu gibi birçok hücresel süreçte görev alan bir tirozin kinazdır [77]. Yukarıda da belirtildiği gibi shPLXNC1 klonlarında BMX fosforilasyonu artarken FAK fosforilasyonunun azalması ilginçtir ve sonuçların başka moleküler tekniklerle doğrulanması gerekmektedir. Bir non-RTK olan Fgr, Src ailesi tirozin kinazlardandır ve birçok kanser türünde aşırı ifadesine rastlanmıştır [78]. Bir RTK ailesi olan TIE, TIE-1 ve TIE-2 olmak üzere iki üyeden oluşmaktadır. Damar oluşumuyla ilgili proteinler olan TIE ailesi, VEGF ile de ilişkilidir [79].

Hücrelerde ortak olarak fosforilasyonu artan veya azalan tirozin kinazlar HCC'nin daha iyi anlaşılması ve ona göre tedavi stratejisi belirlenmesi açısından önemlidir. HCC'de klinikte kullanım onayı almış 4 çoklu-kinaz inhibitörünün ve ileride onay alacak diğer inhibitörlerin hangi HCC olgularında kullanılacağına belirlenmesi, doğru tedaviye kısa sürede ulaşılması açısından büyük önem arz etmektedir. PLXNC1'in HCC tümörlerinde potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. İlaçların inhibe ettikleri RTK'lara ve hasta tümörlerindeki PLXNC1 ifadesine bakılarak hastanın tümörüne göre ilacına karar verilebilir. Tabii ki bunun yapılabilmesi için öncelikle ticari bir kit yardımıyla elde edilen bu sonuçların farklı moleküler biyoloji teknikleriyle doğrulanması ve ardından farklı HCC dokularıyla ve diğer HCC hücre hatlarıyla da karşılaştırılması gerekmektedir.

Bilinen 5 farklı hücre içi sinyal yolağındaki (MAPK, AKT, JAK/STAT, NF- κ B, ve TGF- β) toplamda 56 proteinin fosforilasyon düzeylerini tespit edebilen kitte; PLC/PRF/5 hücre hattının shPLXNC1 klonunda PLKO klonuna göre 21 farklı proteinin fosforilasyon düzeyi belirgin oranda değişirken Hep3B'de bu sayı 36 farklı protein olarak saptandı. İki hücre hattında da fosforilasyonu ortak olarak artan veya azalan proteinler aşağıda belirtilmiştir:

- MAPK yolağında, CREB fosforilasyonu, shPLXNC1 klonlarında PLKO klonlarına göre artmış;
- AKT yolağında, Raf-1, PRAS40, Gsk3a, mTor, P27 fosforilasyonu, shPLXNC1 klonlarında PLKO klonlarına göre azalmış;
- JAK/STAT yolağında, SHP1 (Ser591), EGFR (Ser1070) fosforilasyonu, shPLXNC1 klonlarında PLKO klonlarına göre artmış;
- NF-κB yolağında, ZAP70 (Y292) fosforilasyonu, shPLXNC1 klonlarında PLKO klonlarına göre azalmış;
- TGF-β yolağında, ATF2, c-Jun, c-Fos fosforilasyonu, shPLXNC1 klonlarında PLKO klonlarına göre artmıştır.

MAPK yolağı, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz ve strese karşı cevap gibi birçok hücre sel süreçte önemli rol oynayan bir hücre içi sinyal yolağıdır. Yolak, 3 ila 5 protein katmanından oluşmaktadır: “MAPK kinase kinase kinase (MAP4K), MAPK kinase kinase (MAP3K), MAPK kinase (MAPKK), MAPK ve MAPK-activated protein kinases (MAPKAPK)”. İlk 3 basamak, MAPK yolağının çekirdeğı olup her sinyal iletiminde bulunurken son 2 kinazın yolağına katılımı sinyalin bulunduğu hücreye ve sinyal uyarısına göre değişmektedir. MAPK yolakları arasında en önemlisi Ras/Raf/MEK/ERK1/2 kaskadıdır. Normal fonksiyonunun bozulmasının kanser gelişiminde büyük rol oynadığı bir sinyal yolağıdır [80]. MAPK yolağının aktive ettiği proteinlerden biri olan CREB (cAMP response element-binding protein) hücrelerin büyüme faktörü uyarımına verecekleri hücre sel cevabı düzenler [81].

AKT yolağı, hücre ölümü ve sağ kalımı, hücre sel metabolizma, hücrenin bölünmesi, gelişmesi gibi süreçlerde rol alır. AKT’yi aktive eden üst yolakta PI3K ve PIP3 vardır. AKT’nin etkilediğı yolaklarda ise mTOR düzenleyicisi olarak görev yapan PRAS40, hücre döngüsü inhibitörü p27 ve hücre iskeleti elemanı vimentin gibi proteinler yer almaktadır [82]. AKT’nin GSK-3α’yı da fosforilleyerek inaktif hale geçmesini sağladığı bildirilmiştir [83]. Normalde MAPK yolağıyla ilişkili bir protein olan Raf-1’in AKT yolağı tarafından fosforillenerek inhibe edildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur [84]. Çalışılan kit, Raf-1’i AKT yolağı içinde değerlendirdiğı için bu tez çalışmasında da bu kategoride ele alınmıştır.

JAK/STAT yolağı, sitokin reseptörlerinden aldıkları sinyali hücre içine taşıyan bir diğer hücre içi sinyal yolağıdır. Birçok hücrenel süreçte görev alırlar. Aktive olan JAK'lar transkripsiyon faktörleri olan STAT'ları aktive ederler. SHP1, JAK-STAT yolağının düzenleyicisi olarak görev alırken EGFR JAK/STAT yolağına sinyal ileten büyüme faktörü reseptörlerinden biridir [85]. Hem hücre içi sinyal yolağı hem de tirozin kinaz fosforilasyonu çalışmamızda JAK2 fosforilasyonunun PLC/PRF/5 shPLXNC1 klonunda arttığı saptanmıştır. Ancak, ilginç olarak tirozin kinaz fosforilasyonu çalışmamızda, Hep3B hücrelerinin shPLXNC1 klonunda JAK2 fosforilasyonunun azaldığı görülmüştür. Benzer bir durum EGFR fosforilasyonu açısından da gözlemlenmiştir. İlginç olarak, Hep3B hücrelerinin shPLXNC1 klonunda EGFR fosforilasyonunun azaldığı saptanmıştır.

NF- κ B yolağı, enflamasyon ve doğal bağışıklık sisteminde görevli bir sinyal yolağıdır. ZAP70, T hücreleri ve doğal katil hücrelerinde (NKT) bulunan bir proteindir, TCR ve NK sinyalizasyonunda görevlidir [86], [87]. HCC hücre hatlarındaki ifadesi ve hücre klonlarında fosforilasyonun azalmış olarak bulunması ilginç bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

TGF- β yolağı, hücre proliferasyonu, farklılaşması, morfogenezi gibi birçok süreçte yer alan önemli bir sinyal yolağıdır. TGF- β , SMAD proteinlerini düzenleyerek hücrenel süreçlere yön verirler. EMT (epithelial–mesenchymal transition) sürecindeki ana düzenleyicidir. Ayrıca, PI3K ve MAPK yolları ile de sinyal aktarımında bulunur [88]. TGF- β ile aktiveleşen SMAD'ların ATF2'yi aktive ettiği tespit edilirken [89] c-Jun ve c-Fos'un SMAD'ları inhibe ederek TGF- β sinyalizasyonuna engel olduğu bildirilmiştir [90]. PLXNC1 baskılanmasının hücrede mezenkimal fenotipi teşvik ettiği gösteren önceki bulgularımız, mevcut TGF- β yolağındaki proteinlerin fosforilasyon artışı gözlemlerimiz ile ele alındığında sonuçların kendi içinde tutarlı olduğu anlaşılmaktadır.

Hücrelerdeki Ras-GTP ifadesi, Ras-GAP aktivitesi ile ters orantılıdır. Ras proteini kendi başına veya GAP (GTPase-activating protein) ile birlikte Ras-GTP'yi hidroliz ederek Ras-GDP'ye dönüştürürler. Ras'ın GAP ile birleşmesi, Ras-GTP'den Ras-GDP'ye dönüş hızını artırır [91]. PLXNC1'in Ras-GAP aktivitesi olduğu melanom hücrelerinde yapılan çalışmada gösterilmiştir [41]. HCC'deki PLXNC1'in Ras-GAP aktivitesini araştırmak için HCC hücre hatlarından PLC/PRF/5 ve Hep3B hücrelerinin PLKO ve

shPLXNC1 klonlarında, hücrelerdeki Ras-GTP ifadesi ölçüldü. Her iki hücre hattında da PLXNC1'in baskılanmadığı PLKO hücrelerine 100 ng/ml, 15 dk koşullarında SEMA7A uygulandığında hücrelerdeki Ras-GTP ifadesinin azaldığı görüldü. Bunun sebebinin aktifleşen PLXNC1'in Ras-GAP aktivitesinin artmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ligand bağımsız durumda, PLXNC1 ifadesi baskılanmış hücrelerde PLKO'ya göre Ras-GTP ifadesinin arttığı tespit edildi. Bu artışın, PLXNC1 ifadesi azalan hücrelerde Ras-GAP aktivitesinin kaybindan kaynaklandığı düşünülmektedir. Son olarak, her iki hücrenin de shPLXNC1 klonuna SEMA7A ligandı uygulandığında Ras-GTP ifadesinin azaldığı görüldü. PLXNC1 yokluğunda hücelere SEMA7A uygulamasının Ras-GTP ifadesinin azalması ilginç bulunmuştur. Bu azalmanın, ifadesi tamamen baskılanamayan PLXNC1'den kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ancak, Ras-GTP ifadesinin azalması neredeyse SEMA7A uygulanmış PLKO ile aynı düzeyde olduğu için bilinmeyen başka yolların etkili olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. SEMA7A, İntegrin $\beta 1$ 'in de ligandı olup uygulanan koşullarda İntegrin $\beta 1$ 'i aktifleştirdiği önceki deneylerimizde gösterilmiştir. Literatürde İntegrinlerin Ras proteinlerini aktifleştirebildiği gözlemlenmiş olup [92] Ras proteininin, tek başına Ras-GTP hidrolizini gerçekleştirebildiğinden yukarıda bahsedilmiştir. Ras-GTP ifadesini ölçen ELISA kitiyle yapılan bu sonuçlar, diğer moleküler biyoloji teknikleriyle de doğrulanmalıdır.

Bu tez çalışmasında, HCC hücre hatlarından epitel karakterli PLC/PRF/5 ve Hep3B hücrelerinde, Plexin C1'in etkilediği sinyal yolları geniş bir perspektiften bakılarak incelenmiştir. Literatürde başka doku ve hücrelerde yapılan çalışmalar HCC hücre hatlarıyla denenmiş, literatüre benzer ya da farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmaların HCC'de Plexin C1'in rolünü anlamaya yönelik atılması gereken adımlardan biri olduğu düşünülerek buradaki bulguların daha ileri çalışmalarla doğrulanması ve geliştirilmesi hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Li X., Ramadori P., Pfister D., Seehawer M., Zender L., Heikenwalder M., (2021), "The immunological and metabolic landscape in primary and metastatic liver cancer", *Nature Reviews Cancer*, 21 (9), 541-557.
- [2] Kulik L., El-Serag H. B., (2019), "Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma", *Gastroenterology*, 156 (2), 477-491.e471.
- [3] Höpfner M., Schuppan D., Scherübl H., (2008), "Growth factor receptors and related signalling pathways as targets for novel treatment strategies of hepatocellular cancer", *World Journal of Gastroenterology*, 14 (1), 1-14.
- [4] Avila M. A., Berasain C., Sangro B., Prieto J., (2006), "New therapies for hepatocellular carcinoma", *Oncogene*, 25 (27), 3866-3884.
- [5] Wang Y., Liu D., Zhang T., Xia L., (2021), "FGF/FGFR Signaling in Hepatocellular Carcinoma: From Carcinogenesis to Recent Therapeutic Intervention", *Cancers (Basel)*, 13 (6).
- [6] Calvisi D. F., Pascale R. M., Feo F., (2007), "Dissection of Signal Transduction Pathways as a Tool for the Development of Targeted Therapies of Hepatocellular Carcinoma", *Reviews on Recent Clinical Trials*, 2 (3), 217-236.
- [7] Chen Z., Xie H., Hu M., Huang T., Hu Y., Sang N., Zhao Y., (2020), "Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma", *American Journal of Cancer Research*, 10 (9), 2993-3036.
- [8] Koulouris A., Tsagkaris C., Spyrou V., Pappa E., Troullinou A., Nikolaou M., (2021), "Hepatocellular Carcinoma: An Overview of the Changing Landscape of Treatment Options", *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 8, 387-401.
- [9] Adnane L., Trail P. A., Taylor I., Wilhelm S. M., (2006), "Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature", *Methods in Enzymology*, 407, 597-612.
- [10] Suyama K., Iwase H., (2018), "Lenvatinib: A Promising Molecular Targeted Agent for Multiple Cancers", *Cancer Control*, 25 (1).
- [11] Ettrich T. J., Seufferlein T., (2018), "Regorafenib", *Recent Results in Cancer Research*, 211, 45-56.
- [12] Abou-Alfa G. K., Meyer T., Cheng A. L., El-Khoueiry A. B., Rimassa L., Ryoo B. Y., Cicin I., Merle P., Chen Y., Park J. W., Blanc J. F., Bolondi L., Klumpen H. J., Chan S. L., Zagonel V., Pressiani T., Ryu M. H., Venook A. P., Hessel C.,

- Borgman-Hagey A. E., Schwab G., Kelley R. K., (2018), "Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma", *The New England Journal of Medicine*, 379 (1), 54-63.
- [13] Ohta K., Mizutani A., Kawakami A., Murakami Y., Kasuya Y., Takagi S., Tanaka H., Fujisawa H., (1995), "Plexin: a novel neuronal cell surface molecule that mediates cell adhesion via a homophilic binding mechanism in the presence of calcium ions", *Neuron*, 14 (6), 1189-1199.
- [14] Tamagnone L., Artigiani S., Chen H., He Z., Ming G. I., Song H., Chedotal A., Winberg M. L., Goodman C. S., Poo M., Tessier-Lavigne M., Comoglio P. M., (1999), "Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates", *Cell*, 99 (1), 71-80.
- [15] Kumanogoh A., (2015), "Semaphorins : A Diversity of Emerging Physiological and Pathological Activities", 1st Edition, Springer.
- [16] Mauti O., Sadhu R., Gemayel J., Gesemann M., Stoeckli E. T., (2006), "Expression patterns of plexins and neuropilins are consistent with cooperative and separate functions during neural development", *BMC Developmental Biology*, 6 (1), 32.
- [17] Malik M. F., Ye L., Jiang W. G., (2014), "The Plexin-B family and its role in cancer progression", *Histology and Histopathology*, 29 (2), 151-165.
- [18] Alto L. T., Terman J. R., (2017), "Semaphorins and their Signaling Mechanisms", *Methods in Molecular Biology*, 1493, 1-25.
- [19] Yazdani U., Terman J. R., (2006), "The semaphorins", *Genome Biology*, 7 (3), 211.
- [20] Comeau M. R., Johnson R., DuBose R. F., Petersen M., Gearing P., VandenBos T., Park L., Farrah T., Buller R. M., Cohen J. I., Strockbine L. D., Rauch C., Spriggs M. K., (1998), "A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR", *Immunity*, 8 (4), 473-482.
- [21] Angelisová P., Drbal K., Cerný J., Hilgert I., Horejsí V., (1999), "Characterization of the human leukocyte GPI-anchored glycoprotein CDw108 and its relation to other similar molecules", *Immunobiology*, 200 (2), 234-245.
- [22] Yamada A., Kubo K., Takeshita T., Harashima N., Kawano K., Mine T., Sagawa K., Sugamura K., Itoh K., (1999), "Molecular cloning of a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CDw108", *The Journal of Immunology*, 162 (7), 4094-4100.

- [23] Pasterkamp R. J., Peschon J. J., Spriggs M. K., Kolodkin A. L., (2003), "Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs", *Nature*, 424 (6947), 398-405.
- [24] Jongbloets B. C., Ramakers G. M., Pasterkamp R. J., (2013), "Semaphorin7A and its receptors: pleiotropic regulators of immune cell function, bone homeostasis, and neural development", *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 24 (3), 129-138.
- [25] Lazova R., Gould Rothberg B. E., Rimm D., Scott G., (2009), "The semaphorin 7A receptor Plexin C1 is lost during melanoma metastasis", *The American Journal of Dermatopathology*, 31 (2), 177-181.
- [26] Scott G. A., McClelland L. A., Fricke A. F., Fender A., (2009), "Plexin C1, a receptor for semaphorin 7a, inactivates cofilin and is a potential tumor suppressor for melanoma progression", *Journal of Investigative Dermatology*, 129 (4), 954-963.
- [27] Zhang M., Wang H., Jin F., (2017), "The role of semaphorin 7A and its receptor plexin C1 in the migration of NSCLC cells", *RSC Advances*, 7 (89), 56280-56288.
- [28] Chen J., Liu H., Chen J., Sun B., Wu J., Du C., (2020), "PLXNC1 Enhances Carcinogenesis Through Transcriptional Activation of IL6ST in Gastric Cancer", *Frontiers in Oncology*, 10:33.
- [29] NazimTurhal S., Dogan M., Esendagli G., Artac M., Korkmaz L., Coskun H. S., Goker E., PerranYumuk F., Bilgetekin I., Kose F., Uncu D., Kavgaci H., Akyol G., Ozet A., Yagci T., (2022), "The Relationship Between Plexin C1 Overexpression and Survival in Hepatocellular Carcinoma: a Turkish Oncology Group (TOG) Study", *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 53 (2), 356-362.
- [30] Odabas G., Cetin M., Turhal S., Baloglu H., Sayan A. E., Yagci T., (2018), "Plexin C1 Marks Liver Cancer Cells with Epithelial Phenotype and Is Overexpressed in Hepatocellular Carcinoma", *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2018, 4040787.
- [31] Delorme G., Saltel F., Bonnelye E., Jurdic P., Machuca-Gayet I., (2005), "Expression and function of semaphorin 7A in bone cells", *Biology of the Cell*, 97 (7), 589-597.
- [32] Guan J. L., (2010), "Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer", *IUBMB Life*, 62 (4), 268-276.
- [33] Messina A., Ferraris N., Wray S., Cagnoni G., Donohue D. E., Casoni F., Kramer P. R., Derijck A. A., Adolfs Y., Fasolo A., Pasterkamp R. J., Giacobini P., (2011), "Dysregulation of Semaphorin7A/ β 1-integrin signaling leads to defective

GnRH-1 cell migration, abnormal gonadal development and altered fertility", *Human Molecular Genetics*, 20 (24), 4759-4774.

- [34] Oinuma I., Katoh H., Negishi M., (2006), "Semaphorin 4D/Plexin-B1-mediated R-Ras GAP activity inhibits cell migration by regulating beta(1) integrin activity", *Journal of Cell Biology*, 173 (4), 601-613.
- [35] Scott G. A., McClelland L. A., Fricke A. F., (2008), "Semaphorin 7a promotes spreading and dendricity in human melanocytes through beta1-integrins", *Journal of Investigative Dermatology*, 128 (1), 151-161.
- [36] Hota P. K., Buck M., (2012), "Plexin structures are coming: opportunities for multilevel investigations of semaphorin guidance receptors, their cell signaling mechanisms, and functions", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69 (22), 3765-3805.
- [37] Walker S. A., Cullen P. J., Taylor J. A., Lockyer P. J., (2003), "Control of Ras cycling by Ca²⁺", *FEBS Letters*, 546 (1), 6-10.
- [38] Oinuma I., Ishikawa Y., Katoh H., Negishi M., (2004), "The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras", *Science*, 305 (5685), 862-865.
- [39] Toyofuku T., Yoshida J., Sugimoto T., Zhang H., Kumanogoh A., Hori M., Kikutani H., (2005), "FARP2 triggers signals for Sema3A-mediated axonal repulsion", *Nature Neuroscience*, 8 (12), 1712-1719.
- [40] Uesugi K., Oinuma I., Katoh H., Negishi M., (2009), "Different requirement for Rnd GTPases of R-Ras GAP activity of Plexin-C1 and Plexin-D1", *Journal of Biological Chemistry*, 284 (11), 6743-6751.
- [41] Chen Y., Soong J., Mohanty S., Xu L., Scott G., (2013), "The neural guidance receptor Plexin C1 delays melanoma progression", *Oncogene*, 32 (41), 4941-4949.
- [42] Prunier C., Prudent R., Kapur R., Sadoul K., Lafanechère L., (2017), "LIM kinases: cofilin and beyond", *Oncotarget*, 8 (25), 41749-41763.
- [43] Scott R. W., Olson M. F., (2007), "LIM kinases: function, regulation and association with human disease", *Journal of Molecular Medicine*, 85 (6), 555-568.
- [44] Manetti F., (2012), "LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators", *Medicinal Research Reviews*, 32 (5), 968-998.

- [45] Arnaout M. A., Goodman S. L., Xiong J. P., (2007), "Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion", *Current Opinion in Cell Biology*, 19 (5), 495-507.
- [46] Hynes R. O., (1987), "Integrins: a family of cell surface receptors", *Cell*, 48 (4), 549-554.
- [47] Takada Y., Ye X., Simon S., (2007), "The integrins", *Genome Biology*, 8 (5), 215.
- [48] Howe G. A., Addison C. L., (2012), " β 1 integrin: an emerging player in the modulation of tumorigenesis and response to therapy", *Cell Adhesion and Migration*, 6 (2), 71-77.
- [49] Crowe D. L., Ohannessian A., (2004), "Recruitment of focal adhesion kinase and paxillin to beta1 integrin promotes cancer cell migration via mitogen activated protein kinase activation", *BMC Cancer*, 4, 18.
- [50] Saleem S., Li J., Yee S.-P., Fellows G. F., Goodyer C. G., Wang R., (2009), " β 1 integrin/FAK/ERK signalling pathway is essential for human fetal islet cell differentiation and survival", *The Journal of Pathology*, 219 (2), 182-192.
- [51] Sawai H., Okada Y., Funahashi H., Matsuo Y., Takahashi H., Takeyama H., Manabe T., (2005), "Activation of focal adhesion kinase enhances the adhesion and invasion of pancreatic cancer cells via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling pathway activation", *Molecular Cancer*, 4, 37.
- [52] Singh A. K., Kumar R., Pandey A. K., (2018), "Hepatocellular Carcinoma: Causes, Mechanism of Progression and Biomarkers", *Current Chemical Genomics and Translational Medicine*, 12, 9-26.
- [53] Migliore C., Giordano S., (2008), "Molecular cancer therapy: can our expectation be MET?", *European Journal of Cancer*, 44 (5), 641-651.
- [54] Giordano S., Columbano A., (2014), "Met as a therapeutic target in HCC: Facts and hopes", *Journal of Hepatology*, 60 (2), 442-452.
- [55] Tamagnone L., Comoglio P. M., (2000), "Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond", *Trends in Cell Biology*, 10 (9), 377-383.
- [56] Walzer T., Galibert L., Comeau M. R., De Smedt T., (2005), "Plexin C1 engagement on mouse dendritic cells by viral semaphorin A39R induces actin cytoskeleton rearrangement and inhibits integrin-mediated adhesion and chemokine-induced migration", *Journal of Immunology*, 174 (1), 51-59.
- [57] Granja T., Köhler D., Mirakaj V., Nelson E., König K., Rosenberger P., (2014), "Crucial role of Plexin C1 for pulmonary inflammation and survival during lung injury", *Mucosal Immunology*, 7 (4), 879-891.

- [58] König K., Marth L., Roissant J., Granja T., Jennewein C., Devanathan V., Schneider M., Köhler D., Zarbock A., Rosenberger P., (2014), "The plexin C1 receptor promotes acute inflammation", *European Journal of Immunology*, 44 (9), 2648-2658.
- [59] Chen J., Feng W. L., Mo W. J., Ding X. W., Xie S. N., (2015), "Expression of integrin-binding protein Nischarin in metastatic breast cancer", *Molecular Medicine Reports*, 12 (1), 77-82.
- [60] Misra U. K., Deedwania R., Pizzo S. V., (2005), "Binding of activated alpha2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-dependent activation of LIMK", *Journal of Biological Chemistry*, 280 (28), 26278-26286.
- [61] Li Z. F., Yao Y. D., Zhao Y. Y., Liu Y., Liu Z. H., Hu P., Zhu Z. R., (2020), "Effects of PAK4/LIMK1/Cofilin-1 signaling pathway on proliferation, invasion, and migration of human osteosarcoma cells", *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34 (9).
- [62] Liao J. K., Seto M., Noma K., (2007), "Rho kinase (ROCK) inhibitors", *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 50 (1), 17-24.
- [63] Semenova G., Chernoff J., (2017), "Targeting PAK1", *Biochemical Society Transactions*, 45 (1), 79-88.
- [64] Robinson D. R., Wu Y. M., Lin S. F., (2000), "The protein tyrosine kinase family of the human genome", *Oncogene*, 19 (49), 5548-5557.
- [65] Chen S., Cai C., Sowalsky A. G., Ye H., Ma F., Yuan X., Simon N. I., Gray N. S., Balk S. P., (2018), "BMX-Mediated Regulation of Multiple Tyrosine Kinases Contributes to Castration Resistance in Prostate Cancer", *Cancer Research*, 78 (18), 5203-5215.
- [66] Kramer I. M., (2016), "Chapter 10 - Regulation of Cell Proliferation by Receptor Tyrosine Protein Kinases". In: I. M. Kramer, Editor, "Signal Transduction (Third Edition)", Academic Press.
- [67] Kornmann M., Korc M., (2013), "Fibroblast Growth Factor Receptors and Cancer-Associated Perturbations". In: W. J. Lennarz and M. D. Lane, Editors, "Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)", Academic Press.
- [68] Yashiro M., Kuroda K., Masuda G., Okuno T., Miki Y., Yamamoto Y., Sera T., Sugimoto A., Kushiyama S., Nishimura S., Togano S., Ohira M., (2021), "Clinical difference between fibroblast growth factor receptor 2 subclass, type IIIb and type IIIc, in gastric cancer", *Scientific Reports*, 11 (1), 4698.

- [69] Pollak M., (2008), "Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia", *Nature Reviews Cancer*, 8 (12), 915-928.
- [70] Gnanasambandan K., Sayeski P. P., (2011), "A structure-function perspective of Jak2 mutations and implications for alternate drug design strategies: the road not taken", *Current Medicinal Chemistry*, 18 (30), 4659-4673.
- [71] Reis-Filho J. S., Steele D., Di Palma S., Jones R. L., Savage K., James M., Milanezi F., Schmitt F. C., Ashworth A., (2006), "Distribution and significance of nerve growth factor receptor (NGFR/p75NTR) in normal, benign and malignant breast tissue", *Modern Pathology*, 19 (2), 307-319.
- [72] Heldin C.-H., Westermark B., (1999), "Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor", *Physiological Reviews*, 79 (4), 1283-1316.
- [73] Becker G., Schmitt-Graeff A., Ertelt V., Blum H. E., Allgaier H. P., (2007), "CD117 (c-kit) expression in human hepatocellular carcinoma", *Clinical Oncology*, 19 (3), 204-208.
- [74] Wang W., Shui L., Liu Y., Zheng M., (2021), "C-Kit, a Double-Edged Sword in Liver Regeneration and Diseases", *Frontiers in Genetics*, 12:598855.
- [75] Darling T. K., Lamb T. J., (2019), "Emerging Roles for Eph Receptors and Ephrin Ligands in Immunity", *Frontiers in Immunology*, 10:1473.
- [76] Segers V. F. M., Dugaucquier L., Feyen E., Shakeri H., De Keulenaer G. W., (2020), "The role of ErbB4 in cancer", *Cellular Oncology*, 43 (3), 335-352.
- [77] Mitra S. K., Hanson D. A., Schlaepfer D. D., (2005), "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6 (1), 56-68.
- [78] Shen K., Moroco J. A., Patel R. K., Shi H., Engen J. R., Dorman H. R., Smithgall T. E., (2018), "The Src family kinase Fgr is a transforming oncoprotein that functions independently of SH3-SH2 domain regulation", *Science Signaling*, 11 (553).
- [79] Tsiamis A. C., Morris P. N., Marron M. B., Brindle N. P. J., (2002), "Vascular Endothelial Growth Factor Modulates the TIE-2:TIE-1 Receptor Complex", *Microvascular Research*, 63 (2), 149-158.
- [80] Guo Y. J., Pan W. W., Liu S. B., Shen Z. F., Xu Y., Hu L. L., (2020), "ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis", *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19 (3), 1997-2007.

- [81] Xing J., Ginty D. D., Greenberg M. E., (1996), "Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase", *Science*, 273 (5277), 959-963.
- [82] Nitulescu G. M., Van De Venter M., Nitulescu G., Ungurianu A., Juzenas P., Peng Q., Olaru O. T., Grădinaru D., Tsatsakis A., Tsoukalas D., Spandidos D. A., Margina D., (2018), "The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review)", *International Journal of Oncology*, 53 (6), 2319-2331.
- [83] Hermida M. A., Dinesh Kumar J., Leslie N. R., (2017), "GSK3 and its interactions with the PI3K/AKT/mTOR signalling network", *Advances in Biological Regulation*, 65, 5-15.
- [84] Zhu J., Balan V., Bronisz A., Balan K., Sun H., Leicht D. T., Luo Z., Qin J., Avruch J., Tzivion G., (2005), "Identification of Raf-1 S471 as a novel phosphorylation site critical for Raf-1 and B-Raf kinase activities and for MEK binding", *Molecular Biology of the Cell*, 16 (10), 4733-4744.
- [85] Hu X., Li J., Fu M., Zhao X., Wang W., (2021), "The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic", *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6 (1), 402.
- [86] Hoesel B., Schmid J. A., (2013), "The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer", *Molecular Cancer*, 12 (1), 86.
- [87] de Mel S., Mustafa N., Selvarajan V., Azaman M. I., Jaynes P. W., Venguidessane S., Phuong H. M., Alnaseri Z. T., Phyu T., Girard L.-P., Chng W. J., Wardyn J., Li Y., An O., Yang H., Ng S. B., Jeyasekharan A. D., (2022), "T and NK cell lymphoma cell lines do not rely on ZAP-70 for survival", *PLOS One*, 17 (1).
- [88] Massagué J., (2012), "TGF β signalling in context", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13 (10), 616-630.
- [89] Sano Y., Harada J., Tashiro S., Gotoh-Mandeville R., Maekawa T., Ishii S., (1999), "ATF-2 Is a Common Nuclear Target of Smad and TAK1 Pathways in Transforming Growth Factor- β ; Signaling", *Journal of Biological Chemistry*, 274 (13), 8949-8957.
- [90] Zhang Y., Feng X.-H., Derynck R., (1998), "Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- β -induced transcription", *Nature*, 394 (6696), 909-913.
- [91] Rudack T., Xia F., Schlitter J., Kötting C., Gerwert K., (2012), "Ras and GTPase-activating protein (GAP) drive GTP into a precatalytic state as revealed by combining FTIR and biomolecular simulations", *Biophysics and Computational Biology*, 109 (38), 15295-15300.

- [92] Yoon S.-O., Shin S., Lipscomb E. A., (2006), "A Novel Mechanism for Integrin-Mediated Ras Activation in Breast Carcinoma Cells: The $\alpha 6\beta 4$ Integrin Regulates ErbB2 Translation and Transactivates Epidermal Growth Factor Receptor/ErbB2 Signaling", *Cancer Research*, 66 (5), 2732-2739.



ÖZGEÇMİŞ

Maide Şeker, lisans eğitimini Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde aldı. 2019 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitiminde farklı projelerde proje bursiyeri olarak çalıştı.



EKLER

EK A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Şeker M., Dik Ş., Bahçekapılı B. M., Odabaş G., Çetin M., Yağcı T., (2021), "Hepatosellüler Karsinomada Plexin-C1 Tarafından Düzenlenen Reseptör Tirozin Kinaz ve Hücre-içi Sinyal Yolaklarının Araştırılması", 5. GTÜ Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Kocaeli, Türkiye, 10-11 Haziran.

EK B: Şekil Kullanım İzinleri

Tablo B1.1: Kullanılan şekiller için alınan izinler.

Şekil Numarası	Lisans Tarihi	Lisans Numarası	Hak Sahibi
Şekil 2.1	11/06/2022	5325881076329	Elsevier
Şekil 2.2	14/06/2022	5327651243346	Wiley