

TC.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE  
PROLİFERASYONUNDA LÖSİNCE ZENGİN  
TEKRARLAR İÇEREN G-PROTEİN ARACILIKLI  
RESEPTÖR 5 (*LGR5*)'İN ÖNEMİ**

**SOHEIL AKBARI**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İZMİR-2012**

DEU.HSILMSc-2008970098

TC.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE  
PROLİFERASYONUNDA LÖSİNCE ZENGİN  
TEKRARLAR İÇEREN G-PROTEİN ARACILIKLI  
RESEPTÖR 5 (*LGR5*)'İN ÖNEMİ**

**SOHEIL AKBARI**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Ş. Esra Erdal

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından  
DEU 2011-KB-SAG-001 sayı ile desteklenmiştir.

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Doç. Dr. Esra ERDAL'ın danışmanı olduğu Soheil Akbari tarafından gerçekleştirilen "**Hepatosellüler Karsinoma Hücre Proliferasyonunda Lösince Zengin Tekrarlar İçeren G-protein Aracılıklı Reseptör 5 (LGR5)'in Önemi**" isimli bu tez 11.07.2012 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.



**Jüri Başkanı**

Doç. Dr. Ş. Esra ERDAL

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



**Jüri Üyesi**

Prof. Dr. S. Neşe ATABEY

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



**Jüri Üyesi**

Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**Yedek Jüri Üyesi**

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ERESEN YAZICIOĞLU

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Yedek Jüri Üyesi**

Doç. Dr. Mukaddes GÜNELİ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

| <b>İÇİNDEKİLER</b>                                                                                          | <b>Sayfa No</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| TABLO DİZİNİ.....                                                                                           | İV              |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                                        | V               |
| KISALTMALAR .....                                                                                           | VI              |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                               | Viii            |
| ÖZET.....                                                                                                   | 1               |
| ABSTRACT.....                                                                                               | 3               |
| <b>1.GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>                                                                                 | <b>5</b>        |
| <b>2.GENEL BİLGİLER.....</b>                                                                                | <b>7</b>        |
| 2.1. Hepatoselüler Karsinom .....                                                                           | 7               |
| 2.2. Wnt Sinyal Yolağı.....                                                                                 | 10              |
| 2.3. LGR5'in Wnt/ $\beta$ -katenin Sinyal Yolağı Yedefi Olarak Normal ve Kanserli<br>Dokulardaki Rolü ..... | 12              |
| 2.4. LGR5'in yapısı ve işlevi.....                                                                          | 13              |
| 2.5. Wnt/ $\beta$ -katenin Sinyalizasyonunun HCC'deki Rolü.....                                             | 15              |
| 2.6. LGR5-R spondin Sinyalizasyonu ve Olası Rollerini .....                                                 | 16              |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>                                                                              | <b>18</b>       |
| 3.1. Araştırmanın Tipi.....                                                                                 | 18              |
| 3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı .....                                                                      | 18              |
| 3.3. Araştırma Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları .....                                                  | 18              |
| 3.4. Çalışma Materyali .....                                                                                | 18              |
| 3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....                                                                         | 18              |
| 3.6. Veri Toplama Araçları .....                                                                            | 18              |
| 3.6.1. Hücre Kültürü.....                                                                                   | 18              |
| 3.6.2. Hücre Sayımı ve Canlılık Testi .....                                                                 | 19              |
| 3.6.3. Lityum Uygulanması .....                                                                             | 20              |
| 3.6.4. LGR5 Ekspresyonunun RNA Düzeyinde Belirlenmesi.....                                                  | 20              |
| 3.6.4.1. Transfekte Edilen ve Edilmeyen HCC Hücre Hatlarından Total RNA Eldesi .....                        | 21              |
| 3.6.4.2. Trizol Yöntemi ile Total RNA İzolasyonu.....                                                       | 21              |
| 3.6.4.2.1 RNA Miktarının Ölçümü.....                                                                        | 22              |

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6.4.3. cDNA Sentezi.....                                                                                                                   | 22 |
| 3.6.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....                                                                                              | 23 |
| 3.6.4.4.1. RT-PCR İle Elde Edilen Ürünlerin Agaroza Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi.....                                   | 24 |
| 3.6.5. LGR5 Geçici Transfeksiyon Yöntemi İle Aşırı Ekspresyonunun Sağlanması.....                                                            | 25 |
| 3.6.5.1. Transformasyon .....                                                                                                                | 26 |
| 3.6.5.2. Miniprep plazmid DNA İzolasyonu .....                                                                                               | 26 |
| 3.6.5.3. Restriksiyon Enzim Kesimi .....                                                                                                     | 27 |
| 3.6.5.4. Maksiprep plazmid DNA İzolasyonu .....                                                                                              | 27 |
| 3.6.5.5. Transfeksiyon .....                                                                                                                 | 28 |
| 3.6.5.5.1. Transfeksiyon Optimizasyonunun Floresan Mikroskopu Kullanılarak Takibi...                                                         | 28 |
| 3.6.6. Transfekte Edilen ve Edilmeyen HCC Hücre Hatlarından Protein Düzeyinde LGR5 Ekspresyonun “Western Blot” Yöntemi İle Belirlenmesi..... | 30 |
| 3.6.6.1. Optimize Transfeksiyon Koşulları .....                                                                                              | 30 |
| 3.6.6.2. Total Protein Lizatı Hazırlanması.....                                                                                              | 31 |
| 3.6.6.2.1. Protein Miktarlarının Belirlenmesi .....                                                                                          | 31 |
| 3.6.6.3. Proteinlerin SDS-PAGE Poliakrilamid Jelde Yürütülmesi.....                                                                          | 32 |
| 3.6.6.4. Poliakrilamid Jelde Yürütülen Proteinlerin PVDF Membranlara Transferi ve Membranın Bloklanması.....                                 | 33 |
| 3.6.6.4.1. Proteinlerin Membrana Transferi.....                                                                                              | 33 |
| 3.6.6.4.2. Blotlama .....                                                                                                                    | 33 |
| 3.6.6.4.3. Primer ve Sekonder Antikorlar .....                                                                                               | 33 |
| 3.6.6.4.4. Proteinlerin membran üzerinde saptanması .....                                                                                    | 34 |
| 3.6.7. LGR5’in $\beta$ -katenin Bağımlı Tcf/Lef Transkripsiyonel Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi .....                            | 34 |
| 3.6.7.1. Lusiferaz Reporter Assay .....                                                                                                      | 35 |
| 3.6.7.2. Lusiferaz Ölçümü.....                                                                                                               | 36 |
| 3.6.8. LGR5’in Wnt Sinyal Yolağında Etkisini $\beta$ -katenin Proteinini İmmün Floresan ile Yolu ile Boyanması.....                          | 36 |

|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6.9. Elektronik Algılamaya Bağlı Gerçek Zamanlı Hücre Adezyonu ve Çoğalmasının İncelenmesi..... | 37        |
| 3.7 Araştırmanın Planı ve Takvimi .....                                                           | 38        |
| 3.8 Verilerin Değerlendirilmesi.....                                                              | 38        |
| 3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları .....                                                             | 39        |
| 3.10 Etik Kurul Onayı .....                                                                       | 39        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                                           | <b>40</b> |
| 4.1. HCC Hücre Hatlarında LGR5 Ekspresyonu.....                                                   | 40        |
| 4.2. HuH7 Hücre Hattında Lityum Etkisinde LGR5 Ekspresyonu .....                                  | 41        |
| 4.3. HuH7 Hücrelerinde LGR5’in Ektopik Olarak Overeksprese Edilmesi.....                          | 42        |
| 4.4 LGR5 Overekspresyonunun HuH7 Hücre Hattında Yarattığı Biyolojik Davranış Değişimleri.....     | 44        |
| 4.4.1 Hücre Adhezyonuna Etkisi.....                                                               | 44        |
| 4.4.2 Hücre Çoğalmasına Etkisi .....                                                              | 45        |
| 4.5. LGR5 Sinyalizasyonu .....                                                                    | 46        |
| 4.6 LGR5/Wnt3a/R-spondin Sinyalizasyonu .....                                                     | 47        |
| 4.7.LGR5/R-Spondin1/Wnt3a Sinyalizasyonun Hücre Çoğalmasına etkisi.....                           | 49        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                                                                           | <b>51</b> |
| <b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>                                                                 | <b>55</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR.....</b>                                                                          | <b>57</b> |
| <b>8. EKLER.....</b>                                                                              | <b>65</b> |

## **TABLÖLER DİZİNİ**

## **Sayfa No**

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> cDNA sentezinde kullanılan malzemeler ve konsantrasyonl.....                       | 22 |
| <b>Tablo 2.</b> RT-PCR’da kullanılan spesifik primerler.....                                       | 23 |
| <b>Tablo 3.</b> RT-PCR‘ da kullanılan optimum çalışma koşulları.....                               | 24 |
| <b>Tablo 4.</b> SDS-PAGE ayrıştırıcı ve istifleme jel bileşenleri.....                             | 32 |
| <b>Tablo 5.</b> Western blotlamada kullanılan antikorlar .....                                     | 34 |
| <b>Tablo 6.</b> Araştırma Planı .....                                                              | 38 |
| <b>Tablo 7.</b> HCC hücre hatlarında BCAT ve AXIN mutasyonları ve Tcf/Lef<br>Transaktivasyonu..... | 41 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

## Sayfa No

|                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Hepatokarsinogenezin çok basamaklı gelişimi.....                                                                                                                                                                                                                 | 8  |
| Şekil 2. Karaciğer gelişiminde ve hepatik tümörögenizde kök hücrelerin rolü .....                                                                                                                                                                                         | 10 |
| Şekil 3. Wnt/ $\beta$ -katenin .....                                                                                                                                                                                                                                      | 11 |
| Şekil 4. Hemositometrik olarak hücre sayımı .....                                                                                                                                                                                                                         | 19 |
| Şekil 5. Gen transkripsiyonu düzeylerinin RT-PCR ile incelenmesi.....                                                                                                                                                                                                     | 20 |
| Şekil 6. pCMV6-AC-GFP ve LGR5'in bu plazmid'e klonlandığı bölge ve işlem şeması. 25                                                                                                                                                                                       |    |
| Şekil 7. Gen ekspresyonlarındaki değişimin incelenmesi: "Western blot" .....                                                                                                                                                                                              | 30 |
| Şekil 8. Tcf/Lef transkripsiyonel aktivite incelenmesi "Lusiferaz" .....                                                                                                                                                                                                  | 35 |
| Şekil 9. Tüm HCC hücre hatlarında, transkript düzeyinde LGR5 ekspresyonları.....                                                                                                                                                                                          | 40 |
| Şekil 10. HuH7 hücrelerinde LiCl varlığında LGR5'in RNA ve Protein seviyesi .....                                                                                                                                                                                         | 42 |
| Şekil 11. A) HuH7 hücrelerinde geçici transfeksiyon ile LGR5 'in RNA seviyesinin artışı. B) HuH7 hücrelerinde geçici transfeksiyon ile LGR5 'in Protein seviyesinin artışı. C) HuH7 hücrelerinde geçici transfeksiyon sonrası ekzojen LGR5'e takılı GFP'in görüntüsü..... | 43 |
| Şekil 12. HuH7 hücrelerinde LGR5 overekspresyonun hücre adezyonuna etkisi.....                                                                                                                                                                                            | 44 |
| Şekil 13 HuH7 hücrelerinde LGR5 overekspresyonun farklı zaman aralıklarında hücre çoğalmasına etkisi .....                                                                                                                                                                | 45 |
| Şekil 14. Gerçek zamanlı hücre çoğalmasına etkisi.....                                                                                                                                                                                                                    | 46 |
| Şekil 15. HuH7 hücrelerinde LGR5 overekspresyonunun $\beta$ -katenin'in yerleşmesinde rolü.....                                                                                                                                                                           | 47 |
| Şekil 16. Atasal HuH7 hücrelerinde, farklı Wnt3a konsantrasyonlarının, farklı zaman aralıklarında, Tcf/Lef aktivasyonu üzerine etkileri .....                                                                                                                             | 47 |
| Şekil 17. LGR5 overeksprese edilmiş HuH7 hücrelerinde, farklı R-Spondin1 konsantrasyonlarının, optimize Wnt3a varlığında ve yokluğunda Tcf/Lef aktivasyonuna etkileri.....                                                                                                | 48 |
| Şekil 18. HuH7 hücrelerinde LGR5'in Wnt3a/Rspondin1 sinyalizasyonunda etkisi.....                                                                                                                                                                                         | 49 |
| Şekil 19. LGR5 overeksprese Huh7 ve boş vektör içeren Huh7 hücrelerinde, R-Spondin1/Wnt3a'in birarada, ayrı ayrı ve hiç olmadığı koşullarda hücre çoğalması Değişimleri.....                                                                                              | 50 |



## **KISALTMALAR**

**AFP:** Alfa Fetoprotein (Alpha-feto protein)

**APC:** Adenomatous polyposis coli

**BSA:** Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin)

**BCA:** Bi-sinkronik Asit (Bi-cincronic acid)

**CDK:** Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin Dependent Kinase)

**EMT:** Epitelyal–Mezenşimal geçiş(Epithelial--mesenchymal transition)

**EpCAM:** Epithelial cell adhesion molecule

**FBS:** Fötal Sığır Serumı (Fetal Bovine Serum)

**FZD-7:** Frizzled family receptor 7

**HH:** Hedgehog

**HCC:** Hepatoselüler karsinom (Hepatocellular carcinoma)

**HBV:** Hepatit B virüsü

**HCV:** Hepatit C virüsü

**HGF:** Hepatosit Büyüme Faktörü (Hepatocyte Growth Factor)

**HpCSC:** Hepatik Kanser Kök Hücre(Hepatic Cancer Stem Cell)

**GSK3b:** Glycogen synthase kinase 3 beta

**IGFR:** İnsülin benzeri büyüme faktörü (Insulin Like Growth Factor)

**LGR5:** Lösine zengin tekraralar içeren g-protein aracılıklı reseptör (leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5)

**LRP:** Low density lipoprotein receptor-related protein

**MAPK:** Mitojen Aktive Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase)

**MH-HCC:** Mature hepatosit benzeri HCC

**NaF:** Sodyum Florid (Sodium Fluoride)

**NaCl:** Sodyum Klorid (Sodium Chloride)

**OD:** Optik densite

**PBS:** Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffered Saline)

**PTEN:** Fosfataz ve tensin homolog (phosphatase and tensin homolog)

**PCP:** Planar Cell Polarity

**PCR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

**pRB:** Retinoblastom Proteini (Retinoblastoma rotein)

**PI3K:** Fosfatidil-inositol 3 Kinaz (Phosphatidyl-inositol 3 kinase)

**RT-PCR:** Ters transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse-Transcriptase polymerase chain reaction)

**SDS:** Sodyum Dodesil Sülfat (Sodium Dodesyl Sulphate)

**SDS-PAGE:** SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS Poliacrilamide Gel Electrophoresis)

**TEMED:** N,N,N,N Tetramethyl-1,2 diaminoethane

**TGF:** Transforme-edici Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)

**Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>:** Sodyum Orto-vanadat (Sodium Ortho-vanadate)

**PVDF:** Poliviniliden Diflorid (Poly-vinylidene floride)

## **Teşekkür**

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca yaptığı her türlü katkıdan dolayı başta danışmanım Doç. Dr. Esra Erdal'a ve Prof. Dr. Nese Atabey'e ve laboratuardaki arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç biliyorum.

# **HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRE PROLİFERASYONUNDA LÖSİNCE ZENGİN TEKRARLAR İÇEREN G-PROTEİN ARACILIKLI RESEPTÖR 5 (*LGR5*)'İN ÖNEMİ**

Soheil Akbari, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Inciraltı-İzmir, Türkiye, [soheilakbari123@yahoo.com](mailto:soheilakbari123@yahoo.com)

## **ÖZET**

Her yıl yaklaşık 700 bin yeni karaciğer kanseri olgusu tanımlanmaktadır ve bu vakaların yaklaşık %85-90'ı Hepatosellüler karsinoma (HCC)'dır. İkinci ölümcül kanser türü olan HCC için, hepatit virüsleri, kronik alkol kullanım, obezite ve aflatoksin gibi kimyasallar en iyi bilinen risk faktörleridir. Tüm HCC'lerin üçte birinde, mutasyonel ya da mutasyonel olmayan şekilde oluşan Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalizasyon bozuklukları, bu yolağın hepatokarsinogenez sürecindeki önemini göstermektedir. Örneğin bir Wnt reseptörü olan FZD-7 HCC'lerin %90'ında aşırı eksprese edilmektedir. Yine HCC'lerin %20 ile %40 aralığında, anormal sitoplazma ve çekirdekte lokalize  $\beta$ -katenin birikimi bulunmaktadır. Fakat, artan nükleer  $\beta$ -katenin ve onun transkripsiyonel hedeflerinin ekspresyonu arasında bir korelasyon olmaması bize HCC için bilinen hedef genlerinin ekspresyonunu kontrol eden başka sinyal yollarının olabileceğini ve/veya böylesine aktivasyona bağlı HCC'de bilinenlerin dışında başka hedef genlerin bulunabileceğini düşündürdü. Grubumuzca yapılan önceki çalışmalarda Lityum-aracılıklı Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalizasyonu uyarımı ile HCC hücre hatlarından HuH7'da LÖSİNCE ZENGİN TEKRARLAR İÇEREN G-PROTEİN ARACILIKLI RESEPTÖR 5 (*LGR5*) gen ekspresyonunun en az 10 kat arttığı gösterilmiştir. Barsak dokusunda Wnt/ $\beta$ -katenin hedef genlerinden biri olarak tanımlanan *LGR5*'in, son yıllarda kolon ve saç folikül hücrelerinde kök hücre belirtici olduğu ve özellikle kolon kanser kök hücrelerin tanımlanmasında kullanıldığı bildirilmiştir. Bu tez kapsamında ise *LGR5*'in HCC hücre hatlarında ekspresyonları ve hücre proliferasyonundaki rolü araştırılmıştır. Buna göre, ilk olarak *LGR5*, 9 HCC hücre hattından (SNU398, SNU-475, SK-Hep1, HepG2, PLC, Mahlavu, Hep3B, SNU449, HuH7), yalnızca literatürde hepatik kanser kök hücre (HpCSC) içerdikleri bildirilen, daha az motil ve invaziv olan, epitelyal-benzeri HCC hücre hatlarında (HepG2, PLC, Hep3B, HuH7) yüksek düzeyde eksprese olurken, diğerlerinde yok/düşük şeklinde bulunduğu tespit edilmiştir. İkinci olarak ise, HuH7 hücrelerinde, Wnt/ $\beta$ -

katenin sinyal yolağını tetikleyen her hangi bir indüksiyon olmadan, pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmiti ile geçici transfeksiyon aracılığı ile overeksprese edilen LGR5'in boş plazmit (mock) kontrolüne karşı hücre proliferasyonunda anlamlı değişiklikler yapmadığı bulunmuştur. Çalışmalarımızda ek olarak LGR5 sinyalizasyonunu ve bu sinyalizasyonun etkilerini aydınlatmak için LGR5 overeksprese eden hücrelerde LGR5/Wnt3a/R-Spondin1 üçlü kompleksin hücre biyolojisini ve Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağını nasıl etkilediği araştırılmıştır. R-Spondin1 tek başına Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesini artırmazken, Wnt3a tek başına Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesinin artışına sebep olmuştur. Ayrıca Wnt3a ve R-spondin1 ikisi bir arada oldukları durumda Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesi daha da artmıştır. HuH7 hücrelerinde, pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmiti ile geçici transfeksiyon aracılığı ile overeksprese edilen LGR5 ekspresyonunun ise bu değişimler üzerine etkisinin olmadığı yani, Wnt3a veya Wnt3a/R-Spondin1 sinyalizasyonunun LGR5'ten bağımsız olduğu sonucu çıkmaktadır. LGR5 overeksprese hücrelerde boş vektör kontrole göre, Wnt3a ve/veya R-Spondin1'in tek başlarına, bir arada ya da hiç olmadıkları durumlar arasında hücre proliferasyonunda bir değişimin olmadığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, LGR5'in , Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağını indüklemeyen HCC hücre proliferasyonunda anlamlı bir rolü bulunmasa da, HpCSC içeren daha az invaziv ve motil olan grupta daha fazla bulunması bize, henüz bilmediğimiz başka biyolojik davranışlarda rolü olabileceğini ve bunun ileride araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** LGR5 , Wnt/ $\beta$ -katenin , HpCSC , Proliferasyon , HCC

## **The Importance of Leucine-rich Repeat containing G-protein coupled Receptor 5 (*LGR5*) in Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cell**

Soheil Akbari, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Inciraltı-İzmir, Türkiye, [soheilakbari123@yahoo.com](mailto:soheilakbari123@yahoo.com)

### **ABSTRACT**

Every year, approximately 700 thousands of newly diagnosed liver cancer cases are reported and approximately 85% to 90 of all these cases are hepatocellular carcinoma (HCC). HCC is the third most common cause of cancer related death and the most well-known risk factors for HCC are chronic viral hepatitis, chronic alcohol consumption, obesity, and chemicals such as aflatoxin. Presence of non-mutational or mutational Wnt/ $\beta$ -catenin signaling deregulation in the one-third of all HCC indicates the importance of this pathway in hepatocarcinogenesis. For example, FZD-7, which is a Wnt receptor, is overexpressed in 90% of all HCC cases. Furthermore abnormal cytoplasmic and nuclear  $\beta$ -catenin accumulation was found in 20 to 40% of HCC cases. However the lack of correlation between increased nuclear  $\beta$ -catenin level and expression of its target proteins give us the idea that signaling pathways other than Wnt/ $\beta$ -catenin might regulate expression of the target genes and/or activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling network might control other target genes which have not been described yet. In our previous studies we observed that Lithium mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signalization caused a 10-fold increased in the expression of LGR5 in HuH-7 cells (HCC cell line). LGR5, which is defined as one of the target genes of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the intestine, is reported to be a stem cell marker in hair follicle and especially it is used for describing colon cancer stem cells. In this thesis, expression of LGR5 in HCC cell lines and role of its expression in proliferation were investigated. Firstly, we showed that, among 9 HCC cell lines (SNU398, SNU-475, SK-Hep1, HepG2, PLC, Mahlavu, Hep3B, SNU449, HuH7), while LGR5 expressed significantly in poorly invasive and motile epithelial like HCC cell lines cell lines, comprising hepatic cancer stem cell population, it has no or low expression level in the others. Secondly, when without any induction that triggers Wnt /  $\beta$ -catenin signaling pathway, LGR5 was overexpressed in HuH-7 cell lines by transient transfection with pCMV6-AC-GFP-LGR5 plasmid in the presence of mock cell controls, no significant effect was observed on proliferation. Since results obtained from mock controls comprising empty plasmid

vector, and parental controls were considerably different from each other, it is worth repeating the experiments. In addition to LGR5 signalization and effects of this signalization on cell biology, we also investigated role of the triple complex of LGR5/Wnt3a/R-Spondin1 on cell biology and on Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in the LGR5-overexpressed cells. While R-Spondin1 had no influence on transcriptional activity of Tcf/Lef, Wnt3a had little effect on Tcf/Lef activity when used alone. However, R-Spondin1 strongly synergized with Tcf/Lef activity induced by Wnt3a. In HuH7 cells, which were transiently transfected with the pCMV6-AC-GFP-LGR5 plasmid, overexpression of LGR5 did not affect either Wnt3a or Wnt3a/R-Spondin1 mediated signalization. This result implicated that Wnt3a and Wnt3a/R-Spondin1 mediated signalization was independent from LGR5-induced signalization. Wnt3a and/or R-Spondin treatment did not alter cell proliferation of LGR5-transiently transfected HuH7 cells compared to mock-transfected control cells. Overall, although LGR5 has no significant role in proliferation, its expression in HpCSC including poorly motile and invasive cell lines let us to think that it may involve in other biological behaviors of cells and this should be investigated in the future.

**Key Words:** LGR5 , Wnt/ $\beta$ -catenin , HpCSC , Proliferation , HCC

## **1.GİRİŞ VE AMAC**

Hepatosellüler karsinoma (HCC), genelde sirotik karaciğer zemininde gelişen, nodüler lezyonlarla karakterize, karaciğerin malign neoplazisidir. HCC, dünyada en çok görülen kanser türleri arasında 5. sıklıkta, mortalite oranlarında ise 3. sıklıkta yer almaktadır<sup>1</sup>. Hepatit C ve hepatit B enfeksiyonları başta olmak üzere, çeşitli kimyasallar ve başka etkenler, ileri karaciğer hastalıkları ve sonrasında HCC gelişimine zemin oluşturan risk faktörleridir. Bu faktörlere bağlı gelişen inflamasyon, karaciğerde sitokin salınımı, reaktif oksijen ve nitrojen birikimi ve buna bağlı hasar oluşmasını sağlar. Karaciğerde oluşan hasara gelen hızlı yanıt rejenerasyon yani hepatosit hücrelerinin proliferasyonudur. Sonuçta karaciğer proliferasyonun artması aynı zamanda hasara bağlı nekrozun bunu dengelemesi ve bu tekrarlayan döngünün, zaman içerisinde proliferasyon yönünde dengenin bozulmasına neden olmaktadır<sup>2</sup>. Son yıllarda hücre kültürü ve dokulardan yapılan çalışmalarda Hepatosellüler karsinomanın hepatik kök hücrelerin bu proliferasyon/nekroz döngüsü sonrası aktive olması ile oluşturduğu klonların, yeniden tümör başlatma, ilaç dirençliliği ve metastaz süreçlerinden de sorumlu olabileceği gösterilmiştir<sup>3</sup>.

Wnt/ $\beta$ -Katenin sinyal yolağı, HCC sürecinde aktive olduğu ve bunun karaciğer hücrelerin kontrolsüz proliferasyon ve immortalite kazanmasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir<sup>4,5</sup>. HCC doku ve hücrelerinde Axin1'in  $\beta$ -katenin'e bağlanma noktalarındaki mutasyonları,  $\beta$ -katenin'in Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3b) tarafından fosforile edilme noktalarındaki mutasyon ve delesyonları yoluyla Wnt sinyalizasyonunun aşırı arttığı bilinmektedir<sup>6,7</sup>. Yine, son yıllarda bir Wnt aktivasyonuna bağlı Tcf/Lef aracılıklı transkripsiyonu artan genlerden epithelial cell adhesion moleküle (EpCAM)'in, sito keratin (CK19) ve Alfa Fetoprotein (AFP) gibi önemli bir karaciğer kanseri kök hücre belirteci olduğu da gösterilmesi Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının HCC'deki önemini artırmıştır<sup>8</sup>.

2005 yılında "*International Journal of Cancer*" dergisinde yayınlanan çalışmamızda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının *in vitro* aktivatörü olan lityumun HCC hücre hatlarında beklenenin aksine proliferasyonu inhibe ettiği ve bunun hücre döngüsünün G1 aşamasında duraksama şeklinde olduğu gösterilmiştir<sup>9</sup>. Bu etkinin en fazla gözlemlendiği HCC hücre hattı olan HuH7'de lityum yarattığı genom düzeyindeki ekspresyon değişikliklerinin mikroarray yolu ile incelenmesi sonucunda, bir Wnt/  $\beta$ -katenin hedefi olduğu bilinen LGR5'in transkript düzeyinde en çok artan



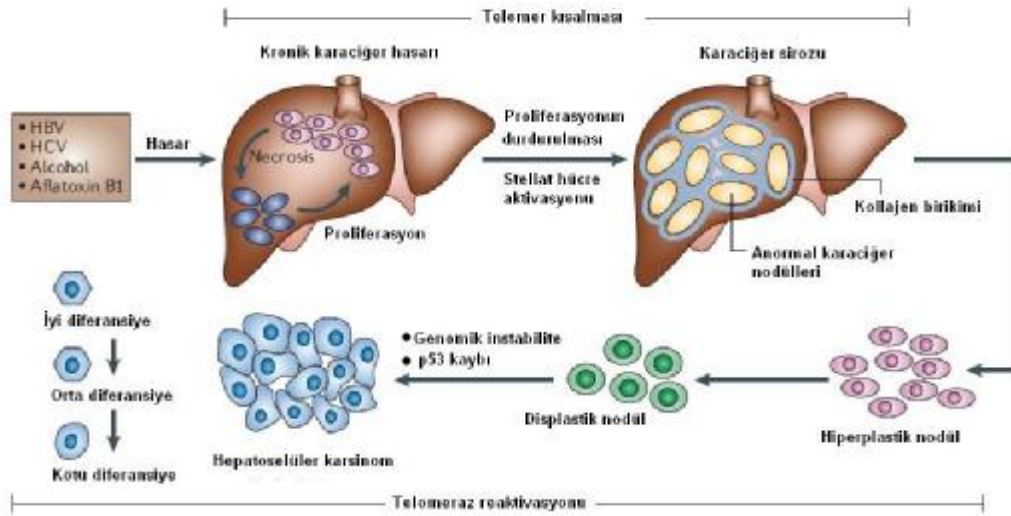
gen olduğu bulunmuştur. Bu da bize, LGR5'in HCC hücre proliferasyonundaki olası rolünü düşündürmüştür. Bu tez kapsamında LGR5'in tüm HCC hücre hatlarında ekspresyon düzeylerinin ve hücre proliferasyonundaki rolünün belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Günümüzde HCC tedavisinde, radyoterapi ve kemoterapiye dirençliliği nedeniyle sadece sınırlı cerrahi tedavilere kullanılmaktadır.<sup>10,11,12</sup>. Bu tez kapsamında bulunacak mekanizmaların ve yeni moleküllerin ileride olası tedavi hedefleri olarak kullanılmasına yol açabilir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Hepatosellüler Karsinom**

Her yıl yaklaşık 700 bin yeni karaciğer kanseri olgusu tanımlanmaktadır ve bu vakaların yaklaşık %85-90'ı Hepatosellüler karsinoma (HCC)'dir. HCC, pankreatik duktal adenokarsinom'dan sonra ikinci ölümcül kanser türü olup, Hepatit B ve C virusleri başta olmak üzere, kronik alkol kullanımı, obezite, aflatoksin gibi kimyasallar HCC için en iyi bilinen risk faktörleridir<sup>13</sup>. Bu ve benzeri etkenlerin karaciğerde oluşturduğu enflamasyonu takiben gelişen hepatosit nekrozu ve buna yanıt olan rejenerasyon süreçleri döngüsel şekilde devam etmekte ve nihayetinde kronik karaciğer hasarı oluşmaktadır. Bu süreçte yaşanan hızlı hepatosit proliferasyonu, hücrelerin telomer kısalmasına bağlı replikatif yaşlanmaya girmelerinde sonrasında da bu yaşlanmadan dolayı proliferasyonun azalmasına neden olur. Aynı zamanda enflamasyon sonrası başlıca kollajen I ve fibronektin gibi hücre dışı matriks elemanlarındaki değişime bağlı gelişen yeni mikroçevre, biliyer ağaç dallarında bulunan hepatik kök hücrelerin ve/veya satellite hücrelerin aktivasyonunu sağlar. Hayvan modellerinde oval hücre reaksiyonu olarak da tanımlanan hepatik kök hücre aktivasyonuna bağlı, oval çekirdeğe ve çok az oranda sitoplazmaya sahip immatur biliyer hücrelerin oluşturduğu anastomozlu kordların oluşturduğu reaktif duktal yapılar gösterilmiştir. Hepatik kök hücre aktivasyonu ile oluşan hem karaciğer hem biliyer hücrelere dönüşebilme yeteneği olan bipotent progenitörler hızla çoğalarak sırasıyla siroz, displastik nodül ve malign tümörü oluşturmaktadır (Şekil 1)<sup>14,15</sup>. Bu noktada, apoptoz, büyüme, proliferasyon ve hücre sağ kalımı gibi biyolojik olaylar arasındaki denge bozulurken, Transforme-edici büyüme faktörü( TGFβ1) sinyal yolunun aktivasyonu ile fibrotik bir zemin hazırlandığı bilinmektedir.<sup>16</sup> Biriken oksijen ve nitrojen radikalleri, bunlara bağlı oksidatif hasarla paralel gelişen *p53*, retinoblastoma geni (*pRb*), *p16INK4a* ve insulin benzeri büyüme faktörü-2 reseptörü (*IGF-2R*) inaktivasyonlarının hepatosellüler karsinoma gelişimini tetiklediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir<sup>17,18,19</sup>. Yine, MYC gen amplifikasyonlarına bağlı olarak myc protein artışının, HCC gelişiminde, telomeraz enzimini indükleyerek hücrelerin replikatif senesenden kaçmalarını ve kontrolsüz çoğalmalarını tetiklediği bilinmektedir<sup>20</sup> (Şekil 1).

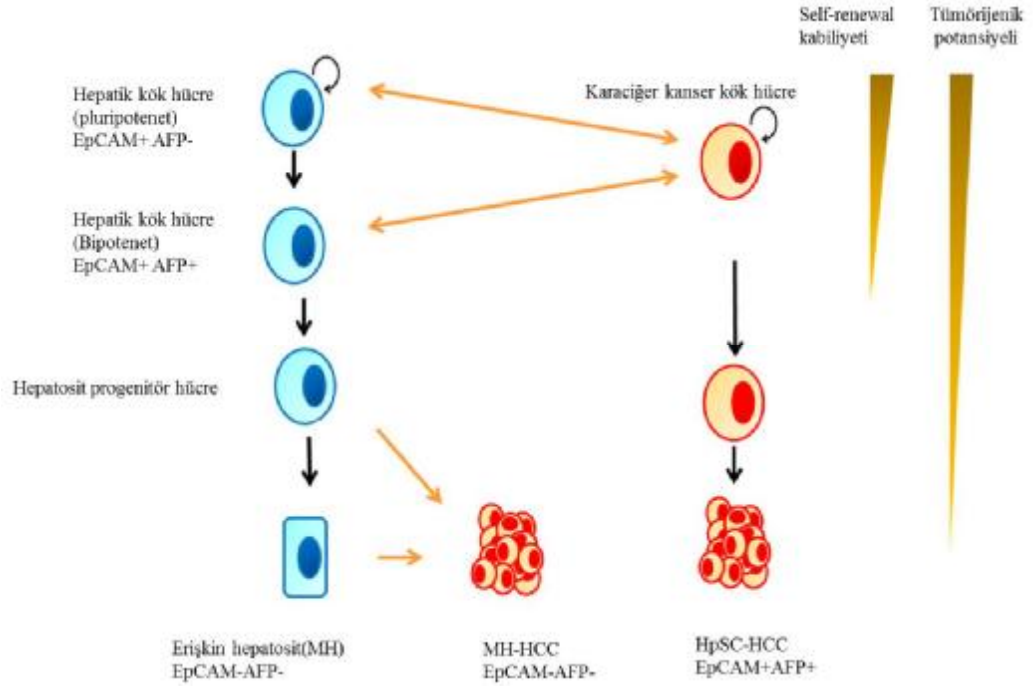


**Şekil 1.** Hepatokarsinogenezin çok basamaklı gelişimi<sup>14</sup>

HCC doku ve hücre hatlarında yapılan mikroarray gibi yeni teknolojilerle yapılan yüksek çözünürlüklü moleküler analizler, hepatokarsinogenez sürecinin genetik, epigenetik, viral ve çevresel faktörlerin bir kombinasyonuna bağlı olduğunu ve son derece kompleks ve heterojen olduğunu göstermektedir<sup>21</sup>. Yapısal genomik mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler gen ekspresyon paternini değiştirerek rol aldıkları sinyal yollarındaki etkisini göstermektedir. Hepatokarsinogenez sürecinde yeniden düzenlendiği iyi bilinen sinyal yollarından en önemlileri, Wnt/ $\beta$ -katenin, Fosfoinozitol-3-kinaz(PI3K)/Akt, TGF  $\beta$ , Hedgehog (HH), Notch ve Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) sinyal yollarıdır. Bunlardan HH sinyal yolağı, hücre proliferasyonu kontrolünde oldukça önemli bir sinyal yolağıdır. *Sonic* ya da *İndian* ligantların overekspresyonu ve/veya tümör baskılayıcı (HH inhibitör protein) genlerin inaktivasyonu, insan HCC'lerinde HH yolağının aktivasyonuna neden olmaktadır<sup>22,23,24</sup>. HCC gelişiminde çok önemli bir rol üstlendiği bilinen diğer sinyal yolu da PI3K/Akt sinyal yoludur. PI3K/Akt sinyal yolunun aktif olması ve Akt'nin negatif düzenleyicisi olan fosfataz ve tensin enzim analogu(PTEN) molekülünün ekspresyonundaki azalma HCC olgularının %40-60'ında rapor edilmiştir. Akt sinyal yolunun aktiflenmesiyle beraber apoptoz ve farklılaşmadan sorumlu olan TGF  $\beta$  yolu baskılandığı ayrıca  $\beta$ -katenin sinyal yolunun da aktif hale geçtiği bilinmektedir<sup>25</sup>.

Kanser kök hücre teorisi ilk olarak 10 sene önce hematolojik malignansiler de gösterilmiştir , bunların yanında bir çok solid tümörlerde kolorektal, pankreas, melanoma, meme, beyin ve karaciğer gibi tümörlerde de rapor edilmiştir. Kanser kök hücreleri sadece normal kök hücrelerin transformasyonundan ortaya çıkmamaktadır. Farklaşmasını tamamlayan hücrelerde oluşan mutasyonlar, bu hücrelere kök hücre özelliği kazandırmış olabileceği düşünülmektedir<sup>26,27</sup>.

HCC’de, son yıllarda heterojenite, tümör başlangıcı, metastaz ve relapstan karaciğer kanser kök hücrelerinin sorumlu olduğu gösterilmiştir<sup>28,29</sup>. Bu çalışmalarda, insan karaciğerinde, farklı potansiyelde hepatik kök hücrelerin (HpSCs) varlığı ve bu hücrelerin, hepatosit ve safra hücrelerine farklılaşabilen bipotent/progenitör hepatoblastlara dönüşebildiği deneysel olarak gösterilmiştir. Wang XW. ve grubu çalışmalarında daha önceden de başka modellerde hepatik kök hücre belirteci olarak gösterilen Wnt sinyal yolağı hedef moleküllerinden biri olan epitelyal hücre adhezyon molekülü olan EpCAM ile AFP statülerine dayanarak HCC’leri sınıflandırmışlardır<sup>30</sup>. Buna göre, hepatosit kök hücre HCC (HpSC-HCC) olarak adlandırdıkları, EpCAM ve AFP pozitif tümörlerin, zayıf prognozlu olmasına karşın, hepatosit özelliğine sahip mature hepatosit benzeri HCC (MH-HCC) olarak adlandırdıkları EpCAM ve AFP negatif tümörlerin iyi prognoz gösterdikleri bulunmuştur. EpCAM’in direk Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağı hedefi olmasının yanı sıra embriyonik kök hücrelerin devamlılığında da rol oynaması kanser kök hücrelerin aktivasyonunda önde gelen sinyal yollarından biri olduğunu vurgulamaktadır. Tüm bunların yanında Wnt/ $\beta$ -Katenin yolağının aktivasyonunun karaciğer kök hücresi olarak adlandırılan oval hücrede gösterilmesi, bu yolağın downstream’de olan EpCAM gibi, LGR5’in da HCC’de kanser kök hücre belirteci olma olasılığının test edilmesi gerekliliğini gündeme getirmiştir (Şekil 2).

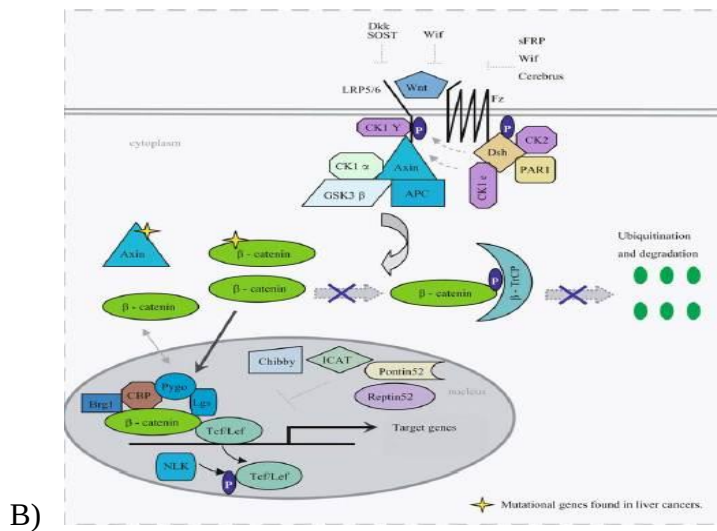
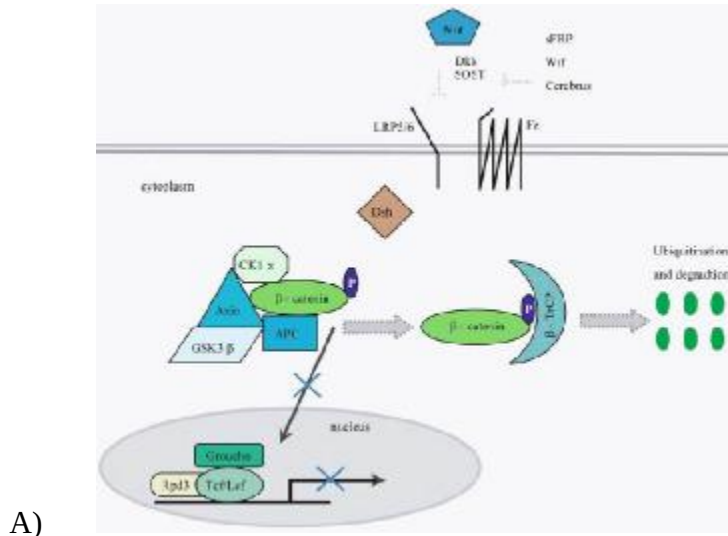


**Şekil 2.** Karaciğer gelişiminde ve hepatik tümörögenizde kök hücrelerin rolü<sup>30</sup>

## 2.2. Wnt Sinyal Yolağı

Embriyo gelişimi sırasında hücre kaderinin belirlenmesinde anahtar roller oynayan Wnt sinyal yolağı organların gelişimi ve epitelyal-mezenşimal dönüşümlerde, kök hücre kaderi belirlenmesinde, hücre proliferasyonu ve differansiasyon kararının uygulanmasında rol oynayan çok önemli bir sinyal yolağıdır<sup>31,32,33,34,35</sup>.

Wnt sinyal yolağı iki farklı şekilde *canonical* ve *non-canonical* olarak tanımlanmaktadır. Canonical yolak  $\beta$ -katenin aracılığı ile sinyal iletiği için Wnt/ $\beta$ -katenin adını taşımaktadır. Wnt-PCP (Planar Cell Polarity), Wnt-Ca<sup>2+</sup> Ror ve Ryk reseptör tirozin kinaz yolu ile Wnt sinyalini ileten yolak non-canonical olarak tanımlanmaktadır. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağı üç farklı protein kompleksi tarafından yönlendirilir. Ligant reseptör kompleksi;  $\beta$ -katenin yıkılma kompleksi ve  $\beta$ -katenin TCF transkripsiyon kompleksi (Şekil 3).



**Şekil 3.** Wnt/β-katenin. A) “off” model: Wnt proteinleri, represörleri tarafından inhibe olduğu için LRP ve Fz resptörlerine bağlanamadığından β-katenin GSK3b tarafından fosforillenir , fosforile β-katenin yıkılma kompleksi tarafından tanınır ve yıkılması sağlanır. B) “on” model: Wnt LRP ve Fz reseptörlerine bağlandığı zaman yolak açılır, bu durumda yıkılma kompleksinin fonksiyonu bloklanır, β-katenin çekirdeğe transloke olur, Tcf/Lef’e bağlanıp ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktifleştirir.<sup>36</sup>

Wnt ligantlarının olmadığı normal koşullarda sitozolik havuz içerisinde olan β-katenin, APC, Axin, Ser/Thr kinaz(CK1α),GSK3β nın birlikte oluşturduğu β-katenin yıkılma kompleksi

tarafından sürekli olarak yıkıma uğramaktadır.  $\beta$ -katenin, yıkılma kompleksiyle bağlandığı zaman N-terminalinden fosforillenerek proteoliz için ubiquitin tarafından sürekli işaretlenir. Eğer Wnt ligantları hücre yüzeyindeki, 7 kez membranı geçen Frizzled ve bir kez membranı geçen LDL ilişkili reseptör ailesi (LRP) üyelerinden (özellikle LRP5 ya da LRP6) oluşan Wnt reseptör kompleksine bağlanırsa, Dsh proteini aktif olarak GSK3b kompleksinin üyelerini bir birinden ayırarak  $\beta$ -katenin yıkılma kompleksini inhibe edecek şekilde sinyali iletilir. Böylece  $\beta$ -katenin fosforile olmadığından sitoplazmada ve sonrasında çekirdekte birikir ve sonuçta Tcf/Lef transkripsiyonel aktivasyonunu artırarak *tcf responsive* genlerin transkripsiyonunu sağlar<sup>36,37</sup>. Son yıllarda LGR5 özellikle ince bağırsak ve kolonda Tcf/Lef transkripsiyonuna bağlı olarak ekspresyonu kontrol edilen genlerden biri olarak tanımlanmıştır.

### **2.3. LGR5'in Wnt/ $\beta$ -katenin Sinyal Yolağı Hedefi Olarak Normal ve Kanseri Dokulardaki Rolü**

İnce bağırsakta Wnt sinyal yolağının hedef genleri arasında tanımlanan LGR5, ince ve kalın bağırsak ve saç foliküllerinde kök hücre belirteci olarak gösterilmiştir. Buna göre bağırsak villüslerinin kriptik bölgedeki kriptik bazal kolumnar hücrelerinin LGR5 aktivasyonuna bağlı olarak farklılaştığı, kriptik villus yönünde migrasyonu ve terminal farklılaşmış bağırsak epiteline dönüştüğü kanıtlanmıştır<sup>38</sup>. Son yıllarda H. Clevers ve ark.larının yaptığı çalışmalar başta olmak üzere, çeşitli araştırmalarda, LGR5'in bazal hücre karsinomlarında ve kolon kanserinde kök hücre aktivasyonu ve sınırsız proliferasyon yeteneğinin kazanılmasında primer role sahip olduğu da gösterilmiştir<sup>39,40,41</sup>. Yine Becker L. ve arkadaşları farelerdeki benzer şekilde insan bağırsağında da LGR5 taşıyan kök hücrelerin varlığını gözlemlemişlerdir<sup>42</sup>.

Kanser hücrelerin kan ve/veya lenf yolu ile diğer doku ve organlara migrasyonu, başka bir deyişle invazyonu ve sonrasında gelişen metastazda, Epitelyal–Mezenşimal geçiş (EMT)'nin büyük rolü olduğu bilinmektedir<sup>43</sup>. EMT'nin kolorektal kanserde dahil birçok kanser modelinde Wnt sinyal yolağı tarafından indüklenebildiği gösterilmiştir<sup>44</sup>. Bir Wnt hedef geni olan LGR5'in EMT fenotipinin ortaya çıkışında direk rolü olup olmadığı bilinmese de bazı çalışmalarda, EMT belirteci olan Vimentin (VIM) ekspresyonunun, LGR5 ekspresyonu ile paralellik gösterdiği bildirilmiştir. Yine, EMT'yi baskıladığı bilinen miR200c ekspresyonunun yüksek olduğu

kolorektal karsinoma dokularında LGR5 ekspresyonunun az olduğu bulunmuştur. Buna karşın bazı çalışmalarda farklı olarak LGR5 ile Wnt'in ve EMT'nin ters orantılı olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada LGR5 ekspresyon artışının kök hücreyi kendi nişinde alıkoyduğu ve LGR5 in azalması durumunda ise Wnt sinyalinin aktiflenip invazyonun arttığı gösterilmiştir<sup>45,46</sup>.

LGR5'in insan karaciğer kanseri oluşumundaki olası rolüne ilişkin literatürde halen sadece bir adet yayın bulunmaktadır. Bu çalışmada normal karaciğerde LGR5 ekspresyonu çok az ya da hiç eksprese olmazken,  $\beta$ -katenin mutasyonu olan HCC doku (normale göre 3 kat) ve hücre hatlarında (PLC ve HepG2'de % 87) LGR5 geni aşırı miktarda eksprese edildiği bildirilmiştir. Ek olarak, aynı çalışmada, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağı hedef genlerinden c-myc ve siklin D1 artışı olan dokularda benzer şekilde LGR5'de artışı gözlenmiştir<sup>47</sup>.

#### 2.4. LGR5'in Yapısı ve İşlevi

LGR ailesi (LGR4, LGR5 LGR6) gen ürünlerinin yapısı, glikoprotein hormon reseptör, tiroid uyarıcı hormon reseptör, folikül uyarıcı hormon reseptör ve lüteinize edici hormon reseptör ile çok benzerlik göstermektedir.<sup>48</sup> LGR ailesi temel olarak 3 gruba ayrılmaktadır; 1. Glikoprotein hormon reseptörler/GPR (LH, FSH, TSH), 2. GPR49 (LGR5), GPR48 (LGR4), LGR6 ve 3. Relaksin aile ligant reseptör (LGR7, LGR8) <sup>49</sup>.

G protein aracılıklı reseptörler hücre dışı faktörlerin uyarısını ileten en büyük reseptörler grubunda yer almaktadırlar<sup>50</sup>. Bu büyük ailenin elemanlarının en çarpıcı özelliği 17 lösin tekrarı içeren N-ucu'nun hücre dışında kalacağı şekilde yedi kez membranı kat etmeleridir <sup>51</sup>. LGR5, LGR4 ve LGR6 reseptörleri ile %54 homoloji göstermektedir. LGR5 *knockout* olan farelerde *ankyloglossia* ve mide ve bağırsak geriliminden dolayı neonatal ölüm görülmüştür <sup>52</sup>. Bunun yanında birçok araştırmacı tarafından LGR5 eksikliğinin böbrek<sup>53,54</sup>, testis<sup>55,56</sup>, göz<sup>57</sup> kemik, deri ve safra kesesinde <sup>58,59,60</sup> LGR4'un eksikliğinin de çeşitli organlarda gelişim bozukluklarına sebep olduğu gösterilmiştir. Bu iki reseptörün normal ve kanser gelişiminde kök hücreye özgül ekspresyonu olmasına rağmen, endojen uyarıcı ve/veya ligantı, sinyal yolağı mekanizması ve kök hücrede olası işlevi henüz aydınlatılmamıştır<sup>61</sup>.



LGR5 geni 12. kromozomun 12q22-q23 kolunda 144 kb'lik bir alana oturmaktadır. Bu genin 18 eksonu olup ve 2880 bp büyüklüğünde bir mRNA sentezlemektedir. LGR5 gen ürünü, 907 aminoasiti olan 100 kD ağırlığında bir proteindir<sup>62</sup>. Bu proteinin 3 içerde 3 dışarıda olmak üzere membran dışında kalan sisteince zengin aminoasitlerden oluşan 6 ilmeği mevcuttur ve G-proteinler ile bu sisteinler aracılığı ile bağlanmaktadırlar. N-ucu kısmı dışarıda kaldığından olasılıkla liganta bağlanan kısımdır. Hücre içinde bulunan C-ucu ise, protein kinaz A fosforilasyon kısmı olup ve bu bölgeler ile G-protein aracılıklı cAMP aktivasyonunda rolü olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda LGR5'in C-ucunda SH2, SH3 domainler içermesi protein-protein etkileşimlerinde rolü olabileceğini düşündürmektedir<sup>49</sup>.

Literatürde LGR5 reseptörünün ligantı, hangi proteinlerle etkileştiği ve hangi sinyal yolaklarında nasıl bir rol oynadığına ait çok sınırlı bilgi vardır. Hayvan modellerinde belirlendiğinden GPR49/HG38/FEX olarak da bilinen LGR5'in delesyonu neonatal ölüme sebebiyet verdiğinden yaşamsal bir gen olduğu ve farklı tümörlerde aşırı ekspresyonu gözlemlendiğinden neoplastik transformasyonda görev aldığı düşünülmektedir<sup>52</sup>. Bazı çalışmalarda gen amplifikasyonu, overekspresyonu veya işlev-kazanım mutasyonların gösterilmiş olması LGR5'in tümör hücrelerinin çoğalması ile ilişkili olacağını düşündürmüştür.<sup>63</sup>

Burkhard HA von Rahden ve arkadaşları Barrett özofagus adenokarsinoma (EAC) dokularının % 85'inde ve EAC dokuların % 81'inde LGR5 ekspresyonunun varlığını immunoboyamalarla tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada, boyama pozitif kabul edilen dokulardaki, LGR5+ hücre gruplarında proliferasyonu tanımlayan Ki-67 ekspresyonunun diğer hücrelere göre daha fazla olması, bu hücre gruplarının hızlı çoğalma kapasitesine sahip kanser kök hücreler olabileceğini düşündürmüştü ve LGR5 varlığı ile zayıf prognoz arasında ilişki olduğu gösterilmiştir<sup>64</sup>.

Kolon kanserli dokularda yapılan çalışmalarda LGR5'in kanserli dokuda normal kolona göre çok fazla eksprese olduğu gösterilmiş olup, bu çalışmalarda klinikopatolojik veriler incelendiğinde, LGR5 ekspresyon seviyesinin erken teşhis için kullanılmasını önerilmiştir<sup>63</sup>. LGR5'in tümör oluşumunda üstlendiği görevi aydınlatmak için yapılan çalışmalar, fare modellerinde LGR5+ hücrelerin bağırsak kanserin kaynağı olduğu gösterilmiştir. Ama halen

LGR5 fonksiyonu ve kanser kök hücrelerine nasıl bir anlam kattığı tam olarak belli değildir. Francesca Walker ve arkadaşları kolorektal kanser hücre hatlarında LGR5 ekspresyonu sessizleştğinde hücrelerin invazyonu, yüzeye bağımsız büyüme özellikleri ve xenograflarda tümör oluşturma güçlerinin arttığını, LGR5 overeksprese olduğu zaman ise hücrelerin adhezyonun arttığını ve *xenograflarda* tümör oluşturma güçlerinin azaldığı gözlemlemişlerdir<sup>45</sup>.

## 2.5. Wnt/ $\beta$ -katenin Sinyalizasyonunun HCC'deki Rolü

Literatürde bilinen Wnt yolağındaki her hangi bir yeniden düzenlenme çeşitli kanserlere kolorektal, HCC, melanom ve baş/boyun karsinomalarına yol açabilmektedir. Wnt sinyal yolağının yeniden düzenlenmesini sağlayan, gen ve gen ürünlerindeki mutasyon ve değişimlerin tanımlanması HCC de dahil olmak üzere birçok kanserin tanı ve tedavisinde önemli olacaktır. Wnt yolağının yersiz aktif olmasının hayvan ve insan deneylerinde HCC'ye yol açabildiği gösterilmiştir<sup>65,66,67</sup>. Wnt sinyal yolağı molekülünden  $\beta$ -katenin'in sitoplazma ve çekirdekte birikimi olduğu durumlarda HCC gelişimine katkı sağladığı bilinmektedir. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağın aktivasyonu  $\beta$ -katenin gibi pozitif modülatörlerin dominat fonksiyon kazandırıcı mutasyonları ve *Adenomatous polyposis coli* (APC) ve Axin gibi negatif modülatörlerin fonksiyon kaybettirici mutasyonları veya ekspresyon değişimine sebep olan epigenetik değişikliklerin HCC de varlığı gösterilmiştir<sup>68</sup>. Bununla birlikte sitokeratin 1( CK1) ve GSK-3b gibi  $\beta$ -katenin fosforilasyonunu sağlayıp ardından yıkılmasına katkı sağlayan proteinlerden birinde mutasyon olması  $\beta$ -katenin degradasyonunu bloke edip HCC'de varlığı birçok araştırmada gösterilmiştir<sup>69,70,71</sup>. Kolorektal kanser dokularında Wnt hedef genlerinden MYC ekspresyonu ve hücre döngüsü duraklamasında görevli bir siklin-bağımlı kinaz inhibitörü olan p21 ile LGR5 ekspresyonu arasında paralellik gözlenmiştir ve bu bulgu LGR5 bağırsak epitel dokularında da dolaylı veya direk olarak wnt hedefi olduğu görüşünü destekler niteliktedir. Bu verilere dayanarak Wnt yolağın onkogenik sinyalleri bir siklin-bağımlı kinaz inhibitörü ile antagonize edip hücre döngüsünü ve farklılaşmayı kontrol ettiğini düşündürmektedir<sup>46</sup>.

Kolorektal hücre hatlarında yapılan bir çalışmada  $\beta$ -katenin mutasyonu taşıyan hücre hatlarında LGR5 artışı gözlenmiş fakat APC mutasyonları tek başına LGR5 ekspresyonun

artırmak için yeterli olmamıştır. Beklenildiği gibi bu çalışmada Wnt sinyalizasyonu uyarılmasının(Wnt3a) ardından sonra  $\beta$ -katenin mutasyonlarını içeren hücre hatların LGR5 seviyesi değişmemiş ama APC mutasyonu taşıyan hücrelerde LGR5 ekspresyonu artmıştır<sup>45</sup>.

Son yıllarda karaciğer ve kolon kanser kök hücre belirteci olarak tanımlanan EpCAM'de çok iyi bilinen bir Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağı hedefidir. Kanser kök hücrelerin gen imzasının birçok kanser çeşidinde var olması tümör rekürrensini düşündürmektedir. Kolorektal kanserlerde yüksek Wnt sinyal yolağı aktivasyonu ile karakterize olan kanser kök hücre gen imzası birçok başka kanserde de zayıf prognozla ilişkilendirilmiştir. Fakat E Melo'nun çalışmasında Wnt hedef genlerini az eksprese eden tümörlerin olgunlaşmamış kanser kök hücre imzası taşıdığı bunun yanında artmış Wnt hedef genlerinin iyi prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur. Tümörögenез sırasında ASCL2 ve LGR5 de dahil olmak üzere birçok Wnt hedef geninin CpG adacıklarının metillenerek susturulduğu ve tümör büyümesi azaldığında genlerin yeniden eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu veriler Wnt hedef genlerindeki promotor metilasyonunun kolorektal kanser rekürrensinde önemli olduğunu göstermiştir<sup>72</sup>.

## **2.6. LGR5/R-Spondin Sinyalizasyonu ve Olası Roller**

2011 yılından itibaren LGR5 için ligant bulma çalışmaları sonuç vermeye başlamış ve literatüre LGR5 ligantının R-Spondin molekül ailesi üyeleri olduğunu söyleyen yayınlar girmiştir<sup>61</sup>. R-Spondin ailesi Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının potansiyel aktivatörü olan ve %60 sekans homoloji gösteren 4 üyeden (R-Spondin 1- 4) oluşan sekrete proteinlerdir. Bu ailenin bütün üyeleri gastrointestinal sistem kriptlerde hücre proliferasyonu indüklemektedir<sup>73</sup>. R-Spondinlerin sitozolik  $\beta$ -katenin seviyesini stabilize etmesi ve Wnt3a ile sinerjistik çalışması Wnt yolağını regüle eden bir molekül olduklarını gösteren bir kanıttır<sup>74,75</sup>. R-Spondin proteinlerinin FRZ ve LRP6 reseptörleri ile etkileşime girdiği bilinmektedir. Genel Wnt regülatörleri olan R-Spondinler etkilerini gerçekleştirebilmek için Wnt ligantları ve LRP6 ko-reseptörüne ihtiyaç duyarlar. R-Spondinler fosforile LRP'nin internalizasyonunu sağlayan DKK proteininin antagonistidirler ve DKK1 bağımlı LRP6 internalizasyonunu engellendiğinden LRP6 membranda birikmesini sağlayarak Wnt ligantlarını olan Wnt3a, 1 ve 7A'nın oluşturduğu Tcf/Lef yanıtını amplifiye ederler. Özetle genel olarak bu ailenin tüm üyeleri hücre yüzeyinde bulunan LRP6 reseptör

miktarını modüle ederek Wnt ligantların hücrel yanıtını regüle ederler. Ailenin tüm üyeleri aynı etkiyi yapmakla beraber en güçlü yanıtı R-Spondin1 oluşturmaktadır.

Son bir yılda, literatüre arka arkaya giren üç yayında da vurgulandığı gibi LGR4 ve LGR5 R-Spondin reseptörü gibi davranıp Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalini indüklerler. Bu çalışmalar aynı zamanda R-Spondin ailesinin LGR4 ve LGR5 ile fiziksel etkileşimi olduğunu ve fiziksel bağlantı gerçekleşmesi durumunda birlikte internalize olduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda Wnt3a varlığında R-Spondinin yarattığı Tcf/Lef artışı LGR5 in varlığının da eklenmesi ile daha da artmıştır. R-Spondin ailesinin Wnt sinyalini artırma yönündeki potansiyeli LGR4 ve LGR5 seviyesi ile belirlenmekle beraber maksimum Tcf/Lef aktivitesi Wnt3a ve LRP6 seviyesine bağlıdır<sup>61</sup>.

Bu çalışmada diğer kanser modellerinde kanser kök hücre belirteci olarak tanımlanmış LGR5'in HCC gelişimindeki olası rolü araştırılmıştır. LGR5'in HCC gelişiminde rolünün aydınlatılması preneoplastik süreçten kansere dönüşüm sürecinin detaylarının anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Bunun yanında karaciğer kanseri kök hücresi belirteci taşıyan hücrelerin sinyalizasyonlarındaki farklılıkların belirlenmesinde katkı sağlayacaktır. Çok yakın zamanda LGR5'in spesifik ligandı olarak tanımlanan R-Spondin proteinin ve R-Spondin-LGR5 bağlantısının HCC'deki rolünün aydınlatılması ve LGR5'in HCC proliferasyonundaki öneminin belirlenmeside bu çalışmanın hedeflerindendir.

### **3. GEREK VE YÖNTEM**

#### **3.1 Araştırmanın Tipi**

Deneysel nitelikte bir araştırmadır.

#### **3.2 Araştırmanın yeri ve zamanı**

Çalışma, 2010 Şubat- 2012 Şubat yılları arasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yapılmıştır.

#### **3.3 Araştırma Evreni ve Örneklemi/ çalışma Grupları**

İnsan üzerinde çalışma yapılmamıştır.

#### **3.4 Çalışma Materyali**

Çalışmada kullanılan hepatoselüler karsinoma hücre hatları olan HuH7, SNU398, SNU-475, SK-Hep1, HepG2, PLC, Mahlavu, Hep3B, SNU449 Bilkent Üniversitesinden Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından hediye edilmiştir.

#### **3.5 Araştırmanın Değişkenleri**

Çeşitli Hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmanın ilk kısımlarında LGR5 gen ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar kendi içlerinde değerlendirilmiş olup, deneysel eşit yükleme kontrolü olarak housekeeping genlerden RPL41 kullanılmıştır. Çalışmanın devam eden tüm kısımlarında ise HuH7 hücrelerinde LGR5 gen ekspresyonunu ektopik olarak arttırmak amacıyla kullanılan plazmidin, LGR5 geninin içermeyen mock plazmidi ve parental HuH7 hücreleri kontrol olarak kullanılmıştır.

#### **3.6 Veri Toplama Araçları**

##### **3.6.1. Hücre Kültürü**

Çalışmada HCC hücre hatları olan HuH7, SNU398, SNU-475, SK-Hep1, HepG2, PLC, Mahlavu, Hep3B, SNU449 kullanılmıştır. Hücreler %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom,

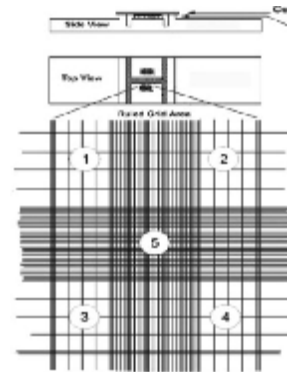
S0125), 2 mM L-glutamin (Biological Industries, 03-020-1C), 100 u/ml penisilin (Biological Industries, 03-031-1C) ve 0,1 mg/ml streptomisin (Biological Industries, 03-031-1C) ve % 1 esansiyel olmayan aminoasit karışımı içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Biological Industries, 01-050-1A) içerisinde kültüre edildi. Hücre kültürü işlemleri biogüvenlik 2 düzeyinde laminar kabinet (Thermo Scientific Cabinet / MSC1.2) içerisinde yapılırken, hücreler 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde (Thermo Scientific Incubator / Forma Stericycle CO2) uygun zaman aralığında kültüre edildi. Hücreler büyüme hızlarına ve başlangıç yoğunluklarına göre değişmekle birlikte üç ila beş günlük aralıklarla bir alt kültüre işlemleri yapıldı. Hücreler %70 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi yapıp ve hücreleri kaldırmak için Tripsin/EDTA (%0.05/%0.02, Biological industries, 03-051-5B) solüsyonu kullanıldı.

### 3.6.2. Hücre Sayımı ve Canlılık Testi

Kültürde üretilen hücrelerin ortamları uzaklaştırılıp ve 1X PBS ile iki kere yıkama yapıldı. 1X Tripsin-EDTA solüsyonu ile hücreler kaldırılıp, Elde edilen hücre süspansiyonundan 50µl alınarak tripan mavisi (Biological industries, 03-102-1B) ile karıştırıldıktan sonra hücreler Neubauer lamında 10 farklı alanda hemositometrik olarak sayılıp ve yaklaşık hücre sayısı bulundu(Şekil 4). 50µl hücre süspansiyonu + 100µl 1X PBS + 100µl tripan mavisi

Hücre sayısı,

$$\frac{\text{Toplam hücre}}{10} * \text{dilüsyon faktörü} * 10^4 = \text{Hücre/mL}$$



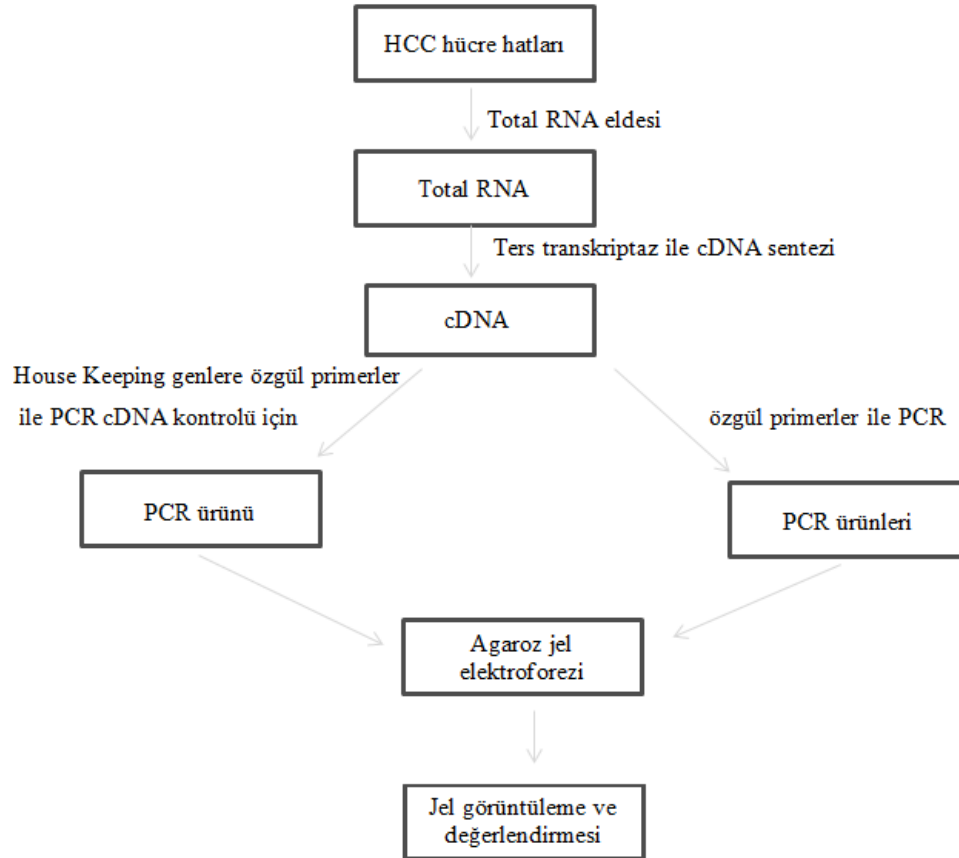
**Şekil 4.** Hemositometrik olarak hücre sayımı

### 3.6.3. Lityum Uygulanması

Lityumun moleküler düzeyde yarattığı değişimleri incelemek için pasajlanan ve gece boyunca adezyonunu tamamlamış %50 yoğunluktaki hücrelerin kültür ortamına son konsantrasyon 20mM olacak şekilde LiCl(Sigma, L9650) eklendi.

### 3.6.4. LGR5 Ekspresyonun RNA Düzeyinde Belirlenmesi

Gen transkripsiyonu analizi RT-PCR ile, aşağıdaki basamaklarda gerçekleştirildi(Şekil 5).



**Şekil 5.** Gen transkripsiyonu düzeylerinin RT-PCR ile incelenmesi

#### *3.6.4.1. Transfekte Edilen ve Edilmeyen HCC Hücre Hatlarından Total RNA Eldesi:*

HuH7 hücreleri kültüre edilip %70 yoğunluğa ulaştıklarında deney başlatıldı. Deney sırasında hücreler tripsinle kaldırılıp, sayılarak, bir sonraki gün %70 yoğunluğa erişebilecek sayıda kültüre edildi. Ertesi gün %70 yoğunluğa erişen hücrelerin ortamı uzaklaştırılıp, PBS (1X) ile yıkanıp ve transfeksiyon yapıldı. 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonra Trizol yöntemi ( Guanidinyum Tiyosiyanat-Fenol-Kloroform ) ile total RNA eldesi yapıldı. HuH7 hücre hatı için 72 saat dolduktan sonra, hücre alt kültüre edilip tekrar transfeksiyon yapıldıktan sonra 6. ve 7. gün RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu öncesinde kullanılan tüm ependorflar ve hücre kazıyıcıları %0,1 DEPC (Applchem, 0881) ile muamele edilmiş distile su içerisinde 24 saat bekletildikten sonra otoklavlanarak DEPC'den arındırıldı.

#### *3.6.4.2. Trizol Yöntemi ile Total RNA İzolasyonu*

Hücreler buz üzerine alınarak ve ortamları uzaklaştırılıp ve soğuk 1X PBS ile 3 kez yıkanma yapıldı. Hücrelerin üzerine uygun miktarda (1mL) Trizol kimyasalı (RNAtidy G, Applchem, A2867-0200) eklenip hücre kazıyıcı (Costar Cell scraper, 3010) ile kazınma işlemi yapıldı. Soğuk ependorflar içine alınan hücre solüsyonu üzerine 200µL kloroform (Sigma, C-2432) eklenerek ve buz üzerinde bekletilmiş, organik ve sulu fazın ayrışması için 12,000 rpm' de santrifüj yapıldı. (Eppendorf Centrifuge, 5415R). RNA'ları içeren sulu faz yeni bir tüpe alındıktan sonra RNA presipitasyonu için eşit hacimde izopropanol (Applchem, A3928) eklenerek -20 °C'de bir gece inkübasyon yapıldı. Presipite olan RNA, 12,000 rpm de 15 dk. santrifüjlenerek çöktürülmüş, %75'lik etanol (Applchem, A3678) (DEPC ile muamele edilmiş distile suyla hazırlanmıştır) (Research genetics, 1-800-533-4363) ile 2 kez yıkama yapıldı ve son yıkamadan sonra çöktürülen RNA pelleti, etanolün uzaklaşması için kurumaya bırakıldı. Kuruyan RNA pelleti 50 µl RNaz'dan arındırılmış pH'ı 8'e ayarlanmış dH2O içerisinde çözüldü. Bu RNA'ların bir kısmı spektrofotometrik ölçüm için geri kalanı ise cDNA sentezi için kullanıldı.



#### 3.6.4.2.1. RNA Miktarının Ölçümü

RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayinleri için 260nm ve 280nm'deki absorbanları Picodrop (Picodrop, Picopet01) ile spektrofotometrik olarak saptandı.

RNA konsantrasyonların belirlenmesi için  $A^{260} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 40 = 1\text{ml'deki RNA miktarı (g)}$  formülü kullanıldı(A).

$A^{260}/A^{280}$  oranından faydalanarak RNA saflık değerleri elde edildi. En iyi sonuç için RNA'ların saflıkları 1.6-1.8 arasında olmasına dikkat edildi. Protein veya DNA bulaşı olan RNA'lar saflaştırıldı.

#### 3.6.4.3. cDNA Sentezi

Hücre dizilerinden total RNA izole edilip miktarı ve kalitesi belirlendikten sonra, bir  $\mu\text{g}$  total RNA'dan, Tablo1 de listelenen malzemeleri kullanılarak cDNA sentezlendi. Bu işlemde MBI Fermentas marka cDNA sentez kiti(K1622) kullanıldı. Bu amaçla total RNA, "random primer", "Oligo(dT) primer" ve "DEPC" ile muamele edilmiş distile su içerisinde hazırlandıktan sonra 70 °C'de 5 dk. inkübe edildi. Daha sonra karışıma 5X reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü ve dNTP ve "M-MuLV Reverse Transcriptase" eklendi. 25 °C'de 10 ve 42°C'de 60 dk. inkübe edilerek ilk-zincir cDNA sentezi bir termal döngüleyici (Techne TC-312) içerisinde yapıldı. Tüpler 70 °C'de 10 dk. inkübasyon ile reaksiyon sonlandırıldı.

**Tablo1.** cDNA sentezinde kullanılan malzemeler ve konsantrasyonl

| Malzeme Adı                         | Stok konsantrasyonu            | Son konsantrasyonu                              |
|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------|
| Ribolock RNase                      | 200 U/ $\mu\text{L}$           | <b>0,2 U/ <math>\mu\text{L}</math></b>          |
| Ters transkriptaz                   | 200 U/ $\mu\text{L}$           | <b>0,2 U/ <math>\mu\text{L}</math></b>          |
| 5X reaksiyon tamponu                | 5X                             | <b>1X</b>                                       |
| dNTP karışımı                       | 10mM                           | <b>0.5 mM</b>                                   |
| Oligo(dT) primer                    | 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  | <b>0.2 <math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math></b> |
| Random hekzamer primer              | 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  | <b>0.2 <math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math></b> |
| Kontrol RNA                         | 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ | <b>1 <math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math></b>   |
| DEPC ile muamele edilmiş distile su |                                |                                                 |

#### 3.6.4.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İlk-zincir cDNA sentezlendikten sonra bu cDNA'lar (her bir cDNA reaksiyonundan 2 µl) kalıp olarak kullanılarak ilgilenilen gene özgül primerler aracılığıyla PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Primerler gen bankasında yer alan diziler üzerindeki korunmuş bölgelere özgü olacak ve ekson kesişim bölgelerini tanıyacak şekilde web tabanlı "IDT Oligodesign" programı ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)) ile tasarlanmıştır. İnternal kontrol olarak da karaciğere spesifik bir housekeeping gen olan RPL41 ve GAPDH genlerine özgül primerler kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primer dizileri aşağıdaki gibidir (Tablo 2).

**Tablo2.** RT-PCR'da kullanılan spesifik primerler

|              | İleri 5'-3'             | Geri 5'-3'               |
|--------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>LGR5</b>  | ATCGTCCAACCTCCTGTCGCTTT | TGCTCCATACTGCTGTTGTGACCT |
| <b>RPL41</b> | AACCGCTAGCTTGTGCACT     | TCCAGAATGTCACAGGTCCA     |
| <b>GAPDH</b> | GGCTGAGAACGGAAGCTTGTCAT | CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA |

Tabloda gösterilen genlere özgül primerler kullanılarak, her bir gen için farklı MgCl<sub>2</sub>(Fermentas, 00028790), farklı primer bağlanma sıcaklığı (annealing), farklı primer konsantrasyonu denenerek optimizasyon yapıldı. Bu işlemde Taq DNA polimeraz(Sigma, D6677) kullanılmıştır. Optimizasyonlar sonrası belirlenen koşullar tablo 3 de verilmiştir.

**Tablo 3.** RT-PCR‘ da kullanılan optimum çalışma koşulları

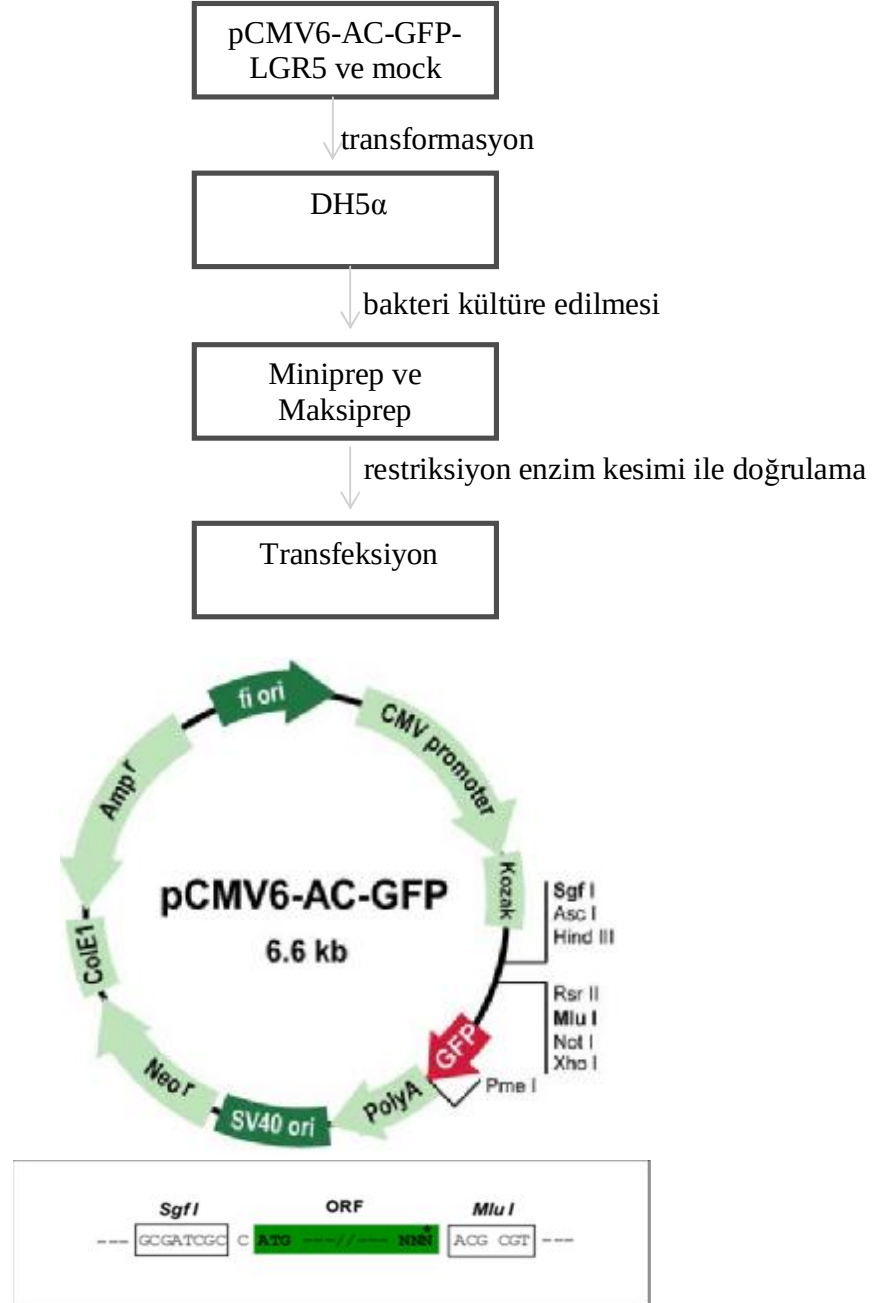
|                         | <b>LGR5</b> | <b>RPL41</b> |
|-------------------------|-------------|--------------|
| <b>dNTP</b>             | 0.2mM       | 0.2mM        |
| <b>MgCL2</b>            | 1.5mM       | 1.5mM        |
| <b>Primer</b>           | 0.5pmol/ µL | 1pmol/µL     |
| <b>Taq polimeraz</b>    | 0.625 U     | 1.25U        |
| <b>İlk denatürasyon</b> | 95°C, 5dk   | 95 °C , 5dk  |
| <b>Denatürasyon</b>     | 95°C, 30sn  | 95 °C,30sn   |
| <b>Bağlanma</b>         | 50°C,40sn   | 55 °C,40sn   |
| <b>Uzama</b>            | 72°C,40sn   | 72°C,30sn    |
| <b>Döngü sayısı</b>     | 25          | 28           |
| <b>Son uzama</b>        | 72°C,7dk    | 72°C,5dk     |

**3.6.4.4.1. RT-PCR ile Elde Edilen Ürünlerin Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi ve Görüntülenmesi**

Belirtilen deney koşullarında elde edilen PCR ürünlerinin görüntülenmesi için 40 ml TAE tamponu içerisinde %2’lik agaroz (Applichem, 5510UB) jel hazırlanmıştır. Jel içerisine 0,5 µg/ml etidyum bromür (*Sigma*, E-8751)’de eklenmiştir. PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünlerin her birinden 10’ar µl alınarak 2 µl 6X yükleme tamponu (Fermentas, R1151) ile karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklenerek 90 V’luk gerilim altında TAE ile dolu elektroforez tankında (Thermo) yürütülmüştür. Daha sonra amplifiye edilmiş olan DNA’lar transillüminatör (Stratagene, Eagle Eye II) ile UV ışığı altında görüntülenmiştir.

### 3.6.5. LGR5 Geçici Transfeksiyon Yöntemi İle Aşırı Ekspresyonunun Sağlanması

çalışmada kullanılan pCMV6-AC-GFP-LGR5 ve pCMV6-AC-GFP ticari olarak temin edilmiştir.



Şekil 6. pCMV6-AC-GFP ve LGR5'in bu plazmid'e klonlandığı bölge

#### 3.6.5.1. Transformasyon

Kompetan hücre E-coli DH5 $\alpha$ 'dan 100 $\mu$ l alınarak ependorfa aktarıldı. Kompetan hücrelerin üzerine 200ng plazmid eklendi. 30 dakika buz üzerinde bekletilen plazmid ve kompetan hücre karışımı, 42°C'lik su banyosunda 45 saniye bekletildi. Daha sonra 2 dakika buz üzerinde bekletilen karışımın üzerine 1M MgCl<sub>2</sub>'den 50  $\mu$ l içeren 900 $\mu$ l SOB ortamı eklendi. 37°C'ye ayarlanan bakteri inkübatörü içerisinde 160rpm'de 1 saat inkübe edildi. Ampisilin içeren ve içermeyen Luria Broth (LB) veya Luria Bertani Broth sıvı ortamlarına ekim yapıldı. 37°C'ye ayarlanan bakteri inkübatöründe gece boyunca bırakıldı. Ampisilin içeren ortamda üreyen ve tek tek düşmüş kolonilerden bir koloni seçilerek 5ml LB ortamına ekildi. Bakteri inkübatöründe 37°C ve 160rpm'de gece boyu inkübe edildiler. Ampisilinli LB ortamında çoğalan vektör içeren E-coli DH5 $\alpha$  hücrelerinin 1,5ml'si Miniprep plazmid DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Restriksiyon enzim kesiminden sonra, maksiprep plazmid DNA izolasyonu için 250ml ampisilin içeren LB ortamına ekim yapılmış, 37°C'ye ayarlanan bakteri inkübatöründe gece boyunca bırakılmıştır. Kullanılan ortamlar ve hazırlanışları tablo ek'de gösterilmiştir.

#### 3.6.5.2. Miniprep plazmid DNA İzolasyonu

Uygulama basamakları,

37°C'lik bakteri inkübatöründe 160rpm'de ve ampisilin içeren LB ortamında bırakılan bakteri kültüründen 1,5ml alınarak ependorfa aktarıldı. Önceden +4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüj içerisinde 2500rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldı. 100 $\mu$ l ALS-1 solüsyonu içerisinde resüspanse edilen pellet, kuvvetlice vortekslendi. Taze hazırlanan ALS-2 solüsyonu ependorfa eklendi. Tüp 5 kere alt üst edildi. 150  $\mu$ l önceden soğutulmuş ALS-3 solüsyonu ependorfa eklendi ve 5dk buz üzerinde inkübe edildi. Tüpler +4°C ve 13000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. Süpernatant üzerine eşit hacimli olacak şekilde Fenol-Kloroform-Izoamil alkol eklendi. Vortekslenen tüpler 13000rpm ve +4°C'de 5dk santrifüj edilerek üstteki şeffaf faz yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı. %70 Etanol'den süpernatantın iki kat hacminde olacak şekilde eklendi kuvvetlice vortekslenen tüpler, 5' oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüpler +4°C ve 13000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi,

süpernatant atıldı. Pelletin üzerine %70 Etanol'den 1ml eklendi. Tüpler +4°C ve 13000rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atılarak pellet kurumaya bırakıldı. Pellet 50µl Tris-EDTA (pH 8,0) solüsyonu içerisinde çözüldükten sonra 260 ve 280nm'de saflık ve konsantrasyon ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen plazmid DNA'larının restriksiyon enzim kesimleri yapılmıştır. Miniprep plazmid DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar ve içerikleri ek'de gösterilmiştir.

#### *3.6.5.3. Restriksiyon Enzim Kesimi*

Çalışmada kullanılan pCMV6-AC-GFP-LGR5(katalog RG212825) ve 9480 baz çifti uzunluğundadır (Şekil 6 ). Restriksiyon enzim kesimi için 1µg plazmid DNA sı ve SgfI(FD2094) ve MluI(FD0564) enzimlerini kullanılarak 37°C de 1 saatlik inkübasyon ile LGR5'in cDNAsi(NM\_003667) yerleşen bölgeden kesildi. Enzim aktivitesini sonlandırmak için tüpler 80°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Örnekler %0,8'lik agaroz jelde 100V'ta 1,5 saat yürütülerek görüntülendiler.

#### *3.6.5.4. Maksiprep plazmid DNA İzolasyonu*

Bir gece önceden 100µg/ml ampicilin içeren 250ml LB ortamında sallamalı bakteri inkübatöründe 37°C'de ve 160rpm'de inkübe edilen bakteri hücreleri 250ml'lik tüpe aktarıldı. Maksiprep plazmid DNA izolasyonu için "Invitrogen Hipure Plasmid DNA Purification Kit (K2100-02)" kullanıldı.

250ml'lik tüpe aktarılan bakteri hücreleri 4000g'de 15dk santrifüj edildi ve ortam tamamen uzaklaştırıldı. Tüpe 10ml resüspanسیون tamponu eklendi ve hücre pelleti homojen bir hale gelene kadar resüspanse edildi. Hücre süspanسیونu 50ml santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücrelerin üzerine 10ml lizis tamponu eklendi. Tüp 5 kere ters düz edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. 10ml presipitasyon tamponu eklendi. Tüp alt üst edilerek karıştırıldı. 9000g'de 30 dakika santrifüj edildi. DNA'nın bağlanması: Süpernatant daha önceden denge tamponu ile muamele edilmiş kolona aktarıldı. Hiçbir güç uygulanmadan karışımın kolondan yer çekimi yardımı ile geçmesi beklendi. Kolona 60ml yıkama tamponu eklendi. Hiçbir güç uygulanmadan karışımın kolondan yer çekimi yardımı ile geçmesi beklendi. Toplama kabı atıldı.

Kolon steril bir toplama kabına yerleştirildi. 15ml elüsyon tamponu kolona eklendi. Hiçbir güç uygulanmadan karışımın kolondan yer çekimi yardımı ile geçmesi beklendi. DNA yer çekimi ile kolondan toplama kabına indi. Kolon atıldı. Tüpe 10,5ml izopropanol eklendi. Ters düz edilerek iyice karıştırıldı. Önceden +4°C'ye ayarlanan soğutmalı santrifüj ile 9000g'de 1 saat santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Tüpler 5ml %70 Etanol'de resüspanse edilir. +4°C'de ve 9000g'de 30 dakika santrifüj edildi. Dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet kurutuldu. Kurutulan DNA pelleti 500µl TE tamponu içerisinde resüspanse edildi. Elde edilen plazmid DNA'ları 260 ve 280nm'de saflık ve konsantrasyon ölçümü yapıldı. Örnekler -20°C'de saklandı. Restriksiyon enzim kesimi yapıldı.

#### *3.6.5.5. Transfeksiyon*

6 kuyulu plateler kullanılarak yapılan deneyde HuH7 hücreleri ekim'den 24 saat sonra %70 yoğunlukta olması için  $30 \times 10^4$  hücre/plate olacak yoğunlukta ekildi. Ekim'den 24 saat sonra hücrelerin durumu kontrol edilip ve pCMV6-AC-GFP-LGR5(Origene, PS100010) ve pCMV6-AC-GFP( Origene,PS100001) plazmit'leri ile transfeksiyon Eugene HD transfeksiyon kiti kullanılarak (Roche Eugene, 04709705001) aşağıdaki basamaklar takip edilerek uygulandı. Transfeksiyona işlemine başlamadan 2-3 saat önce transfeksiyon reagent oda sıcaklığında bekletildi ve kullanmadan hemen önce 10 saniye vortex yapılarak karıştırıldı. Transfeksiyon kompleksi 8µl(transfeksiyon reagent):2µg(DNA) oranı kullanarak, FBS içermeyen DMEM ve DNA karışımı ile yapıldı. Hazırlanan DNA: reagent:ortam karışımı 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 1 gün önce ekilmiş hücrelerin ortamı uzaklaştırılıp ve iki kere 1x PBS ile yıkadıktan sonra oluşturulan karışımdan 200 µl her kuyuya eklendi. Kuyular içerisindeki 200µl lik solüsyon %10 FBS içeren ortam eklenerek normal hacime tamamlandı ve inkubatörde gerekli sürelerde inkübasyon yapıldı.

##### *3.6.5.5.1. Transfeksiyon Optimizasyonunun Floresan Mikroskopu Kullanılarak Takibi*

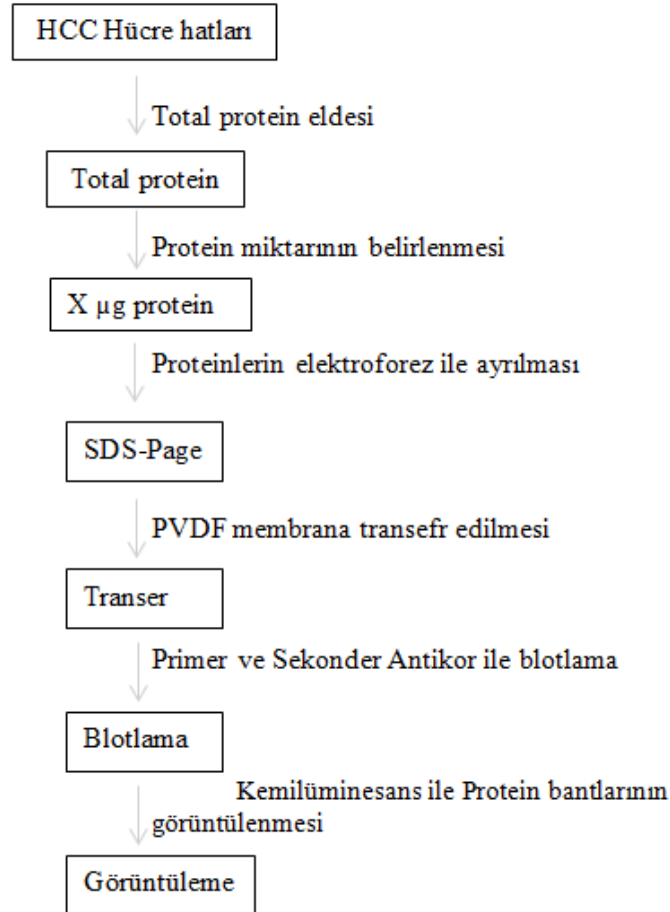
pCMV6-AC-GFP-LGR5 ve aynı kökene sahip mock vektörü, sırasıyla LGR5 proteininin C-ucunda ya da yalnız başına 26-28 kD'luk turbo GFP eki sentezlemektedir. Bu turbo GFP

proteinin floresan mikroskopunda (Olympus, BX61) dalga boyunda gözlenebilmekte aynı zamanda bu proteine karşı geliştirilen özgül antikor kullanılarak western blotlama yöntemi ile protein düzeyinde izlenebilmektedir.

HuH7 hücreleri  $13 \times 10^4$  ve  $6.5 \times 10^4$  hücre/kuyu olmak üzere 6 kuyulu hücre kültürü kaplarında steril kare lameller üzerine ekildi. Ertesi gün %70 yoğunluğa erişen hücrelerin ortamı uzaklaştırıldı, PBS (1X) ile yıkanıp pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmid ile transfeksiyon yapıldı. Her hangi bir müamele ile maruz bırakılmamış HuH7 ve sadece transfeksiyon kimyasalı içeren HuH7 hücreleri transfeksiyon işleminin negatif kontrolü olarak kullanıldı. 72 saat dolduktan sonra transfekte olan HuH7 hücrelerin ortamı uzaklaştırıldı, PBS (1X) ile yıkanıp ve pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmid ile tekrar transfeksiyon yapıldı. Diğer iki koşulu ise ortamları 1X PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve %10 DMEM ve transfeksiyon kimyasalı içeren %10 DMEM eklendi. Hücreleri 48 saat(6.gün) ve 72(7.gün) saat ikinci transfeksiyondan sonra fikse edilip ve incelendi. Fiksasyon yapmak için hücrelerin ortamı çekildi üç kere soğuk 1X PBS ile yıkama yapıldı. Yıkamalardan sonra %4 paraformaldehid/PBS ile 15dk oda sıcaklığında hücrelerin fiksasyonu yapıldı. daha sonra paraformaldehiti uzaklaştırmak için üç kez soğuk PBS ile oda sıcaklığında yıkama yapıldı. Hücreleri geçirgen(permeabilize) yapmak için PBS içinde hazırlanan %0.3'luk Triton X-100 (pierce, 28314) solüsyonu ile membran permeabilizasyonu yapıldı. Hücreler 1X PBS ile yıkandı sonra 0,1 µg/ml konsantrasyonunda DAPI içeren PBS solüsyonu ile 45 saniye inkübasyon yapıldı, ve yine 3 kere PBS ile yıkandı. Lameller 1 damla floresans “mounting medium” (Dako, S3023) ile lam üzerine kapatıldı ve floresans mikroskopta (BX) GFP ve DAPI dalga boylarına uygun filtreler kullanılarak analiz edildi.



### 3.6.6. Transfekte Edilen ve Edilmeyen HCC Hücre Hatlarından Protein Düzeyinde LGR5 Ekspresyonun “Western Blot” Yöntemi İle Belirlenmesi



**Şekil 7.** Gen ekspresyonlarındaki değişimin incelenmesi: “Western blot”

#### 3.6.6.1. Optimize Transfeksiyon Koşulları

HuH7 hücreleri kültüre edilip %70 yoğunluğa ulaştıklarında deney başlatılmıştır. Deney sırasında hücreler tripsin ile kaldırılıp, sayılarak, bir sonraki gün %70 yoğunluğa erişebilecek sayıda kültüre edilmiştir. Ertesi gün %70 yoğunluğa erişen hücrelerin ortamı uzaklaştırılmış, PBS (1X) ile yıkanmış ve transfeksiyon yapılmıştır. 24 saat, 48 saat ve 72 saat sonra total protein

izolasyonu yapıldı. HuH7 hücre hattı için 72 saat dolduktan sonra, hücre alt kültüre edilip tekrar transfeksiyon yapıldıktan sonra 7. ve 8. gün protein izolasyonu yapılmıştır.

#### *3.6.6.2. Total Protein Lizatı Hazırlanması*

Optimum sürelerde inkübasyon sonrasında, buz üzerine alınan hücrelerin ortamları uzaklaştırılarak soğuk PBS ile 2-3 kez yıkamalarının yapılmasının ardından 1 ml PBS içerisine hücre kazıyıcılar (Costar Cell Scraper, 3010) ile kazınip ve 1.5 ml'lik tüpler içerisinde hücreler toplanmıştır. Hücreleri çöktürmek için 1,500 g'de 5 dk santrifügasyon yapılarak (Eppendorf Centrifuge, 5415R) süpernatant atılmış ve hücre pelletine hacminin üç katı kadar lizis tamponu (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, %1 NP-40, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) eklenerek tüpler buz üstünde protein ekstraksiyonu için 5 dakikada bir vortekslenerek 45 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücre debrislerinin uzaklaştırılması için örnekler 15,000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Proteinleri içeren süpernatant yeni bir tüpe alınmış ve protein miktarının belirlenmesi aşamasına geçilmiştir.

##### *3.6.6.2.1 Protein Miktarlarının Belirlenmesi*

Protein miktarlarının belirlenmesi için Pierce marka "BCA protein assay kit" (Pierce, 23225) kullanılmıştır. Standart eğrinin çizilebilmesi için 0, 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 µg BSA (Pierce, 23209) ve elde edilen hücre lizatları kitin kullanım yönergesi doğrultusunda kit bileşenleri ile hazırlanan 100µL reagen ile 1,5mL ependorfların içerisinde birleştirilmiştir. Reaksiyonun tamamlanması için 60 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra protein konsantrasyonuyla birlikte artan BCA/bakır kompleksi 562 nm'de spektrofotometrik olarak PICODROP aleti (PICOPET01) ile ölçülmüştür. Sığır serum albumini (BSA) konsantrasyonlarına bağlı olarak çıkan ölçümler standart grafiğin çizilmesinde kullanıldı ve örneklerin bu standart grafiğe göre ne kadar protein içerdiği "Microsoft Office Excel" hesaplanmıştır.

### 3.6.6.3. Proteinlerin SDS-PAGE Poliakrilamid Jelde Yürütülmesi

BioRad mini protein elektroforez sistemi ve jel hacmi (Mini-PROTEAN Electrophoresis Cell 165 -3301) kılavuzunda tarif edildiği şekilde hazırlanmıştır. LGR5 yaklaşık 95 KDa ve LGR5-GFP yaklaşık 130 Kda ağırlığında proteinler olup ayırması için %8'lik poliakrilamid jelde yürütülmüştür. İstifleyici (Stacking) olarak da %5'lik jel kullanılmıştır (Tablo 4).

**Tablo 4.** SDS-PAGE ayırıştırıcı ve istifleme jel bileşenleri

|                       | %8'lik jel (10mL) | %5'lik jel (5mL) |
|-----------------------|-------------------|------------------|
| dH <sub>2</sub> O     | 4,6               | 3,4              |
| %30'luk akrilamid     | 2,7               | 0,83             |
| 1.5 M Tris-Cl, pH 8.8 | 2,5               | 0,63*            |
| %10 SDS               | 0,1               | 0,05             |
| %10 amonyum persulfat | 0,1               | 0,05             |
| TEMED                 | 0,006             | 0,005            |

\*%5'lik jel için 1 M Tris-Cl, pH 6.8 kullanılmıştır.

Her bir protein için optimize edilen miktarda total protein alınmış ve bu proteinlerin denaturasyonu için %12(140mM) oranında DTT (Applichem, A2948,0005 )içeren 4X yükleme tamponu (Applichem, A3484) ile eşit hacimde karıştırılarak 95 °C'lik su banyosunda 10dk. inkübe edilmiştir. Kaynatılan protein örnekleri yükleme işlemine geçilene kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elektroforez tankının (BioRad) içerisine Tris-Glisin elektroforez tamponu (“running buffer”, 25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0.1 SDS) eklenmiş ve jeller uygun olarak yerleştirildikten sonra örnekler ince uçlu pipet uçları ile yüklenmiştir. Aynı zamanda protein göçünü izleyebilecek nitelikteki belirteçlerden (protein marker) (MBI Fermentas, SM1811 ve SM0671) 4'er µl yüklenmiş ve 70 V'luk gerilim uygulanarak paketleyici jeli geçmesi sağlanmıştır daha sonra proteinler ayırıştırıcı jelde 110 V'luk gerilim ile belirteçlerin bantları açılana kadar yürütülmüştür.

#### *3.6.6.4. Poliakrilamid Jelde Yürütülen Proteinlerin PVDF Membranlara Transferi ve Membranın Bloklanması*

##### *3.6.4.1. Proteinlerin Membrana Transferi*

Elektroforez işlemi bittikten sonra jeller cam aparatlardan çıkartılarak taze hazırlanan Tris-Glisin transfer tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0.02 SDS, %10 metanol) içerisine alınmıştır. PVDF membran (Thermo, TM151.1) 40sn metanol içerisinde bekletilerek porlarının açılması sağlanmış ve transfer tamponu içerisine alınmıştır. Bu tampon içerisinde bir kaset içerisine sırasıyla sünger, “Whatmann” kağıdı, jel, PVDF membran, “Whatmann” kağıdı ve sünger olacak şekilde yerleştirilmiştir. Kaset kapatıldıktan sonra transfer tankının içerisine yerleştirilip, 300 mA’lık akımda 4 saat transferde tutulmuştur. daha sonra proteinlerin jelden üzerine geçtiği membran çıkartılmıştır.

##### *3.6.6.4.2. Blotlama*

Transferden alınan membran kullanılan antikor için uygun bloklama solüsyonu içerisine alınarak optimize edilen sürelerde +4°C’de veya oda sıcaklığında bloklamaya bırakılmıştır.

##### *3.6.6.4.3. Primer ve Sekonder Antikorlar*

Bloklama solüsyonundan alınan membranlar optimize edilen dilüsyonlarda primer antikor ile muamele edilmiştir. Anti-LGR5(Novus,NBP1-40567) , Anti-GFP(Origene,TA150041 ) antikorları kullanılmıştır. Bloklayıcı ajan olarak her antikora uygun %0,1- 0,5 lik Tris-tamponlu-tuz solusyonu-Tween20 (TBS-T=Tris-Buffered Saline Tween-20) içinde hazırlanmış %5-10 yağsız süt tozu (NFMP) kullanılmıştır. Primer antikor dilüsyonları antikora uygun olarak optimize edilen konsantrasyonda %6-12 NFMP %0,5 TBS-T ile yapıp ve inkübasyonları +4°C de gece boyu olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Sekonder antikor olarak Pierce firmasının Anti-fare (Thermo, 32430) veya anti-tavşan (Thermo, 32460) antikorları kullanılmıştır. Antikorlar %6-12 NFMP, %0,5 TBS-T ile optimize oranlarında sulandırılarak +4<sup>0</sup> C, gece boyunca uygulanmıştır. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyonları Tablo (5) gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Western blottingde kullanılan antikorlar

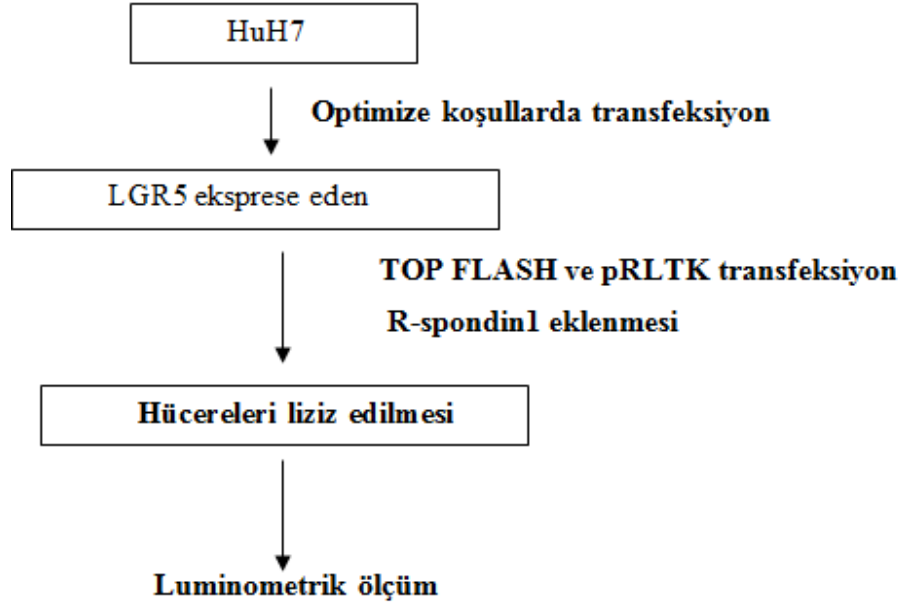
| Primer Antikor | Primer Antikor Dilüsyonu | Sekonder antikor | Sekonder Antikor Dilüsyonu |
|----------------|--------------------------|------------------|----------------------------|
| Anti-LGR5      | 1:200                    | Anti-Rabbit      | 1:2500                     |
| Anti-tGFP      | 1:1000                   | Anti-Mouse       | 1:5000                     |

#### 3.6.6.4.4. Proteinlerin Membran Üzerinde Saptanması

Sekonder antikordan alınıp, yıkama işlemi tamamlanan membranların, görüntülenmesi için sekonder antikorlara bağlı olan peroksidaz enzimlerinin substratını parçalaması esasına dayanan ve sonuçta modifiye substrattan oluşan kimyasal ışımının film üzerinde saptanması temeline dayanan kemoluminisans (Pierce-RPN2108) görüntüleme yöntemi kullanılmıştır. Üretici firmanın önerdiği şekilde hazırlanan karışım membran üstüne, membranı kaplayacak miktarda yayılarak 2-3 dk bekletilip, Membranlar ışık geçirmeyen bir kaset içine alındıktan sonra üzerlerine kemilüminesansa duyarlı filmler (Kodak, 5256441) koyulup uygun sürelerde beklenerek protein bantları görüntülenmiştir. Filmlerin banyosunda ticari olarak satın alınan sırası ile geliştirici ve sabitleyici solüsyonlarında 1'er dakika bekletilerek protein bantları görüntülenmiştir. Görüntüleme işlemi karanlık odada yapılmıştır.

#### 3.6.7. LGR5'in $\beta$ -katenin Bağımlı Tcf/Lef Transkripsiyonel Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

2011 yılında yayınlanan çalışmalarda kolon kanserinde LGR5'in Wnt/ $\beta$ -kateninin aktive edebileceğini göstermiştir. Çalışmamızda LGR5'in HuH7 hücre hattında bu aktivasyonda rolünü tanımlanması amaçlanmıştır(Şekil 8).



**Şekil 8.** Tcf/Lef transkripsiyonel aktivite incelenmesi “Lusiferaz”

#### 3.6.7.1. Lusiferaz Reporter Assay

Çalışmamızda Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesinin belirlenebilmesi için kullanılan vektörler Doç.Dr. Aykut Üren tarafından'dan sağlanmıştır. HuH7 hücreleri  $5.5 \times 10^4$  hücre/kuyu olmak üzere 12 kuyulu hücre kültürü kaplarının üzerine ekildi. Ertesi gün %70 yoğunluğa erişen hücrelerin ortamı uzaklaştırıldı, PBS (1X) ile yıkanıp ve pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmid ile transfeksiyon yapıldı. Her hangi bir muamele ile maruz bırakılmamış HuH7 ve sadece transfeksiyon kimyasalı içeren HuH7 hücreleri transfeksiyon işleminin negatif kontrolü olarak kullanıldı. 20mM LiCl büyüme ortamına eklenerek Wnt sinyal yolağının pozitif kontrolü olarak kullanıldı. 72 saat dolduktan sonra transfekte olan HuH7 hücrelerin ortamı uzaklaştırıldı, PBS (1X) ile yıkanıp ve pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmid ile tekrar transfeksiyon yapıldı. Diğer üç koşulu ise ortamları 1X PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve %10 DMEM ve transfeksiyon kimyasalı içeren %10 DMEM ve 20mM LiCl içeren %10 DMEM eklendi. 36 saat ve 60 saat sonrasında hücrelerin ortamları 1X PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra transfeksiyon ortamı 5(ul transfeksiyon reagent):2(ug DNA) oranı ile hazırlandı. Bu aşamada Top/Flash

plazmiti ve normalizasyonun yapılabilmesi için Renillia (pRLTK) ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 12 saat sonra her iki koşulunda yani 7.gün ve 8.gün sonunda lusiferaz ölçümü yapıldı. R-spondin 1 molekülün LGR5 varlığında nasıl bir etki yaratıldığını incelemek için yukarıda yazılan işlemin aynısı yapıldı fakat ölçümden 12 saat önce yani lusiferaz plazmidlerin transfeksiyonundan hemen sonra 100ng/ml son konsantrasyon olacak şekilde ortama eklendi ve belirlenen zaman sonunda luminometrik ölçüm yapıldı.

#### 3.6.7.2. Lusiferaz Ölçümü

Belirtilen süre sonunda hücrelerin ortamları tamamen uzaklaştırıldı. 1X PBS ile iki kere yıkama yapıldı. Hücrelerin üzerine 200µl lizis tamponundan eklendi ve 15 dakika sallamalı karıştırıcıda hücrelerin parçalanması sağlandı ve 1,5ml'lik ependorflara aktarıldı. Ayrı tüplere 50µl lusiferaz assay tamponu (LARII) eklendi üzerine hücre lizatından 20 µl eklendi ve 10 saniye süre ile luminometrik ölçüm yapıldı. Ependorflara 50 µl "Stop Glo" solüsyonundan eklenerek lusiferaz aktivitesi sonlandırıldı ve Renillia aktivitesinin başlaması sağlandı. 10 saniye süre ile luminometrik ölçüm yapıldı.

#### 3.6.8. LGR5'in Wnt sinyal yolağında etkisini $\beta$ -katenin proteinini İmmünfloresan ile yolu ile boyanması

Huh7 hücreleri  $5.5 \times 10^4$  hücre/kuyu olmak üzere 12 kuyulu hücre kültürü kaplarında steril yuvarlak lameller üzerine ekildi. Ertesi gün %70 yoğunluğa erişen hücrelerin ortamı uzaklaştırıldı, PBS (1X) ile yıkanıp ve pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmid ile transfeksiyon yapıldı. Her hangi bir muameleye maruz bırakılmamış Huh7 ve sadece transfeksiyon kimyasalı içeren Huh7 hücreleri transfeksiyon işleminin negatif kontrolü olarak kullanıldı. 20mM LiCl büyüme ortamına eklenerek Wnt sinyal yolağının pozitif kontrolü olarak kullanıldı. 72 saat dolduktan sonra transfekte olan Huh7 hücrelerin ortamı uzaklaştırıldı, PBS (1X) ile yıkanıp ve pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmid ile tekrar transfeksiyon yapıldı. Diğer üç koşulu ise ortamları 1X PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve %10 DMEM ve transfeksiyon kimyasalı içeren %10 DMEM ve 20mM LiCl içeren %10 DMEM eklendi. Hücreler 48 saat(6.gün) ve 72(7.gün) saat

ikinci transfeksiyondan sonra fikse edilip betakatenin boyaması yapıldıktan sonra incelendi. Fiksasyon yapmak için hücrelerin ortamı çekildi üç kere soğuk 1X PBS ile yıkama yapıldı. Yıkamalardan sonra %4 paraformaldehid/PBS ile 10dk oda sıcaklığında hücrelerin fiksasyonu yapıldı. daha sonra paraformaldehid'i uzaklaştırmak için üç kez 100mM glycine içeren soğuk PBS ile oda sıcaklığında yıkama yapıldı. Hücreleri geçirgen (permeabilize) yapmak için PBS içinde hazırlanan %0.3'luk Triton X-100 solüsyonu ile 3dk membran permeabilizasyonu yapıldı. Daha sonra %20 FBS içeren PBS ile hücreler 20 dk inkübe edilerek bloklama işlemi yapıldı. Ortam uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile 3 kez 5'er dk yıkandı.  $\beta$ -katenin antikoru (Santa Cruz-7963) 1/100 oranlarında %2 FBS içeren PBS-T(%0.5) içinde dilüe edildi ve lamellerin üzerine eklenerek içi ıslak havlu yerleştirilerek nemlendirilmiş bir kap içerisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. inkübasyon sonrası antikoru uzaklaştırmak için 6 kez 5'er dk %0.5 PBS-T ile yıkama yapıldı. Sekonder antikor(Alexa 555 Invitrogene A-21206) dilüsyonu 1:6000 olarak kullanıldı ve bu antikor da yine %2 FBS içeren PBS-T solüsyonu içerisinde hazırlandı,ve 30 dk oda sıcaklığında nemli ortam da inkübe edildi. Sekonder antikor muamelesinden sonra 10'ar dk 6 kez PBS-T ile yıkamalar yapıldı. Daha sonra 0,1  $\mu$ g/ml konsantrasyonunda DAPI içeren PBS solüsyonu ile 45 saniye inkübasyon yapıldı, ve yine 2-3 dk PBS ile yıkandı. Lameller 1 damla floresans "mounting medium" (Dako, S3023) ile lam üzerine kapatıldı ve floresans mikroskopta GFP ve Alexa 555 ve DAPI dalga boylarına uygun filtreler kullanılarak analiz edildi.

### *3.6.9. Elektronik Algılamaya Bağlı Gerçek Zamanlı Hücre Adezyonu ve Çoğalmasının İncelenmesi*

Bu işlem xCELLigence-Roche Applied Science cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. HuH7 hücreleri  $13 \times 10^4$  hücre/plate olmak üzere 35mm'lik hücre kültürü kapları üzerine ekildi. Ertesi gün %70 yoğunluğa erişen hücrelerin ortamı uzaklaştırıldı, PBS (1X) ile yıkanıp ve pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmid ve pCMV6-AC-GFP mock ile transfeksiyon yapıldı. Her hangi bir muamele ile maruz bırakılmamış HuH7 ve sadece transfeksiyon kimyasali içeren HuH7 hücreleri transfeksiyon işleminin negatif kontrolü olarak kullanıldı. İlk transfeksiyondan 72 saat sonra cihaza ait olan E-plate'lere ortam koyularak bir saat inkübasyon yapıldı. İnkübasyondan



hemen sonra her kuyuya 5000 hücre ekildi ve cihaz başlatıldı. Bu işlemten 24 saat sonra tekrardan transfeksiyon yapıp diğer iki koşulun ortamları yenilenerek gerçek zamana bağlı olarak 120 saat süre ile inceleme yapıldı.

### 3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi

Tez çalışması için yapılan araştırma planı aşağıdaki şekilde tablolatırılmıştır (Tablo 7).

**Tablo 6.** Araştırma planı

|                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2010<br>Şubat-<br>Aralık | Tüm HCC’lerde LGR5 gen ekspresyonları analizler                                                                                                                                                                                                                                                |
|                          | LGR5 geninin tümünün pFLAG-CMV vektörü içerisine klonlanması için:<br>LGR5 tüm gen (2886bp) amplifikasyonunun optimizasyonu(çok sayıda farklı sistem kullanılmasına rağmen ampikon elde edilemedi ve “origene” firmasında LGR5 içeren pCMV6-AC-GFP-LGR5 vektörü ve mock kontrolü satın alındı) |
| 2011<br>Ocak-<br>Aralık  | Plazmidlerin çoğaltılması ve transfeksiyon optimizasyonlarının tamamlanması                                                                                                                                                                                                                    |
|                          | LGR5 varlığına bağlı olarak biyolojik davranış değişikliklerinin analizi                                                                                                                                                                                                                       |
|                          | LGR5 lgr5in Wnt/ $\beta$ -katenin yolağın regüle edici rolünü aydınlatılması için Tcf/Lef aktivite analizleri                                                                                                                                                                                  |

### 3.8. Verilerin Değerlendirilmesi:

Veriler istatistiksel program olan Graphpad Prism 5’ı kullanılarak ANOVA testi aracılığı ile analizlenmiştir.

### **3.9. Araştırmanın Sınırlıkları**

Ticari olarak satılan Anti-LGR5 antikorları literatürde kullanılma henüz tam olarak girmemesine nedeniyle ile bu çalışmada üç farklı firmanın antikorı kullanılmıştır. Buna rağmen kaliteli bir LGR5 Western Blot sonucu elde edilememiştir. Sorun nedeniyle overeksprese ettiğimiz koşullarda LGR5 Tag'ini tanıyan Anti-tGFP antikorı kullanılmıştır. Bu sebeplerden dolayı insan ve hayvan dokularında bu molekülün varlığı incelenememiştir.

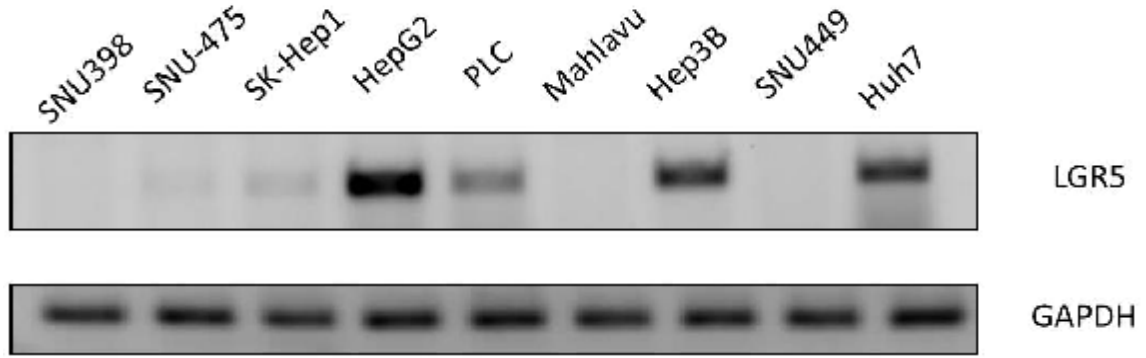
### **3.10. ETİK KURUL ONAYI**

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel(Invaziv) olmayan Klinik Araştırmalar değerlendirme komisyonu tarafından 26 Mayıs 2010 tarih ve 38-IOÇ/2010 Protokol numarası ile onaylanmıştır.

## **4. BULGULAR**

### **4.1. HCC Hücre Hatlarında Basal LGR5 Ekspresyonu**

Normal koşullarda kültüre edilen HCC hücre hatlarında LGR5 ekspresyonunu transkript düzeyinde inceleyebilmek üzere, 9 farklı HCC hücre hattı (SNU398, SNU-475, SK-Hep1, HepG2, PLC, Mahlavu, Hep3B, SNU449, HuH7) kullanılmıştır. Buna göre, LGR5'in HepG2, PLC, Hep3B, HuH7 hücre hatlarında belirgin şekilde diğerlerinde ise var/yok şeklinde eksprese olduğu gözlenmiştir (Şekil 9) (Kunter I. yayınlanmamış veri).



**Şekil 9.** Tüm HCC hücre hatlarında, transkript düzeyinde LGR5 ekspresyonları. GAPDH eşit yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Literatürde gösterilen, Wnt sinyal yolağında aktive edici mutasyonların olduğu HCC dokularındaki LGR5 ekspresyonundaki artışa uyumlu olarak, çalışmamızda  $\beta$ -katenin delete formunu içeren HepG2, Axin 1 mutasyonu içeren PLC/PRF/5 hücrelerinde ve bazal Tcf/Lef aktivitesi diğer hücre hatlarına göre fazla olan Hep3B ve HuH7 hücrelerinde LGR5 ekspresyonu transkript düzeyinde diğer hücrelere göre yüksek olduğunu belirlenmiştir (Tablo 7).

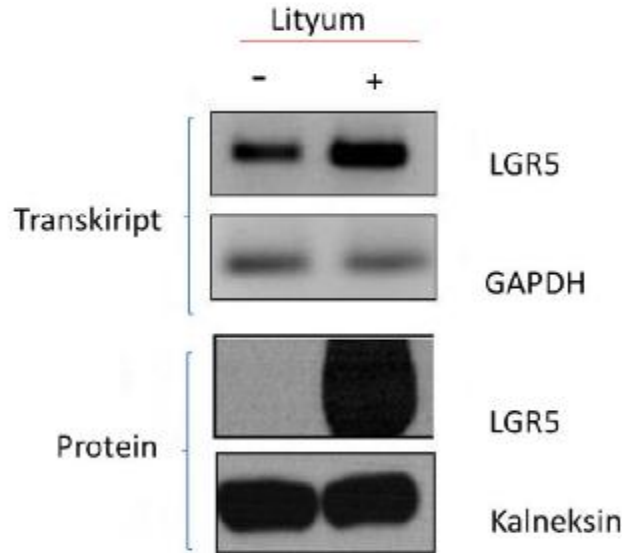
**Tablo 7.** HCC hücre hatlarında BCAT ve AXIN mutasyonları ve Tcf/Lef transaktivasyonu<sup>84,85,86,79</sup>

| Hücre hattı | Mutasyon <sup>84,85,86</sup> |                   | LGR5 ekspresyonları | Tcf/Lef transaktivasyon derecesi <sup>79</sup> |
|-------------|------------------------------|-------------------|---------------------|------------------------------------------------|
|             | $\beta$ -CAT                 | Axin1             |                     |                                                |
| HuH7        | Wt                           | Wt                | ++                  | Orta                                           |
| PLC/PRF-5   | Wt                           | Axin1R146X+LOH16p | +                   | ND                                             |
| Hep3B       | Wt                           | ND                | +++                 | Orta                                           |
| Hep G2      | DelW25-1140                  | ND                | ++++                | Yüksek                                         |
| Mahlavu     | Wt                           | ND                | –                   | Düşük                                          |
| SNU-449     | +                            |                   | –                   | Düşük                                          |
| SNU-475     | Wt                           | +                 | –                   | Orta                                           |
| SNU-398     | Wt./S37C                     | ND                | –                   | Yüksek                                         |
| SNU-387     | ND                           | ND                | –                   | Düşük                                          |
| SNU-182     | Wt                           | ND                | –                   | Düşük                                          |
| SK-Hep1     | Wt                           | ND                | –                   | ND                                             |

#### 4.2. HuH7 Hücre Hattında Lityum Etkisinde LGR5 Ekspresyonu

Önceki çalışmalarımızda, Huh7 hücrelerinde LiCl aracılığıyla oluşturulan hücre döngüsü arresti sonrasında, genom düzeyinde transkripsiyonları değişen genler mikroarray yöntemi ile analiz edildiğinde, kontrole göre en çok LGR5 geninin arttığı bulunmuştur (G.Karakülâh Yüksek Lisans Tezi). Bu veri bize LGR5’in HCC proliferasyonunda rolü olabileceğini düşündürmüştür. Tez kapsamında LGR5’in transkripsiyonel değişimi mikroarray verisini konfirme etmek amacıyla alternatif bir yöntem olan semî kantitatif RT-PCR ile ve protein düzeyinde değişim ise

Western Blotlama ile incelenmiştir. İnceleme sonrasında LiCl etkisiyle Huh7 hücrelerinde LGR5 geni hem mRNA hem de protein düzeyinde artışı belirlenmiştir (Şekil 10).

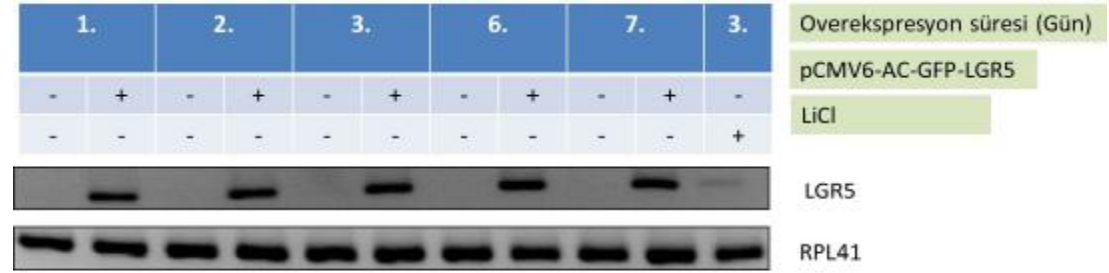


**Şekil 10.** HuH7 hücrelerinde LiCl varlığında, transkript (mRNA) ve protein düzeylerinde LGR5 ekspresyonunun artışı

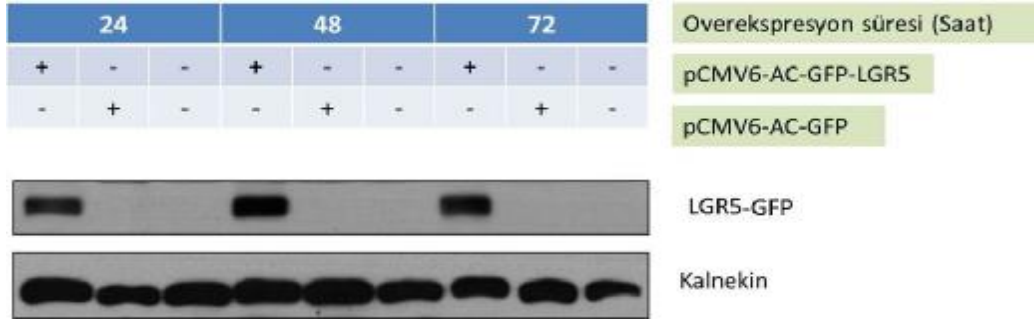
#### 4.3. HuH7 Hücrelerinde LGR5'in Ektopik Olarak Overeksprese Edilmesi

HuH7 hücreleri transfeksiyon optimizasyon deneyleri yapıldıktan sonra seçilen transfeksiyon koşullarında geçici olarak pCMV6-AC-GFP-LGR5 ve mock pCMV6-AC-GFP plazmitleri ile ayrı ayrı transfekte edilmiştir. LGR5 transfeksiyonu yapılmamış parental HuH7 hücre hattı ve mock plazmiti ile transfekte edilen HuH7 hücreleri, LGR5 eksprese etmezken , pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmiti ile transfekte edilen HuH7 hücrelerinin LGR5'i RT-PCR ile mRNA düzeyinde eksprese ettiği gösterilmiştir. RLP41 cDNA'sı cDNA miktar kontrolü amacıyla kullanılmıştır (Şekil 11A). Yine, LGR5 içermeyen mock pCMV6-AC-GFP plazmiti ile transfekte olan ve HuH7 hücre hatının kendisi LGR5 eksprese etmezken , pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmiti ile transfekte edildikten sonra HuH7 hücrelerinin LGR5 proteinini overeksprese ettiği turbo GFP proteinine karşı geliştirilen antikor kullanılarak Western Blot yöntemi ile gösterilmiştir. Burada kalneksin eşit yükleme kontrolü için kullanılmıştır (Şekil 11B).

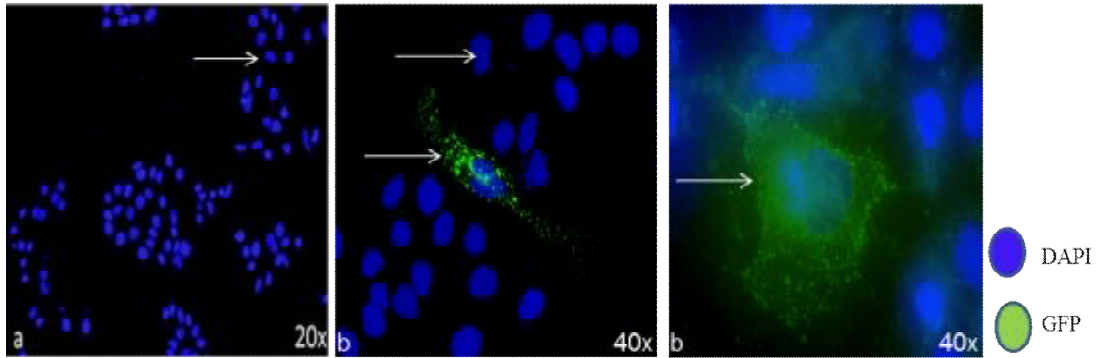
Ektopik olarak pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmiti kullanılarak LGR5 ekspresyonu sağlanmış olan HuH7 hücrelerinde plazmit tarafından üretilen LGR5'in N-terminaline takılı olan GFP floresan mikroskopunda gözlenmiştir (Şekil 11C).



A)



B)



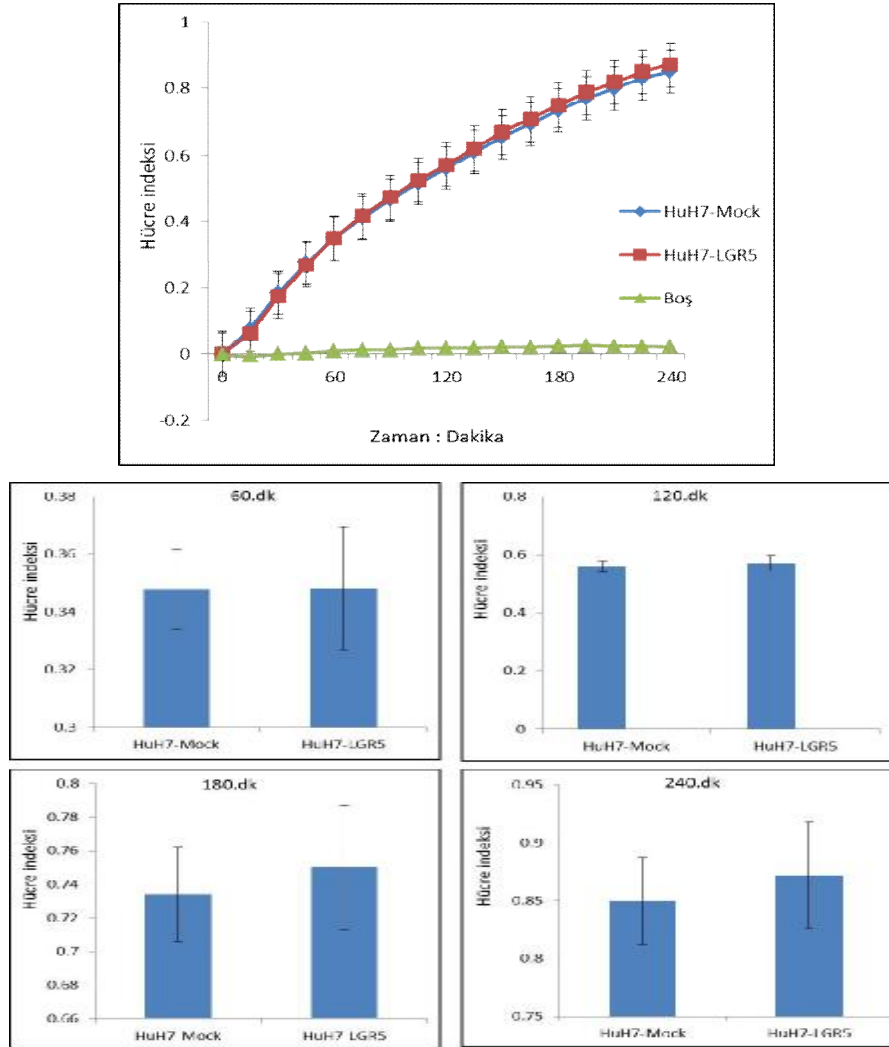
C)

**Şekil 11.** A) HuH7 hücrelerinde geçici transfeksiyon ile LGR5 'in RNA seviyesinin artışı. B) HuH7 hücrelerinde geçici transfeksiyon ile LGR5 'in protein seviyesinin artışı. C) a)Atasal HuH7 hücresi, b) ekzojen olarak LGR5 eksprese eden hücrelerde GFP ekspresyonu, DAPI, çekirdek boyaması mavi renkle gözlenmektedir.

#### 4.4 LGR5 Overekspresyonunun HuH7 Hücre Hatında Yarattığı Biyolojik Davranış Değişimleri

##### 4.4.1 Hücre Adhezyonuna Etkisi

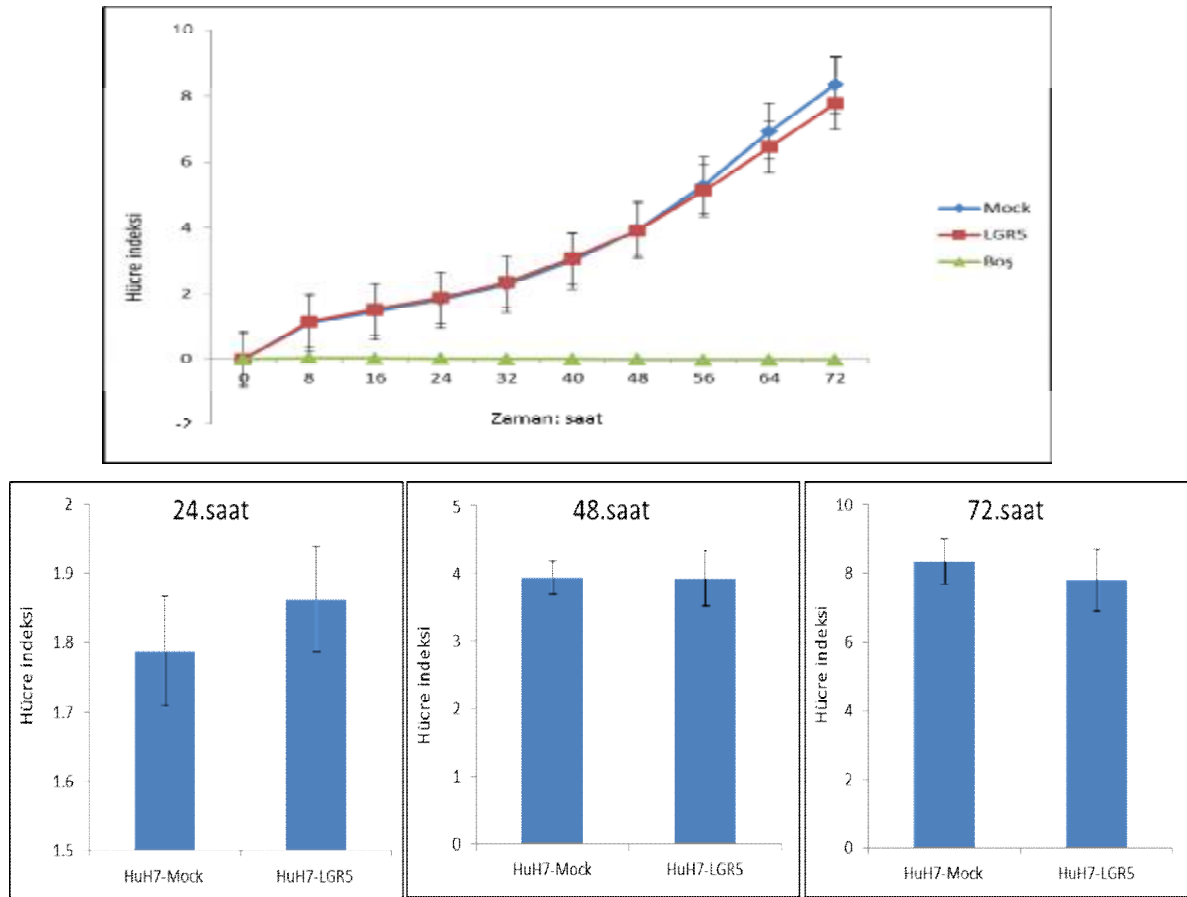
HuH7 hücrelerinde LGR5 overekspresyonu sonrası XCelligence cihazı ile gerçekleştirilen adezyon deneyinde LGR5 varlığının 6 saatlik hücre adezyonu üzerinde her hangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, mock plazmidi içeren hücreler ve LGR5 overeksprese eden hücrelerin, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağını tetikleyen her hangi bir indüksiyon olmadan 0.dakika ile 240. dakika arasında aynı düzeyde yüzeye yapışma yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. HuH7 hücrelerinde LGR5 overekspresyonunun hücre adezyonuna etkisi.

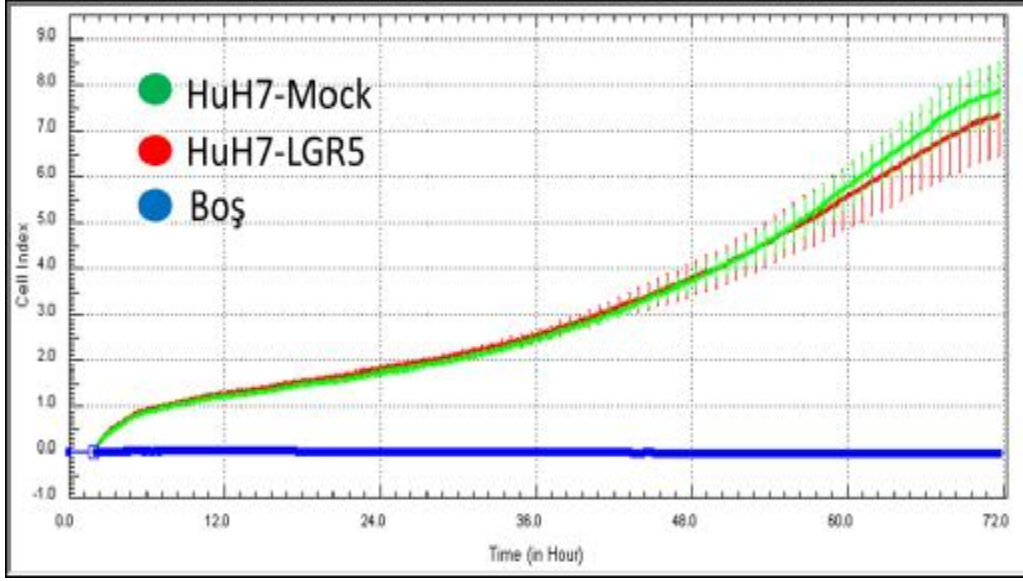
#### 4.4.2 Hücre çoğalmasına Etkisi

HuH7 hücrelerinde LGR5 overekspresyonu sonrası XCelligence cihazı ile gerçekleştirilen proliferasyon deneyinde her hangi bir indüksiyon yapmadan, LGR5 varlığının proliferasyona etkisi gerçek zamanlı olarak izlenmiştir (Şekil13). 24.saaten 72.saate kadar elde edilen değerler gerçek zamanlı doğrusal grafik incelendiğinde, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağını tetikleyen Wnt3a ve R-Spondin indüksiyonu yapılmadan, LGR5 overeksprese eden pCMV6-AC-GFP-LGR5 plasmidi ile transfekte koşulun boş plazmit pCMV6-AC-GFP koşuluna göre proliferasyonu anlamlı düzeyde baskıladığı gözlenmemektedir. Değerler incelendiğinde 48.saaten başlayarak özellikle 72.satte olmak üzere, LGR5 overeksprese eden koşulda mock kontrole karşı baskılanma gözlenmektedir fakat bu istatisel olarak anlamlı düzeyde bulunmamaktadır. (Şekil 14 ).



**Şekil 13.** HuH7 hücrelerinde LGR5 overekspresyonun farklı zaman aralıklarında hücre çoğalmasına etkisi.

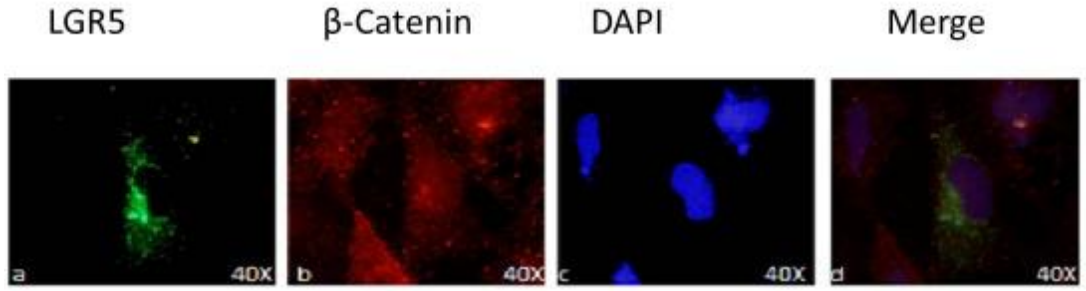




**Şekil 14.** Gerçek zamanlı hücre çoğalması

#### 4.5. LGR5 Sinyalizasyonu

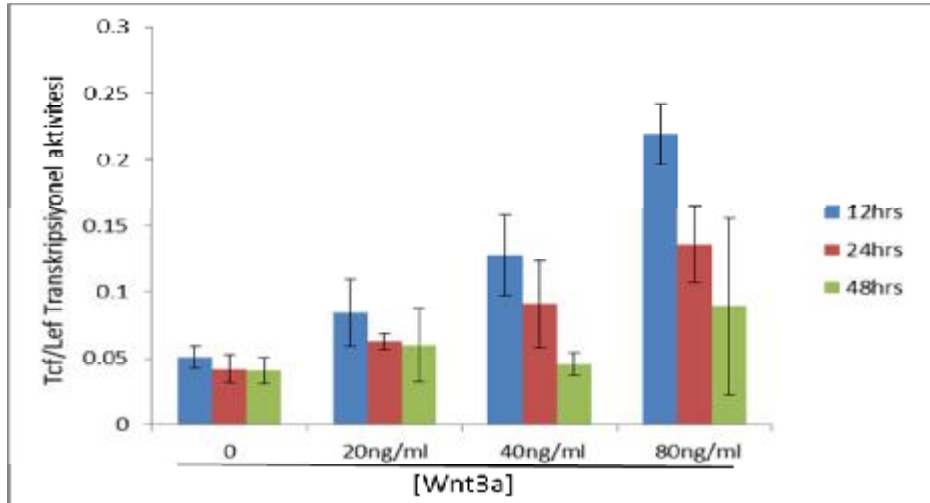
LGR5 reseptörünün membranda yerleştiği bilinmesine rağmen HCC’de nasıl bir sinyalizasyonda rol oynadığı bilinmemektedir. Bir Wnt hedef geni olan LGR5’in aynı zamanda Wnt sinyalinin hücre içerisine iletilmesinde bir aracı molekül olup olmadığının araştırmak amacıyla, LGR5 over eksprese edilen hücrelerde hiçbir indüksiyon olmayan koşulda atasal ve mock kontrollerine göre,  $\beta$ -katenin nükleer lokalizasyon değişimleri immün floresan boyama yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonunda, hem atasal Huh7 hemde LGR5 overeksprese Huh7 hücrelerinde nükleer  $\beta$ -katenin’e rastlanmamıştır. Buda bize, LGR5’in bu hücrelerde tek başına, yani indüklemeye olmadan Wnt/  $\beta$ -katenin’i aktive edemediğini göstermiştir. Şekil 15.de LGR5 overeksprese eden Huh7 hücrelerinde  $\beta$ -katenin boyaması görülmektedir.



**Şekil 15.** HuH7 hücrelerinde LGR5 overekspresyonunun  $\beta$ -katenin'in hücre içi yerleşmesinde rolü a) Ekzojen olarak LGR5+GFP ekspresyonu, b)  $\beta$ -Katenin ekspresyonu, c) Çekirdek boyaması, d) Merge görüntü

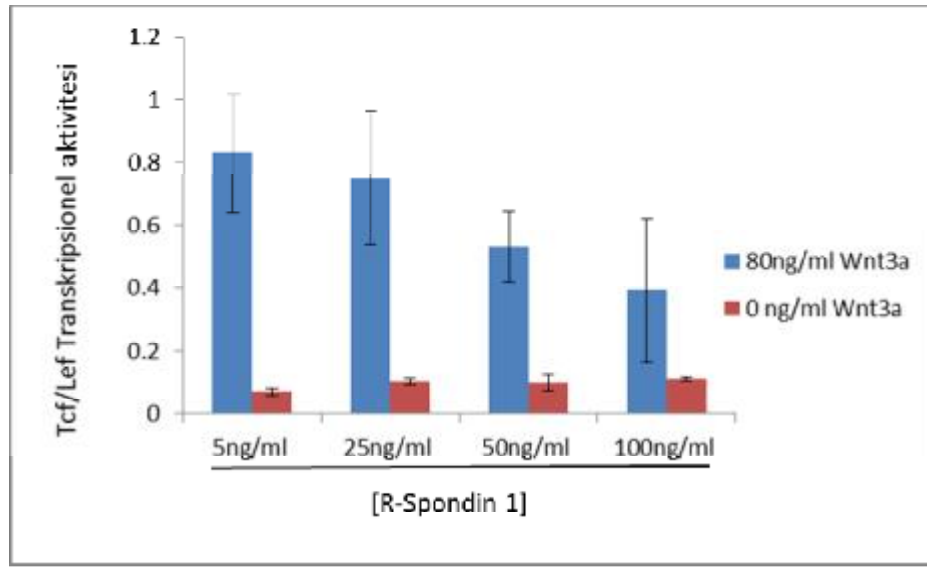
#### 4.6. LGR5/Wnt3a/R-Spondin Sinyalizasyonu

Literatürde oldukça yeni tanımlanan R-Spondin1, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağını Wnt3a varlığında LGR5 ile sinerjistik şekilde aktive edebilen LGR5 ligant adaylarından. HCC'de bu sinyalizasyonun ve/veya komponentlerinin nasıl çalıştığını araştırmak üzere, ilk olarak, Wnt3a'nın atasal Huh7 hücrelerinde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalizasyonunu dolayısıyla Tcf/lef aktivitesini hangi konsantrasyonda ve hangi saatte en fazla arttırdığı tespit edilmiştir. En fazla artış 80ng/ml Wnt3a konsantrasyonunda ve 12. saat'in sonunda gözlenmiştir (Şekil 16).



**Şekil 16.** Atasal HuH7 hücrelerinde, farklı Wnt3a konsantrasyonlarının, farklı zaman aralıklarında, Tcf/Lef aktivasyonu üzerine etkileri.

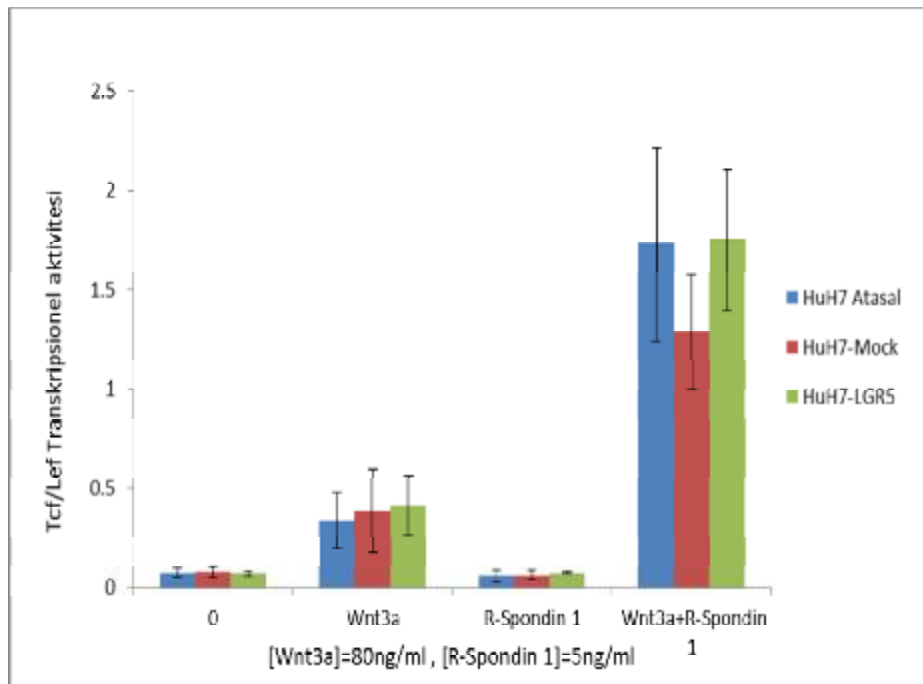
İkincil olarak, LGR5 overeksprese eden hücrelerde, Wnt3a indüksiyonunda, farklı R-Spondin1 konsantrasyonlarının, Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesine olan etkileri incelenmiştir. Buna göre, pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmit vektörü ile geçici transfeksiyon yoluyla LGR5 overeksprese edilen HuH7 hücrelerinde, 5ng/ml R-Spondin1, Wnt3a varlığında, Wnt3a olmayan kontrole göre, Tcf/Lef aktivitesini yaklaşık 13 kat daha fazla artırmıştır. Başka bir deyişle, tek başına R-Spondin1 LGR5 varlığında Wnt3a olmadan Tcf/Lef aktivasyonunu anlamlı şekilde değiştirmemektedir (Şekil 17).



**Şekil 17.** LGR5 overeksprese edilmiş HuH7 hücrelerinde, farklı R-Spondin1 konsantrasyonlarının, optimize Wnt3a varlığında ve yokluğunda Tcf/Lef aktivasyonuna etkileri

Son olarak, Huh7 hücrelerinde, LGR5'in Wnt3a/R-Spondin1 sinyalizasyonunda etkisi araştırılmıştır. Bunun için, pCMV6-AC-GFP-LGR5 plazmit vektörü ve/veya pCMV6-AC-GFP boş vektör ile geçici transfeksiyon yapılan Huh7 hücreleri ve atasal hücrelerde, Wnt3a ve/veya R-Spondin1'in tek başlarına ve birlikte Tcf/Lef aktivasyonuna etkileri incelenmiştir. Atasal HuH7 ve mock plazmit ile transfekte olan HuH7 hücrelerinde, R-Spondin1 tek başına Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesini artırmazken, Wnt3a tek başına Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesinin artışına sebep olmuştur. Ayrıca Wnt3a ve R-spondin1 ikisi bir arada oldukları durumda Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesi daha da artmıştır. LGR5 overeksprese eden HuH7 hücrelerinde de

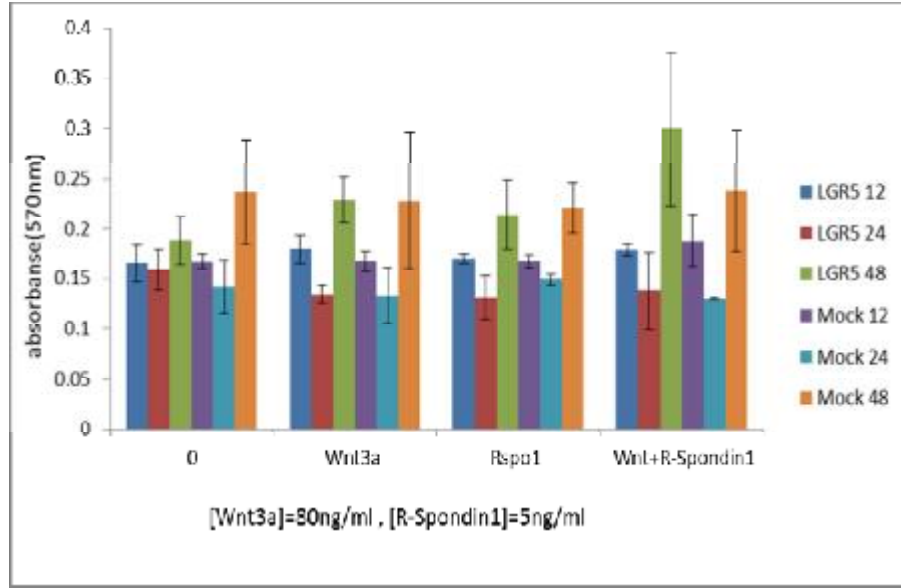
Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesinin sonuçları, atasal Huh7 ve HuH7 mock hücreler ile benzerlik göstermektedir. Bu deney bize LGR5 overekspresyonunun hiçbir indüksiyon olmayan (DMEM) koşullarda atasal ve boş plazmit kontrollerine göre Tcf/Lef aktivasyonunu yani Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalizasyonunun uyarılması üzerine etkisi olmadığını göstermiştir. Dolayısıyla sonuç olarak, LGR5 overekspresyonunun, Huh7 hücrelerinde Wnt3a/R-Spondin1 tarafından tetiklenen kanonikal Wnt aktivasyonunda rolü olmadığı, bunun yanısıra R-Spondin'in, kanonikal Wnt aktivasyonunda, Wnt3a'nın etkisini arttırıcı rolü olduğu bulunmuştur(Şekil 18).



**Şekil 18.** HuH7 hücrelerinde LGR5'in Wnt3a/Rspondin1 sinyalizasyonunda etkisi

#### 4.7. LGR5/R-Spondin 1/Wnt3a Sinyalizasyonun Hücre Çoğalmasına Etkisi:

HuH7 hücrelerinde LGR5 overekspresyonu sonrası MTT kit ile gerçekleştirilen proliferasyon deneyinde, Lgr5'in Wnt3a ve R-Spondin1 varlığında 24, 48, 72 saatlik sürelerde proliferasyona etkisi incelenmiştir. LGR5 overeksprese hücrelerde boş vektör kontrolüne göre, Wnt3a ve/veya R-Spondin1'in tek başlarına, birarada ya da hiç olmadıkları durumlar arasında hücre proliferasyonunda bir değişimin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 19).



**Şekil 19.** LGR5 overekspres Huh7 ve boş vektör içeren Huh7 hücrelerinde, R-Spondin1/Wnt3a'nın birarada, ayrı ayrı ve hiç olmadığı koşullarda hücre çoğalması değişimleri

## **5. TARTIŞMA**

Dünya Sağlık Örgütünün verilerine göre, 2008 yılı itibarı ile Dünya'da her yıl yaklaşık 700 bin yeni karaciğer kanseri olgusu tanımlanmakta ve bu hastaların yaklaşık 690,000'i ölmektedir. Karaciğer kanseri Pankreatik duktal adenokarsinom'dan sonra ikinci ölümcül kanser türü olup, karaciğer kanseri hastalarında 5 yıllık sağkalım, 2007 rakamlarına göre ABD' de % 9.9, Avrupa ülkelerinde % 6.2 oranındadır.

HCC karaciğer kanserinin en sık görülen formu dur ve tüm karaciğer kanserlerinin, % 85'ini oluşturur. Günümüzde radikal transplantasyon cerrahisi dışında HCC'nin bilinen başarılı bir tedavisinin olmayışı HCC'de tedavi hedefi olabilecek yeni moleküler mekanizmalarının araştırılmasını ve bunlara bağlı hedeflerin bulunması gerekliliğini öne çıkarmaktadır.

Dokuz HCC hücre dizisi kullanılarak yapılan daha önceki çalışmalarımızda LiCl'un tüm bu hücrelerin proliferasyonlarında % 90 ila % 60 aralığında olmak üzere, farklı düzeylerde proliferasyonu inhibe ettiği bulunmuştur<sup>9</sup>. Sonrasında en çok LiCl-bağımlı proliferasyon inhibisyonunun görüldüğü HuH7 hücre dizisinde yapılan mikroarray analizlerinde de, kontrole göre en fazla mRNA düzeyinde ekspresyonu değişen genin LGR5 olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler ek olarak Son yıllarda LGR5 geninin bağırsak kök hücrelerinin çoğalma ve farklılaşmasındaki tanımlanan rolleri bize HCC'lerde de bu gen ürününün hücre proliferasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürdü. Sonuç olarak, LGR5 in HCC hücre proliferasyonunda üstlendiği görevinin aydınlatılması ve kanser hücre davranışlarını nasıl etkilediğinin anlaşılması özellikle sonrasında bu moleküle karşı çok özgün düzenleyicilerin üretilmesini sağlayabilir.

Bu tez kapsamında, ilk olarak laboratuvarımızda bulunan tüm HCC hücre dizilerinde LGR5 gen ekspresyonunu belirlenmeyi ve sonrasında LGR5 ekspresyonunun hücre proliferasyonundaki önemini aydınlatmayı amaçlandık. Bu amaçla literatürde gösterilen, Wnt sinyal yolağında aktive edici mutasyonların olduğu HCC dokularındaki LGR5 ekspresyonundaki artışa uyumlu olarak, bizde  $\beta$ -katenin delete formunu içeren HepG2, axin 1 mutasyonu içeren PLC/PRF/5 hücrelerinde ve bazal Tcf/Lef aktivitesi diğer hücre hatlarına göre fazla olan Hep3B ve HuH7 hücrelerinde LGR5 ekspresyonu transkript düzeyinde diğer hücrelere göre yüksek olduğunu gösterdik<sup>76,77,78</sup>. Bu bulgular Hirohashi ve ark.nın yayınladığı 38 adet HCC dokusunda normal olan dokulara göre RNA düzeyinde LGR5 ekspresyonunu fazla olduğunu gösteren

çalışma ile uyumludur. Aynı çalışmada LGR5+ olan dokularda %87 gibi yüksek bir oranda  $\beta$ -katenin artırıcı mutasyonun olduğu bulunmuştur. Fakat bu çalışmada HCC'de LGR5 ekspresyonunun direk Wnt/ $\beta$ -katenin aracılıklı kontrol edilip edilmediği ve biyolojik rolünün ne olduğu tanımlanmamıştır. Yine, henüz ticari olarak satılan LGR5'e spesifik iyi bir antikör olmadığından LGR5'in ekspresyonunu protein düzeyinde gösteren yayınlanmış çalışma sayısı çok azdır. Dokuz adet HCC hücre dizisinde yaptığımız analizlerde, LGR5 mRNA düzeyinde ekspresyonunun fazla olduğu hücre dizilerinin oluşturduğu grubun, daha önce içinde bulunduğumuz bir çalışmada da gösterildiği gibi<sup>79</sup>, daha invaziv karakterde ve hepatik kanser kök hücre içeren hücre hatlarından oluşması dikkat çekici bir sonuçtu. Literatürde, son yıllarda HCC doku ve hücre hatlarında iki grup tanımlanmıştır. Bunlar, invaziv ve *nude* farelerde yeniden tümör başlatma kapasitesine sahip hepatik kök hücremsi (CK19+/CD133+/EpCAM+/AFP+)/invazif karakterde olan HCC'ler ve olgun hepatosit benzeri fenotipe sahip, *nude* farelerde yeniden tümör başlatma kapasitesine sahip olmayan HCC'lerdir<sup>30</sup>. Bu tez kapsamında da LGR5 ekspresyonu fazla olan hücre hatlarının (HuH7, PLC/PRF/5, ve Hep3B) epitelyal karakterde (E-kadherin+) ve hepatik kök hücre grubu içeren (EpCAM+/AFP+/CK19+) hücreler olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla LGR5'in neden bu grupta daha fazla eksprese olduğunu anlamak, bize ileride LGR5'in HCC'ye özel bir kanser kök hücre belirteci olma potansiyelini test etmek ve böyle ise bu moleküle karşı inhibitör geliştirerek karaciğer kanser kök hücrelerin aktivasyonunu, yani tümör oluşturmalarını engellemeyi sağlayacaktır.

Aynı zamanda literatürde özellikle kolon ve ince bağırsakta kriptik villüsler içerisinde LGR5<sup>+</sup> hücrelerin bağırsak villüsü kök hücresi ve kanser kök hücre kaynağını oluşturması bize LGR'in karaciğer kök hücre aktivasyonunda rolü olabileceğini düşündürmüştür.

Literatürde LGR5'in yarattığı biyolojik etkileri aydınlatmak için yeterince çalışma olmamasına karşın LGR5'in adezyon üzerine etkisini araştıran tek çalışmada LGR5 in adezyonu pozitif olarak regüle ettiği bulunmuştur<sup>45</sup>. LGR5 ekspresyonu baskılandığında invazyon ve yapışma bağımsız büyümenin arttığı, LGR5 ekspresyonu artırıldığında ise adezyonun arttığını söyleyen bu çalışmaya karşın çalışmamızda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağını tetikleyen her hangi bir indüksiyon yapılmadan LGR5 in HCC'de biyolojik davranış olarak adezyonu değiştirmediğini ortaya koyduk.

Buna ek olarak farklı çalışmalarda LGR5 in kanserleşme sürecinde tümörogenik roller oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur<sup>64</sup>. Özellikle ince bağırsakta yapılan çalışmalardan, Ki67 ve PCNA gibi proliferasyon belirteçleri ekprese etmeyen ve villüs bütünlüğünü korumak için sadece gerekli durumlarda bölünen hücrelerde LGR5 ekspresyonunun olduğunu gösteren çalışmalar ve kolorektal kanser hücre hatlarında LGR5 susturulmasının koloni sayısını artırdığını ortaya koyan çalışmalar, LGR5'in proliferasyonda negatif rol oynadığını düşündürmüştür<sup>45,80,81</sup>. Bu çalışmada yapılan gerçek zamanlı hücre proliferasyon analizinde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağını tetikleyen her hangi bir indüksiyon yapılmadan LGR5 ekprese etmeyen boş vektörün kullanıldığı koşul ile LGR5 overeksprese eden koşul arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. LGR5 hücrelerde overeksprese edildiği halde bu reseptörün proliferasyon ve/veya benzeri biyolojik davranışları tetikleyici sinyalizasyonu başlatabilmesi için ligandının ortamda olması gerekmektedir. Dolayısıyla tüm bu deneylerin LGR5 için tanımlanan Wnt3a ve/veya R-Spondin1 ile birlikte tekrarlanması önemlidir. Bunun yanı sıra, LGR5 overeksprese eden hücrelerin populasyon içerisindeki oranının artırılması, değişen biyolojik yanıtı gözlemlememiz için gerekli diğer bir gerekliliktir. İlerleyen dönemlerde LGR5 overekspresyonunun proliferasyon üzerindeki etkisinin diğer konvansiyonel proliferasyon analiz yöntemleri kullanılarak da araştırılması planlanmaktadır.

Son bir yılda, literatüre arka arkaya giren üç yayında, LGR5 ve aynı protein ailesinden olan LGR4'ün, R-Spondin reseptörü gibi davranarak, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalini indükledikleri bildirilmiştir<sup>82,83</sup>. Ayrıca bu çalışmalarda, R-Spondin ailesinin LGR4 ve LGR5 ile fiziksel etkileşiminin olması ve fiziksel bağlantının gerçekleşmesi durumunda birlikte internalize oldukları ve Wnt3a varlığında R-Spondinin oluşturduğu Tcf/Lef aktivitesindeki artışın LGR5 varlığında daha da fazlaştığı gösterilmiştir. Başka bir deyişle bu çalışmalarda kullanılan HEK293T hücrelerinde R-Spondin ailesinin Wnt sinyalini artırma yönündeki potansiyeli LGR4 ve LGR5 seviyesi ile belirlenmekle beraber maksimum Tcf/Lef aktivitesi Wnt3a ve LRP6 seviyesine bağımlı olduğu söylenmiştir. Bu tez kapsamında ise, Wnt3a'nın olmadığı koşullarda R-Spondin-1 in LGR5 overeksprese eden HuH7 hücrelerinin atasala göre Tcf/Lef aktivitelerinde bir değişime neden olmadığını gözlemledik. Wnt3a tek başına ise parental HuH7 ve LGR5 overeksprese eden HuH7 hücrelerin Tcf/Lef aktivitelerinde aynı miktarda artışa neden olduğunu saptadık. Fakat atasal HuH7 ve LGR5 overeksprese eden HuH7 hücrelerinde Wnt3a ve R-Spondin1 bir arada



oldukları zaman Tcf/Lef aktivitesini hem DMEM kontrole hem de Wnt3a tek başına koşullarına karşın ciddi miktarda arttırmıştır. Ama bu artış atasal HuH7 ve LGR5 overeksprese eden HuH7 hücrelerindeki benzerlik göstermektedir. Dolayısıyla literatürde tanımlanan LGR5/R-Spondin bağımlı Tcf/Lef aktivitesi kontrolünün, HCC hücrelerinde Wnt3a bağımlı olma olasılığı oldukça yüksektir. İleri çalışmalarımızda ise Wnt3a varlığında LGR5/R-Spondin bağımlı Tcf/Lef aktivitesi deneylerini yapmak önemlidir.

## **6. SONUC VE ÖNERİLER**

Çalışmamız kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir,

1. LGR5'in, incelediğimiz dokuz HCC hücre hattından (SNU398, SNU-475, SK-Hep1, HepG2, PLC, Mahlavu, Hep3B, SNU449, HuH7), yalnızca iyi diferansiye , hepatik kanser kök hücre (HpCSC) özelliği gösteren ve epitelyal kökenli olanlarında (HepG2, PLC, Hep3B, HuH7) yüksek düzeyde eksprese olduğu, diğerlerinde ise yok/düşük şeklinde bulunduğu tespit edilmiştir.
2. LGR5 overeksprese eden HuH7 hücrelerinde de Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesinin sonuçları, atasal Huh7 ve HuH7 mock hücreler ile benzerlik göstermektedir. Bu da bize LGR5 overekspresyonunun hiçbir indüksiyon olmayan (DMEM) koşullarda atasal ve boş plazmit kontrollerine göre Tcf/Lef aktivasyonunu yani Wnt/ $\beta$ -katenin sinyalizasyonunun uyarılması üzerine etkisi olmadığını göstermiştir.
3. Atasal HuH7 ve mock plazmit ile transfekte olan HuH7 hücrelerinde, R-Spondin1 tek başına ve LGR5 ile bir arada olduğu durumda, Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesini artırmazken, Wnt3a tek başına Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesinin artışına sebep olmuştur. Ayrıca Wnt3a ve R-spondin1 ikisi bir arada oldukları durumda Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesi daha da artmıştır. Dolayısıyla sonuç olarak, LGR5 overekspresyonunun, Huh7 hücrelerinde Wnt3a/R-Spondin1 tarafından tetiklenen kanonikal Wnt aktivasyonunda rolü olmadığı, bunun yanısıra R-Spondin'in, kanonikal Wnt aktivasyonunda, Wnt3a'nın etkisini artırıcı rolü olduğu bulunmuştur.
4.  $\beta$ -katenin'in nükleer lokalizasyonu LGR5 overeksprese eden ve etmeyen hücreler arasında her hangi bir farkı olmadığı gözlemlendi. Bu sonuca dayanarak, tek başına LGR5 ekspresyonu olması,  $\beta$ -katenin'in nükleusta birikmesi için yeterli değildir denilebilir. Bu sonuç Tcf/lef transkripsiyonel aktivitesinde artış olmamasını da açıklamaktadır.
5. pCMV6-AC-GFP-LGR5 vektörü kullanarak geçici transfeksiyonu yolu ile LGR5 ekspresyonu artırılan Huh7 hücreleri, mock ve parental hücreler ile karşılaştırıldıklarında, gerçek zamanlı proliferasyonları açısından anlamlı düzeyde farklılık göstermemişlerdir. Fakat LGR5'in reseptörü olduğu düşünülen Wnt3a ve/veya R-

Spondin1 indüksiyonunda proliferasyonu etkileme olasılığı halen vardır. Bunun denenmesi gereklidir.

6. LGR5'in, insan ve/veya hücre hatlarından izole edilen EpCAM, CK19 gibi kök hücre belirteçlerini taşıyan hücrelerde diğerlerine göre LGR5 ekspresyonlarında farklılık olup olmadığı araştırılmalıdır.
7. LGR5'i stabil olarak overeksprese etmek ve/veya bazal düzeyi yüksek olan bir hücre hattında susturarak, Wnt3a/R-pondin aracılıklı sinyalizasyonu tetikleyerek proliferasyona olan etkileri araştırılmalıdır.

## **7.KAYNAKLAR**

---

1. Chun-Ming W , Irene O. L. Ng et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver international* 2007; 1478-3223
2. Levrero M. et al. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 2006; 26: 25(27):3834-47
3. Sigal SH, Brill S, Fiorino AS, et al. The liver as a stem cell and lineage system. *Am J Physiol* 1992;263:G139–G148
4. Lee H.C, Kim M , Wands, J.R. Wnt/frizzled signaling in hepatocellular carcinom *Front. Biosci.* 2006; **11**: 1901-1915
5. Villanueva A, Newell P, Chiang D.Y, Friedman S.L, Llovet J.M . Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma *Semin. Liver Dis* 2007; 27(1): 55-76
6. Takigawa Y , M.C. Brown A . Wnt Signaling in Liver Cancer. *Current Drug Targets* 2008; 9 : 1013-1024
7. Zhang X, Yu L. Wnt/b-catenin signaling pathway and its role in hepatocellular carcinoma. *Front. Med. China* 2008; 2(3): 216–228
8. Uenishi T, Kubo S, Yamamoto T, Shuto T, Ogawa M. Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence. *Cancer Sci.* 2003 Oct;94(10):851-7
9. Erdal E, Ozturk N. et al. Lithium-mediated downregulation of PKB/Akt and cyclin E with growth inhibition in hepatocellular carcinoma cells. *IJC* 2005 ; 115 (6): 903–910
10. Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet J.M.Focus on hepatocellular carcinoma *Cancer Cell* 2004; 5(3): 215-219.
11. Llovet J.M, Burroughs A, Bruix J. hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362(9399): 1907-1917.
12. Abou-Alfa, G.K, Schwartz L, Ricci S, Amadori D. Phase II Study of Sorafenib in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma *J. Clin. Onco* 2006; 24(26): 4293-4300.
13. Gianluigi G. et. al. Novel Concepts in Hepatocellular Carcinoma: From Molecular Research to Clinical Practice. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: Number 9

- 
- 14.** Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*. 2006 Sep;6(9):674-87.
- 15.** Yang S, Koteish A, Lin H, et al. Oval cells compensate for damage and replicative senescence of mature hepatocytes in mice with fatty liver disease. *Hepatology*. 2004; 39: 403-411
- 16.** Sandrine P. Hepatitis B x Protein Inhibits p53-dependent DNA Repair in Primary Mouse Hepatocytes'' 2007; Vol. 273, No. 50, Issue of December 11, pp. 33327–33332
- 17.** Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J. et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2001;120:1763-1773
- 18.** Liew CT, Li HM, Lo KW, Leow CK. et al. High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999; 18:789-795
- 19.** De Souza AT, Hankins GR, Washington MK, Orton TC, Jirtle RL: M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nat Genet* 1995; 11:447-449
- 20.** Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N. Et al. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet* 1999; 21:220-224
- 21.** Marrero J. A. Hepatocellular Carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21:308-312
- 22.** Takayama H, Larochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, et al. Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *PNAS* 1997;94(2):701–6
- 23.** Sicklick JK, Li YX, Jayaraman A, Kannangai R, Qi Y, Vivekanandan P, et al. Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2006;27(4):748–57.
- 24.** Lin L, Amin R, Gallicano GI, Glasgow E, Jogunoori W, Jessup JM, et al. The STAT3 inhibitor NSC 74859 is effective in hepatocellular cancers with disrupted TGF-beta signaling. *Oncogene* 2009;28 (7):961–72.
- 25.** Wang R, Brattain MG. AKT can be activated in the nucleus, *Cell Signal*, 2006; 18(10):1722-31 1-10

- 
26. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J et al. A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; **367**: 645–8
27. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011; **469**: 314–22
28. Ma S, Chan KW, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; **132**: 2542-2556
29. Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepato-cellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene*. 2006; **25**: 3818-3822
30. Oishi N, Wang XW. Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells. *Int J Biol Sci*. 2011 Apr 26; **7**(5):517-35.
31. Arias A M. Epithelial mesenchymal interactions in cancer and development. *Cell*;2001;105(4): 425–431
32. Moon R T, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002; **296**(5573): 1644–1646
33. Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis— a look outside the nucleus. *Science*; 2000: **287**(5458): 1606–1609
34. Weeraratna A T, Jiang Y, Hostetter G. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 2002; **1**(3): 279–288
35. Rhee C S, Sen M, Lu D, Wu C, Leoni L, Rubin J, Corr M, Carson D A. Wnt and frizzled receptors as potential targets for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 2002; **21**(43): 6598–6605
36. Clevers, H. Wnt/  $\beta$ -catenin signaling in development and disease *Cell* 2006; **127**(3): 469-480
37. Gordon, M.D. and Nusse, R. Wnt Signaling: Multiple Pathways, Multiple Receptors, and Multiple Transcription Factors *J. Biol. Chem* 2006; **281**(32): 22429-22433
38. M Leushacke , N Barker. Lgr5 and Lgr6 as markers to study adult stem cell roles in self-renewal and cancer. *Oncogene* , (17 October 2011) | doi:10.1038/onc.2011.479
39. Haegebarth A, Clevers H. Wnt Signaling, Lgr5, and Stem Cells in the Intestine and Skin. *Am J Pathol*. 2009 Mar; **174**(3):715-21. Epub 2009 Feb 5

- 
40. Tanese K, Fukuma M, Yamada T, Mori T. Et al. G-Protein-Coupled Receptor GPR49 is Up regulated in Basal Cell Carcinoma and Promotes Cell Proliferation and Tumor Formation. *Am J Pathol.* 2008 Sep;173(3):835-43
41. van der Flier LG, Clevers H. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Laurens G. van der Flier and Hans Clevers. Annu Rev Physiol.* 2009;71:241-6
42. Becker L, Huang Q, Mashimo H. Immunostaining of Lgr5, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue. *ScientificWorldJournal* 2008; 8:1168–1176
43. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:744–9.
44. Mariadason JM, Bordonaro M, Aslam F, et al. Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer Res.* 2001;61:3465–71
45. Walker F, Zhang HH, Odorizzi A, Burgess AW. LGR5 Is a Negative Regulator of Tumorigenicity, Antagonizes Wnt Signalling and Regulates Cell Adhesion in Colorectal Cancer Cell Lines. *PLoS One.* 2011;6(7):e22733. Epub 2011 Jul 28
46. Takahashi H, Ishii H, Nishida N, Takemasa I et al. Significance of Lgr5+ve Cancer Stem Cells in the Colon and Rectum. *Ann Surg Oncol.* 2011 Apr;18(4):1166-7
47. Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Tsuiji H, Kenetaka K, Asaka M, Hirohashi S: Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with  $\beta$ -catenin mutations *Hepatology* 2003; 37:528–533
48. Hsu SY, Kudo M, Chen T, Nakabayashi K. Et al. The three subfamilies of leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptors (LGR): identification of LGR6 and LGR7 and the signaling mechanism for LGR7. *Mol Endocrinol* 2000; 14:1257–1271
49. Hsu SY, Liang SG, Hsueh AJ. Characterization of Two LGR Genes Homologous to Gonadotropin and Thyrotropin Receptors with Extracellular Leucine-Rich Repeats and a G Protein-Coupled, Seven- Transmembrane Region. *Mol Endocrinol.* 1998 Dec;12(12):1830-45
50. Dohlman HG, Caron MG, Lefkowitz RJ. A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* 1987; 26:2657-64

- 
51. Brzostowski JA, Kimmel AR. Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci* 2001; 5:291-7
52. Morita H, et al. Neonatal lethality of LGR5 null mice is associated with ankyloglossia and gastrointestinal distension. *Mol Cell Biol* 2004; 24:9736–9743
53. Mazerbourg S, et al. Leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptor 4 null mice exhibit intrauterine growth retardation associated with embryonic and perinatal lethality. *Mol Endocrinol* 2004;18:2241–2254
54. Kato S, et al. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-4 (LGR4, Gpr48) is essential for renal development in mice. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 104: e63–e75
55. Mendive F, et al. Defective postnatal development of the male reproductive tract in LGR4 knockout mice. *Dev Biol* 2006;290:421–434
56. Hoshii T, et al. LGR4 regulates the postnatal development and integrity of male reproductive tracts in mice. *Biol Reprod* 2007; 76:303–313.
57. Weng J, et al. Deletion of G protein-coupled receptor 48 leads to ocular anterior segment dysgenesis (ASD) through down-regulation of Pitx2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:6081–6086.
58. Luo J, et al. Regulation of bone formation and remodeling by G-proteincoupled receptor 48. *Development* 2009; 136:2747–2756.
59. Mohri Y, Kato S, Umezawa A, Okuyama R, Nishimori K . Impaired hair placode formation with reduced expression of hair follicle-related genes in mice lacking Lgr4. *Dev Dyn* 2008; 237:2235–2242.
60. Yamashita R, et al. Defective development of the gall bladder and cystic duct in Lgr4-hypomorphic mice. *Dev Dyn* 2009; 238:993–1000.
61. Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling Kendra S. Carmon1, Xing Gong1, Qiushi Lin, Anthony Thomas, and Qingyun Liu2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 12;108(28):11452-7
62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8549>



- 
- 63.** McClanahan T, Koseoglu S, Smith K, Grein J, Gustafson E, et al. Identification of Overexpression of Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR49 in Human Colon and Ovarian Primary Tumors. *Cancer Biol Ther.* 2006 Apr;5(4):419-26
- 64.** Von Rahden BH, Kircher S, Lazariotou M, Reiber C, et al. LgR5 expression and cancer stem cell hypothesis: clue to define the true origin of esophageal adenocarcinomas with and without Barrett's Esophagus?. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; Feb 23;30:23
- 65.** Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J et al. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology,* 2001; 120(7): 1763–1773
- 66.** Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus. *Science,* 2000;287(5458): 1606–1609
- 67.** Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev,* 2000, 14(15): 1837–1851
- 68.** Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007;27(1):55–76
- 69.** Legoix P, Bluteau O, Bayer J, Perret C et al. Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity. *Oncogene,* 1999; 18(27): 4044–4046
- 70.** Huang H, Fujii H, Sankila A, Mahler-Araujo B M, Matsuda M, Cathomas G, Ohgaki H. Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Pathol,* 1999; 155(6): 1795– 1801
- 71.** Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. Alterations of beta-catenin and Tcf-4 instead of GSK-3 $\beta$  contribute to activation of Wnt pathway in hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl),* 2003; 116(12): 1885–1892
- 72.** De Sousa E Melo F, Colak S, Buikhuisen J, Koster J , et al. Methylation of Cancer-Stem-Cell-Associated Wnt Target Genes Predicts Poor Prognosis in Colorectal Cancer Patients.
- 73.** Kim KA, Kakitani M, Zhao J, Oshima T ,et al. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science.* 2005 Aug 19;309(5738):1256-9

- 
- 74.** Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stannek P ,et al. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell*. 2004 Oct;7(4):525-34
- 75.** Binnerts ME, Kim KA, Bright JM, Patel SM ,et al. R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 11;104(37):14700-5
- 76.** Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X ,et al. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene*. 2002 Jul 18;21(31):4863-71
- 77.** Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C, Boyault S ,et al. Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene*. 2007 Feb 1;26(5):774-80
- 78.** Hu J, Dong A, Fernandez-Ruiz V, Shan J, Kawa M ,et al. Blockade of Wnt Signaling Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res*. 2009 Sep 1;69(17):6951-9
- 79.** Yuzugullu H, Benhaj K, Ozturk N, Senturk S , et al. Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer*. 2009 Oct 22;8:90
- 80.** Sala FG, Matthews JA, Speer AL, Torashima Y , et al. A multicellular approach forms a significant amount of tissue engineered small intestine in the mouse. 2011 Jul;17(13-14):1841-50
- 81.** Tian H, Biehs B, Warming S, Leong KG ,et al. A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*. 2011 Sep 18;478(7368):255-9
- 82.** De Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK ,et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signaling. *Nature*. 2011 Jul 4;476(7360):293-7
- 83.** Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 12;108(28):11452-7
- 84.** Cagatay T, Ozturk M . P53 mutation as a source of aberrant beta-catenin accumulation in cancer cells. *Oncogene*. 2002 Nov 14;21(52):7971-80

- 
- 85.** Zucman-Rossi J, Benhamouche S, Godard C, Boyault S , et al. Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene*. 2007 Feb 1;26(5):774-80
- 86.** Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N , et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet*. 2000 Mar;24(3):245-50

## 8.E KLER

### Etik Kurul Raporu

|                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                         |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>KARAR BİLGİLERİ</b> | <b>Karar No:2010/02-25</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>Tarih:26.05.2010</b> |
|                        | Doç.Dr.Esra Erdal'ın proje yöneticisi olduğu Dr.Soheil Akbari sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Hepatosellüler karsinoma hücre proliferasyonunda LGR5 geninin önemi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. |                         |

| ETİK KURUL BİLGİLERİ |                                                                                                                            |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ÇALIŞMA ESASI</b> | DEU Girişimsel (Invaziv) Olmayan Klinik Araştırmaları Değerlendirme Komisyonu Yönergesi , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu |

| ETİK KURUL ÜYELERİ                       |                                     |                                                               |           |                                                                  |      |
|------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------|------|
| Unvanı/Adı/Soyadı                        | Uzmanlık Alanı                      | Kurumu                                                        | Cinsi yet | Araştırma ile ilişkili mi?                                       | İmza |
| Prof. Dr. Aysegül YILDIZ (Başkan)        | Psikiyatri                          | DEU Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı                    | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Dr.Ecz.İskender İNCE (Başkan yardımcısı) | Eczacı                              | Ege Üniversitesi ARGEFAR                                      | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ                    | Fizyoloji                           | DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı                     | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Ph.D. Z.Candan ALGUN                | Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon | DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı              | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR                    | Ph.D. Yüksek Hemşire                | DEU Tıp Fakültesi Hemşirelik Yüksekokulu                      | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Ece BÖBER                        | Pediyatrik Endokrinoloji            | DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Nuray DUMAN                      | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları       | DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Derya ERÇAL                      | Genetik                             | DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı                 | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Banu ÖNVURAL                     | Biyokimya                           | DEU Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı                     | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU              | Kalp Damar Cerrahisi                | DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı          | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK          | İç Hastalıkları                     | DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı               | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Doç.Dr.Hülya ELLİDOKUZ                   | Halk Sağlığı                        | DEU Onkoloji Enstitüsü Prevaltif Onkoloji Anabilim Dalı       | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ                   | Farmakoloji                         | DEU Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı                   | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Doç.Dr.Yeşim ÖZTÜRK                      | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları       | DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı | Kadın     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| Av. Tayfun OZANKAYA                      | Hukuk                               | Serbest                                                       | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |
| İhsan ÇELİKDEMİR                         | Sağlık mensubu olmayan üye          | 75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.                      | Erkek     | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> |      |

\* Girişimsel (Invaziv) Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu Karar Formu

2 / 3

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ**  
**GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KOMİSYONU KARARI**

|                            |                                                                                                           |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ETİK KOMİSYONUN ADI</b> | <b>DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ</b><br><b>GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KOMİSYONU</b> |
| <b>AÇIK ADRES</b>          | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 1. Kat İnciraltı-İZMİR                                   |
| <b>TELEFON</b>             | 0 232 412 22 54-0 232 412 22 58                                                                           |
| <b>FAKS</b>                | 0 232 412 22 43                                                                                           |
| <b>E-POSTA</b>             | etikkurul@deu.edu.tr                                                                                      |

|                          |                                                         |                                                                                                 |
|--------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b> | DOSYA NO:                                               | 38 -İOÇ                                                                                         |
|                          | ARAŞTIRMA                                               | UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>                 |
|                          | ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI                                   | Hepatocellular karsinoma hücre proliferasyonunda LGR5 geninin önemi                             |
|                          | ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU                                 | -                                                                                               |
|                          | SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI | Soheil Akbari<br>Doç.Dr.EsraErdal                                                               |
|                          | ARAŞTIRMA MERKEZİ ve AÇIK ADRESİ                        | Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı<br>İnciraltı-İZMİR 35340 |
|                          | DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ                             | -                                                                                               |
|                          | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ              | -                                                                                               |
|                          | ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER                           | TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> TEK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>            |
|                          |                                                         |                                                                                                 |

|                                 |                                     |        |                   |                                                                                                              |
|---------------------------------|-------------------------------------|--------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>DEĞERLENDİRİLEN BELGELER</b> | Belge Adı                           | Tarihi | Versiyon Numarası | Dili                                                                                                         |
|                                 | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ                 | Mevcut |                   | Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                 | ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR      | Mevcut |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input checked="" type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/> |
|                                 | BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU | -      |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>            |
|                                 | OLGU RAPOR FORMU                    | -      |                   | Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>            |

## ÖZGEÇMİŞ

SOHEİL AKBARI

|                                    |                                                                                                           |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TC Kimlik No / Pasaport No:</b> | Z14446163                                                                                                 |
| <b>Doğum Yılı:</b>                 | 21/03/1984                                                                                                |
| <b>Yazınma Adresi:</b>             | Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Balçova, İzmir, Türkiye |
| <b>Telefon:</b>                    | 00905549459429                                                                                            |
| <b>Faks:</b>                       | -                                                                                                         |
| <b>e-posta:</b>                    | Soheilakbari123@yahoo.com                                                                                 |

### EĞİTİM BİLGİLERİ

| Ülke    | Üniversite                              | Fakülte/Enstitü            | Öğrenim Alanı             | Derece        | Mezuniyet Yılı |
|---------|-----------------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------|----------------|
| İRAN    | Shahriyar Shahreghods Azad Üniversitesi | Fen Fakültesi              | Moleküler Biyoloji        | Lisans        | 2007           |
| TÜRKİYE | Dokuz Eylül Üniversitesi                | Sağlık Bilimleri Enstitüsü | Tıbbi Biyoloji ve Genetik | Yüksek Lisans | -              |
|         |                                         |                            |                           |               |                |