

TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA
HÜCRELERİNDE LİTYUMUN GENOM
DÜZEYİNE ETKİLERİ**

İMGE KUNTER

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2013

DEU.HSL.PhD-2006970166

TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA
HÜCRELERİNDE LİTYUMUN GENOM
DÜZEYİNE ETKİLERİ**

İMGE KUNTER

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DOKTORA TEZİ

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

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
DEU 2008-KB-SAG-023 sayı ile desteklenmiştir.

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Doç. Dr. Esra ERDAL'ın danışmanı olduğu İmge Kunter tarafından gerçekleştirilen “**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA HÜCRELERİNDE LİTYUMUN GENOM DÜZEYİNE ETKİLERİ**” isimli bu tez 20.09.2013 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

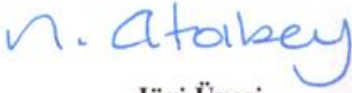


Jüri Başkanı

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



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Funda YILMAZ

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji

Anabilim Dalı



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Nedime Serakıncı

Yakın Doğu Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Meral Sakızlı

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Deniz NART

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji

Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
TABLO DİZİNİ	İV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
KISALTMALAR	VI
TEŞEKKÜR	VIII
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2.GENEL BİLGİLER	7
2.1. Lityum Klorür ve Etkileri	7
2.1.1. <i>Lityum Klorürün Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları</i>	7
2.1.2. <i>Lityumun GSK3β Üzerine Etkisi</i>	7
2.1.3. <i>Lityumun IMP Üzerine Etkisi</i>	8
2.1.4. <i>Lityumun Farklı Kanser Modellerinde Etkileri</i>	9
2.1.5. <i>Lityumun Pluripotensi Üzerine Etkileri</i>	9
2.1.6. <i>Lityumun Farklı Hayvan Modelleri Ve Dokularda Genom Düzeyindeki Etkileri</i>	10
2.2. Hepatoselüler Karsinoma	11
2.2.1 <i>HCC Etiyolojisi</i>	13
2.2.2 <i>HCC'de Genetik ve Epigenetik Değişiklikler</i>	13
2.3. Hepatik Kaser Kök Hücrelerin Hepatokarsinogenezdeki Rolü.....	14
2.3.1. <i>HpKKK'lerde Değişen Sinyal Yolakları</i>	17
2.3.1.1. <i>Wnt/β-katenin Sinyal Yolağı</i>	18
2.3.2. <i>HpKKK'lerde Kemoterapi Direnci</i>	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Araştırmanın Tipi	23
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	23
3.3. Araştırma Evreni ve Örneklemi / Çalışma Grupları.....	23
3.4. Çalışma Materyali	23
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	23
3.6. Veri Toplama Araçları.....	24
3.6.1. <i>Hücre Kültürü Çalışmaları</i>	24

3.6.1.1. HCC Hücre Hatları ve İdamesi	24
3.6.1.2 Hücrelerin Dondurulup Çözülmesi	25
3.6.1.3 Hücrelerin LiCl'e Maruz Bırakılması	25
3.6.2. Mikrodizin Analizleri	25
3.6.2.1. Ham Mikrodizin Verilerinin Eldesi	25
3.6.2.2. İnternet Tabanlı Biyoinformatik Araçların Yardımıyla İstatistiksel Sonuçların Çözümlemesi.....	26
3.6.3. Plazmid Vektörlerin Eldesi	27
3.6.3.1. Transformasyon	27
3.6.3.2. Miniprep Plazmid DNA İzolasyonu.....	27
3.6.3.3. Maxiprep Plazmid DNA İzolasyonu	28
3.6.4. Tcf/Lef Lusiferaz Reporter Assay	29
3.6.5. RNA Eldesi ve PCR.....	31
3.6.5.1. RNA Eldesi Ve Konsantrasyon Ölçümü	31
3.6.5.2. cDNA Sentezi	31
3.6.5.3. Yarı-Kantitatif Ters-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	32
3.6.5.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR) Reaksiyonu	35
3.6.6. İmmunfloresan Boyama	35
3.6.7. İmmunositokimya.....	36
3.6.8. Western Blot	37
3.6.8.1. Total Protein İzolasyonu	37
3.6.8.2. Protein Miktar Tayini	37
3.6.8.3. SDS- Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	38
3.6.8.4. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi ve Bloklama.....	38
3.6.8.5. İmmünoiblotlama Deteksiyon	39
3.6.9. Hücre Prolifersyon Analizleri	40
3.6.9.1. BrdU İnkooperasyonu	40
3.6.9.2. DNA Floresan Işıması Temelli Hücre Proliferasyon Testi.....	40
3.6.9.3. Elektronik Hücre Algılamaya Bağlı Gerçek Zamanlı Hücre Adezyonu Ve Çoğalmasının İncelenmesi	41
3.6.10. Motilite/ İnvazyon analizleri	41

3.6.11. Manyetik Hücre Seperasyonu (MACS)	42
3.6.12. MACS Sonrasında Flow Sitometri Konfirmasyonu	43
3.6.13. İstatistik.....	43
3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi	44
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	45
3.9. Araştırmanın Sınırlıkları.....	45
3.10. Etik Kurul Onayı	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Hepatosellüler Karsinoma (HCC) Hücre Hatlarında Lityum Klorür'ün Biyolojik Davranışa Olan Etkileri.....	46
4.1.1. HCC Hücre Hatlarında Lityum Klorür Bağımlı Proliferasyon inhibisyonu	46
4.1.2. HuH-7 Hücrelerinde Lityum Klorür Bağımlı Gerçek Zamanlı Adhezyon İnhibisyonu.....	48
4.1.3. HuH-7 Hücrelerinde Lityum Klorür Bağımlı Motilite/İnvazyon Aktivasyonu	49
4.2. HuH-7 Hücrelerinde Lityum Klorür Bağımlı Wnt/ β -katenin Sinyal Yolu Aktivasyonu	50
4.3. HuH-7 Hücre Hattında Lityum Klorür Bağımlı Transkriptom Değişikliklerinin Modellenmesi...	52
4.4. HCC Hücre Hatlarında Lityum-Klorür Bağımlı Olası Yeni Mekanizmaların Tanımlanması	64
4.4.1. LGR5: HCC Hücrelerinde Yeni Tanımlanan Wnt/ β -katenin Sinyal Yolu Hedef Geni.....	64
4.5. Lityum Klorür'ün Hepatik Kanser Kök Hücre (HpKKH) Fenotipine Etkisi	70
4.5.1. LiCl'ün Pluripotensi, Differansiasyon ve Hepatik Kanser Kök Hücre Genlerine Etkileri	70
4.5.2. HuH-7 Hücre Hattında EpCAM+/CD133+ HpKKH'lerin Ayrılmanması ve Biyolojik Davranış Farklılıklarının Belirlenmesi	72
4.5.2.1. HuH-7 Hücre Hattında Hepatik Kanser Kök Hücre Grubunun Belirlenmesi.....	72
4.5.2.2. HuH-7 Hücre Hattında EpCAM+/CD133+ Hepatik Kanser Kök Hücre Grubunun Zenginleştirilmesi	73
4.5.2.3. EpCAM+/CD133+ Hepatik Kanser Kök Hücremsi Alt Grubun Karakterizasyonu	75
4.5.2.3.1. EpCAM+/CD133+ Grubun Pluripotensi Gen Ekspresyonları	75
4.5.2.3.2. EpCAM+/CD133+ Grubun Biyolojik Karakterizasyonu	76
4.6. Lityumun EpCAM+/CD133+ Hepatik Kanser Kök Hücremsi Gruba Etkisi	79
5.TARTIŞMA.....	83
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	88
KAYNAKLAR.....	110

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Kullanılan plazmitler ve kullanım amaçları.....	29
Tablo 2. PCR reaksiyonlarında kullanılan spesifik primerler ve özellikleri.....	33
Tablo 3. Kullanılan antikorlar ve özellikleri.....	39
Tablo 4. Araştırma planı.....	44
Tablo 5. Mikrodizin analizinde HuH-7 hücrelerinde lityum uygulanmasıyla 5 kat ve üzeri değişim göstermiş genlerin listesi.....	53
Tablo 6. HuH-7 da lityum etkisiyle anlamlı düzeyde etkilenen KEGG yolları(p<0.05) ve bu yollarla ilişkili genlerin listesi.....	56
Tablo 7. Gen setine ait 3 ayrı sınıftaki istatistiksel açıdan anlamlı GO terimleri ile seviyeleri ve bu terimlerle ilişkili gen sayıları ile olasılık değerleri.....	58
Tablo 8. HuH-7 ve literatürdeki diğer çalışmalarda kullanılan modellerde lityumun ortak hedef genlerin listesi.....	60
Tablo 9. Mikrodizin analizinde HuH-7 hücrelerinde LiCl uygulanmasıyla değişen genlerin içerisinde Tcf/Lef bağlanma bölgesi içeren genlerin listesi.....	62

SEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Lityumun GSK3 β fosforilasyonuna ve Wnt/ β -katenin sinyaline etkisi	7
Şekil 2. Lityumun Wnt/ β -katenin ve PI3K sinyal yolağına etkisi.	9
Şekil 3. HCC oluşumunda histopatolojik ve moleküler değişiklikler.....	12
Şekil 4. HCC oluşumunda etiyolojik faktörlerin karaciğer kanseri kök hücrelerini aktifleşmesi	10
Şekil 5. HCC'nin moleküler patojenezinin şematik özeti.....	14
Şekil 6. Differansiye karaciğer hücresinden veya hepatik kök hücreden HpKKK'lerin türevlenmesi	16
Şekil 7. Karaciğer progenitör hücrelerinden kanser kök hücreye geçişte değişen sinyal yolları	17
Şekil 8. Hepatik kanser kök hücrelerin farklılaşma basamaklarında kendini yenileme ve tümörojenik potansiyellerinin değişimi	22
Şekil 9. HCC hücre hatlarında 20 mM LiCl'ün farklı meydana getirdiği proliferasyon inhibisyonunu.....	47
Şekil 10. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl'ün 48 saatte meydana getirdiği proliferasyon inhibisyonu.....	48
Şekil 11. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl'ün meydana getirdiği proliferasyon inhibisyonunun zamana bağımlı değişimi.....	48
Şekil 12. . HuH-7 hücrelerinde 48 saat 20 mM LiCl uygulamasının hücrelerinde meydana getirdiği gerçek zamanlı hücre adezyon farklılıkları	49
Şekil 13. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl'ün 24 saatlik hücre motilitesi ve invazyonu üzerine etkisi etkisi.....	50
Şekil 14. Lityumun HuH-7 hücrelerinde Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesi üzerindeki doz bağımlı etkisi	51
Şekil 15. Lityumun HuH-7'da Wnt/ β -katenin sinyal yolağında yarattığı etkiler	52
Şekil 16. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl bağımlı gen ekspresyon değişimlerinin RT-PCR ile doğrulanması.....	63

Şekil 17. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl bağımlı değişim gösteren AXIN2, EPHA5 genlerinin gerçek zamanlı PCR ile doğrulanması	64
Şekil 18. Lityumun Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesini değiştirdiği koşullarda LGR5 protein ve transkript seviyesindeki artış.....	65
Şekil 19. Bazal koşullarda farklı HCC hücre hatlarında LGR5 transkripsiyonu	65
Şekil 20. HuH-7, Hep3B, PLC/PRF/5 ve Hep G2 hücre hatlarında lityumun LGR5 ekspresyonu ve Wnt sinyal yolağı üzerine etkisi	67
Şekil 21. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl, rekombinant Wnt-3a ve Δ NTCF, BCAT ve de Δ N AXIN plazmitleriyle özgül olarak düzenlenen Wnt/ β -katenin sinyal yolağının LGR5 ekspresyonuna etkisi	69
Şekil 22. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl'ün hepatik kanser kök hücre belirteçlerinin ekspresyonuna transkript ve protein düzeyinde etkisi	70
Şekil 23. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl'ün hepatik kanser kök hücre belirteçlerinin transkript ve protein düzeyinde ekspresyona etkisi.....	71
Şekil 24. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl'ün hepatik farklılaşma belirteçlerinin transkript ve protein düzeyinde ekspresyonuna etkisi	71
Şekil 25. HuH-7 hücrelerinde EpCAM proteini taşıyan hücre altpopulasyon oranı.....	72
Şekil 26. HuH-7 hücrelerinde EpCAM ve CK-19 proteinlerinin aynı hücrelerde birlikte lokalizasyonu.....	73
Şekil 27. Parental hücre HuH-7'nin ve MACS sonrası elde edilen <i>EpCAM</i> ⁺ / <i>CD133</i> ⁺ , <i>EpCAM</i> ⁻ / <i>CD133</i> ⁻ alt populasyonlarının flow sitometride <i>CD133</i> ve <i>EpCAM</i> oranlarının belirlenmesi (flow sitometri). ..	74
Şekil 28. <i>EpCAM</i> ⁺ / <i>CD133</i> ⁺ ve <i>EpCAM</i> ⁻ / <i>CD133</i> ⁻ hücrelerde transkripsiyon düzeyinde pluripotensi gen ekspresyonları	75
Şekil 29. <i>EpCAM</i> ⁺ / <i>CD133</i> ⁺ hücrelerin lityum uygulanmış HuH-7 hücrelere olan benzerliği.	76
Şekil 30. <i>EpCAM</i> ⁺ / <i>CD133</i> ⁺ ve <i>EpCAM</i> ⁻ / <i>CD133</i> ⁻ hücrelerinde gerçek zamanlı hücre adezyonu	77
Şekil 31. <i>EpCAM</i> ⁺ / <i>CD133</i> ⁺ , <i>EpCAM</i> ⁻ / <i>CD133</i> ⁻ hücrelerde 48 saatlik gerçek zamanlı ve son nokta proliferasyon farkları	77

Şekil 32. <i>EpCAM+/CD133+</i> , <i>EpCAM-/CD133-</i> hücrelerin 24 saatlik motiliteleri.....	78
Şekil 33. <i>EpCAM+/CD133+</i> , <i>EpCAM-/CD133-</i> hücrelerin 24 saatlik invazyonları	78
Şekil 34. <i>EpCAM+/CD133+</i> ve <i>EpCAM-/CD133-</i> hücrelerin lityum uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda oluşturduğu morfolojik değişim	79
Şekil 35. <i>EpCAM+/CD133+</i> , <i>EpCAM-/CD133-</i> hücrelerde lityumun adezyon üzerine 9 saatlik etkisi	80
Şekil 36. <i>EpCAM+/CD133+</i> , <i>EpCAM-/CD133-</i> hücrelerde lityumun 48 saatlik gerçek zamanlı proliferasyon üzerine etkisi	80
Şekil 37. <i>EpCAM+/CD133+</i> , <i>EpCAM-/CD133-</i> hücrelerde lityumun 24 saatlik hücre motilitesi üzerine etkisi.....	81
Şekil 38. <i>EpCAM+/CD133+</i> , <i>EpCAM-/CD133-</i> hücrelerde lityumun 24 saatlik hücre invazyonu üzerine etkisi	82

KISALTMALAR

ALDH: Aldehit Dehidrogenaz

AFP: Alfa Fetoprotein (Alpha-feto protein)

APC: Adenomatous Polyposis Coli

ATP: Adenozin Trifosfat

BSA: Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin)

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

CDK: Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin Dependent Kinase)

EGFR: Epidermal Büyüme Faktör Reseptör

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

EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule

FBS: Fötal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)

FoxO1: Forkhead box O1

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)

HpKKH: Hepatik Kanser Kök Hücre(Hepatic Cancer Stem Cell)

GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 beta

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

IMPase: İnozitol monofosfataz

İPKK: İndüklenebilen pluripotent kök hücreler

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LGR5: Lösence 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)

MMP: Matriks Metalloproteinaz (Matrix-Metalloproteinase)

MH-HCC: Mature hepatosit benzeri HCC

NaF: Sodyum Florid (Sodium Fluoride)

NaCl: Sodyum Klorid (Sodium Chloride)

Na₃VO₄: Sodyum Orto-vanadat (Sodium Ortho-vanadate)

OD: Optik densite

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz (Phosphate Buffered Saline)

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

PIP₂: Fosfatidil inozitol İki fosfat

PIP₃: Fosfatidil inozitol üç fosfat

PKB: protein kinaz B

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)

PVDF: Poliviniliden Diflorid (Poly-vinylidene fluoride)

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)

TNF: Tümör Nekrozis Faktörü (Tumour Necrosis Factor)

TERT: Telomerase Reverse Transcriptase

VEGF: Vaskular Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

GO: Gene Ontology

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans ve Doktora öğrenimim boyunca yaptığı her türlü katkıdan dolayı danışmanım Doç. Dr. Esra Erdal'a ve Prof. Dr. Neşe Atabey'e, öğrenimim boyunca bilgi birikimime katkıda bulunan tüm hocalarıma, tezin biyoinformatik analizlerinde hiç yardımını esirgemeyen Gökan Karakülah'a ama hepsinden önce beni eğittikleri için anne ve babama teşekkürü bir borç biliyorum.

ÖZET

Hepatosellüler Karsinoma Hücrelerinde Lityumun Genom Düzeyine Etkileri

İmge KUNTER, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı-İzmir, Türkiye, imge_kunter@yahoo.com

Hepatosellüler karsinoma (HCC) dünyada ölümle sonuçlanan kanser türleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda, hepatik kanser kök hücrelerin de (HpKKH) hepatokarsinogenezden sorumlu olabileceğini bildirilmiştir.

Çalışmamızda lityumun HuH-7 hücrelerinde transkriptoma, biyolojik yanıtlara ve HpKKH'lere etkisi araştırıldı.

HCC hücre hatlarında proliferasyon inhibisyonu yaratan lityum, HuH-7 hücrelerinde adezyonu azaltırken motilite ve invazyonu artırdı.

Yapılan transkriptome analizlerinde, lityumun değiştirdiği genlerin büyük kısmının metabolizma ve hücre döngüsüyle ilişkili olduğu ortaya kondu. Aynı zamanda lityumun pluripotensi ile farklılaşma genleri üzerinde yarattığı etki ve yönlendirdiği biyolojik davranışlar, hücrelere daha az farklılaşmış daha pluripotent bir fenotip kazandırdığını gösterdi.

Bunun yanında çalışmalarımızın sonunda, kolon kanser kök hücreleri markeri olarak bilinen *LGR5*'in, HCC'de bir Wnt/b-katenin hedef geni ve bir kanser kök hücre belirteci olduğu belirlendi.

Yine çalışmalarımızda, EpCAM ve CD133 yüzey molekülleri kullanarak HuH-7 hücreleri içerisinden ayrımlanan hepatik kanser kök hücrelerde (HpKKH), *OCT-4*, *KLF4*, *MYC* ve *SOX2* pluripotensi genlerinin daha yüksek düzeyde eksprese edildiğini gösterdi.

Bununla birlikte, *EpCAM*+/ *CD133*+ HpKKH'lerin, morfolojik ve davranışsal olarak lityuma maruz kalmış hücrelere benzediği ortaya kondu. Aynı zamanda bu hücrelerin *EpCAM*-/ *CD133*- hücrelere göre daha az proliferatif, daha az adeziv ve daha motil karakterde olduğu bulundu. Lityumun HpKKH'ler üzerinde etkisini araştırdığında, *EpCAM*-/ *CD133*- hücrelerin proliferasyon ve adezyon davranışları bakımından parental HuH-7 hücreleri gibi lityuma duyarlı

olduğunu, buna karşın *EpCAM*+/*CD133*+ HpKKH'lerdeki adezyon, proliferasyon ve motilite gibi biyolojik davranışların lityuma yanıt olarak etkilenmediği görüldü.

Tüm verilerimiz bir arada değerlendirildiğinde, Wnt/b-katenin yolağının HpKKH karakterini ve metabolizmasını yeniden programladığı ve geliştirilecek tedavi stratejilerinde hedef alınması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler; HCC, Lityum, HpKKH, Wnt/b-katenin sinyal yolağı

ABSTRACT

Genome Wide Effects of Lithium on Hepatocellular Carcinoma Cells

İmge KUNTER, Dokuz Eylul University, School of Medicine, Dept. of Medical Biology,
İnciralti-Izmir, Turkey, imge_kunter@yahoo.com

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third most common cause of cancer mortality worldwide. Many studies have reported that hepatic stem cells are responsible for hepatocarcinogenesis.

In this study, we did a thorough investigation to find out the genome wide and biological effects of lithium on Huh-7 cell line.

Lithium caused proliferation inhibition on HCC cell lines, also reduced adhesion, increased motility and invasion in HuH-7 cells.

The transcriptome analysis revealed the majority of lithium regulated genes related to metabolism and cell cycle.

Importantly, effect of lithium on genes related to pluripotency and differentiation and the motility/invasion assays indicated that lithium treated cells gained a more pluripotent phenotype.

We prove that *LGR5* is a target gene of Wnt/b-catenin signalling in HCC which is known colon cancer stem cell marker.

In addition, with using EpCAM and CD133 surface markers, we isolated HpCSC's from HuH-7 cell line and showed that this subpopulation have high pluripotency genes compared to the cells without these markers. Besides, we observed that EpCAM+/CD133+ cells were act similar to lithium treated cells. In this regard, EpCAM+/CD133+ cells were less proliferative and adhesive also more motile than EpCAM-/CD133- cells. We show that the EpCAM-/CD133- cells were sensitive to lithium similar to HuH-7 parental cells, whereas proliferation, motility and adhesion behavior of *EpCAM+/CD133+* cells did not effected by lithium.

Our study indicated that Wnt/b-catenin pathway effect metabolism and reprogrammed HpCSC-like properties and it is of great importance that this is considered when developing new therapeutic strategies.

Key Words; HCC, Lithium, HpCSC, Wnt/b-catenin signalling pathway

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğerin malign neoplazilerinin % 90'ından sorumlu olan hepatosellüler karsinoma (HCC), tüm dünyada yetişkinlerde gözlenen kanserlerin %5,9'unu oluşturmaktadır ^{1, 2}. HCC gelişimine katkıda bulunan önemli etiyolojik faktörler; viral enfeksiyonlar, aşırı alkol tüketimi, çevresel kansinojenler, hemokromatozis ve son yıllarda kabul gören alkolsüz steatohepatit olarak tanımlanan insülin direnci ile ilişkili metabolik hastalıklardır ^{3, 4, 5}. Henüz HCC patogenezi ve mekanizması tam olarak anlaşılmamış ve hepatokarsinogenez sürecinde tümör büyümesini tetikleyen kontrolsüz biyolojik davranış etkenlerinin tam olarak neler olduğu aydınlatılmamıştır. HCC tanısının geç konulabilmesi, prognozunun kötü seyretmesi, kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olması nedeniyle hastaların çok azında küratif tedavi uygulanabilmektedir ⁶. Bu nedenle erken tanı ve de tedavi stratejilerinin oluşturulabilmesi için hem hepatokarsinogenez hem de ileri evrelerde tümör sağ kalımı için gerekli moleküler basamakların anlaşılması çok önemlidir.

Hepatokarsinogenez için temelde iki mekanizma önerilmektedir. Bunlardan biri farklılaşmış bir karaciğer hücresinin tümorojenik mutasyonların ardından seçilime uğraması ve bu seçim boyunca ek mutasyonlar kazanarak heterojen kanser hücrelerine dönüşmesini kabul eden stokastik modeldir. Diğeri ise karaciğer kök hücrelerinin tümörojenik mutasyonlar kazanarak tümör içerisinde, tümör kitlesinin devamlılığını sağlayan, küçük bir populasyon olan karaciğer kanseri kök hücrelerine dönüşmesini kabul eden kanser kök hücre modelidir. Bu karaciğer kanseri kök hücrelerinden köken alan hücreler tümör içerisinde çeşitli farklılaşma seviyelerine sahiptirler. Son yıllarda çeşitli solid tümörlerde gösterildiği gibi, karaciğer kanserinde de; gelişim, metastaz ve ilaç dirençliliği basamaklarında, hepatik kanser kök hücrelerin (HpKKH) rol oynadığı kabul görmüştür ^{6, 7, 8, 9}.

HpKKH'lerde birçok sinyal iletim yolağı yeniden düzenlenmektedir. Bu yolakların en önemlilerinden biri, Wnt/ β -katenin yolağıdır. Wnt/ β -katenin yolağının; birçok doku tipinde embriyonel gelişimde, kök hücrelerin kendi kendini yenileyebilme ve farklılaşma basamaklarında görev aldığı, bunun yanında, HCC'de hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozda önemli rolleri olduğu bilinmektedir ^{10, 11, 12, 13, 14}. Fakat HCC dokularının büyük bir kısmında Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonuna rastlanmakla birlikte, bu yolakla ilgili bilinen mutasyonlar ve

epigenetik değişiklikler bu artışı açıklayabilmekte yetersizdir. Bu durumda HCC'de Wnt/ β -katenin yolağının ne gibi proseslerde rol oynadığı ve nasıl regüle edildiği incelenmelidir.

Bipolar bozuklukların tedavisinde uzun yıllardır kullanılan lityumun GSK3 β ve IP3K inhibisyonu yaratarak Wnt/ β -katenin ve Akt sinyal yolaklarını kontrol ettiği bilinmektedir. 2005 yılında “*International Journal of Cancer*” dergisinde yayınlanan çalışmamızda lityumun Wnt/ β -katenin sinyal yolağını aktive etmesine rağmen, beklenilenin tersine, HCC hücre hatlarında proliferasyon inhibisyonu yarattığı gösterildi ¹⁵. Lityumun Wnt/ β -katenin sinyal yolağını aktive ettiği de gösterilmiş olmasına rağmen hücre proliferasyonunun baskılaması oldukça ilginçtir. Bu çalışmanın hedeflerinden birisi, lityumun proliferasyon inhibisyon yarattığı bir HCC hücre hattı olan HuH-7’de, genom düzeyinde meydana gelen ekspresyon değişikliklerinin mikrodizin yöntemiyle global olarak incelenmesidir.

Çalışmanın bir diğer amacı ise beklenmedik etki yaratan lityumun sinyal yolakları ve çeşitli biyolojik davranışlar üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda lityumun bilinmeyen biyolojik etkileri ve hedef genlerini aydınlatması amaçlanmıştır.

Son olarak bu çalışmada, lityumun genom ve de HpKKH’ler üzerinde etkisinin ne olduğu araştırılacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Lityum Klorür ve Etkileri

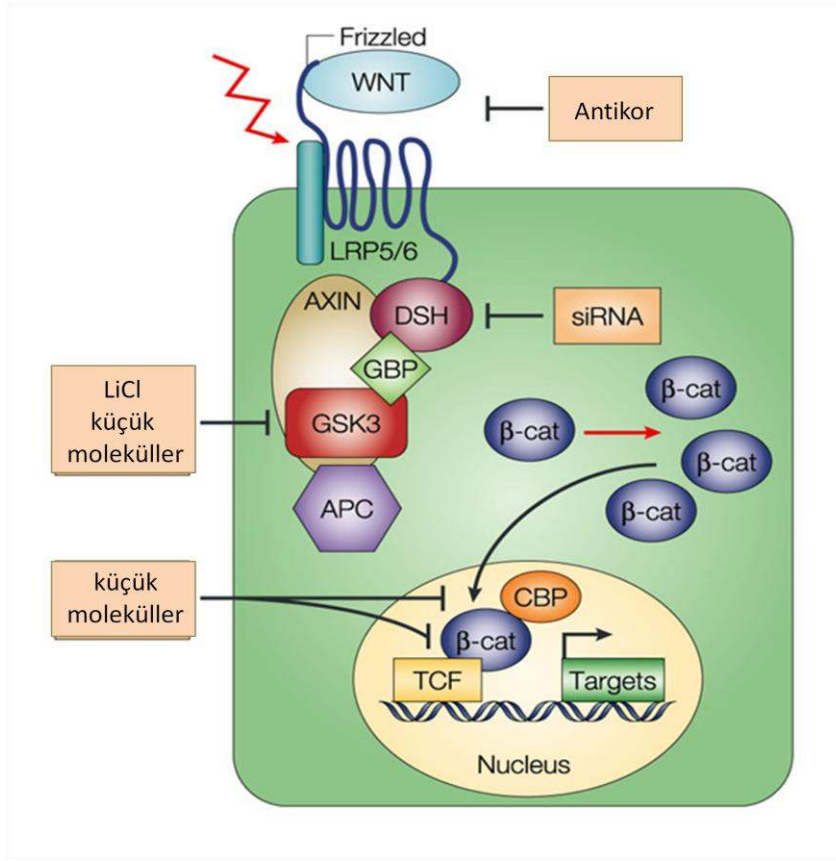
2.1.1. Lityum Klorürün Genel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Lityum klasik bir duygudurum bozukluğu olan bipolar bozukluk ve diğer ruhsal bozuklukların klinik tedavisinde yarım yüzyıldan uzun bir süredir kullanılan monovalent inorganik bir iyondur ^{16, 17}. Lityumun hedef paneli üzerindeki molekülerin çoğunluğu glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3 α , GSK3 β), protein kinaz B (PKB) ve inozitol monofosfataz (IMPase), gibi metal bağımlı enzimlerdir ^{18, 19, 20, 21}. Genellikle mental bozuklukların tedavisinde kullanılıyor olmasına rağmen, sinir hücrelerinin korunması ve iletişimlerinde ve de farklı hücrelerde çeşitli gelişim basamaklarında etkileri mevcuttur. Lityum birçok moleküler araştırmacı tarafından farklı modellerde Wnt sinyal yolağının indükleyici ajanı olarak kullanılmıştır ^{9, 22, 23}.

2.1.2. Lityumun GSK3 β Üzerine Etkisi

Günümüze kadar yüksek bir evrimsel korunmuşlukla gelen, gelişim ve farklılaşma, büyüme ve sağkalım, kemostas ve metabolizma ile glikojen sentezinde görevli GSK3 β , lityumun en temel hedeflerinden birisidir ²⁴. GSK3 β 'nin hatalı düzenlenmesi, diyabet, onkojenez ve nörodejenerasyon gibi birçok klinik durum ile ilişkili olmuştur. Biyokimyasal analizler, bir Ser/Thr protein kinaz olan GSK3 β 'nin maksimum aktivite ile çalışabilmesi için yüksek konsantrasyonlarda (~20 mM) Mg²⁺ iyonuna ihtiyaç duyduğunu ve bu magnezyum bağımlılığının lityum ile yarıştığını göstermiştir. GSK3 β 'nin substratı ve ATP miktarı göz önüne alındığında lityum rekabetçi olmayan bir inhibitördür. GSK3 β 'nin lityum sensitivitesi bütün kinazlarda olan Mg²⁺-ATP bağlanma bölgesinin dışında bir Mg²⁺ bağlanma bölgesi üzerinden gerçekleşir. GSK-3 β 'nin lityuma duyarlı tek kinaz olması bu kavramla uyumludur ²⁵.

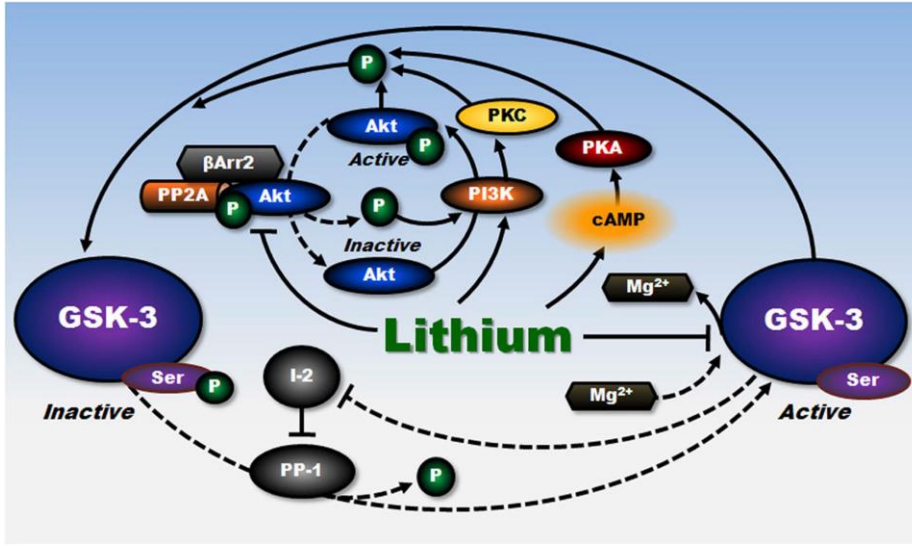
Lityumun etkisi ile GSK3 β 'nin Ser-9 ve Ser-21 inhibitör fosforile formları artarak, aktivitesi inhibe olur. Lityum etkisine bağlı olarak inhibe olan GSK3 β , Wnt ailesi üyelerinin yarattığı etkiye benzer şekilde, β -kateninin hücre içi birikimini sağlayarak kanonikal Wnt sinyalinin açılmasını sağlar (Şekil 1) ²⁶.



Şekil 1. Lityumun GSK3β fosforilasyonuna ve Wnt/β-katenin sinyaline etkisi ²⁶

2.1.3. Lityumun IMP Üzerine Etkisi

Lityumun hedef aldığı başlıca enzimlerden bir diğeri de, inozitolmonofosfatın defosforile olup fosfatidil inozitola dönüşmesini ve de çeşitli sinyallerde görevli inozitol halkalarının oluşmasını sağlayan inozitolmonofosfataz (IMPase) enzimidir. $PI(4,5)P_2$, (PIP_2) , $PI(3,4,5)P_3$ (PIP_3) inozitol halkaları genellikle membran trafiğinden sorumlu ve lityum en çok etkilediği lipidlerdir ^{27, 28, 29}. Lityumun kültüre hücrelerin PIP_3 ve Ca^{2+} seviyelerini düşürdüğü bilinmektedir ³⁰. PIP_3 hücre büyümesi, sağkalım ve kemotaksis dahil olmak üzere pek çok önemli süreçte rol oynayan lipittir. Lityumun $PI3K/Akt$ sinyali üzerindeki etkisi hücre ve durum spesifik olarak iki yönlü olabilmektedir. Lityum etkisi ile PIP_3 ün azaltılması $PI3K/Akt$ sinyal yolağında inhibisyona neden olmaktadır ^{31, 32, 33}.



Şekil 2. Lityumun Wnt/β-katenin ve PI3K sinyal yolağına etkisi (şematik gösterim) ⁴¹

2.1.4. Lityumun Farklı Kanseri Modellerinde Etkileri

Çeşitli araştırmalarda, lityumun; glioma, keratinosit, kolorektal kanser, meduloblastoma ve düz kas gibi çeşitli kanser ve normal hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir ^{15, 34, 35, 36, 37}. Akciğer, prostat gibi çeşitli kanser türlerinde ise kemoterapötiklerin etkinliğini artırdıkları gözlenmiştir ^{38, 39}. Hatta mental rahatsızlığı bulunan hastalarda lityumun koruyucu etkisinden dolayı genel kanser prevalansının daha düşük olduğu öne sürülmüştür ⁴⁰. Bununla birlikte özellikle beyin bölgesinde kemoterapi veya radyoterapi sonrasında oluşan hasarın önüne geçilmesi veya giderilmesi için lityum kullanımını öneren araştırmacılar da mevcuttur ⁴¹. Lityumun moleküler seviyede Wnt/β-katenin, TNF, FASL, p53, Akt gibi kanserle ilişkili genleri düzenleyerek kanser hücrelerinde büyüme ve tümörojeniteyi baskıladığı düşünülmektedir ^{42,35, 36, 43, 44}.

2.1.5. Lityumun Pluripotensi Üzerine Etkileri

İnsan ve fare somatik hücrelerinde, pluripotensiye indükleyen spesifik genlerin (*OCT-4*, *SOX-2*, *KLF4*, *c-MYC*, *NANOG*, *LIN28*) aşırı eksprese edilmesi ile embriyonik kök hücre benzeri klonlara döndürülebilen hücrelere, indüklenebilen pluripotent kök hücreler denilir (iPKK) ^{45, 46}. 2013 yılı Nobel ödülü alan bu çalışmada ortaya çıkan devrim niteliğindeki bilgi terminal

differentiye bir hücrenin, en baş formu olan farklılaşmamış embriyonik kök hücre fenotipine dönüştürülebilir olması idi. Yine yeni yayınlanan bir çalışmada lityumun iPKK oluşumunu büyük oranda kolaylaştırdığı gösterilmiştir ⁴⁷. Lityum bu etkisinin büyük kısmını en önemli hedefi olan GSK3β'dan bağımsız şekilde *OCT-4* *SOX2* ve *KLF4* genlerinin artışıyla sağlayarak gerçekleştirmiştir. Diğer GSK3β inhibitörlerinden farklı olarak lityum sadece *NANOG* ekspresyonunu değil transkripsiyonel aktivitesini de artırmıştır. Ayrıca bu çalışmada, lityumun etkisini, histon 3'ün lizin 4 rezidüsüne (H3K4-) spesifik bir histon demetilaz yardımıyla gösterdiği ve lityumun etkisini bir epigenetik regülasyon aracılığıyla gerçekleştirdiği düşünülmüştür ⁴⁷. Ayrıca bizim çalışmalarımızda lityumun H3K27me3, H3K27me4, H3K36me1, H3K9me3 gibi histon modifikasyonlarına sebep olduğu gözlenmiştir (Avcı S.T.).

2.1.6. Lityumun Farklı Hayvan Modelleri Ve Dokularda Genom Düzeyindeki Etkileri

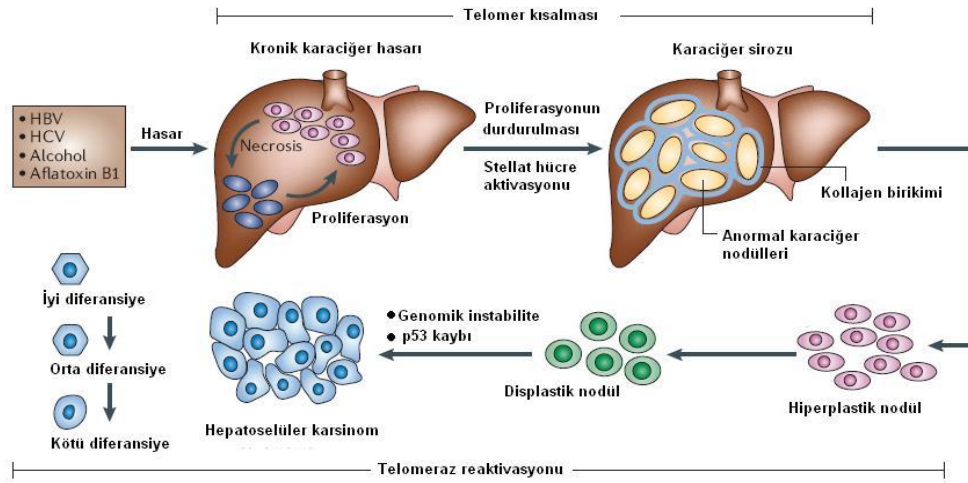
Lityumun global olarak gen ekspresyonu üzerine yaptığı değişikliklerin anlaşılması için, birçok araştırmacı, farklı modellerde, mikrodizin yöntemi ile lityumun genom düzeyinde yarattığı etkileri aydınlatmaya çalışmıştır. Bu çalışmalar lityumun farklı doz ve sürelerde sistemik olarak verilmesiyle; *Drosophila* kafalarında ⁴⁸, sıçan böbreklerinde ⁴⁹, fare nöronlarında ⁵⁰ ve beyinde ^{51, 52, 53}, sıçan amigladasında ⁵⁴ yapılmış ve genom düzeyindeki etki mikrodizin yöntemiyle incelenmiştir. Fakat literatürde, lityumun insan karaciğer veya HCC hücreleri üzerinde genom düzeyinde etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Grubumuzun daha önceki çalışmasında lityumun β-katenin birikimi ve Tcf/Lef aktivitesinde artış sağlamakla birlikte dokuz farklı HCC hücre dizisinin proliferasyonunu farklı seviyelerde durdurduğunu gösterilmiştir. Lityumun HCC hücreleri üzerinde spesifik moleküller taranarak etkisini aydınlatmaya çalışan bizim çalışmamız dışında tek bir çalışma vardır ^{16, 55}. Bu çalışmada, lityum bir HCC hücre hattı olan SMMC-7721 hücrelerinde G2/M arresti yapmakla birlikte GSK3β aktivasyonunu ve IMP havuzunu etkilememiştir. Bizim çalışmamızda, lityum uygulanması sonucu en yüksek proliferasyon inhibisyonu yanıtını veren HuH-7 hücreleri kullanılarak mikrodizin çalışması yapılmış ve lityumun bu hücrelerde genom düzeyinde yarattığı etkiler araştırılmıştır.

2.2. Hepatoselüler Karsinoma

Hepatoselüler karsinoma, çoğu zaman sirotik karaciğer zemininde, küçük hücreli yüksek dereceli displastik nodüllerden gelişen, karaciğerin malin neoplazilerlerinin sık rastlanan biçimidir ^{1, 2, 56}. 2008 yılı GLOBOCAN projesi verilerine göre; yetişkin erkekler arasında 523,000 yeni vaka ile ve toplam kanser vakaların %7.9 unu, kadınlar arasında 226,000 yeni vaka ve toplam kanser vakalarının %6,5 ini oluşturarak, dünyada 5. sıklıkta rastlanan kanser türü olmuştur. Ölüm insidansı çok yüksek olan HCC (0,93 genel örüm oranı) dünya çapında kanserlerden ölümler arasında 3. sıraya yükselmiştir. Özellikle Doğu ve Güneydoğu Asya ile Orta ve Batı Afrika yüksek insidansla Güney Avrupa dışındaki gelişmiş bölgelerde ise daha düşük insidansla rastlanması etiyolojik faktörlerle bağlantılıdır.

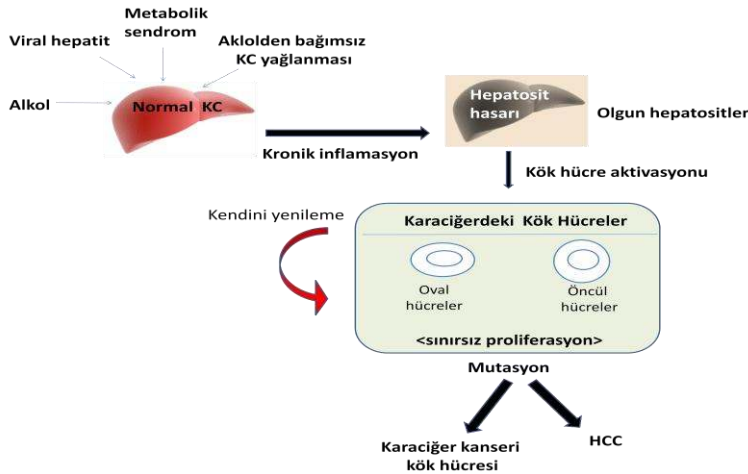
HCC tanısının geç konulabilmesi, prognozunun kötü seyretmesi, kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olması hastaların çok azında küratif tedavinin uygulanabilir olmasını sağlamaktadır ⁵⁷. Bu nedenle erken tanı ve de tedavi stratejilerinin oluşturulabilmesi için hem hepatokarsinogenez hem de ileri evrelerde tümör sağ kalımı için gerekli moleküler basamakların anlaşılması çok önemlidir.

Hepatokarsinogenez için temelde iki mekanizma önerilmektedir. Bunlardan biri farklılaşmış bir karaciğer hücresinin çoğalmasını sağlayan genetik ve epigenetik değişimlerin ardından hücrelerin seçilime uğraması ve bu seçim boyunca ek mutasyonlar kazanarak heterojen kanser hücrelerine dönüşmesini kabul eden stokastik modeldir. Bu teoride hepatositlerin aşırı mitotik olması telomeraz ekspresyonu artmış, mikrosatellit instabilitesi olan, kromozomal ve gen düzeyinde yapısal dengesizlikler içeren monoklonal bir popülasyonun artmasını sağlamaktadır. Bu şekilde odaklar ve nodüller oluşturan displastik hepatositlerde, geri dönüşümsüz yapısal değişimler birikmektedir. Bu birikimlerin malignant fenotipi artırıp, HCC'ye doğru hücresel değişimi yönlendirdiği düşünülmektedir (Şekil 3). Bu teoride HCC'nin farklı histopatolojik alt türlerinin ise farklı düzenleyici yollarla ilgili genlerin yapı ve işlevlerinin bozulmasıyla ilgili olduğuna inanılmaktadır ^{58, 59}.



Şekil 3. HCC oluşumunda histopatolojik ve moleküler değişiklikler ⁶⁰

Hepatokarsinogenez için önerilen diğer mekanizma ise karaciğer kök hücrelerinin tümörojenik mutasyonlar kazanarak tümör içerisinde küçük bir popülasyon olan karaciğer kanseri kök hücrelerine dönüştüğünü savunan modeldir. Kanser kök hücre modelinde tümör içerisinde çeşitli farklılaşma seviyelerine sahip hücrelerin kanser kök hücrelerden köken aldığı düşünülmektedir ⁶¹. Normal hepatositten kanser hücresine geçişte hücrenin kazanmış olması gereken, ilaç dirençliliği, sınırsız proliferasyon yeteneği, kendini yenileyebilme gibi birçok işlevin halihazırda hepatik kök hücrelerde mevcut olması bu teoriyi desteklemektedir (Şekil 4).



Şekil 4. HCC oluşumunda etiyolojik faktörlerin karaciğer kanseri kök hücrelerini aktifleşmesi

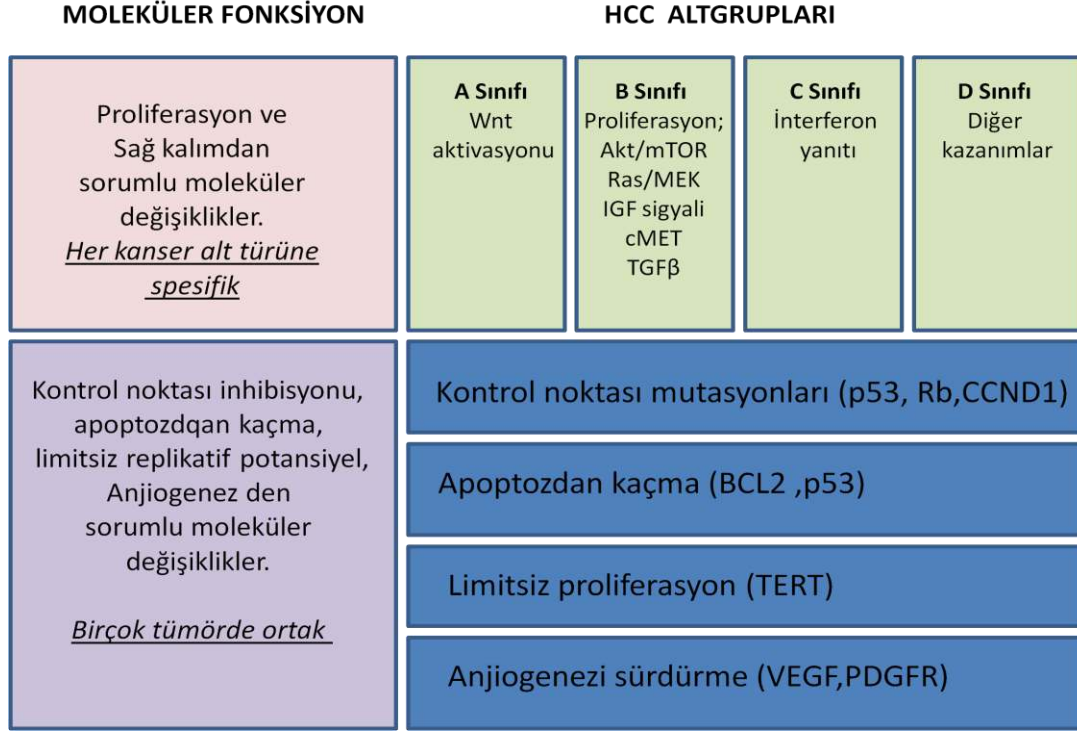
2.2.1. HCC Etiyolojisi

HCC doku ve hücre hatlarında mikrodizin gibi yeni teknolojilerle yapılan yüksek çözünürlüklü moleküler analizler hepatokarsinogenez sürecinin anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. Bu çalışmalar hepatokarsinogenez sürecinin genetik, epigenetik, viral ve çevresel faktörlerin bir kombinasyonuna bağlı olduğunu, son derece karmaşık ve heterojen olduğunu göstermektedir ⁶². HCC gelişimine katkıda bulunan önemli etiyolojik faktörler siroz, hepatit B(HBV), hepatit C (HCV), mycotoksin, aflatoksin, aşırı etanol tüketimi ve siroz oluşumuna yol açan diğer risk faktörleridir. Sigara kullanımı, aşırı demir alımı, kadınlarda uzun dönemli oral kontraseptif kullanımı, hemokromatoz ve son yıllarda kabul gören alkolsüz steatohepatit olarak tanımlanan insülin direnci ile ilişkili metabolik hastalıklar ise daha düşük sıklıkla HCC' ye neden olan minör risk faktörlerindendir ^{4, 63, 64}. Viral yollarla, aflatoksinle veya alkolle indüklenmiş hepatokarsinogenez sürecinde önemli olan temel basamaklar tüm karsinogenez süreçlerinde olduğu gibi hücreye yaşama avantajı kazandıran genetik ve epigenetik değişimlerdir. Bu değişimler hücreye limitsiz bölünme, apoptozdan kaçma, anjiogenez yapabilme özellikleri kazandırır.

2.2.2. HCC'de Genetik ve Epigenetik Değişiklikler

Yapılan çalışmalar hepatokarsinogenez sürecinin genetik, viral ve çevresel faktörlerle indüklenen son derece karmaşık ve heterojen bir süreç olduğunu göstermektedir ⁶⁵. HBV, HCV, aflatoksin ve kronik alkol alımı gibi hepatokarsinogenez sürecini indükleyebilen başlıca sebeplerin hepatokarsinogenez sürecinde yarattığı değişimler, önemli sinyal yollarıyla bağlantılı genlerin değişmesine sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda büyüme, hücre döngüsü, apoptoz, metastaz, sinyal iletimi, hücre döngüsü, metabolizma gibi çeşitli süreçte yer alan genlerin ekspresyon değişimleri bulunmuştur. HCC vakalarında kromozomal seviyede 1p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 13q, 16p, 17p bölgelerinde kayıplar gözlenirken, 1p, 6p, 8q, 17q bölgelerinde fazlalıklar tespit edilmiştir. HCC'de APC, p16INK4a, Rb, p53, β -katenin ve AXIN mutasyonları sıklıkla gözlenir. Bunun yanında E-kadherin, p15 gibi genlerin epigenetik olarak yeniden düzenlenmesine ve de daha az sıklıkla IGF-R, c-MYC ve c-MET'i aşırı eksprese edici mutasyonlarına rastlanmıştır ^{66, 67, 68}. Bu gibi anahtar moleküllerde meydana gelen değişimler

sayesinde DNA hasarında görev yapan p53 yolağı, hücre döngüsünde görev alan Rb yolağı, büyümede görev alan TGFβ yolağı, hücre-hücre adezyonunda ve sinyal iletiminde rol alan Wnt yolağı gibi sinyal yolları değişime uğramıştır ⁶⁹. Şekil 5.' te bu değişimler özetlenerek şematize edilmiştir.



Şekil 5. HCC'nin moleküler patojenezinin şematik özeti (Ref 108 den yararlanılarak çizilmiştir.)

2.3. Hepatik Kanser Kök Hücrelerin Hepatokarsinogenezdeki Rolü

Günümüzde tümörler içerisinde kendini yenileme yeteneği olan ve fenotipik olarak farklı tümör hücrelerine dönüşüp tümörögenezi yönlendiren nadir hücrelerin, kanser kök hücreler olduğu bilinmektedir. Hematolojik kanserlerde uzun yıllardır kanser kök hücre kavramı kabul görmektedir. Yapılan çalışmalarda beyin ^{70, 71} prostat ^{72,73}, akciğer ^{74, 75, 76} meme ⁷⁷, baş boyun ⁷⁸, pankreas ⁷⁹, kolon ^{80, 81}, melanoma ⁸² gibi farklı solid tümör modellerinde kanser kök hücrelerin varlığı kabul edilmektedir. Son yıllarda ise HCC gelişiminde ve ilerlemesinde birçok basamakta rol oynayan, HpKKH' lerin varlığı kabul görmüştür ^{6,83}.

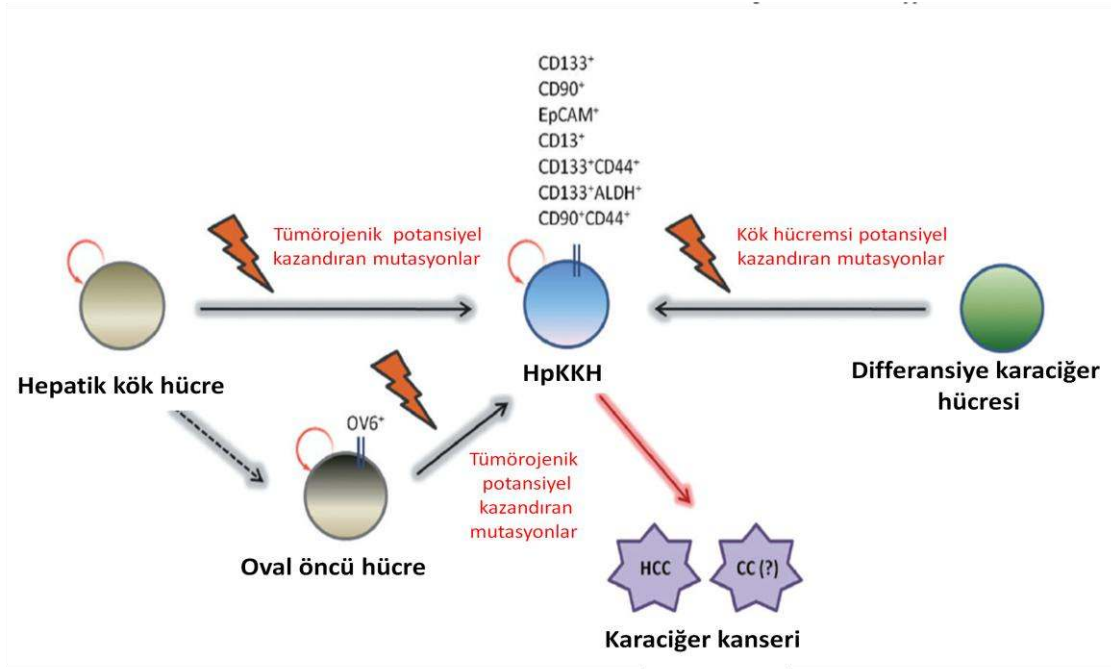
Temelde etiyolojik faktörlerin yol açtığı zedelenmenin onarılması için karaciğer yenilenme sürecine girer. Bu süreçte kronik karaciğer zedelenmesine rejeneratif yanıt olarak portal fibroblastlar, hepatositler ve hepatosit öncü hücreler sürekli çoğalarak hasar giderilmeye çalışılır ⁸⁴. Bu durumda karaciğer rezerv kök hücrelerinin aktiflendiği ve hasarın giderilmeye çalışıldığı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Bu süreçte hepatositler telomer kısalmasıyla birlikte senesense girdiğinden, aktifleşen öncü hücrelerinin mutasyonlara açık ve karsinogenez için aday hücreler haline geldiği gösterilmiştir ^{7,61}. Şekil 4. de etiyolojik faktörlerce hasar gören karaciğerdeki öncül hücre aktivasyonu şematik olarak gösterilmiştir.

HCC'de yüzey belirteçleri ve davranış biçimlerine göre kanser kök hücrelerini tanımlayıcı birçok çalışma mevcuttur. Son yıllarda tüm hücrelerinin yeniden oluşumunu sağlayabilecek kapasitede, heterojenite, tümör başlangıcı, metastaz, ilaç dirençliliğinden ve relapstan karaciğer kanser kök hücrelerinin sorumlu olduğu düşünülmekte ve bu konuyla ilgili birçok çalışma yapılmaktadır ^{61,85}. Bu çalışmalarda, insan karaciğerinde, farklı potansiyelde hepatik kök hücrelerin (HpKHHs) 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 epitelyal hücre adhezyon molekülü (EpCAM) ile alfa fetoprotein (AFP) statülerine dayanarak HCC'leri sınıflandırmışlardır ⁸⁶. Buna göre HCC dokularından izole edilen hücreler invaziv HCC oluşturabilecek hepatik kök hücremsi-HCC (HpKHH) ve yeniden HCC oluşturamayacak olgun hepatosit-HCC(MH-HCC) olarak sınıflandırılmıştır. HpKHH'lerin özellikle EpCAM ve AFP pozitif moleküllerini taşıdığı ve zayıf prognoz ve metastatik karakterle ilişkilendirildiğini gösterilmiştir ^{10, 87}. EpCAM'in direk Wnt/ β -katenin sinyal yolağı hedefi olmasının yanı sıra, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının embriyonik kök hücrelerin devamlılığında da rol oynaması kanser kök hücrelerin aktivasyonunda önde gelen sinyal yollarından biri olabileceğini düşündürmektedir.

Genellikle kanser kök hücreleri ve normal kök hücreler benzer moleküler belirteçler taşırlar. HCC hücre ve dokularında çoğunlukla normal karaciğer kök hücrelerinde de eksprese olan CD133 ^{88, 89} CD90 ⁹⁰, CD44 ⁶, EPCAM ^{78, 91} ALDH ⁹², ABCC2 ⁹³, AFP ^{19, 94, 95} ve CD13 ⁹⁶ gibi karaciğer kanseri kök hücre belirteçlerinin varlığı gösterilmiştir. Bu biyo belirteçler HCC'nin prognozunu tahmin etmede ve de spesifik hedefli terapiler oluşturmada oldukça önemlidir. Fakat

bütün bunlara rağmen HpKKH'leri daha yüksek spesifistede diğerlerinden ayıracak ve tanımlayacak belirteçler bulunması için yapılan çalışmalar yetersizdir. Doğru ve güvenilir olarak terapötikler tarafından hedeflenebilmeleri için karaciğer kanseri kök hücrelerinin, tüm moleküler imzasının spesifik olarak tanımlanması gerekmektedir. Bunun için moleküler olarak detaylı çalışmalara ve yeni belirteçlere ihtiyaç vardır.

HCC'nin köken aldığı HpKKH'lerin karaciğerdeki mevcut kök hücrelere tümörojenik potansiyel kazandıran mutasyonlarla veya olgun hepatositlere kök hücre benzeri potansiyel kazandıran mutasyonlarla oluşabildiği düşünülmektedir (Şekil 6) . Bu konuda henüz aydınlatılmamış birçok bilinmeyen mevcuttur.



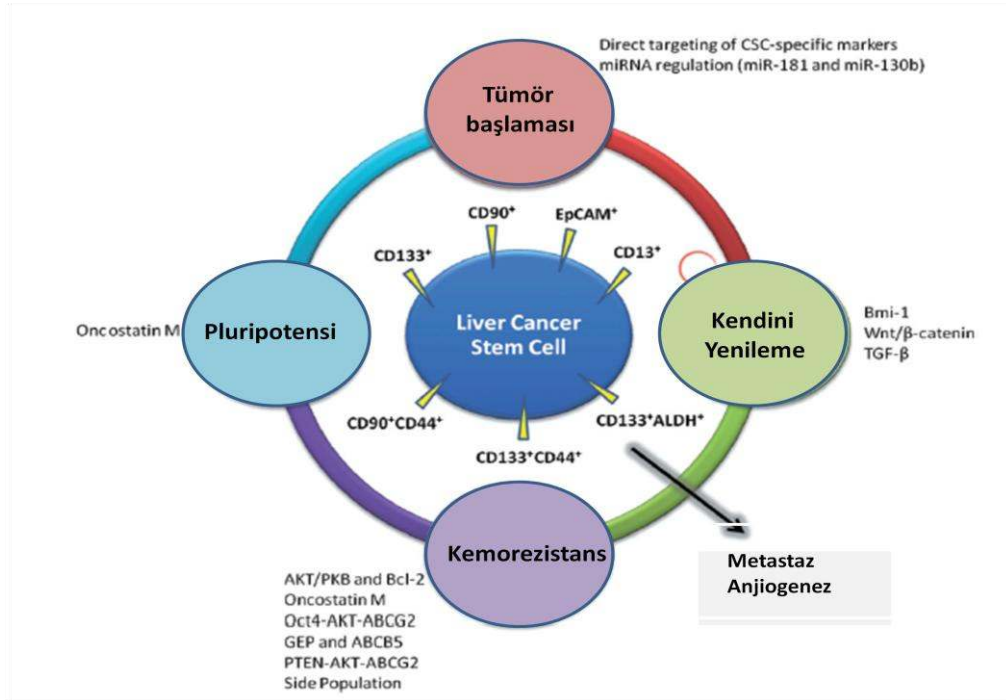
Şekil 6. Differansiye karaciğer hücrelerinden veya hepatik kök hücreden HpKKK'lerin türevlenmesi (6 nolu referanstan yararlanılmıştır)

Aynı zamanda tümör hücrelerine kök hücre benzeri potansiyel kazandıran bu davranışları, kök hücrelerde sıklıkla aktive olan Notch, Wnt ve TGFβ gibi sinyal yollarının düzenlediği düşünülmektedir. HpKKH'lerde de benzer yolların aktive oluşu kök hücrelerin noeplastik dönüşüm sürecinin hepatositlere göre daha az parametre ile başarılabılır olduğunu düşündürmektedir ⁹⁷. HpKKH'ler ile ilgili bilinmeyen birçok detay mevcuttur. HCC'nin erken

teşhisini ve tedavisi için, kesin hücre kökeni, moleküler genetiğini, hastalığın yüksek düzeyde agresif klinik sergilemesine sebep olan mekanizmaların ve de değişen sinyal yollarının anlaşılması önemlidir. HpKKK'lerinin, geriye kalan kanser hücrelerinin ve de karaciğer kök hücrelerinden farkının tam olarak anlaşılması HCC de tümör biyolojisini anlamak ve etkin terapiler oluşturmak açısından önemlidir.

2.3.1. HpKKK'lerde Değişen Sinyal Yolları

Embriyonel gelişim, organ hasarı onarımı ve doku yenilenmesi gibi fizyolojik durumlar çeşitli moleküler ile büyüme faktörü sinyallerin karmaşık bir denge içerisinde olmasını gerektirir. Bu sinyal yolları ve bileşenlerinin bozulması kanser oluşumunu sağlayan temel ilkelerdendir. Birçok kanser türünde olduğu gibi hepatokarsinogenez sürecinde de proliferasyon, apoptoza direnç, farklılaşma, kendini yenileme, pluripotensi, anjiyogenez ve ilaç dirençliliği gibi sinyal yollarında yeniden düzenlemeler gerçekleşmiştir. Sinyal yollarındaki bu değişimlerin progenitor hücrelerde gerçekleştiği bilgisi bugün literatürde kabul görmüştür (Şekil 7) ^{98, 10}.



Şekil 7. Karaciğer progenitor hücrelerinden kanser kök hücreye geçişte değişen sinyal yolları.

(6 nolu referanstan yararlanılmıştır)

HpKKK 'nin kendini yenileme ve tümörojenik kapasitesinin sürdürülmesinde Bmi-1^{99, 100} Wnt/ β -katenin¹⁰¹, Notch^{102, 103} ve Sonic Hedgehog¹⁰³ gibi birçok sinyal yolağı görev aldığı bilinmektedir (Şekil 3). Aynı zamanda TGF- β , IGF/IGF-1R, HGF/MET, Wnt/ β -katenin, Notch, Hedgehog ve TGF- α /EGFR gibi düzenleyici sinyal yolaklarının HCC'de HpKKH'lerin transformasyon, apoptoza direnç, proliferasyon ve invazyon karakterine katkı sağlayan anahtar rolleri olduğu bulunmuştur^{86, 104}.

2.3.1.1. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı

Wnt/ β -katenin sinyal yolağı embriyo gelişimi sırasında hücre kaderinin belirlenmesinde anahtar roller oynar. Aynı zamanda proliferasyon, kendini yenileme, hücre hücre bağlantısı, motilite, farklılaşma kök hücre karakteri, tümorogenez ve epitelyal-mezenşimal dönüşüm gibi süreçlerde önemli rolleri bulunan bir sinyal yolağıdır^{105, 106}. APC, AXIN, Ser/Thr kinaz(CK1 α) ve GSK3 β bir arada β -katenin yıkılma kompleksi denilen bir kompleks oluşturur. Wnt ligantlarının olmadığı normal koşullarda; sitozolik havuz içerisinde olan β -katenin, β -katenin yıkılma kompleksi tarafından sürekli olarak N-terminalindeki serin rezidülerinden fosforillenir. Fosforillenen β -katenin ubiquitin-proteosome yolağında proteolizlenir. Hücre yüzeyinde 7 kez membranı geçen Frizzled ve bir kez membranı geçen düşük dansiteli lipid reseptör ailesi (LRP5/LRP6) üyeleri bir reseptör kompleksi oluştururlar. Eğer Wnt ligantları, bu reseptör kompleksine bağlanırsa, dishelved (Dsh) proteini aracılığıyla β -katenin yıkılma kompleksi dağılır ve β -katenin sitoplazmada birikir. Sitoplazmada biriken β -katenin nükleusa göç ederek, Wnt/ β -katenin hedef genlerinin açılmasını sağlayan, Tcf/Lef (T-cell factor/ lymphocyte enhancer factor) ailesine ait transkripsiyon faktörlerini aktive eder^{16, 107}. Böylelikle Wnt/ β -katenin hedef genlerinin transkripsiyonunu gerçekleştirir. Neoplastik transformasyon ile ilişkili süreçlerde rol oynayan ve hücre döngüsünü uyaran c-MYC, siklin D, antiapoptotik role sahip survivin ve de proinvaziv genlerden MMP gibi genler Wnt/ β -katenin hedefleri arasındadır^{26, 108}. Literatürde Wnt/ β -katenin sinyalinin Tcf/Lef transkripsiyon faktörünün farklı splice varyantlarına göre hedeflediği genlerin değişebileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur¹⁰⁹.

Genetik ve epigenetik sebeplerle Wnt sinyal yolağının bozulduğu ve bunun özellikle kolon ve karaciğer kanseriyle ilişkilendirildiği farklı çalışmalar tarafından gösterilmiştir^{11, 13, 110, 69, 111}. Aynı zamanda Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonu kolorektal, HCC, melanom ve baş/boyun

gibi çeşitli kanserlere yol açabildiği sıkça gözlenen bir durumdur. Yapılan çeşitli hayvan ve insan çalışmalarında Wnt/ β -katenin yolağının yersiz aktif olmasının HCC'ye yol açabildiği gösterilmiştir ^{112, 113, 114}. β -katenin gibi pozitif modülatörlerin fonksiyon kazandırıcı mutasyonları, *APC* ve *AXIN* gibi negatif modülatörlerin fonksiyon kaybettirici mutasyonları ve/veya ekspresyonlarının değişimine sebep olan epigenetik düzenlemeler HCC'de gösterilmiştir ^{11, 115}. HCC olgularının büyük çoğunluğunda, sitokeratin1 (*CK1*), *PIN1*, *FZD7*, β -katenin ve *AXIN* geni mutasyonlarının varlığı ve β -katenin'in nükleusta biriktiğinin gösterilmesi bu yolağın HCC'deki önemini vurgulamaktadır ^{116, 117, 118, 119}.

Bunun yanında, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonu HpKKH popülasyonlarında gösterilmiştir ^{87, 120, 121}. Yine başka bir çalışmada, özellikle EpCAM'in HCC de Wnt/ β -katenin sinyalinin direk hedefi olduğu bulunmuş ve EpCAM'in RNAi yöntemiyle susturulmasının kendini yenileme, tümörojenite, hareketlilik ve ilaç dirençliliğini azalttığı ortaya konmuştur ⁹. Dolayısıyla, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının HpKKH'ler deki en belirgin görevi kendini yenileme sürecindeki rolleri olduğu düşünülmektedir. Literatüre yeni giren çalışmalar, Wnt/ β -katenin sinyalinin son nokta aracısı olan ve sekans spesifik olarak DNA'ya bağlanıp Wnt hedef genlerini regüle eden, Tcf/Lef transkripsiyon faktörlerinin farklı izoformlarının gen ekspresyonunu aktiflemek ve baskılamak gibi farklı etkileri olabileceğini ortaya koymuştur. Tcf/Lef heterojenitesi bu ailenin genlerinin alternatif promotor ve RNA splice varyantlarından ileri gelir. Bu kapasite aktivitede heterojen patern yaratır. Tcf/Lef ailesi genlerinin farklı işlevleri olan korunmuş bölgelerinin splice varyantlarla fonksiyon kaybetmesi heterojeniteyi destekler. Bunun fonksiyonel anlamı ise Tcf/Lef bir gen hedefleme yapabileceği gibi çeşitli aktivite edici veya baskılayıcı faktörlerle bir araya gelerek; Wnt/ β -katenin hedef genlerinin ekspresyonel aktivasyonuna veya represyonuna sebebiyet verebilir ¹⁵¹. HCC'de yapılmış bir çalışmada HCC hücre hatlarının 14 farklı splice varyantların birçok çeşidini eksprese ettiği ve hücre tipine ve hücrenin kanserleşme seviyesine göre varyantların değişebildiği gösterilmiştir. Ayrıca farklı varyantların hücrenin malignant özelliklerini değiştirebileceği de ortaya konmuştur ¹⁵².

2.3.1.2. PI3K/Akt Yolağı

Fare ksenograf modeliyle yapılan çalışmalarda HpKKH'lerin normal kanser hücrelerine göre daha yüksek p-AKT, p-BAD ve BCL-2 seviyesine sahip olduğu ve bunun da kemoretafinin direnci olan CD133+ hücrelerde daha da arttığı görülmüştür. Aynı zamanda AKT inhibitörü kemoterapiyle birlikte kullanıldığında HpKKH'lerin hayatta kalma oranlarının neredeyse tamamen yok olduğu gözlenmiş ve HpKKH'lerde AKT yolağının özellikle kemoterapi direncinde önemli olduğu vurgulanmıştır ¹²². Bunun yanında HpKKH'lerde ve de kemoterapiye dirençli alt gruplarda *OCT-4* ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışma *OCT-4* 'ün ektopik olarak aşırı ekspresyonu ile kemoterapi direncinin arttığını ve *OCT-4*'ün susturulması ile kemoterapi direncinin azaldığı göstermiştir. Aynı zamanda *OCT-4* ekspresyonunun AKT sinyal yolağının aktivasyonuna bağlı olduğu ve de AKT inhibitörü ile bu etkinin geri çevrildiği ortaya konmuştur ¹²³.

2.3.1.3. TGF β Yolağı

TGF- β ailesi hem kök hücre hem de kanser hücrelerinin çoğalma ve hücreyel farklılaşma kontrolünde önemli rollere sahiptir. TGF- β sinyalinin, bilinen HpKKH markerlerinden biri olan CD133 ekspresyonunda rolü olduğu bilinmektedir ¹²⁴. TGF- β sinyalinin karaciğer progenitör hücrelerde interlökin 6 (IL-6) tarafından aktive olduğu ve HCC gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bunlara ek olarak TGF- β ve IL-6 sinyalinin bloklanmasıyla EpCAM+ HpKKH'lerinin elimine olduğu araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur ^{125, 126}.

2.3.1.4. miRNA'ların Etkisi

miRNA'lar post-transkripsiyonel seviyede gen ve protein ekspresyonunun negatif düzenlenmesinde önemli düzenleyici moleküller olarak işlev gören küçük, kodlayıcı olmayan RNA'lar sınıfıdır. miRNA'lar farklılaşma ve pluripotensi de dahil olmak üzere hücreyel süreçleri geniş bir yelpazede kontrol etmektedirler. miRNA'ların ekspresyonu aynı zamanda tümör oluşum aşamasına önemlidir ve kanser prognozu ile ilişkilidir. Aynı zamanda miRNA'ların kanser

gelişimi ve metastaz ilerlemesinde de ciddi katkıları olduğu bilinmektedir ¹²⁷. Son zamanlarda, miRNA'ların HpKKH 'lerdeki rolüne ilişkin çalışmalar literatüre girmeye başlamıştır ¹²⁸.

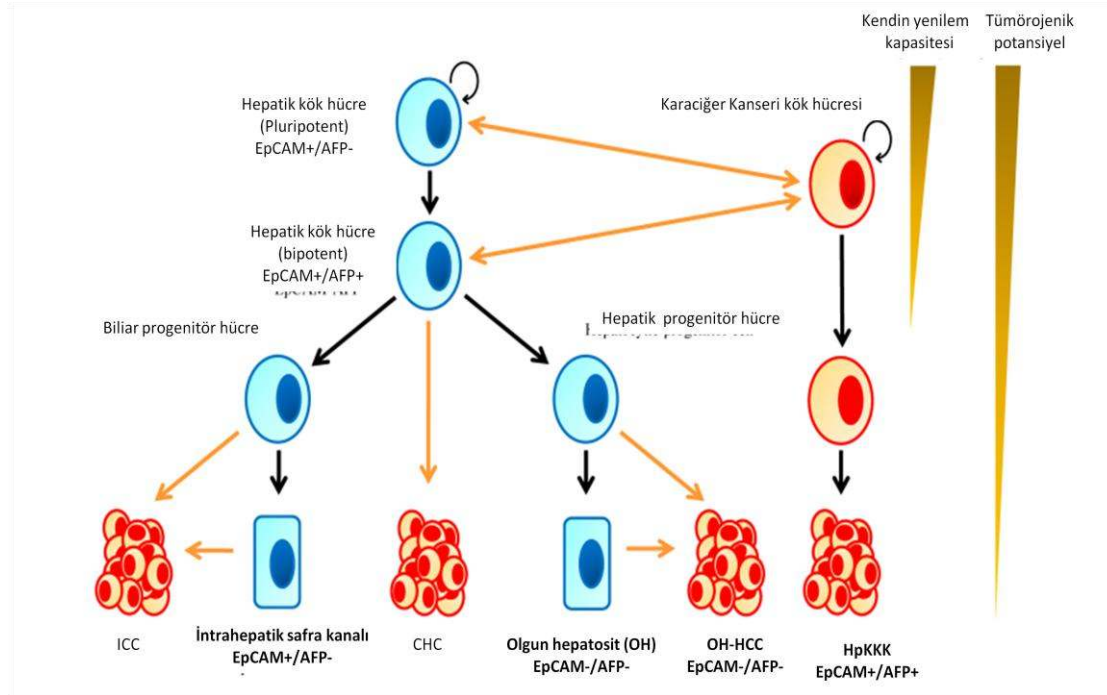
HpKKH'lerde miRNA düzenlenmesinin önemli olduğu gösterilen ilk çalışmada miR-181a, miR-181b, miR-181c and miR-181d gibi miR-181 ailesi üyelerinin EpCAM+/AFP+ hücrelerde arttığı ve miR-181'in ektopik olarak aşırı eksprese edilmesiyle EpCAM+ alt populasyonun çoğaldığı gösterilmiştir. Bunun yanında miR-181; *NLK*, *CDX2* ve *GATA6* gibi hepatik transkripsiyonel regülatörleri hedefleyerek kök hücremsi karakter için çok önemli olan Wnt/ β -katenin yolağının aktivasyonunu sağlamaktadır ^{129, 130}. Yakın zamanda miR-130b'nin de tümör dokusundan izole edilmiş CD133+ olan HpKKH'lerde arttığı bulunmuştur. Fonksiyonel çalışmalar ise miR-130b'nin kendini yenileme, tümörojenite ve de kemoterapi dirençliliğinde etkili olduğu göstermiştir ¹²⁰.

2.3.2. HpKKK'lerde Kemoterapi Direnci

Sağ kalım oranı 5 yıllık sürede %5'in altında olan ve prognozu kötü ilerleyen bir kanser türü olan HCC için tek küratif tedavi seçeneği karaciğer rezeksiyonu, karaciğer nakli veya transarteriyel kemoembolizasyon gibi cerrahi işlemlerdir. Fakat hastalık tanı konduğunda vakaların %70'i küratif cerrahi tedaviler için uygun değildir ^{131, 132}. HpKKK teorisi HCC'de kullanılan kemoterötiklerin neden genellikle tümörün büyük bir kısmını yok edip ve başarılı gibi görülmekle birlikte tümörü tamamen ortadan kaldırmakta ve nüksü engellemekte başarısız olduğunu açıklar. Çoğunlukla karaciğer tümörlerinde kullanılan anti-kanser ilaçlardan sisplatin, doksorubisin ve 5-florourasil tümör içerisindeki hızlı çoğalan kanser hücrelerini hedef alır. Fakat tümör içerisinde alt bir populasyon oluşturan HpKKK bu ilaçlara dirençlidir ve tedavi sonrası hayatta kalıp varlıklarını sürdürürler. Böylelikle kurtulan tümör hücreleri kendini yenileyerek, tümörlerin gelişimini ve yayılımını sağlayacak ilaca dirençli kloniler oluştururlar ^{14, 6}. Var olan kemoterapi seçenekleri bu sebeplerden dolayı etkili değildir ^{21, 132}. Kemoterapi dirençliliğinde rol oynayan mekanizmalardan biri de fonksiyonlarını yitirmiş öncü veya kök hücrenin plastisite özelliklerinde rol oynayan TGF- β , IGF/IGF-1R, HGF/MET, Wnt/ β -katenin, Notch, Hedgehog ve TGF- α /EGFR gibi aktif sinyal yollarıdır ^{28, 29, 86, 133, 134}.

2.3.3. HpKKK'lerde Pluripotensi

Günümüzde en belirgin ve spesifik olarak HpKKK'leri ayıran yüzey molekülü EpCAM'in kanser başlatıcı ve kanser kök hücrelerinde ¹³⁵, doku spesifik normal kök hücrelerde ¹³⁶ hepatik kök hücrelerde ¹³⁷ ve embriyonik kök hücrelerde ¹³⁸ eksprese olduğu bilinmektedir. Fare embriyonik fibroblastları iPKK'ye dönüşüme indüklenmesinin ardından EpCAM ve ilişkide olduğu Cldn7 moleküllerinin yeniden programlama sürecinde arttığı gösterilmiştir ¹³⁹. Aynı çalışmada EpCAM ve CLDN7 inhibisyonuyla yeniden programlama etkinliği azalmış ve aşırı ekspresyonuyla ise yeniden programlama etkinliği artmıştır. Benzer olarak başka bir çalışmada EpCAM'in suturulmasıyla pluripotensi genlerinin ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiş ve EpCAM nükleer kısmının OSKM genlerinin direk olarak promotorunu regüle edebileceği düşünülmüştür ¹⁴⁰. Tüm bu veriler EpCAM'in pluripotensinin programlanmasında görev yaptığını ve EpCAM taşıyan hepatik kanser kök hücrelerin daha pluripotent olduğunu göstermektedir (Şekil 8).



Şekil 8. Hepatik kanser kök hücrelerin farklılaşma basamaklarında kendini yenileme ve tümörojenik potansiyellerinin değişim

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Deneysel nitelikte bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma, 2008 Eylül- 2013 Haziran 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 SNU-387, HuH-7, SNU-398, SNU-475, SK-HEP-1, PLC/PRF/5, Hep40, SNU-182, Hep3B, Hep G2, Mahlavu Bilkent Üniversitesinden Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından hediye edilmiştir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Çeşitli hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmanın ilk kısımlarında farklı genlere ait gerçek zamanlı ve yarı kantitatif gen ekspresyonları analizlenirken deneysel eşit yükleme kontrolü olarak *housekeeping* genlerden RPL41 ve GAPDH bunun yanında *western blot* yönteminde *housekeeping* gen olarak kalneksin kullanılmıştır.

Başlangıç deneylerinde lityum klorür'ün iyonik kontrolü olması açısından Sodyum Klorür (NaCl) kullanıldığında, moleküler ve biyolojik düzeyde değişimlere rastlanmadığından deneylerin devamında LiCl'ün yarattığı etkiler DMEM'e göre kıyaslanmıştır ¹⁵.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.6.1.1. HCC Hücre Hatları ve İdamesi

Bu çalışma kapsamında kullanılan HCC hücre hatları (Mahlavu, HuH-7, Hep40, SNU-475, SNU-398, SNU-387 SNU-449, SK-Hep1, PLC/PRF/5, Hep3B, Hep G2, SNU-182) Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden Prof. Dr. Mehmet Öztürk tarafından sağlandı. Deneyler başlatılmadan önce STR profillemesi ile kimlik doğrulaması yapılmış hücre hatlarında mikoplazma bulaşı testi belirli aralıklarla yapıldı.

Kullanılan HCC hücre hatlarında, normal koşullarda %10 FCS (Fetal Calf Serum) (Biochrom, S0125), 2mM L-Glutamin (Biological Industries, 03-020-1C), 100u/ml penisilin ve 0,1mg/ml streptomisin (Biological Industries, 03-031-1C) ve % 1 esansiyel olmayan aminoasit karışımı (Biological Industries, 01-340-1B) içeren DMEM (Biological Industries, 01-104-1A) içerisinde üretildi. Hücre kültürü işlemleri biyogüvenlik 2 düzeyinde laminar kabinet (Thermo Scientific Cabinet / MSC1.2) içerisinde yapılırken, hücreler 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde (Thermo Scientific Incubator / Forma Stericycle CO2) uygun zaman aralığında kültüre edildi. Hücreler büyüme hızlarına ve başlangıç yoğunluklarına göre değişmekle birlikte 3 ila 5 günlük aralıklarla bir alt kültüre edildi. Hücreler %80 civarında yoğunluğa ulaştığı zaman kültür kaplarındaki ortam çekilip, 3 defa pH: 7.4 steril PBS ile yıkanıp, PBS uzaklaştırılması ardından yüzeyi kaplayacak miktarda Trypsin-EDTA (%0.05/%0.02, Biological Ind., 03-054-1B) solüsyonu konularak inkübatörde hücreler tutundukları yüzeyden ayrılması beklendi. Trypsinize edilen hücrelerin üzerine FCS içeren ortam konularak pipetlendi ve bu işlemin sonunda *Neubauer* lamında hemasitometrik olarak sayılarak, istenilen miktarda hücre yeni kültür kaplarına ekildi. Hücre kültürü çalışmalarında ters bakışlı faz kontrast mikroskobundan (Olympus CKX41) yararlanıldı.

3.6.1.2. Hücrelerin Dondurulup Çözülmesi

Logaritmik büyüme evresine gelmiş hücreler %70-80 yoğunluğa ulaşınca donduruldu. Bunun için tripsinize edilen ve hücre kültür ortamıyla süspanse edilip ve 2500 rpm de 5 dakika santrifüjlenip çöktürüldü. Çöktürülmüş hücre pelleti taze olarak hazırlanmış soğuk hücre dondurma ortamında (%30 FCS, %10 DMSO, %70 DMEM) süspanse edilerek özel tüpler içerisinde, dakikada 1 °C'lik soğuma sağlayan buz kutusuna (Nalgene 5100-0001) konularak gece boyunca -80 °C'de donduruldu ve uzun süreli stoklamalar için sıvı azot tankına kaldırıldı. Dondurulmuş hücrelerin çözülmesi için hücreler sıvı azottan çıkarılıp, hızla çözülerek hücre kültürü ortamı ile süspanse edildi. Hücre süspansiyonu 2500 rpm de 5 dakika santrifüjlenip DMSO içeren üst faz atıldı ve hücre pelleti taze kültür ortamıyla süspanse edilerek uygun hücre kültür kabına ekildi.

3.6.1.3. Hücrelerin LiCl'e Maruz Bırakılması

Lityumun moleküler düzeyde ve biyolojik olarak yarattığı değişimlerin incelenmesi için, pasajlanan ve gece boyunca adezyonunu tamamlamış %50-60 yoğunluktaki farklı hücre hatları ve zenginleştirilmiş hücre gruplarının ortamı, içerisinde 20 mM LiCl (Sigma, L9650) içeren taze kültür ortamı ile değiştirildi. Hücreler 48 saat boyunca lityuma maruz kaldıktan sonra uygulanacak deney basamaklarına devam edildi. Lityumun zaman içerisindeki etkisini anlamak için yapılan deneyler ise yukarıda anlatıldığı gibi lityum eklenmesinin ardından deney istenilen sürede durduruldu.

3.6.2. Mikrodizin Analizleri

3.6.2.1. Ham Mikrodizin Verilerinin Eldesi

Lityum'un, HuH-7 hücrelerinde meydana getirmiş olduğu gen ekspresyonu değişikliklerinin *in silico* çözümlenmesinde, mikrodizin ham ekspresyon verileri kullanıldı. HuH-7 hücre hattına üç ayrı deney setinde 48 saatlik LiCl uygulamasının ardından elde edilen RNA dan, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümünde Doç.Dr. Hilal Özdağ ve ekibi tarafından cRNA elde edilerek mikroarray analizlerinde kullanıldı. Bulunan gen ekspresyon verileri elli dört bin altı yüz yetmiş beş prob setinden oluşan *Affymetrix GeneChip Human Genome U133*

Plus 2.0 platformu kullanılarak elde edildi. Çalışmadaki mikrodizin çiplerinin kalite değerlendirmesi, ham ekspresyon verilerinin normalizasyonu ve normalize ekspresyon verilerinin istatistiksel çözümlmeleri için R 2.5.1. sürümü kullanıldı.

Lityum'un HuH-7 hücrelerinde, gen ekspresyonu düzeyinde meydana getirdiği değişikliklerin istatistiksel anlamlılığının ortaya konması için, *Significance Analysis of Microarray* (SAM) yöntemi ile istatistiksel çözümleme yapıldı. İstatistiksel çözümlmeler normalize ekspresyon verileri kullanılarak, SAM yönteminin R ortamına uyarlanmış şekli *samr* paketi kullanılarak gerçekleştirildi. False Discovery Rate (FDR) değeri 0.01 olarak seçildi ve $FDR < 0.01$ koşulunu sağlayan probe setler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bu yolla HuH-7 hücre hattında ekspresyonu, Lityum uygulanmamış hücrelerdekine göre anlamlı olarak artmış ya da azalmış problemler belirlendi.

Bu çalışmanın veri çözümleme ile ilgili pek çok basamağı, mikrodizin istatistiksel çözümlmeleri ile bu çözümlmelere ait girdi ve çıktıların resmedilmesi, çeşitli programlama dili ve ortamı kullanılması Doktora öğrencisi Gökhan Karakulah tarafından gerçekleştirildi.

3.6.2.2. İnternet Tabanlı Biyoinformatik Araçların Yardımıyla İstatistiksel Sonuçların Çözümlemesi

Ekspresyon düzeyleri anlamlı bir şekilde değişmiş problemlerin, biyolojik açıdan taşıdığı anlamların ortaya konması için *WebGestalt*, *Onto-Express* ve *Fatigo+*, *KEGG* fonksiyonel anotasyon araçları kullanıldı. *WebGestalt* veri tabanı kullanılarak yapılan *Gene Ontology* (GO) çözümlemesinde, istatistiksel yöntem olarak Hipergeometrik test, anlamlılık düzeyi olarak da 0.01 değeri seçildi. *Onto-Express* veri tabanı ile yapılan çözümlemelerde ise istatistiksel anlamlılığın test edilmesinde FDR yöntemi tercih edildi. Ayrıca gen ekspresyonu verilerinin gen seti düzeyinde yorumlanması ve çözümlemesinde *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) yöntemi kullanıldı. Çözümlemede kullanılan gen setleri için c2 gen seti koleksiyonu *Molecular Signature Database*'den indirilmiş ve c2 koleksiyonu, Wnt sinyal yolağı hedef genleri ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerden oluşan setleride eklemek amacı ile de yeniden düzenlenmiştir.

GSEA ile yapılan analizde permütasyon sayısı bin olarak alınmış olup, on dokuzdan az ve beş yüzden fazla sayıda gen içeren gen setleri çözümlenmeye dahil edilmedi. İnternet tabanlı biyoinformatik araçların yardımıyla istatistiksel sonuçların çözümlenmesi Doktora öğrencisi Gökhan Karakülah'tan destek alındı.

Lityum etkisiyle değişen genlerden hangilerinin Tcf/Lef transkripsiyon faktörü ile regüle edildiğini anlamak için, Transfact veri tabanındaki farklı *quality* değerlerindeki *matrix*'ler kullanılarak Tcf4 ve Lef1 için belirlenmiş gen grupları ile gen setimiz örtüştürüldü.

3.6.3. Plazmid Vektörlerin Eldesi

3.6.3.1. Transformasyon

E-coli DH5 α suşu kullanılarak plazmitler transforme edilip çoğaltıldı. Kompetan hücre E-coli DH5 α 'dan 100 μ l üzerine 200 ng plazmid eklenerek 30 dk buz üzerinde inkübe edilen plazmid ve kompetan hücre karışımı, 42°C'lik su banyosunda 45 saniye(sn) bekletildi. Daha sonra 2 dk buz üzerinde bekletilen bu karışımın içerisine taze olarak hazırlanan 50 mg/ml MgCl₂ içeren 900 μ l SOB ortamı eklendi. 37°C'ye ayarlanan bakteri inkübatörü içerisinde 160 rpm'de 1 saat çalkalanarak inkübe edildi. Ampisilin içeren ve içermeyen Luria Broth Agar (LB) katı ortama direk ve dilüe ekim yapıldı ekim yapıldı ve gece boyu 37°C'de bakteri inkübatöründe inkübe edildi. Ampisilin içeren ortamda üreyen ve tek tek düşmüş kolonilerden bir koloni seçilerek 5ml LB sıvı ortamına ekildi. Bakteriler 37°C ve 160 rpm'de gece boyu çalkalanarak inkübe edildi. Ampisilinli LB ortamında çoğalan vektör içeren E-coli DH5 α hücrelerinin 1,5 ml'si Miniprep plazmid DNA izolasyonu için kullanıldı. Restriksiyon enzim kesiminden sonra, maksiprep plazmid DNA izolasyonu için 250 ml ampisilin içeren LB ortamına 1,5 ml ilk kültürden ekildi ve 37°C ve 160 rpm'de gece boyu inkübe edildi.

3.6.3.2. Miniprep Plazmid DNA İzolasyonu

Yukarıda anlatıldığı gibi kloni, seçiminden sonra gece boyu inkübe edilen bakteri kültüründen 1,5 ml ile miniprep yapıldı. 5 dakika +4°C'de 2500 rpm'de santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. 100 μ l ALS-1 solüsyonu içerisinde resüspanse edilen pellet, kuvvetlice vortekslenerek taze hazırlanan 200 μ l ALS-2 solüsyonu ependorfa eklendi. Tüp 5 kere alt üst

edildi ve 150 µl önceden soğutulmuş ALS-3 solüsyonu ependorfa eklendi. 5 dk buz üzerinde inkübe edilen tüpler +4°C ve 13000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek, süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. Süpernatant üzerine eşit hacimli olacak şekilde Fenol-Kloroform-Izoamil alkol eklenerek vortekslenen tüpler 13000 rpm ve +4°C'de 5 dk santrifüj edilerek üstteki şeffaf sulu faz yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı. %70 etanol'den süpernatantın iki kat hacminde olacak şekilde eklenip kuvvetlice vortekslenen tüpler, 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve 1 ml %70'lik etanolden geçirilip pellet kurumaya bırakıldı. Pellet 50 µl Tris-EDTA (pH 8,0) solüsyonu içerisinde çözüldükten sonra 260 ve 280 nm'de saflık ve konsantrasyon ölçümleri yapıldı. Elde edilen bu plazmid DNA'larına restriksiyon enzim kesimi yapıp DNA parçaları jelde görüntülendi ve doğrulanan klonilerden maksiprep ekim yapıldı.

3.6.3.3. *Maxiprep Plazmid DNA İzolasyonu*

Maksiprep plazmid DNA izolasyonu için "*Invitrogen Hipure Plazmid DNA Purification Kit (K2100-02)*" kullanıldı. Bir gece önceden 100 µg/ml ampicilin içeren 250 ml LB ortamında sallamalı bakteri inkübatöründe 37°C'de ve 160 rpm'de inkübe edilen bakteri hücreleri 250 ml'lik tüpe aktarıldı. 250 ml'lik tüpe aktarılan bakteri hücreleri 4000 g'de 15 dk santrifüj edildi ve ortam tamamen uzaklaştırıldı. Tüpe 10 ml kit içeriğindeki resüspanسیون tamponu eklendi ve hücre pelleti homojen bir hale gelene kadar resüspanse edildi. Hücre süspanسیونu 50 ml santrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 10 ml Lizis tamponu eklendi. Tüp 5 kere ters düz edildi ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. 10 ml presipitasyon tamponu eklenip alt üst edilerek karıştırılıp 9000 g'de 30 dk santrifüj edildi. Süpernatant daha önceden denge tamponu ile muamele edilmiş kolona aktarılarak DNA'nın kolona bağlanması sağlandı. Karışımın kolondan yer çekimi yardımı ile geçmesi beklendi. Kolon 60 ml yıkama tamponu ile yıkandı. Kolon steril bir toplama kabına yerleştirilerek 15 ml elüsyon tamponu kolona eklendi. DNA yer çekimi ile kolondan toplama kabına indi. Tüpe 10.5 ml izopropanol eklenip ters düz edilerek iyice karıştırıldı. Önceden +4°C'ye ayarlanan soğutmalı santrifüj ile 12000 g'de 1 saat santrifüj edildi. Pellet 5ml %70 Etanol'de resüspanse edilip. +4°C'de ve 12000 g'de 30 dk santrifüjlendi. Kurutulan DNA pelleti 500 µl TE tamponu içerisinde resüspanse edildi ve elde edilen plazmid DNA'larının 260 ve 280 nm'de saflık ve konsantrasyon ölçümü yapılarak, restriksiyon enzim kesimi ile doğrulamaları yapıp, -20°C'de saklandı.

3.6.4. Tcf/Lef Lusiferaz Reporter Assay

Çalışmamızda Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesinin belirlenebilmesi ve de Wnt/ β -katenin sinyal yolağının yeniden düzenlenmesi ve Tcf/Lef transkripsiyonel aktivite ölçümleri için kullanılan vektörler George Town Üniversitesinden Aykut Üren tarafından sağlandı (Tablo.1).

Tablo 1. Kullanılan plazmitler ve kullanım amaçları

Vektör adı	Kullanım amacı
S37A BCAT /pFLAG-CMV2	*Yıkım için fosforile olması gereken rezidüngen mutant olduğu BCAT'in aşırı ekspresyonu sağlayıp Wnt/ β -katenin sinyal yolağını uyarmak. (bu vektör ürünü, hücre içerisindeki β -katenin ile yarışarak Wnt/ β -katenin sinyal yolağını uyarmaktadır)
pFLAG-CMV2	BCAT boş kontrol vektörü olarak
AXIN GID5-6/pCS2	GSK3 β 'ya bağlanıp aktivitesini inhibe eden AXIN parçasının aşırı miktarda ekspresyonunu sağlayıp Wnt/ β -katenin sinyal yolağını uyarmak. (Bu vektör ürünü, hücre içerisindeki AXIN ile yarışarak Wnt/ β -katenin sinyal yolağını uyarmaktadır.)
pCS2	AXIN boş kontrol vektörü olarak
DNTCF4	B-katenine bağlanma bölgesi içerip DNAYA bağlanma bölgesi içermeyen TCF4'ün aşırı ekspresyonunu sağlayıp Wnt/ β -katenin sinyal yolağını baskılamak. (Bu vektör ürünü, hücre içerisindeki TCF4 ile yarışarak Wnt/ β -katenin sinyal yolağını uyarmaktadır.)
pBABE	DNTCF4 boş kontrol vektörü olarak
M50 Super 8x TOPFlash	Tcf yanıt elemanı içeren bölgesine Tcf/Lef bağlanmasıyla lüsiferaz enzimi ekspresyonu sağlamak. (Hücre içinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının sonunda hedef genlerin açılmasını sağlayan Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesi artınca plazmitin ürettiği lüsiferaz enzim miktarı artmakta ve ortama konulan substrattan yararlanıp daha yüksek ışımaya vermektedir.)

M51 Super 8x FOPFlash	Tcf bağlanma bölgesi mutant olduğundan artan Wnt/ β -katenin sinyal yolağına yanıt veremeyen yalancı lüsiferaz vektörü.
-----------------------	---

HuH-7 hücreleri 4×10^4 hücre/kuyu olmak üzere steril 12 kuyulu hücre kültürü kaplarına ekildi. Gece boyunca kültüre edilen hücrelerin bir gün sonra ortamı uzaklaştırılıp PBS ile yıkanarak transfeksiyon işlemine geçildi. HuH-7 hücreleri için optimize edilen koşullar 12 kuyulu hücre kültürü kapları için 0.8 μ g DNA ve 2 μ l Transfeksiyon kimyasalıdır (TR). Tüm plazmitler için yapılan transfeksiyonlar bu oranlar kullanılarak hazırlanmıştır. Bunun dışında normalizasyon için kullanılan pRLTK plazmiti diğerler plazmitlere oranla 1/10 oranında kullanıldı.

Transfeksiyon ortamları hazırlanırken polistren tüpler kullanılarak kuyu başına 50 μ l DMEM-0 içerisine 0.8 μ g DNA ve 2 μ l Eugene (Roche, 04709705001), transfeksiyon reagenti kullanıldı. Tüm bu bileşenler vortexlenerek karıştırılıp, oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi ve ortamı uzaklaştırılıp PBS ile yıkanan her kuyu içerisindeki 1 ml normal kültür ortamı üzerine eklenerek transfeksiyon gerçekleştirildi. Transfeksiyondan 4 saat sonra ilgili koşula kültür ortamı içerisine son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde LiCl eklendi, hücreler 48 saat boyunca lityuma maruz kaldıktan sonra lüsiferaz ölçümleri *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega E1910) kiti yardımıyla gerçekleştirildi.

Wnt sinyal yolağı çeşitli basamaklarda yukarıdaki plazmitlerle yeniden düzenlenip sonrasında yapılacak Tcf/Lef reporter deneyi için hücreler önce BCAT, Δ N TCF, Δ N AXIN plazmitleriyle transfeksiyonu gerçekleştirilip bir gün sonrasında Tcf/Lef reporter plazmitleri ile yeniden transfekte edildiler. Tcf/Lef plazmitlerinin transfeksiyonu sonrasındaki tüm işlemler yukarıdaki sıralama ile yapıldı. Deney süresi dolduğu zaman lüsiferaz ölçümleri kitin önerileri doğrultusunda aşağıdaki sırayla gerçekleştirildi. Belirtilen süre sonunda hücrelerin ortamları uzaklaştırılıp 1X PBS ile iki kere yıkama yapıldı. Hücrelerin üzerine kit içeriğinde mevcut 200 μ l lizis tamponundan eklenip 15 dk sallamalı karıştırıcıda hücrelerin parçalanması sağlandı ve lizatlar 1,5 ml'lik ependorflara aktarıldı. Şeffaf ependorf tüpleri içerisine 50 μ l lüsiferaz assay tamponu (LARII) konulup bunun üzerine hücre lizatından 20 μ l eklendi ve 10 sn

süre ile luminometrik ölçüm yapıldı. Ependorflara 50 µl ‘‘Stop Glo’’ solüsyonundan eklenerek lusiferaz aktivitesi sonlandırıldı ve Renillia aktivitesinin başlaması sağlandı. 10 sn süre ile luminometrik ölçüm yapılarak Renillia değeri kaydedildi.

Elde edilen lusiferaz değerleri kullanılarak yapılan hesaplamada her kuyunun değeri kendi internal kontrolü olan Renillia değerine bölündükten sonra elde edilen değerler, doğru vektör/yanlış vektör hesaplaması yapılarak, Tcf/Lef transkripsiyonel aktivite değerleri elde edildi.

3.6.5. RNA Eldesi ve PCR

3.6.5.1. RNA Eldesi Ve Konsantrasyon Ölçümü

Çalışmada kullanılan tüm hücre hatları ve zenginleştirilmiş hücre grupları lityum olan ve olmayan koşullarda 48 saat boyunca kültüre edildikten sonra ticari olarak satılan PureLink RNA Mini Kiti (ambion 12183018A) RNA izolasyon kiti kullanılarak ve de sağlayıcının protokolüne sadık kalınarak total RNA eldesi yapıldı. RNA izolasyonu sırasında kit içeriği dışında kullanılan tüm plastik sarf malzemeleri %0.1 DEPC (Applchem, 0881) kullanılarak RNazlardan arındırıldı. Elde edilen Total RNA'nın bir kısmı spektrofotometrik ölçüm, geri kalanı ise ters transkriptaz ile cDNA sentezi yapmak için kullanıldı. RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayinleri 260 nm ve 280 nm'deki absorpsanları Picodrop (Picodrop, Picopet01) ile spektrofotometrik olarak saptandı. 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 saf dışı bırakıldı.

3.6.5.2. cDNA Sentezi

Total RNA izole edilip konsantrasyon ve kalite belirlendikten sonra son konsantrasyonu 2 µg olacak RNA ile ticari olarak sağlanan MBI Fermentas(K1622) cDNA sentez kitinden yararlanılarak cDNA sentezlendi. İşlemler termal döngüleyici (Techne TC-312) yardımıyla kit önerileri doğrultusunda yapıldı. Total RNA, ‘‘Random primer’’, ‘‘Oligo(dT) primer’’ ve su içerisinde hazırlandıktan sonra 70°C’de 5 dk inkübe edilip, 5X reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü ve dNTP ve ‘‘M-MulV Reverse Transcriptase’’ eklenerek ve kitin önerdiği sıcaklıklarda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra karışıma 5X reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü, dNTP

ve “*M-MuLV Reverse Transcriptase*” eklenip, 25°C’de 10 ve 42°C’de 60 dk inkübe edilerek hazırlanan ilk-zincir cDNA reaksiyonu reaksiyon, 70°C’de 10 dk inkübasyon ile sonlandırıldı.

3.6.5.3. Yarı-Kantitatif Ters-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

İlk-zincir cDNA sentezlendikten sonra bu cDNA’lar (her bir cDNA reaksiyonundan 2 µl) kalıp olarak kullanılarak ilgilenilen gene spesifik primerler aracılığıyla PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. İnternal kontrol olarak da karaciğere spesifik bir housekeeping gen olan RPL41 ve de GAPDH genine spesifik primerler kullanıldı ve yarı-kantitatif olarak gen ekspresyonu GAPDH ve RPL41 miktarına göre oranlanarak belirlendi. Primerler *Entrez* ve *Ensembl* gen bankalarında yer alan diziler üzerindeki korunmuş bölgelere özgü olan web tabanlı “*IDT Oligodesign*” programı (www.idtdna.com) kullanılarak, PCR ve gerçek zamanlı PCR primerleri kriterlerine uygun olacak şekilde tasarlandı. Tüm primerler için farklı MgCl₂ (Fermentas, 00028790), termal profil, primer konsantrasyonu denenerek optimizasyon yapıldı ve her primer uygun olan optimizasyon koşullarında kullanıldı. Kullanılan genlere ait primer özellikleri Tablo 2’deki gibidir.

PCR ürünlerinin yürütülmesi ve analizi için TBE tamponu içerisinde %2’lik agaroz (Applichem, 5510UB) jel kullanıldı. Jel içerisine 0.5 µg/ml etidyum bromür (Sigma, E-8751) eklenerek DNA floresan olarak boyandı. PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünlerin herbirinden 10’ar µl kullanılarak 6X DNA yükleme tamponu (Fermentas, R1151) yardımıyla jele yüklendi. Bantlar açılana kadar (30-60 dk) 70 V’luk gerilim uygulanarak örnekler TAE ile dolu elektroforez tankında yürütüldü. Daha sonra amplifiye edilmiş olan DNA’lar transillüminatör ile UV ışığı altında DNA’ya interkale olan etidyum bromür aracılığı ile incelendi.

Tablo 2. PCR reaksiyonlarında kullanılan spesifik primerler ve özellikleri

Gen Adı	Entrez ID	İleri 5' →3' / Geri 5'→3'	Hedef bölge (bp)
<i>BIK</i>	638	İleri 5'- GAGACATCTTGATGG AGACC -3' Geri 5'- TCTAAGAACATCCCTGATGT -3'	290
<i>LGR5</i>	8549	İleri 5'- ATCGTCCAACCTCCTGTCGTCTTT -3' Geri 5'- TCGTCCATACTGCTGTTGTACCT -3'	229
<i>GLIPR1</i>	11010	İleri 5'- CACAAGCTGCACCCAAACTTCACT -3' Geri 5'- CCACCTGTGGCAACCTGCAAATAA -3'	758
<i>KLF4</i>	9314	İleri 5'- TTCAACCTGGCGGACATCAACGA-3' Geri 5'- TTCAGCACGAACTTGCCCATCA-3'	143
<i>FAM46C</i>	54855	İleri 5'- TGGCTCTTCCAACAGAGGCAGAAT -3' Geri 5'- TGAACTCAAACCTGACGCCGAATGG -3'	249
<i>VCAN</i>	1462	İleri 5'- GCCTTCCAAGGCCAAGATGTTCA -3' Geri 5'- GGTGGCAAAGTAGGCATCGTTGAA -3'	177
<i>PHLDA1</i>	22822	İleri 5'- TGCAGTACAAGAATCGTCAGGCCA -3' Geri 5'- TGAGGATGAGAGTGTGGATGTGGA -3'	247
<i>EPHA5</i>	2044	İleri 5'- TTCTGTGACCGATGAACCTCCCAA -3' Geri 5'- CTGCACACTTGACAGGTGCCATTT -3'	123
<i>AXIN2</i>	8313	İleri 5'- TTATTGGGCGATCAAGACGGTGCT -3' Geri 5'- CCTGAATCCATTGCAGGCAAACCA -3'	102
<i>JMJD3</i>	23135	İleri 5'- TCTGCAGGAGGAGAAGGAGA -3' Geri 5'- TCCACCGCTTAGCATCAGAC -3'	149
<i>SP5</i>	389058	İleri 5'- TTCGTGTGCAACTGGCTCTTCTG -3' Geri 5'- TTCTGGTGAGTCTTGACGTGCTTC -3'	164
<i>RELN</i>	5649	İleri 5'- TGGACAGCATTTACATTGGGCAGC -3' Geri 5'- ACTCCCAGCCATTCTGGTTCTCAA -3'	171
<i>UGT1A1</i>	54658	İleri 5'- CTCTTTCCATGTCCCAATGA-3' Geri 5'- ATTGATCCCAAAGAGAAAACCAC-3'	362
<i>UGT1A3</i>	54659	İleri 5'- GTTGAACAATATGTCTTTGGTCT -3'	384

		Geri 5'- ATTGATCCCAAAGAGAAAACCAC -3'	
<i>UGT1A9</i>	54600	İleri 5'- GAACATTTATTATGCCACCG -3' Geri 5'- ATTGATCCCAAAGAGAAAACCAC -3'	275
<i>SOX2</i>	20674	İleri 5'- GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG -3' Geri 5'- TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG -3'	151
<i>OCT3/4</i>	18999	İleri 5'- GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG -3' Geri 5'- CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCCAAAC -3'	141
<i>Myc</i>	4609	İleri 5'- GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC -3' Geri 5'- TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCTG -3'	328
<i>Nanog</i>	79923	İleri 5'- TCCTGAACCTCAGCTACAAAC -3' Geri 5'- GCGTCACACCATTGCTATTTC -3'	108
<i>HNF4a</i>	3172	İleri 5'- CCTACCTCAAAGCCATCATCTT -3' Geri 5'- GTCGTTGATGTAGTCCTCCAAG -3'	116
<i>SAA4</i>	6291	İleri 5'- TAAACTCATCAGCCGTTCCAGGGT -3' Geri 5'- TATTTCTTAGGCAGGCCGTCAGGT -3'	171
<i>ASPM</i>	259266	İleri 5'- ACCTTTCCCGTCACCTTGGCTTAT -3' Geri 5'- TTGAGAGGTCCCAGTTCTGTGTGA -3'	162
<i>EpCAM</i>	4072	İleri 5'- GCTGGCCGTAAACTGCTTTGTGAA -3' Geri 5'- TCGCAGTCAGGATCATAAAGCCCA -3'	201
<i>NAT8</i>	9027	İleri 5'- ACTCAAGGCTCTTGTGGTGACAGT -3' Geri 5'- AAGGTGGGATCATCAACAGGCAGA -3'	492
<i>CDKN2C</i>	1031	İleri 5'- TGCGCTGCAGGTTATGAACTTGG -3' Geri 5'- AGGGCAGGTTCCCTTCATTATCCT -3'	200
<i>KNG1</i>	3827	İleri 5'- AGCTGTGGATGCTGCTCTGAAGAA -3' Geri 5'- AACGTGTCAGAGCCAACCGTCTTA -3'	108
<i>KLB</i>	152831	İleri 5'- TTGGCATGGGTATGGGACAGGTAT -3' Geri 5'- TGATGTGGGCGGAAATGTGTGTTG -3'	138
<i>CDH1</i>	999	İleri 5'- AACCTCTGTGATGGAGGTCA -3' Geri 5'- GTGGTGGGATTGAAGATCG -3'	303
<i>KMT6</i>	2146	İleri 5'- AGCCTTGTGACAGTTCGTGC -3' Geri 5'- CAGCGGCTCCACAAGTAAGA -3'	192
<i>PALMD</i>	54873	İleri 5'- GCTGCCGTTCAAACCTTGTCAGTCA -3' Geri 5'- AAGAGAAGCAGGGAGAAATCCGCT -3'	183
<i>HNF6</i>	3175	İleri 5'- GCGCAGGTCAGCAATGGAAGTAAT -3'	376

		Geri 5'- TTGCATGTAGAGTTTCGACGCTGGA -3'	
<i>RPL41</i>	6171	İleri 5'- AACCGCTAGCTTGTGCACT -3' Geri 5'- TCCAGAATGTCACAGGTCCA -3'	225
<i>GAPDH</i>	2597	İleri 5'- CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA -3' Geri 5'- GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT -3'	143

3.6.5.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR) Reaksiyonu

Tüm PCR reaksiyonları her bir gen için özgün olarak tasarlanan primerlerle, AB Step-One-Plus cihazında (Applied Biosystems system kat no: 4376592) ve de amplifikasyonlar *SYBR Green PCR Master Mix* (Power SYBR Green Applied Biosystems cat no: 4367695) kullanılarak yapıldı. Deney seti gen ekspresyonları analizlenmeden önce, primer çiftleri ile cDNA miktarı, primer miktarı, annealing ısıları gibi parametreler optimize edildi. Amplifikasyonlar optimizasyon sonrası elde edilen en uygun koşullarda yapıldı. Her örnek için dört tekrarlı setlerle çalışıldı. Her amplifikasyon için, 25 µl master mix (kit içerisinde hazır olan), 1.25 µl primer, 5 µl cDNA ve 17.5 µl dH₂O'dan oluşan 50µl'lik solusyon hazırlanıp vorteksenerek karıştırıldı. Cihaza ait floresan ışık geçirgen 96 well plate'in her kuyusuna 10µl olacak şekilde karıştırılan bu solusyon dağıtılıp ve spin edildi ve reaksiyon başlatıldı. Amplifikasyon reaksiyonu, 10 dk 95°C denatürasyonu takiben 40 döngü olacak şekilde (95°C'de 15 sn, 55°C'de 40 sn, 72°C 40 sn) gerçekleştirildi. Deneylerde her bir reaksiyon içerisine eklenen ROX boyası hacimsel farklılıkları normalize etmek imkanı sağladı. Amplifikasyon bittikten sonra her primer için C_t değerleri tespit edildi. Gen ekspresyonları Relative Kantifikasyon $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile hesaplanıp endojen kontrole göre normalize edildi. Bu deneylerde gen ekspresyonun semi-kantitatif olarak değerlendirilebilmesi için RPL41 ve GAPDH ekspresyon düzeyi referans olarak kullanıldı.

3.6.6. Immunfloresan Boyama

6 kuyulu kültür kapları içerisindeki 22 mm²'lik steril cam slaytlar üzerinde ekilen 10x10⁴ hücre, %80 yoğunluğa ulaştığında PBS ile yıkanıp soğuk metanol ile 5 dakika fikse edildi. Lityumun etkisini anlamak için yapılan deneylerde ise 20 mM LiCl eklendikten 48 saat sonra fiksasyon yapıldı. Fikse edilen hücreler üzerine, özgül olmayan bağlanmaları bloklamak amacıyla, %20 FBS içeren PBS-T oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. Hücreler PBS-T ile

yıkandıktan sonra, %2 FBS içeren PBS-T içerisinde 1/50 oranında seyreltilmiş olan, FITC konjuge EpCAM antikoru (Miltenyi,130-080-301) ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Örnekler PBS-T yıkamaları sonrasında, çekirdek boyası için kullanılacak olan seyreltilmiş DAPI içerisinde 10 dk bekletilip PBS-T yıkamaları tekrar edildi. Son olarak, floresan mounting media (Dako, S3023) yardımıyla kapatılarak motorize floresan mikroskop (Olympus BX61) aracılığıyla uygun filtreler kullanılarak görüntülendi. Negatif kontrollere birincil antikor yerine sadece % 1.5'lik FBS içeren PBS konuldu, bu adımın dışındaki tüm işlem sırası aynı şekilde uygulandı.

EpCAM/CD133, EpCAM/CK-19, EpCAM/ β cat çiftli boyamalar, ppGSK3 β ve β -katenin boyamaları için, CD133 (Miltenyi, 130-090-422), CK19 (Santa Cruz 6278), β cat (Santa Cruz 7963) ve ppGSK3 β (Cell Signalling, 9331) antikorları kullanıldı. Bu antikorlar herhangi bir floresan boya ile konjuge olmadığından görüntüleme için floresan isaretleyicilerle konjuge sekonder antikorlar kullanıldı. CD133, CK-19 ve β cat antikorları fareden elde edildiğinden bunlara karşı anti mouse Alexa 555, ppGSK3 β 'e karşı anti-mouse FITC işaretleli ikincil antikorları kullanıldı. Bunun için, örnekler bloklama sonrasında ilk olarak, yukarıda açıklandığı gibi 1/50 oranında seyreltilmiş fare anti-CD133, 1/200 oranında seyreltilmiş fare CK-19 veya 1/100 oranında seyreltilmiş fare anti ppGSK3 β primer antikorları ile problandıktan sonra, 1:2500 oranında seyreltilmiş Alexa 555 (Invitrogen, A-31570) ve FITC (Chemicon, AP124F) işaretleli anti-fare IgG sekonder antikor ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi ardından yıkama işlemleri gerçekleştirilerek DAPI boyaması yapıldı.

3.6.7. İmmunositokimya

6 kuyulu kültür kapları içerisindeki 22 mm²'lik steril cam slaytlar üzerinde 10x10⁴ hücre ekildi ve 20 mM LiCl eklendikten 48 saat hücre kültür ortamı uzaklaştırılıp PBS ile yıkanarak soğuk metanol ile 5 dk fikse edildi. Fikse edilen hücreler özgül olmayan bağlanmaları engellemek için, %20 FBS içeren PBS-T ile oda ısısında 20 dk inkübe edildi. Bloklamanın ardından nemli ortam sağlaması amacıyla içerisinde yarı ıslak havlular olan kapalı kabın içinde, 6 kuyulu kültür kabındaki lamellerin üzerine, %2'lik FBS içeren PBS-T de sulandırılmış primer antikor LGR5 (Origene,TA301323) lamel yüzeyini kaplayacak (60 μ l) miktarda konuldu ve 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından yıkamalar yapıldı ve kit içeriğindeki UltraTek Anti-

Polyvalent ile 10 dk inkübasyonun ardından yıkama işlemi tekrarlandı. UltraTek HRP uygulamasının sonrası yeniden yıkanan slaytlara, 100 µl DAB-substrat (Dako, 3468) kromojeni eklendi ve negatif kontrolün boyama almadığı sürede renklendirme yapıldı. Tüm hücrelerde zıt boyama sağlayan hematoksilen boyasıyla 3 dk inkübe edilerek çekirdek boyaması yapıldı. Lamellerin lamalar üzerine kapatılması sırasında mounting medium kullanıldı (Dako, S3025). Negatif kontrollere birincil antikor yerine sadece % 1.5'lik FBS içeren PBS konuldu, bu adımın dışındaki tüm prosedür aynı şekilde uygulandı. Fotoğraflar ışık mikroskobu aracılığıyla alındı.

3.6.8. Western Blot

3.6.8.1. Total Protein İzolasyonu

Tanımlanan deney koşulları ile üretilerek, % 70-80 yoğunluğa ulaşmış hücreler soğuk PBS ile 2-3 kez yıkayıp proteinaz inhibitörü içeren 1ml soğuk PBS içerisinde hücre kazıyıcılarla kazılarak 1.5 ml' lik ependorf tüplerine toplandı. Elde edilen hücre süspansiyonu 2500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenip (Eppendorf Centrifuge 5415R) üst faz uzaklaştırıldı. Hücre pelleti üzerine, pelletin yaklaşık olarak 4 katı kadar buzda soğutulmuş RIPA liziz tamponu (50 mM pH 7.4 Tris-HCl, % 1 NP-40, % 0.25 sodyumdeoksikolat, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄) eklendi. Buz üzerinde 5 dk aralıklarla karıştırılarak 30 dk boyunca parçalanmış örnekler +4 °C'de soğutulmuş santrifüjde 13000 rpm devirde 15 dk santrifüjlendikten sonra total hücre proteinini içeren üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve elde edilen proteinlerin protein miktarı belirlenip, -80 °C'lik buzdolabında daha sonra kullanılmak üzere donduruldu.

3.6.8.2. Protein Miktar Tayini

Protein miktar belirlemesi için ticari olarak temin edilen BCA Protein Assay Kit (Pierce 23225) kullanıldı. Her bir tüpte farklı miktarlarda stok BSA (Pierce, 23209) içeren, BCA ve ddH₂O ilaveleriyle standart grafiği elde etmek üzere farklı seri konsantrasyonlarda BSA çözeltileri hazırlandı. Yine bunlara paralel olarak, miktarı tayin edilecek toplam protein lizatlarının her birinden 2 µl içeren (1/50 oranında seyreltilmiş protein solusyonu) ve aynı şekilde BCA ve ddH₂O ile reaktif solüsyonlar hazırlandı. Tüm örnekler tepkime gerçekleşmesi için 60

⁰C’ de 15 dk inkübe edildi. Isı altında içerdikleri protein miktarlarına orantılı şekilde değişiklik gösteren reaksiyon sonunda oluşan bikronik asit-bakır komplekslerinin absorbansı, Varioskan Flash Multimode Reader ile 562 nm dalga boyunda köre karşı ölçüldü. Bilinen BSA konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri kullanılarak çizilen standart doğrusal grafikten elde edilen eğim değeri kullanılarak diğer örneklerdeki bilinmeyen protein miktarları hesaplandı.

3.6.8.3. SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi

BioRad mini protein elektroforez sistemi (Mini-PROTEAN Electrophoresis Cell 165-3301) kılavuzunda tarif edildiği şekilde hazırlandı. Sisteme uygun jel hacmi yine kılavuza göre tanımlanıp ek tablolarında belirtilen bileşenler karıştırılarak ayırıcı ve istifleyici jeller hazırlandı. Öncelikle ayırıcı jel hazırlanıp ve iki cam arasına döküldü ve Jelin üzerini kaplayacak miktarda ddH₂O’ya doydurulmuş saf izoamil alkol eklenerek jelin polimerize olması beklendi. Ayırıcı jelin içereceği poliakrilamid konsantrasyonuna western blotlamada incelenecek proteinin büyüklüğüne göre karar verildi (Ek 8.3). Ayırıcı jel katılınca % 5’lik istifleme jeli hazırlanıp donan jel üzerine eklendi ve hemen uygun taraklar yerleştirilip istifleme jelinin katılması beklendi.

Konsantrasyonları belirlenmiş örneklerden eşit miktarlardaki proteinler, %12 β-ME (Applichem, A1108,0100) içeren 4X yükleme tamponu ile son konsantrasyon 1X olacak şekilde karıştırılıp, 95 ⁰C’ de 10 dk kaynatıldı. Kaynatılan örnekler oda sıcaklığına gelince, jelin kuyularına yüklendi. Protein göçünü izleyebilmek için jelin bir kuyusuna büyüklük belirteci (MBI Fermantas SM0671) yüklendi. Örnekler istifleyici jelin sonuna kadar 70 V’da, ayırıcı jelde ise 110 V sabit gerilimde 2-3 saat belirlenecek proteinin büyüklüğüne göre yürütüldü.

3.6.8.4. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi ve Bloklama

Uygun boyutlarda kesilen PVDF membran (millipore, IPVH15150) 40 sn metanol ile kalibre edilip su ile yıkandı. Membran ve whatman kağıtları Tris-Glisin transfer tamponu içinde en az 10 dk bekletildikten sonra transfer işlemine geçildi. 100 kD altındaki proteinler için yarı-kuru, 100 kD üzerindeki proteinler için ıslak transfer tercih edildi. Transfer sırasında

“Whatmann” kağıdı, jel, PVDF membran, “Whatmann” kağıdı yarı-kuru transfer cihazına (Hoefer SemiPhor- Pharmacia Biotech) veya ıslak transfer kasetlerine yerleştirildi ve jelin mm³’ü başına 3.5 - 5.5 mA olacak şekilde akım geçirilerek 12 V civarında, akım sabitlenilerek protein büyüklüğüne göre değişen sürelerde akım geçirilerek proteinlerin jelden membrana transferi yapıldı. Transferin ardından membran % 8’lik süt tozu % 0.5 Tween-20 içeren TBS-T tamponu ile 1 saat oda sıcaklığında bloklama işlemi gerçekleştirildi.

3.6.8.5. İmmünoiblotlama Deteksiyon

Primer antikorlarlar %4 süt tozu içeren TBS-T içinde optimizasyonla belirlenmiş konsantrasyonlarda, +4 °C’de gece boyunca inkübe edildi. Ardından membran en az 3 kere 10’ar dakikalık çalkalamalarla yıkandı. Daha sonra primer antikorun elde edildiği hayvana karşı ve ucunda HRP enzimi takılı antikor hazırlanarak membranlarla muamele edildi. Tüm yıkamaların ardından, Pierce dura (West Dura Extended Duration Substrate, 34075) veya pico (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat, 34077) gibi farklı deteksiyon solüsyonları kullanılarak, ışımaya duyarlı Kodak (5256441) filmler üzerinde sonuçlar görüntülendi. Kullanılan antikorlara ait bilgiler ve optimize edilmiş dilüsyon koşulları Tablo 3’de mevcuttur.

Tablo 3. Kullanılan antikorlar ve özellikleri

Firma/Katalog no	Köken	Antikor Adı	Dilüsyon*	Yöntem
Origene TA301323	Tavşan monoklonal	LGR5	1/250 , 1/50	WB/ICC
Cell Signalling CS-9331S	Tavşan poliklonal	pp-GSK3β	1/100	IF/WB
Santa cruz Sc-7963	Fare Monoklonal	β -katenin	1/200	IF
Santa cruz Sc-6278	Fare Monoklonal	CK19	1/1000	WB
Santa cruz sc-20691	Tavşan poliklonal	KLF4	1/500	WB
Cell Signalling CS-2750	Tavşan poliklonal	Oct-3/4	1/1000	WB
Santa cruz Sc-8987	Fare Monoklonal	HNF4α	1/250	WB
Santa cruz Sc-51515	Fare Monoklonal	ALB	1/500	WB
Santa cruz Sc-11397	Tavşan poliklonal	Kalneksin	1/2500	WB

*IF: immünofloresan, ICC : immunositokimya, WB: westernblotlama

3.6.9. Hücre Proliferyon Analizleri

3.6.9.1. BrdU İnkooperasyonu

Bu yöntem kullanarak proliferasyon değerdendirilmesi için 24 kuyucuklu hücre kültürü kabına önceden optimizasyon deneyi ile belirlenen 20×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekildi. Hücreler yaklaşık olarak gece boyunca yapışmalarını tamamladıktan sonra ortama 20 mM LiCl eklendi ve 48 saat sonra deney durdurulup proliferasyon değerdendirildi. Bunun için zaman dilimi dolmadan 4 saat önce kuyucuklara son konsatrasyon 30 μ M olacak şekilde BrdU eklenip 4 saat inkübatörde 37 °C’de bekletildi. Dört saatlik inkübasyon bitiminde hücreler PBS ile iki kez yıkanıp Etanol (Merck 1.11727.2500) ile 10 dk sabitlendi. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2N HCl (Merck K27564414) ile 20 dk inkübe edilip PBS ile 15 dk yıkandı ve PBS içerisinde hazırlanmış %1 BSA (Amresco 0332-1006) %0.5 Tween ile bloklandı. 1/500 dilüsyonda anti BrdU antikoru (DakoCytomation M0744) ile 1 saat inkübasyonun ardından PBS-T yıkamaları yapıldı ve peroksidaz işaretli ikincil antikor (Dako, 4061) ile 30 dakika inkübe edilip PBS-T ile yeniden yıkandı. DAB substrat kromojeni (Dakocytomation, K3468) eklenip, 1 dk inkübe edilen kromojen suyla yıkanıp çekirdeklerin belirlenmesi için hücreler hematoksilinle boyandı. Mikroskopta kuyucuk içerisinde belirlri 5 alandaki proliferen olan ve olmayan hücreler renklerine göre ayırt edilip sayıldı ve yüzde bölünen hücre sayısı bulundu. Deney dördtlü set halinde yapıldığından her koşulun ortalaması ve standart sapması belirlenip değerdendirildi ve istatistiki değerdendirme yapıldı.

3.6.9.2. DNA Floresan Işıması Temelli Hücre Proliferyon Testi

Bu deneyde DNA ya bağlanan floresan boya içeren bir kit olan *CyQUANT® NF Cell Proliferation Assay* (Invitrogen, C35006) kiti kullanıldı. Bu yöntem kullanarak proliferasyon değerdendirilmesi için 48 kuyucuklu hücre kültürü kabına önceden optimizasyon deneyi ile belirlenen 10×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekildi. Hücreler yaklaşık olarak gece boyunca yapışmalarını tamamladıktan sonra ortama 20 mM LiCl eklendi ve deneyin durdurulacağı her saat diliminde işlem gerçekleştirildi. Kit yönergesi doğrultusunda hazırlanan DNA boyası her kuyucuğa 100 μ l olacak şekilde eklenip 60 dk boyunca inkübatörde inkübe

edildi. Intensitesi 485 nm de eksitasyon 530 nm emisyon yapılacak şekilde floresan mikropate okuyucu kullanılarak elde edildi.

3.6.9.3. Elektronik Hücre Algılamaya Bağlı Gerçek Zamanlı Hücre Adezyonu Ve Çoğalmasının İncelenmesi

Bu işlem *xCELLigence-Roche Applied Science* cihazında aynı sisteme ait özel 16 kuyulu E-plateler kullanılarak (Roche, 06 324 738 001) yapıldı. İşlem öncesinde cihazın ve E-Platelerin kalibrasyonu için her kuyuya deney setine göre lityum içeren ve içermeyen 30 µl ortam eklenerek inkübatör içerisinde 1 saat kalibrasyon işlemi gerçekleştirildi. 48 saat lityuma maruz bırakılmış veya bırakılmamış *EpCAM+/CD133+* ve *EpCAM-/CD133-* hücreler kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekilerek cihaz başlatıldı. Cihazın okuma yaptığı ilk 9 saat adezyon analizi için kullanılmak üzere cihazdan 72. saate kadar cell indeks okuması alındı.

3.6.10. Motilite/ İnvazyon analizleri

İnvazyon deneyi için 8.0 mikron por çaplı matrijel kaplı ticari 24 kuyulu odacıklar (BD BioCoat), motilite deneyinde ise aynı por çapına sahip herhangi bir hücre dışı matriksle kaplı olmayan kontrol odacıklar (BD BioCoat, 354578) kullanıldı. Deneye başlamadan her iki deneyde kullanılacak odacıklar sırasıyla -20°C ve +4°C'den alınıp 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. İnvazyon odacıkları oda sıcaklığına gelince, üzerine %0 FBS olan DMEM eklenerek, motilite odacıklarına ise hiçbirşey eklemenden inkübatöre kaldırıldı. 2 saatin sonunda odacıklar inkübatörden alınarak içerisindeki ortam uzaklaştırıldı. Kuyuların içerisine deney koşullarına uygun şekilde 20 mM LiCl içeren ve içermeyen 750 µl %10 FBS'li DMEM eklendi. İçerisinde bu ortamlar olan bu kuyulara yukarıda anlatılan işlemlerden geçmiş odacıklar daldırıldı. Oluşturulan serum gradyanına göç etmesi için deney öncesinde 6 saat serum açlığında bırakılmış hücreler 500 µl hacimde 4×10^4 hücre olacak şekilde %2 FBS içeren DMEM ortamının içerisinde odacıklara ekildi. Bu işlemten sonra 24 saat kültüre edilen odacıklar aşağıdaki protokoldeki gibi fikse edilerek boyandı.

“*Diff-Quick*” kiti (Medion Diagnostic, 130832) kullanılarak fiksasyon ve boyama gerçekleştirildi. 24 saattin sonunda hücreler inkübatörden alındı. Odacıkların içerisindeki ortam tamamen uzaklaştırıldı. Hücrelerin fiksasyonunu sağlamak için, odacıklar 1dk süreyle fikse

edildi. Odacıklar hafifçe kurutma kağıdına tutularak kurumaları sağlandı. Bu işlemin ardından odacıklar hücre sitoplazmasını boyayan eozin temelli birinci boyada ve de hücre çekirdeğini boyayan hematoksilin temelli ikinci boyada sırasıyla birer dk tutuldu. Kuyular distile sudan geçirilip membranın alt kısmına geçen invaziv ve motil olan hücrelerin görüntülenebilmesi için kulak çöpü ile üstte kalan invaziv ve motil olmamış hücreler temizlendi. Mikroskop yardımıyla membran altında kalmış hücrelerin sayısı belirlendi.

3.6.11. Manyetik Hücre Seperasyonu (MACS)

HuH-7 hücre hattında, kanser kök hücreleri olarak tanımlanan *EpCAM*+/CD133+ hücreleri ve bu özelliği taşımayan *EpCAM*-/CD133- hücreleri ayırmak amacıyla, manyetik hücre seperasyon yöntemi kullanıldı. Bu amaçla 10×10^7 hücre içeren pellet 500 µl manyetik ayırlama solüsyonu (PBS içerisinde %5 FBS ve 2mM EDTA) içerisinde süspansiyon edilerek, sırasıyla 100 µm'lik ve 40 µm'lik süzgeçlerden geçirildi ve 4°C'de 2500 rpm de santrifüjlendi. Hücreler daha sonra 300 µl MACS solüsyonunda seyreltilerek, özgül olmayan antikor bağlanmalarını engellemek için 100 µl FcR (Fc Reseptör) bloklayıcı solüsyonu (Miltenyi, 130-059-901) ile blokladı. Toplamda 500 µl olan bu solüsyon içerisine, kitle önerildiği gibi 1/10 dilüsyonda olması için 50 µl *EpCAM*-FITC antikor (anti-*EpCAM*-FITC, miltenyi 130-080-301) eklendi. Bu antikorla +4°C karanlıkta 10 dakika inkübe edilen hücreler 2 kez 10 ml MACS buffer ile yıkanıp 2500 rpm de +4°C'de çöktürülerek bağlanmayan antikorların ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Elde edilen *EpCAM* ile işaretli hücreler içeren pellet, 300 µl manyetik ayırlama solüsyonu içerisinde çözöldü ve totalde 400 µl olan solüsyona 40 µl (1/10 oranında) anti-FITC magnetik boncuk eklendi (anti-FITC microbead, miltenyi 130-048-701). Bu hücreler +4°C'de karanlıkta 12 dk inkübe edilerek boncukların *EpCAM* ile işaretli hücrelerdeki anti *EpCAM* antikor ile konjuge olan FITC'lere yapışması sağlandı. Antikor işaretlemeinden sonra yapılan yıkama basamakları yenilendi. Manyetik alandaki özel pozitif ayırlama kolonlarına (Miltenyi,130-042-401) bu süspansiyon yüklenerek, manyetik boncuk ile işaretlenmiş hücreler kolonda tutulması sağlanarak işaretsiz olan hücrelerin ayırlama solüsyonu içerisinde kolona tutulmadan akması ve yeni bir tüpe toplanması sağlandı. Negatif olan hücreler negatif ayırlama kolonları aracılığıyla (Miltenyi, 130-042-901) pozitif hücrelerden tamamen temizlenerek saf *EpCAM*- populasyon elde edildi. Pozitif seleksiyon kolonunda oyalanan hücreler yapılan

yıkamaların ardından manyetik alanın kaldırılması ve basınç uygulaması ile elde edildi. Aynı işlemler birinci basamakta elde edilen fraksiyonlar kullanılarak sırasıyla CD133 için, CD133'e karşı üretilmiş konjuge antikör (anti-CD133-APC, miltenyi 130-090-826) ve APC ye karşı üretilmiş magnetik boncuklar (anti-APC microbead, miltenyi 130-090-855) ile tekrar edildi ve deney sonunda *EpCAM+/CD133+* ve *EpCAM-/CD133-* populasyonlar elde edildi. Son olarak, ayrımlanan hücrelerin bir miktarı flow sitometri ve immunfloresans boyamalarla konfirmasyon için kullanıldı. Ayrımlanmış hücreler kültürel edildikten sonra, daha sonraki deneyler için kullanıldı.

3.6.12. MACS Sonrasında Flow Sitometri Konfirmasyonu

MACS sonrası kültüre edilen hücreler, tripsinize edildikten sonra, 2500 rpm'de santrifüjlenerek pellet elde edildi. 100 µl MACS solüsyonu ile seyreltilen hücreler, 1/20 oranında EpCAM ve CD133'e spesifik iki farklı konjuge antikörle (anti-EpCAM-FITC, miltenyi 130-080-301, anti-CD133-APC, miltenyi 130-090-826) +4C'de karanlıkta 12 dk inkübe edildi. Bu şekilde işaretlenmiş olan hücreler PBS ile yıkanarak, Becton Dickinson , FACSCalibur cihazında APC ve FITC ye uygun lazerler kullanılarak BD CellQuestPro programı aracılığıyla analiz edildi.

3.6.13. İstatistik

Veriler istatistiksel program olan Graphpad Prism 5'ı kullanılarak veriye uygun şekilde tek yönlü ANOVA veya t-testi kullanılarak yapılmıştır.

3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi

Tez çalışması için yapılan araştırma planı aşağıdaki şekilde tablolastırılmıştır (Tablo 4.)

Tablo 4. Araştırma planı

2009- 2010	Lityumun hücre proliferasyonuna etkisi / mikrodizin verilerinin eldesi ve çözümlemelerinin yapılması
	Lityum uygulaması ardından elde edilen RNA lar ile yapılan mikrodizin çalışmasından elde edilen verilerle biyoinformatik çalışmalar yapıldı ve lityumun genom düzeyinde etkilediği moleküller ve KEGG yolları bilgisine ulaşıldı. Tüm HCC hücrelerinde lityum uygulamasının ardından RNA ve protein izolasyonları tamamlandı.
2010- 2011	Lityumun HuH-7 hücrelerinde biyolojik davranışa ve Tcf/Lef aktivitesine etkilerinin incelenmesi
	Lityumun HuH-7 hücrelerinde proliferasyon, motilite, invazyon ve Tcf/Lef aktivitesine etkileri incelendi.
2011- 2011	Lityumun literatürde bilinen ve bilinmeyen hedeflerinin ve de farklılaşma üzerindeki etkisinin aydınlatılması
	Lityumun Wnt/ β -katenin sinyal yolağıyla ilgili hedefleri aydınlatıldı ve de indüklediği <i>LGR5</i> gibi kök hücre genlerinin Wnt/ β -katenin yolağı düzenleyicileri tarafından regüle edildiği gösterildi, aynı zamanda lityumun pluripotensi ve farklılaşma genlerine olan etkisi incelendi.
2011-2012	HpKKH'lerin izolasyonu karakterizasyonu ve biyolojik davranışlara etkisi
	CD133 ve EpCAM belirteçleri kullanılarak kanser kök hücre gurubu HuH-7 hücreleri içerisinde ayrıldı ve de proliferasyon, motilite, invazyon, adezyon gibi biyolojik davranışları belirlenip , Wnt/ β -katenin sinyal yolağı incelendi.

2012-2013	Lityumun HpKKH'ler üzerinde etkisi
	Lityumun HuH-7 üzerindeki etkisini aydınlatmak için yapılan birçok biyolojik deney lityumun kök hücre grubuna etkiyi aydınlatmak için kullanıldı.

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Veriler istatistiksel program olan Graphpad Prism 5 ile veriye uygun şekilde tek yönlü ANOVA veya t-testi kullanılarak yapıldı.

3.9. Araştırmanın Sınırlıkları

*İlgilenilen her gen için gerçek zamanlı PCR yapılabilecek uygun primerlerin gen sekansının içeriğinden elde edilememesi ve de gerçek zamanlı PCR maliyetlerinin çok fazla olmasından dolayı, birçok gen için RT-PCR ile doğrulandı.

*Ticari olarak satılan Anti-LGR5 antikorları literatürde kullanılma henüz tam olarak girmemesine nedeniyle ile bu çalışmada üç farklı firmanın antikoru kullanıldı. Western blotta orta kalitede görüntüler elde edilmesine rağmen kaliteli bir LGR5 immünboyaması gerçekleştirilemedi. Bu sebeplerden dolayı zenginleştirdiğimiz hücre gruplarında LGR5 boyaması yapılamadı.

* MACS yöntemiyle CD133 ve EpCAM yüzey belirteçleri kullanılarak yapılan kanser kök hücre zenginleştirme yüksek oranda başarılı oldu. Fakat hücreler manyetik alandan elde edilip kültüre edildiklerinde, kültür süresinde kök hücre belirteçleri taşıyan hücrelerin oranı gittikçe azaldı. Bu durum biyolojik yanıtları anlamaya yönelik deneylerler tasarlarken kök hücrelerden gelecek olan yanıtların dilue olmasını sağlamaktadır.

3.10. Etik Kurul Onayı

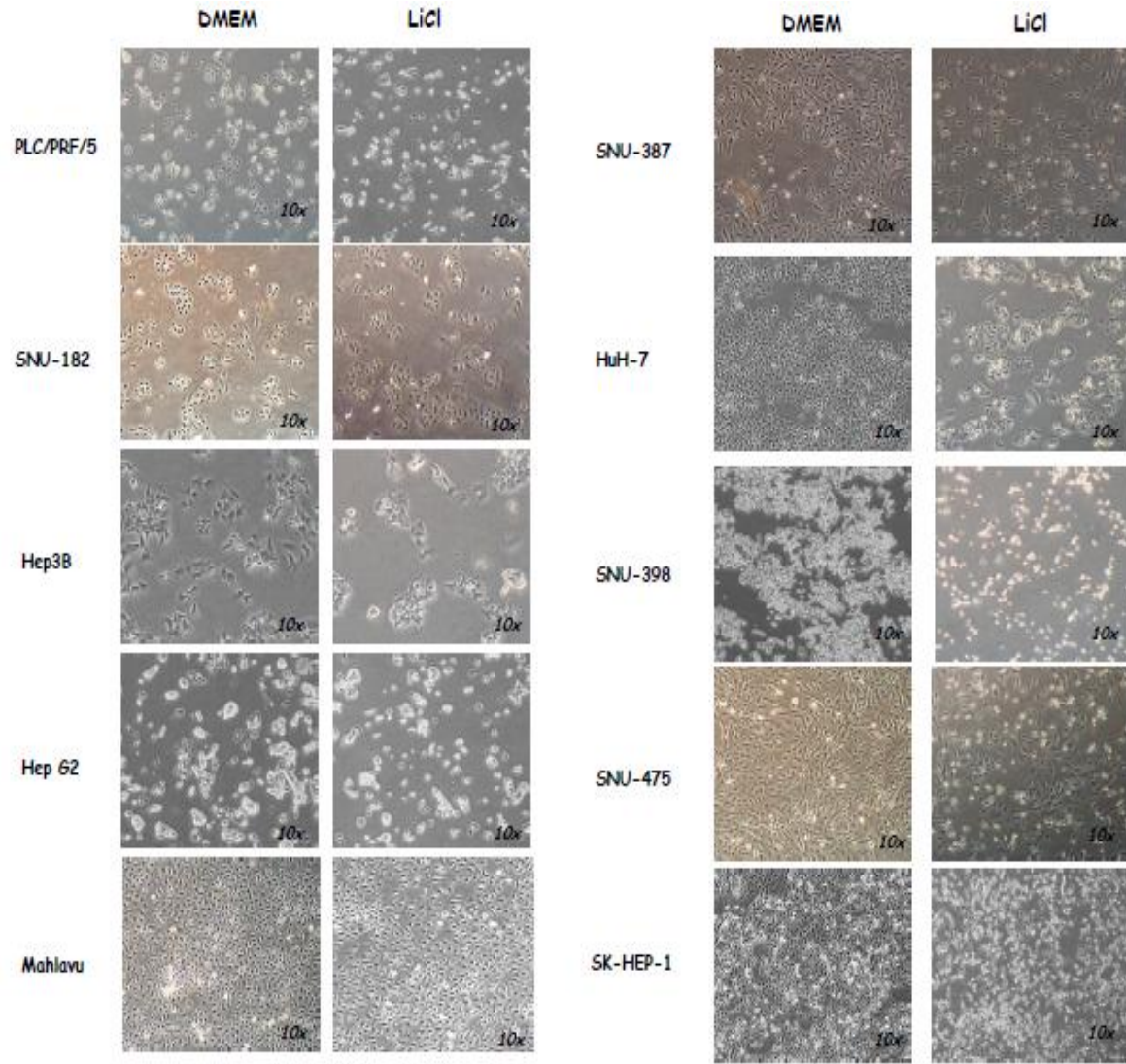
Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel olmayan Klinik Araştırmalar değerlendirme komisyonu tarafından 9 Eylül 2008 tarih ve 121/2008 Protokol numarası ile onaylanmıştır.(Etik kurul onayı ek 1'dedir)

4. BULGULAR

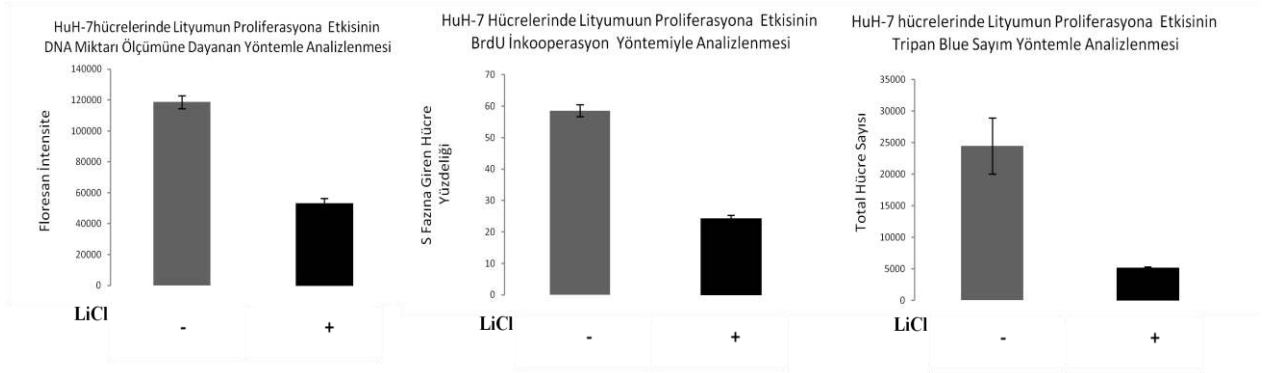
4.1. Hepatosellüler Karsinoma (HCC) Hücre Hatlarında Lityum Klorür'ün Biyolojik Davranışa Olan Etkileri

4.1.1. HCC Hücre Hatlarında Lityum Klorür Bağımlı Proliferasyon inhibisyonu

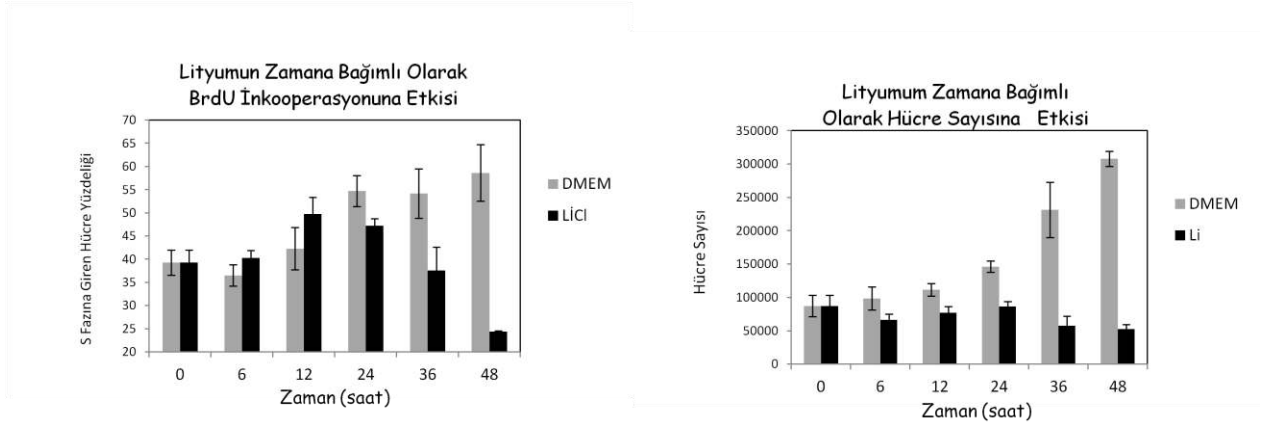
Grubumuzca yapılan çalışmalarda lityum klorür'ün farklı HCC hücre hatlarında çeşitli düzeylerde p16 ve p53 bağımsız şekilde proliferasyon inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir (Erdal E., 2005). Bu çalışma kapsamında da farklı 11 HCC hücre hattında (SNU-387, HuH-7, SNU-398, SNU-475, SK-HEP-1, PLC/PRF/5, Hep40, SNU-182, Hep3B, Hep G2, Mahlavu) aynı doz LiCl kullanıldığında çeşitli düzeylerde proliferasyon inhibisyonu yarattığı gözlemlendi (Şekil 9). Proliferasyon inhibisyonunun en etkin gözlemlendiği hücre hattı olan HuH-7 hücrelerinde LiCl'ün proliferasyona olan bu şiddetli etkisi farklı yöntemler ile konfirme edildi (Şekil 10). Bunun yanında farklı zaman dilimlerinde durdurulan deney setlerinde lityumun etkisinin zamana bağımlı olduğu sonucu elde edildi (Şekil 11).



Şekil 9. HCC hücre hatlarında 20 mM LiCl'ün meydana getirdiği proliferasyon inhibisyonunu



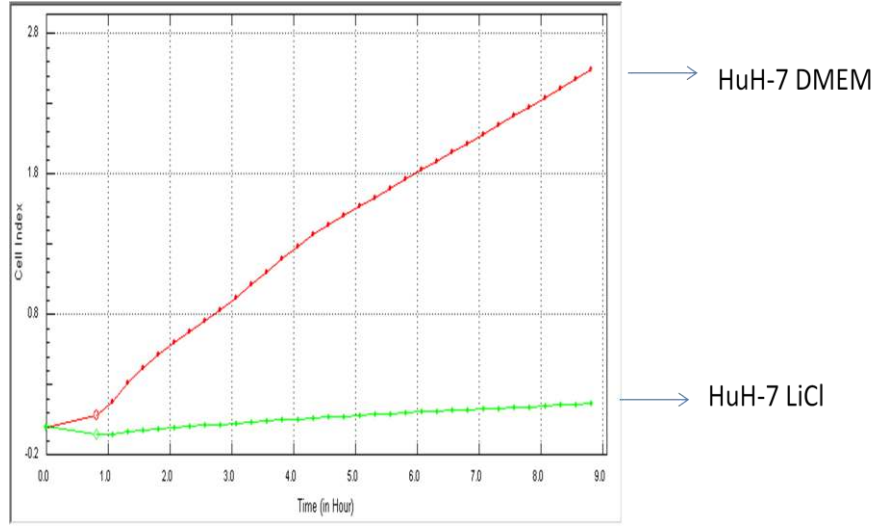
Şekil 10. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl'ün 48 saatte meydana getirdiği proliferasyon inhibisyonu (Tripin Blue sayımı, DNA miktarının florometrik analizi, BrdU inkorporasyonu)



Şekil 11. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl'ün meydana getirdiği proliferasyon inhibisyonunun zamana bağımlı değişimi (BrdU inkorporasyonu, DNA miktarının florometrik analizi)

4.1.2. HuH-7 Hücrelerinde Lityum Klorür Bağımlı Gerçek Zamanlı Adhezyon İnhibisyonu

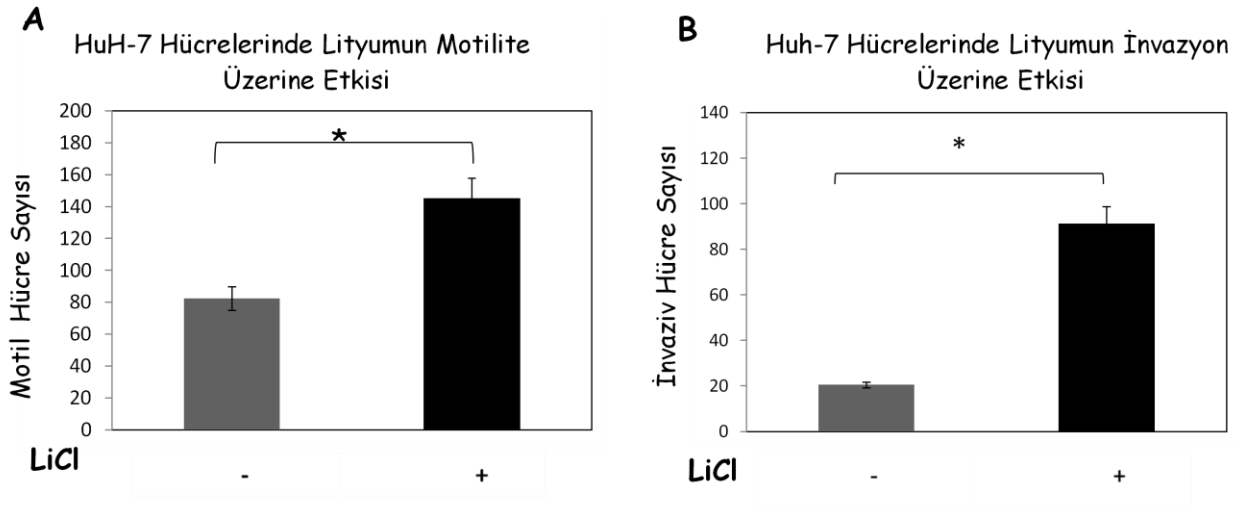
Lityum Klörür'ün gerçek zamanlı hücre adhezyonuna olan etkilerinin anlaşılması için *XCELLigence* cihazı kullanıldı. Yapılan deneylerde, HuH-7 hücrelerinde 48 saat LiCl uygulaması ardından yapılan adezyon deneyinde, lityumun kontrole göre başlangıçtan itibaren dokuzuncu saate kadar adezyonu azalttığı bulundu (Şekil 12).



Şekil 12. HuH-7 hücrelerinde 48 saat 20 mM LiCl uygulamasının hücrelerinde meydana getirdiği gerçek zamanlı hücre adezyon farklılıkları

4.1.3. HuH-7 Hücrelerinde Lityum Klorür Bağımlı Motilite/İnvazyon Aktivasyonu

LiCl'ün HCC hücre motilite ve invazyonuna olan etkilerini araştırmak üzere, 48 saat LiCl uygulanmış ve uygulanmamış hücreler, sırasıyla 8 μ m por büyüklüğüne sahip membran içeren kuyulara ekilerek, 24 saatlik motilite farklılıkları ve matrijelle kaplı motilite kuyularına ekilerek de 24 saatlik invazyon farklılıkları analiz edildi. Buna göre, LiCl'ün bu koşullarda kontrole göre, motilite ve invazyonu anlamlı şekilde arttırdığı gösterildi (Şekil 13).

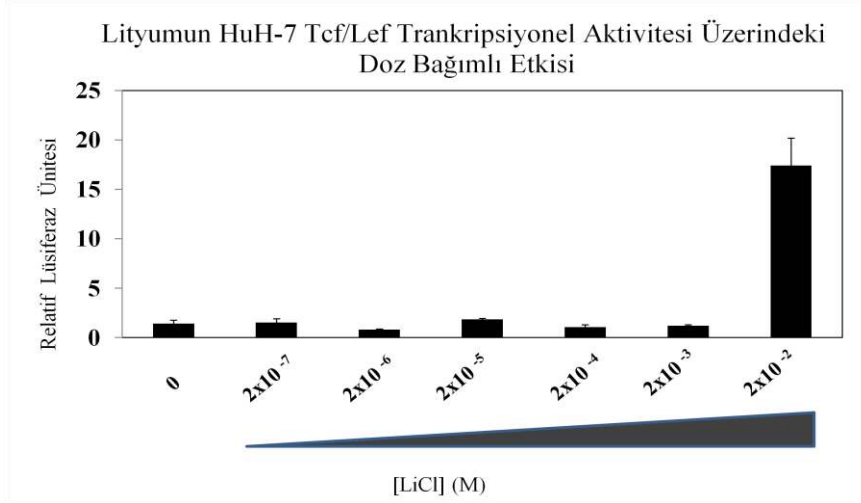


Şekil 13. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl'in 24 saatlik hücre motilitesi ve invazyonu üzerine etkisi etkisi **A**-Motilite **B**-İnvazyon (* $p<0.05$)

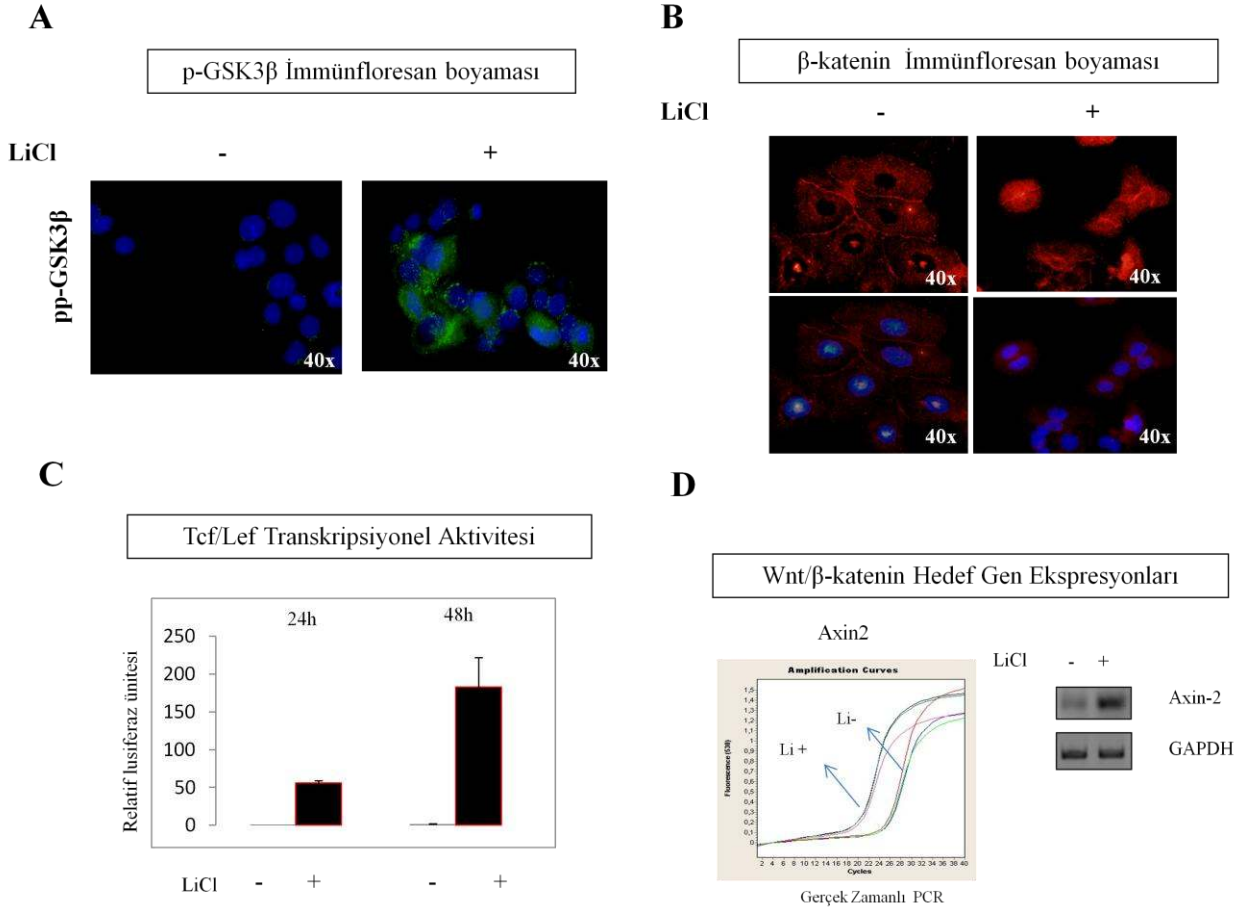
4.2. HuH-7 Hücrelerinde Lityum Klorür Bağımlı Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı Aktivasyonu

LiCl, literatürde HCC'de dahil farklı birçok modelde oldukça iyi tanımlanmış bir Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivatörü olarak kullanılmaktadır. Hepatokarsinogenezde bu sinyal yolağının önemli role sahip olduğu bilinmesine rağmen, hangi mekanizmalarda, hangi hedef moleküller aracılığıyla görev aldığı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Buna ek olarak LiCl'ün HCC hücre hatlarında böylesine etkin şekilde proliferasyonu durdurması, literatürde bilinen bilgiler ile açıklanması oldukça zor olan bir sonuçtur. Bu etkinin nedenlerini aydınlatmak üzere yapılacak mikrodizin çalışmalarından önce, LiCl'in farklı dozlarda Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonu test edilerek etkin ve toksik olmayan dozun belirlenmesi sağlandı. Bunun için 48 saat, farklı dozlarda LiCl uygulanmış HuH-7 hücrelerinde, Tcf/Lef transkripsiyonel aktivite ölçümü için lusiferaz reporter deneyi yapıldı. 20 mM altındaki dozlar HuH-7 hücrelerinde Tcf/Lef transkripsiyonel aktivite atışı sağlamazken, 20 mM üzerindeki dozlar hücreler üzerinde toksik etki yarattı. Bu deneyin sonucuna göre biyolojik davranış farklılıklarının en etkin gözlemlendiği 20 mM konsantrasyonun hücrelerde en ideal Tcf/Lef transkripsiyonel aktivasyonuna sebep olduğu tespit edildi (Şekil 14). Ek olarak HuH-7 hücrelerinde, 48 saat süre ile 20 mM LiCl

uygulanması, GSK3 β ser 9 ve 21 den fosforile inhibitör fosforilasyonlarının artmasına, β -kateninin çekirdeğe göçüne, Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesi artışına ve buna bağlı olarak Wnt/ β -katenin yolağının bilinen hedef genlerinden AXIN2 transkripsiyonunun artmasına neden olmuştur (Şekil 15).



Şekil 14. Lityumun HuH-7 hücrelerinde Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesi üzerindeki doz bağımlı etkisi



Şekil 15. LiCl'ün HuH-7'da Wnt/ β -katenin sinyal yolağında yarattığı etkilerin **A**-ppGSK3 β ekspresyonu (Yeşil-ppGSK3 β , mavi-DAPI çekirdek boyası) **B**- β -katenin (Kırmızı- β -katenin Alexa555, Mavi-DAPI çekirdek boyası) lokalizasyonu ve ekspresyonu **C**- Tcf/Lef transkripsiyonel aktivasyonunu **D**- AXIN-2 gen seviyesini ile araştırılması

4.3. HuH-7 Hücre Hattında Lityum Klorür Bağımlı Transkriptom Değişikliklerinin Modellenmesi

LiCl'in toksik olmadan biyolojik davranışlarda en etkin olduğu HuH-7 hücrelerinde yeni hedef mekanizma ve moleküllerin belirlenmesi amacıyla yapılan mikrodizin çalışmalarında, 48 saat 20 mM LiCl uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda üretilen HuH-7 hücreleri kullanıldı. Yapılan istatistiksel anlamlılık testinde, lityum uygulanmış HuH-7 hücrelerindeki 1807 genin

ekspresyon düzeyinin, lityum uygulanmamış hücrelerdekine göre anlamlı olarak değiştiği gözlemlendi (FDR<0,01) (Karakulah G. Yayınlanmamış veri).

Yapılan GSEA'lerde Wnt hedef genlerin, lityum etkisinde ekspresyonu artan ya da azalan genlerimiz arasında anlamlı ölçüde değişime uğradığı bulunmuştur. Bu analiz için kullanılan Wnt hedef gen kümesi; *MYC, CCND1, TCF1, LEF1, PPARD, JUN, FOSL1, PLAUR, MMP7, AXIN2, NRCAM, TCF4, GAST, CD44, EFNB2, EFNB1, BMP4, CLDN1, BIRC5, VEGF, FGF18, ATOH1, MET, EDN1, MYCBP, L1CAM, ID2, TIAM1, NOS2A, DKK1, FGF9, FGF20, LGR5, SOX9, RUNX2, GREM2, SALL4, TNFSF11, CYR61, PTTG1, DLL1, FOXN1, MMP26, NANOG, FZD7, FST, ISL1, MMP9, MMP2, PITX2, EGFR, CDKN2A, IL8* genlerinden oluşmaktadır.

Bu çalışma kapsamında yapılan analizlerde, ekspresyonu anlamlı olarak artan genlerin artış miktarları 16.89 kat ile 1.47 kat aralığında değişim gösterirken, ekspresyonu azalan genlerde ise değişim miktarı 18.00 ile 1.47 aralığında bulundu. Tüm ekspresyonel değişimler göz önüne alındığında ekspresyonu en çok artan gen BCL2-interacting killer (16.89 kat), ekspresyonu en çok azalan gen ise N-acetyltransferase 8 (18.00 kat) geni olarak belirlendi. Azalan yirmi iki artan on yedi olmak üzere toplamda otuz dokuz genin ekspresyonu 5 ve üzeri kat değişmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Mikrodizin analizinde HuH-7 hücrelerinde LiCl uygulanmasıyla 5 kat ve üzeri değişim göstermiş genlerin listesi

Gen Sembolü	Gen Adı	Entrez Gen ID	Biyolojik Süreçlerdeki Rolü	Mikrodizindeki Karlı artış
Artan Genler				
<i>BIK</i>	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	638	Apoptoz indüklenmesi	16.89
<i>LGR5</i>	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5	8549	Kök hücre devamlılığı	13.48
<i>RFX6</i>	Regulatory factor X, 6	222546	Farklılaşma ve transkripsiyon regülasyonu	13.06
<i>PHLDA1</i>	Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	22822	Apoptoz regülasyonu	9.45
<i>EPHA5</i>	EPH receptor A5	2044	Hücreler arasındaki iletişim	8.38
<i>AXIN2</i>	AXIN2	8313	Wnt sinyali regülasyonu	7.37
<i>FHL2</i>	Four and a half LIM domains 2	2274	Myogenez	6.66
<i>RELN</i>	Reelin	5649	Hücre morfogenezi ve adezyonu	6.34
<i>FAM46C</i>	Family with sequence similarity 46, member C	54855	Bilinmiyor	6.27

<i>GLIPR1</i>	GLI pathogenesis-related 1	11010	Farklılaşma	6.16
<i>TSC22D3</i>	TSC22 domain family, member 3	1831	Apoptoz, inflamasyon ve transkripsiyon regülasyonu	6.10
<i>KLF4</i>	Kruppel-like factor 4 (gut)	9314	Farklılaşma, hücre döngüsü inhibisyonu, organ gelişimi	5.92
<i>UGT1A1</i>	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1	54658	Detoksifikasyon	5.82
<i>GAL</i>	Galanin prepropeptide	51083	Glukoz ile indüklenen insülin sekresyonunun inhibisyonu, büyüme hormonu salgılanması, gastrointestinal hareketin modülasyonu	5.80
<i>VCAN</i>	Versican	1462	Hücre adezyonu, proliferasyonu, migrasyonu ve angiogenezi, doku morfogenez ve devamlılığı	5.64
<i>SSR3</i>	Signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma)	6747	ER yerleşimli proteinlerin regülasyonu	5.33
<i>HNRNPD</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa)	3184	mRNA metabolizması ve taşınımı	5.19
Azalan Genler				
<i>NAT8</i>	N-acetyltransferase 8 GCN5-related, putative)	9027	Hücre adezyonu ve gastrulasyon regülasyonu	18.01
<i>CDKN2C</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	1031	Hücre döngüsü inhibisyonu	10.36
<i>NR1H4</i>	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	9971	Safra asidi sentezi ve transportu	9.66
<i>PALMD</i>	Palmdelphin	54873	Bilinmiyor	7.86
<i>SPTLC3</i>	Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 3	55304	Lipit metabolizması	7.61
<i>KNG1</i>	Kininogen 1	3837	Trombin fonksiyonları ve pıhtılaşmanın regülasyonu	6.74
<i>PDZK1</i>	PDZ domain containing 1	5174	cAMP yapısı ve trafiği, iyon kanalı aktivitesi	6.67
<i>ATP2B2</i>	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2	491	Hücre membranı boyunca kalsiyum transportu	6.66
<i>NAT8B</i>	N-acetyltransferase 8B (GCN5-related, putative, gene/pseudogene)	51471	Gastrulasyon	6.54
<i>METTL7A</i>	Methyltransferase like 7A	25840	Bilinmiyor	6.52
<i>GABRB1</i>	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 1	2560	Sinaptik ileti	6.31
<i>SLC30A10</i>	Solute carrier family 30, member 10	55532	Çinko iyon transportu	6.10
<i>AIM1</i>	Absent in melanoma 1	202	Bilinmiyor	6.08
<i>B9D1</i>	B9 protein domain 1	27077	Silliogenez	5.93

<i>HAVCR1</i>	Hepatitis A virus cellular receptor 1	26762	Organizmalar arasındaki türler arası iletişim	5.87
<i>SRI</i>	Sorcin	6717	Kalsiyum homeostazı	5.78
<i>ODZ2</i>	Odz, odd Oz/ten-m homolog 2 (Drosophila)	57451	Hücreler arası sinyal dönüştürücü	5.47
<i>HSD17B2</i>	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	3294	Steroid metabolizması	5.41
<i>NIPSNAP3A</i>	Nipsnap homolog 3A (C. elegans)	25934	Bilinmiyor	5.36
<i>KLB</i>	Klotho beta	152831	Kolesterol ve safra kesesi metabolizması	5.25
<i>ASPM</i>	Asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	259266	Mitotik iplikçik regülasyonu ve nörogenezi	5.14
<i>TMEM200A</i>	Transmembrane protein 200A	114801	Bilinmiyor	5.11

WebGestalt veri tabanı kullanılarak ekspresyonu anlamlı olarak değişmiş gen setinin ilişkili oldukları *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) yolları belirlendi. Ekspresyonu değişen gen setinin ilişkili olduğu yüz kırk iki KEGG yolağının biyoinformatik çözümlemesinde on sekizinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,01$) (Tablo 6). Analiz sonuçlarına göre ortaya çıkan KEGG yolları içerisinde çeşitli alt başlıklarda incelenebilen metabolizma değişimlerinin öne çıkması dikkat çekicidir. Bu sonuçlar ışığında LiCl'in hepatosellüler karsinoma hücrelerinde dolaylı ve direk olarak değişen metabolik faaliyetlere etki ettiği açıktır.

Tablo 6. HuH-7 da LiCl'in etkisiyle anlamlı düzeyde etkilenen KEGG yolları (p<0.05) ve bu yollarla ilişkili genlerin listesi

Biyolojik olay	KEGG yolağı	p- değeri	Bu yollarındaki değışen genler
Amino asit metabolizması	Arjinin ve prolin metabolizması	0.0257	ACY1, AGXT2, AOC2, ARG2, GAMT, GLS
	Glisin, Serin ve threonin metabolizması	0.0273	
Kanser	Kolorektal Kanser	0.0329	ACVR1C, AXIN2, FOS, FZD1, FZD7, CDH1, COL4A6, FGFR2, FH, ITGA2, JUP, KITLG
	Kanser sinyal yolları	0.0458	
Karbonhidrat metabolizması	Askorbat ve aldarat metabolizması	0.0004	FH, GBA3, IDH2, PCK2, UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A9
	Pentoz ve glukuronat dönüşümleri	0.0005	
	Nışasta ve şükroz metabolizması	0.0015	
	Sitrat döngüsü (TCA döngüsü)	0.0251	
Endokrin ve metabolik hastalıklar	Gençlerde diyabet başlangıcı	0.0122	NR5A2, PAX6, SLC2A2
Endokrin sistem	Androjen ve östrojen metabolizması	9.89E-005	ACSL1, ACSL5, CPT1A, CPT2, HSD17B2, NFKBIB, PCK2, SLC27A2, SORBS1, SRD5A3, UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A9
	PPAR sinyal yolağı	0.0006	
	Adipositokin sinyal yolağı	0.0137	
Enerji metabolizması	Nitrojen metabolizması	0.0122	CA13, CHST13, GLS, HAL, SULT1A1
	Sülfür metabolizması	0.0217	
İmmun sistem	Komplement ve pıhtılaşma kaskadı	9.20E-005	C3, C4BPB, CD55, CFB, CPB2, F12, KNG1, SERPING1
Lipid metabolizması	Yağ asidi metabolizması	0.0108	ACSL1, ACSL5, CPT1A, CPT2
Kofaktör ve vitamin metabolizması	Porfirin ve klorofil metabolizması	3.30E-007	BLVRB, CP, MMAB, PPOX, UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A9
	Retinol metabolizması	0.0257	
Diğer aminoasit metabolizması	Glutasyon metabolizması	0.0028	GSTA2, GSTA4, GSTK1, IDH2, RRM2
Sinyal molekülleri ve interaksyon	ECM-reseptör ilişkisi	0.0329	COL4A6, HMMR, ITGA2, RELN, SDC1
Ksenobiyotik degradasyonu ve metabolizması	Sitokrom P450 tarafından ksenobiyotik metabolizması	0.0003	GSTA2, GSTA4, GSTK1, UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A9
	İlaç metabolizması- sitokrom P450	0.0004	
	İlaç metabolizması- Diğer enzimler	0.0138	

WebGstalt veri tabanıyla yapılan GO terimleri çözümlemesinde ise, ekspresyonel olarak değişim gösteren gen setlerinin ilişkili olduğu biyolojik süreçler, moleküler işlevler ve hücre bileşenleri bilgileri olasılık değerleri ile birlikte elde edildi. Gen setinin ilişkili olduğu elli altı biyolojik süreç, on sekiz moleküler işlev ve on üç hücre bileşeni olmak üzere 3 ayrı GO kategorisinden seksen yedi GO terimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,01$) (Tablo 3). Analiz sonuçlarına göre ortaya çıkan GO terimleri incelendiğinde biyolojik süreçler içerisinde metabolizma ve hücre döngüsü terimleri ile ilişkili gen sayıları diğer süreçlere göre çok yüksektir. Lityumun metabolizma üzerindeki etkisi, hem "*GO term*" çözümlemesinde hem de KEGG yolağı analizlerinde ortaya çıkması lityumun çarpıcı bir şekilde metabolizma regülasyonunda rol oynadığını göstermektedir. Hücre döngüsü ile ilgili "*GO term*" ile ilişkili gen sayılarının yüksek olması biyolojik verilerle doğrulanan hücre döngüsü duraklamasını temsil ettiğinden in siliko analizlerin iç kontrolü gibi değerlendirilebilir. Moleküler işlevler açısından GO terimleri incelendiğinde ise metabolizmayla ilişkili olabilecek enzimatik aktivite terimleri ön plandadır. Tüm bu veriler ışığında lityumun metabolizma üzerinde etkin olduğu sonucu çıkmaktadır.

Tablo 7. Gen setine ait 3 ayrı sınıftaki istatistiksel açıdan anlamlı GO terimleri ile seviyeleri ve bu terimlerle ilişkili gen sayıları ile olasılık değerleri.

Biyolojik süreç terimleri			
Seviye	GO terimi	GO terimi ile ilişkili gen sayısı	Olasılık değeri
3	metabolism	493	1.52E-03
4	cell cycle	68	1.74E-03
4	chromosome segregation	9	9.80E-04
4	blood coagulation	13	5.63E-03
4	urea cycle intermediate metabolism	4	6.48E-03
5	M phase	28	1.66E-04
5	mitotic cell cycle	29	2.33E-04
5	regulation of cell cycle	46	4.25E-03
5	amine metabolism	47	9.79E-07
5	aromatic compound metabolism	16	3.83E-04
5	organic acid metabolism	56	7.51E-07
5	sister chromatid segregation	6	9.89E-04
5	amino acid and derivative metabolism	38	6.73E-06
5	regulation of blood coagulation	4	6.48E-03
5	acute inflammatory response	11	3.15E-03

5	wound healing	14	6.18E-03
6	M phase of mitotic cell cycle	25	4.50E-05
6	regulation of progression through cell cycle	46	3.71E-03
6	amine biosynthesis	12	2.00E-03
6	amine catabolism	11	8.87E-04
6	aromatic compound catabolism	6	2.91E-04
6	nitrogen compound biosynthesis	12	2.00E-03
6	carboxylic acid metabolism	55	1.43E-06
6	mitotic sister chromatid segregation	6	6.82E-04
6	negative regulation of blood coagulation	4	6.48E-03
6	nitrogen compound biosynthesis	12	2.00E-03
7	mitosis	24	9.85E-05
7	amino acid biosynthesis	11	1.75E-04
7	amino acid catabolism	11	5.07E-04
7	amine biosynthesis	12	2.00E-03
7	deoxyribonucleotide metabolism	5	2.16E-04
8	mitotic sister chromatid segregation	6	6.82E-04
8	iron ion homeostasis	7	1.84E-04
8	transition metal ion homeostasis	7	7.59E-04
8	Microtubule cytoskeleton organization and biogenesis	11	1.73E-03
8	glutamine family amino acid biosynthesis	5	6.44E-03
8	aromatic amino acid family catabolism	4	6.48E-03
8	L-phenylalanine metabolism	4	2.79E-03
8	arginine metabolism	4	6.48E-03
8	phospholipid biosynthesis	11	4.72E-03
8	pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism	3	3.62E-03
8	transition metal ion transport	8	6.88E-03
8	Microtubule cytoskeleton organization and biogenesis	11	1.73E-03
8	activation of plasma proteins during acute inflammatory response	7	9.32E-03
8	pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism	3	3.62E-03
9	positive regulation of mitosis	3	3.62E-03
9	Intracellular sequestering of iron ion	2	5.64E-03
9	spindle organization and biogenesis	6	3.36E-03
9	L-phenylalanine catabolism	4	2.79E-03
9	arginine catabolism	3	3.62E-03
9	glutamine family amino acid biosynthesis	5	6.44E-03
9	RNA splicing\, via endonucleolytic cleavage and ligation	2	5.64E-03
9	tRNA splicing	2	5.64E-03
9	complement activation	7	9.32E-03
10	positive regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	2	5.64E-03
10	tRNA splicing	2	5.64E-03
Moleküler işlev terimleri			
Seviye	GO terimi	GO terimi ile ilişkili gen sayısı	Olasılık değeri
2	catalytic activity	363	1.70E-05
3	ligase activity	31	8.45E-03
3	oxidoreductase activity	70	4.87E-05

4	ligase activity forming carbon-sulfur bonds	6	2.99E-04
4	oxidoreductase activity acting on the OH-CH group of donors	8	6.02E-15
4	transferase activity transferring alkyl or aryl (other than methyl groups)	9	1.25E-03
5	fatty acid ligase activity	4	1.68E-03
5	oxidoreductase activity, oxidizing metal ions oxygen as acceptor	2	5.69E-03
5	glutathione transferase activity	5	2.57E-03
6	long chain fatty acid CoA ligase activity	4	1.68E-03
6	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) activity	2	5.69E-03
6	2,4 dienoyl CoA reductase (NADPH) activity	2	5.69E-03
6	amine oxidase activity	3	3.67E-03
6	ferroxidase activity	2	5.69E-03
6	N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferase activity	3	3.67E-03
7	succinate CoA ligase (GDP forming) activity	2	5.69E-03
8	carnitine O acyltransferase activity	3	6.94E-03
9	single stranded DNA specific exodeoxyribonuclease activity	2	5.69E-03
Hücre bileşeni terimleri			
Seviye	GO terimi	GO terimi ile ilişkili gen sayısı	Olasılık değeri
4	İntracellular	536	3.77E-05
5	İntracellular part	504	8.99E-05
5	organelle	439	1.77E-03
6	cytoplasm	264	4.84E-05
6	embrane bound organelle	401	2.66E-04
6	intracellular organelle	463	1.74E-03
7	cytoplasmic part	191	3.85E-04
7	intracellular membrane bound organelle	401	2.55E-04
7	FACIT collagen	3	6.97-E03
8	mitochondrion	69	9.98-E05
8	microbody	19	5.66E-07
9	peroxisome	19	5.66E-07
10	BRCA1 BARD1 complex	2	5.61E-03

Lityumun global olarak gen ekspresyonu üzerine yaptığı değişikliklerin anlaşılması için literatürdeki çalışmalarda birçok farklı modelde değişen süre ve dozlarda lityum uygulaması yapıldı. Bu nedenle Python programlama dili ile yazılmış komut dosyası kullanarak bu çalışmalarda değişen genler ile bizim çalışmamızda değişen genlerin haritalanması yapıldı. Tablo 8'de lityumun literatürde ve bizim çalışmamızda yarattığı gen değişimlerinin ve bunların fonksiyonlarının listesi bulunmaktadır. Bu değerlendirmede kullanılan çalışmalar farklı türlerden canlılar içerdiğinden MGI Mammalian Orthology database aracılığıyla kullanılan memeli gen

sembolleri (Sıçan, fare vb.) insan gen sembollerine dönüştürüldü. Yapılan eşleşmelerin ardından daha önceki çalışmalarla bizim çalışmamız arasında lityum hedef geni olan 33 farklı gen bulundu.

Tablo 8. HuH-7 ve literatürdeki diğer çalışmalarda kullanılan modellerde lityumun ortak hedef genlerin listesi.

Fonksiyon	Gen sembolü	Açıklama	Entrez Gen ID	Kaynak
ATP sentezi ve hidrolizi	ATP2A2	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	488	Youngs ve ark., 2006
	ATP2B2	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2	491	Youngs ve ark., 2006
Hücre adezyonu	ATRN	attractin	8455	Youngs ve ark., 2006
	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	2263	McQuillin ve ark., 2007
	MCAM	melanoma cell adhesion molecule	4162	Youngs ve ark., 2006
Büyüme faktörleri, büyüme regülatörleri ve hücre döngüsü	CCNB2	cyclin B2	9133	Zhang ve ark., 2005
	CCNG2	cyclin G2	901	Zhang ve ark., 2005
	RACGAP1	Rac GTPase activating protein 1	29127	Youngs ve ark., 2006
Hücre içi sinyal ileti yolağı	ERCC1	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)	2067	Zhang ve ark., 2005
Kromatin ile ilişkili protein bileşenleri	HIST1H1C	histone cluster 1, H1c	3006	McQuillin ve ark., 2007, Zhang ve ark., 2005
Prptein katlanması ve trafiğı	FKBP5	FK506 binding protein 5	2289	McQuillin et al., 2007
Sinyal iletimi	GPR37	G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like)	2861	McQuillin ve ark., 2007
	GTPBP5	GTP binding protein 5 (putative)	26164	Youngs ve ark., 2006
Sinyal iletimi	SSTR2	somatostatin receptor 2	6752	Sun ve ark., 2004
Transkripsiyon faktörleri ve regülasyonu	TSC22D3	TSC22 domain family, member 3	1831	McQuillin ve ark l., 2007
	ATF3	activating transcription factor 3	467	Brandish ve ark., 2005
Çeşitli moleküllerin zardan ulaşımı	SLC2A2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2	20526	Brandish ve ark., 2005
Çeşitli	ACTL6A	actin-like 6A	86	Youngs ve ark., 2006
	AXIN2	AXIN 2	8313	Cheshire ve ark., 2004
	C6orf70	chromosome 6 open reading frame 70	55780	Seelan ve ark., 2008

HAGH	hydroxyacylglutathione hydrolase	3029	Rojek ve ark., 2005
HNRPDL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	9987	McQuillin ve ark., 2007
HSD11B2	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2	3291	Rojek ve ark., 2005
KIAA0776	UFM1-specific ligase 1	23376	Zhang ve ark., 2005
PAPOLA	poly(A) polymerase alpha	10914	Seelan ve ark., 2008
PFKL	phosphofructokinase, liver	5211	Bosetti ve ark., 2002
PIGO	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class O	84720	Youngs ve ark., 2006
PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	5366	Zhang et al., 2005
POPDC3	popeye domain containing 3	64208	Zhang ve ark., 2005
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1	8651	Bosetti ve ark., 2002
STXBP5	syntaxin binding protein 5 (tomosyn)	134957	Brandish ve ark., 2005
SULT1A1	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1	6817	McQuillin ve ark., 2007
TST	thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)	7263	McQuillin ve ark., 2007

Çalışmamızda HuH-7 hücrelerinde lityumun, GSK3 β inhibitör fosforilasyonlarının artmasına, β -kateninin çekirdeğe göçüne, Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesine sebep olduğu gösterildi. HCC'de TCF ailesi üyelerinden en aktif olarak eksprese olan transkripsiyon faktörleri TCF4 ve LEF1'dir ¹⁵¹. In siliko analizlerimiz sonucu ortaya konan, lityum varlığında ekspresyonu değişen genlerin ne kadarının Tcf/Lef transkripsiyon faktörü ile regüle edildiğini anlamak için, promotor bölgesinde, tanımlanmış çeşitli TCF4 ve LEF1 motifleri içeren gen setleri kullanıldı. ¹⁵² Bu gen setleri ile bizim verilerimiz örtüştürülerek, TCF4 ve LEF1 ile transkripsiyonu primer olarak kontrol edilen hedef genler bulunmuştur (Tablo 9).

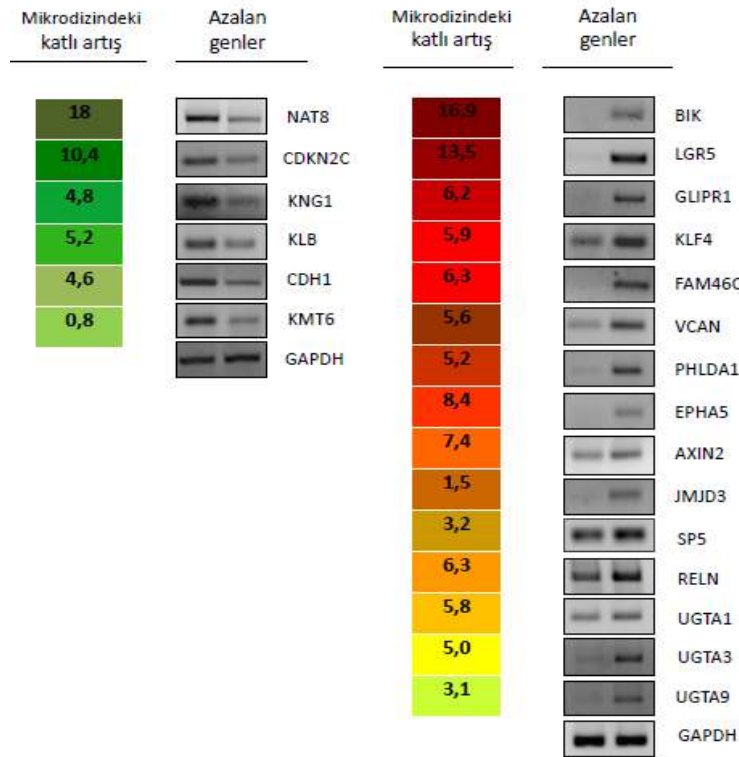
Bu genler içerisinde, *SORBS1*, *SLC17A2*, *PLSCR3*, *KHDRBS1*, *PLA2G4A*, *ANK3*, *UCP2*, *EPHA2*, *RCN1*, *ACSL5*, *SLC6A14*, *DTNA*, *EFNA1*, *GRIA3*, *FZD7* genleri promotorlarında farklı motifler içerdiğinden birden çok gen kümesi altında tanımlandı. Lityum etkisiyle değişmiş ve de promotorunda TCF4 ve LEF1 bağlanma bölgesi içeren toplamda 59 farklı gen mevcuttur. Bu analiz sonucunda tüm genlerin primer olarak TCF ve LEF transkripsiyon faktörleri tarafından yönlendirilmediği ortaya kondu. Lityumla değişen gen havuzunda, Tcf/Lef bağımlı veya bağımsız başka mekanizmaların tetiklenebileceği, değişen genlerin ikincil Tcf/Lef hedef genleri

olabileceği ve β -kateninin başka hedef transkripsiyon faktörleri üzerinden de gen ekspresyonunu etkileyebileceği düşünülmüştür.

Tablo 9. Mikrodizin analizinde HuH-7 hücrelerinde LiCl ile transkripsiyonu değişen genler içerisinde promotorunda Tcf/Lef bağlanma bölgesi içeren genlerin listesi

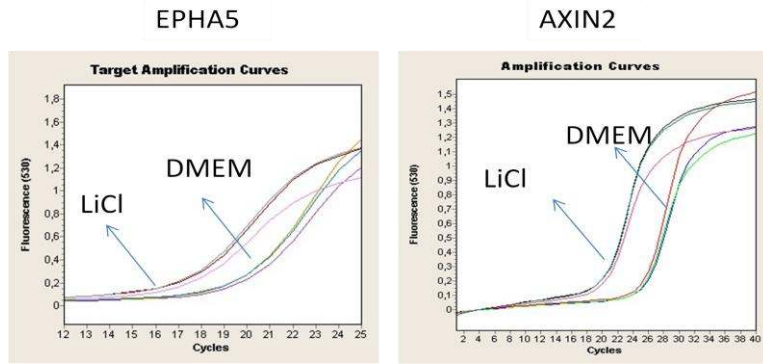
<i>Matrix ismi</i>	<i>Açıklama</i>	<i>Lityum etkisinde artan genler ile örtüşeler</i>	<i>Lityum etkisinde azalan genler ile örtüşeler</i>
V\$TCF4_Q5	Promotor bölgesinde transkripsiyon başlama bölgesi yakınlığında [-2kb, 2kb] SCTTTGAW motifi içeren ve TCF4 transkripsiyon faktörü ile örtüşen genler.	<i>SORBS1, SLC17A2</i>	<i>UCP2</i>
V\$LEF1_Q6	Promotor bölgesinde transkripsiyon başlama bölgesi yakınlığında [-2kb, 2kb] SWWCAAAGGG motifi içeren ve TCF1, LEF1, LF-B1, HNF1 transkripsiyon faktörü ile örtüşen genler.	<i>GAP43, SORBS1, SLC17A2, WEE1, EFNA1, KHDRBS1</i>	<i>PLSCR3</i>
V\$LEF1_Q2	Promotor bölgesinde transkripsiyon başlama bölgesi yakınlığında [-2kb, 2kb] TCAAAG motifi içeren ve TCF1, LEF1, LF-B1, HNF1 transkripsiyon faktörü ile örtüşen genler.	<i>ACSL5, PLA2G4A, SORBS1, EPHA2, RCN1</i>	<i>UCP2, ANK3</i>
CTTTGA_V\$LEF1_Q2	Promotor bölgesinde transkripsiyon başlama bölgesi yakınlığında [-2kb, 2kb] CTTTGA motifi içeren ve LEF1, transkripsiyon faktörü ile örtüşen genler.	<i>ACSL5, PLA2G4A, AOC2, KITLG, SLC6A14, DTNA, SORBS1, SLC17A2, EPHA2, RCN1, NXF1, ABCF2</i>	<i>TNRC15, AGXT2, CLIC6, PPAN, GRIA3, PCK2, MT2A, JAG1, ANK3, FZD7, NINJ2, UCP2</i>
CTTTGT_V\$LEF1_Q2	Promotor bölgesinde transkripsiyon başlama bölgesi yakınlığında [-2kb, 2kb] CTTTGT motifi içeren ve LEF1, transkripsiyon faktörü ile örtüşen genler.	<i>FBXO31, FOS, TRIB1, EFNA1, HNRPD, LUC7L, SOCS5, AXIN2, ST7, KHDRBS1, PRKRIP1, TP53, MGEA5, ZNF583, GABPB2, ITGA2, TLE3, DDX31, SLC6A14, DTNA, ABCC5, WDR3, BTG2</i>	<i>PLSCR3, GPR133, GRIA3, FLJ32312, LOX, PAK7, GC, AKAP7, RHOTB1, FLJ25476, ANK3, ANXA6, FZD7</i>

Mikrodizin yöntemi kullanılarak elde edilen verinin başka konvensiyonel yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir. Bu amaçla, mikrodizin deneyleri ile aynı koşullarda elde edilen RNA'lar kullanılarak, rastgele olarak seçilen yirmi beş gendeki LiCl bağımlı transkripsiyon değişimleri, yarı-kantitatif ve/veya kantitatif PCR yöntemiyle analiz edildi. Buna göre *CDKN2C*, *SAA4*, *ASPM*, *PALMD* genleri dışında kalan yirmi bir genin, mikrodizin verisine uyumlu olarak değiştiği gösterildi (Şekil 16).



Şekil 16. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl etkisiyle değişen gen ekspresyonlarının RT-PCR ile doğrulanması

Bunun yanında lityumun *AXIN2* ve *EPHA5* ekspresyonuna etkisi gerçek zamanlı PCR ile de incelendi ve mikrodizin verisine benzer şekilde lityum ile *AXIN2* ekspresyonunun 22.9 kat arttığı ve *EPHA5* ekspresyonunun 8.6 kat arttığı bulundu (Şekil 17).



Şekil 17. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl bağımlı değişim gösteren *AXIN2*, *EPHA5* genlerinin gerçek zamanlı PCR ile doğrulanması (*EPHA5* 8.6 kat *AXIN* 22.9 kat artmıştır.)

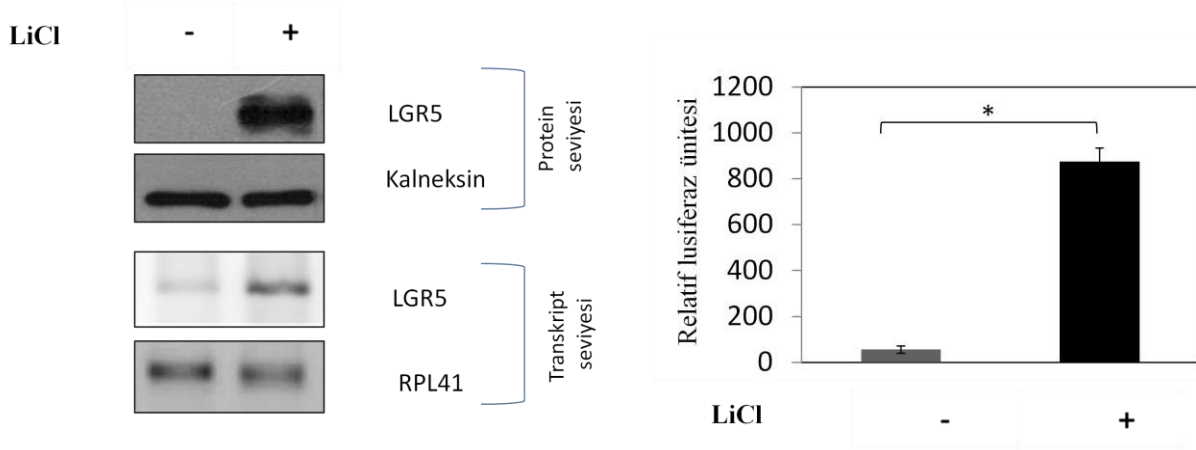
4.4. HCC Hücre Hatlarında Lityum-Klorür Bağımlı Olası Yeni Mekanizmaların Tanımlanması

4.4.1. LGR5: HCC Hücrelerinde Yeni Tanımlanan Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı Hedef Geni

HCC’de LiCl’in etkisini açıklayabilecek yeni hedef moleküllerin belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerde ilk olarak, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının bilinen hedef genlerinden olan *AXIN-2*’nin transkripsiyonel değişimi gerçek zamanlı (kantitatif) ve de RT-PCR ile analiz edildi. Bu ve yukarıda sonuçları bildirilmiş deneylere göre, HuH-7 hücrelerinde, 48 saat süre ile 20 mM LiCl uygulanması, GSK3 β inhibitör fosforilasyonunun artmasına, β -kateninin çekirdeğe göçüne, Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesinin ve buna bağlı *AXIN-2* transkripsiyonunun artmasına neden oldu (Şekil 15).

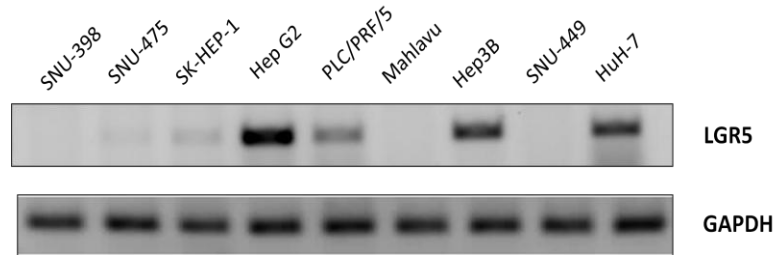
Mikrodizin verilerine göre, LiCl aracılığı ile uyarılmış Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu etkisinde transkripsiyonu artan genler arasında olan *LGR5*, HCC’deki rolü bilinmemekle birlikte, kolon kanserinde kanser kök hücre belirteci olarak kabul edilmiş bir reseptör proteindir. HCC hücrelerinde de *LGR5*’in bir Wnt/ β -katenin hedefi olup olmadığını test etmek amacıyla ilk olarak, 48 saat 20 mM LiCl uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde aynı anda Tcf/Lef aktivitesi,

LGR5 transkript ve protein düzeyleri araştırılmıştır. Bu deney sonucuna göre *LGR5*'in TCF/LEF aktivitesine paralel şekilde protein ve RNA düzeyinde arttığı gösterildi (Şekil 18).



Şekil 18. Lityumun Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesini değiştirdiği koşullarda *LGR5* protein ve transkript seviyesindeki artış

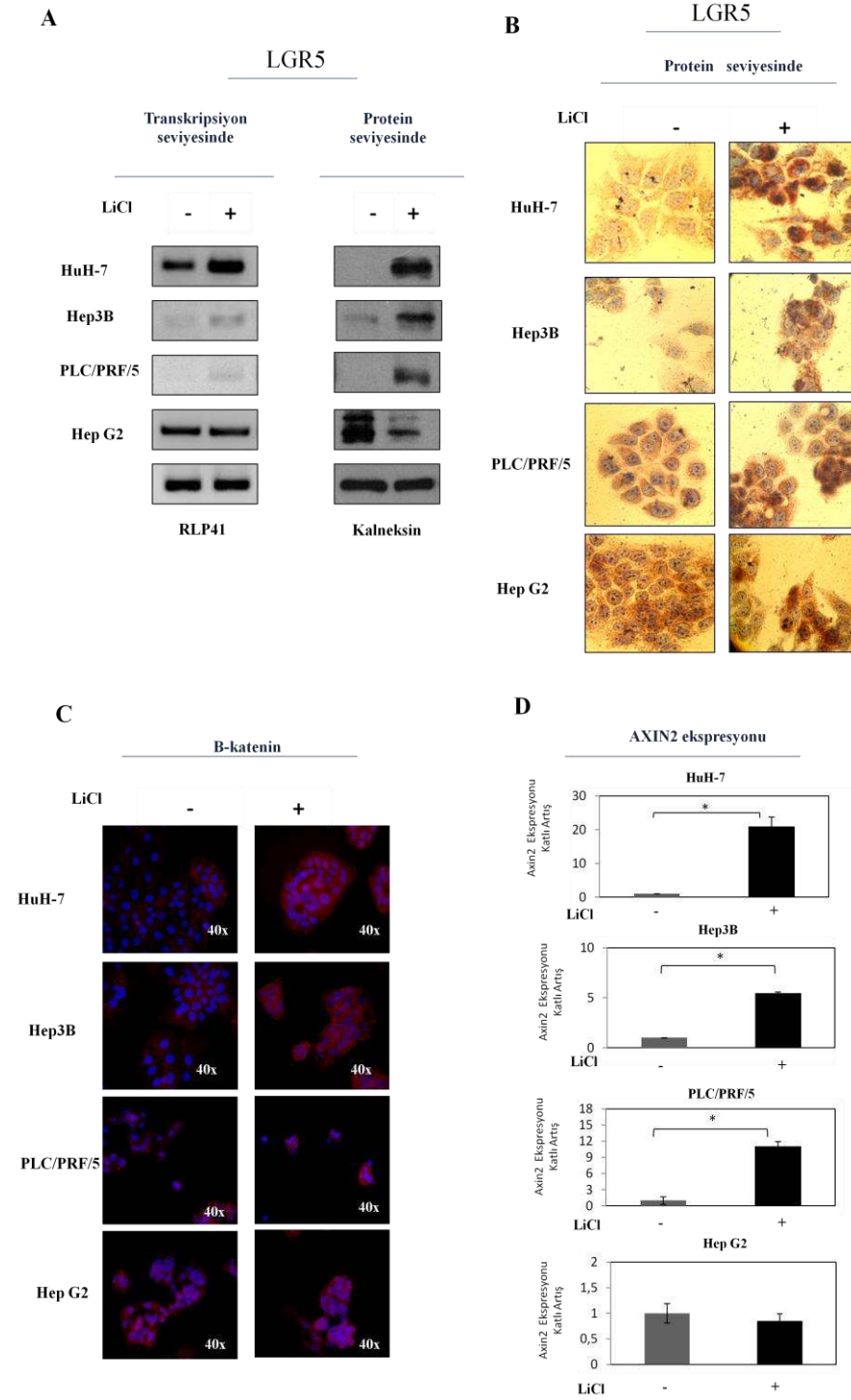
Ek olarak, *LGR5*'in kök hücremsi fenotipe sahip olduğu bilinen, iyi differansiye ve epitelyal hücre hatlarında (Hep G2, PLC/PRF/5, Hep3B, HuH-7), diğer hücrelere oranla daha yüksek miktarda, transkribe olduğu da PCR ile ortaya kondu (Şekil 19). Bu da bize hepatik kök hücre belirteci olarak HCC'de, Wnt/ β -katenin bağımlı kontrol edilen *LGR5*'in bir aday molekül olabileceğini düşündürdü.



Şekil 19. Bazal koşullarda farklı HCC hücre hatlarında *LGR5* transkripsiyonu

LiCl aracılığıyla Wnt/ β -katenin sinyalizasyonları arttırılmış olan farklı HCC hücre hatlarında da *LGR5*'in hedef gen olup olmadığını test etmek amacıyla RNA düzeyinde *LGR5* eksprese eden hücreler kullanıldı. HuH-7, Hep3B, PLC/PRF/5 ve Hep G2 hücrelerine yukarıda belirtilen standart koşullarda LiCl uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde *LGR5* ekspresyonları transkript ve protein düzeyinde analiz edildi. (Şekil 20).

Yine bu hücrelerde lityum uygulamasının Wnt/ β -katenin sinyal yolağına etkisinin anlaşılması için β -katenin immunfloresans boyaması yapılarak mikar ve lokalizasyonu belirlendi (Şekil 20). Bunun yanında Wnt/ β -katenin sinyal yolağı hedef genlerinden olan *AXIN2*'nin de ekspresyonunun gerçek zamanlı PCR ile incelenmesiyle Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonu doğrulamakta kullanıldı (Şekil 20). Buna göre, LiCl ile Hep G2 hücre hattı dışında; HuH-7, PLC/PRF/5, Hep3B hücre hatlarında *LGR5* ekspresyonları farklı düzeylerde indüklendi (Şekil 20). Hep G2 hücrelerinde *LGR5* ekspresyonunun artmamış olmasının nedeni Wnt/ β -katenin sinyal yolağın bu hücrede konstitütif aktif olması ve bu sebeple LiCl'ün halihazırda aşırı aktif olan yolağa etki etmemesi olarak açıklanabilir.



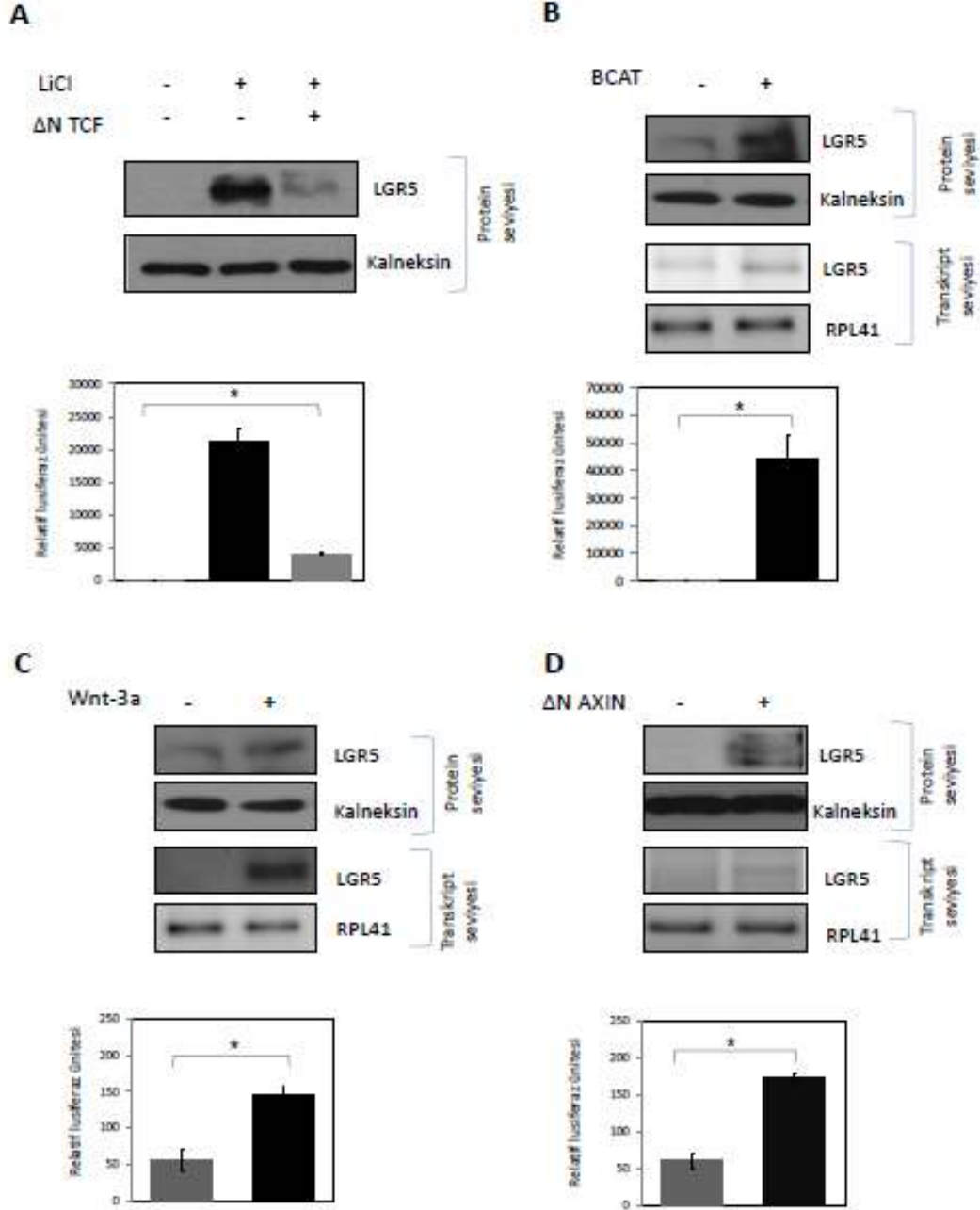
Şekil 20. HuH-7, Hep3B, PLC/PRF/5 ve Hep G2 hücre hatlarında LiCl'ün *LGR5* ekspresyonu ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağı üzerine etkisi **A-** *LGR5* protein ve RNA seviyesinin LiCl ile

değişimi **B-** *LGR5* protein seviyesinin ve lokalizasyonunun LiCl ile değişimi (immunositokimya) **C-** β -katenin protein seviyesinin ve lokalizasyonunun LiCl ile değişimi (immunfloresans) **D-** *AXIN2*'nin ekspresyonel seviyesinin LiCl ile değişimi (Gerçek zamanlı PCR) (* $p < 0.05$)

Son olarak, *LGR5* transkripsiyonunun özgül olarak Wnt/ β -katenin sinyalizasyonuna bağlı olup olmadığını test etmek amacıyla Wnt/ β -katenin yolağını özgül olarak aktiflemek için ligant ve ekspresyon vektörleri kullanıldı.

Wnt-3a Frizzled ligantı olarak ve ΔN TCF vektörü lityum ile açılmış yolakta artan Tcf transkripsiyon faktörünü inhibe etmek için kullanıldı. Bunun yanında BCAT vektörü biriken β -katenin havuzunu taklit etmek için ve ΔN AXIN vektörü ise β -katenin havuzunun yıkılmasını sağlayacak kompleksin dağılmasını sağlamak için kullanıldı.

Yapılan deneylerde, indükleyici ajan olarak kullanılan Wnt-3a'nın *LGR5* transkripsiyonunu arttırdığı, LiCl ile arttırılmış Tcf/Lef aktivasyonunun ΔN TCF aracılığıyla düşürülmesine paralel olarak *LGR5* transkripsiyonunun azaldığı gösterildi. BCAT ve ΔN AXIN plazmidlerinin Tcf/Lef aktivasyonunu arttırdığı ve bu artışa paralel olarak *LGR5* ekspresyonun da RNA ve protein düzeyinde arttığı gösterildi (Şekil 21). Bu veri *LGR5* transkripsiyonunun özgül olarak Wnt/ β -katenin sinyalizasyonuna bağlı olarak değiştiğini kanıtlar niteliktedir.

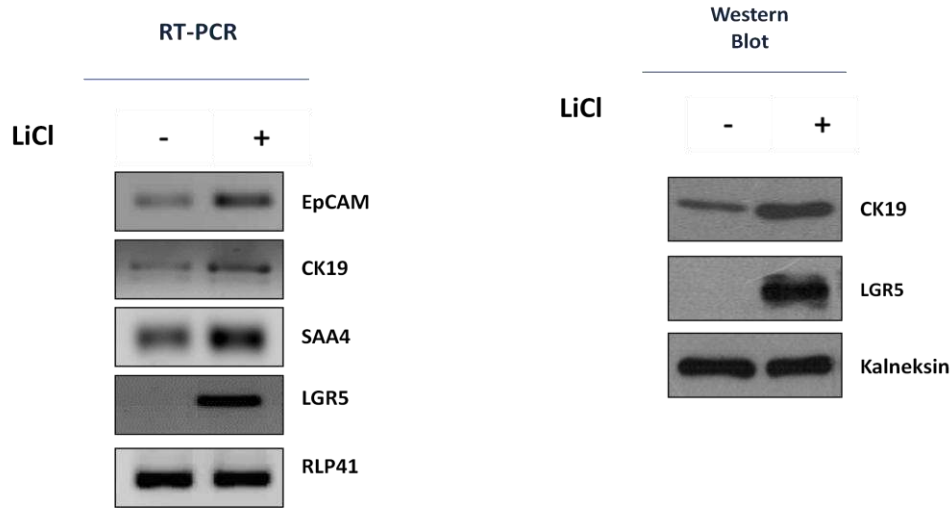


Şekil 21. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl, rekombinant Wnt-3a ve ΔN TCF, BCAT ve de ΔN AXIN plazmitleriyle özgül olarak düzenlenen Wnt/ β -katenin sinyal yolağının *LGR5* ekspresyonuna etkisi **A-** Lityum ve ΔN TCF vektörünün **B-** BCAT vektörünün **C-**Rekombinant Wnt-3a'nın **D-** ΔN AXIN vektörünün *LGR5* ekspresyonu ve Tcf/Lef aktivitesine etkisi (* $p < 0.05$)

4.5. Lityum Klorür'ün Hepatik Kanser Kök Hücre (HpKKH) Fenotipine Etkisi

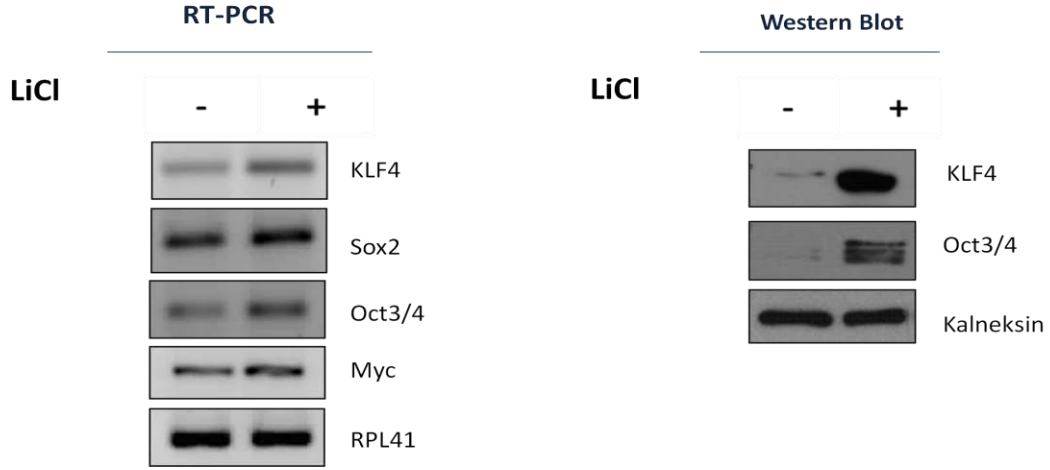
4.5.1. LiCl'ün Pluripotensi, Differansiasyon ve Hepatik Kanser Kök Hücre Genlerine Etkileri

Literatürde bilinen hepatik kanser kök hücre ve/veya hepatoblast (bipotent) hücre belirteçlerinden *EpCAM*, *SAA4* ve *CK19* genlerinde, lityum uygulanmış hücrelerde uygulanmayanlara göre transkript düzeyinde artışı, mikroarray analizleri sonucunda tespit edildi. Bu veriyi konvensiyonel başka bir yöntem ile kontrol etmek üzere yapılan semi-kantitatif RT-PCR analizi bize bu genlerin lityum varlığında transkript (RNA) düzeyinde arttığını gösterdi (Şekil 22). Yine deneylerimizde, karaciğerde rejenerasyondan sorumlu olduğu düşünülen, aynı zamanda kolon kanser kök hücre belirteci olduğu bilinen *LGR5*'in da lityum etkisinde aşırı şekilde arttığını bulduk. Buda bize *LGR5*'inde bir HpKKH belirteci olabileceğini düşündürdü. Ek olarak, LiCl'ün *LGR5* ve *CK19*'in protein seviyesinde de artışı western blotlama yöntemi ile gösterildi.



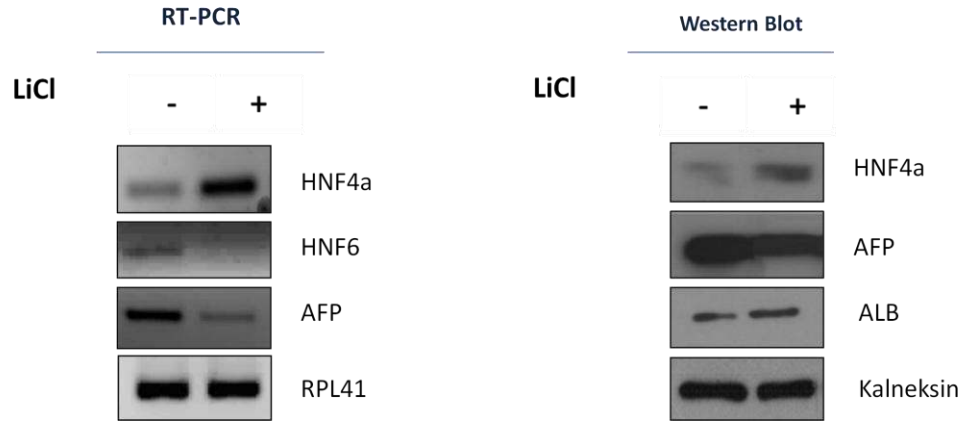
Şekil 22. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl'ün hepatik kanser kök hücre belirteçlerinin ekspresyonuna transkript ve protein düzeyinde etkisi

Terminal differansiye hücrede pluripotensiyi yeniden düzenlediği bilinen, *OCT-4*, *SOX-2*, *KLF4* ve *MYC* genlerinin, HuH-7 hücrelerine lityum uygulandığında da artmış olması bize, kanser hücrelerinde de yeniden programlamanın mümkün olduğunu düşündürdü (Şekil 23).



Şekil 23. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl'ün hepatik kanser kök hücre belirteçlerinin transkript ve protein düzeyinde ekspresyona etkisi

Bunun yanında lityumun hepatosit farklılaşmasında önemli role sahip oldukları bilinen genlerden, Hepatosit Nüklear Faktör (*HNF*) 4 α , *HNF6*, Alfa-feto Protein (*AFP*) ve Albumin (*ALB*) gibi genlerin ekspresyonel değişimleri incelendiğinde, *HNF4a*'nın arttığı, *ALB*'nin değişmediği ve *HNF6* ve *AFP*'nin azaldığını gösterildi (Şekil 24). Bu veri LiCl'ün HuH-7 hücrelerinde farklılaşmayı etkilediğinin diğer bir göstergesidir.

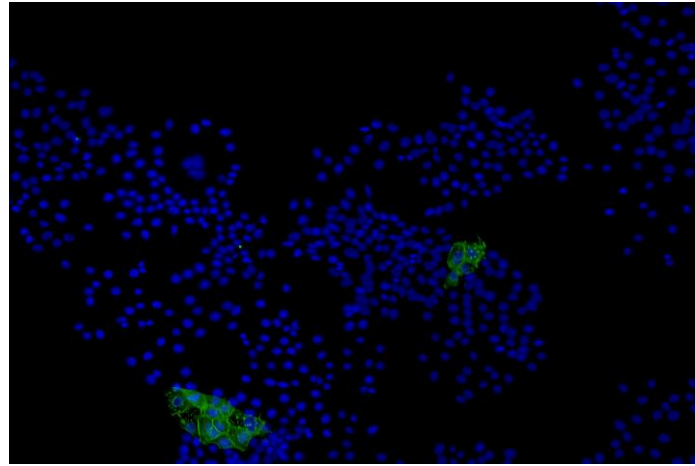


Şekil 24. HuH-7 hücrelerinde 20 mM LiCl'ün hepatik farklılaşma belirteçlerinin transkript ve protein düzeyinde ekspresyonuna etkisi

4.5.2. HuH-7 Hücre Hattında EpCAM+/CD133+ HpKKH'lerin Ayrımlanması ve Biyolojik Davranış Farklılıklarının Belirlenmesi

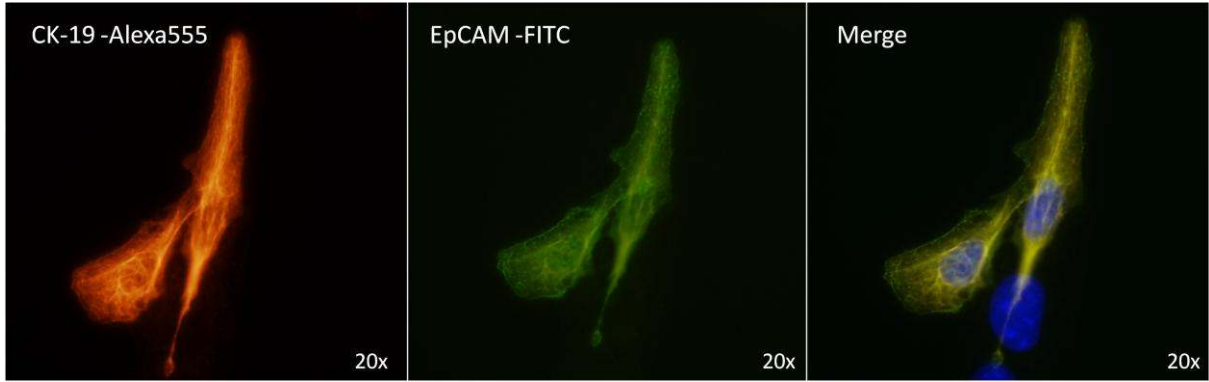
4.5.2.1. HuH-7 Hücre Hattında Hepatik Kanser Kök Hücre Grubunun Belirlenmesi

Lityumun hepatik farklılaşma ve pluripotensi genleri üzerinde yarattığı ekspresyonel değişim, proliferasyonda yarattığı duraklama, invazyon ve motiliteyi artırması, lityumun HuH-7 hücrelerinde hepatik kanser kök hücre fenotipini öne çıkarabileceğini doğrulamaktadır. HuH-7 hücrelerinde heterogenite ve literatürde xenograf modelleri ile yapılan deneylerde belirtilen tümör başlatıcı hepatik kanser kök hücre alt grubunun varlığı da düşünüldüğünde, bu alt grubun diğer hücrelerden farklı lityum yanıtı oluşturabilecekleri yüksek bir olasılıktı. Dolayısıyla, bu aşamada HuH-7 hücrelerinde manyetik seperasyon yöntemi ile EpCAM ve CD133 yüzey moleküllerine göre ayrımlanan HpKKH'in ve bu yüzey belirteçlerini taşımayan diğer hücrelerin lityuma olan yanıtları araştırıldı. Literatürde hepatik kanser kök hücreleri tanımlamak için kullanılan en etkin belirteç olan EpCAM proteinine spesifik antikor ile HuH-7 hücreleri immunfloresan boyama yapılarak tarandı ve bu hücrelerde % 5 civarı bir subpopulasyonda EpCAM varlığına rastlandı (Şekil 25). Bu oran literatürde bilinen hepatik kanser kök hücre oranı ile örtüşmektedir.



Şekil 25. HuH-7 hücrelerinde EpCAM proteini taşıyan hücre altpopulasyon oranı (Yeşil - EpCAM FITC pozitif hücreler, Mavi- DAPI çekirdek boyaması)

EpCAM taşıyan tüm hücrelerin aynı zamanda bir diğer hepatik kanser kök hücre belirteci olan CK-19 da eksprese ettiği, EpCAM ve CK-19 ile yapılan ikili immunfloresan boyamalarda gösterildi (Şekil 26) Tüm bu veriler EpCAM'in hepatik kanser kök hücreleri spesifik olarak ayırabileceğinin bir göstergesi niteliğindedir.

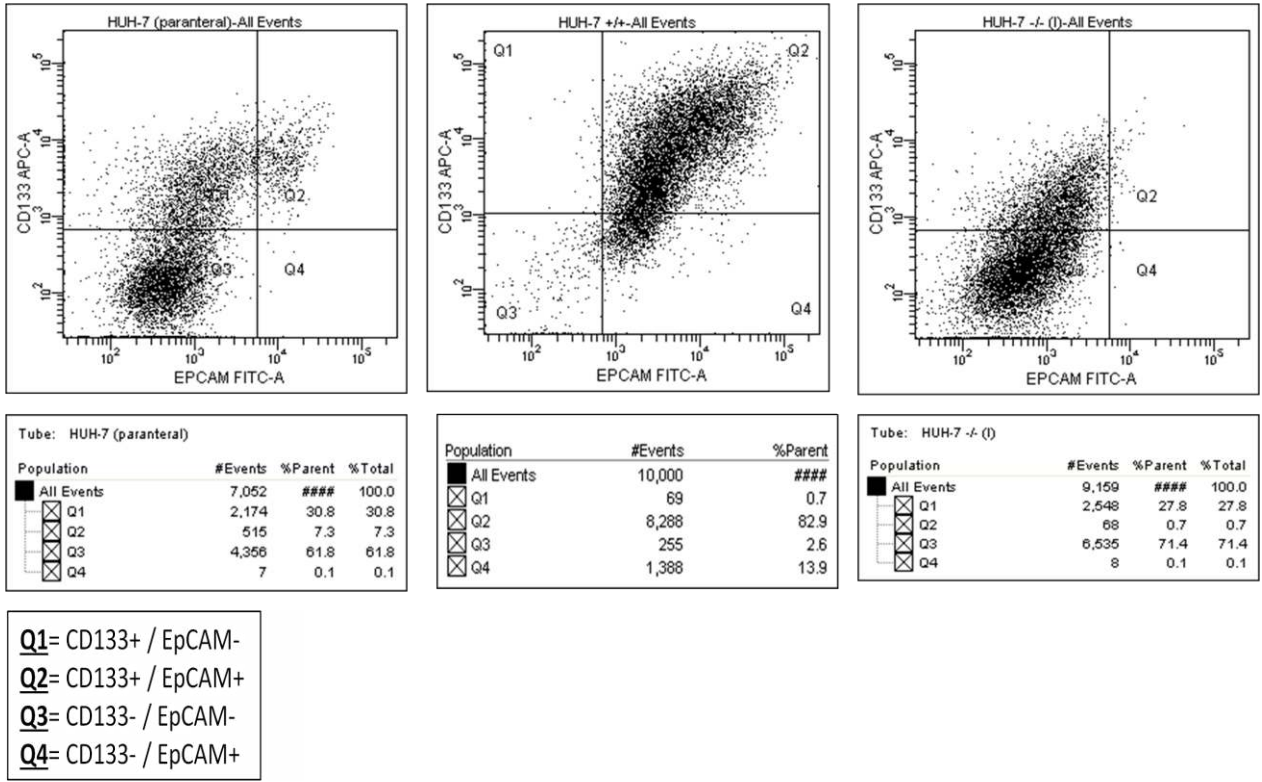


Şekil 26. HuH-7 hücrelerinde EpCAM ve CK-19 proteinlerinin aynı hücrelerde birlikte lokalizasyonu (Kırmızı- CK-19 - Alexa555, Yeşil -EpCAM FITC, Mavi- DAPI çekirdek boyaması)

4.5.2.2. *HuH-7 Hücre Hattında EpCAM+/CD133+ Hepatik Kanser Kök Hücre Grubunun Zenginleştirilmesi*

HuH-7 hücreleri içerisindeki bu subpopulasyon üzerine lityumun etkisinin araştırılması için öncelikle hepatik kanser kök hücre markeri taşıyan populasyonun saflaştırılması gerekmektedir. Lityumun biyolojik etkilerinin EpCAM taşımayan hücrelere göre kıyaslanması , sonrasında bu iki populasyonun lityuma verdikleri biyolojik yanıtların araştırılması lityum etki mekanizmalarının anlaşılması açısından önemlidir.

Literatürde solid tümörler için kabul görmüş ve hücre yüzeyinde eksprese iki farklı kanser kök hücre markeri olan CD133 ve EpCAM ' e spesifik antikolar kullanılarak HpKKH'ler MACS yöntemiyle zenginleştirildi. HuH-7 hücreleri içerisinde hepatik kanser kök hücre markeri taşıyan *EpCAM+/CD133+* ve hepatik kanser kök hücre markeri taşımayan *EpCAM-/CD133-* alt populasyonları birbirinden ayrıldı. Bu populasyonların zenginleştirilme işlemi flow sitometri ile doğrulandı (Şekil 27).

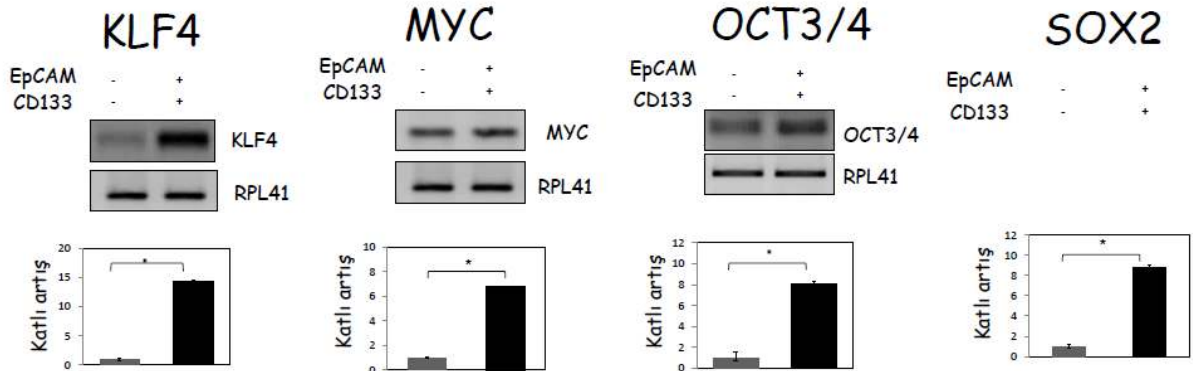


Şekil 27. Parental hücre HuH-7'nin ve MACS sonrası elde edilen *EpCAM*+/*CD133*+, *EpCAM*-/*CD133*- alt populasyonlarının flow sitomeride *CD133* ve *EpCAM* oranlarının belirlenmesi

4.5.2.3. *EpCAM*+/*CD133*+ Hepatik Kanser Kök Hücremsi Alt Grubun Karakterizasyonu

4.5.2.3.1. *EpCAM*+/*CD133*+ Grubun Pluripotensi Gen Ekspresyonları

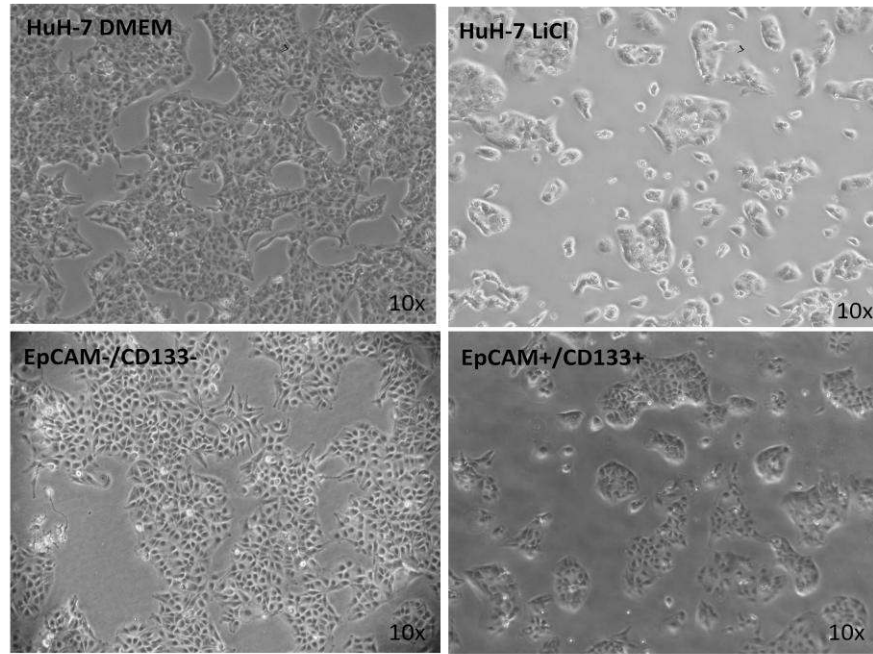
HpKKH olarak nitelendirdiğimiz *EpCAM*+/*CD133*+ hücrelerde bazal pluripotensi *OCT4*, *SOX-2*, *MYC*, *KLF4* gen ekspresyonları , *EpCAM*-/*CD133*- hücrelerin ekspresyon paterni ile karşılaştırıldı. Pluripotensi ve farklılaşma genleri, Wnt/ β -katenin sinyal yolağı yüksek olan *EpCAM*+/*CD133*+ hücrelerde genel olarak artış gösterdi (Şekil 28). Çalışmanın önceki basamaklarında gösterildiği gibi LiCl'ün HuH-7 hücrelerinde pluripotensi genlerini indüklemesi (Şekil 23.) ve de *EpCAM*+/*CD133*+ hücrelerdeki yüksek Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu düşünüldüğünde, HpKKH'lerdeki daha yüksek pluripotensi gen ekspresyonu anlamlıdır. Aynı zamanda kanser kök hücre grubu olduğunu ifade ettiğimiz bu hücrelerin daha yüksek pluripotensi genleri taşıması da differansiasyon seviyeleri açısından düşünüldüğünde literatür ile uyumludur.



Şekil 28. *EpCAM*+/*CD133*+ ve *EpCAM*-/*CD133*- hücrelerde transkripsiyon düzeyinde pluripotensi gen ekspresyonları (* p<0.05)

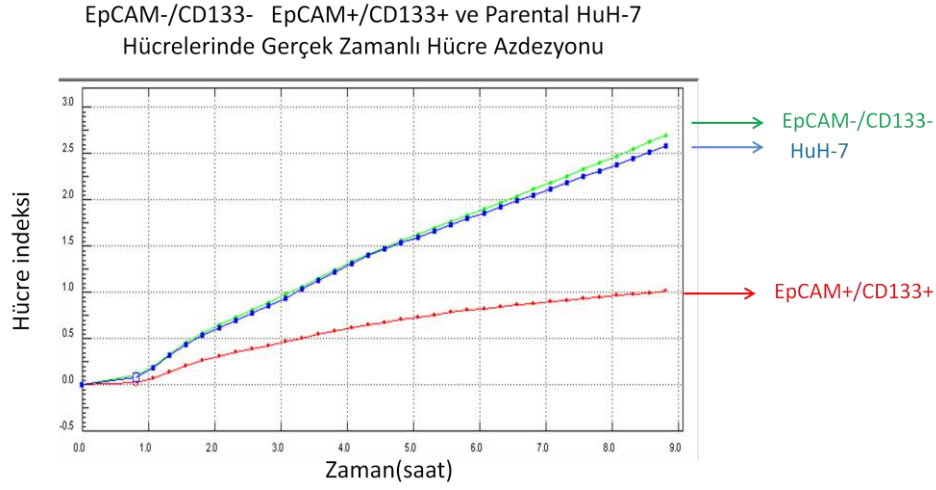
4.5.2.3.2. *EpCAM*+/*CD133*+ Grubun Biyolojik Karakterizasyonu

EpCAM+/*CD133*+ ve *EpCAM*-/*CD133*- olarak ayrımlanan bu hücrelerin morfolojik olarak farklılık gösterdikleri gözlemlendi. *EpCAM*+/*CD133*+ hücrelerin morfolojik olarak LiCl'e maruz bırakılmış HuH-7 hücrelere benzerliği dikkat çekicidir (Şekil 29). Bu durumda Wnt/ β -katenin seviyesinin yükselmesi sonucu hücre morfolojisinin %30-40 yoğunlukta Şekil 29.'daki gibi olacağını sonucuna varılabilir.



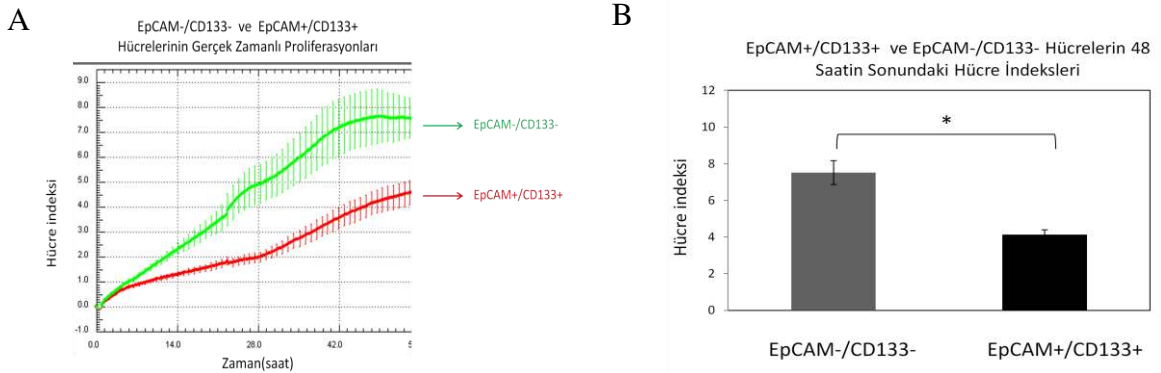
Şekil 29. *EpCAM*+/*CD133*+ hücrelerin lityum uygulanmış HuH-7 hücrelere olan benzerliği

Yine bu hücrelerdeki adezyon incelendiğinde, morfolojik görüntü benzerliği gibi *EpCAM*+/*CD133*+ hücre adezyonlarının *EpCAM*-/*CD133*- hücelere kıyasla daha az olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında HuH-7 hücreleri ve *EpCAM*-/*CD133*- popülasyon tamamen benzer adezyona sahiptir (Şekil 30).



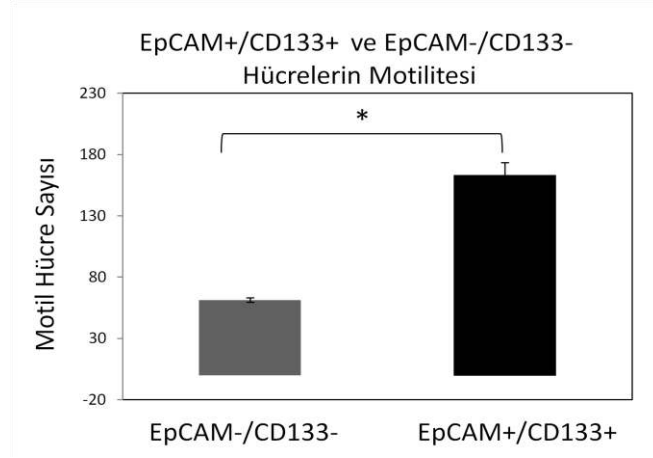
Şekil 30. *EpCAM*+/*CD133*+ ve *EpCAM*-/*CD133*- hücrelerinde gerçek zamanlı hücre adezyonu

Bu grupların proliferasyonlarındaki farklılıklar *XCELLigence* sisteminde gerçek zamanlı olarak 48 saat boyunca incelendiğinde adezyon yanıtına benzer şekilde *EpCAM*+/*CD133*+ hücre proliferasyonunun *EpCAM*-/*CD133*- popülasyona göre daha düşük olduğu bulundu (Şekil 31).



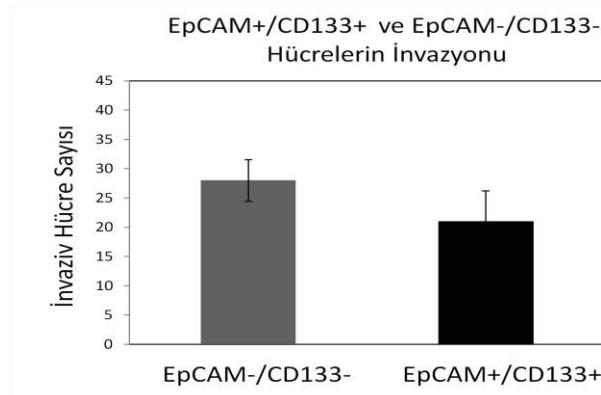
Şekil 31. *EpCAM*+/*CD133*+ , *EpCAM*-/*CD133*- hücrelerde 48 saatlik gerçek zamanlı ve son nokta proliferasyon farkları . **A-** tüm zaman değerlerindeki hücre indeksi **B-** 48 saat sonundaki hücre indeksi (* $p < 0.05$)

Hücre motiliteleri incelendiğinde beklenen şekilde *EpCAM+/CD133+* hücrelerin *EpCAM-/CD133-* hücrelere göre daha motil olduğu gözlenmiştir (Şekil 32). *EpCAM+/CD133+* hücrelerin proliferasyonları düşük olduğu halde motil olmaları, temel kök hücre karakterleri taşıdığını işaret etmektedir.



Şekil 32. *EpCAM+/CD133+* , *EpCAM-/CD133-* hücrelerin 24 saatlik motiliteleri (* p<0.05)

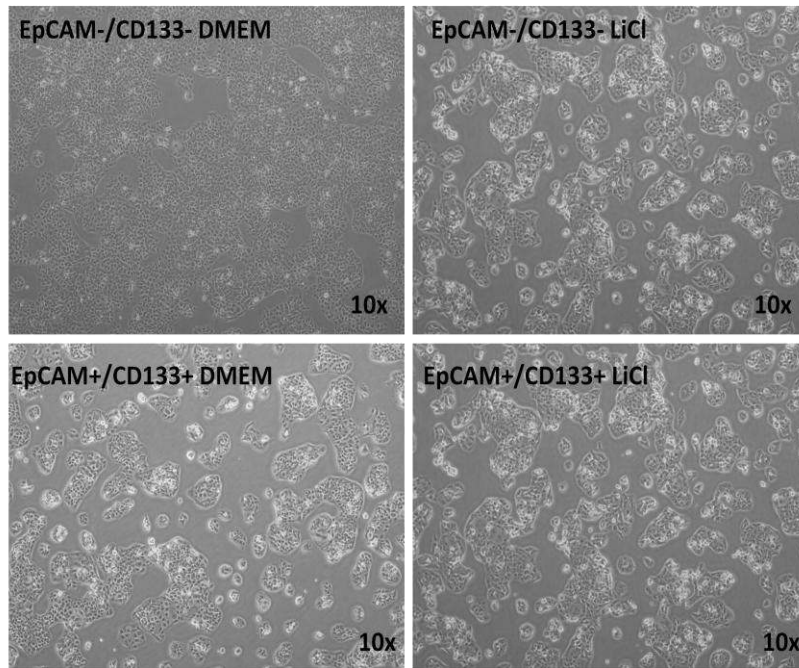
Bunun yanında hücrelerin invazyonları incelendiğinde *EpCAM+/CD133+* ve *EpCAM-/CD133-* hücrelerin invazyon kapasiteleri arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 33).



Şekil 33. *EpCAM+/CD133+* , *EpCAM-/CD133-* hücrelerin 24 saatlik invazyonları

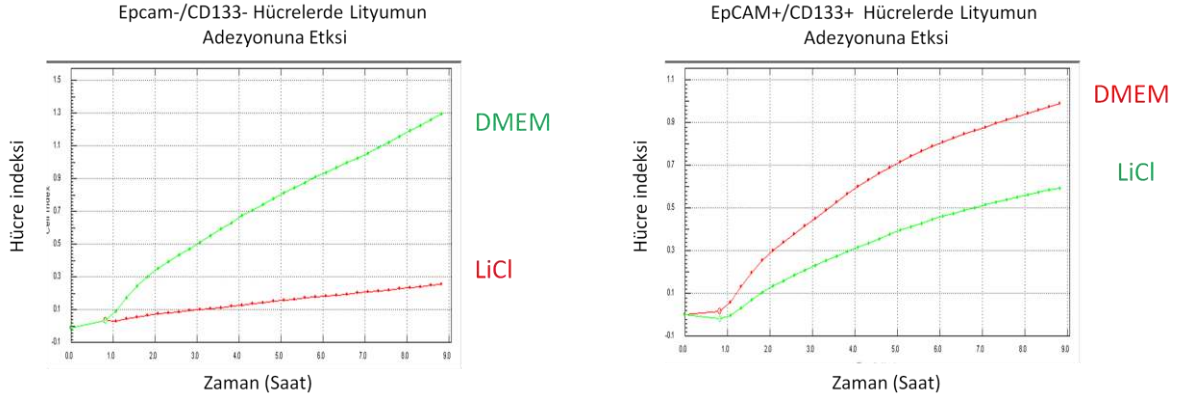
4.6. Lityumun *EpCAM*+/*CD133*+ Hepatik Kanser Kök Hücremsi Gruba Etkisi

Lityumun kanser kök hücresi olan ve olmayan hücre populasyonları üzerinde yarattığı etkinin anlaşılması için *EpCAM*+/*CD133*+ ve *EpCAM*-/*CD133*- hücreler 48 saatlik LiCl'e maruz kaldıktan sonra, adezyon, proliferasyon, motilite ve invazyon gibi biyolojik yanıtlar incelendi. Bu deneyler yapılırken, morfolojik olarak *EpCAM*-/*CD133*- hücreler HuH-7 hücrelerine benzer şekilde lityumdan etkilenirken, *EpCAM*+/*CD133*+ hücreler lityumla morfolojik değişikliğe uğramadığı gözlemlendi (Şekil 34).



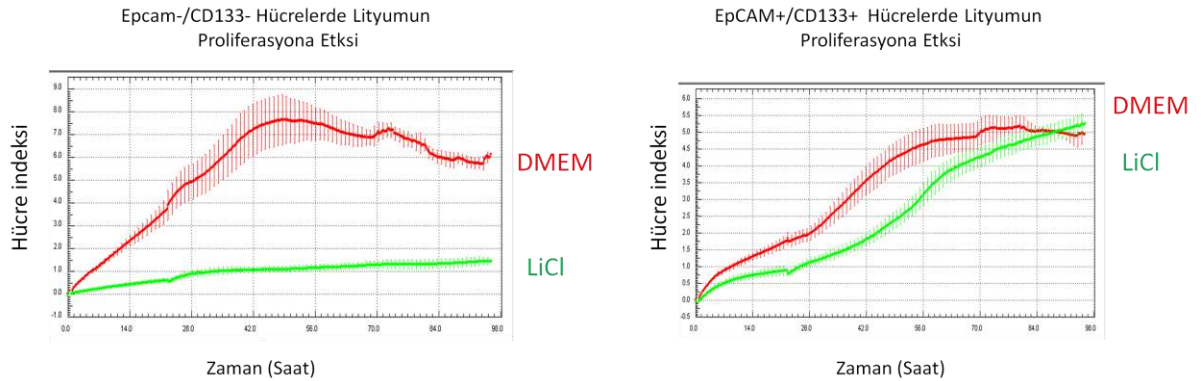
Şekil 34. *EpCAM*+/*CD133*+ ve *EpCAM*-/*CD133*- hücrelerin lityum uygulanmış ve uygulanmamış koşullarda oluşturduğu morfolojik değişim

Bu hücrelerin adezyon özellikleri üzerine LiCl'in etkisini *XCELLigence* sisteminde gerçek zamanlı olarak 9 saat boyunca incelediğinde lityuma yanıt olarak *EpCAM-/CD133-* hücrelerde HuH-7'a benzer şekilde adezyonda azalma gözlemlendi fakat *EpCAM+/CD133+* hücrelerinin adezyonu lityumdan etkilenmedi (Şekil 35).



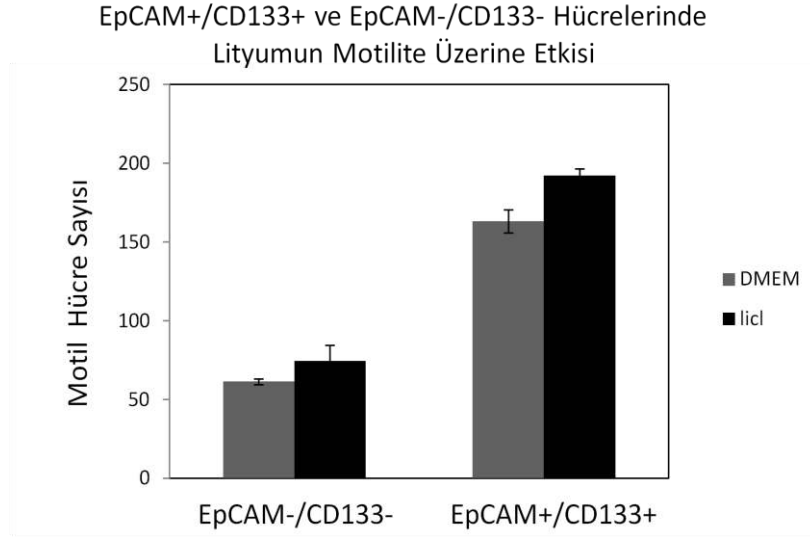
Şekil 35. *EpCAM+/CD133+* , *EpCAM-/CD133-* hücrelerde lityumun adezyon üzerine 9 saatlik etkisi (Yeşil çizgi- lityum, Kırmızı çizgi- DMEM varlığında)

Aynı deney setinde *XCELLigence* sisteminde gerçek zamanlı olarak proliferasyon incelendiğinde, *EpCAM-/CD133-* hücrelerin lityuma yanıt olarak HuH-7 hücrelerine benzer şekilde proliferasyonda inhibisyonuna neden olduğu, fakat *EpCAM+/CD133+* hücrelerin proliferasyon inhibisyonu oluşturma yanıtında lityuma daha dirençli olduğu bulundu (Şekil 36).

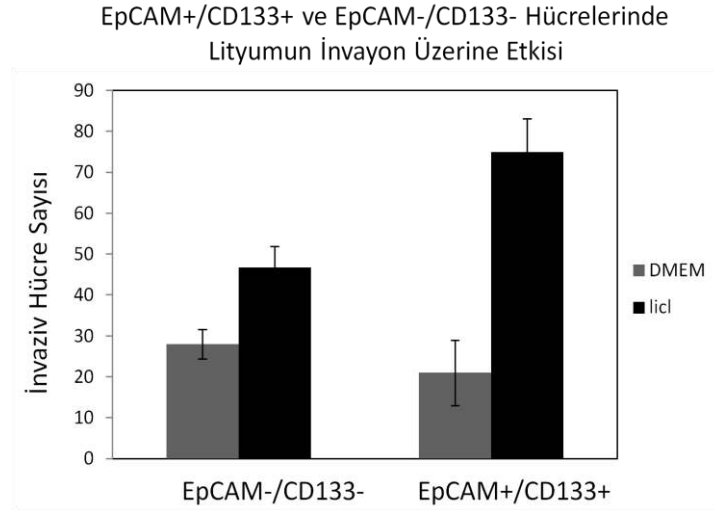


Şekil 36. *EpCAM+/CD133+* , *EpCAM-/CD133-* hücrelerde lityumun 48 saatlik gerçek zamanlı proliferasyon üzerine etkisi (Yeşil çizgi- lityum , Kırmızı çizgi- DMEM varlığında)

Bu biyolojik etkilerin yanında lityumun her iki hücre grubunun motilite ve invazyonuna etkisi incelendi. Lityum her iki hücre grubunun da motilitesi üzerinde etkili olmazken (Şekil 37) hücre invazyonu, *EpCAM*+/*CD133*+ hücrelerinde daha etkin olarak artırmıştır (Şekil 38). Lityum özetle, *EpCAM*-/*CD133*- gruba etki etmezken, *EpCAM*+/*CD133*+ grubun daha invaziv olmasını sağlamıştır.



Şekil 37. *EpCAM*+/*CD133*+, *EpCAM*-/*CD133*- hücrelerde lityumun 24 saatlik hücre motilitesi üzerine etkisi



Şekil 38. *EpCAM+/CD133+* , *EpCAM-/CD133-* hücrelerde lityumun 24 saatlik hücre invazyonu üzerine etkisi

EpCAM+/CD133+, *EpCAM-/CD133-* hücreleri ayrı ayrı kültüre edilip, lityum uygulamasının morfolojik değişim, hücre adezyonu, hücre proliferasyonu sonuçları değerlendirildi. Tüm bu deneylerin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde lityumun *EpCAM-/CD133-* hücrelerde daha etkin şekilde biyolojik davranışı değiştirdiği *EpCAM+/CD133+* hücrelerin ise lityuma daha dirençli olduğu gözlemlendi. Bu durum parental hücre HuH-7'da lityum yarattığı, adezyon ve proliferasyonda azalma etkisinin *EpCAM-/CD133-* hücreler tarafından yönlendirildiğini düşünülmektedir.

5.TARTIŞMA

Hepatosellüler karsinoma, çoğu zaman sirotik karaciğer zemininde gelişen, karaciğerin malign neoplazilerilerinin sık rastlanan biçimidir ^{1, 2, 56}. Yetişkin erkekler arasında 523000 yeni vaka ile ve toplam kanser vakaların %7.9, kadınlar arasında 226000 yeni vaka ve toplam kanser vakalarının %6.5 ini oluşturarak, dünyada 5. sıklıkta rastlanan kanser türü olmuştur. Ölüm insidansı çok yüksek olan HCC (0,93 genel örüm oranı) dünya çapında, kanser nedeni ile ölümler arasında 3. sıraya yükselmiştir. HCC’de, tanının geç konulabilmesi, prognozun kötü seyretmesi ve tümörün kemoterapi ve/veya radyoterapiye dirençli olması hastalığın sınırlılıklarıdır ve hastaların sadece çok azında radikal transplantasyon cerrahi tedavisi uygulanabilmektedir ⁵⁷. Dolayısıyla, HCC’de tedavi hedefi olabilecek yeni moleküler mekanizmalarının araştırılmasını ve bunlara bağlı hedeflerin bulunmasının gerekliliğini öne çıkarmaktadır.

Uzun yıllardır solid tümörlerde bilinen kanser kök hücre kavramı literatürde yer edinmiştir. Son yıllarda HCC’de de ilaç dirençliliğinden sorumlu, motilite ve invazyonu yönlendiren, metastatik tümörler oluşmasını sağlayan, HpKKH’ lerin varlığı gösterilmiştir ^{6, 83}. Etiyolojik faktörlerin yol açtığı hasarın giderilmesinde rejeneratif yanıt olarak öncül hücrelerin devreye girdiği ve bu dönemde ek mutasyonlar kazanarak transforme olduğu düşünülmektedir ⁷. ⁶¹. Hepatokarsinogenez sürecinde proliferasyon, apoptoza direnç, farklılaşma, kendini yenileme, pluripotensi, anjiyogenez ve ilaç direnci ile ilgili sinyal yollarında görülen birtakım değişimlerin öncül hücrelerde gerçekleştiği bilgisi bugün literatürde kabul görmüştür ^{10, 98}. HpKKH’ lerinin kendini yenileyebilme, motilite, kemoterapi dirençliliği ve farklılaşma gibi davranışları için Wnt/ β -katenin sinyal yolağının önemli olduğu bilinmektedir ¹²¹. HpKKH’lerin tam olarak biyolojik davranışlarının belirli olmaması nedeni ile bu hücreleri hedefleyebilecek kemoterapötik ilaçlar henüz geliştirilememiştir.

Çeşitli çalışmalarda, lityumun kolorektal, akciğer, prostat ve meduloblastoma gibi çeşitli solid tümörleri inhibe ettiği veya kemoterapötiklerin etkinliğini artırdığı gösterilmiştir ^{34, 35, 141}. Lityumun, tümörojeniteyi baskılama etkisinin moleküler seviyede Wnt/ β -katenin, TNF, FASL, p53, Akt gibi kanserle ilişkili molekülleri modüle ederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir ^{44, 43}. ⁴². Fakat literatürde, daha önce lityumun HCC hücreleri üzerindeki etkisini inceleyen bizim çalışmamız dışında, tek bir çalışma bulunmaktadır. Bizim çalışmamızdan farklı olarak bu

çalışmada lityumun en iyi bilinen iki hedefi olan GSK3 β ve PI3K sinyal yolağı aktivasyonu değişmemiştir ⁵⁵. Bu çalışmada lityumun etkisinin büyük kısmı DNA hasarını algılayan Chk1 proteini üzerinden gerçekleşmiş ve de SMMC-7721 hücreleri G2/M fazında proliferasyon inhibisyonuna uğramıştır. Bu veriler lityum biyolojik etkisinin hücrenin moleküler altyapısı ile değişebileceğini göstermektedir.

Araştırma grubumuz tarafından yapılan önceki çalışmalarımızda, lityum klorür'ün farklı HCC hücre hatlarında, p16 ve p53 düzeylerinden bağımsız şekilde, % 60-90 arasında değişen oranlarda proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir ¹⁵. Bu çalışmada ise, GSK3 β ' yı inhibe ederek Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonuna neden olan lityumun HuH-7 hücrelerinde genom düzeyinde etkileri ve HpKKH'ler üzerine yarattığı biyolojik davranış değişiklikleri incelendi.

Lityum, zamana bağlı olarak HuH-7 hücrelerinin adezyon ve proliferasyonunda azalma yaratırken, motilite ve invazyonunda artışa neden olmaktadır. Bu bilgi lityumun diğer kanser çeşitlerinde bilinen etkisine paralel olmakla birlikte normal hepatositler üzerinde yarattığı proliferasyon artışı bilgisine terstir ¹⁴². Benzer şekilde glioma hücrelerinde yapılan bir araştırmada lityum glioma hücrelerinin proliferasyonunu artırıp invazyonunu azaltırken, aynı çalışmadaki kök hücre özelliği gösteren tümör hücrelerine ters etki yapıp proliferasyonu azaltmıştır ¹⁴³. Bu da bize lityumun hücre spesifik olarak etkisini çeşitli şekillerde ortaya çıkabildiğini gösterir. Lityumun hepatosellüler karsinoma hücrelerinde, Wnt/ β -katenin sinyali aracılığıyla proliferasyonu baskılaması buna bir örnektir. Bunun yanında daha az çoğalma yeteneğine sahip ve daha hareketli hücre fenotipi lityumun kök hücre karakterini indüklediğini düşündürmektedir.

Lityum HuH-7 hücrelerinde EpCAM, SAA4, LGR5 ve CK19 gibi kök hücre belirteçlerini; *KLF4*, *OCT-4*, *SOX2* gibi pluripotensi genlerini ve Vimentin, *ZEB-1*, *SNAIL*, *VCAN* gibi mezenşimal fenotip genlerini artırması, bu hücrelerde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının kök hücre benzeri fenotipi indüklediğini düşündürdü. Tüm veriler birarada incelendiğinde artan motilite ve invazyon, pluripotensi ve differansiasyon genlerindeki artma, kök hücre belirteci ve mezenşimal fenotip genlerindeki artış lityum varlığında kök hücre benzeri fenotipin uyarıldığını vurgulamaktadır. Literatürde az sayıda çalışmada verilerimize benzer şekilde, lityumun farklı kanser modellerinde, kök hücre fenotipini indükleyebileceğini bildirilmiştir ^{144, 145, 146}. Literatürde Huh-7 hücreleriyle yapılmış bir çalışmada, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aşırı aktivasyonunun

ksenograf modellerde daha erken ve daha büyük tümörler oluşturduğu gösterilmiştir ve bu bilgi bizim verilerimizi desteklemektedir ¹⁵².

Çalışmamızın bir diğer kısmında, HuH-7 hücre hattı kullanılarak lityumun genom düzeyinde yarattığı etkilerin anlaşılması için RNA mikrodizin analizi yapılmıştır. Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda ise Wnt/ β -katenin hedef genlerinin grup olarak arttığı görülmektedir. Bununla birlikte yapılan KEGG analizlerinde anlamlı olarak bulunan 18 yolağdan 14 ü metabolizma ile ilişki olması, lityumun Wnt/ β -katenin hedef yolağı üzerinden hepatosellüler karsinoma hücrelerinde metabolik faaliyetlere etki ettiğini düşündürdü. GO terimleri çözümlemesinde biyolojik süreçler, moleküler işlevler ve hücre bileşenleri incelendiğinde biyolojik süreçler içerisinde metabolizma ve hücre döngüsü terimleri ile ilişkili gen sayıları diğer süreçlere göre çok yüksek olarak bulundu. Bunun yanında moleküler işlev terimleri analizlendiğinde katalitik aktivite ile ilişkili gen sayısının diğer süreçlere göre çok yüksek olduğu ortaya kondu. Bu da KEGG analizleriyle birlikte yine lityumun metabolizmayı etkilediğini işaret etmektedir. Yapılan analizlerde değişen tüm genler içerisinde Tcf/Lef transkripsiyon faktörü bağlanma sekansı gösteren yalnızca 59 gen mevcuttur. Bu da gen setimizdeki sadece 59 genin olarak Tcf/Lef'in primer hedefi olmadığını göstermektedir. Bu durum gen setimizde bulunan etkin görevleri olan epigenetik düzenleyiciler ile ve veya primer olarak etkilenen 59 genin hücre içerisinde etkilediği gen kaskatları ile veya β -katenin bağımlı Tcf/Lef bağımsız mekanizmalar ile açıklanabilir.

Lityumun, en yüksek miktarda ekspresyon artışına sebep olduğu genlerden olan LGR5'in farklı gastrointestinal kanserlerde Wnt/ β -katenin hedefi ve kök hücre belirteci olduğu bilinmesine rağmen, HCC'de LGR5'in tam olarak rolleri aydınlatılamamıştır ^{147, 148, 149}. Literatürde HCC dokularıyla yapılmış tek çalışmada, Wnt sinyal yolağında aktive edici mutasyonların olduğu dokulardaki LGR5 ekspresyon artışı bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise bu verilere paralel olarak β -katenin delete formunu içeren Hep G2 hücrelerinde, *AXIN 1* mutasyonu içeren PLC/PRF/5 hücrelerinde ve bazal Tcf/Lef aktivitesi diğer hücre hatlarına göre fazla olan Hep3B ve HuH-7 hücrelerinde *LGR5* ekspresyonu transkript düzeyinde yüksektir. Aynı zamanda literatüre çok yeni olarak giren bir çalışmada *LGR5*'in HCC hücrelerde aşırı ekspresyonunun hücrelerin tümörogenite ve hareketliliklerini artırdığı, epitelyal mezensimal dönüşümüne

sebebiyet verdiği ve de sitotoksik ilaçlara daha dayanıklı hale geldiğini gösterilmiştir ¹⁵⁰. Bu bilgi kök hücre markeri taşıyan HCC'lerin aynı zamanda *LGR5* ekspresyonu olmasını doğrulamakta ve *LGR5*'in kanser kök hücre tanımlama belirteci olarak potansiyelini gözler önüne sermektedir.

Buna ek olarak RNA düzeyinde *LGR5* içeren Hep G2, PLC/PRF/5, Hep3B ve HuH-7 hücreleri lityum ile uyarılıp *LGR5* seviyeleri incelendiğinde lityumun Wnt/ β -katenin sinyal yolağını aktive ettiği ve paralel olarak *LGR5* seviyesinin artırdığı bulundu. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aşırı aktif olduğu için lityum tarafından uyarılamayan Hep G2 hücre hattı bu durumdaki istisna hücre hattıdır. Bu hücre hattındaki β -katenin mutasyonu aşırı yolak aktivasyonunu ve neden lityumla imdüklenemediğini açıklar. *LGR5* mRNA'sının gösterilebildiği bu hücre hatları, aynı zamanda hepatik kanser kök hücre belirteci EpCAM içeren hücre hatları idi. Bu veriler *LGR5*'in diğer modellerde olduğu gibi HCC'de de Wnt/ β -katenin sinyal yolağının bir hedefi ve de HpKKH belirteci olabileceğini desteklemektedir. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının regülasyonunu sağlayacak BCAT, DN-AXIN, ve DN-TCF plazmitleri veya Wnt3a rekombinant proteini kullanıldığında; *LGR5*'in ekspresyonunun Tcf/Lef transaktivitesine paralel olarak değişimi; ince barsakta ve kolorektal kanserde Wnt/ β -katenin sinyal yolağı hedefi olan *LGR5*'in HCC'de de aynı yolağın hedef molekülü olduğu açığa çıkardı.

Literatürde yapılan çalışmalarda, HCC dokularından ve çeşitli hücre hatlarından izole edilen hücreler ksenograf modellerinde yeniden HCC oluşturabilecek hepatik-kök hücre benzeri (HpKKH) ve yeniden HCC oluşturamayacak olgun hepatosit HCC (MH-HCC) olarak sınıflandırılmıştır. Zayıf prognoz ve metastatik karakterle ilişkilendirilmiş bu hücrelerin EpCAM, CD133, CK19 gibi belirteçler taşıdığı bilinmektedir. Çalışmamızda HuH-7 'in bu belirteçleri %5-10'luk bir alt popülasyonda taşıdığı bulundu. Yapılan hücre zenginleştirmeler sonunda, *EpCAM*+/*CD133*+ alt grubun popülasyondaki negatif hücrelere göre transkripsiyon seviyesinde daha yüksek oranda pluripotensi genleri taşıdığı saptandı. Aynı etkinin lityum ile gözlenmesi ve literatür ile uyumlu bu sonuçtur ve lityumun HpKKH fenotipini indüklediğini net olarak ortaya koyar. Literatürde EpCAM'in bir Wnt/ β -katenin hedef geni olduğu bilinmektedir. Bu bilgi ile bilgiye uyumlu olarak parental hücre içerisindeki *EpCAM*+ hücrelerde *EpCAM*- popülasyona göre daha yüksek β -katenin seviyesi tespit edildi. Bu da EpCAM'in HCC'de bir Wnt/ β -katenin hedef geni olduğunu ve de HpKKH fenotipinde bu sinyal yolağının önemini vurgular.

Çalışmamızın bir diğer kısmında, *EpCAM*+/*CD133*+ popülasyonun, *EpCAM*-/*CD133*- popülasyona göre; adezyon ve proliferasyonunun daha az, motilitesinin daha yüksek olduğu belirlendi. Literatürde yapılan çalışmalarda *EpCAM*+/*CD133*+ hücrelerin çoğalma potansiyelinin daha yüksek olması bizim verilerimizle çelişkili olmakla birlikte, *EpCAM*+/*CD133*+ hücrelerin proliferasyonları düşük olduğu halde hareketli olmaları, temel kök hücre karakterlerini taşıdıklarını göstermektedir. İnvazyonlarının ise hemen hemen hiç değişmemiş olması, MMP seviyesinde gereken artışın sağlanamamasından kaynaklanıyor olabilir.

Çok ilginç olarak hücre zenginleştirme işlemi ile elde edilen *EpCAM*+/*CD133*+ grubu hücrelerin morfolojik özellikleri, adezyon, motilite ve proliferasyon davranışları lityum uygulanan hücrelerle birebir uyumludur. Lityumun HpKKH'ler üzerinde etkisini araştırdığımızda ise *EpCAM*-/*CD133*- hücrelerin çoğalmalarının durması ve adezyon yeteneklerinin azalması, HuH-7 hücrelerine benzer şekilde duyarlı olduklarını göstermektedir. Fakat *EpCAM*+/*CD133*+ HpKKH'lerin lityuma yanıt olarak morfolojik değişime uğramadığı gibi adezyon, proliferasyon ve motilite gibi biyolojik davranışlarının da lityum etkisiyle değişmediği ortaya kondu. Bu durum hem lityumun kök hücre fenotipini indüklediğini hem de HpKKH'lerde popülasyon içerisindeki diğer kanser hücrelerine göre Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktif olduğunu ve de lityum uygulamasının bunu değiştirmedikçe düşündürdü. Kök hücrenin temel karakteristik özelliklerinden olan ilaç dirençliliği hücre yüzeyinde taşıdıkları membran pompalarından ve de metabolizmal aktivite farklarından ileri gelir. Bu durumda HpKKH'lerin lityuma dirençli olması literatürdeki bilgilere dayanarak açıklanabilen bir sonuçtur.

Çalışmamız sonuç olarak HCC içerisinde var olan HpKKH popülasyonunda, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktif olduğunu ve bu yolağın hücrelerin pluripotensi karakterinin korunmasında görevli olduğunu göstermektedir. Bu bulgular HCC'nin moleküler mekanizmasının anlaşılmasında ve HCC'de HpKKH'leri hedef alan yeni ilaçların üretiminde önemlidir. Bunun yanında lityumun oluşturduğu global etki bize lityumun yarattığı biyolojik değişimlerin arkasında geniş çapta metabolik değişikliklerin olduğunu gösterdi. Kanser hücrelerinde değiştiği bilinen metabolizmanın, terapötik ilaçlar geliştirilirken kanser kök hücreleri ele alınarak incelenmesi faydalı olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir,

1-) Lityum klörür tüm HCC hücre hatlarında değişen seviyelerde proliferasyon inhibisyonu yaratmaktadır. Prolifasyon inhibisyonunun ardındaki moleküler mekanizmaların anlaşılması için model olarak seçilen lityuma en duyarlı hücre hattı olan HuH-7 da yapılan biyolojik davranış deneylerine göre, HuH7'da lityum adezyon ve proliferasyonu azaltırken, motilite ve invazyonu artırmaktadır.

2-) Lityum HuH-7 hücrelerinde en genel etkilerinden biri GSK3 β inhibisyonu yoluyla Wnt/ β -katenin aktivasyonu yaratmaktadır ve buna rağmen lityum beklenen etkisi proliferasyonda artma yerine HCC hücrelerinde proliferasyonda azalma yaratmaktadır.

3-) Lityumun biyolojik etkilerinin ardındaki moleküler imzanın anlaşılması için yapılan mikrodizin ve veri analizi çalışmalarında lityumun 1807 genin ekspresyonunda anlamlı olarak değişim yaratmaktadır. Lityum, özellikle metabolizma ve hücre döngüsü ile ilgili birçok genin değişimine sebep olmaktadır. 1807 genin 59 tanesi promotorunda Tcf/Lef bağlanma bölgesi içerdiğinden direk olarak Tcf/Lef tarafından regüle edilmektedir. Mikrodizin yönteminde değişimi gösterilmiş 21 tanesinin RT-PCR ile doğrulanmıştır.

4-) Kanseri kök hücre markeri olarak literatüre yeni giren bir aday molekül olan LGR5; Tcf/Lef aktivitesi yüksek, kök hücremsi fenotipe sahip olduğu bilinen, iyi differansiye ve epitelyal hücre hatlarında (Hep G2, PLC/PRF/5, Hep3B, HuH-7), diğer hücrelere oranla daha yüksek miktarda eksprese olmaktadır. Paralel olarak bu hücre hatlarında lityum ile Wnt/ β -katenin yolağı aktiflendiğinde LGR5 ekspresyonu artmaktadır. Bunun yanında LGR5 ekspresyonu, lityum gibi bir kimyasal, Wnt-3a gibi bir ligant veya BCAT, Δ N AXIN veya Δ N TCF gibi plazmit vektörlerle regüle edilebilmektedir. Tüm bu veriler bize LGR5'in HCC'de bir kanser kök hücre belirteci olabileceğini ve de Wnt/ β -katenin sinyal yolağı tarafından düzenlendiğini göstermektedir.

5-) HuH-7 hücrelerinde, lityumun sadece *LGR5*'i değil *EpCAM*, *CK19*, *SAA4* gibi bilinen diğer hepatik kanser kök hücre belirteçlerini, *KLF4*, *SOX2*, *OCT-4*, *MYC* gibi pluripotensi genlerini, *HNF4a*, *HNF6*, *AFP*, *ALB* gibi hepatik farklılaşmayla ilgili genleri de regüle ederek HCC hücrelerinde farklılaşma ile ilgili düzenlemeler yaptığı sonucuna ulaşılmıştır.

6-) HuH-7 hücre hattı içerisinde %5-10 lik bir alt popülasyonda *EpCAM*, *CD133* ve *CK19* kök hücre belirteçleri taşıyan bir altpopulasyon mevcuttur. *EpCAM* ve de *CD133* yüzey belirteçleri kullanılarak bu popülasyon zenginleştirilmiştir. Zenginleştirilen bu popülasyon pluripotensi genlerini daha yüksek oranda taşımaktadır. HpKKH olarak nitelendirdiğimiz bu hücreler daha yüksek Wnt/ β -katenin aktivasyonuna sahiptir.

7-) HpKKH olarak nitelendirilen *EpCAM*+/*CD133*+ hücreler *EpCAM*-/*CD133*- hücelere göre daha az proliferatif, daha az adeziv ve aynı zamanda daha motil karakterdedir.

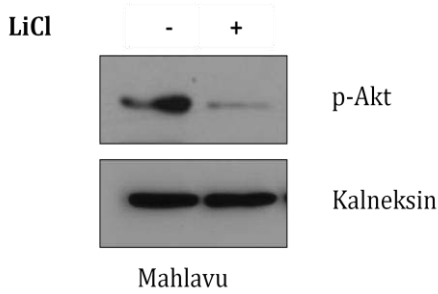
8-) Lityum genel olarak adezyon, proliferasyon davranışları açısından HpKKH'ler üzerinde *EpCAM*-/*CD133*- hücrelerinde olduğu kadar etkili olmamaktadır. Buna rağmen lityum *EpCAM*+/*CD133*+ hücrelerin invazyonu üzerinde artışa sebep olmaktadır. Her iki hücre grubunun lityum etkisiyle incelenen biyolojik davranışları, lityumun HuH-7 üzerinde yarattığı etkiyi popülasyonun büyük kısmını oluşturan *EpCAM*-/*CD133*- hücreleri hedef alarak ortaya çıkardığını düşündürmüştür.

9) Tüm mikrodizin verileri, biyoinformatik analizler biyolojik ve moleküler çalışmalar ve de HpKKH grubu incelendiğinde, lityumun HCC hücrelerinde Wnt/ β -katenin yolağı aktivasyonu ile, birçok metabolik ve differansiasyon basamağını regüle ettiği ve bunun sonucunda da kanser kök hücre fenotipini indüklediği görülmektedir.

Destekleyici Veriler:

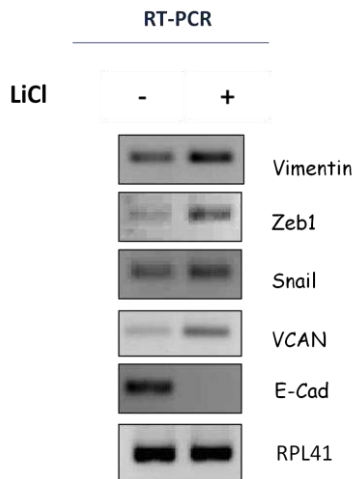
Lityumun P-Akt sinyal yolağı üzerindeki etkisi;

Literatürde bilinen lityumun PI3K/Akt yolağına etkisini anlamak için bu yolağın temel oyuncularından AKT'nin aktivasyon durumunu belirleyen Ser-473'ten fosforile formunun LiCl etkisiyle değişimi incelendiğinde LiCl'ün p-AKT seviyesinde azalma yarattığı gözlemlendi. Bu bilgi inozitol havuzunu etkileyen lityum için anlamlıdır. Lityumun Wnt/ β -katenin sinyali üzerine etkisi incelenen bu çalışmada AKT yolağıyla ilgili değişimler incelenmemiştir. Lityumun PI3K/AKT sinyali üzerine yaptığı etkilerin incelenmesi çok kapsamlı bir konu olup bu başlık yeni bir çalışma altında incelenmelidir.



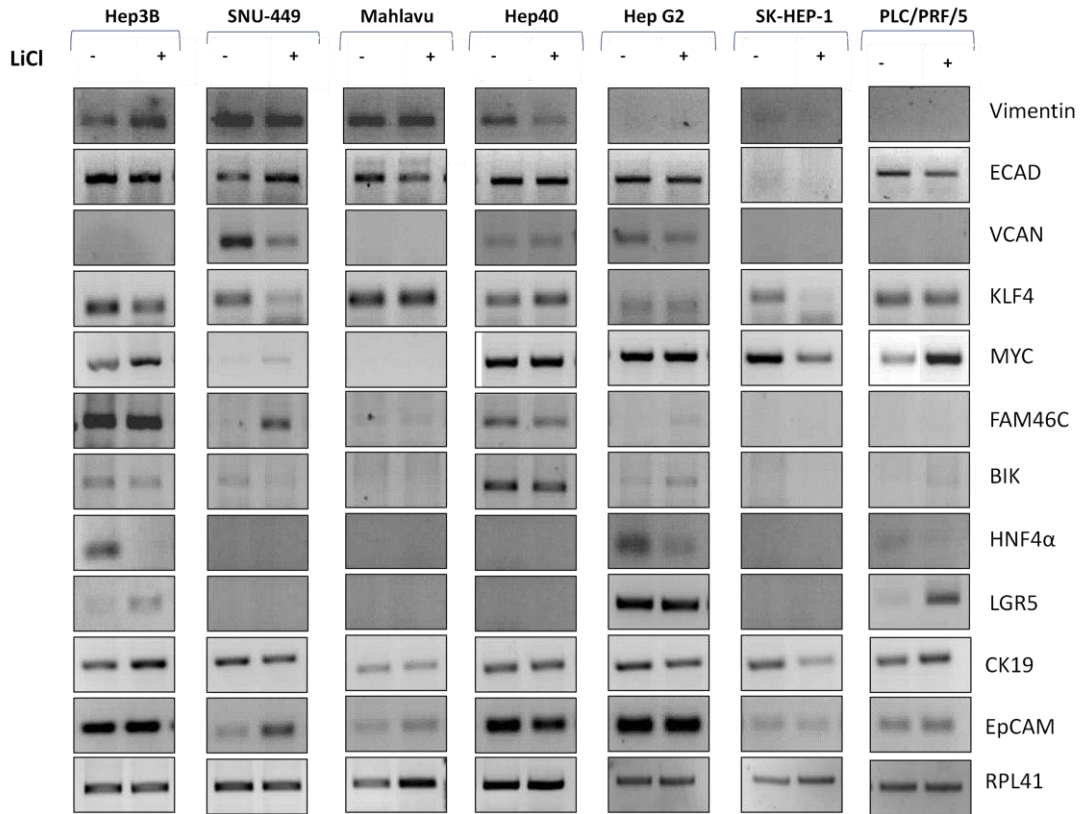
Lityumun mezensimal fenotip gen ekspresyonları üzerindeki etkisi;

Lityumu etkisiyle incelenen pluripotensi ve farklılaşma genlerine ek olarak, mezensimal fenotip genleri de incelenmiş ve lityum etkisiyle daha mezensimal bir fenotipin indüklendiği gösterilmiştir.



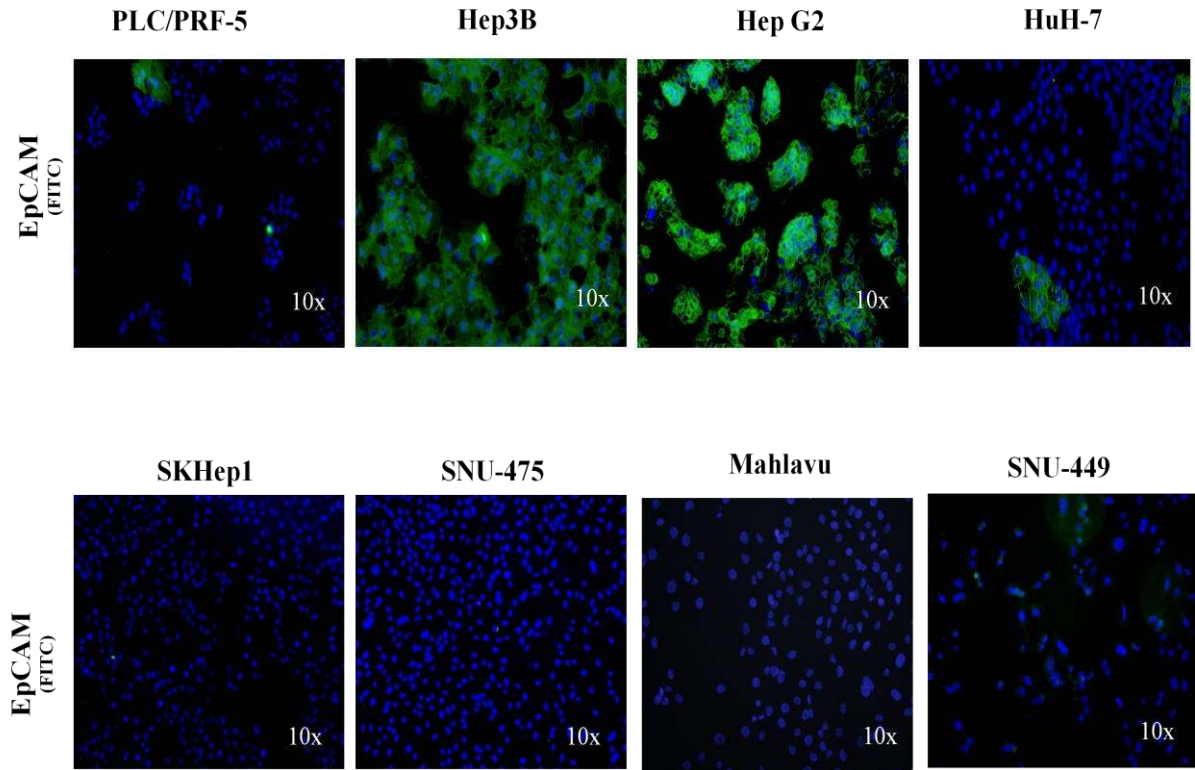
Lityumun HuH-7 dışındaki diğer hücrelerde etkilediği genler;

Lityum etkisiyle HuH-7 hücrelerinde, değişime uğradığı mikrodizin ve de PCR ile gösterilmiş genler içerisinde 11 tanesinin; farklı hücre hatlarında da lityum etkisindeki ekspresyonal değişimi incelendi. Bu deneyin sonucuna göre hücreler arasında herhangi bir örüntü benzerliğine rastlanamamıştır. Her hücre hattının değişik farklılaşma seviyesine ve farklı mutasyon zeminlerinde olduğu ve de birçok yolaktaki farklı gen düzenlemeleri düşünüldüğünde, HuH-7 hücre hattındaki gen ekspresyonu değişimlerinin diğer hücrelerde benzer şekilde gözlenmemesi anlaşılır bir sonuçtur.



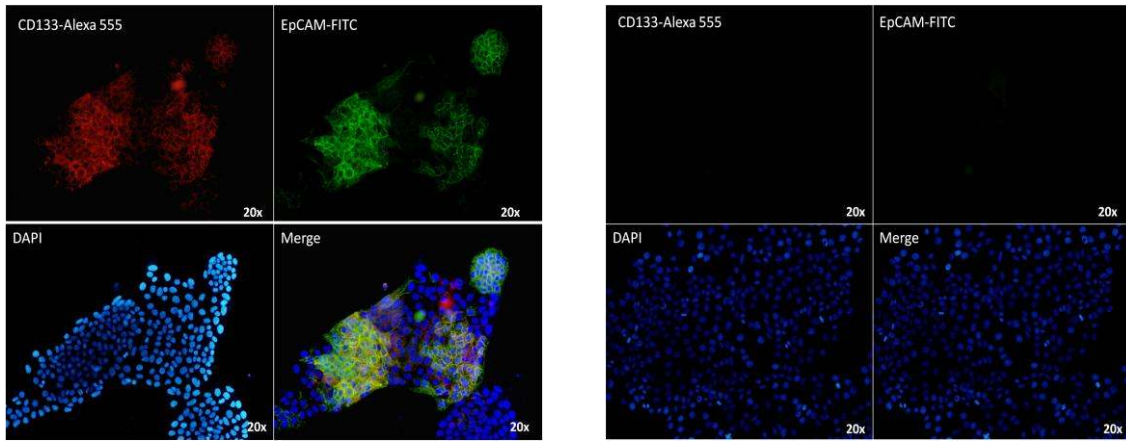
HCC hücrelerinde EpCAM pozitifliği;

Epitelyal ve mezensimal hücre hatlarında EpCAM protein ekspresyonu incelendiğinde, PLC/PRF/5, Hep3B, Hep G2, HuH-7, hücrelerinde çeşitli seviyelerde EpCAM varlığına rastlanırken, SKHep1, SNU-475, Mahlavu, SNU-449 hücre hatlarında ekspresyon gözlenemedi. Hep3B ve Hep G2 hücre hatlarında EpCAM ekspresyonu yüksek düzeyde ve homojendir. Bu durum her iki hücre hattında yüksek Wnt/ β -katenin yolağı sinyalizasyonu ile açıklanabilir. PLC/PRF/5 ve HuH-7 hücre hatlarında ise sadece küçük bir alt populasyonda EpCAM ekspresyonuna rastlandı. Kanseri kök hücre teorisine uygun şekilde bu oranın %10 un altında olması bu belirteci taşıyan hücrelerin diğerlerine göre biyolojik yanıtlarının farklı olacağı literatür tarafından belirtilmektedir.



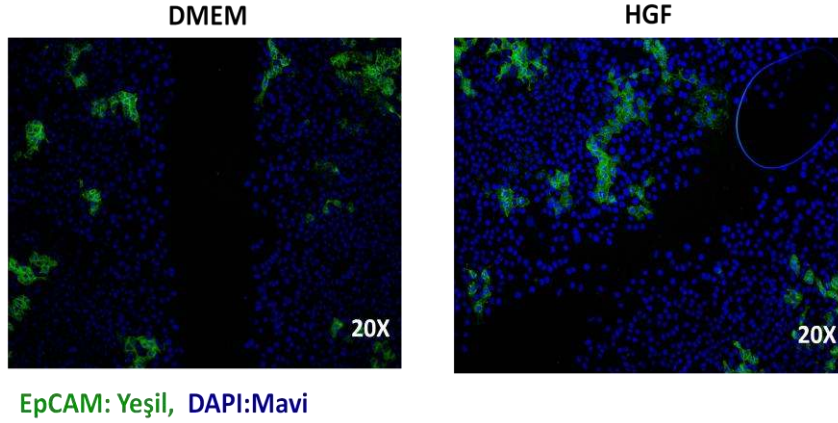
MACS sonrası EpCAM+/CD133+ ve EpCAM-/CD133- hücrelerde immunfloresan boyama ile EpCAM ve CD133 belirteçlerinin gösterilmesi

MACS sonrası elde edilen *EpCAM+/CD133+*, *EpCAM-/CD133-* populasyonlarında CD133 ve EpCAM belirteçlerinin oranları immünfloresan yöntemlerle gösterildi. *EpCAM+/CD133+* hücreler sol panelde *EpCAM-/CD133-* hücreler sağ paneldedir (Kırmızı-CD133-Alexa555, Yeşil -EpCAM FITC , Mavi- DAPI çekirdek boyaması)



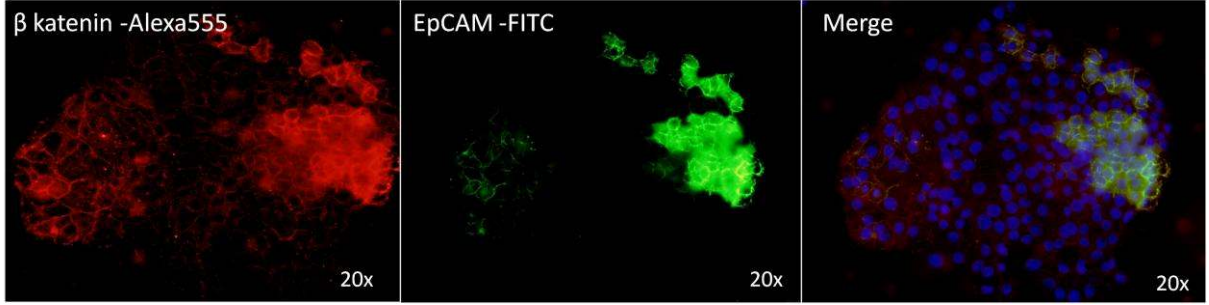
HuH-7 hücre hattında yara iyileşmesi sırasında EpCAM+ hücre lokalizasyonları

HpKKH'lerin motilite davranışının daha yüksek olması EpCAM+ hücrelerin daha hareketli olduğunu düşündürdü. Buna göre yara kapatma bölgesine göçen hareketli hücrelerin EpCAM pozitifliğini sorgulandı. Bu deneyin sonucuna göre yara bölgesine göç eden hücrelerin EpCAM belirteci taşıma oranlarının değişmediği gözlemlendi.



Parental hücre içerisindeki EpCAM+ Hücrelerin Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı Aktivasyonu

Literatürdeki bilinen bilgilere göre EpCAM bir Wnt/ β -katenin sinyal yolağı hedefi olduğundan EpCAM belirteci taşıyan hücrelerin daha aktif Wnt/ β -katenin sinyal yolağına sahip olması beklenir. Bu bilginin HuH-7 hücrelerinde doğrulanması için β -katenin ve EpCAM ikili immüñfloresan boyamaları gerçekleştirildi. HuH-7 hücrelerinin bazılarında populasyonun kalanına göre daha yüksek düzeyde ve çekirdek lokalizasyonunda β katenin boyaması olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda β -katenin seviyesi yüksek ve nükleer yerleşimli olan bu hücrelerin EpCAM eksprese etmesi, HuH-7 da EpCAM'in Wnt sinyal yolağı hedeflerinden olduğunu ve dolaylı olarak *EpCAM*+/*CD133*+ hücrelerin daha aktif Wnt/ β -katenin sinyal yolağına sahip olduğunu gösterdi. Bu bilgi EpCAM'in Wnt/ β -katenin sinyal yolağı hedefi olduğu bilgisiyle uyushmaktadır. (Kırmızı- β katenin - Alexa555, Yeşil -EpCAM- FITC, Mavi- DAPI çekirdek boyaması)

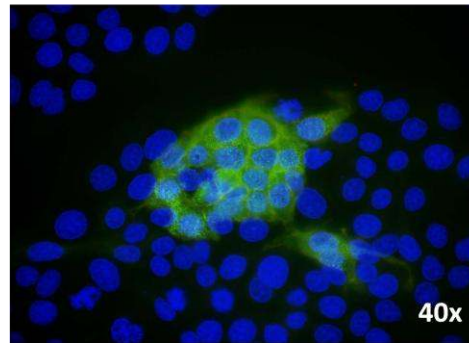
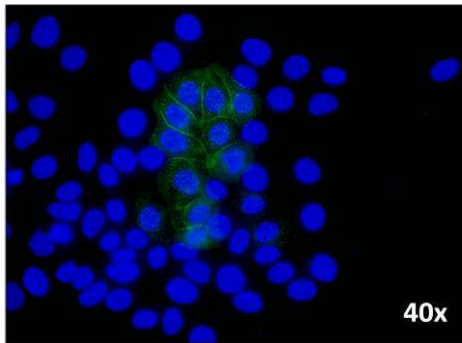


Aynı zamanda lityum varlığında popülasyon içinde EpCAM eksprese eden hücre oranı değişmemekle birlikte, EpCAM ekspresyonu olan hücrelerdeki EpCAM protein ekspresyonu artmaktadır. Bu bilgi indüklenebilen Wnt/ β -katenin yolağının EpCAM ekspresyonunu artırdığını, fakat EpCAM eksprese etmeyen hücrelerde ekspresyonu başlatamadığını göstergesidir. HuH-7 hücrelerinde lityumun, EpCAM taşıyan hücre oranı ve ekspresyonuna etkisi immunfloresan yöntemlerle gösterilmiştir. (Kırmızı- β katenin - Alexa555, Yeşil -EpCAM- FITC, Mavi- DAPI çekirdek boyaması)

LiCl

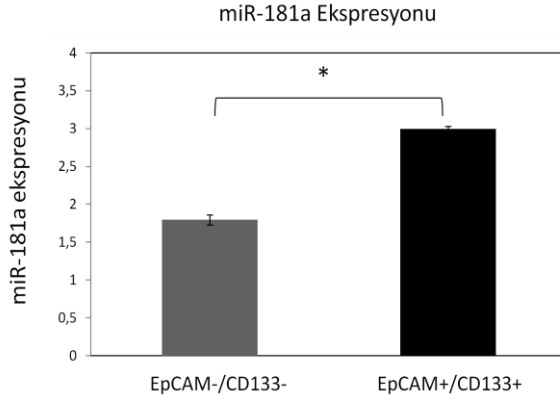
-

+



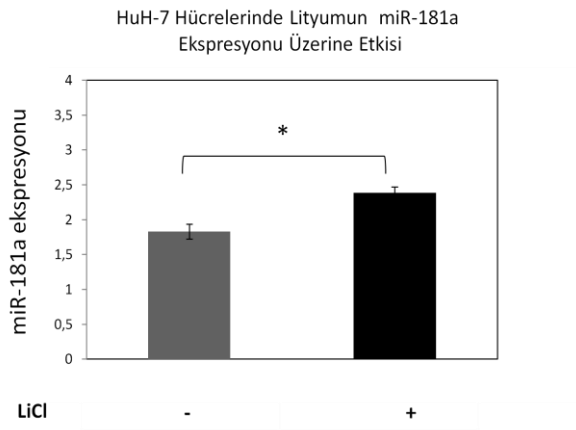
HpKKH'lerde miR-181a ekspresyonu;

Literatürdeki bilgilere göre *EpCAM+/CD133+* kanser kök hücrelerde artan ve de inhibisyonunun kanser kök hücre potansiyelini azalttığı bilinen miR-181'in HpKKH diye tanımladığımız altpopulasyondaki ekspresyonu gerçek zamanlı PCR ile incelendi. Buna göre literatüre uyumlu şekilde miR-181a HpKKH grubunda artış gösterdi (Korhan P.,KunterI).



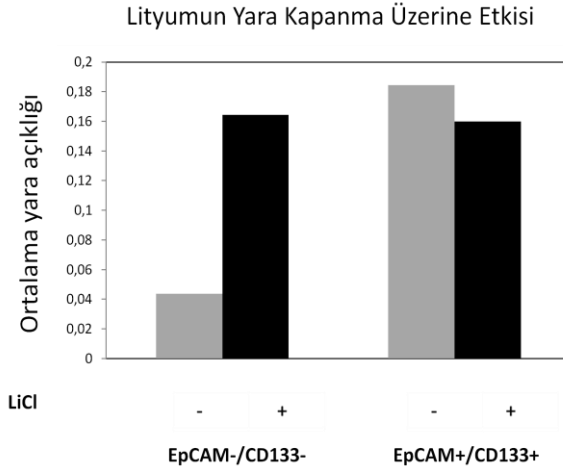
miR-181a'nın Lityum ile değişimi ;

Lityumun kanser kök hücrele fenotipini indüklediği tezimizin farklı bir açıdan doğrulanması için HpKKH'lerde ekspresyonu artan miR-181a' nın lityum ile değişimi gerçek zamanlı PCR ile incelendi ve lityumun mir181a ekspresyonunu anlamlı şekilde arttırdığı bulundu. Bu deney sonucu, lityumun HpKKH fenotipini indüklediği verilerini desteklemektedir.



Lityumun *EpCAM*-/*CD133*- ve *EpCAM*+/*CD133*+ hücrelerde yara kapatma etkinliği üzerine etkisi;

Motiliteden farklı olarak hasar durumunda hücrelerin hareketliliğini gösteren bu deneyde, lityumun *EpCAM*-/*CD133*- ve *EpCAM*+/*CD133*+ hücre grupları üzerine etkisi incelendi. Bazal koşullarda *EpCAM*+/*CD133*+ hücrelerin yara açıklığı *EpCAM*-/*CD133*- hücrelere göre daha yüksekti. Bunun yanında lityum *EpCAM*-/*CD133*- hücrelerde yara kapanmasını engellerken *EpCAM*+/*CD133*+ hücrelerde etkin olmamıştır. Bu durum her iki hücre grubunun lityum etkisiyle incelenen diğer biyolojik davranışlarına benzemekte ve de lityumun HuH-7 hücre hatları üzerinde yarattığı etkiyi populasyonun büyük kısmını oluşturan *EpCAM*-/*CD133*- hücreler üzerinden yaptığı görüşüne katkı sağlamaktadır.



8. EKLER

8.1. Etik kurul belgesi

 **T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI**

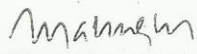
Tel. : 0 232 - 259 87 73 - 259 87 74 Fax : 0 232 - 259 05 41 İnciraltı 35340-İzmir

Sayı : B.30.2.DEÜ.0.01.00.00 / 6726

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE 9 NİSAN

Fakültemiz Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Başkanlığının 25 Nisan 2008 tarih ve 147 sayılı yazısıyla Dekanlığımıza iletilen; 121/2008 Protokol numaralı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Öğretim Üyelerinden Yard.Doç.Dr.Esra ERDAL'ın proje yöneticisi ve İmge KUNTER'in sorumlusu olduğu, "Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde lityumun genom düzeyine etkileri" isimli proje ile ilgili Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Kararı ve sonuç ek'te sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve ilgiliye iletilmesi hususunda gereğini rica ederim.


Prof.Dr. Hakan ABACIOĞLU
Dekan

Ek: Etik Kurul Kararı

ASLI GİBİDİR

Yunus KARSLI
Fakülte Sekreteri

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Tarih ve Sayı: 25.04.2008/147

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Prof.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Üzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 24 Nisan 2008 tarih ve 09/09/2008 no.lu toplantısında; 121/2008 Protokol numaralı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Öğretim Üyelerinden Yard.Doç.Dr.Esra ERDAL'ın proje yöneticisi ve İmge KUNTER'in sorumlusu olduğu, "**Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde lityumun genom düzeyine etkileri**" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Taner Çamsarı

Prof. Dr.Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

Etik Kurul Sekreteri

Elif İÇİ

ASLI GİBİDİR

Yunus Karşı
Yunus KARSLI
Fakülte Sekreteri

Tel: 0232 412 22 54

8.2. Özgeçmiş

ADI SOYADI; İmge Kunter

TC Kimlik No / Pasaport No:	24047751022
Doğum Yılı:	1982
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AbD, İzmir, Türkiye
Telefon :	0533-6045903
Faks :	
e-posta :	imge_kunter@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyokimya	Lisans	2004
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Yüksek Lisans	2007
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Doktora	Devam ediyor

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Araştırma Görevlisi	2005-2013

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı	

Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐	Bölüm İkinciliği Ödülü	Ege Biyokimya Bölümü	2004
	Kök hücre alanında en iyi genç araştırmacı ödülü	Genocell	2011
	En iyi poster ödülü	1st international Conference on Stem Cell Research and Applications	2011
	Uzman Araştırma Yarışması Deneysel Kategori Birincilik Ödülü	Türk Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Derneği	2011

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Erdal C., Karakulah G., Fermancı E., Kunter İ. , Silistreli E., Canda T., Erdal E., Hepağuşlar H. “Early Biventricular Molecular Responses to an Acute Myocardial Infarction” <i>Int. J. Med. Science</i> 2012 9(1)74-82
Erdal E., Erdal C., Bulut G., Kunter I. , Kir M., Atabey N., Acikel U. “Mutation analysis of the Vangl2 coding region revealed no common cause for Tetralogy of Follot”, <i>The Journal of International Medical Research</i> , 2007, 35:867-872
İsmet Durak, Özlem Barut Selver, Esra Erdal, İmge Kunter, Zeynep Özbek Söylemezoğlu, Jose

Mario Wolosin, "Limbal Kök Hücre Yetmezliğinde Kültüre Edilmiş Limbal Epitel Hücreleri ile Oküler Yüzey Rekonstrüksiyonunun Bir Yıllık Sonuçları" Türk Oftalmoloji Dergisi (TJO). 2012;42(3)

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Kunter İ., Atabey N., Erdal E., “Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde LGR5 ekspresyonu ve Wnt/ β -catenin sinyal yolağı tarafından düzenlenmesi”, IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, December 2012, Bursa , Turkey

Secil Kurtalan, Ahmet Oztarhan, Emel Sokullu Urkaç, Taner Dağcı, **İmge Kunter** “Ion Implantation on Electrospun Fabricated Poly-L Lactide Caprolactone (PLC) Nanofibers for Cell Proliferation in Tissue Scaffolds ” 22nd International Conference on the Application of Accelerators in Research and Industry, Ağustos 2012, Fort Worth, Texas, ABD

Kunter İ., Atabey N., Erdal E., “Characterization of EpCAM+/CK19+ Hepatic Stem Cells in Hepatocellular Carcinoma”, Cellular Signaling & Molecular Medicine, Haziran 2012, Cavtat, Dubrovnik

Tercan Avcı S., **Kunter İ.**, Atabey N, Erdal Ş, "Hepatoselüler karsinoma hücre hattı HuH 7'da lityum aracılı hücre döngüsü kontrolünün histon3 lizin metilasyon değişimine etkileri", XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ekim 2011, Antalya

Kunter I., Urgu K., Karaca C, Mıcılı S.C., Ergür U.B., Uzun B., Karagüler Z., Arıcan Z., Atabey N. “Noncultured and Cultured ADAS Treatment for Primary Wound Healing Following Radiotherapy”, 1.st International conference/Workshop on Stem Cell and Applications, 2011, Kayseri

Durak, Ö. Barut Selver, E. Erdal, **İ. Kunter**, Z. Özbek, J M. Wolosin “Limbal Kök Hücre Yetmezliğinde Kültüre Edilmiş Limbal Epitel Hücreleri İle Oküler Yüzey Rekonstrüksiyonu:1.Yıl Sonuçları” 45. Ulusal TOD Kongresi, 2011, Ekim, KKTC

Kunter I. Atabey N, Erdal E., "LGR5 has been regulated by wnt/bcat signalling in HCC cells" Cell Signal Omics-2011 Integrated Cellular Pathology-Systems Biology of Disease, 2011, Luxembourg
İ. Durak, Ö. Barut Selver, E. Erdal, İ. Kunter , Z. Özbek, J M. Wolosin "Limbal Kök Hücre Yetmezliğinde Kültüre Edilmiş Limbal Epitel Hücreleri İle Oküler Yüzey Rekonstrüksiyonu" 44. Ulusal TOD Kongresi, 29 Eylül-3 Ekim 2010, Antalya
Kunter İ. , Gozukukizil A., Çokaklı M, Atabey N, Ozturk M., Erdal Ş, "Increased Expression of LGR5 might be related with stem cell like properties of Hepatocellular Carcinoma Cell Lines", Wnt2009 meeting, Amerika Birleşik Devletleri, Haziran 2009, Uluslararası Hakemli organizasyon
Kunter İ. , Atabey N, Erdal Ş. E., "Inhibition of the PI3K/Akt signalling caused G0/G1 arrest through the mechanism of Rb/E2F1 on the HCC cell lines", II.International Congress of Molecular Medicine, İstanbul, Mayıs 2009
Fermancı E, Erdal E., Bulut G., Kunter I. , Canda T., Yılmaz O., Atabey N., Açikel U., Erdal C. "Molecular Characterization of Wnt/ β -catenin Signaling Pathway After Myocardial Infarction" European Society for Cardiovascular Surgery 55th International Congress, St Petersburg, Russian Federation, pg.169, May 11-14, 2006
Kunter I. , Ozdag H, İlk G, Yılmaz S, İlk O, Atabey N, Ozturk M, Erdal E, "Molecular Dynamics of the Lithium-mediated Growth Inhibition in Hepatocellular Carcinoma Cells", Workshop on Emerging Topics in Human Functional Genomics and Proteomics, 26 - 31 March 2006, Antalya, Turkey
Kunter İ. , Akbari S, Atabey N., Erdal E. "Involvement of LGR5/R-Spondin1 signaling to activation of Wnt/ β -catenin in Hepatocellular Carcinoma" EMBO Young Scientists' Forum, 2012, Istanbul,
Kunter I. , Karakulah G., Atabey N., Erdal E. "Lityum aracılıklı Wnt-bcatenin aktivasyonunun karaciğer kanserinde kök hücre fenotipine etkisi" 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ekim 2011, Antalya
Kunter I. , Atabey N., Erdal E. "PI3K/Akt/mTOR Sinyal İleti Yolağının Hepatosellular Karsinoma Hücrelerinde Hücre Döngüsü Kontrolündeki Rolü" 10. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik

Kongresi,Eylül 2007, Antalya

Kunter I, Ozdag H, Ilk G, Yilmaz S, Ilk O, Atabey N, Ozturk M, Erdal E, “Molecular Dynamics of the Lithium-mediated Growth Inhibition in Hepatocellular Carcinoma Cells”, Workshop on Emerging Topics in Human Functional Genomics and Proteomics, 26 - 31 March 2006, Antalya, Turkey

8.3. Solusyonlar

PBS (Phosphate buffered saline):

Kimyasallar	Konsantrasyon (mmol/L)
NaCl	137
KCL	2,7
Na ₂ HPO ₄	10
K ₂ HPO ₄	1,76

Kimyasallar tartıldıktan sonra 800ml distile su içerisinde çözüldü. Ph'ı 7,4'e ayarlandıktan sonra 1 litreye tamamlandı.

Tris-BSA:

0.5 M Tris-bazı

1.5 M NaCl

%2 BSA eklenerek hazırlandı. pH 7,3'e ayarlanarak +4oC de saklandı.

cDNA sentezi reaksiyon tamponu:

cDNA sentezi reaksiyon tamponu içeriği

5X reaksiyon tamponu --5 µl

10mM dNTP-- 2,5 µl

Ribolock RNase inhibitörü --1,25 µl

Reverse transkriptaz-- 1,5 µl

Reaksiyon tamponu 25µl'lik bir reaksiyon için hesaplanmıştır. Tabloda belirtilen içerikte hazırlandı ve her bir örneğin üzerine 10,25 µl eklendi.

Tris-asetat EDTA (TAE):

50X stok solüsyonu hazırlandı.

Tris-Asetat EDTA içeriği

Tris-Base 242 g

Asetik asit 57,1 ml

EDTA (0,5M, pH 8) 100 ml

Kimyasallar tartıldıktan sonra 1000 ml distile su içerisinde çözüldü. Agaroz jel elektroforezi uygulamalarında son konsantrasyonu 1X olacak şekilde seyreltildi.

6X yükleme tamponu:

10mM Tris-HCL (pH 7,6)

%0,003 bromofenol mavisi

%0,003 ksilen siyanol FF

%60 Gliserol

60mM EDTA

LB (Luria broth, Luria bertani broth):

5g Maya ekstraktı (Oxoid, L-21)

10g NaCl (Applichem, 2942)

10g Tripton (Applichem, 1553)

Kimyasallar tartılarak 800ml distile su içerisinde çözöldü. pH 7,2-7,4 arasında ayarlandı.

121°C’de 15 dk otoklavlandı.

Ampisilinli LB:

5g Maya ekstraktı (Oxoid, L-21)

10g NaCl (Applichem, 2942)

10g Tripton (Applichem, 1553)

100 µg/ml Ampisilin (Applichem, 0839)

Kimyasallar tartılarak 800ml distile su içerisinde çözöldü. pH 7,2-7,4 arasında ayarlandı.

121°C’de 15 dk otoklavlandı. Sıcaklık 45°C’nin altına düştüğünde ampisilin eklendi.

Agarlı LB:

5g Maya ekstraktı

10g NaCl

10g Tripton

15g Agar (Oxoid, L-11)

Kimyasallar tartılarak 800ml distile su içerisinde çözöldü. pH 7,2-7,4 arasında ayarlandı.

121°C’de 15dk otoklavlandı. Bakteri kültür kaplarına 15ml dököldü.

Ampisilin içeren agarlı LB:

5g Maya ekstraktı

10g NaCl

10g Tripton

15g Agar (Oxoid, L-11)

100 µg/ml Ampisilin (Applichem, 0839)

Kimyasallar tartılarak 800ml distile su içerisinde çözöldü. pH 7,2-7,4 arasında ayarlandı. 121°C’de 15dk otoklavlandı. Sıcaklık 45°C’nin altına düştüğünde ampisilin eklendi. Bakteri költür kaplarına 15ml dököldü.

Süper optimal broth (SOB):

5g NaCl

20g Tripton

5g Maya ekstraktı

1M KCl’den 2,5ml

(Applichem, 2939)

Kimyasallar tartılarak 800ml distile su içerisinde çözöldü. pH 7,2-7,4 arasında ayarlandı.

121°C’de 15dk otoklavlandı. Kullanımdan önce 1M MgCl₂ solösyonundan 1litreye 10ml olacak şekilde eklenerek kullanıldı.

Miniprep plazmid DNA izolasyonu için kullanılan solösyonlar ve içelikleri:**ALS-1**

- 50 mM Glukoz

- 25 mM Tris-HCl

- 10 mM

ALS-2

-0.2 N NaOH

-%1 SDS

ALS-3

100ml ALS-3 için,
-60 ml 5M Potasyum
Asetat
-11.5 ml Asetik Asit
-28.5ml Distile Su

SDS-PAGE ayırlama jel bileşenleri (10 ml için):

Kullanılacak kimyasal	%8'lik	%10'luk
dH ₂ O	4.6 ml	4.0
%30 akrilamid mix	2.7 ml	3.3
1.5M Tris-HCl (pH8.8)	2.5 ml	2.5
%10 SDS	0.1 ml	0.1
%10 Amonyum persülfat	0.1 ml	0.1
TEMED	0.006 ml	0.04

SDS-PAGE istifleme jeli bileşenleri :

Kullanılacak kimyasal	%5'lik istifleme jeli(5 ml)
dH ₂ O	3.4
%30 akrilamid mix	0.83
1.5M Tris-HCl (pH6.8)	0.63
%10 SDS	0.05
%10 Amonyum persülfat	0.05

TEMED 0.005

SDS-PAGE ayırmlama etkinliği:

% Akrilamid konsantrasyonu	Doğrusal ayırmlama aralığı (kD)
15	12-43
10	16-68
7.5	36-94
5	57-212

KAYNAKLAR

- ¹ Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012 Jan-Feb;62(1):10-29
- ² Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010.
- ³ Uehara T, Ainslie GR, Kutanzi K, Pogribny IP, et al. Molecular mechanisms of fibrosis-associated promotion of liver carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 2013 Mar;132(1):53-63
- ⁴ El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007 Jun;132(7):2557-76
- ⁵ Levrero M. Et al. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 2006, 26;25(27):3834-47.
- ⁶ Tong CM, Ma S, Guan XY. Biology of hepatic cancer stem cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Aug;26(8):1229-37.
- ⁷ Wu XZ, Chen D. Origin of hepatocellular carcinoma: role of stem cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006 Jul;21(7):1093-8.
- ⁸ Ma S. Biology and clinical implications of CD133(+) liver cancer stem cells. *Exp Cell Res.* 2013 Jan 15;319(2):126-32.
- ⁹ Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology.* 2009 Mar;136(3):1012-24.
- ¹⁰ Lee, H.C.; Kim, M. and Wands, J.R. (2006) *Front. Biosci.*, 11, 1901-1915.
- ¹¹ Villanueva, A.; Newell, P.; Chiang, D.Y.; Friedman, S.L. and Llovet, J.M. (2007) *Semin. Liver Dis.*, 27(1), 55-76.
- ¹² Takigawa Y, Brown AM. Wnt signaling in liver cancer. *Curr Drug Targets.* 2008 Nov;9(11):1013-24
- ¹³ Yang W, Yan HX, Chen L *et al.* Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res.* 2008; 68: 4287–95.
- ¹⁴ Lade AG, Monga SP. Beta-catenin signaling in hepatic development and progenitors: which way does the WNT blow? *Dev Dyn.* 2011 Mar;240(3):486-500.

-
- ¹⁵ Erdal E, Ozturk N, Cagatay T, Eksioglu-Demiralp E, Ozturk M. Lithium-mediated downregulation of PKB/Akt and cyclin E with growth inhibition in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2005 Jul 20;115(6):903-10
- ¹⁶ Johnson G, Gershon S. Early North American research on lithium. *Aust N Z J Psychiatry*. 1999 Dec;33 Suppl:S48-53
- ¹⁷ Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. Neural and developmental actions of lithium: A unifying hypothesis. *Cell* 1989; 59: 411–419
- ¹⁸ Cohen P, Goedert M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Jun;3(6):479-87.
- ¹⁹ Mora A, Sabio G, Risco AM, Cuenda A, Alonso JC, Soler G, Centeno F. Lithium blocks the PKB and GSK3 dephosphorylation induced by ceramide through protein phosphatase-2A. *Cell Signal*. 2002 Jun;14(6):557-62.
- ²⁰ Spiegelberg BD, Dela Cruz J, Law TH, York JD. Alteration of lithium pharmacology through manipulation of phosphoadenosine phosphate metabolism. *J Biol Chem*. 2005 Feb 18;280(7):5400-5. Epub
- ²¹ Klein PS, Melton DA. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8455–8459)
- ²² Kirton JP, Crofts NJ, George SJ, Brennan K, Canfield AE. Wnt/beta-catenin signaling stimulates chondrogenic and inhibits adipogenic differentiation of pericytes: potential relevance to vascular disease? *Circ Res*. 2007 Sep 14;101(6):581-9.
- ²³ Gow M, Mirembe D, Longwe Z, Pickard BS. A gene trap mutagenesis screen for genes underlying cellular response to the mood stabilizer lithium. *J Cell Mol Med*. 2013 Apr 12.
- ²⁴ Force, T.; Woodgett, J.R. Unique and overlapping functions of GSK-3 isoforms in cell differentiation and proliferation and cardiovascular development. *J. Biol. Chem.*, 2009, 284(15), 9643-9647.
- ²⁵ Ryves, W.J.; Dajani, R.; Pearl, L.; Harwood, A.J. Glycogen synthase kinase-3 inhibition by lithium and beryllium suggests the presence of two magnesium binding sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 290, 967-972.
- ²⁶ Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*. 2004 Sep;5(9):691-701.

-
- ²⁷ Berridge, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, 1793(6), 933-940.
- ²⁸ Cantley, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002, 296, 1655-1657.
- ²⁹ Di Paolo, G.; De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 2006, 443, 651-657.
- ³⁰ Hokin, L.E. Lithium increases accumulation of second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate in brain cortex slices in species ranging from mouse to monkey. *Adv. Enzyme Regul.*, 1993, 33, 299-312.
- ³¹ Chalecka-Franaszek E, Chuang DM. Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 20;96(15):8745-50.
- ³² King, J.S.; Teo, R.; Ryves, J.; Reddy, J.V.; Peters, O.; et al. The mood stabiliser lithium suppresses PIP3 signalling in Dictyostelium and human cells. *Dis. Model Mech.*, 2009, 2, 306-312.
- ³³ Chiu CT, Chuang DM. Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders. *Pharmacol Ther*. 2010 Nov;128(2):281-304.
- ³⁴ Vidal F, de Araujo WM, Cruz AL, Tanaka MN, Viola JP, et al. Lithium reduces tumorigenic potential in response to EGF signaling in human colorectal cancer cells. *Int J Oncol*(2011) 38: 1365–1373.
- ³⁵ Ronchi A, Salaroli R, Rivetti S, Della Bella E, Di Tomaso T, et al. Lithium induces mortality in medulloblastoma cell lines. *Int J Oncol*(2011) 37: 745– 752.
- ³⁶ Li FL, Li X, Wang YF, Xiao XL, et al. Astragaloside IV Downregulates β -Catenin in Rat Keratinocytes to Counter LiCl-Induced Inhibition of Proliferation and Migration. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:956107.
- ³⁷ Wang Z, Zhang X, Chen S, Wang D, Wu J, Liang T, Liu C. Lithium chloride inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration and alleviates injury-induced neointimal hyperplasia via induction of PGC-1 α . *PLoS One*. 2013;8(1):e55471.
- ³⁸ Lan Y, Liu X, Zhang R, Wang K, Wang Y, Hua ZC. Lithium enhances TRAIL-induced apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. *Biometals*. 2013 Apr;26(2):241-54.
- ³⁹ Hossein G, Zavareh VA, Fard PS. Combined Treatment of Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Line DU145 with Chemotherapeutic Agents and Lithium Chloride: Effect on Growth Arrest and/or Apoptosis. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2012 Apr;4(2):75-87.

-
- ⁴⁰ Cohen Y, Chetrit A, Cohen Y, Sirota P, Modan B (1998) Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment. *Med Oncol* 15: 32–36.
- ⁴¹ Khasraw M, Ashley D, Wheeler G, Berk M. Using lithium as a neuroprotective agent in patients with cancer. *BMC Med.* 2012 Nov 2;10:131.
- ⁴² Zhu Z, Kremer P, Tadmori I, Ren Y, Sun D, et al. Lithium suppresses astrogliogenesis by neural stem and progenitor cells by inhibiting STAT3 pathway independently of glycogen synthase kinase 3 beta. *PLoS One* 6(2011):e23341.
- ⁴³ Kaufmann L, Marinescu G, Nazarenko I, Thiele W, Oberle C, et al. LiCl induces TNF-alpha and FasL production, thereby stimulating apoptosis in cancer cells. *Cell Commun Signal* (2011) 9: 15.
- ⁴⁴ Mao CD, Hoang P, DiCorleto PE Lithium inhibits cell cycle progression and induces stabilization of p53 in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*(2001) 276: 26180–26188.
- ⁴⁵ Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germlinecompetent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448:313-317
- ⁴⁶ Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318:1917-1920
- ⁴⁷ Wang Q, Xu X, Li J, Liu J, Gu H, Zhang R, Chen J, Kuang Y, Fei J, Jiang C, Wang P, Pei D, Ding S, Xie X. Lithium, an anti-psychotic drug, greatly enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Res.* 2011 Oct;21(10):1424-35.
- ⁴⁸ Kasuya J, Kaas G, Kitamoto T. Effects of lithium chloride on the gene expression profiles in *Drosophila* heads. *Neurosci Res.* 2009 Aug;64(4):413-20.
- ⁴⁹ Rojek A, Nielsen J, Brooks HL, Gong H, et al. Altered expression of selected genes in kidney of rats with lithium-induced NDI. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jun;288(6):F1276-89.
- ⁵⁰ Yazlovitskaya EM, Edwards E, Thotala D, Fu A. Lithium treatment prevents neurocognitive deficit resulting from cranial irradiation. *Cancer Res.* 2006 Dec 1;66(23):11179-86.
- ⁵¹ McQuillin A, Rizig M, Gurling HM. A microarray gene expression study of the molecular pharmacology of lithium carbonate on mouse brain mRNA to understand the neurobiology of mood stabilization and treatment of bipolar affective disorder. *Pharmacogenet Genomics.* 2007 Aug;17(8):605-17.
- ⁵² Blair IP, Chetcuti AF, Badenhop RF, Scimone A, Positional cloning, association analysis and expression studies provide convergent evidence that the cadherin gene *FAT* contains a bipolar disorder susceptibility allele. *Mol Psychiatry.* 2006 Apr;11(4):372-83.

-
- ⁵³ Chetcuti A, Adams LJ, Mitchell PB, Schofield PR. Microarray gene expression profiling of mouse brain mRNA in a model of lithium treatment. *Psychiatr Genet*. 2008 Apr;18(2):64-72.
- ⁵⁴ Youngs RM, Chu MS, Meloni EG, Naydenov A, Carlezon WA Jr, Konradi C. Lithium administration to preadolescent rats causes long-lasting increases in anxiety-like behavior and has molecular consequences. *J Neurosci*. 2006 May 31;26(22):6031-9.
- ⁵⁵ Wang XM, Li J, Feng XC, Wang Q, Guan DY, Shen ZH. Involvement of the role of Chk1 in lithium-induced G2/M phase cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biochem*. 2008 Jul 1;104(4):1181-91.
- ⁵⁶ Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
- ⁵⁷ Asghar U, Meyer T. Are there opportunities for chemotherapy in the treatment of hepatocellular cancer? *J Hepatol*. 2012 Mar;56(3):686-95.
- ⁵⁸ Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL ve ark. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21(16): 2593-604.
- ⁵⁹ Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening. *Semin Liver Dis* 2005; 25(2): 143-54.
- ⁶⁰ Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*. 2006 Sep;6(9):674-87.
- ⁶¹ Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene*. 2006 Jun 26;25(27):3818-22. Review.
- ⁶² Marrero J. A. Hepatocellular Carcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21:308-312
- ⁶³ Kew MC. Hepatocellular carcinoma in developing countries: Prevention, diagnosis and treatment. *World J Hepatol*. 2012 Mar 27;4(3):99-104.
- ⁶⁴ Meguro M, Mizuguchi T, Kawamoto M, Hirata K. The molecular pathogenesis and clinical implications of hepatocellular carcinoma. *Int J Hepatol*. 2011;2011:818672.
- ⁶⁵ Cha C., DeMatteo R., P., Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2005, 19-1:25-37.
- ⁶⁶ Lau S., Guan X., Cytogenetic and molecular genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005, 26-6:659-665.

-
- ⁶⁷ Suriawinata A, Xu R. An update on the molecular genetics of hepatocellular carcinoma. *Seminars in liver disease*. 2004;24: 77-88
- ⁶⁸ Thorgeirsson S. S., Lee J. S., Grisham J. W., Functional Genomics of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2006, 43:145-150.
- ⁶⁹ Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene*. 2006 Jun 26;25(27):3778-86.
- ⁷⁰ Ortensi B, Setti M, Osti D, Pelicci G. Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Feb 28;4(1):18.
- ⁷¹ Heywood RM, Marcus HJ, Ryan DJ, Piccirillo SG, Al-Mayhany TM, Watts C. A review of the role of stem cells in the development and treatment of glioma. *Acta Neurochir (Wien)*. 2012 Jun;154(6):951-69; discussion 969.
- ⁷² Nikitin AY, Matoso A, Roy-Burman P. Prostate stem cells and cancer. *Histol Histopathol*. 2007 Sep;22(9):1043-9.
- ⁷³ Chen X, Rycaj K, Liu X, Tang DG. New insights into prostate cancer stem cells. *Cell Cycle*. 2013 Feb 15;12(4):579-86.
- ⁷⁴ Hanna JM, Onaitis MW. Cell of origin of lung cancer. *J Carcinog*. 2013 Mar 16;12:6.
- ⁷⁵ Mizugaki H, Sakakibara-Konishi J, Kikuchi J, et al. CD133 expression: a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers. *Int J Clin Oncol*. 2013 Mar 12.
- ⁷⁶ Alamgeer M, Peacock CD, Matsui W, Ganju V, Watkins DN. Cancer Stem Cells in Lung Cancer: Evidence and Controversies. *Respirology*. 2013 Apr 16.
- ⁷⁷ Farnie G, Clarke RB. Mammary stem cells and breast cancer--role of Notch signalling. *Stem Cell Rev*. 2007 Jun;3(2):169-75.
- ⁷⁸ Tang AL, Owen JH, Hauff SJ, Park JJ, Papagerakis S, Bradford CR, Carey TE, Prince ME. Head and Neck Cancer Stem Cells: The Effect of HPV--An In Vitro and Mouse Study. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013 Apr 12
- ⁷⁹ Welsch T, Kleeff J, Friess H. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer: advances and challenges. *Curr Mol Med*. 2007 Aug;7(5):504-21.
- ⁸⁰ Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):111-5.
- ⁸¹ Pohl A, Lurje G, Kahn M, Lenz HJ. Stem cells in colon cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2008 Mar;7(2):92-8.

-
- ⁸² Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 2005 Oct 15;65(20):9328-37.
- ⁸³ Chen Y, Yu D, Zhang H, He H, et al. CD133(+)EpCAM(+) phenotype possesses more characteristics of tumor initiating cells in hepatocellular carcinoma Huh7 cells. *Int J Biol Sci.* 2012;8(7):992-1004.
- ⁸⁴ Szabo G, Lippai D. Molecular hepatic carcinogenesis: impact of inflammation. *Dig Dis.* 2012;30(3):243-8.
- ⁸⁵ Ma S, Chan KW, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 2542-2556
- ⁸⁶ Oishi N, Wang XW. Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells. *Int J Biol Sci.* 2011 Apr 26;7(5):517-35.
- ⁸⁷ Yamashita T, Forgues M, Wang W, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2008 Mar 1;68(5):1451-61.
- ⁸⁸ S. Ma, K. W. Chan, L. Hu et al., Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells, *Gastroenterology* 2007, vol. 132, no. 7, pp. 2542–2556.
- ⁸⁹ Zhu Z, Hao X, Yan M *et al.* Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133(+)CD44(+) population in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 2010; **126**: 2067–78.
- ⁹⁰ Z. F. Yang, P. Ngai, D. W. Ho et al., Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer, *Hepatology* 2008, vol. 47, no. 3, pp. 919–928.
- ⁹¹ Terris B, Cavard C, Perret C. EpCAM, a new marker for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2010 Feb;52(2):280-1.
- ⁹² Ma S, Chan KW, Lee TK et al. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Mol. Cancer Res.* 2008; **6**: 1146–53.
- ⁹³ M. Dean, T. Fojo, and S. Bates, “Tumour stem cells and drug resistance,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, no. 4, pp. 275–284, 2005.
- ⁹⁴ Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:1451–1461.
- ⁹⁵ Schulze K, Gasch C, Staufer K, Nashan B, et al. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2013 Apr 24.

-
- ⁹⁶ N.Haraguchi, H. Ishii, K.Mimori et al., “CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells,” *Journal of Clinical Investigation* 2010, vol. 120, no. 9, pp. 3326–3339.
- ⁹⁸ Wang B, Jacob ST. Role of cancer stem cells in hepatocarcinogenesis. *Genome Med.* 2011 Feb 22;3(2):11.
- ⁹⁹ Chiba T, Zheng YW, Kita K, Yokosuka O, et al. Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. *Gastroenterology* 2007, 133:937-950.
- ¹⁰⁰ Wang H, Pan K, Zhang HK, Weng DS, et al: Increased polycomb-group oncogene Bmi-1 expression correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008, 134:535-541.
- ¹⁰¹ Wong DJ, Liu H, Ridky TW, Cassarino D, et al. Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008 Apr 10;2(4):333-44.
- ¹⁰² Song K, Wu J, Jiang C. Dysregulation of signaling pathways and putative biomarkers in liver cancer stem cells (Review). *Oncol Rep.* 2013 Jan;29(1):3-12.
- ¹⁰³ Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, et al: In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 2003, 17:1253-1270.
- ¹⁰⁴ Kitisin K, Pishvaian MJ, Johnson LB, Mishra L. Liver stem cells and molecular signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Gastrointest Cancer Res.* 2007;1(4 Suppl 2):S13-21.
- ¹⁰⁶ Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843–850.
- ¹⁰⁷ Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000; 11(4): 273-82.
- ¹⁰⁸ Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2008 Oct;48(4):1312-27.
- ¹⁰⁹ Wallmen B, Schrempp M, Hecht A. Intrinsic properties of Tcf1 and Tcf4 splice variants determine cell-type-specific Wnt/ β -catenin target gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2012 Oct;40(19):9455-69.
- ¹¹⁰ MacDonald BT, Tamai K, He X Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* (2009) 17: 9–26.
- ¹¹¹ Tannapfel, A., and C. Wittekind.. Genes involved in hepatocellular carcinoma: deregulation in cell cycling and apoptosis. *Virchows Arch* 2002. 440:345-52.
- ¹¹² Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus. *Science*, 2000;287(5458): 1606–1609

-
- ¹¹³ Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 2000, 14(15): 1837–1851
- ¹¹⁵ 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.
- ¹¹⁶ Ishizaki Y, Ikeda S, Fujimori M et al. Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol*, 2004; 24(5): 1077-83.
- ¹¹⁷ Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2012 May 6;44(6):694-8.
- ¹¹⁸ Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2006; 25(27): 3787-800.
- ¹¹⁹ Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. Alterations of beta-catenin and Tcf-4 instead of GSK-3beta contribute to activation of Wnt pathway in hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)*, 2003; 116(12): 1885–1892
- ¹²⁰ Ma S, Tang KH, Chan YP *et al.* miR-130b promotes CD133+ liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Cell Stem Cell* 2010; **7**: 694–707.
- ¹²¹ Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2007; **67**: 10831–9
- ¹²² Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene*. 2008 Mar 13;27(12):1749-58. Epub 2007 Sep 24.
- ¹²³ Wang XQ, Ongkeko WM, Chen L *et al.* Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP binding cassette G2 pathway. *Hepatology* 2010; **52**: 528–39.
- ¹²⁴ You H, Ding W, Rountree CB. Epigenetic regulation of cancer stem cell marker CD133 by transforming growth factor-beta. *Hepatology* 2010; **51**: 1635–44.
- ¹²⁵ Brimble SN, Sherrer ES, Uhl EW, Wang E, . The cell surface glycosphingolipids SSEA-3 and SSEA-4 are not essential for human ESC pluripotency. *Stem Cells*. 2007 Jan;25(1):54-62

-
- ¹²⁶ Yamashita T, Honda M, Nio K *et al.* Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res.* 2010; **70**: 4687–97.
- ¹²⁷ Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs- microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006; **6**: 259–69.
- ¹²⁸ Law PT, Wong N. Emerging roles of microRNA in the intracellular signaling networks of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2011; **26**: 437–49.
- ¹²⁹ Ji J, Yamashita T, Budhu A *et al.* Identification of microRNA-181 by genome-wide screening as a critical player in EpCAM-positive hepatic cancer stem cells. *Hepatology* 2009; **50**: 472–80.
- ¹³⁰ Budhu A, Jia HL, Forgues M *et al.* Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; **47**: 897–907.
- ¹³¹ Zender L, Kubicka S. Molecular pathogenesis and targeted therapy of hepatocellular carcinoma. *Onkologie.* 2008 Oct;31(10):550-5..
- ¹³² Roberts A, Mishra L: Role of TGF-beta in stem cells and cancer. *Oncogene* 24(37):5667, 2005
- ¹³³ Noda T, Nagano H, Takemasa I, Yoshioka S, Murakami M, et al. Activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon-alpha/5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2009 May 19;100(10):1647-58.
- ¹³⁴ Oishi N, Wang XW. Novel therapeutic strategies for targeting liver cancer stem cells. *Int J Biol Sci.* 2011 Apr 26;7(5):517-35.
- ¹³⁵ Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jun 12;104(24):10158-63.
- ¹³⁶ Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM. The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells.* 2006 Aug;24(8):1852-8.
- ¹³⁷ Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao H. L., Coexpression of CD14 and CD326 Discriminate Hepatic Precursors in the Human Fetal Liver (2007) *J. Exp. Med.* 204, 1973–1987
- ¹³⁸ Sundberg M, Jansson L, Ketolainen J, Pihlajamäki H, et al. CD marker expression profiles of human embryonic stem cells and their neural derivatives, determined using flow-cytometric analysis, reveal a novel CD marker for exclusion of pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 2009 Mar;2(2):113-24.

-
- ¹³⁹ Huang HP, Chen PH, Yu CY, Chuang CY, Stone Let al . Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) complex proteins promote transcription factor-mediated pluripotency reprogramming. *J Biol Chem*. 2011 Sep 23;286(38):33520-32.
- ¹⁴⁰ Lu TY, Lu RM, Liao MY, Yu J, Chung CH, Kao CF, Wu HC. Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2010 Mar19;285(12):8719-32.
- ¹⁴¹ Yamazaki CA, Padovani RP, Biscolla RP, Ikejiri ES, Marchetti RR, Castiglioni ML, Matsumura LK, Maciel RM, Furlanetto RP. Lithium as an adjuvant in the postoperative ablation of remnant tissue in low-risk thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2012 Oct;22(10):1002-6.
- ¹⁴² Krause P, Unthan-Fechner K, Probst I, Koenig S. Cultured hepatocytes adopt progenitor characteristics and display bipotent capacity to repopulate the liver. *Cell Transplant*. 2013 Mar 5. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23485196.
- ¹⁴³ Atkins RJ, Dimou J, Paradiso L, Morokoff AP, Kaye AH, Drummond KJ, Hovens CM. Regulation of glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) by the Akt pathway in gliomas. *J Clin Neurosci*. 2012 Nov;19(11):1558-63
- ¹⁴⁴ Silva AK, Yi H, Hayes SH, Seigel GM, Hackam AS. Lithium chloride regulates the proliferation of stem-like cells in retinoblastoma cell lines: a potential role for the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Vis*. 2010 Jan 13;16:36-45.
- ¹⁴⁵ Cai C, Zhu X. The Wnt/ β -catenin pathway regulates self-renewal of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *Mol Med Rep*. 2012 May;5(5):1191-6.
- ¹⁴⁶ Teng Y, Wang X, Wang Y, Ma D. Wnt/beta-catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Feb 12;392(3):373-9.
- ¹⁴⁷ Merlos-Suárez A, Barriga FM, Jung P, et al. The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell*. 2011 May 6;8(5):511-24.
- ¹⁴⁸ Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. 2009 Jan 29;457(7229):608-11.
- ¹⁴⁹ Fukuma M, Tanese K, Effendi K, Yamazaki K, Masugi Y, Suda M, Sakamoto M. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 regulates epithelial cell phenotype and survival of hepatocellular carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 2013 Feb 1;319(3):113-21.
- ¹⁵⁰ Cadigan KM, Waterman ML. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Nov 1;4(11).

¹⁵¹ Tsedensodnom O, Koga H, Rosenberg SA, Nambotin SB, Carroll JJ, Wands JR, Kim M. Identification of T-cell factor-4 isoforms that contribute to the malignant phenotype of hepatocellular carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 2011 Apr 15;317(7):920-31.

¹⁵² <http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>

¹⁵³ Kavak E, Najafov A, Ozturk N, Seker T, Cavusoglu K, Aslan T, Duru AD, Saygili T, Hoxhaj G, Hiz MC, Unal DO, Birgül-Iyison N, Ozturk M, Koman A. Analysis of the Wnt/B-catenin/TCF4 pathway using SAGE, genome-wide microarray and promoter analysis: Identification of BRI3 and HSF2 as novel targets. *Cell Signal*. 2010 Oct;22(10):1523-35.