

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA GLUKOZ
METABOLİZMASI VE c-MET YOLAĞININ
ETKİLEŞİMİNİN İRDELENMESİ**

YELİZ YILMAZ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2020

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2014970101

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA GLUKOZ METABOLİZMASI VE c-MET YOLAĞININ ETKİLEŞİMİNİN İRDELENMESİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DOKTORA TEZİ

YELİZ YILMAZ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Safiye Neşe ATABEY

İkinci Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Sultan CİNGÖZ

(Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 114S359 sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2014970101

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLOLAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	viii
TEŞEKKÜR.....	xii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hepatosellüler Karsinoma	4
2.1.1 Hepatosellüler Karsinoma Gelişimi ve İlerlemesi.....	4
2.1.2 HCC’de Risk Faktörleri ve Etki Mekanizmaları	6
2.1.2.1 Hepatit Virüsleri	7
2.1.2.2 Aflatoksin Maruziyeti	7
2.1.2.3 Alkol Kullanımı	7
2.1.2.4. Obezite	8
2.2. Obezite ve Kansereleşme Süreci	9
2.2.1 Obezite ve HCC Gelişimi	10
2.2.2 Tümör Hücrelerinde Glukoz Metabolizması	11
2.2.3 Hiperglisemi ve Hiperinsülininin HCC Gelişimindeki Önemi	13
2.3 c-Met Sinyal İletim Yolağı	17
2.3.1 c-Met’in Aktivasyonu ve Hücre İçi Sinyal İletimi	18
2.3.2 HCC’de c-Met’in Önemi	22

2.3.3 Obezite, c-Met ve Tümör Metabolizması İlişkisi	23
2.4 İnsülin Reseptörü Sinyal İletim Yolağı	26
2.4.1 IR Aktivasyonu ve Hücre İçi Sinyal İletimi	27
2.4.2 İnsülin Sinyal İletiminin Hepatokarsinogenezdeki Rolü	29
2.4.3 İnsülin Reseptör İzofomları ve Hepatokarsinogenez Sürecindeki Rollerini	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1 Araştırmanın Tipi	33
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı	33
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	33
3.4 Çalışma Materyali	33
3.5 Araştırmanın Değişkenleri	34
3.6 Veri Toplama Araçları	34
3.6.1 Malzeme ve Cihazlar	34
3.6.2 Yöntemler	43
3.7 Araştırma Planı ve Takvimi	54
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi	55
3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları	55
3.10 Etik Kurul Onayı	55
4. BULGULAR	56
4.1 Yüksek Glukoz ve İnsülinin HCC hücrelerinde c-Met Ekspresyonu ve Aktivasyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi	56
4.2 Yüksek Glukoz ve İnsülin Uyarımının c-Met ve IR Etkileşimindeki Rolünün Belirlenmesi	58
4.3 Yüksek Glukoz ve İnsülin Uyarımında c-Met-IR İlişkili Anahtar Moleküllerin İncelenmesi	62

4.4 Yüksek Glukoz ve Yüksek İnsülinin Ayrı Ayrı veya Birlikte Uygulanmasının HCC Hücrelerinin Proliferasyon, Motilite ve Metastaz Kapasiteleri Üzerine Etkisinin Karşılaştırılması	64
4.5. Yüksek Glukoz-Yüksek İnsülin Koşullarında c-Met İnhibisyonunun Etkisi	68
4.6 Yüksek Glukoz-Yüksek İnsülin Koşullarında c-Met Aktivasyonu ve İnhibisyonunun HCC Hücre Metabolizması Üzerine Etkisi	77
4.7 Yüksek Glukoz ve İnsülin Uyarımının c-Met Aktivasyonu Aracılıklı Hücre Biyolojik Yanıtlarına Etkisinin Belirlenmesi	82
4.7.1 Yüksek Glukoz ve İnsülin Uyarımının HCC Hücre Adezyonu ve Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	82
4.7.2 Yüksek Glukoz ve İnsülin Uyarımının HCC Hücre Motilitesi ve İnvazyonu Üzerine Etkisi	84
4.7.3 Yüksek Glukoz ve İnsülinin HCC Hücrelerinin In vitro Sferoid Oluşumu Kapasitesine Etkisi	90
4.8 HCC’de İnsülin Reseptörü İzofomları ve c-Met İlişkisinin İncelenmesi.....	92
5. TARTIŞMA.....	98
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	108
7. KAYNAKLAR	109
8. EKLER.....	123
8.1. Etik Kurul Raporu	123
8.2. Özgeçmiş	126

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. c-Met sinyal iletiminde görevli anahtar moleküllerin hücre metabolizmasındaki düzenleyici rolleri.....	23
Tablo 2. Araştırmada kullanılan ekipman ve cihazlar	34
Tablo 3. Araştırmada kullanılan kitler ve inhibitörler.....	36
Tablo 4. Araştırmada kullanılan antikorlar	37
Tablo 5. Araştırmada kullanılan RT-qPCR için dizayn edilmiş primer dizileri	38
Tablo 6. Araştırmada kullanılan besi yerleri ve tampon çözeltiler	40



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. HCC gelişim süreci	5
Şekil 2. Sirotik Zeminde HCC Gelişimi	6
Şekil 3. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde obezitenin malignan karaciğer neoplazmasıyla ilişkili ölümlerle korelasyonu.....	9
Şekil 4. Hücre enerji metabolizması.....	14
Şekil 5 c-Met'in Yapısı.....	20
Şekil 6. c-Met sinyal iletimi	21
Şekil 7. IR sinyalleşme mekanizması	28
Şekil 8. HCC hücrelerinde yüksek glukoz ve/veya yüksek insülin uygulamalarının zamana bağlı c-Met aktivasyonu üzerine etkisinin western blot yöntemi ile incelenmesi	56
Şekil 9. Western blot yöntemi ile yüksek glukoz ve insülin uygulamasının c-Met aktivasyonuna etkisinin incelenmesi.....	58
Şekil 10. c-Met'in yüksek glukoz ve/veya insülin uyarımı ile hücresel ekspresyon ve dağılımının immünfloresan olarak gösterilmesi.....	59
Şekil 11. SK-Hep1 ve HUH7 hücrelerinde IR ve c-Met protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	60
Şekil 12. Spearman Korelasyon analizi ile IR-c-Met protein ekspresyonlarındaki korelasyonun yüksek glukoz uyarımı sonucu incelenmesi.	61
Şekil 13. c-Met-IR etkileşiminin yüksek glukoz (HG) ve insülin uyarımları konucu starvasyon grubuna oranla analizi.	62
Şekil 14. Erk 1/2 ve Akt proteinlerinin yüksek glukoz uygulaması sonrası zaman bağımlı aktivasyonunun western blot yöntemi ile analizi.	63
Şekil 15. Yüksek glukoz ve yüksek insülinin ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının Erk, Akt ve STAT3 aktivasyonlarına etkisinin karşılaştırılması	64
Şekil 16. Yüksek glukoz ve/veya insülin uygulamalarının hücre proliferasyonu üzerine etkisi	65
Şekil 17. Yüksek glukoz ve/veya insülin uygulamalarının hücre motilitesi üzerine etkisi.	65

Şekil 18. Zebrabalığı larvalarının çeşitli konsantrasyonlarda yüksek glukoz (YG) ve/veya yüksek insülin (YI) ortamlarında gelişimlerinin incelenmesi.	66
Şekil 19. Zebrabalığı zenograft modelinde yüksek glukoz-yüksek insülin uygulamasının HCC hücrelerinin metastaz kapasitesine etkisinin belirlenmesi	68
Şekil 20. SU11274 uygulamasının YGYİ tarafından oluşturulan c-Met aktivasyonuna etkisinin western blot yöntemi ile analizi	69
Şekil 21. SU11274 uygulamasının YGYİ tarafından oluşturulan c-Met aktivasyonuna etkisinin immünfloresan görüntüleme yöntemi ile SK-Hep1 (A) ve HuH-7 (B) hücrelerinde analizi.....	70-71
Şekil 22. SU11274 uygulamasının YGYİ tarafından oluşturulan IR aktivasyonuna etkisinin western blot yöntemi ile analizi.	72
Şekil 23. SU11274 uygulamasının YGYİ tarafından oluşturulan IR aktivasyonuna etkisinin immünfloresan görüntüleme yöntemi ile SK-Hep1 (A) ve HuH-7 (B) hücrelerinde analizi.....	73-74
Şekil 24. c-Met inhibitörünün yüksek glukoz ve insülin varlığında gerçekleşen c-Met-IR etkileşimine etkisinin incelenmesi..	75
Şekil 25. Floresan işaretli Tomato-IR-A ve GFP-c-Met'in canlı hücre görüntülemesi ile takip edilmesi i.	76
Şekil 26. c-Met inhibitörünün yüksek glukoz ve insülin uygulaması ile aktive olan Erk ve Akt fosforilasyonu üzerine etkisi	77
Şekil 27. c-Met inhibitörünün yüksek glukoz uygulaması ile aktive olan Erk ve Akt fosforilasyonu üzerine etkisi.	77
Şekil 28. Seahorse deneyi ile YGYİ/SU11274 varlığında mitokondriyal stres yaratılan durumlarda HCC hücre metabolizması analizi	78
Şekil 29. Glukoz metabolizması ile ilişkili genlerin YGYİ uygulaması ile veya YGYİ'e ek olarak SU11274 varlığında ekspresyonlarının katlı değişim grafikleri.	79
Şekil 30. PGC-1α'nın viral olarak indüklendiği hücrelerde starvasyon, yüksek glukoz, yüksek insülin ve c-Met inhibitörü etkisinin incelenmesi.....	80
Şekil 31. SNU 398 mock ve GFP-Met overeksprese eden HCC hücrelerinde bazal düzeyde EGR ve TXNIP gen ekspresyonlarının incelenmesi.....	81

Şekil 32. HCC hücrelerinde starvasyon, yüksek glukoz-yüksek insülin (YGYİ) ve c-Met inhibitörü uygulamalarının EGR (A) ve TXNIP (B) gen ekspresyonları üzerine etkisinin incelenmesi.....	82
Şekil 33. YGYİ'nin tek başına ya da c-Met inhibitörü SU11274 veya IR inhibitörü HNMPA-(AM)3 ile birlikte uygulamasının hücre adezyon ve proliferasyonuna etkisi..	83
Şekil 34. YGYİ, SU11274 ve HNMPA-(AM)3 uygulamalarının ayrı ayrı ya da birlikte HCC migrasyonu üzerine etkilerinin analizi	85
Şekil 35. Yüksek glukoz ve insülin uygulamalarının c-Met ve IR inhibitörleri ile ayrı ayrı ya da birlikte HCC invazyonuna etkisinin incelenmesi	86
Şekil 36. Zebrabalığı zenograft modelinde metastatik ve metastatik olmayan zebrabalığı larvalarının değerlendirilmesi.....	87
Şekil 37. YGYİ/SU11274 uygulamalarının hücre iskeleti üzerine olan etkisinin incelenmesi.....	88-89
Şekil 38. ACTG gen ekspresyonunun katlı artış olarak c-Met klonlarında ve YGYİ/SU11274 uygulanan HCC hücrelerinde analiz edilmesi	90
Şekil 39. Yüksek glukoz ve insülin uyarımının HUH-7 hücrelerinde sferoid oluşumuna etkisinin incelenmesi.....	91
Şekil 40. EMT ve kök hücre karakteri ile ilişkili bazı gen ekspresyonlarının katlı artış olarak YGYİ/SU11274 uygulanan HCC hücrelerinde analiz edilmesi.	92
Şekil 41. Kontrol plazmidi pRC, IR-A ve IR-B kalıcı ekspresyon klonlarında bazal düzeyde INSR-A ve INSR-B (A); MET, TXNIP, EGR, ACTG (B) genlerinin katlı değişim gen ekspresyon grafikleri	93
Şekil 42. Oldukça düşük MET eksprese eden (SNU 398 Mock) ve yüksek düzeyde c-Met eksprese eden (SNU 398 GFP-Met) klonlarında bazal koşullarda INSR-A gen katlı değişim ekspresyon grafiği.....	94
Şekil 43. YGYİ ve YGYİ+SU11274 ile indüklenen HUH-7 pRC, IR-A ve IR-B klonlarda c-Met ve IR aktivasyonlarının western blot yöntemi ile belirlenmesi.	95
Şekil 44. İnsülin reseptörü A (IRA) ya da insülin reseptörü B (IRB) eksprese eden hücrelerde mitokondriyal solunum oksijen tüketiminin (Oxygen Consumption Rate-OCR) değerlendirilmesi ve glikolizin hücreden proton salınımı ile değerlendirilmesi..	96

KISALTMALAR

ACTG: Gamma Aktin

AGE: İleri Glikasyon Son Ürünleri

AGER/RAGE: İleri Glikasyon Son Ürünleri Reseptörü

Akt/PKB: Protein Kinaz B

AMPK: AMP ile Aktive Edilen Protein Kinaz

Asetil CoA: Asetil Koenzim A

ATP: Adenozin Trifosfat

BSA: Sığır Serum Albumin

BCA: Bisinkronik Asit

CAV: Kaveolin

Co-IP: Birlikte immüncökeltme

DNA: Deoksiribonükleik Asit

ECM: Hücre Dışı Matriks

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

EGR: Erken Büyüme Yanıtı

ERK: Ekstrasellüler Olarak Düzenlenen Kinaz

FBS: Fetal Sığır Serum

FDA: Amerikan İlaç Dairesi

FDG-PET: Florodeoksiglukoz Pozitron Emisyon Tomografisi

FGFR: Fibroblast Büyüme Faktörü

FOXO: Forkhead Box O3

GAB1: GRB2-İlişkili Bağlanma Protein

GRB2: Büyüme Faktörü Reseptörü Bağlı Protein 2

GLUT: Glukoz Taşıyıcı

GRB2: Büyüme Faktörü Reseptör Bağlayıcı Protein

GSK3 β : Glikojen Sentaz 3 β

GTP: Guanozin Trifosfat

HbA1C: Hemoglobin A1C

HBV: Hepatit B Virüsü

HCC: Hepatoselüler Karsinoma
HCV: Hepatit C Virüsü
HER: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü
HIF: Hipoksik Koşullarda Hipoksi İle Uyarılan Faktör
HK2: Hekzokinaz 2
HMGA1: Yüksek Mobilite Grup Proteini A2
HT-FIR: Hepatosite Özel İnsülin Reseptörü Transkripsiyon Faktörü
IGF: İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü
IGFR: İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
IL: İnterlökin
IR: İnsulin Reseptörü
IRS: İnsülin Reseptör Substratı
IP: İmmünçökeltme
JNK: c-Jun N-Terminal Kinase
LDH: Laktat Dehidrogenaz
MAPK: Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz
MET: Mezenkimal-Epitelial Transizyon
MMP: Matriks Metalloproteinaz
mTOR: Rapamisinin Mekanistik Hedefi
NaF: Sodyum Florid
NAFLD: Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı
NaCl: Sodyum Klorid
NASH: Alkolik Olmayan Steatohepatit
Na₃VO₄: Sodyum Ortovanadat
NCSLC: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
OXPHOS: Oksidatif Fosforilasyon
PARP: Poly ADP Riboz Polimeraz
PBS: Fosfat Tamponlu Salin
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGFR: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü

PDH: Piruvat Dehidrogenaz
PDHC: Pyruvate Dehydrogenase Complex
PI3K: Fosfatidil-İnositol 3 Kinaz
PIP: Phosphatidylinositol (4,5)-Bifosfat
PVDF: Poliviniliden Diflorid
qPCR: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RET: Transfeksiyon Sırasında Yeniden Düzenlenen
RNA: Ribonükleik Asit
RTK: Reseptör Tirozin Kinaz
RT-qPCR: Reverse-Transkriptaz Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat
SH2: Src Homoloji-2
STAT3: Senesens ile İlişkili İkincil Bir Fenotip
STZ: Streptozotocin
TCA: Trikarboksilik Asit
TGFR: Transforme Edici Büyüme Faktörü Reseptörü
TNF α : Tümör nekroz faktörü α
TM: Transmembran
VDAC1: Voltaj Bağımlı Seçici Anyon Kanalı Protein 1
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
YG: Yüksek Glukoz
Yİ: Yüksek İnsülin
YGYİ: Yüksek Glukoz Yüksek İnsülin

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMADA GLUKOZ METABOLİZMASI VE c-MET
YOLAĞININ ETKİLEŞİMİNİN İRDELENMESİ

**Yeliz YILMAZ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi Balçova 35340
İzmir/Türkiye
yelizyilmaz@outlook.com**

ÖZET

Amaç: Bu tez çalışması kapsamında hepatosellüler karsinoma (HCC) hücrelerinde yüksek glukoz ve insülin uyarımı sonucu c-Met ve insülin reseptörü karşılıklı etkileşiminin HCC hücrelerinin biyolojik yanıtlarına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu araştırmada immünblotlama ve immünfloresans, birlikte-immünçökeltme, kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu, gerçek zamanlı hücre adezyon ve proliferasyon testi, motilite ve invazyon analizi, Seahorse hücre metabolizması analizi ve zebrabalığı zenograft modelinde metastaz testi yöntemleri kullanılmıştır.

Bulgular: Yüksek glukoz ve yüksek insülin ile uyarılan HCC hücrelerinde c-Met'in ekspresyonunda ve aktivasyonunda artış olduğu belirlenmiştir. Bu uyarımlar ile c-Met altında yer alan proteinlerin aktive olduğu gösterilmiştir. HCC hücre metabolizmasının c-Met inhibisyonundan etkilendiği görülmüştür. c-Met'in insülin reseptörü ile karşılıklı etkileşimi incelenmiş, yüksek glukoz ve insülin uyarımı sonucu iki reseptörün daha yüksek oranda etkileştiği saptanmıştır. HCC hücrelerinin proliferasyon, adezyon, migrasyon ve invazyon yeteneklerinin yüksek glukoz ve insülin varlığında arttığı, c-Met inhibisyonu ile baskılandığı görüldürken, ilaveten insülin reseptörü inhibisyonu ile bu özelliklerin daha da baskılandığı belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışma ile ilk kez yüksek glukoz ve insülin varlığında insülin reseptörü ve c-Met'in etkileştiği, bu etkileşimin daha metastatik HCC hücrelerinin oluşumunu sağladığı belirlenmiştir. İki reseptörün inhibisyonu ise HCC hücrelerinin bu kabiliyetlerini sınırlamaktadır ve özellikle obezite temelinde gelişen HCC'de iyi birer tedavi adayı olarak önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: İnsülin, glukoz, c-Met, insülin reseptörü, HCC

INVESTIGATING THE CROSSTALK OF GLUCOSE METABOLISM AND c-MET
PATHWAY IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

**Yeliz YILMAZ, Institute of Health Sciences, Department of Medical
Biology and Genetics, Dokuz Eylül University Health Campus Balçova
35340 İzmir/Turkey
yelizyilmaz@outlook.com**

ABSTRACT

Objective: In the context of this study, investigating the crosstalk of c-Met and insulin receptor under high glucose and insulin induction and the effect of this interaction on HCC cell biology is aimed.

Methods: Immunoblotting and immunofluorescence, co-immunoprecipitation, quantitative polymerase chain reaction, real time cell adhesion and proliferation, motility and invasion analysis, Seahorse cell metabolism assay and metastasis analysis in zebrafish xenograft model were used in this study.

Results: c-Met expression and activation are elevated under high glucose and insulin conditions. Besides downstream molecules are also activated as a result. HCC cell metabolism is affected when c-Met is inhibited. The interaction of c-Met with insulin receptor is increased when cells are treated with high glucose and insulin. Cell adhesion, proliferation, motility and invasion are increased with high glucose and insulin induction. The effects are reversed with c-Met inhibition and even more together with insulin receptor inhibition.

Conclusion: It has been shown for the first time that c-Met and insulin receptor are interacting as a result of high glucose and insulin induction, which helps HCC cells to gain more metastatic abilities. However these effects are suppressed when both receptors are inhibited, and both receptors are suggested as valuable therapeutic targets especially in HCC developed in the background of obesity.

Keywords: Insulin, glucose, c-Met, insulin receptor, HCC

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer kanseri oldukça hızlı bir yükseliş ivmesine sahip bir kanser türü olup, dünya genelinde 1990-2015 yılları arasında karaciğer kanseri tanısı alan kişi sayısı %75 artmıştır (1). Her 100.000 kişiden yaklaşık 10'u karaciğer kanseri tanısı almakta olup, karaciğer kanseri dünyada en sık tanı alan altıncı kanser tipidir ve kanserden kaynaklı ölümlerin erkeklerde ikinci, totalde dördüncü sebebidir (2). Uzun süreli inflamasyon, oksidatif stres ve fibrojeniz sonucu alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (*non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD*)'den gelişen alkolik olmayan steatohepatit (*non-alcoholic steatohepatitis: NASH*), karaciğerde fibrozis, siroz ve HCC süreci gerçekleşmektedir.

Klinik çalışmalar özellikle obezite, diyabet ve yüksek kan glukozu ve yüksek kan insülin seviyesinin HCC gelişimi için risk faktörleri olduğunu ve HCC'de kötü prognostik belirteçler olduğunu göstermektedir (3,4). Obezite, diyabet, yüksek kan glukozu ve insülin seviyesi ile invaziv ve agresif HCC fenotipi korrelasyon çalışmaları epidemiyolojik olarak sınırlandırılmış, moleküler mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Yüksek glukoz ve insülin varlığının insülinel seragn reseptörünü aktive ettiği bilinmektedir. Aktive olan insülin reseptörünün HCC'de hangi reseptörler ile etkileşime sebep olduğu konusundaki çalışmalar limitlidir. c-Met ise HCC sürecindeki aktivasyonunun önemi iyi tanımlanmış bir reseptördür ve hastalarda kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Yaptığımız literatür taramaları, yüksek glukoz ve insülin varlığında aktive olan insülin reseptörünün c-Met ile karşılıklı etkileşim gösterebileceğini ve c-Met yolağının aktive olabileceğini düşündürmüştür.

Bu tez çalışmasında yüksek glukoz ve insülin varlığında c-Met aktivasyon mekanizmalarının araştırılması ve insülin reseptörü ile olası etkileşiminin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

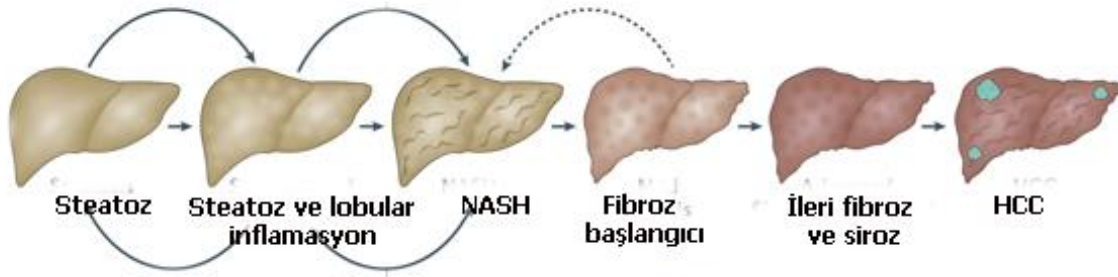
2.1 Hepatosellüler Karsinoma

Primer karaciğer kanserleri, karaciğer kanserinin en sık rastlanan türüdür. Kolanjiokarsinom, karaciğer anjiosarkom, hepatoblastom ve hepatosellüler karsinoma primer karaciğer kanserinin alt tipleridir. Hepatosellüler karsinoma en sık rastlanan primer karaciğer kanseri tipi olup, tüm primer karaciğer kanserlerinin %75 gibi büyük bir yüzdesini ise oluşturur (1). HCC genellikle hastalığın geç dönemlerinde tanı almaktadır, bunun sebepleri arasında mevcut etkin erken tanı testlerinin olmaması, hastalığın erken dönemlerinde semptom vermemesi ve taramaların yetersiz oranda yapılması sayılabilir (5,6). Hastalığın prognozu oldukça kötüdür ve henüz ileri aşamadaki HCC gelişimini geri döndürecek bir tedavi bulunmamaktadır. Tedavi almayan hastaların sağ kalım süreleri ise ortalama 7 aydır (5). Karaciğerin kısmi cerrahi rezeksiyonu ve karaciğer nakli en başarılı tedavi yöntemi olsa da, yalnızca ilerleyen aşamaya gelmemiş hastalara uygulanabilmektedir. İleri aşamadaki HCC hastalarında ve cerrahi girişim sonrasında sıklıkla gelişen nüks durumunda uygulanacak tedavi girişimleri oldukça kısıtlıdır. Şimdiye kadar yalnızca iki multikinaz inhibitörü, Sorafenib ve Regorafenib, HCC tedavisinde kullanılmak üzere Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı almıştır. Her iki inhibitör de toplam sağkalım süresini anlamlı olarak arttırsalar da bu süre bir yıldan daha uzun değildir (7). HCC'deki kötü sağkalım oranlarının en önemli nedenleri vasküler invazyon ve metastaz gelişimidir. Lokal yayılım ve özellikle portal damar gibi kan damarlarına invazyon oldukça yaygındır. HCC hücreleri buradan diyafram ve kolona ve peritoneal boşluğa yayılabildiği gibi, damar içinden uzak organlara metastaz yaparak kemiğe, akciğere, beyne ve adrenal bezlere de yerleşebilmektedir (8).

2.1.1 Hepatosellüler Karsinoma Gelişimi ve İlerlemesi

Karaciğerin %80'ini parankimal hücreler ve hepatositlerden köken alır. Bu hücreler kanı filtreleyerek hepatotoksik ajanları metabolize ederken onların toksik

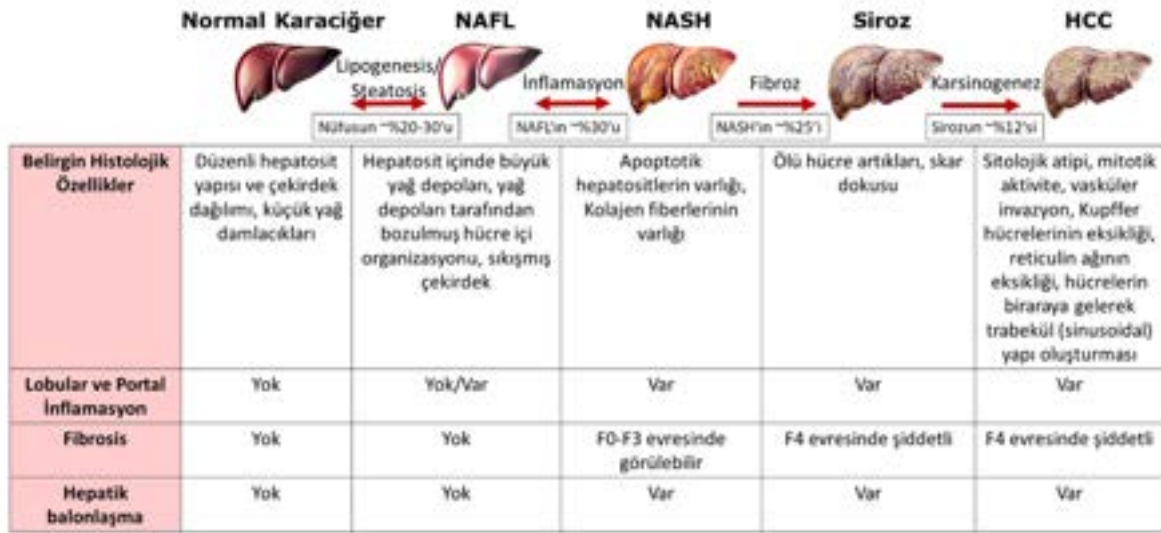
etkisine maruz kalır. Çevresel ajanlar, yüksek miktarda alkol kullanımı, viral enfeksiyonlar gibi etmenler ile kronik temas hepatosit ölümüne sebep olarak karaciğerde inflamatuvar bir ortam yaratmaktadır (9). İnflamatuvar yanıtta görevli en önemli sitokinler interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-2 (IL-2), interlökin-6 (IL-6), interlökin-17 (IL-17) ve Tümör nekroz faktörü α (tumor necrosis factor α : TNF α)'dır. Bu süreç boyunca karaciğer Küpffer hücreleri tarafından salgılanan birçok proinflamatuvar sitokin, parenkimal hücreleri aktive ederek hasarı onarma amaçlı rejenerasyon sürecini başlatmaktadır. Sitokinler tarafından uyarılan yara iyileşmesi durumuna büyüme faktörleri de katkı sağlamakta, tetiklenen sinyalleşme yolları sürekli rejenerasyon sürecini uyarmaktadır. Bu süreç uzun vadede pre-malign hepatositlerde proliferasyon, anjiyogenez, sağkalım gibi hücre yanıtları kontrol eden mekanizmaların deregölasyonu ve ekstrasellüler matriks (ECM) kompozisyonunun bozulması ile sonuçlanmaktadır (**Şekil 1**). Bu da fibrozis gibi karaciğer yapısını bozan değişikliklere neden olmaktadır (10).



Şekil 1. HCC gelişim süreci (10'dan düzenlenmiştir).

Fibrozis, akut karaciğer hasarında karaciğerin yapısını korumaya yönelik yara iyileşmesini tetikleyen naif bir mekanizmayken, sürekli hasar durumunda kronik ve fonksiyonel olmayan bir mekanizmaya dönüşür ve HCC gelişiminde oldukça önemli basamaklardan birisi haline gelir. İleri fibrozis durumunda fibrotik yara oluşumu görülür ve bunu genellikle siroz gelişimi takip eder. Sağlıklı karaciğerden, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı evresine kadar olan bozulmalar tedavi edilebilirken, NASH'ten sonra gelişen siroz geri döndürülemez bir hasar yaratır (9,10).

Siroz gelişimi çok basamaklı ve uzun yıllar alan bir süreçtir ve hastalarının %70-90'ında HCC siroz zemininde gelişir. Hepatit B/Hepatit C (HBV/HCV) enfeksiyonları siroz gelişimine önemli katkı sağlamaktadır. Kronik hepatitin gelişmesi hastalarda ortalama 10 yılda gerçekleşirken, siroz gelişimi 20 yıl, HCC gelişimi ise 30 yıl sürmektedir. Basamaklı gelişen siroz sürecinde hastalık inflamasyona bağlı kronik hasar, rejenerasyon ve displazi doğrultusunda seyretmektedir (8). Siroz gelişimi olmadan alkolik olmayan yağlı karaciğer ile ilişkilendirilen HCC'de en önemli etiyolojik etken olarak metabolik sendrom tanımlanmaktadır (**Şekil 2**) (11,12).



Şekil 2. Sirotik Zeminde HCC Gelişimi

2.1.2 HCC'de Risk Faktörleri ve Etki Mekanizmaları

HCC gelişiminde genetik faktörlerden ziyade çevresel faktörler rol oynamaktadır. En önemli çevresel risk faktörlerini arasında kronik hepatit B ve C enfeksiyonları, aflatoksin maruziyeti, yağlı karaciğer hastalığı, alkol kullanımına bağlı gelişen siroz, obezite ve diyabet yer almaktadır (3).

2.1.2.1 Hepatit Virüsleri

Hepatit B ve C enfeksiyonları en sık gözlenen etiyolojik ajanlardır. Hepatitis B virüsünü taşıyıcılarının hayat boyu HCC geliştirme riski %10-25'tir, HBV bir DNA virüsüdür ve hepatositleri enfekte ederek hücre genomuna yerleşmekte, bu süreçte oluşan mutasyonlar ise HCC gelişimine zemin hazırlamaktadır (13). Hepatitis virus C ise genoma entegre olmayan bir RNA virüsüdür ve genellikle tümörigenez başlangıcında primer rol oynamamaktadır. Ancak ileri dönemde özellikle siroz gelişiminde önem kazanmaktadır, kronik HCV enfeksiyonu sonrasında HCC gelişme riskinin 10-20 kat artmasına neden olmaktadır (14,15). Son yıllarda geliştirilen antiviral tedaviler ve koruyucu aşı programları sayesinde hepatit enfekte HCC hasta sayısı oldukça düşmüştür. Tayvan'da gerçekleştirilen 30 yıllık bir önleyici aşı programının raporu, HBV aşılmasının HCC görülme sıklığını %80, ölüm sıklığını ise %92 düşürdüğünü göstermektedir (16).

2.1.2.2 Aflatoksin Maruziyeti

HCC gelişiminde önemli genotoksik ajanların başında Aflatoksin B1 maruziyeti gelir. Aflatoksinler *Aspergillus* türleri tarafından üretilen mikotoksinlerdir ve genellikle buğday, kurubaklagiller, mısır ve yerfıstığında rastlanır (17). Vücuda girdikten sonra kan ile karaciğere taşınarak hepatositlerin içine alınır ve hücre içindeki sitokrom P-450 sistemi ile metabolize olurlar. Metabolizasyon sırasında oluşan AFV1-8,9-epoksit oldukça kararsız bir reaktiftir ve hücre içinde DNA'ya ve diğer proteinlere saldırabilir (18). Böylece oluşan mutasyonlar tümörigenez sürecini başlatır.

2.1.2.3 Alkol Kullanımı

Kronik alkol kullanımı özellikle gelişmiş ülkelerde önemli çevresel risk etmenleri arasında yer alır. Aflatoksin B1 gibi, alkol de karaciğerde metabolize olduğu için, bu metabolizasyon sırasında en büyük zararı karaciğer hücreleri görür (19). Karaciğer hasarı endotoksin maruziyeti, inflamasyon ve oksidatif strese bağlı olarak gelişir.

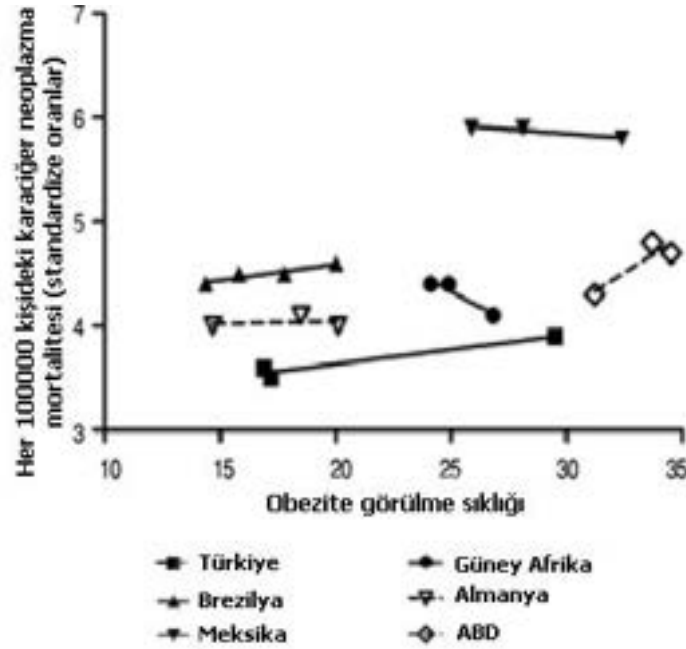
Alkolün karaciğerde oksidatif olarak asetaldehide dönüşmesi sonucu toksik ve karsinojenik bir molekül olan asetaldehid dolaşıma katılır, bağırsak duvarında incelmeye gerçekleştirir ve bu incelmeye endotoksinlerin vücuda geçişini artırır (20). Endotoksinler Kupffer hücrelerinden reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve inflamatuvar sitokinlerin salınımını sağlayarak karaciğerde kronik inflamasyon ortamı yaratır. Alkolün uzun süreli kullanımı özellikle diğer risk faktörlerinin etkilerini arttırarak gerçekleşmektedir; örneğin endotoksin maruziyetini ve HCV enfeksiyonu riskini yükseltir, ya da alkol tüketimi sayesinde artan CYP450 aktivasyonu diyetle ve sigara ile alınan karsinojenlerin daha yüksek metabolizasyonunu sağlayarak hepatositlerde daha fazla karsinojenik ajanın birikmesine sebep olmaktadır (21). Gelişen kronik inflamasyon ve karsinojen birikimi alkole bağlı steatosis, fibrozis, siroz ve HCC gelişimine sebep olur.

2.1.2.4 Obezite

Obezite 1997 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından global epidemi olarak tanımlanmıştır ve vücut kitle endeksi 30 kg/m² olan bireyler obez olarak sınıflandırılmıştır. WHO'nun verilerine göre obez yetişkin sayısı 1975 yılından beri dünya genelinde üçe katlanmıştır, 2016 yılında yetişkinlerde fazla kilolu oranı %39 iken, obez oranı ise %13'tür (22). 2005 yılında yayınlanan bir çalışmada dünya genelinde 937 milyon fazla kilolu, 396 milyon obez yetişkin bulunurken, ileriye dönük yapılan analizlerde 2030 yılında bu rakamların sırasıyla 1,35 milyara ve 573 milyona ulaşacağı tahmin edilmiştir (23). Ancak yeni projeksiyon analizleri şimdiden 2030 yılında dünya genelinde obez oranının %48,9 olacağı yönündedir (24).

Yukarıda belirtilen risk faktörlerinin HCC gelişimine katkısı aynı kalmakta ya da azalmaktadır, ancak HCC insidansı global olarak artmaya devam etmektedir. Türkiye'de HCC'ye bağlı ölüm oranı 2009-2013 yılları arasında %21,9'a yükselmiştir, bu oran Amerika'da %20'dir (25). Özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan Türkiye gibi ülkelerde karaciğer neoplazmlarına bağlı ölüm ve obezite ilişkisinde paralel bir yükseliş gözlenmektedir (**Şekil 3**). Amerika'da HCC gelişimi 1979 ile 2007 yılları karşılaştırıldığında 3 kat artmıştır ve hastaların üçte biri hepatit yönünden negatiftir

(26). Bu artışın kaynağının obezite ile ilişkili diyabet, NAFL ve NASH olduğu belirtilmektedir. Mayo Clinic'te NASH hastaları ile gerçekleştirilen güncel bir çalışmada obezite ile ilişkili diyabet zeminine sahip hastalarda HCC gelişim riskinin anlamlı oranda daha yüksek olduğu belirlenmiştir (27).



Şekil 3. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde obezitenin malignan karaciğer neoplazmasıyla ilişkili ölümlerle korrelasyonu (25'ten düzenlenmiştir).

2.2 Obezite ve Kanserleşme Süreci

Organizmanın düzenli çalışmasında görevli birçok sistemde obeziteye bağlı bozukluklar görülür. Bu sistemlerin başında insülin, insülin-benzeri büyüme faktörleri (Insulin-like growth factors : IGF) 1 ve 2, leptin, adiponektin, inflamasyon ile ilişkili sitokinler ve steroid hormonları yer alır. Bozulan sistemlerin etkilediği en önemli organ ve dokular karaciğer, adipoz doku, kolon, böbrek, meme, endometrium ve pankreasır. Obezitenin risk faktörü olduğu tümörler de genellikle bu dokulardan gelişmektedir (28,29). Obezite ile ilişkili olarak gelişen metabolik sendrom, insülin direnci ve NAFLD HCC için gittikçe önem kazanan risk faktörleridir (30).

Obezite ile ilişkili değişiklikler, Hanahan ve Weinberg tarafından tanımlanan kanserleşme niteliklerini etkileyerek tümörigenez ve metastaz süreçlerini tetiklemektedir (31). Obezite ile kanda yükselen başta insülin olmak üzere, IGF1-2, leptin ve adiponektin, hücre yüzeyindeki ilişkili reseptörün aktivasyonunu sağlamaktadır. Bunun sonucunda temel olarak proliferatif mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (mitogen-activated protein kinase: MAPK) yolağı ve hücre sağkalımı ile ilişkili protein kinaz B (Protein kinase B (PKB diğer adıyla Akt) yolağı açılmaktadır. Ayrıca bu sinyal yollarının aktivasyonu, peroksizom proliferatörü ile aktive edilmiş reseptör (peroxisome proliferator activated receptor: PPAR) ve AMP ile aktive edile protein kinaz (AMP-activated protein kinase: AMPK) gibi hücre metabolizmasında merkezi rol oynayan proteinleri regüle ederek tümör metabolizmasının artan enerji ihtiyacını sağlamaktadır (28). Obezite tarafından aktive edilen diğer sistem ise tümör oluşumuna zemin hazırlayan inflamasyondur. Kronik inflamasyonun temel mekanizmaları arasında Janus kinaz (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3: JAK/STAT3) ve Nükleer faktör kappa B (nuclear factor-kB : NF-kB) sinyal yollarının aktivasyonu gelir. Adipoz stromal hücreler gibi visseral yağ dokusundan salgılanan adipo-sitokinler (IL-6, FGF-21, leptin gibi..) STAT3/MAPK/PI3K aktivasyonu ile proliferasyonu, anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu ile hücre sağkalımını, pro-angiogenik gen ekspresyonu ile de metastazı artırır (32).

2.2.1 Obezite ve HCC Gelişimi

Obezite ile kanda glukoz, insülin ve serbest yağ asidi düzeylerinin artması, karaciğer başta olmak üzere metabolizma ilişkili birçok sistemin faaliyetlerini etkiler. Dolaşımdaki serbest yağ asitlerindeki artış, karaciğerde de novo lipogenez artış ve mitokondri β oksidasyonundaki düşüş hepatositlerde NAFLD ile karakterize hücre içi yağ birikimine, hepatosit disfonksiyona ve apoptozuna sebep olur (33). Karaciğerde gelişen bu hasarı dengeleyebilmek için hepatosit proliferasyonunu uyaran JAK/STAT3 aktive olurken, NF-kB üzerinden çalışan IL-6 ve Tümör nekroz faktörü (TNF) ve c-Met sinyal yolağı üzerinden çalışan hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi birçok faktör salgılır (34,35). Uzun vadede telafi edilemeyen doku hasarı, kronik inflamasyon, oksidatif stres

ve endoplazmik retikulum (ER) stresi sonucu NAFL süreci, NASH ve sonunda HCC gelişimi görülür (36).

Obezitenin HCC gelişimindeki bir diğer rolü mikrobiyota üzerine olan etkisi sayesinde. Obezite ile değişen bağırsak florası ve geçirgenliği, endotoksinlerin kana daha fazla karışmasına ve portal vende birikmesine sebep olur. Karaciğerde biriken endotoksinler Kupffer hücrelerinin inflamatuvar sitokinleri salgılamasına ve kronik inflamasyonu tetiklemesine sebep olurken; bağırsak mikrobiyotasında obezite ile gerçekleşen değişiklikler hepatik stellat hücrelerini aktive eder ve inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve proteazların salınımını kapsayan senesens ile ilişkili ikincil bir fenotip (Senescence-Associated Secretory Phenotype: SASP) gelişmesine sebep olarak HCC'yi tetikler (28).

2.2.2 Tümör Hücrelerinde Glukoz Metabolizması

Obezite ve buna bağlı ortaya çıkan insülin direnci ile diyabet gelişme sürecinde hiperglisemi ve hiperinsülinemi oluşumu kaçınılmazdır. Epidemiyolojik çalışmalar özellikle insüline duyarlı dokularda (meme, karaciğer, pankreas, kolon, endometriyum gibi) diyabetin kanser gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (37).

Yüksek kan glukozu, tümörigenez ile uzun yıllardır ilişkilendirilmektedir. İnsülin uyarımı ile eksprese olan glukoz taşıyıcılar (glucose transporter: GLUT) aracılığıyla hücre içine alınan glukoz, sitoplazmada glikoliz ile piruvata metabolize edilir. Normal hücreler aerobik koşullarda glikolizden elde edilen piruvatı ağırlıklı olarak mitokondriye taşır ve piruvat dehidrogenaz (PDH) kompleksi ile asetil koenzim A (Asetil CoA)'ya okside eder. Asetil CoA, trikarboksilik asit (TCA) siklusuna girer ve sonuçta oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) yolu ile bir molekül glukozdan yaklaşık 36 ATP elde edilir. Anaerobik koşullarda ise glikoliz sonucu oluşan piruvat çoğunlukla sitoplazmada laktat dehidrogenaz (LDH) tarafından laktata dönüştürülür ve tümör mikroçevresine bırakılır, bu koşullarda 1 molekül glukozdan 2 ATP elde edilmiş olur (38).

Otto Warburg'un 1956 yılında ortaya koyduğu "Warburg etkisi" teorisine göre tümör hücreleri anaerobik ya da aerobik koşullarda glukozu mitokondriyel yolla yakmak yerine glikolizde kullanmayı ve laktik aside çevirerek hücrenin enerji ihtiyacının büyük

kısmını karşılamayı tercih etmektedir (39). Enerji üretimi açısından çok da kârlı olmayan bu tercih, tümör hücrelerinin proliferasyon ve motilite gibi aktiviteler için duydukları yüksek enerji ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla hücre içine oldukça fazla glukoz alımına sebep olmaktadır. Günümüzde hastalarda tümör oluşumunun belirlenmesi için altın standart olarak kullanılan florodeoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi (fluorodeoxyglucose positron emission tomography; FDG-PET) taraması, tümör hücrelerindeki yüksek glukoz metabolizmasından faydalanmaktadır. Hipergliseminin varlığı, tümör hücrelerinin Warburg sürecine geçmesini kolaylaştırmakta ve ihtiyaç duydukları yüksek enerjiyi sağlamaktadır. Hücrelerin Warburg etkisine geçmesi heksokinazlar gibi glikolitik enzimlerin sentezindeki artış, glukoz transporterlardaki artış, laktat birikimine bağlı asidite artışı ve mitokondriyal metabolizmada yer alan moleküllerin konsantrasyonlarının azalması ile tanımlanır. Bu tabloyu yaratan erken mekanizmalar, tümör dokusunun erken evrede hızlı büyümesi sonucunda yeterli düzeyde oksijenlenememesinden kaynaklanan hipoksik koşullarda hipoksi ile uyarılan faktör (hypoxia-inducible transcription factor: HIF) ve serbest oksijen radikalleri (reactive oxygen species: ROS) salınımıdır. Tümör gelişiminde ve ilaç direncinin oluşumu sırasında büyüme faktörlerinin aktivasyonu da önemli bir yer tutar (40, 38). Hücre içinde aktive olan birçok onkogenin ve tümör baskılayıcı genin kanser hücrelerinin metabolizması ile ilişkisi aydınlatılmıştır. Bu genler arasında özellikle Ras, Akt, Myc ve p53'ün rolü oldukça iyi tanımlanmıştır. Ras'ın aktive edici mutasyonlarının glikolizi arttırdığı, Myc'in ise glikoliz ile ilişkili enzimlerin transkripsiyonunda görev aldığı, Akt aktivasyonundaki artışın glukozun hücre içine alımını arttırdığı, p53 inaktivasyonunun ise TIGAR, SCO2 ve NF-κB gibi moleküller üzerinden glikolizi arttırdığı ve glukoneogenezi baskıladığı belirlenmiştir (40).

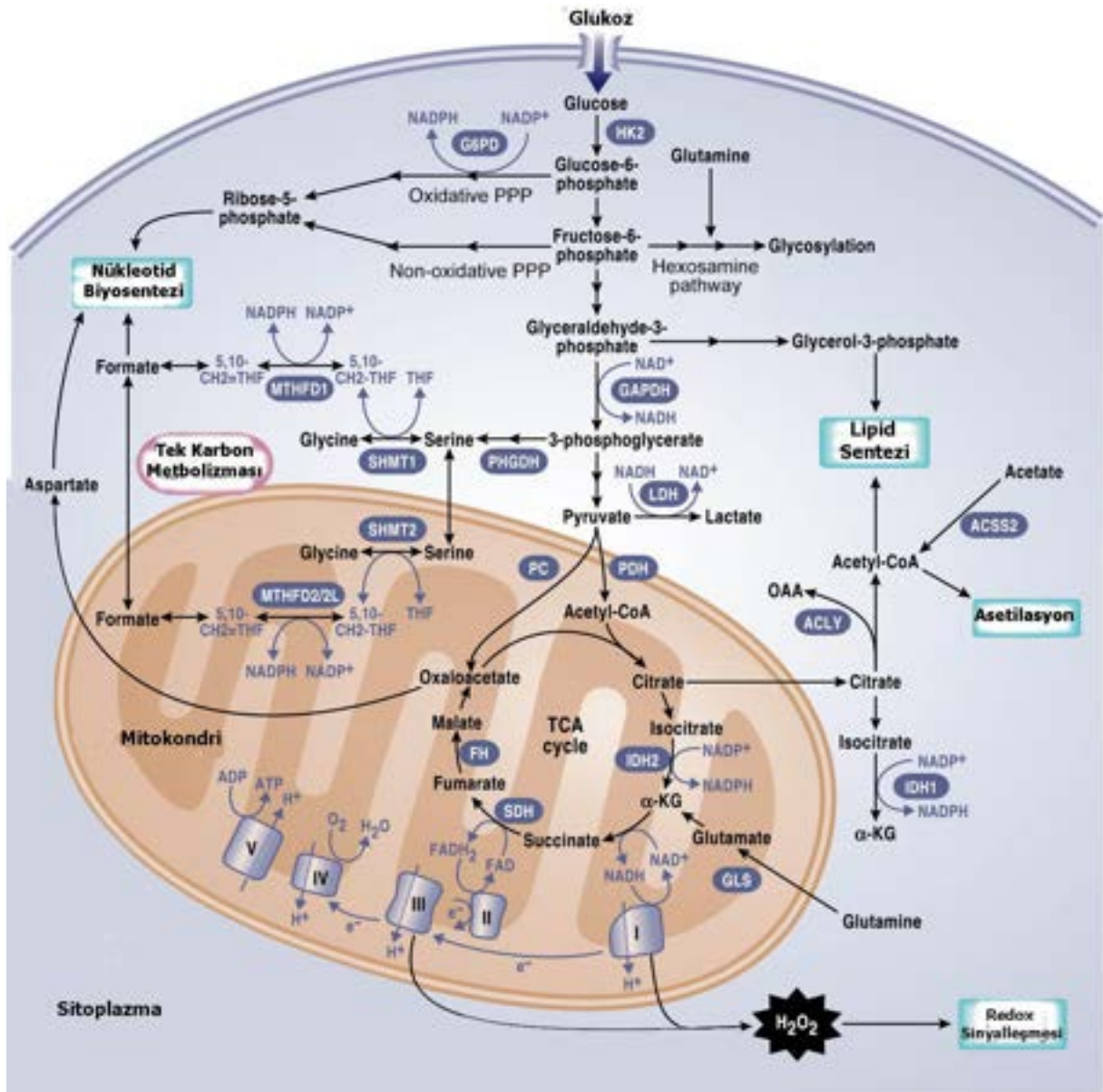
Tümör hücrelerinin enerjiktik olarak kârlı olmayan Warburg yönelimini seçmesinin onlara sağladığı avantajlar vardır. Öncelikle tümör hücreleri yüksek proliferasyon döngüleri nedeniyle nükleotidler, yağ asitleri, membran lipidleri, amino asitler gibi birçok ara moleküle ihtiyaç duymaktadır. Mitokondriyal solunum sonunda karbondioksit kadar dönüştürülen ve kaybedilen glukoz karbonları, Warburg tercihi yapıldığında diğer biyosentez yollarına dahil olarak hücrenin ihtiyacı olan moleküllere dönüşebilmektedir. Warburg etkisinin hücrelere avantaj sağlamadaki bir diğer rolü

sağkalım ve apoptoz üzerindendir. Hücreler mitokondriyal solunumu tercih ettiğinde sitokrom c salınımı artmakta ve apoptoz uyarılmaktadır, ayrıca oksidatif fosforilasyon ROS üretimini arttırmakta ve böylece hücrede kaspaz aktivasyonunu tetiklemektedir (41). Bu durum tümör dokusu içindeki heterojen toplulukta Warburg tercihinin yapan kanser hücrelerine selektif bir avantaj sağlamaktadır.

2.2.3 Hiperglisemi ve Hiperinsülininin HCC Gelişimindeki Önemi

Karaciğer insanda glukoz metabolizmasının oldukça aktif olduğu ve insüline en önemli yanıt veren organların başında yer alır. Bu nedenle obeziteye bağlı hiperglisemi ve hiperinsülinemiden yüksek düzeyde etkilenir.

Literatürde hipergliseminin HCC gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olduğunu ve tedavi sürecini olumsuz etkilediğini gösteren birçok çalışma yer almaktadır. Tayvan'da 51705 tip 2 diyabet hastasında gerçekleştirilen bir retrospektif kohortta glikasyona uğramış hemoglobin A1C (HbA1C) HCC gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (37). HCV pozitif olup karaciğer biyopsisi alınan 203 hastada glukoz toleransı ile HCC gelişimi arasındaki ilişki incelendiğinde, tokluk durumundaki hipergliseminin HCV enfekte HCC hastalarında bağımsız bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir (42). Çeşitli diyet türleri ile oluşturulan HCC fare modelleri incelendiğinde ise, yüksek nişasta içeren diyet ile beslenmiş/yüksek yağlı diyet ile beslenmiş/streptozotocin (STZ) ile pankreas beta hücreleri hasara uğratılmış fare gruplarının hepsinde hiperglisemi olduğu ancak insülin direnci bulgularının yalnızca diyet ile oluşturulan farelerde görüldüğü belirlenmiştir ve STZ ile HCC gelişimi gözlenmemiştir. Bu bulgu fare modelinde hipergliseminin tek başına HCC gelişimine sebep olamadığını düşündürmektedir (43).



Şekil 4. Hücre enerji metabolizması (44'ten düzenlenmiştir.)

Hipergliseminin sadece HCC gelişimi için değil, HCC prognozu için de önemli bir risk faktörü olduğu yapılan restrospektif çalışmalarda belirlenmiştir. Radyofrekans ablasyon yöntemi ile tedavi edilen HCC hastalarının sağkalım ve rekürans oranları yüksek kan şekeri seviyeleri değerlendirilerek incelendiğinde, yüksek kan glukozunun HCC rekürrensini arttırdığını ve 1, 2 ya da 3 yıllık sağkalımları anlamlı derecede düşürdüğünü bulunmuştur (45). Laparoskopik operasyon uygulanmış HCC hastaları post-operatif takip edildiğinde hiperglisemili hastalarda rekürrens birinci yıldan sonra neredeyse

iki kat arttığı, ikinci yıldan sonra ise yaklaşık %70 daha yüksek olduğu olduğu görülmüştür (46). Ayrıca Khan ve ark. tarafından yapılan çalışmada, glukoz toleransı bozulmuş olan hastalarda HCC mortalitesinin 11 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (47).

Hipergliseminin hücre sinyal elemanları üzerine etkisi HCC gelişiminde önemli bir araştırma alanıdır. Bu süreçte etkilenen mekanizmalardan birisi yüksek glukoz varlığında biyomoleküllerin (protein, lipid ya da DNA) herhangi bir enzime ihtiyaç duymadan Maillard reaksiyonu ile glike olması sonucunda ileri glikasyon ürünlerini (advanced glycation end-product: AGEs) oluşturmalarıdır. Glukoz/galaktoz/fruktoz gibi şekerlerin karbonil grupları lizin amino asidine spontan olarak eklenerek bir dizi düzenlenme ile daha stabil hale gelir ve AGE bileşiklerini oluşturur. Ancak bu glikasyon reaksiyonu sırasında özellikle HCC gelişiminde rol oynayan glioksal türevi birçok aktif ara bileşik oluşur (48). Ayrıca sirküle olan AGE'ler, hücre membranında lokalize ileri glikasyon son ürünleri reseptörü (receptor for advanced glycation end-products: RAGE) için ligand görevi görür, bu reseptörü ve hücre içi yolları aktive eder. RAGE aktivasyonu ile NF- κ B, STAT3 ve IL-6 gibi inflamasyon ile ilişkili moleküllerde artış görülür, hücre içi ROS üretimi yükselir, MAPK ve PI3K yolları üzerinden hücre proliferasyonu ve invazyonu artar. AGE'lerin NAFLD sürecinden itibaren yüksek düzeyde bulunduğu ve HCC gelişimine erken dönemde katkı sağladığı belirlenmiş, yüksek serum düzeylerinin NASH gelişiminde önemli bir biyobelirteç olabileceği önerilmiştir (49). Yüksek glikoz varlığında aktivasyonu artan moleküllerin varlığı da HCC gelişimini tetiklemektedir, Chouhan ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada in vitro ve in vivo koşullarda yüksek glukoz uygulamasının Wnt antagonisti DKK4 seviyesini azaltırken, beta-katenin aktivasyonunu ve c-Myc düzeyini arttırdığı, böylece HCC hücrelerini daha proliferatif kıldığı belirlenmiştir (50).

Uzun süreli hipergliseminin karaciğer ya da adipoz doku gibi insüline duyarlı dokuların hücrelerinde, FOXO1, Akt ve GLUT4 gibi temel moleküller üzerinden, glukoneogenez ve lipogenez mekanizmalarında bozulmalara sebep olduğu bilinmektedir. Karaciğer gibi vücut glukoz dengesini sağlamakta önemli organlardaki bu bozulma sonucu kan glukozu etkin şekilde düşürülemede, bu durumu dengelemek için pankreatik beta hücrelerinden daha da yüksek düzeyde insülin salınımı

gerçekleşmektedir. Ayrıca karaciğerde insülin degradasyonu da bozulmakta, hiperinsülinemik bir ortam yaratılmaktadır. İnsülin direncinin ana akımını oluşturan bu gelişmeler karaciğerde oksidatif stresi, inflamasyonu ve fibroz oluşumunu tetikleyerek NAFL-NASH ve HCC gelişimine sebep olmaktadır (51,52).

Epidemiyolojik çalışmalar diyabet tanısı koyulmamış hastaların dolaşımında yüksek düzeyde insülin bulunmasının meme, kolon ve pankreas gibi metabolizma ile ilişkili kanser türleri için bağımsız risk faktörleri olduğunu ve ayrıca hiperinsülinemisinin kötü prognoz ve agresif fenotip ile ilişkili olduğunu göstermiştir (53-56). Hiperinsülinemisinin HCC gelişimine katkısının NAFLD gelişiminden itibaren devam ettiği bilinmektedir. Diyabet ya da NAFLD tanısı almayan 4954 kişide yapılan analizlerde hastalar kan insülin düzeylerine göre 4 gruba ayrılmıştır. Kan insülin düzeyi yüksek hastaların 5 yıl içinde insülin düzeyine paralel bir artış oranı ile NAFLD geliştirdiği yayınlanmıştır ve açlık insülin düzeyinin NAFLD gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir (57). Bril ve ark. tarafından gerçekleştirilen araştırmada ise NAFLD, basit steatoz ve NASH hastalarının insülin salınımı ve karaciğerden temizlenmesi karşılaştırılmıştır. Araştırmanın bulgularına göre steatoz ve NASH hastalarının insülin düzeyleri, NAFLD ile kıyaslandığında anlamlı oranda daha yüksektir, buna karşın hepatik insülin temizlenmesi ise daha düşüktür (58). İtalya'da gerçekleştirilen bir çalışmada ise sağlıklı kişilere göre, HCC hastalarının insülin plazma düzeyinin anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir (59). Fransa'da 6237 hastayı kapsayan bir kohortta gerçekleştirilen prospektif çalışmada ise hiperinsülinemisinin karaciğer kanseri fatalitesini yaklaşık 3 kat arttırdığı belirlenmiştir (60). Tayvan'da hepatit B pozitif hastalarda gerçekleştirilen prospektif bir diğer çalışmada ise açlık insülin düzeylerindeki artışın HCC gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olduğu açıklanmıştır (61). Prospektif EPIC kohortunda gerçekleştirilen analizler ise kanda insülin düzeyi belirteci olarak kullanılan C-peptid seviyesinin HCC gelişimi için diğer obezite parametrelerinden bağımsız olarak da risk faktörü olduğunu göstermektedir (62).

Kanda artan insülin düzeyinin tümörigenez ile ilişkisi birkaç mekanizma ile açıklanmaktadır. Öncelikle insülin ile aktive olan insülin reseptörünün altında yer alan insülin reseptör substratı (IRS)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt eksenini üzerinden

sinyal iletimi başlar, bunun sonucu memeli rapamisin kompleksi hedefi (mammalian target of rapamycin complex: mTORC) aktivasyonu gerçekleşir ve böylece transkripsiyon, ribozom biyogenezi, protein sentezi, anjiyogenez ve Warburg tercihinde artış meydana gelir. Evert ve ark. gerçekleştirdiği in vivo çalışmada PI3K/mTOR inhibitörü kullanımının hiperglisemik koşullara rağmen glikoliz/ lipogenez/ pentoz fosfat yolu aktivasyonunu ve hücrelerin proliferasyonunu baskıladığı görülmüştür, insülin tarafından oluşturulan hepatokarsinogenez sürecini baskılamak için Akt/mTOR yolunun hedef alınması gerektiği belirtilmiştir (63).

İnsülin uyarımı ile aktive olan bir diğer yolak ise MEK/Erk'dir. Bu aktivasyon ile hücrelerde proliferasyon ve motilite kapasitelerinde artış gerçekleşir. Tüm bunlar tümör oluşumunu tetiklerken, adaptif hücrelere seçim avantajı sağlar (64). İnsülinin karaciğerde doğrudan hepatik stellat hücrelerini uyararak proliferasyonlarını tetiklediği, bu hücrelerde HCC gelişiminde rol alan fibrozis/inflamasyon/anjiogenez ile ilişkili moleküllerin üretimini sağladığı gösterilmiştir (65). Ayrıca insülinin sinüzoidal endotel hücrelerini de doğrudan uyararak vasküler endotelyal büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor: VEGF) salınımını sağladığı, böylece endotel proliferasyonu ve anjiyogenezi tetikleyerek HCC gelişimini ve metastazını arttırdığı belirlenmiştir (66). İnsülinin HCC hücrelerinin agresif fenotipine katkısı düşünüldüğünde ortaya ilginç bir hipotez atılmıştır. Bu hipoteze göre, tümör dokusunda hücreler üzerinde inflamasyonun, hipergliseminin, oksidatif stresin ve serbest yağ asitlerinin yüksek bir seleksiyon baskısı yarattığı ve bu baskı ile insülin sinyalleşmesini aktif olarak devam ettiren (ya da hücrel insülin direncini kıran) hücrelerin metabolik/proliferatif ve sağkalım düzeyinde selektif avantaj kazanarak seçildiği savunulmaktadır (66).

2.3 c-Met Sinyal İletim Yolu

Reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesi üyelerinden olan HGF reseptörü c-Met, MET proto-onkogeni tarafından kodlanır. Kodlanan gen ürünü 170 kDa büyüklüğünde öncül tek zincir bir polipeptiddir. Bu polipeptid translasyon sırasında N-glikasyona uğrar ve golgiden hücre membranına doğru yol alması için salgılanmadan önce 50 kDa büyüklüğündeki α zincir ve 140 kDa büyüklüğündeki β -zincire kesilir. Bu iki zincir

disülfid bağları ile birbirine bağlanarak olgun reseptör monomerini oluşturur (**Şekil 5**) (67).

Tümörijenik olmayan normal fizyolojik koşullarda HGF/c-Met sinyal yolağı, erken embriyonik dönemde organizmanın gelişiminde, yetişkinlerde karaciğer hasarının onarılmasında ve gebelikte pankreatik hücrelerin proliferasyonunda görev alır. c-Met aktivasyonu erken embriyonik dönem hücrelerinde embriyonik hücrelerin sağkalımı, proliferasyonu ve invazyonu için önemlidir (68). Erişkinde ise karaciğerde aktivasyonu, hasar ve rejenerasyon gerekliliği gibi durumlarla limitlidir. HGF/c-Met yolağının aktivasyonunda ve kontrolünde gerçekleşen bozukluklar sonucu karaciğer, kolorektal, gastrik, yumurtalık, meme, renal karsinomlar gibi birçok kanser türünün gelişimi tetiklenir. c-Met'in sürekli aktivasyonu tümör gelişimi, metastaz, ilaç direnci ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Bu nedenle c-Met aktivasyonunu kontrol eden mekanizmalar birçok çalışmaya konu olmuştur (69).

Kanser dokularında yapılan mutasyon taramalarında MET geni üzerinde düşük sıklıkta mutasyon gerçekleştiği görülmüştür, varolan genetik değişikliklere genellikle gen amplifikasyonu şeklinde rastlanır. Primer solid tümörler arasında MET amplifikasyonu sırasıyla en sık renal, adenokortikal, gastro-özefagal, meme ve yumurtalık tümörlerinde görülür (70). Lorenzato ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada aktive edici somatik MET mutasyonlarının primer tümörlerde oldukça nadir olmasına karşın, metastaz yapmış hücrelerde daha sık rastlandığı bulunmuş ve c-Met'in aktive edici değişikliklerinin hücrelerin metastatik özellikler kazandığı aşamada yer aldığı, böylece seçim şansı kazanmasında daha önemli olduğu gösterilmiştir (71). Bu bulgu, sonraki yıllarda gerçekleştirilen klinik denemelerde ve in vitro koşullarda inhibitör uygulanan hücrelerde c-Met ekspresyon ve aktivasyonundaki artış verileri ile desteklenmektedir (72,73).

2.3.1 c-Met'in Aktivasyonu ve Hücre İçi Sinyal İletimi

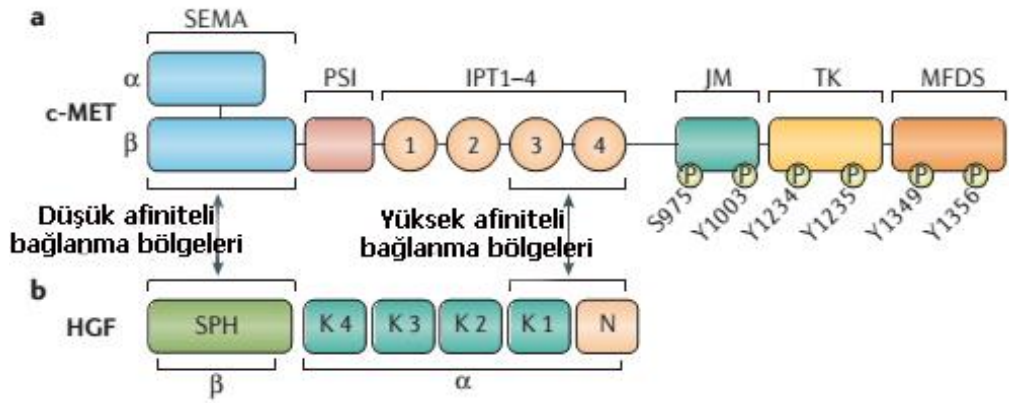
c-Met, hepatositlerin en potent büyüme faktörü olan HGF'in bilinen tek reseptörüdür ve HGF uyarımı ile gerçekleşen c-Met aktivasyonu, yolağın kanonik aktivasyonunu başlatır (74). HGF, kanserle ilişkili fibroblastlar (cancer-associated

fibroblasts: CAF) gibi stromal hücreler tarafından salgılanabildiği gibi, otokrin olarak da salgılanabilir (75,76). RTK ailesinin bir üyesi olarak, kanonikal iletimde ligand bağlanması membran üzerinde reseptör dimerizasyonunu sağlar. Dimerizasyon sonucu kinaz domainleri üzerinde yer alan Y1234/35 transfosforile edilir ve kinaz aktivasyonu gerçekleşir. Gab-1, Grb2 gibi adaptör moleküllerin bağlanması için iskele görevi gören Y1349 ve 1356 da otofosforile olduktan sonra SHP2, SOS, p85, STAT3 gibi birçok hücre içi sinyal iletim molekülünün src homoloji-2 (src homology-2: SH2) domaini aracılığıyla etkileşimi sayesinde intraselüler sinyal iletimi gerçekleşir (**Şekil 6**). Kanser hücresi karakterini kazandıran özellikler temel olarak üç temel kol üzerinden yürür: MAPK, PI3K/Akt ve STAT3.

MAPK: Ras'a guanozin trifosfat (guanosine triphosphate: GTP) bağlanmasıyla aktivasyonu üzerinden ilerler. Ras, c-Met'e doğrudan bağlanan Gab1/Grb2-SOS kompleksi ile direkt olarak etkileşir ya da SHC adaptör proteini aracılığıyla indirekt olarak etkileşir. Bu büyük komplekse tirozin fosfataz SHP2 da dahil olabilir ve Gab1 üzerindeki baskılayıcı fosforilasyonları kaldırarak daha stabil kompleks oluşumunu sağlar. Aktive olan Ras, hedefi olan Raf kinazının membrana taşınmasını ve aktive olmasını sağlar. Bir dizi fosforilasyon sonucu Raf-Mek1-Mek2 ve sonunda Erk1/2 kinazları aktive olur (70).

PI3K/Akt: PI3K lipid kinazının fosfatidylinositol (4,5)-bifosfat (PIP)-2'yi fosforile etmesi ve oluşan PIP3'ün Akt'ı membrana taşınması ile başlar. Burada PDK1 tarafından S473 ve T308 bölgelerinden fosforlanan ve aktive edilen Akt nükleusa transloke olur. Aktive olmuş Akt, mTOR, glikojen sentaz 3 β (GSK3 β) gibi temel metabolik regülatör proteinlerin sentezini ve aktivasyonunu sağlar. Bu aktivasyon hücre sağkalımı için anti-apoptotik BCL2, NF- κ B ve p53 degradasyonu gibi görevleri olan E3 ubiquitin-protein ligaz MDM2 gibi proteinleri hedef alır; ayrıca Myc gibi temel transkripsiyon faktörlerini regüle ederek kanserleşme ile ilişkili birçok mekanizmayı aktive eder (70,77).

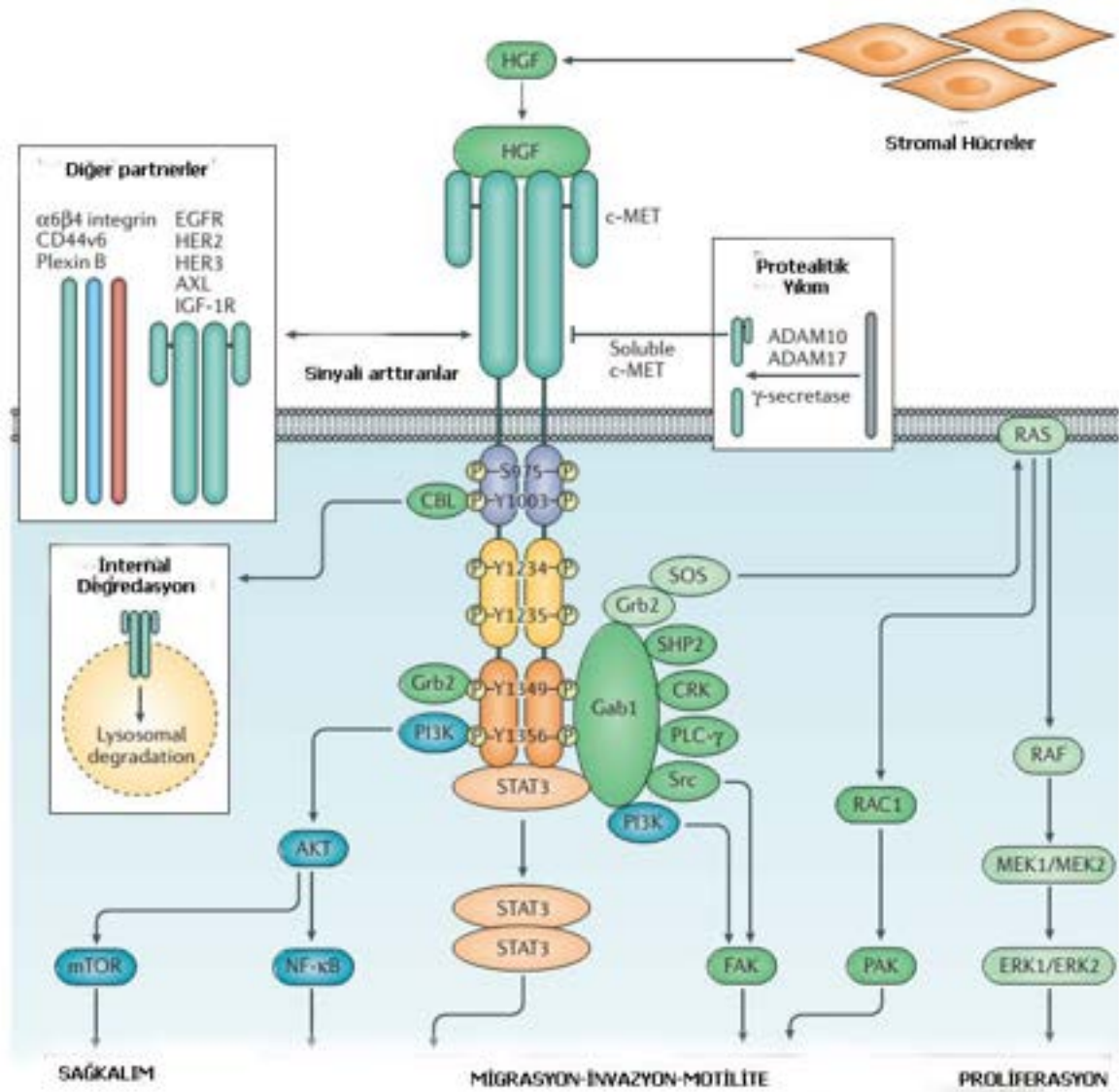
STAT3: c-Met üzerinde aktive olan bağlanma bölgelerine yerleşen STAT fosforile edilerek aktive edilir ve fosforile olan STAT3 transkripsiyon faktörü nükleusa giderek mitokondriyal aktivasyon, anjiyogenez oluşumu ve invazyon ile ilişkili birçok proteinin kodlanmasını sağlar (78).



Şekil 5. c-Met'in Yapısı (69'dan düzenlenmiştir.)

c-Met'in aktivasyon/deaktivasyonunun regülasyonu çok basamaklıdır ve detaylı olarak kontrol edilmektedir. Genel regülasyon basamakları arasında proteoliz, internalizasyon ve degradasyon basamakları, nükleer lokalizasyon, p53 gibi kilit regülatör moleküller tarafından indirekt kontrol ve c-Met'in otheregülasyonu yer alır (79). Bu basamakları yönetmek için post-translasyonel kontrolden faydalanılmaktadır. Bu kontrol mekanizmaları arasında c-Met için şimdiye kadar en iyi tanımlananları fosforilasyon, übikütinasyon ve glikozilasyondur. Yukarıda da belirtildiği gibi, c-Met sinyal iletiminin ana kontrolü fosforilasyon üzerinden gerçekleşir. Y1230, 1234 ve 1235 anahtar fosforilasyon bölgeleridir ve c-Met'in kinaz aktivitesi için bu modifikasyonlar gereklidir (68). Y1349 ve Y1356 ise sinyal iletiminin devamlılığı için gereklidir, Gab1 gibi sinyal iletim moleküllerinin bağlanma bölgesidir.

Bu tirozinlerin PP2A, PTB-1B gibi fosfatazlarla defosforile edilmesi sinyal iletiminin durdurulması ile sonuçlanmaktadır (80). Ayrıca Y975 ve Y1003 fosforilasyonu reseptör downregülasyonu için gereklidir. Bu fosforilasyonlar sonucu E3 übikülin ligaz c-Cbl c-Met'in jukstamembran (JM) domainine çağrılır ve endozomal yıkım için işaret übikülinlerini c-Met'e ekler (81). Y1003 ile übikülinlenmeyen c-Met mutantlarının lizozomal degradasyonunun aksadığı ve hücre içinde endozomal yolda degradasyon için işaretlenmediği gösterilmiştir, bunun sonucunda sürekli Erk aktivasyonu sağlanarak



Şekil 6. c-Met sinyal iletimi (Bradley vd., 2017).

tümörigenezin arttığı in vivo olarak belirlenmiştir (81). c-Met'in bir diğer önemli kontrol basamağı glikozilasyondur. Hem c-Met'in kesilmemiş pro-Met formu, hem de fonksiyonel mature formu glikozile olmaktadır (82). Asparagine amino asidi üzerinden N-glikozilasyon; serin ve threonine amino asitleri üzerinden O-glikozilasyon c-Met için yaygındır. Chen ve arkadaşları 2013 yılında yayınladıkları çalışmada, c-Met'in N-glikozilasyona uğradığını belirlemiştir, Tunicamycin ile bloklan c-Met glikozilasyonu

sonucu c-Met'in proteozomal yıkımı artmaktadır (83). Tunicamycin kullanımı ile ayrıca c-Met'in düzgün kesilemediği ve fonksiyonel olmadığı belirlenmiştir (84).

2.3.2 HCC'de c-Met'in Önemi

Hastalığın progresyonu ve uygulanacak tedaviye yanıt ın öngörülmesi açısından HGF reseptörü c-Met oldukça değerli bir belirteçtir. Adenosin trifosfat (ATP)-bağımsız c-Met inhibitörü olarak geliştirilmiş Tivantinib ile gerçekleştirilen bir faz 2 klinik denemede, yüksek c-Met ekspresyonu olan HCC hastalarının Tivantinib'den daha fazla fayda gördüğü belirlenmiştir. Sağkalım, progresyonsuz sağkalım, progresyon başlayıncaya kadar geçen süre ve hastalık kontrol oranları plasebo gruplarına kıyasla anlamlı ölçüde artmıştır (85). Aynı çalışmada c-Met ekspresyonu ve Sorafenib direnci de ilişkilendirilmiştir. Tivantinib uygulaması öncesi Sorafenib ile tedavi edilmiş HCC hastalarında c-Met ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmayı takiben gerçekleştirilen faz 3 MET IV-HCC klinik çalışmasında ise hastalara Sorafenib uygulaması öncesi biyopsi yapıldığında c-Met pozitifliğinin %35 olduğu, ancak Sorafenib uygulaması sonrası biyopsi yapıldığında ise c-Met pozitifliğinin %69 olduğu belirlenmiştir (72). Daha önce laboratuvarımızda gerçekleştirilen çalışmalarda c-Met'in normal hepatosit-siroz-HCC dokularında ekspresyonunun kademeli olarak arttığı gösterilmiş, ayrıca c-Met'in Sorafenib direncindeki rolü incelenmiştir (73,86). Sorafenib direnci geliştirilen HCC hücrelerinde c-Met'in daha aktif olduğu ve c-Met aktivasyonu sonucu hücrelerin daha invaziv ve metastatik özellik kazandığı, c-Met spesifik inhibitör SU11274 ve HGF nötralize edici antikor kullanımı ile hücrelerde bu etkilerin geri döndürüldüğü, hücrelerin tekrar Sorafenib'e duyarlı hale geldiği belirlenmiştir (73).

c-Met aktivasyonunun HCC oluşumu, gelişimi ve tedavi direncindeki rolünün arkasında birçok mekanizma bulunmaktadır. Kanonikal olarak, HGF salınımının artışı ile ligand-bağımlı c-Met aktivasyonunun daha sürekli hale gelmesi sonucu kanserleşmenin başlaması tetiklenir, bu süreçte hücrelerin adezyon, motilite ve invazyon karakterleri artar ve daha agresif tümör hücreleri oluşur (87). Kanonikal olmayan yollarla c-Met'in aktive olması ise HCC sürecinde sık görülen bir durumdur ve c-Met'in ligandı HGF varlığından bağımsız olarak aktive olması sonucu gerçekleşir (88,89). Bu

mekanizmalardan en önemlisi diğer reseptörler ile karşılıklı etkileşimdir. c-Met'in RTK ailesinden EGFR ile olan etkileşimi en sık kanıt toplanan dimerizasyondur ve bu iki reseptörün HCC, kolorektal, akciğer gibi birçok dokunun kanser hücrelerinde etkileştiği belirlenmiştir, karşılıklı aktivasyon sonucu motilite, proliferasyon, ilaç direnci, sağkalım, invazyon ve metastaz gibi kanser özelliklerinin arttığı belirlenmiştir; insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 ve 3 (human epidermal growth factor receptor 2 and 3: HER2/3) ile heterodimerizasyonunun PI3K/Akt sinyalleşmesini arttırdığı görülmüştür. Ron ile karşılıklı etkileşiminin koloni oluşumunu arttırdığı bulunmuştur, IGFR ve RET ile etkileşiminin c-Met aktivasyonuna bağlı migrasyon ve invazyonu arttırdığı belirlenmiştir (90). Ayrıca yakın zamanda yayınlanan bir araştırmada normal hepatositlerde HGF varlığında etkileşen bir diğer RTK üyesinin insülin reseptörü olduğu gösterilmiştir. HGF ile aktive olan c-Met'in insülin reseptörü ile heterodimer oluşturduğu ve onu fosforlayarak insülinin hücre içi sinyal iletimini aktive ettiği görülmüştür (91).

2.3.3. Obezite, c-Met ve Tümör Metabolizması İlişkisi

c-Met sinyal iletimi altında birçok molekül aktive olmakta ve değişik biyolojik yanıtlara sebep olmaktadır. c-Met altında görev alan moleküllerin etkilediği yanıtlardan birisinin de hücre metabolizmasında gerçekleşen değişiklikler olduğu bilinmektedir. c-Met alt iletim yolunda yer alan moleküllerin hücre metabolizması ile ilgileri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (**Tablo 1**) (70,92).

Tablo 1. c-Met sinyal iletiminde görevli anahtar moleküllerin hücre metabolizmasındaki düzenleyici rolleri

c-Met Sinyal Eftör Elemanı	Etkilediği Metabolik Moleküller	Etkilediği Metabolik Faaliyetler
Akt	GLUT, mTOR, Myc, heksokinaz II (HKII),	Glukozun hücre içine yüksek düzeyde alınmasını sağlamak, glikolizi ve Warburg etkisini arttırmak

	phosphofructokinase (PFK) ve GSK3 β	
	FOXO	OXPHOS'u arttırarak ATP üretimini yükseltmek
	HIF-1	PDK1 artışı ve piruvatın TCA siklusuna girmesini baskılamak, HK ve GLUT ekspresyonunu arttırmak
PI3K	Pyruvate kinase	Piruvatın mitokondriye taşınarak TCA siklusuna girmesini baskılamak, glikolizi ve Warburg etkisini sağlamak
mTOR	G6PD, RPIA, PGD	Pentoz fosfat yolağının aktivasyonu, NADPH oluşumu, nükleotid sentezi
	Glutaminase	Esansiyel olmayan amino asitlerin sentezi
	SREBP-1/2	Sterol biyosentezi, yağ asidi oluşumunda görevli enzimlerin üretilmesi
RAS	GLUT, HK, LDH	Glukozun hücre içine yüksek düzeyde alınmasını sağlamak, glikolizi ve Warburg etkisini arttırmak
STAT3	HK, PFK, LDH	Glukozun hücre içine yüksek düzeyde alınmasını sağlamak, glikolizi ve Warburg etkisini arttırmak

c-Met'in doğrudan hücre glukoz metabolizması ile ilişkisini inceleyen yayınların sayısı kısıtlıdır. Mevcut yayınlar genellikle kanser hücrelerinde c-Met spesifik inhibitörlerin kullanımının metabolik enzimler üzerine etkisinin belirlenmesini temel almaktadır ve c-Met aktivasyonu ile Warburg etkisi arasında paralellik kurmaktadır. Guo vd., 2010 yılında yayınladığı çalışmada c-Met inhibitörü PHA-665752 kullanımının küçük hücreli-dışı akciğer kanserinde (NSCLC) HK-II ve PKM2 gibi glikolitik enzimlerin ekspresyonunu arttırırken, adenine nucleotide translocase 2 (ANT2) ve voltage-dependent anion selective channel protein I (VDAC1) gibi mitokondriyal enzimlerin ekspresyonunu azalttığını göstermiştir (93). Tang ve ark. 2008 yılında yayınladıkları bir başka çalışmada akciğer kanserinde c-Met spesifik inhibitörü SU11274'ü fare xenograftlarına uygulamış ve uygulamadan sonra tümör metabolik faaliyetini PET taraması ile izlemiştir. Tümör hücrelerinin glukoz metabolizmasının, inhibitör uygulamasından 24 saat sonra gibi erken bir sürede bile, %45 daha düşük aktiviteye sebep olduğunu göstermişlerdir (94). Ayrıca Crizotinib ile c-Met inhibisyonunun, boyun ve baş skuamöz hücre karsinomasında HKII düzeyini ve üretilen laktat düzeyini düşürdüğü bulunmuştur (95). Karaciğer kanseri ile ilişkili yayınlanan güncel bir çalışmada HGF uyarımı ile aktive olan c-Met'in glutaminase aktivasyonunu sağlayarak pyruvate dehydrogenase complex (PDHC)'i baskıladığı, böylece glutaminoliz ve Warburg etkisini yarattığı belirlenmiştir (96).

Obezitenin HGF ile ilişkilendirildiği çalışmalar da literatürde yer almaktadır. Obezite ile tetiklenen bazal-benzeri meme kanserini fare modelinde, obezitenin HGF sekresyonunu ve c-Met aktivasyonunu arttığı, HGF'in nötralizasyonu sonucu tümör agresif karakterinin baskılandığı gösterilmiştir (97). Yine aynı araştırma grubunun aynı modeli kullanarak yayınladıkları bir başka çalışmada obezite tarafından artan HGF/c-Met aktivasyonunun kilo kaybı ile geri döndürüldüğü ve tümör progresyonunun baskılandığı görülmüştür (98). Bu modelde c-Met aktivasyonuna paralel olarak obezite bağımlı kan glukoz seviyesi, hiperinsülinemi ve leptin:adiponektin oranlarında artış görülmüştür. Kilo kaybı ile, c-Met aktivasyonu ve tümör gelişimine paralel olarak, bu özellikler de azalmıştır.

2.4 İnsülin Reseptörü Sinyal İletim Yolağı

İnsülin reseptörü (IR), c-Met gibi reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir ve yüksek afiniteli ligandı insülinin bağlanması ile aktive olarak, hücrelerin glukoz alımını ve glukozun hücre içinde metabolize olmasını düzenleyen bir dizi sinyal yolağının aktivasyonunu başlatır. İnsülin reseptörü yaygın olarak birçok dokuda INSR geni üzerinden eksprese olur (karaciğer, beyin, böbrek, pankreas, monositler, plasenta, granülositler, adipoz doku, kas dokusu). Ancak pankreasın beta hücrelerinden salgılanan insülinin hedef dokuları karaciğer, adipoz doku, iskelet kası ve beyindir (99). Normal fizyolojik koşullarda en yüksek IR ekspresyonu adipoz dokuda görülür, beyin ve pankreasta ise çok daha düşüktür ve bu dokularda metabolik aktiviteden farklı görevleri de vardır (100). Karaciğer gibi insüline duyarlı dokularda yüksek insülin reseptörünü gen ekspresyonunu sağlamak için promotor aktivitesini pozitif yönde arttıran faktörler eksprese edilir. Bunlar arasında, yüksek mobilite grup proteini A2 (high-mobility group protein A1: HMGA1), FOXO1, özgünlük proteini 1 (specificity protein 1: SP1), IR nükleer faktör I ve II (IRNF-I/II) ve karaciğere özel karaciğere-özgü insülin reseptör geni transkripsiyon faktörü (hepatocyte-specific transcription factor of the insulin receptor gene: HT-FIR) bulunur (101,102). Negatif regülasyon için p53'ün insülin reseptörünün transkripsiyonunda görev aldığı ve SP1 ile etkileşerek baskılayıcı rolü olduğu bulunmuştur. p53 mutantlarının ise doğrudan *INSR* promotoruna bağlanabildiği ve IR overekspresyonu yarattığı gösterilmiştir (103). Ayrıca *INSR* promotor bölgesinde östrojen yanıt elemanlarının bulunduğu ve östrojene bağlı olarak östrojen reseptörünün *INSR* transkripsiyonundaki baskılayıcı rolü nedeniyle insülin direncinde rol alabildiği belirlenmiştir (104).

İnsülin reseptörü (IR) 22 exon içeren INSR geninden eksprese edilir, bu transkript insülin reseptörünün α ve β alt ünitelerini içerir. Öncül transkript yaklaşık 150 kDa büyüklüğünde bir amino asit zinciriyken, fürin tarafından kesilmesi sonucu oluşan α ve β zincirleri yüksek miktarda (ve dokudan dokuya değişen oranlarda) gliko olur ve disülfid bağları ile birbirine bağlanır. α alt ünitesi ektodomaini oluşturur, ekstrasellüler bölgede yer alır ve insülinin bağlanmasından sorumludur. β alt ünitesi ise tek bir transmembran (TM) helikse bağlı JM kısım, intrasellüler bölgede kinaz aktivitesinden

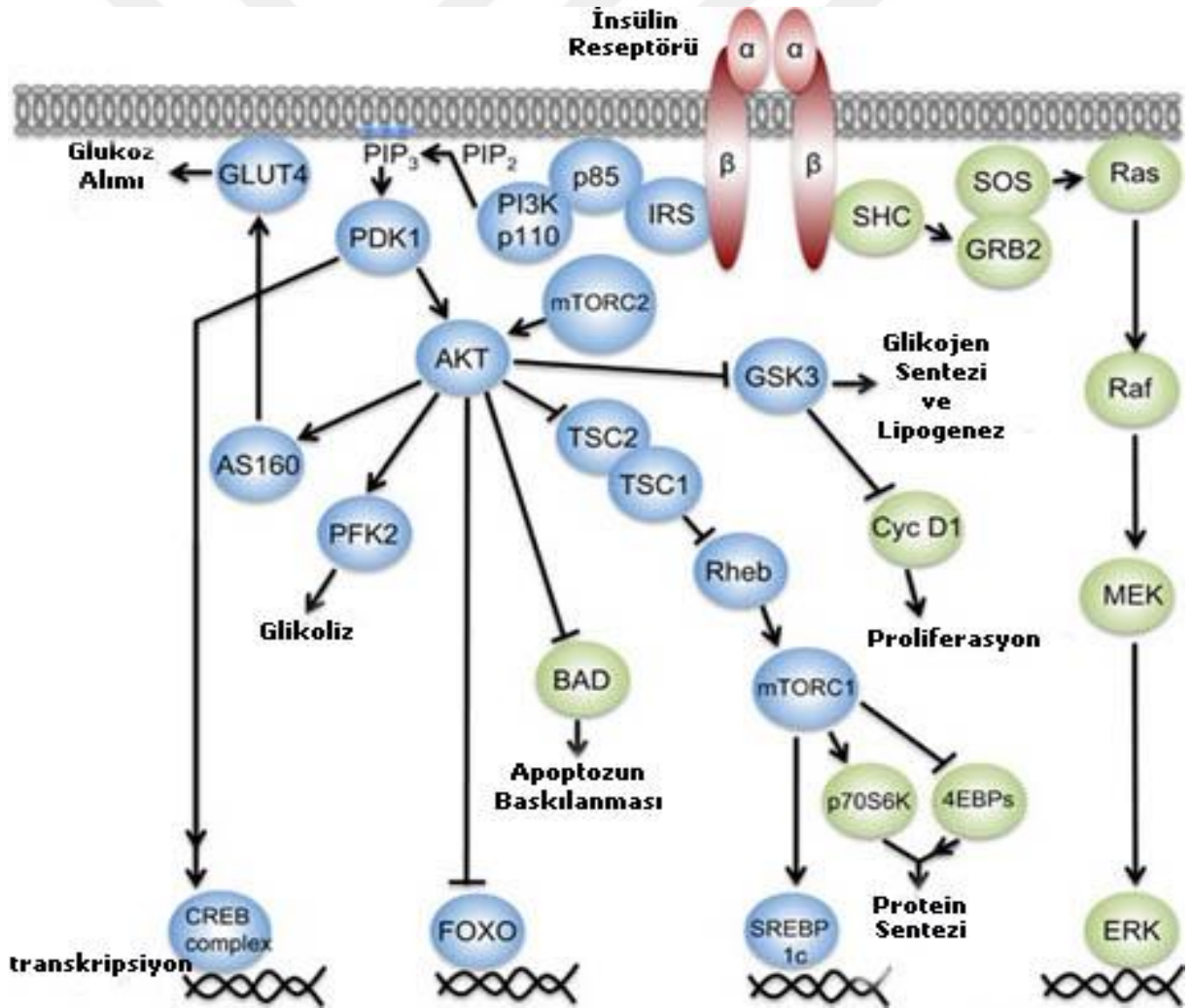
sorumlu tirozin kinaz (TK) domaini ve hücre içi sinyal iletim elemanlarının bağlandığı iskele bölgesinden oluşur. Klasik glukoz homeostazını düzenleyen modelde IR'ü ($\alpha\beta$)₂ homodimerinden oluşur (101). Kristalografi çalışmaları membranda inaktif homodimer halinde bulunan IR'nün bir monomerine insülin bağlanmasının yapısal düzenlemelere neden olduğunu göstermiştir. Tek monomerin aktivasyonu ile başlayan düzenlemelerin transmembran domainlerini yakınlaştırdığı ve dimeri aktif hale getirerek sinyalleşmeyi başlatan otofosforilasyonu gerçekleştirebildiğini göstermiştir. İnsülinin olmadığı durumda transmembran domainleri birbirinden ayrı ve inaktif halde bulunur (105).

2.4.1 IR Aktivasyonu ve Hücre İçi Sinyal İletimi

İnsülinin IR α domainine bağlanması ile gerçekleşen yapısal değişiklikler, kinaz domain aktivitesi ve IR'nün oto/transfosforilasyon sürecini başlatan ilk adımdır. Fosfopeptid haritalama teknikleri ile IR üzerinde fosforile olan birçok amino asit bulunmuştur: juxtamembran kısmında yer alan Y953, Y960, Y972; katalitik domainde yer alan 1146, 1151 ve 1152; karboksiterminal bölgede yer alan Y1316 ve Y1322, ve 1345. Transfosforilasyon için en önemli kısım katalitik domainde yer alan Y1146, Y1151/1152'dir. JM kısmında gerçekleşen fosforilasyonlar insülin sinyal iletiminin en önemli adaptör molekülü olan IRS'in bağlanmasını ve böylece IR tarafından fosforile edilmesini sağlarken Y953 ve Y960 fosforilasyonları reseptör endositozundan sorumludur (106).

Aktive olan IR'ünün hedefleri arasında IRS ailesinin yanında Gab1 ve Shc gibi intrasellüler substratlar da vardır. Bu adaptör proteinler üzerindeki fosfat grupları farklı SH2 domain içeren moleküllerin (Grb2, PI3K'in p85 alt ünitesi, SHP2, Src, Ras) bağlanmasını sağlar. Bu protein kompleksleri ile sağlanan sinyal iletimi Akt ve MAPK yollarını aktive eder. Akt yolağı daha çok hücrede glikoneogenez baskılanması, glikoliz, lipogenez, ve protein ekspresyonu ve sentezi gibi metabolizma ilişkili faaliyetleri koordine eder. Bu amaçla; SREBP1, mTORC1, GSK3, FOXO, CREB ve GLUT ekspresyonları ve aktivasyonlarını sağlar (**Şekil 7**) (107). Diğer yandan MAPK sinyal iletimi iki koldan aktive edilir:

1. Grb2 fosforlanan IRS adaptör proteinlerine bağlanırken SH3 domaini ile SOS nükleotid değişim faktörünü çağırır. SOS ise GDP bağlı inaktif formda olan Ras'a GTP yükleyerek Ras'ı aktive eder ve Ras/Raf/MEK/Erk fosforlanma zincirini başlatır.
2. IR üzerinde fosforlanan Y972'ye doğrudan bağlanan Shc, Grb2-SOS-Ras kompleksini çağırır (106). Her iki kolun birarada aktive olmasıyla hem Shc hem de IRS, Grb2 adaptörüne birlikte bağlanır. Daha stabil ve devamlılığı yüksek sinyal iletimi gerçekleşir. Aktive olan Erk 1/2 hücre çekirdeğine geçerek bir dizi transkripsiyon faktörünü fosforlayarak aktive eder; c-Myc, STAT3, c-Fos, Elk-1, MEF-2. MAPK yolağı insülinin mitojenik aktivitesini kontrol eder, özellikle tümör oluşumu ve progresyonunda insülinin rolünün önemli bir kısmını yönetir (107).



Şekil 7. IR sinyalleşme mekanizması (107'den düzenlenmiştir.).

2.4.2 İnsülin Sinyal İletiminin Hepatokarsinogenezdeki Rolü

Yukarıda detaylı olarak bahsedildiği gibi, obezite kaynaklı hiperinsülinemi birçok kanser türünün gelişiminde önemli bir role sahiptir ve birçok epidemiyolojik çalışmada kanser gelişiminde bağımsız risk faktörü olarak belirlenmiştir. Erken dönemde alınan önlemler değerlidir, örneğin İsveç'te gerçekleştirilen çarpıcı bir çalışmada, katılımcılar arasında bariyatrik cerrahi sonrasında vücut ağırlığının %30'undan fazlası azalan kadınlarda kanser geliştirme riskinde %41 oranında azalma görülmüştür (108). Ancak girişimsel müdahaleler her zaman mümkün değildir ve zamanlama önemlidir. Bu nedenle yalnızca diyet kontrolü ve yaşam tarzı değişikliği önerilerinin dışına çıkabilmek, yenilikçi tedavi yaklaşımları geliştirebilmek amacıyla hiperinsülinemi ve kanser sürecindeki mekanizmalarının aydınlatılmasını amaçlayan birçok çalışma gerçekleştirilmektedir.

Hiperinsülinemi hem sirotik hastalarda hem de genel popülasyonda HCC riski ve gelişim süreci için önemli bir prognostik faktördür (109-111). İnsülin sinyal yolağının HCC gelişimine hangi mekanizmalar ile katkı sağladığı aşağıdaki gibi gruplandırılmıştır:

1. IRS1/2 ekspresyonunda artış: Hepatokarsinogenezin erken dönemindeki neoplastik lezyonlarda IRS1/2 ekspresyonundaki artış ile insülin sinyal yolağının ligand bağımsız aktive olduğu gösterilmiş, ileri dönem HCC hastalarında IRS-1 ekspresyonundaki artış ile tümör büyüklüğü ve hastalığın seyri arasındaki pozitif korelasyon saptanmıştır (56,112),
2. Negatif regülatörlerin kaybı: İnsülin sinyal yolağının regülasyonunu sağlayan sağlayan PP2A, PKC, PTEN gibi negatif regülatörlerin kaybı ile insülin reseptörü yolağın aktivasyon devamlılığı sağlanmaktadır (113,114),
3. Glikolitik enzimlerdeki artış: Warburg etkisi ile HK2, PKM2 gibi glikolitik enzimlerdeki artış HCC proliferasyonu ve sağkalımını sağlamaktadır (115-117),
4. İnsülin reseptörünün yüksek ekspresyonu: En önemli mekanizmalardan biri olarak kanserleşme sürecinde insülin reseptörünün yüksek ekspresyonu görülmektedir, böylece yolağın aktivasyonundaki artış HCC gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (118),

5. İnsülin reseptörünün reseptörler ile karşılıklı haberleşme (receptor crosstalk): İnsülin reseptörünün kanser hücrelerinde IGF-II tarafından aktive edildiği ve IGFR ile etkileştiği belirlenmiştir. Ayrıca insülinin dolaylı yollardan IGF-I'in sentezini ve sirkülasyonunu arttırdığı görülmüştür (118),
 6. Leptin ile İlişkisi: Yüksek insülinin adipoz ve kanser hücrelerinden leptin sentezini ve salınımını Erk 1/2 ve Akt yollarının aktivasyonu üzerinden arttırdığı belirlenmiştir (119,120),
 7. VEGF ile İlişkisi: İnsülinin kanser hücrelerinden VEGF ekspresyon ve salınımını sağlayarak sinüzoidal endotel hücrelerinin proliferasyonunu sağlamadığı tanımlanmıştır (121,122),
 8. IR izoform seçilimi: Özellikle metabolizma ile ilişkili dokuların kanserleşme süresince IR izoformlarından IR-A'nın ekspresyonunun yükseldiği ve bu yükselişin kanser kök hücresi özelliklerini arttırdığı ve malignitede artışa sebep olduğu belirlenmiştir (118).
- Tüm bu mekanizmalar arasında insülin reseptörü izoformunun seçilimi son yıllarda önem kazanmaktadır.

2.4.3 İnsülin Reseptör İzoformları ve Hepatokarsinogenez Sürecindeki Roller

İnsülin reseptörünün kodlandığı genden elde edilen mRNA ekson 11'de alternatif kesilmeye uğrayarak insülin reseptör izoform A ve izoform B'yi oluşturur. Aynı genden üretilen bu iki transkript daha sonra translasyona uğrayarak IR-A ve IR-B proteinlerini oluşturur. Bu iki protein arasında yalnızca 12 amino asitlik bir fark vardır, IR-B α alt ünitesi daha uzundur. Bu 12 amino asitlik bölge ligand bağlanması ve reseptör dimerizasyonunu etkiler. IR-B yüksek afinite ile yalnızca insüline bağlanabilirken ve homodimer oluşturmaya yatkınken, IR-A yüksek afinite ile insüline bağlandığı gibi daha düşük afiniteyle pro-insüline ve IGF-II'ye de bağlanabilmektedir. IR-A diğer membran reseptörleri ile heterodimer oluşturmaya daha yatkındır (123). İnsülin reseptörü izoformları selektif olarak farklı dokularda eksprese olurlar ve hücre içinde farklı görevlerde baskın olarak yer alırlar. IR-B yetişkinde en yüksek oranda karaciğerde eksprese edilir ve ayrıca insüline yanıt veren iskelet kası, adipoz doku gibi dokular da

oldukça yüksek düzeyde eksprese olur. IR-B'nin görevi daha çok hücre içindeki metabolik faaliyetleri yürütmektir ve Akt yolağı aracılıklı metabolik olaylarını kontrol eder (118,124). IR-A ise özellikle embriyonik dönemde ve yetişkinde beyin ve yumurtalıklarda yüksek seviyede eksprese olur. IR-A ekspresyonu özellikle malignant hücrelerde artar ve IR-A:IR-B ekspresyon oranı yükselir. Böylece hücrelerdeki IR'leri IR-A izoformu baskın olan mitojenik IR formuna dönüşür.

Karaciğer, kolon, akciğer, meme, prostat, endometriyum, tiroid, testis, yumurtalık gibi pek çok kanser dokusunda IR-A:IR-B oranı anlamlı olarak yüksektir (125). Tip2 diyabeti olan 46 hastanın karaciğer dokusuyla gerçekleştirilen bir çalışmada IR-A:IR-B oranının diyabetik hastalarda daha yüksek olduğu gösterilmiş ve hiperinsülineminin izoform seçilimindeki önemine değinilmiştir (126). Ayrıca bariyatrik operasyon geçiren ya da düşük kalorili beslenen hastalarda, açlık insülin seviyelerinin düştüğü ve paralel olarak IR-B ekspresyonunun arttığı, IR-A:IR-B oranının azaldığı belirlenmiştir (127). Ayrıca obez ve diyabetik rhesus maymunlarının karaciğer dokularında yapılan analizlerde, hiperinsülineminin IR-A'nın yüksek ekspresyonu ile ilişkili olduğu görülmüştür (96). Fransız 85 HCC hasta kohortunda gerçekleştirilen analizlerde, hastaların %40'ından fazlasında IR overekspresyonu bulunurken, %70'inden fazlasında selektif izoform ekspresyonu gözlenmiştir (118).

Dokularda selektif seçim yapabilmek için özellikle alternatif kesim yapan bazı kesme-birleştirme (splicing) faktörlerinin kullandığına değinilmektedir. CUG-BP ve çeşitli hnRNPlar IR-A oluşumunu sağlayan kesme-birleştirmesinde rol alırken; RBM4, Srpote ve MBNL faktörleri IR-B oluşumunda görev alır (101). HCC hücre hatlarında da CUGBP1, hnRNPH, hnRNPA1, hnRNPA2B1 ve SF2/ASF splicing faktörlerinin ekspresyonlarının normal hepatositlere kıyasla arttığı ve selektif IR-A ekspresyonunu sağladıkları gösterilmiştir (118). Yine aynı araştırma grubunun güncel bir çalışmasında IR izoform seçiliminin HCC progresyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir: IR-A ve -B izoformlarını selektif olarak kalıcı eksprese eden HCC klonlarında diferansiyasyon ve agresif belirteçlerin farklı olduğu bulunmuştur (128). IR-A eksprese eden klonların kanser kök hücre belirteçlerinde artış gerçekleştiği ve hücrelerin daha az diferansiye olduğu, alfa-fetoprotein (AFP) konsdesairasyonlarının yükseldiği görülmüştür. Ayrıca IR-A klonlarının daha motil ve invaziv olduğu, mikrovasküler invazyonun yüksek oranda

gerçekleştiği belirlenmiştir. IR-A/IR-B oranı yüksek olan ve küratif rezeksiyon tedavisi gören HCC hastalarında sağkalımın da daha düşük olduğu saptanmıştır (128).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma HCC’de yüksek glukoz ve insülin uyarımının c-Met aktivasyonu ile ilişkisini tanımlamaya yönelik deneysel bir laboratuvar çalışmasıdır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, Eylül 2016’da literatür taraması ve ön çalışmaların gerçekleştirilmesi ile başlamış olup, Ağustos 2020 tez savunması ile sonlanmıştır. arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ve İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada insan üzerinde bir çalışma yapılmamıştır. Araştırmada insan karaciğer kanseri hücre hatları SK-Hep1, HuH-7, SNU-182, SNU-387, SNU-398, SNU-423, SNU-449, SNU-475, Hep3B, HepG2, Hep40, Focus ve Mahlavu; ayrıca kalıcı ekspresyon klonları HUH-7 pRC, HUH-7 IR-A, HUH7 IR-B, SNU-398 CMV-GFP (Mock) ve SNU-398 MET-GFP kullanılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışma kapsamında kullanılan SK-Hep1, HuH-7, SNU-182, SNU-387, SNU-398, SNU-423, SNU-449, SNU-475, Hep3B, HepG2, Hep40, Focus ve Mahlavu HCC hücre hatları Prof. Dr. Mehmet Öztürk (İBG, İzmir) tarafından; insülin reseptörü izoform klonları HUH-7 pRC (kontrol), HUH-7 IR-A ve HUH7 IR-B klonları Dr. Christele Desbois-Mouthon (INSERM Sorbonne Üniversitesi, Paris) tarafından temin edilmiştir. Zebrabalığı zenograft modelinde kullanılan SNU-398 CMV-GFP (Mock) ve SNU-398 MET-GFP klonları ise laboratuvarımızda gerçekleştirilen önceki çalışmalarda elde edilmiştir. In-vivo model oluşturmak için İBG Zebrabalığı Birimi’nde yetiştirilen 48 saatlik zebrabalığı larvaları kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

SNU-398 CMV-GFP, SNU-398 MET-GFP HUH-7 pRC, HUH-7 IR-A ve HUH7 IR-B klonları ve kullanılan tüm HCC hücre hatları ve yapılan yüksek glukoz/yüksek insülin/hepatosit büyüme faktörü/inhibitör uygulamaları bağımsız değişkendir. Bu hücrelerden elde edilen bağımlı değişkenler ise elde edilen protein seviyeleri, fosforlanma seviyeleri, metabolizma düzeyleri, ribonükleik asit (RNA) düzeyleri, adezyon, proliferasyon, invazyon ve metastaz değerleridir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1 Malzeme ve Cihazlar

Tablo 2. Araştırmada kullanılan ekipman ve cihazlarlar

Cihaz	Marka ve Model
Isı Bloğu	Stuart, STSBH130D
İnkübatör	Memmert, Inco 153 Eppendorf New Brunswick, Galaxy 170-S
Santrifüj	Beckman Coulter, Optima L100XL Eppendorf, 5415R Beckman Coulter, Allegra X-15R Thermo Scientific, Micro CL17R Eppendorf, 5702
Buzdolabı ve Derin dondurucu	Siemens, KG57 +4 Buzdolabı Beko, B8459 SMN -20°C Dondurucu Thermo Scientific, Forma -80°C ULT Dondurucu
Sıvı Azot Tankı	Thermo Scientific, Cryo Plus 2
Terazi	Sartorius, Quintix 225-1S
İmmünblotlama Ekipmanı	Bio-Rad, Mini Trans-Blot Cell

Jel Görüntüleme Sistemi	Bio-Rad, GelDoc XR
Blot Görüntüleme Sistemi	LICOR, Odyssey CLx 9140-00
Elektroforez Ekipmanı	Thermo Scientific, Maxi Horizontal
Mikrohacim Spektrofotometre	Thermo Scientific, Nanodrop ND2000
Biyogüvenlik Kabini	Thermo Scientific, Safe 2020 Class II
Manyetik karıştırıcı	IKA, C-MAG MS10 VWR, VNS-C4
Mikropipetler	Eppendorf, Research Plus Gilson, Pipetman
Floresan Mikroskop	Olympus, BX61 Olympus, IX71-F22FL/PH
Konfokal Mikroskop	Zeiss, LSM880
Gerçek Zamanlı Hücre Takip Mikroskobu	Incucyte, Essen Bioscience
Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi	ACEA, xCELLigence RTCA DP
Hücre Metabolizması Analiz Sistemi	Seahorse XF96, Agilent
Mikrodalga Fırın	Bosch, HMT72G420
pH metre	Hanna, HI-2002
Pipetör	Thermo Scientific, S1 Pipet
Güç kaynağı	Bio-Rad, PowerPac Basic
Çalkalayıcı	Thermo Scientific, TS-75004061
Sonikatör	Diagenode, Bio-ruptor Pico
Mikroplaka Okuyucu	Thermo Scientific, Varioscan Flash çoklu plaka okuyucu
Termal Döngü Cihazı	Applied Biosystems, Simplicamp A24811

Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Cihazı	Applied Biosystems, 7500 Fast
Vortex	Thermo Scientific, Eled 88880018
Buz Makinesi	Uğur, UBM Buzal 30
Su Banyosu	Nüve, NB9
Saf Su Sistemi	MilliQ Su Arıtma Sistemi, Millipore Merck
Otoklav	Gettinge, VS90
Sterilizasyon Fırını	Binder, ED53
Mikroenjektör	Eppendorf, Femtojet Express
Stereomikroskop	Carl Zeiss, Stereo Discovery V8

Tablo 3. Araştırmada kullanılan kitler ve inhibitörler

Kit	Marka ve Katalog Numarası
Protein Miktar Tayini Kiti	Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific 23227
Plazmid İzolasyon Kiti	Zymopure Plasmid Miniprep Kit, Zymo Research D4210 Maxiprep Plasmid Isolation Kit, Qiagen 12362
cDNA Sentez Kiti	RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific K1622
Transfeksiyon Ajanı	Lipofectamine 3000 Transfection Reagent, Thermo Scientific L3000075
Metabolizma Analiz Kiti	Seahorse XF Cell Mito Stress Kit, Agilent
SU11274 c-Met inhibitörü	Calbiochem, 448101
HNMPA-(AM)3 İnsülin reseptörü inhibitörü	Santa Cruz, sc-221730

Tablo 4. Araştırmada kullanılan antikorlar

Antikor	Yöntem	Dilüsyon	Bloklama Solüsyonu	Marka, Katalog No.
Anti-cMet	İmmünblotlama İmmünçöktürme İmmünfloresan	1:1000 1:200 1:100	1X PBST içinde %3 sığır serum albumin (BSA) 1X PBST içinde %1 BSA	Santa Cruz, sc161
Anti-cMet P1234-35	İmmünblotlama	1:1000	1X TBST içinde %3 süt tozu	Cell Signaling, CS3129
Anti-IR beta	İmmünblotlama İmmünçöktürme İmmünfloresan	1:1000 1:200 1:100	1X TBST içinde %3 BSA	Cell Signaling, CS3025
Anti-IR P-1345/46	İmmünblotlama İmmünfloresan	1:1000 1:100	1X TBST içinde %3 BSA	Cell Signaling, CS3026
Anti-Erk	İmmünblotlama	1:1000	1X TBST içinde %3 süt tozu	Cell Signaling, CS4696
Anti-Erk P-202/204	İmmünblotlama	1:1000	1X TBST içinde %3 BSA	Cell Signaling, CS9101
Anti-Akt	İmmünblotlama	1:1000	1X TBST içinde %3 süt tozu	Cell Signaling, CS9272
Anti-Akt P-473	İmmünblotlama	1:1000	1X TBST içinde %3 süt tozu	Cell Signaling, CS4060
Anti-STAT3	İmmünblotlama	1:1000	1X TBST içinde %3 BSA	Cell Signaling, CS4904
Anti-STAT3 P705	İmmünblotlama	1:1000	1X TBST içinde %3 BSA	Cell Signaling, CS4113
Anti-Cav1	İmmünblotlama	1:1000	1X TBST içinde %3 süt tozu	Santa Cruz, sc894

Anti-Cav1 P-14	İmmünblotlama	1:1000	1X TBST içinde %3 süt tozu	Cell Signaling, CS3251
EGR1	İmmünblotlama	1:1000	1X TBST içinde %5 BSA	Cell Signaling, CS4153
Calnexin	İmmünblotlama	1:2500	1X TBST içinde %3 süt tozu	Santa Cruz- sc11397

Tablo 5. Araştırmada kullanılan RT-qPCR için dizayn edilmiş primer dizileri

Hedef Gen	Primer Dizisi (5'-3')
<i>MET</i>	F: TGGGCACCGAAAGATAAACCT R: TCTCGGACTTTGCTAGTGCC
<i>INSRA</i>	F: CTGGTCTCCACCATTCGAGT R: CGAGATGGCCTGGGGACG
<i>INSRB</i>	F: CTGGTCTCCACCATTCGAGT R: CCTCGGCACCAAGTGCCTG
<i>INSR</i>	F: CTGGTCTCCACCATTCGAGT R: CAAGGGACCTGCGTTTCCG
<i>EGR1</i>	F: CTCTCTGAAACAACGCGAAGGTCT R: AGATGGTGCTGAGGACGAGGA
<i>TXNIP</i>	F: GAGCCAGCCAACTCAAGAGA R: TTGGGCTCTCCAATCGGTGATCTT
<i>ACTG1</i>	F: GGAACAAAAGGCGGGGTCG R: AAACCAGCTTTGCACATGCC
<i>HK2</i>	F: GCTGTGGTGGACAGGATACG R: ATTTCCGAGCCAGGTCCTTC
<i>PDK1</i>	F: GCAGCTTCAGCTCGGACTC R: GCAACTCTTGCCGCAGAAAC
<i>PDK2</i>	F: GACATGGCTAAGCTCCTGTGT

	R: CGCCCTCATGGCATTCTTGA
<i>PDK3</i>	F: CCCCTTTGGCTGGATTTGGT R: AGGCGTGGTCTTGTAATGGC
<i>PDK4</i>	F: CCAAGCCACATTGGAAGCAT R: CGATGTGAATTGGTTGGTCTGG
<i>H6PD</i>	F: TGCCTTTCCGAGACCAGAAC R: GCGAATGACACCGTACTCCT
<i>PDPR</i>	F: ATCTCCCCAAGAAAGTGGC R: CATGAAGAACAGATGTCCGGT
<i>PKLR</i>	F: CAACTGACCCAGGAGCTG R: CTCCACGGAGCGAGATGC
<i>PHKG1</i>	F: ACTGAAGATCTGAGCATGACCC R: ATCGCCTGACCACACTGCTAA
<i>MMP15</i>	F: ACCAAGGAGTGGATGAAGCG R: CAGCCCAACTTCTCCGTGTA
<i>AFP</i>	F: AGGGAGCGGCTGACATTATT R: GGCCAACACCAGGGTTTACT
<i>E-Cad</i>	F: TACACTGCCCAGGAGCCAGA R: TGGCACCAGTGTCCGGATTA
<i>N-Cad</i>	F: ATTGGACCATCACTCGGCTTA R: CAACTGGCAAACCTTCACG
<i>SLUG</i>	F: AGACCCTGGTTGCTTCAAGGA R: GACCTGTCTGCAAATGCTCTGT
<i>Vimentin</i>	F: CCTTGACATTGAGATTGCCACCTA R: TCATCGTGATGCTGAGAAGTTTCG
<i>RPL41</i>	F: GAAACCTCTGCGCCATGA R: TCTTTCTTCTTTTGGCGTTCA

Tablo 6. Araştırmada kullanılan besi yerleri ve tampon çözeltiler

Hücre Büyütme Ortamı	1 g/lt D-glukoz içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, 31885-049) ya da Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Gibco, 21875-034) %10 Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum, FBS) (Gibco, 10500064) %1 Penisilin/Streptomisin (10000 ünite/ml; 10 mg/ml) (Gibco, 15140122) %1 Esansiyel olmayan amino asit solüsyonu (10 mM) (Biological Industries, 01-340-1B) %1 L-Glutamin (200 mM) (Gibco, 25030024)
Hücre Açlık Ortamı	D-glukoz içermeyen DMEM (Biological Industries, 01-057-1A) ya da RPMI (Biological Industries, 01-101-1A) %1 Penisilin/Streptomisin (10000 ünite/ml; 10 mg/ml) %1 Esansiyel olmayan amino asit solüsyonu (10 mM) %1 L-Glutamin (200 mM)
Yüksek Glukoz İndüksiyon Ortamı	4.5 g/lt D-glukoz içeren DMEM (Gibco, 11960085) %1 Penisilin/Streptomisin (10000 ünite/ml; 10 mg/ml) %1 Esansiyel olmayan amino asit solüsyonu (10 mM) %1 L-Glutamin (200 mM)
Yüksek İnsülin İndüksiyon Ortamı	D-glukoz içermeyen DMEM (Biological Industries, 01-057-1A) 100 nM insulin (Roche, 11376497001)

	%1 Penisilin/Streptomisin (10000 ünite/ml; 10 mg/ml) %1 Esansiyel olmayan amino asit solüsyonu (10 mM) %1 L-Glutamin (200 mM)
Yüksek Glukoz ve Yüksek İnsülin İndüksiyon Ortamı	4.5 g/lt D-glukoz içeren DMEM (Gibco, 11960085) 100 nM insulin (Roche, 11376497001) %1 Penisilin/Streptomisin (10000 ünite/ml; 10 mg/ml) %1 Esansiyel olmayan amino asit solüsyonu (10 mM) %1 L-Glutamin (200 mM)
Hücre Dondurma Ortamı	% 70 Hücre büyütme ortamı % 20 FBS % 10 Dimethyl Sulfoxide (DMSO)
1X Fosfat Tamponlama Salin Solüsyonu (<i>Phosphate Buffered Saline</i> : PBS) pH 7.4	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 8 mM Na₂HPO₄ 2 mM KH₂PO₄
% 4 PFA fiksasyon solüsyonu	% 4 Paraformaldehid (PFA) 1X PBS
Aseton-metanol fiksasyon solüsyonu	% 50 aseton % 50 metanol
%10 SDS-PAGE poliakrilamid jeli	% 10 Akrilamid:bisakrilamid (29:1) 375 mM Tris-HCl (pH 8.8) % 0.1 Sodyum dodesil sulfat (SDS) % 0.1 Amonyum persulfat (APS) % 0.1 N,N,N',N',-tetramethylethylenediamine (TEMED)

%8 SDS-PAGE poliakrilamid jeli	% 8 Akrilamid:bisakrilamid (29:1) 375 mM Tris-HCl (pH 8.8) % 0.1 SDS % 0.1 APS % 0.1 TEMED
%5 SDS-PAGE poliakrilamid jeli	% 5 Acrylamide:bisacrylamide (29:1) 125 mM Tris-HCl (pH 6.8) % 0.1 SDS % 0.1 APS % 0.1 TEMED
4X Laemmli Protein Örnek Tampon Çözeltisi	% 8 SDS 0.25 mM Tris.HCl (pH 6.8) % 40 Glycerol % 20 β -mercaptoethanol % 0.004 Bromophenol Blue
SDS-PAGE Yürütme Tampon Çözeltisi	25 mM Tris.HCl 250 mM Glisin % 0.2 SDS
Western Blot Transfer Tampon Çözeltisi	25 mM Tris.HCl 200 mM Glisin % 20 Metanol
PBS-T	1X PBS % 0.1 Tween 20
Tris Tamponlama Salin Solüsyonu-Tween 20 (TBS-T)	20 mM Tris.HCl (pH 8.0) 150 mM NaCl % 0.1 Tween 20
Coomassie Blue Solüsyonu	% 50 Metanol % 10 Asetik Asit % 0.05 Coomassie R250
Jel Fiksasyon Solüsyonu	% 50 Metanol

	% 7 Asetik Asit
Jel Destain Solüsyonu	% 5 Metanol % 7 Asetik Asit
Strip Solüsyonu	62.5 mM Tris.HCl (pH 6.8) % 2 SDS % 0.7 β -mercaptoethanol
RIPA Tampon Çözeltisi	50 mM Tris.HCl (pH 7.4) 150 mM NaCl 1 mM EDTA (pH 8.0) % 1 NP40 1X Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, 589297-0001) 1X PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche, 4906837001)

3.6.2. Yöntemler

3.6.2.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Bu çalışmada laboratuvarımızda mevcut bulunan insan karaciğer kanseri hücre hatları SK-Hep1, HuH-7, SNU-182, SNU-387, SNU-398, SNU-423, SNU-449, SNU-475, Hep3B, HepG2, Hep40, Focus ve Mahlavu; ayrıca kalıcı ekspresyon klonları HUH-7 pRC, HUH-7 IR-A, HUH7 IR-B, SNU-398 CMV-GFP (Mock) ve SNU-398 MET-GFP kullanılmıştır. SNU-182/387/398/423/449/475 hücreleri RPMI-1640 içeren hücre büyüme ortamında büyütülürken, diğer hücreler DMEM içeren hücre büyüme ortamında büyütülmüştür. Hücrelerle ilgili tüm işlemler laminar kabinet içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin inkübasyonu ise 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde yapılmıştır. Hücreler %70 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanmış, hücreleri kaldırmak için % 0.25 Trypsin/ 1 mM EDTA solüsyonu kullanılmıştır. Hücre sayımı için kültürde üretilen hücrelerin ortamları uzaklaştırılmış ve 1X PBS ile iki kere yıkandıktan sonra Trypsin/EDTA solüsyonu ile hücreler kaldırılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonundan 100 μ l alınarak 200 μ l tripan mavisi ve 200 μ l 1XPBS ile

karıştırıldıktan sonra süspansiyon örneği Neubauer lamına yüklenmiş ve 10 farklı alanda hemositometrik sayım yapılarak hücre konsantrasyonu hesaplanmıştır. Hücre tipine ve yapılacak uygulamaya göre optimize edilmiş sayılarda hücre büyütme ortamında ekilmiştir. Hücrelerden aralıklı olarak stok alınmış ve tripsin ile kaldırılan hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra pellet hücre dondurma solüsyonu içinde çözülmüştür. Kriyotüplere alikotlanan hücreler -80°C dondurucuda yavaş yavaş soğutulmuş, daha sonra uzun süreli saklama için sıvı azota alınmıştır.

Hücrelere yüksek glukoz ve yüksek insülin uygulaması yapılması için; hücreler ekildikten 24 saat sonra glukoz ve FBS içermeyen hücre açlık ortamında 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde tutulmuştur. Daha sonra hücreler yüksek glukoz uyarımı için 25 mM D-glukoz, yüksek insülin için 100 nM içeren hücre büyütme ortamı içerisinde deneyde belirlenen süreler boyunca (zaman bağımlı ya da 16 saat) inkübe edilmiştir. c-Met inhibisyonu için hücre tipine optimize dozlarda c-Met'e spesifik inhibitör SU11274 (Calbiochem) kullanılmış, insülin reseptörü inhibisyonu için ise HNMPA-(AM)₃ (Santa Cruz) inhibitörü kullanılmıştır.

3.6.2.2. Protein İzolasyonu ve Protein Miktarının Tayini

İnkübatörden alınan hücreler buz üzerine koyulmuştur ve vakum pompası ile hücrelerin ortamları uzaklaştırılmıştır. Daha sonra iki kez soğuk 1X PBS ile yıkamanın ardından 1 mM Na₃VO₄ ve 1 mM NaF içeren 1X PBS ile hücre kazıyıcı kullanılarak kazınan hücreler ve 15 ml'lik falkon tüpler içerisine alınmıştır. 2500 rpm hızında, 4°C'de 5 dakika boyunca santrifigasyonun ardından hücre pelleti hacminin üç katı kadar RIPA lizis tamponunda çözündürülmüş ve 1.5 ml hacmindeki eppendorf tüplere aktarılmıştır. Yarım saat buzda tutulan ve aralıklı vortekslenen hücre süspansiyonu bu sürenin sonunda 14000 rpm hızında, 4°C'de, 20 dakika boyunca tüpler hücre debrislerinin uzaklaştırılması için santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre lizatında protein miktarının tayini için Pierce Bicinkoninik asit (BCA) Assay kiti, kit talimatlarına uygun şekilde kullanılmıştır. Kısaca 562 nm'de gerçekleştirilen fotometrik ölçümde standart olarak BSA proteini kullanılmış ve BSA'nın çeşitli konsantrasyonlarına göre standart grafiği

izilmiştir. Bu standart grafiği baz alınarak bilinmeyen protein konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.6.2.3. İmmünblotlama

Proteinlerin hücredeki miktarını, aktivasyonunu/deaktivasyonunu belirlemek için proteinler SDS-PAGE yöntemi kullanılarak büyüklüklerine göre ayrılmıştır. Bu sebeple eşit miktarda protein  rneği 4X Laemmli tampon çözeltisi ile karıştırılmış ve 95 C'de 10 dakika boyunca kaynatılmıştır. Oda sıcaklığına getirilen örnekler kısaca çöktürüldükten sonra %8 ya da %10'luk SDS-poliakrilamid jeline yüklenmiştir. Ayrıca proteinlerin yanına ayrı bir kuyucuğa protein belirteci yüklenmiştir. Örnekler western blot yürütme tamponu içinde istifleme jeli boyunca 80V, ayırlama jeli boyunca 110V ile yürütülmüş, daha sonra floresan uyumlu polyvinylidene difluoride (PVDF) membrana transfer edilmiştir. Transfer, soğuk ortamda western blot transfer tampon çözeltisi içinde 3 saat boyunca 400 mA akım ile gerçekleştirilmiştir. Transfer sonunda membran kısaca 1XTBS ile yıkanmış, daha sonra uygun bloklayıcı solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat döndürülerek spesifik olmayan bağlanmalar bloklanmıştır. Çalışmada kullanılan antikorlar ve optimize koşulları detaylı olarak Tablo 4'te verilmiştir. Daha sonra membran çalışılan proteine spesifik monoklonal veya poliklonal (tavşan, fare veya keçiden elde edilen) birincil antikor ile gece boyunca 4 C'de d nd r lm ştir. Spesifik olmayan antikor bağlantıları 3 kez 5 dakika 1X TBST yıkaması ile uzaklaştırıldıktan sonra membran, primer antikorun yetiştirildiği hayvana yönelik infrared işaretili sekonder antikor solüsyonu ile 2 saat oda sıcaklığında d nd r lm ştir. Sekonder antikor solüsyonu bloklayıcı solüsyonu içinde infrared işaretili ikincil antikorun 1:20000 oranında çözülmesi ile hazırlanmıştır. Beş kez 5 dakika boyunca 1X TBST ve 1 kez 5 dakika boyunca 1X TBS yıkamasının ardından membrana LICOR infrared görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. Protein bantlarının görüntüleri daha sonra Adobe Photoshop programı ile düzenlenmiştir. Proteinlerin bağlı olduğu membran üzerinde farklı proteinleri hedef alan yeni blotlama yapılması için membran stip edilmiştir. Bu amaçla görüntülemesi biten membran Tablo 6'da belirtilen stripping solüsyonu ile 55  C'de 30 dakika boyunca döndürülmüş, daha sonra 3 kez 10 dakika 1X TBST ile yıkanmıştır. Bu

aşamadan sonra ilgili proteinin optimize bloklama solüsyonu ile bloklamaya alınmış ve bu basamaktan itibaren prosedür devam etmiştir. Jelin görüntülenmesi ise Coomassie Blue boyaması ile gerçekleştirilmiştir. Transferden sonra çıkarılan poliakrilamid jel 1 saat fiksatif solüsyonda bekletilmiş, daha sonra gece boyunca Coomassie boyama solüsyonu ile oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Ertesi gün boya yıkama solüsyonu ile birkaç dakika, bantlar görünür oluncaya kadar çalkalanmıştır.

3.6.2.4. Birlikte İmmünçöktürme (Co-IP)

Kültüre edilen hücreler, proteaz ve fosfataz inhibitörü içeren 1X PBS içinde kazınarak toplanmış ve 2500 rpm hızında 5 dakika boyunca 4°C'de santrifüj ile çöktürülmüştür. Hücre pelletleri proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyli içeren soğuk RIPA lizis tampon solüsyonunda çözüldükten sonra, buz üzerinde sık sık döndürülerek 1 saat boyunca hücreler lize edilmiştir. Ardından 20 dakika 4°C'de 14000 rpm'de santrifugasyon ile hücre debris uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernetan daha önceden lizis tampon solüsyonu ile üç kez yıkanmış 30 µl Sepharose G boncukları ile 4°C'de 20 dakika dönen platformda inkübe edilmiştir, böylece boncuklara spesifik olmadan bağlanacak proteinlerden arınmıştır. Protein konsantrasyonu Pierce BCA kiti ile belirlenmiş, lizat konsantrasyonu 1mg/ml olarak ayarlanmıştır. Hedef proteini ve ona bağlanan proteinleri çöktürmek için protein lizatı 16 saat 4°C'de insülin reseptörü ya da c-Met antikoruna ile dönen platformda inkübe edilmiştir. Ertesi gün 3 kez soğuk RIPA tampon çözeltisi ile yıkanmış 50 µl Sepharose G boncukları lizata eklenmiş ve 3 saat boyunca 4°C'de antikor-boncuk etkileşiminin sağlanması için döndürülmüştür. Spesifik olmayan bağlanma 5 kez proteaz ve fosfataz inhibitörü içeren RIPA tamponu ile yıkama ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen protein ve antikorların bağlı olduğu boncuklar 40 µl Laemmli solüsyonunda çözülmüş ve 95°C'de 10 dakika kaynatılmıştır. SDS-PAGE jeline yüklenmeden önce 1 dakika santrifüj edilerek boncuklar uzaklaştırılmış, süpernetanda kalan protein örnekleri ayrılarak jelle yüklenmiştir.

3.6.2.5. İmmünfloresan Mikroskopisi

Hücreler sayıldıktan sonra 700.000 hücre 10 cm hücre kültürü kabı içine yerleştirilmiş lamellerin üzerine ekilmiştir ve ertesi gün 24 saat boyunca aç bırakılmıştır. Onaltı saatlik yüksek glukoz ve insülin uyarımından sonra 2 kez 1X PBS ile yıkanan hücrelere -20°C'de soğutulmuş 1:1 oranından aseton:metanol ya da %4 PFA fiksasyon solüsyonu eklenmiştir. On dakikalık fiksasyonun ardından (aseton:metanol fiksasyonu -20°C'de, PFA fiksasyonu ise oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir) hücreler 3 kez 1X PBS ile yıkanmıştır. PFA fiksasyonu uygulanmışsa hücrelerin geçirgenliği % 0.25 Tween içeren 1X PBS ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon ile sağlanmıştır. Bloklama için %1 BSA içeren 1XPBS ile oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyonun ardından 1 saat bloklama solüsyonu içinde çözülmüş birincil antikor ile hücreler oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üç kez 10 dakikalık 1XPBS yıkamasının ardından, antikor seyreltme tampon çözeltisinde optimize edilmiş oranlarda seyreltilmiş ikincil antikor eklenmiştir ve hücreler ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hücre çekirdeği 1XTBS içinde çözülmüş 20 µM DAPI solüsyonu ile 5 dakika oda sıcaklığında boyanmıştır. Üç kez 1XPBS ile 10 dakikalık yıkamadan sonra kapama solüsyonu eklenerek lameller lamlara kapatılmıştır. Hücreler konfokal mikroskopta ya da floresan mikroskopta görüntülenmiştir. Görüntü analizleri ImageJ programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.2.5. RNA İzolasyonu

Hücreler 6 cm çapındaki hücre kültürü kaplarında büyütülüp uyarım yapıldıktan sonra inkübatörden çıkarılmış ve 1 ml NucleoZOL (Macherey-Nagel) solüsyonu eklenerek pipetaj ile toplanmıştır ve RNase/Dnase içermeyen eppendorf tüplere aktarılmıştır. 400 µl RNase/Dnase içermeyen su eklendikten sonra 15 saniye boyunca tüpler çalkalanmış ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda oda sıcaklığında, 12000g hızında 15 dakika santrifüj edilen örneklerden 1 ml süpernetan dikkatlice çekilerek yeni 2 ml hacmindeki RNase/Dnase içermeyen eppendorf tüplere aktarılmıştır. Süpernetan içindeki RNA'yı çöktürmek için eşit hacimde izopropanol örneklerin üzerine eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan

sonra 12000g hızında 10 dakika santrifüj ile RNA'lar tüpün dibine çöktürülmüştür. Pellet üstünde yer alan süpernetan atılmış, pellet iki kez RNase içermeyen suda çözünmüş % 75 etanol ile yıkanmıştır. Yıkamalar 3 dakika oda sıcaklığında 8000g hızında santrifüj ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA pelleti 40 µl RNase/Dnase içermeyen ultra saf su ile çözülmüş, 65°C'de 10 dakika ısı bloğunda inkübe edildikten sonra örneklerin konsantrasyonu Nanodrop ile ölçülmüş ve -80°C'de saklanmıştır.

3.6.2.6. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için RevertAid cDNA sentez kiti (Thermo Scientific) protokolü takip edilmiştir. Bunun için nükleazdan arınmış eppendorf tüpleri buza alınmış ve üzerine 1 µg RNA, 1 µl Oligo dT primer, 1 µl random hexamer eklendikten sonra 12 µl'ye kadar nükleazdan arındırılmış su eklenmiştir. RNA-primer karışımı 65°C'de 5 dakika tutulduktan sonra buz üzerinde soğutulmuş ve kısa süreli santrifüj edilmiştir. Daha sonra her reaksiyon tüpüne 4 µl 5X reaksiyon tampon çözeltisi, 1 µl Riboblock Rnase inhibitörü (20 U/µl), 2 µl dNTP karışımı (10 mM) ve son olarak 1 µl RevertAid revert transcriptase enzimi (200 U/µl) eklenmiş ve 5 dakika 25°C'de, 1 saat boyunca 42°C'de, 5 dakika 70°C'de tutularak cDNA sentez reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA stoğundan 5 ng/µl konsantrasyonda ara stok hazırlanarak -20 °C'de saklanmıştır.

3.6.2.7. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

Gen ekspresyon düzeylerini karşılaştırmalı olarak belirlemek için Real Q Plus SYBR (Thermo Scientific) karışımı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 5'te verilmiştir. Reaksiyonların standardizasyonu için referans gen olarak RPL41 kullanılmıştır. Primerler 10 µM ara stok olarak seyreltilmiştir. ABI 7500 Fast cihazı ile uyumlu mikrolakalar ve yapışkan kapaklar kullanılmıştır. Her reaksiyon için 10 ng cDNA, 6.25 µl RealQ Plus SYBR karışımı, 0.25 µl forward primer (10 µM), 0.25 µl reverse primer (10 µM), 3.75 µl nükleazdan arındırılmış su kullanılmıştır. Her primer için optimize termal döngü ile qPCR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve sonuçların istatistiksel analizi GraphPad Prism programı ile gerçekleştirilmiştir.

3.6.2.8 Sulforhodamine B (SRB) Deneyi

IR inhibitörü HNMPA-(AM)₃'ün inhibitör etkin dozunu (IC₅₀) dozunu belirlemek için In Vitro Toksikoloji Assay kiti (Sigma Aldrich) protokolünde önerildiği gibi kullanılmıştır. Üç 96 kuyucuklu plaka üzerine kuyu başına 2500 hücre ekilmiş ve logaritmik artan dozlarda inhibitör uygulaması yapılmıştır. Her uygulama için en az 4 kuyucuklu tekrar ile çalışılmıştır. İnhibitör uygulamasının 24., 48., ve 72., saatlerinde 96 kuyucuklu plakalar inkübatörden çıkarılmış ve ortam hacminin dörtte biri miktarında soğuk %50 (w/v) trichloroacetic asit (TCA) solüsyonu eklenerek hücreler 1 saat boyunca +4 °C'de fikse edilmiştir. Daha sonra TCA solüsyonu kuyulardan çekilmiş ve kuyular beş kez 200 µl su ile yıkanarak kurutulmuştur. Çokluplaka okuyucu spektrofotometrede arka plan ölçümü alındıktan sonra kuyulara 100 µl %0.4 SRB boya solüsyonu eklenmiş ve fikse olan proteinler 30 dakika oda sıcaklığında boyanmıştır. Boyamanın sonunda fazla boya 5 kez 200 µl %1 asetik asit solüsyonu yıkaması ile uzaklaştırılmıştır. Kuyular kurutulduktan sonra 100 µl 10 mM Tris solüsyonu eklenmiştir, 5 dakika çalkalama ve pipetaj ile boya çözölmüştür. Varioskan plaka okuyucuda 565 nm absorbans ölçümü alınarak protein içeriği ölçölmüştür. Arka plan sinyali olarak 690 nm absorbans ölçümü yapılarak 565 nm absorbans ölçümünden çıkarılmıştır. Yalnızca inhibitör çözgeni olan DMSO içeren kuyu referans alınmış, inhibitörün IC₅₀ değeri GraphPad programı kullanılarak belirlenmiştir.

3.6.2.8. Yara İyileşmesi Deneyi

Hücreler 24 kuyucuklu hücre kültürü plakasına kuyucukların tamamını kaplayacak yoğunlukta ekildikten 24 saat sonra kuyular 1X PBS ile yıkanmış ve açıklık hücre büyütme ortamına alınarak hücre kültürü inkübatöründe 24 saat bekletilmiştir. Ertesi gün her bir kuyuya 200 µllik pipet ucu ile tek bir doğrusal çizik atılmış ve bu çizikten kalkan hücreler 1X PBS yıkaması ile uzaklaştırılmıştır. Her kuyuya uygun deney ortamı eklendikten sonra mikroskopta kuyuların çizik boyunca deney başlangıç fotoğrafları çekilmiştir, daha sonra da her 6 saatte bir kuyuların çizik boyunca imajları alınmış ve 24 saat sonunda deney sonlandırılmıştır. Çiziklerin kapanma başarısı görüntülerin ImageJ

“wound healing tool” makrosu yardımı ile analiz edilmiş, istatistiksel analiz için GraphPad Prism programı kullanılmıştır.

3.6.2.9. Boyden Chamber Kullanılarak Motilite ve İnvazyon Deneyi

Boyden chamberları matrijel ile kaplamadan kullanarak hücrelerin motilite özellikleri, matrijel kaplaması ile kullanılarak ise invazyon özellikleri test edilmiştir. Matrijel bir gece önceden buz üzerine alınıp bir gece boyunca +4°C'de çözülmüştür. Ertesi gün 24 kuyucuklu hücre büyüme plakasına boyden chamberlar koyulmuş, invazyon deneyi için son konsantrasyonu 0.25 mg/ml olacak şekilde glukoz içermeyen soğuk boş DMEM ile karıştırılarak 150 µl hacminde chamberların üzerine eklenmiştir. Matrijelin donması için 37°C inkübatörde 2 saat beklendikten sonra donmayan matrijel pipet yardımıyla geri çekilmiştir. Bekleme süresince hücreler sayılmış ve her chamber üzerine 500 µl açlık hücre büyüme ortamı içinde 5000 SK-Hep1/20000 HUH-7 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Hücreleri eklemekten önce matrijel içeren insertler 300 µl %0.1 BSA içeren DMEM ile yıkanmış ve 750 µl kemoatraktan içeren kuyucuklara hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilmiştir. İnhibitör içeren koşullarda inhibitörler hem insert üstünde hücre süspansiyonuna hem de kemoatraktan içeren alt kuyuya eklenmiştir. İnsertlerin üzerine hazırlanan hücre süspansiyonları eklendikten 24 saat sonra insertlerden geçen hücreler DiffQuik boyama kiti ile boyanmıştır. Her insert 1 dakika fiksatif solüsyonda, 1 dakika eozin solüsyonunda, 1 dakika hematoksilen solüsyonunda tutulduktan sonra su ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Bir kulak çubuğu yardımıyla insert altına geçmeyen hücreler insertin iç yüzeyinden temizlenmiştir. İnsertin altına geçen hücreler mikroskop altında sayılmıştır.

3.6.2.9. Sferoid Oluşumu

HUH-7 hücreleri 10 cm çapında hücre kültürü kabına ekildikten sonra 24 saat boyunca açlık ortamında tutulmuştur. Deney gününden bir gün önce 48 kuyucuklu bir hücre büyüme plakasının her kuyusu 150 µl polyHEMA ile 1 gece 37°C inkübatörde

kaplanmıştır. Matrijel bir gece önceden buz üzerine alınıp bir gece boyunca +4°C'de çözülmüştür. Deney günü kurumuş olan polyHEMA içeren kuyucuklar iki kez 1X PBS ile yıkanmıştır. Her kuyuya 250 µl matrijel-hücre karışımı eklenmiştir. Matrijelin son konsantrasyonu 2.5 mg/ml'dir, her kuyuya 1000 hücre eklenmiştir. Matrijelin seyreltmesi ilgili deney ortamı ile yapılmıştır. Daha sonra plaka 1000g hızında, oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilerek hücre kültürü inkübatörüne kaldırılmıştır. Ertesi gün 350 µl deney ortamı her kuyuda donan matrijelin üzerine eklenmiştir. Buharlaşmayı önlemek için kuyular arasındaki boşluğa 1X PBS koyulmuştur. Her dört günde bir 75 µl deney ortamı kuyulara eklenmiştir. 21 gün sonunda oluşan sferoidler mikroskop altında incelenmiş ve analiz edilmiştir.

3.6.2.10. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

Yüksek glukozun/insülinin hücre adezyonu ve proliferasyonu üzerine olan etkisi Roche xCELLigence cihazı, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile incelenmiştir. Hücreler E-plate üzerine yapıştıklarında elektrik akımına karşı bir direnç oluşur ve "Cell index" olarak ölçülmektedir. Çalışmanın yapılacağı hücreler 10 cm hücre kabına ekildikten sonra 24 saat boyunca açlık ortamında tutulmuş ve deneye alınacakları gün tripsin ile kaldırılarak sayılmıştır. Kuyu başına 5000/kuyu hücre gelecek şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu sırada E-plateleri kalibre etmek için 30 µl deneysel hücre ortamı her kuyuya eklenmiş ve E-plate 30 dakika 37°C inkübatörde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 1 dakikalık arkaplan ölçümü alınmıştır. Her kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu eklenmiş, E-plate cihazın yuvalarına yerleştirilmiş ve 15 dakikada bir ölçüm alınacak şekilde deney programı başlatılmıştır. Hücreler cihazda 4 gün boyunca takip edilmiştir. Gerçek zamanlı analiz sistemi ile ilk 7 saatlik ölçüm aynı zamanda adezyonun değerlendirilmesi için incelenmiştir. Her örnek 4 kez çalışılmıştır. Slope analiz yöntemi ile hücre proliferasyon eğrisi analiz edilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

3.6.2.10. Seahorse Hücre Metabolizması Analizi

Yapılan uygulamaların hücre metabolizması üzerine nasıl etki ettiğini belirlemek için Seahorse Hücre Enerjisi Fenotip testi ve Hücre MitoStress testi Seahorse XF Assay kiti protokolüne uygun olarak takip edilmiştir. İlk gün öncelikle 96 kuyucuklu Seahorse plakasına 5000 SKHep1 hücresi 80 µl hücre büyüme ortamında ekilmiştir. Plakada 4 kuyu arkaplan okuması için boş bırakılmıştır ve 37°C inkübatörde 1 gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün hücreler 24 saat boyunca açlık hücre büyüme ortamına alınmıştır. Açlık ortamında olan hücreler çıkarılmış, 16 saat boyunca inhibitörlü/inhibitörsüz indüksiyon ortamında tutulmuştur. Seahorse deney gününden 1 gün önce Xfe96 Extracellular Flux Assay kiti açılmış, utilite plakasının kuyularına 200 µl XF kalibre solüsyonu eklenmiştir. Sensör kartuşu utilite plakasının kuyularına daldırılmış, sensörlerin kalibre solüsyonuna girdiğinden emin olunmuştur ve 37°C karbodioksit içermeyen ancak nem sağlanan inkübatörde 1 gece tutulmuştur. Ertesi gün 100 ml XF Baz ortamı hazırlanmış ve 37 °C'ye ısıtılmıştır. Bunun için 97.6 ml Agilent Seahorse XF Baz ortamı, 400 µl glukoz (2.5 M), 1 ml sodyum piruvat (100 mM) ve 1 ml L-Glutamin (200 mM) karıştırılmıştır. Solüsyon pH 7.4'e ayarlanmış ve filtrelenerek sterilize edilmiştir. Hücrelerin olduğu Seahorse plakası çıkarılmış, hücreler 2 kez 200 µl deney ortamı ile yıkanmıştır. Daha sonra hücre plakası 37°C karbodioksit içermeyen ancak nem sağlanan inkübatörde 1 saat bekletilmiştir. Bu sırada kartuşun talimatlarına göre enjeksiyon sırasına göre A/B/C/D portlarına ilgili bileşikler 25 µl hacminde eklenmiştir. Kartuş plakası Agilent Seahorse XF Analyzer cihazına yerleştirilmiş, kalibrasyon programı başlatılmıştır. Daha sonra ise hücre plakasının eklenmesi ile 3 dakika karıştırma, 2 dakika bekleme, 2 dakika ölçüm siklusundan oluşan program başlatılmıştır. Bu program için 3 bazal ölçüm, 3 yüksek glukoz (25 mM) enjeksiyonu sonrası ölçüm, 3 SU11274 (1 µM) enjeksiyonu sonrası ölçüm, 3 Oligomisin (2 µM) enjeksiyonu sonrası ölçüm, 3 FCCP (1 µM) enjeksiyonu sonrası ölçüm alınmıştır. Sonuçlar Seahorse Wave 2.3 programı ile analiz edilmiştir.

3.6.2.11. Zebrabalığı Zenograft Deneyi

AB +/+ tip yabancı zebrabalıklarından elde edilen embriyolar zenograft modelinin oluşturulması için kullanılmıştır. Bu amaçla döllenmeden sonra alınan embriyolar 28°C inkübatörde E3 ortamında 48. Saate kadar büyütülmüş, daha sonra koryonlarından çıkarılarak embriyoların besin keselerine 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate (DiI) boyası ile floresan olarak boyanmış 300 hücre mikroenjeksiyon yöntemi ile enjekte edilmiştir. Larvalar mikroenjeksiyondan 1 gün sonra (1dpi) floresan stereomikroskop ile incelenmiş, besin keselerinde lokal tümör oluşturanlar seçilmiştir ve erken dönemde dolaşımında floresan tümör hücresi olanlar ayıklanmıştır. Mikroenjeksiyondan 1 gün sonraki incelemeden sonra ayıklanan balıklar yüksek glukoz/insülin ya da yüksek glukoz/insülin/SU11274 içeren ortamlara alınmıştır. Açlık durumunda olan grup ise yalnızca E3 ortamında idame ettirilmeye devam etmiştir. Enjeksiyonun 4. gününde (4dpi) balıklar Tricaine ile fiks edilen zebrabalıkları floresan stereomikroskop altında körlene yöntemi ile incelenmiş, metastaz yapan ve metastaz yapmayan hücreleri içeren larvaların sayıları belirlenmiş ve farklı koşullardaki hücrelerin metastaz yetenekleri kıyaslanmıştır.

Bu çalışmalarda iki farklı hücre hattı kullanılmıştır. c-Met ekspresyonu olmayan yalnızca kontrol plazmidi içeren HCC hücre hattı SNU398-mock ve bu hattan elde edilen, kalıcı olarak yüksek c-Met eksprese eden SNU398-Met mikroenjeksiyon yolu ile aktarılmıştır. Hücreler hücre kültürü kaplarına eşit sayıda ekildikten sonra 8 saat glukoz ve serum içermeyen ortamda aç bırakılmış, daha sonra yüksek glukoz ve insulin ya da SU11274 inhibitörü ile 16 saat inkübe edilmiştir. Etkinin daha iyi görülebilmesi adına yüksek glukoz ve insulin ve/veya SU11274 uygulaması balıkların büyüme ortamlarına eklenmiş, uyarımın/inhibisyonun devamlılığı sağlanmıştır. Larvaların içinde bulunduğu ortam her gün yenilenmiştir.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

YILLAR	2016	2017-2018		2018-2019		2019-2020	
	09-12	01-06	07-12	01-06	07-12	01-06	7-12
İŞ AKIŞI AYLAR							
Malzemelerin temini ve ön optimizasyon çalışmaları							
Yüksek glukoz ve insülin (YG-YI) uyarımı ile c-Met aktive edici fosforilasyonlarının incelenmesi							
YG-YI'e bağlı c-Met ve IR aktive edici fosforilasyonlarının inhibitör varlığında incelenmesi							
YG-YI'e bağlı c-Met-IR etkileşiminin /aşağı komplekslerinin incelenmesi							
c-Met-IR izoform ilişkisinin incelenmesi							
Zebrabalığı zenograft modelinde YG-YI ve c-Met'in rollerinin analizi							
YG-YI ile c-Met-IR ko-lokalizasyonunun incelenmesi							
c-Met'in hücre metabolizması üzerine etkisinin incelenmesi							
YG-YI'e bağlı hücre adezyonu ve proliferasyonunun incelenmesi							
YG-YI'ye bağlı hücre motilite ve invazyonunun belirlenmesi							
YG-YI uyarımı ve inhibitörlerle varlığında sferoid oluşturma yeteneklerinin test edilmesi							
Tez Savunması							

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizlerde GraphPad Prism programı kullanılmıştır. İkili grupların karşılaştırılması amacıyla Student's t-test; çoklu grupların karşılaştırılması amacıyla Analysis of variance (ANOVA) yöntemi kullanılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Şekillerde yer alan "*" işareti $p < 0.05$, "***" $p < 0.001$, "****" $p < 0.0001$ değerlerini ifade etmektedir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu çalışmada insandan elde edilen ve ticari olarak dağıtılan HCC hücre hatları kullanılmıştır. Görülen etkilerin kendiliğinden hiperglisemik ve hiperinsülinemik *in-vivo* modellerde incelenmemiş olması bir sınırlılıktır.

3.10. Etik Kurul Onayı

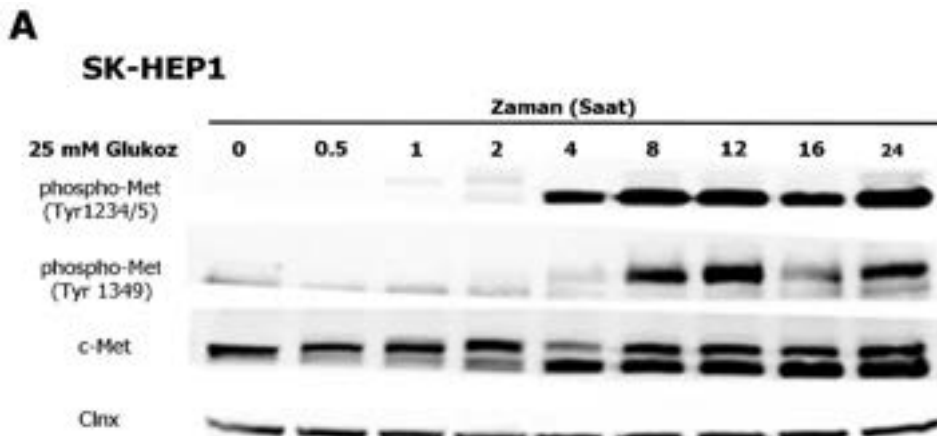
Bu tezde yer alan hücre kültürü çalışmalarının gerçekleştirilmesi, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 27.06.2014 tarihinde 1567-GOA protokol numaralı 2014/23-01 karar numarası ile etik açıdan uygun bulunmuştur. In vivo zebrabalığı modelini içeren çalışmaların gerçekleştirilmesi ise İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İBG-HADYEK) tarafından 08.07.2020 tarihinde 2020-032 protokol numaralı kararı ile etik açıdan uygun bulunmuştur. Etik kurul izin belgeleri ekte yer almaktadır.

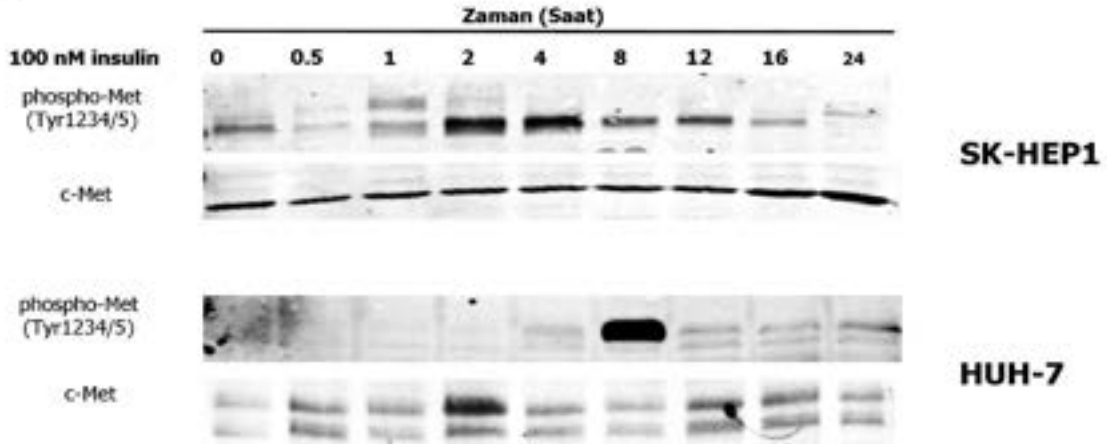
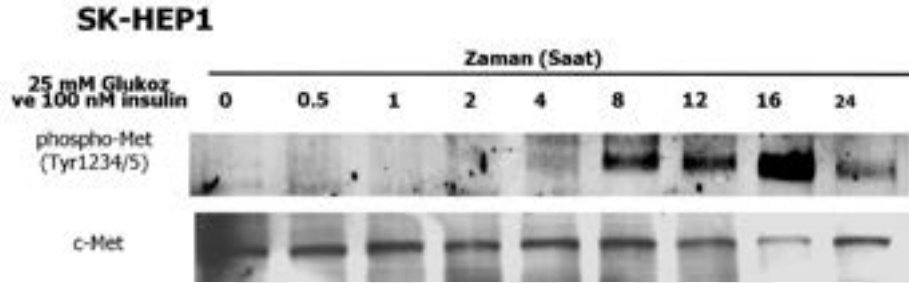
4. BULGULAR

4.1 Yüksek Glukoz ve İnsülinin HCC hücrelerinde c-Met Ekspresyonu ve Aktivasyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Obezite sürecinde artan kan glukoz ve insülin değerlerini hücre kültüründe yansıtmak amacıyla HCC hücre dizileri SK-Hep1 ve HuH-7 hücrelerine 25 mM D-glukoz ve/veya 100 nM insülin uyarımı yapılmıştır. Bu iki hücre hattı farklı diferansiyasyon kapasitelerine sahiptir. HuH-7 hücreleri epitelyal özelliklere sahip, daha iyi diferansiye olmuş hücrelerdir. SK-Hep1 hücreleri ise mezenkimal karaktere sahip, daha az diferansiye olmuş hücrelerdir. HCC sürecinin farklı aşamalarındaki etkileri belirlemek amacıyla bu iki farklı karakterdeki hücre dizileri seçilmiştir.

c-Met reseptörünün aktivasyonu sonucu transfosforilasyon ile Tirozin-1234 ve 35 fosforlanmaktadır. Daha sonra otofosforilasyon ile 1349. konumda bulunan tirozin amino asidi fosforillenmektedir. Çalışmamızda öncelikle reseptör aktivasyonu ile ilişkili bu fosforilasyonlar western blot yöntemi ile incelenmiştir (**Şekil 8**). Çeşitli saatlerde yapılan inkübasyonun etkisi sonucu ilerleyen deneylerde en etkin inkübasyon süresinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla 24 saat glukoz ve serum açlığında bekletilen HCC hücreleri yüksek glukoz (YG) koşulu (**Şekil 8A**) veya yüksek insülin (Yİ) koşulu (**Şekil 8B**) veya yüksek glukoz ve yüksek insülinin (YGYİ) birlikte (**Şekil 8C**) uygulanması ile "0, 30 dakika, 1 saat (sa.), 2 sa., 4 sa., 8 sa., 12 sa., 16 sa. ve 24 sa." boyunca uyarılmıştır.



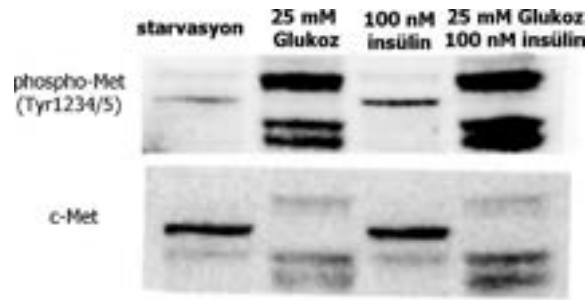
B**C**

Şekil 8. HCC hücrelerinde yüksek glukoz ve/veya yüksek insülin uygulamalarının zaman bağılı c-Met aktivasyonu üzerine etkisinin western blot yöntemi ile incelenmesi.

Verilerimize göre yüksek glukoz uygulaması c-Met'i genellikle 4. saatten sonra yüksek düzeyde aktive etmiştir. Yüksek insülin uygulaması ise SK-Hep1 için 2. saatte, HuH-7 için ise daha geç olarak 8 saatte c-Met'i aktive etmeye başlamıştır. Yüksek glukoz ve yüksek insülin konsantrasyonunuda ise 8. saatten sonra yüksek düzeyde c-Met aktivasyonu görülmüş, en yüksek aktivasyon uygulama süresinin ise 16 saat olduğu belirlenmiştir. Genel olarak 16 saatlik inkübasyonun tüm hücrelerde hem yüksek glukozun hem de yüksek insülinin c-Met aktivasyonuna sebep olduğu görülmüştür.

Yüksek glukoz ve insülinin ayrı ayrı ve birlikte uygulaması için HCC hücrelerinde ortak zaman belirlendikten sonra 16 saatlik bu uygulamaların c-Met aktivasyonu üzerine ayrı ayrı ve birlikte etkisi western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir (**Şekil 9**). Yüksek glukoz ve insülin uygulamalarının özellikle birlikte olduklarında c-Met'in aktive edici fosforilasyonu olan 1234-35 tirozin fosforilasyonlarını arttırdığı western blot

yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca c-Met'in yüksek glukoz uygulaması sonucu farklı boyutlarda izoformlarının da olduğu görülmektedir.



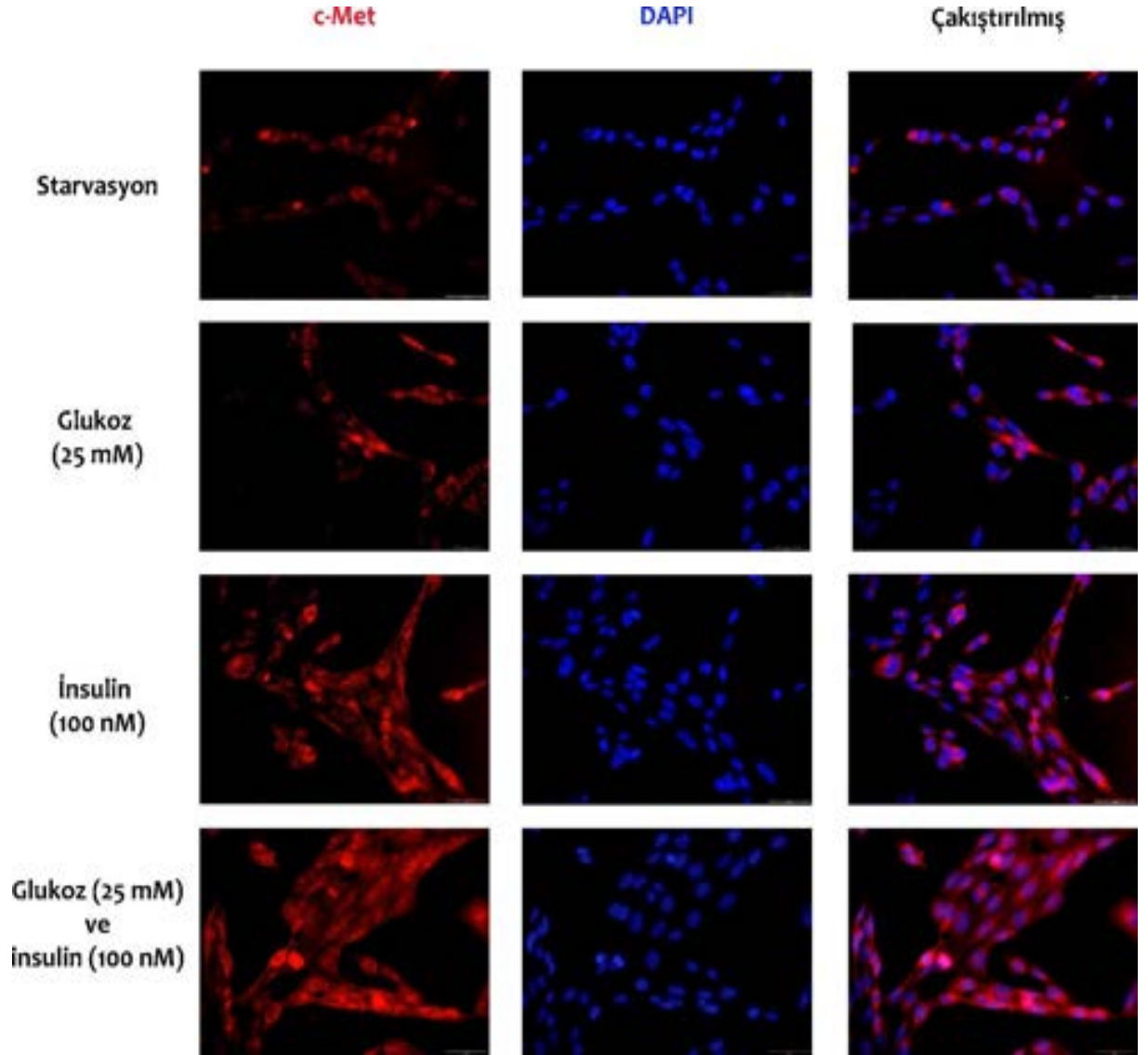
Şekil 9. Western blot yöntemi ile 16 saatlik yüksek glukoz ve insülin uygulamasının c-Met aktivasyonuna etkisinin incelenmesi.

c-Met'in hücre içindeki etkilerinin belirlenmesinde aktivasyonu kadar lokalizasyonu da önemlidir. Bu nedenle 16 saatlik yüksek glukoz ve/veya insülin uygulamalarının c-Met protein ekspresyonu ve lokalizasyonu üzerine etkileri ayrı ayrı ve birlikte immünfloresan mikroskopisi analizleri ile değerlendirilmiştir (**Şekil 10**).

Ön sonuçlarımıza göre c-Met starvasyon koşullarında perinükleer olarak lokalize olurken, yüksek glukoz/ insülin ile hem ekspresyonu hem de membrana dağılımı artmaktadır. Membranda yer alan c-Met aktif sinyalleşmeyi işaret etmektedir.

4.2 Yüksek Glukoz ve İnsülin Uyarımının c-Met ve IR Etkileşimindeki Rolünün Belirlenmesi

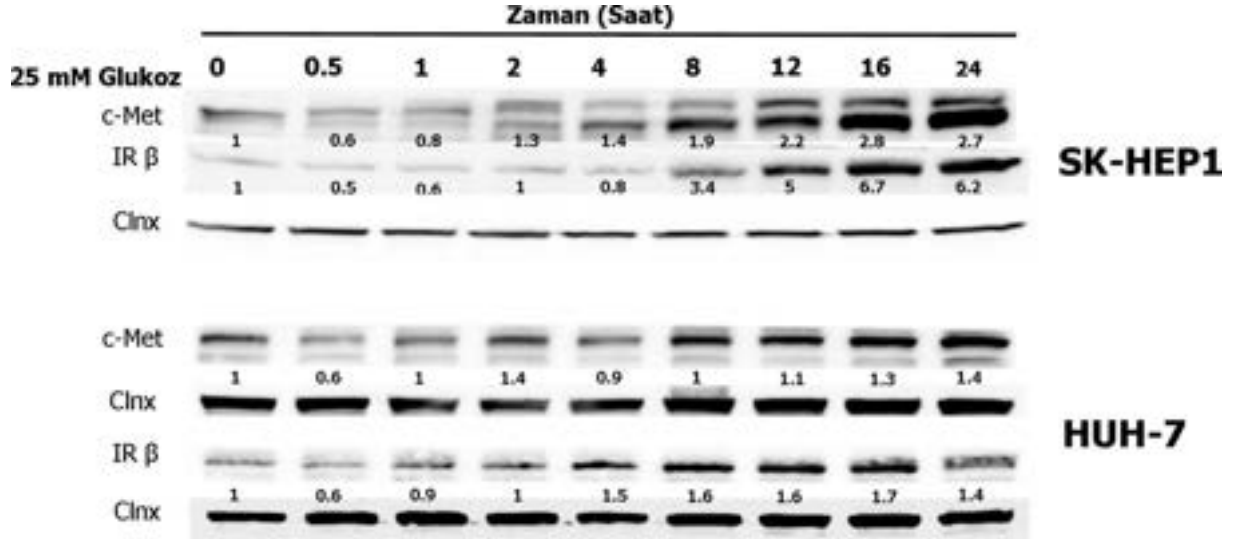
IR ve c-Met'in HCC hücrelerinde yüksek glukoz ve/veya insülin uyarımı sonucu protein düzeylerindeki değişiklik western blot yöntemi ile analiz edilmiştir (**Şekil 11**). Bantların intensite analizi ImageJ programı ile yapılmış, c-Met ve IR protein ekspresyon düzeyleri aynı blottaki Calnexin protein düzeyine ve açlık koşullarındaki protein düzeylerine normalize edilmiştir. Elde edilen analiz sonuçlarının sayısal verileri Şekil 11'de bantların üzerine yerleştirilmiştir.



Şekil 10. c-Met'in yüksek glukoz ve/veya insülin uyarımı ile hücresel ekspresyon ve dağılımının immünfloresan olarak gösterilmesi.

Buna göre SK-Hep1 hücrelerinde yüksek glukoz indüklenmesi c-Met ve insülin reseptörü için oldukça iyi bir şekilde görülmektedir. Her iki reseptörün de 30. dakikadan sonra protein seviyeleri artış göstermiş, özellikle 4. saatten 8. saate geçerken c-Met neredeyse iki kat artarken insülin reseptörü seviyesi üç kattan fazla artmıştır. Her iki reseptör de 16. saatlik yüksek glukoz indüklenmesinden sonra maksimum protein seviyelerine ulaşmışlardır.

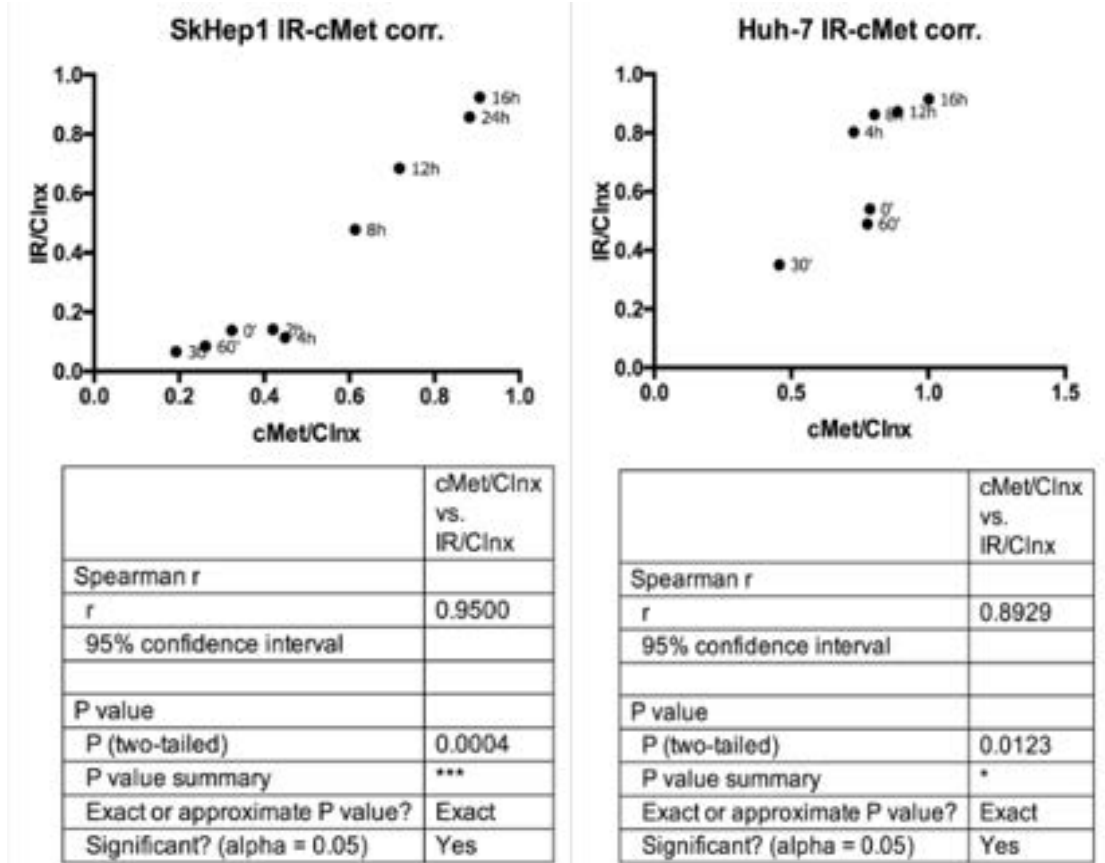
SK-Hep1 hücre hattında yüksek glukoz uygulaması; c-Met ve insulin reseptörünün protein seviyesini zaman bağımlı olarak, aynı eğilimle arttırmıştır. Her iki protein için ekspresyon sekizinci saatten sonra yüksek düzeyde devam etmektedir.



Şekil 11. SK-Hep1 ve HUH-7 hücrelerinde IR ve c-Met protein ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması. c-Met ve IR protein düzeylerini belirlemek için bant intensite analizleri yapılmış, rakamsal veriler ilgili bantların altında yer almaktadır.

Yüksek glukoz indüklemesinden 2 saat sonra c-Met protein düzeyi en yüksek değere ulaşmıştır ve starvasyona kıyasla %40 oranında artış göstermiştir. İnsülin reseptörü de c-Met reseptörüne benzer bir eğilime sahiptir; ilk 30 dakikada azalırken, özellikle 4. saatten sonra yükselmiştir. İnsülin reseptörünün protein seviyesi 16 saatlik yüksek glukoz indüksiyonunda en yüksek değerine ulaşmakta ve starvasyona kıyasla %60 oranında artmaktadır.

Huh7 hücre hattında yüksek glukoz uygulaması c-Met ve insulin reseptörünün protein seviyesini zaman bağımlı olarak, benzer bir eğilimle arttırmaktadır. Bu proteinlerin zamana bağımlı ekspresyonlarında herhangi bir korelasyonun olup olmadığı, elde edilen bant intensite değerleri kullanılarak Spearman Korelasyon analizi ile sorgulanmıştır (**Şekil 12**). Korelasyon analizi için GraphPad programı kullanılmıştır.

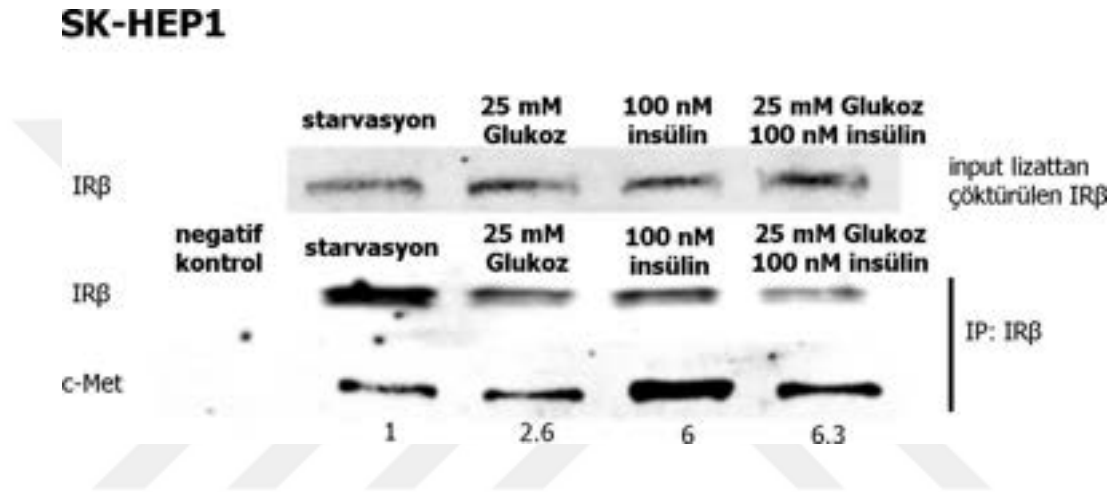


Şekil 12. Spearman Korelasyon analizi ile IR-c-Met protein ekspresyonlarındaki korelasyonun yüksek glukoz uyarımı sonucu incelenmesi.

Yapılan bu analize göre SK-Hep1 hücrelerinde c-Met ve IR protein ekspresyon düzeyleri yüksek glukoz uyarımı sonucu yüksek anlamlılıkta korelasyon göstermektedir (Spearman r 0.9500, *** p <0.001). HUH-7 hücrelerinde benzer şekilde c-Met ve IR ekspresyonları yüksek glukoz uyarımına bağlı korelasyon göstermekte ve zamanla artmaktadır (Spearman r 0.8929, * p <0.05). Her iki hücre hattında da IR ve c-Met ekspresyonları yüksek glukoz uyarımı sonrası anlamlı olarak pozitif yönde korelasyon göstermektedir.

Bu veriler doğrultusunda ve literatürde yer alan Fafios ve arkadaşlarının çalışmasına dayandırdığımız hipotezimizi test etmek amacıyla, c-Met aktivasyonunun potansiyel IR etkileşimi ile ilişkisini inceledik. Reseptör tirozin kinazların aktive olması için transfosforilasyonlarının gerçekleşmesi gerekmektedir ve dimerizasyon transfosforilasyon için gereklidir. c-Met ve IR'nün heterodimer oluşturup oluşturmadıklarını analiz etmek amacıyla, c-Met-IR etkileşimi yüksek glukoz ve/veya

insülin uyarımı sonrası co-IP yöntemi ile incelenmiştir (**Şekil 13**). Heterodimerizasyonun incelenmesi için IR-c-Met korelasyonunun en yüksek olduğu SK-Hep1 hücre hattı ve c-Met aktivasyonunun en fazla olduğu 16 saatlik uyarım seçilmiştir. IR- β antikoru kullanılarak IR ve onunla etkileşen diğer proteinler birlikte çöktürülmüş, western blot yöntemi ile IR ve c-Met antikorları kullanılarak protein etkileşimi analiz edilmiştir. Etkileşen protein miktarını belirlemek için c-Met bant intensiteleri, IR- β bant intensite düzeyi ve starvasyon koşullarına normalize edilmiştir.

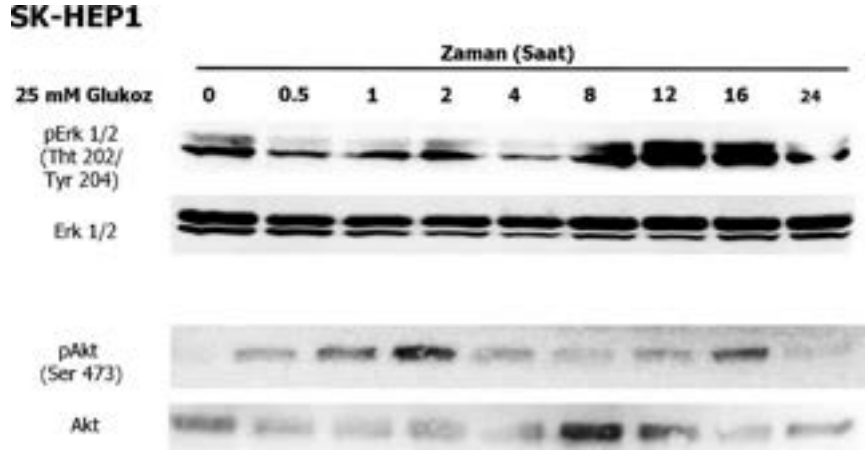


Şekil 13. c-Met-IR etkileşiminin yüksek glukoz (25 mM) ve/veya insülin (100 nM) uyarımları sonucu starvasyon grubuna oranla analizi.

Böylece c-Met ve IR'nün hem yüksek glukoz, hem de insülin varlığında etkileştiği gösterilmiştir. Yüksek glukoz uyarımı ile bazal koşullarda gerçekleşen etkileşime kıyasla 2.6 katlık bir artış; yüksek insülin ve yüksek glukoz ile birlikte kullanılan yüksek insülinin ise sırasıyla 6 kat ve 6.3 katlık artışlar sağladığı gösterilmiştir.

4.3 Yüksek Glukoz ve İnsülin Uyarımında c-Met-IR İlişkili Anahtar Moleküllerin İncelenmesi

HCC'de c-Met'in aktivasyonu ile fosforile olan ve proliferasyon, invazyon gibi hücrel cevapları kontrol eden anahtar moleküllerden Erk 1/2, Akt ve STAT3 aktivasyonları western blot yöntemi ile zaman bağımlı olarak incelenmiştir (**Şekil 14**).



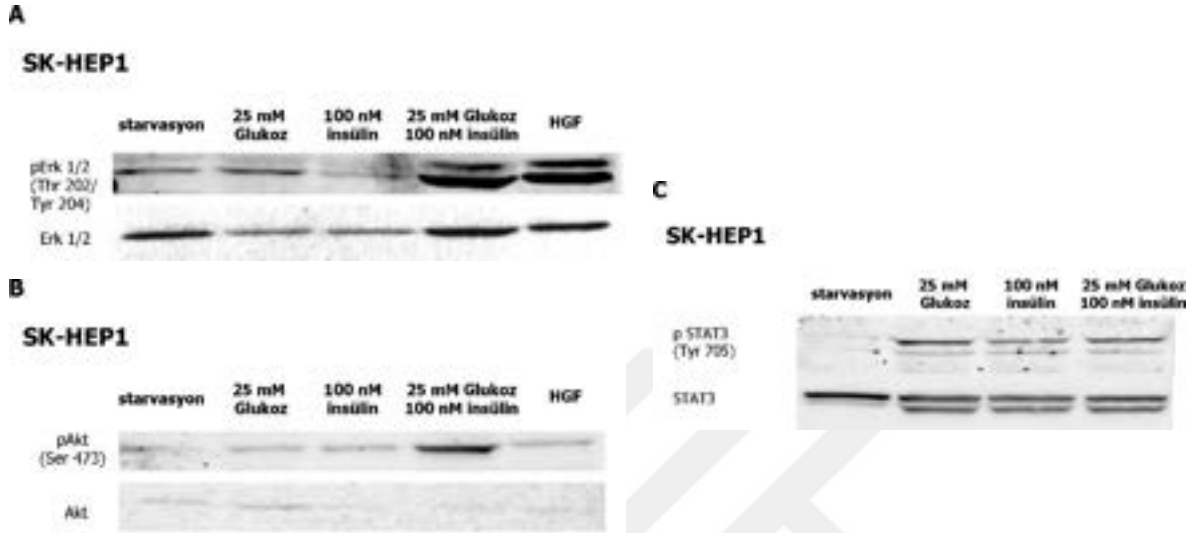
Şekil 14. Erk 1/2 ve Akt proteinlerinin yüksek glukoz uygulaması sonrası zaman bağımlı aktivasyonunun western blot yöntemi ile analizi.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre hücre migrasyonu ve invazyonu ile ilişkili Erk aktivasyonu özellikle c-Met'in aktivasyonu ile paralel şekilde 8 saatlik yüksek glukoz inkübasyonu ile artarken, özellikle 12 ve 16 saatlik uygulamalarda en yüksek değerlerine ulaşmıştır. Sağkalım ve hücre metabolizması ile ilişkili Akt proteini incelendiğinde dalgasal aktivasyon gösterdiği, yine 16 saatlik uygulamada yüksek düzeyde fosforillendiği ve aktive olduğu belirlenmiştir.

Yüksek glukoz ve yüksek insülin uygulamalarının ayrı ayrı ya da birlikte yapılmasının etkilerini karşılaştırmak amacıyla lizatlarda Erk 1/2, Akt ve STAT3 fosforilasyonları aynı blot üzerinde incelenmiştir (**Şekil 15**). Ayrıca pozitif kontrol olarak c-Met'in ligandı HGF'in (2 saat, 10 ng/μl) uygulandığı lizatlarda da aktivasyon incelemesi yapılmıştır.

Western blot sonuçlarına göre yüksek glukoz ve/veya insülin uygulaması ile, ayrıca pozitif kontrol olarak kullanılan HGF uygulaması ile artmaktadır (**Şekil 15A**). Yüksek glukoz ve insülinin birlikte kullanılması, Erk fosforlanmasını HGF kadar yüksek düzeyde uyarmaktadır. Akt ise en yüksek aktivasyon düzeyine, yüksek glukoz ve yüksek insülin birlikte uygulandığında ulaşmaktadır (**Şekil 15B**). Önceki çalışmalarımız HGF'in etkisini Erk yolağını uyararak ve Akt yolağında yüksek aktivasyon yapmadan gerçekleştirdiğini göstermektedir. Uyumlu şekilde HGF uygulaması sonucu Akt aktivasyonu düşüktür.

c-Met'in altında yer alan ve biyolojik yanıtlarla ilişkili bir diğer mekanizma STAT3 aktivasyonudur. Tüm uygulamalar sonucu, starvasyona göre STAT3'ün aktivasyonu ile ilişkili fosforilasyonunun arttığı belirlenmiştir (**Şekil 15C**). Uygulamalar arasında anlamlı bir artış farkı belirlenmemiştir.



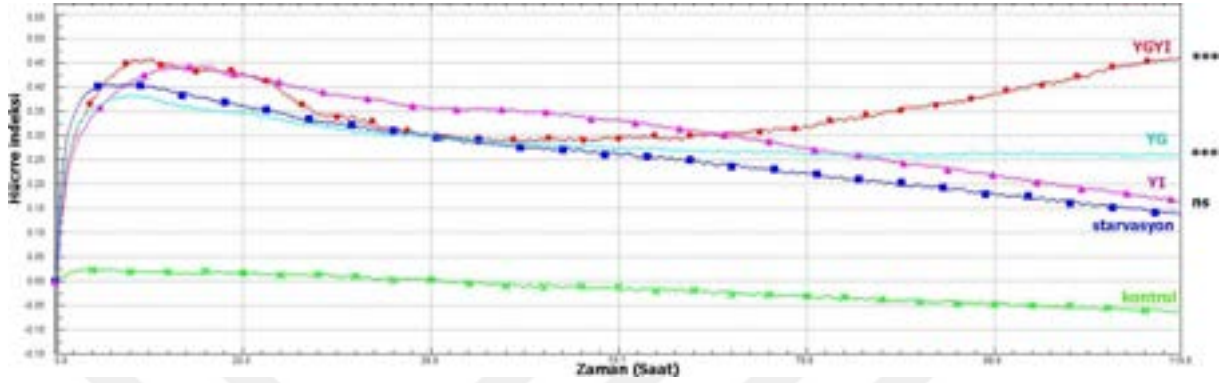
Şekil 15. Yüksek glukoz ve yüksek insülinin ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının Erk, Akt ve STAT3 aktivasyonlarına etkisinin karşılaştırılması.

4.4 Yüksek Glukoz ve Yüksek İnsülinin Ayrı Ayrı veya Birlikte Uygulanmasının HCC Hücrelerinin Proliferasyon, Motilite ve Metastaz Kapasiteleri Üzerine Etkisinin Karşılaştırılması

Yüksek glukoz/insülin ile aktive olduğu belirlenen Erk, Akt ve STAT3 yolları ile ilişkili biyolojik yanıtlardan proliferasyon, motilite ve metastaz oluşumu incelenmiştir ve uygulamalar arasında fark olup olmadığı karşılaştırılmıştır.

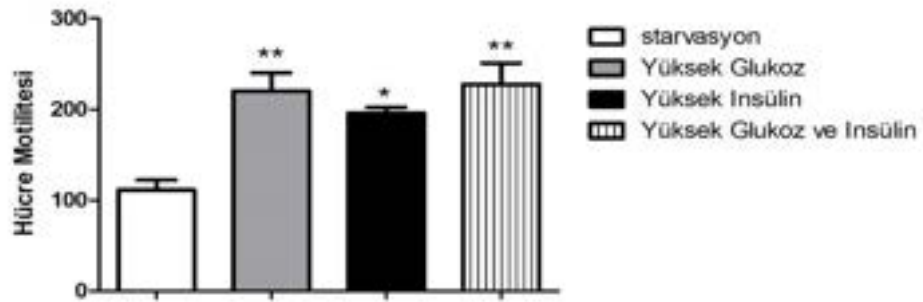
Proliferasyon kapasitesini incelemek için xCELLigence yöntemi kullanılmıştır. Hücreler xCELLigence plakaları üzerinde 96 saat boyunca büyütülmüş ve gerçek zamanlı hücre indeksi ölçümleri alınmıştır (**Şekil 16**). Hücrelerin büyüme trendi slope analizi yöntemi ile değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen analizler sonucunda en yüksek proliferasyon kapasitesine, yüksek glukoz-yüksek insülin ile inkübe edilen hücrelerin sahip olduğu belirlenmiştir. Açlık grubuna göre yapılan değerlendirmede yüksek glukoz-yüksek insülin uygulaması ve yüksek glukoz uygulaması proliferasyonu anlamlı oranda

arttırmaktadır ($***p \leq 0.001$). Yüksek glukoz-yüksek insülin uygulaması da diğer tüm gruplara göre anlamlı ölçüde yüksek proliferasyona sebep olmaktadır ($***p \leq 0.001$). Yüksek insülinin ise tek başına hücre proliferasyonu üzerine anlamlı bir etkisi bulunmamaktadır.



Şekil 16. Yüksek glukoz ve/veya insülin uygulamalarının hücre proliferasyonu üzerine etkisi. (Yüksek glukoz- YG, Yüksek insülin- Yİ, Yüksek glukoz ve Yüksek insülin-YGYİ)

Daha sonra bu koşulların, özellikle Erk üzerinden yönetilen hücre motilitesi üzerine etkisi Boyden Chamber yöntemi ile belirlenmiştir. Motilite özelliği kazanarak insertlerden geçen hücreler sayılmış ve yüzdesel olarak starvasyon koşulları ile karşılaştırılmıştır (**Şekil 17**). Bu analizlere göre her üç uygulama da HCC motilitesini anlamlı oranda arttırmaktadır. Starvasyona oranla hücre motilitesi yüksek glukoz ile 1.98 kat ($**p \leq 0.01$); yüksek insülin ile 1.75 kat ($*p \leq 0.05$); yüksek glukoz-insülin ile 2.04 kat ($**p \leq 0.01$) artmıştır.



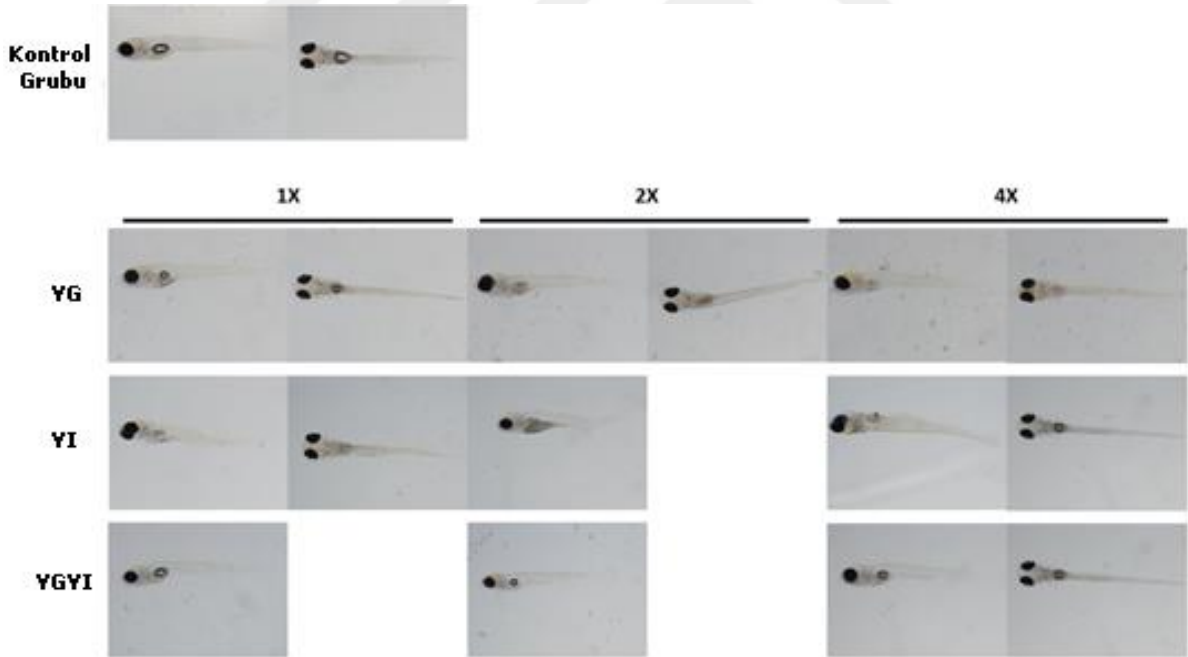
Şekil 17. Yüksek glukoz ve/veya insülin uygulamalarının hücre motilitesi üzerine etkisi.

Bu biyolojik yanıtlar değerlendirildiğinde, en etkili uygulamanın olarak yüksek glukoz-yüksek insülin uygulaması olduğu belirlenmiştir. Yüksek glukoz-yüksek insülin

uygulamasının hücrelerin metastaz yetenekleri üzerine etkisini karşılaştırmak için zebrabalığı zenograft modeli kullanılmıştır.

Yüksek glukoz ve insülinin etkileri önce hücre kültüründe hücreleri 16 saat boyunca maruz bırakarak oluşturulmuştur. Zebrabalığı enjeksiyonundan sonra da bu etkilerin devamlılığını sağlamak için zebrabalığı larvaları, enjeksiyon sonrası yüksek glukoz ve/veya insülin koşullarında tutulmuştur.

Balıkların inkübe edildiği koşulları optimize etmek için yüksek glukoz-insülin uygulamalarının zebrabalığı larvalarına fizyolojik etkisi belirlenmiştir (**Şekil 18**). Zebrabalığı larvalarının inkübasyon ortamları sırasıyla 25 mM (1X), 50 mM (2X) ve 100 mM (4X) glukoz solüsyonu ile; 100 nM (1X), 200 nM (2X) ve 400 nM (4X) insülin solüsyonu ile; 25 mM glukoz-100 nM insülin (1X), 50 mM glukoz-200 nM insülin (2X) ve 100 mM glukoz-400 nM insülin (4X) içeren E3 ortamıdır. Bu ortamlarda inkübasyon 6 gün boyunca devam etmiştir. Altıncı günün sonunda zebrabalığı larvalarının gelişimsel ve davranışsal durumlarını analiz edilmiştir.

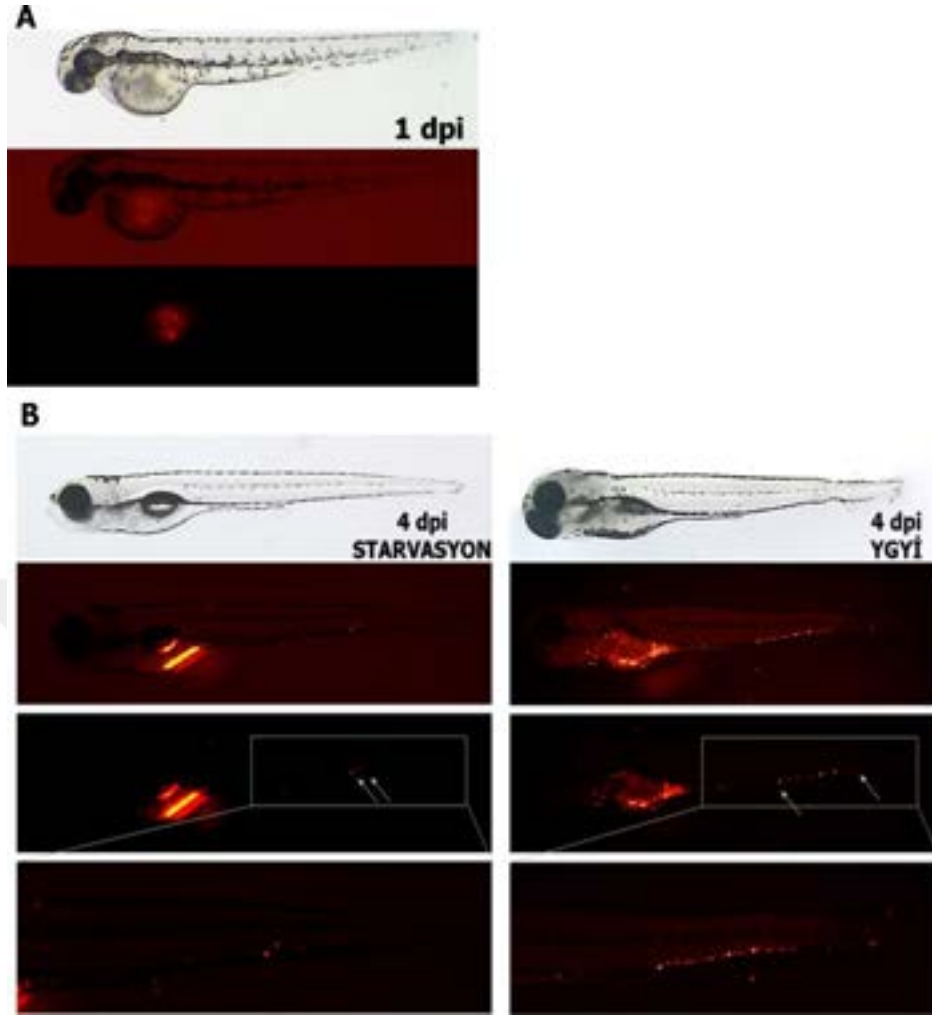


Şekil 18. Zebrabalığı larvalarının çeşitli konsantrasyonlarda yüksek glukoz (YG) ve/veya yüksek insülin (YI) ortamlarında gelişimlerinin incelenmesi.

Sadece E3 ortamında inkübe edilen starvasyon kontrol grubunda larvalar gelişimlerini normal fizyolojide sürdürürken, özellikle yüksek glukoz (50-100 mM) ve

yüksek insülinin (200-400 nM) tek başına uygulanmasının larvalarda ciddi davranışsal ve gelişimsel bozukluklara yol açtığı belirlenmiştir. Bu bozukluklar başta kardiyak aritmi, vücut ve yüzgeçte eğrilik, dokunmaya duyarlılık olmuştur. 25 mM glukoz-100 nM insülin içeren E3 ortamında büyüyen balıkların ise kontrol grubuna en yakın fizyolojiye sahip balıklar olduğu gözlemlenmiştir. Bu sebeple zenograft deneylerinde bu koşulların kullanılması uygun görülmüştür.

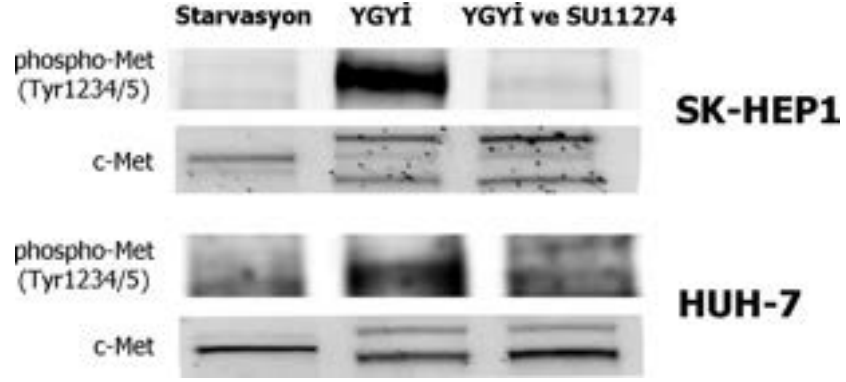
Hücre kültüründe yüksek glukoz ve yüksek insülin ile muamele edilen ve floresan Dil boyası ile işaretlenmiş HUH-7 hücreleri daha sonra zebrabalığı larvalarına enjekte edilmiş ve ertesi gün floresan mikroskopta ayıklama işleminden sonra larvalar E3 ortamına ya da yüksek glukoz-yüksek insülin ortamına alınmıştır. Enjeksiyondan 4 gün sonra deney sonlandırılmış ve balıklarda kuyruğa metastaz yapan hücreler floresan mikroskop ile görüntülenmiştir (**Şekil 19**). Metastaz yapan balıklar sayıldığında starvasyon koşullarında metastaz oranı %8'i iken, YGYİ koşullarında metastaz oranı %18'dir. YGYİ koşullarında metastaz yapan balıkların %90'ında 20 ve üzeri hücre sayılmıştır, metastaz yapan hücre sayısı oldukça fazladır. Starvasyon koşullarında ise metastaz görülen balıkların %66'sında 20 ve üzeri hücre metastazı görülmüştür.



Şekil 19. Zebrabalığı zenograft modelinde yüksek glukoz-yüksek insülin uygulamasının HCC hücrelerinin metastaz kapasitesine etkisinin belirlenmesi.

4.5. Yüksek Glukoz-Yüksek İnsülin Koşullarında c-Met İnhibisyonunun Etkisi

Yüksek glukoz ve yüksek insülin uygulamalarının HCC hücreleri üzerindeki etkisi belirlendikten sonra bu etkilerin c-Met inhibisyonundan ne kadar etkilendiği ve geri döndürülüp döndürülemeyeceğini araştırmak amacıyla c-Met inhibitörü SU11274 uygulaması yapılmıştır. Öncelikle inhibitörün YGYİ tarafından oluşturulan c-Met aktivasyonunu baskılama yeteneği western blot ve immünfloresan yöntemler ile belirlenmiştir (**Şekil 20-21**).

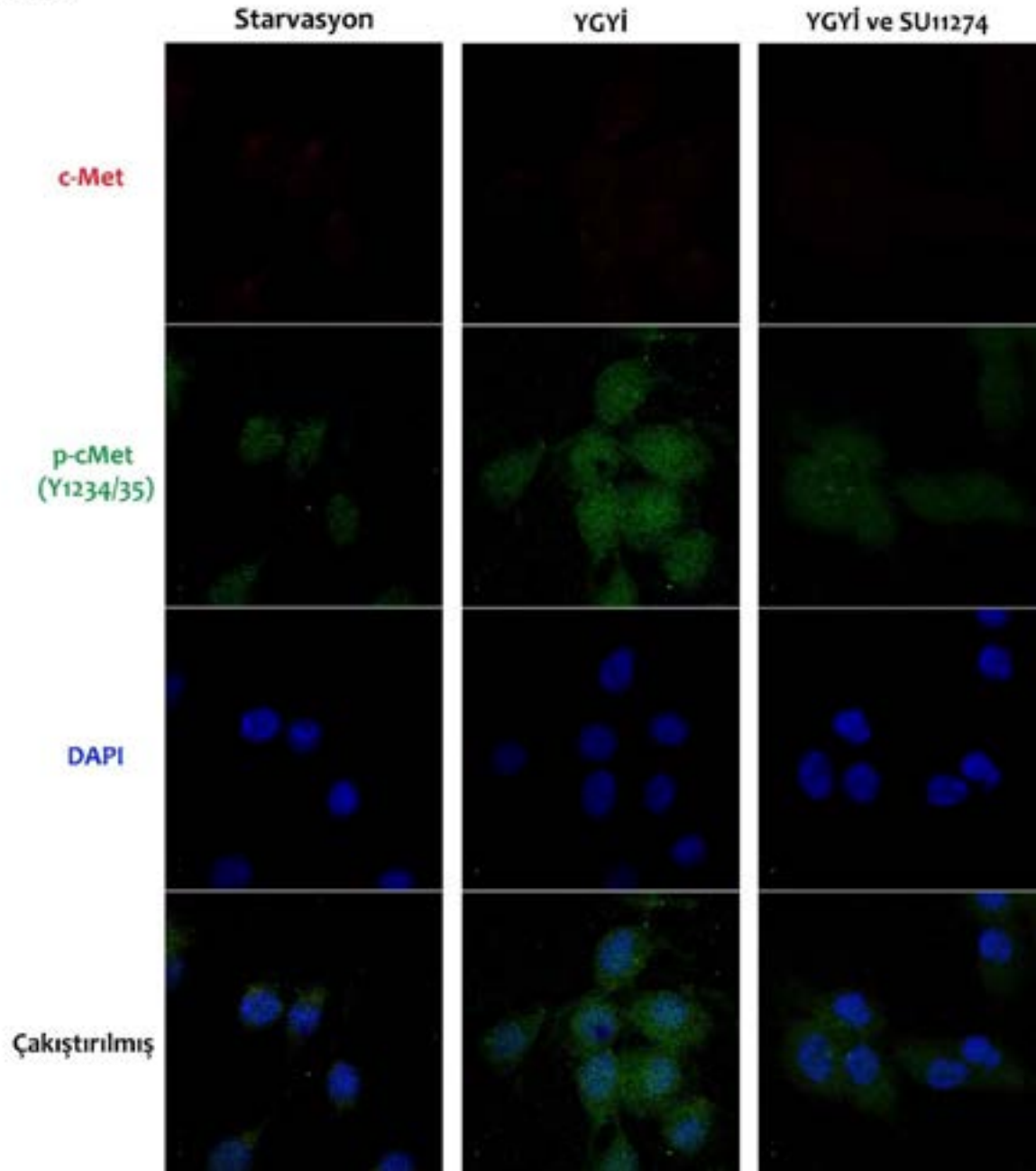


Şekil 20. SU11274 uygulamasının YGYİ tarafından oluşturulan c-Met aktivasyonuna etkisinin western blot yöntemi ile analizi.

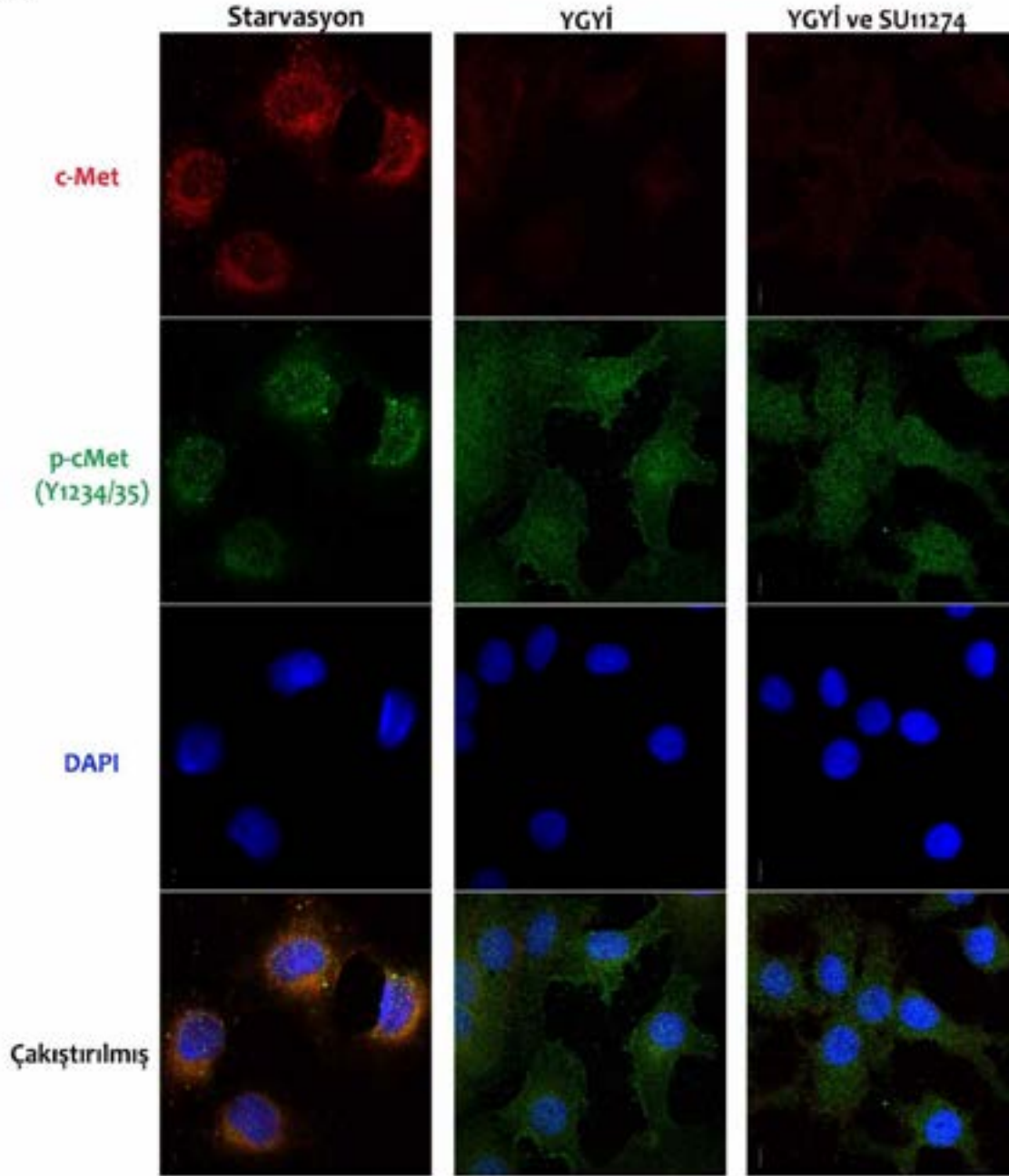
Ayrıca c-Met inhibitörünün c-Met'e spesifik olduğunu ve IR aktivasyonu üzerine etkisinin bulunmadığını belirlemek için IR aktive edici fosforilasyonları da western blot ve immüno Floresan görüntüleme yöntemleri ile incelenmiştir (**Şekil 22-23**). IR aktivasyonunu belirlemek için otofosforilasyon bölgelerinden olan 1345. tirozin amino asidinin fosforillenmesi incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre; 1000 nM SU11274 uygulaması sonucu c-Met aktivasyonu belirgin oranda düşmektedir ve starvasyon koşullarına yaklaşmaktadır. Ayrıca hücre içinde membran lokalizasyonu da azalırken sitoplazmik lokalizasyonu artmaktadır. SU11274'ün IR aktivasyonu üzerine ise herhangi bir etkisi belirlenmemiştir. IR, 16 saatlik yüksek glukoz ve yüksek insülin uygulaması ile aktive olurken SU11274 uygulamasından etkilenmemiştir. Yüksek glukoz ve insülin uygulaması ile starvasyona kıyasla hücre membranında phospho-IR (Tyr-1345) lokalizasyonu belirgin biçimde artmaktadır. SU11274 ise bu aktivasyonu etkilememektedir.

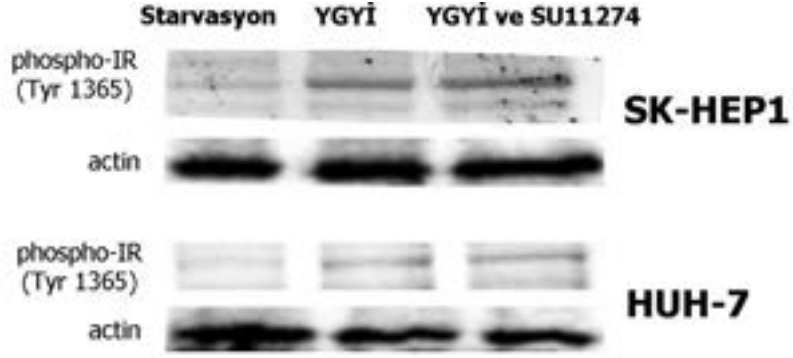
A
SK-HEP1



B
HUH7



Şekil 21. SU11274 uygulamasının YGYİ tarafından oluşturulan c-Met aktivasyonuna etkisinin immünfloresan görüntüleme yöntemi ile SK-Hep1 **(A)** ve HuH-7 **(B)** hücrelerinde analizi.

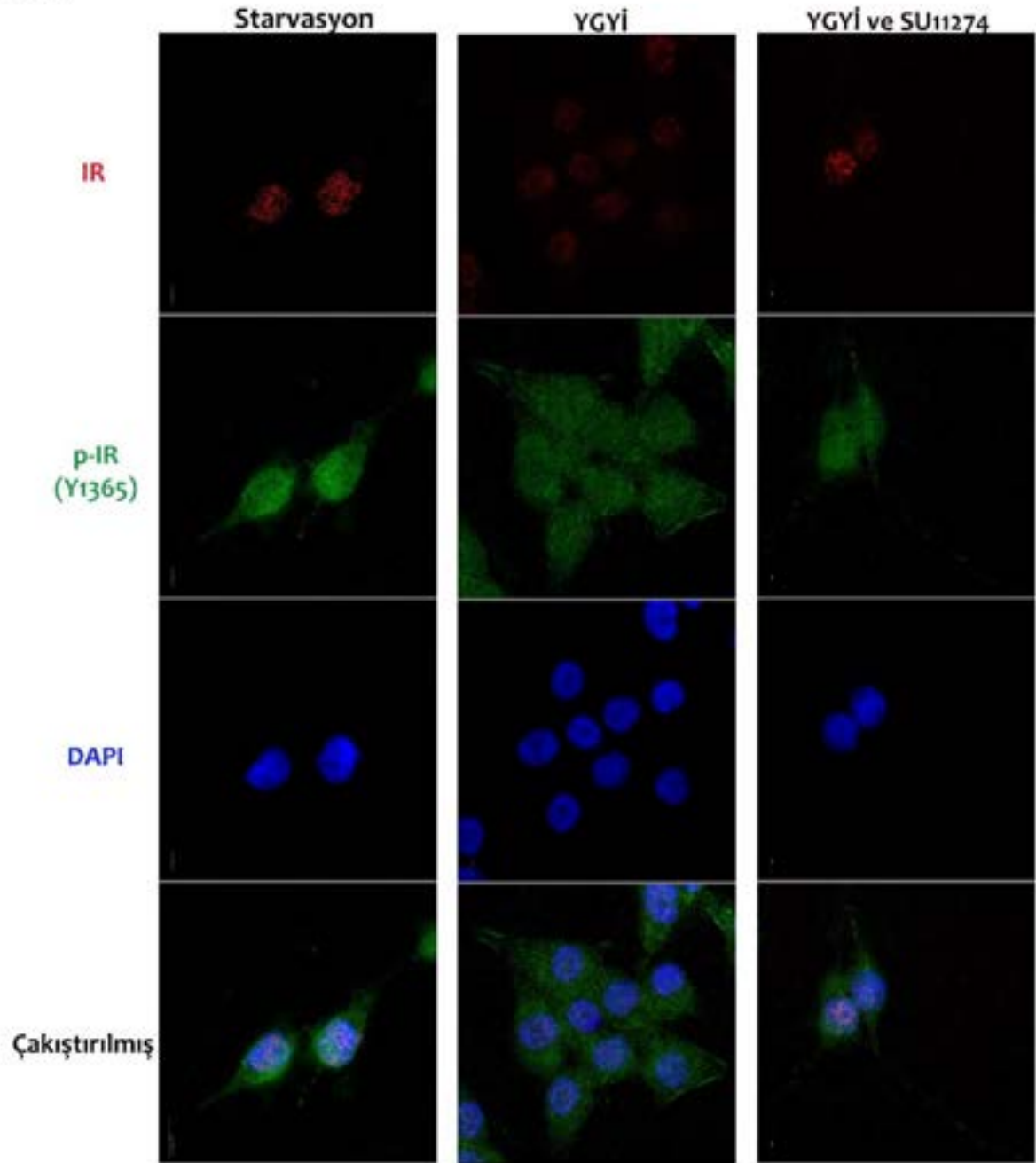


Şekil 22. SU11274 uygulamasının YGYİ tarafından oluşturulan IR aktivasyonuna etkisinin western blot yöntemi ile analizi.

SU11274'ün YGYİ koşulları tarafından sağlanan c-Met-IR etkileşiminde rol oynayıp oynamadığının, diğer bir deyişle c-Met aktivasyonunun heterodimerizasyondaki etkisinin belirlenmesi amacıyla IR- β antikoru kullanılarak IR çöktürülmüştür. Elde edilen kompleks western blot yöntemi ile incelendiğinde, önceki veri konfirme edilmiştir (**Şekil 24**). c-Met ve IR yüksek glukoz ve insülin varlığında etkileşirken, SU11274'ün varlığı bu etkileşimi bozmamaktadır. YGYİ koşullarında ya da YGYİ ile birlikte SU11274 uygulandığında c-Met ve IR etkileşimi yüksek düzeyde gerçekleşmektedir.

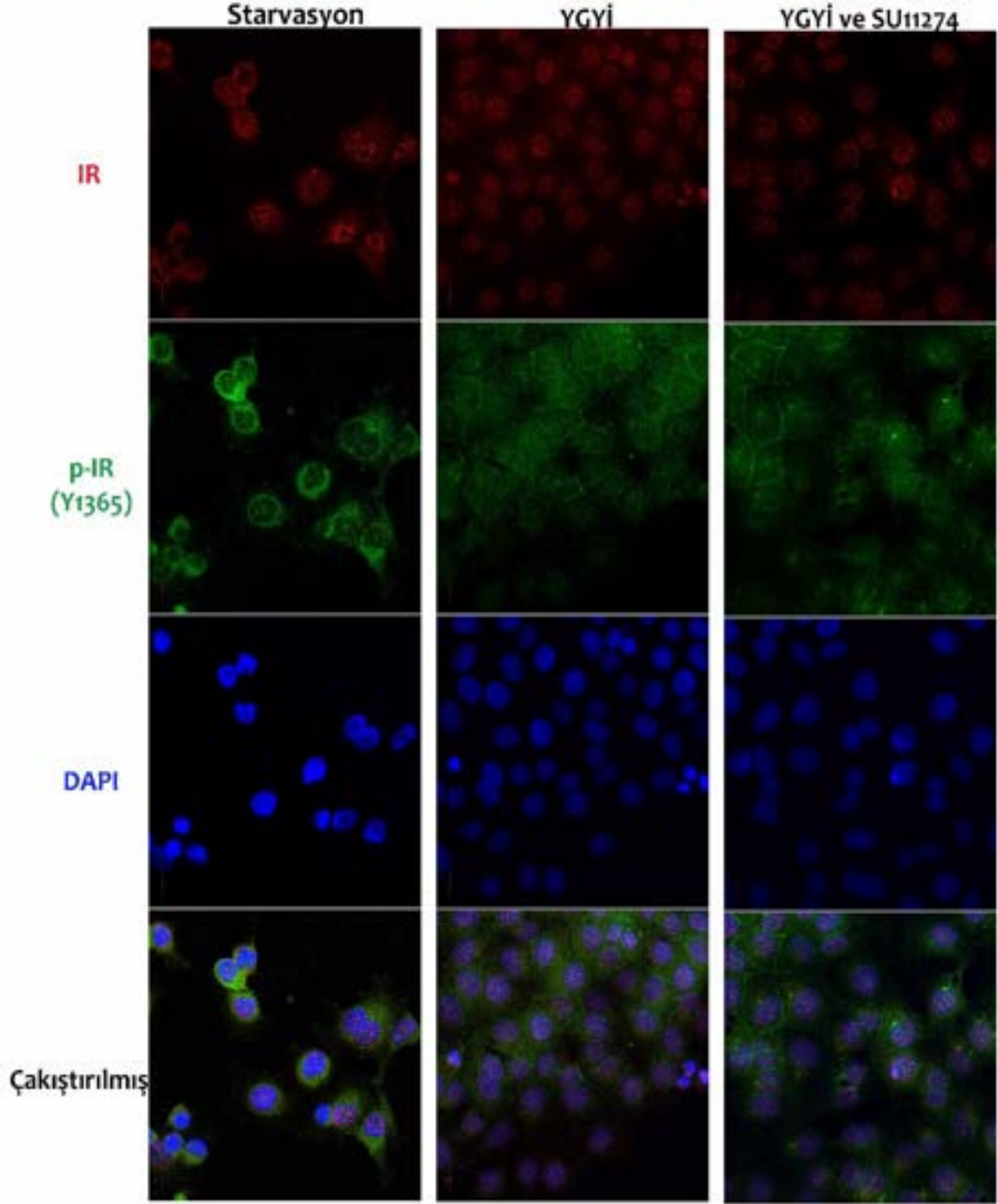
A

SK-HEP1

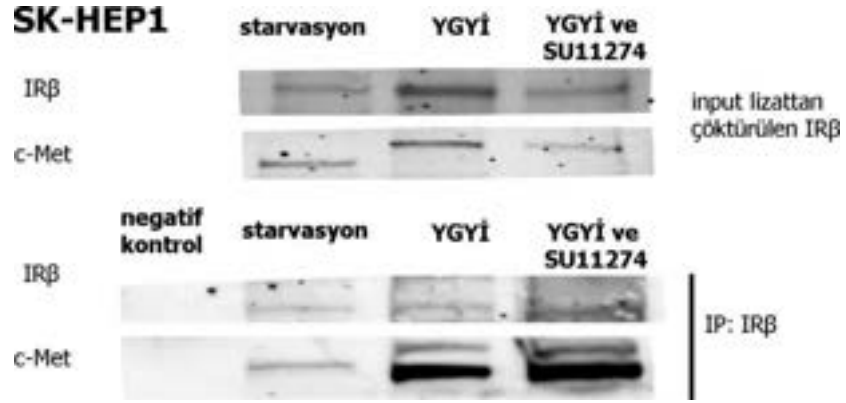


B

HUH7



Şekil 23. SU11274 uygulamasının YGYİ tarafından oluşturulan IR aktivasyonuna etkisinin immünfloresan görüntüleme yöntemi ile SK-Hep1 **(A)** ve HuH-7 **(B)** hücrelerinde analizi.

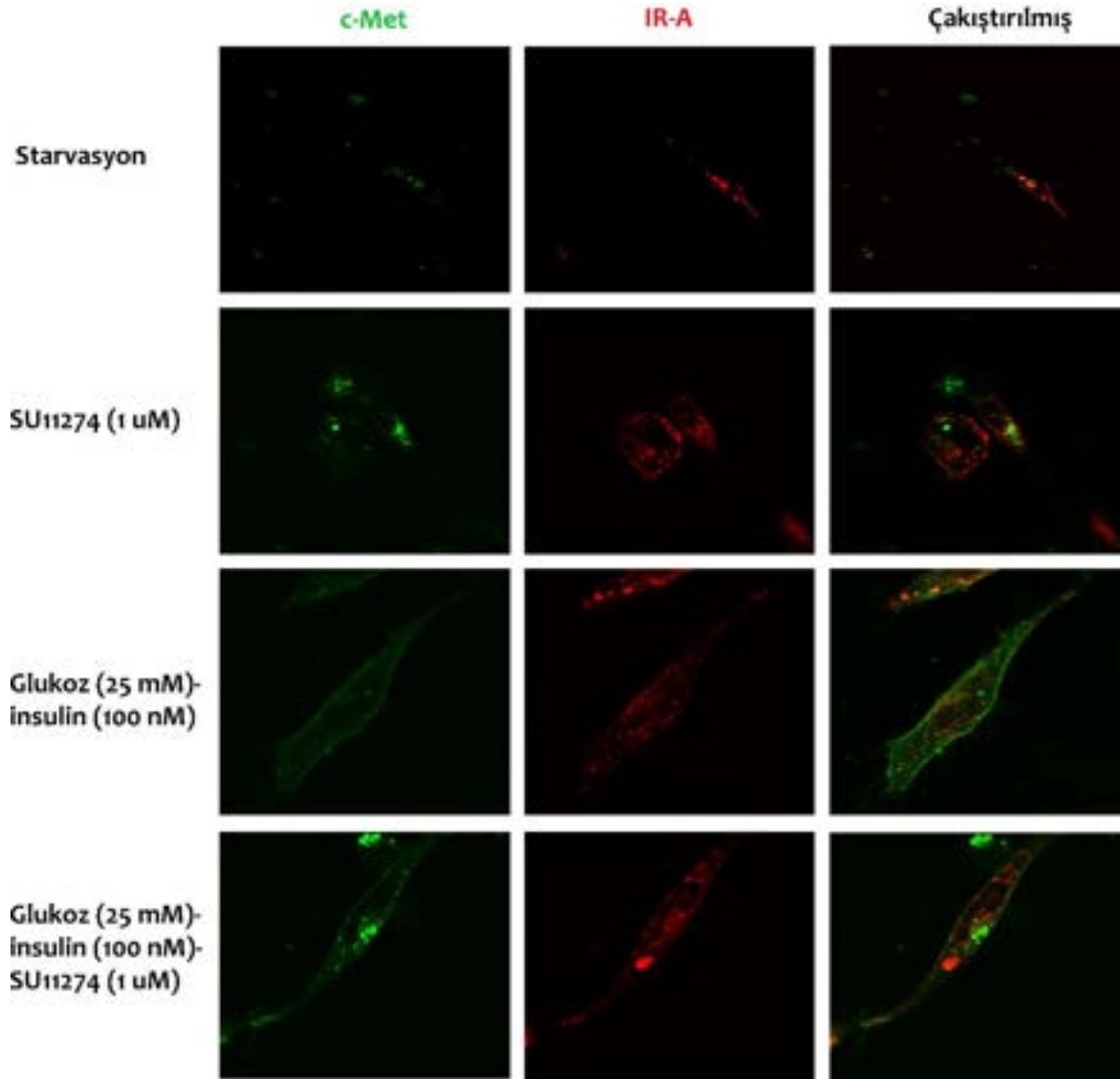


Şekil 24. c-Met inhibitörünün yüksek glukoz ve insülin varlığında gerçekleşen c-Met-IR etkileşimine etkisinin incelenmesi.

İnsülin reseptörünü ve c-Met'i, yüksek glukoz ve insülin uygulaması yapılmış hücrelerde canlı görüntülemek ve birlikte lokalizasyonu detaylı olarak konfokal mikroskopta gözlemlemek amacıyla floresan işaretli proteinler kullanılmıştır. Bu amaçla kırmızı floresan işaret (Tomato tag) taşıyan insülin reseptörü izoform A (IR-A) vektörü ve GFP işaret taşıyan c-Met vektörü SK-Hep1 hücrelerine geçici olarak transfekte edilmiştir. Hücreler starvasyona alınırken lipozom içine alınmış plazmid DNA'sı ile transfekte edilmiş, 24 saatlik serum starvasyonunun ardından yüksek glukoz ve insülin uygulaması yapılmıştır ve bu aşamada c-Met/IR-A proteinlerini eksprese eden hücreler konfokal mikroskopta canlı olarak görüntülenmiştir (**Şekil 25**). Bu deneyde c-Met inhibitörünün etkisini belirlemek amacıyla hücreler c-Met inhibitörü SU11274 ile starvasyon sırasında muamele edilmiştir.

Bu deneyin sonuçlarına göre starvasyona kıyasla yüksek glukoz ve insülin uygulaması sonucunda c-Met ve IR ekspresyonları ve membranda lokalizasyonları artmaktadır. c-Met inhibitörünün uygulandığı durumlarda ise özellikle c-Met'in membranda lokalize olmadığı, hücre içi kompartmanlarda lokalize olduğu gözlenmiştir.

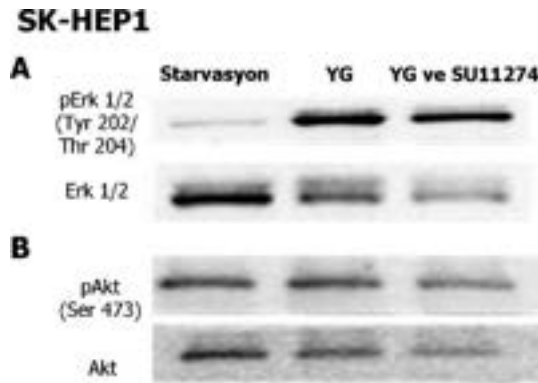
c-Met ve IR'nün yüksek glukoz ve insülin uygulamaları sonucu membranda birlikte lokalize olduğu görülmektedir ve bu birliktelik inhibitör uygulaması ile önlenmektedir.



Şekil 25. Floresan işaretli Tomato-IR-A ve GFP-c-Met'in canlı hücre görüntülemesi ile takip edilmesi.

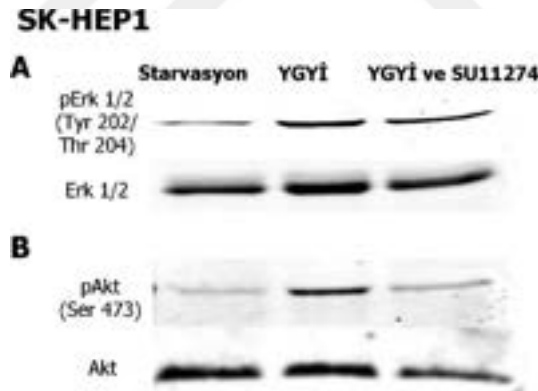
SU11274'ün, yüksek glukoz ve insülin uygulaması sonucunda gerçekleşen anahtar moleküllerin aktivasyonuna etkisini belirlemek için, bu moleküllerin aktivasyonları inhibitör varlığında incelenmiştir. SK-Hep1 ve HUH-7 hücrelerine uygulanan 16 saatlik YG (**Şekil 26**) ya da YGYİ (**Şekil 27**) sonrasında elde edilen lizatlardan pErk 1/2 ve pAkt aktivasyonları incelenmiştir.

Western blot sonuçlarına göre uygulanan 1000 nM SU11274, YG ile aktive olan Erk ve Akt fosforilasyonunu geri döndürmede anlamlı bir fark göstermemiştir.



Şekil 26. c-Met inhibitörünün yüksek glukoz ve insülin uygulaması ile aktive olan Erk ve Akt fosforilasyonu üzerine etkisi.

Yüksek glukoz ve insülin uyarımı ile aktive olan Erk 1/2 ve Akt fosforilasyonlarının SU11274 uygulaması ile azaldığı saptanmıştır. Böylece c-Met'in, YGYİ uygulaması sonucu Erk ve Akt aktivasyonları üzerinden gerçekleşen biyolojik yanıtlar üzerine etkisinin, SU11274 kullanılarak baskılanabileceği belirlenmiştir.



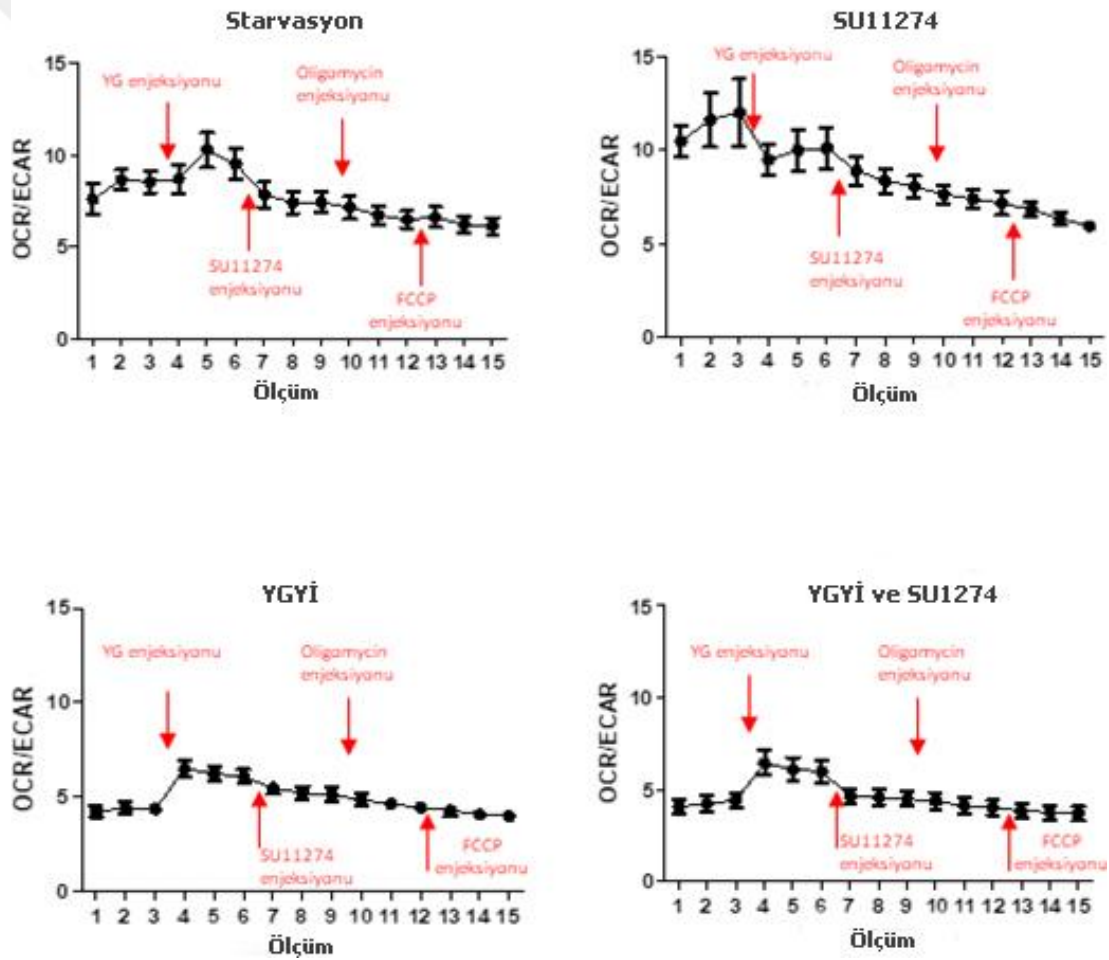
Şekil 27. c-Met inhibitörünün yüksek glukoz uygulaması ile aktive olan Erk ve Akt fosforilasyonu üzerine etkisi.

4.6. Yüksek Glukoz-Yüksek İnsülin Koşullarında c-Met Aktivasyonu ve İnhibisyonunun HCC Hücre Metabolizması Üzerine Etkisi

Uzun süreli yüksek glukoz-yüksek insülin uygulamasının HCC metabolizması üzerine etkisini ve bu etkinin c-Met inhibitörü SU11274 uygulaması ile değişip

değişmediğini belirlemek amacıyla Seahorse cihazı kullanılarak hücre metabolizmasının fenotipi analiz edilmiştir (**Şekil 28**).

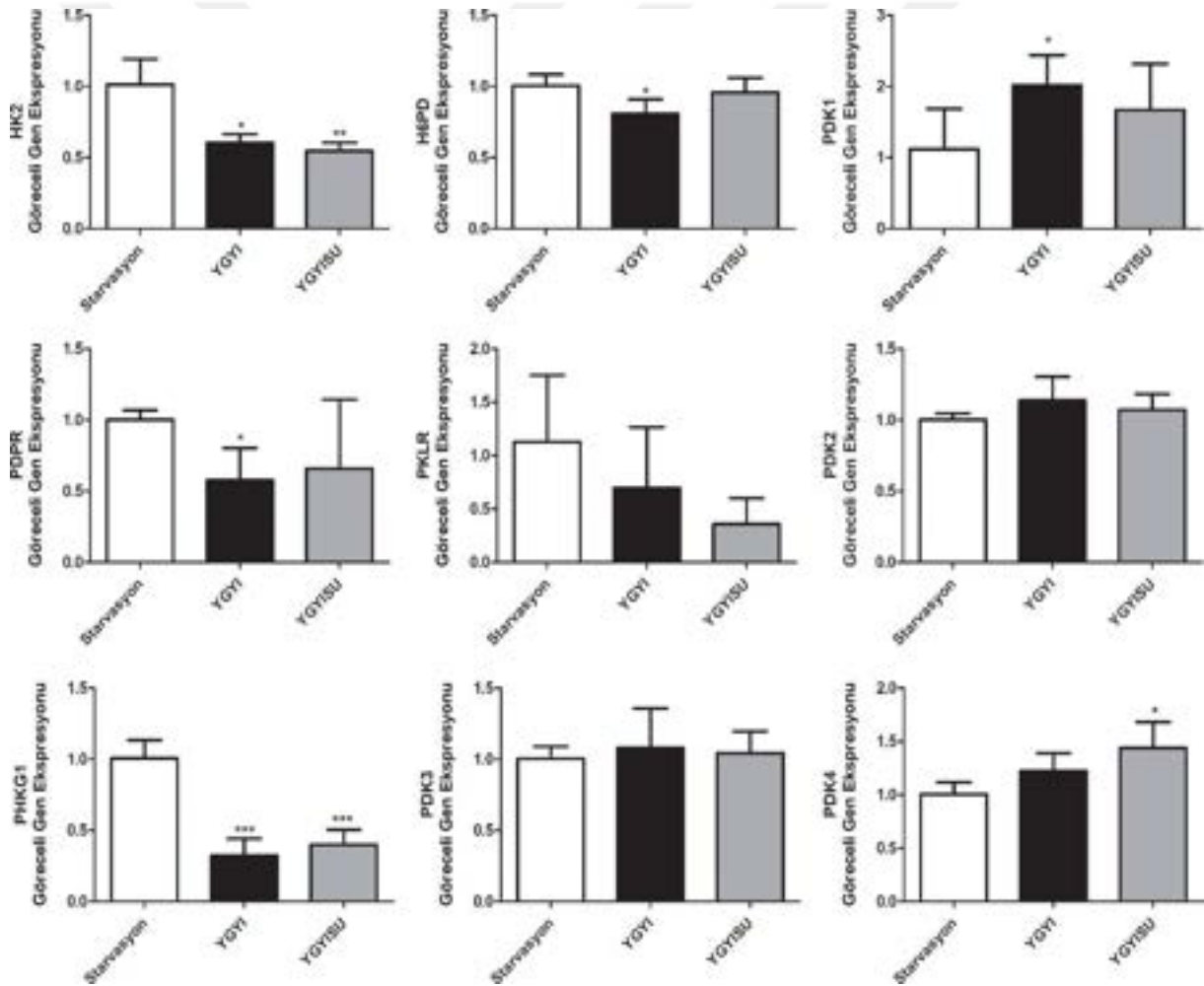
OCR mitokondriyel aktiviteyi ve oksidatif solunum oranını temsil ederken, ECAR glikolitik yolağı temsil etmektedir. OCR/ECAR oranı ne kadar yüksekse hücreler enerji eldesi için mitokondriyi kullanmakta, ne kadar düşüksen hücreler glikolitik yolağı kullanmaktadır ve Warburg etkisi görülmektedir. Bu çalışma kapsamında hücrenin metabolik fenotipi belirlenirken, ayrıca mitokondriyel metabolizmanın etki aşamalarını belirlemek üzere Mitostress deneyi kapsamında oksidatif fosforilasyonda yer alan ATP sentaz inhibitörü "Oligomycin" ve mitokondriyel uncoupler "Trifluoromethoxy carbonylcyanide phenylhydrazone (FCCP)" kullanılmıştır.



Şekil 28. Seahorse deneyi ile YGYİ/SU11274 varlığında mitokondriyel stres yaratılan durumlarda HCC hücre metabolizması analizi.

Elde edilen sonuçlarda ilk üç ölçüm bazal ölçümlerdir. Daha sonra belirtilen port enjeksiyonları gerçekleştirilmiş ve 3'er ölçüm analiz edilmiştir. Tüm uygulamalar göz önüne alındığında, yüksek glukoz ve yüksek insülin uygulaması hücrelerin glikolitik yola kullanımlarını arttırmıştır. Ancak c-Met inhibitörünün bu etkiyi geri döndürmede, uygulanan doz ile, yetersiz kaldığı görülmüştür. Mitokondriyel inhibisyondan en çok etkilenen grup ise yalnızca SU11274 ile uyarılan hücreler olmuştur, oligomycin ve FCCP uygulaması sonunda bazal düzeyin bile altında OCR/ECAR değerleri elde edilmiştir.

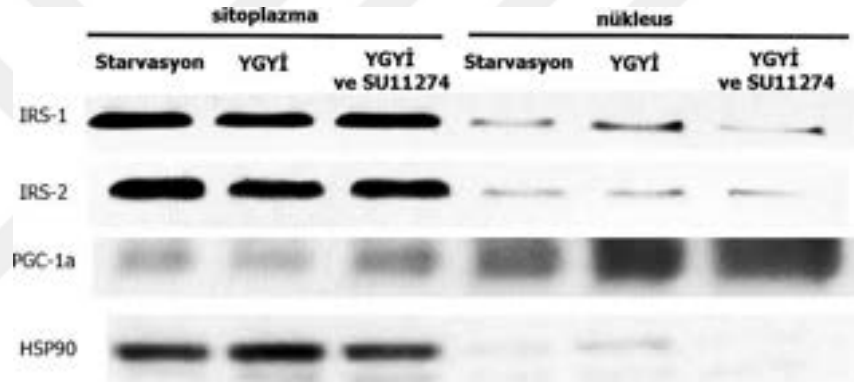
H6PD, *HK2*, *PDPR*, *PHKG1*, *PKLR* ve *PDK 1/2/3/4* gibi glukoz metabolizması ile ilişkili genlerin YGYİ uygulaması ile, veya buna ek olarak SU11274 varlığında ekspresyonları qRT-PCR yöntemi ile incelenmiştir (**Şekil 29**).



Şekil 29. Glukoz metabolizması ile ilişkili genlerin YGYİ uygulaması ile veya YGYİ'e ek olarak SU11274 varlığında ekspresyonlarının katlı değişim grafikleri.

Yapılan analizler sonucunda YGYİ uygulamasına bağlı olarak *HK2* (* $p \leq 0.05$), *PDPR* (* $p \leq 0.05$), *PHKG1* (** $p \leq 0.001$), *H6PD* (* $p \leq 0.05$) anlamlı oranda azalırken; *PDK1* ekspresyonu (* $p \leq 0.05$) ise anlamlı oranda artmıştır.

HCC hücrelerinde c-Met ile ilişkili Warburg etkisini daha iyi tanımlayabilmek için Warburg genleri ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinden olan Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) incelenmiştir. Warburg etkisinde mitokondriyel genlerin ekspresyonundaki değişimin PGC-1 α tarafından gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğini belirlemek amacıyla c-Met'in inhibe edildiği koşullarda PGC-1 α , insülin reseptör substratı (IRS)-1 ve IRS-2 düzeyleri incelenmiştir (**Şekil 30**). Bu çalışmada GFP-PGC-1 α eksprese eden viral partiküller ile hepatositlere transdüksiyon sağlanmıştır.

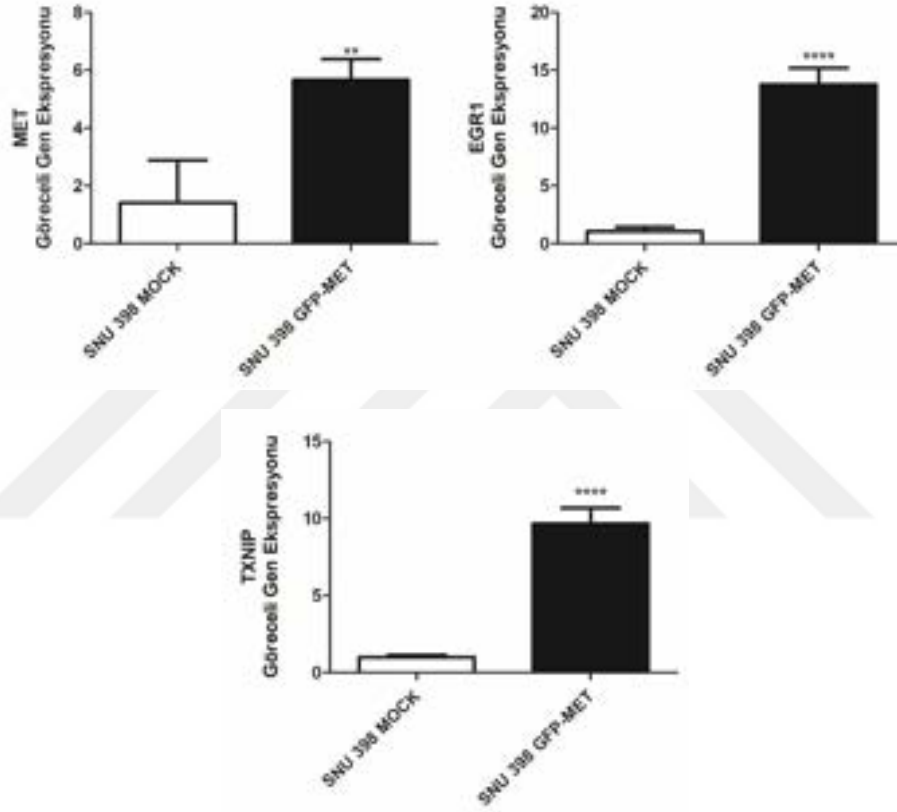


Şekil 30. PGC-1 α 'nın viral olarak indüklendiği hücrelerde starvasyon, yüksek glukoz, yüksek insülin ve c-Met inhibitörü etkisinin incelenmesi.

PGC-1 α ekspresyonunun viral olarak indüklendiği koşullarda hücrelerde yüksek glukoz ve insülin stimülasyonuna bağlı PGC-1 α nükleer lokalizasyonu artmıştır ve bu etki c-Met inhibitörü SU11274 kullanımı ile bir miktar geri döndürülmüştür. Açlığın, yüksek glukoz ve insülinin ya da c-Met inhibitörünün PGC-1 α 'nın sitoplazmik lokalizasyonunda anlamlı bir etkisi saptanmamıştır. HSP-90 sitoplazmik proteini nükleer-sitoplazmik ekstraksiyonun başarılı olduğunu göstermektedir. Sitoplazmada varlığı belirlenmişken, nükleer lizatta çok az miktarda bulunmaktadır.

PGC-1 α 'nın yanında HCC sürecinde hem metabolizma hem de metastaz ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinden *EGR-1* ve *TXNIP* ekspresyonları HCC hücre hatlarında incelenmiştir.

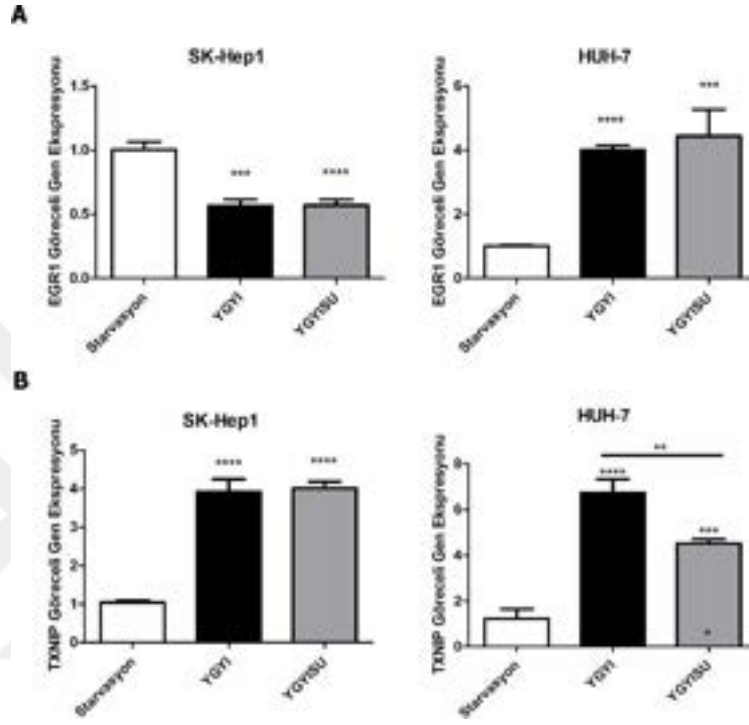
Öncelikle c-Met eksprese eden ve etmeyen hücre klonları kullanarak bazalda *EGR* ve *TXNIP* gen ekspresyonları incelenmiştir (**Şekil 31**). Buna göre oluşturulan SNU-398 hücre klonlarında *MET* gen ekspresyonu bazalda oldukça azken, GFP-MET overeksprese eden klonlarda 6 kat artmıştır. *MET* eksprese eden ve etmeyen hücrelerde *TXNIP* ve *EGR* ekspresyonları incelendiğinde ise her ikisinin de anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür (*EGR* 14 kat, **** $p \leq 0.0001$; *TXNIP* 10 kat, **** $p \leq 0.0001$).



Şekil 31. SNU 398 mock ve GFP-Met overeksprese eden HCC hücrelerinde bazal düzeyde *EGR* ve *TXNIP* gen ekspresyonlarının incelenmesi.

TXNIP ve *EGR* ekspresyonlarının c-Met ile ilişkisi tanımlandıktan sonra YGYİ ve SU11274 uygulamalarının bu gen ekspresyonlarına etkisi incelenmiştir. Bulgularımıza göre *EGR* gen ekspresyonu SK-Hep1 hücrelerinde yüksek glukoz ve insülin uyarımı sonucu starvasyona oranla %45 azalmıştır (*** $p \leq 0.001$). HUH-7 hücrelerinde ise YGYİ uygulaması *EGR* ekspresyonunu 4 kat arttırmıştır (**** $p \leq 0.0001$). Her iki hücrede de c-Met inhibitörü uygulaması, yüksek glukoz ve insülin koşuluna kıyasla, anlamlı bir fark

yaratmamıştır (**Şekil 32A**). SK-Hep1 hücrelerinde *TXNIP* gen ekspresyonu yüksek glukoz ve insülin ile 3.9 kat artarken (**** $p \leq 0.0001$), HUH-7 hücrelerinde 6.7 kat artmaktadır (**** $p \leq 0.0001$) (**Şekil 32B**). 1000 nM c-Met inhibitörü uygulaması SK-Hep1 hücrelerinde yetersiz kalırken, HUH-7 hücrelerinde YGYİ'e bağlı *TXNIP* ekspresyonunu anlamlı oranda düşürmüştür (** $p \leq 0.01$).



Şekil 32. HCC hücrelerinde starvasyon, yüksek glukoz-yüksek insülin (YGYİ) ve c-Met inhibitörü uygulamalarının *EGR* (A) ve *TXNIP* (B) gen ekspresyonları üzerine etkisinin incelenmesi.

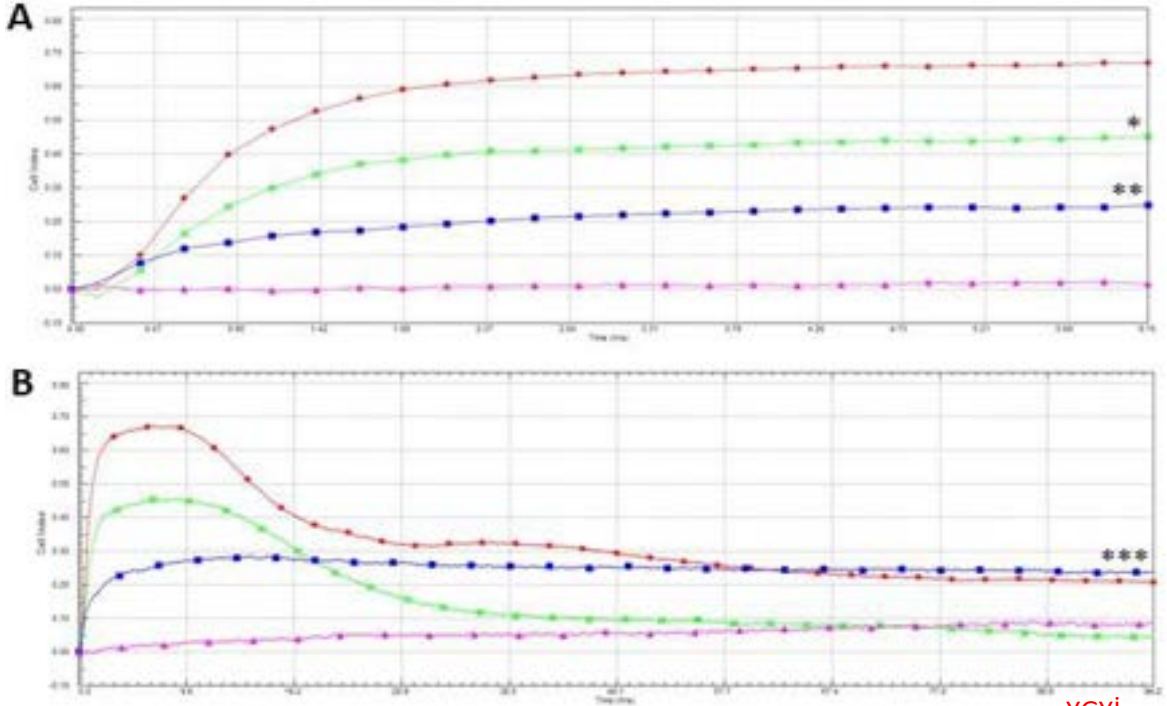
4.7 Yüksek Glukoz ve İnsülin Uyarımının c-Met Aktivasyonu Aracılıklı Hücre Biyolojik Yanıtlarına Etkisinin Belirlenmesi

4.7.1. Yüksek Glukoz ve İnsülin Uyarımının HCC Hücre Adezyonu ve Proliferasyonu Üzerine Etkisi

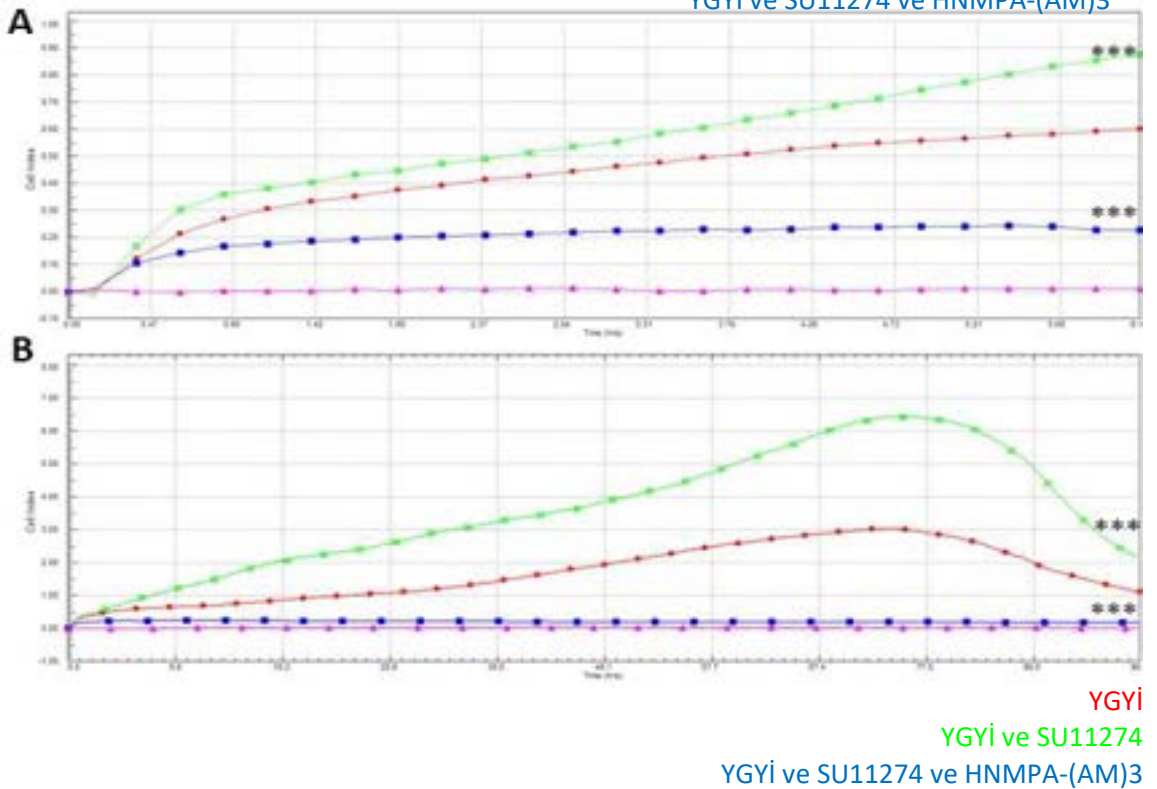
Yüksek glukoz ve insülin uyarımlarının hücre proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi kullanılmıştır. Hücrelerin yüzey ile temasının yarattığı elektriksel değişimin ölçülmesi sonucu cell-index değerleri her 15 dakikada bir ölçülmüştür. Hücrelerin proliferasyon trendlerini

karşılaştırmak amacıyla eğim analizi yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen proliferasyon grafikleri Şekil 33'te sırasıyla SK-Hep1 adezyon, SK-Hep1 proliferasyon, HUH-7 adezyon ve HUH-7 proliferasyon grafikleri olarak verilmiştir (**Şekil 33**).

SK-Hep1



HUH-7

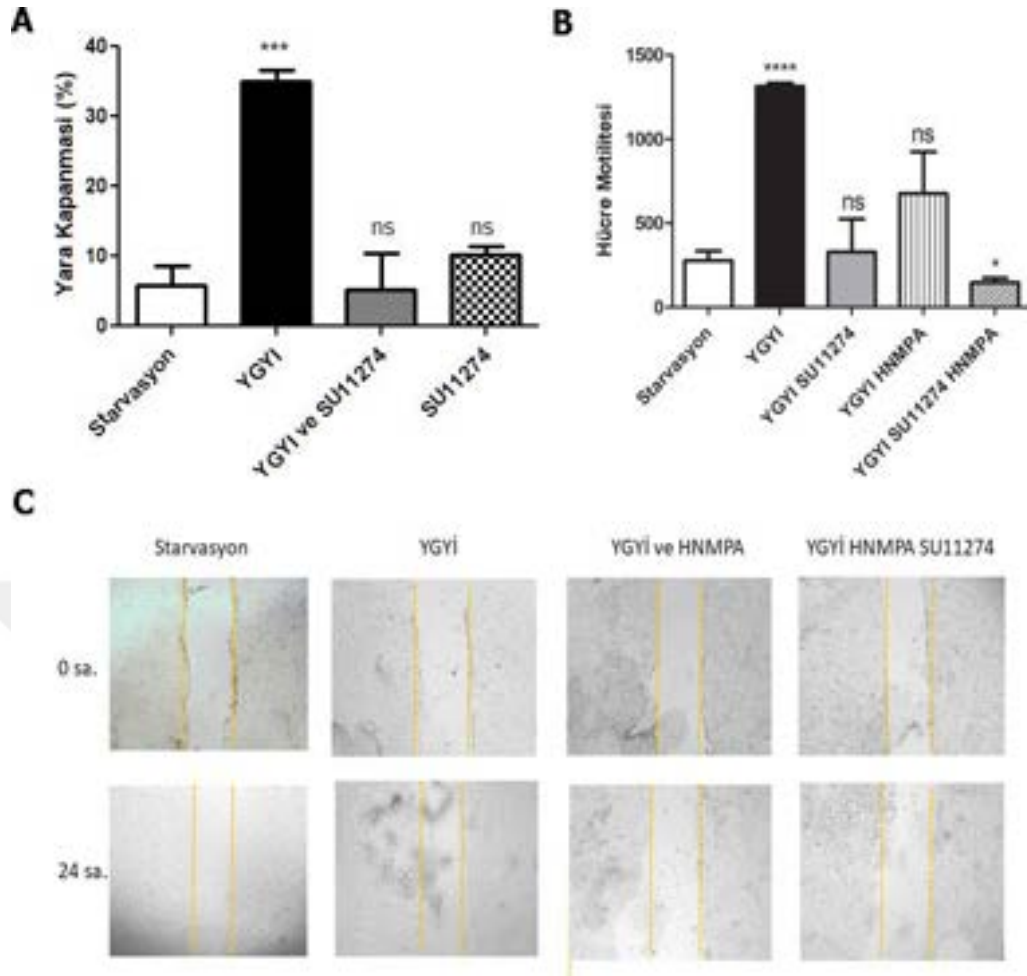


Şekil 33. YGYİ'nin tek başına ya da c-Met inhibitörü SU11274 veya IR inhibitörü HNMPA-(AM)3 ile birlikte uygulamasının hücre adezyon (A) ve proliferasyonuna (B) etkisi.

Eğim analizlerinin istatistiksel değerlendirmesi sonucu elde ettiğimiz sonuca göre, SK-Hep1 hücrelerinde c-Met inhibitörü SU11274 kullanımı adezyonu baskılamak için yeterliyken, proliferasyonu anlamlı miktarda baskılamak için yetersiz kalmıştır. Ancak SU11274'e ilaveten IR inhibitörü HNMPA-(AM)3 kullanımı hem adezyonu hem de proliferasyonu anlamlı düzeyde düşürmüştür. HUH-7 hücrelerinde ise SU11274 kullanımı adezyon ya da proliferasyonu azaltmazken, HNMPA-(AM)3 ile birlikte kullanımı hem hücre adezyonunu hem de hücre proliferasyonunu anlamlı oranda azaltmıştır.

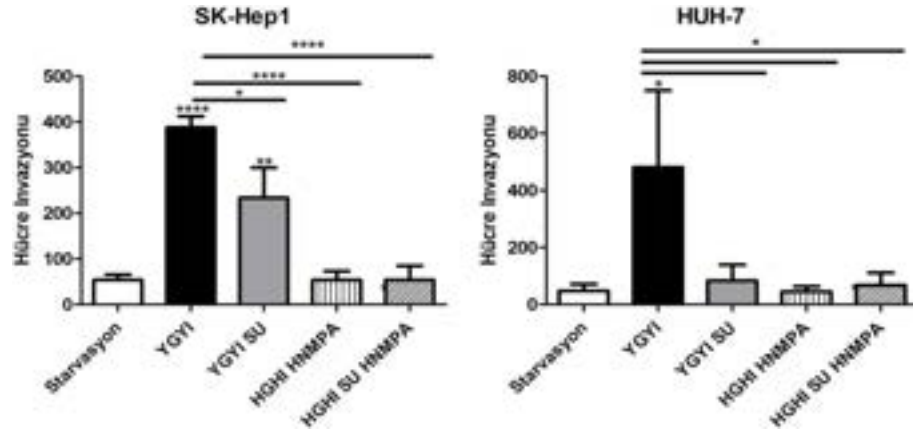
4.7.2. Yüksek Glukoz ve İnsülin Uyarımının HCC Hücre Motilitesi ve İnvazyonu Üzerine Etkisi

Yüksek glukoz ve insülinin hücrelerin motil karakteri üzerine etkisi yara iyileşmesi ve boyden chamber yöntemleri ile incelenmiştir. Yüksek glukoz ve insülinin etkisinin c-Met üzerinden olup olmadığını anlamak için c-Met inhibitörü SU11274 ile c-Met aktivasyonu baskılanmış ve hücrelerin motilite/invazyon yetenekleri karşılaştırılmıştır. HUH-7 hücrelerinde gerçek zamanlı görüntüleme ile yara iyileşmesi takip edilmiştir ve 24 saat sonunda yara kapanması analiz edilmiştir (**Şekil 34A**). Elde edilen sonuçlara göre YGYİ uygulaması hücre motilitesini oldukça anlamlı olarak 5 kat arttırmaktadır (** $p \leq 0.001$). Bu etki c-Met inhibitörü uygulaması ile tamamen starvasyon düzeylerine geri döndürülebilmektedir. SU11274'e ek olarak IR inhibisyonu da gerçekleştirilmiştir. Boyden chamber yöntemi ile gerçekleştirilen analizlerde, c-Met ve IR birlikte inhibe edildiğinde anlamlı olarak starvasyondan bile düşük düzeyde hücre motilitesi elde edilmiştir (* $p \leq 0.05$) (**Şekil 34B**). HNMPA-(AM)3 YGYİ uygulamasında tek başına da motiliteyi baskılamakta başarılı bulunmuştur. İki inhibitörün ayrı ayrı ve birlikte kullanımının yara iyileşmesi üzerine etkisi belirlenmiştir. İnsülin reseptörü tek başına da inhibe edildiğinde yara iyileşme oranını düşürmektedir (**Şekil 34C**).



Şekil 34. YGYİ, SU11274 ve HNMPA-(AM)3 uygulamalarının ayrı ayrı ya da birlikte HCC migrasyonu üzerine etkilerinin analizi.

Yüksek glukoz ve insülinin HCC invazyonuna etkisi matrijel ile kaplı boyden chamberlar kullanılarak araştırılmıştır. Bu deney sonucuna göre starvasyona kıyasla yüksek glukoz ve insülin uygulamaları HUH-7 ve SK-Hep1 hücre invazyonunda oldukça anlamlı bir yüksek artışa sebep olurken c-Met inhibitörü SU11274 ve/veya IR inhibitörü HNMPA-(AM)3 uygulaması yüksek glukoz ve insüline bağlı invaze olan hücre sayısını anlamlı ölçüde düşürmüştür (**Şekil 35**).



Şekil 35. Yüksek glukoz ve insülin uygulamalarının c-Met ve IR inhibitörleri ile ayrı ayrı ya da birlikte HCC invazyonuna etkisinin incelenmesi.

Hücre kültüründe in vitro etkilerini gördüğümüz yüksek glukoz ve insülin uygulamalarının hücre metastazı üzerine etkilerini test etmek amacıyla in vivo zebrabalığı zenograft modelinde araştırmamıza devam edilmiştir. Bu kapsamda açlıkta bıraktığımız ya da yüksek glukoz-insülin uyguladığımız SNU-398 mock/GFP-MET klonlarında zebrabalığındaki metastaz kapasiteleri karşılaştırılmıştır.

AB +/+ zebrabalığı larvalarına, daha önce 16 saat boyunca deney ortamında tutulmuş MOCK ve MET grubu SNU398 hücreleri enjekte edildikten bir gün sonra larvalar deney ortamlarına alınmıştır. Açlık durumunda olan hücre grubunda ise E3 ortamında tutulmuşlardır. Enjeksiyondan 96 saat sonra deney durdurulmuş, balıklar Tricaine solüsyonu ile uyutularak metastaz yapanlar sayılarak görüntülenmiştir (**Şekil 36**). Mock YG-Yİ grubunda %40 oranında, MET açlık grubunda %46 oranında, MET YG-Yİ grubunda ise %61 oranında metastaz görülmüştür.

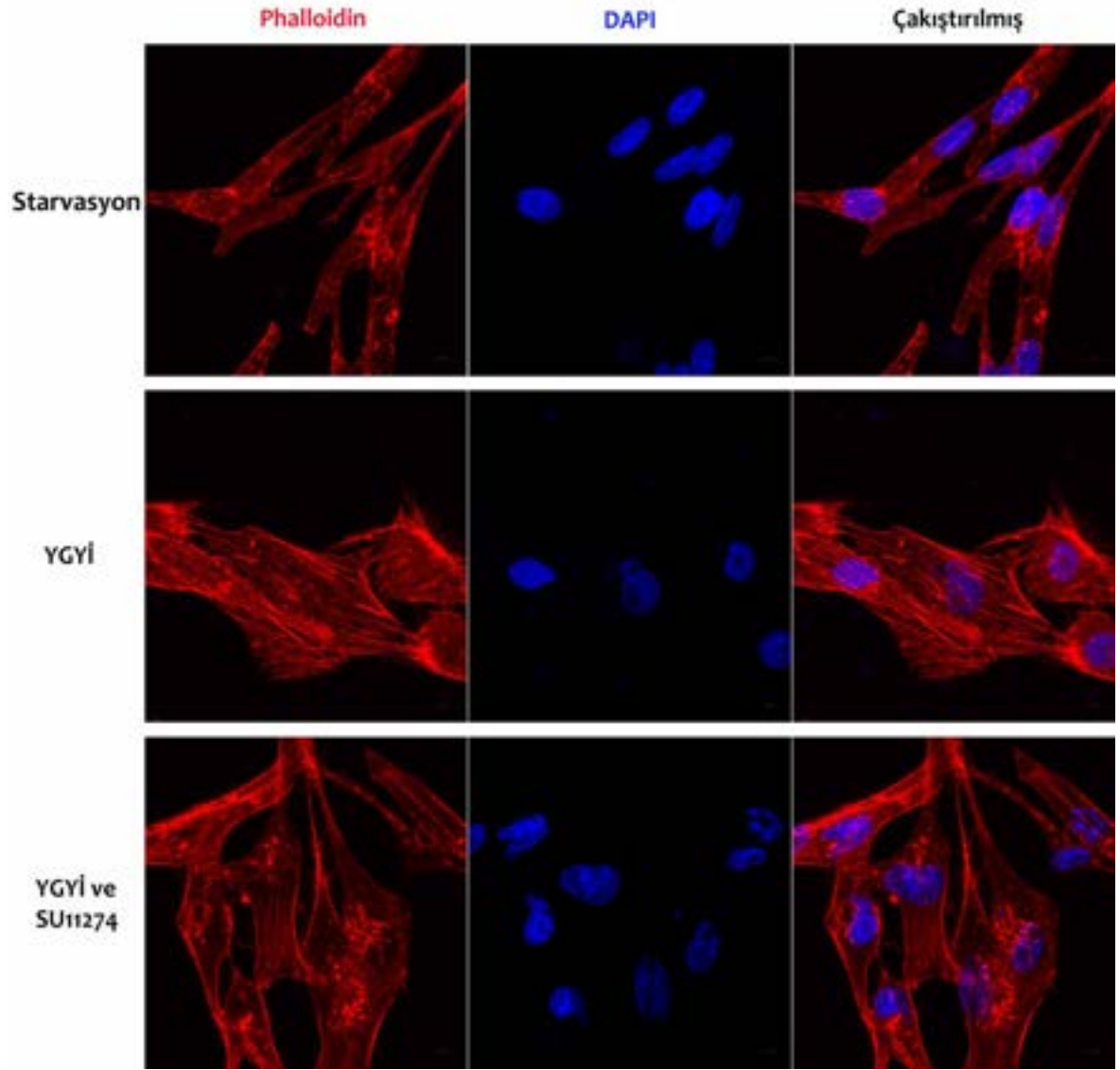


şekil 36. Zebrabalığı zenograft modelinde metastatik ve metastatik olmayan zebrabalığı larvalarının değerlendirmesi.

Motil karakter kazanan hücrelerin sitoiskelet organizasyonunu incelemek amacıyla motilitede organize olan actin filamanları, floresan işaretli phalloidin boyası ile boyanmış ve Sk-Hep1 ve HUH-7 hücreleri konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir (**şekil 37**).

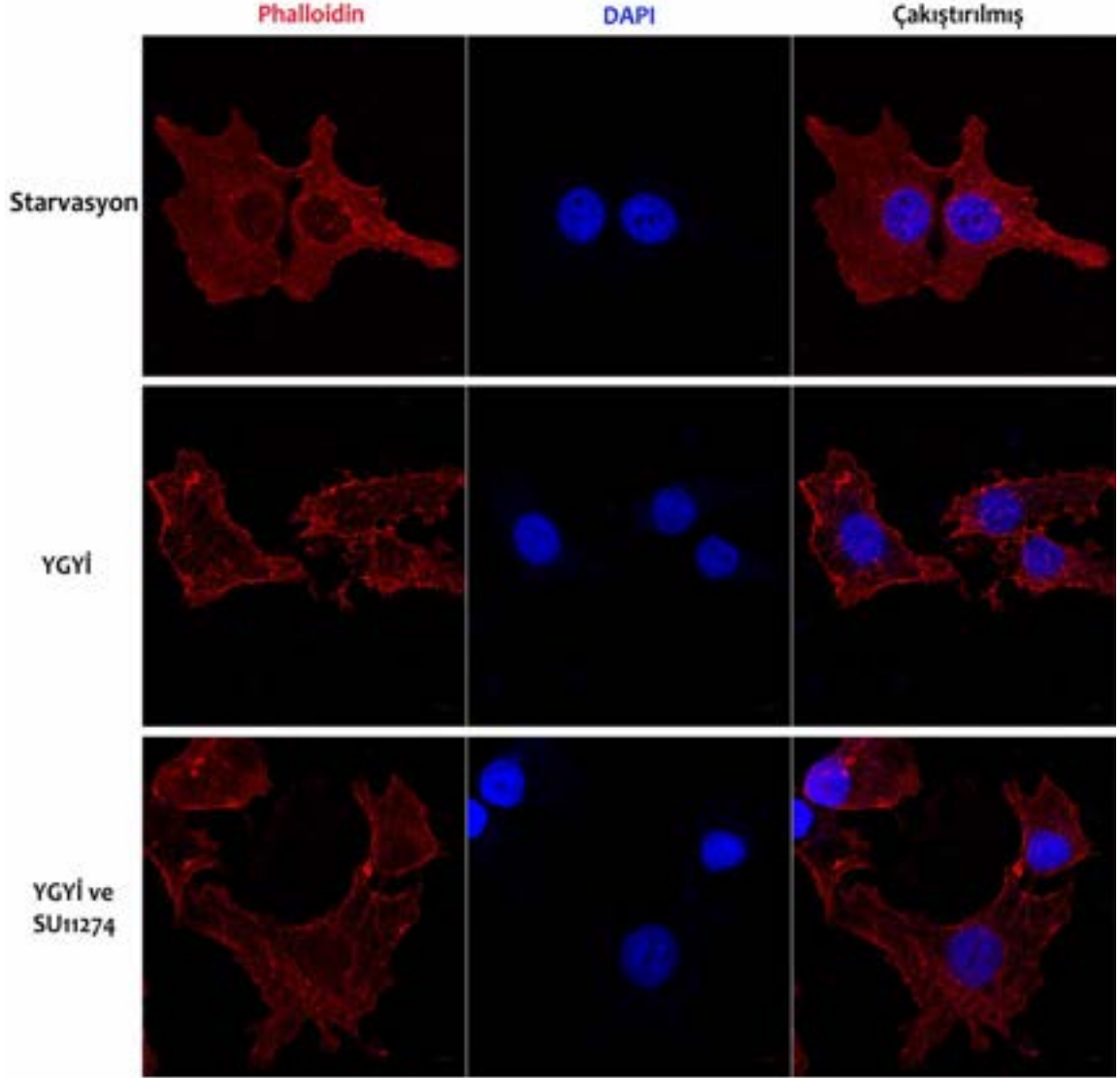
A

SK-HEP1



B

HUH7

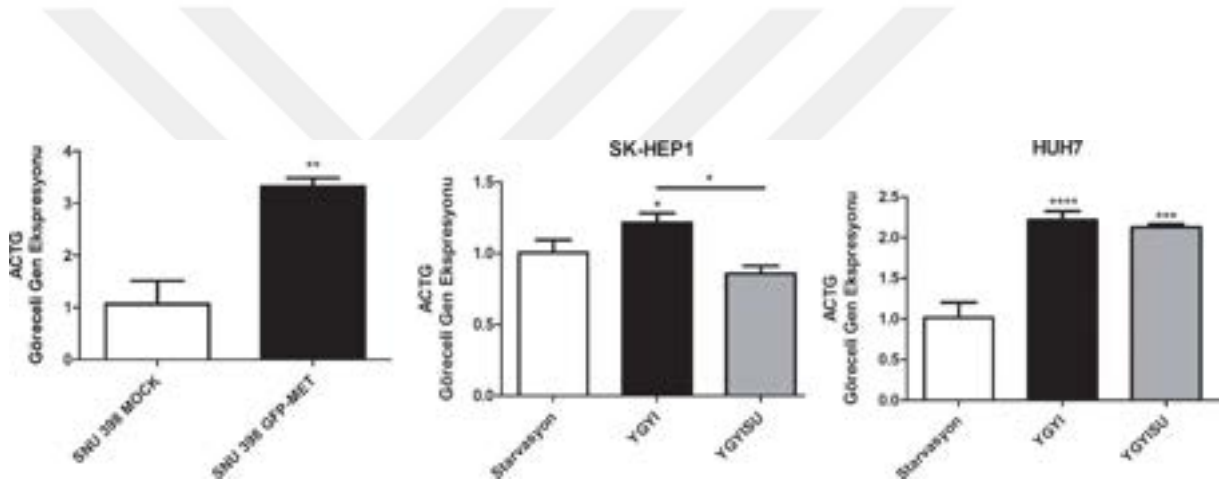


Şekil 37. YGYİ/SU11274 uygulamalarının hücre iskeleti üzerine olan etkisinin incelenmesi.

Hücreler incelendiğinde; starve edilen hücrelerin daha yaygın ve yüzeye yapışık olduğu, actin filamanlarının hücre içinde dağınık olduğu görülmektedir. YGYİ uygulaması ile ise hücrelerde motilite ilişkili aktin filaman organizasyonu artmakta, hücre uzantıları belirgin olarak görülmektedir. Ayrıca nanotip denilen, hücrelerin

doğrudan iletişim ve paylaşımını sağlayan ince tüp oluşumların artışı gözlemlenmiştir. YGYİ'e ek olarak uygulanan SU11274 uygulaması ile aktin filaman organizasyonu ve nanotüp oluşumunun azaldığı belirlenmiştir.

Hücre motilite ve invazyonu ile ilişkili G tipi actin, *ACTG1* gen ekspresyonu, motil karakter mekanizmasını aydınlatmak için analiz edilmiştir (**Şekil 38**). Bulgularımıza göre *ACTG* ekspresyonu GFP-Met overeksprese SNU398 klonlarında anlamlı olarak 3.5 kat artarken (** $p \leq 0.01$), ayrıca SK-Hep1 (* $p \leq 0.005$) ve HUH-7 (**** $p \leq 0.0001$) hücrelerinde YGYİ uygulaması ile anlamlı olarak artmaktadır. SU11274 varlığında ise SK-Hep1 hücrelerinde anlamlı ölçüde baskılandığı ve starvasyondan daha da gerilediği görülmüştür.

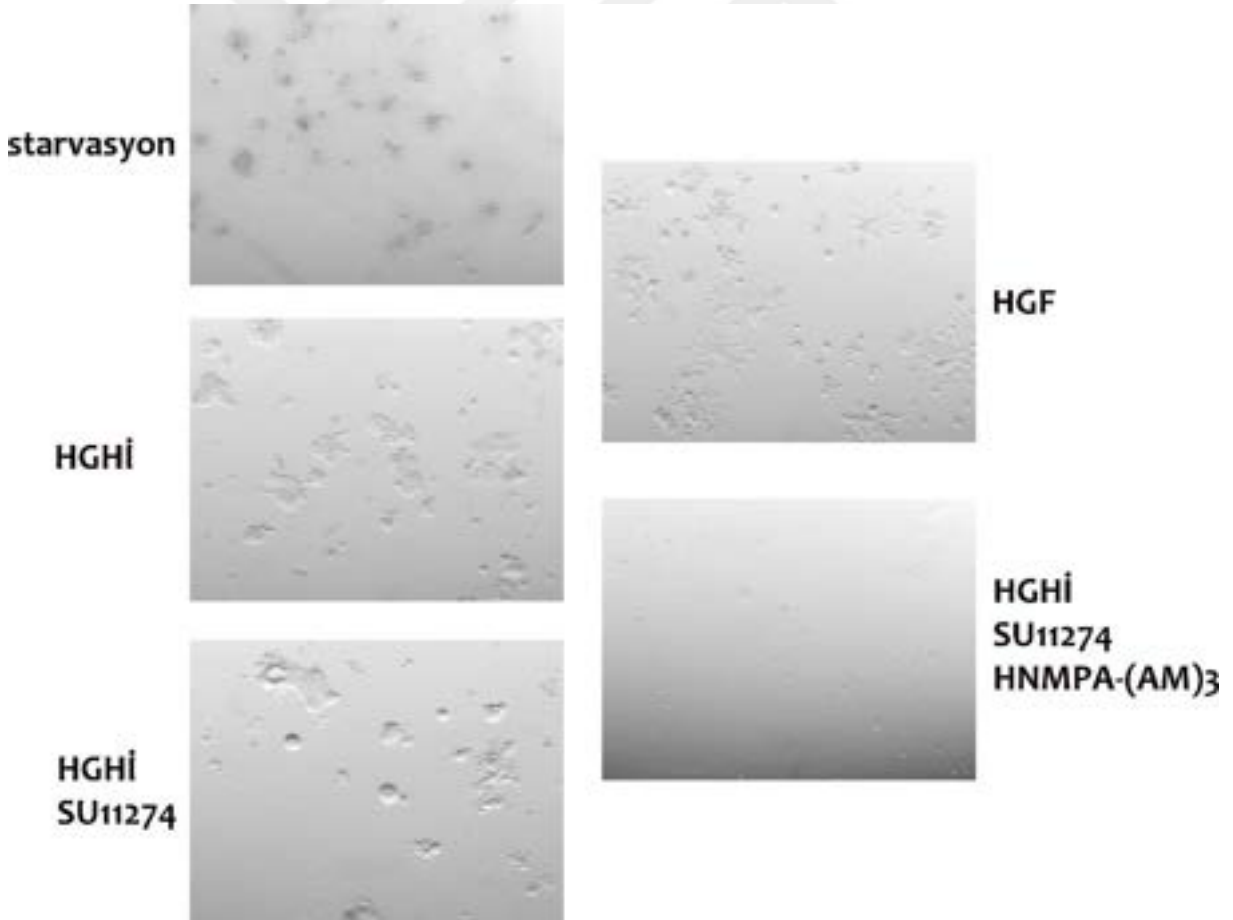


Şekil 38. *ACTG* gen ekspresyonunun katlı artış olarak c-Met klonlarında ve YGYİ/SU11274 uygulanan HCC hücrelerinde analiz edilmesi.

4.7.3. Yüksek Glukoz ve İnsülinin HCC Hücrelerinin In vitro Sferoid Oluşumu Kapasitesine Etkisi

Yüksek glukoz ve insülin koşullarında HCC hücrelerinin kendini yenileme ve multipotent kanser kök hücresi karakterini analiz etmek amacıyla HUH7 hücreleri matrijel içine gömülerek sferoid oluşturma yetenekleri 3 hafta boyunca takip edilmiştir. Bu süre içinde sferoidler açlık ortamı, yüksek glukoz/insülin, c-Met inhibitörü, IR inhibitörü ve pozitif kontrol olarak HGF içeren ortamlarda tutulmuştur. Deney sonunda sferoidlerin görüntüleri alınmış ve analizleri yapılmıştır (**Şekil 39**).

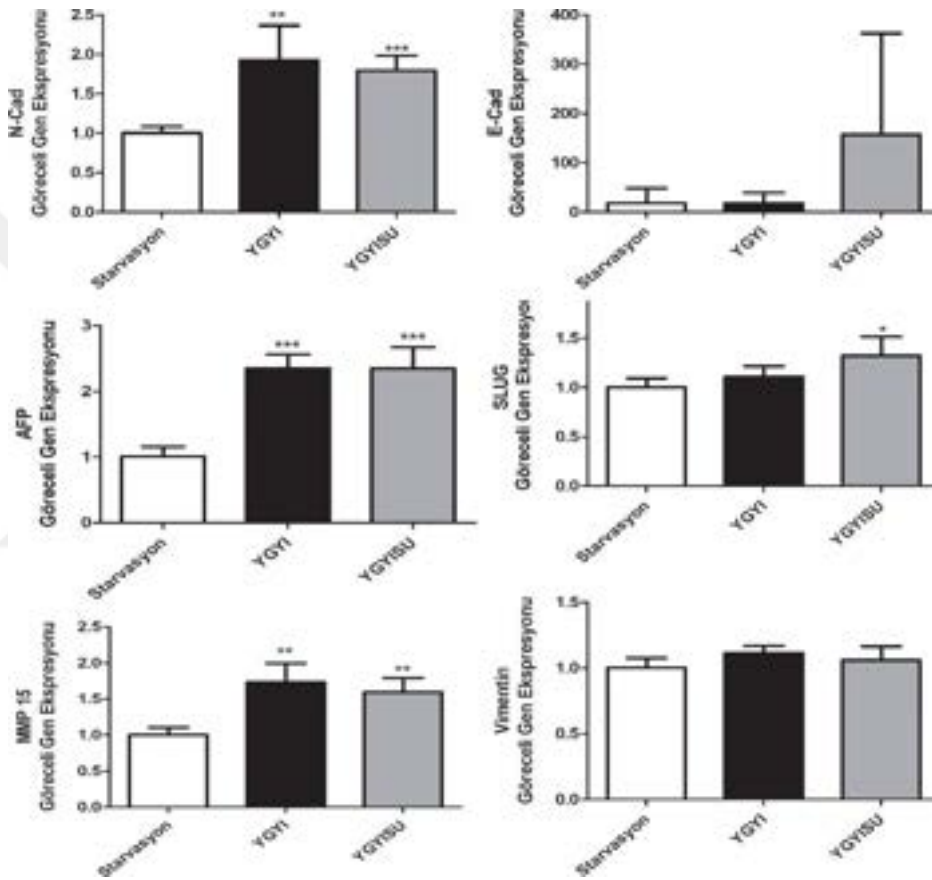
Açlık ortamında tutulan HUH7 hücrelerinde sferoid oluşumu gözlenmezken, yüksek glukoz ve insülin ile tutulan hücrelerde anlamlı oranda büyük sferoid oluşumu gözlenmiştir. Oluşan sferoidlerin sayısı ve büyüklüğü açlık grubuna göre anlamlı oranda yüksektir. Ayrıca bu sferoidlerden çıkan ve invazyon ile de ilişkili invadopodial yapılarda artış vardır. c-Met inhibitörü ile muamele edilmiş hücrelerde ise sferoid oluşumunda sayı olarak açlığa göre artış vardır, inhibitör sferoid oluşumunu engellememiştir. Ancak sferoid büyüklüğü daha düşükken, invadopoidal yapıların oluşumu baskılanmıştır. Pozitif kontrol olarak HGF ile uyarılan hücrelerde ise sferoid sayısı ve büyüklüğü açlık grubuna göre anlamlı oranda yüksekken, invadopoidal yapılarda oldukça fazla artış görülmektedir. IR inhibitörü ise tek başına kullanıldığında bile hücre proliferasyonunu baskılamasına benzer şekilde sferoid oluşumunu açlık düzeyine geri döndürmüştür ve tamamen baskılamıştır.



Şekil 39. Yüksek glukoz ve insülin uyarımının HUH-7 hücrelerinde sferoid oluşumuna etkisinin incelenmesi.

Hücrelerin metastatik karakter kazanmasında etkin mekanizmaları belirlemek amacıyla bazı metastaz, EMT ve kök hücre ilişkili genlerin ekspresyonları incelenmiştir (**Şekil 40**).

Elde edilen verilere göre *N-Cadherin*, *AFP* ve *MMP15* ekspresyonları YGYİ uygulaması ile anlamlı düzeyde artarken; *E-Cadherin* ve *SLUG* ekspresyonları SU11274 uygulaması ile artmaktadır. *Vimentin* ekspresyonunda anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

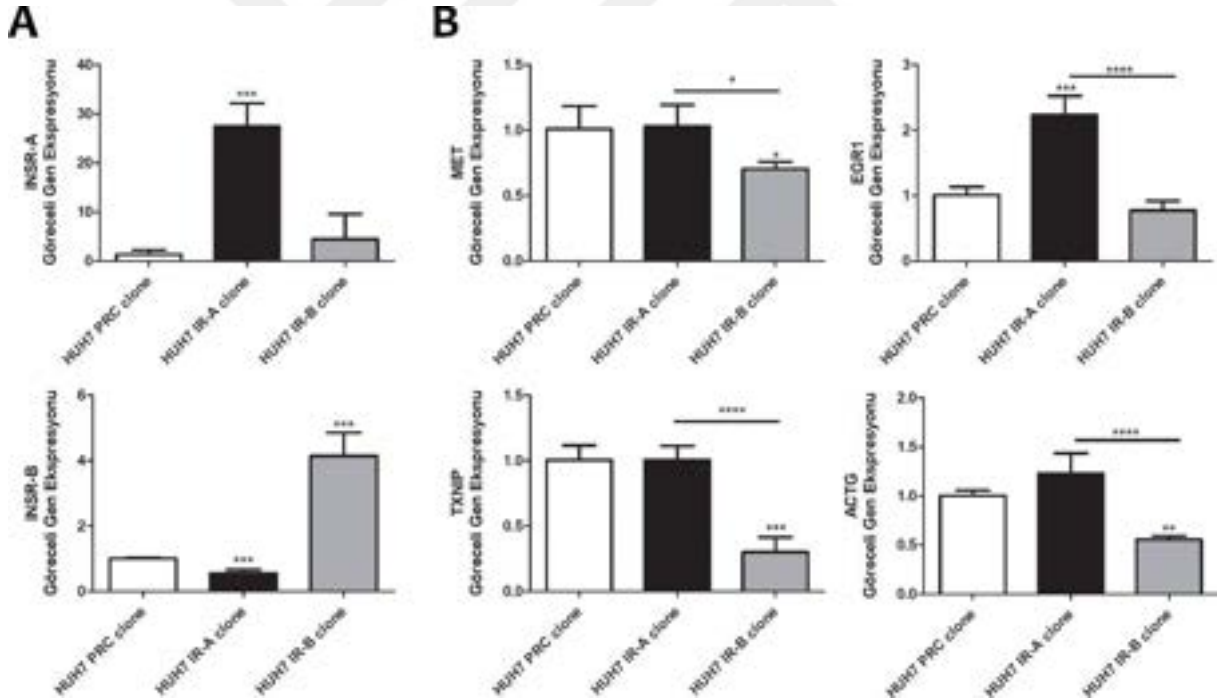


Şekil 40. EMT ve kök hücre karakteri ile ilişkili bazı gen ekspresyonlarının katlı artış olarak YGYİ/SU11274 uygulanan HCC hücrelerinde analiz edilmesi.

4.8. HCC’de İnsülin Reseptörü İzofomları ve c-Met İlişkisinin İncelenmesi

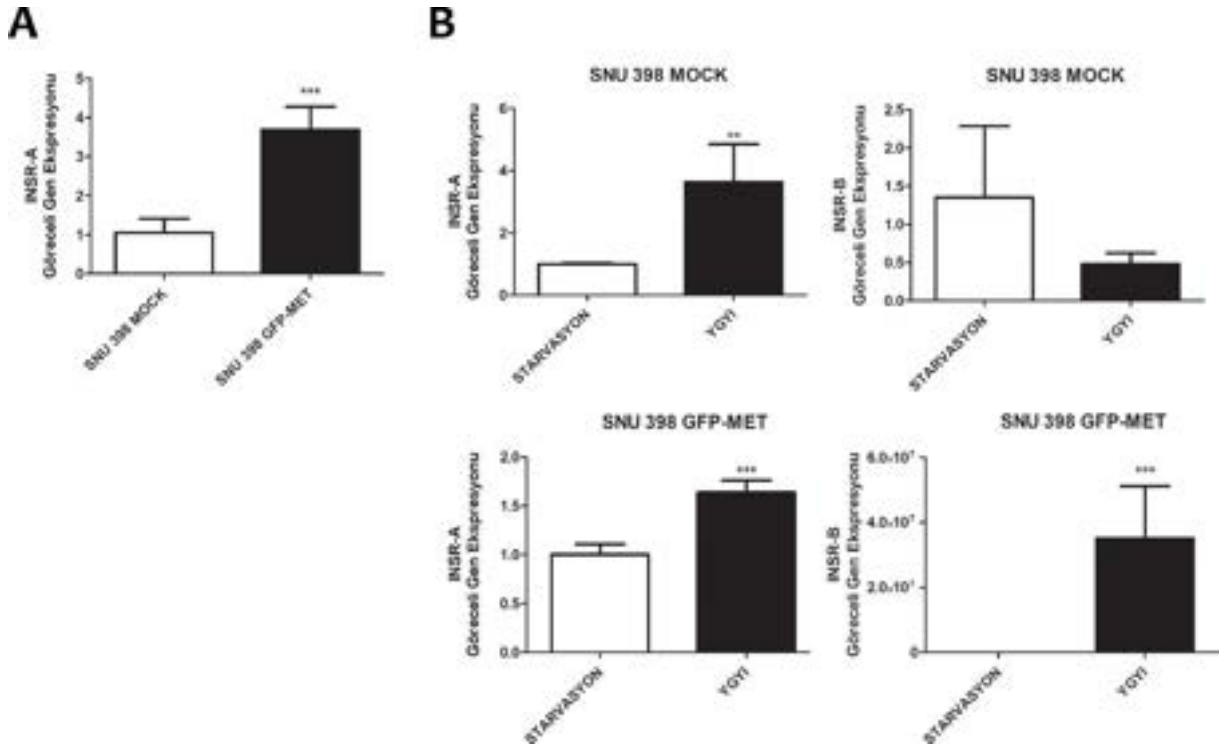
HCC progresyonunda IR izofomlarının rolünü ve c-Met ile ilişkisini belirlemek için öncelikle kalıcı ve seçici olarak kontrol plazmidi pRC, IR-A izofomunu ve IR-B

izoformunu overeksprese eden HUH-7 hücre klonlarından bazal koşullarda RNA elde edilmiştir. Öncelikle seçici *INSR-A* ve *INSR-B* ekspresyonu bu hücrelerde konfirme edilmiş, gen ekspresyonunun katlı değişim grafiği elde edilmiştir (**Şekil 41A**). Daha sonra bu klonlarda *MET*, *TXNIP*, *EGR* ve *ACTG* genlerinin ekspresyonları incelenmiştir ve katlı değişim grafiği elde edilmiştir (**Şekil 41B**). Bulgularımıza göre kontrol hücrelerine kıyasla bazalda, *MET* ekspresyonunda IR-A klonunda anlamlı düzeyde artış sağlanmamıştır. IR-B klonunda ise anlamlı olarak ($*p \leq 0.05$) %30'luk bir *MET* ekspresyon düşüşü görülmüştür. *TXNIP* (%70 azalma, $****p \leq 0.0001$) ve *ACTG* (%40 azalma, $****p \leq 0.0001$) düzeyleri de *MET* ekspresyonu ile paralel şekilde IR-B klonlarında daha az eksprese olmaktadır. *EGR* ekspresyonunda ise IR-A klonunda 2.2 katlık bir artış görülmüştür ($***p \leq 0.001$). *EGR* düzeyi, IR-B klonunda ise kontrol pRC klonu ile aynı düzeyde görülmektedir.



Şekil 41. Kontrol plazmidi pRC, IR-A ve IR-B kalıcı ekspresyon klonlarında bazal düzeyde *INSR-A* ve *INSR-B* (**A**); *MET*, *TXNIP*, *EGR*, *ACTG* (**B**) genlerinin katlı değişim gen ekspresyon grafikleri.

İnsülin reseptörü izoformlarının *MET* üzerine etkisini incelemenin ardından, *MET* ekspresyonunun izoform alttipi ekspresyonu üzerine etkisini belirlemek için c-MET'i oldukça düşük düzeyde olan SNU-398 mock ve overeksprese eden SNU-398 GFP-Met hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrelerden elde edilen RNA örneklerinde *INSR-A* ve *INSR-B* ekspresyonları bazal düzeyde ve yüksek glukoz-yüksek insülin ile uyarıldığında incelenmiştir, katlı değişim gen ekspresyon düzeyleri **Şekil 42**'de verilmiştir.

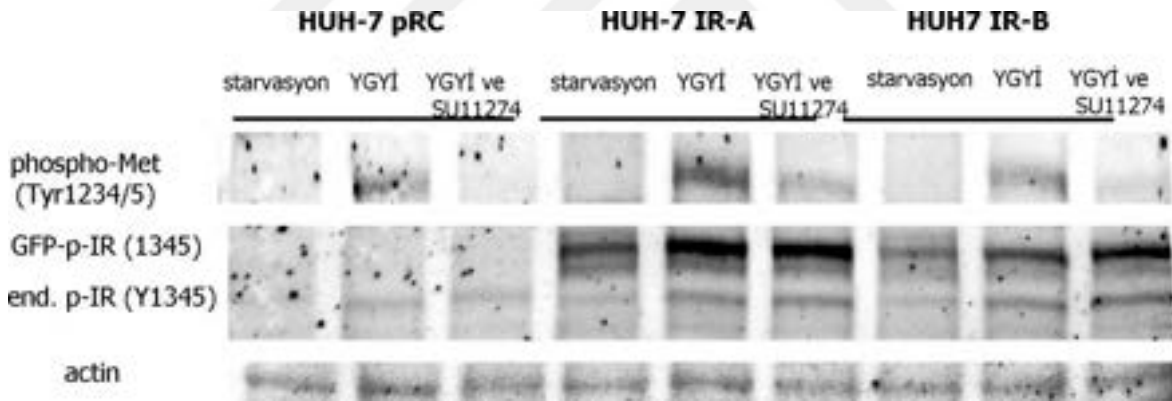


Şekil 42. Oldukça düşük MET eksprese eden (SNU 398 Mock) ve yüksek düzeyde c-Met eksprese eden (SNU 398 GFP-Met) klonlarında bazal koşullarda *INSR-A* gen katlı değişim ekspresyon grafiği **(A)** c-Met klonlarının yüksek glukoz-yüksek insülin (YGYİ) ile uyarılması sonucu *INSR-A* ve *INSR-B* düzeylerinin katlı değişim gen ekspresyon grafikleri **(B)**.

Elde edilen bulgulara göre bazal koşullarda SNU-398 c-Met overekspresyon klonlarında, kontrol mock hücrelerine kıyasla *INSR-A* düzeyinde 3.7 katlık anlamlı bir artış görülmüştür **(Şekil 42A)**. *INSR-B* düzeyi ise mock hücre klonlarında belirlenemeyecek kadar düşüktür. Bu nedenle bazalda *INSR-B* analizi gerçekleştirilememiştir. SNU 398 mock hücrelerine 16 saat YGYİ uygulandığında elde

edilen RNA örneklerinde *INSR-A* düzeyinde 3.6 katlık anlamlı bir artış belirlenmiştir (** $p \leq 0.01$). Bu örneklerde YGYİ düzeyinde *INSR-B* gen ekspresyonunda anlamlı bir fark belirlenmemiştir (**Şekil 42B**). GFP-MET klonlarının 16 saatlik YGYİ uyarımı sonrası elde edilen RNA örneklerinde *INSR-A* ekspresyonu yine anlamlı olarak 1.6 kat artmıştır (** $p \leq 0.001$). *INSR-B* düzeyinde ise GFP-Met klonlarında YGYİ uyarımı ile oldukça yüksek bir artış belirlenmiştir (** $p \leq 0.001$).

IR izoformlarının bazal koşullarda *MET* ekspresyonunda anlamlı bir artış yaratmamasının ardından protein düzeyinde c-Met aktivasyonu üzerine etkisini incelemek için IR izoform klonları 16 saat süreyle yüksek glukoz ve insülin ile uyarılmıştır, ayrıca diğer grupta indüksiyon koşuluna ek olarak 1000 nM c-Met inhibitörü SU11274 uygulanmıştır. Elde edilen protein örneklerinde c-Met ve IR aktive edici fosforilasyonları western blot yöntemi ile belirlenmiştir (**Şekil 43**).

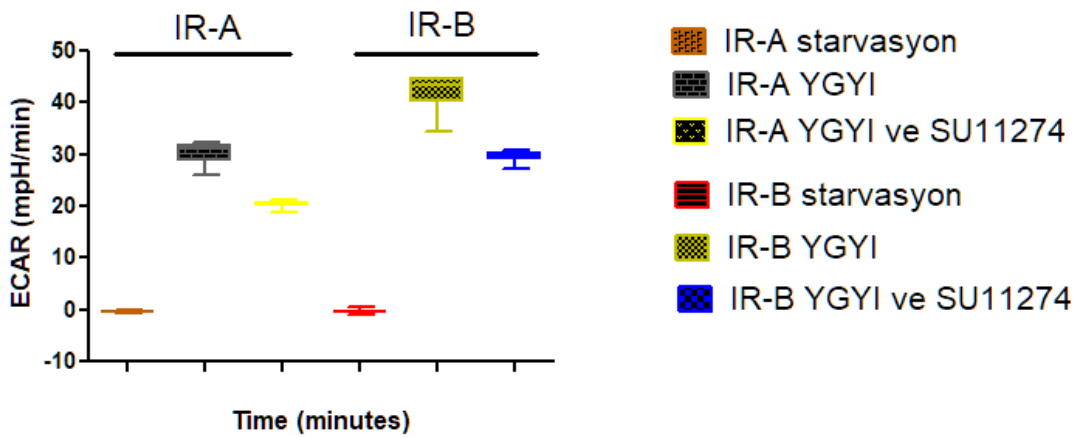


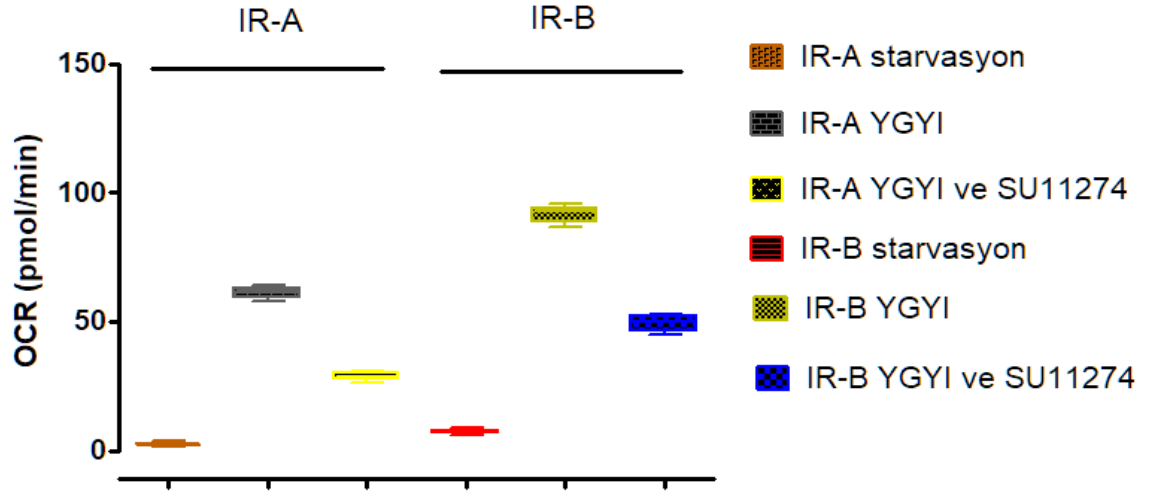
Şekil 43. YGYİ ve YGYİ+SU11274 ile indüklenen HUH-7 pRC, IR-A ve IR-B klonlarda c-Met ve IR aktivasyonlarının western blot yöntemi ile belirlenmesi.

c-Met tirozin 1234-35 fosforilasyonu tüm hücrelerde YGYİ ile artarken, SU11274 uygulaması ile baskılanmıştır. c-Met'in aktivasyonunun özellikle IR-A klonlarında daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. IR tirozin 1345 fosforilasyonu GFP-IR eksprese eden klonlarda 30 kDa'luk bir artış ile belirlenirken, bazal düzeyde eksprese olan IR fosforilasyonundaki artış daha altta yer almaktadır. IR aktivasyonu YGYİ uyarımı ile artarken, önceki bulgulara paralel şekilde SU11274 uygulaması ile engellenmemiştir.

İnsülin reseptörü izoformlarının hücre metabolizmasının düzenlenmesinde c-Met ile olan ilişkisini incelemek amacıyla, IR-A ve IR-B plazmidlerinin transient olarak transfekte edildiği SK-Hep1 hücrelerinin metabolik fenotipi Seahorse deneyi ile incelenmiştir.

Literatürde IR-B'nin daha çok hücrenin enerjetik sistemini yönettiği ve enerji ile ilgili genleri regüle ettiği bilinmektedir, IR-A'nın ise daha çok hücrelerin proliferasyon ile ilişkili genlerini regüle ettiği ve bölünmeyi kontrol ettiği bilinmektedir. Bu nedenle kanser hücrelerimizde IR-B'nin yüksek glukoz ve insüline yanıtı IR-A eksprese eden hücrelerden daha yüksektir (**Şekil 44**). c-Met inhibitörü SU11274 uygulaması ise her iki reseptör izoformunu eksprese eden hücrelerde hem oksidatif yolağı hem de glikolitik yolağı etkilemektedir. c-Met inhibitörü uygulaması IR-A eksprese eden hücrelerde mitokondriyal oksijen tüketimini 60 pmol/min'den 30 pmol/min'e düşürmüştür; IR-B eksprese eden hücrelerde ise 105 pmol/min'den 55 pmol/min'e düşürmüştür. IR-A eksprese eden hücrelerde c-Met inhibitörü uygulaması glikoliz kaynaklı proton salınımını 28 mpH/min'den 20 mpH/min'e düşürmüştür; IR-B eksprese eden hücrelerde ise 42 mpH/min'den 32 mpH/min'e düşürmüştür. Sonuçlarımıza göre c-Met inhibitörü uygulaması IR izoformundan bağımsız olarak kanser hücrelerinin metabolik faaliyeti değiştirmektedir, hücrelerin hem mitokondriyal hem de glikolitik solunumunu düşürmektedir.





Şekil 44. İnsülin reseptörü A (IRA) ya da insülin reseptörü B (IRB) eksprese eden hücrelerde mitokondriyal solunum oksijen tüketiminin (Oxygen Consumption Rate-OCR) değerlendirilmesi ve glikolizin hücreden proton salınımı ile değerlendirilmesi (Extracellular Acidification Rate-ECAR).

4. **TARTIŞMA**

Son yıllarda geliştirilen etkin tanı ve tedavi yaklaşımları sayesinde bazı kanser türlerinin görülme sıklığı ve ölüm artış oranları sabit kalmakta ya da düşmekteyken, melanoma, pankreas kanseri ve karaciğer kanserinin gözlenme ve ölüm sıklığı yüksek bir hızda artmaya devam etmektedir (129). Özellikle hepatit enfeksiyonuna karşı başarıyla uygulanan aşılama çalışmaları hepatit enfeksiyonu kaynaklı karaciğer kanseri ölümlerinin sayısını düşürürken, karaciğer kanserinin görülme ve ölüm sıklığında gözlenen bu artış hızı, obezitenin dünya genelindeki agresif yayılımı ile ilişkilendirilmektedir. Bu sebeple obezite temelinde gelişen karaciğer kanserinin mekanizmalarının aydınlatılması ve spesifik olarak bu mekanizmaları hedef alan tanı ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi giderek daha çok önem kazanmaktadır.

Bu çalışma kapsamında obezite temelindeki HCC gelişim sürecinde hastalarda görülen hiperglisemi ve hiperinsülineminin etkisi in vitro hücre kültüründe ve in vivo zebrabalığı zenograft modelinde taklit edilerek incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle yüksek glukoz ve/veya yüksek insülin ile uyarılan HCC hücrelerinde, HCC'de aktivasyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiş c-Met'in protein ve aktivasyon düzeyleri incelenmiştir. Çalışmamızda HCC'de yüksek glukoz ve insülinin, beraber ya da ayrı ayrı uygulandığı koşullarda c-Met'in protein düzeyinin arttığı ve ligand bağımsız aktive olduğunu belirledik. Ayrıca aktive olan c-Met'in membran lokalizasyonunun arttığını belirledik. Literatürde obezite ile c-Met'in ilişkilendirilmesi, meme kanserinin obeziteyle ilişkisinin araştırıldığı birkaç çalışma ile yer almaktadır. Bu çalışmalar kapsamında obezite farelerin meme dokusunda c-Met protein seviyesinin 2,5 kat arttığı görülmüştür (98). Benzer şekilde obezite ile tetiklenen bazal-benzeri meme kanseri fare modelinde, obezitenin HGF sekresyonunu ve c-Met aktivasyonunu arttırdığı, HGF'in nötralizasyonu sonucu tümör agresif karakterinin baskılandığı gösterilmiştir (97). Yine aynı araştırma grubunun aynı modeli kullanarak yayınladıkları bir başka çalışmada obezite tarafından artan HGF/c-Met aktivasyonunun kilo kaybı ile geri döndürüldüğü ve tümör progresyonunun baskılandığı görülmüştür (98). Bu modelde c-Met aktivasyonuna paralel olarak obezite bağımlı kan glukoz seviyesi, hiperinsülinemi ve leptin:adiponektin oranlarında artış görülmüştür. Kilo kaybı ile, c-Met aktivasyonu ve tümör gelişimine

paralel olarak, bu belirtiler de azalmıştır. Biz de laboratuvarımızda, yüksek glukozun HCC hücrelerinden HGF sekresyonunu arttırıp arttırmadığını inceledik ve incelediğimiz HUH-7, HepG2, SNU449, SK-Hep1 hücrelerinde HGF sekresyonunda bir değişikliğe sebep olmadığını belirledik. Böylece HCC’de c-Met’in ligandı HGF’ten bağımsız olarak aktive olduğunu belirledik.

c-Met’in ligand bağımsız aktivasyonu birçok çalışmada ele alınmıştır ve kanserde oldukça yaygındır. c-Met’in HGF-bağımsız aktivasyonunun önemli mekanizmalarından birisi ise reseptör karşılıklı-haberleşmesidir. Çalışmamıza öncü olan yayınlardan birisi; c-Met’in kendisi gibi reseptör tirozin kinaz ailesi üyelerinden insülin reseptörü ile en benzer kinaz yapısına sahip olduğunu belirtmiş ve HGF varlığında c-Met’in aktive olarak insülin reseptörü ile heterodimer oluşturduğunu, insülin reseptörünü ligandı insülin yokken bile fosforlayarak aktive ettiğini göstermiştir (91). Çalışmayı gerçekleştiren araştırmacılar HGF uygulamasını ve c-Met aktivasyonunu insülin direnci durumunda kullanmayı önermiştir. Bu çalışma bize, HCC sürecinde tam tersi şekilde, artan glukoz ve insülinin insülin reseptörünü aktive ederek c-Met ile heterodimer oluşumunu tetiklediğini ve c-Met’i aktive ettiğini düşündürdü.

Öncelikle c-Met’in yüksek glukoz ve insülin koşullarındaki aktivasyonunun, aktive olan IR’dan kaynaklanıp kaynaklanmadığını araştırdık. HCC hücrelerine yüksek glukoz ve insülin uygulaması sonucu hem c-Met’in hem de IR’nün yüksek düzeyde korrele şekilde protein ekspresyonlarının arttığını gördük. Gerçekleştirdiğimiz co-IP deneyi sonucunda da yüksek glukoz ve insülin uygulamalarının ayrı ayrı ya da birlikte heterodimerizasyonu arttırdığını belirledik ve ilk kez iki reseptörün yüksek glukoz ve yüksek insülin koşullarında biraraya geldiğini gösterdik. Ayrıca yüksek glukoz ve insülin uygulaması sonucu IR’nün aktive olduğunu da teyit ettik. Böylece yüksek glukoz ve insülin uyarımı ile HCC hücrelerinde c-Met gibi IR’nün de aktive olduğunu ve c-Met ile heterodimer oluşturarak aktivasyonunda önemli bir role sahip olduğunu gösterdik.

Yüksek glukoz ve insülin ile aktive olan c-Met’in downstreaminde yer alan sinyal iletim yolağı elemanlarından Erk, Akt ve STAT3’ün aktivasyonlarını inceledik. Bu moleküllerin aktive edici fosforilasyonları incelendiğinde yüksek glukoz ve insülin uyarımı ile downstreamde aktive olduklarını belirledik. MEK tarafından aktive edilen Erk kinazı, hedefi olan diğer molekülleri fosforlayarak sinyalleşmenin devamını sağladığı

gibi, hücre çekirdeğine transloke olarak farklı transkripsiyon faktörlerinin regülasyonunu da sağlamaktadır. Bu faktörler arasında c-Fos, c-Jun ve c-Myc yer alır, Erk aktivasyonu ayrıca hücre metastazı ile ilişkili matriks metalloproteinazlarının da gen ekspresyonunu arttırmaktadır (130). Akt ise daha çok hücre sağkalımını ve metabolizmasını regüle etmekte görevlidir. Akt ve c-Met'in birlikte aktivasyonunun mTORC/yağ asidi sentaz (Fatty Acid Synthase, FASN) yolağını aktive ettiği ve agresif HCC gelişimine sebep olduğu belirlenmiştir. İki yolağın aktive edildiği koşullar, farelerin hidrokinamik enjeksiyon sonrası 8 haftada ötenaziye alınmasına sebep olmuştur (131). STAT3 ise proliferasyon ve sağkalım gibi birçok hücresel aktivitede görevli bir transkripsiyon faktörüdür ve HCC'de kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Aktive olan tirozin kinazlar tarafından tirozin-705 üzerinden fosforlandığı, fosforlanan STAT3 proteinlerinin dimerize olarak nükleusa gittiği ve hedef genlerin promotor bölgelerine bağlandığı bilinmektedir (78). Bu genler arasında c-Fos, cyclin D, c-Myc yer almaktadır. Ayrıca STAT3'ün mitokondride de lokalize olduğu ve hücre metabolizmasını düzenleyerek, hücreleri oksidatif fosforilasyona yönlendirdiği bildirilmiştir (132). Tez çalışmasının bir sonraki aşamasında ise bu anahtar moleküller ile ilişkili biyolojik yanıtları araştırdık.

Yüksek glukoz ve/veya insülin düzeylerinin hücrelerin; proliferasyon kapasiteleri (xCELLigence sisteminde), motilite kapasiteleri (boyden chamber sisteminde) ve metastaz kapasiteleri (zebrabalığı xenograft modelinde) üzerine etkisini karşılaştırmalı olarak inceledik. Yüksek glukoz ve/veya insülin uygulamalarının tüm koşullarda hücre motilitesini anlamlı olarak arttırdığını belirledik. Hücre proliferasyonunda ise yüksek glukoz ve insülin birlikte kullanıldığında anlamlı olarak artış olduğunu gördük. Zebrabalığı larvaları metastaz modelinde de YGYİ uygulaması ile metastatik hücre sayısında artış gözlemledik. c-Met'in de HCC'de proliferasyondan daha çok, motilite ve agresif karakter ile ilişkisi olduğu bilinmektedir (86). Elde ettiğimiz bu biyolojik veriler, YG/Yİ'nin etkilerini c-Met üzerinden gösterdiğini işaret etmektedir. Ayrıca YGYİ beraber uygulamasında ise c-Met'e ek olarak farklı mekanizmaların da aktive olmuş olabileceğini düşündürmektedir.

YGYİ üzerinden görülen etkilerin c-Met tarafından ne derece kontrol edilip edilmediğini belirlemek için c-Met'e selektif, ATP-yarışçısı SU11274 inhibitörünü

kullandık (133). c-Met'in YGYİ'e bağı aktivasyonunun ve membran lokalizasyonunun SU11274 uygulaması ile baskılandığını, downstream yolak elemanlarının da aktivasyonunun düştüğünü belirledik. IR aktivasyonunun ise c-Met inhibisyonundan etkilenmediğini saptadık. IR-c-Met etkileşimini incelediğimizde ise yine bu etkileşimin SU11274 uygulaması ile baskılanmadığını gösterdik. Böylece YGYİ ile aktive olan IR'nün c-Met'in aktivasyonundan bağımsız olarak c-Met'e bağlandığını belirledik. Bulgularımız ışığında c-Met'in kristal yapısı incelendiğinde ATP bağlanma cebine oturan SU11274'ün IR etkileşimini engelleyecek konumda bulunmadığı ancak ATP bağlanma cebine uzaysal düzlemde yakın konumda olan aktivasyon bölgesine IR'nün erişimini kısıtladığı düşünülmüştür. Bu önerinin ileri yapısal analizler ile incelenmesi ile, c-Met aktivasyonu ve diğer reseptörler ile heterodimerizasyon oluşumu ile ilgili yeni bilgiler açığa çıkabilir. SU11274'ün c-Met aktivasyonu üzerine baskılayıcı etkilerini belirledikten sonra YGYİ uyarımında c-Met aktivasyonu/inhibisyonunun HCC progresyonundaki rollerini tanımlamayı amaçladık.

Hanahan ve Weinberg tarafından 2011 yılında derlenen ve kanserleşme sürecinin önemli dönüm noktalarının ifade edildiği çalışmaya göre kanser hücrelerine avantaj sağlayan yeteneklerin arasında proliferasyon kapasitelerinin artması, apoptozdan kaçış, invazyon ve metastaz yeteneklerinin artması ve hücre enerji mekanizmalarında yeniden yapılanmalar yer almaktadır (31). Biz de çalışmamızda metabolizma ilişkili bu temel dönüm noktalarını ele aldık ve c-Met aktivasyonundaki değişikliklerden nasıl etkilendiklerini inceledik. Öncelikle hücre metabolizmasındaki değişikliklere odaklandık. Yüksek glukoz ve insülin uygulanan kanser hücrelerinde c-Met aktivasyonuna paralel olarak Warburg etkisini destekleyen bulgular elde ettik. Hücre metabolizma profillemeye çalışmalarımız hücrelerin glikolitik metabolizmayı aktive ettiğini gösterdi. Buna ek olarak ayrıca oksidatif fosforilasyonun da arttığını belirledik. Hücrelerin genel enerji kullanma potansiyeli oldukça artış gösterdi. Literatürde insülin reseptörü izoform seçiliminin de hepatokarsinogenezi ve progresyonu desteklediğini gösteren çalışmalar yer almaktadır (118,128). IR-B daha çok hücre metabolizması ile ilişkili olayları yönetirken, IR-A ekspresyonu hücre proliferasyonu ve motilite gibi yeteneklerin kazanılmasında seçim sağlamaktadır (128). Çalışmamızın son bölümünde gösterdiğimiz gibi, hücre metabolizmasındaki bu değişiklikleri incelemek için IR-A ve

IR-B vektörlerini transfekte ederek ve c-Met'i inhibe ettiğimiz ve etmediğimiz koşullarda hücre metabolizmasını profileledik. Sonuçlarımıza göre literatür ile uyumlu şekilde IR-B'nin yüksek glukoz ve insüline yanıtı IR-A eksprese eden hücrelerden daha yüksek olarak bulundu. Hangi IR izoformunun eksprese olduğundan bağımsız olarak, c-Met inhibitörü SU11274 uygulaması ise hem oksidatif yolağı hem de glikolitik yolağı etkilemektedir. Böylece HCC tedavisinde c-Met inhibisyonunun hücrelerin metabolik kapasitelerini baskılayarak önemli bir yolağı hedef aldığını görmekteyiz. Ancak bulgularımız in vitro koşullarda elde edilmiştir ve in vivo çalışmalarla ve hasta örneklerinde yapılacak incelemelerle desteklenmelidir.

Hücrede glukoz metabolizmasında regülatör görevi olan enzimlerin ekspresyonu da incelenmiştir. Özellikle PDK1 düzeyindeki YGYİ uyarımında görülen anlamlı artışın c-Met inhibitörü ile geri döndürülmesi ve paralel şekilde *PHKG1*'in ekspresyonundaki baskılanmanın SU11274 ile geri döndürülmesi hücrede c-Met aracılıklı yaşanan metabolik değişim açısından önemli bir ipucudur. Piruvat dehidrogenaz kinaz 1, hücrede özellikle piruvat dehidrogenazı (PDH) fosforilleyerek, inaktivasyonundan sorumludur. Böylece glukoz-yağ asidi metabolizmasında önemli bir düzenleyici role sahiptir. Mitokondri kavşağında metabolit akısını (metabolite flux) düzenleyerek piruvattan asetil koenzim-A oluşumunu düşürür. Böylece aerobik solunumu baskılar, hücrenin metabolizmasının glikolize geçişini sağlayarak Warburg etkisinin görülmesinde önem taşır (134,135). Özellikle glukoz bağımlı tümörlerde inhibisyonunun önemli bir antikanser tedavi yöntemi olduğu savunulmaktadır.

Çalışmamızda *PDK1* ekspresyonuna karşıt düzeyde seyreden; YGYİ ile anlamlı oranda ekspresyonu düşen ve SU11274 kullanımı ile ekspresyonu artan genlerden birisi piruvat dehidrogenaz fosfataz regülatör alt ünitesi olan PDPR olarak belirlenmiştir. PDK'e ters olarak piruvatın oksidatif dekarboksilasyonundan sorumludur, yani piruvatın TCA siklusuna girmesinde ve yağ asidi sentezlenmesinde görev almaktadır. YGYİ ile baskılanması sonucu hücre metabolizmasının glikolitik yolağı tercih etmesi sağlanır.

Özetle YGYİ varlığında PDK seviyesi artar, piruvat dehidrogenaz (PDH) fosforlanır ve aktivasyonu baskılanır. Bu sırada PDPR düzeyi de düşürülür ve defosforilasyonu da baskılanmış olur. Aktivasyonu düşürülen PDH, piruvatın TCA siklusuna ve yağ asidi sentez yolağına girmesini sağlayan reaksiyonu katalizleyemez.

Glikoz glikolitik yıkım ile devam eder ve hücre metabolizması Warburg etkisine geçiş yapar. Bu etkilerin SU11274 ile azalması ise, c-Met'in bu metabolik geçişte önemli bir rolü olduğunu ve kanser metabolizmasında regülatör görevi üstlendiğini göstermektedir.

PDPR'ye benzer şekilde ekspresyonu değişen bir diğer gen *PHKG1* olarak saptanmıştır. *PHKG1*, fosforilaz B kinazın (PHK) katalitik ünitesinde görevlidir ve glikojen fosforilazı regüle ederek glikojen yıkımından sorumludur. Bu sürecin YGYİ ile baskılanması, yani ortamda yüksek miktarda glukoz ve insülin bulunmaktayken glikojen yıkımının inhibe edilmesi hücre metabolizması açısından mantıklıdır ve hücrenin kaynaklarını etkili kullandığını düşündürmektedir. Ayrıca 12 hastadan elde edilen karaciğer sirotik nodülde gerçekleştirilen genom boyunca ekspresyon analizinde, *PHKG1* downregüle olduğu belirlenen genler arasındadır (136). Bu nodüllerde c-Met ligandı HGF ve insülin benzeri büyüme faktörlerinin de upregüle olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmasının devamında, Erk, Akt ve STAT3 gibi proteinlerin de downstreaminde yer alan, hem metabolizma ile ilişkili ve hem HCC sürecinde rol aldığı bilinen transkripsiyon faktörlerini ve molekülleri inceledik. Bu faktörlerden PGC-1 α ve ilişkili olduğu IR sinyalleşmesi temel molekülleri IRS-1 ve IRS-2 değişimine baktığımızda yüksek glukoz ve insülin uyarımı sonucu literatür ile uyumlu şekilde PGC-1 α 'nın nükleer lokalizasyonunun arttığını, IRS-1'in de nükleer lokalizasyonunun arttığını ancak IRS-2 lokalizasyonunda bir değişim olmadığını belirledik. Literatürde yer alan diethylnitrosamine (DEN) ile indüklenmiş fare hepatosellüler karsinoma modelinde IRS-1 ekspresyonunun insülin yolağı aktivasyonu ile arttığı ve tümör dokularında yoğunlaştığı, IRS-2 ekspresyonunun ise değişmediği belirlenmiştir (137). Tümör hücrelerinde IRS'in nükleer lokalizasyonunun arttığı tanımlanmıştır (138). Benzer şekilde bu deney modelinde yüksek glukoz ve insülin ile PGC-1 α gibi IRS-1 nükleer lokalizasyonunda artış olmuştur ancak IRS-2 lokalizasyonunda bir değişim gözlenmemiştir. IRS-2 hücre invazyonu, proliferasyon ve sağkalım ile ilişkili bir moleküldür. Sun ve ark. gerçekleştirdiği bir çalışmada IRS-2 adaptör proteininin insülin uyarımı ile meme kanseri hücrelerinde nükleer translokasyonunun arttığı gösterilmiştir, ayrıca IRS-2'nin kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı ve bağlanma-bağımsız olarak hücre büyümesini gerçekleştirdiği belirlenmiştir (139). Aynı çalışmada IRS-2'nin

farklı reseptör bağlanma domainlerinin olması sebebiyle seçici olarak aktive olduğu ve nükleusa giderek siklin-D1 promotoruna bağlandığı belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında, çalışmamızdaki IRS-2'nin nükleer lokalizasyonunun yüksek glukoz ve insülin ile artarken c-Met inhibitörü ile düşmesi beraber değerlendirildiğinde c-Met inhibisyonunun insülin sinyalleşmesinin alt mekanizmalarını da etkilediğini ve böylece de hücre proliferasyonu, motilitesi üzerine etki edebileceğini düşündürmüştür.

Laboratuvarımızda HCC ile ilişkili olduğu daha önce belirlenen proteinlerden Egr1 ve TXNIP düzeyleri incelendiğinde; *EGR* ekspresyon düzeyinin hücre bağımlı olarak arttığı ya da azaldığı, *TXNIP*'in ise hem SK-Hep1 hem de HUH-7 hücrelerinde YGYİ bağımlı olarak arttığı belirlenmiştir. TXNIP, SKHep1 hücrelerinde bazalda yüksek düzeyde, HUH-7 hücrelerinde ise düşük düzeyde bulunmaktadır (140). SU11274'ün HUH-7 hücrelerinde *TXNIP* ekspresyon düzeyini düşürmede başarılı olması ancak SK-Hep1 hücrelerinde başarısız olması inhibitör dozunun yetersiz kaldığını düşündürmektedir. Ayrıca bu proteinlerin ekspresyon düzeyleri değişme bile hücresel lokalizasyonları ile etkileri değişebileceği için, aktivitelerinin kontrolü SU11274 ile değişebilmektedir. Bu sebeple ileri deneylerle TXNIP ve Egr1'in hücre lokalizasyonunun incelenmesi ve lusiferaz deneyi gibi çalışmalarla sorumlu oldukları gen ekspresyonlarının belirlenmesi önemlidir ve ileri bir çalışma konusudur.

c-Met'in YGYİ bağımlı hücre metabolizmasına ek olarak etki gösterdiği biyolojik yanıtlar arasında proliferasyon, sferoid oluşumu, motilite ve metastaz kapasitesi incelenmiştir. Yüksek glukoz ve insülin uyarımı beraber ya da ayrı ayrı yapıldığında da hücrelerin proliferasyonlarının arttığı ancak bu yanıtın c-Met inhibitörü kullanımıyla baskılanmadığı belirlenmiştir. Gerçekleştirdiğimiz yara iyileşmesi, boyden chamber ile hücre motilite ve zebrabalığı metastaz çalışmalarına göre yüksek glukoz ve/veya insülin uygulamaları hücre motilitesini ve invazyon kapasitesini arttırmaktadır. Proliferasyonun aksine bu hücresel yetenekler c-Met inhibisyonu ile baskılanmaktadır. Bu bulgu c-Met'in HCC'de hücre proliferasyonu üzerinden değil ancak hücrelerin motilite ve invazyonu üzerinden etki gösterdiğini bir kez daha doğrulamaktadır.

Yüksek insülin uygulamasının gen ve protein ekspresyonlarındaki etkisini inceleyen bir meta-analizde, insülin tarafından aktive edilen Erk'in *EGR* ekspresyon artışını sağladığı, Egr1'in ise gamma-actin geninin (*ACTG1*) ekspresyonunu

düzenleyerek hücre motilitesini arttırdığı bağlantısı kurulmuştur (141). Bu çalışmadan sonra araştırmamızın devamında ACTG genindeki değişiklikleri inceledik ve Met overeksprese eden klonlarda ve HCC hücrelerinde YGYİ ile anlamlı düzeyde artış gösterdiğini belirledik. Gamma aktinin polimerize olması ile oluşan F aktin fibrillerini de phalloidin çalışması ile inceledik. Bu çalışma ile de hem F aktin düzeyinin arttığını, hem de hücrenin motil karakterinin oluşmasını sağlayan organizasyonun arttığını belirledik. Ayrıca starvasyonda neredeyse gözlenmeyen ancak özellikle YGYİ uygulaması ile artan, hücrelerde belirgin uzantılar saptanmıştır. Bu uzantıların tünel nanotüpler (Tunneling nanotubes, TNTs) olarak literatürde yer almaktadır, hücre-hücre iletişimde ve hücreden hücreye doğrudan kargo taşınmasında görev aldığı bilinmektedir (142). Bu tüplerden hücrelerin protein, RNA, virüs ve hatta mitokondri gibi organelleri birbirine aktardığı görülmüştür. Özellikle metabolit ve mitokondri aktarımı, hücrelerin metabolik olarak senkronize olması için önemlidir (143). İleri çalışmalar ile YGYİ uygulamasında arttığı gözlemlenen bu nanotünellerin rolünün aydınlatılması heyecan vericidir. Bu nanotünellerde aktive c-Met ve IR'nün hücreden hücreye taşınması olasıdır.

Gerçekleştirilen biyolojik etki deneylerinden birisi de sferoid oluşumu deneyidir. Hücrelerin matrijel içinde serumdan bağımsız üç boyutlu ortamda koloni oluşturma yetenekleri incelenmiştir. Elde edilen verilerde glukoz ve insülin bakımından starve hücrelerde sferoid oluşumu gözlemlenmemiştir. YGYİ uyarımı ve pozitif kontrol olarak HGF uyarımı sferoid oluşumunu artmıştır. SU11274 uygulaması ise sferoid sayısında anlamlı fark yaratmazken, büyüklüğü ve motilite/invazyon ile ilişkili invadopodial yapıların oluşumundan azalma meydana gelmiştir. İnvadopodial yapılar aktin organizasyonu yönünden zengin, ekstrasellüler matriks yıkımında aktif, invazyon ile ilişkili yapılardır ve oluşumları metastaz sürecinde önemlidir (144).

Elde edilen verilerle ilişkili olan EMT ve kanser kök hücre belirteçlerinden bazılarının gen ekspresyon düzeyleri de incelenmiştir. Sonuçlarımıza göre YGYİ ile, bilinen bir HCC belirteci olan alfa-fetoproteini kodlayan *AFP* ekspresyon düzeyi anlamlı oranda artmıştır. İnvazyon ile ilişkili ve önceki verilerimizi de tamamlayıcı olarak *MMP15* gen ekspresyonunda da artış görülmüştür. Epitelyal karakter ile ilişkili E-cadherin ekspresyon düzeyi SU11274 uygulaması ile artarken, mezenkimal karakter ile ilişkili N-cadherin RNA seviyesi YGYİ ile artmıştır. Ancak beklenilenin aksine EMT transkripsiyon

faktörlerinden Vimentin ya da Slug RNA ekspresyon düzeyleri YGYİ ile artmamıştır. Diğer önemli EMT belirteçleri *Twist* ve *ZEB* ekspresyonları ve hücre iskeleti elemanlarından epitelyal karakter ile ilişkili sitokeratin 18 ve 19 (K18, K19) düzeylerinin de incelenmesi, sürecin anlaşılması için önem taşımaktadır. Elde edilen RNA örnekleri 16 saat indüksiyon örnekleridir, EMT belirteçlerinde RNA düzeyinde fark görmek için bu süre uygun olmayabilir. İleri deneylerde protein düzeyindeki farka bakmak daha aydınlatıcı sonuçlar verebilir.

İnsülin reseptörü A ve B olarak iki izoformda bulunur, IR-B genellikle erişkin hücrelerde dominant form olarak yer alırken IR-A:IR-B ekspresyon oranı embriyonik dönemde ve malignant hücrelerde IR-A yönünde artış gösterir (123). IR-A'nın hücrenin mitojenik faaliyetlerini kontrol etme özelliği bulunduğu belirlenmiştir. İnsülin reseptörü izoformlarının HCC sürecindeki önemi, son yıllarda yayınlanan çalışmalarda önem kazanmıştır. Fransız bir kohortta 85 HCC hastasında %40'tan fazla oranda IR overekspresyonu bulunurken, %70'inden fazlasında IR-A yönünde selektif izoform ekspresyonu gözlenmiştir (128). Bu hastalarda sitokeratin 19 ve AFP düzeyleri de anlamlı olarak artmıştır ve IR-A ekspresyonu ile korreledir. Ayrıca oluşturulan IR izoform spesifik hücre klonlarında yapılan hücre kültürü deneylerinde, IR-A klonlarının diğer hücrelere kıyasla motilite, invazyon karakterlerinin arttığı belirlenmiştir. Çalışmalarımıza oldukça tamamlayıcı olan bu araştırmayı yürüten grup ile gerçekleştirdiğimiz temas sonunda, bilimsel bir ortaklık kurduk ve HUH-7 hücre klonlarını temin ettik. IR klonlarında gerçekleştirdiğimiz deneylerde IR-A izoformunu eksprese eden klonlarda; *EGR* ve *ACTG1* genlerinde anlamlı bir artış görürken, *MET* ve *TXNIP* gen düzeylerinde anlamlı bir artış görmedik. IR-B klonlarında ise *MET*, *TXNIP* ve *ACTG* gen düzeylerinde anlamlı oranda azalış görürken, *EGR* ekspresyonunda fark görmedik. Bu sonuçlar, daha invaziv karakter kazandıran IR-A izoform ekspresyonunun c-Met ile korrelasyonunun önemini vurguladı. Bu nedenle c-Met eksprese eden ve etmeyen SNU-398 klonlarında IR izoform ekspresyonlarını inceledik. c-Met overeksprese eden klonda mock hücrelerine kıyasla IR-A ekspresyonunda oldukça anlamlı bir artış saptadık. Ayrıca hem mock hem de c-Met overeksprese klonlarda YGYİ uyarımı ile IR-A'nın anlamlı düzeyde arttığını belirledik. Böylece c-Met'in ekspresyonunun IR ekspresyonunda regülatör görevi görebileceğini gördük. İleri

çalışmalarda IR izoformlarının seçici oluşumundan sorumlu alternatif splicing elemanlarının araştırılması, daha aydınlatıcı verilerin elde edilmesini sağlayacaktır. Son olarak IR izoform klonlarında YGYİ ile uyarılan c-Met aktivasyonunda fark olup olmadığını western blot yöntemi ile belirledik. Sonuçlarımıza göre IR-A klonu hücrelerinde, YGYİ ile c-Met aktivasyonu daha yüksek düzeydedir. Bu da bize YGYİ koşullarında IR-A'nın seçici olarak c-Met ile etkileşiyor olabileceğini düşündürmektedir.

Bulgularımız ile birlikte c-Met inhibitörleri ile yapılan klinik deneme sonuçları değerlendirildiğinde, c-Met inhibitörlerinin klinik çalışmalarda tek başına neden yetersiz olduğu ve neden kombinasyon tedavilerinde daha başarılı olduğu bir bakıma anlam kazanmaktadır. Örneğin çalışmalarımızda kullandığımız HNMPA-(AM)3 IR inhibitörü gibi hücre proliferasyonunu da baskılayıcı bir ajan ile birlikte c-Met'in inhibe edilmesi, özellikle obezite temelinde HCC gelişen hastalarda önemli bir alternatif tedavi yöntemi olarak ele alınabilir. Literatürde insülin reseptörü inhibisyonunun ve insülin sensitize edici ajanların kullanımının meme kanserinde toplam tümör yükünü azalttığını ve progresyonu olumlu etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (145).

Çalışmamızın obezite ile ilişkili farklı kanser türlerinde de tekrarlanması; ve ayrıca IR'nn diğer tirozin kinazlarla da etkileşime girerek ligand bağımsız reseptör aktivasyonunu sağlamadaki genel rolünün araştırılması kanser gelişimi ve ilerlemesi sürecinde yeni bir mekanizma tanımlanmasını sağlayabilir.

Bu alışma ile birlikte kanser hastalarında insülin düzeylerinin yalnızca metabolik bir belirteç düzeyinden fazlası olabileceği, özellikle obezite temelinde gelişen kanserlerde terapi düzenlemesinde yeri olabileceği ve mitojenik etkisinin önemi vurgulanmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamıza konu olan araştırmamız sonucunda literatürde ilk kez obezite temelinde gelişen yüksek glukoz ve insülinin c-Met'i karaciğer kanseri hücrelerinde aktive ettiği gösterilmiştir. İlk kez yüksek glukoz ve insülin uyarımı ile c-Met'in insülin reseptörü ile heterodimerizasyonunun arttığını gösterdik. Heterodimerizasyon ile aktive olan c-Met'in alt yolağının da aktive olduğunu ve bu aktivasyon ile hücre proliferasyonu, motilitesi ve invazyonunun yükseldiğini belirledik. c-Met'in bilinen paternine benzer şekilde inhibisyonunun proliferasyon kapasitesini etkilemediğini ancak hücre motilitesini ve invazyonunu baskıladığını belirledik. c-Met inhibitörüne ek olarak IR inhibitörünün kullanımının ise proliferasyonu baskılamakta başarılı olduğunu, motilite ve invazyonu ise daha da baskıladığını belirledik. Böylece iki reseptörün beraber inhibisyonunun HCC'de önemli bir tedavi yaklaşımı olarak önem taşıyabileceğini ilk kez önerdik. c-Met'in HCC hücre metabolizmasındaki regülatör rolü, özellikle piruvat oluşumu üzerindeki etkisi de araştırmamız ile belirlenmiştir. Ayrıca c-Met'in spesifik IR izoformları ile ilişkisi ilk kez değerlendirilmiştir ve IR-A ile olası selektif etkileşiminin incelenmesinin HCC gelişiminde önemli olduğu ilk kez ortaya atılmıştır.

Bulgularımız ışığında hasta odaklı, kişiselleştirilmiş tedavinin ne kadar önemli olduğu bir kez daha vurgulanmıştır.

Çalışmamız; obezitenin global olarak artışından kaynaklı gelişen kanser türlerinde obezite odaklı, hiperglisemik ve hiperinsülinemik hastalara özel tedavi yöntemlerinin uygulanmasının, bu hastalarda c-Met pozitifliği fazla ise c-Met ve IR'nün birlikte inhibisyonunun iyi bir yaklaşım olabileceğini, hatta reseptör dimerizasyonunu engelleyen yeni nesil inhibitörlerin ya da dual reseptör inhibisyonunu sağlayan antikorların üretilmesinin tedavide önemli bir basamak olabileceğini önermektedir.

6. KAYNAKLAR

- 1.** Fitzmaurice C, Allen C, Barber R M, Barregard L, ve ark. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived with Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2017, 3(4), 524-48.
- 2.** Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R L, ve ark. Global Cancer Statistics 2018: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2018, 68(6), 394-424.
- 3.** El-Serag H B. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med.* 2011, 365(12), 1118-27.
- 4.** Li C I, Chen H J, Lai H C, Liu C S, ve ark. Hyperglycemia and Chronic Liver Diseases on Risk of Hepatocellular Carcinoma in Chinese Patients with Type 2 Diabetes-National Cohort of Taiwan Diabetes Study. *International Journal of Cancer.* 2015, 136(11), 2668-79.
- 5.** Prieto J, Melero I ve Sangro B. Immunological Landscape and Immunotherapy of Hepatocellular Carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015, 12(12), 681-700.
- 6.** Yilmaz Y, Erdal E, Atabey N ve Carr B I Platelets, Microenvironment and Hepatocellular Carcinoma. *Biochem Anal Biochem.* 2016, 5(281), 2161-1009.
- 7.** Personeni N, Pressiani T, Santoro A ve Rimassa L. Regorafenib in Hepatocellular Carcinoma: Latest Evidence and Clinical Implications. *Drugs Context.* 2018, 7 212533.
- 8.** Weledji E P, Enow Oroch G, Ngowe M N ve Nsagha D S. How Grim Is Hepatocellular Carcinoma? *Ann Med Surg (Lond).* 2014, 3(3), 71-6.
- 9.** O'Rourke J M, Sagar V M, Shah T ve Shetty S. Carcinogenesis on the Background of Liver Fibrosis: Implications for the Management of Hepatocellular Cancer. *World J Gastroenterol.* 2018, 24(39), 4436-47.
- 10.** Anstee Q M, Reeves H L, Kotsiliti E, Govaere O, ve ark. From Nash to Hcc: Current Concepts and Future Challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019, 16(7), 411-28.
- 11.** Desai A, Sandhu S, Lai J P ve Sandhu D S. Hepatocellular Carcinoma in Non-Cirrhotic Liver: A Comprehensive Review. *World J Hepatol.* 2019, 11(1), 1-18.

- 12.** Schutte K, Schulz C, Poranzke J, Antweiler K, ve ark. Characterization and Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma (Hcc) in the Non-Cirrhotic Liver. BMC Gastroenterol. 2014, 14 117.
- 13.** McGlynn K A, Petrick J Lve El-Serag H B. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. Hepatology. 2020.
- 14.** De Mitri M S, Poussin K, Baccarini P, Pontisso P, ve ark. Hcv-Associated Liver Cancer without Cirrhosis. Lancet. 1995, 345(8947), 413
- 15.** Davis C R. Interventional Radiological Treatment of Hepatocellular Carcinoma. Cancer Control. 2010, 17(2), 87-99.
- 16.** Chiang C J, Yang Y W, You S L, Lai M S, ve ark. Thirty-Year Outcomes of the National Hepatitis B Immunization Program in Taiwan. JAMA. 2013, 310(9), 974-6.
- 17.** Wu H Cve Santella R. The Role of Aflatoxins in Hepatocellular Carcinoma. Hepat Mon. 2012, 12(10 HCC), e7238.
- 18.** Forrester L M, Neal G E, Judah D J, Glancey M J, ve ark. Evidence for Involvement of Multiple Forms of Cytochrome P-450 in Aflatoxin B1 Metabolism in Human Liver. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990, 87(21), 8306-10.
- 19.** Testino G, Leone Sve Borro P. Alcohol and Hepatocellular Carcinoma: A Review and a Point of View. World J Gastroenterol. 2014, 20(43), 15943-54.
- 20.** Testino G. Alcoholic Hepatitis. J Med Life. 2013, 6(2), 161-7.
- 21.** Seitz H K ve Stickel F. Molecular Mechanisms of Alcohol-Mediated Carcinogenesis. Nat Rev Cancer. 2007, 7(8), 599-612.
- 22.** Obesity and Overweight, WHO, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>, erişim: 21.06.2020
- 23.** Kelly T, Yang W, Chen C S, Reynolds K, ve ark. Global Burden of Obesity in 2005 and Projections to 2030. Int J Obes (Lond). 2008, 32(9), 1431-7.
- 24.** Ward Z J, Bleich S N, Cradock A L, Barrett J L, ve ark. Projected U.S. State-Level Prevalence of Adult Obesity and Severe Obesity. N Engl J Med. 2019, 381(25), 2440-50.
- 25.** Seyda Seydel G, Kucukoglu O, Altinbasv A, Demir O O, ve ark. Economic Growth Leads to Increase of Obesity and Associated Hepatocellular Carcinoma in Developing Countries. Ann Hepatol. 2016, 15(5), 662-72.

- 26.** Davila J A, El-Serag H B. The rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. *Gastroenterology*. 2012, 142(suppl 1), S914.
- 27.** Yang J D, Ahmed F, Mara K C, Addissie B D, ve ark. Diabetes Is Associated with Increased Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Cirrhosis from Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology*. 2020, 71(3), 907-16.
- 28.** Font-Burgada J, Sun Bve Karin M. Obesity and Cancer: The Oil That Feeds the Flame. *Cell Metab*. 2016, 23(1), 48-62.
- 29.** Hopkins B D, Goncalves M Dve Cantley L C. Obesity and Cancer Mechanisms: Cancer Metabolism. *J Clin Oncol*. 2016, 34(35), 4277-83.
- 30.** Bakiri Lve Wagner E F. Mouse Models for Liver Cancer. *Mol Oncol*. 2013, 7(2), 206-23.
- 31.** Hanahan Dve Weinberg R A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011, 144(5), 646-74.
- 32.** O'Sullivan T A, Oddy W H, Bremner A P, Sherriff J L, ve ark. Lower Fructose Intake May Help Protect against Development of Nonalcoholic Fatty Liver in Adolescents with Obesity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014, 58(5), 624-31.
- 33.** Jung U Jve Choi M S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2014, 15(4), 6184-223.
- 34.** Di Minno M N, Russolillo A, Lupoli R, Ambrosino P, ve ark. Omega-3 Fatty Acids for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *World J Gastroenterol*. 2012, 18(41), 5839-47.
- 35.** Dominguez-Perez M, Nuno-Lambarri N, Clavijo-Cornejo D, Luna-Lopez A, ve ark. Hepatocyte Growth Factor Reduces Free Cholesterol-Mediated Lipotoxicity in Primary Hepatocytes by Countering Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2016, 2016 7960386.
- 36.** Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, Font-Burgada J, ve ark. Er Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger Tnf-Dependent Spontaneous Hcc Development. *Cancer Cell*. 2014, 26(3), 331-43.

- 37.** Li C I, Chen H J, Lai H C, Liu C S, ve ark. Hyperglycemia and Chronic Liver Diseases on Risk of Hepatocellular Carcinoma in Chinese Patients with Type 2 Diabetes-
-National Cohort of Taiwan Diabetes Study. *International Journal of Cancer*. 2015, 136(11), 2668-79.
- 38.** Lu J. The Warburg Metabolism Fuels Tumor Metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2019, 38(1-2), 157-64.
- 39.** Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science*. 1956, 123(3191), 309-14.
- 40.** Hsu P Pve Sabatini D M. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell*. 2008, 134(5), 703-7.
- 41.** Bonnet S, Archer S L, Allalunis-Turner J, Haromy A, ve ark. A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell*. 2007, 11(1), 37-51.
- 42.** Takahashi H, Mizuta T, Eguchi Y, Kawaguchi Y, ve ark. Post-Challenge Hyperglycemia Is a Significant Risk Factor for the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2011, 46(6), 790-8.
- 43.** Niwa Y, Ishikawa K, Ishigami M, Honda T, ve ark. Effect of Hyperglycemia on Hepatocellular Carcinoma Development in Diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015, 463(3), 344-50.
- 44.** DeBerardinis R Jve Chandel N S. Fundamentals of Cancer Metabolism. *Sci Adv*. 2016, 2(5), e1600200.
- 45.** Hosokawa T, Kurosaki M, Tsuchiya K, Matsuda S, ve ark. Hyperglycemia Is a Significant Prognostic Factor of Hepatocellular Carcinoma after Curative Therapy. *World J Gastroenterol*. 2013, 19(2), 249-57.
- 46.** Yu W, Wang Yve Liao G. Blood Sugar Level Affects the Recurrence of Hepatocellular Carcinoma after Laparoscopic Surgery: A Retrospective Study. *J BUON*. 2018, 23(3), 622-8.
- 47.** Khan M M, Saito S, Takagi S, Ohnishi H, ve ark. Relationship between Hepatocellular Carcinoma and Impaired Glucose Tolerance among Japanese. *Hepatogastroenterology*. 2006, 53(71), 742-6.
- 48.** Jabir N R, Ahmad Sve Tabrez S. An Insight on the Association of Glycation with Hepatocellular Carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 2018, 49 56-63.

- 49.** Takeuchi M, Sakasai-Sakai A, Takata T, Ueda T, ve ark. Serum Levels of Toxic Ages (Tage) May Be a Promising Novel Biomarker in Development and Progression of Nash. *Med Hypotheses*. 2015, 84(5), 490-3.
- 50.** Chouhan S, Singh S, Athavale D, Ramteke P, ve ark. Glucose Induced Activation of Canonical Wnt Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma Is Regulated by Dkk4. *Sci Rep*. 2016, 6 27558.
- 51.** Czech M P. Insulin Action and Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes. *Nat Med*. 2017, 23(7), 804-14.
- 52.** Rahman R, Hammoud G M, Almashhrawi A A, Ahmed K T, ve ark. Primary Hepatocellular Carcinoma and Metabolic Syndrome: An Update. *World J Gastrointest Oncol*. 2013, 5(9), 186-94.
- 53.** Wolpin B M, Bao Y, Qian Z R, Wu C, ve ark. Hyperglycemia, Insulin Resistance, Impaired Pancreatic Beta-Cell Function, and Risk of Pancreatic Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2013, 105(14), 1027-35.
- 54.** Goodwin P J, Ennis M, Pritchard K I, Trudeau M E, ve ark. Fasting Insulin and Outcome in Early-Stage Breast Cancer: Results of a Prospective Cohort Study. *J Clin Oncol*. 2002, 20(1), 42-51.
- 55.** Dankner R, Shanik M H, Keinan-Boker L, Cohen C, ve ark. Effect of Elevated Basal Insulin on Cancer Incidence and Mortality in Cancer Incident Patients: The Israel Goh 29-Year Follow-up Study. *Diabetes Care*. 2012, 35(7), 1538-43.
- 56.** Chettouh H, Lequoy M, Fartoux L, Vigouroux C, ve ark. Hyperinsulinaemia and Insulin Signalling in the Pathogenesis and the Clinical Course of Hepatocellular Carcinoma. *Liver Int*. 2015, 35(10), 2203-17.
- 57.** Rhee E J, Lee W Y, Cho Y K, Kim B I, ve ark. Hyperinsulinemia and the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Nondiabetic Adults. *Am J Med*. 2011, 124(1), 69-76.
- 58.** Bril F, Lomonaco R, Orsak B, Ortiz-Lopez C, ve ark. Relationship between Disease Severity, Hyperinsulinemia, and Impaired Insulin Clearance in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. 2014, 59(6), 2178-87.

- 59.** Donadon V, Balbi Mve Zanette G. Hyperinsulinemia and Risk for Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Liver Diseases and Type 2 Diabetes Mellitus. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009, 3(5), 465-7.
- 60.** Balkau B, Kahn H S, Courbon D, Eschwege E, ve ark. Hyperinsulinemia Predicts Fatal Liver Cancer but Is Inversely Associated with Fatal Cancer at Some Other Sites: The Paris Prospective Study. *Diabetes Care.* 2001, 24(5), 843-9.
- 61.** Chao L T, Wu C F, Sung F Y, Lin C L, ve ark. Insulin, Glucose and Hepatocellular Carcinoma Risk in Male Hepatitis B Carriers: Results from 17-Year Follow-up of a Population-Based Cohort. *Carcinogenesis.* 2011, 32(6), 876-81.
- 62.** Aleksandrova K, Boeing H, Nothlings U, Jenab M, ve ark. Inflammatory and Metabolic Biomarkers and Risk of Liver and Biliary Tract Cancer. *Hepatology.* 2014, 60(3), 858-71.
- 63.** Evert M, Calvisi D F, Evert K, De Murtas V, ve ark. V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog/Mammalian Target of Rapamycin Activation Induces a Module of Metabolic Changes Contributing to Growth in Insulin-Induced Hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2012, 55(5), 1473-84.
- 64.** Perry R J, Shulman G I. Mechanistic Links between Obesity, Insulin, and Cancer. *Trends Cancer.* 2020, 6(2), 75-78.
- 65.** Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Casini A, ve ark. Insulin and Insulin-Like Growth Factor-1 Stimulate Proliferation and Type I Collagen Accumulation by Human Hepatic Stellate Cells: Differential Effects on Signal Transduction Pathways. *Hepatology.* 1999, 29(6), 1743-51.
- 66.** Qiao J G, Wu L, Lei D Xve Wang L. Insulin Promotes Sinusoidal Endothelial Cell Proliferation Mediated by Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor in Regenerating Rat Liver after Partial Hepatectomy. *World J Gastroenterol.* 2005, 11(38), 5978-83.
- 67.** Coleman D T, Gray A L, Kridel S Jve Cardelli J A. Palmitoylation Regulates the Intracellular Trafficking and Stability of C-Met. *Oncotarget.* 2016, 7(22), 32664-77.
- 68.** Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier Cve Vande Woude G. Targeting Met in Cancer: Rationale and Progress. *Nat Rev Cancer.* 2012, 12(2), 89-103.

- 69.** Bradley C A, Salto-Tellez M, Laurent-Puig P, Bardelli A, ve ark. Targeting C-Met in Gastrointestinal Tumours: Rationale, Opportunities and Challenges. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018, 15(3), 150.
- 70.** Garajova I, Giovannetti E, Biasco G ve Peters G J. C-Met as a Target for Personalized Therapy. *Transl Oncogenomics.* 2015, 7(Suppl 1), 13-31.
- 71.** Lorenzato A, Olivero M, Patane S, Rosso E, ve ark. Novel Somatic Mutations of the Met Oncogene in Human Carcinoma Metastases Activating Cell Motility and Invasion. *Cancer Res.* 2002, 62(23), 7025-30.
- 72.** Rimassa L, Assenat E, Peck-Radosavljevic M, Pracht M, ve ark. Tivantinib for Second-Line Treatment of Met-High, Advanced Hepatocellular Carcinoma (Metiv-Hcc): A Final Analysis of a Phase 3, Randomised, Placebo-Controlled Study. *Lancet Oncol.* 2018, 19(5), 682-93.
- 73.** Firtina Karagonlar Z, Koc D, Iscan E, Erdal E, ve ark. Elevated Hepatocyte Growth Factor Expression as an Autocrine C-Met Activation Mechanism in Acquired Resistance to Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Sci.* 2016, 107(4), 407-16.
- 74.** Organ S L ve Tsao M S. An Overview of the C-Met Signaling Pathway. *Ther Adv Med Oncol.* 2011, 3(1 Suppl), S7-S19.
- 75.** Deying W, Feng G, Shumei L, Hui Z, ve ark. Caf-Derived Hgf Promotes Cell Proliferation and Drug Resistance by up-Regulating the C-Met/Pi3k/Akt and Grp78 Signalling in Ovarian Cancer Cells. *Biosci Rep.* 2017, 37(2).
- 76.** Ding X, Ji J, Jiang J, Cai Q, ve ark. Hgf-Mediated Crosstalk between Cancer-Associated Fibroblasts and Met-Unamplified Gastric Cancer Cells Activates Coordinated Tumorigenesis and Metastasis. *Cell Death Dis.* 2018, 9(9), 867.
- 77.** Maroun C R ve Rowlands T. The Met Receptor Tyrosine Kinase: A Key Player in Oncogenesis and Drug Resistance. *Pharmacol Ther.* 2014, 142(3), 316-38.
- 78.** Lee C ve Cheung S T. Stat3: An Emerging Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2019, 11(11).
- 79.** Zhang B ve Finn R S. Personalized Clinical Trials in Hepatocellular Carcinoma Based on Biomarker Selection. *Liver Cancer.* 2016, 5(3), 221-32.

- 80.** Furcht C M, Buonato J M, Skuli N, Mathew L K, ve ark. Multivariate Signaling Regulation by Shp2 Differentially Controls Proliferation and Therapeutic Response in Glioma Cells. *J Cell Sci.* 2014, 127(Pt 16), 3555-67.
- 81.** Peschard P, Fournier T M, Lamorte L, Naujokas M A, ve ark. Mutation of the C-Cbl Tkb Domain Binding Site on the Met Receptor Tyrosine Kinase Converts It into a Transforming Protein. *Mol Cell.* 2001, 8(5), 995-1004.
- 82.** Zhang J, Babic A. Regulation of the Met Oncogene: Molecular Mechanisms. *Carcinogenesis.* 2016, 37(4), 345-55.
- 83.** Chen R, Li J, Feng C H, Chen S K, ve ark. C-Met Function Requires N-Linked Glycosylation Modification of Pro-Met. *J Cell Biochem.* 2013, 114(4), 816-22.
- 84.** Giordano S, Di Renzo M F, Narsimhan R P, Cooper C S, ve ark. Biosynthesis of the Protein Encoded by the C-Met Proto-Oncogene. *Oncogene.* 1989, 4(11), 1383-8.
- 85.** Santoro A, Rimassa L, Borbath I, Daniele B, ve ark. Tivantinib for Second-Line Treatment of Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Randomised, Placebo-Controlled Phase 2 Study. *Lancet Oncol.* 2013, 14(1), 55-63.
- 86.** Bozkaya G, Korhan P, Cokakli M, Erdal E, ve ark. Cooperative Interaction of Muc1 with the Hgf/C-Met Pathway During Hepatocarcinogenesis. *Mol Cancer.* 2012, 11 64.
- 87.** Ozen E, Gozukizil A, Erdal E, Uren A, ve ark. Heparin Inhibits Hepatocyte Growth Factor Induced Motility and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells through Early Growth Response Protein 1. *PLoS One.* 2012, 7(8), e42717.
- 88.** Korhan P, Erdal E, Kandemis E, Cokakli M, ve ark. Reciprocal Activating Crosstalk between C-Met and Caveolin 1 Promotes Invasive Phenotype in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One.* 2014, 9(8), e105278.
- 89.** Iscan E, Gunes A, Korhan P, Yilmaz Y, ve ark. The Regulatory Role of Heparin on C-Met Signaling in Hepatocellular Carcinoma Cells. *J Cell Commun Signal.* 2017, 11(2), 155-66.
- 90.** Viticchie G, Muller P A J. C-Met and Other Cell Surface Molecules: Interaction, Activation and Functional Consequences. *Biomedicines.* 2015, 3(1), 46-70.

- 91.** Fafalios A, Ma J, Tan X, Stoops J, ve ark. A Hepatocyte Growth Factor Receptor (Met)-Insulin Receptor Hybrid Governs Hepatic Glucose Metabolism. *Nat Med.* 2011, 17(12), 1577-84.
- 92.** Chandel V., Raj S., Choudhari R., Kumar D. (2020) Role of c-Met/HGF Axis in Altered Cancer Metabolism. In: Kumar D. (eds) *Cancer Cell Metabolism: A Potential Target for Cancer Therapy.* Springer, Singapore.
- 93.** Guo T, Zhu Y, Gan C S, Lee S S, ve ark. Quantitative Proteomics Discloses Met Expression in Mitochondria as a Direct Target of Met Kinase Inhibitor in Cancer Cells. *Mol Cell Proteomics.* 2010, 9(12), 2629-41.
- 94.** Tang Z, Du R, Jiang S, Wu C, ve ark. Dual Met-Egfr Combinatorial Inhibition against T790m-Egfr-Mediated Erlotinib-Resistant Lung Cancer. *Br J Cancer.* 2008, 99(6), 911-22.
- 95.** Kumar D, New J, Vishwakarma V, Joshi R, ve ark. Cancer-Associated Fibroblasts Drive Glycolysis in a Targetable Signaling Loop Implicated in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Progression. *Cancer Res.* 2018, 78(14), 3769-82.
- 96.** Huang Z, Bodkin N L, Ortmeyer H K, Zenilman M E, ve ark. Altered Insulin Receptor Messenger Ribonucleic Acid Splicing in Liver Is Associated with Deterioration of Glucose Tolerance in the Spontaneously Obese and Diabetic Rhesus Monkey: Analysis of Controversy between Monkey and Human Studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996, 81(4), 1552-6.
- 97.** Sundaram S, Freemerman A J, Johnson A R, Milner J J, ve ark. Role of Hgf in Obesity-Associated Tumorigenesis: C3(1)-Tag Mice as a Model for Human Basal-Like Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013, 142(3), 489-503.
- 98.** Sundaram S, Freemerman A J, Galanko J A, McNaughton K K, ve ark. Obesity-Mediated Regulation of Hgf/C-Met Is Associated with Reduced Basal-Like Breast Cancer Latency in Parous Mice. *PLoS One.* 2014, 9(10), e111394.
- 99.** Kaplan S A. The Insulin Receptor. *J Pediatr.* 1984, 104(3), 327-36.
- 100.** Bailyes E M, Nave B T, Soos M A, Orr S R, ve ark. Insulin Receptor/Igf-I Receptor Hybrids Are Widely Distributed in Mammalian Tissues: Quantification of Individual Receptor Species by Selective Immunoprecipitation and Immunoblotting. *Biochem J.* 1997, 327 (Pt 1) 209-15.

- 101.** Belfiore A, Malaguarnera R, Vella V, Lawrence M C, ve ark. Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocr Rev.* 2017, 38(5), 379-431.
- 102.** Yoshizato K, Shirotani T, Furukawa N, Taguchi T, ve ark. Identification of a Cis-Acting Element and a Novel Trans-Acting Factor of the Human Insulin Receptor Gene in Hepg2 and Rat Liver Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 280(2), 428-34.
- 103.** Webster N J, Resnik J L, Reichart D B, Strauss B, ve ark. Repression of the Insulin Receptor Promoter by the Tumor Suppressor Gene Product P53: A Possible Mechanism for Receptor Overexpression in Breast Cancer. *Cancer Res.* 1996, 56(12), 2781-8.
- 104.** Garcia-Arencibia M, Molero S, Davila N, Carranza M C, ve ark. 17beta-Estradiol Transcriptionally Represses Human Insulin Receptor Gene Expression Causing Cellular Insulin Resistance. *Leuk Res.* 2005, 29(1), 79-87.
- 105.** Gutmann T, Kim K H, Grzybek M, Walz T, ve ark. Visualization of Ligand-Induced Transmembrane Signaling in the Full-Length Human Insulin Receptor. *J Cell Biol.* 2018, 217(5), 1643-9.
- 106.** Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, ve ark. Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease. *Endocr Rev.* 2009, 30(6), 586-623.
- 107.** Poloz Y ve Stambolic V. Obesity and Cancer, a Case for Insulin Signaling. *Cell Death Dis.* 2015, 6 e2037.
- 108.** Sjostrom L, Gummesson A, Sjostrom C D, Narbro K, ve ark. Effects of Bariatric Surgery on Cancer Incidence in Obese Patients in Sweden (Swedish Obese Subjects Study): A Prospective, Controlled Intervention Trial. *Lancet Oncol.* 2009, 10(7), 653-62.
- 109.** Salmon D, Bani-Sadr F, Loko M A, Stitou H, ve ark. Insulin Resistance Is Associated with a Higher Risk of Hepatocellular Carcinoma in Cirrhotic Hiv/Hcv-Co-Infected Patients: Results from Anrs Co13 Hepavih. *J Hepatol.* 2012, 56(4), 862-8.

- 110.** Nkontchou G, Bastard J P, Ziol M, Aout M, ve ark. Insulin Resistance, Serum Leptin, and Adiponectin Levels and Outcomes of Viral Hepatitis C Cirrhosis. *J Hepatol.* 2010, 53(5), 827-33.
- 111.** Aleksandrova K, Boeing H, Nothlings U, Jenab M, ve ark. Inflammatory and Metabolic Biomarkers and Risk of Liver and Biliary Tract Cancer. *Hepatology.* 2014, 60(3), 858-71.
- 112.** Tanaka Sve Wands J R. Insulin Receptor Substrate 1 Overexpression in Human Hepatocellular Carcinoma Cells Prevents Transforming Growth Factor Beta1-Induced Apoptosis. *Cancer Res.* 1996, 56(15), 3391-4.
- 113.** Boissan M, Beurel E, Wendum D, Rey C, ve ark. Overexpression of Insulin Receptor Substrate-2 in Human and Murine Hepatocellular Carcinoma. *Am J Pathol.* 2005, 167(3), 869-77.
- 114.** Calvisi D F, Ladu S, Gorden A, Farina M, ve ark. Ubiquitous Activation of Ras and Jak/Stat Pathways in Human Hcc. *Gastroenterology.* 2006, 130(4), 1117-28.
- 115.** Sze K M, Wong K L, Chu G K, Lee J M, ve ark. Loss of Phosphatase and Tensin Homolog Enhances Cell Invasion and Migration through Akt/Sp-1 Transcription Factor/Matrix Metalloproteinase 2 Activation in Hepatocellular Carcinoma and Has Clinicopathologic Significance. *Hepatology.* 2011, 53(5), 1558-69.
- 116.** Nemazanyy I, Espeillac C, Pende Mve Panasyuk G. Role of Pi3k, Mtor and Akt2 Signalling in Hepatic Tumorigenesis Via the Control of Pkm2 Expression. *Biochem Soc Trans.* 2013, 41(4), 917-22.
- 117.** Chen Z, Wang Z, Guo W, Zhang Z, ve ark. Trim35 Interacts with Pyruvate Kinase Isoform M2 to Suppress the Warburg Effect and Tumorigenicity in Hepatocellular Carcinoma. *Oncogene.* 2015, 34(30), 3946-56.
- 118.** Chettouh H, Fartoux L, Aoudjehane L, Wendum D, ve ark. Mitogenic Insulin Receptor-a Is Overexpressed in Human Hepatocellular Carcinoma Due to Egfr-Mediated Dysregulation of Rna Splicing Factors. *Cancer Res.* 2013, 73(13), 3974-86.
- 119.** Rose D Pve Vona-Davis L. The Cellular and Molecular Mechanisms by Which Insulin Influences Breast Cancer Risk and Progression. *Endocr Relat Cancer.* 2012, 19(6), R225-41.

- 120.** Bartella V, Cascio S, Fiorio E, Auriemma A, ve ark. Insulin-Dependent Leptin Expression in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 2008, 68(12), 4919-27.
- 121.** Yamagishi S, Kawakami T, Fujimori H, Yonekura H, ve ark. Insulin Stimulates the Growth and Tube Formation of Human Microvascular Endothelial Cells through Autocrine Vascular Endothelial Growth Factor. *Microvasc Res.* 1999, 57(3), 329-39.
- 122.** Qiao J G, Wu L, Lei D Xve Wang L. Insulin Promotes Sinusoidal Endothelial Cell Proliferation Mediated by Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor in Regenerating Rat Liver after Partial Hepatectomy. *World J Gastroenterol.* 2005, 11(38), 5978-83.
- 123.** Vella V, Milluzzo A, Scalisi N M, Vigneri P, ve ark. Insulin Receptor Isoforms in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018, 19(11).
- 124.** Leibiger B, Leibiger I B, Moede T, Kemper S, ve ark. Selective Insulin Signaling through a and B Insulin Receptors Regulates Transcription of Insulin and Glucokinase Genes in Pancreatic Beta Cells. *Mol Cell.* 2001, 7(3), 559-70.
- 125.** Westermeier F, Navarro-Marquez M, Lopez-Crisosto C, Bravo-Sagua R, ve ark. Defective Insulin Signaling and Mitochondrial Dynamics in Diabetic Cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta.* 2015, 1853(5), 1113-8.
- 126.** Basic V, Shi H, Stubbs R Sve Hayes M T. Aberrant Liver Insulin Receptor Isoform a Expression Normalises with Remission of Type 2 Diabetes after Gastric Bypass Surgery. *PLoS One.* 2015, 10(3), e0119270.
- 127.** Kaminska D, Hamalainen M, Cederberg H, Kakela P, ve ark. Adipose Tissue Insr Splicing in Humans Associates with Fasting Insulin Level and Is Regulated by Weight Loss. *Diabetologia.* 2014, 57(2), 347-51.
- 128.** Benabou E, Salame Z, Wendum D, Lequoy M, ve ark. Insulin Receptor Isoform a Favors Tumor Progression in Human Hepatocellular Carcinoma by Increasing Stem/Progenitor Cell Features. *Cancer Lett.* 2019, 450 155-68.
- 129.** Marquardt J Uve Andersen J B. Liver Cancer Oncogenomics: Opportunities and Dilemmas for Clinical Applications. *Hepat Oncol.* 2015, 2(1), 79-93.
- 130.** Li L, Zhao G D, Shi Z, Qi L L, ve ark. The Ras/Raf/Mek/Erk Signaling Pathway and Its Role in the Occurrence and Development of Hcc. *Oncol Lett.* 2016, 12(5), 3045-50.

- 131.** Hu J, Che L, Li L, Pilo M G, ve ark. Co-Activation of Akt and C-Met Triggers Rapid Hepatocellular Carcinoma Development Via the Mtorc1/Fasn Pathway in Mice. *Sci Rep.* 2016, 6 20484.
- 132.** Wegrzyn J, Potla R, Chwae Y J, Sepuri N B, ve ark. Function of Mitochondrial Stat3 in Cellular Respiration. *Science.* 2009, 323(5915), 793-7.
- 133.** Berthou S, Aebersold D M, Schmidt L S, Stroka D, ve ark. The Met Kinase Inhibitor Su11274 Exhibits a Selective Inhibition Pattern toward Different Receptor Mutated Variants. *Oncogene.* 2004, 23(31), 5387-93.
- 134.** Liu Tve Yin H. Pdk1 Promotes Tumor Cell Proliferation and Migration by Enhancing the Warburg Effect in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncol Rep.* 2017, 37(1), 193-200.
- 135.** Zhang W, Zhang S L, Hu Xve Tam K Y. Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (Pdks) a Viable Anticancer Target? *Int J Biol Sci.* 2015, 11(12), 1390-400.
- 136.** Nagai H, Terada Y, Tajiri T, Yabe A, ve ark. Characterization of Liver-Cirrhosis Nodules by Analysis of Gene-Expression Profiles and Patterns of Allelic Loss. *J Hum Genet.* 2004, 49(5), 246-55.
- 137.** Sakurai Y, Kubota N, Takamoto I, Obata A, ve ark. Role of Insulin Receptor Substrates in the Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep.* 2017, 7(1), 5387.
- 138.** Reiss K, Del Valle L, Lassak Ave Trojanek J. Nuclear Irs-1 and Cancer. *J Cell Physiol.* 2012, 227(8), 2992-3000.
- 139.** Sun H Z, Xu L, Zhou B, Zang W J, ve ark. Depletion of Insulin Receptor Substrate 2 Reverses Oncogenic Transformation Induced by V-Src. *Acta Pharmacol Sin.* 2011, 32(5), 611-8.
- 140.** Gunes A, Bagirsakci E, Iscan E, Cakan-Akdogan G, ve ark. Thioredoxin Interacting Protein Promotes Invasion in Hepatocellular Carcinoma. *Oncotarget.* 2018, 9(96), 36849-66.
- 141.** Kawata K, Hatano A, Yugi K, Kubota H, ve ark. Trans-Omic Analysis Reveals Selective Responses to Induced and Basal Insulin across Signaling, Transcriptional, and Metabolic Networks. *iScience.* 2018, 7 212-29.

142. Vignais M L, Caicedo A, Brondello J Mve Jorgensen C. Cell Connections by Tunneling Nanotubes: Effects of Mitochondrial Trafficking on Target Cell Metabolism, Homeostasis, and Response to Therapy. *Stem Cells Int.* 2017, 2017 6917941.

143. Vincent A E, Turnbull D M, Eisner V, Hajnoczky G, ve ark. Mitochondrial Nanotunnels. *Trends Cell Biol.* 2017, 27(11), 787-99.

144. Eddy R J, Weidmann M D, Sharma V Pve Condeelis J S. Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions That Orchestrate Metastasis. *Trends Cell Biol.* 2017, 27(8), 595-607.

145. Belfiore Ave Malaguarnera R. Insulin Receptor and Cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2011, 18(4), R125-47.



8. EKLER

8.1. Etik Kurul Raporu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
AÇIK ADRES	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	0 232 412 22 43
	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	1567-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Hepatosellüler Karsinomada Glukoz Metabolizması ve c-Met Yolağının Etkileşiminin İrdelenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Neşe ATABEY Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014/23-01	Tarih: 26.05.2014
	Prof.Dr.Neşe ATABEY'in sorumlu olduğu "Hepatosellüler Karsinomada Glukoz Metabolizması ve c-Met Yolağının Etkileşiminin İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyî Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlgili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ş. Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARİOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEÜ Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D.)	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.İlpi TEKMEİN	Histoloji ve Embriyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Müşt KIRAY	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEÜ Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEÜ Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	



İZMİR BİYOTIP VE GENOM MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İBG-HADYEK)
KARARI

Toplantı Tarihi : 08/07/2020 **Toplantı Günü** : Çarşamba
Toplantı Sayısı : 9 **Toplantı Saati** : 15:30

Sayın Prof. Dr. Neşe ATABEY,

2020-032 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Hepatosellüler Karsinomada Glukoz Metabolizması ve c-Met Yolağının Etkileşiminin İrdelenmesi" başlıklı projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Doç. Dr. Gülneş ÖZHAN BAYKAN Başkan	Vet. Hek. Kerem ESMEN Başkan Yardımcısı
Prof. Dr. H. Alper BACRIYANIK Üye	Prof. Dr. Ensari GUNELI Üye
Doç. Dr. Kaşın DİRİL Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Banu DEMİR Üye
(Projede araştırmacı) Dr. Gülçin ÇAKAN AKDOĞAN Üye	Vet. Hek. Umur KELEŞ Üye
H. Muafımmar KARAGÖZ Üye	

8.2. Özgeçmiş



YELİZ YILMAZ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Doğum Tarihi
İletişim Adresi
Telefon
E-posta
Web Adresi

Öğrenim Bilgileri

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Haziran 2019 - Şu Anda (1 yıl 2 ay) (Yeni Zamanlı)
ARAŞTIRMACI, İZMİR BIYOTİP VE GENOM MERKEZİ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

ALMANCA (Okuma: Orta, Yazma: Başlangıç, Konuşma: Başlangıç)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Moleküler Biyoloji ve Genetik -- Kanser
Moleküler Biyolojisi

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Biyokimya -- Metabolizma

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

A. SAHİN, M. A. ARICI, Y. YILMAZ, S. KALKAN, N. DURMUS, B. U. ERGUR, I. Y. N. ATABEY & Y. TUNCOK, A Comparison of the Effectiveness of Silibin Resveratrol in Preventing Alpha-Amanitin-Induced Hepatotoxicity, *BA CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY*, 2018, 1742-7835, 122, 6, 63

P. KORHAN, Y. YILMAZ, E. BAĞIRSAKÇI, A. GÜNEŞ, H. TOPEL BATARLAR, B. & S. N. ATABEY, Pleiotropic effects of heparins: from clinical applicati molecular mechanisms in Hepatocellular Carcinoma, *CANADIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY*, 2018, 2291-2797, 2018, 75687 B.

Y. YILMAZ, A. GÜNEŞ, H. TOPEL BATARLAR & S. N. ATABEY, Signaling Pathw Potential Therapeutic Targets in Hepatocarcinogenesis, *Journal of Gastroint Cancer*, 2017, 1941-6636, 48, 3, 2257237.

E. ISCAN, A. GUNES, P. KORHAN, Y. YILMAZ, E. ERDAL & N. ATABEY, The regl role of heparin on c-Met signaling in hepatocellular carcinoma cells, *JOURNAL CELL COMMUNICATION AND SIGNALING*, 2017, 1873-9601, 11, 2, 155-16

Y. YILMAZ, Ş. E. ERDAL BAĞIRYANIK, S. N. ATABEY & B. I. CARR, Pl Microenvironment and Hepatocellular Carcinoma, *Biochemistry and Ani Biochemistry*, 2016, 2161-1009, 5, 2, 1000281.

Bildiriler

Y. YILMAZ, H. TOPEL BATARLAR & S. N. ATABEY, Identification of c-M Insulin Receptor Heterodimer as a Mediator for Hepatocellular Carcinoma, Sunumu, 25th Biennial Congress of EACR, 30 Haziran 2018, 03 Temmuz 2

Y. YILMAZ, H. TOPEL BATARLAR & S. N. ATABEY, Regulation of c-Met Signa Neddylation in Hepatocellular Carcinoma Cells, Poster Sunumu, 42nd Congress, 10 Eylül 2017, 14 Eylül 2017, 284, Supplement 1.

Y. YILMAZ, H. TOPEL BATARLAR & S. N. ATABEY, Regulation of c-Met Signa Neddylation in Hepatocellular Carcinoma Cells, Poster Sunumu, FEBS Scientists' Forum Jerusalem 2017, 07 Eylül 2017, 10 Eylül 2017.

Y. YILMAZ, E. BAĞIRSAKÇI, A. GÜNEŞ, E. KAHRAMAN, H. TOPEL BATARLAR ATABEY, Regulatory roles of c-Met in HCC metabolism: crosstalk be insulin/IR and HGF/c-Met signaling, Sözlü Sunum, FEBS Advanced Lecture I on Oncometabolism, 18 Haziran 2017, 24 Haziran 2017.

Y. YILMAZ, E. BAĞIRSAKÇI, A. GÜNEŞ, E. KAHRAMAN, H. TOPEL BATARLAR ATABEY, Regulatory Role of Hyperglycemia and Hyperinsulinemia on c Insulin Receptor Interaction and Downstream Signaling in Hepatoc Carcinoma Cells, Poster Sunumu, EMBO Workshop: Metabolic Disorders an Cancer, 23 Nisan 2017, 26 Nisan 2017.

Y. YILMAZ, A. GÜNEŞ, E. KAHRAMAN, E. BAĞIRSAKÇI, H. TOPEL BATARLAR ATABEY, Obezite ilişkili Koşulların c-Met-İnsülin Reseptörü Aktivasyonu v Gelişimindeki Rollerinin Tanımlanması, Poster Sunumu, İnsülin I Sempozyumu, 22 Mart 2017, 22 Mart 2017.

Y. YILMAZ & K. B. BİLGE, SIK2 Involvement in Down-Regulation of FGF Signa Through Gab1 and Raf-1, Poster Sunumu, 38th FEBS Congress Mechanism Biology, 06 Temmuz 2013, 11 Temmuz 2013, 280, S1, 1 - 661.

Projeler

TEMEL ARAŞTIRMA, DİĞER, Yüksek Glukoz Aracılıklı Hepatosellüler Karsinc Progresyonunun Moleküler Mekanizması: c-Met Aktivasyonu ve Yeni Ada Thioredoxin Interacting Protein, Sestrin 2 ve lncRNA HOTAIR, Yürütülen Kuru DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: İZMİR BİYOTİP VE GEN MERKEZİ (Yurt İçi) , 01 Ekim 2014, 01 Nisan 2017.

ULUSAL, BURSİYER, SIK2'NİN FGF SİNYAL YOLAKLARININ MODÜLASYONUN YER ALMA OLASILIĞININ İRDELENMESİ, Yürütülen Kuruluş: KURU GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: , 15 Ekim 2009, 15 E 2011.

Ödüller

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Uluslararası, EACR Tr Fellowship , Oxford Üniversitesi'nde dr Christian Eggeling'in araştırma grubunc ay boyunca süper rezolüsyon mikroskopi tekniklerinde deneyim kazanı amacıyla, Ödül Alınan Kurum: European Association for Cancer Research (EA (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), İNGİLTERE, 06 Eylül 2018.

Diğer, Uluslararası, 42nd FEBS Congress and Young Scientists' Forum Burs "42nd FEBS Congress From Molecules to Cells and Back" kongre ve g araştırmacılar forumuna katılım-seyahat-konaklama için burs, Ödül Alınan Kur Federation of European Biochemical Societies (FEBS) (Sistemde kayıtlı olma kuruluş), İSRAİL, 20 Temmuz 2017.

Diğer, Uluslararası, EMBO Workshop Travel Grant, "EMBO Workshop:Metab Disorders and Liver Cancer" çalıştayına katılım için EMBO seyahat bursu, Ç Alınan Kurum: EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANISATION, İSPANYA, Şubat 2017.

Diğer, Uluslararası, 38th FEBS Congress Bursary, "38th FEBS Congri Mechanisms in Biology" katılımını kapsayan kongre bursu , Ödül Alınan Kur Federation of European Biochemical Societies (FEBS) (Sistemde kayıtlı olma kuruluş), RUSYA FEDERASYONU, 06 Mayıs 2013.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

109T200, Sık2'nin Fgf Sinyal Yolaklarının Modülasyonunda Yer Alma Olasılığının İrdelenmesi, 1001 - Araştırma, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, KBAG - Kimya Biyol Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 15.10.2009 - 15.10.2011, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.10.2009 - 15.10.2011. 114S927, Alfa-Amanitine Bağlı Karaciğer Toksisitesinin Önlenmesinde Silibinin Resveratrolün Etkililiğinin Karşılaştırılması, 3001 - Başlangıç AR-GE, Burslu, Soi raporu kabul, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.12.2014 - 15.10.2015, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.12.2014 - 01.06.2016. 115E056, Metastazın Erken Tanısında Yeni Bir Yonga-Üstü-Laboratuvar (Lab-C A-Chip, Loc) Cihazı, 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama), Burslu, Sonuçlandı, ARD EEEAG - Elektrik, Elektronik Ve Enformatik Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 16.10.2015 - 20.03.2019, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 15.10.2015 - 15.04.2019.

BİDEB Destekleri

YELİZ YILMAZ, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-A Genel