KEMOTERAPİ AJANLARINA DİRENÇLİ HEPATOSELLÜLAR KARSİNOMA HÜCRELERİNDE OLASI BİYOİŞARETLERİN *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Oğuzhan KARAOSMANOĞLU

Eskişehir 2018

KEMOTERAPİ AJANLARINA DİRENÇLİ HEPATOSELLÜLAR KARSİNOMA HÜCRELERİNDE OLASI BİYOİŞARETLERİN *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

Oğuzhan KARAOSMANOĞLU

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hülya SİVAS

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Temmuz-2018

Bu tez çalışması BAP komisyonunca kabul edilen 1508F587 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Oğuzhan Karaosmanoğlu'nun "Kemoterapi ajanlarına dirençli hepatosellülar karsinoma hücrelerinde olası biyoişaretlerin *in vitro* araştırılması" başlıklı tezi 06/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı): Prof. Dr. Hülya SİVAS	
Üye : Prof. Dr. Sreeparna BANERJEE	
Üye : Prof. Dr. Ülkü Dilek UYSAL	
Üye : Doç. Dr. Asuman DEMİROĞLU-ZERGEROĞLU	
Üye : Doç. Dr. Tuba YILDIRIM	

Prof. Dr. Ersin YÜCEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

KEMOTERAPİ AJANLARINA DİRENÇLİ HEPATOSELLÜLAR KARSİNOMA HÜCRELERİNDE OLASI BİYOİŞARETLERİN *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

Oğuzhan KARAOSMANOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı
Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2018

Danışman: Prof. Dr. Hülya SİVAS

Hepatosellülar karsinoma (HSK) kanser ilişkili ölümler sıralamasında dünyada ikincidir. Epitel-mezenkimal geçiş (EMT) metastaz başlaması için önemli bir programdır. Buna rağmen, pek çok kanser hücresi bütün epitel karakterleri tamamen kaybetmeden yada bütün mezenkim karakterleri tamamen kazanmadan kısmi EMT programıyla metastaz yapabildiği de bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, tam ve kısmi EMT'nin benzeyen ve ayrışan yönlerini tespit etmek için EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörü olan Slug'ın iki farklı HSK hücre hattında aşırı ifadesi sağlandı. Sonra hücreler EMT fenotipi, kemodirenç ve kök hücre özellikleri bakımından analiz edildi. Aşırı Slug ifadesinin HSK'da hem tam hem de kısmi EMT'yi tetiklediği gösterildi. Tam EMT, E-cadherin'in azalması, ZEB2 mRNA'sının ise artması ile karakterize edildi. Kısmi EMT ise E-cadherin'in artması ve vimentin ve ZEB2 mRNA'sının azalması ile karakterize edildi. ABCB1 azalması ve ABCG2 artması ile ortaya çıkan Slug aracılı kemodirenç gelişimi ilginç bir şekilde hem tam hemde kısmi EMT'de ortak olarak olarak gözlendi. Buna ilave olarak kök hücre karakteri olan CD133 mRNA'sının artması her iki EMT için ortak olan diğer bir özellikti. Bunların yanında, kısmi EMT fenotipi gösteren HSK hücrelerinden izole edilen koşullu medyumda, translasyon sonrası değiştirilmiş fibronektin1 ve kollajen tip II α 1 ile değiştirilmemiş fibrinojen gama zincirinin artması tespit edildi. Böylece bu proteinlerin kemodirenç ve kısmi EMT biyoişaretleri olarak kullanılabileceği ileri sürüldü. Aynı şekilde koşullu medyumda, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-101-3p ve hsa-miR-885-5p miRNA miktarlarının artması tespit edildi. Böylece bu mikroRNA'ların da HSK'da kemodirenç ve kısmi EMT biyoişaretleri olarak kullanılabileceği ileri sürüldü.

Anahtar Sözcükler: Kemodirenç, kısmi EMT, girişimsel olmayan biyoişaretler, ekzozom, miRNA

ABSTRACT

IN VITRO INVESTIGATION OF POSSIBLE BIOMARKERS OF CHEMORESISTANT HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS

Oğuzhan KARAOSMANOĞLU

Department of Biology
Anadolu University, Graduate School of Sciences, July 2018

Supervisor: Prof. Dr. Hülya SİVAS

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the second-leading cause of cancer-related deaths worldwide. Complete EMT has long been considered as a crucial step for initiating metastasis. However, it is now known that many carcinoma cells can metastasize with incomplete loss of epithelial traits or incomplete gain of mesenchymal phenotype, which is named as partial EMT. Here, in order to determine the similarities and differences between complete and partial EMT phenotype in HCC, the EMT associated transcription factor Slug was overexpressed in different HCC cell lines and the cells were compared for their EMT phenotype, chemoresistance and stemness. Conditioned medium was also collected from a HCC cell line overexpressing Slug and was analyzed for markers of chemoresistance and partial EMT. We observed that Slug overexpression resulted in the induction of both complete and partial EMT in different HSK cell lines. Complete EMT was characterized by the down regulation of E-cadherin and up-regulation of ZEB2 mRNA. Partial EMT was characterized by the up-regulation of E-cadherin and down-regulation of vimentin and ZEB2 mRNA. Interestingly, Slug mediated chemoresistance through the down-regulation of ABCB1 and up-regulation of ABCG2 mRNAs as well as expression of CD133, a stemness marker was similar in both complete and partial EMT phenotype. On the other hand, partial EMT was associated with enhanced secretion of post translationally modified fibronectin1, collagen type II alpha 1 and native fibrinogen gamma chain upregulations in the conditioned medium of HSK cells. These proteins can therefore be considered as potential biomarkers of chemoresistance and partial EMT in HSK. Similarly, in the conditioned medium, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-885-5p, miRNAs were found to be up regulated respectively. It has been suggested that these microRNAs can also be used as chemoresistance and partial EMT biomarkers in HCC.

Keywords: Chemoresistance; partial EMT; non-invasive biomarkers; exosomes; miRNA

ÖNSÖZ

Tezimin projelendirilmesinden, yazılmasına kadar tüm aşamalarında yol gösteren, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hülya SİVAS'a teşekkürlerimi sunarım. Tez sürecinde pek çok konuda bilgisine başvurduğum Prof. Dr. Sreeparna BANERJEE'ye özellikle teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarımda yardım eden Melis ÇOLAKOĞLU'na ve tüm moleküler biyoloji laboratuvarı arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu tez çalışması için beni destekleyen TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlar Yurtiçi Doktora Burs Programına teşekkür ederim.

Anneme, babama, eşim Tuba'ya, kızım Hatice Sare'ye ve kardeşlerime özellikle teşekkür ederim ki bana her zaman inandılar ve en zor anlarımda bana olan güvenlerini yanı başımda hissederek yeniden bir kere daha deneme gücünü elde ettim.

Oğuzhan KARAOSMANOĞLU

Anneme, babama,

eşim Tuba'ya, kızım Hatice Sare'ye ve kardeşlerime

06/07/2018

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan "bilimsel intihal tespit programı"yla tarandığını ve hiçbir şekilde "intihal içermediğini" beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Oğuzhan KARAOSMANOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI ..... **i**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ..... **ii**

ÖZET ..... **iii**

ABSTRACT ..... **iv**

ÖNSÖZ ..... **v**

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ ..... **vii**

İÇİNDEKİLER ..... **viii**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **xii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xii**

GÖRSELLER DİZİNİ ..... **xiv**

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xv**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Hepatosellüler Karsinom ve Moleküler Mekanizması **2**

1.2. Metastaz ve Epitel-Mezenkimal Geçiş **8**

1.3. Hepatosellüler Karsinom Biyoişaretleri **13**

1.4. Hepatosellüler Karsinom Terapisi **15**

1.5. Ekzozomlar ve Metastaz **16**

1.6. Kemodirenç **20**

1.7. Hipotez **21**

2. MATERYAL VE METOT **24**

2.1. Materyal **24**

2.1.1.Hücre hatları **24**

2.1.2. Hücre kültürü için kullanılan materyaller **24**

2.1.3. Kalsiyum fosfat aracılı ve katyonik lipid kullanımı aracılı transfeksiyon ve monoklonal hücre hattı oluşturmak için kullanılan materyaller 25

2.1.4. Kemodirenç belirlemek için kullanılan malzemeler 25

2.1.5. mRNA'ların gerçek zamanlı PCR ile kantifikasyonu kullanılan malzemeler.....26

2.1.6. Western Blotlama için kullanılan malzemeler 26

2.1.7. In cell Western deneyi için kullanılan malzemeler 27

2.1.8. Ekzozom izolasyonu için kullanılan materyaller 27

2.1.9. Ekzozomal proteomik çalışmalar için kullanılan materyaller.....27

2.1.11. Küçük-RNA dizileme için kullanılan materyaller 28

2.1.12. miRNA'ların gerçek zamanlı PCR ile kantifikasyonu için kullanılan malzemeler.....28

2.2. Metot……..28

2.2.1. Deneysel tasarım 28

2.2.2. Hücre kültürü.....29

2.2.3. Plazmit hazırlığı, kalıcı (stable) ve geçici (transient) transfeksiyonlar ve monoklonal hücre hatlarının oluşturulması 29

2.2.4. In cell western.....30

2.2.5. Western blotlama 30

2.2.6. qRT-PCR 31

2.2.7. Nötral kırmızısı alımı testi.....33

2.2.8. Doxorubicin kümelenme deneyi 33

2.2.9. Yara iyileşme deneyi 34

2.2.10. Ekzozomal ve ekstrasellülar protein izolasyonu 34

2.2.11. Ekzozomal ve ekstrasellüler proteinlerin MALDI-TOF/TOF identifikasyonu.....34

2.2.12. Fibronektin1, kolajen tip II α 1 ve fibrinojen gama zinciri proteinleri için ELISA testleri 35

2.2.13.Ekzozomal miRNA izolasyonu.....35

2.2.14.Small RNA-seq ile ekzozomal miRNA'ların dizilenmesi.....35

2.2.15. İfadesi farklılaşan miRNA'lardan literatür araştırması ile seçilenlerin miRNA RT-qPCR ile teyit edilmesi 36

2.2.16. İstatistik analizi 37

3. BULGULAR 38

3.1. Aşırı Slug İfadesinin HepG2 ve Huh7 Hücrelerin Tam ve Kısmi EMT Fenotipi Üzerine Olan Etkisi……...……38

3.2. Aşırı Slug İfadesinin Kök Hücre Fenotipi (Stemness) Üzerine Olan Etkisi……..……50

3.3. HSK'da Kemodirenç ve Kısmi EMT için Protein Yapılı Biyoişaretler…….…….51

3.4. HSK'de Kemodirenç ve Kısmi EMT için miRNA Biyoişaretler…….……...56

4. TARTIŞMA 59

4.1. Kısmi ve Tam EMT Süreçleri…….……59

4.2. Slug Aracılı Gelişen Kemodirenç…….……...60

4.3. Slug Aracılı Gelişen Kök Hücre Fenotipi…….…..61

4.4. Kemodirenç ve Kısmi EMT Karakterizasyonu için Kullanılabilecek Protein Yapılı Ekzozomal Biyoişaretler……....62

4.5. Kemodirenç ve Kısmi EMT Karakterizasyonu için Kullanılabilecek miRNA Yapılı Ekzozomal Biyoişaretler……64

5. SONUÇ 65

KAYNAKÇA 66

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. qPCR için kullanılan primer dizileri. 32

Tablo 2.2. cDNA sentezi için gerekli bileşenler. 36

Tablo 2.3. miRNA qPCR'ı için kullanılan primer setleri. 37

Tablo 3.1. Kontrol grubuna göre ifadesi anlamlı ölçüde farklılaştığı için biyoişaret olabilecek miRNA'lar. 57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya çapında Hepatit B virüs enfeksiyonu prevalansı (Schweitzer ve ark. 2015)..... 4

Şekil 1.2. Dünya çapında Hepatit C virüs enfeksiyonu prevalansı (Averhoff ve ark. 2012) 4

Şekil 1.3. HSK'da faaliyete geçen Hedgehog, Wnt/β-catenin ve MAPK yolakları 7

Şekil 1.4. Metastatik süreç (Wirtz ve ark. 2011) 8

Şekil 1.5. Epitelden mezenkime geçiş süreci (Kao ve ark. 2016)..... 11

Şekil 1.6. Ekzozom yapı, biyogenez ve fonksiyonu (a) Ekzozom yapısı. (b) Ekzozom biyogenezi ve fonksiyonu (Braicu ve ark. 2015) 18

Şekil 1.7. Kemodirenç mekanizmaları (Marin ve ark. 2016)..... 21

Şekil 3.1. Aşırı Slug ifade eden monoklonal hücre hatlarının in-cell western deneyi ile seçimi. 39

Şekil 3.2. Slug ifadesinin HepG2-BV, HepG2-Sl-Klon1, Huh7-BV ve Huh7-Sl- Klon1 hücrelerinde western blotlama ve qPCR ile belirlenmesi. 40

Şekil 3.3. E-cadherin ve vimentin seviyelerinin HepG2-BV, HepG2-Sl-Klon1, Huh7-BV ve Huh7-Sl- Klon1 hücrelerinde western blotlama ile belirlenmesi. 41

Şekil 3.4. Zeb2 ifadesinin HepG2-BV, HepG2-Sl-Klon1, Huh7-BV ve Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinde qPCR ile belirlenmesi..... 42

Şekil 3.5. Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinde yara iyileşme oranının belirlenmesi. 46

Şekil 3.6. Kısmi ve tam EMT'de nötral kırmızısı alım testi ile belirlenen kemodirenç deneyinin sonucu. 47

Şekil 3.7. Kısmi ve tam EMT'de doxorubicin kümelenmesi deneyi sonuçları. 48

Şekil 3.8. Kısmi ve tam EMT'de ABCB1 ve ABCG2 mRNA ifadesinin qPCR ile belirlenmesi. HepG2-Sl-Klon1 hücreleri birkaç pasajlamada aşırı Slug ifadesini yitirdikleri için bu grubun deneyleri bir kez yapıldı. Huh7-Sl-Klon1 hücreleriyle tüm deney üç bağımsız biyolojik tekrar ile yapıldı. 49

Şekil 3.9. Aşırı Slug ifade eden hücrelerde CD133 proteini seviyesi ve mRNA ifadesinin western blotlama ve qPCR ile belirlenmesi. CD133 proteini ile Slug proteini western blotlamaları için aynı membran kullanılmıştır..... 50

Şekil 3.10. Aşırı Slug ifadesini kalıcı olarak gerçekleştiren Huh7 hücrelerinde COL2A1, FGG ve FN1 mRNA ifadelerinin qPCR ile belirlenmesi..... 52

Şekil 3.11. Aşırı Slug ifadesini geçici olarak gerçekleştiren HepG2 ve Huh7 hücrelerinde COL2A1, FGG ve FN1 mRNA ifadelerinin qPCR ile belirlenmesi. 53
Şekil 3.12. Aşırı Slug ifadesini kalıcı olarak gerçekleştiren Huh7 hücrelerinde COL2A1, FGG ve FN1 proteinlerinin ELISA testi ile ölçüm sonuçları. 55
Şekil 3.13. Aşırı Slug ifadesini geçici olarak gerçekleştiren HepG2 ve Huh7 hücrelerinde COL2A1 ve FN1 proteinlerinin ELISA testi ile ölçüm sonuçları. 56
Şekil 3.14. Aşırı Slug ifadesini kalıcı olarak gerçekleştiren Huh7 hücrelerinde miR-101-3p, miR-296-3p ve miR-885-5p miRNA ifadelerinin miRNA RT-qPCR ile araştırılması. 58

GÖRSELLER DİZİNİ

Görsel 3.1. Boş vektör ifadesini geçici olarak gerçekleştiren HepG2 hücrelerinin morfolojisi.....44

Görsel 3.2. Aşırı Slug ifadesini geçici olarak gerçekleştiren HepG2 hücrelerinin morfolojisi. Fibroblast-benzeri görünüm kazanmış bir HepG2 hücresi ok ile gösterilmektedir. 44

Görsel 3.3. Boş vektör ifadesini geçici olarak gerçekleştiren Huh7 hücrelerinin morfolojisi.....45

Görsel 3.4. Aşırı Slug ifadesini geçici olarak gerçekleştiren Huh7 hücrelerinin morfolojisi.....45

Görsel 3.5. A) Markır (M), Huh7-BV (BV) ve Huh7-Sl-Klon1 (Sl) hücreleri ekzozomal proteinlerinin SDS-PAGE ile ayrılması. Ekzozomal protein ifadesinin karşılaştırmalı analizi için kullanılan jel fotografı. B) SDS-PAGE jelinde boş dikdörtgenler, jelden kesilerek zip-tiplenen ve MALDI-TOF/TOF analizi için kullanılan protein bantlardır.....52

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

DTH	Dolaşan tümör hücreleri
EMT	Epitelden mezenkime geçiş
HSK	Hepatosellular karsinom
HBV	Hepatit B virüsü
HCV	Hepatit C virüsü
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HNF1α	Hepatosit nükleer faktör α1
IGF	İnsülin-benzeri büyüme faktörü
MAPK	Mitojenlerle faaliyete geçen protein kinaz

1. GİRİŞ

Vücudun en büyük organı olan karaciğer metabolik olarakta en faal organlarından biridir. Karaciğer, kalpten bol oksijenli kan getiren karaciğer atardamarı ve ince bağırsaktan gelen sindirim ürünlerini içeren bu sebeple besin yönünden zengin fakat oksijen önünden fakir içeriğe sahip olan kapı toplardamarı olmak üzere iki farklı kan kaynağına sahiptir. Kapı toplardamarının düşük oksijen içeriği nedeniyle çoğu hepatik hücre, hipoksi şartlarında yaşar (Vidal-Vanaclocha 2011). Karaciğer, sindirim sisteminin ürünleri olan besinler, toksinler ve bağırsak mikroorganizmaları ile bu mikroorganizma metabolitlerinin karşılaştığı ilk organdır. Bu nedenle karaciğerin dört temel görevi vardır: 1) Sindirim ürünlerinin metabolizmasını sağlayarak diğer organların ihtiyacı kadar besin maddesini kana vermek, 2) Ksenobiyotikleri detoksifiye ederek bertaraf etmek, 3) Bağışıklık sisteminin patojenlerle olan mücadelesine katkı sağlamak ve 4) Çeşitli homeostatik işlevleri yerine getirmek (Häussinger 2014).

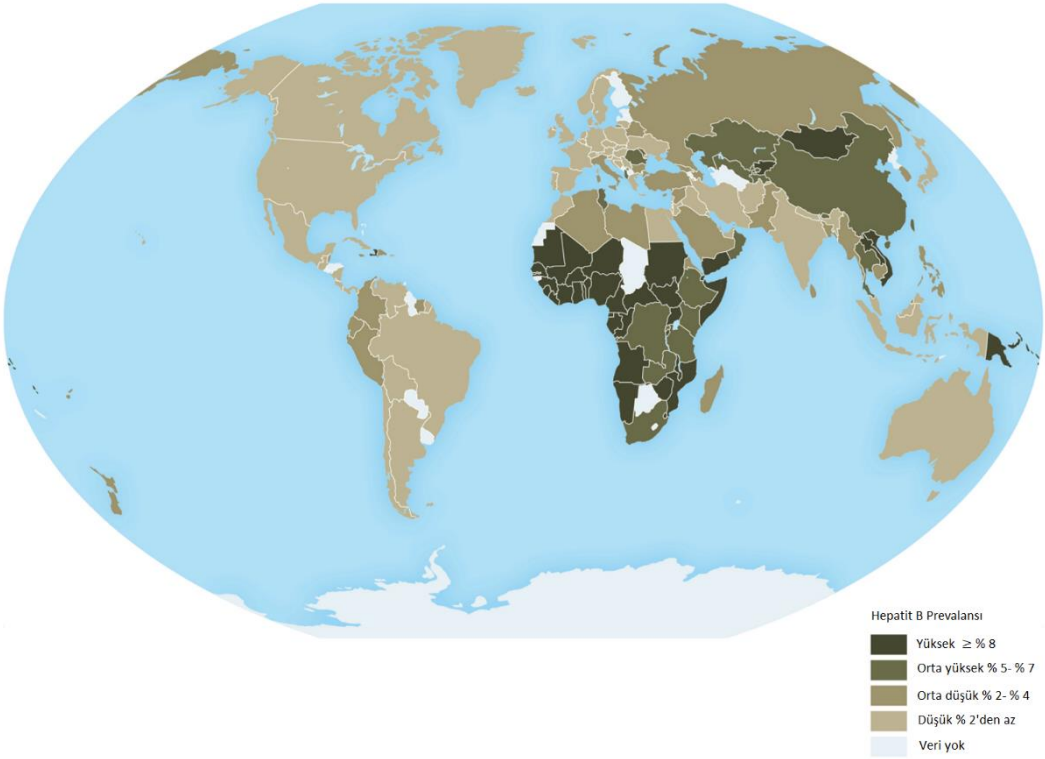
İnce bağırsaktan gelen glikozun fazlası karaciğerde glikojen olarak depolanırken, galaktoz ve früktoz glikoza karaciğerde çevrilir. Ayrıca, yağ asitlerinin oksidasyonu, kolesterol, lipoprotein ve fosfolipitlerin sentezi karaciğerde gerçekleştirildiğinden yağ metabolizması için önemli işlevler burada yerine getirilir. Aminoasitlerin deaminasyonu ile enerji kaynağı olarak kullanılması sürecine katkı sağlar. Azotlu bileşiklerden üre oluşturarak amonyağın vücuttan atılması karaciğer faaliyeti ile olur. A, D, B12 vitaminlerinin ve demirin depolanmasında önemli rol oynar (Hall 2015). Besinlerle alınan vücut için zararlı olabilecek ilaç ve toksin gibi yabancı bileşiklerin (ksenobiyotikler) bertaraf edilmesi olmazsa olmaz bir süreçtir ve bunlar karaciğerde metabolize edilir. Karaciğerde iki temel süreç ile ksenobiyotiklerin metabolizması gerçekleştirilir. Üçüncü bir süreç ise bu bileşiklerin taşınmasını sağlar. İlk süreçte, ksenobiyotiklerin suyu sevme özellikleri artırılarak böbrekten atımı kolaylaştırılır. Bu amaçla hedef moleküllere detoks enzimleri de denilen sitokrom p450 enzimleri katalizörlüğünde indirgenme ve yükseltgenme tepkimeleri aracılığıyla hidroksil, amin veya sülfidril grupları eklenir. İlk aşama reaksiyonlarının yetersiz olduğu ve hedef molekülün hala reaktif olduğu durumlarda üridin difosfoglukoronosil transferaz, N-asetil transferaz, glutatyon S-transferaz ve sulfotransferaz gibi enzimlerin katalizörlüğünde konjugasyon reaksiyonlarıyla büyük polar bir grup eklenir. Böylece hedef molekülün çözünürlüğü artırılır. Üçüncü aşamada ise karaciğer epitel ve endotel hücrelerinde yerleşmiş ilaç

taşıyıcı proteinler rol oynayarak ilacın absorbsiyonu, dağılımı ve eliminasyonunu sağlanır (Iwano ve ark. 2014, Woolbright ve ark. 2015). Karaciğer karsinojenik ve diğer toksik kimyasallara maruz kaldıktan sonra yeniden iyileşebilen bir organdır. Fakat bu iyileşme beraberinde kimyasallara karşı edinilmiş direnç gelişimi ile sonuçlanır. Pek çok kanser türünde kemoterapi ilaçlarına karşı direnç gelişimi kemoterapi uygulamasından sonra meydana gelirken, karaciğer kanserinde kanser gelişimi varsa zaten dirençte vardır şeklinde bir durum ortaya çıkmaktadır. Bu durumun klinikte gözlenen sonucu pek çok kemoterapi ilaçlarının hastanın yaşam süresine herhangi bir katkıda bulunmamasıdır (Carr ve ark. 2016). Karaciğer bütün bu çok önemli metabolik reaksiyonları gerçekleştirmenin yanında doğuştan gelen immün sistemin önemli bir bileşeni olmak gibi bir role de sahiptir. Karaciğer, Kupffer hücreleri ve dentritik hücreler, T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü hücreleri barındırarak malignant, enfeksiyon ve otoimmün hastalıklara karşı savunmayı sağlar (Nemeth ve ark. 2009). Karaciğerin ayrıca vücudun asit-baz dengesi, glukoz dengesi, çoğu plazma proteinlerinin sentezlenmesi, trigliserit ve kolesterol metabolizmasının sağlanması, hormon işlenmesi ve salgılanması gibi diğer homeostatik işlevleri yerine getirmek gibi görevleri de bulunmaktadır (Häussinger 2014). Karaciğer, vücut için çok önemli işlevleri yerine getirmesine karşın ne yazık ki kanser geliştirme riskinin en yüksek olduğu organlardan biridir. Karaciğer kanserinin gelişimiyle ilgili ileri sürülen bir hipoteze göre, karaciğerde viral enfeksiyonlar, alkol ve aşırı kimyasala maruz kalan hepatik hücreler artan hücre ölümüne karşı yeni hücreleri oluşturmak için hücre çoğalma sürecini başlatırlar. Bu hücreler bir süre sonra çeşitli mekanizmalarla genom kararlılıklarını yitirerek karaciğer kanseri gelişimine giden sürece dahil olmaktadır (Coleman 2003).

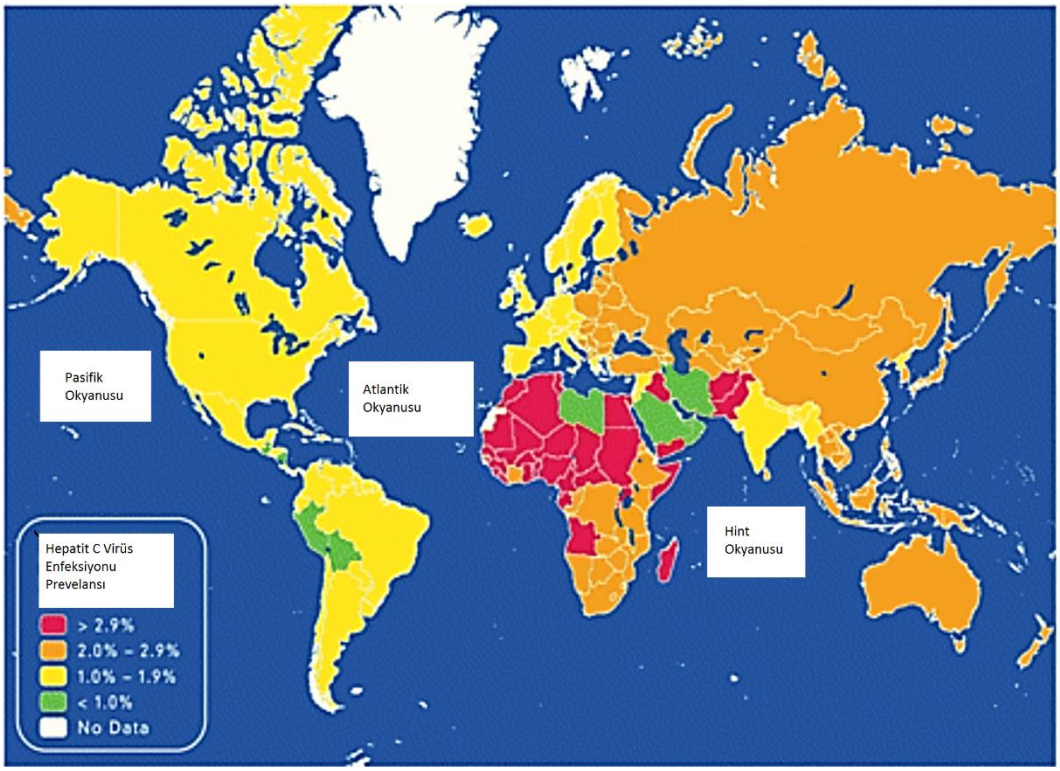
1.1. Hepatosellüler Karsinom ve Moleküler Mekanizması

Karaciğerde en sık oluşan primer malign tümör hepatosellüler karsinom (HSK) olup en yaygın kanserler sıralamasında dünyada beşinci sırada yer almaktadır (Ferlay ve ark. 2015). Doğu Asya ve Afrika ülkeleri gibi karaciğer kanserinin yüksek sıklıkla meydana geldiği bölgelerde 20-50 yaş aralığı risk grubunu oluşturmaktayken, Amerika ve çoğu Avrupa ülkelerinde bu risk grubu 75 yaşın üstündedir. Batı toplumlarında HSK sıklığı artan bir eğilim göstermesine rağmen HSK çoğunlukla önlenebilir bir hastalıktır. HSK'nın erkeklerde kadınlardan daha çok görüldüğü bir kitap bölümünde ifade edilmektedir (White ve ark. 2016). HSK'ya neden olan risk faktörleri hepatit B, hepatit

C enfeksiyonu, aflatoksin, ağır alkol tüketimi, siroz ve obezite/diyabet olarak bilinmektedir (McGlynn ve ark. 2011). HBV enfeksiyonunun dünya çapında prevelansına bakıldığında ülkemiz orta üstü sıklıkta (popülasyonun %5-7'sinin enfekte olduğu) yer almaktadır (Şekil 1.1). HCV enfeksiyonunun dünya çapında dağılımına bakıldığında ülkemiz orta sıklıkta (%2-2,9) HCV enfeksiyonu bulunan ülkeler arasındadır (Şekil 1.2). Ülkemizde HSK yaygın olmasına rağmen HSK verilerinin elde edilebileceği güvenilir bir kaynak bulunmamaktadır. Buna rağmen az sayıdaki çalışma HSK risk faktörlerinin ülkemizdeki durumu hakkında bilgi vermektedir. Bu çalışmalardan ilkinde, HSK tanısı almış 207 hastanın %56'sı HBV, %23,2'si HCV, %15,9'u ise aşırı alkol ile ilişkilendirilmiştir (Uzunalimoglu ve ark. 2001). İkincisi, HSK tanısı almış 52 hastayla gerçekleştirilmiş ve hastalardan %50'sinin p53 mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir (Cengiz ve ark. 2003). Başkent Üniversitesi Adana Eğitim ve Araştırma hastanesinde 35 HSK tanısı almış hastalarla gerçekleştirilen üçüncü bir çalışmada, hastaların ortalama 61 yaşında oldukları, erkek hastaların kadınlardan 4 kat daha fazla olduğu, hastaların %65,7'sinin HBV, %28,6'sının ise HCV ile enfekte olduğu gösterilmiştir (Ozer ve ark. 2003). Ülkemizde beş farklı hastanede 221 HSK hastasıyla gerçekleştirilen dördüncü bir araştırma hastaların %44,4'ünde HBV, %21,3'ünde HCV enfeksiyonu tespit edildiği ifade etmektedir. Bu hastaların %74,2'si siroz tanısı almış olup, hastaların ortalama yaşam süresi 14 ay olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada α-fetoprotein seviyesi normal olan hastaların yüksek olan hastalara göre daha uzun bir yaşam süresine sahip oldukları da ileri sürülmüştür (Alacacioglu ve ark. 2008). Beşinci çalışma, HSK tanısı almış 50 kişi ile gerçekleştirilmiş olup bunlardan bir kişide p53 mutasyonu tespit edildiğini bu nedenle ülkemizde aflatoksinin azalmasına rağmen hala aflatoksin sebebiyle geliştiği bilinen p53 mutasyonuna bağlı olarak HSK'nın ortaya çıktığı ifade edilmiştir (Ozdemir ve ark. 2010). Altıncı çalışma 98 HSK tanısı almış hasta ile yapılmış olup, %80,6'sının erkek ve ortalama yaşlarının 61 olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, hastaların %60,2'sinin HBV, %15,3'ünün HCV ile enfekte olduğu, %15,3'ünün ise alkol bağımlısı olduğu raporlanmıştır (Dogan ve ark. 2012). Türkiye'nin 13 şehrinden toplam 963 HSK tanısı almış hastayla gerçekleştirilen yedinci bir çalışmada hastaların %79'unun erkek, %57,6'sının HBV %16,5'inin ise HCV ile enfekte olduğu %14,2'sinin ise alkol bağımlısı olduğu ifade edilmiştir (Can ve ark. 2014). Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde HSK'nın ülkemizdeki en önemli risk faktörleri 61 yaş ortalaması, erkek cinsiyet, HBV, HCV enfeksiyonları ile alkol bağımlılığı olarak karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 1.1. *Dünya çapında Hepatit B virüs enfeksiyonu prevalansı (Schweitzer ve ark. 2015)*



Şekil 1.2. *Dünya çapında Hepatit C virüs enfeksiyonu prevalansı (Averhoff ve ark. 2012)*

Hepatosellüler karsinom çok sayıda genetik ve epigenetik değişikliğin birlikte etkisiyle meydana gelir. Bu genetik değişikliklerden bazıları; kromozomlardan parça kaybı ve eklenmesi, nokta mutasyonu ve heterozigotluğun kaybıdır. Epigenetik değişikliklerden bazıları ise hiper/hipometilasyon ve maternal allelde impritlenmenin kaybıdır. Bu genetik ve epigenetik değişiklikler çoğunlukla tümör baskılayıcı gen ürünleri olan RB1, TP53 ve HNF1α proteinlerinin işlevlerinin ortadan kalkması, gelişimde rol alan WNT ve Hedgehog yolaklarının yeniden faaliyete geçmesi ve STAT ve MAPK (mitojenlerle faaliyete geçen protein kinaz) yolaklarında onkogenik dönüşümler ile sonuçlanır (Shiraha ve ark. 2013).

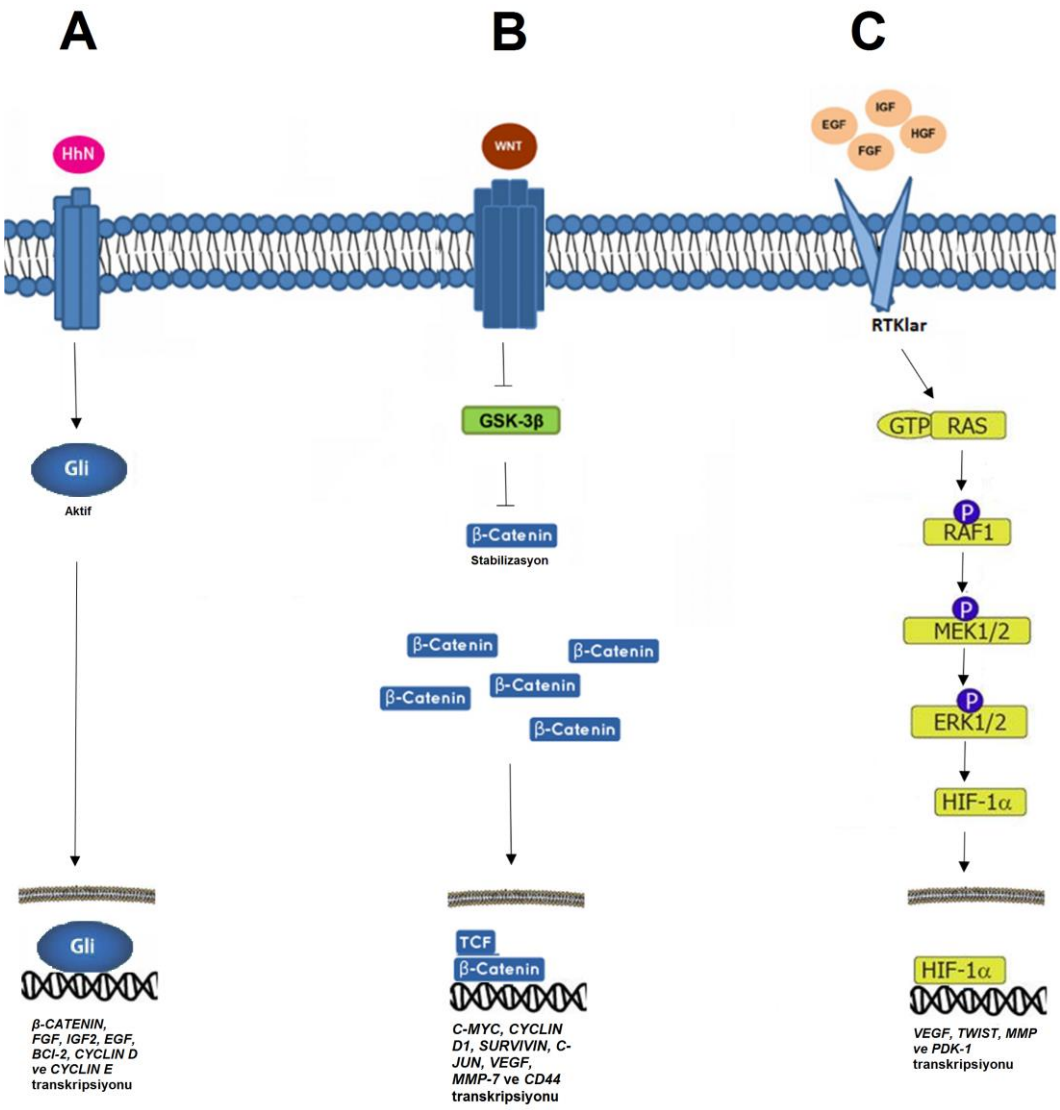
Büyüme hormonlarının olmadığı durumlarda RB1 proteini E2F transkripsiyon faktörüne bağlanarak onun DNA'ya bağlanmasını engeller. Böylece hücre döngüsünün S-fazıyla ilgili olan proteinlerin üretimine ket vurularak hücre büyümesi engellenir. 13. kromozomun q kolundaki bir parça kaybı *RB1* geninin delesyonuyla sonuçlanabilir. Bu delesyon sonucunda RB1 proteini hedef transkripsiyon faktörüne bağlanamaz ve büyüme hormonu yokluğunda bile hücre bölünmesinin önüne geçilemediğinden hücre büyüyüp çoğalır. Pek çok HSK'da hücre döngüsünün RB1 aracılığıyla düzenlenmesine zarar verildiği gösterilmiştir (Schulz 2005). Bir tümör baskılayıcı protein olan TP53; DNA tamiri, apoptoz ve anti-anjiyogenez bakımından önemlidir (Bertheau ve ark. 2008). *TP53* genetik hasarı Li-Fraumeni sendromu veya kanser sıklığını artırır (Srivastava ve ark. 1990). HSK'da kemoterapi için kullanılan üç ajanın (Mitoksantrone, Doxorubicin ve Bleomicin) HepG2'lerde (HSK hücre hattı) p53 ailesi proteinleri (p53, p63 ve p73) aracılığıyla hem proapoptotik (APAF1, BIM, RAD) hemde antiapoptotik (BCL-XL, MDM2, FLIP, MCL-1) genlerin ifadesini artırdığı ileri sürülmüştür (Seitz ve ark. 2010). Malignant kanser hücrelerinin p53 aracılığıyla apoptozu kanser terapisi için istenilen bir durumken, yine p53 aracılığıyla hücre döngüsünün tutuklanması sonucu ilaç direnci gelişimi, terapi açısından olumsuzluklar taşımaktadır (Hopker ve ark. 2013).

Hepatosit nükleer faktörleri (HNF), karaciğere özgü pek çok genin ifadesini düzenlemekle görevlidir. HNF4α'nın embriyonik gelişimde hepatosit farklılaşması için bir düzenleyici olarak çalıştığı (Parviz ve ark. 2003), yetişkin karaciğer hepositlerinde aşırı ifade edilerek epitel programı faaliyete geçirirken mezenkimal programı ise baskıladığı ileri sürülmüştür (Santangelo ve ark. 2011). *HNF1α* tümör baskılayıcı gen olarak çalışır ve HNF1α ifadesinin azalması HSK gelişimine katkı sağlar (Bluteau ve ark.

2002). Yavaş gelişen HSK'ya sahip farelerde HNF4α ifadesinin artırılmasının farklılaşma ve EMT inhibisyonu aracılığıyla tümör invazyonunu azalttığı gösterilmiştir (Lazarevich ve ark. 2004). Ailesel adenomların %84'ünde *HNF1α* geninin mutasyon taşıdığı gösterilmiştir (Bacq ve ark. 2003). Yeni bir çalışma ile HNF1α'in HSK hücrelerinde Notch yolağı aracılığıyla kök hücre özelliklerinin artmasına yol açtığı bulunmuştur (Zhu ve ark. 2017). Bir başka çalışmada ise *HNF1B* aşırı ifadesinin hastalığın seyrini tahmin etmeyi zorlaştırdığı ileri sürülmüştür (Yu ve ark. 2015).

HSK olgularının %50'sinde STAT yolağının sürekli faaliyeti söz konusu olduğu ileri sürülen bir başka yolakta STAT yolağıdır. STAT yolağı, IL6 ile tetiklenir ve bir kere faaliyete geçtikten sonra sitokin olmasa da saatlerce faaliyetini yitirmez. *SOCS1* gen promotorunda hipermetilasyon ve 16p13'te heterozigotluğun kaybı sonucu STAT yolağı uzun süre sinyal iletir ve apoptoza karşı daha kuvvetli direnç oluşumuna yol açar (Subramaniam ve ark. 2013). Hedgehog yolağı embriyonik dönemde faal olup farklılaşma, çoğalma, doku polaritesi, ve karsinogenezde etkilidir (Jia ve ark. 2015). Şekil 1.3 A'da görüldüğü gibi hücre dışı ortamda Hedgehog faktörlerinin (HhN) reseptörlere bağlanması sonucu faaliyete geçen Gli proteinleri çekirdeğe geçer ve *β-CATENIN, FGF, IGF2, EGF, BCI-2, CYCLIN D ve CYCLIN E* genlerinin transkripsiyonunu başlatır (McMillan ve ark. 2012). Hedgehog yolağının HSK ile ilgisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Fakat Wnt/β-catenin yolağı ile çapraz-etkileşim sonucu HSK gelişimine yol açtığı düşünülmektedir (Giakoustidis ve ark. 2015). Wnt/β-catenin yolağı evrimsel olarak yüksek seviyede korunmuş olup embriyogenez sırasında hücre göçü, polaritesi ve organogenezi düzenler (Komiya ve ark. 2008). Şekil 1.3 B'de şematize edildiği gibi Wnt/β-catenin yolağı wnt faktörlerinin reseptöre bağlanmasıyla tetiklenir. Bu bağlanma sitoplazmada GSK-3β proteinlerini inhibe edilerek β-catenin'in stabilizasyonuna yol açar. Bu durum, β-catenin'in çekirdeğe yerleşmesini ve TCF proteini ile birlikte *C-MYC, CYCLIN D1, SURVIVIN, C-JUN, VEGF, MMP-7* ve *CD44* genlerinin transkripsiyonun açılmasını sağlar (Kim ve ark. 2013). Wnt/β-catenin yolağının sürekli faaliyetinin ve onkogenik dönüşüme yol açtığı ileri sürülmüştür (Chen ve ark. 2014, Gedaly ve ark. 2014). Ayıca Wnt yolağının anormal olarak sürekli faaliyette bulunması, hepatit C virüsü ile ilişkili HSK'larda rapor edilmiştir (Forner ve ark. 2012). HSK'da bir başka faaliyete geçen yolak MAPK'dır. Şekil 1.3 C'de görüldüğü gibi EGF, IGF, HGF ve FGF gibi faktörler hücre zarında reseptör tirozin kinazlar veya G-protein eşleşmiş

reseptörlerle algılanarak küçük G-protein ailesinin bir üyesi olan RAS proteinini tetikler. Bu durum sırasıyla RAF ve MEK1/2 ve ERK1/2 proteinlerini faaliyete geçmesini sağlar (Delire ve ark. 2015). ERK1/2 proteinleri aracılığıyla tetiklenen HIF1α, çekirdeğe yerleşerek *VEGF, TWIST, MMP ve PDK-1* genlerinin transkripsiyonunun başlatılmasını sağlar (Sodhi ve ark. 2000, Liu ve ark. 2012). Düzenleyici bölgesinde mutasyon taşıyan bir RAF proteini MAPK yolağın sürekli faaliyette tutulmasına neden olarak onkojenik transformasyona yol açar. HSK'ların yaklaşık %7'si *KRAS* onkogeninde mutasyon taşır (Karnoub ve ark. 2008). Vinil klorit nedeniyle gelişen 18 HSK olgusunun %33'ünde *KRAS*'ın mutant olduğu rapor edilmiştir (Laurent-Puig ve ark. 2006).

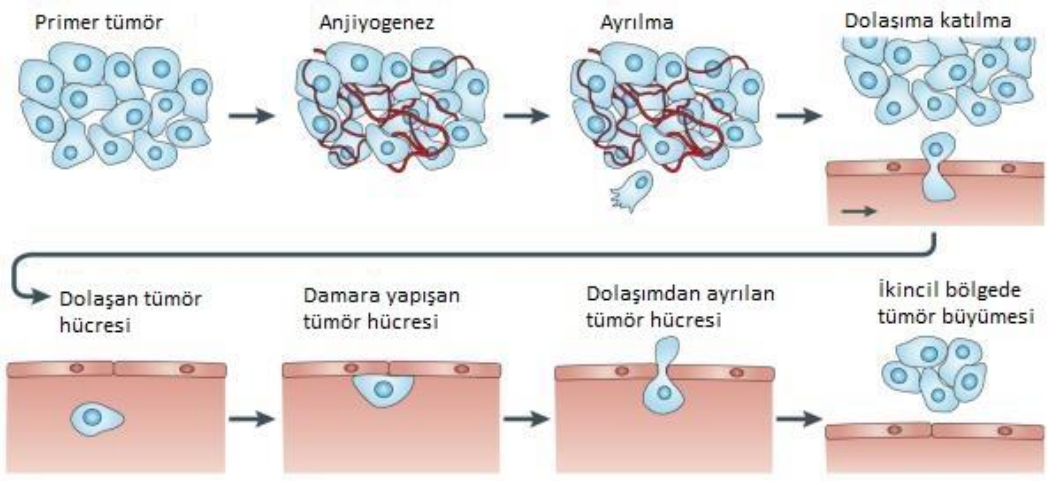


***Şekil 1.3**. HSK'da faaliyete geçen Hedgehog, Wnt/β-catenin ve MAPK yolakları*

1.2. Metastaz ve Epitel-Mezenkimal Geçiş

Kanserin ölümcül olmasının ardında yatan başlıca sebep tümör hücrelerinin vücudun diğer organlarını istila etmesidir. Metastaz adı verilen bu olay karmaşık ve çok aşamadan oluşan bir süreçtir. Primer tümör hücrelerinin ikincil bölgelere metastaz yapabilmesi için Şekil 1.4'te belirtilen ve aşağıda sıralanan metastatik süreci tamamlamaları gereklidir. Bunun için tümör hücrelerinin;

1. Öncelikle içinde bulundukları tümör dokusunda anjiyogenez ile damar oluşumunu sağlamaları,
2. Sonra tümör dokusunun içinde bulunduğu bölgeden ayrılmaları,
3. Daha sonra kan veya lenf dolaşımına katılarak vücudun farklı bölgelerine ulaşmaları,
4. Ardından dolaşım sisteminden ayrılmaları ve nihayet ulaştıkları ikincil bölgelerde çoğalmaları gerekmektedir (Chaffer ve ark. 2011, Hanahan ve ark. 2011, Wirtz ve ark. 2011).



Şekil 1.4. *Metastatik süreç (Wirtz ve ark. 2011)*

Bütün bu metastatik süreç boyunca tümör hücreleri; immün sistem elemanları, hormon, sitokin ve metabolit gibi çok sayıda biyolojik molekül ve kimyasalın çeşitli etkilerine maruz kalırlar. Bu etkiler çoğu zaman tümör hücrelerinin ölümüyle sonuçlandığı gibi bazen de (ne yazık ki) yaşama, büyüme ve çoğalma konusunda daha inatçı bir fenotip geliştirmelerine yol açar. Metastaz yapmış bir tümör hücresi, dolaşım

sisteminde bulunan ve ölümcül etkiye sahip olan çok sayıdaki biyolojik molekülü (doğal öldürücü hücreler, sitotoksik T hücreleri, TNF-ilişkili apoptoz tetikleyen ligand (TRAIL), küçük araya giren RNA (siRNA) gibi) çeşitli mekanizmalarla atlatarak zaten var olan kontrolsüz çoğalma yeteneklerine birde ölümü atlatma (direnç) yeteneği ekler. Bu iki özelliği birlikte taşıyan tümör hücreleri artık baş edilmesi neredeyse mucizelere kalmış birer istilacı hücrelere dönüşür.

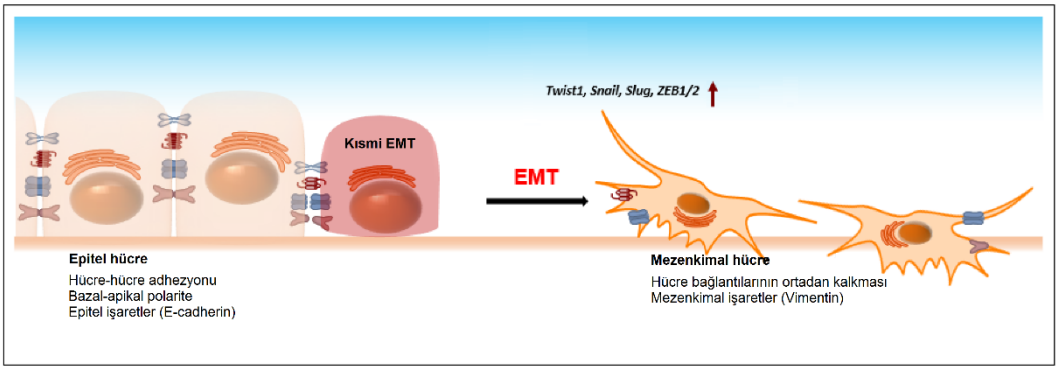
Belirli kanser tiplerinin dokuya özgü bir şekilde metastaz yaptığı uzun zamandır bilinmektedir. Örneğin; meme kanseri için genellikle kemik, akciğer, karaciğer ve beyin sekonder metastatik bölge iken, kolon ve pankreas kanserleri için akciğer ve karaciğer, prostat kanseri için ise kemikler sekonder metastatik bölgedir (Nguyen ve ark. 2009). Sekonder metastatik bölgelerin kanser tipine özgü olabileceğine dair ilk gözlem iyi bir cerrah olan Stephen Paget tarafından 100 yıl önce kayıt edilmiştir. Paget, 735 meme kanseri vakasında sıklıkla karaciğerin metastaza uğradığını gözlemlemiş bu gözlemini "tohum-toprak" hipotezi ile açıklamıştır. Tohum-toprak hipotezine göre bir tohumun ancak uygun şartlarda bir toprak üzerinde yeşermesi gibi, kanser hücreleri de ancak uygun bir organ üzerinde gelişerek metastaz yapabilmektedir (Paget 1889). Tohum-toprak hipotezi sadece meme kanseri ile sınırlı kalmayıp yukarıda bahsedildiği gibi çok sayıda kanser tipi için genelleşmiştir. Şu anki bilgilerimiz, kanser hücrelerinin sekonder organlara yayılmasını tetikleyen önemli unsurlardan birisinin pre-metastatik niş oluşumu olduğunu göstermektedir. Pre-metastatik niş, ikincil organlarda metastaz oluşumuna zemin hazırlayan çevre şartlarının gelişimidir. Pre-metastatik niş oluşumunun bilinen ilk deneysel kanıtlarından biri, henüz hiçbir kanser hücresi bulunmayan sekonder tümör odaklarında kemik iliği öncül hücrelerinin kümelenerek, burada tümör hücrelerinin yerleşmesine yardımcı olan integrin $\alpha_4\beta1$ (VLA-4) ve fibronektin proteinleri seviyesinin artmasını sağlamasıdır (Kaplan ve ark. 2005). Sonraki yıllarda, melanoma ekzozomlarının kemik iliği öncül hücrelerinde reseptör tirozin kinaz tetiklenmesini sağlayarak bu hücrelerin pre-metastatik niş oluşumuna yardımcı olduğu gösterilmiştir (Peinado ve ark. 2016). Ayrıca, pankreas tümör hücreleri tarafından salgılanan ekzozomların dolayısıyla ekzozomlarda bulunan protein ve nükleik asitlerin karaciğerde metastatik niş oluşumuna katkı sağladığı ileri sürülmüştür (Costa-Silva ve ark. 2015). Dahası, fare ve insan akciğer, karaciğer ve beyin tümör hücrelerinden salgılanan ekzozomların hedef organlarda yerleşmiş hücreler tarafından seçici olarak hücre içine

alındığı ve bu hücreler aracılığıyla pre-metastatik niş oluşumuna katkı sağladığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada ekzozomal integrinlerden olan $\alpha_6\beta_1$ ve $\alpha_6\beta_4$'ün akciğer $\alpha_5\beta_4$'in ise karaciğer metastazı ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Hoshino ve ark. 2015).

Epitel hücreler, vücut ve organ yüzeylerini örterek organların dış dünyaya karşı bir bariyer oluşturmasını sağlar. Epitel hücrelerin organ boşluklarındaki koruyucu etkisi; sindirim, solunum, ürogenital sistemlerinin iç boşluklarını da kaplamak suretiyle görülür. Salgı, emilim, duyu algılama gibi işlevlere de sahip olan epitel hücreler birbirlerine çok sıkı bağlarla bağlanmıştır. Epitel hücrelerde bazal, apikal ve lateral yüzey olarak bilinen kutuplaşma da söz konusudur. Epitel hücrelerin polarite gösteren yüzeylerinden lateral yüzey, hücrelerin sıkı bağlar, adheren bağlar, desmozomlar ve gap bağlantılarıyla birbirlerine bağlandıkları yüzeyini oluştururken, bazal yüzeyde hücreler bazal membrana fokal adezyonlarla bağlanır. Apikal yüzey ise genellikle boşluklara bakan yüzeyi oluşturur (Pavelka ve ark. 2015). Epitel dokuda, travma ve mekanik yıkım etkisiyle hücre ölümü sıklıkla gerçekleşir. Buna bağlı olarak, hücre yenilenmesi hızlanır böylece bu hücrelerde mitotik indeks diğer doku hücrelerine göre artar. Bu durum hücre yenilenmesi için bir avantaj olmasına karşın, karsinom oluşumu için gerekli bir genetik program hazırlar (Lurie 1969, Miller ve ark. 1988, Miliaras 1999, Ceccaroni ve ark. 2004, Wang ve ark. 2010). Epitelden mezenkime geçiş, gelişim sırasında embriyonik epitel hücrelerin mezenkim hücrelerine dönüşmesini sağlayarak hücrelere plastisite kazandırır (Kerosuo ve ark. 2012, Nakaya 2014, Cheng ve ark. 2015). Epitel tümörlerde, transforme hücrelerden bir kısmı; parke taşı şeklinde olan morfoloji, bazal-apikal polarite ve hücre-hücre bağlantıları gibi bir takım epitel karakterlerini kaybeder. Epitel karakterlerini kaybeden hücreler uzamış iğ şeklinde bir morfoloji ve hareketli (motile) bir fenotip kazanarak mezenkimal özellikler geliştirir (Şekil 1.5). Epitelden mezenkime geçiş (EMT) olarak bilinen bu olay hücrelerin primer tümör odağından yayılmasının temelini oluşturur (Ye ve ark. 2015). Epitelden mezenkime geçiş tamamen hücresel duruma bağlı olan bir süreç olup bazı tümör hücreleri bu süreci tamamlayarak (tam EMT) metastaz yaparken diğerleri ise bu sürecin herhangi bir aşamasında (kısmi EMT) metastaz gerçekleştirebilir (Jordan ve ark. 2011). Tam EMT, E-cadherin gibi epitel işaretleri protein seviyesinin azalması; Snail, Slug, Twist1, ZEB1 ve ZEB2 gibi EMT transkripsiyon faktörleri ile vimentin gibi mezenkim işaretleri protein seviyelerinin artması ile karakterize edilir.

(Samatov ve ark. 2013). Kısmi EMT'de ise hücreler epitel ve mezenkim özelliklerini birlikte taşır. Bu sayede kısmi EMT fenotipli hücreler epitel karakterlerin kısmi kaybı ve mezenkim karakterlerin kısmi kazancı ile metastaz yapar (Christiansen ve ark. 2006). Bu konudaki bilgiler özellikle kandan izole edilmiş olan dolaşan tümör hücrelerinden bazılarının hücre-hücre adhezyon karakterleri bakımından epitelyal, hücre göçü karakterleri bakımından ise mezenkimal özellikler taşımasıyla tespit edilmiştir (Yu ve ark. 2013). Hem ortaklaşa hücre göçü hem de dolaşım sisteminde kümelenme üstünlükleri sayesinde, kısmi EMT fenotipinde olan dolaşan tümör hücrelerinin tek başına göç eden dolaşan tümör hücrelerine göre apoptoza karşı daha dirençli ve 50-kat daha fazla metastaz yapma kabiliyetinde oldukları gösterilmiştir (Aceto ve ark. 2014).

EMT transkripsiyon faktörleri olan Snail ve Slug, E-cadherin kodlayan gen (*CDH1*) promotorunda E-kutusuna bağlanarak gen ifadesini baskılar. Dahası; vimentin, fibronektin1 ve metalloproteinaz gibi hücre göçüne yardımcı olan proteinleri kodlayan genlerin ifadesini artırır (Peinado ve ark. 2004). Slug veya Snail'in *in vitro* şartlarda aşırı ifadesinin hem normal epitel hücrelerde (Bolos ve ark. 2003, Savagner ve ark. 2005) hem de kanser hücrelerinde (Sun ve ark. 2014, Zhao ve ark. 2015) EMT'nin tetiklenmesine yol açtığı gösterilmiştir. Normal hücrelerde gelişen EMT ile yara iyileşme sürecine katkı sağlanırken kanserli hücrelerde EMT'nin tetiklenmesi daha çok metastaz ile ilişkilidir. Slug-aracılı gelişen EMT'nin oral dil skuamöz hücreli karsinomda tam (Zheng ve ark. 2015) veya böbrek hücrelerinde kısmi (Leroy ve ark. 2007) EMT olabileceği gösterilmiştir.



Şekil 1.5. *Epitelden mezenkime geçiş süreci (Kao ve ark. 2016)*

Hem *in vivo* hemde *in vitro* çalışmalar invazyon yapan hücrelerin çok çeşitli morfolojilerde olabileceğini göstermiştir. Tümör hücresinin bulunduğu mikroçevre hücre morfolojisi ve hareket tipini belirlemede etkilidir (Joyce ve ark. 2009, Hernandez-Gea ve ark. 2013). Malignant hücrelerin sekonder organlara ulaşması için üç farklı hareket bilinmektedir. Bunlar fibroblast benzeri hareket, amip hareketi ve kollektif hücre göçüdür. Bu hareketler arasında geçişkenlikler de söz konusudur. Tümör hücreleri tek hücreler şeklinde bağ dokuyu geçebileceği gibi, kolektif olarak hatta tek hücre-kollektif hücre grubu arasında geçişkenlikler kurarak metastazı gerçekleştirebilir (Friedl ve ark. 2003, Krakhmal ve ark. 2015). Malignant hücreler EMT sonucu, epitel polaritelerini kaybederek mekik şeklide fibroblast benzeri kazandıkları için bu hücrelerin hareketi de fibroblast benzeri hareket olarak adlandırılmıştır (Friedl ve ark. 2003, van Zijl ve ark. 2011). HSK hücrelerinin de dahil olduğu bazı tümör hücreleri, lökositler ve dolaşan tümör hücreleri amip-benzeri hareket ile metastaz yapabilirler (Hou ve ark. 2012, Clark ve ark. 2015). Amip hareketin karakterizasyonu için hücre şeklinin hücrelerarası matrikse hızlı ve kolay uyum sağlayacak şekilde yuvarlak olması ve hücre zarından kabarcıklanmalar benzeri çıkıntılar oluşturulması kullanılır (Friedl ve ark. 2003, van Zijl ve ark. 2011, Clark ve ark. 2015). Amip benzeri hareket sırasında hücre morfolojisiyle beraber çekirdek şekli ve yerleşimi de değişmektedir (Krakhmal ve ark. 2015). Tümör hücreleri dar yerlerden ve küçük porlardan geçmek zorunda olduğu için, çekirdek hücre hareketini kolaylaştırmak üzere hücrenin ön tarafına doğru ilerler. Amip benzeri hareketin karakterizasyonu için bir başka kriter, hücre-matriks etkileşiminin zayıflaması ve fokal bağlantıların ya tamamen ortadan kalkması veya zayıflamasıdır (Krakhmal ve ark. 2015). Hücre mikroçevresinde meydana gelen değişikliklere adaptasyon için tümör hücrelerinin amip benzeri hareket ile fibroblast benzeri hareket arasında geçiş yapabilecekleri de rapor edilmiştir (Friedl ve ark. 2003, Krakhmal ve ark. 2015). Kollektif hücre göçü, birbirine sıkı bağlantılı tümör hücrelerinin birlikte hareketini tanımlamak için kullanılır ve kollektif polarizasyonun kurulması, sürdürülmesi sonucu meydana gelir (Haeger ve ark. 2015). Hücre-hücre adezyonuna sahip bir grup hücrenin epitel hücre tabakaları halinde hareket etmesiyle kendisini gösteren kollektif hücre göçünün karakterizasyonu için üç temel ayırdedici özellik kullanılır. Bunlar; 1) hücre hareketi boyunca hücre-hücre bağlantılarının korunması, 2) hücre iskeletinin polarizasyonu ve 3) hücrelerarası matriksin yeniden organizasyonudur (van Zijl ve ark. 2011, Krakhmal ve ark. 2015). Metastatik hasta kanlarında dolaşan tümör hücreleri kümeler halinde bulunabildiği (Hou

ve ark. 2012) ve bu hücre kümelerinin kanser hücrelerinin kanda biraraya gelmesinden ziyade, kollektif olarak hareket etmeleriyle oluştuğu gösterilmiştir (Hou ve ark. 2012, Aceto ve ark. 2014). Bireysel hücre göçünden kollektif hücre göçüne geçiş ile malignant neoplazmların, invazyon ve metastaz potansiyelinin arttığı ileri sürülmektedir (Clark ve ark. 2015, Haeger ve ark. 2015, Krakhmal ve ark. 2015). HSK'da kollektif hücre göçünün önemiyle ilişkili yayın oldukça az olmakla birlikte, transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β)'nın hepatositler üzerindeki etkisini araştıran bir çalışma oldukça ilgi çekicidir. Bu çalışmada, yüksek seviyede farklılaşmış immortalize bir hepatosit hücre hattı olan mhAT3F hücrelerine TGF- β uygulandığında hücrelerin kültür kabı adezyonlarını ya tamamen ya da kısmen yitirerek kollektif hücre göçü ile hareketlerini artırdıkları ifade edilmektedir. Dahası, TGF- β uygulamasının hepatositlerde E-cadherin, İntegrin $\alpha_5\beta_1$ ve Fibronektin ifadelerini artırdığı gösterilmiştir (Biname ve ark. 2008). Ayrıca, ister fibroblast-benzeri hareket ile isterse kollektif hücre göçüyle dolaşan tümör hücrelerinin HSK nüksetmesine katkı sağladığını, bu sebeple kanser terapisi için önemli birer hedef olabilecekleri ifade edilmektedir (Li ve ark. 2013, Zhang ve ark. 2014). Yeni yapılan bir başka çalışmada ise HSK hücrelerinde plektin azalması ve E-cadherin artmasının, kollektif hücre göçünü artırdığı gösterilmiştir (Cheng ve ark. 2018). Bir homeobox proteini olan goosecoidin HSK hücre hatlarında aşırı ifadesi, kollektif hücre göçünden ziyade fibroblast-benzeri hareket aracılığıyla hücrelerin invazyon yeteneğini artırdığı gösterilmiştir (Xue ve ark. 2014).

1.3. Hepatosellüler Karsinom Biyoişaretleri

Klinikte kullanılmak üzerine yeni kanser biyoişaretlerini keşfetmek için son yıllarda önemli çabalar sarf edilmektedir. Ancak, bir derlemede biyoişaret keşfine yönelik çaba ile klinikte uygulamaya giren işaret sayısı arasında çarpıcı bir tutarsızlık olduğuna vurgu yapılmaktadır (Fuzery ve ark. 2013). Dahası günümüz kliniklerinde kullanılan biyoişaretlerin düşük duyarlılıkta ve özgünlükte olmalarından dolayı geliştirilmeleri gerektiği çok yakın zamanda yazılmış bir başka derleme ile açıkça ifade edilmektedir (Ye ve ark. 2018). Bu durum HSK için de geçerli olup, HSK'da patologların kullanabileceği biyoişaret sayısı oldukça sınırlıdır (Di Tommaso ve ark. 2017). Günümüzde HSK tanısı için kullanılabilen işaretler serum α-fetoprotein (AFP), AFP-L_3, des-gama-karboksi-protrombini (DCP), osteopontin (OPN), golgi protein 73 ve glipican-3'tür (Beale ve ark.

2008, Forner ve ark. 2009, Mossad ve ark. 2014, Wan ve ark. 2014, Yang ve ark. 2015, Johnson ve ark. 2016, Li ve ark. 2017).

AFP yetişkinlerde bulunan albümin proteininin fetal protein analoğudur. Doğumdan sonra kaybolmasına rağmen HSK gibi patolojik şartlarda yeniden üretilir. HSK dışında kronik karaciğer hastalığı gibi diğer patolojik şartlarda da AFP üretiminin arttığı rapor edildiğinden AFP'nin tek başına HSK biyoişareti olarak kullanımı yeterli olmamaktadır (Forner ve ark. 2009). Fötal karaciğer tarafından üretilen bir glikoprotein olan AFP-L_3'ün yetişkinlerde üretiminin artması özgün olarak HSK tanısı koymak bakımından total AFP'den çok daha kullanışlıdır (Mossad ve ark. 2014). Olgunlaşmamış prothrombin olan DCP'nin yüksek konsantrasyonu (> 7,5 ng/ml) HSK riskinin beş kat artmasıyla ilişkilendirilmiş olup DCP düzeyinin HSK öncesinde artmaya başlayabileceğine dair öneriler bulunmaktadır (Beale ve ark. 2008, Gao ve ark. 2012). İntegrine bağlanan bir glikofosfoprotein olan OPN, hepatit C virüsü taşıyan HSK hastalarında AFP ile ya eşit veya daha iyi tanı etkinliği sağlaması bakımından önemlidir (Wan ve ark. 2014). Bir transmembran proteini olan golgi protein 73 patolojik şartlarda hepatosit yüzeyinde ifade edilerek salgılanabilir. Serum golgi protein 73 ifadesinin, HSK tanısı için AFP ile benzer perfomans gösterdiği rapor edilmiştir (Yang ve ark. 2015). Fakat sonraki yıllarda golgi protein 73'ün siroz arka planında gelişmeyen HSK tanısı için uygun olmadığı gösterilmiştir (Liu ve ark. 2017). Son yıllarda, glikozil-fosfatidilinositol çıpası ile hücre zarına bağlanan bir proteoglikan olan Glipikan-3'ün HSK tanısı için bir biyoişaret olabileceği, OPN ile birlikte kullanmanın HSK'yı özgün olarak tanımlamada etkin olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir (Liu ve ark. 2014, Li ve ark. 2017).

Yukarıda bahsedilen AFP, DCP, AFP-L_3, OPN, golgi protein 73 ve glipican-3 gibi biyoişaretler günümüzde HSK tanısı için kullanılmaktadır. Ancak kanser tedavisi sadece tanı ile sınırlı olmayan zor bir süreç olup kemoterapi sebebiyle hastalar çoğunlukla yan etkilerden zarar görmektedir. Her bir hastaya özgü en iyi kemoterapi seçeneğini uygulamak için tanı koyulduktan sonra mücadele edilmesi gereken tümör iyi karakterize edilmeli, tümör karakterini hedef alan ilaçlar uygun miktarda kullanılmalı, tedavi sırasında ilaç direnci gelişimi olup olmadığı kontrol edilmeli ve tedavi sonrasında hastalığın nüksetmesini engellemek gereklidir. Özellikle tedavi sırasında ilaç direnci gelişimi olup olmadığını saptamak için klinikçilerin kullanabileceği güvenilir bir biyoişaretin bulunmadığı çok yeni yayınlanan bir derlemede önemle ifade edilmektedir

(Gerhards ve ark. 2018). HSK özelinde konu ele alındığında, HSK'nın kemoterapiye karşı düşük duyarlılıkta olduğu (Petraccia ve ark. 2003), çok sayıda mekanizma ile çoklu ilaç direncine sahip olduğu (Zhang ve ark. 2007, Luo ve ark. 2014) bilindiği için kemodirenç biyoişaretlerine olan ihtiyaç HSK'da daha da kendini göstermektedir.

1.4. Hepatosellüler Karsinom Terapisi

Günümüzde HSK için bazı tedavi opsiyonları bulunmaktadır. Bunlar; cerrahi operasyon, sistemik terapiler (kemoterapi, immünoterapi, hormonalterapi, hücre döngüsünün büyüme faktörleri veya antikorlarla kontrolü), karaciğer nakli, ablasyon tedavileri, transkateteryel hepatik arter tedavileri (transarteryal kemoterapi, transarteryal embolizasyon, transarteryal kemoembolizasyon, ^{90}Y mikroküreleri (sirküreler yada teraküreler), ^{131}I Lipiodol, ^{66}Ho, ^{188}Re, Gen terapileri), eksternal lazer konformal radyasyonu ve destekleyici palyatif tedavilerdir (Carr ve ark. 2016).

Cerrahi yöntemler diğer pek çok kanserde olduğu gibi HSK için de ana yöntemdir. Cerrahi yöntemler sonucu hastaların %60-80'inde 5 yıl yaşama süresine ulaşılmıştır (Llovet ve ark. 1999). Ablasyon genellikle tümör dokusunun ısıtma, dondurma veya kimyasal madde uygulamasıyla tahrip etme işlemidir. Ablasyon cerrahi operasyonun kısıtlı olduğu hallerde erken aşamada yakalanan tümörlerin tahrip edilmesi için kullanılır (Livraghi ve ark. 1993).

Sistemik terapilerden olan kemoterapi HSK terapisi için sıklıkla kullanılmasına rağmen tedaviye olumlu cevap veren hasta oranı %30'dan fazla değildir. HSK'nın, kimyasallara dirençli olması kemoterapiye olumlu yanıt verme imkanını sınırlamaktadır. Bazı ilaç kombinasyonlarının uygulandığı kemoterapi ise hasta yaşam süresini uzatmadan tedaviye olumlu cevap veren birey sayısında %20 artış sağlamaktadır (Carr ve ark. 2016). HSK terapisinde FDA'dan onay almış tek terapi ajanı bir tirozin kinaz inhibitörü olan Sorafenib/Nexavar'dir (Peek ve ark. 2008). Kuzey Amerika ve Avrupa'da yapılan çalışmalar Sorafenib'in ilerlemiş karsinomlarda uygulanmasının yaşam süresini birkaç ay artırdığını, ancak diyare, hipertansiyon ve el-ayak deri rahatsızlıkları gibi yan etkiler oluşturduğunu rapor etmektedir (Llovet ve ark. 2008, de Guevara 2012).

HSK terapisi için az sayıda da olsa çeşitli immunoterapi uygulamaları test edilmiş ve tartışmalı bazı sonuçlar elde edilmiştir. Metastatik melanomalarda antitümör faaliyeti

gösteren interferon α'nın, HSK üzerindeki etkisi üç önemli çalışmada araştırılmıştır. Bunlardan ilkinde, rekombinant interferon α2'nin doxorubucine göre daha az yan etkiyle birlikte daha çok tümör gerilemesini sağladığı gösterilmiştir (Lai ve ark. 1989). İkinci bir çalışmada Çinli hastalar üzerinde interferon α'nın olumlu etkisi tespit edilirken (Lai ve ark. 1993) üçüncü çalışma ise interferon α2'nin Avrupalı hastalar üzerinde herhangi bir olumlu etkiye sahip olmadığını ileri sürmektedir (Llovet ve ark. 2000). HSK'da $CD8^+$ T hücrelerinde bir immün baskılayıcı yüzey reseptörü olan PD-1 ifadesinin arttığı ve kupfer hücrelerinde PD-L_1'in artığı gösterilmiştir (Pardee ve ark. 2012). Bir PD-1 reseptörü bloklayıcı antikoru olan Nivolumab'ın HSK'de faz II çalışmaları tamamlanmış ve faz III çalışmaları yürütülmektedir (Sangro ve ark. 2016). HSK terapisi için antivaskular endoteliyal büyüme faktörü olarak çalışan ve bir monoklonal antikor olan Bevacizumab'ın Erlotinib ile kombine edildiğinde Asya toplumu için düşük yan etki ile terapi sağlayabileceği gösterilmiştir (Hsu ve ark. 2013).

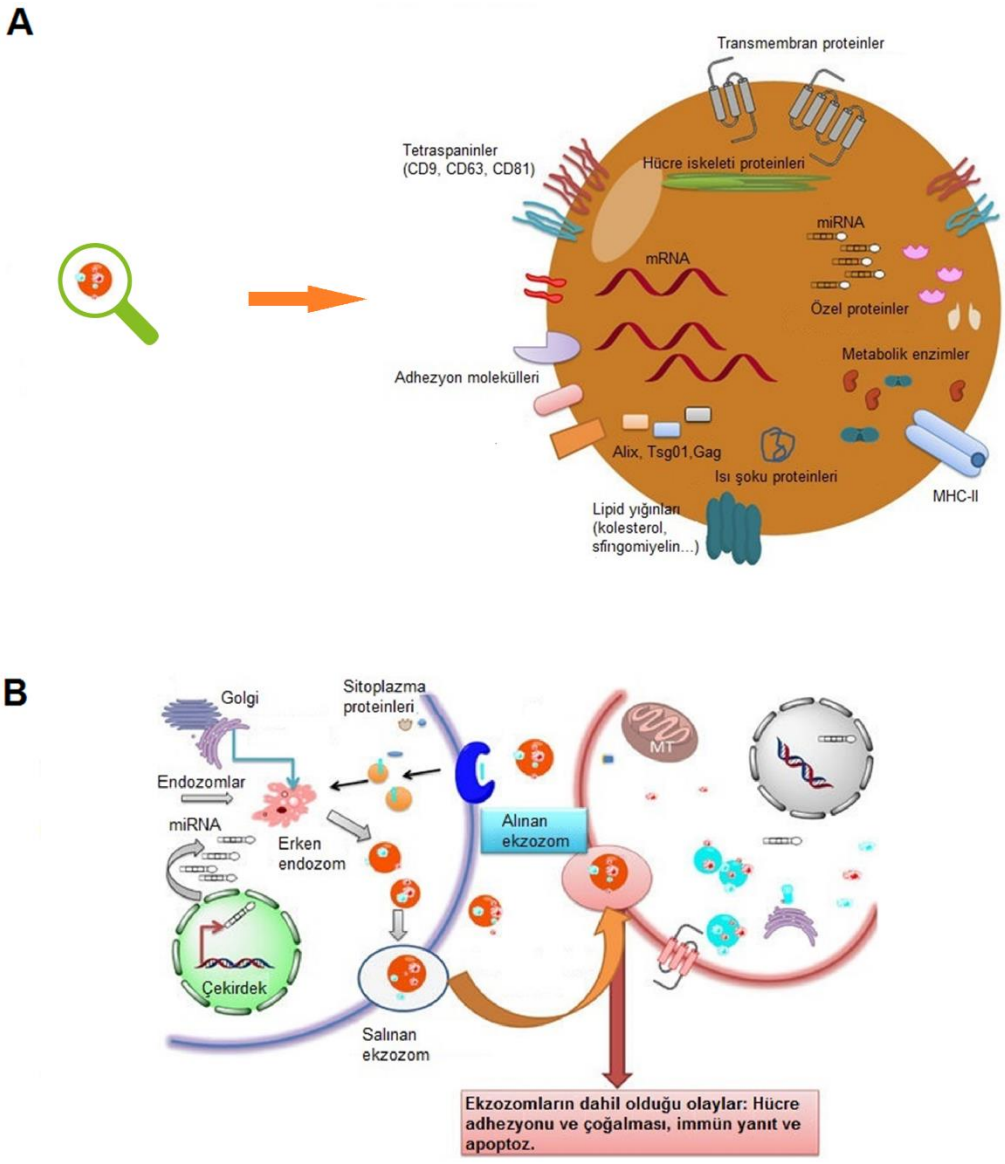
1.5. Ekzozomlar ve Metastaz

Kanser tedavisindeki en önemli engellerden birisi tümör hücrelerinin, immün hücrelerin antitümör faaliyetlerini baskılayarak hücre ölümünden kaçmalarıdır (Taylor ve ark. 2003, Whiteside 2006, Morrot ve ark. 2018). Geçtiğimiz yıllarda, kanser hastaları seralarının normal T hücreleriyle kısa bir inkübasyonunun (sağlıklı birey seralarının aksine) T hücre fonksiyonlarının ortadan kalkmasına yol açtığı gösterilmiştir. Kanser hastalarının seralarında bulunan bu baskılayıcı etkinin 50-100 nm arasında boyutlara sahip küçük zarlı keseciklerden (ekzozom) kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Huber ve ark. 2005, Kim ve ark. 2005).

Hücre dışı salgı vesikülleri günümüzde en az üç kategori altında incelenebilir. Bunlar; apoptotik cisimcikler, mikrovesiküller ve ekzozomlardır (Danielson ve ark. 2014). Bu salgı vesiküllerinin farklı tiplerini birbirinden ayırmak için diferansiyel santrifüjleme kullanılır. Büyük mikrovesiküller (200-1000 nm çaplı) 10.000-20.000g'de çökerken, ekzozomlar (30-150 nm çaplı) 100,000g'de çöker (Xu ve ark. 2016). Vücuttaki tüm hücreler tarafından sürekli olarak üretilip salgılanan ekzozomlar, Şekil 1.6 A'da belirtildiği gibi önemli işlevleri olduğu düşünülen DNA (tek zincirli DNA, çift zincirli DNA, mtDNA) ve RNA (mRNA, miRNA, lncRNA ve diğer RNA'lar) moleküllerini taşır (Thery ve ark. 2002). Ayrıca, tetraspanin proteinleri (CD9, CD63, CD81), adhezyon

molekülleri (integrinler), reseptörler (MHC-II, MHC-I, CD86) hücre iskeleti proteinleri (aktin, tubulin), vesikül trafiği proteinleri (Anneksin, TSG01, Alix), ısı şoku proteinleri (Hsp70, Hsp90) ve enzimler gibi protein yapılı moleküller ekzozom içeriğinde bulunur. Dahası ekzozomlar kolesterol, sfingolipitler ve seramid gibi bazı yağ yapılı molekülleri de barındırır (Braicu ve ark. 2015). Ekzozomların biyogenezinde, klasik endozomal yolakların rol oynadığı gösterilmiştir. Buna göre geç endozomal zarların tomurcuklanması ile meydana gelen vesikül içerisinde çok sayıda ekzozom bulunan cisimcikler oluşur (Peinado ve ark. 2016). Bu cisimciklerin hücre zarı ile birleşmesi sonucu ekzozomlar hücre dışı ortama salgılanır (Şekil 1.6 B). Salınan ekzozomlar hedef hücreye ulaştığında hücrelerin içine girer ve içerdikleri biyolojik moleküller aracılığıyla hedef hücrede hücre adhezyonu ve çoğalması, immün yanıt ve apoptoz gibi fizyolojik mekanizmalar üzerinde etkili olur (Braicu ve ark. 2015).

Kanser hücreleri de ekzozom salgılayarak bulundukları yakın çevreyi ve sekonder metastaz bölgelerini sürekli olarak modifiye eder (Costa-Silva ve ark. 2015, Hoshino ve ark. 2015, Peinado ve ark. 2016). Bu özelliklerinden ve çeşitli vücut sıvılarından girişimsel olmayan (non-invasive) yöntemlerle izole edilebildiklerinden dolayı, ekzozomların kanser tanısı ve tedavi takibi için önemli olan pek çok biyomoleküle sahip olabileceği ileri sürülmektedir (Li ve ark. 2015, Shao ve ark. 2016, Jia ve ark. 2017).



***Şekil 1.6**. Ekzozom yapı, biyogenez ve fonksiyonu (a) Ekzozom yapısı. (b) Ekzozom biyogenezi ve fonksiyonu (Braicu ve ark. 2015)*

Kanser hücrelerinden kökenlenen ekzozomların, metastaz gelişiminin neredeyse tüm aşamasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu aşamalar, primer dokudaki tümör hücrelerini çevreleyen doku invazyonu, immun sistemden kaçış ve pre-metastatik niş oluşumudur (Syn ve ark. 2016). Ekzozomların pre-metastatik niş oluşumundaki rolü çok çeşitli olup, metabolik reprogramlamadan metastatik gelişimi kolaylaştırmak için çeşitli immün ve stroma hücrelerini işe dahil etmeye kadar uzanır. Bir çalışmada, hipoksi

şartlarında miyeloma hücrelerinin, ekzozomlarla taşınan miR-135b ifadesini artırarak aniiyogenezi tetiklediği rapor edilmiştir. miR-135b'yi taşıyan ekzozomlarla muamele edilen endoteliyal hücrelerinde, miR-135b'nin faktör inhibe edici hipoksi ile tetiklenebilen faktör-1 (FIH-1) mRNA'sında 3'-UTR bölgeye bağlanmasıyla, HIF-1 α seviyesi artmıştır. Aynı çalışmada, primer tümör çevresinde anjiyogenez için ekzozomların etkili olduğu gösterilmiştir (Umezu ve ark. 2014). Dahası, renal karsinomlardan kökenlenen $CD105^+$ vesikülleri HUVEC hücrelerinin çoğalmasını artırmıştır (Grange ve ark. 2011).

Tümör kaynaklı ekzozomlar endotel hücrelerinden başka, mezenkimal kök hücreleri, fibroblastlar ve epiteliyal hücreler gibi stromal hücreler üzerinde de etkili olarak metastazı kolaylaştırmaktadır. Örneğin; insan kronik lenfosittik lösemi hücrelerinden kökenlenen ekzozomların *in vitro* şartlarda mezenkimal lösemi hücrelerinin içine girdiği, sonuçta mezenkimal kök hücrelerinin çoğalmasını artırdığı ve tümör hücrelerinin çoğalmasını sağlayan sitokin salgılamalarını sağladığı ileri sürülmüştür (Paggetti ve ark. 2015). TGF-β içeren ekzozomların fibroblastlardan FGF2, VEGF, HGF ve MMP salgılamasını artırarak pro-anjiyogenik ve tümör başlatıcı karakter oluşumuna yol açtığı bilinmektedir (Chowdhury ve ark. 2015). Tümör kaynaklı ekzozomlarda bulunan küçük RNA'ların, pre-metastatik niş bölgelerinde bulunan epiteliyal hücrelerde Toll-benzeri reseptör (TLR3) ifadesini artırarak bu hücrelerden kemokin salgılanmasını uyardığı ve sonuç olarak, bu bölgelerde nötrofil toplanmasını sağlayarak inflamasyonu artırdığı ve pre metastatik niş oluşturduğu ileri sürülmüştür (El Rayes ve ark. 2015, Liu ve ark. 2016).

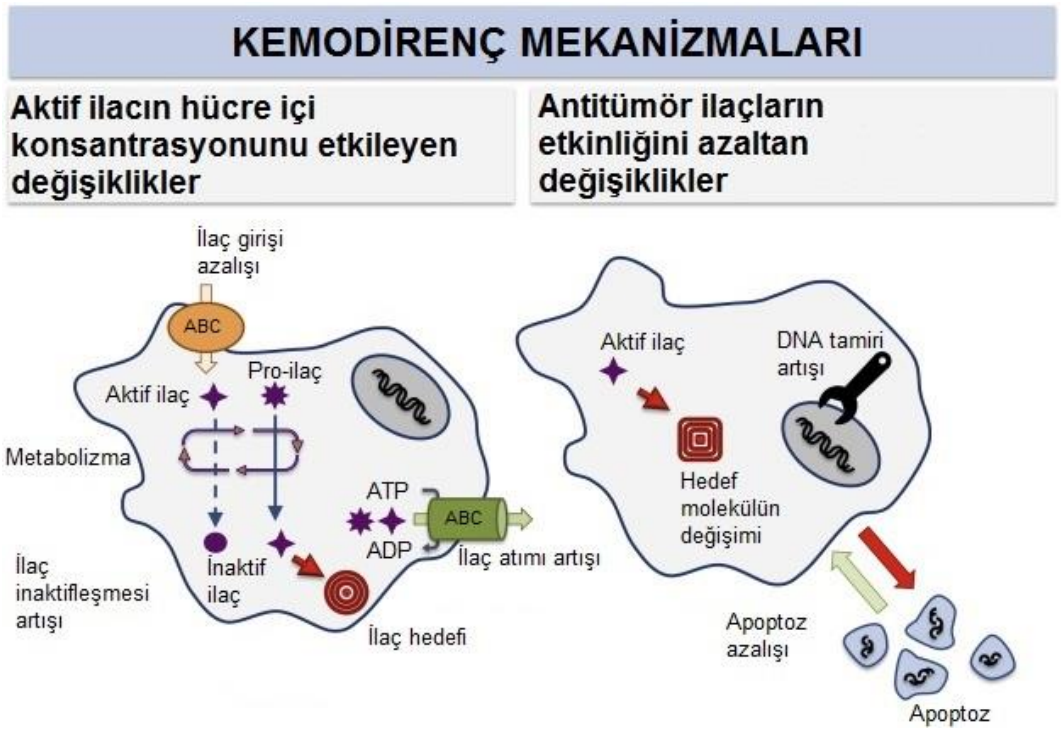
Tümör kaynaklı ekzozomların immün sistem üzerindeki etkileri de bilinmektedir. Bir çalışmada, kanserli hastalardan izole edilen ekzozomların immün baskılayıcı bir etki gösterdiği, $CD8^+$ T hücrelerinde apoptoza yol açtığı, regülatör T hücrelerinin (Treg) artmasını sağladığı ve doğal öldürücü hücrelerin sitotoksisitesini azalttığı tespit edilmiştir (Whiteside 2013). Bir diğer çalışmada, tümör hücrelerinden salgılanan ekzozomların, tümörleri tanıtan antikorlara bağlanarak bu antikorların tümör hücrelerine bağlanmasını etkin bir şekilde inhibe ettiği, bu sayede vücudun tümöre karşı antikor aracılı mücadelesini zayıflattığı belirtilmiştir (Battke ve ark. 2011). Bütün bunların üstüne, ekzozomal proteinlerin terapötik monoklonal antikorlara bağlanarak terapi için gerekli olan antikor miktarında artışa yol açtığı ileri sürülmüştür (Aung ve ark. 2011).

Ekzozomların HSK'da ilaç direncine, metastaza ve nüksetmesine katkı sağladıklarına ilişkin araştırmalar bulunmaktadır. Bunlardan birinde, HSK hücrelerinden kökenlenen ekzozomların *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla sorafenib direncine yol açtığı gösterilmiştir (Qu ve ark. 2016). Ekzozomların HSK metastazı ile ilişkili oldukları ve bu sebeple yeni biyoişaretlerin keşfi için önem taşıdıkları bir derleme ile ileri sürülmüştür (Qu ve ark. 2015). Son olarak karaciğer transplantasyonundan sonra HSK nüksetmesi için ekzozomların kilit önemde oldukları gösterilmiştir (Chen ve ark. 2016).

1.6. Kemodirenç

Günümüzde, kemoterapi kanser ilerlemesini durdurmak için kullanılan başlıca tedavi yöntemidir. Kemoterapi başlangıçta iyi sonuçlar vermesine rağmen belirsiz bir zaman sonra tümör hücreleri kemoterapi ajanlarına karşı direnç (kemodirenç) geliştirmektedir. Kemodirenç, kemoterapinin başarısız olmasına yol açarak hastaların ölümüyle sonuçlanmaktadır (Avila ve ark. 2006, Hombach-Klonisch ve ark. 2018, Kretz ve ark. 2018).

Kemodirenç, kompleks ve dinamik bir süreç olup çok sayıda mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. Bu mekanizmalar Şekil 1.7'de görüldüğü gibi; iki farklı grup altında incelenebilir. 1) Aktif ilacın hücre içi konsantrasyonunu etkileyen değişikler: ABC transporter ifadesinin değişimi ve glutayon S-transferaz gibi bazı transferaz grubu enzimlerinin çeşitli metabolik faaliyetleri sonucu hücre içinde ilaç inaktifleşmesinin artışı gibi değişiklikler bu grupta ele alınabilir. 2) Antitümör ilaçların etkinliğini azaltan değişiklikler: Apoptozun azalması, DNA tamirinin artışı ve ilaç hedef molekülünün değişimi olarak özetlenebilecek mekanizmalar bu grupta ele alınabilir (Marin ve ark. 2016). Bu mekanizmalarda kalsiyum-bağlanma proteinleri, hücre döngüsü ve kontrol noktaları proteinleri, moleküler şaperonlar, DNA tamir proteinleri, ilaç detoksifiye eden proteinler, sinyal iletim proteinleri, hücre iskeleti proteinleri, metabolik enzimler, protein sentezi proteinleri ve redoks proteinlerinin iş gördüğü derlenmiştir (Zhang ve ark. 2007).



Şekil 1.7. *Kemodirenç mekanizmaları (Marin ve ark. 2016)*

Çeşitli kanser tiplerinde ekzozom aracılı kemodirenç gelişimini gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, pankreatik duktal adenokarsinom tedavisi için uzun süre kullanılan Gemcitabin'e karşı, tümör hücrelerinin miR-155 ifadesini, ekzozom üretimini ve anti-apoptotik faaliyeti artırdıkları tespit edilmiştir (Mikamori ve ark. 2017). Ayrıca, renal hücre karsinomu tedavisi için kullanılan Sunitib'e karşı gelişen direncin, ekzozomlarla taşınan lncARSR'nin mir-34/mir-449'lara bağlanması sonrasında kanser hücrelerinde AXL ve c-MET ifadesini artırdığı kanıtlanmıştır (Qu ve ark. 2016). İlaç direnci gelişimini sağladığı bilinen ABCB1 transporter proteinlerin ekzozomlarla taşınarak Doxetaxel direnci gelişimini sağlayabileceği ileri sürülmüştür (Corcoran ve ark. 2012). Cisplatine dirençli ovaryan kanseri hücrelerinin, ekzozomlar aracılığıyla duyarlı hücrelere miR-21-3p aktarması sonucu bu hücrelerinde cisplatine karşı direnç kazandığı gösterilmiştir (Pink ve ark. 2015).

1.7. Hipotez

Bu çalışmada, hepatosellüler karsinom hücrelerinde aşırı Slug ifadesinin kemodirenç ve kök hücre özelliklerini etkileyebileceğini ve bu hücre ekzozomlarından

kemodirenç ve kısmi EMT ile ilişkili biyoişaretlerin tespit edilebileceği hipotezi kurulmuştur.

Yukarıda geniş bir şekilde ele alındığı gibi kemodirenç çok sayıda mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle sadece bir mekanizmayı hedef almanın yetersiz olacağı gözükmektedir. Diğer yandan, aynı anda çok sayıda mekanizmayı hedef almanın karmaşıklığı, kimyasallara karşı direnç gelişimini ortadan kaldırmanın oldukça zor olacağını göstermektedir. Mademki kemoterapi gören hastaların kemodirenç ile karşılaşmaları kemoterapinin doğal bir sonucudur o halde kemodirenç gelişiminin kısa zamanda etkin olarak belirlenebileceği biyoişaretler keşfetmek günümüz kemoterapisi için hayati öneme sahiptir. Böylece bu biyoişaretler kullanılarak kanser tedavisinde faydasız, meşakkatli ve giderek ağırlaşan bir sürece girilmeden başka bir tedaviye geçilebilecektir. Fakat bunca bilgiye ve ihtiyaca rağmen henüz karaciğer kanserinde kemodirenç gelişimini serumdan belirleyebilmek için klinikte kullanılabilecek etkin bir biyoişaret bulunmamaktadır. Bu durumun başlıca nedeni, ilaç uygulamasıyla dirençli hale getirilen hücrelerden belirgin (günümüz proteomik teknikleriyle saptanabilir düzeyde) şekilde biyoişaret salınımı gerçekleşmemesi olarak düşünülmektedir. Bu düşünceyle birlikte, kemodirençli hücre fenotipini daha belirgin şekilde elde etmek için yeni yöntemler kullanmanın gerekliliği sonucuna ortaya çıkmaktadır. Direnç gelişimiyle ilgili EMT transkripsiyon faktörlerinden Slug proteiniyle yapılan çalışmalar ilgi çekicidir. Örneğin bir çalışmada, pankreas kanseri hücrelerinde SLUG geninin "knockdown" edilmesinin gemcitabine olan duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (Tsukasa ve ark. 2015). Slug'ın aşırı ifadesinin ise lösemi hücrelerinde hem kemodirence (Mancini ve ark. 2010) hem de radyodirence (Maier ve ark. 2009) neden olduğu bulunmuştur. Bu tez araştırmasında kullanılan karaciğer hücre hatlarından HepG2'lerin sürekli ifade promotorü (cytomegalovirus) kontrolü altında SLUG geni taşıyan plazmitle transfeksiyonu; CD133+ antijenini ifade etmelerine, çoğalmalarının hızlanmasına ve invazyonun artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Sun ve ark. 2014). Sun ve arkadaşları, elde ettikleri SLUG transfekte HepG2 hattının kemodirençli olup olmadığını test etmemiş olmasına rağmen, CD133+ nöroblastoma hücrelerinin Doxorubisine (Vangipuram ve ark. 2012) ve CD133+ gastrik kanser hücrelerinin 5-FU'ya (Xu ve ark. 2015) dirençli olduğunu ileri süren çalışmalar bulunmaktadır. Bu araştırmaların sonuçları birleştirildiğinde, EMT transkripsiyon faktörlerinden Slug'ın HSK hücre hatlarında aşırı

ifadesi sağlanırsa kemodirençli hücre fenotipi elde edileceği ve transfekte hücrelerden izole edilen ekzozomlarından biyoişaret olarak kullanılabilecek protein ve miRNA'ların tanımlanabileceği ortaya çıkmaktadır. Tanımlanan biyoişaretler kanser tedavisi takibinde kullanılabileceği gibi yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine de katkı sunacaktır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Hücre hatları

Çalışmada insan hepatosellüler karsinom hücreleri olan HepG2 (ATCC) ve Dr. Mehmet ÖZTÜRK'ten hediye olarak temin edilen Huh7 hücre hatları kullanılmıştır.

2.1.2. Hücre kültürü için kullanılan materyaller

Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, pH 7,4

Fosfatla tamponlanmış EDTA'lı tuz çözeltisi: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, EDTA 1 mM, pH 7,4

Fetal sığır serumu (Sigma)

DMEM, L-glutamin ve yüksek glukoz içeren (Sigma)

Penisilin (10000 ünite)-Streptomisin (10 mg) (Sigma)

Tripsin/EDTA (Sigma): %0,5 Tripsin, %0,2 EDTA

Hidroklorik asit (Sigma)

KCl (Sigma)

NaCl (Sigma)

KH_2PO_4 (Sigma)

Na_2HPO_4 (Sigma)

EDTA (Sigma)

Hücre kültürü flaskları 25 ve 75 cm^2'lik (Cell star)

Plakalar 6, 12, 24 ve 96 kuyulu (Cell star)

Petri kapları 8,5 cm^2'lik (Orange scientific)

Otomatik mikropipetleyiciler ve uçları 10, 100 ve 1000 µl'lik

Cam pipetler 1, 5 ve 10 ml'lik

Duran şişeler 50, 100 ve 500 ml'lik

Santrifüj tüpleri 15 ve 50 ml'lik

Mikrofüj tüpleri 1.5 ve 2 ml'lik

Plastik pastör pipetleri

Metalik cam pipet kutuları

Metalik pastör pipeti kutuları

Hücre sayım cihazında kullanılan tek kullanımlık sayım lamlar (Roche, Cedex XS)

Kryotüp, 2 ml'lik (Greinger)

Hücre dondurma kabı (Mr. Frosty)

İzopropil alkol (Sigma)

Filtreler, 0,22 ve 0,45 µm por çaplı (Whatman)

Zefiran (Zefirolum)

Parafilm (Parafilm M)

Eldiven (Aloe mate)

Şeffaf bant (Scotch)

Biyolojik Güvenlik Kabini, Sınıf II, Type A2 (Thermo, Herasafe KS 12)

Ters-faz mikroskop (Olympus, BX50)

Soğutmalı masaüstü santrifüj cihazı (Thermo, Hereous Biofuge Stratos)

Hücre sayıcı (Roche, Cedex XS)

2.1.3. Kalsiyum fosfat aracılı ve katyonik lipid kullanımı aracılı transfeksiyon ve monoklonal hücre hattı oluşturmak için kullanılan materyaller

SlugMyc_pcDNA3 plazmidi (Addgene, ID 31698)

pcDNA3.1 plazmidi (Dr. Sreeparna BANERJEE)

$CaCl_2$, 2,5 M (Sigma)

HEPES ile tamponlanmış tuz çözeltisi, 2x'lik: 280 mM NaCl, 50 mM Hepes, 1,5 mM Na_2HPO_4, pH 7,05-7,12

Steril klonlama silindirleri (Milipore)

G418 (Sigma)

Turbofect (Thermo)

2.1.4. Kemodirenç belirlemek için kullanılan malzemeler

Doxorubicin (Sigma)

Cisplatin (cis-diammineplatinum(II) dichloride) (Sigma)

Nötral red (Sigma)

Nötral red ekstraksiyon çözeltisi: Glasiyal asetik asit/Etanol/Distile Su (1/50/49)

Absorbans okuyucu (Bio-tek, ELx808)

2.1.5. mRNA'ların gerçek zamanlı PCR ile kantifikasyonu için kullanılan malzemeler

Nucleospin RNA izolasyon kiti (MN)
ProtoScript II cDNA sentez kiti (NEB)
Primerler (Sentegen)
Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green PCR kiti (Agilent)
Agaroz (Sigma)
Yatay elektroforez sistemi (Thermo)
Gerçek-zamanlı PCR cihazı (Agilent, Mx3005)

2.1.6. Western Blotlama için kullanılan malzemeler

RIPA tamponu (CST)
Proteaz inhibitör kokteyli (Roche, 11836170001)
Hücre kazıyıcı
Mini Protean Dikey Elektroforez Seti (Biorad)
TGX Stain Free Fastcast Akrilamid Çözeltileri (Biorad)
Protein Örnek Tamponu (Licor)
Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder (Licor)
SDS-PAGE Tank tamponu: 25 mM Tris, 192 mM Glisin, %0,1 SDS, pH 8,3
Trans Blot Turbo Transfer Sistemi (Biorad)
Nitrosellüloz membran (Licor)
Extra thick blot filter papers (Sigma)
Towbin tamponu: 25 mM Tris, 192 mM Glisin, %20 Metanol
Skim milk powder (Sigma)
Anti-Slug (CST, 9585)
Anti-Vimentin (CST, 5741)
Anti-E cadherin (CST, 3195)
Anti-CD133 (Thermo, MA5-18323)
Anti-Beta aktin (CST, 3700)
TBS-T: 20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, %0,1 Tween-20
IRDye 800CW anti Rabbit (Licor, 925-32213)
IRDye 680CW anti Mouse (Licor, 925-68072)

İnfra-red yakını floresans western blot görüntüleme cihazı (Odyssey clx, Licor)

2.1.7. In cell Western deneyi için kullanılan malzemeler

Paraformaldehit, %4'lük (Sigma)

Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, pH 7,4

Odyysey bloklama tamponu (Licor)

Glisin, 0,15 M (Sigma)

Triton X-100, %5 (Sigma)

CellTag 700 Stain ICW kit (926-41091)

İnfra-red görüntüleme cihazı (Odyssey clx, Licor)

2.1.8. Ekzozom izolasyonu için kullanılan materyaller

Type 45 Ti rotor ve tüpü (Beckman, 355623)

Type 90 Ti rotor ve tüpü (Beckman, 355645)

Total Exosome isolation reagent (Thermo, 4478359)

Ultrasantrifüj cihazı (Beckman, Optima LE80K)

Soğutmalı masaüstü santrifüj cihazı (Thermo, Hereous Biofuge Stratos)

2.1.9. Ekzozomal proteomik çalışmalar için kullanılan materyaller

RIPA tamponu (CST)

Proteaz inhibitör kokteyli (Roche, 11836170001)

Mini Protean Dikey Elektroforez Seti (Biorad)

TGX Stain Free Fastcast Akrilamid Çözeltileri (Biorad)

Protein Örnek Tamponu (Licor)

Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder (Licor)

In-gel triptic digestion kit (Pierce)

ZipTipC18 (Milipore)

Maldi-tof/tof cihazı (AB SCIEX, TOF/TOF 5800)

2.1.10. ELISA testi için kullanılan materyaller

Fibronectin simplestep Eliza kiti (Abcam, ab181419)

Kollagen tip II α 1 Eliza kiti (Elabscience, E-EL-H0777)

Fibrinojen gama kiti (Aviva systems biology, OKEH00109)

Mikroplaka okuyucu (Bio-tek, Epoch2)

2.1.11. Küçük-RNA dizileme için kullanılan materyaller

Nucleospin miRNA izolasyon kiti (MN)

Sodyum asetat, 3 M, pH 5,5

NEBNext Small RNA Library prep Set for Illumina (NEB, E7330S)

Yeni nesil dizileme cihazı (Illumina, Hiseq)

2.1.12. miRNA'ların gerçek zamanlı PCR ile kantifikasyonu için kullanılan malzemeler

Nucleospin miRNA izolasyon kiti (MN)

M-MuLV ters transkriptaz (NEB, M0253S)

E.coli poli A polimerazı (NEB, M0276S)

E.coli poli A polimeraz tamponu (NEB, M0276S)

ATP (NEB, M0276S)

dNTP (NEB, M0253S)

RT primeri (Sentegen)

miRNA'ya özgü ileri primer (Oligomer)

miRNA'ya özgü geri primer (Oligomer)

Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green PCR kiti (Agilent)

miRprimer2 software

2.2. Metot

2.2.1. Deneysel tasarım

HepG2 ve Huh7 hücreleri Slug plazmidi ile transfekte edildi. Her iki hücre tipinden, Aşırı Slug ifadesini gösteren iki farklı monoklonal hücre hatları oluşturularak HepG2-Sl-Klon1, HepG2-Sl-Klon2, Huh7-Sl-Klon1 ve Huh7-Sl-Klon2 olarak adlandırıldı. pcDNA3.1/Neo boş vektörünü stabil olarak ifade eden kontrol hücreleri elde edildi ve bunlar HepG2-BV ve Huh7-BV olarak adlandırıldı. HepG2-Sl-Klon1 ve Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinde EMT, kemodirenç ve kök hücre fenotipleri karşılaştırıldı. Dahası

Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinin kültür medyumuna salgıladıkları protein ve miRNA tabanlı kemodirenç ve kısmi EMT biyoişaretleri araştırıldı. Tespit edilen biyoişaretlerin kısmi ve tam EMT'de ifadesini araştırmak için HepG2 ve Huh7 hücrelerinde geçici olarak aşırı Slug ifadesi gerçekleştirildi. Elde Edilen HepG2-Sl (Gç) ve Huh7-Sl (Gç) hücrelerinde biyoişaretlerin mRNA ve protein seviyeleri qPCR ve ELİSA testi ile araştırıldı.

2.2.2. Hücre kültürü

ATCC'den (Middlesex, UK) HepG2 hücreleri ve Dr. Mehmet Öztürk'ten (Dokuz Eylül Üniversitesi) alınan Huh7 hücreleri %10 fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) ve penisilin (100 U/mL)-streptomycin (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich) içeren DMEM medyumunda; %5 CO_2 ve 37 °C şartlarında büyütüldü. Hücre morfolojisi inverted mikroskop (Olympus, BX 50, Center Valley, PA, ABD) ile gözlemlendi.

2.2.3. Plazmit hazırlığı, kalıcı (stable) ve geçici (transient) transfeksiyonlar ve monoklonal hücre hatlarının oluşturulması

SlugMyc_pcDNA3 (Addgene ID 31698) plazmidi Dr. Paul WADE'den temin edildi (Kajita ve ark. 2004). SlugMyc_pcDNA3 ve boş pcDNA3.1 (Invitrogen) vektörlerinin kalıcı transfeksiyonu kalsiyum-fosfat aracılı kimyasal yöntemle gerçekleştirildi (Graham ve ark. 1973). Kısaca, 6-kuyulu plakanın her bir kuyusuna 150,000 hücre ekildi. Bir gece geliştirildi. Transfeksiyondan iki saat önce hücre medyumu değiştirildi. Bir tüpte 2x HeBS (50 mM Hepes, 280 mM NaCl, ve 1,5 mM Na_2HPO_4) ile DNA/$CaCl_2$ (20 µg DNA/0,5 M $CaCl_2$) çözeltisi karıştırıldı ve hemen vortekslenerek 20 dk bekletildi. Elde edilen çözelti hücre medyumuna eşit olarak dağıtıldı. Sonra hücreler standart büyüme şartlarında 48 saat büyütüldü. Plazmitleri alan hücrelerin seçimi için üç-dört hafta boyunca 500 µg/ml G418 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) kullanıldı. Koloniler klonlama silindirleri (Milipore) ile alınarak önce 96 kuyulu plakaya daha sonra 6-kuyulu plakaya alındı. Huh7 ve HepG2 hücrelerinin her birinden 40 monoklonal koloni seçilerek monoklonal hücre hatları oluşturuldu ve stoklandı.

SlugMyc_pcDNA3 ve boş pcDNA3.1 (Invitrogen) vektörlerinin geçici transfeksiyonu için Turbofect (Thermo) katyonik lipit kullanımına dayalı yöntem kullanıldı.

2.2.4. In cell western

Aşırı Slug ifade eden hücre hatlarını seçmek için her bir monoklonal hücre hattı Slug ifadesi bakımından in cell western ile test edildi. Bu yöntemi, immunofloresans yönteminin 96 kuyulu plakalar üzerinde gerçekleştirilebilen bir versiyonu olarak değerlendirebiliriz. Slug ifadesinin kantitatif analizi için 50.000 hücre 96-kuyulu plakaya ekilerek 48 saat büyütüldü. Sonra hücreler soğuk-etanol ile 10 dk -20 ^{0}C'de fikse edildi. Kuyular 200 µl PBS ile üç kez yıkanarak Odyssey bloklama tamponunda (Licor, Lincoln, NE, ABD) oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Kuyular Slug antikoru (Cell Signaling Technology (CST), Danvers, MD, ABD, Cat. No: C19G7, 1:100 dilüsyon) ve %0,1 Tween-20 içeren tampon ile 4 ^{0}C'de bir gece inkübe edildi. Süre sonunda kuyular PBS-T (%0,1 Tween-20 içeren PBS çözeltisi) ile üç kez yıkandı. Yıkama sonunda kuyular, Infrared IRDye800CW secondary antibody (1:1000), Cell tag stain (1: 2000) ve %0,2 Tween-20 içeren Odyssey bloklama tamponu ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda kuyular yıkama tamponuyla üç kez yıkandı. Yıkama sonunda plaka infrard tarayıcı cihazında (Licor, Odyssey Clx) 700 ve 800 nm dalgaboyu kanallı kullanılarak okundu. Ham Slug ifadesi 800 nm'den gelen absorbansın ölçülmesiyle elde edilirken, arka plan absorbansı ise hücresiz kuyuların sadece sekonder antikor uygulamasıyla elde edildi. Hücre sayısıyla ilişkili olan ve normalizasyon için kullanılan absorbans ise 700 nm'den gelen absorbansın ölçülmesiyle elde edildi. Data ImageStudio software ile elde edildi, Excel de analiz edildi. Aşırı Slug ifade eden monoklonal hücre hatları HepG2-Sl-Klon1, HepG2-Sl-Klon2, Huh7-Sl-Klon1 and Huh7-Sl-Klon2 olarak adlandırıldı. Kontrol hücreleri olan ve boş pcDNA3.1 vektörü ile transfekte edilen hücreler ise HepG2-BV ve Huh7-BV olarak adlandırıldı.

2.2.5. Western blotlama

Kısmi ve tam EMT fenotipindeki hücrelerde CD133, E-cadherin, Slug ve vimentin ifadesini belirlemek için 75 cm^2'lik flasklara 750.000 hücre ekildi. Hücreler %80 doluluğa ulaşınca soğuk PBS ile yıkandı ve proteaz inhibitör kokteyli (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche Mannheim, Almanya) içeren RIPA tamponu ile kazındı. Protein örneklerine β-mercaptoethanol (%5 finalde) ve Laemmli tamponu ile karıştırıldı ve 90 ^{0}C'de 5 dk kaynatıldı. SDS-PAGE için stain free jeller (TGX Stain-free, Bio-Rad, Richmond, CA, ABD) kullanıldı. Elektroforez sonrasında jel dökumantasyon

sistemiyle (Gel Doc EZ, Bio-Rad) görüntülendi. Semi-dry elektrotransfer cihazı (Transblot turbo, Bio-Rad) kullanımıyla proteinler nitrosellüloz membrana (Licor, Odyssey Clx, Lincoln, NE) transfer edildi. Membran, skim milk powder (Sigma-Aldrich) ile oda sıcaklığında 1 saat bloklandıktan sonra CD133 (Invitrogen, Cat. No: PA5-38014, 1:1000 dilusyon), E-cadherin (CST, Cat. No: 24E10, 1:1000 dilüsyon), Slug (CST, Cat. No: C19G7, 1:500 dilüsyon) ve vimentin (CST, Cat. No: D21H3-XP, 1:100 dilusyon) antikorlarıyla 4˚C'de bir gece inkübe edildi. Süre sonunda membranlar üç kere TBS-T (%0,1 Tween 20, 50 mM Tris, pH 7,5 ve 150 mM NaCl) ile yıkandı. Sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda membranlar üç kere TBS-T ile yıkandı ve kemiluminesans görüntüleme sistemi (ChemiDoc MP, Bio-Rad) ile görüntülendi. Yükleme kontrolü olarak b-aktin ifadesi kullanıldı. Data imagelab software ile kantifiye edildikten sonra b-aktin ifadesi ile normalize edildi. Aşırı Slug ifadesini birkaç pasajda kaybettiklerinden HepG2-Sl-Klon1 ve HepG2-Sl-Klon2 hücreleri hariç tüm deneyler için üç bağımsız tekrarlar ile gerçekleştirildi.

2.2.6. qRT-PCR

HepG2-BV, HepG2-Sl-Klon1, Huh7-BV ve Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinde ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5, ABCG2, CD133, COL2A1, FGG, FN1, SLUG ve ZEB2; HepG2-Sl (Gç) ve Huh7-Sl (Gç) hücrelerinde ise COL2A1, FGG, FN1 ve SLUG mRNA ifadelerini belirlemek için toplam RNA izolasyonu Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Almanya) kit yönlendirmesine göre gerçekleştirildi. cDNA sentezi için Protoscript II kiti (NEB, Ipswich, ABD) üretici yönlendirmesine göre kullanıldı. PCR amplifikasyonu için kullanılan primerler Tablo 1'de bulunmaktadır. PCR amplifikasyonu, Brilliant SYBR Green qPCR master mix (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, ABD) kullanılarak real-time PCR platformunda (Mx3005P, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, ABD) gerçekleştirildi. Data, ACTB ifadesine göre normalize edilerek daha önce belirtilen şekilde rölatif olarak kantifiye edildi (Pfaffl 2001).

Tablo 2.1. *qPCR için kullanılan primer dizileri*

Gen Adı **(Aksesyon Numarası)**	**İleri Primer**	**Geri Primer**
ABCB1 (NM_000927.4)	5'-TGACATTTATTCAAAGTTAAAAGCA-3'	5'-TAGACACTTTATGCAAACATTTCAA-3'
ABCC1 (NM_004996.3)	5'-AGTGGAACCCCTCTCTGTTTAAG-3'	5'-AACAGCAGCACGGTGTAGAA-3'
ABCC2 (NM_000392.4)	5'-TCCTTGCGCAGCTGGATTACAT-3'	5'-TCGCTGAAGTGAGAGTAGATTG-3'
ABCC3 (NM_003786.3)	5'-CAGAGAAGGTGCAGGTGACA-3'	5'-CTAAAGCAGCATAGACGCCC-3'
ABCC5 (NM_001320032.1)	5'-AGAGGTGACCTTTGAGAACGCA-3'	5'-CTCCAGATAACTCCACCAGACGG-3'
ABCG2 (NM_001348989.1)	5'-CCGCGACAGCTTCCAATGACCT-3'	5'-GCCGAAGAGCTGCTGAGAACTGTA-3'
ACTB (NM_001101.3)	5'-GAGCGCGGCTACAGCTT-3'	5'-TCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'
CD133 (NM_001145847.1)	5'-AGTCGGAAACTGGCAGATAGC-3'	5'-GGTAGTGTTGTACTGGGCCAAT-3'
COL2A1 (NM_001844.4)	5'-AACCAGATTGAGAGCATCCG-3'	5'-AACGTTTGCTGGATTGGGGT-3'
FGG (NM_000509.5)	5'-CAGGATGGATCTGGTTGGTGG-3'	5'-GGAGTAGATGCTTTTGAGTAAGTGC-3'
FN1 (NM_212474.2)	5'-TGGGCAACTCTGTCAACGAA-3'	5'-CCACTCATCTCCAACGGCAT-3'
SLUG (NM_003068.4)	5'-CGAACTGGACACACATACAGTG-3'	5'-CTGAGGATCTCTGGTTGTGGT-3'
ZEB2 (NM_001171653.1)	5'-ATCTGAAAGAACACCTGCGAAT-3'	5'-TGTAGGAACCAGAATGGGAGAA-3'

2.2.7. Nötral kırmızısı alımı testi

EMT genellikle ilaç direnci ile ilişkili olduğu için (Wang ve ark. 2016) kısmi veya tam EMT fenotipinde olan hücrelerin sayısında yarılanmaya yol açan cisplatin konsantrasyonunu (IC_{50} değeri) belirlemek ve karşılaştırmak için nötral kırmızısı alım testi daha önce belirtildiği şekliyle uygulanmıştır (Repetto ve ark. 2008). Kısaca HepG2-Sl-Klon1, HepG2-Sl-Klon2, Huh7-Sl-Klon1, Huh7-Sl-Klon2 test hücreleri ile HepG2-BV ve Huh7-BV kontrol hücreleri 10,000 hücre/kuyu olacak şekilde 96-kuyulu plakalara ekildi. Hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat bekletildi. Süre sonunda cisplatinin iki-kat azalan konsantrasyonları (100-1,5 µM) uygulandı ve 72 saat bekletildi. Süre sonunda canlı hücreler 50 µg/mL Nötral Kırmızısı ile 3 saat inkube edilrek boyandı. Süre sonunda kuyular PBS ile yıkandı ve boya ekstraksiyon çözeltisi (asetik asit-su-etanol 1:49:50) eklenerek 15 dk inkübe edildi. Süre sonunda kuyuların 540 nm absorbansları, ELx 808 Ultra Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, ABD) ile ölçüldü. Deney üç kez tekrarlandı. Monoklonal hücre hatlarının herbirinin cisplatin için IC_{50} değeri tespit edilerek karşılaştırılmak suretiyle ilaç direnci araştırıldı.

2.2.8. Doxorubicin kümelenme deneyi

Dirençli hücrelerin sitotoksik ilaçları daha az hücre içinde tuttukları bilindiğinden doxorubicinin kısmi ve tam EMT fenotipindeki hücrelerde kümelenme seviyesi araştırıldı. Bunun için, HepG2-Sl-Klon1, HepG2-Sl-Klon2, Huh7-Sl-Klon1, Huh7-Sl-Klon2 ile HepG2-BV ve Huh7-BV kontrol hücreleri 350.000 hücre/kuyu olacak şekilde, 35 mm steril lamel bulunan 6-kuyulu plakalara ekildi. Ardından hücreler 0,18 µM Doxorubicin (Sigma-Aldrich) ile 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda hücreler %4'lük paraformaldehit ile fikse edildikten sonra PBS ile üç kez yıkandı ve %1'lik Triton X-100 ile geçirgen hale getirildikten sonra yeniden yıkanarak 0,05 µg/ml DAPI içeren çözelti ile 5 dk bekletildi ve yıkama işleminin ardından lam üzerinde kapatıldı. Flouresans mikroskobu (Olympus, BX 50, Center Valley, PA, ABD) ile fotoğraflandı. Deney üç kez tekrarlandı. Data ImageJ'de (NIH, Bethesda, MD, ABD) kantifiye edildi. Doxorubicin sinyalinin normalizasyonu için DAPI sinyalleri kullanıldı.

2.2.9. Yara iyileşme deneyi

Kısmi EMT'nin hücre motilitesi üzerindeki etkisi henüz tam olarak bilinmediğinden kısmi EMT fenotipi gösteren hücrelerin hareketlerini tespit etmek için yara iyileşme deneyi uygulandı. Bunun için, Huh7-BV ve Huh7-Sl-Klon1 hücreleri 6-kuyulu plakaya ekilerek %100 doluluğa ulaşana kadar büyütüldü. Steril 200 µl'lik pipet uçları ile doğrusal bir çizgi yapılarak yara oluşturuldu. PBS ile yıkamanın ardından hücrelere serumsuz medyum uygulandı. Ters-faz mikroskop (Olympus, BX 50, Center Valley, PA, ABD) ile 0,48 ve 96 saatlerde fotoğraflandı. Fotoğraflar ImageJ ile kantifiye edildi. Yara iyileşme oranı, 0. saatteki yara genişliği ile 48. ve 96. saatlerdeki yara genişliğinin karşılaştırılması sonucu hesaplandı.

2.2.10. Ekzozomal ve ekstrasellülar protein izolasyonu

Kısmi EMT'nin sekrotom protein profili üzerindeki etkisini araştırmak için Huh7-BV ile Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinden izole edilen ekzozomal ve ekstrasellülar protein profilleri karşılaştırıldı. Ekzozom izolasyonu, daha önce belirtildiği şekliyle diferansiyel ultrasantrifüjleme kullanılarak izole edildi (Thery ve ark. 2006). Kısaca, hücreler 750.000 hücre/75 cm^2 flask olacak şekilde ekildiler. %80 doluluğa ulaşınca serumsuz medyum verilerek 24 saat bekletildi. Süre sonunda 90 ml koşullu medyum (KM) toplandı. Toplanan KM seri olarak sırayla 300g'de 10 dk, 2000g'de 10 dk, 10.000g'de 30 dk ve son olarak Beckman Optima LE 80 K ultrasantrifüjü ve Beckman Type 45 Ti rotor kullanılarak 100.000g'de 70 dk ultrasantrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet Laemmli tamponunda (%0,02 Bromophenol blue, %4 SDS, %20 Glycerol, 120 mM Tris-HCl, pH 6,8) çözülerek standart SDS-PAGE protokolü sonrasında Coomassie Brilliant Blue G250 ile boyandı. Elde edilen jel, dökümentasyon cihazı (Gel Doc EZ, Bio-Rad Richmond, CA, ABD) ile görüntülenerek protein profili belirlendi.

2.2.11. Ekzozomal ve ekstrasellüler proteinlerin MALDI-TOF/TOF identifikasyonu

Protein profilinde ifadesi farklılaşan proteinler jelden kesildi. Kesilen bantlarda zip-tipleme ve MALDI TOF/TOF analizi daha önce belirtildiği şekliyle hizmet alımı olarak yaptırıldı (Akpinar ve ark. 2017).

2.2.12. Fibronektin1, kolajen tip II α 1 ve fibrinojen gama zinciri proteinleri için ELISA testleri

MALDI-TOF/TOF'dan elde edilen verilerin sağlaması için KM'de bulunan Fibronektin1, Kolajen tip II α 1 ve Fibrinojen gama zinciri proteinleri için ELISA testi uygulandı. Bunun için kalıcı transfekte hücreler, 750.000 hücre/75 cm^2 flask olacak şekilde ekildi, %80 doluluğa ulaşınca serumsuz medyum verilerek 24 saat bekletildi. Süre sonunda 10 ml KM toplandı. Geçici transfekte hücrelerin transfeksiyonundan 72 saaat sonra KM toplandı. Toplanan KM'ler 1000g'de 20 dk santrifüjlendi. KM'deki hedef protein seviyelerini tespit etmek için Fibronektin1 (Abcam, Cambridge, UK), kolajen tip II α 1 (Elabscience, China) ve fibrinojen gamma zinciri (Aviva Systems Biology, San Diego, CA,ABD) ELISA kitleri üretici firma yönlendirmesine göre kullanıldı. Kantifikasyon için plakalar 490 nm dalga boyunda plaka okuyucu cihazında (Epoch2, BioTek Instruments, Winooski, VT, ABD) okutulara absorbans değerleri elde edildi. Deney üç kez tekrarlandı.

2.2.13. Ekzozomal miRNA izolasyonu

Kısmi EMT'nin sekrotom miRNA profili üzerindeki etkisini belirlemek için Huh7-BV ile Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinden izole edilen ekzozomal miRNA profilleri karşılaştırıldı. Bunun için önce ekzozom izolasyonu gerçekleştirildi, sonra izole edilen ekzozomlar "small RNA-seq" ile dizilendi ve biyoinformatik analizi yapıldı. Son olarak ifadesi farklılaşan miRNA'lardan beş tanesi, miRNA RT-qPCR ile doğrulandı.

Ekzozomal miRNA izolasyonu için Total Ekzozom İzolasyon kiti (Invitrogen) ve Total Exosome RNA Protein Isolation Kiti (Thermo) üretici firmanın yönlendirmesine göre uygulandı.

2.2.14. Small RNA-seq ile ekzozomal miRNA'ların dizilenmesi

İzole edilen ekzozomal miRNA'lar yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak Fasteris (İsveç) firmasında hizmet alımı olarak dizilendi ve biyoinformatik analizi yapıldı. Firmaca gerçekleştirilen işlemler kısaca şunlardır. miRNA yapılı biyoişaretleri belirlemek için ekzozomlardan izole edilen miRNA'lar yeni nesil dizileme cihazında (Hiseq 2000, Illumina) dizilenmiştir. Bu amaçla öncelikle, standart küçük-RNA

kütüphanesi hazırlama protokolüne göre kütüphane hazırlanmıştır. Sonra yüksek çıktılı, 1x50 bç'lik, 10 M eco-V4 kimyasında "Run" gerçekleştirilmiştir. Datanın biyoinformatik olarak analizi için "smallRNA DESeq" standart analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizde kısaca 3' adaptörler uzaklaştırılmış, büyüklük profiline göre insert boyutu seçilmiş, referans genomda veya pre-mir miRNA veritabanında haritalama gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamada miRNA veya pre-mir varlığı BEDTOOLS ile belirlenmiştir. Belirlenen miRNA'ların kontrol grubuna göre ifadeleri bir tablo haline getirilerek ortaya koyulmuştur.

2.2.15. İfadesi farklılaşan miRNA'lardan literatür araştırması ile seçilenlerin miRNA RT-qPCR ile teyit edilmesi

hsa-miR-296-3p, hsa-miR-101-3p ve hsa-miR-885-5p ifadelerindeki değişimini bir kez de miRNA RT-qPCR'ı ile tespit etmek için hsa-miR-16-1-3p ve hsa-miR-1228-3p miRNA'ları internal kontrol miRNA'ları olarak kullanıldı.

miRNA'ların miRNA RT-qPCR ile ifadesini belirlemek daha önce belirtildiği şekliyle protokol uygulandı (Balcells ve ark. 2011). Buna göre, öncelikle izole edilen miRNA'ların cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 2.2. *cDNA sentezi için gerekli bileşenler*

Adı	**Ana stok**	**Ara stok**	**Hacim (ul)**	**Final konsantrasyonu**
Toplam RNA		-		100 ng
Poli A polimeraz tamponu	10x	-	1	1x
ATP	10 mM	1 mM	1	0,1 mM
RT primeri	100 uM	10 uM	1	1 uM
dNTP	10 mM	1 mM	1	0,1 mM
MuMLV enzimi	200 ünite/ul	100 ünite/ul	1	100 ünite
Poli A polimeraz	5 ünite/ul	1 ünite/ul	1	1 ünite
Su			Son hacim 10 ul	

İleri ve geri primerlerin tasarımı için miRprimer2 software kullanıldı. Tablo 3'te bu primerler bulunmaktadır.

Tablo 2.3. *miRNA qPCR'ı için kullanılan primer setleri*

miRNA Adı (Aksesyon numarası)	**İleri Primer (5'-3')**	**Geri Primer (5'-3')**
hsa-miR-296-3p (MIMAT0004679)	GGAGGGTTGGGTGGAG	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTGGAGA
hsa-miR-101-3p (MIMAT0000099)	GCGCAGTACAGTACTGTG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCAGTT
hsa-miR-885-5p (MIMAT0000764)	GCGCAGTCCATTACACTAC	AGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTAGAG
hsa-miR-16-1-3p (MIMAT0004489)	CGCAGCCAGTATTAACTGT	TCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCAGCA
hsa-miR-1228-3p (MIMAT0005583)	GCAGTCACACCTGCCT	GTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTGGG
RT primeri	CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCA	

miRNA'ların PCR amplifikasyonu için, Brilliant SYBR Green qPCR master mix (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, ABD) kullanılarak real-time PCR platformunda (Mx3005P, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, ABD) gerçekleştirildi. Datanın normalizasyonu için hsa-miR-1228-3p ve hsa-miR-16-1-3p ifadeleri kullanıldıktan sonra daha önce belirtilen şekilde rölatif olarak kantifiye edildi (Pfaffl 2001).

2.2.16. İstatistik analizi

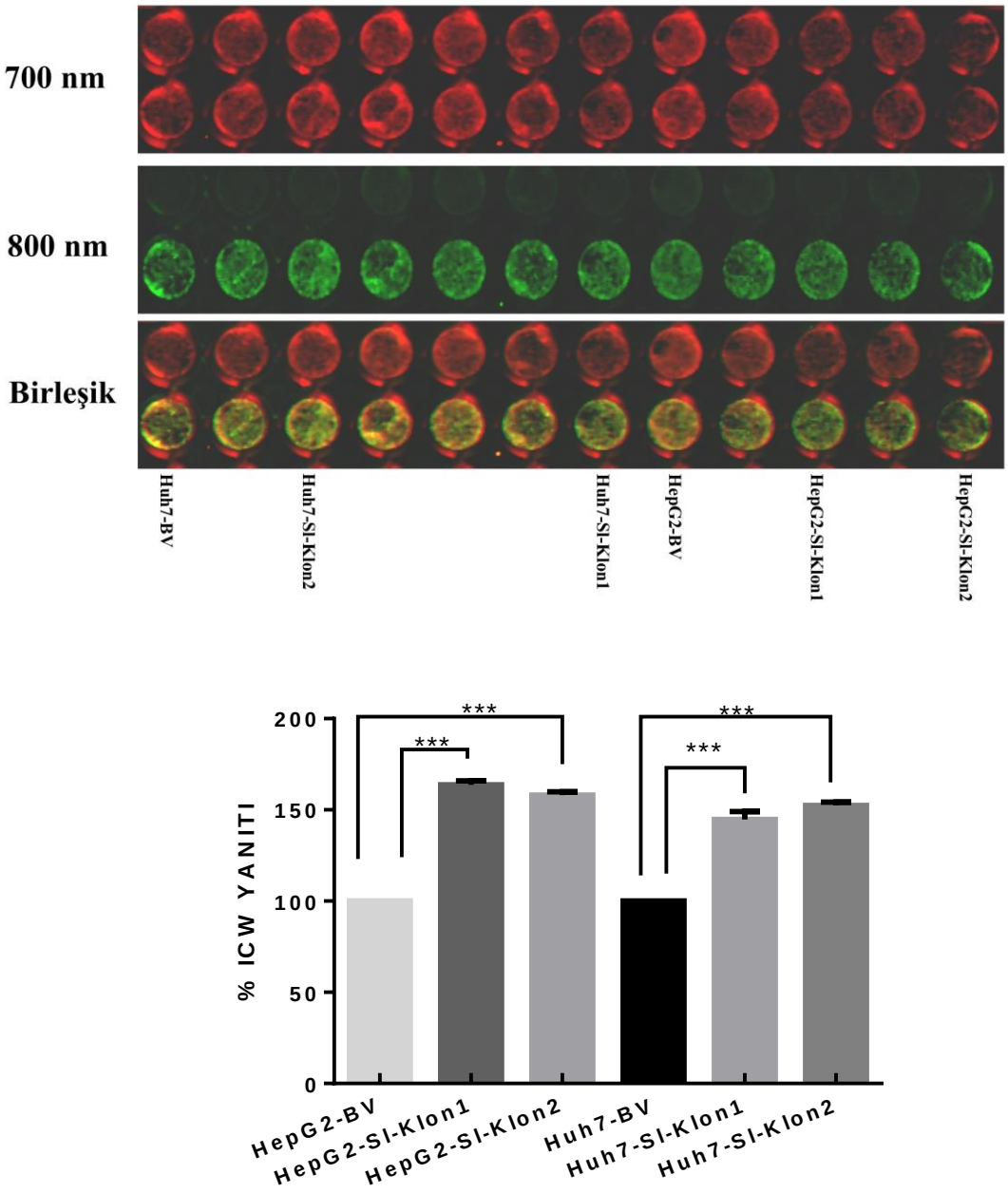
Deneyler aksi belirtilmedikçe üç biyolojik tekrarlı olarak gerçekleştirildi. İstatistik analiz için GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, ABD) programında one-way anova sonrası Dunnet post hoc testi veya Student-T testi kullanıldı. p-değerinin 0,05'ten küçük olduğu durum istatistik bakımından anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

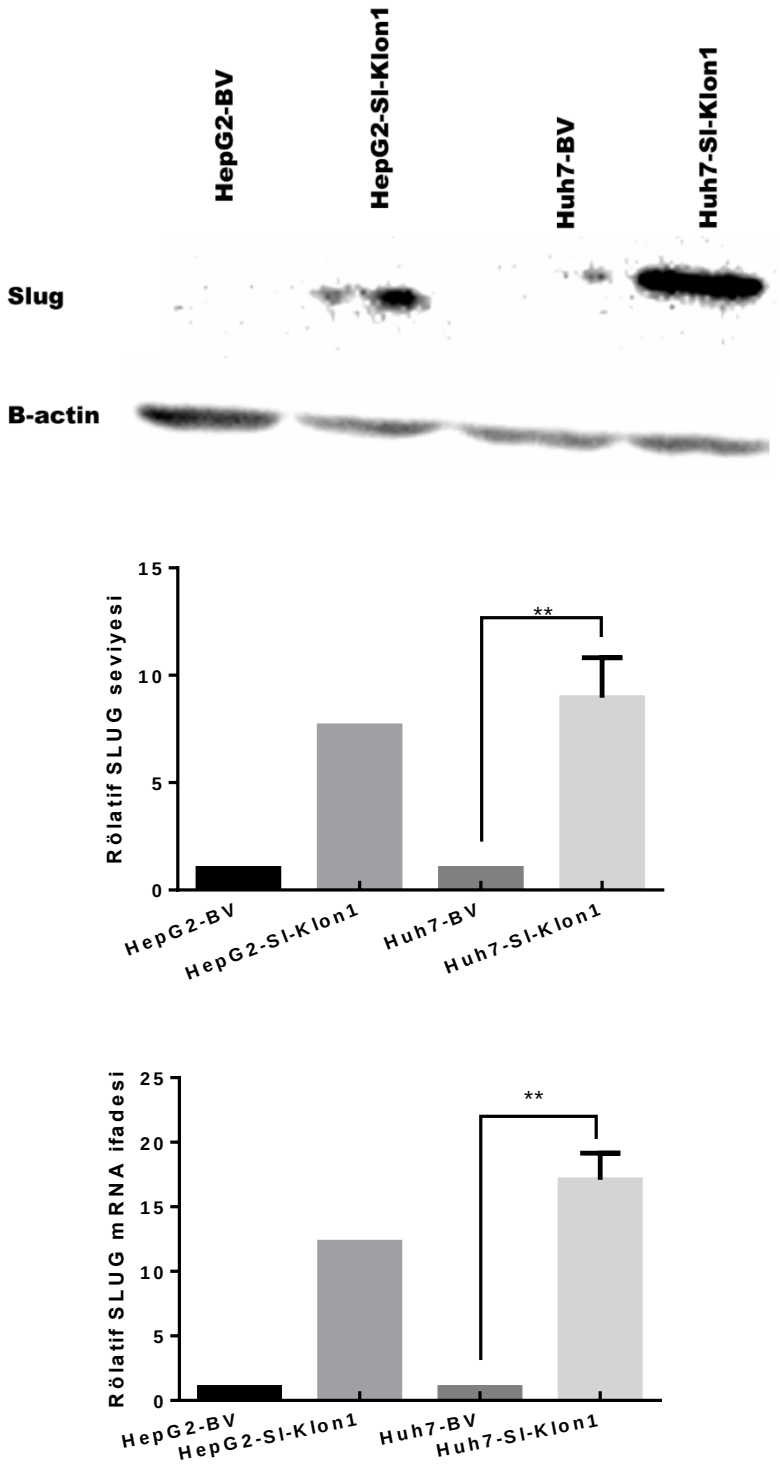
3.1. Aşırı Slug İfadesinin HepG2 ve Huh7 Hücrelerin Tam ve Kısmi EMT Fenotipi Üzerine Olan Etkisi

Transfeksiyon sonucu elde edilen monoklonal hücre hatlarında Slug'ın, aşırı ifadesinin sağlanıp sağlanmadığı in-cell western deneyi ile tarandı. In-cell western deneyinden elde edilen sonuçlar Şekil 3.1'de bulunmaktadır. Şekil 3.1'de bulunan 700 nm kanalı hücre sayısına bağlı olarak elde edilen sinyaldir. 800 nm kanalı ise Slug primer antikoruna bağlanan sekonder antikoruna bağlı olarak elde edilen sinyaldir. 800 nm kanalının birinci sırasında arka planı oluşturan ve hücresiz kuyulardan gelen sinyal bulunmaktadır. İkinci sırada ise data analizi için kullanılan kontrol ve test hücreleri bulunmaktadır. Slug ifadesi arttıkça birleşik kanaldaki kuyu rengi turuncudan yeşile doğru yaklaşmaktadır. Bu sebeple, en yüksek Slug ifadesi olan kuyu yeşil olarak gözükürken en az Slug ifadesi olan kuyu ise turuncu olarak gözükmektedir.

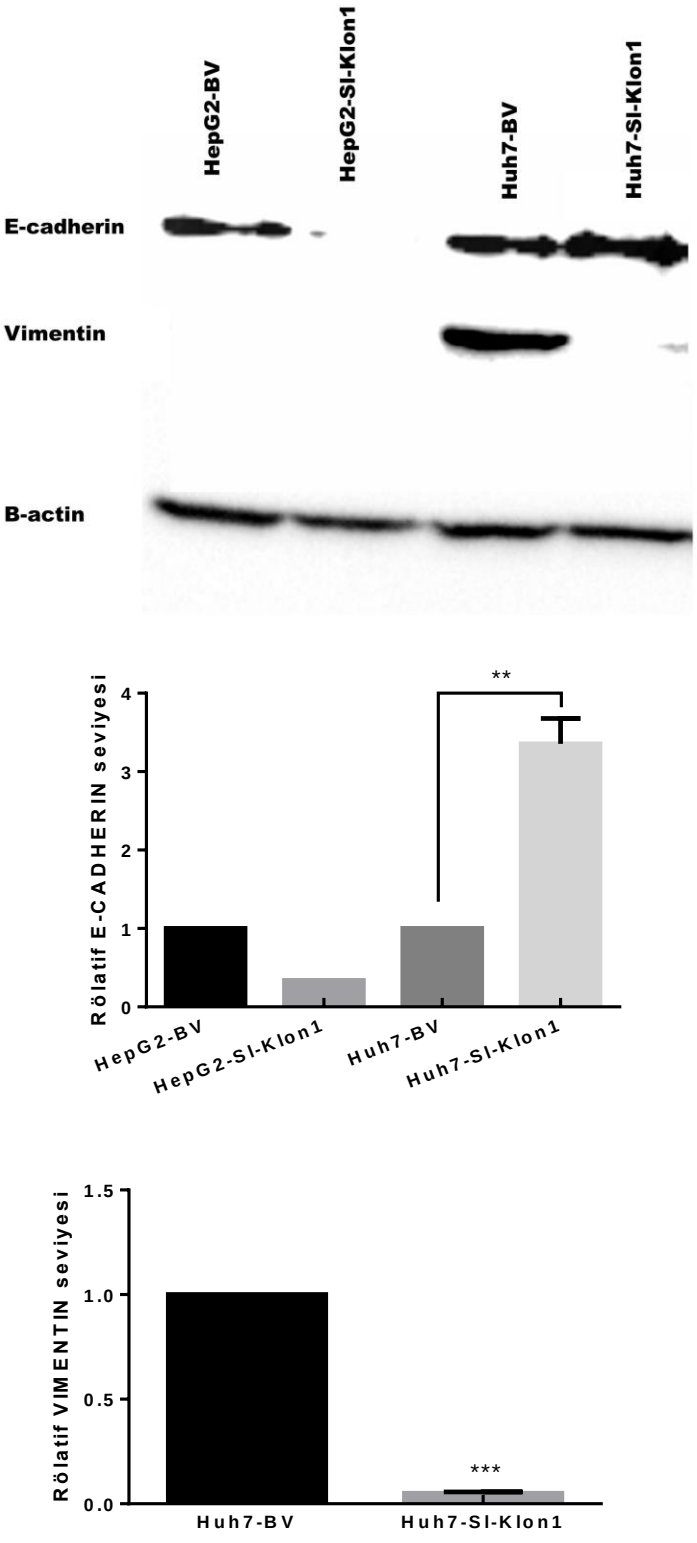
Seçilen monoklonal hücre hatlarında Slug aşırı ifadesinin teyit edilmesi için western blotlama ve RT-qPCR deneyleri gerçekleştirildi. Şekil 3.2'de görüldüğü gibi HepG2-Sl-Klon1 hücrelerinin Slug protein ve mRNA'sını sırasıyla 7 ve 12 kat arttırdığı tespit edildi. Ayrıca, Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinin Slug protein ve mRNA'sını sırasıyla 9 ve 17 kat arttırdığı tespit edildi. Daha sonra EMT markırları olan E-cadherin ve vimentin proteinlerinin seviyesi araştırıldı. Slug'ı aşırı ifade eden HepG2 hücrelerinin E-cadherini 3 kat arttığı gözlendi. Vimentin sinyali ise HepG2 hücrelerinde ilginç bir şekilde elde edilemedi. Bu sonuçlar beklendiği gibi aşırı Slug ifadesinin en azından E-cadherin seviyesini azaltarak tam EMT'ye yol açtığını göstermekteydi (Şekil 3.3). Diğer taraftan, Slug'ı aşırı ifade eden Huh7 hücrelerinde E-cadherin 3 kat artarken vimentin seviyesi ise 20 kat azaldı. Bu durum Huh-7 hücrelerinin kismi EMT fenotipinde olabileceğini düşündürdü. Bu sebeple aşırı Slug ifade eden hücrelerde ZEB2 mRNA'sı seviyeleri araştırıldı.



Şekil 3.1. *Aşırı Slug ifade eden monoklonal hücre hatlarının in-cell western deneyi ile seçimi*

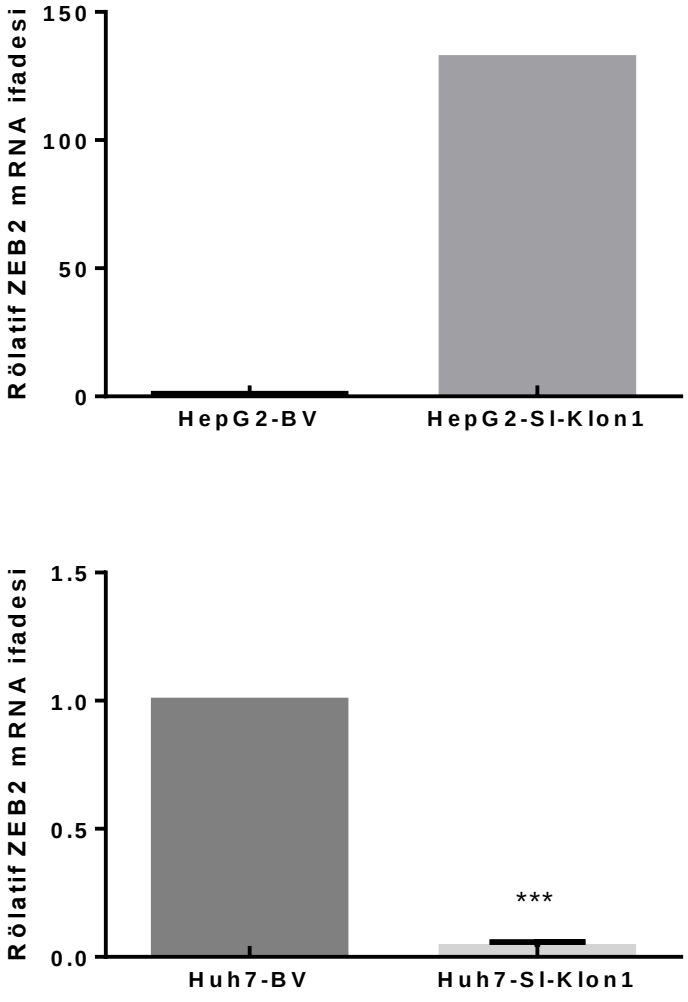


Şekil 3.2. *Slug ifadesinin HepG2-BV, HepG2-Sl-Klon1, Huh7-BV ve Huh7-Sl- Klon1 hücrelerinde western blotlama ve qPCR ile belirlenmesi*



Şekil 3.3. *E-cadherin ve vimentin seviyelerinin HepG2-BV, HepG2-Sl-Klon1, Huh7-BV ve Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinde western blotlama ile belirlenmesi*

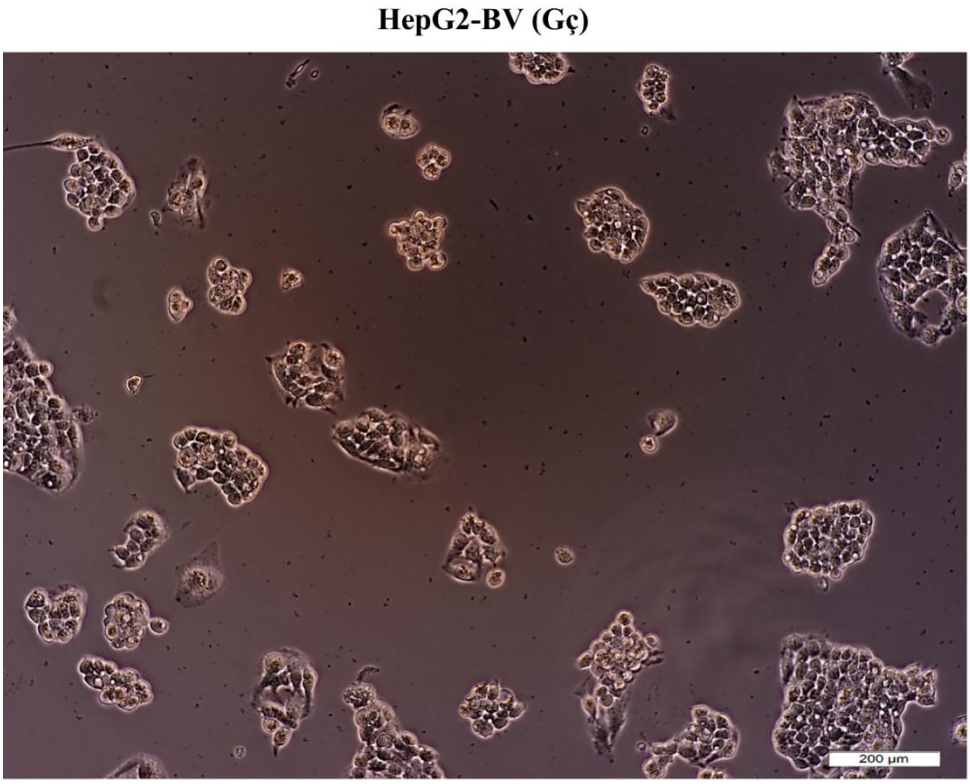
Slug'ı aşırı ifade eden HepG2 hücrelerinin ZEB2 mRNA'sı ifadesinin 132 kat arttığı gözlendi. Diğer taraftan, Slug'ı aşırı ifade eden Huh7 hücrelerinde ZEB2 mRNA'sı ifadesinin ise 33 kat azaldığı tespit edildi (Şekil 3.4). Bu bulgularla Aşırı Slug ifade eden HepG2 hücrelerinin tam EMT, Huh7 hücrelerinin ise kısmi EMT fenotipi (Leroy ve ark. 2007) gösterdiği sonucuna ulaşıldı.



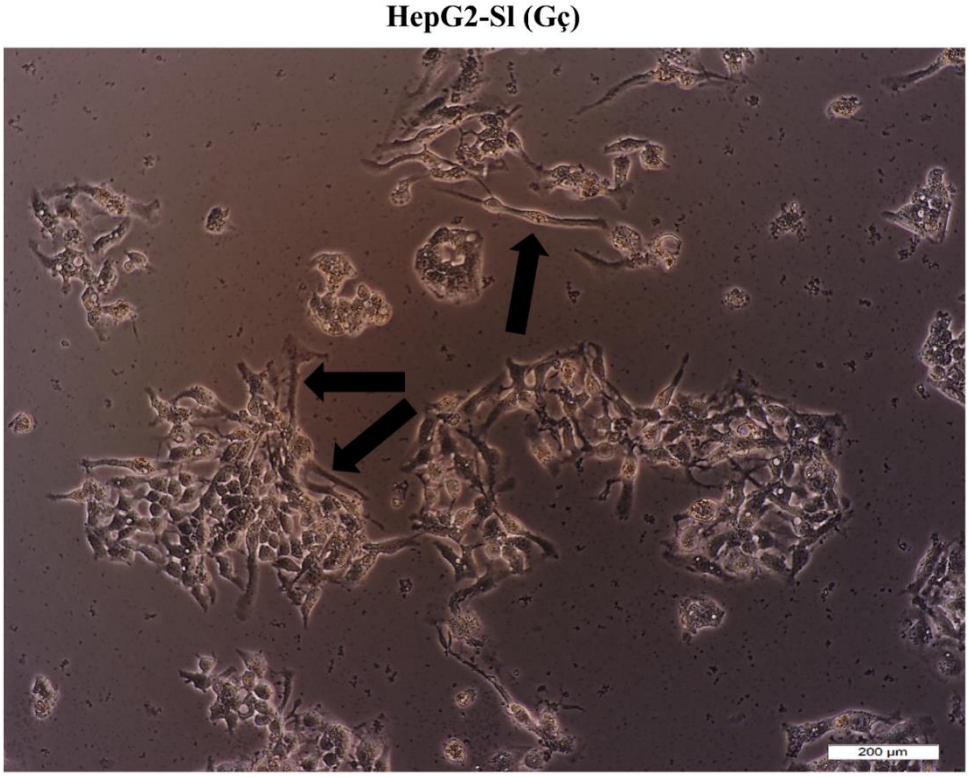
Şekil 3.4. *Zeb2 ifadesinin HepG2-BV, HepG2-Sl-Klon1, Huh7-BV ve Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinde qPCR ile belirlenmesi*

Aşırı Slug ifade eden HepG2 hücrelerinde tam EMT fenotipini morfolojik olarak değerlendirmek için pcDNA3.1 ve SlugMyc_pcDNA3 plazmitleriyle geçici olarak transfekte edilerek HepG2-BV (Gç) (Görsel 3.1) ve HepG2-Sl-(Gç) (Görsel 3.2) hücreleri elde edildi. HepG2-Sl-(Gç) hücrelerinin Görsel 3.2'de bulunan ok ile gösterildiği gibi uzayarak fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip oldukları tespit edildi. Aşırı Slug ifade eden Huh7 hücrelerinde morfolojik olarak inceleme yapmak için pcDNA3.1 ve SlugMyc_pcDNA3 plazmitleriyle geçici olarak transfekte edilerek Huh7-BV (Gç) (Görsel 3.3) ve Huh7-Sl-(Gç) (Görsel 3.4) hücreleri elde edildi. Huh7-Sl-(Gç) hücrelerinin Görsel 3.4'te görüldüğü gibi kontrol grubu hücrelerinden belirgin bir farklılıklarının bulunmadığı tespit edildi. Tam fenotipinin hücre-hücre adhezyon moleküllerinin kaybı ile birlikte hücre polaritesinin ortadan kalkması sonunda ilerlemiş hücre göçüyle ilişkili olan iğ benzeri morfolojiye dayandığı bilinmektedir (Ye ve ark. 2015). Fakat kısmi EMT fenotipinde olan hücrelerin invazyon yetenekleri hakkında detaylı bir bilgi bulunmamaktadır. Bu sebeple, kısmi EMT fenotipinde olan aşırı Slug ifade eden Huh7 hücrelerini hücre göçü yetenekleri yara iyileşmesi deneyi ile araştırıldı (Şekil 3.5). Aşırı Slug ifade eden Huh7 hücrelerinin yara iyileştirme oranının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde fazla olduğu sonucuna ulaşıldı. Bu durum kısmi EMT fenotipinde olan hücrelerin göç yeteneklerinin arttığını gösterdi. Bu deney serumsuz medyum ile yapıldığından hücre çoğalmasının yara iyileşmesine katkısı asgari ölçüde tutuldu.

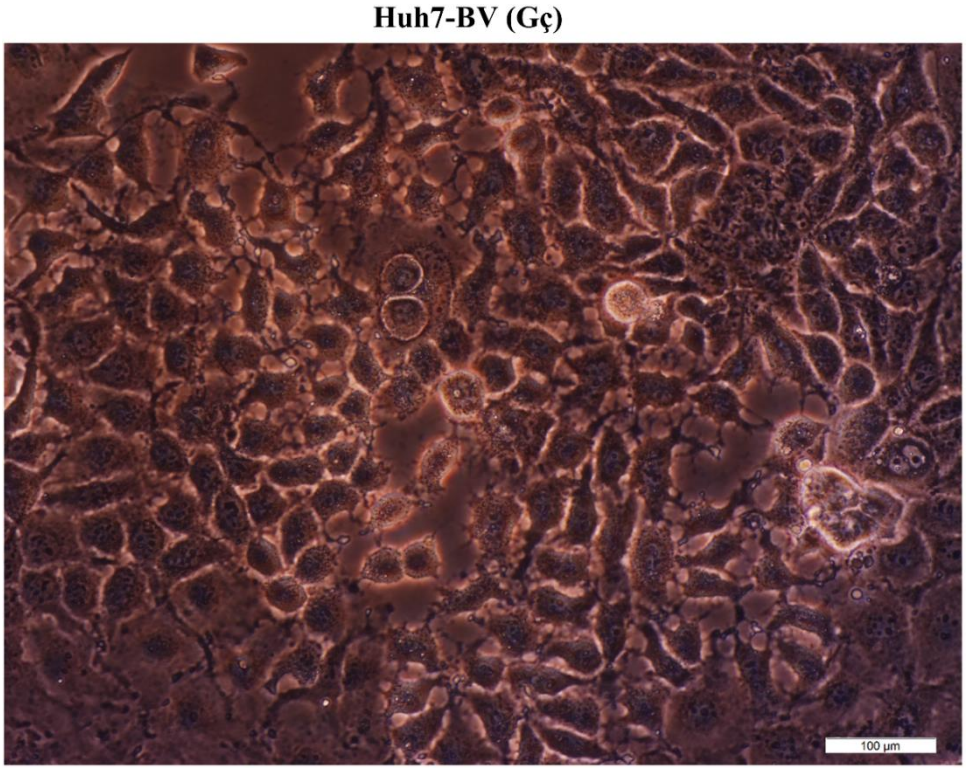
EMT programının ilaç direnci ile eşleştiği bilindiğinden (Zheng ve ark. 2015), aşırı Slug ifadesinin cisplatin direnci ile olan ilişkisi nötral kırmızısı alım testi ile araştırıldı. Buna göre, hücre sayısında yarılanmaya neden olan cisplatine konsantrasyonu (IC_{50} değerleri); HepG2-BV'de 11,2 µM iken, aşırı Slug ifade eden HepG2-Sl-Klon1 ve HepG2-Sl-Klon2 hücrelerinde sırasıyla 27,16 µM ve 19,4 µM'a ulaştı. Huh7-BV'de 11,8 µM iken, aşırı Slug ifade eden Huh7-Sl-Klon1 ve Huh7-Sl-Klon2 hücrelerinde sırasıyla 23,4 µM ve 15,65 µM'a ulaştı (Şekil 3.6). IC_{50} değerlerinde bu anlamlı artışlar hem kısmi hem de tam EMT'de kemodirenç gelişiminin meydana geldiğini gösterdi.



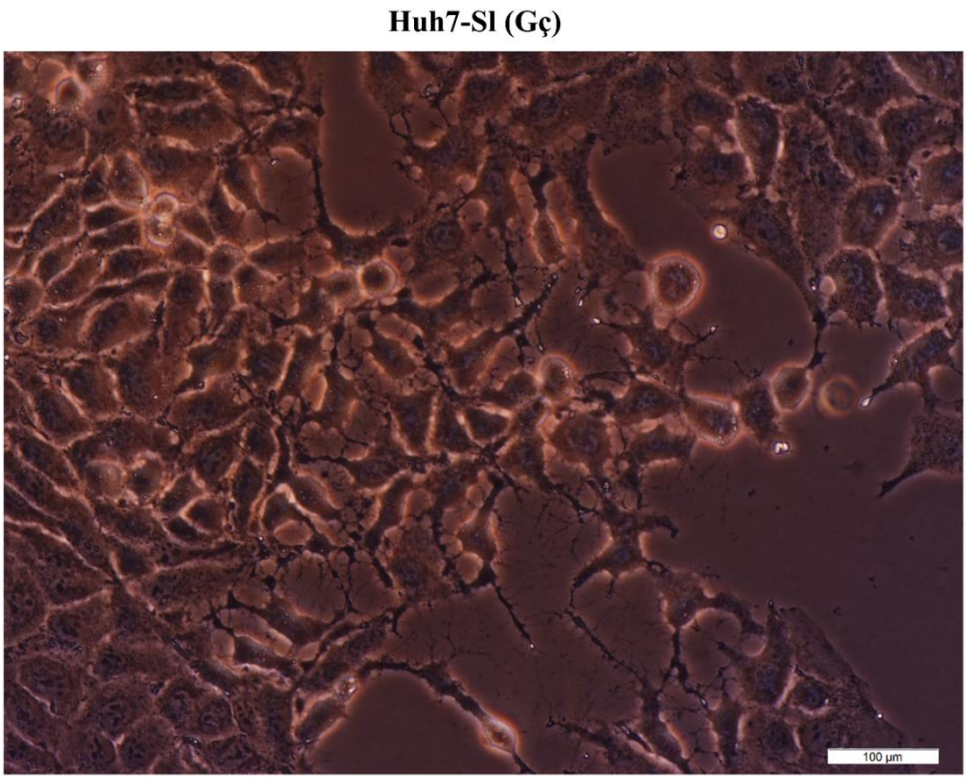
Görsel 3.1. *Boş vektör ifadesini geçici olarak gerçekleştiren HepG2 hücrelerinin morfolojisi*



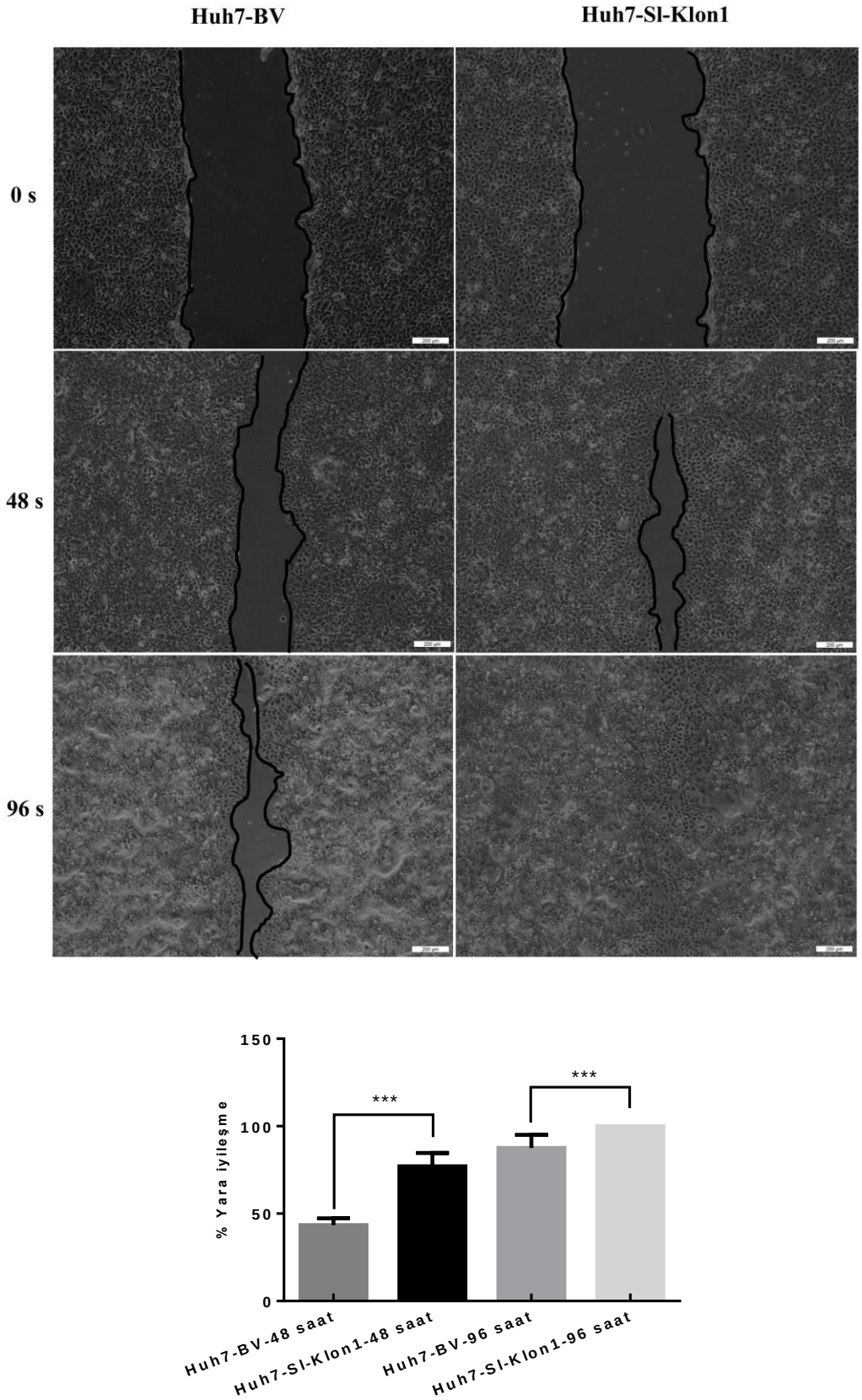
Görsel 3.2. *Aşırı Slug ifadesini geçici olarak gerçekleştiren HepG2 hücrelerinin morfolojisi. Fibroblast-benzeri görünüm kazanmış bir HepG2 hücresi ok ile gösterilmektedir*



Görsel 3.3. *Boş vektör ifadesini geçici olarak gerçekleştiren Huh7 hücrelerinin morfolojisi*

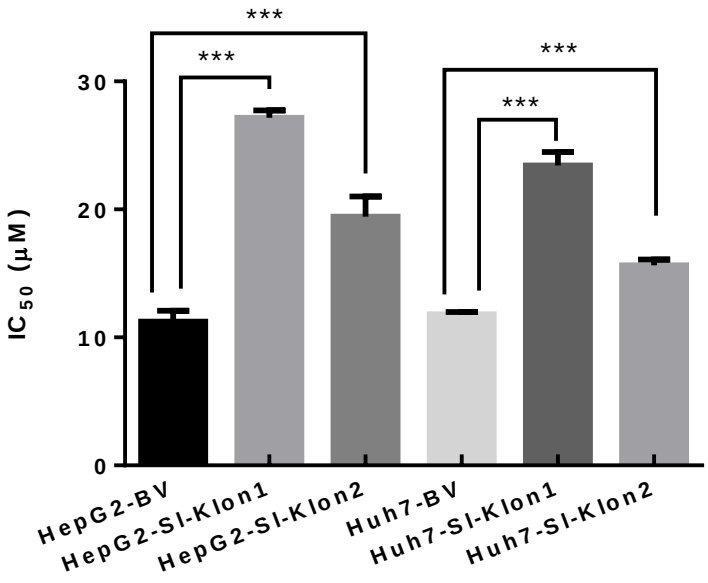


Görsel 3.4. *Aşırı Slug ifadesini geçici olarak gerçekleştiren Huh7 hücrelerinin morfolojisi*

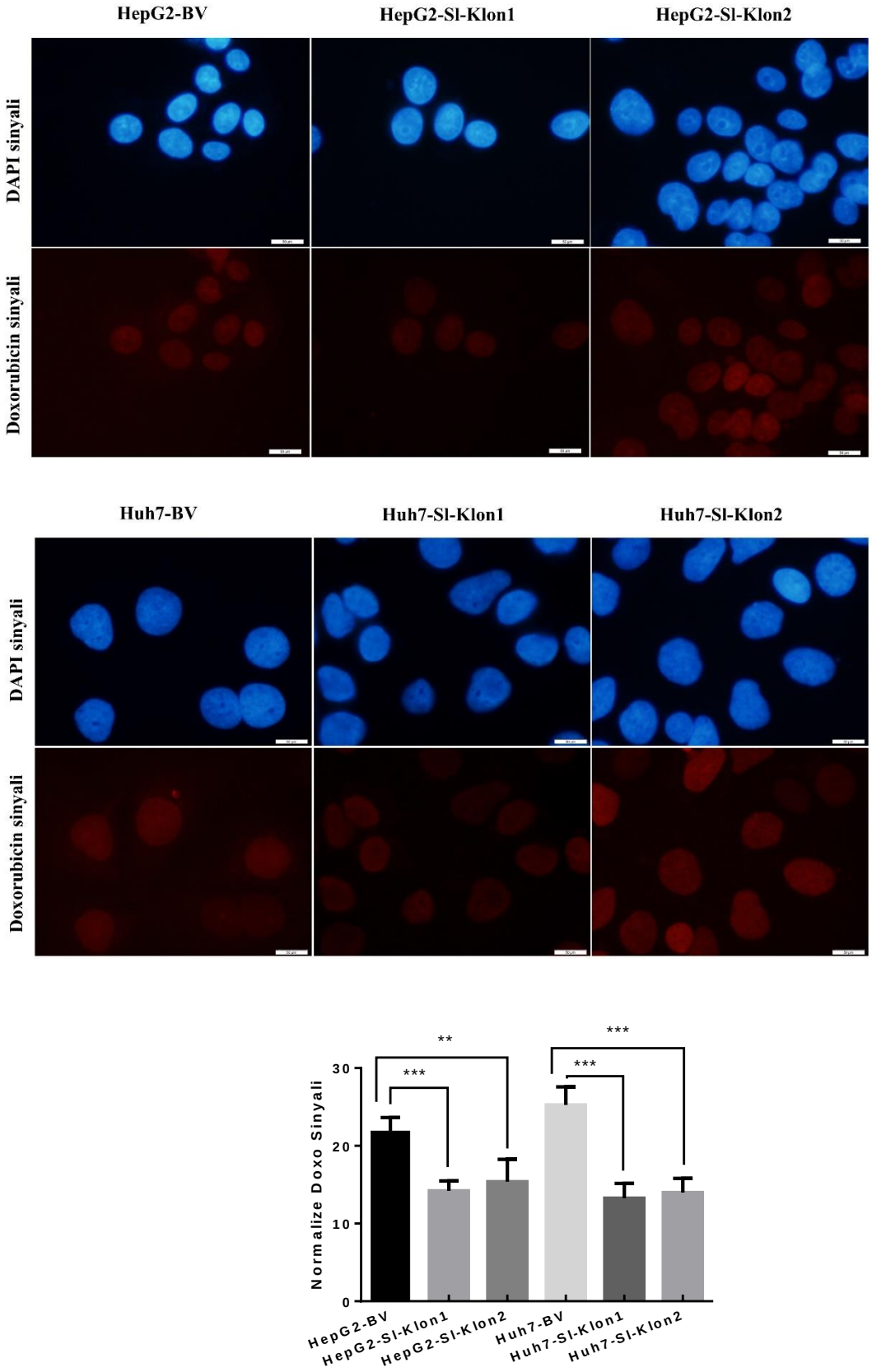


Şekil 3.5. *Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinde yara iyileşme oranının belirlenmesi*

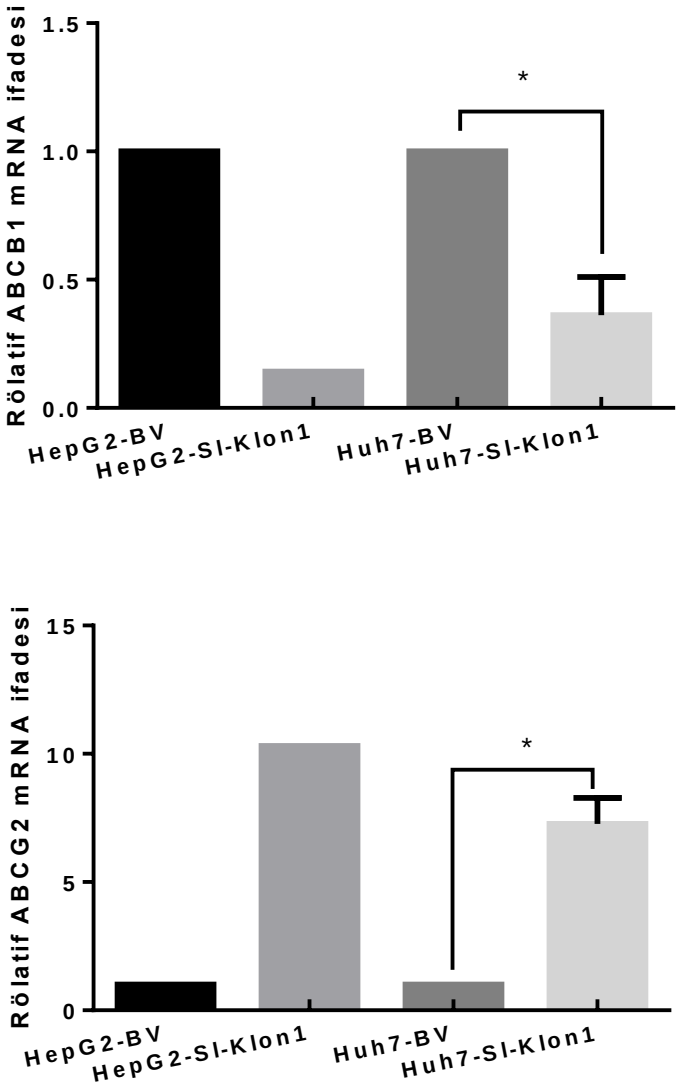
Aşırı Slug ifadesinin kemodirenç ile ilişkisini belirlemek için ayrıca doxorubicin kümelenme deneyi de yapıldı. Bu deney, dirençli hücrelerin doxorubicini hücreden dışarıya atması sebebiyle hücre içi doxorubicin seviyesini asgari düzeyde tutmasına bağlı olarak floresans mikroskobunda görülebilen doxorubicin sinyallerinin azalması temeline dayanır. Gerçekten aşırı Slug ifade eden hücrelerde doxorubicin kümelenmesinin anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi (Şekil 3.7). Kemodirenç mekanizmasını bulmak için bir dizi transporter gen ifadesi ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5 ve ABCG2 qPCR ile araştırıldı. ABCC1, ABCC2, ABCC3 ve ABCC5 ifadelerinin değişmediği tespit edildi. Buna karşın ABCG2'nin HepG2-Sl-Klon1 ve Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinde sırasıyla 10 ve 7 kat arttığı tespit edildi. İlginç olarak, ABCB1 ifadesinin HepG2-Sl-Klon1 ve Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinde sırasıyla 7 ve 3 kat azaldığı beklenmedik bir şekilde tespit edildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.6. *Kısmi ve tam EMT'de nötral kırmızısı alım testi ile belirlenen kemodirenç deneyinin sonucu*



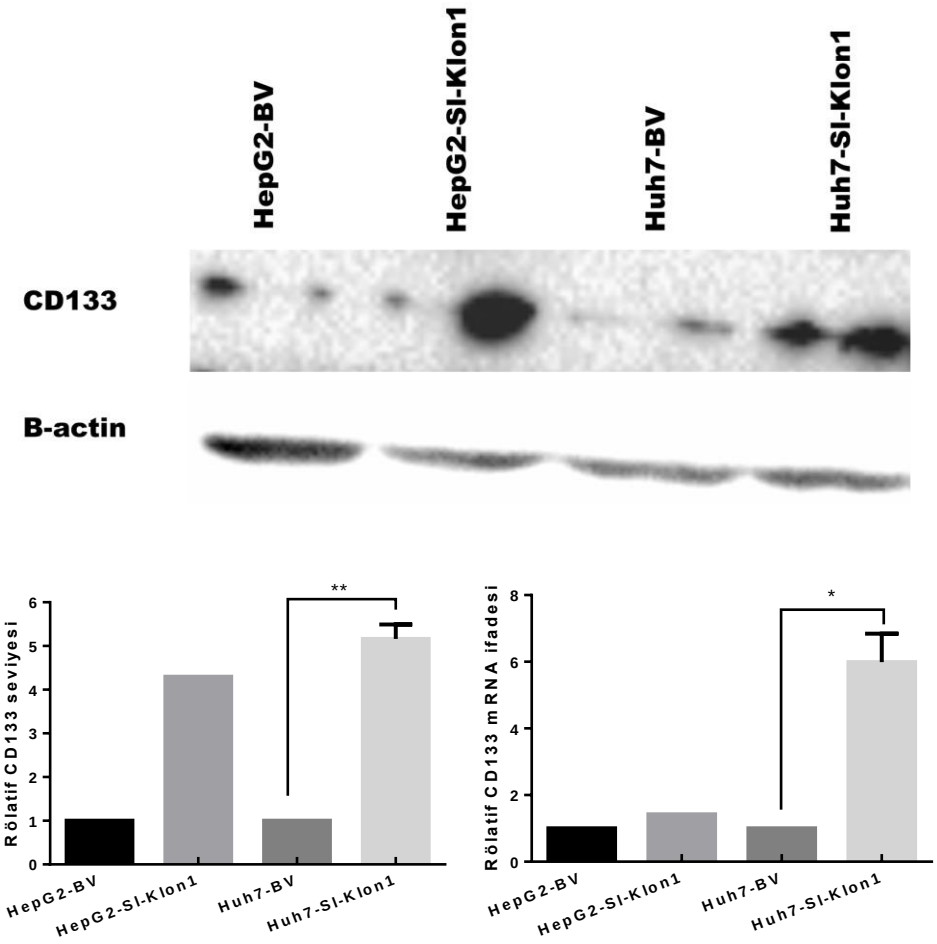
Şekil 3.7. *Kısmi ve tam EMT'de doxorubicin kümelenmesi deneyi sonuçları*



Şekil 3.8. *Kısmi ve tam EMT'de ABCB1 ve ABCG2 mRNA ifadesinin qPCR ile belirlenmesi. HepG2-Sl-Klon1 hücreleri birkaç pasajlamada aşırı Slug ifadesini yitirdikleri için bu grubun deneyleri bir kez yapıldı. Huh7-Sl-Klon1 hücreleriyle tüm deney üç bağımsız biyolojik tekrar ile yapıldı*

3.2. Aşırı Slug İfadesinin Kök Hücre Fenotipi (Stemness) Üzerine Olan Etkisi

Aşırı Slug ifadesinin, ovaryum kanserde (Kurrey ve ark. 2009) ve hepatosellülar karsinom hücrelerinde (Sun ve ark. 2014) kök hücre fenotipi gelişimine yol açtığı bilinmektedir. Bu sebeple kısmi ve tam EMT'de CD133 ifadesi araştırıldı. CD133 proteininin HepG2-Sl-Klon1 ve Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinde sırasıyla 4 ve 5 kat arttığı, dahası CD133 mRNA'sının HepG2-Sl-Klon1 ve Huh7-Sl-Klon1 hücrelerinde sırasıyla 1,5 ve 6 kat arttığı tespit edildi (Şekil 3.9). Bu bulgular kök hücre fenotipinin Slug proteini tarafından düzenlendiği fikrini destekledi.

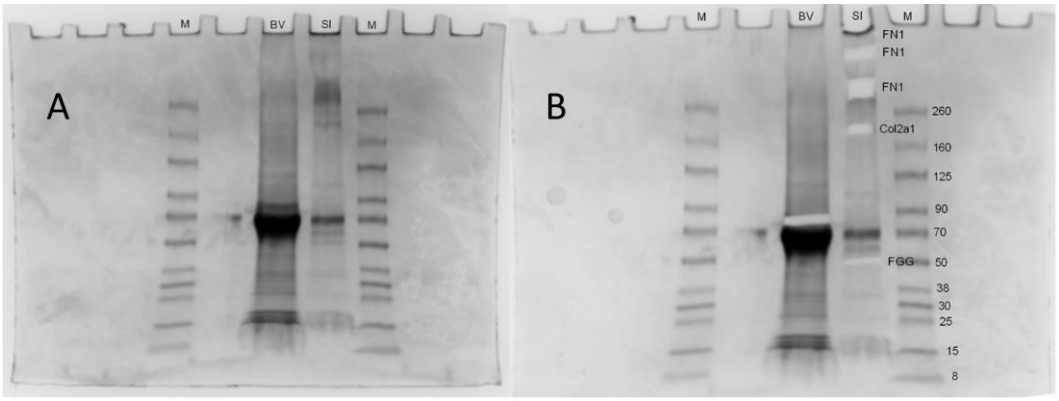


Şekil 3.9. *Aşırı Slug ifade eden hücrelerde CD133 proteini seviyesi ve mRNA ifadesinin western blotlama ve qPCR ile belirlenmesi. CD133 proteini ile Slug proteini western blotlamaları için aynı membran kullanılmıştır*

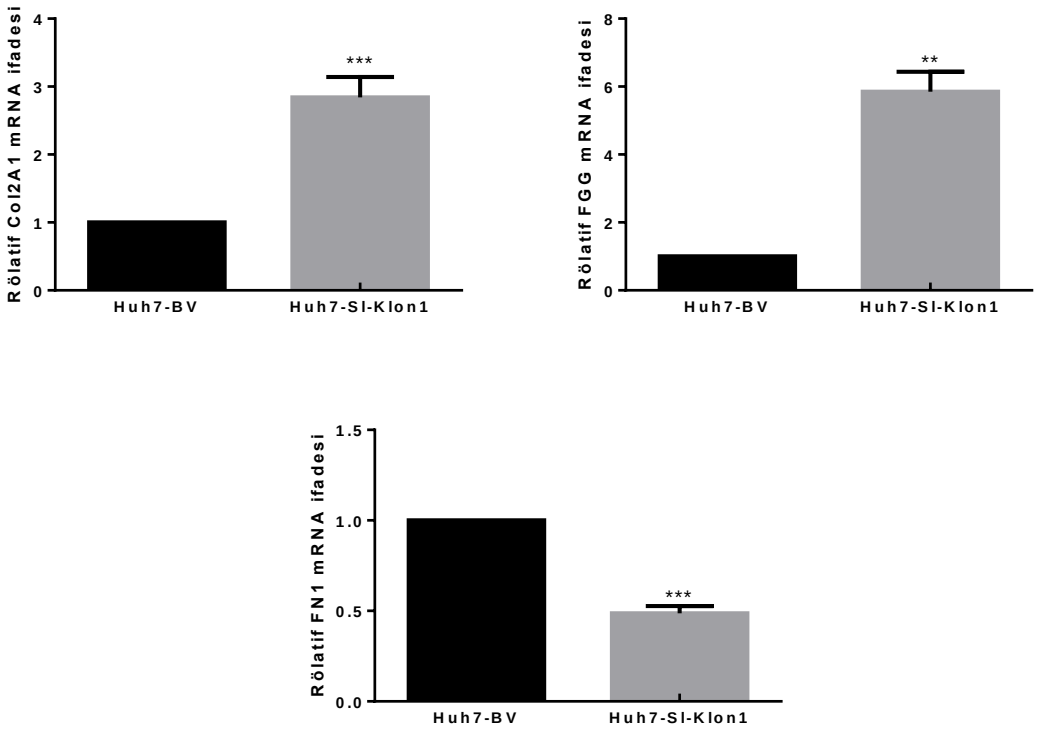
3.3. HSK'da Kemodirenç ve Kısmi EMT için Protein Yapılı Biyoişaretler

Ekzozomlardan kaynaklanan ve girişimsel olmayan yöntemlerle ulaşılabilir olan kemodirenç biyoişaretleri, kanser yönetimi ve nüks etme riskinin belirlenmesi bakımından önemlidir (Manne ve ark. 2016). Kısmi EMT, tam EMT'ye göre daha az çalışılmış olduğu için bu çalışmada olası kısmi EMT biyoişaretleri hücre kültürü süpernatanında çalışıldı. Bunun için, Huh7-Sl-Klon1 ve Huh7-BV hücreleri koşullu medyumdan ekzozomal proteinler izole edildi. Aşırı Slug ifade eden Huh7 hücrelerinde ekzozomal proteinlerden özellikle üç proteinin ifadesinin oldukça arttığı tespit edildi (Görsel 3.5). MALDI-TOF/TOF analizi ile bu proteinlerin molekül ağırlığı 262 kDa'dan büyük olan fibronektin1 (FN1), molekül ağırlığı 210 kDa olan kollajen tip II α 1 (COL2A1) ve molekül ağırlığı 50 kDa olan fibrinojen gama zinciri (FGG) proteinleri oldukları tespit edildi. Literatürde FN1, COL2A1 ve FGG proteinlerinin beklenen moleküler ağırlıkları sırasıyla 262, 141 ve 50 kDa olduğu için kısmi EMT'de FN1 ve COL2A1'in post translasyonel olarak modifiye edildikleri sonucuna ulaşıldı. FGG'nin ise post translasyonel olarak herhangi bir modifikasyona uğramadığı tespit edildi.

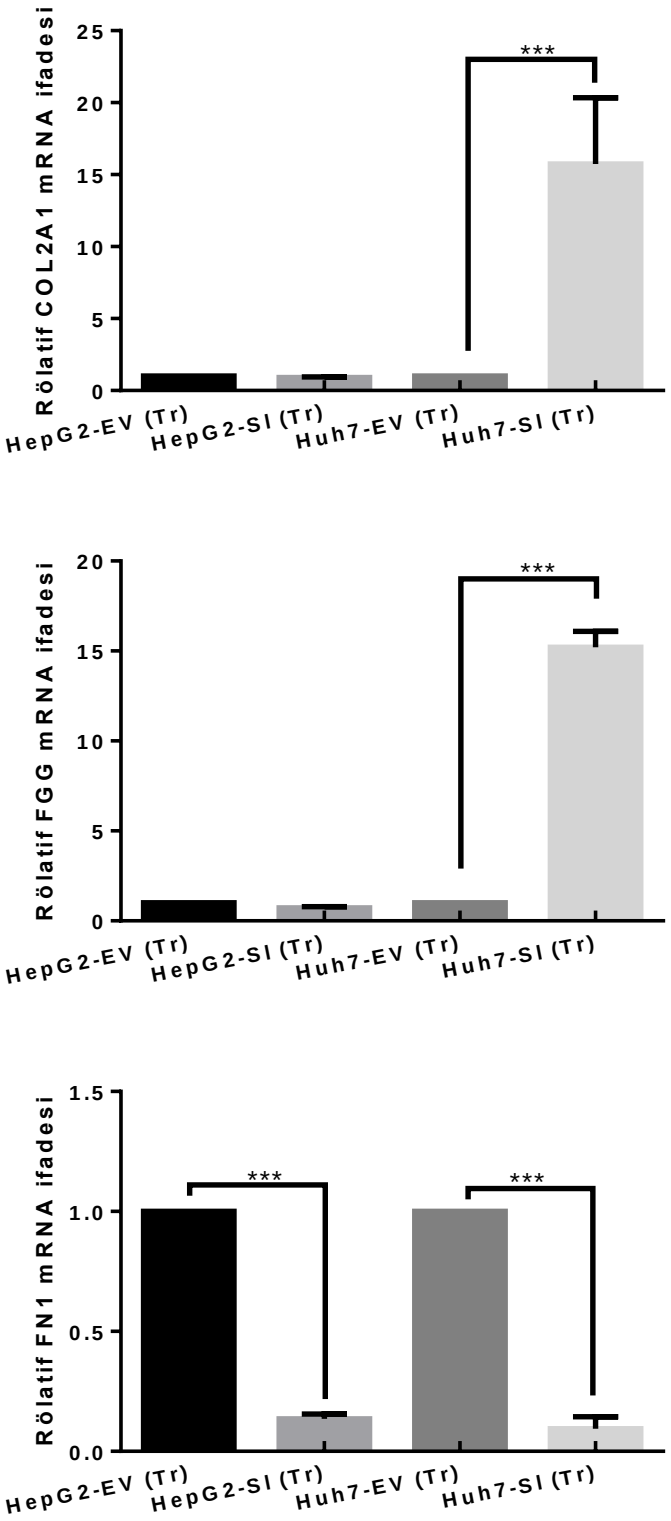
Aşırı Slug ifadesini kalıcı olarak gerçekleştiren ve kısmi EMT fenotipinde olan Huh7 hücrelerinde qPCR sonuçları COL2A1 ve FGG mRNA'larının sırasıyla 2,8 ve 5,8 kat arttığını gösterdi. Fakat FN1 mRNA'sının 2 kat azaldığı tespit edildi (Şekil 3.10). Aşırı Slug ifadesini geçici olarak gerçekleştiren ve tam EMT fenotipinde olan HepG2-Sl (Gç) ile kısmi EMT fenotipinde olan Huh7-Sl (Gç) hücrelerinin COL2A1, FGG ve FN1 ifadelerini tespit etmek için gerçekleştirilen qPCR sonuçlarına göre, kısmi EMT'de COL2A1, FGG mRNA'larının sırasıyla 15'er kat artmış FN1 mRNA'sını ise 11 kat azalmış; tam EMT'de ise COL2A1 ve FGG mRNA'larının ifadeleri stabil kalmış FN1 mRNA'sı ise 11 kat azalmıştır. (Şekil 3.11).



Görsel 3.5. *A) Markır (M), Huh7-BV (BV) ve Huh7-Sl-Klon1 (Sl) hücreleri ekzozomal proteinlerinin SDS-PAGE ile ayrılması. Ekzozomal protein ifadesinin karşılaştırmalı analizi için kullanılan jel fotografı. B) SDS-PAGE jelinde boş dikdörtgenler, jelden kesilerek zip-tiplenen ve MALDI-TOF/TOF analizi için kullanılan protein bantlardır*



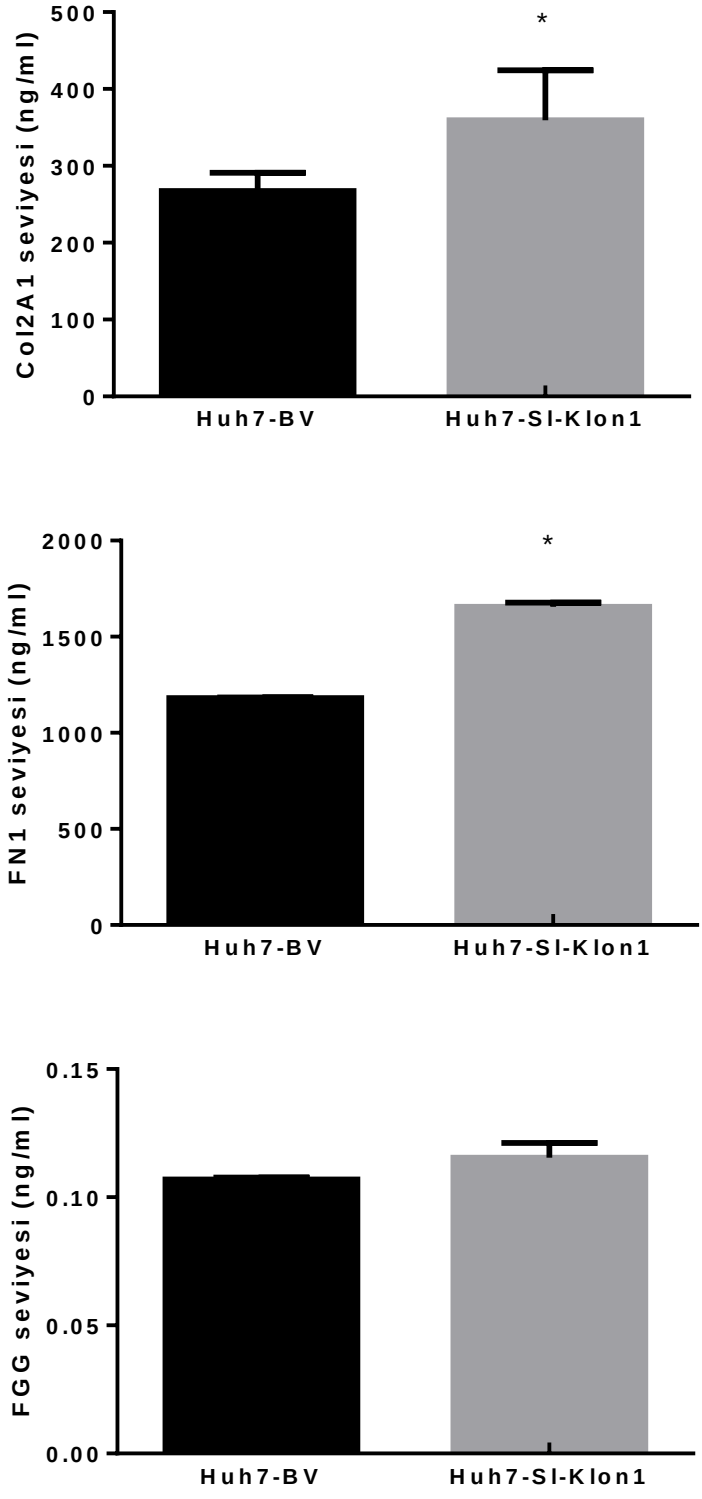
Şekil 3.10. *Aşırı Slug ifadesini kalıcı olarak gerçekleştiren Huh7 hücrelerinde COL2A1, FGG ve FN1 mRNA ifadelerinin qPCR ile belirlenmesi*



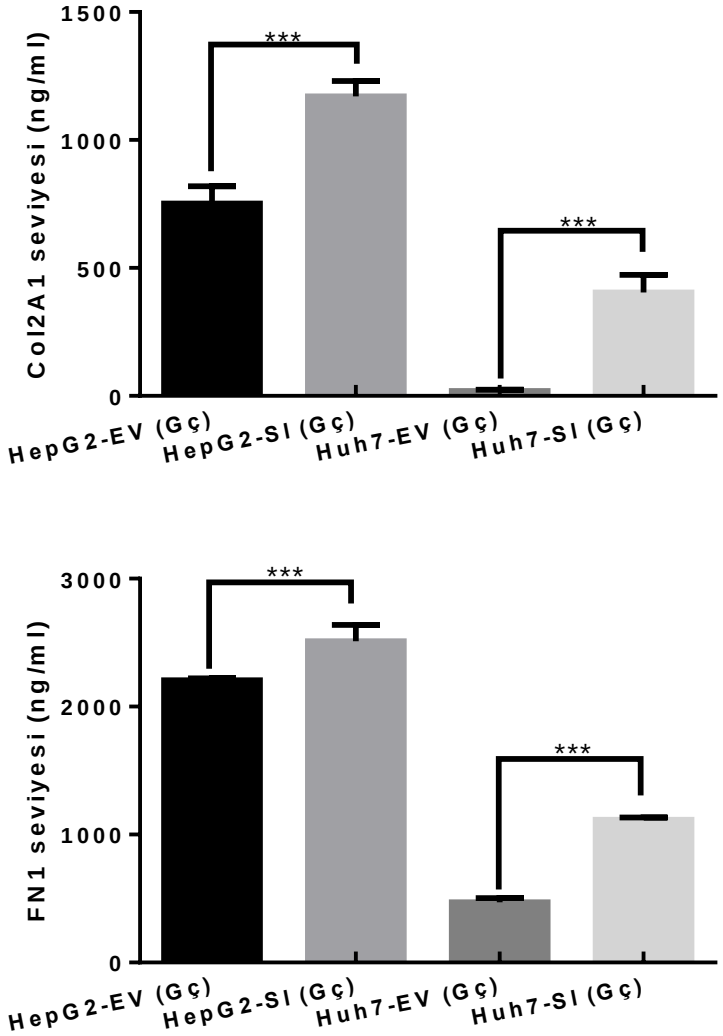
Şekil 3.11. *Aşırı Slug ifadesini geçici olarak gerçekleştiren HepG2 ve Huh7 hücrelerinde COL2A1, FGG ve FN1 mRNA ifadelerinin qPCR ile belirlenmesi*

ELISA testleriyle hücre kültürü süpernatanında COL2A1, FGG ve FN1 protein ifadeleri araştırıldığında toplam (modifiye edilmiş ve edilmemiş) COL2A1 ve FN1 proteinleri ifadelerinin kontrol hücrelerinde sırasıyla 267 ve 1181 ng/ml iken aşırı Slug ifadesini kalıcı olarak gerçekleştiren ve kısmi EMT fenotipinde olan hücrelerde bu proteinlerin ifadeleri sırasıyla 359 ve 1656 ng/ml'ye ulaşarak istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi. Ne yazık ki, FGG seviyesi kit deteksiyon limitinin altında kaldığı için tespit edilemedi (Şekil 3.12).

Aşırı Slug ifadesini geçici olarak gerçekleştiren ve tam EMT fenotipinde olan HepG2-Sl (Gç) ile kısmi EMT fenotipinde olan Huh7-Sl (Gç) hücrelerinin COL2A1, FGG ve FN1 ifadelerini tespit etmek için gerçekleştirilen ELISA testi gerçekleştirilmiştir. Buna göre, kontrol grubunda 752 ve 2205 ng/ml olan COL2A1 ve FN1 proteinleri tam EMT'de 1171 ve 2510 ng/ml seviyesine ulaşarak anlamlı ölçüde artmıştır. Yine kontrol grubunda 18 ve 471 ng/ml olan COL2A1 ve FN1 proteinleri kısmi EMT'de 404 ve 1115 ng/ml seviyesine ulaşarak anlamlı ölçüde artmıştır. ELISA çalışmaları COL2A1 proteini ifadesinin dramatik bir şekilde arttığını göstermektedir. Bu nedenle COL2A1'in özellikle kısmi EMT için özelleşmiş bir biyoişaret olma potansiyelini ortaya koymaktadır. FN1 ifadesindeki artış hem kısmi hemde tam EMT'de gerçekleştiği için FN1'in EMT durumundan ziyade kemodirenç için kullanılabilecek bir biyoişaret olduğu ortaya çıkmıştır (Şekil 3.13).



Şekil 3.12. *Aşırı Slug ifadesini kalıcı olarak gerçekleştiren Huh7 hücrelerinde COL2A1, FGG ve FN1 proteinlerinin ELISA testi ile ölçüm sonuçları*



Şekil 3.13. *Aşırı Slug ifadesini geçici olarak gerçekleştiren HepG2 ve Huh7 hücrelerinde COL2A1 ve FN1 proteinlerinin ELISA testi ile ölçüm sonuçları*

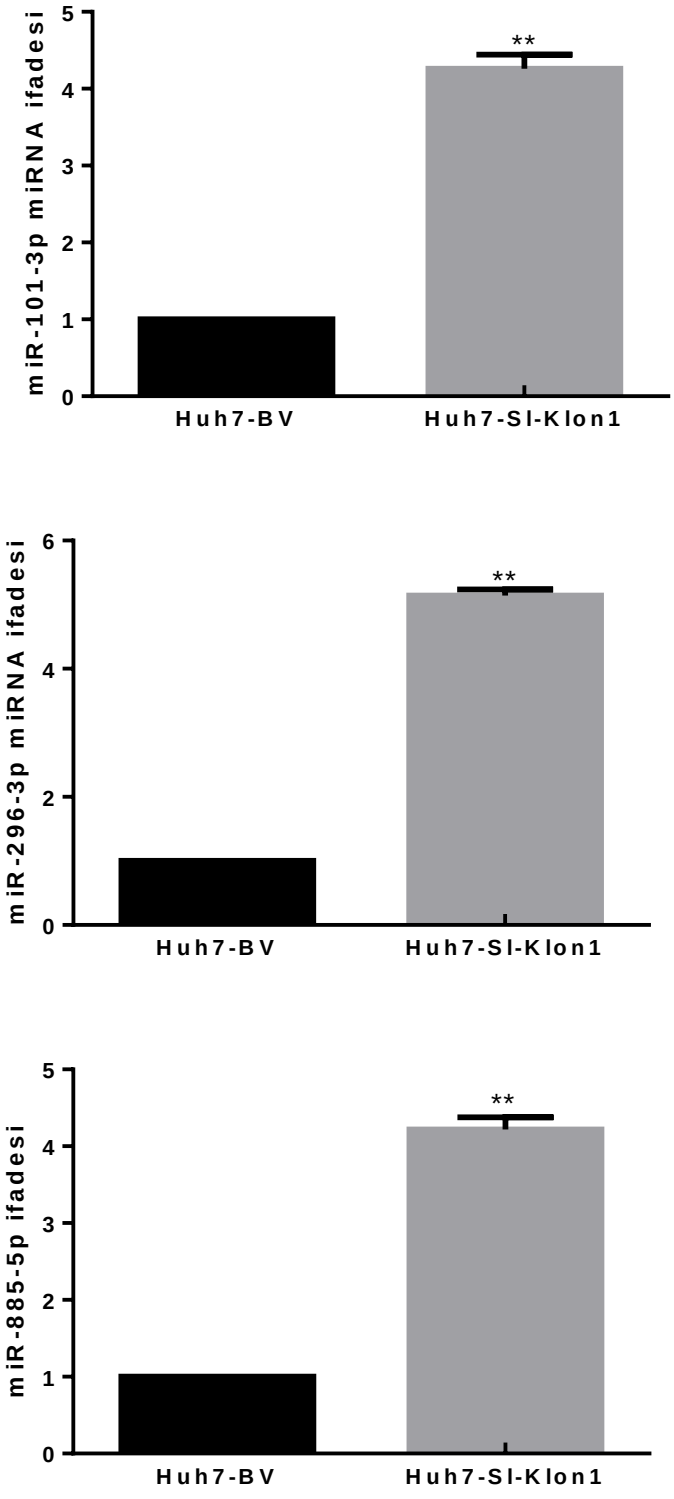
3.4 HSK'de Kemodirenç ve Kısmi EMT için miRNA Yapılı Biyoişaretler

miRNA yapılı biyoişaretleri belirlemek için ekzozomlardan izole edilen miRNA'lar yeni nesil dizileme cihazında (Hiseq 2000, Illumina) dizilenmiştir. Dizilenen ve kontrol grubuna göre ifadesi anlamlı ölçüde farklılaştığı için biyoişaret olabilecek miRNA'lar Tablo 3.1'de bulunmaktadır.

Tablo 3.1. *Kontrol grubuna göre ifadesi anlamlı ölçüde farklılaştığı için biyoişaret olabilecek miRNA'lar*

Adı_Aksesyon Numarası	**Adı_Aksesyon Numarası**
hsa-miR-101-3p_MIMAT0000099	hsa-miR-340-5p_MIMAT0004692
hsa-miR-125a-5p_MIMAT0000443	hsa-miR-3677-3p_MIMAT0018101
hsa-miR-1266-5p_MIMAT0005920	hsa-miR-375_MIMAT0000728
hsa-miR-1269a_MIMAT0005923	hsa-miR-3928-3p_MIMAT0018205
hsa-miR-1273d_MIMAT0015090	hsa-miR-3944-3p_MIMAT0018360
hsa-miR-1273e_MIMAT0018079	hsa-miR-4461_MIMAT0018983
hsa-miR-1296-5p_MIMAT0005794	hsa-miR-4634_MIMAT0019691
hsa-miR-1303_MIMAT0005891	hsa-miR-4707-3p_MIMAT0019808
hsa-miR-1307-5p_MIMAT0022727	hsa-miR-4739_MIMAT0019868
hsa-miR-145-5p_MIMAT0000437	hsa-miR-4745-5p_MIMAT0019878
hsa-miR-183-5p_MIMAT0000261	hsa-miR-4792_MIMAT0019964
hsa-miR-193b-5p_MIMAT0004767	hsa-miR-483-3p_MIMAT0002173
hsa-miR-19a-3p_MIMAT0000073	hsa-miR-550a-5p_MIMAT0004800
hsa-miR-19b-3p_MIMAT0000074	hsa-miR-551a_MIMAT0003214
hsa-miR-210-3p_MIMAT0000267	hsa-miR-561-5p_MIMAT0022706
hsa-miR-215-3p_MIMAT0026476	hsa-miR-589-3p_MIMAT0003256
hsa-miR-215-5p_MIMAT0000272	hsa-miR-615-5p_MIMAT0004804
hsa-miR-216a-3p_MIMAT0022844	hsa-miR-642a-3p_MIMAT0020924
hsa-miR-218-5p_MIMAT0000275	hsa-miR-6509-5p_MIMAT0025474
hsa-miR-25-3p_MIMAT0000081	hsa-miR-659-5p_MIMAT0022710
hsa-miR-25-5p_MIMAT0004498	hsa-miR-671-5p_MIMAT0003880
hsa-miR-296-3p_MIMAT0004679	hsa-miR-6723-5p_MIMAT0025855
hsa-miR-301b-3p_MIMAT0004958	hsa-miR-6858-5p_MIMAT0027616
hsa-miR-3150b-5p_MIMAT0019226	hsa-miR-7847-3p_MIMAT0030422
hsa-miR-339-5p_MIMAT0000764	hsa-miR-877-5p_MIMAT0004949
hsa-miR-33b-5p_MIMAT0003301	hsa-miR-885-5p_MIMAT0004947

Daha önce literatürde kemodirenç ile ilişkili olduğu bilinen hsa-miR-296-3p, hsa-miR-101-3p ve hsa-miR-885-5p miRNA'larının ifadesi miRNA RT-qPCR'ı ile Huh7-Sl-Klon1 hücreleri koşullu medyumda araştırılmış sonuçta bu miRNA'ların sırasıyla 5, 4 ve 4 kat arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. *Aşırı Slug ifadesini kalıcı olarak gerçekleştiren Huh7 hücrelerinde miR-101-3p, miR-296-3p ve miR-885-5p miRNA ifadelerinin miRNA RT-qPCR ile araştırılması*

4. TARTIŞMA

Hasta serumundan kemodirenç araştırmak için kullanılabilen ve girişimsel olmayan biyoişaretlerin belirlenmesi, kemoterapi etkinliğini büyük ölçüde artıracaktır. Kemodirenç, sıklıkla, çeşitli kanser türlerinde EMT markırı ve transkripsiyon faktörü olan Slug'ın aşırı ifadesi ve faaliyete geçmesi ile ilişkilidir (Kurrey ve ark. 2009, Liang ve ark. 2014, Tsukasa ve ark. 2015, Pan ve ark. 2017). Bu doktora tezinde Slug proteininin iki farklı HSK hücre hattında aşırı ifadesi sağlandı ve sonuçta HSK için **dört temel durum ilk kez raporlandı. 1)** Slug aracılı tam ve kısmi EMT'nin HepG2 ve Huh7 hücrelerinde sırasıyla tetiklenmesi. **2)** Hem kısmi hemde tam EMT'de kemodirenç ve kök hücre özelliklerinin ortaya çıktığının gösterilmesi. **3)** Post translasyonel olarak modifiye edilmiş fibronektin1, kollajen tip II α 1 ve doğal fibrinojen gama zinciri ifadelerindeki artışın kemodirenç ve kısmi EMT biyoişaretleri olarak kullanılma potansiyellerinin bulunması. **4)** hsa-miR-296-3p, hsa-miR-101-3p ve hsa-miR-885-5p miRNA'ları ifadelerindeki artışın kemodirenç ve kısmi EMT biyoişaretleri olarak kullanılma potansiyellerinin bulunması.

4.1. Kısmi ve Tam EMT Süreçleri

Bu doktora tezinde HepG2'lerde aşırı Slug ifadesinin tam EMT'yi, buna karşın Huh7'lerde aşırı Slug ifadesinin ise kısmi EMT'yi başlattığına dair kanıtlar sunuldu. Tam EMT fenotipi gösteren ve aşırı Slug ifade eden HepG2 hücrelerinde, bir mezenkimal markır olan ZEB2 mRNA'sının artması ile bir epitel markır olan E-cadherin proteininin azalması, EMT'nin tipik özelliği ile eşleşir bir hal ortaya koydu. Bu bulgular önceki raporla benzerlik gösteriyordu (Sun ve ark. 2014). Buna karşın kısmi EMT fenotipi gösteren ve aşırı Slug ifade eden Huh7 hücrelerinde, mezenkimal markırlar olan vimentin proteini ve ZEB2 mRNA'sının azalması ile bir epitel markır olan E-cadherin proteininin artması, tam EMT programı ile çelişkili bir durum oluşturuyordu. Bu durumu açıklamak için literatür araştırması yapıldığında birkaç makalede; kısmi EMT fenotipinde olan hücrelerde aynı zamanda E-cadherin ifadesinin de arttığının ileri sürüldüğü gözlendi. Bu makalelerden birinde, köpekten alınmış normal böbrek epitel hücrelerine (MDCK hücreleri) HGF uygulamasının kısmi EMT programı ile birlikte E-cadherin ifadesini arttırdığı gösteriliyordu aynı makalede Slug'ın kısmi EMT sırasında hücre hareketinden ziyade hücre yaşamı için önemli bir transkripsiyon faktörü olduğu ileri sürülüyordu

(Leroy ve ark. 2007). Ayrıca, bazı ilerlemiş karsinomlarda iyi farklılaşmış epitel hücre özellikleriyle birlikte mezenkimal özelliklerin de bulunduğu bir derleme ile ileri sürülmüştür (Christiansen ve ark. 2006). Dahası, kanser hücrelerinin EMT programına hiç ihtiyaç duymadan ancak MEK ve MAPK yolaklarını sürekli faaliyette tutmak suretiyle daha invasif ve metastatik bir fenotip geliştirebilecekleri gösterilmiştir (Pinkas ve ark. 2002).

E-cadherin ifadesinin azalmasının Snail ailesi proteinlerce başlatıldığı fakat ZEB proteinleri tarafından tamamlandığı bilinmektedir (Garcia de Herreros ve ark. 2012). Hatta EMT sırasında pek çok gen ifadesinde baskılamanın, EMT'yi tetikleyen sinyalden bağımsız olarak ZEB ailesi proteinleri tarafından sağlandığı da ileri sürülmektedir (Taube ve ark. 2010). Bu çalışmada HepG2 ve Huh7 hücrelerinin aşırı Slug ifadesi karşısında verdikleri cevapların farklı olmasını sağlayan en temel faktörün ZEB2 ifadesindeki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Huh7 hücrelerinde Slug aracılı olarak gelişen ZEB2 azalması kısmi EMT ile sonuçlanmış olabilir, ki bu durum EMT'nin tamamlanmasında ZEB'nin vazgeçilemez bir öneme sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu fikri destekleyen güncel bir çalışmada FOXO1 transkripsiyon faktörünün, HSK'de EMT transkripsiyon faktörleri ifadelerini düzenleyerek EMT'yi geri çevirdiği gösterilmiştir. Hatta bu çalışmada Huh7 hücrelerinde FOXO1 aşırı ifadesinin ZEB2 ifadesini azalttığı, Slug ifadesini ise değiştirmediği gösterilmiştir (Dong ve ark. 2017). Dahası ZEB1 ve ZEB2 proteinleri HSK'de, MYC-ilişkili çinko parmağı proteini (MAZ) ile düzenlenir. MAZ susturulmasının hücre çoğalmasını, invasyonunu ve göçünü inhibe ettiği gösterilmiştir (Luo ve ark. 2016). Bu durum ZEB2'nin EMT'nin tamamlanmasını sağlayan bir rol üstlendiği fikrini desteklemektedir. Son olarak literatürde HepG2 hücrelerinde aşırı ZEB2 ifadesinin hücre göçünü ve invasifliğini arttırdığı gösterilmiştir (Yang ve ark. 2015).

4.2. Slug Aracılı Gelişen Kemodirenç

Kemoterapi hala pek çok kanser türü için temel tedavi unsuru olarak kullanılmaktadır. Ne yazık ki, tümör hücreleri sıklıkla kemoterapiye karşı direnç kazanmaktadır. Kemoterapi karmaşık ve dinamik bir prosedür olduğu için anti-apoptoz yolakları, ABC transporter ifadeleri ve DNA tamir sistemleri gibi çok sayıda mekanizma ile düzenlenir (Yang ve ark. 2015). Prostat (Martin ve ark. 2015) ve pankreas (Zheng ve

ark. 2015) kanserinde kemodirencin EMT ile ilişkili olduğunu ileri süren yayınlar ortaya çıkmaya başlamıştır. Fakat HSK'de kısmi EMT ile kemodirenç arasındaki ilişki neredeyse hiç çalışılmamıştır. HSK'de özellikle kısmi EMT'nin kemodirençle ilişkili olduğu ilk kez bu doktora tezinde ileri sürülmektedir. Kemodirenci belirlemek için kısmi ve tam EMT'de cisplatin IC_{50} değerleri karşılaştırılmış, doxorubicin kümelenmesi ve ABC transporter ifadeleri seviyesi araştırılmıştır.

Aşırı Slug ifadesinin cisplatin direncine, hücre içi doxorubicin kümelenmesinin azalmasına yol açtığı bulunmuştur. Hem kısmi hemde tam EMT'de Doxorubicin kümelenmesinin azlığının, ABCG2 transporter ifadesinde artış sayesinde olduğu düşünülmektedir. Bu bulgular öncekilerle uyum içindedir (Wu ve ark. 2016, Zhang ve ark. 2016). Fakat diğer taraftan hem kısmi hemde tam EMT'de ABCB1 ifadesinde meydana gelen azalma Slug'ın HSK'de kemodirenci ABCB1 ve ABCG2 transporterları ifadelerini birlikte düzenleyediği fikrini düşündürmektedir. Aşırı Slug ifadesinin farklı kanser tiplerinde kemodirenci düzenlediğine dair birkaç yayın bulunmaktadır (Chang ve ark. 2011, Haslehurst ve ark. 2012, Uygur ve ark. 2015). Buna karşın HSK hücrelerinde (MHSKLM3 and SMMC-7721) Slug inhibisyonunun ABCB1 ve ABCG2 artması ile kemodirence yol açtığını gösteren yayın da bulunmaktadır (Zhao ve ark. 2016). Tüm bu yayınlar birlikte ele alındığında, HSK'de EMT aracılığıyla gelişen heterojenlik ortaya çıkmaktadır. Aynı tümör organından kökenlenen iki farklı kanser hücreleri aynı etkiye farklı cevap oluşturabilmektedir. Bu durumda HSK'de ilaç direncinin veya duyarlılığının Slug ifadesindeki değişimine bağlı olduğunu ileri sürmek mümkün olmakla birlikte, bu direncin veya duyarlılığın ortaya çıkması tamamen hücresel içeriğe bağlı olan bir durumdur. Bu sebeple, Slug-hedefli bir terapi uygulamadan önce her tümör özelinde iyi belirlenmiş bir kemodirenç profili oluşturmak bir zorunluluk olarak karşımıza çıkmaktadır.

4.3. Slug Aracılı Gelişen Kök Hücre Fenotipi

CD133, HSK hücrelerinden kök hücre benzeri hücre izolasyonu için kullanılan primer markırdır. CD133 pozitif olan kanser hücrelerinin negatif olanlarına göre daha yüksek çoğalma kapasitesinde oldukları ileri sürülmektedir (Suetsugi ve ark. 2006). CD133 pozitif hücreler ayrıca soft agar üzerinde etkin bir koloni oluşturma ve daha yüksek oranda *in vivo* tümör oluşturma potansiyeline de sahiptir (Ma ve ark. 2007).

CD133 pozitif kanser hastalarının hastalığın tekrar nüksü için daha büyük risk taşıdıkları da gösterilmiştir (Song ve ark. 2008). Karaciğerde inflamasyonlu bölge sebebiyle normal karaciğer kök hücrelerinin, EMT pozitif metastatik kanser kök hücrelerine transformasyonu henüz yeni raporlanmıştır (Mitra ve ark. 2017). Fakat HSK'de tam ve kısmi EMT'de CD133 ifadesinin farklılaşıp farklılaşmadığı hakkında henüz bir yayın bulunmamaktadır. Bu çalışmada ilk kez kısmi EMT'de CD133 ifadesinin arttığı bu sebeple kısmi EMT'nin de kanser kök hücresi gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir.

4.4. Kemodirenç ve Kısmi EMT Karakterizasyonu için Kullanılabilecek Protein Yapılı Ekzozomal Biyoişaretler

Bu çalışmada potansiyel kemodirenç ve kısmi EMT ekstrasellular markırlarını belirlemek için aşırı Slug ifade eden HSK hücrelerinden ekzozom izolasyonu gerçekleştirilmiş ve farklılaşan bantlar MALDI-TOF/TOF ile tanımlanmıştır. Sonunda post translasyonel olarak modifiye edilmiş fibronektin1 (FN1) ve kollajen tip II α 1 ile doğal formunda bulunan fibrinojen gama zincirinin kısmi EMT'de arttığı ilk kez gösterildiğinden bu proteinlerin kısmi EMT için biyoişaret olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Aşırı Slug ifadesini kalıcı ve geçici olarak gerçekleştiren HepG2 ve Huh7 hücrelerinde, FN1 mRNA'sının azaldığı buna karşın toplam FN1 (modifiye edilmiş ve edilmemiş) protein seviyesinin her iki hücre grubunda da anlamlı bir şekilde arttığı bulunmuştur. Bu durum FN1 proteininin hem kısmi hem tam EMT'de biyoişaret olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada ilk kez HCC'de kemodirencin kısmi EMT ile ilişkili olduğu da gösterildiğinden, FN1'in HCC'de EMT durumundan bağımsız bir şekilde kemodirenç biyoişareti olarak kullanılma potansiyelinin olduğunu ortaya koymaktadır. Fibronektin'in primer rolü hücre matriks tutunmasını sağlamaktır bundan başka yara iyileşmesinde, fagositozda etkili olduğu bilinmektedir (Ruoslahti 1988). C-terminalinde bisülfit köprüsüyle bir dimer oluşturur. Bu dimerin herbir zinciri yaklaşık 2350 aminoasit uzunluğunda olan ve integrinler, sulfatlanmış proteoglikanlar, fibrin ve denature kollajen formları ile DNA'nın bağlanabileceği altı domenden oluşur (Hynes 1985). İnsan FN'lerinde yedi potansiyel N-glikolizasyon bölgesi bulunur ki bu bölgeler FN molekülünün büyük karbonhidratlarını taşır (Tajiri ve ark. 2005). Bu glikan bölgelerinin onkolojik değişimleri ve FN'nin aşırı ifadesiyle oluşan hücre çoğalmasının

artması, hücre göçünün artması, kanser hücrelerinin invasyonu raporlanmıştır (Kanaji ve ark. 2017, Sundquist ve ark. 2017, Wang ve ark. 2017, Xia ve ark. 2017). Kısmi EMT fenotipinde olan hücrelerde yara iyileşmesiyle gözlenen agresifliğin en önemli sebeplerinden biri FN1 ifadesindeki artış olabilir çünkü FN1'in oligosakkarit kısmı jelatine karşı çok ilgili olup, fibroblast adezyonu ve yayılmasına yardımcı olduğu bilinmektedir (Jones ve ark. 1986, Tajiri ve ark. 2005). Ayrıca FN1 molekülüne post translasyonel olarak eklenen oligosakkaritlerin molekül yıkımını önleyici etkisi (Tajiri ve ark. 2005) sebebiyle toplam FN1 proteini miktarının artmış, bu sayede FN1 mRNA'sında yarıya düşüşten etkilenme asgari düzeyde tutulmuş olabilir.

Kollajenler ekstrasellülar matriksin önemli bir yapısal bileşenidir. Tip 2 kollajen diğer bir ismiyle kartilaj kollajeni kondrositlerce sentezlenir. COL2A1'de onkolojik değişimler bilinmektedir (Muller ve ark. 2005, Yoshida ve ark. 2013, Clarke ve ark. 2016). Bu doktora tezinde kısmi EMT'de toplam ve post translasyonel olarak modifiye COL2A1 proteini ve mRNA'sının dramatik bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Tam EMT'de de protein miktarında bir miktar artış bulunmakla birlikte mRNA ifadesi durağan kalmıştır. Bu durum HCC'de COL2A1 protein ve mRNA'sının aşırı artışlarının kısmi EMT için bir biyoişaret olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde translasyonu başlatıcı metiyonin tRNA'sının stromal fibroblastlardan tip II kollajeni artırarak tümör büyümesi ve anjiyogenisitesini artırdığı gösterilmiştir (Clarke ve ark. 2016). Ayrıca tip II kollajen mezenkimal kondrosarkoma için bir işaret olarak tanımlanmıştır (Muller ve ark. 2005). Dahası COL2A1'in ovaryum kanserinde tümörün nüksetmesini ön görmek amaçlı kullanılabilecek bir molekül olduğu ispatlanmıştır (Ganapathi ve ark. 2016).

Bir plazma glikoproteini olarak karaciğerden sentezlenen fibrinojenin temel görevi platelletlerin adezyonu ve kümelenmesini sağlamaktır. Fibrinojen yapısal olarak α, beta ve gama olmak üzere üç farklı alt birimi vardır. Bu doktora tezinde ilk kez FGG mRNA'sının kısmi EMT'de arttığı tam EMT'de ise durağan kaldığı gösterilmiştir. Literatürde bu önerinin doğru olabileceğini destekleyen bir araştırmada HSK hastalarında FGG ve fibrinojenin aşırı ifade edildiğinin gösterilmiş olmasıdır (Zhu ve ark. 2009).

4.5. Kemodirenç ve Kısmi EMT Karakterizasyonu için Kullanılabilecek miRNA Yapılı Ekzozomal Biyoişaretler

Aşırı Slug ifade eden Huh7 hücrelerinden ekzozomal miRNA profillemesi sonucu üç farklı miRNA'nın (hsa-miR-296-3p, hsa-miR-101-3p ve hsa-miR-885-5p) ifadelerindeki artış, bu miRNA'ların kısmi EMT ve kemodirenç için bir biyoişaret olarak kullanılabileceği ilk kez bulunmuştur.

Bunlardan, miR-296-3p'nin insan glioblastomalarında (Bai ve ark. 2013), akciğer kanseri hücrelerinde (Luo ve ark. 2016), kemodirenci düzenlediği gösterilmiştir. miR-101-3p'nin ise nazofarangiyal (üst yutak) karsinomda radyodirenci düzenlediği gösterilmiştir (Wang ve ark. 2017). miR-885-5p'nin ise gemcitabine karşı dirençli akciğer kanseri hücrelerinde arttığı gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2013).

5. SONUÇ

İki farklı HSK hücre hattı olan HepG2 ve Huh7 hücre hatlarında aşırı Slug ifadesinin sağlanması sırasıyla tam ve kısmi EMT programları gelişimiyle sonuçlanmıştır. Dahası, aşırı Slug ifadesi her iki EMT fenotipinde de benzer şekilde gözlenen kemodirenç ve kök hücre fenotipi gelişimine yol açmıştır. Bunlara ilave olarak translasyon sonrası değiştirilmiş FN1 ve COL2A1 ile doğal formda bulunan FGG proteinleri ve hsa-miR-296-3p, hsa-miR-101-3p ve hsa-miR-885-5p miRNA'ları ifadelerinin kısmi EMT'de arttığı tespit edilmiştir.

Bu tezde kısmi EMT ve kemodirenç biyoişaretleri olarak öne sürülen protein ve miRNA'ların hastalarda kullanılabilir özellikte olduğunun ispatlanması için, kemodirenç ortaya çıkmış hasta serumlarında bu protein ve miRNA miktarlarının tayin edileceği bir çalışma, gelecekte araştırmaya değer güzel bir konu olarak ortaya çıkmıştır. Umarım böyle bir çalışma gerçekleştirilir ve sonucunda, klinikçiler belirtilen protein ve miRNAları kullanılarak tedaviyi takip etme imkanına kavuşur. Böylece HSK kemoterapisinde kemodirenç oluşması ve hastalığın nüksetmesi gibi olumsuzlukların ortaya çıkma riski azaltılır.

KAYNAKÇA

Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H. L., Brannigan, B. W., Kapur, R., Stott, S. L., Shioda, T., Ramaswamy, S., Ting, D. T., Lin, C. P., Toner, M., Haber, D. A. ve Maheswaran, S. (2014). "Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis." *Cell*, 158(5), 1110-1122.

Akpinar, G., Kasap, M., Canturk, N. Z., Zulfigarova, M., Islek, E. E., Guler, S. A., Simsek, T. ve Canturk, Z. (2017). "Proteomics Analysis of Tissue Samples Reveals Changes in Mitochondrial Protein Levels in Parathyroid Hyperplasia over Adenoma." *Cancer Genomics Proteomics*, 14(3), 197-211.

Alacacioglu, A., Somali, I., Simsek, I., Astarcioglu, I., Ozkan, M., Camci, C., Alkis, N., Karaoglu, A., Tarhan, O., Unek, T. ve Yilmaz, U. (2008). "Epidemiology and survival of hepatocellular carcinoma in Turkey: outcome of multicenter study." *Jpn J Clin Oncol*, 38(10), 683-688.

Aung, T., Chapuy, B., Vogel, D., Wenzel, D., Oppermann, M., Lahmann, M., Weinhage, T., Menck, K., Hupfeld, T., Koch, R., Trumper, L. ve Wulf, G. G. (2011). "Exosomal evasion of humoral immunotherapy in aggressive B-cell lymphoma modulated by ATP-binding cassette transporter A3." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(37), 15336-15341.

Averhoff, F. M., Glass, N. ve Holtzman, D. (2012). "Global Burden of Hepatitis C: Considerations for Healthcare Providers in the United States." *Clinical Infectious Diseases*, 55, S10-S15.

Avila, M. A., Berasain, C., Sangro, B. ve Prieto, J. (2006). "New therapies for hepatocellular carcinoma." *Oncogene*, 25(27), 3866-3884.

Bacq, Y., Jacquemin, E., Balabaud, C., Jeannot, E., Scotto, B., Branchereau, S., Laurent, C., Bourlier, P., Pariente, D., de Muret, A., Fabre, M., Bioulac-Sage, P. ve Zucman-Rossi, J. (2003). "Familial liver adenomatosis associated with hepatocyte nuclear factor 1alpha inactivation." *Gastroenterology*, 125(5), 1470-1475.

Bai, Y., Liao, H., Liu, T., Zeng, X., Xiao, F., Luo, L., Guo, H. ve Guo, L. (2013). "MiR-296-3p regulates cell growth and multi-drug resistance of human glioblastoma by targeting ether-a-go-go (EAG1)." *Eur J Cancer*, 49(3), 710-724.

Balcells, I., Cirera, S. ve Busk, P. K. (2011). "Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers." *Bmc Biotechnology*, 11.

Battke, C., Ruiss, R., Welsch, U., Wimberger, P., Lang, S., Jochum, S. ve Zeidler, R. (2011). "Tumour exosomes inhibit binding of tumour-reactive antibodies to tumour cells and reduce ADCC." *Cancer Immunology Immunotherapy*, 60(5), 639-648.

Beale, G., Chattopadhyay, D., Gray, J., Stewart, S., Hudson, M., Day, C., Trerotoli, P., Giannelli, G., Manas, D. ve Reeves, H. (2008). "AFP, PIVKAII, GP3, SCCA-1 and follisatin as surveillance biomarkers for hepatocellular cancer in non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease." *Bmc Cancer*, 8.

Bertheau, P., Espie, M., Turpin, E., Lehmann, J., Plassa, L. F., Varna, M., Janin, A. ve de The, H. (2008). "TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer." *Pathobiology*, 75(2), 132-139.

Biname, F., Lassus, P. ve Hibner, U. (2008). "Transforming growth factor beta controls the directional migration of hepatocyte cohorts by modulating their adhesion to fibronectin." *Molecular Biology of the Cell*, 19(3), 945-956.

Bluteau, O., Jeannot, E., Bioulac-Sage, P., Marques, J. M., Blanc, J. F., Bui, H., Beaudoin, J. C., Franco, D., Balabaud, C., Laurent-Puig, P. ve Zucman-Rossi, J. (2002). "Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas." *Nat Genet*, 32(2), 312-315.

Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M. A., Fraga, M. F., Esteller, M. ve Cano, A. (2003). "The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors." *Journal of Cell Science*, 116(3), 499-511.

Braicu, C., Tomuleasa, C., Monroig, P., Cucuianu, A., Berindan-Neagoe, I. ve Calin, G. A. (2015). "Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology?" *Cell Death and Differentiation*, 22(1), 34-45.

Can, A., Dogan, E., Bayoglu, I. V., Tatli, A. M., Besiroglu, M., Kocer, M., Dulger, A. C., Uyeturk, U., Kivrak, D., Orakci, Z., Bal, O., Kacan, T., Olmez, S., Turan, N., Ozbay, M. F. ve Alacacioglu, A. (2014). "Multicenter epidemiologic study on hepatocellular carcinoma in Turkey." *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(6), 2923-2927.

Carr, B. I., Nagalla, S. ve Geva, R. (2016). Medical Therapy of HCC. In. *Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Treatment*. B. I. Carr. Cham, Springer International Publishing**:** 489-512.

Ceccaroni, M., Chieco, P., Alboni, C., De Laco, P., Pagano, K., Ceccarelli, C., Santini, D., Taroni, B. ve Pelusi, G. (2004). "p53 expression, DNA ploidy and mitotic index as prognostic factors in patients with epithelial ovarian carcinoma." *Tumori*, 90(6), 600-606.

Cengiz, C., Akarca, U. S., Goker, E. ve Yuce, G. (2003). "Detection of mutant p53 in hepatocellular cancer from Turkey and its correlation with clinicopathologic parameters." *Dig Dis Sci*, 48(5), 865-869.

Chaffer, C. L. ve Weinberg, R. A. (2011). "A perspective on cancer cell metastasis." *Science*, 331(6024), 1559-1564.

Chang, T. H., Tsai, M. F., Su, K. Y., Wu, S. G., Huang, C. P., Yu, S. L., Yu, Y. L., Lan, C. C., Yang, C. H., Lin, S. B., Wu, C. P., Shih, J. Y. ve Yang, P. C. (2011). "Slug Confers Resistance to the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(8), 1071-1079.

Chen, I. H., Nakano, T., Goto, S., Lin, C. C., Chiu, K. W., Wang, C. C., Cheng, Y. F. ve Chen, C. L. (2016). "Circulating Exosomes Key Factors for HCC Recurrence after Liver Transplantation." *Transplantation*, 100, S213-S213.

Chen, J., Liu, J., Jin, R., Shen, J., Liang, Y., Ma, R., Lin, H., Liang, X., Yu, H. ve Cai, X. (2014). "Cytoplasmic and/or nuclear expression of beta-catenin correlate with poor prognosis and unfavorable clinicopathological factors in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis." *PLoS One*, 9(11), e111885.

Cheng, C. C., Chao, W. T., Liao, C. C., Tseng, Y. H., Lai, Y. C., Lai, Y. S., Hsu, Y. H. ve Liu, Y. H. (2018). "Plectin deficiency in liver cancer cells promotes cell migration and sensitivity to sorafenib treatment." *Cell Adh Migr*, 12(1), 19-27.

Cheng, Y. S., Wang, X. Y., Wang, G., Li, Y., Chen, Y. L., Chuai, M. L., Lee, K. K., Ding, X. Y. ve Yang, X. S. (2015). "Effects of Antitumor Drug Sorafenib on Chick Embryo Development." *Anat Rec (Hoboken)*, 298(7), 1271-1281.

Chowdhury, R., Webber, J. P., Gurney, M., Mason, M. D., Tabi, Z. ve Clayton, A. (2015). "Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts." *Oncotarget*, 6(2), 715-731.

Christiansen, J. J. ve Rajasekaran, A. K. (2006). "Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis." *Cancer Res*, 66(17), 8319-8326.

Clark, A. G. ve Vignjevic, D. M. (2015). "Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment." *Current Opinion in Cell Biology*, 36, 13-22.

Clarke, C. J., Berg, T. J., Birch, J., Ennis, D., Mitchell, L., Cloix, C., Campbell, A., Sumpton, D., Nixon, C., Campbell, K., Bridgeman, V. L., Vermeulen, P. B., Foo, S., Kostaras, E., Jones, J. L., Haywood, L., Pulleine, E., Yin, H., Strathdee, D., Sansom, O., Blyth, K., McNeish, I., Zanivan, S., Reynolds, A. R. ve Norman, J. C. (2016). "The Initiator Methionine tRNA Drives Secretion of Type II Collagen from Stromal Fibroblasts to Promote Tumor Growth and Angiogenesis." *Curr Biol*, 26(6), 755-765.

Coleman, W. B. (2003). "Mechanisms of human hepatocarcinogenesis." *Current Molecular Medicine*, 3(6), 573-588.

Corcoran, C., Rani, S., O'Brien, K., O'Neill, A., Prencipe, M., Sheikh, R., Webb, G., McDermott, R., Watson, W., Crown, J. ve O'Driscoll, L. (2012). "Docetaxel-Resistance in Prostate Cancer: Evaluating Associated Phenotypic Changes and Potential for Resistance Transfer via Exosomes." *Plos One*, 7(12).

Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M. T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T. M., Garcia-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T. L., Labori, K. J., Lothe, I. M., Kure, E. H., Hernandez, J., Doussot, A., Ebbesen, S. H., Grandgenett, P. M., Hollingsworth, M. A., Jain, M., Mallya, K., Batra, S. K., Jarnagin, W. R., Schwartz, R. E., Matei, I., Peinado, H., Stanger, B. Z., Bromberg, J. ve Lyden, D. (2015). "Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver." *Nat Cell Biol*, 17(6), 816-826.

Danielson, K. M. ve Das, S. (2014). "Extracellular Vesicles in Heart Disease: Excitement for the Future ?" *Exosomes Microvesicles*, 2(1).

de Guevara, L. L. (2012). "First interim analysis of the GIDEON (Global Investigation of therapeutic DEcisions in hepatocellular carcinoma and Of its treatment with sorafeNib) non-interventional study (vol 66, pg 675, 2012)." *International Journal of Clinical Practice*, 66(9), 912-912.

Delire, B. ve Starkel, P. (2015). "The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications." *Eur J Clin Invest*, 45(6), 609-623.

Di Tommaso, L. ve Roncalli, M. (2017). "Tissue Biomarkers in Hepatocellular Tumors: Which, When, and How." *Front Med (Lausanne)*, 4, 10.

Dogan, E., Yalcin, S., Koca, D. ve Olmez, A. (2012). "Clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma in Turkey." *Asian Pac J Cancer Prev*, 13(6), 2985-2990.

Dong, T. X., Zhang, Y., Chen, Y. D., Liu, P. F., An, T. T., Zhang, J. W., Yang, H. C., Zhu, W. J. ve Yang, X. H. (2017). "FOXO1 inhibits the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by reversing ZEB2-induced epithelial-mesenchymal transition." *Oncotarget*, 8(1), 1703-1713.

El Rayes, T., Catena, R., Lee, S., Stawowczyk, M., Joshi, N., Fischbach, C., Powell, C. A., Dannenberg, A. J., Altorki, N. K., Gao, D. C. ve Mittal, V. (2015). "Lung inflammation promotes metastasis through neutrophil protease-mediated

degradation of Tsp-1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(52), 16000-16005.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. ve Bray, F. (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." *Int J Cancer*, 136(5), E359-386.

Forner, A., Llovet, J. M. ve Bruix, J. (2012). "Hepatocellular carcinoma." *Lancet*, 379(9822), 1245-1255.

Forner, A., Reig, M. ve Bruix, J. (2009). "Alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma diagnosis: the demise of a brilliant star." *Gastroenterology*, 137(1), 26-29.

Friedl, P. ve Wolf, K. (2003). "Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms." *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 362-374.

Fuzery, A. K., Levin, J., Chan, M. M. ve Chan, D. W. (2013). "Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges." *Clinical Proteomics*, 10.

Ganapathi, M. K., Jones, W. D., Sehouli, J., Michener, C. M., Braicu, I. E., Norris, E. J., Biscotti, C. V., Vaziri, S. A. ve Ganapathi, R. N. (2016). "Expression profile of COL2A1 and the pseudogene SLC6A10P predicts tumor recurrence in high-grade serous ovarian cancer." *Int J Cancer*, 138(3), 679-688.

Gao, P., Li, M., Tian, Q. B. ve Liu, D. W. (2012). "Diagnostic performance of des-gamma-carboxy prothrombin (DCP) for hepatocellular carcinoma: a bivariate meta-analysis." *Neoplasma*, 59(2), 150-159.

Garcia de Herreros, A. ve Baulida, J. (2012). "Cooperation, amplification, and feed-back in epithelial-mesenchymal transition." *Biochim Biophys Acta*, 1825(2), 223-228.

Gedaly, R., Galuppo, R., Daily, M. F., Shah, M., Maynard, E., Chen, C., Zhang, X., Esser, K. A., Cohen, D. A., Evers, B. M., Jiang, J. ve Spear, B. T. (2014). "Targeting the Wnt/beta-catenin signaling pathway in liver cancer stem cells and hepatocellular carcinoma cell lines with FH535." *PLoS One*, 9(6), e99272.

Gerhards, N. M. ve Rottenberg, S. (2018). "New tools for old drugs: Functional genetic screens to optimize current chemotherapy." *Drug Resistance Updates*, 36, 30-46.

Giakoustidis, A., Giakoustidis, D., Mudan, S., Sklavos, A. ve Williams, R. (2015). "Molecular signalling in hepatocellular carcinoma: Role of and crosstalk among WNT/ss-catenin, Sonic Hedgehog, Notch and Dickkopf-1." *Can J Gastroenterol Hepatol*, 29(4), 209-217.

Graham, F. L. ve van der Eb, A. J. (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." *Virology*, 52(2), 456-467.

Grange, C., Tapparo, M., Collino, F., Vitillo, L., Damasco, C., Deregibus, M. C., Tetta, C., Bussolati, B. ve Camussi, G. (2011). "Microvesicles Released from Human Renal Cancer Stem Cells Stimulate Angiogenesis and Formation of Lung Premetastatic Niche." *Cancer Research*, 71(15), 5346-5356.

Haeger, A., Wolf, K., Zegers, M. M. ve Friedl, P. (2015). "Collective cell migration: guidance principles and hierarchies." *Trends in Cell Biology*, 25(9), 556-566.

Hall, J. E. (2015). Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology E-Book, Elsevier Health Sciences.

Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell*, 144(5), 646-674.

Haslehurst, A. M., Koti, M., Dharsee, M., Nuin, P., Evans, K., Geraci, J., Childs, T., Chen, J., Li, J. R., Weberpals, J., Davey, S., Squire, J., Park, P. C. ve Feilotter, H. (2012). "EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer." *Bmc Cancer*, 12.

Häussinger, D. (2014). Overview. In. *Metabolism of Human Diseases: Organ Physiology and Pathophysiology*. E. Lammert ve M. Zeeb. Vienna, Springer Vienna**:** 173-179.

Hernandez-Gea, V., Toffanin, S., Friedman, S. L. ve Llovet, J. M. (2013). "Role of the Microenvironment in the Pathogenesis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma." *Gastroenterology*, 144(3), 512-527.

Hombach-Klonisch, S., Mehrpour, M., Shojaei, S., Harlos, C., Pitz, M., Hamai, A., Siemianowicz, K., Likus, W., Wiechec, E., Toyota, B. D., Hoshyar, R., Seyfoori, A., Sepehri, Z., Ande, S. R., Khadem, F., Akbari, M., Gorman, A. M., Samali, A., Klonisch, T. ve Ghavami, S. (2018). "Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response." *Pharmacology & Therapeutics*, 184, 13-41.

Hopker, K. ve Reinhardt, H. C. (2013). "[p53-regulating pathways as targets for personalized cancer therapy]." *Dtsch Med Wochenschr*, 138(3), 82-86.

Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplop, N., Uryu, K., Pharmer, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., Zhang, T., Zhang, H., Hernandez, J., Weiss, J. M., Dumont-Cole, V. D., Kramer, K., Wexler, L. H., Narendran, A., Schwartz, G. K., Healey, J. H., Sandstrom, P., Labori, K. J., Kure, E. H., Grandgenett, P. M., Hollingsworth, M. A., de Sousa, M., Kaur, S., Jain, M., Mallya, K., Batra, S. K., Jarnagin, W. R., Brady, M. S., Fodstad, O., Muller, V., Pantel, K., Minn, A. J., Bissell, M. J., Garcia, B. A., Kang, Y., Rajasekhar, V. K., Ghajar, C. M., Matei, I., Peinado, H., Bromberg, J. ve Lyden, D. (2015). "Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis." *Nature*, 527(7578), 329-335.

Hou, J. M., Krebs, M. G., Lancashire, L., Sloane, R., Backen, A., Swain, R. K., Priest, L. J. C., Greystoke, A., Zhou, C., Morris, K., Ward, T., Blackhall, F. H. ve Dive, C. (2012). "Clinical Significance and Molecular Characteristics of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Patients With Small-Cell Lung Cancer." *Journal of Clinical Oncology*, 30(5), 525-532.

Hsu, C. H., Kang, Y. K., Yang, T. S., Shun, C. T., Shao, Y. Y., Su, W. C., Sandoval-Tan, J., Chiou, T. J., Jin, K., Hsu, C. ve Cheng, A. L. (2013). "Bevacizumab with Erlotinib as First-line Therapy in Asian Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Multicenter Phase II Study." *Oncology*, 85(1), 44-52.

Huber, V., Fais, S., Iero, M., Lugini, L., Canese, P., Squarcina, P., Zaccheddu, A., Colone, M., Arancia, G., Gentile, M., Seregni, E., Valenti, R., Ballabio, G., Belli, F., Leo,

E., Parmiani, G. ve Rivoltini, L. (2005). "Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape." *Gastroenterology*, 128(7), 1796-1804.

Hynes, R. (1985). "Molecular-Biology of Fibronectin." *Annual Review of Cell Biology*, 1, 67-90.

Iwano, H., Ujita, W., Nishikawa, M., Ishii, S., Inoue, H. ve Yokota, H. (2014). "Effect of dietary eugenol on xenobiotic metabolism and mediation of UDP-glucuronosyltransferase and cytochrome P450 1A1 expression in rat liver." *Int J Food Sci Nutr*, 65(2), 241-244.

Jia, Y., Chen, Y., Wang, Q., Jayasinghe, U., Luo, X., Wei, Q., Wang, J., Xiong, H., Chen, C., Xu, B., Hu, W., Wang, L., Zhao, W. ve Zhou, J. (2017). "Exosome: emerging biomarker in breast cancer." *Oncotarget*, 8(25), 41717-41733.

Jia, Y., Wang, Y. ve Xie, J. (2015). "The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation." *Arch Toxicol*, 89(2), 179-191.

Johnson, P. ve Berhane, S. (2016). Protein Biomarkers in the Management of Hepatocellular Carcinoma: Novel Combinatory Approaches. In. *Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Treatment*. B. I. Carr. Cham, Springer International Publishing**:** 331-338.

Jones, G. E., Arumugham, R. G. ve Tanzer, M. L. (1986). "Fibronectin glycosylation modulates fibroblast adhesion and spreading." *J Cell Biol*, 103(5), 1663-1670.

Jordan, N. V., Johnson, G. L. ve Abell, A. N. (2011). "Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer." *Cell Cycle*, 10(17), 2865-2873.

Joyce, J. A. ve Pollard, J. W. (2009). "Microenvironmental regulation of metastasis." *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 239-252.

Kajita, M., McClinic, K. N. ve Wade, P. A. (2004). "Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress." *Mol Cell Biol*, 24(17), 7559-7566.

Kanaji, N., Kita, N., Kadowaki, N. ve Bandoh, S. (2017). "Fibronectin and Hepatocyte Growth Factor Produced by Lung Fibroblasts Augment Migration and Invasion of Malignant Pleural Mesothelioma Cells." *Anticancer Res*, 37(5), 2393-2400.

Kao, S. H., Wu, K. J. ve Lee, W. H. (2016). "Hypoxia, Epithelial-Mesenchymal Transition, and TET-Mediated Epigenetic Changes." *J Clin Med*, 5(2).

Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J. L., Altorki, N., Port, E. R., Ruggero, D., Shmelkov, S. V., Jensen, K. K., Rafii, S. ve Lyden, D. (2005). "VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche." *Nature*, 438(7069), 820-827.

Karnoub, A. E. ve Weinberg, R. A. (2008). "Ras oncogenes: split personalities." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(7), 517-531.

Kerosuo, L. ve Bronner-Fraser, M. (2012). "What is bad in cancer is good in the embryo: importance of EMT in neural crest development." *Semin Cell Dev Biol*, 23(3), 320-332.

Kim, J. W., Wieckowski, E., Taylor, D. D., Reichert, T. E., Watkins, S. ve Whiteside, T. L. (2005). "Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes." *Clin Cancer Res*, 11(3), 1010-1020.

Kim, W., Kim, M. ve Jho, E. H. (2013). "Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus." *Biochemical Journal*, 450, 9-21.

Komiya, Y. ve Habas, R. (2008). "Wnt signal transduction pathways." *Organogenesis*, 4(2), 68-75.

Krakhmal, N. V., Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Vtorushin, S. V. ve Perelmuter, V. M. (2015). "Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms." *Acta Naturae*, 7(2), 17-28.

Kretz, A. L., von Karstedt, S., Hillenbrand, A., Henne-Bruns, D., Knippschild, U., Trauzold, A. ve Lemke, J. (2018). "Should We Keep Walking along the Trail for

Pancreatic Cancer Treatment? Revisiting TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand for Anticancer Therapy." *Cancers*, 10(3).

Kurrey, N. K., Jalgaonkar, S. P., Joglekar, A. V., Ghanate, A. D., Chaskar, P. D., Doiphode, R. Y. ve Bapat, S. A. (2009). "Snail and Slug Mediate Radioresistance and Chemoresistance by Antagonizing p53-Mediated Apoptosis and Acquiring a Stem-Like Phenotype in Ovarian Cancer Cells." *Stem Cells*, 27(9), 2059-2068.

Lai, C. L., Lau, J. Y. N., Wu, P. C., Ngan, H., Chung, H. T., Mitchell, S. J., Corbett, T. J., Chow, A. W. C. ve Lin, H. J. (1993). "Recombinant Interferon-Alpha in Inoperable Hepatocellular-Carcinoma - a Randomized Controlled Trial." *Hepatology*, 17(3), 389-394.

Lai, C. L., Wu, P. C., Lok, A. S. F., Lin, H. J., Ngan, H., Lau, J. Y. N., Chung, H. T., Ng, M. M. T., Yeoh, E. K. ve Arnold, M. (1989). "Recombinant-Alpha-2 Interferon Is Superior to Doxorubin for Inoperable Hepatocellular-Carcinoma - a Prospective Randomized Trial." *British Journal of Cancer*, 60(6), 928-933.

Laurent-Puig, P. ve Zucman-Rossi, J. (2006). "Genetics of hepatocellular tumors." *Oncogene*, 25(27), 3778-3786.

Lazarevich, N. L., Cheremnova, O. A., Varga, E. V., Ovchinnikov, D. A., Kudrjavtseva, E. I., Morozova, O. V., Fleishman, D. I., Engelhardt, N. V. ve Duncan, S. A. (2004). "Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors." *Hepatology*, 39(4), 1038-1047.

Leroy, P. ve Mostov, K. E. (2007). "Slug is required for cell survival during partial epithelial-mesenchymal transition of HGF-induced tubulogenesis." *Mol Biol Cell*, 18(5), 1943-1952.

Li, J. W., Chen, X. L., Dai, M. Y., Huang, S. F., Chen, J. F. ve Dai, S. M. (2017). "Diagnostic accuracy of osteopontin plus alpha-fetoprotein in the hepatocellular carcinoma: A meta-analysis." *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 41(5), 543-553.

Li, M., Rai, A. J., DeCastro, G. J., Zeringer, E., Barta, T., Magdaleno, S., Setterquist, R. ve Vlassov, A. V. (2015). "An optimized procedure for exosome isolation and analysis using serum samples: Application to cancer biomarker discovery." *Methods*, 87, 26-30.

Li, Y. M., Xu, S. C., Li, J., Han, K. Q., Pi, H. F., Zheng, L., Zuo, G. H., Huang, X. B., Li, H. Y., Zhao, H. Z., Yu, Z. P., Zhou, Z. ve Liang, P. (2013). "Epithelial-mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients with different stages of disease." *Cell Death & Disease*, 4.

Liang, D. P., Huang, T. Q., Li, S. J. ve Chen, Z. J. (2014). "Knockdown of S100A4 chemosensitizes human laryngeal carcinoma cells in vitro through inhibition of Slug." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18(22), 3484-3490.

Liu, T., Yao, M., Liu, S., Wang, L., Wang, L., Hou, J., Ma, X., Jia, J., Zhao, J., Zhuang, H. ve Lu, F. (2017). "Serum Golgi protein 73 is not a suitable diagnostic marker for hepatocellular carcinoma." *Oncotarget*, 8(10), 16498-16506.

Liu, W., Shen, S.-M., Zhao, X.-Y. ve Chen, G.-Q. (2012). "Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1." *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(2), 165-178.

Liu, X. F., Hu, Z. D., Liu, X. C., Cao, Y., Ding, C. M. ve Hu, C. J. (2014). "Diagnostic accuracy of serum glypican-3 for hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis." *Clinical Biochemistry*, 47(3), 196-200.

Liu, Y. F., Gu, Y., Han, Y. M., Zhang, Q., Jiang, Z. P., Zhang, X., Huang, B., Xu, X. Q., Zheng, J. M. ve Cao, X. T. (2016). "Tumor Exosomal RNAs Promote Lung Pre-metastatic Niche Formation by Activating Alveolar Epithelial TLR3 to Recruit Neutrophils." *Cancer Cell*, 30(2), 243-256.

Livraghi, T., Lazzaroni, S., Pellicano, S., Ravasi, S., Torzilli, G. ve Vettori, C. (1993). "Percutaneous ethanol injection of hepatic tumors: single-session therapy with general anesthesia." *AJR Am J Roentgenol*, 161(5), 1065-1069.

Llovet, J. M., Fuster, J. ve Bruix, J. (1999). "Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation." *Hepatology*, 30(6), 1434-1440.

Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., de Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J. L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J. F., Borbath, I., Haussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D., Bruix, J. ve Grp, S. I. S. (2008). "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma." *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378-390.

Llovet, J. M., Sala, M., Castells, L., Suarez, Y., Vilana, R., Bianchi, L., Ayuso, C., Vargas, V., Rodes, J. ve Bruix, J. (2000). "Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma." *Hepatology*, 31(1), 54-58.

Luo, D., Wang, Z., Wu, J., Jiang, C. ve Wu, J. (2014). "The role of hypoxia inducible factor-1 in hepatocellular carcinoma." *Biomed Res Int*, 2014, 409272.

Luo, W., Lin, Y., Meng, S., Guo, Y., Zhang, J. ve Zhang, W. (2016). "miRNA-296-3p modulates chemosensitivity of lung cancer cells by targeting CX3CR1." *Am J Transl Res*, 8(4), 1848-1856.

Luo, W., Zhu, X. N., Liu, W., Ren, Y., Bei, C. H., Qin, L. Y., Miao, X. Y., Tang, F., Tang, G. F. ve Tan, S. K. (2016). "MYC associated zinc finger protein promotes the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by inducing epithelial mesenchymal transition." *Oncotarget*, 7(52), 86420-86432.

Lurie, A. (1969). "Effects of low level x-radiation on the mitotic index of hamster basal epithelial cells in vivo." *J Dent Res*, 48(6), 1049-1053.

Ma, S., Chan, K. W., Hu, L., Lee, T. K. W., Wo, J. Y. H., Ng, I. L., Zheng, B. J. ve Guan, X. Y. (2007). "Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells." *Gastroenterology*, 132(7), 2542-2556.

Maier, P., Herskind, C., Zeller, W. J. ve Wenz, F. (2009). "SLUG as new radio protector of normal tissues by the means of lentiviral gene transfer." *Strahlentherapie Und Onkologie*, 185, 48-48.

Mancini, M., Petta, S., Iacobucci, I., Salvestrini, V., Barbieri, E. ve Santucci, M. A. (2010). "Zinc-finger transcription factor slug contributes to the survival advantage of chronic myeloid leukemia cells." *Cell Signal*, 22(8), 1247-1253.

Manne, U., Jadhav, T., Putcha, B. D. K., Samuel, T., Soni, S., Shanmugam, C. ve Suswam, E. A. (2016). "Molecular Biomarkers of Colorectal Cancer and Cancer Disparities: Current Status and Perspective." *Current Colorectal Cancer Reports*, 12(6), 332-344.

Marin, J. J., Briz, O., Rodriguez-Macias, G., Diez-Martin, J. L. ve Macias, R. I. (2016). "Role of drug transport and metabolism in the chemoresistance of acute myeloid leukemia." *Blood Rev*, 30(1), 55-64.

Martin, N. J. P., Cotteret, S., Gaudin, C., Garrido, M., Aarab-Terrisse, S., al Nakouzi, N., Gentilini, L., Compagno, D., Ogryzko, V., Meurice, G., Fizazi, K. ve Chauchereau, A. (2015). "Loss of SHISA3 is an early event of the epithelial-to-mesenchymal transition associated with chemoresistance in prostate cancer." *Cancer Research*, 75.

McGlynn, K. A. ve London, W. T. (2011). "The global epidemiology of hepatocellular carcinoma: present and future." *Clin Liver Dis*, 15(2), 223-243, vii-x.

McMillan, R. ve Matsui, W. (2012). "Molecular Pathways: The Hedgehog Signaling Pathway in Cancer." *Clinical Cancer Research*, 18(18), 4883-4888.

Mikamori, M., Yamada, D., Eguchi, H., Hasegawa, S., Kishimoto, T., Tomimaru, Y., Asaoka, T., Noda, T., Wada, H., Kawamoto, K., Gotoh, K., Takeda, Y., Tanemura, M., Mori, M. ve Doki, Y. (2017). "MicroRNA-155 Controls Exosome Synthesis and Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Scientific Reports*, 7.

Miliaras, D. (1999). "Volume-corrected mitotic index and p53 immunoreactivity in borderline and malignant epithelial ovarian tumors." *Anal Quant Cytol Histol*, 21(5), 425-429.

Miller, M. W., Church, C. C. ve Cox, C. (1988). "Lack of effect of continuous wave ultrasound exposure on in vivo Chinese hamster cheek pouch epithelial mitotic index." *Ultrasonics*, 26(5), 277-279.

Mitra, A., Yan, J., Xia, X., Zhou, S., Chen, J., Mishra, L. ve Li, S. (2017). "IL6-mediated inflammatory loop reprograms normal to epithelial-mesenchymal transition+ metastatic cancer stem cells in preneoplastic liver of transforming growth factor beta-deficient beta2-spectrin+/- mice." *Hepatology*, 65(4), 1222-1236.

Morrot, A., Fonseca, L. M. d., Salustiano, E. J., Gentile, L. B., Conde, L., Filardy, A. A., Franklim, T. N., da Costa, K. M., Freire-de-Lima, C. G. ve Freire-de-Lima, L. (2018). "Metabolic Symbiosis and Immunomodulation: How Tumor Cell-Derived Lactate May Disturb Innate and Adaptive Immune Responses." *Frontiers in Oncology*, 8(81).

Mossad, N. A., Mahmoud, E. H., Osman, E. A., Mahmoud, S. H. ve Shousha, H. I. (2014). "Evaluation of squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complex (SCCA-IGM) and alpha-l-fucosidase (AFU) as novel diagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma." *Tumor Biology*, 35(11), 11559-11564.

Muller, S., Soder, S., Oliveira, A. M., Inwards, C. Y. ve Aigner, T. (2005). "Type II collagen as specific marker for mesenchymal chondrosarcomas compared to other small cell sarcomas of the skeleton." *Mod Pathol*, 18(8), 1088-1094.

Nakaya, Y. (2014). Interaction of Epithelial Cells and Basement Membrane in the Regulation of EMT Exemplified in Chicken Embryo Gastrulation. In. *New Principles in Developmental Processes*. H. Kondoh ve A. Kuroiwa. Tokyo, Springer Japan**:** 111-121.

Nemeth, E., Baird, A. W. ve O'Farrelly, C. (2009). "Microanatomy of the liver immune system." *Seminars in Immunopathology*, 31(3), 333.

Nguyen, D. X., Bos, P. D. ve Massague, J. (2009). "Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization." *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 274-U265.

Ozdemir, F. T., Tiftikci, A., Sancak, S., Eren, F., Tahan, V., Akin, H., Gunduz, F., Kedrah, A. E., Ustundag, Y., Avsar, E., Tozun, N. ve Ozdogan, O. (2010). "The prevalence of the mutation in codon 249 of the P53 gene in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) in Turkey." *J Gastrointest Cancer*, 41(3), 185-189.

Ozer, B., Serin, E., Yilmaz, U., Gumurdulu, Y., Saygili, O. B., Kayaselcuk, F. ve Boyacioglu, S. (2003). "Clinicopathologic features and risk factors for hepatocellular carcinoma: results from a single center in southern Turkey." *Turk J Gastroenterol*, 14(2), 85-90.

Paget, S. (1889). "THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST." *The Lancet*, 133(3421), 571-573.

Paggetti, J., Haderk, F., Seiffert, M., Janji, B., Distler, U., Ammerlaan, W., Kim, Y. J., Adam, J., Lichter, P., Solary, E., Berchem, G. ve Moussay, E. (2015). "Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts." *Blood*, 126(9), 1106-1117.

Pan, Y., Liu, P., Chen, D. ve Dou, L. (2017). "Small interfering RNA (siRNA) against Slug induces apoptosis and sensitizes human anaplastic thyroid carcinoma cells to doxorubicin." *Cancer Biomark*, 18(4), 357-366.

Pardee, A. D. ve Butterfield, L. H. (2012). "Immunotherapy of hepatocellular carcinoma Unique challenges and clinical opportunities." *Oncoimmunology*, 1(1), 48-55.

Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W. D., Savatski, L., Adamson, J. W., Ning, G., Kaestner, K. H., Rossi, J. M., Zaret, K. S. ve Duncan, S. A. (2003). "Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis." *Nat Genet*, 34(3), 292-296.

Pavelka, M. ve Roth, J. (2015). Cell-Cell and Cell-Matrix Contacts and Disorders. In. *Functional Ultrastructure: Atlas of Tissue Biology and Pathology*. Vienna, Springer Vienna**:** 196-221.

Peek, R. ve Reddy, K. R. (2008). "FDA approves sorafenib for patients with inoperable liver cancer." *Gastroenterology*, 134(2), 379-379.

Peinado, H., Kovic, M. A., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C. M., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J. D., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., Brady, M. S., Wolchok, J. D., Chapman, P. B., Kang, Y. B., Bromberg, J. ve Lyden, D. (2016). "Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET (vol 18, pg 883, 2012)." *Nature Medicine*, 22(12), 1502-1502.

Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H. J., Fusenig, N., Nieto, M. A. ve Cano, A. (2004). "Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo." *J Cell Sci*, 117(Pt 13), 2827-2839.

Petraccia, L., Onori, P., Sferra, R., Lucchetta, M. C., Liberati, G., Grassi, M. ve Gaudio, E. (2003). "[MDR (multidrug resistance) in hepatocarcinoma clinical-therapeutic implications]." *Clin Ter*, 154(5), 325-335.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.

Pink, R. C., Samuel, P., Massa, D., Caley, D. P., Brooks, S. A. ve Carter, D. R. F. (2015). "The passenger strand, miR-21-3p, plays a role in mediating cisplatin resistance in ovarian cancer cells." *Gynecologic Oncology*, 137(1), 143-151.

Pinkas, J. ve Leder, P. (2002). "MEK1 signaling mediates transformation and metastasis of EpH4 mammary epithelial cells independent of an epithelial to mesenchymal transition." *Cancer Research*, 62(16), 4781-4790.

Qu, L., Ding, J., Chen, C., Wu, Z. J., Liu, B., Gao, Y., Chen, W., Liu, F., Sun, W., Li, X. F., Wang, X., Wang, Y., Xu, Z. Y., Gao, L., Yang, Q., Xu, B., Li, Y. M., Fang, Z.

Y., Xu, Z. P., Bao, Y., Wu, D. S., Miao, X., Sun, H. Y., Sun, Y. H., Wang, H. Y. ve Wang, L. H. (2016). "Exosome-Transmitted lncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA." *Cancer Cell*, 29(5), 653-668.

Qu, Z., Jiang, C. P., Wu, J. H. ve Ding, Y. T. (2015). "Exosomes as potent regulators of HCC malignancy and potential bio-tools in clinical application." *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(10), 17088-17095.

Qu, Z., Wu, J. H., Wu, J. Y., Luo, D. J., Jiang, C. P. ve Ding, Y. T. (2016). "Exosomes derived from HCC cells induce sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma both in vivo and in vitro." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35.

Repetto, G., del Peso, A. ve Zurita, J. L. (2008). "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity." *Nature Protocols*, 3(7), 1125-1131.

Ruoslahti, E. (1988). "Fibronectin and Its Receptors." *Annual Review of Biochemistry*, 57, 375-413.

Samatov, T. R., Tonevitsky, A. G. ve Schumacher, U. (2013). "Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds." *Mol Cancer*, 12(1), 107.

Sangro, B., Melero, I., Yau, T. C., Hsu, C., Kudo, M., Crocenzi, T. S., Kim, T. Y., Choo, S., Trojan, J., Meyer, T., Kang, Y. K., Anderson, J., Dela Cruz, C. M., Lang, L. X., Neely, J. ve El-Khoueiry, A. B. (2016). "Safety and antitumor activity of nivolumab (nivo) in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (HCC): Interim analysis of dose-expansion cohorts from the phase 1/2 CheckMate-040 study." *Journal of Clinical Oncology*, 34(15).

Santangelo, L., Marchetti, A., Cicchini, C., Conigliaro, A., Conti, B., Mancone, C., Bonzo, J. A., Gonzalez, F. J., Alonzi, T., Amicone, L. ve Tripodi, M. (2011). "The stable repression of mesenchymal program is required for hepatocyte identity: a novel role for hepatocyte nuclear factor 4alpha." *Hepatology*, 53(6), 2063-2074.

Savagner, P., Kusewitt, D. F., Carver, E. A., Magnino, F., Choi, C., Gridley, T. ve Hudson, L. G. (2005). "Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes." *Journal of Cellular Physiology*, 202(3), 858-866.

Schulz, W. A. (2005). Molecular biology of human cancers: an advanced student's textbook. Springer**:** 328-339.

Schweitzer, A., Horn, J., Mikolajczyk, R. T., Krause, G. ve Ott, J. J. (2015). "Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013." *Lancet*, 386(10003), 1546-1555.

Seitz, S. J., Schleithoff, E. S., Koch, A., Schuster, A., Teufel, A., Staib, F., Stremmel, W., Melino, G., Krammer, P. H., Schilling, T. ve Muller, M. (2010). "Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway." *Int J Cancer*, 126(9), 2049-2066.

Shao, Y., Shen, Y., Chen, T., Xu, F., Chen, X. ve Zheng, S. (2016). "The functions and clinical applications of tumor-derived exosomes." *Oncotarget*, 7(37), 60736-60751.

Shiraha, H., Yamamoto, K. ve Namba, M. (2013). "Human hepatocyte carcinogenesis (review)." *Int J Oncol*, 42(4), 1133-1138.

Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Zohar, M., Bais, C., Mesri, E. A. ve Gutkind, J. S. (2000). "The Kaposi's Sarcoma-associated Herpes Virus G Protein-coupled Receptor Up-Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Secretion through Mitogen-activated Protein Kinase and p38 Pathways Acting on Hypoxia-inducible Factor 1α." *Cancer Research*, 60(17), 4873-4880.

Song, W., Li, H., Tao, K., Li, R., Song, Z., Zhao, Q., Zhang, F. ve Dou, K. (2008). "Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma." *Int J Clin Pract*, 62(8), 1212-1218.

Srivastava, S., Zou, Z. Q., Pirollo, K., Blattner, W. ve Chang, E. H. (1990). "Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome." *Nature*, 348(6303), 747-749.

Subramaniam, A., Shanmugam, M. K., Perumal, E., Li, F., Nachiyappan, A., Dai, X., Swamy, S. N., Ahn, K. S., Kumar, A. P., Tan, B. K., Hui, K. M. ve Sethi, G. (2013). "Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma." *Biochim Biophys Acta*, 1835(1), 46-60.

Suetsugi, A., Nagaki, M., Aoki, H., Motohashi, T., Kunisada, T. ve Moriwaki, H. (2006). "Characterization of CD133(+) hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(4), 820-824.

Sun, Y., Song, G. D., Sun, N., Chen, J. Q. ve Yang, S. S. (2014). "Slug overexpression induces stemness and promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis." *Oncol Lett*, 7(6), 1936-1940.

Sundquist, E., Kauppila, J. H., Veijola, J., Mroueh, R., Lehenkari, P., Laitinen, S., Risteli, J., Soini, Y., Kosma, V. M., Sawazaki-Calone, I., Macedo, C. C., Bloigu, R., Coletta, R. D. ve Salo, T. (2017). "Tenascin-C and fibronectin expression divide early stage tongue cancer into low- and high-risk groups." *Br J Cancer*, 116(5), 640-648.

Syn, N., Wang, L. Z., Sethi, G., Thiery, J. P. ve Goh, B. C. (2016). "Exosome-Mediated Metastasis: From Epithelial-Mesenchymal Transition to Escape from Immunosurveillance." *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(7), 606-617.

Tajiri, M., Yoshida, S. ve Wada, Y. (2005). "Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment." *Glycobiology*, 15(12), 1332-1340.

Taube, J. H., Herschkowitz, J. I., Komurov, K., Zhou, A. Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., Onder, T. T., Gupta, P. B., Evans, K. W., Hollier, B. G., Ram, P. T., Lander, E. S., Rosen, J. M., Weinberg, R. A. ve Mani, S. A. (2010). "Core epithelial-to-

mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15449-15454.

Taylor, D. D., Gercel-Taylor, C., Lyons, K. S., Stanson, J. ve Whiteside, T. L. (2003). "T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3-zeta by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors." *Clin Cancer Res*, 9(14), 5113-5119.

Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G. ve Clayton, A. (2006). "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 3, Unit 3 22.

Thery, C., Zitvogel, L. ve Amigorena, S. (2002). "Exosomes: composition, biogenesis and function." *Nat Rev Immunol*, 2(8), 569-579.

Tsukasa, K., Ding, Q., Yoshimitsu, M., Miyazaki, Y., Matsubara, S. ve Takao, S. (2015). "Slug contributes to gemcitabine resistance through epithelial-mesenchymal transition in CD133(+) pancreatic cancer cells." *Hum Cell*, 28(4), 167-174.

Umezu, T., Tadokoro, H., Azuma, K., Yoshizawa, S., Ohyashiki, K. ve Ohyashiki, J. H. (2014). "Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1." *Blood*, 124(25), 3748-3757.

Uygur, B., Abramo, K., Leikina, E., Vary, C., Liaw, L. ve Wu, W. S. (2015). "SLUG is a Direct Transcriptional Repressor of PTEN Tumor Suppressor." *Prostate*, 75(9), 907-916.

Uzunalimoglu, O., Yurdaydin, C., Cetinkaya, H., Bozkaya, H., Sahin, T., Colakoglu, S., Tankurt, E., Sarioglu, M., Ozenirler, S., Akkiz, H., Tozun, N., Degertekin, H. ve Okten, A. (2001). "Risk factors for hepatocellular carcinoma in Turkey." *Digestive Diseases and Sciences*, 46(5), 1022-1028.

van Zijl, F., Krupitza, G. ve Mikulits, W. (2011). "Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration." *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 728(1-2), 23-34.

Vangipuram, S. D., Buck, S. A. ve Lyman, W. D. (2012). "Wnt pathway activity confers chemoresistance to cancer stem-like cells in a neuroblastoma cell line." *Tumor Biology*, 33(6), 2173-2183.

Vidal-Vanaclocha, F. (2011). Architectural and Functional Aspects of the Liver with Implications for Cancer Metastasis. In. *Liver Metastasis: Biology and Clinical Management*. P. Brodt. Dordrecht, Springer Netherlands**:** 9-42.

Wan, H. G., Xu, H., Gu, Y. M., Wang, H., Xu, W. ve Zu, M. H. (2014). "Comparison osteopontin vs AFP for the diagnosis of HCC: A meta-analysis." *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 38(6), 706-714.

Wang, J., Wei, Q., Wang, X., Tang, S. L., Liu, H., Zhang, F. G., Mohammed, M. K., Huang, J. Y., Guo, D., Lu, M. P., Liu, F., Liu, J. X., Ma, C., Hu, X., Haydon, R. C., He, T. C. ve Luu, H. H. (2016). "Transition to resistance: An unexpected role of the EMT in cancer chemoresistance." *Genes & Diseases*, 3(1), 3-6.

Wang, J. P. ve Hielscher, A. (2017). "Fibronectin: How Its Aberrant Expression in Tumors May Improve Therapeutic Targeting." *J Cancer*, 8(4), 674-682.

Wang, S., Ma, X. Y., Xia, Y. ve Zhang, L. H. (2010). "[Expressions of Ki67, PCNA and mitotic index in ovarian epithelial tumors]." *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 41(4), 575-580.

Wang, Y., Wang, C., Chen, C., Wu, F., Shen, P., Zhang, P., He, G. ve Li, X. (2017). "Long non-coding RNA NEAT1 regulates epithelial membrane protein 2 expression to repress nasopharyngeal carcinoma migration and irradiation-resistance through miR-101-3p as a competing endogenous RNA mechanism." *Oncotarget*, 8(41), 70156-70171.

White, D. L., Kanwal, F., Jiao, L. ve El-Serag, H. B. (2016). Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. In. *Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Treatment*. B. I. Carr. Cham, Springer International Publishing**:** 3-24.

Whiteside, T. L. (2006). "Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention." *Semin Cancer Biol*, 16(1), 3-15.

Whiteside, T. L. (2013). "Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes)." *Biochemical Society Transactions*, 41, 245-251.

Wirtz, D., Konstantopoulos, K. ve Searson, P. C. (2011). "The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis." *Nat Rev Cancer*, 11(7), 512-522.

Woolbright, B. L. ve Jaeschke, H. (2015). "Xenobiotic and Endobiotic Mediated Interactions Between the Cytochrome P450 System and the Inflammatory Response in the Liver." *Adv Pharmacol*, 74, 131-161.

Wu, Q., Wang, X., Liu, J., Zheng, J. Y., Liu, Y., Li, Y. M., Su, F., Ou, W. L. ve Wang, R. (2016). "Nutlin-3 reverses the epithelial-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant hepatocellular carcinoma cells." *Oncology Reports*, 36(3), 1325-1332.

Xia, S., Wang, C., Postma, E. L., Yang, Y., Ni, X. ve Zhan, W. (2017). "Fibronectin 1 promotes migration and invasion of papillary thyroid cancer and predicts papillary thyroid cancer lymph node metastasis." *Onco Targets Ther*, 10, 1743-1755.

Xu, R., Greening, D. W., Zhu, H. J., Takahashi, N. ve Simpson, R. J. (2016). "Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application." *J Clin Invest*, 126(4), 1152-1162.

Xu, Z. Y., Tang, J. N., Xie, H. X., Du, Y. A., Huang, L., Yu, P. F. ve Cheng, X. D. (2015). "5-Fluorouracil Chemotherapy of Gastric Cancer Generates Residual Cells with Properties of Cancer Stem Cells." *International Journal of Biological Sciences*, 11(3), 284-294.

Xue, T. C., Ge, N. L., Zhang, L., Cui, J. F., Chen, R. X., You, Y., Ye, S. L. ve Ren, Z. G. (2014). "Goosecoid promotes the metastasis of hepatocellular carcinoma by modulating the epithelial-mesenchymal transition." *PLoS One*, 9(10), e109695.

Yang, J., Li, J. J., Dai, W. Q., Wang, F., Shen, M., Chen, K., Cheng, P., Zhang, Y., Wang, C. F., Zhu, R., Zhang, H. W., Zheng, Y. Y., Wang, J. S., Xia, Y. J., Lu, J., Zhou, Y. Q. ve Guo, C. Y. (2015). "Golgi protein 73 as a biomarker for hepatocellular

carcinoma: A diagnostic meta-analysis." *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(4), 1413-1420.

Yang, Z. H., Sun, B. C., Li, Y. L., Zhao, X. L., Zhao, X. M., Gu, Q., An, J. D., Dong, X. Y., Liu, F. ve Wang, Y. (2015). "ZEB2 promotes vasculogenic mimicry by TGF-beta 1 induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma." *Experimental and Molecular Pathology*, 98(3), 352-359.

Ye, F., Zhao, Y., Ei-Sayed, R., Muhammed, M. ve Hassan, M. (2018). "Advances in nanotechnology for cancer biomarkers." *Nano Today*, 18, 103-123.

Ye, X. ve Weinberg, R. A. (2015). "Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression." *Trends Cell Biol*, 25(11), 675-686.

Yoshida, T., Hashimura, M., Kuwata, T., Matsumoto, T., Suzuki, E., Tazo, Y., Nakajima, H., Inukai, M. ve Saegusa, M. (2013). "Transcriptional regulation of the alpha-1 type II collagen gene by nuclear factor B/p65 and Sox9 in the chondrocytic phenotype of uterine carcinosarcomas." *Hum Pathol*, 44(9), 1780-1788.

Yu, D. D., Jing, Y. Y., Guo, S. W., Ye, F., Lu, W., Li, Q., Dong, Y. L., Gao, L., Yang, Y. T., Yang, Y., Wu, M. C. ve Wei, L. X. (2015). "Overexpression Of Hepatocyte Nuclear Factor-1beta Predicting Poor Prognosis Is Associated With Biliary Phenotype In Patients With Hepatocellular Carcinoma." *Sci Rep*, 5, 13319.

Yu, M., Bardia, A., Wittner, B. S., Stott, S. L., Smas, M. E., Ting, D. T., Isakoff, S. J., Ciciliano, J. C., Wells, M. N., Shah, A. M., Concannon, K. F., Donaldson, M. C., Sequist, L. V., Brachtel, E., Sgroi, D., Baselga, J., Ramaswamy, S., Toner, M., Haber, D. A. ve Maheswaran, S. (2013). "Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition." *Science*, 339(6119), 580-584.

Zhang, H., Mizumachi, T., Carcel-Trullols, J., Li, L., Naito, A., Spencer, H. J., Spring, P. M., Smoller, B. R., Watson, A. J., Margison, G. P., Higuchi, M. ve Fan, C. Y. (2007). "Targeting human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1) to mitochondria enhances cisplatin cytotoxicity in hepatoma cells." *Carcinogenesis*, 28(8), 1629-1637.

Zhang, H. H., Zhang, Z. Y., Che, C. L., Mei, Y. F. ve Shi, Y. Z. (2013). "Array analysis for potential biomarker of gemcitabine identification in non-small cell lung cancer cell lines." *Int J Clin Exp Pathol*, 6(9), 1734-1746.

Zhang, J. T. ve Liu, Y. (2007). "Use of comparative proteomics to identify potential resistance mechanisms in cancer treatment." *Cancer Treat Rev*, 33(8), 741-756.

Zhang, P. F., Li, K. S., Shen, Y. H., Gao, P. T., Dong, Z. R., Cai, J. B., Zhang, C., Huang, X. Y., Tian, M. X., Hu, Z. Q., Gao, D. M., Fan, J., Ke, A. W. ve Shi, G. M. (2016). "Galectin-1 induces hepatocellular carcinoma EMT and sorafenib resistance by activating FAK/PI3K/AKT signaling." *Cell Death & Disease*, 7.

Zhang, Y., Shi, Z. L., Yang, X. ve Yin, Z. F. (2014). "Targeting of circulating hepatocellular carcinoma cells to prevent postoperative recurrence and metastasis." *World Journal of Gastroenterology*, 20(1), 142-147.

Zhao, X. L., Sun, B. C., Sun, D., Liu, T. J., Che, N., Gu, Q., Dong, X. Y., Li, R., Liu, Y. R. ve Li, J. (2015). "Slug promotes hepatocellular cancer cell progression by increasing sox2 and nanog expression." *Oncology Reports*, 33(1), 149-156.

Zhao, X. Y., Li, L., Wang, X. B., Fu, R. J., Lv, Y. P., Jin, W., Meng, C., Chen, G. Q., Huang, L. ve Zhao, K. W. (2016). "Inhibition of Snail Family Transcriptional Repressor 2 (SNAI2) Enhances Multidrug Resistance of Hepatocellular Carcinoma Cells." *Plos One*, 11(10).

Zheng, M., Jiang, Y. P., Chen, W., Li, K. D., Liu, X., Gao, S. Y., Feng, H., Wang, S. S., Jiang, J., Ma, X. R., Cen, X., Tang, Y. J., Chen, Y., Lin, Y. F., Tang, Y. L. ve Liang, X. H. (2015). "Snail and Slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma." *Oncotarget*, 6(9), 6794-6810.

Zheng, X. F., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C. C., LeBleu, V. S. ve Kalluri, R. (2015). "Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer." *Nature*, 527(7579), 525-+.

Zhu, J. N., Jiang, L., Jiang, J. H., Yang, X., Li, X. Y., Zeng, J. X., Shi, R. Y., Shi, Y., Pan, X. R., Han, Z. P. ve Wei, L. X. (2017). "Hepatocyte nuclear factor-1beta enhances the stemness of hepatocellular carcinoma cells through activation of the Notch pathway." *Sci Rep*, 7(1), 4793.

Zhu, W. L., Fan, B. L., Liu, D. L. ve Zhu, W. X. (2009). "Abnormal expression of fibrinogen gamma (FGG) and plasma level of fibrinogen in patients with hepatocellular carcinoma." *Anticancer Res*, 29(7), 2531-2534.

EKLER

Ek: Tezden yayınlanan makale

Cellular Oncology
https://doi.org/10.1007/s13402-018-0384-6

ORIGINAL PAPER

Identification of biomarkers associated with partial epithelial to mesenchymal transition in the secretome of slug over-expressing hepatocellular carcinoma cells

Oğuzhan Karaosmanoğlu[1] · Sreeparna Banerjee[2] · Hülya Sivas[1]

Accepted: 22 May 2018
© International Society for Cellular Oncology 2018

Abstract

Background Hepatocellular carcinoma (HCC) is the second leading cause of cancer-related deaths worldwide. Complete epithelial to mesenchymal transition (EMT) has long been considered as a crucial step for metastasis initiation. It has, however, become apparent that many carcinoma cells can metastasize without complete loss of epithelial traits or with incomplete gain of mesenchymal traits, i.e., partial EMT. Here, we aimed to determine the similarities and differences between complete and partial EMT through over-expression of the EMT-associated transcription factor Slug in different HCC-derived cell lines.

Methods Slug over-expressing HCC-derived HepG2 and Huh7 cells were assessed for their EMT, chemo-resistance and stemness features using Western blotting, qRT-PCR, neutral red uptake, doxorubicin accumulation and scratch wound healing assays. We also collected conditioned media from Slug over-expressing HCC cells and analyzed its exosomal protein content for the presence of chemo-resistance and partial EMT markers using MALDI-TOF/TOF and ELISA assays, respectively.

Results We found that Slug over-expression resulted in the induction of both complete and partial EMT in the different HCC-derived cell lines tested. Complete EMT was characterized by downregulation of E-cadherin and upregulation of ZEB2. Partial EMT was characterized by upregulation of E-cadherin and downregulation of vimentin and ZEB2. Interestingly, we found that Slug induced chemo-resistance through downregulation of the ATP binding cassette (ABC) transporter ABCB1 and upregulation of the ABC transporter ABCG2, as well as through expression of CD133, a stemness marker that exhibited a similar expression pattern in cells with either a complete or a partial EMT phenotype. In addition, we found that Slug-mediated partial EMT was associated with enhanced exosomal secretion of post-translationally modified fibronectin 1 (FN1), collagen type II alpha 1 (COL2A1) and native fibrinogen gamma chain (FGG).

Conclusions From our data we conclude that the exosomal proteins identified may be considered as potential non-invasive biomarkers for chemo-resistance and partial EMT in HCC.

Keywords Hepatocellular carcinoma · Chemo-resistance · Partial EMT · Non-invasive biomarkers · Exosomes · Fibronectin 1 (FN1) · Collagen type II alpha 1 (COL2A1) · Fibrinogen gamma chain (FGG)

1 Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth-most common cancer and the second leading cause of cancer-related deaths worldwide [1]. For epithelial tumors to metastasize, a fraction of the transformed cells loses its epithelial traits and acquires a mesenchymal phenotype, which is characterized by an elongated spindle-like morphology, a motile phenotype, a loss of adherens and tight junctions and attachment to the extracellular matrix via focal adhesions [2]. This process is known as epithelial to mesenchymal transition (EMT). The process of EMT is characterized by a down-regulation of epithelial markers such as E-cadherin, and an up-regulation of mesenchymal markers such as vimentin and EMT transcription factors (EMT-TF) such as Snail, Slug, Twist1, ZEB1 and ZEB2 [3, 4]. Snail and Slug can bind to the promotor of the *CDH1* gene (coding for E-cadherin) and, by doing so, repress its

✉ Oğuzhan Karaosmanoğlu
oguzhankaraosmanoglu@windowslive.com

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Anadolu University, 26400 Eskişehir, Turkey

[2] Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Letters, Middle East Technical University, 06800 Ankara, Turkey

Published online: 01 June 2018

expression. In addition, these transcription factors can up-regulate the expression of proteins that facilitate cell migration such as vimentin, fibronectin 1 and matrix metalloproteases [5]. It has been found that in vitro over-expression of Slug or Snail is sufficient to induce EMT not only in normal epithelial cells [6, 7], but also in cancer cells [8, 9]. There is, however, accumulating evidence indicating that Slug-mediated EMT can be either complete [10] and partial [11]. In case of partial EMT, cells simultaneously express epithelial and mesenchymal traits. Hence, they can initiate metastasis with incomplete loss of epithelial traits and/or incomplete gain of mesenchymal traits [12]. Circulating tumor cells (CTCs) usually exhibit a partial EMT phenotype reminiscent of epithelial cells for their cell-cell adhesion traits and mesenchymal cells for their migratory traits [13]. Taking advantage of both collective migration [12, 14] and clustering in the bloodstream [15, 16], it has been found that CTCs with a partial EMT phenotype may be apoptosis resistant and can be up to 50 times more metastatic than individually migrating CTCs [17]. Therefore, CTCs exhibiting a partial EMT phenotype may pose a higher metastatic risk for patients [18].

Extracellular vesicles (EVs) can be classified in at least three subgroups including apoptotic bodies, micro-vesicles and exosomes [19]. Exosomes that are 40–150 nm in diameter are derived from endosomal pathways [20]. It has been suggested that exosomes, as carriers of proteins, miRNAs and part of the cellular secretome, may contribute to the EMT process [21]. As exosomes are found in body fluids that can be collected non-invasively, they represent a great potential for diagnostic and therapeutic purposes [22, 23].

Here, we hypothesized that over-expression of the EMT inducer Slug may affect the chemo-resistance and stemness of HCC cells. To test this hypothesis, we investigated chemo-resistance and EMT-associated biomarkers from exosomes secreted by these cells. We found that fibronectin 1 (FN1) [24–26], collagen type II alpha 1 (Col2A1) and fibrinogen gamma chain (FGG) may serve as useful non-invasive biomarkers for chemo-resistance and partial EMT in HCC.

2 Materials and methods

2.1 Cell lines and experimental design

HCC-derived HepG2 cells were obtained from the ATCC (Middlesex, UK) and HCC-derived Huh7 cells were kindly provided by Dr. Mehmet Öztürk (Dokuz Eylül University, Turkey). Both cell lines were stably transfected with a Slug plasmid (see below). From each cell line two different Slug over-expressing clones were selected, called HepG2-Sl-Clon1, HepG2-Sl-Clon2 and Huh7-Sl-Clon1 and Huh7-Sl-Clon2. As controls HepG2 and Huh7 cells that were stably transfected with a pcDNA3.1/Neo empty vector were used. In addition, transient transfections were carried out and the resulting cells were called HepG2-Sl (Tr) and Huh7-Sl (Tr). Control cells transiently transfected with a pcDNA3.1/Neo empty vector were called HepG2-EV (Tr) and Huh7-EV (Tr), respectively.

2.2 Cell culture conditions, morphological observations and reagents

HepG2 and Huh7 cells were cultured in DMEM medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 μg/ml) (Sigma-Aldrich) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. Changes in cellular morphologies were assessed using an inverted microscope (Olympus, BX 50, Center Valley, PA, USA). Cisplatin (Sigma-Aldrich) was dissolved in water and doxorubicin (Sigma-Aldrich) was dissolved in DMSO. Both were stored as stock solutions at −20 °C.

2.3 Stable and transient transfection assays

SlugMyc_pcDNA3 (Addgene ID 31698) was a gift from Paul Wade [27]. Stable transfections with SlugMyc_pcDNA3 and the empty pcDNA3.1/Neo (Invitrogen) plasmids were carried out using a calcium phosphate-mediated chemical transfection method [28]. Briefly, 150,000 cells per well were seeded into a 6-well plate and allowed to adhere overnight. Next, the culture medium was replaced by fresh medium 2 h prior transfection. To this end, 2× HeBS (Hepes buffered saline) and DNA/$CaCl_2$ were mixed and immediately vortexed. After 20 min the mixture was evenly distributed to the culture wells after which the cells were incubated for 48 h under standard growth conditions. Subsequent selections were carried out using 500 μg/ml G418 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 3–4 weeks. Single colonies were picked using cloning cylinders (Milipore) and transferred to individual wells of a 96-well plate. Cells growing under selection pressure were subsequently transferred to 6-well plates. More than 40 colonies from both Huh7 and HepG2 were generated in order to select Slug over-expressing clonal cell lines. For each assay empty vector transfected cells were used as controls.

Transient transfections were carried out using Turbofect Reagent (Thermo Scientific, Germany) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 350,000 HepG2 and 140,000 Huh7 cells per well were seeded in 2 ml DMEM in a 6-well plate. After 24 h incubation 8 μg plasmid DNA was diluted in 400 μl serum-free DMEM after which 8 μl Turbofect transfection reagent was added for the transfection of HepG2 cells. For the transfection of Huh7 cells 4 μg plasmid DNA was diluted in 400 μl serum-free DMEM after which 8 μl Turbofect transfection reagent was added.

2.4 In-cell Western assay

For the selection of Slug overexpressing cells, individual cells were examined for Slug expression using an in-cell Western method. For this, cells were seeded into each well of a 96-well plate at a density of 50,000 cells/ml. After 48 h, the cells were fixed in ice-cold methanol for 10 min at −20 °C. Next, the wells were washed with 200 μl PBS three times (3 min each) and subsequently blocked in Odyssey blocking buffer (Licor, Lincoln, NE, USA) for 1 h at room temperature. The wells were then incubated with an anti-Slug antibody (Cell Signaling Technology CST, Danvers, MD, USA, Cat. No: C19G7, 1:100 dilution) in 0.1% Tween 20 containing Odyssey blocking buffer overnight at 4 °C with shaking. Next, the wells were washed 3 times with PBS/0.1% Tween 20 (PBS-T) and incubated with an Infrared IRDye800CW secondary antibody (1:1000) and a cell tag stain (1: 2000) in Odyssey blocking buffer/0.2% Tween-200 for 1 h at room temperature. After this incubation, the wells were washed with PBS-T and imaged on an infrared scanner (Licor, Odyssey Clx) using both 700 and 800 nm wavelength channels. The expression of Slug was determined through absorbance at 800 nm. These signals were background-subtracted from those of wells treated with only secondary antibody, and then normalized to cell numbers through division by the 700 nm signal. Data were acquired using the ImageStudio software tool, exported and analyzed in Excel.

2.5 Western blotting

To determine protein expression, 750,000 cells were seeded in 75 cm^2 flasks. When the cells reached 80% confluency, they were washed with ice-cold PBS and scraped off in RIPA buffer containing a protease inhibitor cocktail (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche Mannheim, Germany). The extracted protein samples were subsequently mixed with β-mercaptoethanol and 4× protein sample loading buffer and incubated at 90 °C for 5 min. Next, the samples were subjected to SDS-PAGE in stain-free gels (TGX Stain-free, Bio-Rad, Richmond, CA, USA) after which the proteins were visualized using a gel documentation system (Gel Doc EZ, Bio-Rad). These proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Licor, Odyssey Clx, Lincoln, NE) using a semi-dry electro-transfer device (Transblot turbo, Bio-Rad) after which the membranes were blocked in skim milk (Sigma-Aldrich) and incubated with antibodies directed against Slug (CST, Cat. No: C19G7, 1:500 dilution), CD133 (Invitrogen, Cat. No: PA5–38014, 1:1000 dilution), E-cadherin (CST, Cat. No: 24E10, 1:1000 dilution) and vimentin (CST, Cat. No: D21H3-XP, 1:100 dilution) at 4 °C overnight. Next, the membranes were washed 3 times in TBS-T buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated with a secondary antibody for 1 h at room temperature. Finally, the membranes were washed 3 times in TBS-T buffer after which the proteins were visualized using a chemiluminescence detection system (ChemiDoc MP, Bio-Rad). As a loading control β-actin was used. The data were quantified using Image Lab software and normalized to the expression β-actin. Three independent biological replicates were carried out for all experiments, except for those with HepG2-Sl-Clon1 and HepG2-Sl-Clon2, as these cells lost their Slug overexpression after a few passages.

2.6 qRT-PCR

In order to determine the mRNA expression levels of ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5, ABCG2, CD133, COL2A1, FGG, FN1, SLUG and ZEB2 in stably transfected cells and the COL2A1, FGG, FN1 and SLUG mRNA expression levels in transiently transfected cells, total RNA was isolated using a Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the directions of the manufacturer. Next, cDNA synthesis was carried out using a Protoscript II kit (NEB, Ipswich, USA) according to the manufacturer's protocol after which quantitative real-time PCR (qRT-PCR) amplification was carried out using a Brilliant SYBR Green qPCR master mix (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) in conjunction with a real-time PCR platform (Mx3005P, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The mRNA expression data were normalized to ACTB and analyzed using an efficiency corrected relative quantification method as reported before [29]. The primers were obtained from Sentegen (Ankara, Turkey) and their sequences are listed in Table 1.

2.7 Neutral red uptake assay

EMT is generally considered to be associated with drug resistance [30]. In in order to determine the concentration of cisplatin required to kill 50% of the cells (IC_{50} values) undergoing complete or partial EMT, a neutral red uptake assay was carried out as reported before [31]. Briefly, HepG2-Sl-Clon1, HepG2-Sl-Clon2, Huh7-Sl-Clon1, Huh7-Sl-Clon2, HepG2-EV and Huh7-EV cells were seeded at densities of 10,000 cells/well in 96-well culture plates (Thermo Scientific, Germany) in a total volume of 100 μl. The cells were allowed to adhere overnight and subsequently treated with different concentrations (1.5–100 μM) of cisplatin for 72 h. Next, the media were removed after which 200 μl fresh medium containing 50 μg/ml neutral red was added to each well and incubated for an additional 3 h. The dye was then removed and each well was washed rapidly with 200 μl phosphate buffer saline (PBS) followed by the addition of 100 μl dye extraction solution (acetic acid-water-ethanol 1:49:50). Next, the plates were incubated for 15 min at room temperature with shaking on a GFL 3012 shaker (Gesellschaft für Labortechnik mbH,

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR

Gene Name (Accession Number)	Forward Primer	Reverse Primer
ABCB1 (NM_000927.4)	5'-TGACATTTATTCAAAGTTAAAAGCA-3′	5'-TAGACACTTTATGCAAACATTTCAA-3′
ABCC1 (NM_004996.3)	5'-AGTGGAACCCCTCTCTGTTTAAG-3′	5'-AACAGCAGCACGGTGTAGAA-3′
ABCC2 (NM_000392.4)	5'-TCCTTGCGCAGCTGGATTACAT-3′	5'-TCGCTGAAGTGAGAGTAGATTG-3′
ABCC3 (NM_003786.3)	5'-CAGAGAAGGTGCAGGTGACA-3'	5'-CTAAAGCAGCATAGACGCCC-3'
ABCC5 (NM_001320032.1)	5'-AGAGGTGACCTTTGAGAACGCA-3'	5'-CTCCAGATAACTCCACCAGACGG-3'
ABCG2 (NM_001348989.1)	5'-CCGCGACAGCTTCCAATGACCT-3'	5'-GCCGAAGAGCTGCTGAGAACTGTA-3'
ACTB (NM_001101.3)	5'-GAGCGCGGCTACAGCTT-3'	5'-TCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'
CD133 (NM_001145847.1)	5'-AGTCGGAAACTGGCAGATAGC-3'	5'-GGTAGTGTTGTACTGGGCCAAT-3'
COL2A1 (NM_001844.4)	5'-AACCAGATTGAGAGCATCCG-3'	5'-AACGTTTGCTGGATTGGGGT-3'
FGG (NM_000509.5)	5'-CAGGATGGATCTGGTTGGTGG-3'	5'-GGAGTAGATGCTTTTGAGTAAGTGC-3'
FN1 (NM_212474.2)	5'-TGGGCAACTCTGTCAACGAA-3'	5'-CCACTCATCTCCAACGGCAT-3'
SLUG (NM_003068.4)	5'-CGAACTGGACACACATACAGTG-3'	5'-CTGAGGATCTCTGGTTGTGGT-3'
ZEB2 (NM_001171653.1)	5'-ATCTGAAAGAACACCTGCGAAT-3'	5'-TGTAGGAACCAGAATGGGAGAA-3'

Burgwedel, Germany) to extract the dye. Finally, the absorbance was measured using an ELx 808 Ultra Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) equipped with a 540 nm filter. Each assay was repeated at least three times. Viability was evaluated through comparison with untreated cells. Drug resistance was evaluated by comparing the IC_{50} values of control and Slug over-expressing cells.

2.8 Doxorubicin accumulation assay

To determine the accumulation of doxorubicin in Slug over-expressing cells, HepG2-Sl-Clon1, HepG2-Sl-Clon2, Huh7-Sl-Clon1 and Huh7-Sl-Clon2 cells, along with control empty vector transfected cells were seeded in each well of a 6-well cell culture plate (3×10^5 cells per well) onto 35 mm sterile coverslips (Thermo Scientific) and allowed to adhere overnight. Subsequently, the cells were incubated with 0.18 μM doxorubicin (Sigma-Aldrich) for 24 h, after which they were fixed with 4% paraformaldehyde and washed with PBS. Next, the cells were treated with 1% Triton X-100 solution to permeabilize, washed with PBS, incubated with 0.05 μg/ml DAPI solution and washed again with PBS. Subsequently, the coverslips were removed from the wells and mounted on glass slides with 50% glycerol, after which images were captured using a fluorescence microscope (Olympus, BX 50, Center Valley, PA, USA). Data were quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) and doxorubicin signals were normalized to DAPI signals.

2.9 Scratch wound healing assay

To determine cell motility, a scratch wound healing assay was carried out. For this, Huh7-EV and Huh7-Sl-Clon1 cells were seeded in 6-well cell culture plates (Thermo Scientific) and cultured until 100% confluence. Next, scratches were made with sterile 200 μl pipette tips after which the wounded monolayers were washed immediately twice with PBS and incubated in serum free medium. Wound healing rates were determined by comparing images captured after 48 and 96 h with the those captured at 0 h using an inverted microscope (Olympus, BX 50, Center Valley, PA, USA). The images were quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.10 Exosomal extracellular protein isolation

For secretome analyses of Slug over-expressing cells, exosomal extracellular proteins were isolated. Exosome isolations were carried out according to a differential ultracentrifugation protocol as reported before [32]. Briefly, Huh7-EV and Huh7-Sl-Clon1 cells were seeded at a density of 750,000 cells in 75 cm^2 flasks. When the cells reached 70% confluence they were serum starved for 24 h, after which 90 ml conditioned medium (CM) was collected. The CM was serially centrifuged at 300×*g* for 10 min, at 2000×*g* for 10 min, at 10, 000×*g* for 30 min and, finally, at 100,000×*g* for 70 min in a Beckman Type 45 Ti rotor using a Beckman Optima LE 80 K ultracentrifuge. The supernatants were discarded and the exosome pellets were dissolved in a Laemmli sample buffer (0.02% Bromophenol blue, % 4 SDS, 20% Glycerol, 120 mM Tris-HCl, pH 6.8) yielding extracellular proteins. The temperature was maintained at 4 °C during all steps.

2.11 MALDI-TOF/TOF assay

The isolated exosomal extracellular proteins were subjected to SDS-PAGE using standard protocols (see above). The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G250 and documented using a Gel Doc EZ system (Bio-Rad Richmond, CA, USA). Further analyses were carried out by the selection of

differentially staining bands. These bands were excised from the gels and subjected to zip-tip and MALDI TOF/TOF analyses as previously reported [33].

2.12 ELISA assay

The upregulation of proteins (as shown by MALDI-TOF/TOF) in the secretome of Slug over-expressing cells was confirmed by ELISA. In the stably transfected group, the culture media of Huh7-Sl-Clon1 and control cells grown to confluence were replaced with serum-free media after which the respective cells were incubated for an additional 24 h and collected. In the transiently transfected group, the culture media of HepG2-Sl (Tr), Huh7-Sl (Tr) and control cells were collected after 72 h of transfection. The resulting conditioned media (CM) were centrifuged at 1000×*g* for 20 min at 4 °C after which the amounts of the proteins of interest were determined using ELISA kits according to the manufacturer's instructions. Respective ELISA kits were used to determine fibronectin 1 (FN1, Abcam, Cambridge, UK), collagen type II alpha 1 (COL2A1, Elabscience, China) and fibrinogen gamma chain (FGG, Aviva Systems Biology, San Diego, CA, USA). For quantification, the plates were read in a plate reader (Epoch2, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

2.13 Bioinformatics and statistical analyses

Normalized expression data of E-GEOD-69667 were downloaded from the Array Express Database (https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-GEOD-69667/) as TPM values. COL2A1, FN1 and FGG expression data were extracted using R software version 4.4.3, and presented as fold changes. Three independent biological replicates were carried out, unless indicated otherwise. Statistical analyses and graphing were performed using Graphpad (GraphPad Prism 6, San Diego, CA, USA). One-way ANOVA with Dunnet post hoc test or Student t-test were used for differential analyses, and p-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

3 Results

3.1 Slug over-expression results in complete EMT in HepG2 cells and partial EMT in Huh7 cells

Based on the analysis of Slug over-expression in HepG2 and Huh7 transfected cells using an in-cell Western assay (see materials and methods), two clones from each cell line were selected, i.e., HepG2-Sl-Clon1, HepG2-Sl-Clon2 and Huh7-Sl-Clon1 and Huh7-Sl-Clon2, respectively (Fig. 1A). Slug over-expression in the selected cell lines was confirmed by Western blotting and qRT-PCR. The HepG2-S1-Clon1 cells showed a 7 and 12-fold upregulation of Slug protein and mRNA, respectively, whereas the Huh7-Sl-Clon1 cells showed a 9 and 17-fold upregulation of Slug protein and mRNA, respectively (Fig. 1B). Next, the expressions of the canonical EMT markers E-cadherin, vimentin and ZEB2 were examined. We found that the E-cadherin protein expression level was 3-fold downregulated and that the ZEB2 mRNA expression level was 132-fold upregulated in Slug over-expressing HepG2 cells, indicating a successful induction of complete EMT in these cells. Interestingly, we could not detect any vimentin expression in the HepG2 cells (Fig. 1C). In Slug over-expressing Huh7 cells we observed a 3-fold upregulation of E-cadherin protein, a 33-fold downregulation of ZEB2 mRNA and 20-fold downregulation vimentin protein expression. Together, these data indicate that Slug over-expression induces a complete EMT in HepG2 cells and a partial EMT in Huh7 cells.

Since the Slug over-expressing Huh7 cells did not show the classical signs of EMT induction, we decided to examine the morphologies of the respective cells under an inverted microscope. While Slug over-expressing HepG2 cells showed a clear fibroblast-like morphology, none of the Slug over-expressing Huh7 cells examined showed a classical spindle shaped morphology characteristic of cells undergoing EMT (Fig. 2). EMT is known to be associated with a loss of cell-cell adhesion molecules, along with the acquisition of a spindle-like morphology, which implies loss of cellular polarity and eventually enhanced migration [2]. Since at present limited data are available regarding the motility of cells undergoing partial EMT, we set out to investigate the motility of the HCC cells undergoing partial EMT using a scratch wound healing assay. The data obtained indicate that the wound closure rate was relatively high in Slug over-expressing Huh7 cells, suggesting that also partial EMT results in an enhanced motility of these cells (Fig. 3). As this experiment was carried out in serum-reduced medium, the contribution of cell proliferation to the wound closure rate was likely to be low.

3.2 Slug over-expression results in chemo-resistance of cells undergoing complete or partial EMT

As the process of EMT is often accompanied by enhanced drug resistance [34], we next set out to analyze the effect of Slug over-expression on cisplatin resistance using a neutral red uptake assay. IC_{50} values were calculated by comparing the viabilities of cells that were exposed to 2-fold serially diluted cisplatin concentrations. While the IC_{50} of cisplatin for HepG2-EV cells was found to be 11.2 μM, we found that it was increased to 27.16 μM and 19.4 μM for HepG2-Sl-Clon1 and HepG2-Sl-Clon2 cells, respectively. In case of Huh7 cells, we found that the IC_{50} of cisplatin for Huh7-EV cells was 11.8 μM, and that it was increased to 23.4 μM and

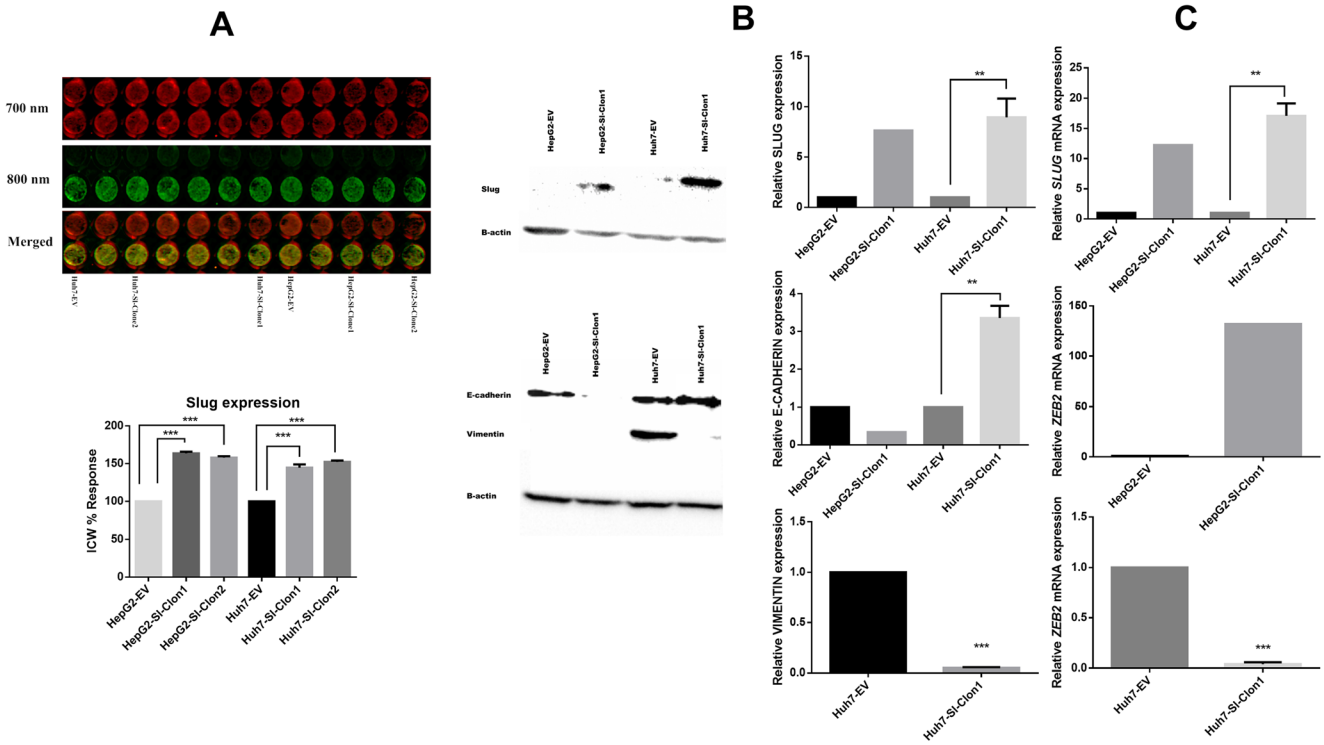


Fig. 1 Expression of EMT markers in Slug over-expressing cells. **A** Selection of Slug over-expressing clonal cell lines by in-cell Western analysis. The signals from the 700 nm channel indicate cell numbers and the signals from the 800 nm channel indicate Slug primary antibody binding to secondary antibody. The first lane was used for background subtraction and the second lane was used for data analysis in both channels. As the Slug expression increases the color in the merged lane changes from orange to green. The Slug protein expression level was significantly higher in SlugMyc_pcDNA3 transfected Huh7 and HepG2 cells (ICW: in-cell Western). The experiment was carried out using three independent biological samples. **B** Relative protein expression of Slug, vimentin and E-cadherin in HepG2-EV, HepG2-Sl-Clon1, Huh7-EV and Huh7-Sl-Clon1 cells determined by Western blotting. Slug was upregulated in HepG2-Sl-Clon1 cells and Huh7-Sl-Clon1 cells. E-cadherin was downregulated in HepG2-Sl-Clon1 cells and upregulated in Huh7-Sl-Clon1 cells. Vimentin expression could not detected in HepG2 cells and was downregulated in Huh7-Sl-Clon1 cells. **C** Relative mRNA expression of SLUG and ZEB2 in HepG2-EV, HepG2-Sl-Clon1, Huh7-EV and Huh7-Sl-Clon1 cells determined by qRT-PCR. Slug was upregulated in HepG2-Sl-Clon1 cells and Huh7-Sl-Clon1 cells. ZEB2 was upregulated in HepG2-Sl-Clon1 cells and downregulated in Huh7-Sl-Clon1 cells. Since the HepG2-Sl-Clon1 cells lost the overexpression of Slug after passaging, the experiments were carried out only once in this group. All experiments with Huh7-Sl-Clon1 cells were performed as three independent biological replicates. Statistical comparisons were carried out using Student t-test or ANOVA followed by Dunnet's post hoc (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$)

15.65 μM for Huh7-Sl-Clon1 and Huh7-Sl-Clon2 cells, respectively (Fig. 4). These increases in IC_{50} values suggest that chemo-resistance was developed by HCC cells undergoing both partial and complete EMT.

The impact of Slug over-expression on chemo-resistance was also determined using a doxorubicin accumulation assay. This assay is based on the premise that drug resistant cells pump out doxorubicin, leading to less accumulation of doxorubicin within the cells which can be monitored using fluorescence microscopy. We found that Slug over-expression resulted in a significantly decreased doxorubicin accumulation in both Huh7 and HepG2 cells (Fig. 5).

Additionally, we investigated a putative mechanism of chemo-resistance development by determining the expression of a series of drug transporters, i.e., ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC5 and ABCG2 using qRT-PCR. We found that the expression of 4 of these transporters (ABCC1, ABCC2, ABCC3 and ABCC5) was not significantly affected (data not shown). In contrast, we found that the expression of ABCG2 was 10 and 7-fold upregulated in HepG2-Sl-Clon1 and Huh7-Sl-Clon1 cells, respectively. Unexpectedly, we found that the expression of ABCB1 was 7 and 3-fold downregulated in HepG2-Sl- Clon1 and Huh7-Sl- Clon1 cells, respectively (Fig. 6).

3.3 Slug over-expression results in stemness in cells undergoing complete or partial EMT

It has been reported that Slug over-expression may result in stemness phenotypes in ovarian [35] and hepatocellular carcinoma cells [9]. In addition, chemo-resistance has also been reported to be associated with stemness phenotypes [35–37]. Based on these findings, we set out to investigate the expression of CD133, a stemness marker, in HCC cells undergoing

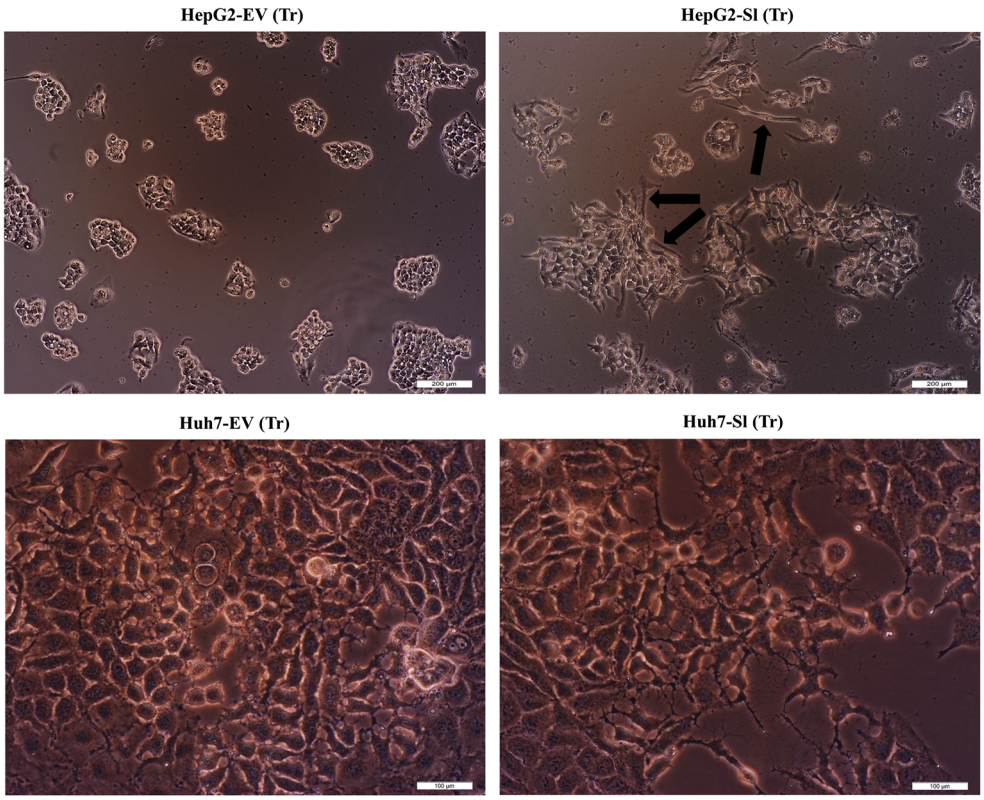


Fig. 2 Morphology of transiently transfected HepG2 and Huh7 cells. Arrows indicate a fibroblast-like morphology of Slug over-expressing HepG2 cells. Similar spindle shaped fibroblast-like morphologies were not seen in any of the Slug over-expressing Huh7 cells

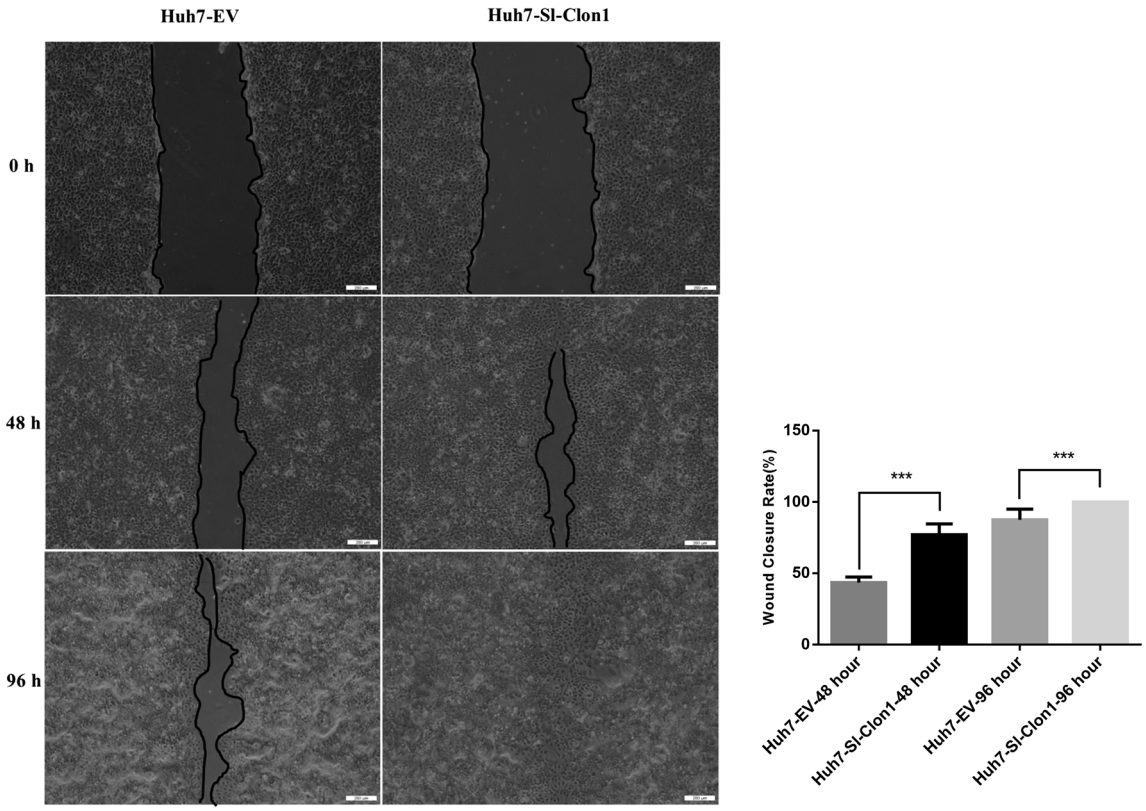


Fig. 3 Scratch wound healing of Huh7-Sl-Clon1 and Huh7-EV cells. Huh7-Sl-Clon1 cells were significantly more motile than Huh7-EV cells. The experiments were carried out using three independent biological replicates. Statistical comparisons were carried out using Student t-test (***$p < 0.001$)

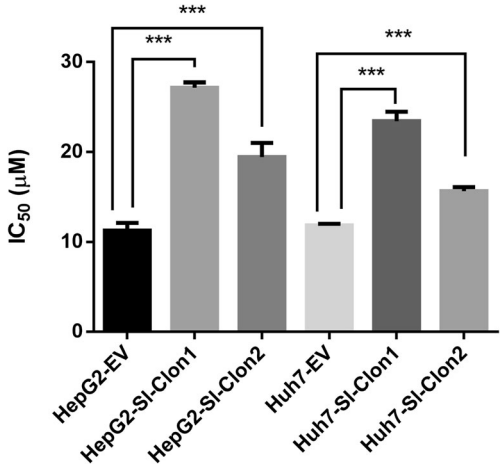


Fig. 4 Chemo-resistance of cells undergoing complete and partial EMT. Neutral-red uptake indicates an increase in IC50 value for cisplatin in all Slug over-expressing cells lines. The experiments were conducted using three independent biological replicates. Statistical comparisons were carried out using ANOVA followed by Dunnet's post hoc (***$p < 0.001$)

complete and partial EMT. We found that CD133 protein was upregulated 4 and 5-fold and that CD133 mRNA was upregulated 1.5 and 6-fold in HepG2-Sl-Clon1 and Huh7-Sl-Clon1 cells (Fig. 7A, B), respectively, indicating that stemness may be induced by Slug regardless the acquisition of complete or partial EMT.

3.4 FN1, COL2A1 and FGG as partial EMT biomarkers in HCC

Non-invasive biomarkers that can act as signatures of chemo-resistance may be of great importance for clinical cancer management and/or the prediction of recurrence [38]. Since so far partial EMT has been less studied than complete EMT, we set out to identify possible partial EMT biomarkers in HCC cell culture supernatants. For this, we isolated exosome proteins from conditioned media of Huh7-Sl-Clon1 and Huh7-EV cells. Subsequent MALDI-TOF/TOF analysis of differentially expressed exosome proteins revealed the presence of three proteins that were highly enriched in Slug over-expressing Huh7 cells (Fig. 8A). These proteins were identified as fibronectin1 (FN1) with a molecular weight > 262 kDa, collagen type II alpha 1 (COL2A1) with a molecular weight of 210 kDa and fibrinogen gamma chain (FGG) with a molecular weight of 50 kDa (Fig. 8B). Since the predicted molecular weights of FN1, COL2A1 and FGG are 262 and 141 and 50 kDa, respectively, we assume that FN1 and COL2A1 are post-translationally modified and that the respective modified protein levels are elevated in the HCC cells undergoing partial EMT. FGG did not appear to undergo any modification in these cells. Subsequent qRT-PCR analyses revealed a 2.8 and 5.8-fold upregulation of respectively COL2A1 and FGG mRNA in Huh7-Sl-Clon1 cells compared to its corresponding

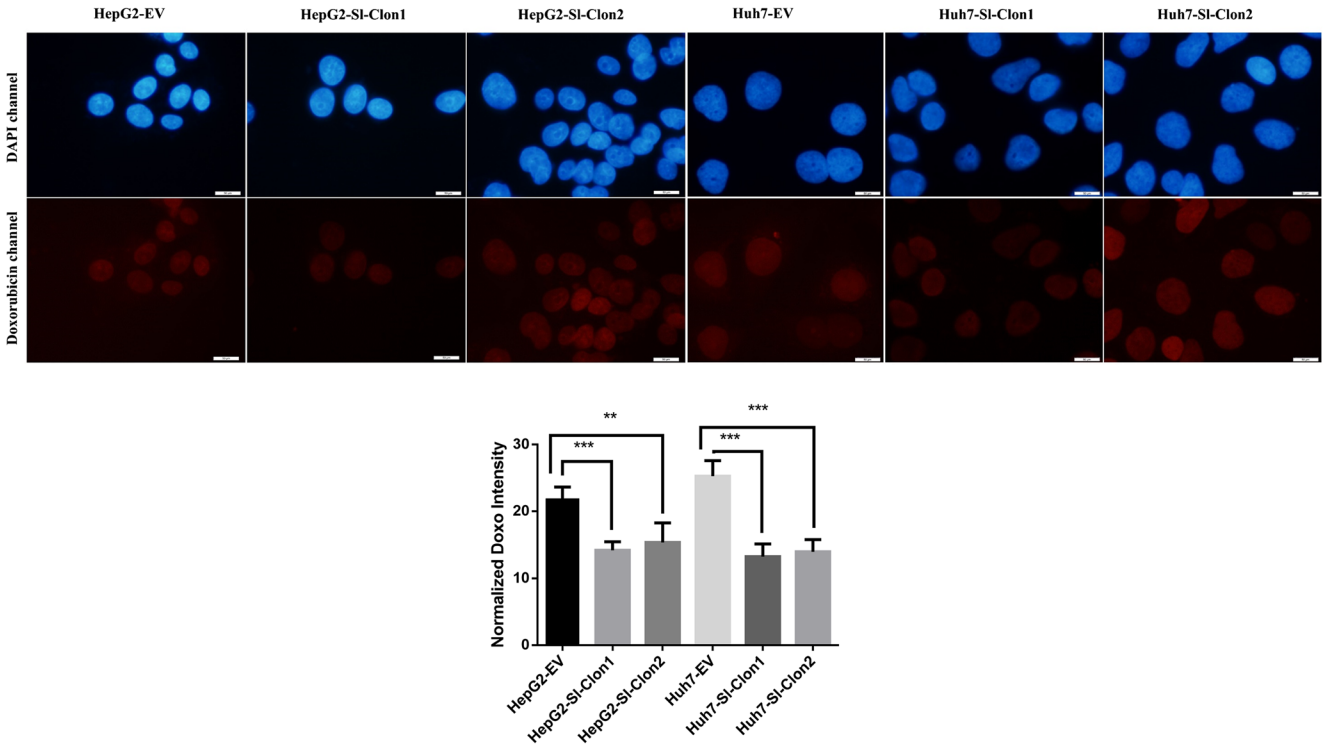


Fig. 5 Doxorubucin accumulation in cells undergoing complete and partial EMT. Intracellular doxorubucin levels were decreased in both cell types indicating enhanced chemo-resistance in the different Slug over-expressing cells. The experiments were done using three independent biological replicates. Statistical comparisons were carried out using ANOVA followed by Dunnet's post hoc (**$p < 0.01$, ***$p < 0.001$)

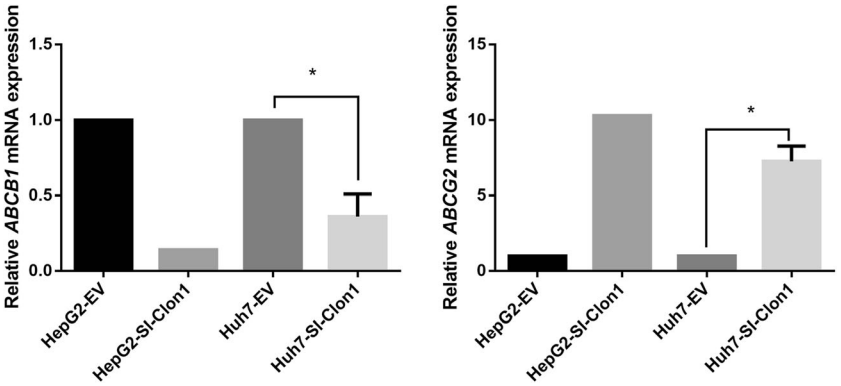


Fig. 6 qRT-PCR analysis of ABCB1 and ABCG2 mRNA levels in cells undergoing complete and partial EMT. Since the HepG2-Sl-Clon1 cells lost Slug over-expression after passaging, the experiments were carried out only once in this group. All experiments with Huh7-Sl-Clon1 cells were performed as three independent biological replicates. Statistical comparisons were carried out using Student t-test (*$p < 0.05$)

empty vector transfected cells. In contrast, we observed a 2-fold downregulation of FN1 mRNA (Fig. 8C). We also assessed the proteins levels of these markers in the conditioned media using ELISA. By doing so, we found that the total (modified and unmodified) COL2A1 and FN1 protein levels were significantly upregulated in Slug over-expressing Huh7-S1-Clon1 cells compared to its corresponding empty vector transfected cells. The FGG levels could not be determined in the conditioned media since they were below the detection limit of the kit used (Fig. 8C).

In order to additionally compare the expression levels of COL2A1, FGG and FN1 in HCC cells undergoing both complete and partial EMT, we transiently transfected HepG2 and Huh7 cells with the Slug over-expression plasmid. Subsequent ELISA analyses of the conditioned media from these cells revealed a statistically significant upregulation of the total (modified and unmodified) COL2A1 and FN1 protein levels in both Slug over-expressing HepG2 and Huh7 cells compared to their corresponding empty vector transfected cells (Fig. 9A). Similar to the stably Slug

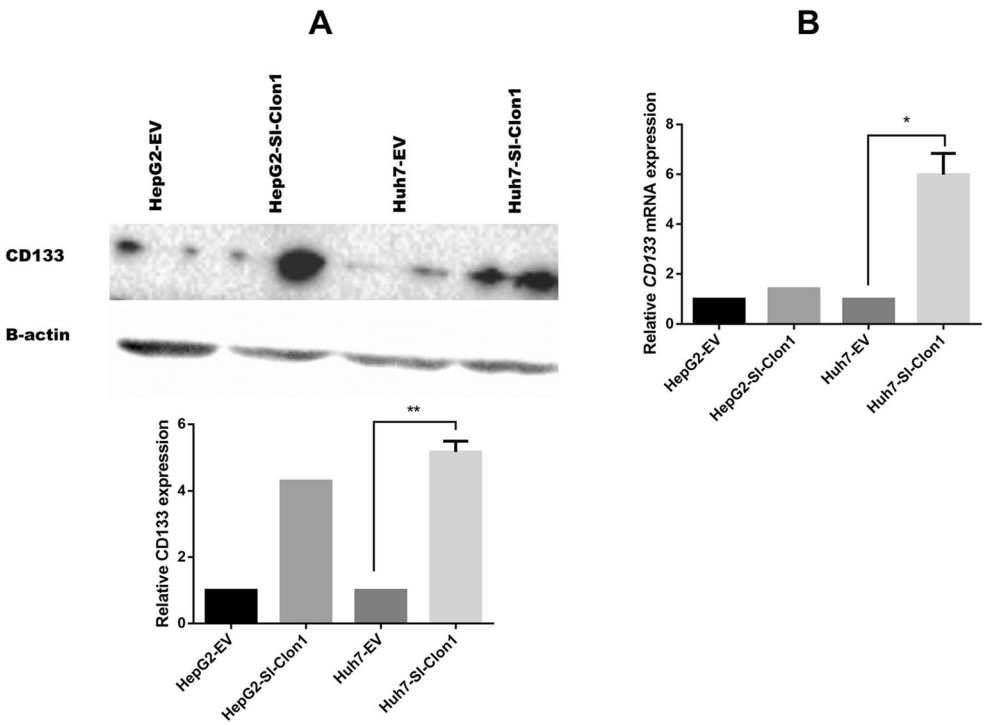


Fig. 7 Expression of CD133, a stemness marker, in Slug over-expressing cells. **A** Relative CD133 protein expression in HepG2-EV, HepG2-Sl-Clon1, Huh7-EV and Huh7-Sl-Clon1 cells determined by Western blotting. CD133 protein was upregulated in HepG2-Sl-Clon1 cells and Huh7-Sl-Clon1 cells. **B** Relative CD133 mRNA expression in HepG2-EV, HepG2-Sl-Clon1, Huh7-EV and Huh7-Sl-Clon1 cells determined by qRT-PCR. CD133 mRNA was upregulated in HepG2-Sl-Clon1 cells and Huh7-Sl-Clon1 cells. Since the HepG2-Sl-Clon1 cells lost Slug over-expression after passaging, the experiments were carried out only once in this group. All experiments with Huh7-Sl-Clon1 cells were performed as three independent biological replicates. Statistical comparisons were carried out using Student t-test (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$)

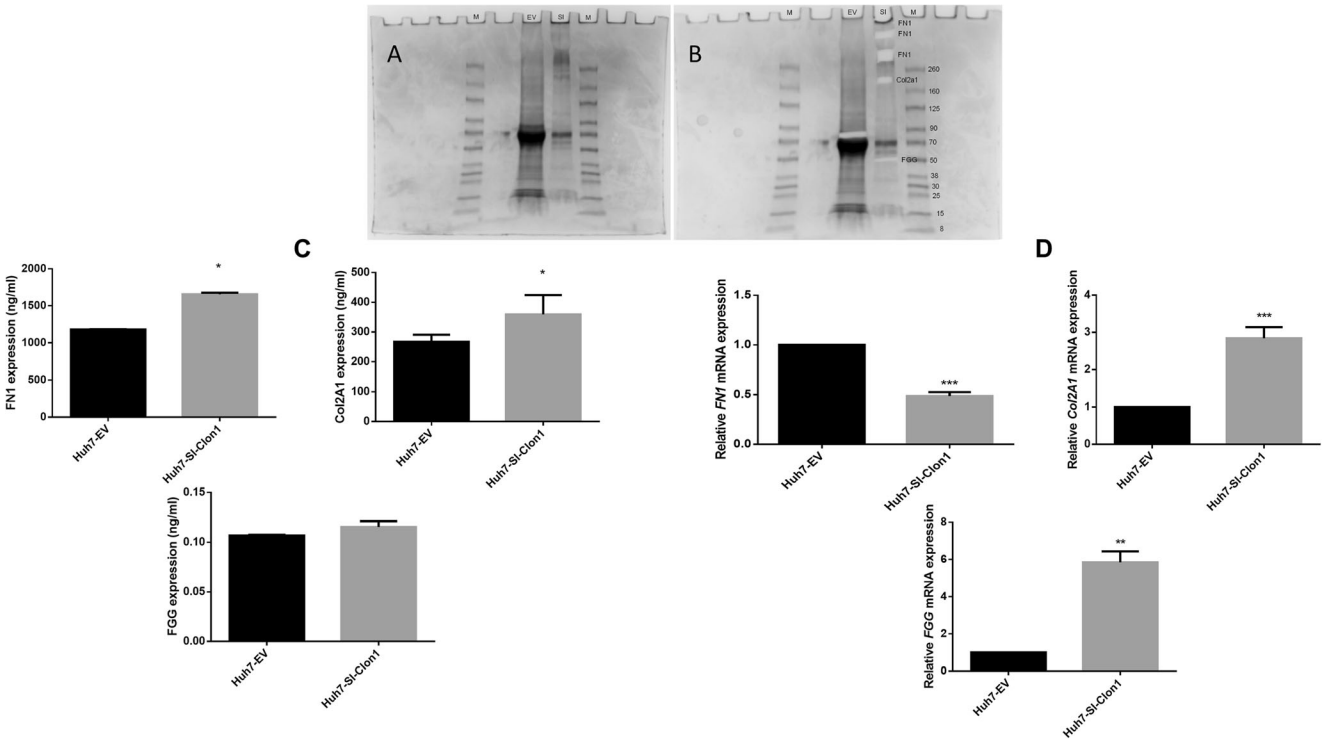


Fig. 8 Biomarker screening for chemoresistance and partial EMT from the secretome of Slug over-expressing cells. **A** SDS-PAGE analysis of molecular weight marker (M), exosomal and extracellular proteins isolated from Huh7-EV (EV) and Huh7-Sl-Clon1 (Sl) cells. A representative image of differentially expressed proteins is shown. **B** Empty rectangles indicate the bands that were excised and subjected to zip-tip and MALDI-TOF/TOF analyses. **C** ELISA of COL2A1, FGG and FN1 from conditioned media. COL2A1 and FN1 protein expression were increased in Huh7-Sl-Clon1 cells compared to control Huh7-EV cells. The FGG level could not be measured due to its low abundance. **D** qRT-PCR analysis of COL2A1, FGG and FN1 mRNA. COL2A1 and FGG mRNA expression were increased in Huh7-Sl-Clon1 cells compared to control Huh7-EV cells. A decrease in FN1 mRNA was observed in Huh7-Sl-Clon1 cells compared to control Huh7-EV cells. All experiments were carried out using three independent biological replicates. Statistical comparisons were carried out using Student t-test (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$)

transfected Huh7 cells, the FGG levels in both transiently Slug over-expressing HepG2 and Huh7 cells could not be determined in the conditioned media as its level was below the detection limit of the kit used. qRT-PCR analyses did not reveal any changes in the expression of the COL2A1 and FGG mRNAs, whereas a 10-fold downregulation of FN1 mRNA was observed in Slug transfected HepG2-Sl (Tr) cells. In contrast, we observed a 15 and 14-fold upregulation of the COL2A1 and FGG mRNAs, respectively, and a 10-fold downregulation of the FN1 mRNA in Slug transfected Huh7-Sl (Tr) cells compared to its corresponding empty vector transfected cells (Fig. 9B).

To further substantiate the roles of FN1, COL2A1 and/or FGG in the induction of either partial or total EMT, we examined a publicly available RNA sequencing dataset (GSE69667) [39]. In this study, the authors induced EMT in A549 lung adenocarcinoma cells with TGFβ in a time course of 0–96 h, and they reported that within a timeframe of 12–36 h the cells exhibited a partial epithelial/mesenchymal phenotype, whereas more epithelial and more mesenchymal characteristics were apparent at the earlier and later time points, respectively. Data for the 0, 36 and 72 h time points, representing epithelial, partial epithelial/mesenchymal and mesenchymal phenotypes, were extracted for analyses of our genes of interest. By doing so, we found that the COL2A1 mRNA expression level was increased 3-fold in the cells exhibiting a partial epithelial/mesenchymal phenotype compared to those exhibiting epithelial and mesenchymal phenotypes (Fig. 9C). Analysis of the same dataset revealed that FN1 was highly expressed at all time points, with a slight increase in expression at the later time points (Fig. 9C). We also found a decrease in the expression of FGG at all time points (data not shown) indicating that, unlike in HCC, this gene may not serve as an EMT biomarker in lung adenocarcinoma.

4 Discussion

Chemo-resistance has frequently been associated with the over-expression and activation of EMT markers such as the transcription factor Slug in a variety of cancer types [35,

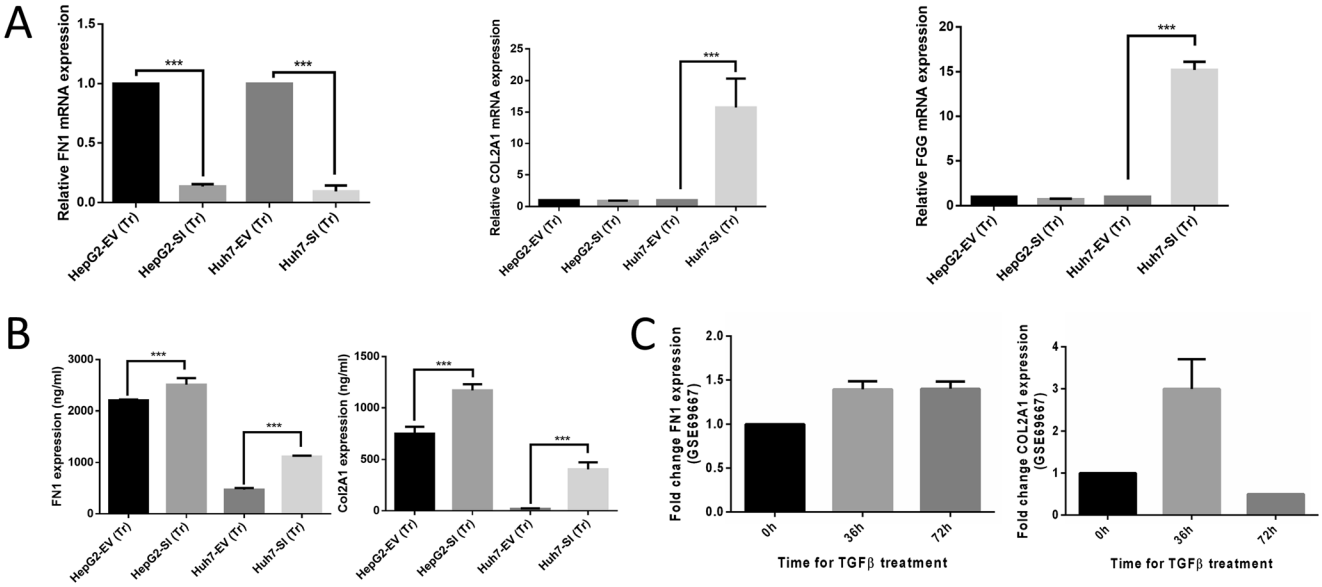


Fig. 9 **A** ELISA analysis of FN1 and COL2A1 proteins in conditioned media. COL2A1 and FN1 protein expression were increased in HepG2-Sl (Tr) and Huh7-Sl (Tr) cells compared to the respective control cells. **B** qRT-PCR analysis of COL2A1, FGG and FN1 mRNAs. Upregulated COL2A1 and FGG and down regulated FN1 levels were observed in Huh7-Sl (Tr) derived media. HepG2-Sl (Tr) cells showed a stable COL2A1 and FGG expression and a downregulated FN1 expression. **C** Analysis of a publicly available RNA sequencing dataset (GSE69667) revealed a higher COL2A1 expression in cells exhibiting a partial EMT phenotype (36 h) compared to cells with either epithelial (0 h) or mesenchymal (72 h) phenotypes. All experiments were performed using three independent biological replicates. Statistical comparisons were carried out using Student t-test (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$)

40–42]. Here, we exogenously over-expressed Slug in two different HCC-derived cell lines and report three primary events: (1) induction of complete and partial EMT in HepG2 and Huh7 cells, respectively, (2) induction of chemo-resistance and stemness in HCC cells undergoing both partial and complete EMT and (3) upregulation of post translationally modified fibronectin 1, collagen type II alpha 1 and native fibrinogen gamma chain, proteins that may be considered as potential biomarkers of chemo-resistance and partial EMT in HCC.

In HepG2 cells undergoing complete EMT the mRNA expression level of the mesenchymal marker ZEB2 was markedly upregulated whereas that of the epithelial marker E-cadherin was downregulated, in conformity with a canonical EMT program. These findings are consistent with a previous report [9]. Surprisingly, however, we found that ZEB2 and vimentin were downregulated while E-cadherin was upregulated in Slug expressing Huh7 cells undergoing partial EMT. Some literature reports have suggested an involvement of upregulated E-cadherin in EMT, and a transient upregulation of E-cadherin during partial EMT in HGF-induced (non-malignant) canine kidney MDCK cells has been noted [11]. In addition, it has been found that some advanced carcinomas can adopt mesenchymal features while retaining characteristics of well-differentiated epithelial cells [12]. It has also been suggested that murine EpH4 mammary tumor cells may be more aggressive and/or invasive without the involvement of classical epithelial or mesenchymal markers such as vimentin and E-cadherin [43]. In addition, it has been found that overexpression of a matrix metalloprotease can promote the invasion of MDCK cells in vivo, indicating that these non-malignant epithelial cells may become invasive through a partial EMT induction [44].

The repression of E-cadherin has been reported to be initiated by members of the Snail family and completed by members of the ZEB family of proteins [45]. Most other genes that are repressed during EMT have, however, been found to be inhibited by ZEB family members, irrespective of the EMT-inducing signal [46]. In the current work, one of the main differences between Slug-mediated complete and partial EMT may result from differences in ZEB2 expression. We found that Slug-mediated downregulation of ZEB2 in Huh7 cells results in partial EMT, suggesting that ZEB2 may be indispensable for the completion of EMT. Very recently, it has been reported that the transcription factor FOXO1 may reverse EMT in HCC cells by regulating the expression of EMT markers and transcriptional activators [47]. Overexpression of FOXO1 was found to repress the expression of ZEB2 without affecting the expression of Slug in Huh7 cells, again indicating a pivotal role of ZEB2 in partial EMT induction. Moreover, ZEB1 and ZEB2 have been found to be regulated by MYC-associated zinc finger protein (MAZ) in HCC cells. Silencing of MAZ resulted in a significant inhibition of HCC cell proliferation, tumorigenesis, invasion and migration [48], which further supports a role for ZEB2 in the decision to complete the EMT program. It has been

reported that ZEB2 over-expression may significantly enhance cell motility, invasiveness and vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through upregulation of the expression of VE-cadherin, Flt-1 and Flk-1 and activation of MMPs [49]. Based on these results, as well as those from our current study, we suggest that ZEB2 may act as a key regulator in the decision-making process for partial or complete EMT after Slug-induced initiation.

Chemo-resistance is a complex and dynamic process that is regulated through various mechanisms, including the activation of anti-apoptotic pathways, the expression of ABC transporters that can pump drugs out of the cell and DNA repair systems that can block the effects of DNA damage-inducing therapeutic agents [50]. It has also been found that chemo-resistance may be associated with EMT in pancreatic cancer [34] and prostate cancer [51]. As yet, however, chemo-resistance in the context of complete and partial EMT has been poorly studied. Here, we show that chemo-resistance can occur in HCC cells undergoing both complete and partial EMT. Chemo-resistance was evaluated by comparing the IC_{50} values of cisplatin, the accumulation of doxorubicin and the expression of ABC transporters in cells that showed either partial or complete EMT. Slug over-expression was found to lead to the development of resistance to cisplatin in cells undergoing both complete and partial EMT. The accumulation of doxorubicin was found to be decreased, implying the presence of more effective efflux pumps, which was corroborated by the observation of a significant increase in the expression of the ABC transporter ABCG2. These results are consistent with previous findings indicating that EMT and chemo-resistance are interrelated in HCC cells [52, 53]. Our data indicate that both complete and partial EMT may lead to the development of chemo-resistance, at least in part through upregulation of the ABCG2 transporter in HCC cells. The expression of ABCB1 was found to be downregulated in cells undergoing both complete and partial EMT, whereas the overall resistance to cisplatin was increased more than 2-fold in cells undergoing both types of EMT. Therefore, it may be suggested that Slug fine-tunes chemo-resistance by regulating the expression of the ABCB1 and ABCG2 transporters in HCC. Several other studies have reported similar data suggesting that Slug over-expression may enhance chemo-resistance in different cancer types [54–56]. Conversely, it has been suggested that Slug inhibition may enhance multi-drug resistance through the upregulation of ABCB1 and ABCG2 in HCC-derived MHCCLM3 and SMMC-7721 cells [57]. Together, these results imply an EMT-mediated plasticity and heterogeneity in HCC. Two cancer cell lines originating from the same primary tumor site, but propagated in different cellular contexts, may exhibit different responses to the same effectors. Together with this notion, we can conclude that drug resistance in HCC may be affected by altering the expression of Slug. Up- or downregulation of Slug expression may result in enhanced or inhibited chemo-resistance depending on the cellular context. Hence, a well-defined chemo-resistance profile of a given tumor seems to be a prerequisite for considering a possible Slug targeted therapy.

CD133 is a biomarker that is used to isolate HCC stem-like cells. CD133 positive cancer cells have been reported to exhibit higher proliferative, self-renewal and differentiation capacities compared to its negative counterparts [58]. CD133 positive cells may also exhibit an increased colony-forming efficiency in soft agar in vitro and an increased ability to form tumors in vivo [59]. It has been shown that liver cancer patients with high CD133 expression levels may exhibit shorter overall survival and higher relapse rates than those with low CD133 expression levels [60]. It has recently also been reported that in inflammatory liver microenvironments normal liver stem cells may transform to EMT-positive metastatic cancer stem cells [61]. Here, we found that CD133 upregulation was similar in cells undergoing complete and partial EMT, increasing both the motility and chemo-resistance of HCC cells.

We next aimed to identify potential chemo-resistance and partial EMT biomarkers in conditioned media from Slug over-expressing HCC cells using MALDI-TOF/TOF. The biomarkers that we identified were: post-translationally modified fibronectin1 (FN1), collagen type II alpha 1 (COL2A1) and native fibrinogen gamma chain (FGG). We conclude that these three proteins may serve as potential biomarkers for chemo-resistance and partial EMT in HCC. Interestingly, we found that FN1 mRNA was downregulated in HepG2 cells transiently over-expressing Slug and Huh7 cells stably and transiently over-expressing Slug, whereas the total (native and post-translationally modified) FN1 protein level was increased in the conditioned media. We conclude that upregulation of the FN1 protein may serve as a biomarker for both partial and complete EMT in HCC, although the fold increase in FN1 secretion in Huh7 cells undergoing partial EMT was 2.4 compared to a 1.1-fold increase in HepG2 cells undergoing complete EMT. These observations were substantiated using a publicly available RNA-sequencing dataset (GSE69667) showing that the expression of FN1 was consistently high in A549 lung adenocarcinoma cells, irrespective their epithelial, partially epithelial/mesenchymal or mesenchymal status. Here, we show that chemo-resistance in HCC cells may be associated with partial EMT, and that FN1 may serve as a chemo-resistance biomarker regardless of EMT status. Fibronectin is a large glycoprotein whose primary role is to attach cells to the extracellular matrix [62]. It may form dimers through disulfide bridge formation at the C-terminus. Each chain is approximately 2350 amino acids long and contains six domains harboring specific binding sites for integrins, sulfated proteoglycans, fibrin, denatured forms of collagen and DNA [63]. Human FN harbors seven potential N-glycosylation sites [64]. Alterations in glycan structure and

aberrant expression of FN are known to be involved in the proliferation, migration and invasion of cancer cells [65–68]. FN1 may be implicated in increased invasiveness of cells showing partial EMT since it is known that the oligosaccharide part of FN1 markedly enhances its affinity to gelatin, and promotes the adhesion and spread of fibroblasts [64, 69]. The post-translational addition of oligosaccharides to FN1 may also protect the molecule from proteolytic degradation, thereby enhancing its half-life [64]. These FN1 modifications may explain our contradictory findings of decreases in FN1 mRNA levels at one hand, whereas on the other hand post-translational modifications of the protein (such as glycosylation) may enhance its half-life as well as enhance its secretion by cells undergoing both partial or complete EMT.

In the past, oncogenic alterations of COL2A1 have been reported [70–72]. It has also been reported that the initiator methionine tRNA may upregulate the secretion of type II collagen from stromal fibroblasts to promote tumor growth and angiogenesis [70]. Also, type II collagen has been defined as a specific biomarker for mesenchymal chondrosarcomas [72]. Here we found that, while total and post-translationally modified COL2A1 protein and its mRNA levels were increased by 20 and 15-fold, respectively, in transiently Slug over-expressing cells exhibiting partial EMT, only a 1.5-fold increase in secreted Col2A1 protein and no change in its mRNA level were noted in HepG2 cells undergoing complete EMT. Based on these findings, we conclude that a dramatic upregulation of COL2A1 mRNA and protein may serve as a biomarker for partial EMT. This conclusion is substantiated by our analysis of a publicly available RNA sequencing dataset in A594 cells where a substantial increase in COL2A1 expression was seen in cells undergoing partial EMT compared to cells with epithelial or mesenchymal phenotypes.

Fibrinogen is a plasma glycoprotein synthesized in the liver that is composed of three structurally different subunits, i.e., alpha (FGA), beta (FGB) and gamma (FGG). Fibrinogen gamma (FGG) and the plasma level of fibrinogen have been reported to be abnormal in HCC patients and it has been claimed that elevated plasma fibrinogen levels may serve as useful predictors of disease progression [73]. Here, we found that the FGG mRNA levels were significantly increased in HCC cells undergoing partial EMT. Future studies are needed to establish whether post-translationally modified FN1 and COL2A1 protein levels and native FGG protein levels are also elevated in sera of patients exhibiting partial EMT, thereby firmly establishing the potential of these proteins to serve as biomarkers of partial EMT and chemo-resistance in HCC.

Acknowledgements We are grateful to Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK (Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey) for generously providing Huh7 cells, to Prof. Dr. Murat KASAP (Kocaeli University, Kocaeli, Turkey) for carrying out the MALDI-TOF/TOF experiments, to Ilir SHERAJ (Middle East Technical University, Ankara, Turkey) for bioinformatics analyses and to Melis ÇOLAKOĞLU (Middle East Technical University, Ankara, Turkey) for help with the Western blots. This study was supported by the Anadolu University (1508F587) and a Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK) 2211-C grant.

Author contributions Oğuzhan Karaosmanoğlu carried out the experiments and wrote the manuscript, Sreeparna Banerjee supervised the research and wrote the manuscript, and Hülya Sivas was responsible for the overall supervision of the research.

Compliance with ethical standards

Human and animal studies The authors did not perform experiments involving human participants or animal models in this study.

References

1. A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics. CA Cancer J Clin **61**, 69–90 (2011)
2. X. Ye, R.A. Weinberg, Epithelial-Mesenchymal plasticity: A central regulator of Cancer progression. Trends Cell Biol **25**, 675–686 (2015)
3. T.R. Samatov, A.G. Tonevitsky, U. Schumacher, Epithelial-mesenchymal transition: Focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. Mol Cancer **12**, 107 (2013)
4. S. Bugide, V.K. Gonugunta, V. Penugurti, V.L. Malisetty, R.K. Vadlamudi, B. Manavathi, HPIP promotes epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in ovarian cancer cells through PI3K/AKT pathway activation. Cell Oncol **40**, 133–144 (2017)
5. H. Peinado, F. Marin, E. Cubillo, H.J. Stark, N. Fusenig, M.A. Nieto, A. Cano, Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. J Cell Sci **117**, 2827–2839 (2004)
6. P. Savagner, D.F. Kusewitt, E.A. Carver, F. Magnino, C. Choi, T. Gridley, L.G. Hudson, Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. J Cell Physiol **202**, 858–866 (2005)
7. V. Bolos, H. Peinado, M.A. Perez-Moreno, M.F. Fraga, M. Esteller, A. Cano, The transcription factor slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: A comparison with snail and E47 repressors. J Cell Sci **116**, 499–511 (2003)
8. X.L. Zhao, B.C. Sun, D. Sun, T.J. Liu, N. Che, Q. Gu, X.Y. Dong, R. Li, Y.R. Liu, J. Li, Slug promotes hepatocellular cancer cell progression by increasing sox2 and nanog expression. Oncol Rep **33**, 149–156 (2015)
9. Y. Sun, G.D. Song, N. Sun, J.Q. Chen, S.S. Yang, Slug overexpression induces stemness and promotes hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis. Oncol Lett **7**, 1936–1940 (2014)
10. M. Zheng, Y.P. Jiang, W. Chen, K.D. Li, X. Liu, S.Y. Gao, H. Feng, S.S. Wang, J. Jiang, X.R. Ma, X. Cen, Y.J. Tang, Y. Chen, Y.F. Lin, Y.L. Tang, X.H. Liang, Snail and slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma. Oncotarget **6**, 6794–6810 (2015)
11. P. Leroy, K.E. Mostov, Slug is required for cell survival during partial epithelial-mesenchymal transition of HGF-induced tubulogenesis. Mol Biol Cell **18**, 1943–1952 (2007)
12. J.J. Christiansen, A.K. Rajasekaran, Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. Cancer Res **66**, 8319–8326 (2006)

13. M. Yu, A. Bardia, B.S. Wittner, S.L. Stott, M.E. Smas, D.T. Ting, S.J. Isakoff, J.C. Ciciliano, M.N. Wells, A.M. Shah, K.F. Concannon, M.C. Donaldson, L.V. Sequist, E. Brachtel, D. Sgroi, J. Baselga, S. Ramaswamy, M. Toner, D.A. Haber, S. Maheswaran, Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. Science **339**, 580–584 (2013)
14. L. Lobastova, D. Kraus, A. Glassmann, D. Khan, C. Steinhauser, C. Wolff, N. Veit, J. Winter, R. Probstmeier, Collective cell migration of thyroid carcinoma cells: A beneficial ability to override unfavourable substrates. Cell Oncol **40**, 63–76 (2017)
15. A. Lecharpentier, P. Vielh, P. Perez-Moreno, D. Planchard, J.C. Soria, F. Farace, Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. Br J Cancer **105**, 1338–1341 (2011)
16. R. Paduch, The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. Cell Oncol **39**, 397–410 (2016)
17. N. Aceto, A. Bardia, D.T. Miyamoto, M.C. Donaldson, B.S. Wittner, J.A. Spencer, M. Yu, A. Pely, A. Engstrom, H. Zhu, B.W. Brannigan, R. Kapur, S.L. Stott, T. Shioda, S. Ramaswamy, D.T. Ting, C.P. Lin, M. Toner, D.A. Haber, S. Maheswaran, Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. Cell **158**, 1110–1122 (2014)
18. A. Grosse-Wilde, A. Fouquier d'Herouel, E. McIntosh, G. Ertaylan, A. Skupin, R.E. Kuestner, A. del Sol, K.A. Walters, S. Huang, Stemness of the hybrid epithelial/Mesenchymal state in breast Cancer and its association with poor survival. PLoS One **10**, e0126522 (2015)
19. K.M. Danielson, S. Das, Extracellular vesicles in heart disease: Excitement for the future ? Exosomes and Microvesicles **2** (2014). https://doi.org/10.5772/58390
20. C. Villarroya-Beltri, F. Baixauli, C. Gutierrez-Vazquez, F. Sanchez-Madrid, M. Mittelbrunn, Sorting it out: Regulation of exosome loading. Semin Cancer Biol **28**, 3–13 (2014)
21. D.W. Greening, S.K. Gopal, R.A. Mathias, L. Liu, J.Y. Sheng, H.J. Zhu, R.J. Simpson, Emerging roles of exosomes during epithelial-mesenchymal transition and cancer progression. Semin Cell Dev Biol **40**, 60–71 (2015)
22. Y. Shao, Y. Shen, T. Chen, F. Xu, X. Chen, S. Zheng, The functions and clinical applications of tumor-derived exosomes. Oncotarget **7**, 60736–60751 (2016)
23. V. Sundararajan, F.H. Sarkar, T.S. Ramasamy, The versatile role of exosomes in cancer progression: Diagnostic and therapeutic implications. Cell Oncol **41**, 223–252 (2018)
24. M. Sponziello, F. Rosignolo, M. Celano, V. Maggisano, V. Pecce, R.F. De Rose, G.E. Lombardo, C. Durante, S. Filetti, G. Damante, D. Russo, S. Bulotta, Fibronectin-1 expression is increased in aggressive thyroid cancer and favors the migration and invasion of cancer cells. Mol Cell Endocrinol **431**, 123–132 (2016)
25. M. Agajanian, F. Runa, J.A. Kelber, Identification of a PEAK1/ZEB1 signaling axis during TGFbeta/fibronectin-induced EMT in breast cancer. Biochem Biophys Res Commun **465**, 606–612 (2015)
26. O. Tang, X.M. Chen, S. Shen, M. Hahn, C.A. Pollock, MiRNA-200b represses transforming growth factor-beta1-induced EMT and fibronectin expression in kidney proximal tubular cells. Am J Physiol Renal Physiol **304**, F1266–F1273 (2013)
27. M. Kajita, K.N. McClinic, P.A. Wade, Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. Mol Cell Biol **24**, 7559–7566 (2004)
28. F.L. Graham, A.J. van der Eb, A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology **52**, 456–467 (1973)
29. M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res **29**, e45 (2001)
30. J. Wang, Q. Wei, X. Wang, S. Tang, H. Liu, F. Zhang, M.K. Mohammed, J. Huang, D. Guo, M. Lu, F. Liu, J. Liu, C. Ma, X. Hu, R.C. Haydon, T.C. He, H.H. Luu, Transition to resistance: An unexpected role of the EMT in cancer chemoresistance. Genes Dis **3**, 3–6 (2016)
31. G. Repetto, A. del Peso, J.L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nat Protoc **3**, 1125–1131 (2008)
32. C. Thery, S. Amigorena, G. Raposo, A. Clayton, Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids, Curr Protoc cell biol **chapter 3**. Unit **3**, 22 (2006)
33. G. Akpinar, M. Kasap, N.Z. Canturk, M. Zulfigarova, E.E. Islek, S.A. Guler, T. Simsek, Z. Canturk, Proteomics analysis of tissue samples reveals changes in mitochondrial protein levels in parathyroid hyperplasia over adenoma. Cancer Genomics Proteomics **14**, 197–211 (2017)
34. X.F. Zheng, J.L. Carstens, J. Kim, M. Scheible, J. Kaye, H. Sugimoto, C.C. Wu, V.S. LeBleu and R. Kalluri, Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer, Nature **527**, 525–530 (2015)
35. N.K. Kurrey, S.P. Jalgaonkar, A.V. Joglekar, A.D. Ghanate, P.D. Chaskar, R.Y. Doiphode, S.A. Bapat, Snail and slug mediate Radioresistance and Chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian Cancer cells. Stem Cells **27**, 2059–2068 (2009)
36. Z.Y. Du, R.Y. Qin, C.F. Wei, M. Wang, C.J. Shi, R. Tian, C.H. Peng, Pancreatic Cancer cells resistant to Chemoradiotherapy rich in "stem-cell-like" tumor cells. Digest Dis Sci **56**, 741–750 (2011)
37. L.F. Zhu, Y. Hu, C.C. Yang, X.H. Xu, T.Y. Ning, Z.L. Wang, J.H. Ye and L.K. Liu, Snail overexpression induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells, Lab Invest **92**, 744–752 (2012)
38. U. Manne, T. Jadhav, B.D.K. Putcha, T. Samuel, S. Soni, C. Shanmugam, E.A. Suswam, Molecular biomarkers of colorectal Cancer and Cancer disparities: Current status and perspective. Curr Colorect Canc R **12**, 332–344 (2016)
39. H. Chang, Y. Liu, M. Xue, H. Liu, S. Du, L. Zhang, P. Wang, Synergistic action of master transcription factors controls epithelial-to-mesenchymal transition. Nucleic Acids Res **44**, 2514–2527 (2016)
40. Y. Pan, P. Liu, D. Chen, L. Dou, Small interfering RNA (siRNA) against slug induces apoptosis and sensitizes human anaplastic thyroid carcinoma cells to doxorubicin. Cancer Biomark **18**, 357–366 (2017)
41. K. Tsukasa, Q. Ding, M. Yoshimitsu, Y. Miyazaki, S. Matsubara, S. Takao, Slug contributes to gemcitabine resistance through epithelial-mesenchymal transition in CD133(+) pancreatic cancer cells. Hum Cell **28**, 167–174 (2015)
42. D.P. Liang, T.Q. Huang, S.J. Li, Z.J. Chen, Knockdown of S100A4 chemosensitizes human laryngeal carcinoma cells in vitro through inhibition of slug. Eur Rev Med Pharmacol Sci **18**, 3484–3490 (2014)
43. J. Pinkas, P. Leder, MEK1 signaling mediates transformation and metastasis of EpH4 mammary epithelial cells independent of an epithelial to mesenchymal transition. Cancer Res **62**, 4781–4790 (2002)
44. P. Soulie, F. Carrozzino, M.S. Pepper, A.Y. Strongin, M.F. Poupon, R. Montesano, Membrane-type-1 matrix metalloproteinase confers tumorigenicity on nonmalignant epithelial cells. Oncogene **24**, 1689–1697 (2005)
45. A. Garcia de Herreros, J. Baulida, Cooperation, amplification, and feed-back in epithelial-mesenchymal transition. Biochim Biophys Acta **1825**, 223–228 (2012)
46. J.H. Taube, J.I. Herschkowitz, K. Komurov, A.Y. Zhou, S. Gupta, J. Yang, K. Hartwell, T.T. Onder, P.B. Gupta, K.W. Evans, B.G. Hollier, P.T. Ram, E.S. Lander, J.M. Rosen, R.A. Weinberg, S.A. Mani, Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic

breast cancer subtypes. P Natl Acad Sci USA **107**, 15449–15454 (2010)
47. T.X. Dong, Y. Zhang, Y.D. Chen, P.F. Liu, T.T. An, J.W. Zhang, H.C. Yang, W.J. Zhu, X.H. Yang, FOXO1 inhibits the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by reversing ZEB2-induced epithelial-mesenchymal transition. Oncotarget **8**, 1703–1713 (2017)
48. W. Luo, X.N. Zhu, W. Liu, Y. Ren, C.H. Bei, L.Y. Qin, X.Y. Miao, F. Tang, G.F. Tang, S.K. Tan, MYC associated zinc finger protein promotes the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by inducing epithelial mesenchymal transition. Oncotarget **7**, 86420–86432 (2016)
49. Z.H. Yang, B.C. Sun, Y.L. Li, X.L. Zhao, X.M. Zhao, Q. Gu, J.D. An, X.Y. Dong, F. Liu, Y. Wang, ZEB2 promotes vasculogenic mimicry by TGF-beta 1 induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. Exp Mol Pathol **98**, 352–359 (2015)
50. J.K. Kim, H.Y. Jeon, H. Kim, The molecular mechanisms underlying the therapeutic resistance of cancer stem cells. Arch Pharm Res **38**, 389–401 (2015)
51. N.J.-p. Martin, S. Cotteret, C. Gaudin, M. Garrido, S. Aarab-Terrisse, N. al Nakouzi, L. Gentilini, D. Compagno, V. Ogryzko, G. Meurice, K. Fizazi, A. Chauchereau, Abstract 2995: Loss of SHISA3 is an early event of the epithelial-to-mesenchymal transition associated with chemoresistance in prostate cancer. Cancer Res **75**, 2995–2995 (2015)
52. Q. Wu, X. Wang, J. Liu, J.Y. Zheng, Y. Liu, Y.M. Li, F. Su, W.L. Ou, R. Wang, Nutlin-3 reverses the epithelial-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant hepatocellular carcinoma cells. Oncol Rep **36**, 1325–1332 (2016)
53. P.F. Zhang, K.S. Li, Y.h. Shen, P.T. Gao, Z.R. Dong, J.B. Cai, C. Zhang, X.Y. Huang, M.X. Tian, Z.Q. Hu, D.M. Gao, J. Fan, A.W. Ke, G.M. Shi, Galectin-1 induces hepatocellular carcinoma EMT and sorafenib resistance by activating FAK/PI3K/AKT signaling. Cell Death &Amp; Disease **7**, e2201 (2016)
54. T.H. Chang, M.F. Tsai, K.Y. Su, S.G. Wu, C.P. Huang, S.L. Yu, Y.L. Yu, C.C. Lan, C.H. Yang, S.B. Lin, C.P. Wu, J.Y. Shih and P.C. Yang, Slug confers resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, Am J Resp Crit Care **183**, 1071–1079 (2011)
55. B. Uygur, K. Abramo, E. Leikina, C. Vary, L. Liaw, W.S. Wu, SLUG is a direct transcriptional repressor of PTEN tumor suppressor. Prostate **75**, 907–916 (2015)
56. A.M. Haslehurst, M. Koti, M. Dharsee, P. Nuin, K. Evans, J. Geraci, T. Childs, J. Chen, J. Li, J. Weberpals, S. Davey, J. Squire, P.C. Park, H. Feilotter, EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. BMC Cancer **12**, 91 (2012)
57. X.-Y. Zhao, L. Li, X.-B. Wang, R.-J. Fu, Y.-P. Lv, W. Jin, C. Meng, G.-Q. Chen, L. Huang and K.-W. Zhao, Inhibition of snail family transcriptional repressor 2 (SNAI2) enhances multidrug resistance of hepatocellular carcinoma cells, PLoS One **11**, e0164752 (2016)
58. A. Suetsugi, M. Nagaki, H. Aoki, T. Motohashi, T. Kunisada, H. Moriwaki, Characterization of CD133(+) hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. Biochem Bioph Res Co **351**, 820–824 (2006)
59. S. Ma, K.W. Chan, L. Hu, T.K.W. Lee, J.Y.H. Wo, I.L. Ng, B.J. Zheng, X.Y. Guan, Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. Gastroenterology **132**, 2542–2556 (2007)
60. W. Song, H. Li, K. Tao, R. Li, Z. Song, Q. Zhao, F. Zhang, K. Dou, Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma. Int J Clin Pract **62**, 1212–1218 (2008)
61. A. Mitra, J. Yan, X. Xia, S. Zhou, J. Chen, L. Mishra, S. Li, IL6-mediated inflammatory loop reprograms normal to epithelial-mesenchymal transition+ metastatic cancer stem cells in preneoplastic liver of transforming growth factor beta-deficient beta2-spectrin+/− mice. Hepatology **65**, 1222–1236 (2017)
62. E. Ruoslahti, Fibronectin and its receptors. Annu Rev Biochem **57**, 375–413 (1988)
63. R. Hynes, Molecular-biology of Fibronectin. Annu Rev Cell Biol **1**, 67–90 (1985)
64. M. Tajiri, S. Yoshida, Y. Wada, Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: Application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment. Glycobiology **15**, 1332–1340 (2005)
65. S. Xia, C. Wang, E.L. Postma, Y. Yang, X. Ni, W. Zhan, Fibronectin 1 promotes migration and invasion of papillary thyroid cancer and predicts papillary thyroid cancer lymph node metastasis. Onco Targets Ther **10**, 1743–1755 (2017)
66. J.P. Wang, A. Hielscher, Fibronectin: How its aberrant expression in tumors may improve therapeutic targeting. J Cancer **8**, 674–682 (2017)
67. E. Sundquist, J.H. Kauppila, J. Veijola, R. Mroueh, P. Lehenkari, S. Laitinen, J. Risteli, Y. Soini, V.M. Kosma, I. Sawazaki-Calone, C.C. Macedo, R. Bloigu, R.D. Coletta, T. Salo, Tenascin-C and fibronectin expression divide early stage tongue cancer into low- and high-risk groups. Br J Cancer **116**, 640–648 (2017)
68. N. Kanaji, N. Kita, N. Kadowaki, S. Bandoh, Fibronectin and hepatocyte growth factor produced by lung fibroblasts augment migration and invasion of malignant pleural mesothelioma cells. Anticancer Res **37**, 2393–2400 (2017)
69. G.E. Jones, R.G. Arumugham, M.L. Tanzer, Fibronectin glycosylation modulates fibroblast adhesion and spreading. J Cell Biol **103**, 1663–1670 (1986)
70. C.J. Clarke, T.J. Berg, J. Birch, D. Ennis, L. Mitchell, C. Cloix, A. Campbell, D. Sumpton, C. Nixon, K. Campbell, V.L. Bridgeman, P.B. Vermeulen, S. Foo, E. Kostaras, J.L. Jones, L. Haywood, E. Pulleine, H. Yin, D. Strathdee, O. Sansom, K. Blyth, I. McNeish, S. Zanivan, A.R. Reynolds, J.C. Norman, The initiator methionine tRNA drives secretion of type II collagen from stromal fibroblasts to promote tumor growth and angiogenesis. Curr Biol **26**, 755–765 (2016)
71. T. Yoshida, M. Hashimura, T. Kuwata, T. Matsumoto, E. Suzuki, Y. Tazo, H. Nakajima, M. Inukai, M. Saegusa, Transcriptional regulation of the alpha-1 type II collagen gene by nuclear factor B/p65 and Sox9 in the chondrocytic phenotype of uterine carcinosarcomas. Hum Pathol **44**, 1780–1788 (2013)
72. S. Muller, S. Soder, A.M. Oliveira, C.Y. Inwards, T. Aigner, Type II collagen as specific marker for mesenchymal chondrosarcomas compared to other small cell sarcomas of the skeleton. Mod Pathol **18**, 1088–1094 (2005)
73. W.L. Zhu, B.L. Fan, D.L. Liu, W.X. Zhu, Abnormal expression of fibrinogen gamma (FGG) and plasma level of fibrinogen in patients with hepatocellular carcinoma. Anticancer Res **29**, 2531–2534 (2009)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Oğuzhan KARAOSMANOĞLU

Yabancı Dil: İngilizce

Doğum Yeri ve Yılı: Kahramanmaraş/1985

E-Posta: oguzhankaraosmanoglu@windowslive.com

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2013, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, Yüksek Lisans
- 2009, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Lisans
- 2011, Araştırma Görevlisi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
- 2010, Araştırma Görevlisi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi

Eserleri:

- Karaosmanoğlu O, Banerjee S, Sivas H (2018). Identification of biomarkers associated with partial epithelial to mesenchymal transition in the secretome of slug over-expressing hepatocellular carcinoma cells, Cellular Oncology.
- Kuete V, Ngnintedo D, Fotso G.W, Karaosmanoğlu O, Ngadjui T, Keumedjio F, Yeboah O, Andrae-Marobela K, Sivas H (2018) Cytotoxicity of seputhecarpan D, thonningiol and 12 other phytochemicals from African flora towards human carcinoma cells, Bmc Complementary and Alternative Medicine 18, 36.
- Kuete V, Fokou F, Karaosmanoğlu O, Beng V, Sivas H (2017). Cytotoxicity of the methanol extracts of Elephantopus mollis, Kalanchoe crenata and 4 other Cameroonian medicinal plants towards human carcinoma cells. BMC Complementary and Alternative Medicine, 17(1), Doi: 10.1186/s12906-017-1793-1.
- Kuete V, Mafodong D, Çelik İ, Fobofou S, Ndontsa BL, Karaosmanoğlu O, Weissjohann LA, Tane P, Koparal AT, Sivas H (2017). In vitro cytotoxicity of compounds isolated from Desbordesia glaucescens against human carcinoma cell lines. South African Journal of Botany, 111, 37-43., Doi: 10.1016/j.sajb.2017.03.031.

- Ünver H, Boyacıoğlu B, Zeyrek CT, Yıldız M, Demir N, Yıldırım N, Karaosmanoğlu O, Sivas H, Elmalı A (2016). Synthesis spectral and quantum chemical studies and use of E 3 3 5 bis trifluoromethyl phenylimino methyl benzene 1 2 diol and its Ni II and Cu II complexes as an anion sensor DNA binding DNA cleavage anti microbial anti mutagenic and anti cancer agent. Journal of Molecular Structure, 1125, 162-176., Doi: 10.1016/j.molstruc.2016.06.058.
- Kuete V, Omosa L, Tala V, Mıdıwo J, Mbaveng A, Swaleh S, Karaosmanoğlu O, Sivas H (2016). Cytotoxicity of Plumbagin Rapanone and 12 other naturally occurring Quinones from Kenyan Flora towards human carcinoma cells. BMC Pharmacology and Toxicology, 17(1), Doi: 10.1186/s40360-016-0104-7.
- Ngnıntedo D, Fotso G, Kuete V, Nana F, Sandjo L, Karaosmanoğlu O, Sivas H, Kmedjıo F, Kırsch G, Ngadjuı B, Andrae MK (2016). Two new pterocarpans and a new pyrone derivative with cytotoxic activities from Ptycholobium contortum N E Br Brummitt Leguminosae revised NMR assignment of mundulea lactone. Chemistry Central Journal, 10(1), Doi: 10.1186/s13065-016-0204-x.
- MEDICINAL SPICES AND VEGETABLES FROM AFRICA: Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases, Bölüm adı:(Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables) (2017)., Kuete V, Karaosmanoğlu O, Sivas H, Elsevier, Editör:Victor Kuete, Basım sayısı:1, ISBN:978-0-12-809286-6, İngilizce(Bilimsel Kitap).