

**Huh-7 İnsan Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hatlarının
Fenotipik Farklılaşmasında Depo-Kontrollü Kalsiyum
Girişinin İşlevsel Genomik Analizi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 113S399

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Metiner TOSUN

Araştırmacılar:

Doç. Dr. Yasemin ERAÇ
Doç. Dr. Buket KOSOVA
Yrd. Doç. Dr. Can KÜÇÜK

Danışmanlar:

Prof. Dr. Şerife Esra ERDAL
Doç. Dr. Ralph Leo Johan MEUWISSEN

Bursiyer:

Bilge KARAÇİÇEK

MAYIS 2017
İZMİR

ÖNSÖZ

Bu proje kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların tamamı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Araştırma Projesi (SBAG 113S399, MT) tarafından desteklenmiştir.

Çalışmalar E.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji AD, Farmasötik Bilimler Araştırma laboratuvarında (FABAL, DPT Altyapı Projesi, 2009K120640), akış sitometrisi ile hücre seçimi İzmir Biotıp ve Genom Enstitüsü (Dokuz Eylül Üniversitesi, DEÜ-İBG), miRNA dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) ve mRNA mikrodizin (microarray, transcriptome) çalışmaları DONE Genetik ve Biyoinformatik A.Ş. laboratuvarlarında NextSeq 500 (Illumina) ve mikrodizin çip okuma IScan (Illumina) cihazları ile bursiyerimizin sürece katılımı ile yapılmıştır. miRNA dizileme ve mRNA mikrodizin analizleri Yrd. Doç. Dr. Can KÜÇÜK (DEÜ-İBG) tarafından kontrol edilerek doğrulanmıştır.

Bulgular kısmi olarak "Role of Endoplasmic Reticulum in phenotypical differentiation of Huh7 Hepatocellular Carcinoma Cell Lines" başlığı ile *Frontiers in Stem Cell and Cancer* (Karacicek B, Erac Y, Selli C, Kosova B, Tosun M, European Molecular Biology Organization/Laboratory EMBO/EMBL, 29-31 Mart 2015, Heidelberg, Almanya) kongresinde, "Effects of STIM1 and Orai1 proteins on the differentiation of hepatocellular cancer stem cell-like cells" başlığı ile de *FEBS Journal* dergisinde (Karacicek B, Erac Y, Tosun M. *FEBS J*, 283(suppl.1):308-308, 2016. doi: 10.1111/febs.13808) poster özeti olarak yayınlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

İçindekiler

1	GENEL BİLGİLER	1
1.1	Kalsiyum	1
1.2	TRP Kanalları	5
1.2.1	TRPC	7
1.2.2	TRPC Aile Üyelerinin Özellikleri	8
1.2.3	TRPC ile Oluşturulan Kompleksler	9
1.3	Endoplazmik Retikulum (ER).....	10
1.4	Depo-Kontrollü Ca ⁺² Girişi (Store Operated Ca ⁺² Entry, SOCE).....	12
1.4.1	ER ve SOCE	12
1.4.2	SOCE'nin Kanserdeki İşlevi.....	15
1.5	Kök Hücre	16
1.5.1	Kanser Kök Hücreleri.....	17
1.6	Hepatoselüler Karsinoma	17
1.6.1	HCC'de Kanser Kök Hücrelerinin Kökeni	18
1.6.2	HCC'de CSC Belirteçleri.....	19
1.7	Mikro RNA (miRNA)	19
1.7.1	miRNA Biyogenezi.....	20
1.7.2	miRNA'ların Özellikleri.....	20
1.7.3	miRNA ve HCC.....	21
1.8	Kanserde Çoklu İlaç Direnç Kavramı	22
1.9	Epitelyal Mezenkimal Geçiş (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT)	23
2	GEREÇ ve YÖNTEM.....	24
2.1	Huh7 HCC Hücre Hattı Kültürü.....	24
2.1.1	Huh7 HCC Hücre Hattı Kimlik Doğrulaması	24
2.1.2	Mikoplazma Kontrolü	25
2.2	FACS ile EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Hücrelerin Ayrılması.....	25
2.2.1	Akış Sitometrisi ile EpCAM ⁺ CD133 ⁺ ve EpCAM ⁻ CD133 ⁻ Hücre Popülasyonlarının Belirlenmesi	25
2.2.2	İmmünofloresan (IF) ile EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Yüzey Antijenlerini taşıyan Huh7 Hücrelerinin Belirlenmesi	26
2.3	Plazmid Vektörlerin Bakteriyel Transformasyonla Çoğaltılması ve Saflaştırılması	26
2.3.1	Plazmidlerin Çoğaltılması	26

2.3.2	FACS ile Seçilen EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh7 Hücrelerinde eYFPStim1 ve CFPOrai1 Transfeksiyonu	29
2.4	Konvensiyonel PCR.....	29
2.5	RNA İzolasyonu	29
2.6	cDNA Sentezi:	30
2.7	Gerçek Zamanlı Nicel RT-PCR (Real Time quantitative Reverse Transcriptase PCR, qRT-PCR)	30
2.8	Protein Analizleri (Western Blot).....	31
2.8.1	Protein İzolasyonu	32
2.8.2	SDS Jel Elektroforezi.....	32
2.9	Hücre içi Ca ⁺² Konsantrasyon Değişimlerin Gerçek Zamanlı İzlenmesi	34
2.10	İnvazyon ve Migrasyon Deneyleleri	34
2.10.1	İnvazyon	35
2.10.2	Migrasyon	35
2.11	miRNA dizileme ve mikrodizin çalışmaları	36
2.11.1	Total RNA İzolasyonu	36
2.11.2	Total RNA'larda Kalite Kontrolü	37
2.11.3	Total RNA Örneklerinin RIN Değerleri.....	38
2.12	Küçük RNA (small RNA, sRNA) Dizileme	39
2.12.1	Adaptörlerin Bağlanması	39
2.12.2	cDNA Sentezi ve Kütüphanelerin Amplifikasyonu	40
2.12.3	Jel Elektroforezi ve cDNA'ların Jelden İzolasyonu	42
2.12.4	Kütüphane Validasyonu.....	44
2.12.5	Dizileme	44
2.12.6	Ön Analiz	44
2.13	Total RNA Mikrodizin çalışmaları	45
2.13.1	RNA Amplifikasyonu	46
2.13.2	Çipin Görüntülenmesi ve Analizi.....	48
2.14	Yumuşak Agarda Koloni Oluşturma (Soft agar assay).....	49
2.15	Sferoid oluşturma	49
2.16	Gerçek zamanlı Hücre Analizi (Real Time Cell Analyzer, RTCA)	49
2.17	Çoklu İlaç Direnci (Multiple Drug Resistance, MDR) İlaç Atılım (Drug Efflux) Deneyleleri	50
2.18	Elektrofizyoloji (Patch Clamp).....	50
3	BULGULAR	51
3.1	Parantel Huh7 Hücre Hattının Kimlik Doğrulaması	51
3.2	Akış Sitometrisi ile EpCAM ⁺ CD133 ⁺ ve EpCAM ⁻ CD133 ⁻ Huh7 Hücrelerin Seçilmesi.....	51
3.2.1	İmmünofluoresan (IF) Mikroskopisi ile EpCAM İfade Eden Hücrelerin Belirlenmesi	52
3.3	[Ca ⁺²] _i değişimlerinin izlenmesi.....	53

3.3.1	EpCAM ⁺ CD133 ⁺ veya EpCAM ⁻ CD133 ⁻ Huh-7 Hücrelerinde ER ve SOCE İlişkili Ca ⁺² Artışları.....	53
3.4	RT-PCR BULGULARI.....	59
3.4.1	STIM1 ve Orai1 Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	59
3.4.2	MDR1.....	62
3.4.3	STIM1-OE, Orai1-OE, STIM1+Orai1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh7 Hücrelerinde EMT Belirteçlerinin mRNA Düzeyleri	63
3.4.4	EpCAM ⁺ CD133 ⁺ ve EpCAM ⁻ CD133 ⁻ Huh7 hücrelerinde <i>TRPC1</i> mRNA İfadesi	65
3.5	Western Blot	66
3.6	İnvazyon ve Migrasyon Analizleri	68
3.7	Çoklu İlaç Direnci (Multiple Drug Resistance, MDR) İlaç Atılım Deneyleri	70
3.8	Total RNA Mikrodizin Çalışmaları	71
3.8.1	Verilerin Kalite Kontrolü	71
3.8.2	Cluster (Kümeleme) Analizleri	72
3.8.3	İstatiksel Analizler	73
3.9	miRNA (micro RNA) Dizileme.....	76
3.9.1	DİZİLEME	76
3.9.2	ÖN ANALİZ.....	77
3.9.3	Sonuçlar.....	78
3.10	Hücre Proliferasyonunun Gerçek Zamanlı İzlenmesi.....	81
3.11	Sferoid Oluşturma.....	82
3.12	Yumuşak Agarda Koloni Oluşturma	84
3.13	Elektrofizyoloji (Patch Clamp).....	85
4	TARTIŞMA.....	87
5	SONUÇ.....	93

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Hücreiçi Ca^{+2} sinyalinin uzamsal etkileri.....	2
Şekil 1.2. Plazma membranında bulunan düzenlenmiş Ca^{+2} giriş yolları.....	4
Şekil 1.3. TRP kanal süper ailesinin filogenetik ağacı.....	6
Şekil 1.4. TRP kanallarının topolojisi.....	6
Şekil 1.5. Endoplazmik retikulumda gerçekleşen hücrel işlevler ve diğer organellerle etkileşim.	12
Şekil 1.6. SOCE aktivasyonu.	13
Şekil 1.7. SOCE'ye aracılık eden moleküller.....	14
Şekil 1.8. Asimetrik ve simetrik kök hücre bölünmesi.	16
Şekil 1.9. Stokastik hipotez ve Hiyerarşik hipotez.....	17
Şekil 1.10. Hepatik kanser kök hücrelerinin oluşması (hipotetik model).	19
Şekil 1.11. miRNA biogenezi.....	21
Şekil 1.12. ABC transportörlerinin genel işleyiş mekanizması.	22
Şekil 2.1. Akış sitometrisi ile ayırıştırma sonrası gerçekleştirilen deneyler.....	24
Şekil 2.2. eYFP STIM1' cDNA'sı taşıyan MO70 plazmid haritası.	27
Şekil 2.3. CFP Orai1 cDNA'sını taşıyan pDEST501 plazmid haritası.	27
Şekil 2.4. İnvazyon ve migrasyon deneylerinde kullanılan kuyucuğun şematik görünümü.	35
Şekil 2.5. Total RNA'lara ait elektroferogramlar.	38
Şekil 2.6. İzole edilen total RNA örneklerinin sanal jel görüntüsü.....	38
Şekil 2.7. sRNA Dizileme Akış Şeması.....	39
Şekil 2.8. Adaptörlerin bağlanması.....	40
Şekil 2.9. RT ve Kütüphanelerin Amplifikasyonu.....	42
Şekil 2.10. Biyoanalizör çıktısı.....	42
Şekil 2.11. Jelin transluminatördeki görünümü.....	43
Şekil 2.12. "HRL Ladder" ve "CRL ladder" bantların boyutu ve örnekler.	43
Şekil 2.13. Transkriptom analizinde kullanılan gen çipi.....	46
Şekil 2.14. Illumina TotalPrep RNA Amplifikasyon süreci.	47
Şekil 2.15. Biotin işaretli cRNA ipliklerinin çipe hibridizasyonu.	48
Şekil 3.1. Parental Huh7 hücreleri.....	51
Şekil 3.2. Akış sitometrisi ile ayırıştırılan hücrelerin şematik gösterimi.....	52
Şekil 3.3. EpCAM ⁺ Huh7 hücrelerinde EpCAM yüzey antijeninin dağılımı.	52
Şekil 3.4. SOCE deney protokolüne ait hücreiçi Ca^{+2} konsantrasyonunda zamana bağlı tipik değişim.	53
Şekil 3.5. EpCAM ⁺ CD133 ⁺ ve EpCAM ⁻ CD133 ⁻ Huh-7 hücrelerinde ER Ca^{+2} salıverilişi ve SOCE düzeylerindeki değişim.	54
Şekil 3.6. Transfeksiyon sonrası EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh7 hücrelerinin faz kontrast ve floresan görüntüleri.....	55
Şekil 3.7. STIM1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh-7 hücrelerinde ER Ca^{+2} salıverilişi ve SOCE.	56
Şekil 3.8 EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh-7 Orai1-OE hücrelerde ER Ca^{+2} salıverilişi ve SOCE.....	57
Şekil 3.9 STIM1-Orai1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh-7 hücrelerinde ER Ca^{+2} salıverilişi ve SOCE.	58
Şekil 3.10. EpCAM ⁺ CD133 ⁺ ve EpCAM ⁻ CD133 ⁻ Huh-7 hücrelerinde STIM1ve Orai1 transkripsiyon düzeyi.	59
Şekil 3.11. STIM1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh-7 hücrelerinde STIM1 mRNA düzeyi.....	60
Şekil 3.12. STIM1 OE-Orai1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh-7 hücrelerinde STIM1 mRNA düzeyi.	60
Şekil 3.13. Orai1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh-7 hücrelerinde Orai1 mRNA düzeyi.	61
Şekil 3.14. STIM1+Orai1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh-7 hücrelerinde Orai1 mRNA düzeyi.	61
Şekil 3.15. Huh-7 hücre altpopülasyonlarında ve STIM1- ve/veya Orai1-OE durumlarında MDR1 transkripsiyon düzeyleri.....	62
Şekil 3.16. FC ile ayırıştırma sonrası 4. günde EpCAM ⁺ CD133 ⁺ hücre oranlarındaki değişim.	63

Şekil 3.17. STIM1-OE ve STIM1-OE+Orai1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh7 hücrelerinde <i>E-cadherin</i> mRNA düzeyi.	64
Şekil 3.18. STIM1-OE ve STIM1-OE+Orai1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh7 hücrelerinde <i>N-cadherin</i> mRNA düzeyi.	64
Şekil 3.19. STIM1-OE ve STIM1-OE+Orai1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh7 hücrelerinde <i>vimentin</i> mRNA düzeyi.	65
Şekil 3.20. EpCAM ⁺ CD133 ⁺ ve EpCAM ⁻ CD133 ⁻ hücrelerde TRPC1 mRNA düzeyi.	65
Şekil 3.21. STIM1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh7 hücrelerinde STIM1 protein analizi.....	66
Şekil 3.22. STIM1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh7 hücrelerinde Orai1 protein analizi.	67
Şekil 3.23. STIM1-OE+Orai1-OE hücrelerinde STIM1 protein analizi.	67
Şekil 3.24. STIM1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh7 hücrelerinde TRPC1 protein analizi.	68
Şekil 3.25. STIM1-OE hücrelerinde TRPC6 protein analizi.....	68
Şekil 3.26. İnvazyon ve migrasyon deney aparatı.	69
Şekil 3.27. STIM1-OE ve STIM1-OE+Orai1-OE EpCAM ⁺ CD133 ⁺ Huh7 hücrelerinin migrasyon ve invazyon sonuçları.	69
Şekil 3.28. STIM1-OE ve STIM1-OE+Orai1-OE uygulamasının EpCAM ⁺ CD133 ⁺ hücrelerde MDR işlevi üzerine etkisi.	70
Şekil 3.29. Problemlerin dağılım grafikleri.	72
Şekil 3.30. Gruplar baz alınarak yapılan "Cluster" Analizi.....	72
Şekil 3.31. Örnekler baz alınarak yapılan "Cluster" Analizi (Problemleri gösterim)	73
Şekil 3.32. X/PK Grubuna karşı PK Grubu.	74
Şekil 3.33. Y/PK Grubuna karşı PK Grubu.	74
Şekil 3.34. NK Grubuna karşı PK Grubu	75
Şekil 3.35. miRNA dizileme (miRNom) akış şeması.	76
Şekil 3.36. Karşılaştırma gruplarında ekspresyonu artan ve azalan miRNA'lar.....	78
Şekil 3.37. Tüm genom miRNA dizileme verilerinden oluşturulan Venn şeması.	79
Şekil 3.38. Her üç uygulama grubunda artış gösteren miRNA'lar ile yapılan yolak analizi.	80
Şekil 3.39. EpCAM ⁺ CD133 ⁺ ve EpCAM ⁻ CD133 ⁻ Huh7 hücrelerinde proliferasyonun gerçek zamanlı izlenmesi.....	81
Şekil 3.40. Sferoid görüntüleri.	83
Şekil 3.41. Sferoid oluşumu.....	83
Şekil 3.42. Koloni oluşturma.	84
Şekil 3.43. Elektrofizyoloji kayıtları.	85

TABLO LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1.1. Kalsiyum hemeostazında işlev gören sistemler	4
Tablo 1.2. TRPC kanal özellikleri	7
Tablo 2.1. PCR çalışmalarında kullanılan primer dizileri.....	31
Tablo 2.2. Mikrodizin çalışmasında kullanılan örnek no ve kodları.....	45
Tablo 2.3. Karşılaştırma grupları	46
Tablo 3.1. Mikrodizin çalışmasında kullanılan örnek no ve kodları	71
Tablo 3.2. Karşılaştırma grupları	71
Tablo 3.3. Mikrodizin analizinden seçilen transkripsiyonları belirgin değişen genler.....	75
Tablo 3.4. Karşılaştırma grupları	777

ÖZET

Hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}_i) konsantrasyonundaki yer ve zamana bağlı değişimler vücutta fizyolojik süreçlerin yanı sıra kanserleşme sürecinde de önemli işlev görmektedir. Depo kontrollü Ca^{+2} girişi (*Store-Operated Ca^{+2} Entry*, SOCE) karaciğer kanserini (*Hepatocellular Carcinoma*, HCC) de kapsayan uyarılmayan hücrelerde önemli bir Ca^{+2} homeostaz mekanizmasıdır. Güncel çalışmalarda tedavi sonrası kanserin nüks etmesinin ana nedeninin tümör popülasyonunda bulunan tümör başlatıcı hücrelerin (*Tumor-Initiating Cells*, TIC) olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda, EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) ve CD133 yüzey antijeni ifade eden Huh7 HCC hücre hattında bulunan TIC'lerin (EpCAM⁺CD133⁺) fenotipik farklılaşmasında SOCE işlevinin aydınlatılması hedeflenmiştir.. Bu amaçla, Huh7 hattından TIC'ler spesifik floresan antikolar ile akış sitometrisinde ayrıştırılmıştır. Daha sonra, SOCE'nin iki önemli bileşeni, endoplazmik retikulum (ER) Ca^{+2} içeriğinin algılanmasından sorumlu STIM1 (*Stromal Interaction Molecule*) ve hücre membrandaki Ca^{+2} kanalı Orai1, bu hücrelerde aşırı düzeyde ifade (*overexpression*, OE) ettirilmiş ve Ca^{+2}_i dinamiklerindeki değişim, hücre proliferasyonu, ilaç direnci (MDR1 gen ifadesi), EMT (epitelden mezenkimale geçiş) belirteçlerinin ifadesi ve migrasyon-invazyon özellikleri incelenmiştir. Bulgular, ER Ca^{+2} salıverilişi ve SOCE'nin TIC'lerde arttığını göstermiştir. Bu gözlem, TIC'lerin fazla Ca^{+2} 'yi ER'de tamponlayarak ve mitokondriyal Ca^{+2} alımını önleyerek apoptozu engelleyebileceklerini düşündürmüştür. TIC'lerin yavaş prolifer olmaları Ca^{+2} tamponlayıcı mekanizmaların hücre farklılaşmasını baskılamasından kaynaklanabilir. SOCE bileşenleri STIM1 ve Orai1'in aşırı ifadesi (STIM1+Orai1-OE) TIC'lerde SOCE yanıtını artırmıştır. Bu durum, başka araştırmacılar tarafından da tanımlanan, STIM1 ve Orai1 arasında sitokiyometrik bir ilişkinin olduğunu düşündürmektedir. MDR çalışmalarında STIM1-OE, Orai1-OE ve STIM1+Orai1-OE grupları arasında en fazla MDR1 ifadesini STIM1+Orai1-OE'nin göstermesi TIC'lerde MDR ve SOCE arasında etkileşim olabileceğini göstermektedir. EMT belirteçlerinin (epitelyal *E-cadherin*; mezenkimal: *N-cadherin* ve *Vimentin*) mRNA düzeyleri STIM1-OE ve STIM1+Orai1-OE TIC'lerde yüksek oluşu bir ara faz olan parsiyel EMT'yi düşündürmektedir. İşlevsel ve genomik analizler STIM1 ve Orai1'in ER'de Ca^{+2} tamponlama kapasitesi, SOCE giriş mekanizması ve hücrenel sağkalım sinyalizasyonunda önemli olduğunu göstermektedir. TIC'lerde SOCE-ilişkili miRNA'ların hedeflenmesi özgül antikanser tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde yardımcı olabilir.

Anahtar sözcükler: HCC; SOCE; STIM1; Orai1

ABSTRACT

Besides physiological processes, spatio-temporal changes in intracellular calcium (Ca^{2+}_i) concentration plays a crucial role in carcinogenesis, as well. Store-operated Ca^{2+} Entry (SOCE) is an important Ca^{2+}_i homeostasis mechanism in non-excitabile cells including hepatocellular carcinoma (HCC) cells. Recently, tumor initiating cells (TICs) in tumor cell population were shown to be the main reason of the reoccurrence of cancer after treatments. Therefore, the purpose of this study is to delineate the role of SOCE in phenotypical differentiation of TICs found in Huh7 HCC cell line expressing specific cell surface markers, EpCAM and CD133. We separated the TICs from parental cells via a flow cytometer by the help of fluorescent specific antibodies. Later, we have the cells overexpressed (OE) the two functionally important components of SOCE, endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} sensor, stromal interaction molecule (STIM1) and a membrane Ca^{2+} channel (Orai1), in these cells. Then, changes in intracellular Ca^{2+} dynamics, cellular proliferation, drug resistance (*MDR1* gene expression), epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) marker expression, and cellular invasion-migration properties were investigated. Based on our data, ER Ca^{2+} release and SOCE were found to be higher in TICs compared to the EpCAM⁺CD133⁺ cells. This may explain how TICs avoid apoptosis, possibly buffering the excess amount of Ca^{2+} in ER in to prevent mitochondrial Ca^{2+} uptake which is necessary for triggering apoptosis. Slow proliferation rates of TICs might be the resulted of Ca^{2+} buffering mechanism that holds these cells in an undifferentiated state. Overexpressing (OE) the SOCE components, STIM1 and Orai1, in TICs led to an effective SOCE in STIM1+Orai1-OE cells. This observation suggested us that there might be a stoichiometric relationship between STIM1 and Orai1 expressions also described by others. In MDR experiments, STIM1+Orai1-OE has the highest expression level of *MDR1* gene suggesting a causal relationship between SOCE and MDR development in TICs. In the epithelial to mesenchymal transition experiments, we evaluated the transcription levels of EMT markers, *E-cadherin* (epithelial), *N-cadherin* and *vimentin* (mesenchymal), in STIM1-OE and STIM1+Orai1 OE TICs. In this regard, elevation of both epithelial and mesenchymal markers suggested us the presence of partial EMT, an interphase between EMT and complete EMT. Based on our functional and genomic analyses, STIM1 and Orai1 would be important for ER Ca^{2+} buffering capacity and SOCE entry operation mechanism, respectively, crucial upstream events for cellular survival. Targeting the TICs for SOCE-related miRNAs can support development of specific anticancer strategies.

Key words HCC; SOCE; STIM1; Orai1

GİRİŞ

Hepatosellüler karsinom (Hepatocellular carcinoma, HCC), dünyada sık karşılaşılan kanser türlerindedir. Geleneksel tedaviler sonrası oldukça yüksek nüks oranına (yaklaşık %70) sahiptir. HCC tedavilerinin başarısız olmasının, heterojen tumor popülasyonunda bulunan tedaviye oldukça dirençli tümör başlatıcı hücrelerden (TICs, tumor initiating cells) kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu hücreler normal kök hücrelerin sahip olduğu birçok özelliği (örn: kendini yenileyebilme ve farklılaşma, sinyal yolları gibi) taşıdıkları bilinmektedir. Heterojen tümör popülasyonunda yer alan TIC'lerin seçilmesi hücre yüzey antijenleri sayesinde gerçekleşmektedir. HCC tümör dokusu ve hücre hatları ile yapılan çalışmalarda EpCAM ve CD133 yüzey antijenlerinin sıklıkla eksprese olduğu belirtilmiştir. Huh7 hepatosellüler karsinoma hücre hattından seçilen EpCAM⁺CD133⁺ hücreler NOD/SCID fareye verildiğinde (10.000 hücre 7 denemenin 6'sında) tümör oluşumu gözlenmesi bu hücrelerin tümör başlatma potansiyeli olduğu görüşünü desteklemiştir.

Kanserleşme sürecinde yer alan proliferasyon, invazyon, migrasyon ve metastaz gibi birçok süreçte Ca⁺² yer almaktadır. Kanser hücreleri gibi uyarılmayan hücrelerde ana Ca⁺² girişi SOCE aracılığıyla sağlanmaktadır. Bu nedenle çalışmada, hepatosellüler karsinomada tümör başlatma potansiyeli olan hücrelerin (EpCAM⁺CD133⁺) fenotipik farklılaşmasında hücre içi kalsiyum ve SOCE bileşenlerinin kanserleşme sürecindeki etkilerinin incelenmesi mekanizmanın aydınlatılmasını sağlamıştır.

Tümörün nüks etmesiyle antikanser tedavinin olumsuz sonuçlanmasına yol açtığı düşünülen tümör başlatıcı özelliği olan belirli yüzey belirteçlerine sahip hücrelerin fenotipik farklılaşma mekanizmalarının aydınlatılmasına ve bu hücrelere karşı özgül terapötik yöntemlerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Gelecekte kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarına yönelik stratejilerin geliştirilmesinde tümör gelişimine neden olan bu hücrelere yönelik yeni ilaç hedeflerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Proje kapsamında yer alan miRNA dizileme ile SOCE düzenlenmesinde yer alan ve kanser başlatma özelliği taşıyan hücrelerle ilişkisi olan miRNA'ların açığa çıkarılması ile potansiyel terapötik hedeflerin ve ilgili sinyal yollarının aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır.

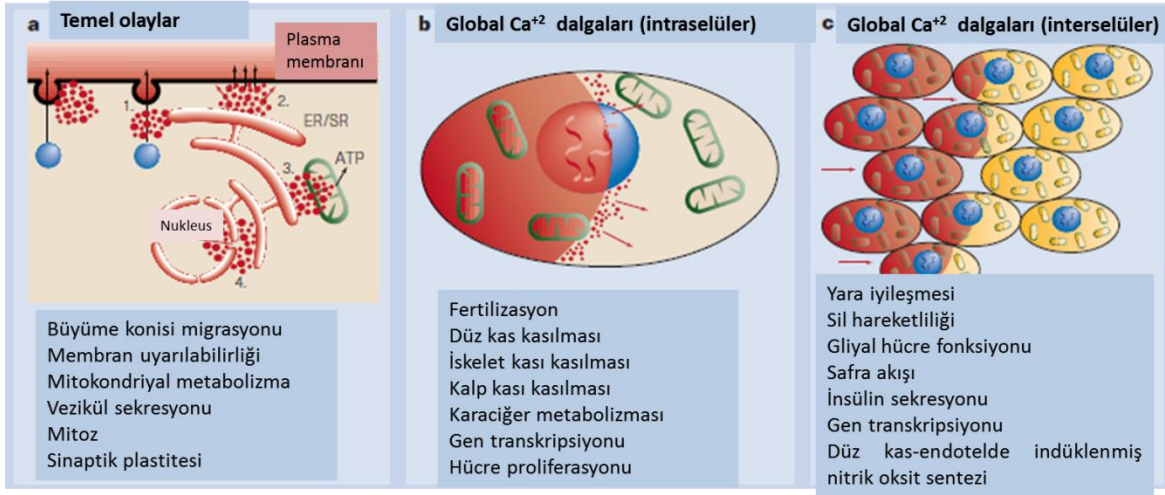
1 GENEL BİLGİLER

1.1 Kalsiyum

Kalsiyumun hücrel işlevler bakımından önemli role sahip olduğu ilk kez Sydney Ringer tarafından 1883'te yaptığı çalışmada gösterilmiştir. Çalışmada Ca^{+2} içeren çeşme suyundan hazırlanmış olan tuzlu su izole edilen kurbağa kalbinin kasılmasına yol açarken, Ca^{+2} içermeyen distile sudan hazırlanan tuzlu suda aynı durumun gözlenmemesi kalsiyumun önemini bir kez daha vurgulamaktadır (BOOTMAN, 2012).

Birçok hücrel süreç Ca^{+2} iyonunun katkılarıyla gerçekleşmektedir. Zihnimize depoladıklarımızdan, beyinde bilgilerin oluşturulmasına, hareketlerimizden, kalbimizin atmasına kadar hücreler arası bilgi alışverişinde ikinci mesajcı olarak yer almaktadır. Ca^{+2} yaşamdan ölüme kadar olan canlılık sürecinin büyük bir kısmına katkıda bulunmaktadır. Yumurtanın fertilizasyonundan başlayarak, gelişim ve farklılaşma ile hücre türlerinin oluşması, işlevlerini gerçekleştirilmesi ve hücrenin görevini tamamlayarak yaşamının sonlandırılmasında yer alan apoptoz ve nekroz gibi işlevlerde Ca^{+2} temel işlev görmektedir (PAREKH, 2005). Canlılığın sürdürülebilmesi için gerekli olan ekzositoz, gen ekspresyonu, hareketlilik, migrasyon, proliferasyon gibi çok çeşitli hücrel süreçlerin gerçekleştirilmesi (DEHAVEN, 2009; CHEN, 2011; MCANDREW, 2011; MOTIANI, 2013), (BOOTMAN, 2012; XIA, 2016) Ca^{+2} 'nin sitoplazmik konsantrasyonundaki yer ve zamana bağlı (*spatio-temporal*) değişimleri aracılığıyla oluşmaktadır (PAREKH, 2005). Söz konusu Ca^{+2} sinyallerinin esnek değişkenliği farklı hücrelerde zamana bağlı farklı işlevlerin gerçekleştirilebilmesini sağlar. Hücrenin çeşitli işlevlerini yerine getirmesindeki Ca^{+2} hücre dışından (ekstraselüler alan) ya da hücre içindeki endoplazmik retikulum (ER) ya da sarkoplazmik retikulum (SR) olarak adlandırılan Ca^{+2} depolarından sağlanmaktadır. Hücrel fonksiyonların sürdürülmesi için hücredeki Ca^{+2} konsantrasyonu ($[Ca^{+2}]_i$) belli düzeylerde tutulmaktadır. Yüksek $[Ca^{+2}]_i$ apoptozu tetikleyebileceğinden uzamsal $[Ca^{+2}]_i$ değişimleri kısa süreli ve düşük genlikte (amplitüd) oluşturulmaktadır. Tek geçici sinyaller kasların kasılması, sekresyon gibi fonksiyonların aktivasyonunda gözlenirken uzun aktarım süresi gereken bilgiler için Ca^{+2} akımları olarak adlandırılan tekrar eden sinyaller oluşturulur. Ca^{+2} sinyalizasyonu temel hücrel süreçlerde işlev görür (**Şekil 1a**). Temel olayların uzam-zamansal özelliklerinden olan Ca^{+2} kıvılcım (*sparks*) ve Ca^{+2} pufları (*puffs*) kanalın bölgesine ve özelliğine göre farklılık göstermektedir. Kanallara özgü olan bu sinyaller sayesinde Ca^{+2} sinyalizasyonunun ayrıntılarına ulaşabilmektedir. Temel olaylar iki şekilde tanımlanmakta olup kanallara oldukça yakın çevrede (**Şekil 1a**) bulunan hücrel işlevlerin aktivasyonu ya da kanalların sayısı hücre boyunca artırılarak (*recruitment*) işlevleri global seviyede tutmaktadırlar (**Şekil 1b,1c**). Farklı hücrel işlevlerin yerine getirilmesi için temel sinyallerin gerçekleştirilmesinde

subselüler bölgedeki Ca^{+2} kanallarının yerleşimi önemlidir. Düz kasta plasma membranı yakınındaki bölgede oluşan Ca^{+2} kıvılcımlarının K^+ kanallarını aktive etmesiyle (**Şekil 1.1a**) kas gevşeme süreci başlar. Temel olaylardan kaynaklanan derinlerdeki sinyaller global Ca^{+2} sinyalleri oluşturmak üzere düzenlendiğinde ise kas kasılır. Bu durum aynı hücrede gerçekleşen zıt olayların Ca^{+2} tarafından aktivasyonun sağlandığı uzamsal organizasyona örnektir. Temel Ca^{+2} salıverilişindeki bölgelerin oluşturduğu küresel yanıtlarda her kanalın diğer bir kanal ile etkileşimi Ca^{+2} dalgalarının oluşturulmasında gereklidir (**Şekil 1.1b**). Hücrelerin bir arada bulunduğu durumlarda intraselüler dalgalar komşu hücrelere dağılarak interselüler dalgalar haline gelerek dokudaki hücresel yanıtları düzenlerler (**Şekil 1.1c**). Ca^{+2} sinyalinin amplitüdündeki çeşitlilik farklı bilgilerin aktarılmasında kullanılmaktadır (farklı genlerin farklı Ca^{+2} amplitüdüleri ile uyarılması gibi) (BERRIDGE, 1998)

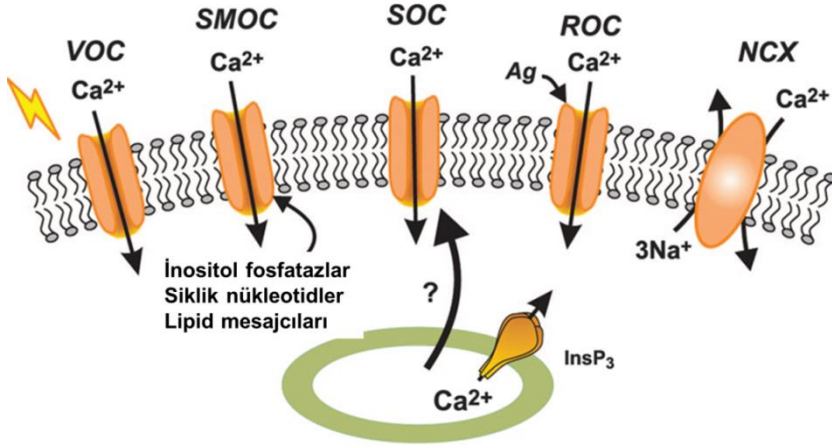


Şekil 1.1. Hücre içi Ca^{+2} sinyalinin uzamsal etkileri. Hücre içine hücre dışından Ca^{+2} 'nin girmesiyle ya da (a) hücre içindeki depolardan (ER ya da SR) salınmasıyla (kırmızı renkli bölgeler) temel olaylar oluşmaktadır. Hücresel materyalin eksportunu kapsayan birçok işlemi aktive edecek olan Ca^{+2} konsantrasyonunda yerel değişimler oluşur (1) K^+ kanallarının açılması (2) ve mitokondrideki metabolizma (3). Çekirdeğe de Ca^{+2} sinyalleri girebilir (4). Bütün bu işlevler oldukça yüksek Ca^{+2} konsantrasyonunda yanıt oluşumu ile temel olayların alt süreçlerini yapılandırmaktadır. Global Ca^{+2} sinyalleri temel olayların aktivasyonu ile birlikte oluşturulan Ca^{+2} dalgaları hücre içinde dağılmaktadır (b). Dokuyu oluşturan komşu hücrelerin uyarılması bir hücreden diğer hücreye geçen hücrelerarası Ca^{+2} dalgaları ile koordine edilir (BERRIDGE, 1998).

Hücre için gerekli olan sitoplazmik Ca^{+2} iki şekilde elde edilmektedir: (1) hücre içi Ca^{+2} deposu olan organellerden (ER ve mitokondri gibi), (2) hücre dışındaki Ca^{+2} 'nin ekstraselüler alandan hücre içine girişi ile sağlanmaktadır. Hücre içinde bulunan organellerden en geniş

Ca^{+2} depolama özelliğine sahip olan organel ER'dir. Mitokondride intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun sağlanmasına ve belli fizyolojik koşullar altında (apoptotik sürecin başlatılması gibi) katkıda bulunmaktadır. Hücreden geçici olarak Ca^{+2} 'nin uzaklaştırılması 10-20 saniye gibi kısa bir süre içerisinde Ca^{+2} salıverilişini sağlayan kanallar ya da ligand-kenetli Ca^{+2} kanallarının inaktive olmasıyla ve çok hızlı bir şekilde sitozolde bulunan organeller aracılığıyla (ER ve mitokondri gibi) tamponlanması, Na^+/Ca^{+2} değiş-tokuşucusu (Na^+/Ca^{+2} exchanger, NCX) ile dışarı atılımı ve Sarkoplazmik/Endoplazmik Ca^{+2} ATPazlar (SERCA) ile sağlanmaktadır. Hücresel işlevler için sitozolde gereksinim duyulan Ca^{+2} konsantrasyonu hücre dışından hücre içine Ca^{+2} girişiyle desteklenmektedir. Dinlenme halindeki (polarize) hücrelerde plazma membranı boyunca 10.000 kat fazla olan Ca^{+2} uyarılmış (hiperpolarize) membran potansiyeli ile birlikte Ca^{+2} 'nin hücre içine girmesi için büyük bir elektrokimyasal itici güç oluşturur. Dinlenme halinde olan hücreler Ca^{+2} için oldukça düşük geçirgenliğe sahiptir. Geçirgenlikteki en küçük artış bile hücre içerisine çok miktarda Ca^{+2} girişine yol açabilir. Ca^{+2} iyonlarına karşı membran geçirgenliğinin arttırılması membranda bulunan Ca^{+2} geçirgen iyon kanallarının açılmasıyla sağlanır. Plazma membranında birçok Ca^{+2} kanalı bulunmaktadır (**Şekil 1.2.**). Voltaj-kontrollü kanallar (Voltage-operated Channels, VOC) sinir hücresi ve kas hücresi gibi uyarılabilen hücrelerde bulunurken uyarılamayan hücrelerde ifade edilmezler. Reseptör-kontrollü kanallar (Receptor-operated Channels, ROC) uyarılan hücrelerde sıklıkla görülmekte ve nörotransmitter gibi dış ligandların bağlanmasıyla açılmaktadır. İkinci ulak aracılı kanallar pek yaygın olmamakla beraber bazı uyarılabilen ve uyarılamayan hücrelerde bulunmaktadır. Depo-Kontrollü Ca^{+2} (Store-operated Ca^{+2} , SOC) kanalları oldukça yaygın olup birçok canlıda (bütün ökaryotlarda mayalardan insanlara kadar) ifade edilmektedir (PAREKH, 2005).

Dinlenme durumunda hücre dışı Ca^{+2} konsantrasyonu 1,2 mM iken hücre içi 50-100 nM arasında tutulmaktadır (BRONNER, 2001; STEWART, 2015). Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun düzenlenmesinde işlev gören SR membranında bulunan SERCA ve hücre membranında bulunan PMCA (Plasma Membrane Ca^{+2} ATPase) pompaları hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu azaltıcı yönde etki göstermektedir (DEHAVEN, 2009; PREVARSKAYA, 2014). Sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonu hücre tarafından sıkı şekilde kontrol edilmektedir. Kalsiyumun hücre içi düzeylerinin yüksek kalması toksik sonuçlar doğurabilmektedir. Ca^{+2} konsantrasyonunu düzenleyen yollarda meydana gelen bozukluklar kas hastalıkları (GOMMANS, 2002), Alzheimer (LAFERLA, 2002), immünolojik hastalıklar (FESKE, 2007), hipertansiyon, kalp hastalıkları, diyabet ve kanser (MONTEITH, 2007; PREVARSKAYA, 2014; STEWART, 2015) gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir (CHEN, 2016; XIA, 2016).



Şekil 1.2. Plazma membranında bulunan düzenlenmiş Ca^{+2} giriş yolları. Ca^{+2} hücre içine birçok Ca^{+2} kanalı aracılığı ile girebilir. Bunlar, VOC, SMOC-, SOC, ROC-reseptör aracılı kanallar. VOC'ler membranın depolarize olması ile aktive olur, SMOC kanalları birçok küçük mesajcı molekül ile aktive olurlar bunlardan en çok bilineni inozitol fosfat, siklik nükleotidler ve lipid kökenli mesajcılardır (diasilgliserol, araşidonik asit ve metabolitleri). SOC'ler hücre içi depolardaki Ca^{+2} 'nin azalmasıyla aktive olurlar. ROC'ler nörotransmitterlerin ya da hormon agonistlerin direkt bağlanması ile aktive olurlar. Bazı durumlarda Ca^{+2} hücre içine $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ değiş-tokuşçularının (NCX) ters yönde çalışmasıyla girerler (PAREKH, 2005). VOC: Voltage-operated Channels (Voltaj-kontrollü kanallar), SMOC: Second Messenger-Operated Channels (ikinci mesajcı-kontrollü kanallar), ROC: Receptor-operated Channels (Reseptör-kontrollü kanallar, SOC: Store-Operated Channels (Depo-Kontrollü Kanallar).

Tablo 1.1. Kalsiyum hemeostazında işlev gören sistemler

A. Hücre içi sistemler:

1. SR Ca^{+2} Kanalları

- İnozitol-3-fosfat (inositol-tri phosphate, IP_3) reseptörü Ca^{+2} kanalı
- Ryanodin reseptörü Ca^{+2} kanalı

2. Mitokondri

- Mitokondride bulunan Ca^{+2} giriş yolları
- Mitokondride bulunan Ca^{+2} çıkış yolları

3. Sarko(endo)plazmik retikulum Ca^{+2} pompası

B. Hücre membranındaki (sarkolemmal) sistemler

- Plazma membranı Ca^{+2} ATPaz (PMCA)
- Hücre membranındaki $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ değiş-tokuşçusu ($\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ exchanger, NCX)

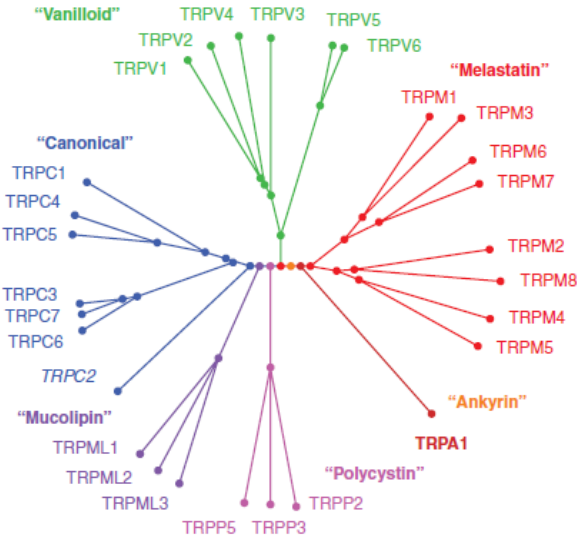
C. Hücre membranı Ca^{+2} kanalları

1. Voltaj-kontrollü Ca^{+2} kanalları (*Voltage-Operated Ca^{2+} Channels*, VOCC)
2. Ligand/reseptör-kontrollü Ca^{+2} kanalları (*Ligand/Receptor-Operated Ca^{2+} Channels*, ROCC)
3. Depo-kontrollü Ca^{+2} kanalları (*Store-Operated Ca^{2+} Channels*, SOCC)

1.2 TRP Kanalları

TRP (Transient Receptor Potential) kanalları katyon geçirme yeteneğinde olan proteinlerdir. TRP kanalı ile ilgili olan gen ilk olarak *Drosophila melanogaster*'da saptanmıştır. Daha sonraları 50'ye yakın TRP kanalı birçok canlıda tanımlanmıştır. Evrimsel bakımdan ilk TRP kanalları protistalarda, alglerde, maya ve bakterilerde kimyasal, termal ve mekanik algılamaya olanak sağladığı belirlenmiştir. Bu özellikler en gelişmiş canlıya kadar korunmuştur. TRP kanalları sıcak/soğuk, doğal kimyasal bileşikler (mentol, kafur, kapsaisin), mekanik uyarın, lipid tabakanın içeriğindeki değişiklikler gibi birçok uyarın ile açılmaktadır. TRP kanalları kan basıncı ve düz kas tonusunun düzenlenmesi, renal Ca^{+2} / Mg^{+2} iletimi, keskin tad ve kokulu bileşiklerin (hardal, sarımsak gibi), mekanik değişikliklerin, ağrı, sıcaklık, tat, koku, ses, feromon, ışık algılama gibi çok önemli birçok süreçte işlev görmektedir (GEES, 2010).

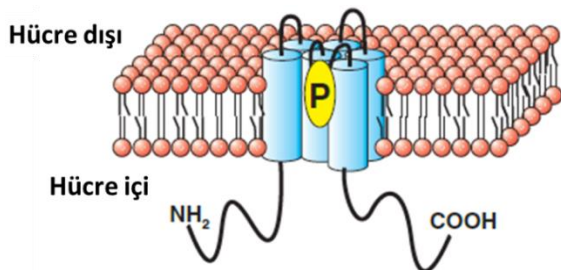
Memelilerde 28 tane TRP kanalı bulunmakla beraber amino asit dizi benzerliklerine göre 6 alt aileye ayrılmaktadır (**Şekil 1.3**): TRPC (canonical, TRPC1-7), TRPV (vanilloid, TRPV1-6), TRPM (melastatin, TRPM1-8), TRPA (ankyrin, TRPA1), TRPML (mucolipin), TRPP (policystin) (GEES, 2010).



Şekil 1.3. TRP kanal süper ailesinin filogenetik ağacı. TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML sadece memelilerde bulunan alt ailelerdir (GEES, 2010).

TRP'ler bütün hücre tiplerinde olmasa da birçok uyarılabilen ve uyarılamayan özellikteki hücrelerde ifade edildikleri saptanmıştır (GEES, 2010). TRP süper aile üyeleri olan katyon kanalları arasında %20-60 benzerlik saptanmıştır (VAZQUEZ, 2004). TRP kanalları ile ilgili bilgiler sınırlı olmasına karşın elde edilen bilgilerden yola çıkarak uyarılabilen ve uyarılamayan hücrelerde hücre içi Ca^{+2} seviyesinin düzenlenmesinde önemli işlevleri olduğu görülmektedir. Birçok fizyolojik işlevde gereksinim duyulmasının yanı sıra duyuşal işlevlerden (tat, sıcaklık, homeostaz, kas faaliyetleri gibi) feromonların algılanmasına kadar geniş bir yelpazede işlev görmektedirler.

TRP kanallarının temel yapısını, membranı 6 kez geçen bölgelerin (6 transmembran, TM1-6) oluşturduğu önerilmektedir. TM5. ve 6. segmentler arasındaki hidrofobik halkanın iyon kanalı oluşturduğu ve $-NH_2$ ve $-COOH$ uçlarının sitoplazmada bulunduğu düşünülmektedir. TRP alttipleri homo ya da heterotetramerik yapılar oluşturarak fonksiyon göstermektedirler (Şekil 1.4.)(GEES, 2010; NILIUS, 2011).



Şekil 1.4. TRP kanallarının topolojisi. (NILIUS, 2011).

TM5 ve TM6 segmentleri arasında iyon kanalı oluşturan por bölgesi içermektedir. Amino (NH₂) ve karboksil (–COOH) uçlarının uzunluğu ve çeşitliliği sahip oldukları farklı bölgelere göre değişiklik göstermektedir (NILIUS, 2011).

1.2.1 TRPC

TRPC kanalları non selektif katyon kanalları olmakla birlikte Ca⁺² iyonuna karşı seçiciliği oldukça azdır. K⁺, Na⁺, Cs⁺, Ca⁺², Ba⁺² gibi iyonlarına karşı geçirgenlik gösterirken diğer divalen katyonlara karşı geçirgenliği değişkendir (CHENG, 2013).

TRPC ailesinin memeli üyeleri, işlevsel benzerlik ve amino asit dizi benzerliği bakımından TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 ve TRPC4/5 olmak üzere 4 alt aileye ayrılmaktadır (VAZQUEZ, 2004; GEES, 2010) TRPC kanalları Ca⁺²ye karşı seçici geçirgen olmayan katyon kanalları olmakla birlikte P_{Ca}/P_{Na} geçirgenlik oranı aileye özgü olarak farklılık göstermektedir. Bazı TRPC proteinlerinin ifade kalıbı yaygın olmakla birlikte (TRPC1 gibi) diğer TRPC proteinleri ise dokuya özgü (sinir hücreleri, endotel hücreleri gibi) olarak ifade edilmektedir. (VENKATACHALAM, 2007). TRPC kanalları kalsiyuma karşı seçici geçirgen olmayan katyon kanalları olmakla birlikte P_{Ca}/P_{Na} geçirgenlik oranı aileye özgü farklılıklar göstermektedir. TRPC ailesi oldukça geniş ve birçok hücrede bulunan üyelere sahiptir (GEES, 2010). Tablo 1.2. TRPC kanallarına ait özellikleri özetlemektedir (SALIDO, 2009; CHENG, 2013).

SOC girişi (Store-Operated Ca²⁺ Entry, SOCE) tarafından gerçekleştirildiği düşünülen birçok fizyolojik işlevde TRPC kanallarının aracılık ettiği düşünülmektedir (CHENG, 2013).

Tablo 1.2. TRPC kanal özellikleri

Kanal	İyon seçiciliği	İletkenlik	Akım	Aktivasyonu
TRPC1	P _{Na} /P _{Ca} ~1:1 ^a	---	Dışa doğru nonselektif katyon akımı	*Reseptör-kontrollü (heteromer TRPC1/TRPC4 ya da TRPC1/TRPC5) *Depo boşalması?
TRPC2	Katyon nonselektif	42 pS	Doğrusala yakın nonselektif katyon akımı	*Reseptör-kontrollü, *Depo boşalması?
TRPC3	P _{Na} /P _{Ca} ~1:1.5	66 pS	İç ve dışa doğru nonselektif katyon akımı	*DAG (Diaçil gliserol)
TRPC4	P _{Na} /P _{Ca} ~1:1.1	41 pS	Nonselektif, genellikle	*Reseptör-kontrollü,

			içe doğru, ie-dışa doğru	*Depo boşalması?
TRPC5	$P_{Na}/P_{Ca} \sim 1:9$	63 pS	Nonselektif, ie-dışa doğru	*Reseptör-kontrollü, *Depo boşalması?
TRPC6	$P_{Na}/P_{Ca} \sim 1:5$	35 pS	ie-dışa doğru, nonselektif katyon akımı	*DAG (Diaçil gliserol), *Depo boşalması?
TRPC7	$P_{Na}/P_{Ca} \sim 1:2$	-100–0 mV:25 pS 0–100 mV: 50 pS	ie-dışa doğru, nonselektif katyon akımı	*PI(4,5)P ₂ , DAG, *Depo boşalması ^c

^a TRPC4 ve TRPC5 ile birlikte ifade edildiğinde, ^c stabil olarak ifade edildiğinde. (SALIDO, 2009)

TRPC kanallarının Ca^{+2} ya da diğer katyonlara karşı geçirgenliği değişiklik gösterse de kanalın aktivasyonunun temelinde Fosfolipaz C (*Phospholipase C*, PLC) ile olan etkileşimler yer almaktadır. PLC'nin yanı sıra IP₃ ya da tapsigarjin aracılı hücre içi depolarda bulunan kalsiyumun azalması da TRPC'lerin aktif hale gelmesini sağlamaktadır (VENKATACHALAM, 2007).

1.2.2 TRPC Aile Üyelerinin Özellikleri

TRPC1

TRPC1 kalp, testis, ovaryum, beyin ve dalakta sıklıkla ifade edilmektedir (VENKATACHALAM, 2007). Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarına karşı nonselektif geçirgenlik göstermektedir. TRPC1 kanalları büyüme faktörü, agonist, protein kinaz C (PKC) ile uyarıldığında trombosit, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve B-lenfositlerde Ca^{+2} girişi için büyük öneme sahiptir (GEES, 2010). TRPC1 kanallarının aktivasyonu ER deposunun boşalması, ER ve PM'nın yapısal olarak kenetlenmesi ile gerçekleşmektedir (VENKATACHALAM, 2007).

TRPC1 proteininin SOCC'lerin temel bir komponenti ve/veya düzenleyicisi olduğu düşünölmektedir (SALIDO, 2009). A7r5 damar düz kas hücrelerinde siRNA aracılığı ile TRPC1 geninin baskılandığı önceki çalışmamızda beklenenin aksine SOCE'deki artış TRPC1 proteininin düzenleyici/inhibitör işlevi olduğunu düşöndürmüştür (SELLI, 2009).

TRPC2

TRPC2 kanalları insanlarda pseudogen (GEES, 2010; CHENG, 2013) olmasına karşın testisler ve vomeronazal organ (VNO) gibi dokularda ifade edilmektedir. Kemirgenlerde feromonların algılanması VNO duyuusal nöronları aracılığı ile sağlanmaktadır.

Spermatozonun yumurta *zona pelusidasını* uyarmasındaki Ca^{+2} sinyallerinin oluşturulmasında TRPC2 kanalları yer almaktadır. Hücre içi depolarından Ca^{+2} 'nin çıkışında TRPC2'lerin etkili olduğu düşünülmektedir (GEES, 2010). $Ca^{+2}:Na^{+}$ geçirgenliği 2.7'dir. TRPC2 kanallarının aktivasyonu DAG (Diaçilgliserol) aracılığı ile gerçekleşmektedir (VENKATACHALAM, 2007).

TRPC3

TRPC3 kanallarının en sık eksprese olduğu yer beyin, düz kas ve kalp kasıdır (GEES, 2010). $Ca^{+2}:Na^{+}$ geçirgenliği 1.6'dır. Kanal aktivasyonu depoların boşalması, konformasyonel kenetlenme, DAG ve ekzositoz aracılığıyla gerçekleşmektedir. TRPC3 bir ROC olduğundan aktivasyonunda DAG önemlidir. TRPC3 kanallarının purinerjik reseptörler aracılı ile uyarılmasıyla hücre içine Ca^{+2} girişi ve düz kas hücrelerinin kasılması ve endotelin depolarizasyonu sağlanır (VENKATACHALAM, 2007; GEES, 2010).

TRPC4

Adrenal bezler, böbrek, beyin, endotel, testis, düz kas ve retina TRPC4 ekspresyonunun sıklıkla karşılaştığı dokulardır (GEES, 2010). $Ca^{+2}:Na^{+}$ geçirgenliği 7'dir. Kanal aktivasyonu ekzositoz ve depoların boşalmasıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (VENKATACHALAM, 2007).

TRPC6

TRPC6 kanalları sıklıkla ovaryum, akciğer, böbrek, beyin ve plasenta gibi dokularda ifade edilmektedir. $Ca^{+2}:Na^{+}$ geçirgenliği 5'dir. DAG, PIP_3 ve konformasyonel kenetlenme ile kanal aktivasyonu gerçekleşmektedir (VENKATACHALAM, 2007; GEES, 2010).

TRPC7

Akciğer, göz, beyin TRPC7'nin en çok ifade edildiği dokulardır. $Ca^{+2}:Na^{+}$ geçirgenliği 1.9 (kendiliğinden) ve 5 (ATP'li akım)'tir. DAG ve depo boşalması ile kanal aktivasyonu sağlanmaktadır (VENKATACHALAM, 2007).

1.2.3 TRPC ile Oluşturulan Kompleksler

TRPC-STIM1-Orai1 Kompleksi

TRPC1 proteininin, Ca^{+2} sinyal yolağında yer alan proteinlerle etkileşmesi, hücreye Ca^{+2} içeriğinin sağlanmasındaki önemini göstermektedir. TRPC1 proteininin Ca^{+2} sinyal yolağında yer alan kalmodulin (CaM), PMCA, IP_3R , kaveolin 1 (Cav1) gibi moleküllerle ilişkisinin/etkileşiminin olduğu gösterilmiştir. ER Ca^{+2} sensörü olarak da bilinen STIM (stromal interaction molecule) uyarılamayan hücrelerde SOCE ve Ca^{+2} saliverilişi ile aktive olan Ca^{+2} kanallarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. STIM1 ER membranında bulunan bir

İntegral membran proteinidir. Birçok çalışmada STIM1'in TRPC1-SOCC ile etkileştiği ve TRPC1/STIM1 kanallarının aktivasyonu için Orai1 proteininin gerekliliği gösterilmiştir. Orai1, membranı dört defa geçen (4TM) ve özellikle Ca^{+2} -salıverilişi ile aktive olan kanalların (Ca^{+2} -release activated Ca^{+2} channels, CRACs) por yapısını oluşturan bir proteindir (CHENG, 2013). Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda meme kanseri migrasyon ve metastazı, serviks kanseri gelişim, migrasyon ve anjiyenezinde STIM1 kaynaklı sinyallerin rol oynadığı gözlemlenmiştir. SOCE, karaciğer kanser hücrelerinin gelişiminde yer alan ana Ca^{+2} giriş yollarından birisini oluşturmaktadır (WU, 2015).

TRPC1-STIM1 Etkileşimleri

STIM1 ve TRPC1 arasındaki etkileşim;

- Deponun boşalması sonrasında TRPC1 ve STIM1'in bir araya gelerek kümeler oluşturması ve birlikte immunopresipitasyonu,
- Çeşitli hücre tiplerinde STIM1'in susturulduğu koşullarda depo boşalmasına karşın TRPC1-aracılı Ca^{+2} girişi,
- TRPC1 ve STIM1'in birlikte ifade edildiği koşullarda SOCE'de artış gözlenmesi,
- STIM1'i negatif yönde etkileyen baskın yapıların olduğu koşullarda TRPC1 aracılı SOCE'de azalma gözlenmesi,

Bu kaynaklar depo-kontrollü TRPC aktivasyonunda STIM1'in oldukça önemli bir molekül olduğu görüşünü desteklemektedir (CHENG, 2013).

TRPC-Orai1 Etkileşimleri

Depo boşalması sonrası TRPC kanalının aktive olabilmesi için Orai1 proteininin varlığı gerekmektedir. TRPC1 ve STIM1 moleküllerinin aşırı eksprese olduğu koşullarda Orai1 molekülünün baskılanması ya da hasarlı Orai1 mutantları ile hücrelerin transfeksiyonunda SOCE'nin azalmasına yol açtığı görülmüştür. Bu çalışmalar Orai1 molekülüne müdahalenin TRPC kanallarının aktivasyonunu ve SOCE'yi etkilediğini göstermektedir (CHENG, 2013).

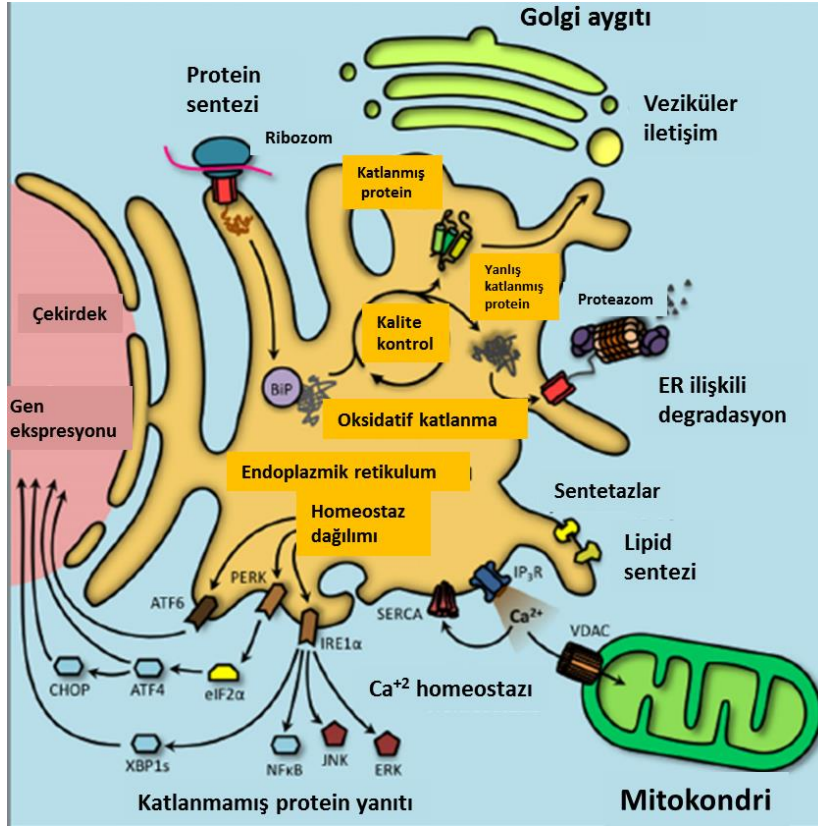
1.3 Endoplazmik Retikulum (ER)

ER bütün ökaryot organizmalarda bulunan hücre gelişimi ve işlevinde önemli role sahip olan çoklu zar yapısında bir organeldir. Proteinlerin katlanması, sentezi, sınıflandırılması, ilgili yerlere gönderilmesi gibi fonksiyonların yerine getirilmesini sağlamaktadır. Proteinlerin katlanmasını sağlayan calnexin, calreticulin, GR78 ve GR94 gibi şaperonlar yeni sentezlenen katlanmamış proteinlerin hidrofobik bölgelerine bağlanarak protein-protein agregatlarının oluşmasını önleyerek proteinlerin doğru katlanmasını sağlarlar. ER'de bulunan ATPaz aktivitesine sahip şaperonlar istenmeyen katlanmaların elimine edilmesinde kullanılır. ER'ye özgü olan oksidatif çevre sayesinde disülfid bağlarının (-S-S-) oluşturulması ve N-

glikozilasyon, protein katlanmasında önemli role sahiptir. ER hücrede bulunan temel Ca^{+2} kaynaklarındandır. Şaperonlar genellikle Ca^{+2} bağımlılığı gösterirler. Bazal luminal Ca^{+2} konsantrasyonu $\approx 1-2$ mM iken sitozolde bu değer $0,1 \mu M$ 'dir. ER'deki Ca^{+2} dengesi, RyR ve IP_3R aracılığı ile sitozole Ca^{+2} salınması ve SERCA ile ER içine alınmasıyla sağlanmaktadır.

Ca^{+2} dengesinin ER'de düzenlenmesi hücre adaptasyonu, sinyalizasyonu ve yaşamın sürdürülmesinde önemli role sahiptir. Hücresel işlevlerin yerine getirilmesinde ER ile diğer organeller (mitokondri, golgi aygıtı, çekirdek ve plazma membranı gibi) arasında iletişim bulunmaktadır (Şekil 1.5.). ER'de depolanan Ca^{+2} seviyesindeki azalma SOCE'yi aktive ederek hücre dışında bulunan kalsiyumun hücre içine girişini sağlar (BRAVO, 2012).

ER'de yanlış katlanan proteinlerin sayısının artışı ER'nin "katlanmamış protein yanıtı" (*Unfolded Protein Response*, UPR)'na yol açar. Böylelikle şaperon sayısı artırılır, protein sentezi durdurulur ve yanlış katlanan proteinlerin degradasyonu ER hacminde artışa neden olur. ER'de meydana gelen bu durum PERK (*Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*), IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1 alpha) ve ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) (transmembran proteinleri) aracılığı ile algılanır. IRE1 α çeşitli transkripsiyon faktörleri (XBP1, X-box, binding protein 1), çoklu protein kompleksleri (TRAF2, TNF receptor-associated factor 2; ASK1, *Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*; BAX/BAK, BAX, Bcl2 associated X protein; BAK, BCL2-antagonist/killer) ve sinyal yolları (NF κ B, *Nuclear Factor kappa B*; JNK, *c-Jun N-terminal kinase* ve MAPK, *Mitogen Activated Protein Kinase*) ile etkileşerek ER stresi sırasında apoptozun aktivasyonu ya da inhibisyonunu düzenlemektedir (BRAVO, 2012).



Şekil 1.5. Endoplazmik retikulumda gerçekleşen hücresel işlevler ve diğer organellerle etkileşim.

(BRAVO, 2012)

1.4 Depo-Kontrollü Ca²⁺ Girişi (Store Operated Ca²⁺ Entry, SOCE)

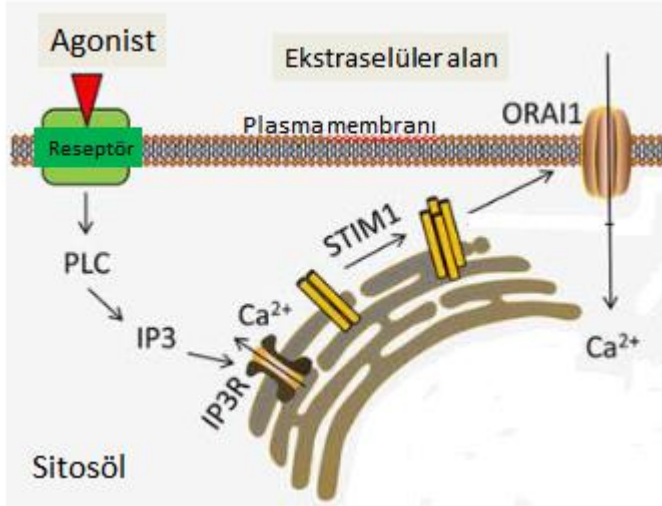
1.4.1 ER ve SOCE

ER birçok hücresel işlevin yer aldığı bir organeldir. Vezikül iletiminde, stres sinyallerinin oluşturulmasında, kolesterol mekanizmasının düzenlenmesinde, apoptozda önemli işlevi vardır. Bunun yanı sıra hücresel kalsiyumun büyük miktarda depolandığı yerdir. Hücresel birçok işlev, proteinin yanlış katlanması, ER stresi sonucu oluşan yanıtlar ve apoptoz intraluminal kalsiyuma gereksinim duymakta ve ER'deki kalsiyumun azalmasıyla tetiklenmektedir.

Yaşamsal bütünlüğün sürdürülebilir olması bakımından ER'deki Ca²⁺ konsantrasyonunun belli bir düzeyde tutulması gerekmektedir. ER Ca²⁺ içeriğinde meydana gelen azalmalar plazma membranında SOCE'yi aktive eder. Bu yolla ER'ye yüksek miktarda Ca²⁺ girişi sağlanarak ER'deki Ca²⁺ içeriği korunmaktadır. ER'nin Ca²⁺ içeriği protein sentezlenmesi ve katlanmasında büyük öneme sahiptir.

Ökaryotik hücrelerin fizyolojik işlevlerinin gerçekleşmesinde SOCE'nin önemli bir yere sahip olduğu görüşü kabul görmektedir. SOCE'de meydana gelecek değişiklikler birçok hastalık ile ilişkilendirilmektedir (PAREKH, 2005).

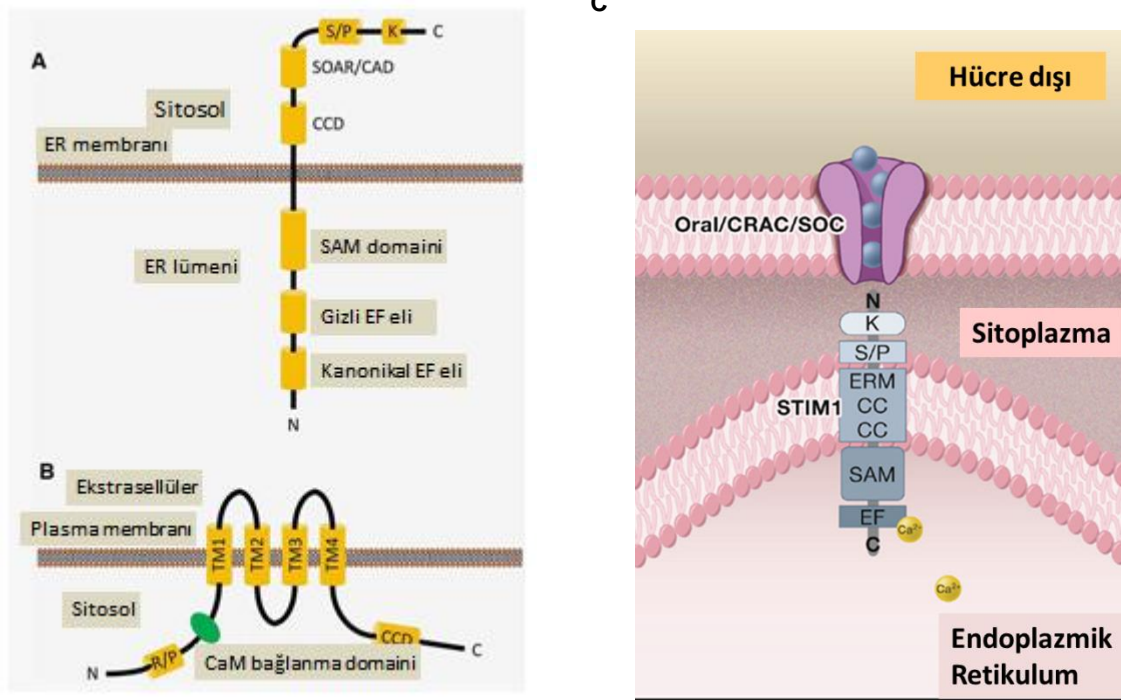
Uyarılmayan hücrelerde kalsiyumun hücreye girişi SOCE ile sağlanmaktadır (CHEN, 2011; WANG, 2015; WU, 2015; ZHAN, 2015). ER'de depolanan kalsiyumun azalması sonrasında hücre içine Ca^{+2} girişinin sağlanması için SOCE aktivasyonu gerçekleşir. Bunun gerçekleşmesi birçok hücrede PLC'nin reseptör aracılı aktivasyonu ile birlikte ikincil mesajcı olan IP_3 oluşmasıyla başlar. ER üzerinde bulunan IP_3 reseptörlerinin IP_3 ile etkileşimi ile Ca^{+2} iyonları ER lümeninden sitoplazmaya salıverilir (BIRD, 2008; CHEN, 2016; LKHAGVADORJ, 2016). (Şekil 1.6.). SOCE aktivasyonu ile ER depolarının doldurulmasının yanı sıra çeşitli hücresel fizyolojik aktivitelerin sürdürülmesi sağlanır (DEHAVEN, 2009; BERGMEIER, 2013).



Şekil 1.6. SOCE aktivasyonu. Plazma membranındaki reseptörlerin agonist ile aktivasyonu sonrasında PLC aracılığı ile ikincil mesajcı olan IP_3 üretimi gerçekleşir. IP_3 , IP_3 reseptörüne (IP_3R) bağlanarak ER'dan Ca^{+2} salıverilmesine yol açar. STIM1 aracılığı ile ER'deki Ca^{+2} azalması Orai1'de konformasyonel değişikliklere neden olur. Bu sayede STIM1 molekülleri Orai1 ile etkileşerek SOCE aracılı Ca^{+2} girişi uyarılır (XIE, 2015).

SOCE STIM1 ve Orai1 moleküllerinin katkısı ile gerçekleşmektedir (YANG, 2009; MOTIANI, 2013; WANG, 2015; ZHAN, 2015; CHEN, 2016; LKHAGVADORJ, 2016; XIA, 2016). STIM proteinleri, STIM1 ve STIM2'yi içeren çoğunlukla ER'de bulunan ve membranı bir kez geçen tip 1 integral membran proteinleridir (XIE, 2015). ER membranında yer alan STIM1 (Şekil 1.7A) proteini, ER Ca^{+2} içeriğinde meydana gelen değişimleri algılar (JARDIN, 2015) ve Orai1 ile etkileşerek SOCE aktivasyonuna neden olur (CHEN, 2011; XIA, 2016). STIM2

proteini de Orai1 ile etkileşmektedir fakat Orai1 aktivasyonunda STIM1 kadar etkili değildir (CHEN, 2016). Çoğunlukla ER'deki Ca^{+2} seviyesi belli bir oranda tutularak SOCE'nin kontrolsüz aktivasyonu engellenir (XIE, 2015). Orai1 (Şekil 1.7B) proteini ise plazma membranında (XIA, 2016) yer alan, kanal oluşturan (YANG, 2009) ve membranı 4 kez geçen yapıya sahiptir. Memelilerde Orai2 ve Orai3 olmak üzere Orai1'in iki tane homoloğu mevcuttur. Orai1 homologları depo boşaldığında STIM1 ile etkileşip kanalın açılmasına neden olmaktadır. Proteinin bir yüzü sitozole bir yüzü ise hücre membranının dışına bakmaktadır. Sitozole bakan kısım STIM1 molekülü ile etkileşerek SOCE'yi uyarır (XIE, 2015).



Şekil 1.7. SOCE'ye aracılık eden moleküller. STIM1 (A) ve Orai1 (B) moleküllerinin şematik gösterimi, (C) STIM1-Orai1 etkileşimi. STIM1 proteini kanonikal EF eli, gizli EF eli ve SAM domainini ER luminal kısmında içermekte olup CCD, SOAR ve ERM domainleri sitozolik kısımda bulunan serin, prolin ve lizin zengin kümeler oluşturmaktadırlar. (B) Orai1 proteini membranı 4 kez geçen bölgelere ve intraselüler N- ve C- uçlarına sahiptir. Orai1'e özgü N-ucunda R/P zengin bölge ve varsayımsal "coiled-coil" bölgesi C-ucunda bulunmaktadır (CLAPHAM, 2007; XIE, 2015).

1.4.2 SOCE'nin Kanserdeki İşlevi

Apoptoz, metastaz, proliferasyon gibi onkojenik transformasyonlarda, STIM1 ve Orai1 proteinlerinin aracılık ettiği SOCE'nin yer aldığı bilinmektedir. Malignite öncülü olan hücrelerde, SOCE aracılı Ca^{+2} sinyalizasyonunda meydana gelen değişiklikler tümör başlangıç aşamasında çeşitli genetik değişimlerin gerçekleştirilmesinde indükleyici işlev görür. Bu genetik değişimler hücrelerin yeniden programlanmasına yol açarak malign değişikliklerin oluşmasına yol açmaktadır (XIE, 2015).

STIM1 ve Orai1 molekülleri aracılığı ile oluşturulan Ca^{+2} sinyallerine sağlıklı hücrelerde olduğu gibi hastalık modellerinde de çeşitli hücresel süreçlerin gerçekleşmesinde gereksinim duyulmaktadır. Hücre migrasyonu ve fokal adezyonların yıkılımı (*turnover*) gibi önemli hücresel işlevlerde yer almaktadırlar. Kansereleşme sürecinde önemli bir basamağı oluşturan metastaz, birincil tümördeki hücreler arası bağlantıları tamamen ortadan kaldıracak kadar zayıflatılmasıyla hücrelerin ikincil bölgeye ekstraselüler matris (*Extracellular Matrix*, ECM) doğrultusunda hareket ederek göç edilen bölgeye yerleşmeleri ve çoğalmaları ile gerçekleşmektedir. Bu oluşum sırasındaki hücrelerin ECM boyunca migrasyonu ve ikincil bölgeye yerleştikten sonraki çoğalmaları Ca^{+2} sinyallerinde meydana gelen değişiklikler sayesinde gerçekleşmektedir. Göç halindeki HEK293 hücrelerinde Orai1 molekülü hücrelerin ön kısmındaki fokal adezyonların düzenlenmesini sağlarken, STIM1 hücrelerin ön kısmında fokal adezyonların yıkımına neden olarak hücrelerin hareketi sağlanmaktadır. STIM1 ve Orai1 moleküllerinin invazyon ve migrasyonu desteklediği birçok kanser çeşidinde gösterilmiştir. Kolorektal kanserde STIM1 ekspresyon düzeylerinin yüksek olması tümör invazyon ve migrasyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Çeşitli kanser türlerinde STIM1 ve ORAİ1 proteinlerinin posttranskripsiyonel olarak "*knock-down*" edilmesi sonucunda invazyon ve migrasyonunun inhibe olduğu gözlenmiştir (HOOPER, 2016).

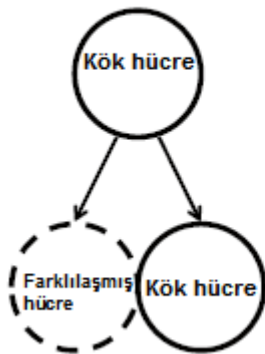
SOCE tarafından sağlanan Ca^{+2} sinyali ile proliferasyon, migrasyon, gen transkripsiyonu gibi hayati öneme sahip birçok hücresel fonksiyon gerçekleştirilirken bu mekanizmada meydana gelecek değişiklikler kansereleşme sürecinde yer alan metastaz, invazyon, migrasyon gibi temel süreçlerin gerçekleşmesine de katkıda bulunmaktadır. Bu bakımdan SOCE bileşeni olan STIM1 ve ORAİ1 proteinlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler (CHEN, 2016) kanser türlerinde çeşitlilik göstermekte olup kanser tanısında biyobelirteç olarak kullanılabilme olasılığı taşımaktadır (ZUI, 2015).

1.5 Kök Hücre

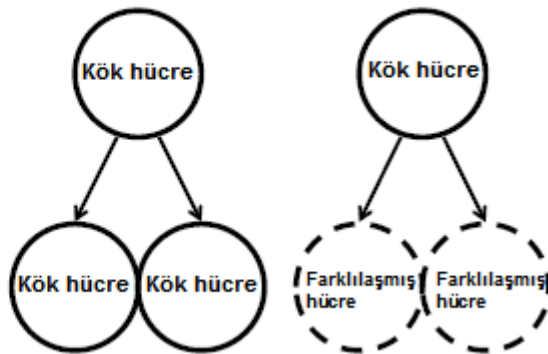
Kök hücre tanım olarak, kendini yenileyebilen ve çeşitli hücelere farklılaşabilme yeteneğinde olan farklılaşmamış hücrelerdir (GUO, 2014). Kendini yenileyebilme özelliği ile kök hücre popülasyonunun devamlılığı sağlanmaktadır. Kök hücrenin sayısı, proliferasyon, farklılaşma ve hücre ölümü gibi özelliklerinin kontrol altında tutulmasıyla dengelenmektedir. Kök hücrelerin sınıflandırılması iki şekilde olmaktadır: (1) farklılaşma potansiyeline göre (*totipotent, pluripotent, multipotent*). (2) Doku kökenine göre (embriyonik ve yetişkin kök hücre). Bu hücreler sonsuz sayıda kendini yenileyebilme özelliğine sahip, simetrik ve asimetrik bölünmelerle (Şekil 1.8) dokuya özgü çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğindeki kardeş hücreleri oluştururlar. Simetrik bölünme genellikle hücre sayısının artırılması istendiği koşullarda tercih edilen bölünme tipi olup aynı kadere sahip iki kardeş hücre meydana gelir. Asimetrik bölünmede ise kök hücre karakteristiği bakımından anne hücreye benzeyen bir hücre ve çeşitli hücre nesillerine farklılaşması için görevlendirilmiş bir kardeş hücre oluşur. Kök hücre karakteristiğine sahip olan hücre, kök hücre nişinde tutulurken, farklılaşma ile görevlendirilmiş hücre bölünmeye devam eder. Bu bölünme tipinin normal doku homeostazının sağlanmasında kullanıldığı düşünülmektedir. Gereksinim doğrultusunda ya da iç (intrinsik) ve dış (ekstrinsik) faktörlerin etkisiyle bu iki bölünme arasında geçiş sağlanmaktadır (SCHWARZ-CRUZ-Y-CELIS, 2011).

Kök hücrelerin yüzeyinde bulunan yüzey antijenleri heterojen hücre popülasyonlarından floresans tarafından aktive edilen hücre ayırıştırma (*Fluorescence-Activated Cell Sorter, FACS*) yöntemi ile kök hücre karakteristiği taşıyan hücrelerin seçilmesine olanak sağlamaktadır (GUO, 2014).

Asimetrik Bölünme



Simetrik Bölünme

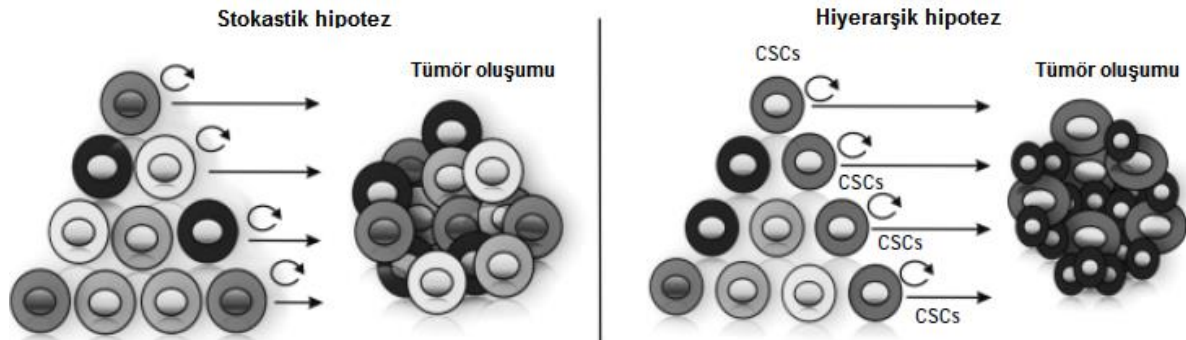


Şekil 1.8. Asimetrik ve simetrik kök hücre bölünmesi. Asimetrik bölünmeyle bir kök hücre ve bir farklılaşmış hücre oluşur. Simetrik bölünme ile iki kök hücre ya da iki farklılaşmış hücre oluşmaktadır (SHAHRIYARI, 2013).

1.5.1 Kanser Kök Hücreleri

“Kanser kök hücrelerinin” (*Cancer Stem Cells*, CSC) kök hücreye benzer şekilde kendini yenileyebilme ve farklılaşma gibi temel özelliklerinin yanısıra kök hücreler tarafından kullanılan sinyal yollarını kullanmaları (Wnt/ β -catenin, Notch, Hedgehog gibi) ‘kanser kök hücre’ tanımının oluşmasını sağlamıştır.

CSC’ler, kendini yenileyebilme, toksik maddelere karşı direnç gösterme, sağ kalım yollarının aktivasyonunda artış, farklılaşma, simetrik ve asimetrik bölünme, invazyon, migrasyon, proliferasyon hızında azalma ve çoklu ilaç direnç mekanizmalarında artış gibi özelliklere sahiptir. Tümör dokusu içinde yer alan CSC’ler oldukça az bir alt popülasyona (%0,01-1) sahiptirler. CSC’lerin oluşumu ile ilgili iki hipotez mevcuttur; *stokastik hipotez* ve *hiyerarşik hipotez*. *Stokastik hipoteze* göre tümörde bulunan bütün hücreler tümörjenik potansiyele sahiptir ve tümör, homojen tümörjenik özellikteki hücre topluluğundan oluşmaktadır. *Hiyerarşik hipotoze* göre tümör heterojen hücre popülasyonundan oluşmaktadır ve farklı biyolojik özellikte, tümör oluşumu ve büyümesini sürdürebilen CSC’leri içermektedir (Şekil 1.9.) (SCHWARZ-CRUZ-Y-CELIS, 2011; CHIBA, 2016).



Şekil 1.9. Stokastik hipotez ve Hiyerarşik hipotez. (SCHWARZ-CRUZ-Y-CELIS, 2011) (CSCs: Cancer stem cells-Kanser kök hücreleri)

Cerrahi girişim sonrası meydana gelen nüks, metastaz, kemorezistans, tümör heterojenitesi gibi durumların heterojen tümör popülasyonunda bulunan CSC’lerden” kaynaklandığı düşünülmektedir (LIU, 2015; CHIBA, 2016).

1.6 Hepatoselüler Karsinoma

Hepatoselüler karsinoma (*Hepatocellular Carcinoma*, HCC) dünya çapında sıklıkla karşılaşılan kanserden kaynaklanan ölümlerde üçüncü sırayı almakla (YANG, 2009; HOFFMANN, 2010), (BEHNE, 2012; ZHAO, 2013; D'ANZEO, 2014; CALLEGARI, 2015; SUGIMACHI, 2015; NEGAHDARY, 2015 June) birlikte giderek artan insidans ve ölüm oranına sahiptir (WU, 2015). HCC olgularının görüldüğü hasta popülasyonunun a) %80-%90'ı siroz öyküsüne sahip hastalar, b) süregelen karaciğer hasarı ve rejenerasyonundan

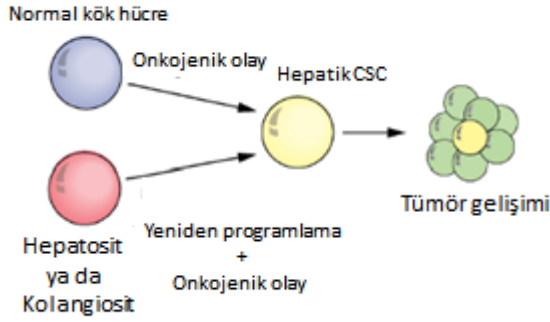
kaynaklanan kronik ve yayılmış hepatik hastalıklar, c) karaciğer sirozunun da ana nedenlerinden olan hepatit B ve C enfeksiyonu olduğu görülmektedir. Aflatoksin B1 ve vinil klorüre maruz kalmak, alkol içmek, sigara içmek, diyabet, hemokromatozis ve α -1 antitripsin eksikliği gibi genetik hastalıklar da HCC'ye yol açabilmektedir (CALLEGARI, 2015). Hepatit-B ve Hepatit-C viral enfeksiyonları HCC'ye yol açan başlıca kaynak olarak gösterilmektedir (NISHIKAWA, 2012). Kronik Hepatit-B virüsü enfeksiyonu siroz ve HCC oluşumu açısından risk faktörü oluşturmaktadır. HCC oluşumunda Hepatit B virüsü enfeksiyonundan kaynaklanmasının yanı sıra birçok faktörün aracılık ettiği kontrolsüz hücre bölünmesi, proliferasyon, ekstrasellüler matriksten ayrılması, invazyon, migrasyon gibi birçok biyolojik işlevin biraraya gelmesi ile gerçekleşmektedir.

Kaydedilen yeni gelişmelerle birlikte sağ kalım süresinde artış söz konusu olsa da hastalığın tekrar etmesi ve metastazı oldukça yüksek olduğundan hastalığın seyri ve bakımından oldukça az bilgiye ulaşılabilmektedir (WU, 2015). Teşhis sonrası 5 yıl içinde sağ kalım süresi %5-9 olup dismal prognozu tümörün geç safhada saptanmasından kaynaklanır. 5 yıllık sağ kalım süresi, tümörün varlığı teşhis edildikten sonra operasyon ile müdahale edilen hastalar için geçerli olmakla birlikte hastalığın nüks etme olasılığı oldukça yüksektir (HUNG, 2014).

HCC patolojik ve klinik olarak heterojenite göstermektedir. Rezidüel karaciğer fonksiyonu ve agresifliğine göre prognozu sağlanmaktadır. HCC'nin ilerlemesinde çeşitli genlerin deregülasyonu hücre işlevlerinde yer alan çeşitli mekanizma ve sinyal yollarında meydana gelen değişiklikler neden olmaktadır. Metabolik farklılaşmadan kaynaklanan kronik enflamasyonlar, çeşitli virüsler, genetik ve epigenetik değişimlerle birlikte sinyal yollarında meydana gelen farklılıkların biraraya gelmesi kanser oluşumuna yol açmaktadır. qRT-PCR ve genom çaplı mikrodizin gen ekspresyon çalışmaları hücre proliferasyonu, sağkalımı, farklılaşması, angiogenez bakımından sinyal yolları her HCC olgusunda değişiklik olduğunu göstermektedir (GIORDANO, 2013). Geçmiş yıllarda çalışmalar HCC oluşumu ve ilerlemesinde işlev gören gen ve proteinlere odaklanırken günümüzde mikroRNA (miRNA) olarak adlandırılan küçük düzenleyici RNA moleküllerine yoğunlaşmaktadırlar (HUNG, 2014).

1.6.1 HCC'de Kanser Kök Hücresinin Kökeni

HCC'de bulunan CSC'lerin kökeni üzerine kesin bir bilgi bulunmasa da normal kök hücrelerde meydana gelen çeşitli mutasyonların neden olduğu düşünülmektedir (Şekil 1.10.) (CHIBA, 2016).



Şekil 1.10. Hepatik kanser kök hücrelerinin oluşması (hipotetik model). Normal hepatik kök/progenitör hücrelerin onkojenik olaylarla tümorojenik aktivite kazanarak hepatik kanser kök hücresi (cancer stem cell, CSC) gibi davranması. Benzer şekilde, yeniden programlanma ve onkojenik olaylar olgun hepatositleri ya da kolanjiositleri hepatik CSC'ye dönüştürebilir (CHIBA, 2016).

1.6.2 HCC'de CSC Belirteçleri

Günümüzde yapılan yeni birçok çalışma ile HCC diyagnozunda, öncül prognozunda ve tedavisinde, potansiyel hepatik kök hücre belirteçlerinin bulunmasıyla ilgili çeşitli girişimler başlamıştır. CD133, CD44, CD90, EpCAM gibi hücre yüzey belirteçleri HCC kök hücrelerinin belirlenmesinde ve çoğaltılmasında sıklıkla kullanılan belirteçlerdendir (LEE, 2013; LIU, 2015; CHIBA, 2016).

1.7 Mikro RNA (miRNA)

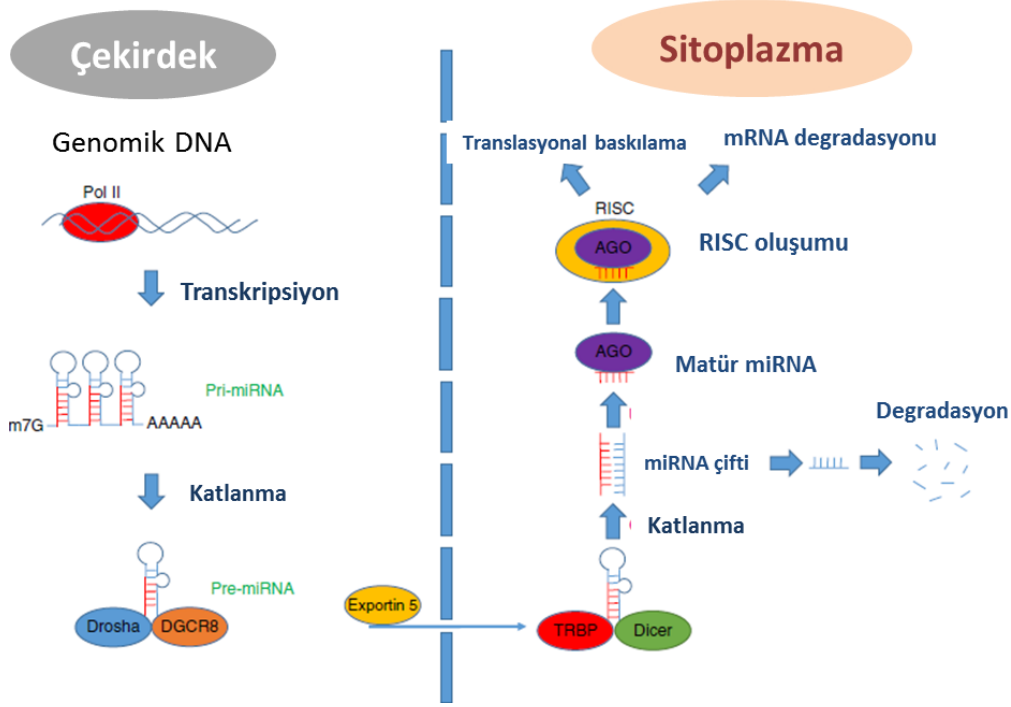
miRNA'lar kodlanmayan RNA'lardan (*non-coding* RNA) olup 20-25 nükleotid uzunluğundadırlar. Bugüne kadar yaklaşık 1,870 adet insan miRNA dizisi miRBase veritabanında yer almaktadır. miRNA'lar hedef mRNA'ların (mesajcı RNA, messenger RNA) translasyonunu ve stabilizasyonunu sağlayan moleküllerdir. miRNA-mRNA etkileşimi 3'UTR bölgesindeki etkileşim ile gerçekleşir (HUNG, 2014; MORISHITA, 2015). miRNA'ların mRNA'ya bağlanması ile hedef transkriptin degradasyonu ya da translasyonel baskılanması şeklinde etkilerini göstermektedirler. İnsan genlerinin yaklaşık olarak üçte birinin miRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir. Buna göre bir miRNA'nın yüzlerce gen ile etkileştiği düşünülmektedir. Bu bakımdan sağlıklı hücrelerden kanserleşme sürecine geçilmesinde tek bir miRNA'nın etkili olması söz konusu olmaktadır. miRNA'lar embriyonik gelişim, metabolizma, hücre döngüsü, farklılaşma, karsinogenez, tümörün ilerlemesi gibi birçok temel hücresel faaliyetin gerçekleşmesinde yer almaktadır. (D'ANZEO, 2014; HUNG, 2014).

1.7.1 miRNA Biyogenezi

Çekirdekte RNA polimeraz II tarafından miRNA genlerinin ilk transkripsiyonu gerçekleştirilir (Şekil 1.11.). Bu sayede 1-4 kb uzunluğunda başlıklı, uzun ve poli-adenil birincil miRNA (pri miRNA) oluşmaktadır. Birincil miRNA'lar daha sonra mikroprosesör kompleksi *Drosha* (nükleaz) ve *Pasha* (çift iplikli RNA'ya bağlanan protein) tarafından kesilerek 60-100 nükleotid uzunluğunda öncül miRNA'lara (pre miRNA) dönüşür. Çekirdekten pre-miRNA *exportin 5* aracılığı ile sitoplazmaya çıkarılır. *Dicer* (RNaz enzimi) tarafından kesilerek çift iplikli miRNA'lar oluşur. Helikaz tarafından çift iplik kesilerek miRNA'lar tek iplikli hale getirilir ve olgun miRNA'lar oluşur, miRNA'lar RISC kompleksi ile birleşir (Şekil 1.11.) (HUNG, 2014; WANG, 2015; YANG, 2015).

1.7.2 miRNA'ların Özellikleri

miRNA'lar proteine kodlanmayan küçük RNA molekülleri olup hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesi ile etkileşerek gen ekspresyonunun düzenlenmesini sağlamaktadır. miRNA'ların uzunlukları 21-23 nükleotid arasında değişmektedir. miRNA'ların transkripsiyon sonrası regülasyonu sağlayan ve büyüme, gelişme, farklılaşma, üreme gibi birçok hücrel ve gelişim işlevinde yer aldığı ileri sürülmüştür. miRNA'lar tümörigenezin oluşumunda önemli role sahiptirler. miRNA mikrodizinleri (transkriptom) kanser tanısında potansiyel belirteç özelliği göstermektedirler. miRNA transkripsiyon kalıpları sayesinde tümörün gelişim kökeni ve farklılaşma aşamalarının aydınlatılması sağlanabilmektedir. Birçok miRNA tümör baskılayıcı, onkogen ya da CSC'lerin ve metastaz düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. miRNA'ların hedefi ve ilgili sinyal yollarının tanımlanmasının miRNA tabanlı terapötiklerin geliştirilmesine katkıda bulunacağı düşünülebilir (ZHU, 2014).



Şekil 1.11. miRNA biogenezi. (MORISHITA, 2015)

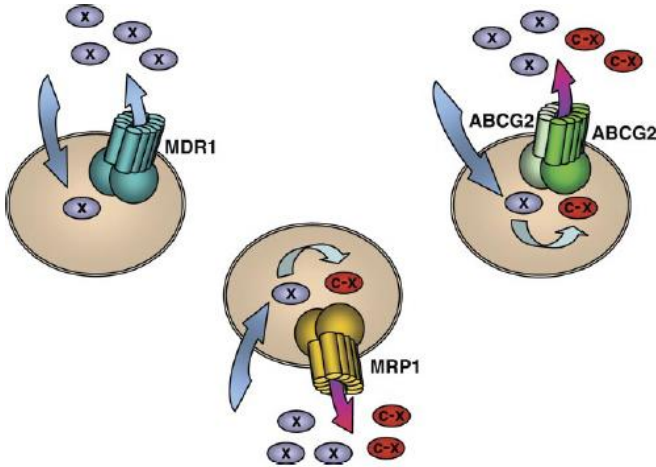
1.7.3 miRNA ve HCC

Son yıllarda kansinjenizde rol oynayan miRNA'larla ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Kanseri hücrelerinde miRNA ekspresyonlarının sıklıkla değiştiği gözlemlenmiştir. Apoptoz, proliferasyon, farklılaşma, anjiyojeniz, metastaz ve invazyonun mekanizmasında miRNA'ların etkisiyle çeşitli değişiklikler gerçekleşmektedir. miRNA'ların ekspresyonlarındaki değişiklikler (azalma-artma) sayesinde kansinjenik süreçler yapılandırılmaktadır. miRNA'lar hedeflerinin hücresel işlevine göre onkogen ya da tümör baskılayıcı genler gibi etki gösterebilirler (HUNG, 2014; CALLEGARI, 2015).

HCC birçok risk faktörünün yol açtığı çok faktörlü bir kanser türüdür. Tümörün başlaması, ilerlemesi ve metastazında rol oynayan moleküler mekanizmaların yanısıra tam olarak mekanizması anlaşılammıştır. miRNA'ların keşfedilmesi ve ilişkili moleküler hedefleri içeren tedavilerin giderek ortaya çıkmasıyla HCC daha baş edilebilir hale gelmektedir. Son günlerdeki karaciğer miRNA çalışmalarında çeşitli tekniklerle spesifik miRNA'ların aşırı düzeyde ifade ettirilmesi ya da inhibisyonu ile *in vivo* koşullarda miRNA'ların karaciğerde önemli işleve sahip olduğu saptanmıştır. Bazı miRNA'ların HCC oluşumu sırasında anormal şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu miRNA'lardan bazılarının prognoz açısından önemli olabileceği düşünülmektedir (ZHU, 2014).

1.8 Kanserde Çoklu İlaç Direnç Kavramı

Kanser hastalarının tedavisinde sıklıkla karşılaşılan durumlardan bir tanesi de çoklu ilaç direncidir. Kemoterapi sonrasında tedaviye istenilen yanıtın alınamamasının sebebi tümör hücrelerin birçok farklı yapı ve fonksiyona sahip sitotoksik ilaçlara karşı duyarsız hale gelmesidir (TAHERI, 2010). Çoklu ilaç direnci (*Multiple Drug Resistance*, MDR) proteinlerinin (ATP-bağlayıcı kaset proteinleri, ATP-Binding Casette) insanlarda başlıca 3 çeşidi vardır, 1- ABCB (ABCB1/MDR1/P-glikoprotein), 2-ABCC (ABCC1/MRP1, ABCC2/MRP2, ABCC3-6, ABCC10-11), 3-ABCG(ABCG2/MXR/BCRP). Bu pompalar çok sayıda ilaç substratını tanıma özeliğinde olup hepsi farklı özellikteki bileşenlere karşı daha duyarlıdır (Şekil 1.12.). Genellikle hidrofobik bileşiklere duyarlı olmalarına karşın amfipatik katyon ve anyonların hücre dışına atılmasında etkilidirler. ABCB1 genellikle hücreden büyük hidrofobik maddelerin atılmasını sağlarken ABCC1 ve ABCG2 hem hidrofobik hemde büyük hidrofobik anyonik bileşiklerin hücreden dışarı atılmasını sağlar (SARKADI, 2006). HCC'de transmembran ABC'lerin hücrede fazlaca ifade edilmesiyle sitotoksik bileşenlerin dışarı atılması sağlanmaktadır. Bu MDR pompaları sayesinde çeşitli farmakolojik maddelerin hücre içinde dağılımı, absorpsiyonu, hücre dışına atılımı gerçekleştirilmektedir. HCC'de MDR proteinlerinin ekspresyonundaki artış hastanın yaşam süresini olumsuz etkilemenin yanı sıra tümörün daha agresif özellikte olmasına neden olmaktadır (HOFFMANN, 2010).



Şekil 1.12. ABC transportörlerinin genel işleyiş mekanizması. MDR transportörleri plazma membranında yer almakta olup çeşitli hidrofobik, amfipatik maddelerin dışarı atılmasını sağlarlar. X: hidrofobik bileşikler, C-X: hidrofobik, hücreiçinde oluşturulan metabolitler örn: glutatyon, glukuronid bileşikleri (SARKADI, 2006).

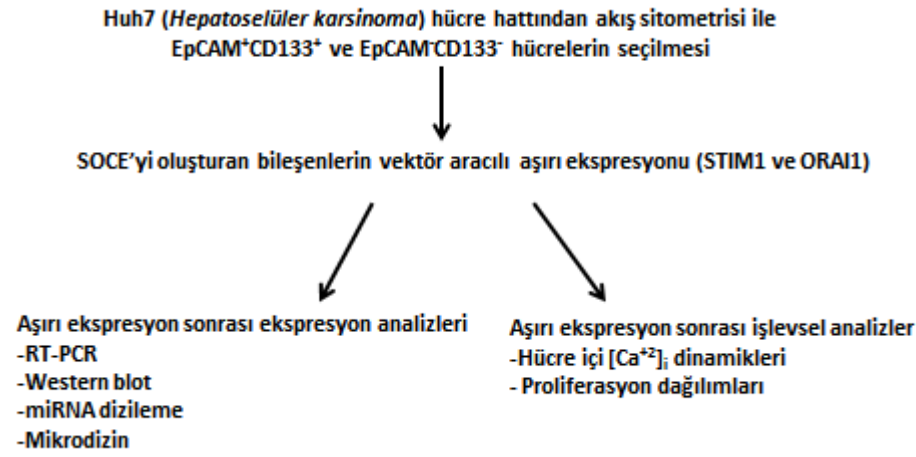
1.9 Epitelyal Mezenkimal Geçiş (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT)

EMT, epitelyal özellikteki hücreler geçici bir süreliğine mezenkimal benzeri hücrelere dönüşmektedir. EMT sırasında hücreler, hücreler arası bağlantılarından kurtularak bireysel olarak hareket edebilme özelliğine sahip olmaktadır. EMT sırasında epitelyal belirteç ekspresyonlarında (*E-cadherin*) azalma, mezenkimal belirteç ekspresyonlarında (*N-cadherin*, *vimentin*, *fibronectin*) artış gözlenmektedir. Kansereleşme sürecinde EMT-MET geçişleri kanser hücrelerinin metastazında önemli işleve sahiptir. Bu sayede kanser hücreleri buldukları bölgeden başka bölgelere göç ederek, yerleşim sağlamaktadırlar (GIANNELLI, 2016).

SOCE'nin ve bileşenlerinin HCC gelişiminde temel işlevlerinin gösterilmesi tedaviye dirençli olmaları nedeniyle kemoterapi sonrası nükslere neden olan söz konusu tümör hücresi alt popülasyonları olan CSC'lerin fenotipik farklılaşmasında SOCE operasyonel olduğunu hipotezini geliştirmemize neden olmuştur. Bu nedenle, SOCE'ye aracılık eden iyon kanalı bileşenleri olan TRPC, STIM1 ve Orai1'in işlevsel genomik düzeyde incelenmesi mekanizmanın aydınlatılmasını ve HCC CSC'lerde hedef miRNA ve ilişkili transkriptler hedef validasyonu kapsamında araştırılmıştır. STIM1 ve Orai1 OE uygulamalarının her ikisinde de iki adet miRNA düzeyi belirgin olarak artmış olup STIM1 ve Orai1'in kanser hücrelerinin 3E süreçlerinden E2 "*Equilibrium*" (denge) fazında işlevsel olabileceği görülmüştür. Bu durum kanser bağışık yanıt düzenlenmesinde (*cancer immunoediting*) önemli bir terapötik hedef geliştirilmesi fırsatı oluşturmaktadır.

2 GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda insan hepatoselüler karsinoma hücre hattı Huh7 hücrelerinden tümör başlatma (Tumor-Initiating, TI) potansiyeli ve kanser kök hücre (*Cancer Stem Cell*, CSC) özelliğine sahip olduğu ileri sürülen hücreler EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*, epitelyal hücre adhezyon molekülü) ve CD133 (Prominin-1) yüzey antijenlerine göre akış sitometrisi ile seçilmiştir. EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 hücrelerde depo kontrollü Ca²⁺ girişinin (*Store-Operated Ca²⁺ Entry*, SOCE,) iki önemli bileşeni olan STIM1 ve Orai1 moleküllerinin aşırı eksprese edildiği koşullardaki hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonunda zamana bağlı değişimler ile ilgili işlevsel analizler ve miRNA dizileme ile hedef miRNA'ların belirlenmesi ve mikrodizin çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Seçilen hücrelerde gerçekleştirilen deneyler Şekil 2.1.'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Akış sitometrisi ile ayrıştırma sonrası gerçekleştirilen deneyler.

2.1 Huh7 HCC Hücre Hattı Kültürü

Huh7 hücreleri %10 fetal sığır serumu (*Fetal Bovine Serum*, FBS), 2 mM L-glutamin ve 0,1 mM esansiyel olmayan aminoasit karışımı eklenen DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) besi ortamında çoğaltıldı.

2.1.1 Huh7 HCC Hücre Hattı Kimlik Doğrulaması

Çalışmalara başlamadan önce Huh7 HCC hücre hattı kimlik doğrulaması (*authenticity*) analizi yaptırıldı (Idexx, Almanya). Kimlik doğrulaması sonucunda örneğin insan kökenli olduğu ve diğer memeli hücre hatları ile kontamine olmadığı doğrulandı. Örnekteki 9 farklı

alel ilgili “belirteçler” kullanılarak belirlendi ve Huh7 HCC hücre hattına özgü aleller ile karşılaştırıldı.

2.1.2 Mikoplazma Kontrolü

Belirli aralıklarla, mikoplazma belirleme kiti (MycoAlert, Lonza) kullanılarak mikoplazma kontrolleri yapıldı. Yöntem, kontaminasyon varlığında besi ortamındaki mikoplazmaya ait enzimlerin MycoAlert substratı ile reaksiyona girerek ADP'nin ATP'ye dönüşümünü katalize etmesi ile ATP düzeylerindeki artışa bağlı olarak oluşan biyoluminesansın luminometrik olarak belirlenmesi (Varioskan Multiplate Reader, Thermo) esasına dayanır.

2.2 FACS ile EpCAM⁺CD133⁺ Hücrelerin Ayrılması

Hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra pellet FACS tampon çözeltisi (1XPBS, 1 mM EDTA, 25 mM HEPES, %1 FBS içeren çözelti, 0,2 µm filtreden geçirildi) ile resüspanse edildikten sonra hücre agregatlarını uzaklaştırmak için önce por çapı 100 µm olan (Miltenyi 130-098-463) daha sonra da 30 µm'lik (Miltenyi 130-098-458) elekten (Miltenyi 352235) geçirildi.

Hücre sayımı yapılarak hücreler 15×10^6 olacak şekilde ayrıldı ve 1500 rpm'de santrifüj edildi. Hücre pelleti 105 µl FACS tampon çözeltisi ile resüspanse edildikten sonra 30 µl FcR bloklama ajanı (Miltenyi, 130-059-901), 15 µl FITC (*fluorescein isothiocyanate*) ile konjuge EpCAM (CD326) antikoru (anti-EpCAM-FITC, Miltenyi 130-080-301, 1:11 oranında) ve 15 µl PE (R-phycoerythrin) ile konjuge CD 133 antikoru (anti-CD133-PE, Miltenyi 130-080-801, 1:11 oranında) eklendi. +4 °C'de 10 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası FACS çözeltisi ile iki kez 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkama yapıldı. Daha sonra hücre pelleti 2 ml FACS çözeltisi ile resüspanse edilerek DAPI boyaması (0,5 µl/ml) ile ön nicel analiz sırasında ölü hücre popülasyonları tanımlanarak ayırlama sırasında elimine edildi. 2 ml FACS çözeltisindeki hücre süspansiyonu BD FACS Aria III (BD Biosciences) cihazı aracılığıyla EpCAM⁺/CD133⁺ ve EpCAM⁻/CD133⁻ olacak şekilde 1 ml FBS içeren iki ayrı tüp içinde toplandı.

2.2.1 Akış sitometrisi ile EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ Hücre Popülasyonlarının Belirlenmesi

Hücreler (2×10^5) 1500rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak boyanmamış hücreler 500 µl FACS çözeltisinde resüspanse edildi, sadece EpCAM-FITC boyaması hücre pelleti 40

µl FACS çözeltisinde çözüldükten sonra 10 µl FcR ve 5 µl FITC ile +4 °C'de karanlıkta inkübe edildikten sonra 500 µl FACS çözeltisi ile 5 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldıktan sonra pellet 500 µl FACS çözeltisi ile resüspanse edildi. Sadece CD133-PE boyaması için hücre pelleti 40 µl FACS çözeltisinde çözüldükten sonra 10 µl FcR ve 5 µl PE ile +4 °C'de karanlıkta inkübe edildikten sonra 500 µl FACS çözeltisi ile 5 dk santrifüjlendi, süpernatant atıldıktan sonra pellet 500 µl FACS çözeltisi ile resüspanse edildi. EpCAM-FITC ve CD133-PE boyaması (ikili boyama) için hücre pelleti 35 µl FACS çözeltisinde çözüldükten sonra 10 µl FcR ve 5 µl FITC ve 5 µl PE ile +4 °C'de karanlıkta inkübe edildikten sonra 500 µl FACS çözeltisi ile 5 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldıktan sonra pellet 500 µl FACS çözeltisi ile resuspanse edildi. FACS Calibur'da okumalar yapıldı ve hücrelerin yüzde değişimleri belirlendi.

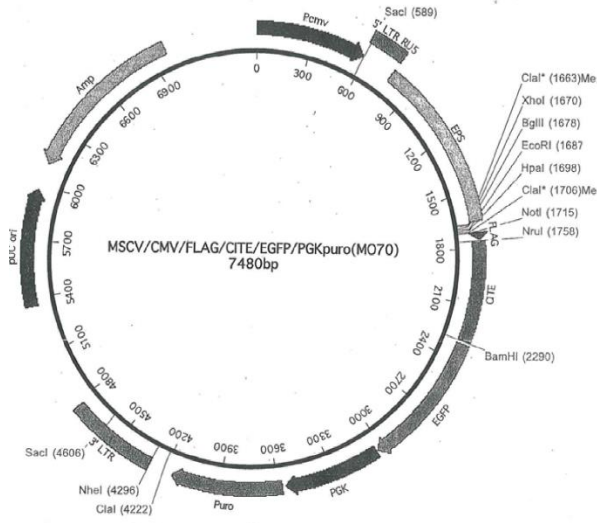
2.2.2 İmmünofloresan (IF) ile EpCAM⁺CD133⁺ Yüzey Antijenlerini taşıyan Huh7 Hücrelerinin Belirlenmesi

12 mm çapında dairesel lamel üzerinde çoğaltılan hücreler formaldehit (%4) ile fikse edildi. Daha sonra bloklama çözeltisi (0,3 M glisin, % 5 BSA, %0,1 Tween20 içeren PBS, PBS-T) 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. 1/50 oranında FITC işaretli anti-EpCAM antikoru (anti-EpCAM-FITC, BD, 347197) ile gece boyunca +4°C'de karanlıkta inkübe edildi. DAPI içeren çözelti ile kapatılan lameller floresan mikroskopu (Olympus, IX71) kullanılarak görüntülendi.

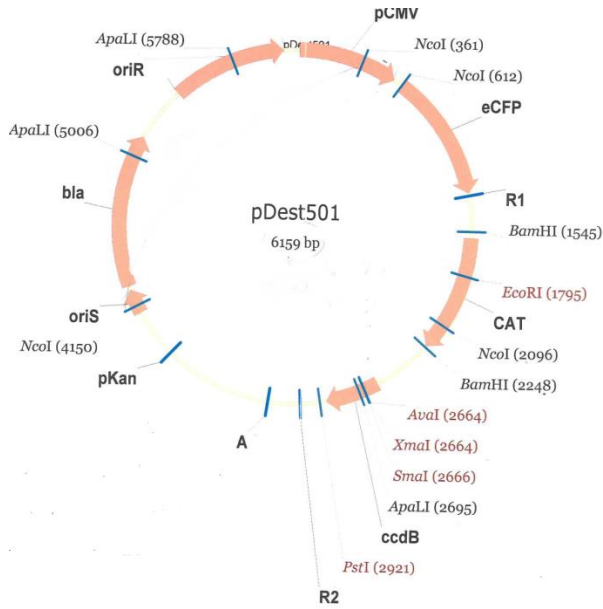
2.3 Plazmid Vektörlerin Bakteriyel Transformasyonla Çoğaltılması ve Saflaştırılması

2.3.1 Plazmidlerin Çoğaltılması

STIM1 ve Orai1 genlerinin aşırı eksprese edilmesine (overexpression, OE) neden olan plazmid vektörler (STIM1 için MO70 Şekil 2.2. ve Orai1 için pDest501 Şekil 2.3.), transfeksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere çoğaltıldı. Bu amaçla aynı zamanda floresan protein eksprese eden CFP Orai1, eYFP STIM1 ve PCMV6 plazmidleri hidrofilik yapıda olmaları nedeniyle bakteri membranından geçişini kolaylaştırmak amacıyla membranı kimyasal olarak geçirgen hale getirilmiş kompetan *E.coli* bakterilerine transformasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 2.2. eYFP STIM1' cDNA'sı taşıyan MO70 plazmid haritası.



Şekil 2.3. CFP Orai1 cDNA'sını taşıyan pDEST501 plazmid haritası.

Transformasyon Protokolü

1. -86°C'de saklanan 50 µl hacimdeki bakteriler buzda çözüldü.
2. Bakteri süspansiyonuna 1-5 µl plazmid eklendi.
3. Bakteri ve plazmid karışımı 30 dk buzda bekletildi.
4. Karışım 42°C su banyosunda 30 sn bekletildikten sonra 2 dk buzda soğutuldu.
5. Bakteri ve plazmid karışımını içeren test tüpüne önceden ısıtılmış 250 µl SOC besi yeri eklendi.
6. 37°C'de çalkalamalı inkübatörde (225 rpm) 1 saat inkübe edildi.

7. 20-200 µl transformasyon çözültüsü, ampisilin (100 µg/ml) içeren “*Luria-Bertani*” LB agar petrilere yayılarak 12 saat 37°C’de inkübe edildi.

Not: Sadece ampisilin direnç genini taşıyan plazmidler ile transforme olan bakteriler ampisilin içeren besi ortamında çoğalarak kolonize olurlar.

Oluşan koloniler 100 µg/ml ampisilin içeren sıvı LB ortamında çalkalamalı inkübatörde (37°C, 200 rpm, 12 saat) çoğaltıldı. Sıvı besi yerinde çoğalan bakteri kültürlerinden gliserol stokları hazırlanarak plazmid izolasyonu yapıldı.

Kompedan Bakterilerin Gliserol Stoklarının Hazırlanışı

850 µl bakteri kültürüne 150 µl steril gliserol (% 50) eklendikten sonra -86 °C’de saklandı.

Plazmid İzolasyonu

Plazmidleri üreten bakteri kültürlerinden plazmid izolasyonu “PureLink HiPure Plazmid Filter Purification Kit” (Invitrogen) kullanılarak aşağıdaki süreç izlenerek gerçekleştirildi.

- Bakteri kültürü 50 ml santrifüj tübüne alındı. Yüksek kopya sayısına sahip plazmidler için 15-25 ml, düşük kopya sayısına sahip plazmidler için 25-100 ml hacminde kültürden izole edildi.
- 10 dk santrifüj (4000 g) edildikten sonra bakteri pelleti üzerindeki sıvı uzaklaştırıldı.
- Bakteri pelleti 10 ml “*Resuspension Buffer*” (RNase A içeren) ile süspand edildi.
- Hücre süspansiyonu yeni bir tüpe alınarak üzerine 10 ml “*Lysis Buffer*” eklendi.
- 10 ml “*Precipitation Buffer*” eklenerek tekrar çökelme sağlandı.
- Çöktürülen lizat “*Mid*” kolonlara aktarıldıktan sonra lizatın kendiliğinden akması beklendi.
- 10 ml “*Wash Buffer*” eklenip lizatın yıkanarak çözültünün filtreden geçmesi için beklendi.
- İç kısımdaki filtrasyon kartuşu atıldı ve 20 ml “*Wash Buffer*” filtre kolonuna eklendi.
- HiPure filtre kolonu altına 15 ml’lik santrifüj tüpü yerleştirildi.
- 5 ml “*Elution buffer*” ile ayrışma sonrası alttaki sıvıya 3,5 ml izopropil alkol eklendi.
- 2 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 30 dk +4°C’de santrifüj (12,000 g) edildi.
- Üstteki süpernatant atıldıktan sonra 3 ml etanol (%70) eklendi.
- 5 dk +4°C’de santrifüj (12,000 g) edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra plazmid DNA pelleti hava ile kurutuldu.
- Pellet 100-200 µl steril TE tampon çözültüsünde çözüldü.

İzole edilen plazmidlerin miktar tayinleri spektrofotometrede (Nanovette, Beckman Coulter) 260 nm'deki absorbans (A_{260}) ölçümü ile yapıldı. Safılıkları $A_{260}/280$ değerleri ile belirlenerek kontrol edildi. $A_{260}/280$ değeri 1,8'den yüksek olan plazmidler transfeksiyon çalışmalarında kullanıldı.

2.3.2 FACS ile Seçilen EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 Hücrelerinde eYFP^{Stim1} ve CFPOrai1 Transfeksiyonu

Hücreler herbirinde yaklaşık 10^5 sayıda olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere ekildi ve 24 saat sonra transfeksiyon işlemi gerçekleştirildi. %10 FBS içeren DMEM uzaklaştırıldıktan sonra serum içermeyen ortamda (opti-MEM, Gibco) hücreler transfeksiyon öncesi 1 saat bekletildi. Her örnek için 100 µl Opti-MEM, 1.5 µg plazmid DNA (MO70-STIM1-eYFP ve pDEST501-Orai1-CFP) ve 1 µl X-tremeGENE HP DNA transfeksiyon ajanından (Roche) oluşan kompleks 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnek içeren her kuyucuğa 100 µl transfeksiyon kompleksi damla damla eklenerek çözeltinin dengeli karışması sağlandı ve 24-72 saat inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra serumsuz DMEM, serum içeren DMEM ile değiştirildi. Kontrol grubu hücreler STIM1 ve Orai1 cDNA'sı içermeyen pCMV6-AC-GFP vektörü ile transfekte edildi.

2.4 Konvansiyonel PCR

Hücrelerden total RNA izolasyonu "High Pure RNA Isolation" kiti (Roche, 11828665001) kullanılarak yapıldı. RNA miktarları spektrofotometrede 260 nm'deki absorbans (A_{260}) değerleri (Nanodrop) ölçülerek belirlendi. "Transcriptor cDNA synthesis kiti (Roche, 04379012001) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. EpCAM transkripsiyon düzeyini belirlemek için PCR optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla, Taq PCR kiti (NEB E5000S) ve termal döngüleyici (thermal cycler, Techne, TC512) kullanıldı.

2.5 RNA İzolasyonu

Hücrelerden High Pure RNA Isolation Kiti (11 828 665 001, Roche) kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

- Hücreler tripsinize edildi ve santrifüj edilerek (180 g 7 dk) pellet oluşturuldu.
- Pellet 200 µl PBS içerisinde tekrar süspansiyon haline getirildi.
- Lizis/bağlanma çözeltisi (400 µl) eklendi.
- Ekstraksiyon tüplerine (*spin cartidge*) yüklendi, 15 sn santrifüj edildi (25°C, 8.000 g).
- DNase inkübasyon çözeltisi (90 µl) + DNase I (10 µl) karışımı ile 15 dk inkübe edildi (25°C).

- 500 µl yıkama çözeltisi (I) eklendi ve 15 sn santrifüj edildi (25°C, 8.000 g).
- 500 µl yıkama çözeltisi (II) eklendi 15 sn santrifüj edildi (25°C, 8.000 g). Bu yıkama işlemi tekrarlandı.
- 2 dk santrifü edildi (25°C, 13.000 g).
- Ayırıştırma için ekstraksiyon tüplerine 50 µl ayırıştırma (*elution*) çözeltisi eklendi ve 1 dk santrifüj edildi (25°C, 8.000 g).

2.6 cDNA Sentezi:

Total RNA örneklerinden Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) kullanılarak cDNA örnekleri oluşturuldu.

- 1 µg total RNA'ya 1 µl *anchored-oligo(dT)* primer eklenerek total hacim su ile birlikte 13 µl tamamlandı.
- Primer-template karışımı 65 °C'de 10 dk *thermal cycles*'de ısıtıldı.
- 4 µl transcriptor "reverse transcriptase"(RT) reaksiyon çözeltisi,
- 0,5 µl Protector RNase inhibitör,
- 2 µl dNTP karışımı,
- 0,5 µl transcriptor RT eklenerek 20 µl total hacim elde edildi.
- 30 dk 55°C'de thermal cycles'da bekletildi.
- Son olarak 85°C'de 5 dk bekletildi.

2.7 Gerçek Zamanlı Nicel RT-PCR (Real Time quantitative Reverse Transcriptase PCR, qRT-PCR)

FC ile seçilen EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ hücrelerde hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri qRT-PCR (LightCycler 1.5, Roche) kullanılarak nicel olarak belirlendi. Hücrelerden kit (HighPure RNA Isolation Kit, Roche) kullanılarak izole edilen RNA örneklerinden 1 µg kullanılarak sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit) ile cDNA'lar oluşturuldu.

Kullanılan PCR programı:

- 1) Başlangıç denatürasyonu: çift sarmal cDNA'nın tek sarmal hale getirilmesi
- 2) Amplifikasyon: hedef cDNA'nın çoğaltılması
 - Denatürasyon: çift sarmal DNA'nın tek sarmal hale getirilmesi
 - Primer bağlanması: hedef DNA'ya spesifik primerlerin bağlanması
 - Uzama: çift sarmal DNA'nın sentezlenmesi (72°C)
- 3) Ergime eğrisi
- 4) Soğutma

mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için FastStart DNA Master SYBR Green I kiti (Roche) kullanıldı. Standart (*18S rRNA*) dilüsyonları kullanılarak her çalışmaya özel çizilen eğriler kullanılarak mRNA konsantrasyonları hesaplandı.

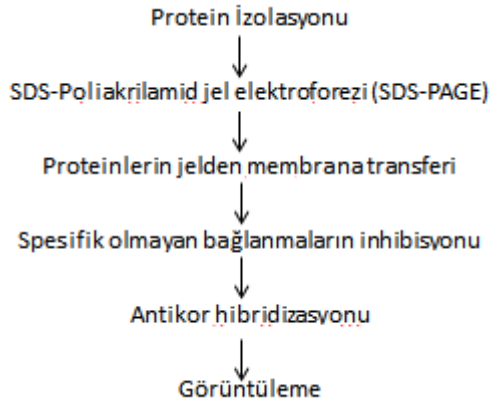
PCR reaksiyonu $MgCl_2$ 2 mM, ileri "forward, F" ve geri "reverse, R" primerler (Tablo 2.1.) her biri 0,5 μ M olacak şekilde gerçekleştirildi ve 18S rRNA referans olarak kullanıldı.

Tablo 2.1. PCR çalışmalarında kullanılan primer dizileri

Gen	Erişim No	Yön	Primer dizisi (5'-3')	Ürün boyutu (bp)
EpCAM	NM_002354	F	CTG GCC GTA AAC TGC TTT GT	182
		R	AGC CCA TCA TTG TTC TGG AG	
MDR	NM_000927.4	F	CAG AGG GGA TGG TCA GTG TT	197
		R	TCA TAG GCA TTG GCT TCC TT	
STIM1	NM_001277961	F	AGC AGA GTT TTG CCG AAT TG	132
		R	ATC ACT TTC TTC CAC ATC CAC AT	
Orai1	NM_032790.3	F	CAG AGT TAC TCC GAG GTG ATG AG	119
		R	GAG AGC AGA GCC GAG GTC C	
E-cad	NM_004360.3	F	TAC ACT GCC CAG GAG CCA GA	103
		R	TGG CAC CAG TGT CCG GAT TA	
N-cad	NM_	F	ATT GGA CCA TCA CTC GGC TTA	159
		R	CAC ACT GGC AAA CCT TCA CG	
Vimentin	NM_003380.3	F	CCT TGA CAT TGA GAT TGC CAC CTA	215
		R	TCA TCG TGA TGC TGA GAA GTT TCG	
Fibronektin	NM_212482.2	F	CAA GCC AGA TGT CAG AAG C	139
		R	GGA TGG TGC ATC AAT GGC A	
18sRNA		F	CGA CGA CCC ATT CGA ACG TCT	312
		R	GCT ATT GGA GCT GGA ATT ACC G	

2.8 Protein Analizleri (Western Blot)

Western blot (WB) yöntemi ile hücre kültüründen elde edilen örneklerde protein ifade düzeyleri spesifik antikorlar yardımıyla belirlendi. WB protokolü aşağıda özetlenmiştir:



2.8.1 Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu “cOmplete Lysis-M, EDTA free” (Roche) ile gerçekleştirildi.

- 6 kuyucuklu petriye yaklaşık 25×10^4 hücre ekildi.
- Kuyucuklardan besi ortamı uzaklaştırıldı.
- 1X PBS ile yıkama yapıldı.
- Her kuyucuğa 200 μ l Lysis-M tamponu eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücre lizati 14.000 g de 10 dk santrifüjlendi.
- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant proteinleri içerir.
- Süpernatant steril bir tüpe aktarılarak Qubit protein assay (Invitrogen) ile konsantrasyon ölçümleri yapıldı.

2.8.2 SDS Jel Elektroforezi

Proteinler jele 40 μ g konsantrasyonda olacak şekilde yüklendi. Her örnek için hesaplanan hacimde protein üzerine örnek 6x yükleme tamponu (1:6 oranında) ilave edildi. Örnek yükleme çözeltisi indirgeyici bir ajan olan β -merkaptoetanol (β -ME) içermektedir. β -ME tampon içerisine örnek yükleneceği zaman ilave edildi. Hazırlanan protein örnekleri jele yüklenmeden önce 5 dk 95-100°C’de kaynatılarak SDS (Sodyum Dodesil sülfat)’nin proteinlerin etrafını kuşatarak proteinleri denatüre etmesi sağlandı (tampon içerisinde bulunan SDS’nin proteinlere bağlanması ile proteinler negatif yüklü hale gelir). Protein örnekleri %10 ve %12,5’lik SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*) jeline yüklenerek SDS-protein komplekslerinin molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlandı. Tankın içine yerleştirilen jel yürütme tamponu içerisinde “stacking” jel için 120 volt, *resolving* için 150 volt uygulanarak örnekler \approx 2-3 saat yürütüldü.

Proteinlerin Transferi

PVDF (Immobilon-P polyvinylidene difluoride, PVDF, Sigma) membran 15 sn metanolde bekletildi. Daha sonra jel ve membran \approx 5-10 dk kadar transfer çözeltisi içerisinde inkübe edildi. Ayrıca kullanılacak olan, Whatman filtre kağıdı ve süngerler de transfer çözeltisi içerisinde bekletildi. Proteinlerin jelden membrana transfer edilmesi için Whatman kağıtları ve süngerler ile bir sandviç oluşturuldu. Jel taşıyıcı kaset üzerine sırasıyla sünger, 2 filtre kağıdı ve jel yerleştirildi. Bunların üzerine jele uygun büyüklükte kesilen membran, 2 filtre kağıdı yerleştirildi. Sandviçi içeren jel taşıyıcı kaset elektrod modülüne yerleştirilip transfer tankına yerleştirildi. Transfer tankı transfer tamponu ile dolduruldu, elektrod modülü transfer tamponu dolu transfer tankı içerisine yerleştirildi. Transfer işlemi oda sıcaklığında 0,25 Amp'de 90 dk süre ile gerçekleştirildi (negatif yüklü proteinler katottan anoda doğru hareket ederler). Transfer işlemi sonrasında proteinlerin etkin bir şekilde transfer olup olmadığını kontrol etmek amacıyla membran Ponceau çözeltisi ile \approx 5 dk muamele edildi. Transfer olan proteinler kırmızı/pembe renkte görülür.

Membranın Bloke Edilmesi ve Antikorlar ile İnkübasyonu

Membran BS blocking buffer(Odyssey, Licor) içerisinde 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Membranın daha sonra protein büyüklük belirleyicisi (Blue Prestained Protein Standard, NEB) yardımı ile belirlenen uygun yerinden kesildi. Böylece aynı membranda hem yükleme kontrolü olarak kullanılan β -aktin proteini hem de Stim1, Orai1, TRPC1 ve TRPC6 proteinleri belirlenebilmiştir. β -aktin proteininin (\sim 43 kDa) bulunduğu düşünülen membranın alt kısmı anti- β -aktin antikorlu (1:1500 dilüsyon, Abcam) ile membranın kalan kısmı anti-Stim1 (3 μ g/ μ l konsantrasyonda, Abcam), anti-Orai1 (1:750 dilüsyon, Abcam), anti-TRPC1 (1:1000 dilüsyon, Abcam) ve anti-TRPC6 antikorları (1:1000 dilüsyon, Sigma) ile +4°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Primer antikorlarla inkübasyon sonrasında membran TBS-T ile 3 kez 5'er dakika (toplam 15 dk) çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Membran anti-rabbit ve anti-mouse (kullanılan primer antikora göre) sekonder antikorlar ile (Odyssey, Licor) 1:5000 dilüsyonda 1 saat süresince karanlıkta çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Membran tekrar TBS-T ile 3 kez 5 dakika yıkanarak görüntülemeye hazır hale getirildi. Membran, görüntüleme cihazında (Odyssey, Licor) sekonder antikorlara göre 680RD ve 800CW kanalında görüntülendi. Stim1, Orai1, TRPC1 ve TRPC6 proteinlerinin bant şiddeti Odyssey 3.0v yazılımı ile belirlenerek β -aktin bandına orantılandı.

2.9 Hücre içi Ca²⁺ Konsantrasyon Değişimlerin Gerçek Zamanlı İzlenmesi

Hücre içi Ca²⁺ konsantrasyon ([Ca²⁺]_i) değişimleri, Ca²⁺ iyonuna spesifik bağlanma gösteren fura-2/asetoksimetil (AM), hücre membranından geçtikten sonra ester grubu sitozolik esterazlarla kesilir. Fura-2'nin karboksil uçları serbest halde olduğunda eksitasyon dalga boyu 380 nm iken Ca²⁺ bağlandığında 340 nm'ye kayar ve 510 nm'de izlenen emisyon şiddeti Ca²⁺ konsantrasyonu ile orantılı olarak artış gösterir. Hücre içi Ca²⁺ değerlerindeki değişim orantısız olarak (F_{340/380}) verilmiştir.

Hücrelerin hazırlanması:

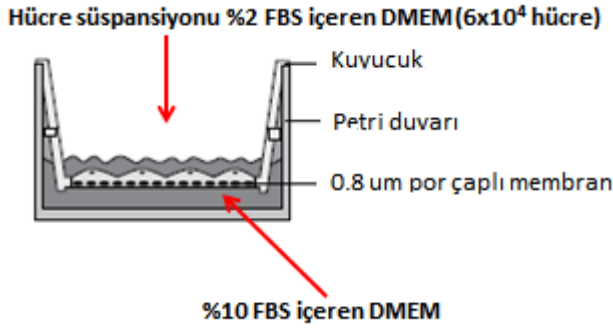
- Hücreler, yuvarlak lamel üzerine ekildikten 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besi ortamı uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı.
- Ca²⁺-spesifik bir boya olan fura-2/AM (5 µM) ve %0,02 pluronik asit (Fura-2/AM'nin inkübasyon çözeltisinde dağılımını sağlayan toksik olmayan deterjan) içeren %1 BSA/HBS çözeltisi ile karanlıkta 25°C'de 60 dk inkübe edildi. HBS (HEPES ile tamponlanmış fizyolojik NaCl çözeltisi), 135 mM NaCl, 5,9 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 1,5 mM CaCl₂, 11,6 mM, 5 mM NaHCO₃, ve 11,5 mM glukoz, pH:7,3)
- İnkübasyon sonrasında %1 BSA/HBS çözeltisi ile 15 dk süreyle 2 kez yıkandı.
- Lameller spektrofotometre (QM8/2005, Photon Technology International) küveti içine yerleştirildi ve Ca²⁺ düzeylerindeki gerçek zamanlı değişimler izlendi.

Deney süresince hücreler HBS (pH:7,3, 25°C) çözeltisi ile perfüze edildi. SOCE'nin izlenmesi amacıyla kullanılan deney protokolü aşağıda verilmiştir:

- Hücreler Ca²⁺ içermeyen HBS çözeltisi ile inkübe edildi.
- Çözeltiye 10 µM CPA ilave edilerek depodan salıverilen Ca²⁺ düzeyleri belirlendi.
- Çözeltiye final konsantrasyonu 1,5 mM olacak şekilde Ca²⁺ çözeltisi eklenerek SOCE gerçek zamanlı olarak izlendi.

2.10 İnvazyon ve Migrasyon Deneyleri

FACS ile seçilen EpCAM⁺CD133⁺ hücreler kontrol, eYFPStim1 ve CFPOrai1 plazmidleri ile transfeksiyondan 48 saat sonra 6 kuyucuklu petrilere kaldırarak matrigel kaplı ve kaplı olmayan kuyucuklara (Corning, 8 µm por çapına sahip, Şekil 2.4.) 6x10⁴ hücrenin ekimi gerçekleştirilerek hücrelerin invazyon ve migrasyon özellikleri incelendi. Kuyucuklara ekimin 24 saat sonrası hücreler boyanarak migrasyon ve invazyon özellikleri değerlendirildi.



Şekil 2.4 İnvazyon ve migrasyon deneylerinde kullanılan kuyucuğun şematik görünümü.

2.10.1 İnvazyon

- Her kuyucuğa 150 μ l matrijel (son konsantrasyon 0,25 mg/ml olacak şekilde DMEM-0 içerisinde seyreltilerek) 2 saat 37°C olan inkübatörde tutularak matrijelin donması sağlandı.
- 2 saat sonrasında donmamış olarak kalan matrijel kuyucuklardan uzaklaştırıldı.
- %0,1BSA içeren DMEM-0 filtrelendi ve her kuyucuğa 300 μ l eklenerek bloklama işlemi gerçekleştirildi ve bloklama solüsyonu hızla uzaklaştırıldı.
- Kuyucuklar 24 kuyucuklu petrilere yerleştirilmeden önce petrinin içine 750 μ l %10 FBS içeren DMEM eklendi, üzerine kabarcık kalmayacak şekilde kuyucuk yerleştirildi.
- Kuyucuğun içine 500 μ l %2 FBS içeren DMEM içinde 6×10^4 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu eklendi.
- İnkübatöre (%5 CO₂ ve 37°C) kaldırıldı.
- 24 saat sonra Diff-Quick (Siemens) kiti ile kuyucuklar boyandı. Önce fiksatif (Yeşil), Eosin (Kırmızı) ve Hematoksilen (Mavi) ile 1'er dakika boyama yapıldı.
- Kuyucukların iç kısmındaki hücreler pamuk çubukla temizlendikten sonra dış kısma göç etmiş hücreler invert mikroskop altında sayıldı.

2.10.2 Migrasyon

- Kuyucuklar 24 kuyucuklu petrilere yerleştirilmeden önce petrinin içine 750 μ l %10 FBS içeren DMEM eklendi, üzerine kabarcık kalmayacak şekilde kuyucuk yerleştirildi.
- Kuyucuğun içine 500 μ l %2 FBS içeren DMEM içinde 6×10^4 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu eklendi.
- İnkübatöre (%5 CO₂ ve 37°C) kaldırıldı.

- 24 saat sonra “Diff-Quick (Siemens) kiti ile kuyucuklar boyandı. Önce fiksatif (Yeşil), Eosin (Kırmızı) ve Hematoksilen (Mavi) ile 1'er dakika boyama yapıldı.
- Kuyucukların iç kısmındaki hücreler pamuk çubukla temizlendikten sonra dış kısma göç etmiş hücreler inverted mikroskop altında sayıldı.

2.11 miRNA dizileme ve mikrodizin çalışmaları

2.11.1 Total RNA İzolasyonu

Mikrodizin ve miRNA dizilemede kullanılacak olan hücrelerden Total RNA purification kit (Norgen) kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. Kullanılan izolasyon kiti total RNA ile birlikte miRNA'ları da içeren küçük RNA'ların izolasyonunu da mümkün kılmaktadır. Örneklerin konsantrasyon ölçümleri Nanodrop ile gerçekleştirildi.

Norgen RNA İzolasyon Protokolü

Hücre lizatı hazırlama

- 6 kuyucuklu petrilere besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 1XPBS ile yıkandı.
- 350 µl lizis solüsyonu kuyucuklara eklendi.
- Çözelti yüzeyde 5 dakika bekletildikten sonra nazikçe petriye vurularak hücrelerin parçalanması sağlandı.
- Enjektör yardımıyla hücre süspansiyonu homojenize edildi.
- Hücre lizatı mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Lizatlara 200 µl %96-100'lük etanol eklendi.

RNA'nın kolona bağlanması

- Kolonlar, toplama tübü ile biraraya getirilir.
- 600 µl lizat kolona aktararak 1 dakika $\geq 3,500 \times g$ 'de ($\approx 6,000$ RPM) santrifüj edildi.
- Toplama tüpü boşaltılarak kolon ile tekrar biraraya getirildi.

DNA'nın uzaklaştırılması

Total RNA'da genomik DNA kalıntısı kalmaması için uygulanır.

- Örnek sayısı kadar 15 µl DNaz I ve 100 µl Enzim inkübasyon solüsyonu A'dan oluşan karışım hazırlandı.
- 400 µl yıkama solüsyonu kolonlara eklenerek 2 dk santrifüj edildi.
- Hazırlanan karışımdan her kolona 100 µl eklendi ve 1 dk 14,000 g'de santrifüj edildi.
- Toplama tüpünde biriken kısım pipetlenerek kolona tekrar eklendi.
- Kolon 15 dakika 25-30°C'de inkübe edildi.

Kolon yıkama

- 400 µl yıkama solüsyonu kolonlara eklenerek 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpünde kalan kısım atıldı ve kolonla toplama tüpü tekrar biraraya getirildi.
- Üsteki iki basamak iki kez tekrar edildi.
- Kolon kuruması için 2 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpü atıldı, kolon eppendorf tüplerine yerleştirildi.
- Kolona 50 µl elüsyon solüsyonu A eklendi.
- 2 dk 200 g'yi takiben 1 dk 14.000 g'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası eppendorf tüpünde toplanan kısım total RNA'yı içermektedir.

2.11.2 Total RNA'larda Kalite Kontrolü

İzole edilen total RNA örnekleri Agilent Bioanalyzer 2100 sisteminde analiz edilerek RNA Integrity Number (RIN) değerleri hesaplanmıştır. RIN değerleri ile RNA'nın ikincil yapısındaki bozulmalardan kaynaklanan RNA degradasyonu ile ilgili bilgilere ulaşılması sağlanır. RIN değeri 1-10 arasında değer almaktadır. 1 çok degrade olmuş RNA yapısına karşılık gelen bir değer iken 10 RNA yapısının çok iyi korunduğunugöstermektedir.

Total RNA'ların RIN Değerinin Belirlenmesi

Jel-Boya Karışımının Hazırlanması

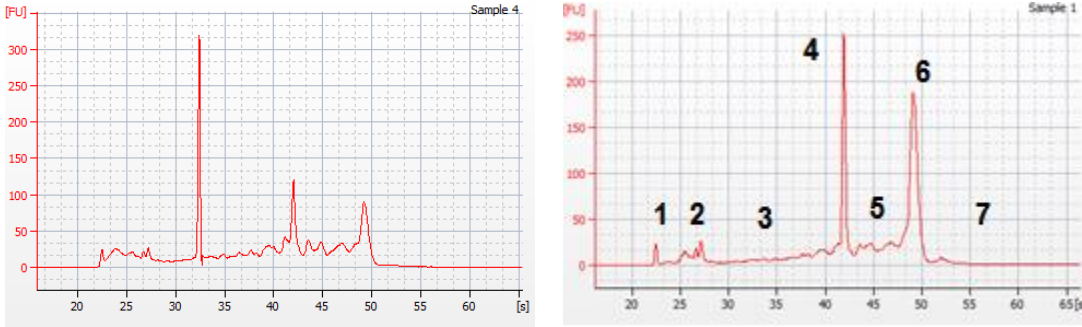
- 1 µl RNA boya konsantresi 65 µl filtrelenmiş jele eklendi.
- Çözelti iyice karıştırıldıktan sonra 1300 g'de oda sıcaklığında 10 dk santrifüj edildi.

Ladder ve Örneklerin yüklenmesi

- Merdiven işareti bulunan kuyucuğa 1 µl *ladder* eklendi.
- 12 örnek kuyucuğunun her birine 1 µl örnek eklendi.
- Kullanılmayan kuyucuklara 1 µl RNA *marker* eklendi.
- Çip yatay şekilde vortekse yerleştirilerek 1 dk 2400 rpm'de vortekslendi.
- Çip Agilent 2100 bioanalizöre yerleştirilerek okumalar yapıldı.

2.11.3 Total RNA Örneklerinin RIN Değerleri

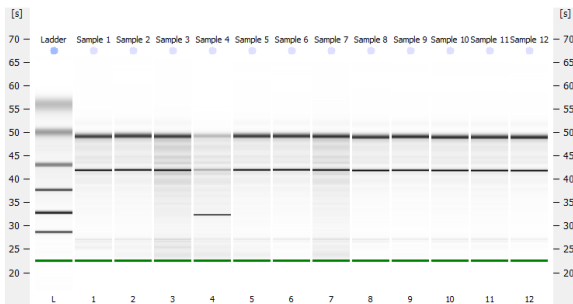
Örnek, RIN: 8,5



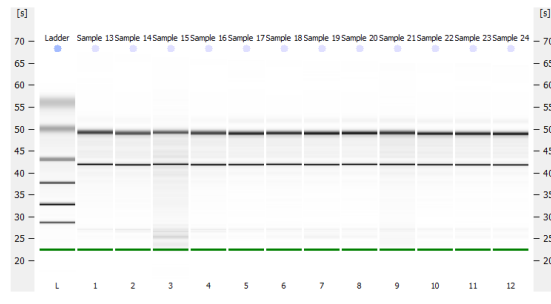
Şekil 2.5. Total RNA'lara ait elektroferogramlar. İlk elektroferogramdaki RNA örneğinde RIN değerlerinin hesaplanmasında kullanılan parametreler (1) marker bölgesi, (2) 5S bölgesi, (3) hızlı bölge, (4) 18S fragmanı, (5) ara bölge, (6) 28S fragmanı, (7) arka plan. FU: *Fluorescence Unit*.

RIN değeri 7-10 arası olan total RNA örnekleri iyi kalitede olarak kabul edilmektedir. Small RNA dizilemede genellikle RIN değeri ≥ 7 olan örneklerin kullanılması önerilmektedir. Şekil 2.6., total RNA'ların kalitesiyle ilgili başka bir gösterimi olan sanal jel görüntüsü.

A. Örnek 1-12 arası



B. Örnek 13-24 arası

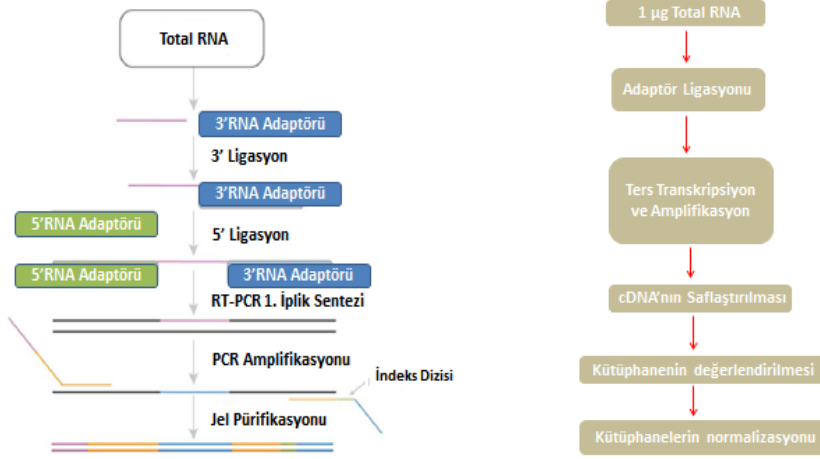


Şekil 2.6. İzole edilen total RNA örneklerinin sanal jel görüntüsü A) ilk 12 örnek B) ikinci 12 örnek. İlk bant 28S (4,5 kb), ikinci bant 18S (1,9 kb) ribozomal RNA'yı (rRNA) göstermektedir. Yüksek kalitedeki RNA'da, 28S rRNA bandı 18S rRNA'nınkinin iki katıdır.

2.12 Küçük RNA (small RNA, sRNA) Dizileme

sRNA dizileme aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır (Şekil 2.7.);

- Adaptörlerin bağlanması
 - 3' adaptörü
 - 5' adaptörü
- Ters transkripsiyon ve kütüphanelerin çoğaltılması
- cDNA'nın çoğaltılması
- Kütüphanelerin kontrol edilmesi
- Kütüphanelerin normalizasyonu



Şekil 2.7. sRNA Dizileme Akış Şeması

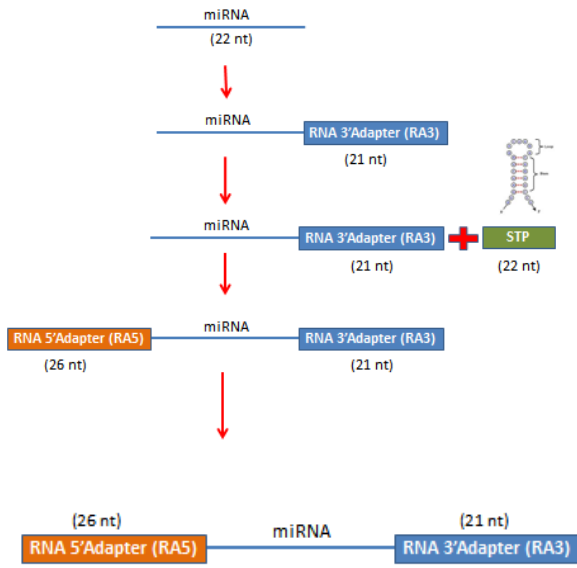
Total RNA örnekleri 5 µl nükleaz içermeyen su içinde 1 µg olacak şekilde hazırlandı.

2.12.1 Adaptörlerin Bağlanması

200 µl'lik PCR tüplerine her örnek için (Şekil 2.8):

- 1 µl 3' RNA adaptörü ve 5 µl nükleaz içermeyen 1 µg total RNA eklendi.
- 70°C'de 2 dk inkübe edildi ve daha sonra buza alındı.
- Örnek sayısı kadar aşağıdaki karışım hazırlandı ve her örneğe 4 µl eklendi.
 - Ligasyon tamponu 2 µl
 - RNase inhibitör 1 µl
 - T4 RNA Ligaz 2, delesyon mutanlığı 1 µl
- 28°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Her örneğe 1 µl Stop Solution (STP) eklenerek nazikçe pipetaj yapıldı.

- 28°C'de 15 dk inkübe edildi ve örnekler buza alındı.
- Örnek sayısı x 1,1 µl 5'RNA adaptörü (RA5) 200 µl'lik PCR tüplerine aktarıldı.
- 70°C'de inkübe edildi ve örnekler buza alındı.
- Örnek sayısı x 1,1 10 mM ATP eklendi.
- Örnek sayısı x 1,1 µl T4 RNA ligaz karışımına eklendi.
- RA3 karışımını içeren örnekler 3'er µl RA5 karışımından eklendi.
- 28°C'de 1 saat inkübe edildi.



Şekil 2.8. Adaptörlerin bağlanması.

2.12.2 cDNA Sentezi ve Kütüphanelerin Amplifikasyonu

RT ile cDNA sentezi

RT sonrasında gerçekleştirilen PCR ile 3' ve 5' adaptörü taşıyan sRNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak cDNA sentezlenmektedir. PCR, adaptörlerin ucuna bağlanan iki primer ile yapılmaktadır.

- 5' ve 3' adaptör bağlı olan RNA'lardan 6 µl alınarak 200 µl'lik PCR tüplerine aktarıldı.
- 1 µl RT RNA primeri eklendi.
- 70°C'de 2 dk inkübe edildi ve hızlıca buza alındı.
- Bir başka PCR tübünde aşağıdaki karışım hazırlandı.
 - Örnek sayısı x 5x 1st strand tamponu,
 - Örnek sayısı x 0,5 µl 12,5 mM dNTP karışımı,

- Örnek sayısı x 1 µl 100 mM DTT,
- Örnek sayısı x 1 µl RNaz inhibitör,
- Örnek sayısı x 1 µl SuperScript II RT ile oluşturulan karışımdan her örneğe 5,5 µl aktarıldı.
- 50°C'de 1 saat inkübe edildi.

PCR Amplifikasyonu

- Buz içinde bulunan 200 µl'lik PCR tüpüne aşağıdaki karışım hazırlandı.
 - Örnek sayısı x 8,5 µl ultrasaf su,
 - Örnek sayısı x 25 µl PCR karışımı,
 - Örnek sayısı x 2 µl RNA PCR primeri (RP1),
- Örnek sayısı x 2 µl RNA PCR indeks primeri (RPIX) iyice karıştırılıp kısa süreli santrifüj edildikten sonra her örneğe karışımdan 37,7 µl aktarıldı.

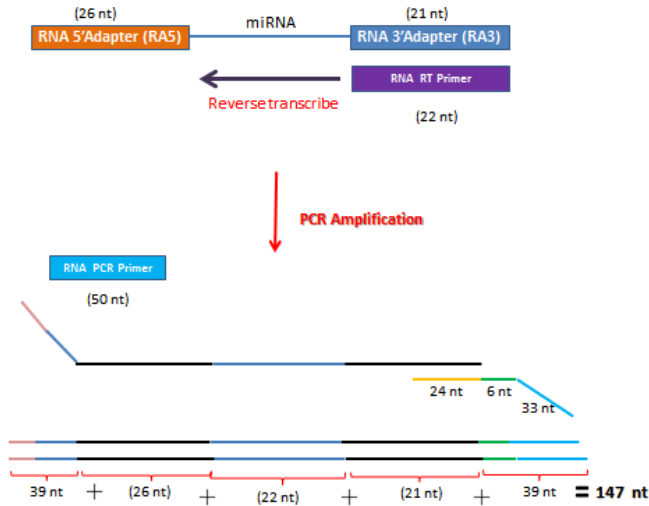
Toplam hacim 50 µl oldu.

Tüpler "termal cycler"a yerleştirilerek aşağıdaki PCR koşulları uygulandı.

- a. 98°C'de 30 sn
- b. 15 döngü aşağıdaki koşullarda yapıldı;
 - 98°C'de 10 sn,
 - 60°C'de 30 sn,
 - 72°C'de 15 sn,
- c. 72°C'de 10 dk

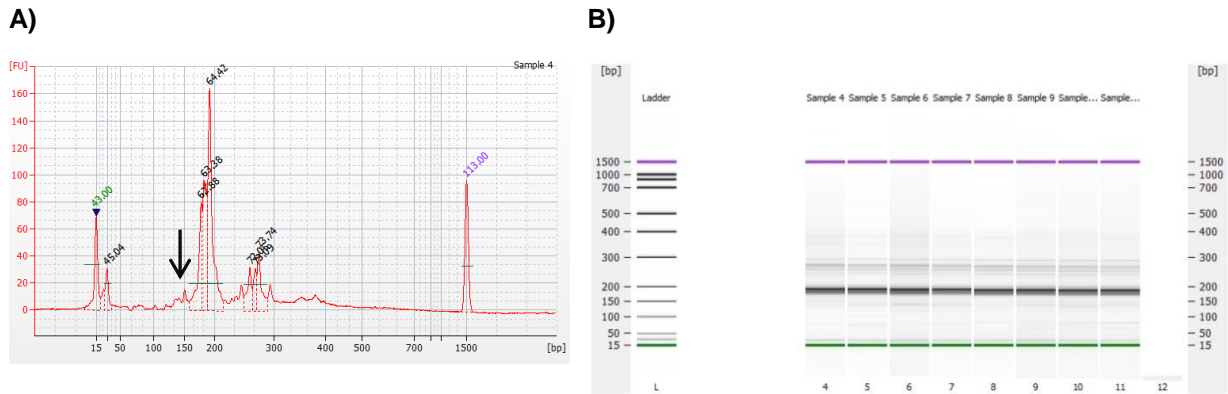
Örnekler DNA 1000 chip'e yüklenerek bioanalizörde okumalar yapılarak olgun miRNA ve diğer regülatör sRNA'ların cDNA kalitesi kontrol edildi.

Agilent biyoanalizörde PCR işlemi sonucu 150 bp civarında olan miRNA'ların çoğaltılıp-çoğaltılmadığı kontrol edildi.



Şekil 2.9. RT ve Kütüphanelerin Amplifikasyonu

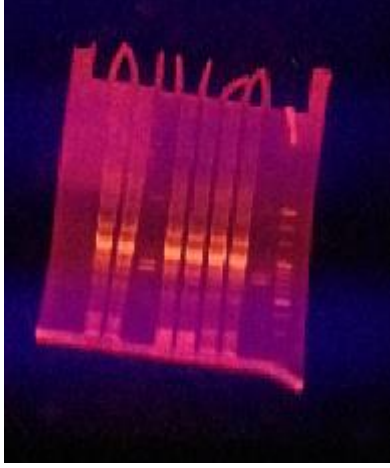
Olgun miRNA'lar \approx 147-150 nt civarında pik sinyali vermektedir. Şekil 2.10.'da miRNA'ların bulunduğu yer siyah ok ile göstermektedir.



Şekil 2.10. Biyoanalizör çıktısı. (A) 147 nt'lik fragmana ait pik siyah ok ile işaretlenmiştir. (B) örneklerin sanal jel görüntüsü. 22 nt sRNA fragmanlarından oluşan olgun miRNA'lar yaklaşık 147 nt uzunluğunda gözlenmektedir.

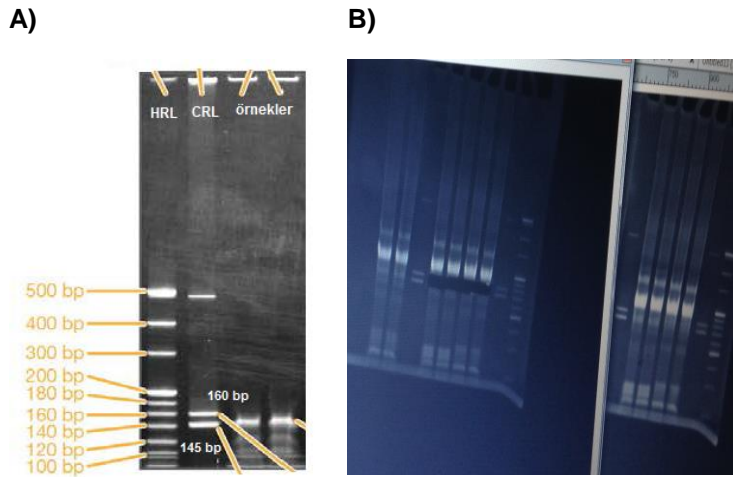
2.12.3 Jel Elektrofrez ve cDNA'ların Jelden İzolasyonu

Jel 60 dk 145 V'da yürütüldü. Yürütülen jelde cDNA'ların görüntülenmesi için jel 15 dk karanlıkta çalkalayıcı üzerinde etidyum bromür (EtBr) ile muamele edildi. EtBr ile boyama sonrası cDNA bantları görüntülemek üzere jel UV transluminatöre alındı (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. Jelin transluminatördeki görünümü.

miRNA'lar yaklaşık 22 nt uzunluğunda olup 3' ve 5' adaptörlerinin eklenmesi ile yaklaşık 147-150 nt uzunluğa ulaşmaktadır. 160 bp'lik bandın alt sınırı ile 145 bp'lik bandın üst sınırı arasında kalan kısım kesilerek alındı (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. “HRL Ladder” ve “CRL ladder” bantlarının boyutu ve örnekler. (A) jelin transluminatörde görüntülenerek miRNA'ları içeren bandın kontrol “CRL” ladder'a göre 145 bp ve 160 bp arasının kesilmesi (B).

Bu basamakta bir önceki basamaktan elde edilen cDNA'nın jelden saflaştırılması sağlanmaktadır. Jelden saflaştırma sonrasında konsantre final kütüphane elde edilebilmektedir.

- “HRL ladder” ve “CRL ladder” yardımıyla miRNA'ları içeren 145 bp-160 bp arası kalan kısımda bulunana bantlar jelden kesilerek ucu delik olan santrifüj tüpünün içine alındı.

- 20.000 x g'de 2 dk santrifüj edilerek 0,5 ml tüp içinde bulunan jelin 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne geçmesi sağlandı. 200 µl ultra saf su 1.5 ml'lik jel bulunan tüplere eklenerek oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 2 saat bırakıldı.
- Tüp içinde bulunan elüsyon ve jel debris 5 µm'lik filtreye aktarıldı.
- Filtre 600 g'de 10 sn santrifüj edildi ve kütüphane validasyonu basamağına geçildi.

2.12.4 Kütüphane Validasyonu

Kütüphane Kontrolü

1 µl resüspanse edilmiş halde bulunan örneklerden alınarak Agilent 2100 Biyoanalizörde boyut, saflık ve kütüphanenin konsantrasyonu bakımından değerlendirildi.

Kütüphanelerin Normalizasyonu

Küme (cluster) oluşumu için DNA kalıplarının 2 nM değere normalize edilmesi gerekmektedir.

2.12.5 Dizileme

Dizileme sürecinde, Illumina NextSeq 500 yeni nesil dizileme platformu üzerinden gerçekleştirildi. Illumina tarafından kullanılan Solexa dizileme yönteminde, DNA fragmanları öncelikle akış-hücre (flow cell) adı verilen çipler üzerine yerleştirildi ve yerleştiği bölgede yüksek doğrulukta sinyal vermek için bölgesel olarak çoğaltıldı (*bridge amplification*). Sonuç olarak *flow cell* üzerinde milyonlarca fragman kümeleri (*cluster*) oluşmaktadır. *Flow cell* üzerinde oluşan fragman kümeleri, her bir döngüde 1 baz okunacak şekilde dizilendi. Illumina tarafından geliştirilen sentez ile dizileme "Sequencing-by-Synthesis" yöntemi ile her döngüde, DNA fragmanları 2 farklı boya ile işaretlenir ve 4 farklı dinükleotide maruz bırakılır. Her bir döngüde, uygun dinükleotitin bağlanması sonrası floresan kamera ile o kümenin görseli alındı. Her bir kümeden gelen görseller birleştirildi ve sonuçta ilgili kümelerin ışımaya karakterlerinden nükleotit dizileri çıkarıldı.

2.12.6 Ön Analiz

Fastq Oluşturulması ve "Demultiplexing"

NextSeq 500 dizileme platformu okuma verileri, *.bcl formatında oluşturulmaktadır. Bu dosyalar, DNA kümelerinin *flow cell* üzerindeki konum ve ID'lerini, ışımaya karakterlerini içermektedir. Bu verilerden Bcl2fastq v.2.1 (Illumina) programı kullanılarak *.fastq dosyaları elde edildi. Aynı zamanda, fastq verileri, içerdiği indeks verilerine göre farklı örneklere ayrıştırıldı (Demultiplexing).

Kalite Kontrol

Kalite kontrol işlemleri, ham fastq verilerinin incelenerek dizileme çalışmasının etkinliğini ölçmede kullanılır. Böylelikle, çalışmada yaşanan herhangi bir sorun ve olası sebepleri hakkında bilgi edinilmiş olur. Çalışmada bu amaçla FASTQC programı (www.bioinformatics.babraham.ac.uk) kullanıldı.

Okuma Filtreleri ve “Trimming”

Dizileme sürecinde, Fastq okuma verilerindeki düşük kalitedeki baz okumaları, sonraki analiz basamaklarında false positif sonuçlara neden olmaması için, okumalardan çıkarıldı. Kalite filtreleri ve kesim işlemleri için Trimmomatic uygulaması (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) kullanıldı.

miRBase Veritabanı Eşleştirmesi

miRNA dizilerinin tespit edilebilmesi için belirlenen tekil dizileri miRBase (www.mirbase.org) üzerinden BLAST ile eşleştirildi. İncelenen dizilerin miRBase veritabanındaki miRNA dizileri ile nükleotit dizimi ve boy açısından tam olarak eşleşmesi durumunda, ilgili dizi miRNA olarak kabul edildi.

2.13 Total RNA Mikrodizin çalışmaları

4 farklı gruptan toplam 12 adet RNA örneğiyle çalışma gerçekleştirildi. Örneklerin cRNA dönüşümleri yapılarak Illumina iScan platformunda 45 binden fazla prob kullanılarak, “HumanHT-12 V4 Expression BeadChip” ile tüm genom ifade kalıbı çıkarıldı. Aynı örnek grubuna dahil olan örnekler aynı kodla adlandırılıp, teknik replika olarak değerlendirildi. Örnek no ve kodları **Tablo 2.2**'te, **Tablo 2.3**'de karşılaştırma grupları verilmiştir.

Tablo 2.2. Mikrodizin çalışmasında kullanılan örnek no ve kodları.

Örnek No	Örnek Kodu
1-2-3	PK (Pozitif Kontrol)
4-5-6	X (STIM1 OE)
7-8-9	Y (STIM1-Orai1 OE)
10-11-12	NK (Negatif Kontrol)

Tablo 2.3. Karşılaştırma grupları

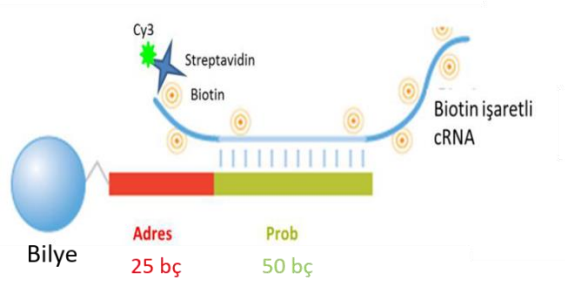
Karşılaştırma	Hedef grup	Kontrol Grup
1. Karşılaştırma	X/PK	PK
2. Karşılaştırma	Y/PK	PK
3. Karşılaştırma	NK	PK

Illumina HumanHT-12_v4_BeadChip gen çipi kullanılarak direkt hibridizasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. RNA örnekleri çip üzerine hibridize edilmeden önce çoğaltılmış ve biotin ile işaretlenmiştir. Hibridizasyon sonrası Cy3-streptavidin ile işaretleme yapılmış ve çip görüntülenmiştir. Kullanılan gen çipi üzerinde 12 adet örnek haznesi ve her bir haznede, tanımlanmış 25.000 adet gene spesifik 47.231 prob bulunmaktadır. 50 bç uzunluğundaki proplar adres dizi ile 3 mikron çapındaki küreler üzerine bağlıdır. Kullanılan gen çipi ve direkt hibridizasyon çalışma ilkesi Şekil 2.13.'de verilmiştir.

A



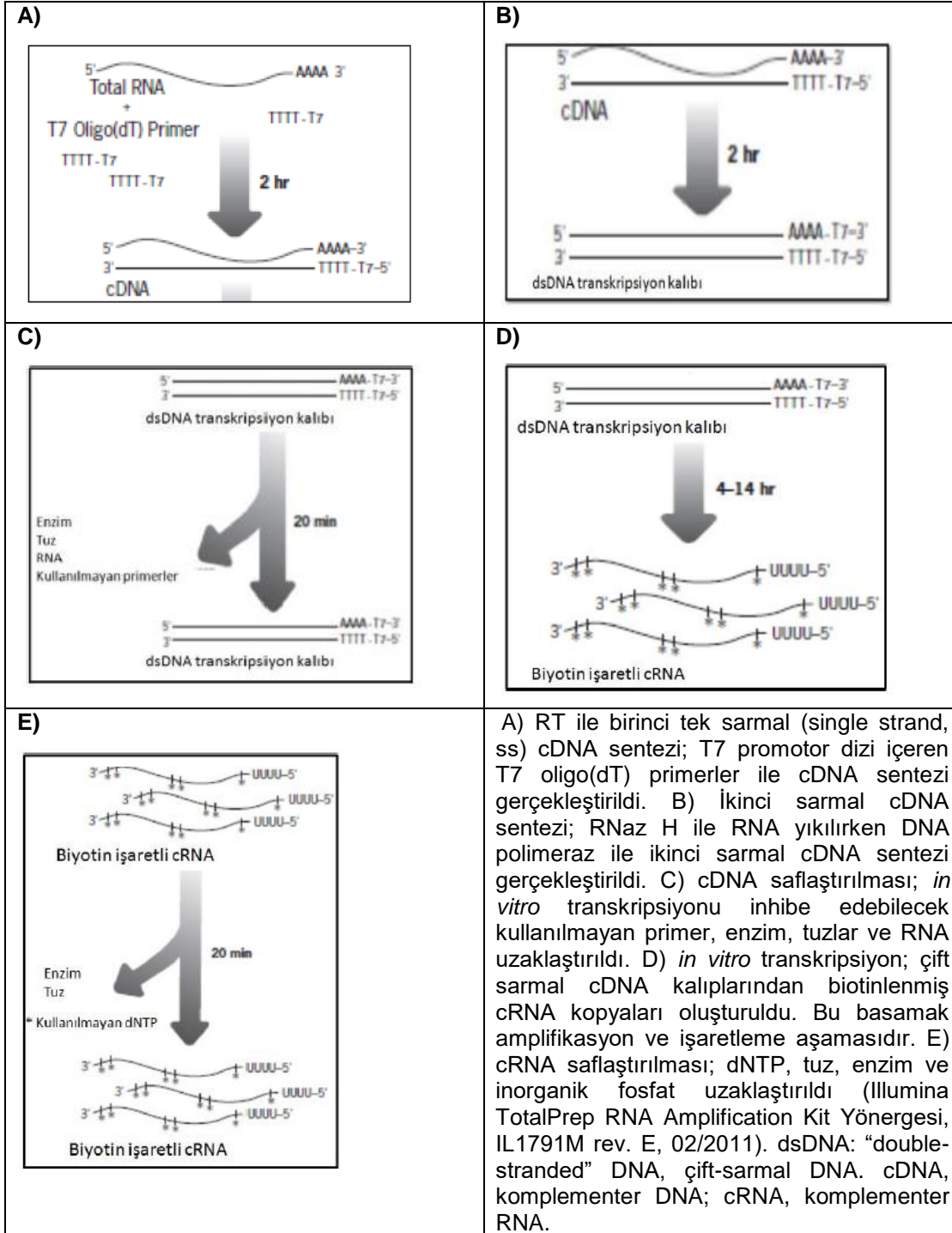
B



Şekil 2.13. Transkriptom analizinde kullanılan gen çipi. Transkriptom analizinde kullanılan gen çipi (A) ve direkt hibridizasyon çalışma ilkesi (B)

2.13.1 RNA Amplifikasyonu

İzole edilen RNA örnekleri (500 ng) çoğaltılmış ve biotin işaretli cRNA'lar oluşturulmuştur (Illumina Total Prep RNA Amplification Kit, Ambion). Çalışmanın basamakları Şekil 2.14.'te verilmiştir.



Şekil 2.14. Illumina TotalPrep RNA Amplifikasyon süreci.

Birinci Tek İplikli cDNA Sentezi

RT reaksiyonu ile total RNA örneklerinden ile birinci tek iplik (single strand, ss) cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon T7 “promoter” taşıyan oligo(dT) primerleri, dNTP karışımı, RNaz inhibitörü ve yüksek verimli ve “full-length” cDNA oluşturan “RT (ArrayScript) varlığında gerçekleştirilmiştir.

İkinci Tek İplikli cDNA Sentezi ve Saflaştırılması

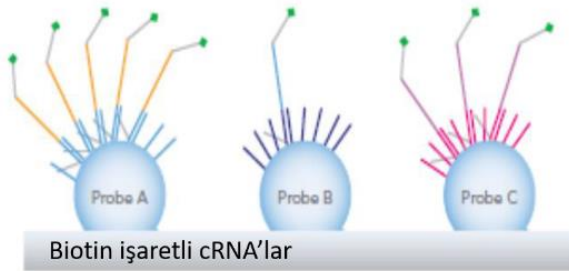
In vitro transkripsiyonda kalıp olarak kullanmak amacıyla dNTP karışımı, RNaz H ve DNA polimeraz varlığında dsDNA oluşturulmuştur. Oluşan dsDNA'lar kartuş filtrelerden geçirilerek saflaştırılmıştır.

In Vitro Transkripsiyon ve cRNA'ların Saflaştırılması

Biotin işaretli NTP ve T7 RNA polimeraz enzimi kullanılarak dsDNA'lardan biotin işaretli cRNA'lar oluşturulmuştur. Oluşan cRNA'lar kartuş filtrelerden geçirilerek saflaştırılmıştır. Quant-iT RNA boyası kullanılarak fluorometrik yöntemle cRNA miktar tayini yapılmıştır (Qubit fluorometre, Invitrogen).

Direkt hibridizasyon

Illumina HumanHT-12_v4_BeadChip gen çiplere 12 örnek yüklenebilmektedir. Çipin her bir kuyucuğuna 750 ng cRNA yüklenmiş ve 58 °C'de 16 saat hibridizasyon fırınında inkübe edilmiştir (**Şekil 2.15**).



Şekil 2.15. Biotin işaretli cRNA ipliklerinin çipe hibridizasyonu. BeadChip üzerindeki gene spesifik dizi içeren problara biotin işaretli cRNA'lar hibridize olur.

2.13.2 Çipin Görüntülenmesi ve Analizi

İşaretleme yapılan çip, 0,8 µm çözünürlüğe sahip lazer tarayıcılı konfokal mikroskop içeren sistemde (iScan, Illumina) görüntülenmiş ve sonuçlar ilk olarak GenomeStudio (Illumina) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Veri analizine geçilmeden gen ekspresyonu mikrodizin veri kalite kontrolü için önce sistem kontrollerinden alınan sinyaller değerlendirilmiştir. Sistemde kullanılan kontrol problemler a) hibridizasyon kontrolü; b) biotin kontrolü ve c) negatif kontrolüdür. Çip üzerinde ayrıca biyolojik örneğin bütünlüğü yapısal genlerin (*housekeeping gene*, HKG) kontrol edilmesi ile izlenebilmektedir. Her örnekte eksprese edilmesi gereken her HKG için 2 kontrol probu (toplam 14 adet) bulunmaktadır. Bu kontrol problemleri birlikte değerlendirildiğinde aykırı (*outlier*) örneklerin, aykırı verininin olası nedeninin belirlenmesi ve tekrarlanması ya da veri setinden çıkartılması gereken örneklerle karar verilmesi olasıdır.

2.14 Yumuşak Agarda Koloni Oluşturma (Soft agar assay)

%6'lık agaroz (low melting) hazırlanarak sterilizasyon amaçlı otoklavlanır. %6'lık agarozdan alt kısımdaki agarozu oluşturacak olan %0,6'lık agaroz serum içermeyen medium içinde hazırlanarak 24 kuyucuklu petrilere 500 µl eklenerek 30 dk kadar donması beklendi. Kontrol, STIM1 OE ve STIM1-Orai1 OE olan EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 3x10³ hücreyi içeren %0,4'lük üst agaroz (FBS içeren mediumda) 500 µl hacimde alt agarozun üstüne eklendi ve yaklaşık 30 dk donması beklendikten sonra inkübatöre kondu. Kolonilerin oluşması 14-21 gün aralığında gerçekleşti.

2.15 Sferoid oluşturma

%1,5'lik agaroz (low Electroendosmosis "EEO" agaroz) suda çözüldükten sonra sterilize etmek amacıyla otoklavlandı. 48 kuyucuklu petrilere kuyucuğun tabanını kaplayacak şekilde 150 µl eklendi ve yaklaşık 30 dk donması beklendi. 200 µl hücre süspansiyonu (2x10³ hücre) içeren medium agarozu donmuş olan kuyucuklara eklendi ve inkübatöre kaldırıldı. Hücrelerin sferoid oluşturma 7 gün içinde gerçekleşti.

2.16 Gerçek zamanlı Hücre Analizi (Real Time Cell Analyzer, RTCA)

Hücre Proliferasyon Profillerinin Belirlenmesi

RTCA, Multi Plate cihazı hücre kültür ortamlarındaki farklı tip ve sayıdaki hücrelerin proliferasyon süreçlerinin 6x96 kuyucukta inkübatörden çıkartmaksızın aynı zamanda izlenmesini sağlamıştır. Bu sistemde hücre proliferasyonun dolaylı bir ölçütü olarak yüzeyde çoğalan hücrelerin elektromanyetik alanda oluşturdukları girişim sonucu empedansdaki değişim oranı (hücre indeksi) izlenmektedir. Hücreler, yüzeyleri altın elektrot ile kaplı özel petrilere (E-plate 96) ekilmiştir.

E-plate'lerin her kuyucuğuna 100 µl medium eklendikten sonra 30 dk inkübatörde bekletildikten sonra cihazda ölçüm alındı. Daha sonra hücre süspansiyonunu da içeren 100 µl besleyici ortam kuyucuklara eklendi, kuyucuklardaki toplam hacim 200 µl oldu. E-plate inkübatörde 30 dk bekletilip hücrelerin kuyucuklara çökmesi sağlandıktan sonra cihaza yerleştirildi ve her 15 dk'da bir ölçüm alınmaya başlandı.

Cihazda hücre indeksi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{"Hücre indeksi (CI)=Hücre impedansı (Rt)- Bazal impedans (Rb)"}$$

2.17 Çoklu İlaç Direnci (Multiple Drug Resistance, MDR) İlaç Atılım (Drug Efflux) DeneYleri

96 kuyucuklu siyah duvarlı (fluorometrik ölçüm için) şeffaf tabanlı petrilere 5×10^3 kontrol, STIM1-OE ve STIM1+Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ hücre ekildikten 24 saat sonra hücre içinden dışına ABC transportörleri aracılığı ile olan ilaç atım mekanizması değerlendirildi. ATP pompalarını bloke edici ajan olarak 10 μ M verapamil kullanıldı. MDR aktivasyonu için 1 μ M doksorubisin kullanıldı. 90 dakika sonra Varioskan'de doksorubisin için (eksitasyon: 470 nm ve emisyon 585 nm) florometrik ölçüm yapıldı.

2.18 Elektrofizyoloji (Patch Clamp)

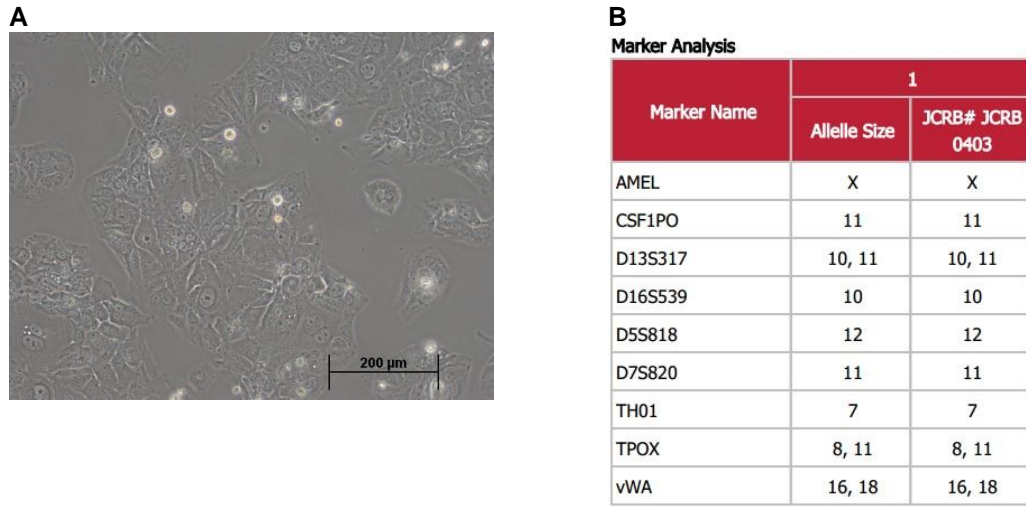
Akış sitometrisi aracılığı ile parental Huh7 hücrelerinden EpCAM+CD133+ hücreler seçildikten sonra kontrol, STIM1-OE, STIM1+Orai1-OE vektörleri ile transfeksiyonu gerçekleştirildikten sonra hücreler 6 kuyucuklu petrilere çok fazla tripsinle maruza bırakılmadan kaldırıldı. Hücre süspansiyonları 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek hücre pelletleri oluşturuldu. Hücre pelletleri Eksternal çözelti içinde süspansiyon edilerek 2-3,5 M Ω (Mega Ohm)'luk çipe aktarıldı. Patch clamp'in "Whole-cell" konfigürasyonundaki 500 "sweep"ten oluşan "TRP ramp" protokolüyle -100 mV ve +100 mV arasındaki akımda meydana gelen değişiklikler zamana ve voltaja karşı incelendi. TRP ramp protokolünde CPA, CaCl₂, EDTA ve MgCl₂ varlığında meydana gelen değişimler incelendi.

(Eksternal çözelti (mM): NaCl, 140; KCl, 4; MgCl₂, 1; CaCl₂, 2; D-glukoz monohidrat, 5; HEPES, 10; pH:7,4. İnternal çözelti (mM):CsCl, 50; NaCl, 10; CsF, 60; EGTA, 20; HEPES, 10, pH: 7,4. Çip direnci (M Ω) 2-3,5)

3 BULGULAR

3.1 Parantel Huh7 Hücre Hattının Kimlik Doğrulaması

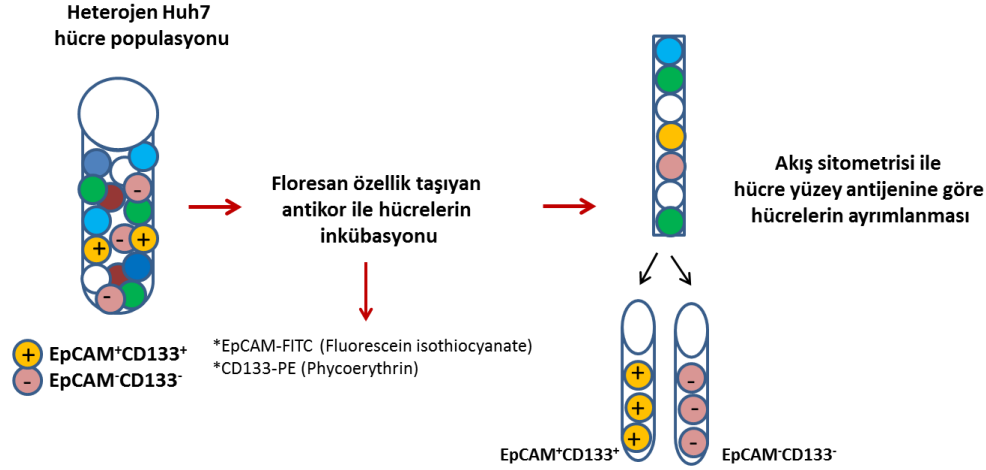
Parantel Huh7 hücre hattının (Şekil 3.1.A) kimlik doğrulaması (authenticity) (Şekil 3.1.B) Kimlik doğrulaması sonucunda örneğin insan kökenli olduğu ve diğer memeli hücre türleri ile kontamine olmadığı doğrulanmıştır. Örnekteki 9 farklı alel ilgili “marker”lar kullanılarak belirlenmiş ve Huh7 hücre hattına özgü aleller ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, test edilen örneğin genetik profilinin Huh7 hücrelerinden farklı olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Parental Huh7 hücreleri. (A) Faz-kontrast mikroskopisi görüntüleri (20x büyütme, Olympus IX71) ve (B) Huh7 hücrelerinin kimlik doğrulaması (IdexxBioResearch, Almanya).

3.2 Akış Sitometrisi Aracılığı ile EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ Huh7 Hücrelerin Seçilmesi

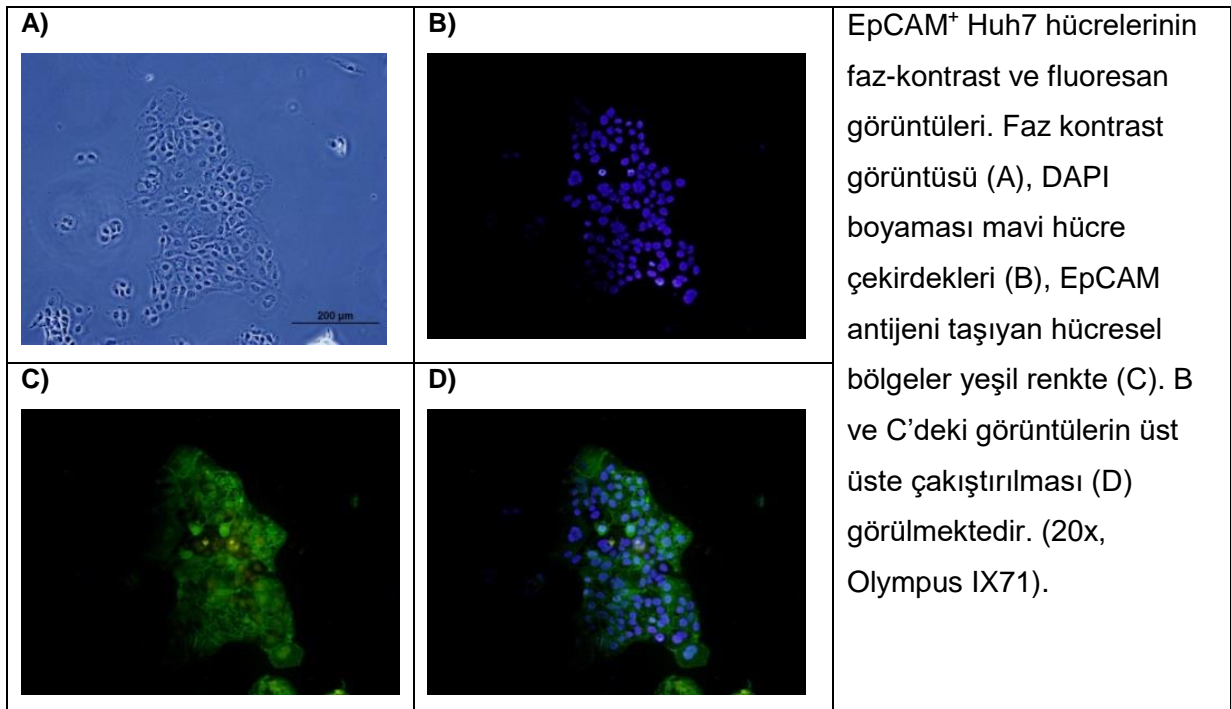
Heterojen Huh7 hücre popülasyonundan kanser kök hücresi olduğu düşünülen hücreler hücre yüzey antijenlerine göre EpCAM ve CD133 akış sitometrisi aracılığıyla seçilerek ayrıştırıldı. Şekil 3.2.'de akış sitometrisi ile ayrımlanan hücrelerin şematik gösterimi verilmiştir. Gerçekleştirilen uygulamalar akış sitometrisi ile seçilen EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ Huh7 hücrelerinde gerçekleştirildi.



Şekil 3.2. Akış sitometrisi ile ayrıştırılan hücrelerin şematik gösterimi.

3.2.1 İmmünofluoresan (IF) Mikroskopisi ile EpCAM İfade Eden Hücrelerin Belirlenmesi

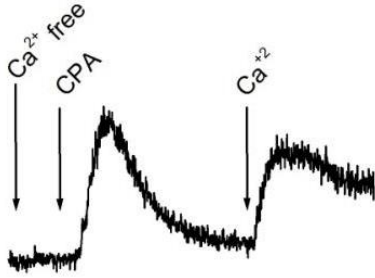
Parental Huh7 hücrelerden EpCAM⁺ hücreler seçildikten sonra EpCAM yüzey antijeni taşıyan hücreler FITC işaretli anti-EpCAM antikoruna ile inkübe edilerek floresan mikroskopu ile görüntülendi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. EpCAM⁺ Huh7 hücrelerinde EpCAM yüzey antijeninin dağılımı.

3.3 $[Ca^{2+}]_i$ değişimlerinin izlenmesi

SOCE'nin izlendiği deney protokolü Şekil 3.4.'te gösterilmiştir. Ca^{2+} yokluğunda (Ca^{2+} free) görülen geçici ilk yanıt, sarkoplazmik retikulum Ca^{2+} pompası (Sarcoplasmic-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA) inhibisyonuna (CPA, *cyclopiazonic acid*) bağlı hücre içi depoların boşalmasından, Ca^{2+} eklendiğinde oluşan kalıcı yanıt ise membranlarda bulunan TRPC-ilişkili SOC kanalları ile gerçekleşen SOCE'den kaynaklanmaktadır.

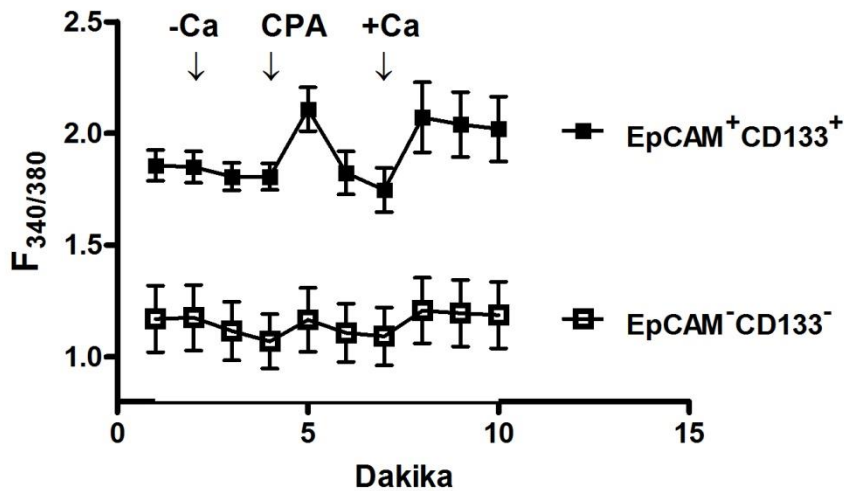


Şekil 3.4. SOCE deney protokolüne ait hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunda zamana bağlı tipik değişim.

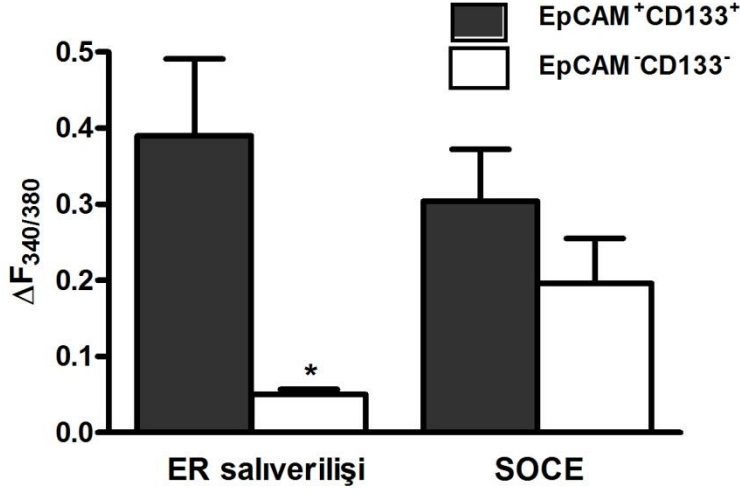
3.3.1 EpCAM⁺CD133⁺ veya EpCAM⁻CD133⁻ Huh-7 Hücrelerinde ER ve SOCE İlişkili Ca^{2+} Artışları

Parental Huh7 hücrelerinden akış sitometri aracılığı ile EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ hücreler ayrıştırılarak Ca^{2+} konsantrasyonlarındaki gerçek zamanlı değişimler izlendiğinde EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerinde ER saliverilişinde anlamlı bir artış gözlenirken, SOCE'de istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış saptandı (Şekil 3.5.).

A



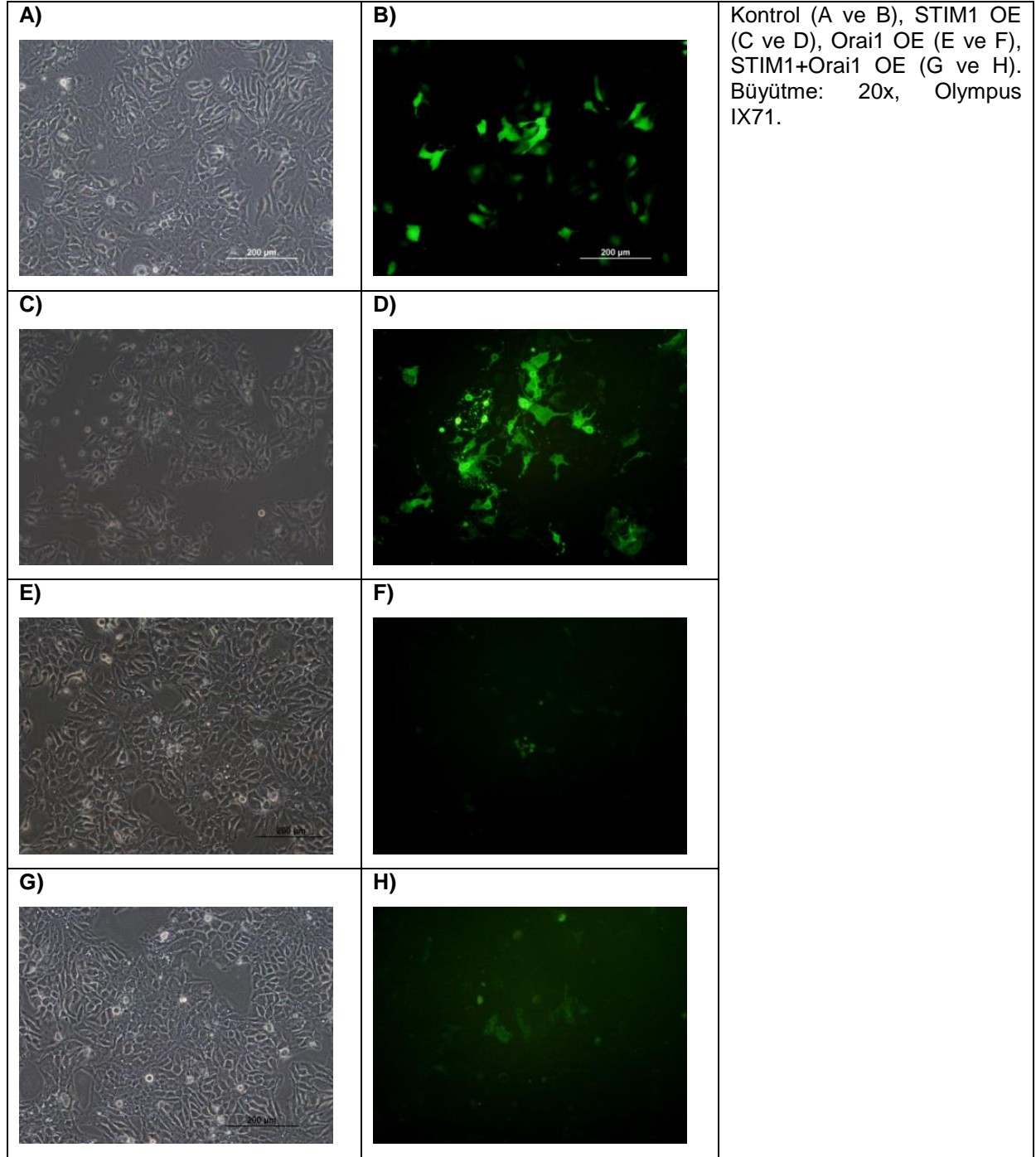
B



Şekil 3.5. EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ Huh-7 hücrelerinde ER Ca⁺² salverilişi ve SOCE düzeylerindeki değişim. EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ hücelere ait deney kayıtları (Ort±O.S.H.) (A). ER salverilişi ve SOCE düzeyleri (B). (Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, **p*<0,05, n=4-6). F340/380: [Ca⁺²]_i değerlerindeki değişim oranı.

STIM1-, Orai1- ve STIM1+Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 Hücrelerinde ER Ca⁺² Salverilişi ve SOCE

Parental Huh7 hücrelerden akış sitometrisi ile EpCAM⁺CD133⁺ hücreler seçildikten sonra bu hücreler SOCE'yi oluşturan bileşenler STIM1 ve Orai1'in aşırı eksprese edildiği çeşitli koşullardaki ER salverilişi ve SOCE izlendi. eYFPSTIM1-OE vektörü (STIM1-OE), CFPOrai1 OE vektörü (Orai1-OE), pCMV6 (kontrol) vektörü ve eYFPSTIM1-OE vektörü+ CFPOrai1-OE vektörleri (STIM1+Orai1-OE) ile transfekte edildikten sonra (Şekil 3.6.) hücre içi Ca⁺² değişimleri izlendi.

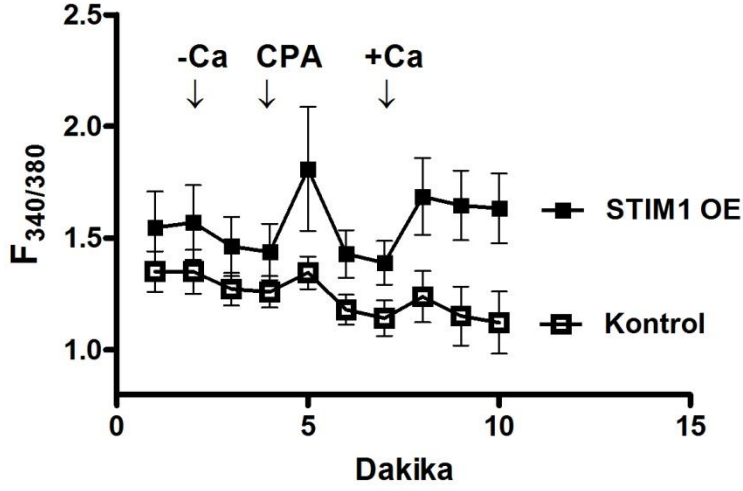


Şekil 3.6. Transfeksiyon sonrası EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 hücrelerinin faz kontrast ve floresan görüntüleri.

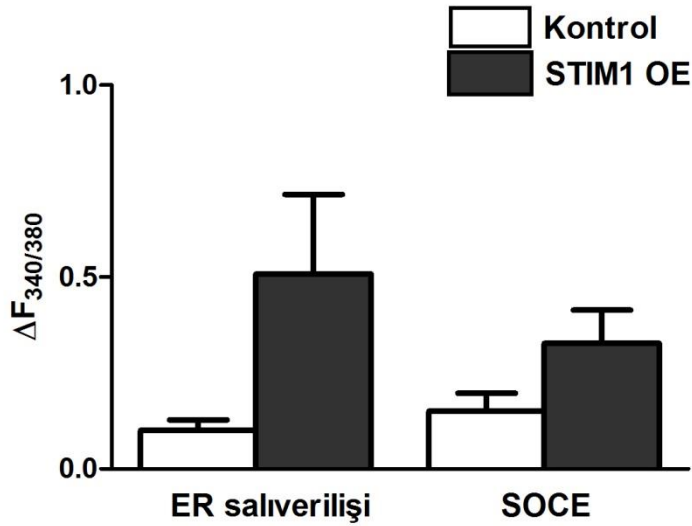
STIM1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 Hücrelerinde ER Ca⁺² Salıverilişi ve SOCE

EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerde STIM1'in aşırı ifadesi (OE) EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ hücreler arasındaki farka benzer bir şekilde ER Ca⁺² salıverilişinde ve SOCE'de artış gözlenmiştir (Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, n=4-6, Şekil 3.7.).

A



B

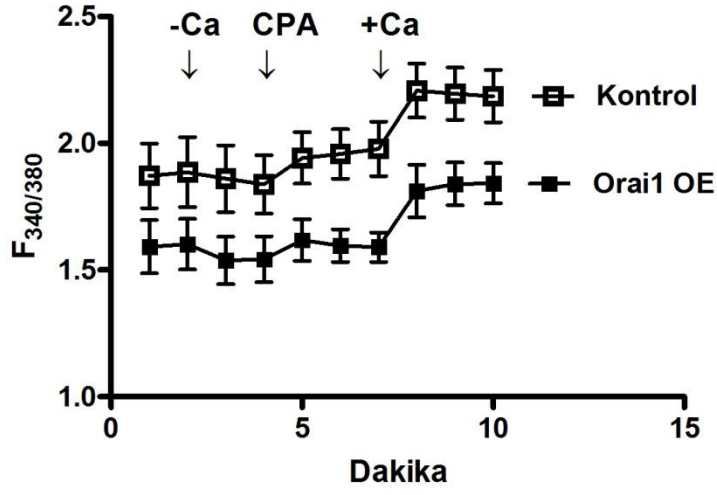


Şekil 3.7. STIM1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 hücrelerinde ER Ca⁺² saliverilişi ve SOCE. Kontrol ve STIM1 -OE hücelere ait deney kayıtları. (Ort±OSH) (A), kümülatif veriler (Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, n=4-6) (B). [Ca⁺²]_i değerlerindeki değişim orantısal olarak (F_{340/380}) verilmiştir.

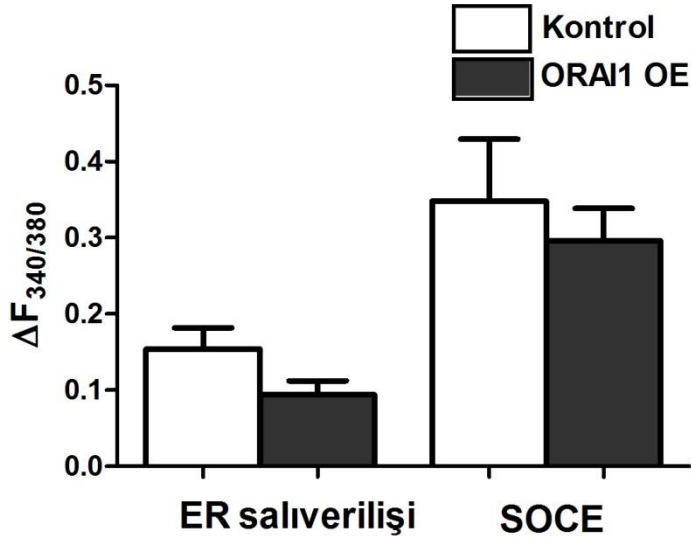
Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 Hücrelerinde ER Ca⁺² Saliverilişi ve SOCE

Orai1 geninin aşırı ifade edildiği EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerinde (Orai1-OE) kontrole oranla ER'den saliverilen Ca⁺² düzeyinde ve SOCE'de istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gözlemlendi (Şekil 3.8.).

A



B

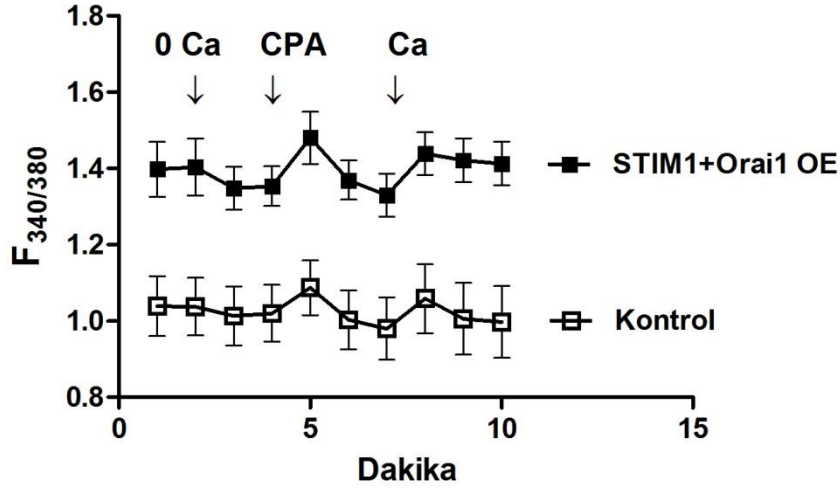


Şekil 3.8 EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 Orai1-OE hücrelerde ER Ca⁺² saliverilişi ve SOCE. Kontrol ve Orai1-OE hücrelere ait deney kayıtları (A), kümülatif veriler (Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, n=5) (B). [Ca⁺²]_i değerlerindeki değişim orantısız olarak (F_{340/380}) verilmiştir.

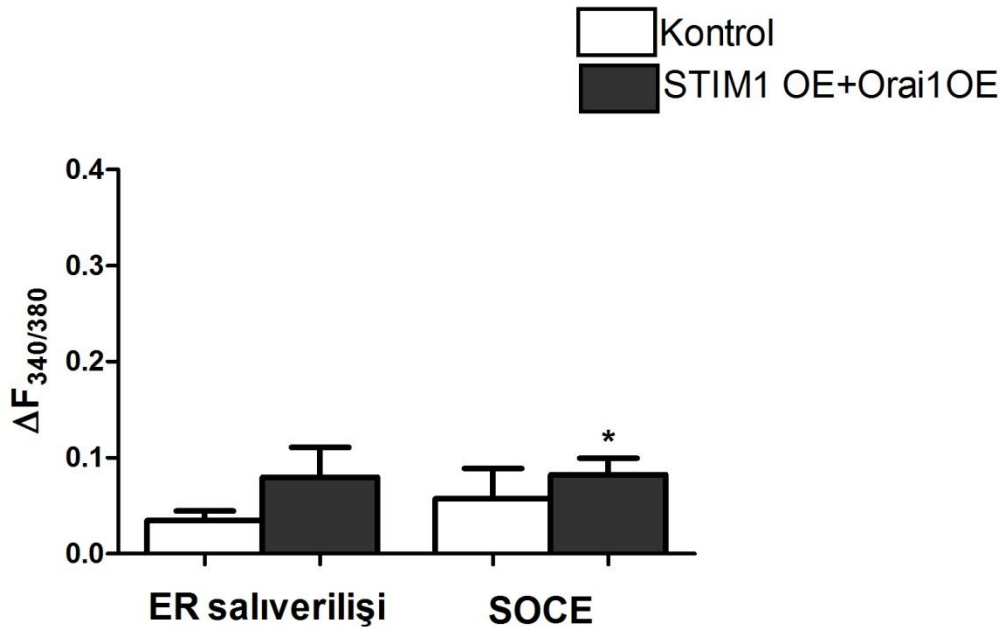
STIM1+Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 Hücrelerinde ER Ca⁺² Saliverilişi ve SOCE

STIM1+Orai1-OE hücrelerde kontrole göre ER saliverilişinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, SOCE'de istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir (Şekil 3.9.).

A



B



Şekil 3.9 STIM1-Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 hücrelerinde ER Ca²⁺ saliverilişi ve SOCE. Kontrol ve STIM1 OE+Orai1-OE hücelere ait deney kayıtları (A). Kümülatif veriler (Ort.±OSH, Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, n=4) (B). [Ca²⁺]_i değerlerindeki değişim orantısal olarak (F340/380) verilmiştir.

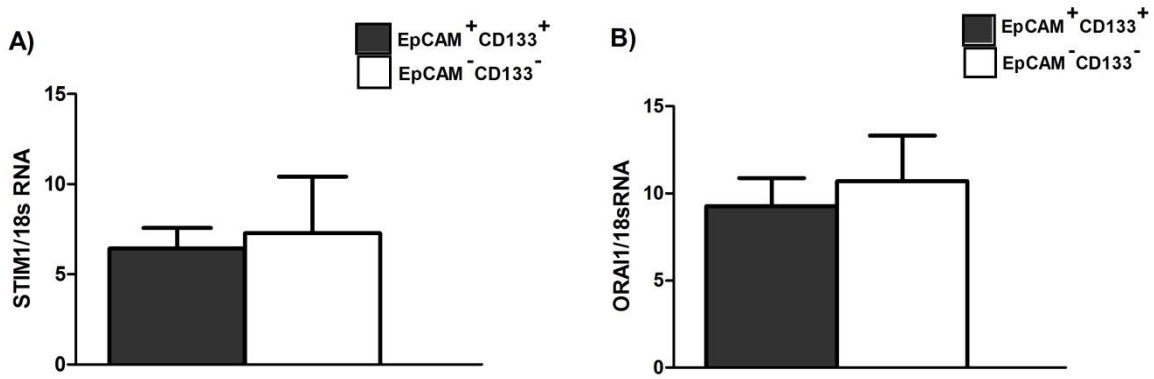
3.4 RT-PCR BULGULARI

3.4.1 STIM1 ve Orai1 Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

STIM1 ve Orai1 ifade düzeyleri sırasıyla EpCAM⁺CD133⁺, EpCAM⁻CD133⁻ ve STIM1-OE, STIM1+Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 hücrelerinde RT-PCR aracılığıyla belirlendi.

EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ Huh7 Hücrelerinde STIM1 ve Orai1 Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi

STIM1 ve Orai1 ifade düzeylerinde EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ arasında herhangi bir fark gözlenmedi (Şekil 3.10.).

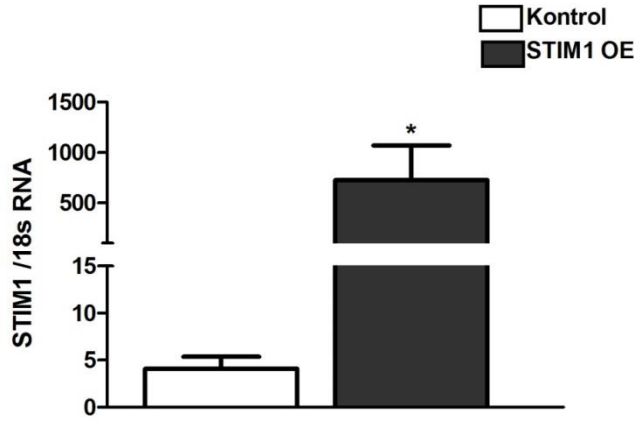


Şekil 3.10. EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ Huh-7 hücrelerinde STIM1 ve Orai1 transkripsiyon düzeyi. STIM1 (A) ve Orai1 (B) mRNA düzeyleri. Değerler 18S RNA mRNA ifade düzeylerine normalize edilmiştir. (Hedef gen/18S RNA mRNA x 10²; Student *t* testi eşleştirilmemiş veriler, n=3-4)

STIM1 OE, STIM1-Orai1 OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 Hücrelerinde STIM1 ve Orai1 İfade Düzeyinin Belirlenmesi

STIM1

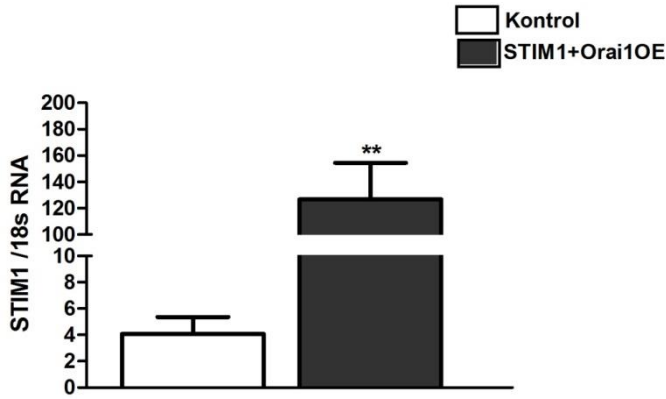
STIM1'in aşırı eksprese edildiği EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 hücrelerden elde edilen total RNA'lardan oluşturulan cDNA'larda STIM1 ekspresyon düzeyleri incelendi (Şekil 3.11., Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, **p*<0,05, n=4). STIM1-OE hücrelerde STIM1 ekspresyonunun kontrole göre (yaklaşık 120 kat) daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 3.11.).



Şekil 3.11. STIM1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 hücrelerinde STIM1 mRNA düzeyi.

Değerler 18S RNA mRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S RNA mRNA x 10²; Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, **p*<0,05, n=4). Not: Y eksenini iki parçalı gösterilmiştir.

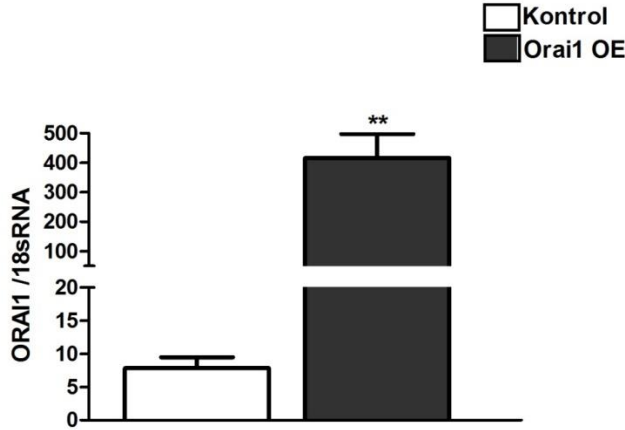
STIM1+Orai-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 hücrelerinde STIM1 mRNA ifadesinin beklendiği gibi kontrole göre (yaklaşık 30 kat) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. STIM1 OE-Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 hücrelerinde STIM1 mRNA düzeyi. Değerler 18S RNA mRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S RNA mRNA x 10²; Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, ***p*<0,01, n=4). Not: Y eksenini iki parçalı gösterilmiştir.

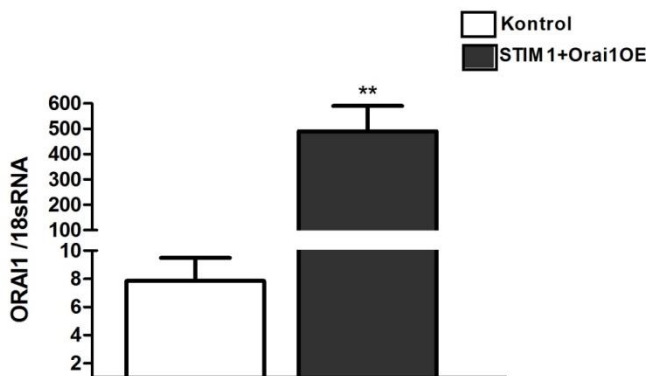
Orai1

Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 hücrelerinden elde edilen total RNA'lardan oluşturulan cDNA'larda Orai1 ekspresyon düzeyleri değerlendirildi (Şekil 3.13). Orai1-OE hücrelerde kontrole göre Orai1 ifadesinin beklendiği gibi (yaklaşık 80 kat) daha fazla olduğu belirlendi.



Şekil 3.13. Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 hücrelerinde Orai1 mRNA düzeyi. Değerler 18S RNA mRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S RNA mRNA x 10²; Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, ***p*<0,01, n=4). Not: Y eksenini iki parçalı gösterilmiştir.

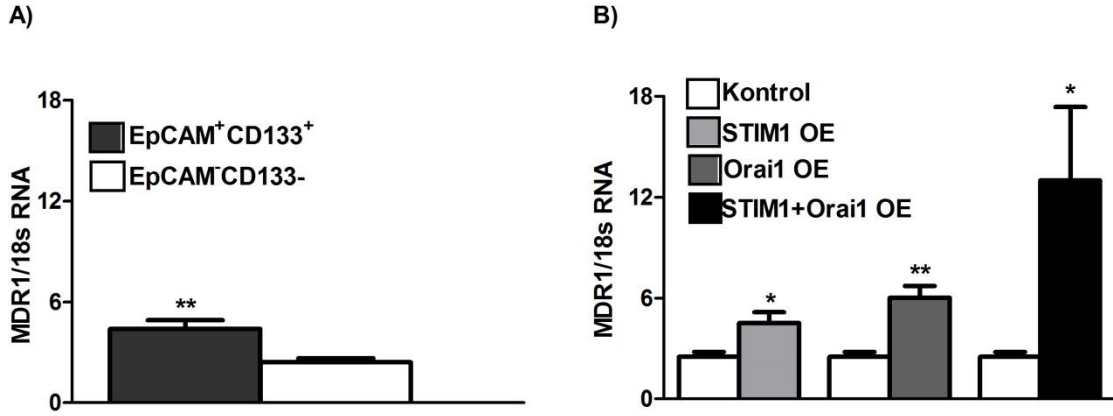
STIM1+Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 hücrelerinde Orai1 ifadesinin kontrole göre (yaklaşık 70 kat) daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. STIM1+Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 hücrelerinde Orai1 mRNA düzeyi. Değerler 18S RNA mRNA ekspresyon düzeylerine normalize edilmiştir (Hedef gen/18S RNA mRNA x 10² Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, ***p*<0,01, n=4). Not: Y eksenini iki parçalı gösterilmiştir.

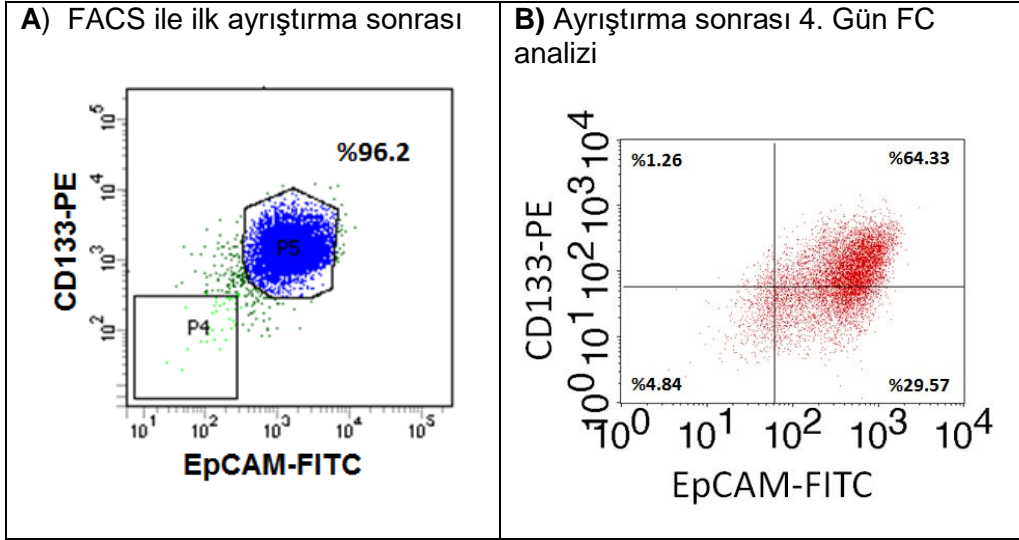
3.4.2 MDR1

MDR1 gen ifadesi sırasıyla EpCAM⁺CD133⁺, EpCAM⁻CD133⁻ Huh7 ile STIM1-OE, Orai1-OE ve STIM1+Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 hücrelerinde incelendi.



Şekil 3.15. Huh-7 hücre altpopülasyonlarında ve STIM1- ve/veya Orai1-OE durumlarında MDR1 transkripsiyon düzeyleri. EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ Huh-7 hücrelerinde (A) ve EpCAM⁺CD133⁺ STIM1-OE, Orai1-OE ve STIM1+Orai1-OE hücrelerde MDR1 mRNA ekspresyon düzeyi (B). (Hedef gen/18S RNA mRNA x 10²; **p*<0,05 Kontrol ve STIM1-OE; Kontrol ve STIM1+Orai1-OE, ***p*<0,01 Kontrol ve Orai1-OE, Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, n=4-5,)

EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ Huh7 hücrelerinde MDR1 gen ifadesinin EpCAM⁺CD133⁺lerde EpCAM⁻CD133⁻lere oranla daha fazla (yaklaşık 2 kat, ***p*<0.01) olduğu belirlendi (Şekil 3.15.A). Kontrole göre EpCAM⁺CD133⁺ STIM1-OE, Orai1-OE ve STIM1+Orai1-OE hücrelerde MDR1 ifadesinin anlamlı şekilde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.15.B). Şekil 3.16. mRNA MDR1 ifade düzeyleri değerlendirilen EpCAM⁺CD133⁺ (akış sitometrisi ile ayrıştırma sonrası) ve EpCAM⁺CD133⁺ STIM1-OE, Orai1-OE ve STIM1+Orai1-OE hücrelerin (ayrıştırma sonrası 4. gün) EpCAM ve CD133 yüzey antijeni yüzdeleri verilmiştir. Şekil 3.16.A EpCAM⁺CD133⁺ (+/+ : %96,2) ve Şekil 3.16.B Kontrol (boş plazmid içeren EpCAM⁺CD133⁺ hücreler, +/+ : %64,3) hücreler arasındaki MDR1 gen ifade farkı EpCAM⁺CD133⁺ yüzdelerindeki azalmadan kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.16. FC ile ayırıştırma sonrası 4. günde EpCAM⁺CD133⁺ hücre oranlarındaki değişim. Parental Huh7 hücrelerden akış sitometrisi ile seçilen EpCAM⁺CD133⁺ (A) aynı EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerin ayırıştırma sonrası 4. gün EpCAM ve CD133 yüzey antijeni yüzdelерinin değişimi (B) (*Soldaki BD FACS Aria III, sağdaki BD FACS Calibur'da yapılmıştır, P4: EpCAM⁻CD133⁻, P5: EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerin yüzdesini göstermektedir).

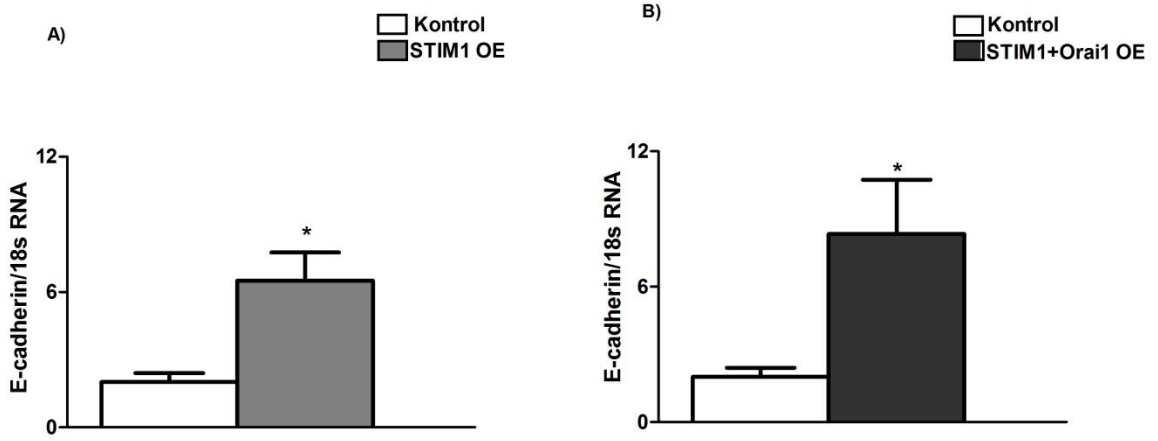
3.4.3 STIM1-OE, Orai1-OE, STIM1+Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 Hücrelerinde EMT Belirteçlerinin mRNA Düzeyleri

EMT aşamasında epitelyal özelliklerin azalmasıyla hücre-hücre arası bağlantılarından ayrılırlar. Mezenkimal karakteristik kazanmaya başladıklarında ise farklı bölgelere doğru hareket edebilmektedirler. EMT'nin değerlendirilmesinde birçok belirteç mevcuttur. Genellikle *E-cadherin* (epitelyal), *N-cadherin* (mezenkimal) ve *vimentin* (mezenkimal) belirteçleri kullanılmaktadır.

STIM1-OE ve STIM1+Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 hücrelerinde EMT belirteçleri olan *N-cadherin*, *E-cadherin* ve *vimentin* mRNA ifade düzeyleri değerlendirildi.

E-cadherin

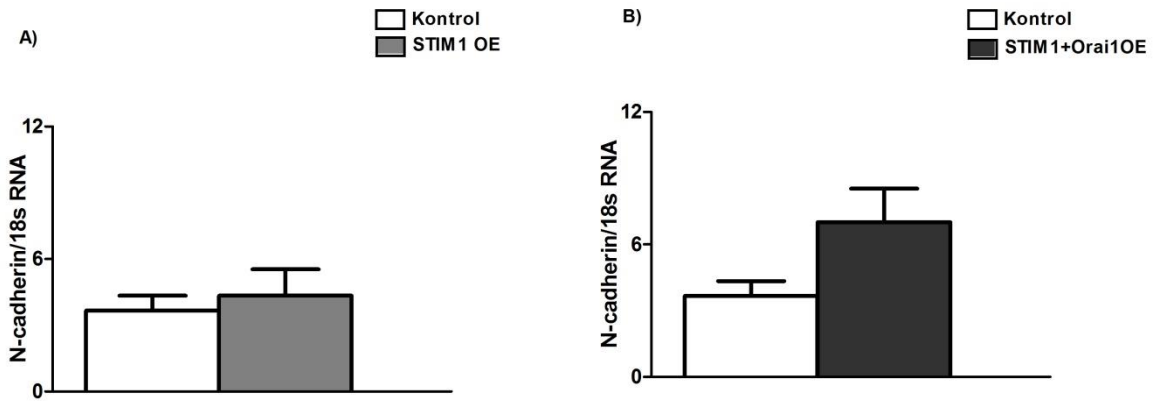
STIM1 OE ve STIM1+Orai1 OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 hücrelerde *E-cadherin* ifadesinin beklendiği gibi kontrole göre daha fazla (yaklaşık 3 kat) olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$, Şekil 3.19.).



Şekil 3.17. STIM1-OE ve STIM1-OE+Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 hücrelerinde *E-cadherin* mRNA düzeyi. STIM1 OE (A) ve STIM1-Orai1-OE (B), (Hedef gen/18S RNA mRNA x 10²; Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, **p*<0,05, n=4)

N-cadherin

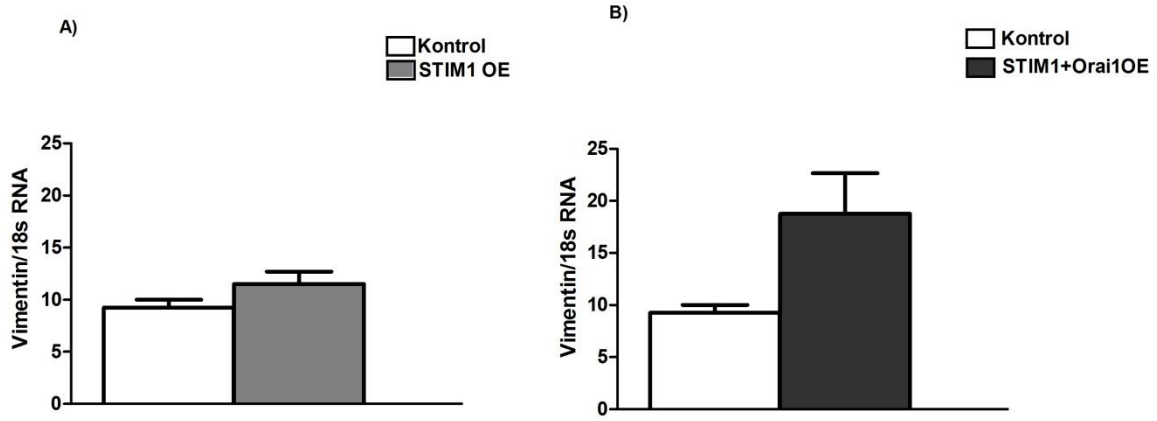
Mezenkimal belirteçlerden biri olan *N-cadherin* ifadesi STIM1-OE hücrelerde kontrole oranla değişmezken STIM1+Orai1-OE hücrelerde anlamlı olmayan bir artış (yaklaşık 2 kat) belirlenmiştir (Şekil 3.20.).



Şekil 3.18. STIM-OE ve STIM1OE-Orai1 OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 hücrelerinde *N-cadherin* mRNA düzeyi. STIM-OE (A) ve STIM1OE-Orai1-OE (B) (Hedef gen/18S RNA mRNA x 10²; Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, n=3)

Vimentin

Mezenkimal belirteçlerden bir diğeri olan *vimentin* geninin ifadesinde STIM1 OE hücrelerde kontrole göre herhangi bir değişiklik gözlenmezken, STIM1+Orai1-OE hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte yaklaşık 2 kat artış belirlenmiştir (Şekil 3.19.)

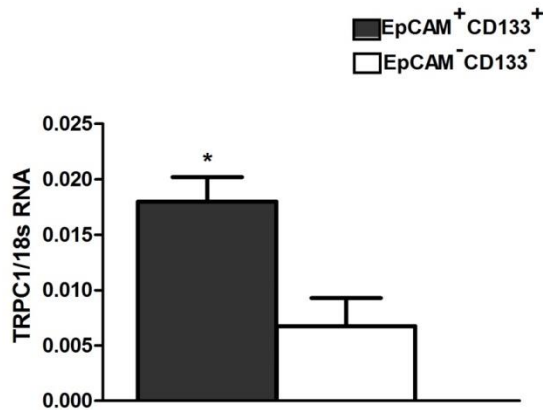


Şekil 3.19. STIM1OE ve STIM1+Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 hücrelerinde *vimentin* mRNA düzeyi. STIM-OE (A) ve STIM+Orai1-OE (B) (Hedef gen/18S RNA mRNA x 10²; Student *t* testi eşleştirilmemiş veriler, n=4)

3.4.4 EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ Huh7 hücrelerinde *TRPC1* mRNA İfadesi

SOCE'nin bileşenlerinden olduğu düşünülen *TRPC1* proteininin mRNA ifade düzeyi EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ hücrelerde incelendi.

TRPC1 mRNA ifade düzeyinin EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerde EpCAM⁻CD133⁻ hücrelere göre yaklaşık 4 kat fazla olduğu belirlenmiştir (**p*<0,05, Şekil 3.20.).



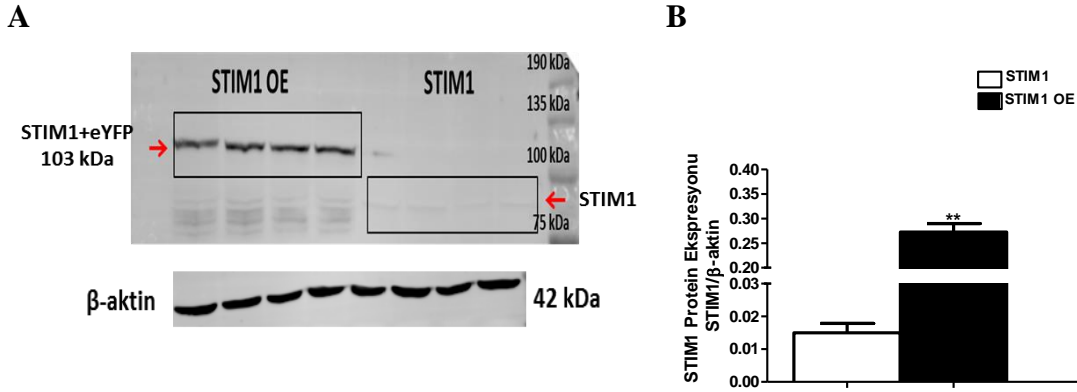
Şekil 3.20. EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ hücrelerde *TRPC1* mRNA düzeyi. (Hedef gen/18S RNA mRNA x 10²; Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, **p*<0,05, n=4).

3.5 Western Blot

STIM1-OE hücrelerden izole edilen proteinlerde STIM1, Orai1, TRPC1 ve TRPC6 proteinlerine spesifik antikolar kullanılarak WB çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışılan proteinlerin yaklaşık olarak moleküler ağırlıkları kontrol plazmid GFP, 27 kDa; STIM1, 77 kDa; Orai1, 33 kDa; TRPC1, 120 kDa; TRPC6, 106 kDa; β -aktin, 43 kDa'dır.

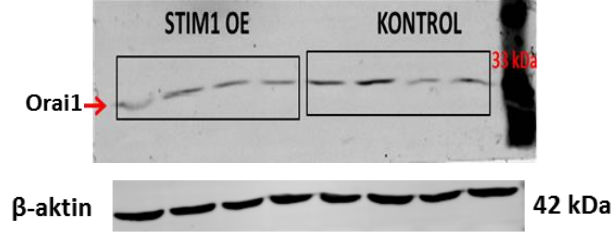
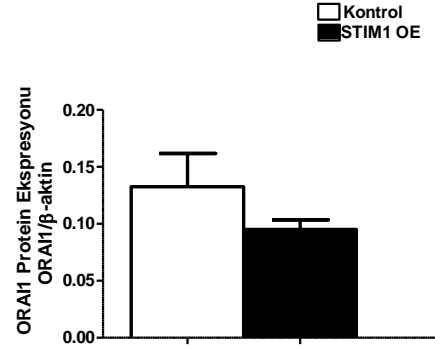
STIM1, Orai1, TRPC1 ve TRPC6 proteinlerinin bantlarının yoğunlukları (optik yoğunluk) hesaplandı. Daha sonra hedef genlerin protein ekspresyon düzeyleri β -aktin proteininin optik yoğunluğuna normalize edilerek (Hedef gen / β -aktin) STIM1, Orai1, TRPC1 ve TRPC6 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Plazmid vektörlerinin taşıdığı floresan proteinlerin molekül ağırlıkları Ori1 için CFP: 31,3 kDa ve STIM1 için YFP: 26,4 kDa'dır.

STIM1-OE hücrelerde beklendiği gibi STIM1 protein ekspresyonu anlamlı şekilde artmıştır (yaklaşık 3 kat, $**p<0,01$, Şekil 3.21).



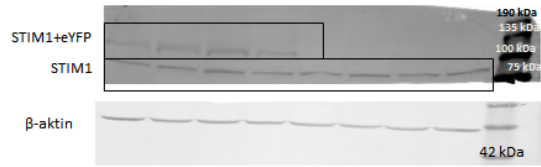
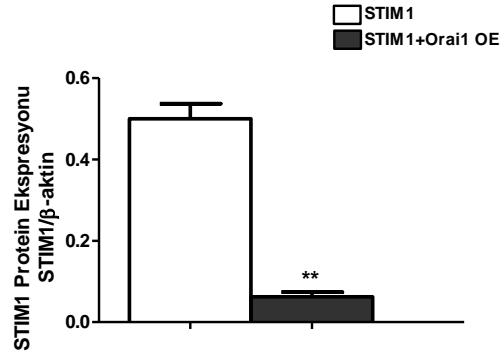
Şekil 3.21. STIM1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 hücrelerinde STIM1 protein analizi. WB analizinde STIM1 OE ve STIM1 bantları (STIM1 OE; STIM1 + eYFP \approx 103 kDa, STIM1 77 kDa) (A) ve STIM1 protein düzeylerinin kümülatif verileri (B). STIM1 bant yoğunlukları β -aktin (42 kDa) bantlarına göre oranlanarak protein ekspresyon düzeyleri belirlendi. (Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, $**p<0,01$, $n=4$). Not: Y eksenini iki parçalı olarak gösterilmiştir.

STIM1-OE olan hücrelerde Orai1 protein ekspresyonunda kontrole karşı azalma gözlenmiştir (Şekil 3.22.).

A**B**

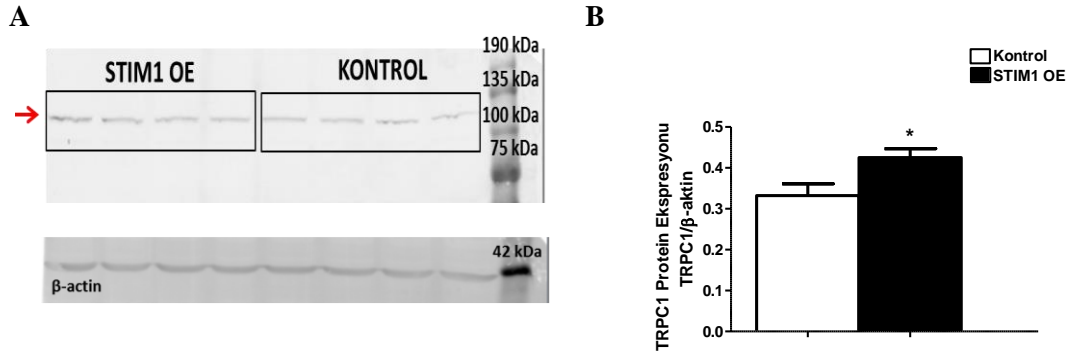
Şekil 3.22. STIM1-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 hücrelerinde Orai1 protein analizi. WB analizinde Orai1 bantları (Orai1 33 kDa) (A), Orai1 protein düzeylerinin kümülatif verileri (B). Orai1 bant yoğunlukları β-aktin (42 kDa) bantlarına göre oranlanarak protein ekspresyon düzeyleri belirlendi. Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, n=4).

STIM1+Orai1-OE EpCAM+CD133+ Huh7 hücrelerinde STIM1 ve Orai1 protein ifadeleri belirlendi (Şekil 3.23. ve 3.24.). İkili plazmid uygulamasına bağlı olarak STIM1 düzeylerinde azalma gözlemlendi.

A**B**

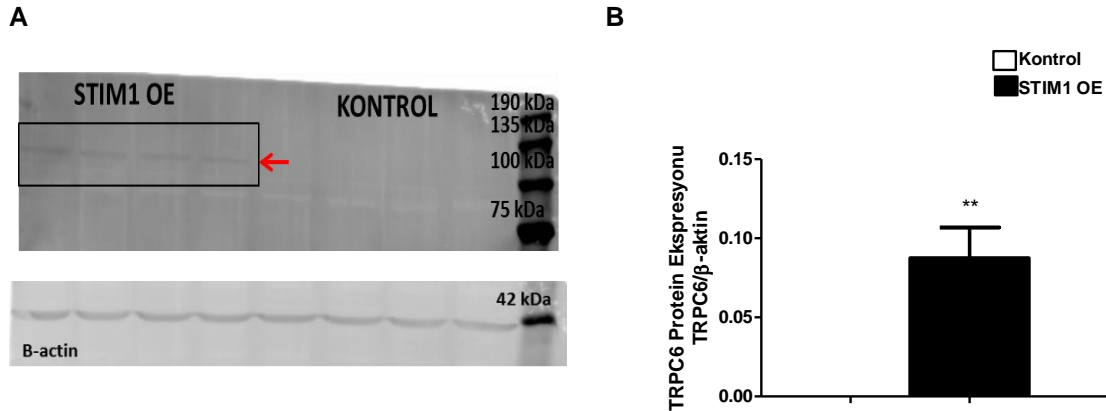
Şekil 3.23. STIM1+Orai1-OE hücrelerinde STIM1 protein analizi. WB analizinde STIM1 OE ve STIM1 bantları (STIM1 OE; STIM1 + eYFP ≈103 kDa, STIM1 77 kDa) (A), STIM1 protein düzeylerindeki değişim kümülatif verileri(B). STIM1 bant yoğunlukları β-aktin (42 kDa) bantlarına göre orantılanarak protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. (Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, ***p*<0,01, n=4).

STIM1-OE EpCAM+CD133+ Huh7 hücrelerinde TRPC1 protein ekspresyonunun kontrole göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (yaklaşık 3 kat, **p*<0,05, Şekil 3.24.).



Şekil 3.24. STIM1-OE EpCAM+CD133+ Huh7 hücrelerinde TRPC1 protein analizi. WB analizinde (A)TRPC1 bantları (TRPC1 120 kDa), (B)TRPC1 protein düzeylerinin kümülatif verileri. TRPC1 bant yoğunlukları β-aktin (42 kDa) bantlarına göre orantılanarak protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. (Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, * $p < 0,05$, $n=4$)

Kontrol grubu hücrelerde TRPC6 proteini belirlenemezken STIM1-OE EpCAM+CD133+ Huh7 hücrelerinde TRPC6 proteininin ifade edildiği gösterilmiştir. STIM1 proteininin aşırı ifadesi TRPC6 proteininin ifadesinde belirgin bir artışa neden olmuştur (Şekil 3.25.).

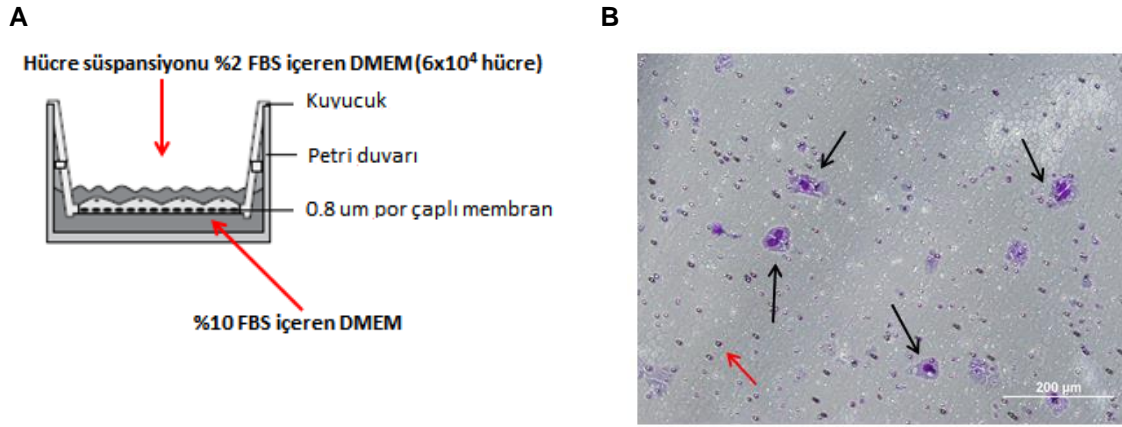


Şekil 3.25. STIM1 OE hücrelerinde TRPC6 protein analizi. WB analizinde (A) TRPC6 bantları (106 kDa), (B) TRPC6 protein düzeylerinin verileri. TRPC6 bant yoğunlukları β- aktin (42 kDa) bantlarına göre oranlanarak protein ekspresyon düzeyleri belirlendi. (Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, ** $p < 0,01$, $n=4$).

3.6 İnvazyon ve Migrasyon Analizleri

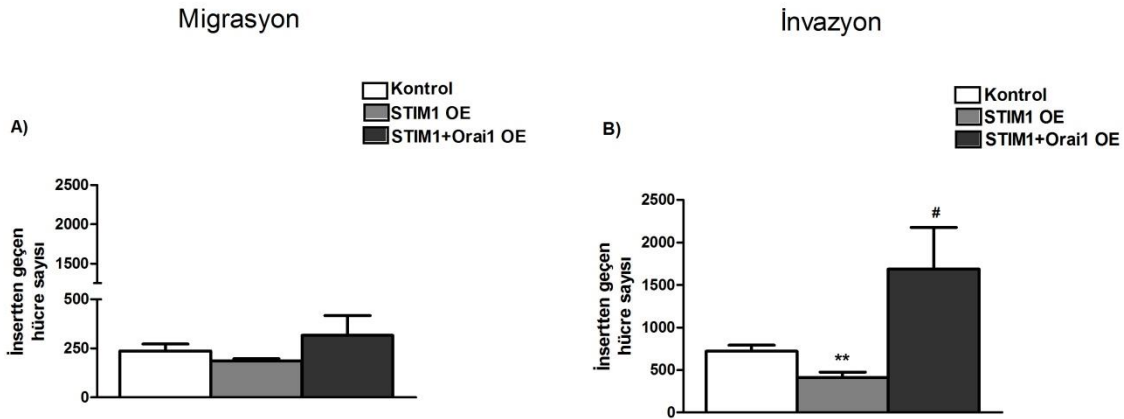
Transfeksiyondan 48 saat sonraki süreçte, EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 STIM1-OE, STIM1+Orai1-OE hücreler, 6 kuyucuklu petrilere kaldırıldıktan sonra matrijel kaplı (invazyon) ve kaplı olmayan (migrasyon) kuyucuklara (Corning, 8 µm por çapına sahip, Şekil 3.26A) 6×10^4

sayıda ekilerek invazyon ve migrasyon özellikleri incelendi. 24 saat sonra hücreler boyandı ve mikroskofta geç eden hücreler (Şekil 3.26.B ve Şekil 3.27.) sayıldı.



Şekil 3.26. İnvazyon ve migrasyon deney aparatı. İnvazyon ve migrasyonda kuyucuğun (insert) görünüşü (A), Kuyucuklardan (insert) geçen hücrelerin görünümü (B). Siyah oklar hücreleri (pembe renkli kısım hücre çekirdeği, mor renkli kısım hücre sitoplazması), kırmızı ok ise 0,8 µm çapındaki porları göstermektedir (10x büyütme, Olympus IX71).

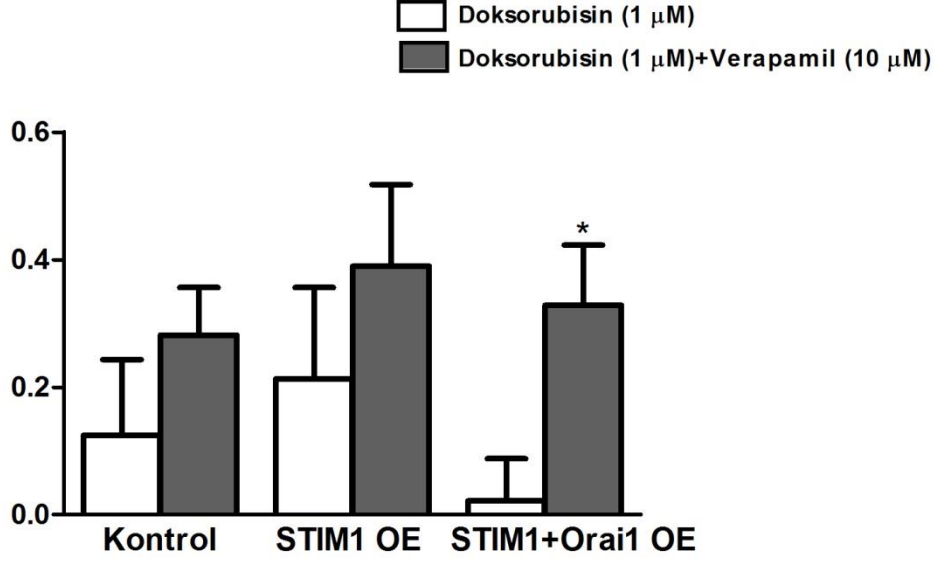
Migrasyon çalışmalarında kontrole göre STIM-OE ve STIM+Orai1-OE hücrelerde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. İnvazyon deneylerinde ise kontrole göre STIM1-OE olan hücrelerde insertten geçen hücre sayısı azalırken, STIM1+Orai1-OE hücrelerde arttığı belirlenmiştir ($p < 0,01$, Şekil 3.28.).



Şekil 3.27. STIM1-OE ve STIM1+Orai-OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh-7 hücrelerinin migrasyon ve invazyon sonuçları. Migrasyon ve invazyon sonrası kuyucuklardan (insert) geçen hücre sayısı. Migrasyon; Kontrol, STIM1-OE ve STIM1+Orai1-OE hücreler (A), İnvazyon: Kontrol, STIM1 OE ve STIM1-Orai1 OE hücreler geçen hücre sayısının kümülatif verileri (B) (Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, n=8, **Kontrol ve STIM1-OE, $p < 0,01$; #STIM1-OE ve STIM1+Orai1-OE, $p < 0,05$).

3.7 Çoklu İlaç Direnci (Multiple Drug Resistance, MDR) İlaç Atılım Deneyleri

Kontrol, STIM1 OE ve STIM1+Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerde çoklu ilaç direnç mekanizmasında yer alan özelliklerden biri olan ilaç atılım özellikleri 1 μ M Doksorubisin, 1 μ M Doksorubisin + 10 μ M verapamil varlığında 90 dakika tutularak değerlendirildi. Kontrol ve STIM1-OE'de doksorubisin+verapamil'de anlamlı olmayan bir artış, STIM1+Orai1-OE'de ise anlamlı bir artış ($p<0,05$) saptanmıştır (Şekil 3.28.).



Şekil 3.28. STIM1-OE ve STIM1+Orai1-OE uygulamasının EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerde MDR işlevi üzerine etkisi. Kontrol, STIM1 OE ve STIM1+Orai1 OE EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerde doksorubisin ve doksorubisin+verapamil varlığında 90 dakikadaki atılımın azalmasına bağlı olarak hücre içi ilaç tutulumunun fluorometrik ölçümü (STIM1+Orai1-OE'de doksorubisin ve doksorubisin+verapamil; Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, * $p<0,05$, n=6). Doksorubisin eksitasyon dalga boyu: 470 nm ve emisyon dalga boyu: 585 nm'dir.

3.8 Total RNA Mikrodizin Çalışmaları

4 farklı gruptan toplam 12 adet RNA örneğiyle çalışma gerçekleştirildi. Örneklerin cRNA dönüşümleri yapılarak Illumina iScan platformunda 45 binden fazla prob kullanılarak, "HumanHT-12 V4 Expression BeadChip" ile tüm genom ifade kalıbı (transkriptom) çıkarıldı. Aynı örnek grubuna dahil olan örnekler aynı kodla adlandırılıp, teknik replika olarak değerlendirildi. Örnek no ve kodları Tablo 3.1'de, Tablo 3.2'de ise karşılaştırma grupları verilmiştir.

Tablo 3.1. Mikrodizin çalışmasında kullanılan örnek no ve kodları

Örnek No	Örnek Kodu
1-2-3	PK (Pozitif Kontrol)
4-5-6	X (STIM1-OE)
7-8-9	Y (STIM1+Orai1 OE)
10-11-12	NK (Negatif Kontrol)

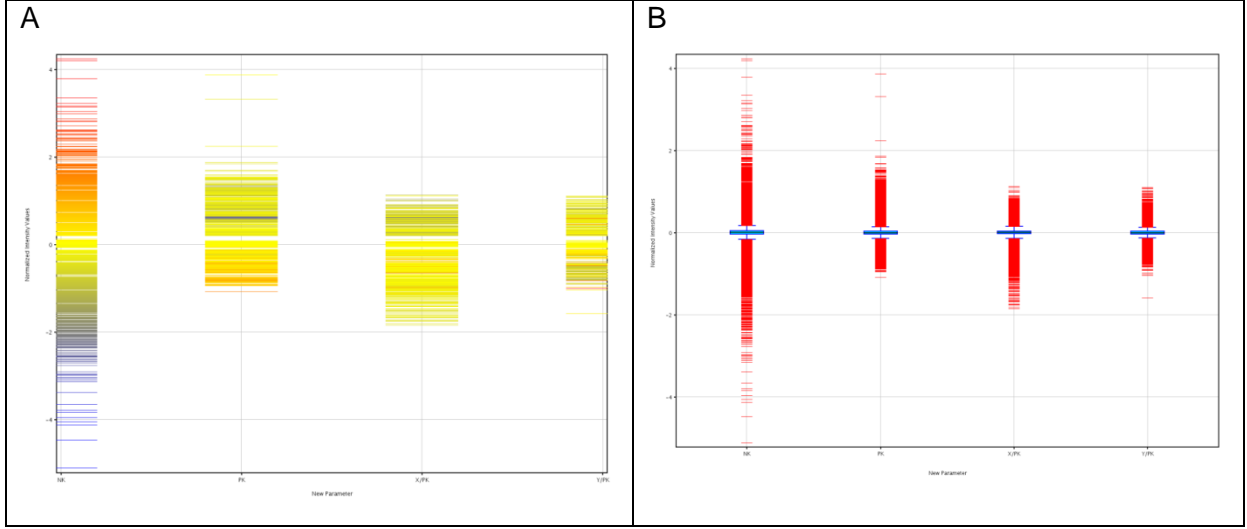
Tablo 3.2. Karşılaştırma grupları

Karşılaştırma	Hedef grup	Kontrol Grup
1. Karşılaştırma	X/PK	PK
2. Karşılaştırma	Y/PK	PK
3. Karşılaştırma	NK	PK

Illumina HumanHT-12_v4_BeadChip gen çipi kullanılarak direkt hibridizasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. RNA örnekleri çip üzerine hibridize edilmeden önce çoğaltılmış ve biotin ile işaretlenmiştir. Hibridizasyon sonrası Cy3-streptavidin ile işaretleme yapılmış ve çip görüntülenmiştir. Kullanılan gen çipi üzerinde 12 adet örnek haznesi ve her bir haznede, tanımlanmış 25.000 adet gene spesifik 47.231 prob bulunmaktadır. 50 bç uzunluğundaki proplar adres dizi ile 3 mikron çapındaki küreler üzerine bağlıdır. Kullanılan gen çipi ve direkt hibridizasyon çalışma ilkesi gereç ve yöntem kısmında verilmiştir.

3.8.1 Verilerin Kalite Kontrolü

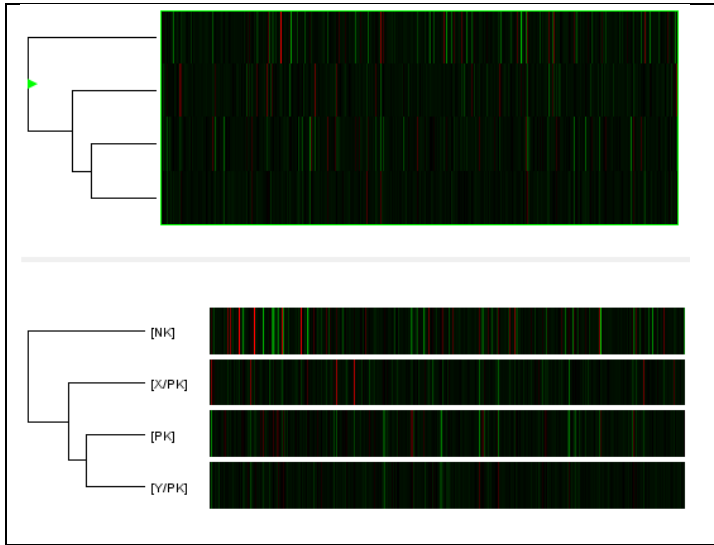
Ham mikrodizin (*microarray*) verisi GenomeStudio programı yardımı ile elektronik verilere dönüştürülmüştür. Mikrodizin verilerinin kalite kontrol amaçlı oluşturulan sinyal yoğunluk grafikleri aşağıda gösterilmiştir. Yapılacak karşılaştırmalı analizler için her örneğin verisinden arka plan gürültüsü uzaklaştırılmış ve tüm örneklerin verisi yüzdelik (*quantile*) normalizasyona tabi tutulmuştur. Propların dağılım grafikleri Şekil 3.29'da gösterilmiştir.



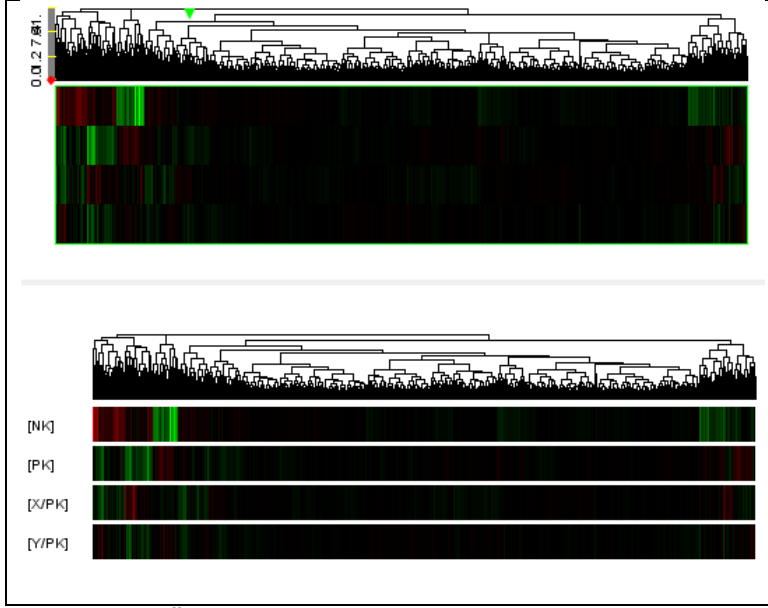
Şekil 3.29. Probların dağılım grafikleri. “Profile plot” gösterimi (A), “Box-Whisker” plot gösterimi (B). Y eksenini: “*Normalized intensity value*” (Normalizasyon sinyali yoğunluğu).

3.8.2 Cluster (Kümeleme) Analizleri

Normalizasyon edilmiş verilerin tüm genom gen ekspresyon profilleri arasında yapılan hiyerarşik kümeleme analizi sonucu aşağıdadır (Şekil 3.30. ve 3.31). Hiyerarşik kümeleme ‘Hierarchical’ yaklaşımı kullanılarak oluşturulmuştur. Uzaklık birimi olarak “Euclidean” ve bağlantı kuralı “Wards” olarak seçilmiştir. Ayrıca, teknik replika olarak çalışılan örneklerden elde edilen prob ışımalarının ortalama verileri hesaplanarak elde edilen grup verisinin hiyerarşik kümeleme sonucu ise aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.30. Gruplar baz alınarak yapılan “Cluster” Analizi



Şekil 3.31. Örnekler baz alınarak yapılan “Cluster” Analizi (Probu gösterim)

3.8.3 İstatiksel Analizler

Çalışmalara 47.322 adet proba başlandı. Daha sonra probalar ekspresyon seviyelerine göre filtrelendi. Normalize verilerden %20'nin altında ışığa alınan probalar filtreye takıldı. 46.898 adet proba çalışmaya devam edildi. Bir probtan, herhangi bir grupta %20'nin üzerinde ışığa alındıysa, filtreden geçmesi sağlandı ve bu sayede prob kaybı en aza indirildi.

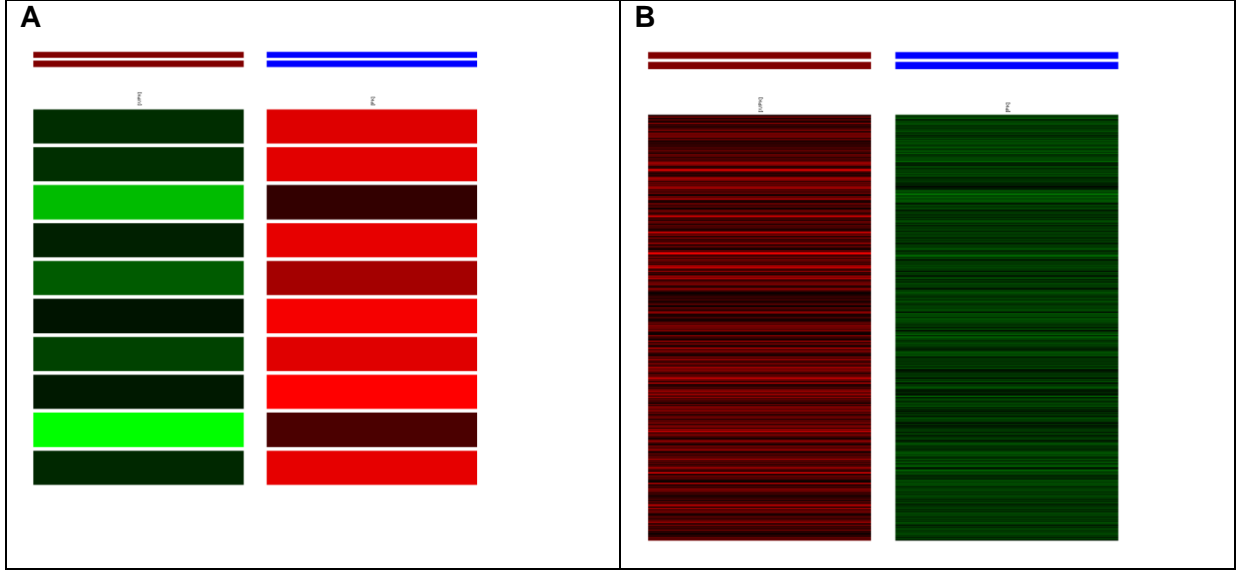
Gruplar arası One Way ANOVA ve Post Hoc Tukey testleri gerçekleştirildi. FC (Fold Change, katlı değişim) analizi yapılarak 2'den büyük kat değişimleri her bir prob için artış ve azalış olarak belirlendi.

Her bir grup için filtrelemelerde, FC hesaplaması yapıldı. Artan problemlerin sıcaklık haritasında değerleri kırmızı, azalan problemlerin ise yeşil olarak gösterildi. Siyah renki bölgeler, belirtilen gende anlamlı değişiklik olmadığını göstermektedir.

X/PK Grubuna Karşı PK Grubu

Kontrol grubu olarak PK grubu seçildi. FC değerleri Analiz Grubu/Kontrol Grubu olarak hesaplandı. FC Filtresi 2 olarak belirlendi.

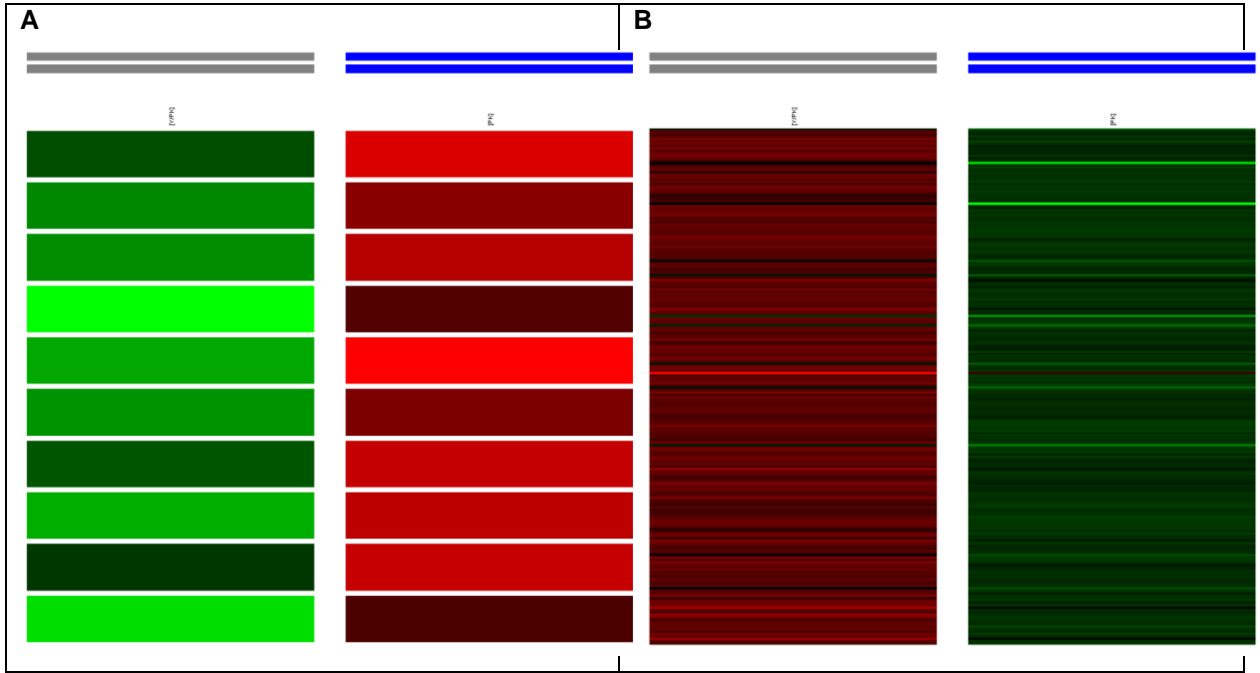
Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 10 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 506 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır. Artan problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.32.A'da, azalanlarınki ise 3.32.B'de verilmiştir.



Şekil 3.32. X/PK Grubuna karşı PK Grubu. Artan (A) ve azalan (B) problemlerin sıcaklık haritası.

Y/PK Grubuna karşı PK Grubu

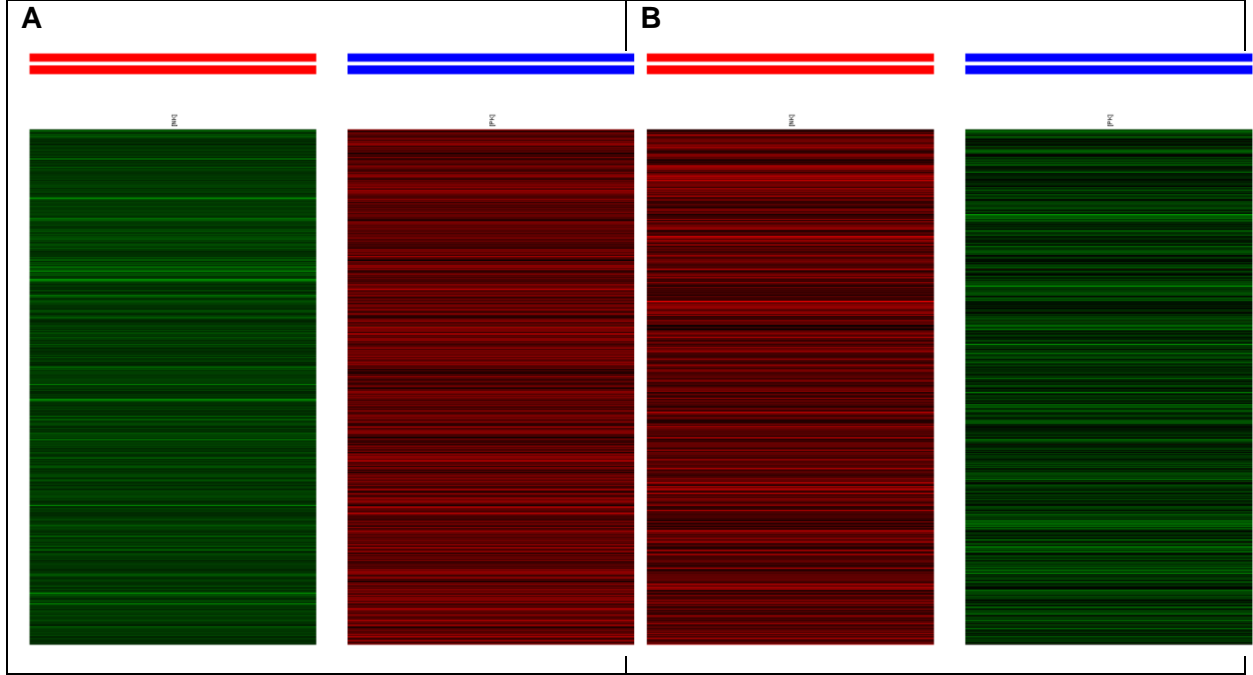
Kontrol grubu olarak PK grubu seçildi. FC değerleri Analiz Grubu/Kontrol Grubu olarak hesaplandı. FC Filtresi 2 olarak belirlendi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 10 adet probun ifadesi kontrol grubuna göre artmış, 216 adet probun ifadesi kontrol grubuna göre azalmıştır. Artan problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.33A'da, azalanları ise Şekil 3.33B'de gösterilmiştir.



Şekil 3.33. Y/PK Grubuna karşı PK Grubu. Artan (A) ve azalan (B) problemlerin sıcaklık haritası.

NK Grubuna Karşı PK Grubu

Kontrol grubu olarak PK grubu seçildi. FC değerleri Analiz Grubu/Kontrol Grubu olarak hesaplandı. FC Filtresi 2 olarak belirlendi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 1193 adet probun ifadesi kontrol grubuna göre artmış, 1330 adet probun ifadesi kontrol grubuna göre azalmıştır. Artan problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.34.A'da, azalan problemlerin sıcaklık haritası Şekil 3.34.B'de gösterilmiştir.



Şekil 3.34. NK Grubuna karşı PK Grubu. Artan (A) ve azalan (B) problemlerin sıcaklık haritası.

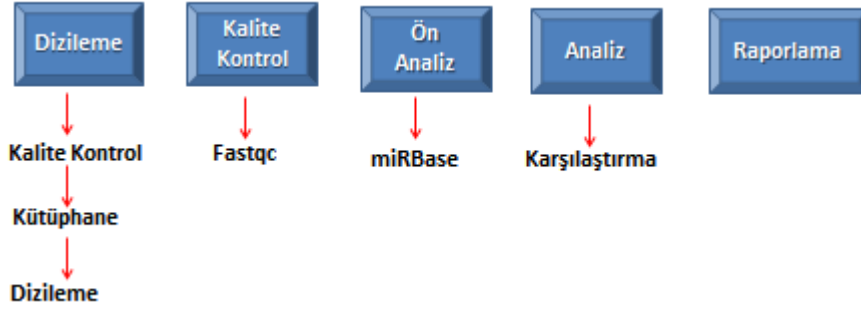
Tablo 3.3. Mikrodizin analizinden seçilen transkripsiyonları belirgin değişen genler.

Gen	X-PK/PK (STIM1 OE / Kontrol)	Y-PK/PK (STIM1+Orai1 OE / Kontrol)
Vimentin	1,12	1,29-1,23
MCUR1	0,85	1,16
MCU1	0,68	1,15-1,14
Calcineurin	1,35	1,3
BID	0,79	1,19

Mikrodizin çalışmaları sırasında ekspresyonunda değişiklik gözlenen genler arasından yukarıda tabloda belirtilenler örnek olarak seçilmiştir. Vimentin mezankimal EMT belirteci, MCUR1 "mitochondrial calcium uniporter regulator 1", MCU1 "mitochondrial calcium uniporter 1", calcineurin: Protein Fosfatase 2B (PP2B); BID: BH3-Interacting Domain Death Agonist.

3.9 miRNA (micro RNA) Dizileme

miRNA dizilemede kullanılan akış şeması **Şekil 3.35'te** verilmiştir.



Şekil 3.35. miRNA dizileme (miRNom) akış şeması.

3.9.1 DİZİLEME

Total RNA örneklerinin RIN değerleri belirlenerek kullanılan örneklerin kalite kontrolü gerçekleştirildi.

Kütüphane Hazırlama

Kütüphane hazırlama basamağında "Illumina Small RNA Library Preparation" kit kullanıldı. Olgunlaşmış miRNA'ların uç kısımlarında 5'-fosfat ve 3'-hidroksil grupları yer almaktadır. Kütüphane hazırlama basamağında kullanılan Illumina adaptörleri, doğrudan ve spesifik olarak bu uç gruplar üzerinden miRNA'lara bağlandı. Bağlanma sonrasında RT işlemi ile tek zincirli cDNA elde edildi. cDNA eldesi ardından 24 farklı indeks kombinasyonu içeren primerlerle PCR gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında, adaptör bağlanması, RT, PCR amplifikasyonu ve jel pürifikasyonu gerçekleştirilerek kütüphane ürünü elde edildi.

Dizileme

Dizileme sürecinde, Illumina NextSeq 500 (Illumina) yeni nesil dizileme platformu üzerinden gerçekleştirildi. Illumina tarafından kullanılan Solexa dizileme yönteminde, DNA fragmanları öncelikle akış hücresi "flow-cell" adı verilen çipler üzerine yerleştirilmekte ve yerleştiği bölgede yüksek doğrulukta sinyal vermek için bölgesel olarak çoğaltıldı (bridge-amplification) ve bunun sonucunda "flow-cell" üzerinde milyonlarca fragman kümeleri (cluster) oluşturuldu. "Flow cell" üzerinde oluşan fragman kümeleri, her bir döngüde 1 baz okunacak şekilde dizilendi. Illumina tarafından geliştirilen sentez ederek dizileme "Sequencing-by-Synthesis" yöntemi ile her döngüde, DNA fragmanları 2 farklı boya ile işaretlenmiş 4 farklı dinükleotide maruz bırakıldı. Her bir döngüde, uygun dinükleotitin bağlanmasını takiben floresans kamera ile o kümenin görseli alındı. Her bir kümeden gelen görseller birleştirilmekte ve sonuçta ilgili kümelerin ışımaya karakterlerinden nükleotid dizileri çıkarıldı.

3.9.2 ÖN ANALİZ

Fastq Oluşturulması ve “Demultiplexing”

NextSeq 500 dizileme platformu okuma verileri, *.bcl formatında oluşturulmaktadır. Bu dosyalar, DNA kümelerinin flow-cell üzerindeki konum ve ID'lerini, ışımaya karakterlerini içermektedir. Bu verilerden Bcl2fastq v.2.1 (Illumina) programı kullanılarak *.fastq dosyaları elde edildi. Aynı zamanda, fastq verileri, içerdiği “index” verilerine göre farklı örneklerle ayrıştırıldı (Demultiplexing).

Kalite Kontrolü

Kalite kontrol işlemleri, ham fastq verilerinin incelenerek dizileme çalışmasının etkinliğini ölçmede kullanılır. Böylelikle, çalışmada yaşanan herhangi bir sorun ve olası sebepleri hakkında bilgi edinilmiş olur. Çalışmada bu amaçla FASTQC programı (www.bioinformatics.babraham.ac.uk) kullanıldı.

Okuma Filtreleri ve “Trimming”

Dizileme sürecinde, Fastq okuma verilerindeki düşük kalitedeki bazı okumaları, sonraki analiz basamaklarında false positif sonuçlara neden olmaması için, okumalardan çıkarıldı. Kalite filtreleri ve kesim işlemleri için Trimmomatic uygulaması (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) kullanıldı.

miRBase Veritabanı Eşleştirmesi

miRNA dizilerinin tespit edilebilmesi için tespit edilen tekil dizileri miRBase (www.mirbase.org) üzerinden BLAST ile eşleştirildi. İncelenen dizilerin miRBase veritabanındaki miRNA dizileri ile nükleotit dizimi ve boy açısından tam olarak eşleşmesi durumunda, ilgili dizi miRNA olarak kabul edildi.

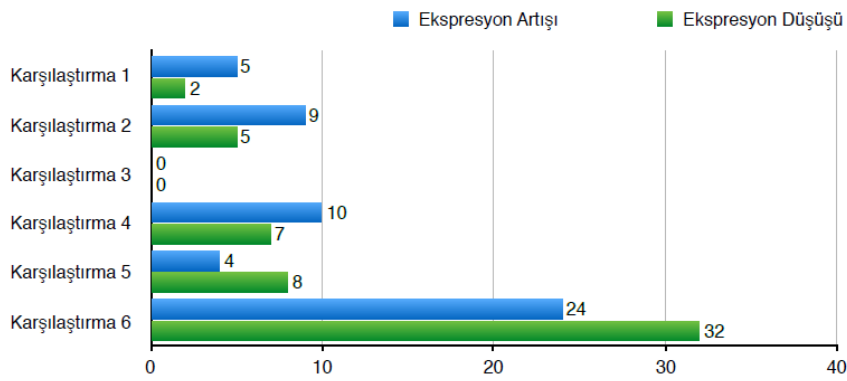
miRNA dizilemede kullanılan gruplar Tablo 3.4.'de listelenmiştir.

Tablo 3.4. Karşılaştırma grupları

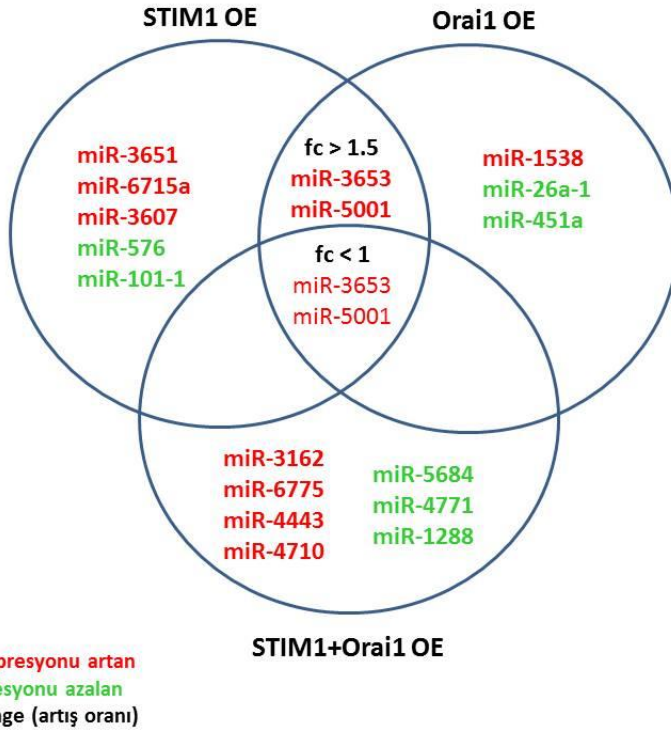
Grup No	Örnekler
1	Kontrol ve STIM1 OE
2	Kontrol ve Orai1 OE
3	Kontrol ve STIM1+Orai1 OE
4	Kontrol ve EpCAM ⁺ CD133 ⁺
5	EpCAM ⁺ CD133 ⁻ ve EpCAM ⁻ CD133 ⁺
6	Kontrol ve EpCAM ⁻ CD133 ⁻

3.9.3 Sonuçlar

Karşılaştırma sonrasında kat değişimi FC değerlerine göre regülasyonu anlamlı derecede artan ve azalan miRNA'lardan (**şekil 3.36.**) $|FC| \geq 1,5$ ve raw (ham veri) $p < 0,05$ koşullarını sağlayanlar alındı. Karşılaştırma 1 (Kontrol ve STIM1-OE) 5 artan, 2 azalan miRNA, karşılaştırma 2 (Kontrol ve Orai1-OE) 9 artan, 5 azalan miRNA, karşılaştırma 3 (Kontrol ve STIM1-Orai1 OE) artan ve azalan miRNA yok, karşılaştırma 4 (Kontrol ve EpCAM⁺CD133⁺) 10 artan, 7 azalan miRNA, karşılaştırma 5 (EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻) 4 artan, 8 azalan miRNA, karşılaştırma 6 (Kontrol ve EpCAM⁻CD133⁻) 24 artan, 32 azalan miRNA saptanmıştır.



şekil 3.36. Karşılaştırma gruplarında ekspresyonu artan ve azalan miRNA'lar. Ekspresyonu artanlar mavı, ekspresyonu azalanlar yeşil ile gösterilmiştir.



Şekil 3.37. Tüm genom miRNA dizileme verilerinden oluşturulan Venn şeması.

STIM1-OE, Orai1 ve STIM1+Orai1-OE hücre gruplarından elde edilen total RNA örneklerindeki miRNA'ların mirPath v.3 (Diana Tools) yazılımı kullanılarak yapılan analiz sonucu 1,5 (fc: fold change,) kat artan ve azalan miRNA'lar (yolak analizi yapılanlar) .

A

mirPath v.3

New search Help

Species:

Gene filter:

Add miRNAs: or

hsa-miR-3653-3p (116)

hsa-miR-5001-5p (577)

Select the way to merge results:

P-value threshold:

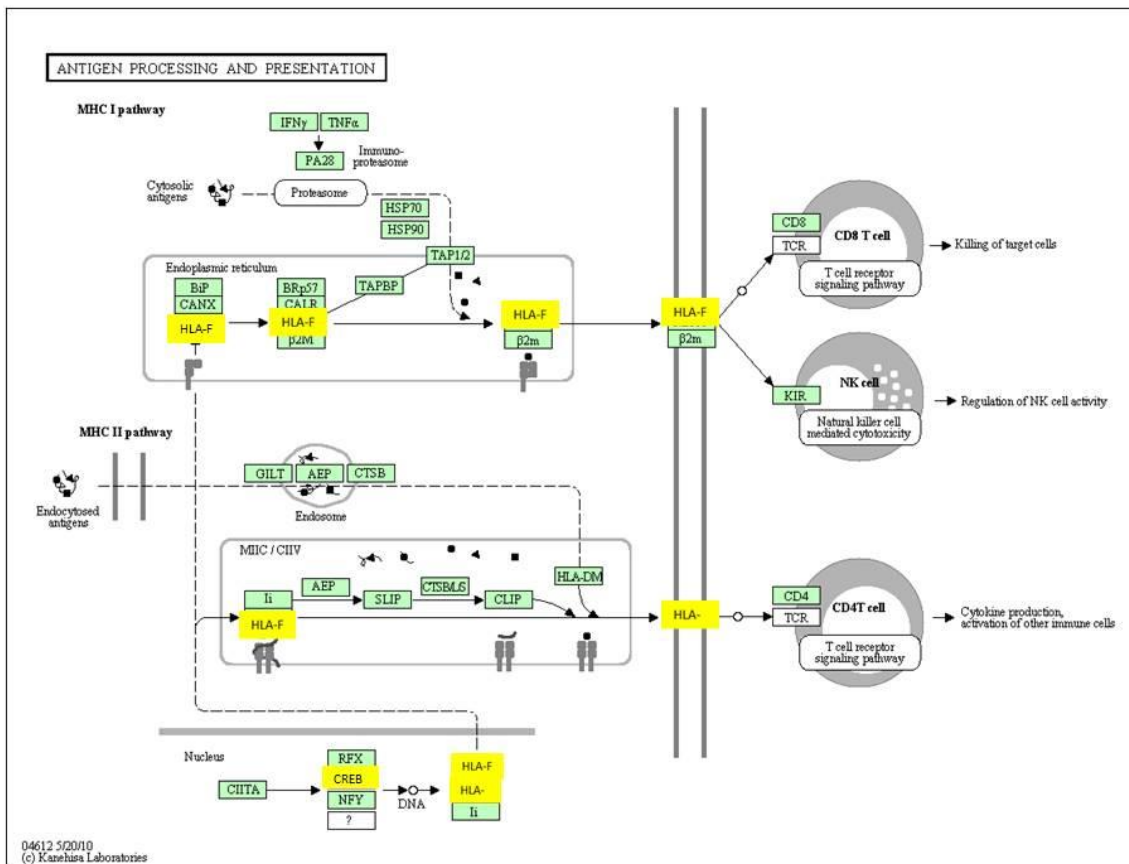
MicroT threshold:

In order to see HeatMap select pathway intersection or pathway union.

B

#	KEGG pathway	p-value	#genes	#miRNAs	download result
1.	Cell adhesion molecules (CAMs) (hsa04514)	1.06344107518e-06	16 see genes	1	details
2.	Allograft rejection (hsa05330)	0.000420828690153	4 see genes	1	details
3.	Acute myeloid leukemia (hsa05221)	0.00642137259638	10 see genes	2	details
4.	Circadian entrainment (hsa04713)	0.0159780718014	12 see genes	2	details
5.	Amphetamine addiction (hsa05031)	0.0221188374807	7 see genes	2	details
6.	Lysine degradation (hsa00310)	0.022664336341	5 see genes	1	details
7.	Proteoglycans in cancer (hsa05205)	0.022664336341	10 see genes	1	details
8.	Antigen processing and presentation (hsa04612)	0.022664336341	6 see genes	2	details
9.	Nicotine addiction (hsa05033)	0.022664336341	5 see genes	2	details
10.	Vitamin digestion and absorption (hsa04977)	0.0289077753151	3 see genes	1	details
11.	Autoimmune thyroid disease (hsa05320)	0.0289077753151	4 see genes	1	details
12.	Vasopressin-regulated water reabsorption (hsa04962)	0.0305788893178	3 see genes	2	details

C



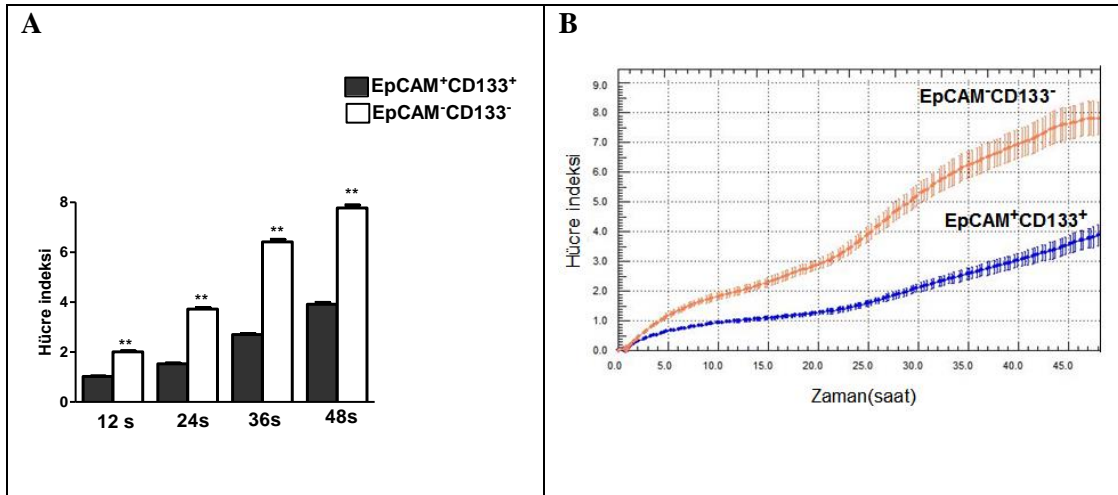
Şekil 3.38. Her üç uygulama grubunda artış gösteren miRNA'lar ile yapılan yolak analizi.

STIM1-OE, Orai1 OE ve STIM1+Orai1-OE hücrelerde farklı düzeylerde arttığı görülen miR-3653 ve miR-5001 miRNA'ların Diana Tools MirPath v.3'te KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri bankasında belirlenen hedef mRNA'ların işlevsel grupları (A ve B) ve karşılık gelen miRNA yolak analizi (C). Her üç uygulamada arttığı belirlenen miRNA'ların 'antigen processing and presentation' (antijen işlem ve sunumu) immün yanıt kaskadında işlevsel olduğu görülmektedir. HLA: Human Leukocyte Antigen (İnsan akyuvar antijeni); CREB: cAMP-Response Element Binding protein, siklik AMP yanıt elementi bağlayan protein.

3.10 Hücre Proliferasyonunun Gerçek Zamanlı İzlenmesi

RTCA (Real Time Cell Analyzer), MP (Multi Plate, Acea) sisteminde hücrelerin çoğalma kalıpları izlendi. Hücreler 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu "e-plate"e ekildi. EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ Huh7 hücrelere ait proliferasyon eğrileri ve ortalama verilerin bar grafikleri (Şekil 3.39.A) ve proliferasyon modelleri (Şekil 3.39.B) incelendi.

EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerin proliferasyon hızlarının EpCAM⁻CD133⁻ hücrelere göre belirgin olarak yavaş olduğu gözlenmiştir.



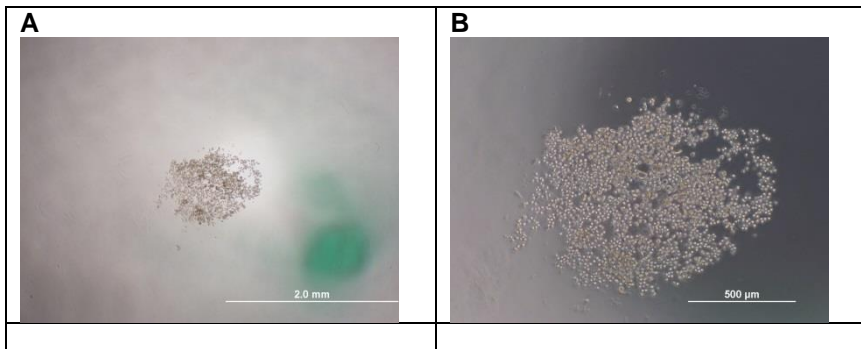
Şekil 3.39. EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ Huh7 hücrelerinde proliferasyonun gerçek zamanlı izlenmesi. EpCAM⁺CD133⁺(mavi) ve EpCAM⁻CD133⁻ (turuncu) Huh7 hücrelerinde proliferasyonun süreçleri. Çalışmada kullanılan 96-kuyucuklu petriye kuyucuk başına 5000 olarak ekilen hücrelerin 5000 hücre/kuyucuk yoğunlukta ekilen hücrelerin 4 farklı zamandaki ortalama verilerin (Ort±O.S.H.) bar grafikleri (A) ve ortalama çoğalma trasesi (B), Hücre indeksi: hücre çoğalmasına bağlı empedans değişim oranı (Student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, ***p*<0,01, n=24).

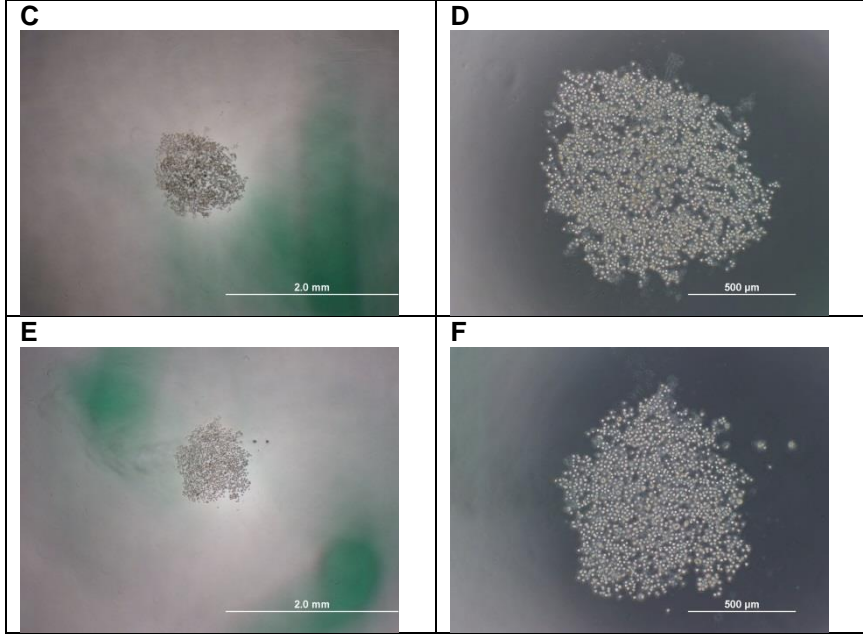
3.11 Sferoid Oluşturma

Kontrol, STIM1OE ve STIM1+Orai1OE EpCAM⁺CD133⁺ Huh7 hücrelerinde transfeksiyon sonrası 7. güne kadar sferoid oluşturma özellikleri incelendi. Şekil 3.40. mikroskop görüntülerini, Şekil 3.41. oluşan sfereroidlerin μM ve mm cinsinden çap ölçümlerini göstermektedir.

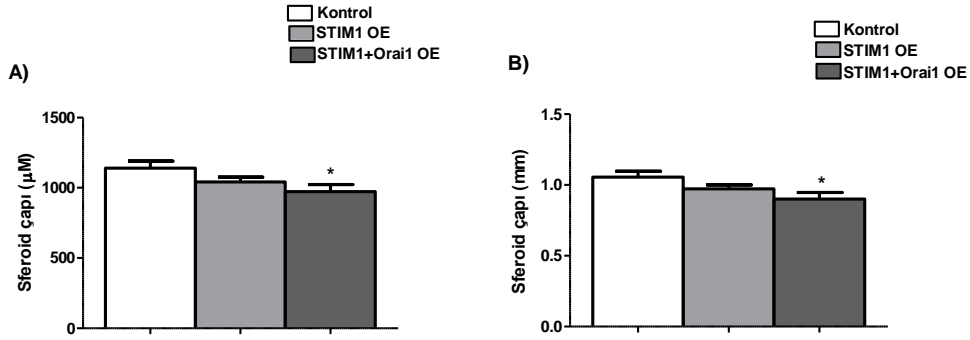
Deneysel kısıtlama: Hücrelerin sferoid oluşturma özelliğinin incelenmesi 7 gün sürmektedir. Hücrelerin TIC özelliği ile ilişkili olduğu bildirilen EpCAM ve CD133 yüzey antijenleri taşıyan hücrelerin toplam popülasyona oranı beş gün sonra %50'nin altına düştüğünden sferoid oluşumu ile ilgili hipotezimizi test edecek deney modelini uygunsuz duruma getirmektedir. Bunun yanı sıra, "transient" (geçici) transfeksiyon metodu kullanılarak transfeksiyonu gerçekleştirilen gruplarda aşırı ifade (OE) plazmidlerin hücre bölünmesi ile çoğalmaları sürecinde 72 saat (transfeksiyon uygulaması 48. saatte mRNA'ya 72. saatte ise protein ifadesine yansımaktadır) sonra plazmidlerini kaybetmesi nedeniyle sentezi indüklenen STIM1 ve Orai1 genlerinin etkisi azalmaktadır. Özetle, TIC hücre popülasyonunun 5. günden sonra azalması ve geçici transfeksiyon uygulanması kısıtlayıcı durum oluşturmuştur. Tanısal kit oluşturma sürecinde olan geniş kapsamlı transkriptom ve miRNom sonuçlarımızın halka açık veri bankalarında HCC hasta verileriyle karşılaştırılması insandaki durumu tam temsil edemeyen *in vitro* karsinogenez deney sonuçlarından daha gerçekçi değerlendirme yapmamıza yardımcı olacaktır.

Bu kapsamda, projemizin ikinci yılında yayınlanan ve çalışmalarımız için önemli bir değer oluşturan Ji ve ark. 2015'te yaptığı çalışmada (Ji, 2015) hasta HCC tümör örneklerinde yapılan mikrodizin ve yeni nesil sekanslama çalışmalarında, çalışmamızda kısıtlama oluşturan (sferoid oluşturma ve yumuşak agarda koloni oluşturma) *in vitro* karsinogenez deneylerinin ötesinde HCC hastalarından ve normal karaciğer örneklerinden elde edilen veriler ile çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin birlikte değerlendirilmesi gerçeğe daha uygun gözükmektedir.





Şekil 3.40. Sferoid görüntüleri. Kontrol (A ve B), STIM1-OE (C ve D), STIM1+Orai1-OE (E ve F) EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerinin transfeksiyon sonrası 7. gün sferoid görüntüleri. A, C, E mikroskop (4x) görüntüleri, B, D, F (10x) görüntüleri (Olympus IX71).

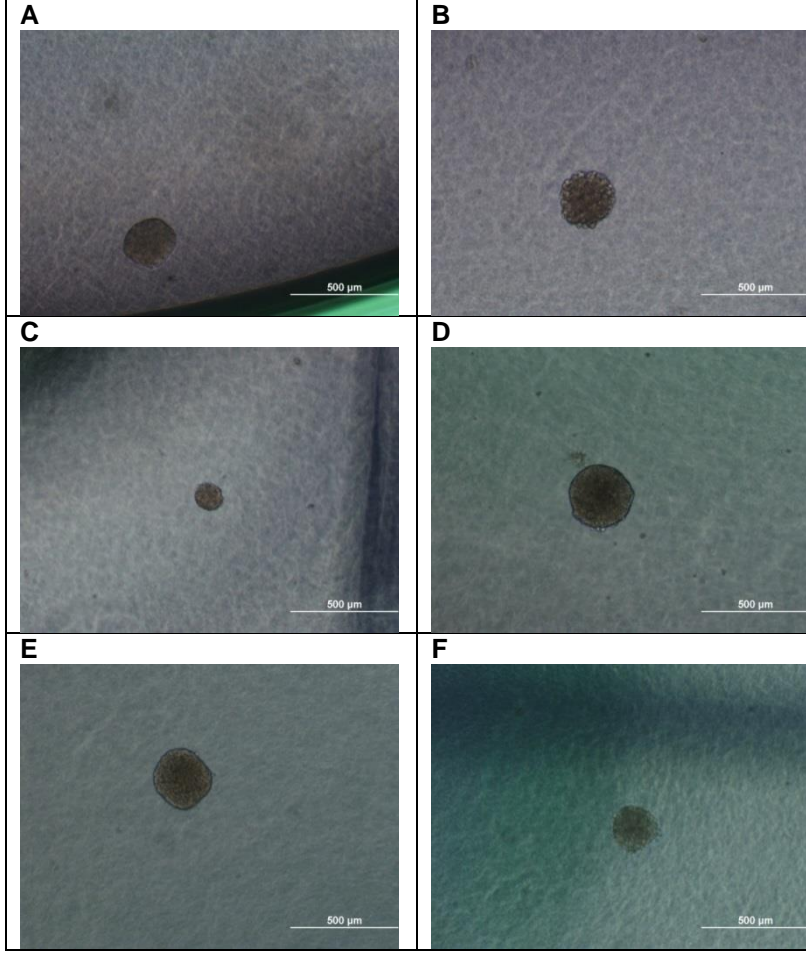


Şekil 3.41. Sferoid oluşumu. Kontrol, STIM1-OE, STIM1+Orai1-OE EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerde oluşan sferoidlerin µM ve mm cinsinden ölçülmüş çapları. (Kontrol ve STIM1+Orai1 OE, student *t* testi, eşleştirilmemiş veriler, **p*<0,05, n=12)

Kontrole göre STIM1-OE hücrelerde anlamlı olmayan bir azalma, STIM1+Orai1-OE hücrelerde sferoid çapında anlamlı bir azalma gözlenmesine karşın söz konusu deneysel kısıtlama nedeniyle yorumlanamamıştır.

3.12 Yumuşak Agarda Koloni Oluşturma

Kontrol, STIM1 OE ve STIM1+Orai1 OE EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerin yumuşak agarda koloni oluşturma özellikleri incelendi.

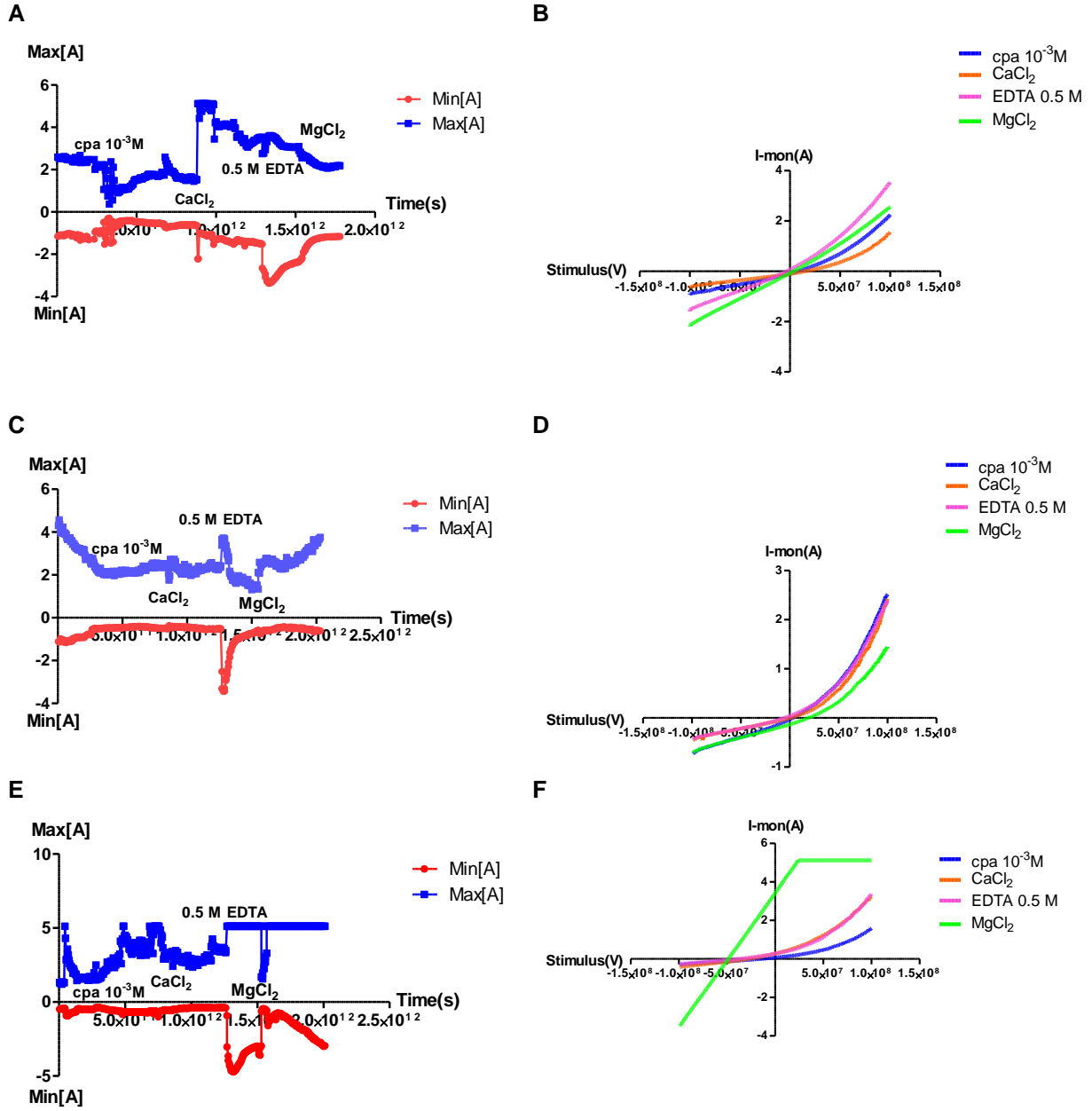


Şekil 3.42. Koloni oluşturma. Kontrol (A ve B), STIM1-OE (C ve D) ve STIM1+Orai1-OE (E ve F) EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerde yumuşak agarda koloni oluşturma 21.gün görüntüleri (10x büyütme, Olympus IX71)

Deneysel kısıtlama: Yukarıda 3.11 bölümünde süre ile ilgili benzer durumla ilişkili olarak hücrelerin yumuşak agarda koloni oluşturma özelliğinin incelenmesi 21 gün sürmektedir. Hücrelerin TIC özelliği göstermesini sağlayan hücre yüzey antijenleri EpCAM ve CD133 ifade eden hücre sayısının beş gün sonra dramatik olarak azalması yumuşak agarda koloni oluşturma çalışmalarında sağlıklı veri oluşturma kapsamında kısıtlayıcı olmuştur. Kritik sürenin on yedi aşılmasına karşın yapılan deneylerde tekrarlanabilirliğin çok düşük oluşu nedeniyle çalışmalara devam edilmemiştir.

3.13 Elektrofizyoloji (Patch Clamp)

Kontrol, STIM1 OE ve STIM1-Orai1 OE EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerde 500 “sweep”ten oluşan TRP rampa protokolünde CPA, CaCl₂, EDTA ve MgCl₂ varlığında -100mV --- +100 mV arası akımda olan değişiklikler zamana karşı (Şekil 3.43) ve voltaja karşı izlendi.



Şekil 3.43. Elektrofizyoloji kayıtları. Kontrol (A ve B), STIM1-OE (C ve D) ve STIM1-Orai1-OE (E ve F) EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerde TRP rampa protokolündeki akıma karşı zaman (A, C, E) ve IV akıma karşı voltaj grafikleri (B, D, F). Rampa protokolü sırasında CPA, CaCl₂, EDTA ve MgCl₂ varlığındaki değişimler izlenmiştir.

Deneysel kısıtlama: Çipe pipet ile 5 µl (yaklaşık 12500 hücre) uygulandığında otomatik vakum sistemi rastlantısal olarak bir hücreyi seçerek çipte bulunan mikro deliğe sabitlemektedir. Ancak bu durumda iki belirsizlik ölçme doğruluğunu olumsuz yönde etkilemektedir. Rastlantısal seçilen hücrenin ilgili plazmidi taşıyıp taşımadığı ve de TIC olup olmadığı bilinmemektedir. Adapte etmek istediğimiz görüntüleme sistemini kurma girişimlerimiz çiplerin tek kullanımlık oluşu ve gerekli yazılım/donanımın yüksek maliyeti nedeniyle bu proje kapsamında gerçekleştirilememiştir.

4 TARTIŞMA

TRPC1, STIM1 ve Orai1 proteinlerinin SOCE'nin temel bileşeni ve/veya düzenleyicisi olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (AMBUDKAR, 2007; DIETRICH, 2014). COS (Yeşil Afrika Maymunu '*Cercopithecus aethiops*' böbrek hücresi) ve CHO (Chinese Hamster Ovary) hücrelerinde TRPC1'in ifadesinin agonist-aracılı Ca^{+2} girişini uyardığı gösterilmiştir. Dr. Ambudkar tarafından insan submandibular tükürük hücrelerinde yapılan bir çalışmada TRPC1'in ifade edilmesi SERCA blokörü thapsigargin (TG)-aracılı Ca^{+2} girişinde artışa neden olurken (çalışmamızda tanımlanan ER Ca^{2+} saliverilişi), TRPC1 susturulması, zıt olarak, Ca^{+2} girişini azaltmaktadır (ZHU, 1996; ZITT, 1996; LIU, 2000; LIU, 2003; SALIDO, 2009). Embriyonik sıçan vasküler düz kas hücre hattında (A7r5), post-transkripsiyonel gen susturma (PTGS) insan primer damar düz kas hücreleri ve parental Huh7 HCC hücrelerinde SOCE ile ilişkili olduğu gösterilen TRPC1 gen ekspresyonunun baskılandığı önceki çalışmalarımızda beklenenin aksine SOCE'deki artış TRPC1 proteininin SOCE'de negatif düzenleyici/inhibitör olarak işlev gösterebileceğini düşündürmüştür (SELLI, 2015). TRPC1'in PTGS aracılı baskılanması sonucunda Ca^{+2} girişinde dramatik artış meydana gelmesi SOCE'nin Ca^{+2} homeostazının sağlanmasında önemli bir işlevi olduğunu göstermiştir (SELLI, 2009; ERAC, 2010; SELLI, 2015).

Bu çalışmada, önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bulgulardan yola çıkarak Huh7 HCC hücrelerinden tümör başlatma (Tumor-Initiating) özelliği taşıdığı düşünülen EpCAM ve CD133 hücre yüzey antijenine sahip hücreler (EpCAM⁺CD133⁺ veya Tumor-Initiating Cells, TIC) akış sitometrisi ile seçilmiş hücre içi Ca^{+2} homeostazının sağlanmasında önemli işlevi olduğu bilinen SOCE ve bileşenlerinin (STIM1 ve Orai1) (YANG, 2013) hücreleri üzerine olan etkileri;

- hücre içi Ca^{+2} dinamikleri (ER Ca^{+2} saliveriliş ve depo kontrollü Ca^{+2} girişi)
- ilaç direnci (MDR1 gen ekspresyonu),
- epitelyal-mezenkimal geçiş (epitelyal ve mezenkimal belirteç ekspresyonu)
- migrasyon/invazyon
- proliferasyon
- tüm genom gen ifade kalıbı (transkriptom) ve
- tüm genom miRNA dizileme (miRnom) kapsamında incelenmiştir.

Yukarıda belirtilen işlevsel bulguların, analizi devam etmekte olan mikrodizin ve miRNA dizileme aracılığıyla elde edilen verilerle genomik düzeyde incelenmesi kanserleşme

sürecinde kritik önemli olan sinyal yollarının ve tedavi hedeflerinin belirlenmesine katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

Bulgularımıza göre ifade ettikleri iki yüzey antijeni ile parental HCC hücre hatlarından ayrıştırılan EpCAM⁺CD133⁺ ve EpCAM⁻CD133⁻ hücrelerin, hücre içi Ca⁺² konsantrasyon değişimlerinin izlendiği deneylerde EpCAM⁺CD133⁺ hücrelerde ER saliverilişinde anlamlı bir artış gözlenirken, SOCE'de anlamlı olmayan bir artış belirlenmiştir. Hücre içi sitozolik ve mitokondriyal Ca⁺² konsantrasyonundaki artışın hücrelerin apoptoza yönelmesine neden olduğu bilinmektedir (RIZZUTO, 2003; PINTON, 2008; GIORGI, 2012). TIC'lerin göğüs kanserinde CD44 ve CD133, pankreas kanserinde CD24, CD44, ESA ve gibi hücre yüzey antijenlerini taşıyan hücrelerin apoptoza karşı dirençli oldukları belirtilmiştir (BAO, 2013; FULDA, 2013; SAFA, 2016). TIC'lerin apoptozdan kaçmak amacıyla sitozolde bulunan Ca⁺²'yi daha çok ER'da tutması ER saliverilişinde de artış meydana getirmiş olabilir.

STIM1 ve Orai1 proteinlerin ifadelerinde meydana gelen yer ve zamana bağlı değişimler tümörigenez sürecinde kanser hücrelerinin çoğalması (proliferasyon), migrasyon ve apoptoz direncinin oluşturulması gibi birçok basamakta yer almaktadır (WEN, 2016). Meme kanseri (MOTIANI, 2010), prostat kanseri (BOUTIN, 2015), glioblastoma (MOTIANI, 2013) ve HCC (YANG, 2013) gibi birçok kanser türünde SOCE'nin iki önemli bileşeni STIM1 ve Orai1 ifadelerinin arttığı gösterilmiştir (WEN, 2016). HCC'de özellikle STIM1'in daha fazla ifade edildiği belirlenmiştir (YANG, 2013; JARDIN, 2015). Bu bulgu, HCC'de STIM1'in prognostik bir belirteç olarak olarak kullanılabileceği önerisinin ileri sürülmesine neden olmuştur (JARDIN, 2015). Ancak, söz konusu STIM1 ve Orai1 artışının gösterildiği çalışmalar heterojen tümör popülasyonunda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda ise, heterojen Huh7 HCC hücre popülasyonu içerisinde seçilen, tümör başlatma özelliği olduğu bildirilen TIC'lerde STIM1 ve Orai1 proteinlerinin işlevini araştırmak amacıyla bu proteinlerin ifadeleri viral (CMV) promotörü taşıyan plazmid vektör uygulanarak artırılmıştır (overexpression, OE). Kanserde gözlenen koşullara benzer şekilde STIM1 ve Orai1 OE durumunda, hücre içi Ca⁺² konsantrasyonundaki değişimler izlenmiştir.

Gerçekleştirilen farklı çalışmalarda, tek başına Orai1-OE, SOCE'de azalmaya neden olurken, tek başına STIM1-OE'de herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır. Buna karşın, STIM1+Orai1-OE koşulunda SOCE'de dramatik bir artış gözlenmiştir (CHENG, 2011). Bu durum STIM1 ve Orai1'in SOCE'yi oluşturmak için 1:1 sitokiyometrik oranda ifade edildiklerini düşündürmüştür.

TIC'lerde STIM1-OE koşulunda ER saliverilişi ve SOCE'de anlamlı olmayan bir artış belirlenmiştir. ER Ca⁺² içeriğinin bir sensörü olarak görev yapan STIM1 miktarındaki artış ER

Ca²⁺ salıverilişindeki artış ile ilişkili olabilir. Buna karşılık, Orai1 OE TIC'lerde ER salıverilişi ve SOCE'de belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Hücre membranında yer alan Orai1 artışının ER salıverilişi üzerine belirgin bir etki oluşturmaması beklenen bir sonuç olmakla beraber Orai1-OE sonrasında SOCE'de artış beklentisinin aksine istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gözlenmiştir. HEK293 hücrelerinde Orai1 proteininin aşırı ifade edildiği koşullarda gerçekleştirilen bir çalışmada da benzer şekilde SOCE'de azalma gözlenmiştir (LIAO, 2008). Bu durum Dr. Soboloff ve ark. tarafından fazla miktarda olan Orai1 kanal proteinleri ile etkileşecek yeterli miktarda sensör STIM1 proteininin bulunmaması ile açıklanmıştır (PUTNEY, 2004; SOBOLOFF, 2006; SOBOLOFF, 2006).

Prostat kanser hücre hattı DU145, HEK (Human embryonic kidney) ve RBL (Rat Basophilic Leukemia) hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmalarda en fazla SOCE artışı, STIM1 ve Orai1 proteinlerinin birlikte aşırı eksprese edildiği koşulda gösterilmiştir (SOBOLOFF, 2006; LIAO, 2008; GIACHINI, 2011; XU, 2015). Bu sonuçlar, SOCE için STIM1 ve Orai1 proteinleri arasındaki etkileşimde sitokiyometrik bir oran olması gerektiği görüşünü desteklemektedir (SOBOLOFF, 2006). Çalışmamızda STIM1+Orai1 OE TIC'lerde ER salıverilişinde belirgin bir değişiklik gözlenmezken, SOCE'de istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmesi bu durumu desteklemektedir.

Kanser hücreleri uygulanan tedavilere karşı geliştirdikleri ilaç direncininin, ilaç hedeflerinin değiştirilmesi, ilacın inaktivasyonu, DNA hasar onarımı, apoptozdan kaçma, hücreden ilacın atılımı, EMT ve heterojen tümör popülasyonunda yer alan "kanser kök hücreleri" gibi faktörden bir ya da birkaçı aracılığı ile gerçekleştiğini göstermektedir (HOUSMAN, 2014). Çalışmamızda yukarıda belirtilen ilaç direncine karşı gösterilen davranışlardan ilaç atılımı ile ilgili olan ABC (*ATP-binding cassette*) transportör ailesi proteinlerinden olan MDR1 geni ürünü (*P-glikoprotein*) (GOTTESMAN, 2015) mRNA ifade düzeyleri incelenmiştir.

Kemoterapinin başarısızlık nedenlerinden biri olduğu düşünülen kanser hücrelerinin ilaç atılımındaki artış davranışının, ABC transportör aile üyesi olan ilaç atılım pompa proteinlerinin ekspresyonundaki artıştan kaynaklandığı belirtilmiştir (FLETCHER, 2010). Tümör popülasyonunda bulunan kanser kök hücreler benzer şekilde hücre içine alınan kemoterapötik ajan miktarını, ilaç atılımındaki artış ile en aza indirgemektedir (HOUSMAN, 2014). Çalışmamızda TIC'lerde *MDR1* geninin transkripsiyonunun EpCAM⁺CD133 hücrelerdekenden fazla oluşu, TIC'lerin ilaç atılımı açısından kanser kök hücreleri ile benzerliğini vurgulamaktadır. Akciğer kanseri (WANG, 2010), gliyoblastoma (JIN, 2009), osteosarkoma (ADHIKARI, 2010), ovaryum kanseri (HU, 2010) kanser kök hücrelerinde MDR1 ifadesinde artış bildirilmiştir (ZHAO, 2015). Bununla birlikte TIC'lerde STIM1-OE,

Orai1-OE ve STIM1+Orai1-OE koşullarında *MDR1* geninin mRNA düzeyinde anlamlı artış gösterdiği saptanmıştır. Üç koşul arasında en fazla artış STIM1+Orai1-OE hücrelerde görülmesi SOCE'deki sitokiyometrik oran ilişkisinin önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

Doksorubisin ve doksorubisin+verapamil varlığında STIM1-OE ve STIM1+Orai1-OE hücrelerde değerlendirilen ilaç atımı çalışmalarında hücreden doksorubisin'in atılımının en fazla STIM1+Orai1 OE hücrelerde olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, *MDR1* geninin mRNA düzeyinde ekspresyonunu değerlendirdiğimiz STIM1+Orai1 OE hücrelerde en fazla olması ilaç atımının bu hücrelerde fazla olmasını desteklemektedir.

Tümör hücresinin ilaca karşı direnç geliştirmesinde katkısı bulunduğu düşünülen sinyal yollarının (JAK/STAT, PI3K/AKT, MAPK/ERK gibi) üst kısmında yer alan Erk, AKT ve STAT3 proteinlerinin fosforilasyonunun Ca^{+2} bağımlı kinaz (Calcium/calmodulin dependent protein kinase II, CaMKII) tarafından gerçekleştirilmesi (WEN, 2016) Ca^{+2} ve ilaç direnç mekanizmaları arasında bir ilişki olduğu görüşünü kuvvetlendirmektedir. Bu bakımdan *MDR1* mRNA ekspresyonunda en fazla anlamlı artışın gözleendiği STIM1+Orai1 OE hücrelerde ilaç direncinin diğer faktörleri (HOUSMAN, 2014) değerlendirilerek Ca^{+2} ve ilaç direnç mekanizması arasındaki ilişkinin aydınlatılması ile yeni tedavi hedeflerinin oluşturulması sağlanabilir.

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), hücrelerin hücreler arası bağlantılardan kurtularak epitelyal özelliklerini azaltması, durağan oldukları bir aşamadan mezenkimal özelliklerini artırarak hareketli oldukları bir aşamaya geçiş sürecinden oluşmaktadır. Bu sayede kanser hücreleri buldukları bölgeden başka bölgelere metastaz yapabilmektedirler. EMT çalışmalarında epitelyal belirteç olarak *E-cadherin*, mezenkimal belirteç olarak *N-cadherin*, *vimentin* sıklıkla kullanılmaktadır (GIANNELLI, 2016). Çalışmamızda STIM1-OE ve STIM1+Orai1-OE TIC'lerde *E-cadherin*, *N-cadherin*, *vimentin* mRNA ifade düzeylerindeki değişim incelenmiştir. STIM1-OE ve STIM1+Orai1 OE hücrelerde epitelyal belirteç olan *E-cadherin* mRNA ifade düzeyinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Mezenkimal belirteç olan *N-cadherin* ve *vimentin* ifadesinde STIM1-OE hücrelerde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, STIM1+Orai1-OE hücrelerde anlamlı olmayan bir artış belirlenmiştir. Epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin birlikte ifade edilmesi parsiyel ya da "kısmi EMT" olarak adlandırılmaktadır (GIANNELLI, 2016). Elde edilen sonuçlara göre, STIM1+Orai1 OE hücrelerde hem epitelyal hem de mezenkimal belirteçlerin ifadesinin gözlenmesi bu hücrelerin 'kısmi EMT' evresinde olabileceklerini düşündürmektedir.

STIM1+Orai1-OE TIC'lerin kısmi EMT davranışı Dr. Robert Schreiber'in teorisi olan kanserdeki 3E (1-*Elimination*, 2-*Equilibrium*, 3-*Escape*) kuralındaki 2. aşama olan denge ile

özdeştirilmiş olup EMT-MET geçişini mikroçevredeki koşullar doğrultusunda şekillendirerek EMT ya da MET davranışına kaydırabileceği şeklinde yorumlanmıştır (DUNN, 2004). Aşırı ekspresyon vektör uygulamalarımızın TIC'lerde bağışık yanıt sisteminde antijen oluşumu ve sunumu yolağında HLA baskılayıcı miR-3653 ve miR-5001'in artması bu hipotezimizi desteklemektedir.

Daha önce, heterojen Huh7 hücrelerinde gerçekleştirilen çalışmalarımızda TRPC1'in susturulmasının SOCE'de dramatik artışa yol açtığı gözlenmesi TRPC1'in SOCE'nin negatif düzenleyicisi olduğunu düşündürmüştü (SELLI, 2015). Sunulan çalışmamızda, TIC'lerde TRPC1 transkripsiyonunda anlamlı bir artış belirlenmiştir. EMT ve MET arasındaki dengenin TRPC1 aracılığıyla sağlandığı speküle edilebilir. STIM1+Orai1 OE TIC'ler TRPC1 ekspresyonunda artış ya da azalma ile SOCE-aracılı hücre içine Ca^{+2} girişinin düzenlenmesi EMT-MET geçişindeki işlevsel yolları dengeleyerek kanserin bağışık yanıt yapılması (Cancer immunoediting)'nda bir işlevsel süreç olabilir.

Kanser hücrelerinin buldukları bölgeden ayrılarak ulaştıkları bölgede yerleşim göstermeleri metastazın iki önemli aşaması migrasyon (göç etme) ve invazyon (istila etme) aracılığıyla gerçekleşmektedir (BOZZUTO, 2010; YANG, 2013). SOCE'nin kanserde migrasyonu desteklediği mide kanseri (LIU, 2015), kolorektal kanser (WANG, 2015), melanoma (UMEMURA, 2014), servikal kanser (CHEN, 2011) ve hepatoselüler karsinomada (YANG, 2013) gösterilmiştir (JARDIN, 2015; XU, 2015). SOCE'nin invazyon mekanizmasındaki işlevi ekstraselüler alandan hücre içine Ca^{+2} girişini sağlayarak bu mekanizmada yer alan Ca^{+2} bağımlı kalpain, fokal adhezyon kinaz ve Rac (Rho ailesinden küçük GTPaz) gibi moleküllerin aktivasyonunu ve migrasyondan sorumlu olan fokal adhezyonların yapım ve yıkım sürecinde yer alması olabilir (CHEN, 2016).

HCC ve servikal kanserde SOCE'nin indüklendiği koşullarda fokal adhezyon döngü (*turnover*) hızındaki artış kanser hücrelerinin migrasyonunu hızlandırırken, SOCE inhibisyonunun daha geniş fokal adhezyonların oluşumu, döngü hızında azalma ve hücre adhezyonunda artışa yol açtığı gösterilmiştir (YANG, 2013; ZHU, 2014). STIM1 OE ve STIM1+Orai1-OE TIC'lerin invazyon davranışlarını incelediğimiz çalışmalarımızın sonuçlarına göre insertten geçen hücre sayısının STIM1+Orai1-OE hücrelerde daha fazla olduğu belirlenmiştir. STIM1:Orai1 proteinleri arasındaki kenetlenme için gerekli olan sitokiyometrinin SOCE açısından önemli olması yukarıda bahsedilen SOCE ve invazyon ilişkisini desteklemektedir. Çalışmamızda da, SOCE'nin daha fazla gözlendiği koşul olan STIM1+Orai1-OE hücrelerde invazyonda insertten geçen hücre sayısında artış saptanmıştır.

Bu durum, hücrelerin ortamda bulunan kalsiyumu kullanarak fokal adhezyon yapım ve yıkım hızını arttırması ve dolayısıyla invazyon kapasitelerini arttırmalarıyla açıklanabilir.

Tümör başlatma özelliğine sahip olduğu düşünölen “kansere kök hücreleri” yani TIC’ler tümör hücrelerine oranla genellikle yavaş büyüme hızına sahiptir (MOORE, 2011; TAKEBE, 2015). Çalışmamızda Huh7 TIC’lerin proliferasyonunun EpCAM⁺CD133⁻ Huh7 hücrelerine oranla daha yavaş olması bu görüşü desteklemektedir.

Huh7 TIC’lerin düşük proliferasyon hızına sahip oluşu, proliferasyon hızlarını baskılamak ve apoptozdan kaçmak için hücre içi Ca⁺² iyonlarını ER’de tuttuğunu düşündürmektedir. TIC’lerin proliferasyon hızlarının EpCAM⁺CD133⁻lere oranla belirgin olarak yavaş oluşu hücre içi bazal Ca⁺² konsantrasyonlarının düşük olmasından da kaynaklanabilir. Bu durum bazal Ca⁺² düzeylerinin belirlenmesi ile doğrulanabilir. Ancak, kullandığımız hücre içi Ca⁺² indikatörü boya olan Fura-2’nin mikroçevreye bağlı olarak Ca⁺² afinitesinin değişmesi mutlak Ca⁺² konsantrasyonlarının belirlenmesi yerine sadece zamana bağlı orantısal değişimleri izlememize olanak vermiştir.

Mikrodizin çalışmalarında (transkriptom) ve miRNA dizileme (miRNom) çalışmalarında proliferasyon, migrasyon, invazyon, ilaç direnci ile ilişkili olan miRNA’ların ekspresyonunda değişiklikler saptanmış olup halka açık veri bankalarındaki insan örnekleri ile karşılaştırılmıştır. Kat değişimi belirgin olan bazı mRNA ve miRNA’ların dışındakiler tanı kiti tasarımı amaçlı doğrulama çalışmalarının devam etmesi nedeniyle sonuç raporunda verilmemiştir.

5 SONUÇ

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda malignite durumlarında kalsiyumun önemi ve her hücrenin kendine özgü bir Ca^{+2} "kodu" olduğu tartışılmaktadır. Malignite durumlarında Ca^{+2} homeostazının düzenlenmesinde oluşan değişiklikler (ki uyarılmayan hücrelerde hücre içi Ca^{+2} düzenlenmesi başlıca SOCE tarafından sağlanmaktadır) sıklıkla karşılaşılan durumlar olması nedeniyle bulgularımız bu sürecin aydınlatılmasına katkıda bulunabilir.

Çalışmalarımız SOCE aracılığı ile gerçekleşen hücre içi Ca^{+2} homeostazının HCC hücre hattında tümör başlatma özelliği taşıdığı düşünülen TIC'lerin yoğun bulunduğu popülasyonda, kanserleşme sürecinde proliferasyon, çoklu ilaç direnci, EMT gibi işlevlerin gerçekleştirilmesinde işlevsel olduğunu göstermektedir. SOCE'nin bileşeni olan STIM1 ve Orai1 moleküllerinin malignite durumlarındaki ifade değişiklikleri bu moleküllerin kanser tanısında belirteç olma potansiyeli taşıdıklarını düşündürmektedir. SOCE bileşenlerinin ve ilişkili miRNA'ların hedeflenmesi ile spesifik antikanser tedavi stratejileri geliştirilebilir.

Kaynaklar

- "Gene chip used in transcriptome analysis. " Retrieved 4 May, 2017, from www.illumina.com.
- Adhikari A. S., Agarwal N., Wood B. M., Porretta C., Ruiz B., Pochampally R. R., Iwakuma T., 2010. "CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance", *Cancer Research*, 70, 11, 4602-4612.
- Ambudkar I. S., 2007. "TRPC1: a core component of store-operated calcium channels", *Biochem Soc Trans*, 35, Pt 1, 96-100.
- Bao B., Ahmad A., Azmi A. S., Ali S., Sarkar F. H., 2013. "Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy", *Current Protocols in Pharmacology*, Chapter 14, Unit 14 25.
- Behne T., Copur M. S., 2012. "Biomarkers for hepatocellular carcinoma", *International Journal of Hepatology*, 2012, 859076.
- Bergmeier W., Weidinger C., Zee I., Feske S., 2013. "Emerging roles of store-operated Ca(2)(+) entry through STIM and Orai proteins in immunity, hemostasis and cancer", *Channels (Austin)*, 7, 5, 379-391.
- Berridge M. J., Bootman M. D., Lipp P., 1998. "Calcium - a life and death signal", *Nature*, 395, 6703, 645-648.
- Bird G. S., DeHaven W. I., Smyth J. T., Putney J. W., Jr., 2008. "Methods for studying store-operated calcium entry", *Methods*, 46, 3, 204-212.
- Bootman M. D., 2012. "Calcium Signaling", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, 7,
- Boutin B., Tajeddine N., Monaco G., Molgo J., Vertommen D., Rider M., Parys J. B., Bultynck G., Gailly P., 2015. "Endoplasmic reticulum Ca(2+) content decrease by PKA-dependent hyperphosphorylation of type 1 IP3 receptor contributes to prostate cancer cell resistance to androgen deprivation", *Cell Calcium*, 57, 4, 312-320.
- Bozzuto G., Ruggieri P., Molinari A., 2010. "Molecular aspects of tumor cell migration and invasion", *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 46, 1, 66-80.
- Bravo R., Gutierrez T., Paredes F., Gatica D., Rodriguez A. E., Pedrozo Z., Chiong M., Parra V., Quest A. F., Rothermel B. A., Lavandero S., 2012. "Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics", *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44, 1, 16-20.

- Bronner F., 2001. "Extracellular and Intracellular Regulation of Calcium Homeostasis", *The Scientific World*, 1, 919–925.
- Callegari E., Domenicali M., Gramantieri L., Negrini M., Sabbioni S., 2015. "Emerging role of microRNAs in the treatment of hepatocellular carcinoma", *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy*, 5 89–102.
- Chen Y. F., Chiu W. T., Chen Y. T., Lin P. Y., Huang H. J., Chou C. Y., Chang H. C., Tang M. J., Shen M. R., 2011. "Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 37, 15225-15230.
- Chen Y. F., Hsu K. F., Shen M. R., 2016. "The store-operated Ca(2+) entry-mediated signaling is important for cancer spread", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863, 6 Pt B, 1427-1435.
- Chen Y. W., Chen Y. F., Chen Y. T., Chiu W. T., Shen M. R., 2016. "The STIM1-Orai1 pathway of store-operated Ca(2+) entry controls the checkpoint in cell cycle G1/S transition", *Scientific Reports*, 6, 22142.
- Cheng K. T., Ong H. L., Liu X., Ambudkar I. S., 2011. "Contribution of TRPC1 and Orai1 to Ca(2+) entry activated by store depletion", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 704, 435-449.
- Cheng K. T., Ong H. L., Liu X., Ambudkar I. S., 2013. "Contribution and regulation of TRPC channels in store-operated Ca²⁺ entry", *Current Topics in Membranes*, 71, 149-179.
- Chiba T., Iwama A., Yokosuka O., 2016. "Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Therapeutic implications based on stem cell biology", *Hepatology Research*, 46, 1, 50-57.
- Clapham D. E., 2007. "Calcium signaling", *Cell*, 131, 6, 1047-1058.
- D'Anzeo M., Faloppi L., Scartozzi M., Giampieri R., Bianconi M., Del Prete M., Silvestris N., Cascinu S., 2014. "The role of Micro-RNAs in Hepatocellular Carcinoma: From Molecular Biology to Treatment", *Molecules*, 19, 5, 6393-6406.
- DeHaven W. I., Jones B. F., Petranka J. G., Smyth J. T., Tomita T., Bird G. S., Putney J. W., 2009. "TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1", *Journal of Physiology-London*, 587, 10, 2275-2298.
- Dietrich A., Fahlbusch M., Gudermann T., 2014. "Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator?", *Cells*, 3, 4, 939-962.

- Dunn G. P., Old L. J., Schreiber R. D., 2004. "The three Es of cancer immunoediting", *Annual Review of Immunology*, 22, 329-360.
- Erac Y., Selli C., Kosova B., Akcali K. C., Tosun M., 2010. "Expression levels of TRPC1 and TRPC6 ion channels are reciprocally altered in aging rat aorta: implications for age-related vasospastic disorders", *Age (Dordr)*, 32, 2, 223-230.
- Feske S., 2007. "Calcium signalling in lymphocyte activation and disease", *Nature Reviews Immunology*, 7, 9, 690-702.
- Fletcher J. I., Haber M., Henderson M. J., Norris M. D., 2010. "ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps", *Nature Reviews Cancer*, 10, 2, 147-156.
- Fulda S., 2013. "Regulation of apoptosis pathways in cancer stem cells", *Cancer Letters*, 338, 1, 168-173.
- Gees M., Colsool B., Nilius B., 2010. "The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca²⁺ Signaling", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, 10,
- Giachini F. R., Lima V. V., Hannan J. L., Carneiro F. S., Webb R. C., Tostes R. C., 2011. "STIM1/Orai1-mediated store-operated Ca²⁺ entry: the tip of the iceberg", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44, 11, 1080-1087.
- Giannelli G., Koudelkova P., Dituri F., Mikulits W., 2016. "Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma", *Journal of Hepatology*, 65, 4, 798-808.
- Giordano S., Columbano A., 2013. "MicroRNAs: New Tools for Diagnosis, Prognosis, and Therapy in Hepatocellular Carcinoma?", *Hepatology*, 57, 2, 840-847.
- Giorgi C., Baldassari F., Bononi A., Bonora M., De Marchi E., Marchi S., Missiroli S., Patergnani S., Rimessi A., Suski J. M., Wieckowski M. R., Pinton P., 2012. "Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis", *Cell Calcium*, 52, 1, 36-43.
- Gommans I. M., Vlak M. H., de Haan A., van Engelen B. G., 2002. "Calcium regulation and muscle disease", *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 23, 1, 59-63.
- Gottesman M. M., Pastan I. H., 2015. "The Role of Multidrug Resistance Efflux Pumps in Cancer: Revisiting a JNCI Publication Exploring Expression of the MDR1 (P-glycoprotein) Gene", *Journal of the National Cancer Institute*, 107(9): djv222.
- Guo Z., Li L. Q., Jiang J. H., Ou C., Zeng L. X., Xiang B. D., 2014. "Cancer stem cell markers correlate with early recurrence and survival in hepatocellular carcinoma", *World Journal of Gastroenterology*, 20, 8, 2098-2106.

- Hoffmann K., Franz C., Xiao Z., Mohr E., Serba S., Buchler M. W., Schemmer P., 2010. "Sorafenib Modulates the Gene Expression of Multi-drug Resistance Mediating ATP-Binding Cassette Proteins in Experimental Hepatocellular Carcinoma", *Anticancer Research*, 30, 11, 4503-4508.
- Hooper R., Zaidi M. R., Soboloff J., 2016. "The heterogeneity of store-operated calcium entry in melanoma", *Science China-Life Sciences*, 59, 8, 764-769.
- Housman G., Byler S., Heerboth S., Lapinska K., Longacre M., Snyder N., Sarkar S., 2014. "Drug resistance in cancer: an overview", *Cancers (Basel)*, 6, 3, 1769-1792.
- Hu L., McArthur C., Jaffe R. B., 2010. "Ovarian cancer stem-like side-population cells are tumorigenic and chemoresistant", *British Journal of Cancer*, 102, 8, 1276-1283.
- Hung C. H., Chiu Y. C., Chen C. H., Hu T. H., 2014. "MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma: Carcinogenesis, Progression, and Therapeutic Target", *Biomed Research International*, 2014, Article ID 486407
- Jardin I., Rosado J. A., 2015. "STIM and calcium channel complexes in cancer", *Biochimica Biophysica Acta*,
- Ji J., Zheng X., Forgues M., Yamashita T., Wauthier E. L., Reid L. M., Wen X., Song Y., Wei J. S., Khan J., Thorgeirsson S. S., Wang X. W., 2015. "Identification of microRNAs specific for epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells in hepatocellular carcinoma", *Hepatology*, 62, 3, 829-840.
- Jin Y., Bin Z. Q., Qiang H., Liang C., Hua C., Jun D., Dong W. A., Qing L., 2009. "ABCG2 is related with the grade of glioma and resistance to mitoxantone, a chemotherapeutic drug for glioma", *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135, 10, 1369-1376.
- LaFerla F. M., 2002. "Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease", *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 11, 862-872.
- Lee T. K., Cheung V. C., Ng I. O., 2013. "Liver tumor-initiating cells as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma", *Cancer Letters*, 338, 1, 101-109.
- Liao Y., Erxleben C., Abramowitz J., Flockerzi V., Zhu M. X., Armstrong D. L., Birnbaumer L., 2008. "Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 8, 2895-2900.
- Liu B., Yu H. H., Ye H. L., Luo Z. Y., Xiao F., 2015. "Effects of stromal interacting molecule 1 gene silencing by short hairpin RNA on the biological behavior of human gastric cancer cells", *Molecular Medicine Reports*, 12, 2, 3047-3054.

- Liu R., Shen Y., Nan K. J., Mi B. B., Wu T., Guo J. Y., Li M. J., Lv Y., Guo H., 2015. "Association Between Expression of Cancer Stem Cell Markers and Poor Differentiation of Hepatocellular Carcinoma", *Medicine*, 94, 31,
- Liu X., Singh B. B., Ambudkar I. S., 2003. "TRPC1 is required for functional store-operated Ca²⁺ channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region", *Journal of Biological Chemistry*, 278, 13, 11337-11343.
- Liu X., Wang W., Singh B. B., Lockwich T., Jadlovec J., O'Connell B., Wellner R., Zhu M. X., Ambudkar I. S., 2000. "Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca(2+) influx mechanism in salivary gland cells", *Journal of Biological Chemistry*, 275, 5, 3403-3411.
- Lkhagvadorj S., Kim J. H., Oh S. S., Lee M. R., Jung J. H., Chung H. C., Cha S. K., Eom M., 2016. "Orai1 Expression Is Closely Related with Favorable Prognostic Factors in Clear Cell Renal Cell Carcinoma", *Journal of Korean Medical Science*, 31, 6, 879-885.
- McAndrew D., Grice D. M., Peters A. A., Davis F. M., Stewart T., Rice M., Smart C. E., Brown M. A., Kenny P. A., Roberts-Thomson S. J., Monteith G. R., 2011. "Orai1-Mediated Calcium Influx in Lactation and in Breast Cancer", *Molecular Cancer Therapeutics*, 10, 3, 448-460.
- Monteith G. R., McAndrew D., Faddy H. M., Roberts-Thomson S. J., 2007. "Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport", *Nature Reviews Cancer*, 7, 7, 519-530.
- Moore N., Lyle S., 2011. "Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance", *Journal of Oncology*, 2011,
- Morishita A., Masaki T., 2015. "miRNA in hepatocellular carcinoma", *Hepatology Res*, 45, 2, 128-141.
- Motiani R. K., Abdullaev I. F., Trebak M., 2010. "A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells", *Journal of Biological Chemistry*, 285, 25, 19173-19183.
- Motiani R. K., Hyzinski-Garcia M. C., Zhang X. X., Henkel M. M., Abdullaev I. F., Kuo Y. H., Matrougui K., Mongin A. A., Trebak M., 2013. "STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion", *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 465, 9, 1249-1260.
- Negahdary M., Eftekhari A., Mirzaei S., Mojganalsadat, Basirizadeh, Ghobadzadeh S., 2015 June. "Tumor Markers and Hepatocellular Carcinoma", *Journal of Biology and Today's World*, 4, 6, 124-131.

- Nilius B., Owsianik G., 2011. "The transient receptor potential family of ion channels", *Genome Biology*, 12, 3,
- Nishikawa H., Osaki Y., Kita R., Kimura T., 2012. "Hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma in Japan", *Cancers (Basel)*, 4, 1, 165-183.
- Parekh A. B., Putney J. W., 2005. "Store-operated calcium channels", *Physiological Reviews*, 85, 2, 757-810.
- Pinton P., Giorgi C., Siviero R., Zecchini E., Rizzuto R., 2008. "Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis", *Oncogene*, 27, 50, 6407-6418.
- Prevarskaya N., Ouadid-Ahidouch H., Skryma R., Shuba Y., 2014. "Remodelling of Ca²⁺ transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks?", *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 369, 1638, 20130097.
- Putney J. W., Jr., 2004. "The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels", *Trends in Cell Biology*, 14, 6, 282-286.
- Rizzuto R., Pinton P., Ferrari D., Chami M., Szabadkai G., Magalhaes P. J., Di Virgilio F., Pozzan T., 2003. "Calcium and apoptosis: facts and hypotheses", *Oncogene*, 22, 53, 8619-8627.
- Safa A. R., 2016. "Resistance to Cell Death and Its Modulation in Cancer Stem Cells", *Critical Reviews in Oncogenesis*, 21, 3-4, 203-219.
- Salido G. M., Sage S. O., Rosado J. A., 2009. "TRPC channels and store-operated Ca(2+) entry", *Biochimica Biophysica Acta*, 1793, 2, 223-230.
- Sarkadi B., Homolya L., Szakacs G., Varadi A., 2006. "Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system", *Physiological Reviews*, 86, 4, 1179-1236.
- Schwarz-Cruz-y-Celis Á., Meléndez-Zajgla J., 2011. "Cancer stem cells", *Revista de Investigación Clínica*, 63, 2, 179-186.
- Selli C., Erac Y., Kosova B., Erdal E. S., Tosun M., 2015. "Silencing of TRPC1 regulates store-operated calcium entry and proliferation in Huh7 hepatocellular carcinoma cells", *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 71, 194-200.
- Selli C., Erac Y., Kosova B., Tosun M., 2009. "Post-transcriptional silencing of TRPC1 ion channel gene by RNA interference upregulates TRPC6 expression and store-operated Ca²⁺ entry in A7r5 vascular smooth muscle cells", *Vascular Pharmacology*, 51, 2-3, 96-100.

- Shahriyari L., Komarova N. L., 2013. "Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer?", *PLoS One*, 8, 10, e76195.
- Soboloff J., Spassova M. A., Dziadek M. A., Gill D. L., 2006. "Calcium signals mediated by STIM and Orai proteins--a new paradigm in inter-organelle communication", *Biochimica Biophysica Acta*, 1763, 11, 1161-1168.
- Soboloff J., Spassova M. A., Tang X. D., Hewavitharana T., Xu W., Gill D. L., 2006. "Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function", *Journal of Biological Chemistry*, 281, 30, 20661-20665.
- Stewart T. A., Yapa K. T., Monteith G. R., 2015. "Altered calcium signaling in cancer cells", *Biochimica Biophysica Acta*, 1848, 10 Pt B, 2502-2511.
- Sugimachi K., Matsumura T., Hirata H., Uchi R., Ueda M., Ueo H., Shinden Y., Iguchi T., Eguchi H., Shirabe K., Ochiya T., Maehara Y., Mimori K., 2015. "Identification of a bona fide microRNA biomarker in serum exosomes that predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation", *British Journal of Cancer*, 112, 3, 532-538.
- Taheri M., Mahjoubi F., Omranipour R., 2010. "Effect of MDR1 polymorphism on multidrug resistance expression in breast cancer patients", *Genetics and Molecular Research*, 9, 1, 34-40.
- Takebe N., Miele L., Harris P. J., Jeong W., Bando H., Kahn M., Yang S. X., Ivy S. P., 2015. "Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update", *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12, 8, 445-464.
- Umemura M., Baljinnyam E., Feske S., De Lorenzo M. S., Xie L. H., Feng X., Oda K., Makino A., Fujita T., Yokoyama U., Iwatsubo M., Chen S., Goydos J. S., Ishikawa Y., Iwatsubo K., 2014. "Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) regulates melanoma proliferation and cell migration", *PLoS One*, 9, 2, e89292.
- Vazquez G., Wedel B. J., Aziz O., Trebak M., Putney J. W., Jr., 2004. "The mammalian TRPC cation channels", *Biochimica Biophysica Acta*, 1742, 1-3, 21-36.
- Venkatachalam K., Montell C., 2007. "TRP channels", *Annual Review of Biochemistry*, 76, 387-417.
- Wang B., Yang H., Huang Y. Z., Yan R. H., Liu F. J., Zhang J. N., 2010. "Biologic characteristics of the side population of human small cell lung cancer cell line H446", *Chinese Journal of Cancer*, 29, 3, 254-260.

- Wang J. Y., Sun J., Huang M. Y., Wang Y. S., Hou M. F., Sun Y., He H., Krishna N., Chiu S. J., Lin S., Yang S., Chang W. C., 2015. "STIM1 overexpression promotes colorectal cancer progression, cell motility and COX-2 expression", *Oncogene*, 34, 33, 4358-4367.
- Wang L., Yue Y., Wang X., Jin H., 2015. "Function and clinical potential of microRNAs in hepatocellular carcinoma", *Oncology Letters*, 10, 6, 3345-3353.
- Wen J., Huang Y. C., Xiu H. H., Shan Z. M., Xu K. Q., 2016. "Altered expression of stromal interaction molecule (STIM)-calcium release-activated calcium channel protein (ORAI) and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP3Rs) in cancer: will they become a new battlefield for oncotherapy?", *Chinese Journal of Cancer*, 35, 32.
- Wen L., Liang C., Chen E., Chen W., Liang F., Zhi X., Wei T., Xue F., Li G., Yang Q., Gong W., Feng X., Bai X., Liang T., 2016. "Regulation of Multi-drug Resistance in hepatocellular carcinoma cells is TRPC6/Calcium Dependent", *Scientific Reports*, 6, 23269.
- Wu Z. S., Qing J. J., Xia Y. X., Wang K., Zhang F., 2015. "Suppression of stromal interaction molecule 1 inhibits SMMC7721 hepatocellular carcinoma cell proliferation by inducing cell cycle arrest", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 62, 1, 107-111.
- Xia J. L., Wang H. Q., Huang H. X., Sun L., Dong S. T., Huang N., Shi M., Bin J. P., Liao Y. L., Liao W. J., 2016. "Elevated Orai1 and STIM1 expressions upregulate MACC1 expression to promote tumor cell proliferation, metabolism, migration, and invasion in human gastric cancer", *Cancer Letters*, 381, 1, 31-40.
- Xie J., Pan H., Yao J., Zhou Y., Han W., 2015. "SOCE and cancer: Recent progress and new perspectives", *International Journal of Cancer*,
- Xu Y., Zhang S., Niu H., Ye Y., Hu F., Chen S., Li X., Luo X., Jiang S., Liu Y., Chen Y., Li J., Xiang R., Li N., 2015. "STIM1 accelerates cell senescence in a remodeled microenvironment but enhances the epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer", *Scientific Reports*, 5, 11754.
- Yang N., Ekanem N. R., Sakyi C. A., Ray S. D., 2015. "Hepatocellular carcinoma and microRNA: new perspectives on therapeutics and diagnostics", *Advances in Drug Delivery Review*, 81, 62-74.
- Yang N., Tang Y., Wang F., Zhang H., Xu D., Shen Y., Sun S., Yang G., 2013. "Blockade of store-operated Ca(2+) entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover", *Cancer Letters*, 330, 2, 163-169.

- Yang S. Y., Zhang J. J. L., Huang X. Y., 2009. "Orai1 and STIM1 Are Critical for Breast Tumor Cell Migration and Metastasis", *Cancer Cell*, 15, 2, 124-134.
- Zhan Z. Y., Zhong L. X., Feng M., Wang J. F., Liu D. B., Xiong J. P., 2015. "Over-expression of Orai1 mediates cell proliferation and associates with poor prognosis in human non-small cell lung carcinoma", *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8, 5, 5080-5088.
- Zhao C. D. a. Y., 2015. "Multiple drug resistance due to resistance to stem cells and stem cell treatment progress in cancer", *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9, 289-293.
- Zhao Y. J., Ju Q., Li G. C., 2013. "Tumor markers for hepatocellular carcinoma", *Molecular and Clinical Oncology*, 1, 4, 593-598.
- Zhu M., Chen L., Zhao P. F., Zhou H., Zhang C., Yu S. P., Lin Y., Yang X. J., 2014. "Store-operated Ca²⁺ entry regulates glioma cell migration and invasion via modulation of Pyk2 phosphorylation", *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33(1): 98.
- Zhu X., Jiang M., Peyton M., Boulay G., Hurst R., Stefani E., Birnbaumer L., 1996. "trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry", *Cell*, 85, 5, 661-671.
- Zhu Z., Zhang X., Wang G., Zheng H., 2014. "Role of MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma", *Hepatitis Monthly*, 14, 8, e18672.
- Zitt C., Zobel A., Obukhov A. G., Harteneck C., Kalkbrenner F., Luckhoff A., Schultz G., 1996. "Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion", *Neuron*, 16, 6, 1189-1196.
- Zui P., JianJie M., 2015. "Open Sesame: treasure in store-operated calcium entry pathway for cancer therapy", *Science China Life Sciences*, 58, 1, 48-53.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. METİNER TOSUN
Proje No:	113S399
Proje Başlığı:	Huh-7 İnsan Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hatlarının Fenotipik Farklılaşmasında Depo-Kontrollü Kalsiyum Girişinin İşlevsel Genomik Analizi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	YASEMİN ERAÇ, BUKET KOSOVA, CAN KÜÇÜK
Danışmanlar:	ŞERİFE ESRA ERDAL, RALPH LEO JOHAN MEUWISSEN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR EKONOMİ Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/11/2013 - 01/05/2017
Onaylanan Bütçe:	484000.0
Harcanan Bütçe:	417845.9
Öz:	Depo-Kontrollü Ca+2 Girişi (Store-Operated Ca+2 Entry, SOCE) karaciğer kanseri (hepatocellular carcinoma, HCC) hücrelerinde de Ca+2 homeostazını düzenlediği bilinmektedir. Kanser tedavisi sonrasında tekrarlamasının tedavisi dirençli tümör başlatıcı hücrelerden (Tumor-initiating cells, TIC) kaynaklanması nedeniyle Huh7 HCC hücre hattında bulunan EpCAM/CD133 yüzey antijenleri taşıyan TIC?lerin fenotipik farklılaşmasında SOCE işlevinin aydınlatılması hedeflenmiştir. İşlevsel-genomik analizlerde SOCE üyelerinden STIM1 ve Orai1?in Ca+2 tamponlama ve hücre sağlığında işlevselliğinin görülmesi ilişkili miRNA?ların spesifik tanı/tedavi değeri olabileceğini düşündürmektedir.
Anahtar Kelimeler:	Huh7 HCC, RTCA, hücre içi kalsiyum, transkriptom, miRnom, mikroRNA, NGS, invazyon, MDR
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Effects of STIM1 and Orai1 proteins on the differentiation of hepatocellular cancer stem cell-like cells (Makale - İndeksli Makale), 2- Simultaneous measurement of cytosolic and mitochondrial calcium levels: Observations in TRPC1-silenced hepatocellular carcinoma cells (Makale - Diğer Hakemli Makale), 3- Role of Endoplasmic Reticulum in phenotypical differentiation of Huh7 Hepatocellular Carcinoma Cell Lines (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 4- Role of Endoplasmic Reticulum in phenotypical differentiation of Huh7 Hepatocellular Carcinoma Cell Lines (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 5- Ion Channels and Calcium Signaling Workshop (Yayımlı - Uluslararası - Düzenlenen Çalıştay), 6- Silencing of TRPC1 regulates store-operated calcium entry and proliferation in Huh7 hepatocellular carcinoma cells. (Makale - Diğer Hakemli Makale),