



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü



**METASTATİK PROSTAT KANSERİ GELİŞİMİNDE
ENFLAMASYON İLİŞKİLİ EPİTELİYAL
MEZENKİMAL GEÇİŞ MEKANİZMASININ
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Elif İŞEL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İZMİR

2024

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**METASTATİK PROSTAT KANSERİ GELİŞİMİNDE
ENFLAMASYON İLİŞKİLİ EPİTELYAL
MEZENKİMAL GEÇİŞ MEKANİZMASININ
ARAŞTIRILMASI**

Elif İŞEL

Danışman: Doç. Dr. Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER

Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

Biyoteknoloji Bölümü Doktora Programı

İzmir

2024

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Metastatik prostat kanseri gelişiminde enflamasyon ilişkili epitelyal mezenkimal geçiş mekanizmasının araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

29/ 08 / 2024

İmzası

Adı-Soyadı

Elif İŞEL

ÖZET

METASTATİK PROSTAT KANSERİ GELİŞİMİNDE ENFLAMASYON İLİŞKİLİ EPİTELYAL MEZENKİMAL GEÇİŞ MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

İŞEL, Elif

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER

Ağustos 2024, 210 sayfa

Bu tez çalışmasında, prostat hücreleri için kritik öneme sahip olan tümör baskılayıcı NKX3.1 proteininin, enflamatuvar mikroçevre koşullarında, prostat kanseri hücre hatlarında, EMT mekanizması üzerindeki moleküler etkisi incelenmiştir. Çalışmalarımızda LNCaP, PC-3 ve DU 145 hücreleri ile *in vitro* enflamatuvar mikroçevreyi temsil eden hücre kültürü modelleri tasarlanmıştır. Enflamasyon ilişkili NKX3.1 protein kaybı ve enflamatuvar ortamda EMT'nin indüklenmesinin hücre kültüründe temsil edilmesi amacıyla TNF- α , TGF- β 1 sitokin uygulamaları yapılmış, ayrıca hücrelere NKX3.1 ekspresyonu kazandırılarak EMT proteinlerinin seviyeleri ve hücre lokalizasyonlarının NKX3.1'e bağlı olarak farklılık gösterip göstermediği, hücrelerin anoikis direncine olan etkisi, migrasyona olan etkisi ve epitelyal-stromal etkileşimler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. LNCaP hücrelerinde NKX3.1 ekspresyonuna ve enflamasyona bağlı olarak hem transkripsiyon seviyesinde hem protein seviyesinde değişiklik gösteren EMT ilişkili genler, DU 145 hücrelerinde NKX3.1 ekspresyonuna ve enflamasyona bağlı değişen genler global transkriptom analizleri ile incelenmiştir. NKX3.1, normal prostatın sağkalımında gerekli olan ve embriyonezisinde kök hücre fonksiyonu gösteren, gelişimsel açıdan kritik öneme sahip bir gendir. EMT fenotipi ile kanser kök hücresi fenotipi özdeş özelliklere sahiptir. Ektopik NKX3.1 seviyesi kazandırılan prostat kanseri hücrelerinde, NKX3.1 ile EMT ilişkili proteinlerin seviyesindeki artış korelasyon göstermektedir. NKX3.1'in normal koşullarda ve düşük dozdaki enflamatuvar koşullarda tümör baskılayıcı rolü ile hücre canlılığı, anoikis direnci ve migrasyonu baskıladığı, daha yüksek dozdaki, uzun süreli enflamatuvar koşullarda mezenkim benzeri hücre morfolojisini desteklediği ve EMT proteinlerinin seviyesel artışında bir rolü olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Prostat kanseri, NKX3.1, enflamasyon, EMT, TNF- α , TGF- β 1



ABSTRACT**INVESTIGATION OF INFLAMMATION RELATED EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION MECHANISM IN METASTATIC PROSTATE CANCER PROGRESSION**

İŞEL, Elif

PhD in Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER

August 2024, 210 pages

In this thesis, the molecular effect of the tumor suppressor NKX3.1 protein, which is critical for prostate cells, on the EMT mechanism in prostate cancer cell lines under inflammatory microenvironmental conditions was examined. In our studies, cell culture models representing the *in vitro* inflammatory microenvironment were designed with LNCaP, PC-3 and DU 145 cells. In order to represent inflammation-related NKX3.1 protein loss and the induction of EMT in the inflammatory environment in cell culture, TNF- α /TGF- β 1 cytokine induction were performed, and NKX3.1 expression was introduced into the cells to determine whether the levels of EMT proteins and cell localizations differ depending on NKX3.1. Its effect on the anoikis resistance of cells, migration and epithelial-stromal interactions were investigated. EMT-related genes that changed at both transcription and protein levels due to NKX3.1 expression and inflammation in LNCaP cells, and genes that changed due to NKX3.1 expression and inflammation in DU 145 cells were examined by global transcriptome analysis. NKX3.1 is a developmentally critical gene that is required for normal prostate survival and functions in stem cell embryogenesis. The EMT phenotype and the cancer stem cell phenotype have identical characteristics. In prostate cancer cells having ectopic NKX3.1, there is a correlation between increased NKX3.1 and increased EMT-related proteins. In conclusion, NKX3.1 suppresses cell viability, anoikis resistance and migration due to its tumor suppressor role in normal conditions and low-dose inflammatory conditions however, supports mesenchyme-like cell morphology in higher-dose, long-term inflammatory conditions and has a role of increasing level of EMT proteins.

Key words: Prostate cancer, NKX3.1, inflammation, EMT, TNF- α , TGF- β 1



ÖNSÖZ

Bu çalışmada, metastatik prostat kanseri gelişiminde enflamasyon ilişkili epitelyal mezenkimal geçiş mekanizmasının moleküler temelleri araştırılmıştır.

Enflamasyonun doku hasarını artırdığı ve prostat kanseri gelişimine katkı sağladığı bilinmektedir. Enflamatuvar tümör mikroçevresinde çeşitli sitokinlerin etkisiyle, prostat kanseri hücrelerinin metastatik potansiyel kazanmasının, EMT mekanizması üzerinden tetiklenebileceği düşünülmektedir. EMT mekanizmasının TGF- β gibi enflamatuvar sitokinler üzerinden aktivasyonu, hücrelerin epitelyal fenotipten farklılaşarak mezenkimal fenotipe dönüşmelerini başlatan bir süreçtir. EMT fenotipine sahip hücrelerin, hücreler arası tutunma özellikleri, yüzey bağlantıları zayıflamakta ve hücreler hücre dışı matriksten ayrılarak invazyon yapma potansiyeli kazanmaktadırlar. Anoikis, birbirlerine ve bazal membrana tutunarak büyüyen hücrelerin, adeziv özelliği ortadan kalktığında apoptoz mekanizması üzerinden ölüme gittiği bir süreçtir. İnvazyon yapma potansiyeli kazanan ve mezenkim benzeri hücreler, anoikis direnci geliştirerek hayatta kalır ve uzak doku ve organlara metastaz yapma süreci başlar.

Prostat kanseri gelişiminde kritik öneme sahip olan, enflamatuvar ortamda hücre içinde parçalanan, tümör baskılayıcı protein NKX3.1'in, prostat kanseri hücrelerine geri kazandırılmasının hücre canlılığı, EMT ilişkili proteinler, hücrelerin anoikis direnci ve migrasyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Tez çalışmamın programlanmasında, araştırılmasında ve yürütülmesinde ilgi ve desteğini asla esirgemeyen, derin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmalarımı başından sonuna kadar bilim ışığı ile şekillendiren saygıdeğer hocam Doç. Dr. Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

29/08/2024

Adı-Soyadı

Elif İŞEL



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK	ii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	iv
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
ÖNSÖZ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xviii
TABLolar DİZİNİ.....	xxiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxv
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Prostat Bezi.....	3
2.2. Prostat Kanseri.....	4
2.3. Prostat Kanseri Gelişimi ve Gleason Skorlama Sistemi.....	5
2.4. Prostat Kanserinin Başlangıç ve İlerlemesinden Sorumlu Olan Faktörler	6
2.4.1. Genetik Faktörler.....	7
2.4.1.1. Germ-line mutasyonlar	8
2.4.1.2. Somatik gen mutasyonları	9
2.4.2. Hormonal Faktörler	9
2.4.3. Yaş Ve Çevresel Etkili Faktörler.....	11
2.4.3.1. Yaş etkili risk faktörleri.....	11
2.4.3.2. Çevresel etkili risk faktörleri	11
2.5. Uygulanan Tedavi Yöntemleri	12
2.5.1. Aktif Gözetim	13
2.5.2. Cerrahi Operasyon.....	13
2.5.3. Radyasyon Terapi.....	14
2.5.4. Hormon Terapileri	14
2.5.5. Kemoterapi	14
2.5.6. Hedefli Tedavi Yaklaşımı.....	15
2.5.7. İmmünoterapi	15
2.5.8. Klinik Olarak Deneme Aşamasında Olan Yeni Nesil Terapi Yaklaşımları	16

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.6. Enflamasyon	16
2.6.1. Enflamatuvar Yanıtların Oluşturulmasında Fonksiyon Gösteren Sitokinler.....	17
2.6.2. Pro-enflamatuvar sitokinler	19
2.6.2.1. İnterferonlar (IFN).....	19
2.6.2.2. Tümör nekrozis faktörleri (TNF).....	20
2.6.2.3. İnterlökinler (IL).....	21
2.6.3. Anti-enflamatuvar Sitokinler	22
2.7. Enflamatuvar Mikroçevre ve Kanseri İlişkisi.....	22
2.7.1. Enflamatuvar Mikroçevrenin Tümör Kontrolündeki Rolü ‘Denge Fazı’	24
2.7.2. Tümör Gelişimini Ve İlerleyişini Teşvik Etmede Enflamatuvar Mikroçevrenin Rolü ‘Kaçış Fazı’	25
2.7.3. Yerleşik Tümörlerin İlerleyişini Kontrol Etmede İmmün Mikroçevrenin Rolü	26
2.7.4. Enflamatuvar Tümör Mikroçevresinin İmmünoterapideki Sınırlılıkları	27
2.8. Enflamasyon ve Prostat Kanseri İlişkisi	29
2.9. Epitelyal Mezenkimal Tranzisyon (EMT) ve Enflamatuvar Koşullarda EMT Aracılıklı Prostat Kanseri Metastazının Gelişimi	31
2.9.1.TGF- β (Dönüştürücü büyüme faktörü- β) Yolağı Aracılı EMT Aktivasyonu	32
2.9.2. EMT Mekanizmasının Upstream Regülatör Proteinleri.....	33
2.9.2.1. TWIST	34
2.9.2.2. SNAIL	36
2.9.2.3. ZEB.....	37
2.9.3. EMT Mekanizmasının Downstream Regülatör Proteinleri	38
2.9.3.1. Vimentin	38
2.9.3.2. E-kaderin ve N-kaderin	39
2.9.3.3. Sitokeratinler	39
2.9.3.4. Fibronektin	40
2.9.3.5. α -SMA	40
2.10. NKX3.1 Proteini ve Prostat Kanserindeki Rolü ve EMT İlişkisi.....	41
2.11. Tümör Mikroçevresindeki Epitelyal-Stromal Hücre Etkileşimleri	43
2.12. EMT Değişimi Geçiren Hücrelerin Apoptoz Direnci: “Anoikis”	45
3. MATERYAL VE METOT	47

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1. Materyal.....	47
3.1.1. Cihaz.....	47
3.1.2. Sarf Malzemeler	48
3.2. Metot.....	54
3.2.1. Hücre Kültürü	54
3.2.1.1. Hücrelerin bakımı ve pasajlanması	54
3.2.1.2. Hücrelerin (-)86°C’de saklanması ve çözündürülmesi	54
3.2.1.3. Hücrelerin mikroskopta sayımı	55
3.2.2. Transfeksiyon	56
3.2.3. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi, RT-PPCR (EMT) Array	56
3.2.4. RNA izolasyonu cDNA kütüphanesi oluşturma ve Illumina ile yeni nesil sekanslama	57
3.2.5. İmmünofloresan.....	58
3.2.5.1. Hücrelerin hazırlanması.....	58
3.2.5.2. Hücre fiksasyonu ve bloklama işlemi.....	58
3.2.5.3. Antikor işaretlemesi.....	59
3.2.5.4. DAPI ile lamellerin lam ile kapatılması	59
3.2.6. SDS-page ve Western Blot	59
3.2.6.1. Protein izolasyonu	59
3.2.6.2. Protein konsantrasyonu ölçümü.....	60
3.2.6.3. BCA karışımı ve örneklerin hazırlanışı	60
3.2.6.4. Proteinlerin SDS-page ile ayrılması	61
3.2.6.5. Membrana transfer.....	63
3.2.6.6. Western blot prosedürü.....	63
3.2.6.6.1. Primer ve sekonder antikor işaretlemeleri	63
3.2.6.6.2. Görüntüleme	64
3.2.7.U937 Monosit Hücrelerinin Makrofajlara Farklılaştırılması ve Conditioned Media/CM (Şartlandırılmış Ortam) Üretimi	64
3.2.8. CM İçerisindeki TNF- α ve TGF- β 1 Sitokin Konsantrasyonlarının Ölçümü	65
3.2.8.1. ELISA yöntemi ile TNF- α ölçümü.....	66
3.2.8.2. ELISA yöntemi ile TGF- β 1 ölçümü.....	67
3.2.9. WST-1 Prosedürü İle Hücre Canlılığı Ölçümleri	68

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.10. Anoikis Assay Analizleri.....	68
3.2.11. Ko-Kültür Analizi.....	69
3.2.12. Migrasyon Analizi	69
3.2.13. İstatistiksel Analizler	70
4. BULGULAR	71
4.1. Epitelyal-Mezenkimal Belirteçlerin <i>in vitro</i> Enflamatuvar Mikroçevre Modelinde Değişimini Gösteren Ön Denemeler	71
4.2. Enflamatuvar Mikroçevre ve Nkx3.1 Ekspresyonunun Anoikis Direncine Etkisi.....	78
4.3. Enflamatuvar Mikroçevre ve NKX3.1 Ekspresyonunun EMT Belirteçlerinin Ekspresyon ve Hücre içi Lokalizasyonlarına Etkisi.....	81
4.4. Enflamatuvar Mikroçevrede EMT ilişkili TNF- α ve TGF β -1 Aracılıklı Etkilerin Belirlenmesi.....	90
4.5. Enflamatuvar Mikroçevre ve NKX3.1 Ekspresyonu Sonucu Epitelyal-Mezenkimal Transizyon ilişkili Genlerin Ekspresyon Değişimleri	103
4.6. Tümör-Stroma Etkileşimin, Enflamatuvar Mikroçevre ve NKX3.1 Ekspresyonu Sonucu Görülen EMT Değişimlerine Etkisi.....	117
4.7. Yeni Nesil Dizileme Örnek Setinin Doğrulanması	118
4.8. Gruplar Arası Karşılaştırma Analizleri Sonucunda Ekspresyon Düzeyi Değişen Genler	119
5. TARTIŞMA.....	145
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	155
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	158
TEŞEKKÜR	179
ÖZGEÇMİŞ.....	181

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Bölgesel olarak şematize edilen prostat bezi anatomisi (Verma et al., 2011).....	3
Şekil 2.2. Prostat dokusundaki farklılaşmış hücre tipleri (Toivanen et al., 2017).....	4
Şekil 2.3. Prostat kanseri risk faktörleri (Elancheran et al., 2017).....	7
Şekil 2.4. Enflamasyonu destekleyen pro-enflamatuvar sitokinler ile enflamasyonu baskılayan anti-enflamatuvar sitokinlerin özetlendiği şema (Subbarao et al., 2021).....	18
Şekil 2.5. Tümör gelişimini destekleyen enflamatuvar mikroçevre ortamı (Hibino et al., 2021).....	23
Şekil 2.6. Enflamatuvar prostat tümör mikroçevresindeki histopatolojik değişimler (Barron et al., 2012).....	30
Şekil 2.7. Tipik bir EMT-MET, MET-EMT mekanizmasının taslağı ve EMT-MET, MET-EMT programlanmasında değişen moleküler faktörler (Dongre et al., 2019).....	34
Şekil 2.8. Hücre dışı matrikse tutunmayı kaybeden normal hücrelerin ve metastatik tümör hücrelerinin kaderi. 1) Hücre dışı matriksten kopan anoikise duyarlı hücrelerin ölümü: Anoikis 2) Hücre dışı matriksten kopan, anoikise dirençli kanser hücrelerinin sağkalımı: Anoikis direnci (Han et al., 2023).....	45
Şekil 3.1. <i>In vitro</i> enflamasyon modeli basamaklarının şematik olarak gösterimi. A. U937 monosit hücrelerinin makrofaj hücrelerine farklılaştırılması ve sitokin salınımı indüksiyonu sonrasında CM'lerin toplanması. B. CM ortamları ile LNCaP hücrelerinin kültürü.....	65
Şekil 4.1. 0.5/25, 1/50 ve 2/100 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile kültürü yapılan LNCaP hücrelerinin a. 1, 2, 3 ve 4 hafta kültür sonunda çekilen, hücrelerin morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri b. 2. ve 4. haftanın bitiminde hücrelerin canlılık/metabolik hızlarını gösteren WST-1 ölçüm grafiği c. NKX3.1 protein seviyesini gösteren western blot görüntüsü. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001.....	73

Şekil 4.2. 20/10, 40/20 ve 80/40 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile kültürü yapılan LNCaP hücrelerinin a. 1, 2, 3 ve 4 hafta kültür sonunda çekilen, hücrelerin morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri b. 2. ve 4. haftanın bitiminde hücrelerin canlılık/metabolik hızlarını gösteren WST-1 ölçüm grafiği. c. NKX3.1 protein seviyesinin doz ve süre bağımlı azaldığını gösteren western blot görüntüsü. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001. 75

Şekil 4.3. 1 hafta boyunca 5/500, 10/1000 ve 20/2000 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile büyütülen LNCaP hücrelerinin a. morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri b. NKX3.1 ve Vimentin protein seviyelerini gösteren western blot görüntüleri. Mezenkimal belirteç proteinlerinden olan c. Vimentin d. α -SMA proteinlerinin bazal NKX3.1 proteini ile hücre içi lokalizasyonlarını e. Vimentin ve α -SMA proteinlerinin NKX3.1 ile kolokalizasyonunu gösteren immünfloresan mikroskobu görüntüleri. 78

Şekil 4.4. 72 saat boyunca 1.25/125, 2.5/250, 5/500 ve 10/1000 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile büyütülen ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinde a. Kontrol ve anoikis (anchorage-independent) petride canlı ve ölü hücreleri gösteren floresan mikroskop görüntüleri b. Hücrelerin anoikis direncini gösteren canlılık grafiği. Calcein AM: Canlı hücreleri boyayan yeşil floresan işaretleme. EthD-1: Ölü hücreleri boyayan kırmızı floresan işaretleme. Birleşik: Calcein AM ve EthD-1 birleşik görüntüleri temsil etmektedir. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001. 80

Şekil 4.5. 2 hafta boyunca 1.5/125, 3/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile büyütülen ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinin a. morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri b. hücrelerin canlılık/metabolik hızlarını gösteren WST-1 ölçüm grafiği c. hücrelerin anoikis direncini gösteren canlılık grafiği. d. epitelyal belirteçler; NKX3.1 ve sitokeratin-8 (CK8), mezenkimal belirteçler; TWIST1-1 ve SNAIL1 proteinlerinin seviyelerindeki değişimi gösteren western blot görüntüsü. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001. 81

Şekil 4.6. LNCaP hücrelerine 1.5/125, 3/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM uygulaması (2 hafta) ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 transfeksiyonu gerçekleştirildi. Epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin ekspresyonlarını ve hücre içi lokalizasyonlarını gösteren immünfloresan mikroskop görüntüleri a. E-kaderin (epitelyal belirteç) ve Fibronektin (mezenkimal belirteç) b. NKX3.1 (epitelyal belirteç) ve CK8 (epitelyal belirteç) c. NKX3.1 (epitelyal belirteç) ve SNAIL1 (mezenkimal belirteç) d. NKX3.1 (epitelyal belirteç) ve TWIST1 (mezenkimal belirteç) e. NKX3.1 (epitelyal belirteç) ve Vimentin (mezenkimal belirteç) proteinlerinin ekspresyonlarını ve hücre içi lokalizasyonlarını gösteren immünfloresan mikroskobu görüntüleri. f. EMT belirteçlerinin birleşik görüntülerin bir arada sunulduğu özet

görüntü. g, h, i ve j. a, b, c, d ve e'de sunulan birleşik görüntülerden seçilenler kolokalizasyonların daha net gösterilmesi amacıyla büyütülerek sunulmuştur. 90

Şekil 4.7. Enflamatuvar mikroçevrede EMT ilişkili belirteçler üzerideki TNF- α ve TGF- β 1 aracılıklı etkilerin ayırmsanması amacıyla farklı konsantrasyonlarda TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile 8 gün kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinin a. 2,5/125, 5/250 ve 10/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 b. 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 c. 45/20, 90/40 ve 180/80 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 uygulanan kültür modeline ait hücrelerin morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri.....93

Şekil 4.8. TNF- α /TGF- β 1 aracılıklı etkileri gözlemlemek üzere farklı dozlarda TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile 8 gün kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinin a. 2,5/125, 5/250 ve 10/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 b. 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 c. 45/20, 90/40 ve 180/80 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 uygulanan kültür modeline ait hücrelerin canlılıklarını gösteren WST-1 grafikleri. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001.....94

Şekil 4.9. TNF- α /TGF- β 1 aracılıklı etkileri gözlemlemek üzere farklı dozlarda TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile 8 gün kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinin a. 2,5/125, 5/250 ve 10/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 b. 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 c. 45/20, 90/40 ve 180/80 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 uygulanan kültür modeline ait hücrelerdeki epitelyal ve mezenkimal belirteçlerinin seviyesel analizlerini gösteren western blot görüntüleri. 95

Şekil 4.10. Şekil 9'da bir arada verilen sonuçların detaylı incelenebilmesi amacıyla büyük versiyonları ayrı ayrı sunuldu. TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile 8 gün kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinin a. 2,5/125, 5/250 ve 10/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 b. 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 c. 45/20, 90/40 ve 180/80 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içerikli CM uygulanan kültür modeline ait hücrelerdeki epitelyal ve mezenkimal belirteçlerinin seviyesel analizlerini gösteren western blot görüntüleri. 97

Şekil 4.11. 8 gün boyunca 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren ile CM ile kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan PC-3 hücrelerinin a. morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri b. hücrelerin canlılık/metabolik hızlarını gösteren WST-1 ölçüm grafiği c. epitelyal ve mezenkimal belirteçlerinin seviyesel analizlerini gösteren western blot görüntüsü. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001.....99

Şekil 4.12. 8 gün boyunca 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren ile CM ile kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan DU 145 hücrelerinin a. morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri b. 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren ile CM ile kültürü yapılan hücrelerin canlılık/metabolik hızlarını gösteren WST-1 ölçüm grafiği c. epitelyal ve mezenkimal belirteçlerinin seviyesel analizlerini gösteren western blot görüntüsü. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001..... 101

Şekil 4.13. Mock kontrol, endojen NKX3.1 ekspresyonu baskılanan ve HMNKX3.1 vektörü ile ektopik NKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinde, NKX3.1 ve TWIST1 proteinlerinin transkripsiyonel (Act.D.) ve translasyonel inhibisyon (Chx) sonucu protein seviyelerini gösteren western blot görüntüsü. Act.D. (Actinomycin D): transkripsiyon inhibitörü, Chx (Cycloheximide):translasyon inhibitörü. 102

Şekil 4.14 . 8 gün boyunca 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinde a. migrasyon oranını b. göç eden hücre sayısını gösteren grafik. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001. 103

Şekil 4.15. Enflamatuvar mikroçevre etkisi, NKX3.1 etkisi, NKX3.1 varlığında enflamatuvar mikroçevre etkisi ve enflamatuvar mikroçevre varlığında NKX3.1 etkisini gösteren gruplar arası karşılaştırmaları açıklayan şema. 104

Şekil 4.16. 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM (8 gün) ile kültürü yapılan, son 48 saat HMNKX3.1 ektopik ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerine ait RT-PCR (EMT) array analizi sonuçları. Grup karşılaştırmaları sonucu A. enflamatuvar mikroçevre (CM), B. NKX3.1 ekspresyonu (NKX3.1), C. enflamatuvar mikroçevrenin NKX3.1 varlığındaki etkisi (CM (NKX3.1)) ve D. NKX3.1 ekspresyonunun CM durumundaki etkisini (NKX3.1 (CM)) gösteren gen ekspresyonu değişim grafikleri. Koyu mavi renk enflamatuvar mikroçevreyi, koyu turuncu renk NKX3.1 ekspresyonunu temsil etmektedir. Açık mavi renk enflamatuvar mikroçevre koşullarındaki NKX3.1 etkisini, açık turuncu renk NKX3.1 ekspresyonu durumunda enflamatuvar mikroçevre etkisini temsil etmektedir. 108

Şekil 4.17 . 8 gün boyunca 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile kültürü yapılan, son 48 saat HMNKX3.1 ektopik ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerine ait EMT ilişkili 39 genin transkripsiyon düzeyindeki seviyesel değişimlerini gösteren RT-PCR (EMT) array grafikleri. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001. 116

Şekil 4.18. 8 gün boyunca 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile kültürü yapılan LNCaP hücrelerinde, kontrole karşı enflamasyon durumunda ve bazal NKX3.1 ekspresyonu varlığında,

epitel-stromal hücre etkileşiminin sağlandığı ko-kültürde (2 replika) , epitelyal ve mezenkimal proteinler ile ECM biyobelirtici olan p-FAK ve FAK proteinlerinin seviyesel analizlerini gösteren western blot görüntüsü. 118

Şekil 4.19. DU 145 hücrelerinde 4 gün süreyle 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM uygulaması yapıldı, son 48 saat geçici HMNKX3.1 ektopik ekspresyonu kazandırıldı. a. Ektopik NKX3.1 ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü b. Trizol ile izole edilen RNA örneklerinin görüntülendiği %5 Formaldehit içeren % 1'lik agaroz jel görüntüsü. 119

Şekil 4.20. Değişen gen ekspresyon analizleri sonucu oluşturulan ısı haritaları. A. 4 deneysel grupta 3 replika ile analizlenmiş 12'li örnek grubunun ısı haritası, B. D3 örneği çıkarılarak oluşturulmuş 11'li örnek grubunun ısı haritası. 122

Şekil 4.21. Grup B/Grup A (HM vektör-CM/ HM vektör-kontrol) karşılaştırması için A. Volkan grafiği, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K. Ekspresyonu azalan ve artan genlerin değişimin gösteren kutu grafikleri, $p < 0.05$ 129

Şekil 4.22. Grup C/Grup A (HMNKX3.1-kontrol/ HM vektör-kontrol) karşılaştırması için A. Volkan grafiği, B, C, D ve E. Ekspresyonu azalan ve artan genlerin değişimin gösteren kutu grafikleri, $p < 0.05$ 132

Şekil 4.23. Grup D/Grup B (HMNKX3.1-CM/ HM vektör-CM) karşılaştırması için A. Volkan grafiği, B, C, D, E ve F. Ekspresyonu azalan ve artan genlerin değişimin gösteren kutu grafikleri, $p < 0.05$ 134

Şekil 4.24. Gruplar arası karşılaştırma analizleri sonucu farklı şekilde eksprese edilen genlerin (differentially expressed genes) kat değişimleri, $p < 0.05$. Grup A: HM vektör-kontrol, Grup B: HM vektör-CM, Grup C: HMNKX3.1-kontrol, Grup D: HMNKX3.1-CM. 135

Şekil 4.25. Gen seti zenginleştirme analizlerinde ("All Gene Sets") çeşitli metabolik yollarda aktive olan ve baskılanan gen gruplarının (count değerleri) p değerlerine göre dağılımını gösteren dot plot grafiği, soldaki sütun aktifleşen, sağdaki sütun baskılanan gen setlerini göstermektedir. A. Grup B/Grup A (HMV-CM/HMV-Kontrol), B. Grup C/Grup A (HMNKX3.1-Kontrol/ HM vektör-Kontrol), C. Grup D/Grup B (HMNKX3.1-CM/ HM vektör-CM), D. Grup D/Grup C (HMNKX3.1-CM / HMNKX3.1-Kontrol) karşılaştırması. 139

Şekil 4.26. Gen seti zenginleştirme analizlerinde ("All Gene Sets") elde edilen verilere göre, değişkenlik gösteren gen gruplarının çoğunlukla hangi hücrel metabolik yollarla ilişkili

olduğunu gösteren ema plot grafiği. A. Grup B/Grup A (HMY -CM/HMY-Kontrol), B. Grup C/Grup A (HMNKX3.1-Kontrol/ HM vektör-Kontrol), C. Grup D/Grup B (HMNKX3.1-CM/ HM vektör-CM), D. Grup D/Grup C (HMNKX3.1-CM/HMKNKX3.1-Kontrol) karşılaştırması. 142

Şekil 4.27. KEGG analizleri sonucu elde edilen verilere göre, değişkenlik gösteren gen gruplarını gösteren ema plot grafiği. A. Grup C/Grup A (HMNKX3.1-Kontrol/ HM vektör-Kontrol), B. Grup D/Grup B (HMNKX3.1-CM/ HM vektör-CM) karşılaştırması..... 144



TABLOLAR DİZİNİ

Tablo

Sayfa

Tablo 3.1. SABiosciences RT ² Profiler™ PCR Array Human Epithelial to Mesenchymal Transition PCR array gen listesi.....	57
Tablo 3.2. Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları.....	62
Tablo 3.3. Ön ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları	62
Tablo 4.1. Makrofajlardan elde edilen CM serilerinde ELISA ile belirlenen TNF- α ve TGF- β 1 konsantrasyon değerleri.....	71
Tablo 4.2. Grup karşılaştırmaları sonucu enflamatuvar mikroçevre (CM), NKX3.1 ekspresyonu (NKX3.1), Enflamatuvar mikroçevrenin NKX3.1 varlığındaki etkisi ve NKX3.1 ekspresyonunun CM durumundaki etkisini gösteren ekspresyonu değişen genlerin listesi. Mavi renk enflamatuvar mikroçevreyi, turuncu renk NKX3.1 ekspresyonunu temsil etmektedir. 40/250 pg/ml TNF- α /TGF β -1 içeren CM (8 gün) ile kültürü yapılan, son 48 saat HMNKX3.1 ektopik ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerine ait RT-PCR (EMT) array analizi sonuçları.	106
Tablo 4.3. DU 145 hücrelerinde yeni nesil dizileme sonuçlarının analizi için kullanılan grup isimleri. Grup A: HM vektör-kontrol, Grup B: HM vektör-CM, Grup C: HMNKX3.1-kontrol, Grup D: HMNKX3.1-CM.	120
Tablo 4.4. Gruplar arası karşılaştırma analizleri sonucu farklı şekilde eksprese edilen genleri (differentially expressed genes) gösteren tablo, p<0.05. Grup A: HM vektör-kontrol, Grup B: HM vektör-CM, Grup C: HMNKX3.1-kontrol, Grup D: HMNKX3.1-CM.	123

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrat Derece
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
λ	Lambda
μ	Mikron
mA	Miliamper
2D	İki boyutlu
3D	Üç boyutlu
*	p değeri<0,05
**	p değeri<0.01
***	p değeri<0.001

Kısaltmalar

ADT	Androjen Deprivasyon Tedavisi
AR	Androjen Reseptörü
ARE	Androjen Reseptör Elenmenti-Bağlanma Dizisi
bHLH	Bazik heliks-loop-heliks
BPH	Benin Prostat Hiperplazisi

CARN	Kastrasyona Dirençli NKX3.1 Eksprese Eden Hücreler
CM	Şartlandırılmış Besiyeri
CRPC	Kastrasyona Dirençli Prostat Kanseri
CSC	Kanser Kök Hücresi
DHT	Dihidrotestosteron
DRE	Dijital Rektam İncelemesi
DU 145	Prostat Kanseri Beyin Metastazı Hücre Hatları
ECM	Ekstrasellüler Matriks
EMT	Epitelyal Mezenkimal Tranzisyon
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
iPSC	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
LNCaP	Prostat Kanseri Lenf Nodu Metastatik Hücre Hatları
LPS	Lipopolisakkarit
MET	Mezenkimal Epitelyal Tranzisyon
MMP	Matriks Metalloproteinaz
p değeri	İstatistiksel Anlamlılık Değeri
PC-3	Prostat Kanseri Kemik Metastazı Hücre Hatları

PCa	Prostat Kanseri/Karsinomu
PIN	Prostatik İnterepitelyal Neoplazi
PMA	Forbol Miristat Asetat
PSA	Prostat Spesifik Antijen
TURP	Transüretral Rezeksiyon
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
U937	Monosit Hücre Hattı
WPMY-1	Prostat Miyofibroblast Hücre Hattı

1. GİRİŞ

Enflamasyonun tümör mikroçevresini çoğu zaman pro-tümöral yönde desteklediği ve prostat kanseri (PCa) gelişimine katkı sağladığı bilinmektedir. Enflamatuvar tümör mikro çevresinde yer alan immün sistem hücrelerinin salgıladıkları sitokin ve kemokinler, mikro çevredeki kanserli hücrelerin proliferasyonunu ve sağkalımlarını artırır. Dokudaki stromal hücreleri aktive ederek reaktif stroma oluşumunu tetikler ve hücre dışı ekstrasellüler matriks (ECM) yeniden modellenir. Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) mekanizmasının aktivasyonu üzerinden, hücreler epitelyal karakterlerini kaybederek mezenkimal fenotip özelliklerini gösteren ve metastatik potansiyeli yüksek invazif transforme hücrelere dönüşürler (Lamouille et al., 2014). Bu sürecin doğası gereği bazı hücre yüzey belirteçleri kaybolur, bazıları kazanılır, hücre-hücre bağlantıları zayıflar, ECM tutunma moleküllerinin organizasyonu değişmeye başlar, hücrelerin polaritesi bozulur, hareket yetenekleri artar (Radisky, 2005). Mezenkimal fenotip özelliği kazanan kanserli hücrelerin migrasyon potansiyeli artar ve yine enflamatuvar ortamın tetiklediği anjiyogenez sürecinde oluşan damar ağına ulaştıklarında dolaşıma katılarak uzak doku ve organlara metastaz yaparlar.

İntravazasyon yapan mezenkimal karakterdeki tümör hücreleri, damar içerisinde seyahat ederken anoikis direnci ile hayatta kalır. Anoikis, hücrelerin apoptoza karşı gösterdikleri direnç demektir. Normal koşullarda, hücre-hücre bağlantıları kopan ve bazal laminadan ayrılan hücreler, apoptoz mekanizması üzerinden ölüme giderler. Hücreler arası bağlantıları kopan mezenkim benzeri hücreler ise mobiliteleri yüksek ve invazif özellikte hücreler oldukları için sağkalımlarını artırmak üzere apoptoza karşı çeşitli mekanizmalar aracılığıyla direnç geliştirirler ve bu sayede uzak doku ve organlara metastaz yapma evresinde damar içerisinde hayatta kalmayı başarırlar (Adeshakin et al., 2021).

Doku yerleşik immün hücrelerin aktivasyonu (Zielinski, 2017), çeşitli immün sistem hücrelerinin tümöral bölgeye infiltrasyonu ve aktivasyonu ile oluşan enflamasyon (Man et al., 2013), kanser gelişiminin her aşaması ile ilişkilidir. Bu nedenle, enflamatuvar bir mikroçevredeki prostat kanseri hücrelerinin EMT dinamiğinin incelenmesi ve bu durumun metastatik davranışları üzerine olan etkisinin araştırılması, enflamatuvar stres koşulları varlığında metastatik PCa'da görülen ortak bir EMT profilinin ortaya konması ve ileri evre kanser tedavileri için terapötik hedef/hedeflerin tanımlanması önemlidir. Günümüz PCa tedavilerinde, androjen ablasyon terapisinden sonra androjen bağımsız olarak çoğalmayı

başarabilen hücreler, metastatik özellik kazanmakta ve bu evreden itibaren hastalığın etkin bir tedavisi bulunmamaktadır (Sartor et al., 2018). Bu tez çalışmasında, prostata özgül bir tümör baskılayıcı gen olan NKX3.1 (Shen et al., 2003)'in, enflamatuvar bir mikroçevre modelinde büyütülen metastatik prostat kanseri hücre hatlarının, metastatik potansiyel kazanması sürecinde EMT değişikliklerinin araştırılması hedeflenmiştir.

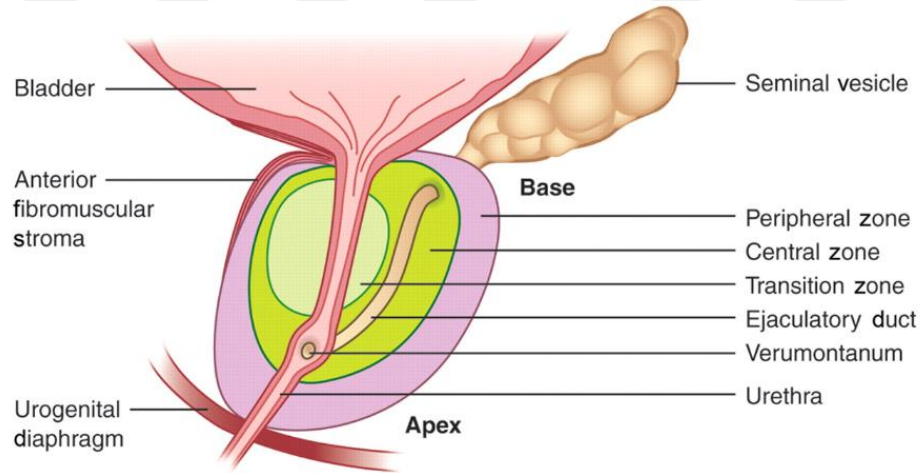


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Bezi

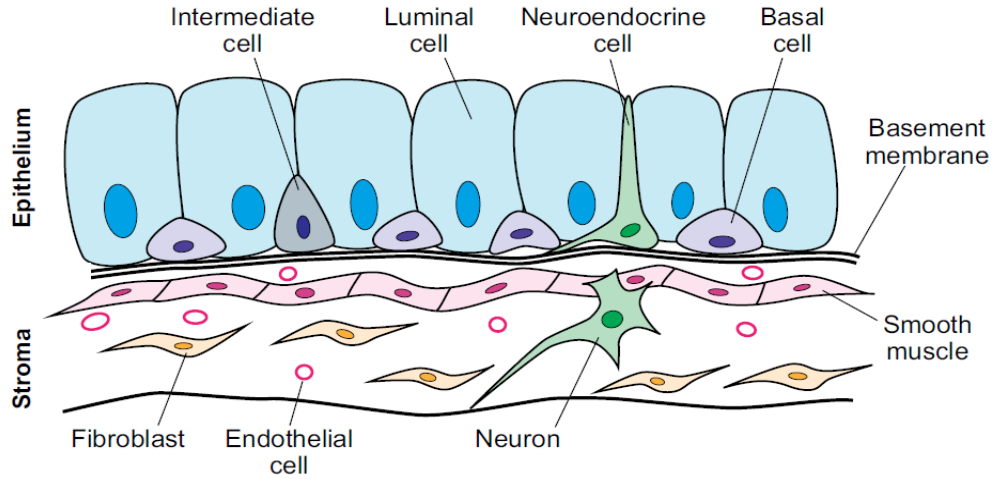
“Prostat” kelimesi, Yunanca kökenli olup “önünde duran” anlamına gelmektedir ve prostat bezinin konumunu ifade eden bir tanım şeklidir. Prostat bezi, mesanenin hemen altında, pelvik taban kaslarının üzerinde bulunan kestane büyüklüğünde bir bezdir. Yaklaşık 20 gram ağırlığındadır. Erkek üreme sisteminin önemli bir parçasıdır. En önemli işlevi, testislerden gelen sperm hücreleri için semen sıvısını üretmektir. Üretilen semenin ejakülasyon sırasında idrar yoluna güçlü bir şekilde bastırılmasını ve dışarı atılmasını sağlar. Prostat bezindeki kanallar prostatın içinden geçerek üretraya akar. Aynı anda idrar ve semen çıkışının engellendiği kontrol merkezidir (Menche et al., n.d.).

Prostat bezi temelde 3 farklı bölgeden oluşmaktadır. Bu bölgeler sırasıyla, Tranzisyon Bölgesi, Merkezi Bölge ve Periferik Bölge’dir. Kanseri gelişimi genellikle periferik bölgede meydana gelmektedir (Verma et al., 2011).



Şekil 2.1. Bölgesel olarak şematize edilen prostat bezi anatomisi (Verma et al., 2011)

Olgun prostat epiteli, morfolojileri farklı olan birkaç farklı hücre tipi içerir. Bazal membran üzerinde yer alan epitelyal kompartmanda; bazal hücreler, salgı yapan luminal hücreleri ve daha az sayıda bulunan nöroendokrin hücre popülasyonları bulunmaktadır. Bu epitelyal kanallar, düz kas hücrelerini, fibroblastları, vasküler ve nöral hücreleri içeren stromal bölgeye bitişiktir (Toivanen et al., 2017)(Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Prostat dokusundaki farklılaşmış hücre tipleri (Toivanen et al., 2017)

2.2. Prostat Kanseri

Prostat kanseri, erkeklerde kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alan bir kanser türüdür (Urabe et al., 2021). Prostat kanseri için başlıca risk faktörleri; ileri yaş, siyah ırk ve aile öyküsüdür. Sağlıksız beslenme ve obezite, hareketsizlik gibi yaşam kalitesini düşüren çevresel etkili faktörler, erkeklerin prostat kanserine yakalanma riskini artırmaktadır. 2018'de yaklaşık 1.3 milyon vaka olduğu tahmin edilmekte ve 2040 yılına kadar vaka sayısının neredeyse ikiye katlanarak 2.3 milyona ulaşması beklenmektedir. Yine 2018 yılı verilerine göre prostat kanserinden ölen bireylerin sayısının yaklaşık olarak 359.000 olduğu, erkek nüfusu arttıkça ve yaş ilerledikçe bu sayının 2040 yılına kadar 740.000'e çıkabileceği tahmin edilmektedir (Shill et al., 2021).

2020 yılında dünya çapında toplam 1.414.259 yeni prostat kanseri vakası ve buna bağlı 375.304 ölüm bildirilmiştir (Wang et al., 2022 a). Ülkemizde PCa ile ilgili çok fazla epidemiyolojik çalışma bulunmamaktadır, 2014 yılı raporlarına göre Türkiye'de her 100.000 kişide 35 kişinin prostat kanserine yakalandığı bildirilmiştir (Zorlu et al., 2014).

2.3. Prostat Kanseri Gelişimi ve Gleason Skorlama Sistemi

Prostat bezi doku organizasyonuna göre 3 ana bölgeye ayrılmaktadır. Bu bölgeler sırasıyla, Tranzisyon Bölgesi, Merkezi Bölge ve Periferik Bölge'dir. Prostat bezinin sağlığını tehdit eden hastalıkların başında Prostatitis gelir. Prostatitis, bakteri enfeksiyonuna bağlı oluşan akut veya kronik enflamasyondan kaynaklanan bir hastalıktır. Benin Prostat Hiperplazisi (BPH), Tranzisyon Bölgesi'nde görülen ve bölgedeki hiperplazik hücrelerin sebep olduğu iyi huylu tümörlerdir. Kansereleşme ise baskın olarak prostatın periferik bölgesinde meydana gelmektedir. PCa'nın çoğunlukla Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (PIN) lezyonlarından kaynaklandığı bilinmektedir (Shen MM and Abate-Shen C: Molecular genetics of prostate cancer). PCa'da görülen tümöral heterojenite, kanserin ilerlemesinin yanı sıra latent ve klinik aşamalar arasındaki ayrımı mümkün kıldığından önemlidir. PCa'nın gelişimi, organizasyonlarını kaybeden epitel hücrelerinin farklılaşması sonucu, hücrelerin göçmen ve invazif bir fenotipe dönüşmeleri ile meydana gelmektedir (DeMarzo et al., 2003).

Yüksek dereceli PIN, malign gibi görünen hücrelerin olduğu iyi huylu prostat asinuslarından oluşur. Bu odaklar, karsinomlu prostatlarda, karsinomu olmayan dokuya göre daha fazla bulunmaktadır. Karsinomun yüksek dereceli PIN bölgelerine sahip olması, bu neoplazinin prostat karsinomlarının öncüsü olduğuna dair histolojik bir kanıttır. Yüksek dereceli PIN, her ne kadar orta ila yüksek dereceli birçok periferik prostat adenokarsinomunun öncü lezyonu gibi görünse de karsinom başlangıcı için her zaman gerekli bir öncül değildir. Çünkü birçok erken evre kanserde, karsinom bölgesi ile bir arada bulunan yüksek dereceli PIN lezyonu bulunmayabilir. Özellikle geçiş bölgesinde yer alan düşük dereceli karsinomlar, yüksek dereceli PIN lezyonları ile birbirlerine yakın değildir (Radisky, 2005).

Gleason skoru prostat kanseri için en sık kullanılan derecelendirme sistemidir. Güçlü bir prognostik indikatördür. Bu skorlama sisteminde öncelikle hücrelerin farklılaşma dereceleri tespit edilir. Farklılaşma derecesi 1-5 arasında değerlendirilir. Kanserli dokuda sıklıkla tespit edilen iki derecenin toplamı Gleason skorunu belirler. Gleason skoru ise 2-10 arasında puanlanmaktadır. Yavaş ilerleme potansiyeline sahip kanser hücrelerini ifade eden skor 2, hızlı ilerleme ve proliferatif potansiyele sahip tümörün varlığını ifade eden skor ise 10'dur. Bu skorlar bahsedildiği üzere 4+3, 3+4 gibi hücrelerin farklılaşma derecelerinin toplamı şeklinde belirlenmektedir. Gleason skoru 2 ile 4 ise iyi derecede farklılaşmış olan, 5 ile 6 arasında ise

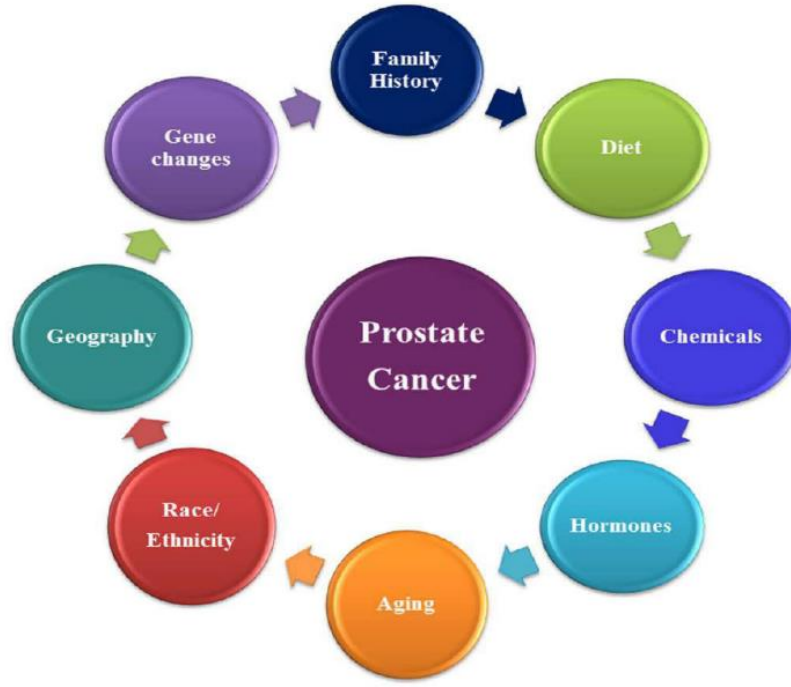
orta düzeyde farklılaşmış olan, 7-10 ise kötü düzeyde farklılaşmış olan kanser hücrelerinin varlığını ifade etmektedir (Anderson et al., 1998).

Belirlenen skora göre uygulanacak olan tedavi yöntemleri farklılık göstermektedir. Skorun beraberinde kandaki PSA (Prostat spesifik antijen) seviyesine bakılarak hastaya bir tedavi yöntemi belirlenmektedir (Shepherd et al., 1996).

PSA, prostat bezinde normal ve malign hücreler tarafından üretilen bir proteindir. PSA testi kandaki PSA düzeyini (mililitredeki nanogram cinsinden PSA değeri) ölçer. Prostat kanseri olan kişilerde kandaki PSA seviyesi sıklıkla yükselir. Bu nedenle PSA testi, tanı konulmuş erkeklerde prostat kanserinin ilerlemesini izlemek için ilk olarak 1986 yılında FDA tarafından onay almıştır. 1994 yılında ise 50 yaş ve üzeri erkeklerde prostat kanserinin saptanmasına kolaylık olarak, dijital rektal muayene (DRE) ile birlikte kullanılacak PSA testinin yapılmasını onaylamıştır (Wever et al., 2010). Kandaki PSA seviyesi 4.0 ng/ml'nin altında ise normal, 4.0-10 ng/ml düzeyinde ise takip edilmesi gereken riskli seviyelerdir. PSA düzeyi yaş, prostat bezinin boyutu ve iltihaplanma veya enfeksiyonla birlikte artma eğilimindedir. Ancak bazı bireylerde PSA düzeyleri 4,0 ng/mL'nin altında olsa bile prostat kanseri görülebilirken, PSA düzeyleri 4 ila 10 ng/mL arasında yüksek olup prostat kanseri olmayan bireyler de vardır. Bu durum PSA seviyesinin çeşitli faktörlere ve kişiden kişiye göre değişken olduğunu göstermektedir. Örnek olarak, prostat biyopsisi alınmadan ve PSA testi yapılmadan 2 gün önce birey ejakülasyon geçirdiyse veya bisiklet sürme gibi şiddetli egzersiz yaptıysa PSA düzeyi yüksek çıkabilmektedir. Aksine, BPH'yi tedavi etmek için kullanılan Finasterid ve Dutasterid gibi bazı ilaçlar PSA seviyesini düşüren ilaçlardır (Thompson et al., 2004). Bu nedenle PSA testi, kanser tanısında tek başına yeterli olmadığı gibi bazı durumlarda da yanıltıcı olabilmektedir. Ancak genel olarak bir erkeğin PSA düzeyi ne kadar yüksekse, prostat kanserine yakalanma olasılığı da o kadar yüksektir. Sağlık uzmanları, 50 yaşından itibaren erkeklerin yıllık PSA taramasını yaptırmalarını tavsiye etmektedirler (Wever et al., 2010).

2.4. Prostat Kanserinin Başlangıç ve İlerlemesinden Sorumlu Olan Faktörler

Tüm kanser tiplerinde olduğu gibi; aile hikayesi, genetik faktörler, hormonal faktörler, yaş, etnik köken, beslenme ve zararlı kimyasallara maruz kalma gibi çevresel faktörler, kanserin başlaması ve gelişiminden sorumlu olan etmenlerdir (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. Prostat kanseri risk faktörleri (Elancheran et al., 2017)

2.4.1. Genetik Faktörler

Gen aktivasyonunun artışı ile proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşümü, tümör baskılayıcı genlerin ise aktivasyonlarını yitirmeleri, kanserlerin başlangıç ve ilerlemesindeki en temel nedenlerdir. Genlerdeki bu aktivasyon artışı veya azalışı çoğunlukla aşırı derecede mutasyon birikimi ve epigenetik değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Eldred-Evans et al., 2021).

Bazı genler farklı kanser türleri için riskli ve o kansere duyarlı genler olarak bilinirler. Örnek olarak; Her2Neu, BRACA1/2 genleri meme kanseri için, APC geni de kolorektal kanserine duyarlılık genidir. Bu genlerdeki mutasyonlar ailesel olarak kalıtılabileceği gibi sporadik olarak da gelişebilmektedir. BRACA1 ve BRACA2 genleri DNA'nın homolog rekombinasyon tamirinde görevli olan DNA onarım enzimlerini kodlayan genlerdir. Meme kanseri olan hastaların çoğunda bu genlerde mutasyonlar saptanmış olduğu için meme kanseri duyarlılık genleri olarak geçmektedirler. (Honrado et al., 2006). Aynı şekilde APC (adenomatöz polip coli) geni de kolon kanseri duyarlılık genidir. APC, bir tümör baskılayıcı genidir, hücrenin Beta-Catenin aracılıklı proliferasyon yolağını kontrol eden bir proteini kodlamaktadır. Bu gende meydana gelen mutasyonlar sonucu aktivasyonunu yitirmesi kolon kanseri gelişimine neden olmaktadır. Söz konusu genler vücudun pek çok organı için hayati

önem taşıyan genler olup kayıplarının sadece bazı organlarda kansere sebep oluşu, o organların bu gen kayıplarını tolere edemeyişinden kaynaklanmaktadır. Bunun gibi farklı kanser türlerine ait farklı gen veya gen takımı örnekleri verilebilir (Kinzler et al., 1992).

Prostat kanseri gelişimine sebep olduğu bilinen duyarlılık genleri; MS, RNASEL, ELAC2, GSTP1, PTEN, TP53, NKX3.1, AR, CDKN1B (P27KIP1), COPEB (KLR6), HTERT, HPN, FASN, AMACR, EZH2, MYC, BCL-2, CYP17 ve SRD5A2'dir (Simard et al., 2002).

2.4.1.1. Germ-line mutasyonlar

MS (anti-enfeksiyöz, süpürücü reseptör), RNASEL (anti-enfeksiyöz, apoptozis), ELAC2 (metal bağımlı hidrolaz) genlerinde meydana gelen mutasyonlar, bu genlerden transkripte olan proteinlerin aktivasyonlarının azalmasına sebep olmaktadır. GSTP1 (detoksifikasyon) geninin promotör bölgesinde oluşan hipermetilasyonlar gen susmasına neden olmaktadır. PTEN (hücre çoğalmasının kontrolü, sağkalım) ve TP53 (sağkalım, genom stabilitesinin korunması, apoptoz) genlerinde genellikle nokta mutasyonları olmak üzere meydana gelen mutasyonlar sonucu heterozigotluğun kaybı görülmektedir (Mertowska et al., 2023). NKX3.1 ve CDKN1B genlerinde de heterozigotluğun kaybı meydana gelmektedir. Bu genlerde alellerden bir tanesi sağlam kalsa bile haployetmezlik görülmekte, sağlam allelden üretilen protein fonksiyonel olarak yetersiz kalmaktadır. COPEB (KLR6) (transkripsiyonel düzenleyici) ve AR (transkripsiyonel düzenleyici, hücre çoğalmasının kontrolü, farklılaşma ve sağkalım) genlerinde nokta mutasyonları sıklıkla gözlenmekte gen fonksiyonları bozulmaktadır. HTERT (hücre immortalitesi), HPN (transmembran proteaz), FASN (yağ asidi sentezi), AMACR (yağ asidi metabolizması), EZH2 (transkripsiyonel düzenleyici, hücre çoğalmasının kontrolü), MYC (hücre çoğalmasının kontrolü), BCL2 (sağkalım, anti-apoptozis) fonksiyon kazandırma mutasyonları sonucu mRNA ve protein seviyesinde overeksprese olan genlerdir. Prostat kanseri için risk oluşturan ve en sık karşılaşılan polimorfizmler ise AR, CYP17 (androjen metabolizması) ve SRD5A2 (androjen metabolizması) genlerinde görülmektedir (Mertowska et al., 2023).

2.4.1.2. Somatik gen mutasyonları

Prostat kanserinde sıklıkla kromozomal veya subkromozomal düzeyde genetik aberasyonlar görülmektedir. Yaygın olarak görülen kromozomal anormaliteler; 7p, 7q, 8q ve Xq kromozom kollarındaki kazanımlar ve 8p, 10q, 13q ve 16q kromozom kollarındaki kayıplardır. Diğer katı tümörlerde olduğu gibi, tanımlanan değişikliklerin sayısının hastalığın evresi ile birlikte artıyor olması, prostat kanserinin klonal genetik değişikliklerin birikmesi sonucu ilerlemekte olduğunu göstermektedir (Cotter et al., 2022).

2.4.2. Hormonal Faktörler

Androjenler erkeklik özelliklerinden sorumlu cinsiyet hormonlarıdır. Testislerdeki Leydig hücrelerinde öncül molekül olan kolesterolden sentezlenmektedir (Wang et al., 2017). Büyük oranda ise adrenal kortekste üretilmektedir (Hu et al., 2012). Adrenal bezlerin ana androjenik ürünleri DHEA (dehydroepiandrosterone) (Ding et al., 2021) ve KT (11-keto-testosterone)'dir (Yazawa et al., 2021). Testislerde ise T (Testosteron) ve düşük bir oranda DHT (dihidrotestosteron) üretilir, ayrıca ciltten feromonların da salgılanmasını sağlar. Androjen hormonlarının, prostat hücrelerinin çoğalması, farklılaşması ve sağkalımı ile ilgili belirgin fonksiyonlarından dolayı pro-tümöral etki gösterdiği bilinmektedir.

T veya DHT, prostat hücrelerinin (prostat epitel hücreleri, fibromusküler stromal hücreler, luminal hücreler ve çok az miktarda bazal hücrelerde) sitozolünde HSP proteinleri ile stabil halde bulunan AR (androjen reseptörü)'ye bağlanarak reseptör aktivasyonunu sağlarlar ve aktive olan AR nükleusa transloke olarak hedef genlerin transkripsiyonel yazılımını başlatır. DHT'nin AR'ye bağlanma afinitesi T'nin AR'ye bağlanma afinitesinden birkaç kat daha fazla olduğu için, T genellikle prostat hücreleri tarafından üretilen 5- α redüktaz enzimi ile T'den DHT'ye dönüştürülür (Alemany, 2022).

AR, KLK3, KLK2 (salgı proteinleri), TMPRSS2-ERG (füzyon genleri), IGF1R, APP (büyüme faktörleri), FKBP5 (PI3K modülatörü), CAMKK2 (metabolik enzim), UBE2C, TACC2 (hücre döngüsü düzenleyicileri), UGT1A1 (glukuronidasyon) ve NKX3.1, FOXP1(tümör baskılayıcı, düzenleyiciler) gibi transkripsiyon faktörleri de dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonlara sahip genlerin ifadesini düzenler. Androjen ile regüle olan genlerin promotör bölgelerinde ARE (Androgen Response Element) dizileri bulunur. Androjenler ile

aktive olan AR proteinleri ARE dizileri üzerine homodimerize olarak bağlanır, çeşitli co-aktivatörlerin buraya bağlanmasını kolaylaştırarak RNA polimeraz-II'nin hedef geni transkribe etmesini sağlar. AR, hücrede proliferatif yollarda rolü olan genlerin de aktivasyonunu sıkı bir şekilde kontrol ettiği için prostat kanseri hücrelerinin de çoğalmasına neden olmaktadır (Fujita et al., 2019).

1940'lı yıllarda Charles Huggins, metastatik prostat kanseri olan hastaların, prostat kanseri tedavisinin başlangıcı olan androjen deprivasyon tedavisi (ADT) ile tedavi edilebileceğini bulmuştur (Denmeade et al., 2002). ADT, günümüzde hala kullanılmakta olan hormonal terapidir. Tedavinin başlarında androjen deprivasyonu, kanserli hücrelerin apoptoza gitmesini indükleyerek tümörün küçülmesini sağlamaktadır. Ancak zamanla ortamda androjen bağımsız ya da androjene bağlı olmayıp androjen hormonuna yanıt verme potansiyelindeki kanserli hücrelerin çoğalması ile tümör nüksü görülmekte ve kastrasyon dirençli prostat kanseri gelişmektedir. Bu evreden itibaren prostat kanserinin tedavisi henüz bulunmamaktadır. Uygulanan terapiler hastaların ömrünü yalnızca 2-3 sene kadar uzatabilmektedir. Lokalize prostat kanserinde prostatektomi ve radyoterapi hala temel tedavi seçenekleridir (Wang et al., 2020).

Kastrasyona dirençli prostat kanseri (CRPC) terimi, 2008 yılında Prostat Kanseri Çalışma Grubu 2 (PCWG2) tarafından kastrasyon ortamında klinik ve/veya biyokimyasal ilerlemeyi tanımlamak için önerilmiştir (Scher et al., 2008). Kastrasyon direnci, ADT terapisi alan hastalarda, terapi bitiminden itibaren yaklaşık olarak 2 veya 3 yıl içerisinde gelişmektedir (Harris et al., 2009). Kastrasyon dirençli prostat kanserinde, hormon bağımsız hücre proliferasyonu gerçekleştiği için hücrelerin çoğalması kontrolden çıkmakta, tümör agresif bir gelişim göstermekte ve metastaz görülmektedir. ADT ile serum testosteronu "kısırlaştırma" seviyelerine (<50 ng/ml'den daha düşük dozlar) kadar baskılanarak tümör büyümesinin durdurulması hedeflenir. Geçmiş yıllarda cerrahi orşiektomi (cerrahi kastrasyon) uygulanmaktaydı ancak artık hipotalamik hipofiz gonadal (HPG) uyarım yolları üzerinden androjenlerin sistemik üretiminin engellenmesiyle adeta 'tıbbi yolla hadım etme' şeklinde ilaçlar üzerinden gerçekleştirilmektedir. Terapötik uygulamada; Leuprolid, Goserelin, Buserelin, Triptorelin gibi GnRH (Gonadotropic Releasing Hormone) agonistleri ve Degarelix antagonistleri ile HPG üzerinden androjen üretiminin baskılanması hedeflenir. Abirateron asetat, CYP17'nin selektif ve geri dönüşsüz bir inhibitörüdür, adrenal bezlerde, testislerde ve prostat tümörü dokusunda androjen üretimini inhibe eder (Crowley et al., 2021).

Ayrıca kombine androjen blokajı (CAB), ADT ile birlikte Enzalutamid, Apalutamid, Darolutamid anti-androjenlerin eş zamanlı uygulamasından oluşur. Anti-androjenler, androjenlere bağlanıp onları bloke eder ve AR reseptörlerine bağlanmalarını engeller. Bu şekilde AR'nin nükleer translokasyonu ve DNA ile birleşmesi engellenir ve AR sinyal yollarına doğrudan müdahale eder. Sternberg ve arkadaşları tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışma, Enzalutamid uygulaması ile birlikte ADT'nin metastatik olmayan CRPC'li erkekler için sağkalımı arttırdığını göstermiştir (Sternberg et al., 2020).

2.4.3. Yaş ve Çevresel Etkili Faktörler

2.4.3.1. Yaş etkili risk faktörleri

Yaşlı erkekler genç erkeklerle kıyasla daha yüksek oranda prostat kanserine yakalanmaktadır. 65 yaş sonrasında prostat kanseri görülme riski 10'da 6 oranındadır. Prostat bezinin yapısında yüksek oranda, sürekli bölünen bez epiteli hücreleri yer almaktadır. Sürekli bölünen hücrelerin genetik materyallerinde zamanla mutasyon birikmektedir. Bunun yanı sıra, onarım yollarının yetersizliği, bazı hormonal dengesizliklerin ortaya çıkması, immün savunma sisteminin zayıflaması, kişinin yaşam kalitesi...vb gibi durumlar yaşa bağlı gelişen risk faktörleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Leitzmann et al., 2012).

2.4.3.2. Çevresel etkili risk faktörleri

Obezite, düzensiz insülin seviyesi, oksidatif stres oluşumu ve oksidatif DNA hasarı, enflamatuvar sitokin sinyalizasyonunun bozulması gibi pek çok komplikasyona sebep olduğu için kolorektal, meme ve prostat kanserine yakalanma riskini artırmaktadır (Singh et al., 2019). PCa'ya bağlı ölüm oranı Tip-I diyabet hastası erkeklerde %20 oranında artarken, Tip-II diyabetli erkeklerde bu risk daha yüksek olup %34 oranındadır. Obezitenin metabolik tahribatlarından birisi de insülin direnci gelişimidir. Bu da hücrelerin büyümeyi teşvik eden bir hormon olan kan insülininin kronik olarak daha yüksek konsantrasyonuna maruz kalmalarına sebep olduğu için, tüm kanser türlerinde olduğu gibi prostat kanseri gelişimi için olası bir risk faktörüdür (Allott et al., 2013).

Sigara kullanımı, prostat kanseri gelişimi için olası risk faktörlerinden biridir. Sigarada bulunan pek çok farklı türde mutajen, prostat epitel hücrelerine zarar vererek tümör gelişimini indükleyebilen bir etkiye sahiptir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'na göre (IARC), tütün ve sigara dumanında tanımlanmış olan 4.000'den fazla kimyasal arasından, yalnızca 60'tan fazlası sınıf 1 ve sınıf 2 kanserojenler grubu içerisinde tanımlanmıştır (Huncharek et al., 2010). Sigara içen erkeklerde daha yüksek düzeyde testosteron saptanmış olup, prostat kanserine yakalanma riskini artıran ve kanserin ilerlemesini destekleyen bir faktör olabileceği öne sürülmüştür (Plaskon et al., 2003).

Sağlıksız beslenme, PCa'ya yakalanma riskini artıran faktörlerden biridir. Aşırı yağlı beslenmek, östrojen ve androjen üretimini destekleyerek prostat kanseri riskini artırmasıyla ilişkilendirilmiştir. Asya tipi beslenme ve vejeteryan diyetleri düşük yağ içeriğine sahiptir ve bu da dolaşımdaki hormon konsantrasyonunun azalmasıyla bağlantılı olduğundan kanser riski düşüktür (Hill et al., 1980). Kalsiyum bakımından zengin süt ürünlerinin, selenyum ve alfa-tokoferol bakımından düşük diyet ürünlerinin PCa olasılığını arttırdığı gözlemlenmiştir. Fazla kalsiyum alımının, D3 vitamininin efektif olan formunu bozduğu, bunun da prostat hücrelerinin aşırı büyümesine neden olduğu tespit edilmiştir. Düşük selenyum alımı 2/10, düşük alfa-tokoferol alımı 2/11 oranında PCa riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Clinton et al., 2020).

Cinsel yolla bulaşan hastalıklar, PCa ile ilişkilidir. Cinsel yolla bulaşan bakteriyel ya da viral patojenler prostatta kronik enflamasyon oluşturarak kanser gelişimine sebep olabilmektedir. Geniş bir popülasyon örneklemini kapsayan bir çalışmaya göre, Gonore ve sifilis enfeksiyonlarının PCa riskini yaklaşık 2-3 kat artırdığı gösterilmiştir (Hayes et al., 2000). Human papillomavirus (HPV) tiplerinin; HPV-16, HPV-18 ve HPV-33 tanıları, yüksek PCa riski ile ilişkilendirilmiştir (Adami et al., 2003). Yine cinsel yolla bulaşan ve AIDS (kazanılmış bağışıklık yetersizliği sendromu) hastalığına sebep olan HIV virüsü ile enfekte olmuş bireylerin, uzayan enfeksiyon süresine bağlı olarak daha yüksek bir oranda prostat kanseri riski ile karşı karşıya oldukları bildirilmiştir (Crum et al., 2004).

2.5. Uygulanan Tedavi Yöntemleri

Hastalık belirtisi saptanan ve prostat kanseri teşhisi koyulan hastalarda tedavi yöntemi, kişinin aile öyküsüne bakılarak ve tümör ilerlediyse hangi evrede olduğu gözetilerek doktor tarafından spesifik olarak belirlenmektedir. Teşhis için yapılan ilk işlemlerin başında kandaki

PSA seviyesinin ölçümü ve DRE (Digital Rectam Exam) olarak isimlendirilen rektal parmak muayenesi gelmektedir (Sarkar et al., 2022). Prostat bezi rektuma yakın konumlandığı için rektumdan parmak ile kontrol edilebilmektedir. Doktor muayenede ele gelen bir kitle hissederse biyopsi alma kararı alır ve alınan biyopsi örneği immünohistokimyasal boyalarla boyanarak mikroskopta incelenir ve Gleason skorlaması yapılır (Shah et al., 2020).

2.5.1. Aktif Gözetim

Bu aşama hastalığın başlangıç zamanını ifade eder. Genellikle 50 yaşının üzerindeki hastalarda tavsiye edilmektedir. ‘Bekle ve İzle’ diye de bilinen bu yöntemde PSA seviyeleri belirli sürelerde kontrol edilir, gerektiğinde DRE incelemesi yapılır ancak herhangi bir terapi şekli uygulanmaz. Çünkü prostatın büyümesi zaten yavaş cereyan etmekte ve bazı durumlarda tümör prostat dışına sıçramamaktadır. Hastanın zaten yaşı da var ise herhangi bir müdahale yapmadan önce bir süre bu şekilde incelenir (Shill et al., 2021).

2.5.2. Cerrahi Operasyon

Hastanın sağlık durumu genel olarak iyi ve tümör metastatik değilse ve prostat dışına çıkmadıysa prostatektomi denilen cerrahi operasyonla uzaklaştırılır. Çeşitli prostatektomi tipleri mevcuttur ve tümör tipine, Gleason skoruna ve yayılma potansiyeline göre hangi tipinin uygulanacağı belirlenir (Preisser et al., 2020).

Radikal Prostatektomi: Prostat, seminal veziküller ve çevre dokuların çıkarıldığı prostatektomi tipidir. Yakın çevrede yer alan lenf nodlarının da eş zamanlı alınmasını içermektedir (Costello, 2020).

Pelvik lenfadenektomi: Pelvis’de bulunan lenf nodlarının alınması işlemidir. Ancak prostattan alınan biyopsi örneği mikroskopta incelendiğinde eğer lenf nodlarında kanserli hücrelere rastlanırsa prostat alınmaz, başka bir terapi kararlaştırılır (Markić et al., 2019).

Transüretral Rezeksiyon (TURP): Bu prosedür iyi huylu BPH tedavisini gerçekleştirmek üzere, başka bir terapi yöntemi önerilmeden önce, bir tümörün neden olduğu semptomları hafifletmek için yapılmaktadır. ‘Altın standart’ olarak bilinen terapi yöntemidir (Arslan, 2024).

2.5.3. Radyasyon Terapi

Yüksek enerjili X-ray ışınlarının uygulanması vasıtasıyla kanserli hücrelerin öldürülmesi ile tümör büyümesinin engellenmesi hedeflenmektedir. Eksternal, internal, hipofraksiyonlama ve radyofarmasötikal tip olmak üzere farklı radyasyon terapi yöntemlerinden birisi tümör tipine uygun olarak seçilmektedir. Prostat kanseri nedeniyle radyasyon tedavisi gören erkeklerde mesane ve/veya mide-bağırsak kanserine yakalanma riski yüksektir. Ayrıca radyasyon tedavisi iktidarsızlığa ve yaşla birlikte daha da kötüye gidebilen idrar sorunlarına neden olabilmektedir (Gay et al., 2018).

2.5.4. Hormon Terapileri

Kanserli prostat hücrelerinin de çoğalmasını teşvik eden androjen hormonlarının üretimlerinin bloklendiği veya bağlandıkları reseptörlerinin aktivasyonlarının bloke edildiği tedavi yaklaşımıdır. Bu terapi yöntemine daha önce de bahsedildiği üzere ADT de denilmektedir (Denmeade et al., 2002). İlerlemiş olan prostat kanseri vakalarında uygulanmaktadır. Abirateron asetat, prostat kanseri hücrelerinin androjen üretmesini engellemek üzere verilmektedir (Thakur et al., 2018). Löprolid, goserelin ve buserelin gibi luteinize edici hormon salgılayan hormon agonistleri, testislerin testosteron üretmesini engelleyen ilaçlardır (Raja et al., 2022). Flutamid, bikalutamid, nilutamid, enzalutamid, apalutamid, ve darolutamid gibi ilaçlar, başta testosteron olmak üzere androjenlerin etkilerini bloke eden anti-androjenik ilaçlar sınıfındadır. Ketokonazol, aminoglutethimid ve hidrokortizon gibi ilaçlar adrenal bezlerde androjen üretimini durduran ilaçlardır (O'Donnell et al., 2004). Ayrıca testosteron gibi ana androjen hormonlarının fazla miktarda üretildiği yer olan testislerin cerrahi olarak alınması işlemi, diğer adıyla orşiektomi de hormon terapi şekillerindendir (Merrill, 1988).

Hormon tedavisinin yan etkileri sayılacak olursa; cinsel isteksizlik, kemiklerde zayıflama, ishal ve mide bulantısı gibi komplikasyonlardır (Nelson et al., 2008).

2.5.5. Kemoterapi

Kemoterapi, kanser hücrelerinin bölünmelerini inhibe eden ve apoptoz ile hücre ölümünün tetiklenmesini hedefleyen tedavi yaklaşımıdır. Prostat kanseri tedavisinde kullanılan birçok standart kemoterapötik ilaç vardır. Prednisone (Zhu et al., 2021) ile kombine olarak

verilen doksetaksel (Taxotere) (Hwang, 2012) standarttır. Son çalışmalar, ADT ile eş zamanlı olarak verilen docetaxel terapisinin yaşam süresini uzattığı ve hastalığın ilerlemesini ve sıçramasını engellediğini göstermiştir. Cabazitaksel (Jevtana), daha önce dosetaksel ilacının denendiği metastatik-kastrasyon dirençli prostat kanseri tedavisi için onay almış bir ilaç olup hücre içi sitoskelet elemanlarının yapılarını bozan mikrotübül inhibitörüdür (Abidi, 2013).

Kemoterapinin yan etkileri kişiden kişiye, alınan kemoterapinin türüne, uygulanan doz ve süreye bağlı olarak değişmektedir. Aşırı yorgunluk, ağız ve boğazda yaralar, ishal, bulantı ve kusma, kabızlık, kan bozuklukları, sinir sistemi etkileri, düşünce ve hafızadaki değişiklikler, cinsel sorunlar ve üreme sorunları, iştah kaybı, ağrı ve saç dökülmesi gibi yan etkileri söz konusudur. Kemoterapinin yan etkileri genellikle tedavi bittikten sonra ortadan kalkmaktadır, ancak bunlardan bazıları zaman içerisinde yeniden gelişebilmektedir (Nader et al., 2018).

2.5.6. Hedefli Tedavi Yaklaşımı

Hedef tedavi, kanser hücrelerinin spesifik olarak hedeflendiği terapi çeşididir. Genel olarak, kemoterapi ve radyasyon terapisinin verdiği zarara nazaran daha az zarar vermektedir. İnhibitör etkili ilaçlar ile terapi uygulanır (Lee et al., 2018). Örnek olarak Olaparib, BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon taşıdığı saptanmış prostat kanseri hastalarını tedavi etmek için kullanılan bir PARP inhibitörüdür. PARP inhibitörleri, DNA onarımında görev alan bir enzimi bloke ederek BRACA1 ve 2'nin mutasyon etkisini artırır ve bu sebeple hasarlı DNA moleküllerini onaramayan kanserli hücrelerin apoptoz ile ölüme gitmeleri sağlanır (Mateo et al., 2024).

2.5.7. İmmünoterapi

İmmünoterapi, kanserli hücreleri hastanın immün sistemine tanıtmada kullanan bir tedavi yöntemidir. Vücut tarafından üretilen veya laboratuvarında tasarlanan ilaçlar, vücudun kansere karşı doğal savunmasını güçlendirmek, yalnızca kanserli hücreleri hedeflemek için kullanılır. Günümüzde kanseri tedavi etmede üzerinde en çok çalışılmakta olan terapi yöntemidir (Zhao et al., 2019). Metastatik prostat kanserini tedavi etmek için geliştirilen Sipuleucel-T (Provenge) aşısının kullanımı bir immünoterapidir (Anassi et al., 2011).

Dendritik aşılarda, kanser hücrelerinin dendritik hücrelerle laboratuvar ortamında bir araya getirilmesiyle elde edilir. Kanser hücrelerine özgü antijenlerle aktive edilen dendritik hücreler, hastaya geri verilerek bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanıması ve yok etmesi sağlanır.

2.5.8. Klinik Olarak Deneme Aşamasında Olan Yeni Nesil Terapi Yaklaşımları

Kanserli prostat hücrelerini dondurarak parçalamayı hedefleyen kriyoterapi, yüksek ses dalgalarını kullanarak parçalamayı hedefleyen yüksek yoğunlukta ultra-ses terapisi, yüksek enerjili proton partikülleri ile parçalamayı hedefleyen proton beam radyasyon terapisi ve lazer ışınlarının etkisiyle parçalamayı hedefleyen fotodinamik terapi gibi yeni nesil terapi yöntemlerinin klinik uygulamaları yapılmaktadır. Bu tedavi yaklaşımları sadece kanserli hücrelere zarar verecek, normal hücrelere de minimum zararı olacak şekilde geliştirilmeye çalışılmaktadır (Osuchowski et al., 2021).

2.6. Enflamasyon

İmmünite, vücudun homeostazis durumunu sürdürmek ve korumak için çalışan savunma mekanizmasını ifade eder. Vücuda giren mikroorganizmaları veya eksojen maddeleri uzaklaştırırken aynı zamanda anormal endojen malzemeleri, atık ürünleri veya hasarlı hücreleri de ortadan kaldırır. Bağışıklık fonksiyonu zayıfladığında vücut enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale gelir veya kötü huylu tümörlerin (kanserler) gelişme olasılığı artar (Suzuki, 2019).

Enflamasyon, doku hasarına ve enfeksiyona karşı bağışıklık sisteminin verdiği yanıt olarak tanımlanmaktadır. İmmün yanıtların oluşumunda nötrofiller, bazofiller, mast hücreleri, T hücreleri, B hücreleri gibi bağışıklık sisteminin ana hücreleri görev alır. Vücutta gelişen çeşitli enflamatuvar lezyonlarda bölgeye spesifik lökositler bulunmakta ve enflamatuvar süreç uygun lökositlerin o bölgeye toplanmasını sağlayacak şekilde düzenlenmektedir. Bu tepkiler; sitokinler, büyüme faktörleri, eikosanoidler (prostaglandinler, lökotrinler, vb.), kompleman ve peptitler dahil olmak üzere bir dizi hücre dışı aracı ve düzenleyici faktörler tarafından kontrol edilir (Punchard et al., 2004).

Akut enflamasyon, günlerce veya haftalarca sürebilen kısa süreli enflamatuvar süreçtir. Akut inflamasyon, çoğunlukla basit doku hasarlarından kaynaklanmaktadır. Süreç içerisinde

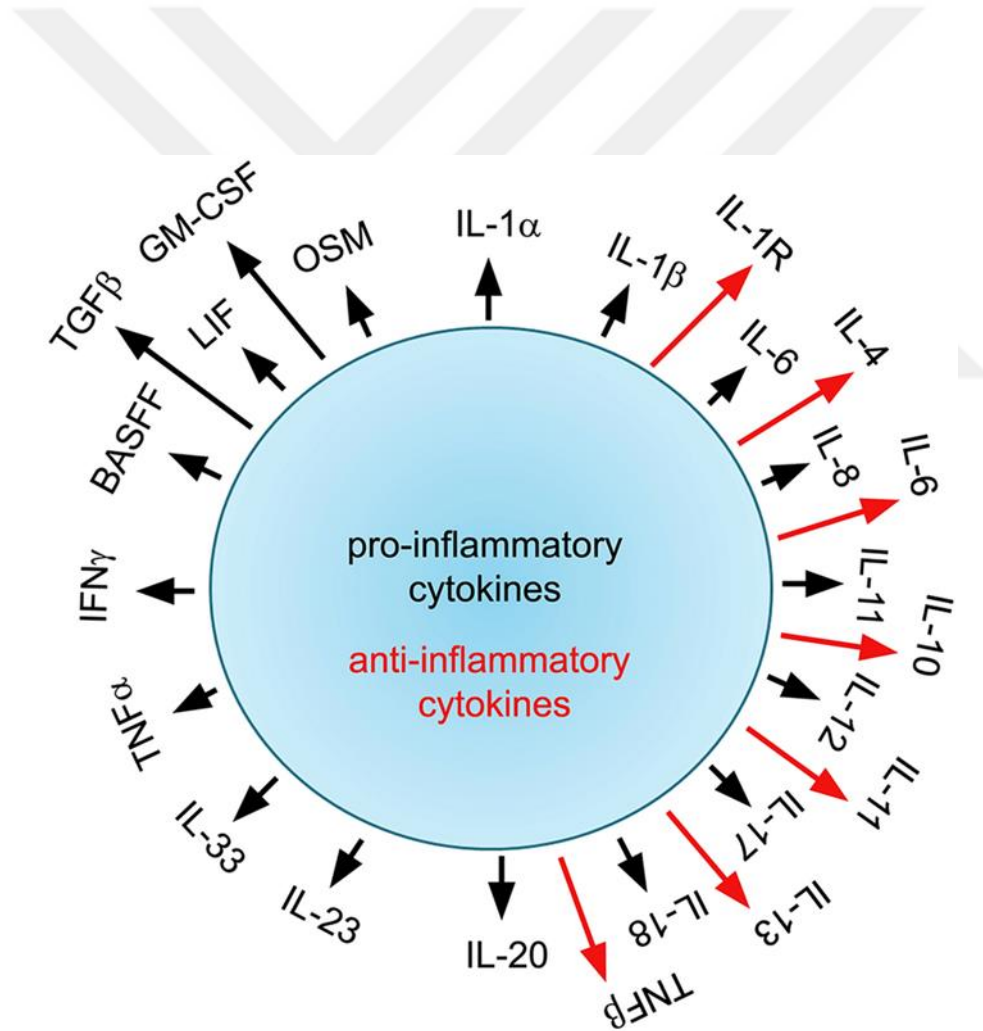
görülen komplikasyonlar; kızarıklık, ısı, şişlik ve ağrı gibi yangı yanıtlarıdır (Rohleder, 2019). Akut enflamasyonun birincil enflamatuvar hücre aracı, erken aşamada nötrofildir ve sonraki süreçlerde makrofaj hücreleri görev görür. Enflamatuvar hücreler tarafından üretilen interlökin ve tümör nekroz faktörü ailelerine ait olan sitokinlere ek olarak histamin, prostaglandinler, lökotrienler, bradikininler ve kompleman bileşenlerini içeren çok sayıda moleküler aracı, akut inflamasyonla ilişkili olarak artık tanımlanmaktadır (Butterfield et al., 2006).

Kronik enflamasyon ise akut enflamasyona göre aylar hatta yıllar sürebilen uzun süreli enflamatuvar süreçtir. Kan damarlarının genişlemesi (vazodilatasyon), kan akışında artış, kılcal geçirgenlik ve nötrofillerin kılcal damarlar yoluyla enfekte dokuya göçü (diapedez) dahil olmak üzere akut enflamasyon özelliklerinin çoğu, enflamasyon kronik boyuta ulaştığında da devam eder. Ancak kısa süre sonra beyaz kan hücrelerinin kompozisyonu değişir ve kısa ömürlü nötrofillerin yerini makrofajlar ve lenfositler almaya başlar. Makrofajlar, lenfositler, plazma hücreleri gibi primer enflamatuvar hücrelerin doku bölgesine infiltrasyonu ve bu hücrelerin çeşitli enflamatuvar sitokinleri, büyüme faktörlerini ve bazı özel enzimleri üretmeleri sonucunda doku hasarının ilerlemesi, kronik inflamasyonun ayırt edici özellikleridir (Milenkovic et al., 2019; Eldred-Evans et al., 2021).

2.6.1. Enflamatuvar Yanıtların Oluşturulmasında Fonksiyon Gösteren Sitokinler

Sitokinler, immün sistem hücrelerinin birbirleriyle iletişim kurma araçları olan moleküler faktörlerdir. Protein yapısında olan bu moleküller, kompleks hücresel birçok yanıt mekanizmasının düzenlenmesinde oldukça kritik rollere sahiptir (Becher et al., 2017). Makrofajlar ve dendritik hücreler gibi doku bağışıklık hücreleri, kendinden olmayan yabancı antijenlere karşı ve bazı durumlarda kendi antijenlerine yanıt olarak, IL-1 ve TNF- α gibi sitokinleri salgılar. Bu sitokinler, dolaşımdaki lökositlerin kemotaksisini ve diapedezini uyaran selektin ve integrin proteinlerinin, hasar bölgesindeki endotel hücrelerinden serbest bırakılmasını sağlar. Lökositlerin dışında, doku makrofajları ve dendritik hücreler, fagositoz yoluyla antijenin temizlenmesinde, sitokinlerin salınmasında rol oynarlar ve lenfositlere antijen sunan hücreler olarak fonksiyon gösterirler. Dolaşımdaki lökositler lokal hasar bölgesine girdiğinde makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından salgılanan çeşitli sitokinler ve kemokinler tarafından aktive edilirler (Tecchio et al., 2014).

Nötrofil hücreleri, akut enflamasyon fazında bölgede en çok bulunan immün sistem hücreleridir. Lizozom içeriği yüksek granüller, matriks metalloproteinazlar ve myeloperoksidaz üreterek ve bu moleküler faktörleri ortama salarak, yabancı antijenlerin veya bu yabancı antijenleri taşıyan hücrelerin parçalanmasını sağlarlar. Ayrıca nötrofil hücreleri, fagositoz yoluyla, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve IL-1, IL-6 ve TNF-a gibi sitokinlerin salınması yoluyla antijeni yok ederler (Nissinen et al., 2014). T ve B lenfositleri bir sonraki savunma hattını başlatan immün sistem hücreleridir ve sitokinlerin salgılanması, lenfositlerin eş zamanlı aktivasyonları, antikorların ve immün komplekslerin üretimi dahil olmak üzere çeşitli kompleks mekanizmalar yoluyla enflamasyona aracılık ederler (Abdou et al., 1976). Enflamatuvar sitokinler; pro-enflamatuvar anti-enflamatuvar sitokinler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Subbarao et al., 2021)(Şekil2.4).



Şekil 2.4. Enflamasyonu destekleyen pro-enflamatuvar sitokinler ile, enflamasyonu baskılayan anti-enflamatuvar sitokinlerin özetlendiği şema (Subbarao et al., 2021).

2.6.2. Pro-enflamatuvar Sitokinler

Pro-enflamatuvar sitokinler otoimmün enflamasyonu ve doku hasarını teşvik ederken, anti-enflamatuvar sitokinler enflamasyonun giderilmesine ve doku onarımının kolaylaştırılmasına yardımcı olur. Pro-enflamatuvar sitokinler, kronik enflamasyonu sürdürmek için lökositlerin yangı bölgesine toplanmasını kolaylaştırır. TNF (tümör nekrozis faktör), interferon ailesi, IL-1 (İnterlökin-1), IL-6 (İnterlökin-6) sitokinleri başlıca pro-enflamatuvar sitokinlerdir. Bu sitokinler çoğunlukla aktive olmuş makrofajlar tarafından üretilir ve enflamatuvar reaksiyonların regülasyonunda rol oynarlar (Zhang et al., 2007).

2.6.2.1. İnterferonlar (IFN)

İnterferonlar, özellikle viral ve bakteriyel enfeksiyonlarda patojenlere karşı savunma hattı oluşturabilmek amacıyla bağışıklık sistemi tarafından üretilen bir grup immünomodülatör moleküldür. Sinyal iletim yollarında yer alan yüzlerce geni aktive ederek bağışıklık sisteminin enfeksiyonlarla savaşmasına yardımcı olur İnsan vücudu, iletişim kurdukları reseptör türüne göre kategorize edilen üç farklı türde interferon üretebilir (Mertowska et al., 2023)

Bilinen 21 tip IFN bilinmektedir ve bunların 13 alt tipi, tip-I IFN'ye aittir (de Jong et al., 2016). Bunlar IFN- α (alfa), IFN- β (beta), IFN- ϵ (epsilon), IFN- κ (kappa), IFN- ω (omega), IFN- ν (nu), IFN- τ (tau) interlökinlerini içerir. Bu sitokinlerin bakteriyel enfeksiyonlarda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

Tip-II IFN ailesinden olan IFN- γ ; bakteri, virüs, patolojik enflamatuvar süreçler ve kansere karşı doğal ve edinilmiş bağışıklık yanıtlarında önemli rol oynamaktadır.

Tip-III IFN ailesinin üyesi olan IFN- λ , doğal bağışıklık yanıtında rol oynayan diğerlerine göre en az karakterize edilmiş olan interferon ailesi üyesidir. Mukozal epitelyumun antiviral savunmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Kotenko et al., 2019).

2.6.2.2. Tümör nekrozis faktörleri (TNF)

Dr. Williams B. Coley, tümör tedavisi çalışmalarında ham bakteri özütlerini kullandığı çalışmasında, bakteriyel ekstraktların tümör nekrozunu tetikleme yeteneğine sahip olduğunu gözlemlemiştir. Tümör gerilemesi gözlenen hastalarda ciddi bir sistematik enflamatuvar reaksiyonun meydana geldiğini fark etmiştir. Böyle bir enflamatuvar reaksiyona neden olduğu günümüzde artık net olarak bilinen başlıca enflamatuvar moleküler aracı TNF faktörleri, endotoksinle tedavi edilen hayvanlardaki tümör hücrelerinde parçalanmaya neden olduğu tespit edildiği için "tümör nekroz faktörü" olarak adlandırılmıştır (Chu, 2013). TNF geni, 1984 yılında izole edilerek karakterize edilmiştir. Hemen hemen aynı sıralarda, 1968 yılında T lenfositlerden saflaştırılan ve T lenfotoksin alfa (TL α) olarak adlandırılan bir proteini kodlayan başka bir gen de izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Bu iki genin aynı aileye ait olduğu belirlendikten sonra; TNF'ye "TNF- α ", TL α 'ya ise "TNF- β " adı verilmiştir. 1985 yılında Nobel Ödülü sahibi Dr. Bruce Beutler ve meslektaşları, endotoksinle tedavi edilen makrofajların süpernatantından 'kateşin' adı verilen bir proteini saflaştırmışlardır. Kateşin proteininin, farelerde kaşeksi ve septik şoka neden olduğu görülmüştür. Daha sonra Kateşin ve TNF'nin aynı protein olduğu ilan edilmiştir (Chu, 2013).

TNF- α daha çok makrofajlar tarafından üretilirken, TNF- β ise T lenfositleri tarafından üretilir. Diğer immün hücrelerde TNF- α ve TNF- β ekspresyon seviyeleri düşüktür. TNF- α salgılanması, Toll benzeri reseptörler tarafından bağlanan lipopolisakkarit (LPS) gibi mikrobiyal patojenlerde ortak olan korunmuş yapısal elementler tarafından indüklenebilir (Aderem et al., 2000). İki farklı TNF- α reseptörü (TNFR) TNF- α sinyaline cevap üretmektedir; TNF- α reseptörü I (TNF-R1; p55 veya p60) ve TNF- α reseptörü II (TNF-R2; p75 veya p80) (Aggarwal, 2003). TNF-R2 yalnızca endotel ve bağışıklık hücrelerinde eksprese edilir. TNF-R1 ise tüm hücre tiplerinde eksprese edilir ve NF- κ B aktivasyonunda TNF-R2'ye kıyasla daha fazla role sahiptir. TNF-R1 ligasyonu reseptör trimerizasyonunu indükleyerek, TNF-R1 ile ilişkili adaptör proteininin (TRADD), TNF-R1'in sitoplazmik domainindeki spesifik ölüm domainine (DD) bağlanmasını indükler. TRADD ayrıca TNF reseptörüyle ilişkili faktörü (TRAF2)'yi bağlar ve reseptörle etkileşen protein (RIP) aracılığıyla I κ B kinazı (IKK) aktive eder. RIP1, TNF-R1 aktivasyonu sırasında TRAF2'ye bağlanır, bu TNF- α 'nın indüklediği IKK ve NF- κ B aktivasyonu için gereklidir. TRAF2, IKK α ve IKK β ile etkileşime girerek IKK kompleksini aktifleştiren TNF-R1'in olduğu yere toplar. IKK kompleksi IKK α , IKK β ve NEMO'dan (IKK γ olarak da bilinir) oluşur. Klasik aktivasyon mekanizmasında, aktive olan

IKK β , I κ B'nin spesifik serin rezidülerini NEMO bağımlı bir şekilde fosforile eder, bu da I κ B fosforilasyonuna sonrasında ubikuitinasyonuna ve proteozomal yıkımına neden olur. I κ B'nin degrede olması, transkripsiyon faktörlerini serbest bırakır. NF- κ B nukleusa geçer ve NF- κ B ilişkili genlerin κ B bölgesine bağlanarak o genlerin transkripsiyonunu aktive eder (Ghosh et al., 1998).

TNF- α sinyal iletim yolu oldukça karmaşık olup hala tam olarak anlaşılamamıştır. TNF- α 'nın pro-enflamatuvar etkileri çoğunlukla NF- κ B aktivasyonu üzerinden olmakta ve hücresel sağkalımı ve proliferasyonu tetiklemektedir. Tam tersi etki olarak TNF- α , anti-tümör yanıtları da başlatabilmekte, bunu Kaspaz-3 aktivasyonu üzerinden hücrede apoptozu tetikleyerek gerçekleştirmektedir.

Hemen hemen tüm hücre tiplerinde, TNF- α 'ya maruz kalındığında NF- κ B aktive olur ve enflamasyonla ilişkili çeşitli genler eksprese olur. Sitokinler tarafından indüksiyona yanıt olarak NF- κ B'nin geçici aktivasyonu enflamatuvar yanıtı indükler. NF- κ B'nin sürekli aktivasyonunun ise kanser hücrelerinin proliferasyonunu teşvik etmek, ilaç direnci geliştirerek apoptozu engellemek, tümör anjiyogenezi ve metastazını arttırmak gibi onkogenезin çeşitli aşamalarıyla ilişkilendirilmiştir (Zhao et al., 2001).

2.6.2.3. İnterlökinler (IL)

IL-1 sitokin ailesi; IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra, IL-37 ve IL-38 ve IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra) dahil olmak üzere 11 üyeden oluşur. Bu sitokinler makrofajlar, monositler, dendritik hücreler ve epitel hücreleri gibi farklı hücre tipleri tarafından salgılanır. IL-1 ailesi sitokinleri, etkilerini uygun IL reseptörlerine bağlanarak hücre içi sinyal yollarını başlatarak gösterir. Hücre içerisinde çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu tetikleyerek enflamatuvar genlerin ekspresyonunu, diğer bağışıklık hücrelerinin toplanmasını ve doku onarımına sağlarlar (Briukhovetska et al., 2021).

IL-6 ailesi, immün regülasyonda ve iltihaplanmada çok önemli bir rol oynar. Bu aile IL-6, IL-11, IL-27, onkostatın M (OSM), lösemi inhibitör faktör (LIF), kardiyotrofin-1 (CT-1), siliyer nörotrofik faktör (CNTF), kardiyotrofin benzeri sitokinden (CLC) ve nöropoietin (NP)'den oluşur. IL-6, enfeksiyon sırasında akut faz yanıtında önemli bir aracıdır. IL-6Ra ve gp130 alt birimlerinden oluşan IL-6 reseptörüne (IL-6R) bağlanarak etki eder. Bu kompleks,

Janus kinaz sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü (JAK/STAT) yolu gibi hücre içi yolları aktive ederek akut faz proteinlerinin (APP'ler) üretimine, immün hücre aktivasyonuna ve doku onarımına katkıda bulunur. Aynı zamanda yardımcı T (Th) hücre alt gruplarının farklılaşmasını ve fonksiyonunu da etkileyerek enfeksiyonlar sırasında edinsel bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde rol oynarlar (Tanaka et al., 2014).

2.6.3. Anti-enflamatuvar Sitokinler

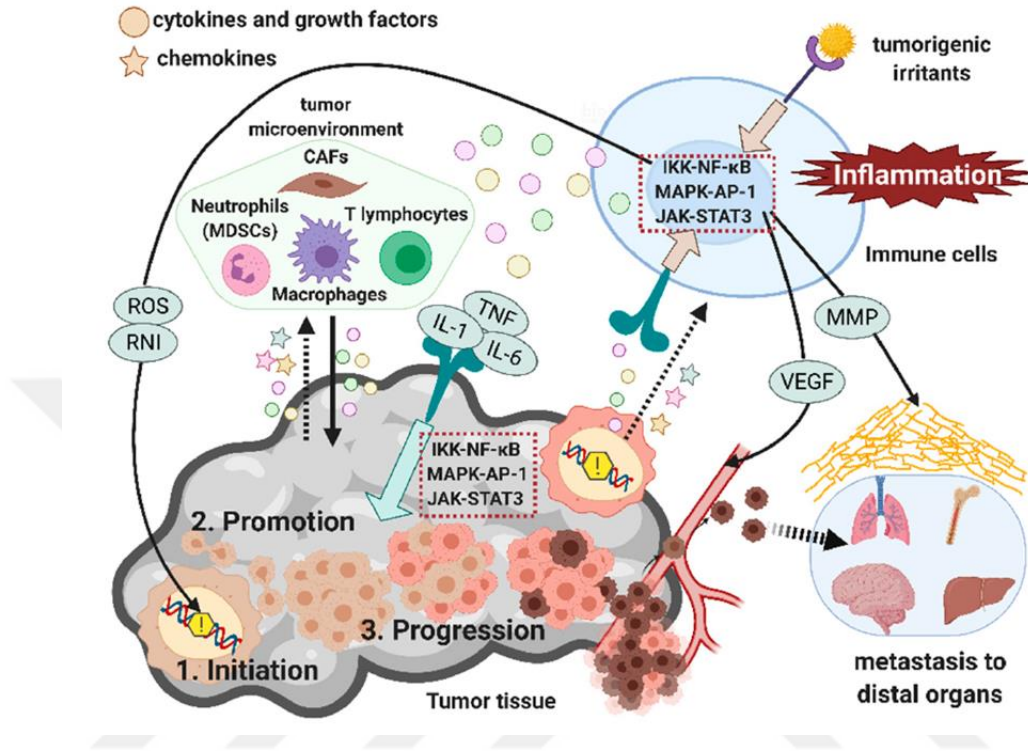
Anti-enflamatuvar sitokinler, pro-enflamatuvar sitokin yanıtlarını kontrol eden (çoğunlukla inhibe eden) bir dizi immün düzenleyici moleküldür. İmmün yanıtlar; sitokin-sitokin etkileşimleri, sitokin inhibitörleri ve çözünür sitokin reseptörleri ile uyum içinde oluşturulur. Başlıca anti-enflamatuvar sitokinler arasında; IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 ve IL-13 yer almaktadır (Opal et al., 2000).

2.7. Enflamatuvar Mikroçevre ve Kanser İlişkisi

Tümör mikroçevresi; kanser hücreleri, stromal doku ve hücre dışı matristen oluşur. İmmün sistem, tümör mikroçevresinin önemli bir belirleyicisidir. Kanser hücreleri ile konakçı bağışıklık tepkisi arasındaki etkileşimler oldukça karmaşıktır ve son yıllarda önemli bir araştırma konusu olmuştur. İnsanlarda olduğu kadar fare modellerinde de çeşitli immünolojik defektler artan tümör gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Smyth et al., 2006). Yapılan araştırmalara bakıldığında bağışıklık fonksiyonları zayıflamış farelerde daha fazla tümör gelişimi gözlenmiştir (Girardi et al., 2018).

Bağışıklık sistemi tarafından etkili tümör sürveyansının (gözetim/denetim), homeostazi sürdürmek için kritik bir durumdur. Buna rağmen, bağışıklık sistemi tarafından tümör gözetimi başarısız olabilir. Kanser bağışıklığını düzenlemenin üç "Es" modelinde açıklandığı gibi, tümör hücreleri klinik olarak saptanabilir hale gelmeden önce bağışıklık sistemi tarafından ilk olarak elimine edilmektedir. Bunu daha sonra bir denge fazı izler ki burada daha az immünojenik tümör varyantları için bir seçim süreci söz konusudur. En sonunda pek çok genetik modifikasyonun da etkisiyle immünojenitesi düşük olan tümöral hücreler immün gözetimden "kaçma" eylemini gerçekleştirirler. Öte yandan, kalıcı enflamasyon ile ilişkili kronik enfeksiyonlar da yeni tümör oluşumunu teşvik edebilir (Engel et al., 1997). Kolorektal, hepatoselüler, servikal ve gastrik karsinomlar, kronik enflamatuvar yanıtlarla güçlü bir şekilde

ilişkilidir. Enflamasyon sırasında çeşitli immünolojik gen ürünlerinin ekspresyonu, tümör büyümesi ve ilerlemesi için uygun bir mikroçevre yaratıyor gibi görünmektedir (Aggarwal et al., 2006).



Şekil 2.5. Tümör gelişimini destekleyen enflamatuvar mikroçevre ortamı (Hibino et al., 2021)

Tümör, genellikle düzenleyici immün bileşenlerin baskın olduğu, immün sistemi baskılanmış bir mikroçevreden yararlanır. Bunun yanı sıra, tümör mikroçevresi içerisindeki pro-inflamatuvar immün yanıtların sürdürülmesi durumunda iyi prognoz görülmektedir. Tümör mikroçevresi, tümör parankim hücreleri, fibroblastlar, mezenkimal hücreler, kan ve lenf damarlarının yanı sıra tümöre infiltre olan immün hücreler, kemokinler ve sitokinler dahil olmak üzere birkaç önemli bileşenden oluşur (Şekil 2.5). Bu çok sayıda ve çeşitli bileşenler karmaşık bir ortam oluşturur ve bu bileşenlerin her biri, tümör gelişimi ve ilerlemesine önemli katkılar sağlayabilir (Pagès et al., 2010).

İmmün olmayan bileşenlerden tümörle ilişkili fibroblastlar, hücre dışı matrisin oluşumundan ve yeniden düzenlenmesinden sorumludur ve karsinom hücrelerinin büyümesini destekleyen bir büyüme faktörü kaynağı oluşturur (Bhowmick et al., 2004). Yeni kan damarlarının oluşumu, kitle büyüdükçe tümör gelişimi için kritik öneme sahipken, mevcut kan ve lenfatik damarlar yerel istila ve uzak doku metastazı için yol görevi görebilir. Birçok çalışma,

vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve matriks metaloproteinazlar (MMP'ler) dahil olmak üzere kan damarı oluşumunu uyaran faktörlerin üretiminin yayılmaya katkıda bulunduğunu ve zayıf prognoza sebep olduğunu göstermiştir (Weis et al., 2011). Mezenkimal kök hücreler dahil olmak üzere diğer hücre soyları sadece yeni karsinom hücrelerini oluşturmakla kalmaz aynı zamanda kanser gelişimi sırasında anjiyogenezi harekete geçirmek için gerekli olan çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilirler (Mohseny et al., 2011). Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC), tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) ve sitotoksik lenfositler dahil olmak üzere tümöre infiltrate olan immün sistem hücreleri, kanserin gidişatının kritik belirleyicileridir. Birçok çalışma, MDSC ve TAM'nin artan yoğunluklarının tümörün ilerleyişini desteklediğini göstermiştir (Ostrand-Rosenberg et al., 2009). Aksine, tümör mikroçevresi içerisindeki sitotoksik lenfositlerin varlığı, çok sayıda kanserde iyi bir prognoz ile ilişkilidir. Kemokinler ve sitokinler dahil olmak üzere tümör mikroçevresinin diğer immün bileşenleri de pro-regülatör ve anti-tümör immün yanıtlarının lokal dengesini değiştirebilir. Mikroçevredeki transforme olmuş, ölmekte olan veya ölü tümör hücrelerinden salınan ısı şoku proteinleri, nükleik asitler ve HMGB1 gibi tehlike sinyalleri, toll benzeri reseptörler (TLR'ler) gibi doğal bağışıklık bileşenleri tarafından algılanır ve anti-tümör bağışıklık tepkilerini aktive edebilir (Chew et al., 2012).

2.7.1. Enflamatuvar Mikroçevrenin Tümör Kontrolündeki Rolü 'Denge Fazı'

Son yıllarda yapılmış birçok araştırmadan elde edilen sonuçlara göre, bağışıklık sisteminin tümör gelişimine karşı gözetimde kritik bir rol oynadığı açıkça görülmektedir. İnterferon (IFN)- γ , perforin, T hücresi veya NK hücre fonksiyonlarında kusurlu immün yetmezliği olan fareler, spontan olarak tümör geliştirir. Örneğin; T ve NK hücre aracılı sitotoksitede fonksiyonel olan perforinin rolü, perforin eksikliği olan fareler kullanılarak açıkça tespit edilmiştir, ancak bunların yerleşik tümörlere karşı kesin rolü hala tartışma konusudur (Van Den Broek et al., 1996). İnsanlarda bağışıklık sistemi zayıf olan kişilerde (örnek: AIDS hastaları) ve uzun süreli immün süpresif tedavi alan transplant alıcılarında daha yüksek tümör insidansının gözlemlenebildiği durumlar da vardır (Strauss et al., 2010).

Çok sayıda immün hücre soyları, anti-tümör yanıtlarında rol oynar. NK hücrelerinin çeşitli kanser modellerinde tümör hücrelerini öldürebildiği uzun zamandır bilinmektedir. Benzer şekilde, sitotoksik T lenfositleri, karsinom hücrelerinde eksprese edilen "anormal"

tümör antijenlerini tespit edebilir ve bu hücreleri yok etmek için hedefleyebilir (Weigelin et al., 2011). Antijen sunan hücreler ve özellikle dendritik hücreler, çapraz sunum olarak bilinen bir mekanizma yoluyla CD8⁺ T hücrelerini etkinleştirmek için MHC sınıf I molekülleri bağlamında tümörden türetilmiş antijenleri işler ve sunar. Karsinom hücrelerinin doğrudan öldürülmesinin yanı sıra, aktifleştirilmiş CD8 + T hücreleri ayrıca IFN- γ salgılayarak anjiyogenezi inhibe edebilir (Flinsenberget al., 2011). Antikor üreten plazma hücrelerine farklılaşmaları sayesinde B hücreleri ve onları aktive eden T hücreleri, kanser aşılarda uzun süreli bağışıklık gözetiminin önemli bileşenleridir (DiLillo et al., 2010). Tümör hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından sürekli öldürüldüğü ve kontrol edildiği dönem "denge fazı" olarak adlandırılır. Tümör, gelişimini destekleyen elverişli bir mikroçevre oluşana kadar uzun süre uykuda kalabilir. Dormansi kısmen sitotoksik CD8⁺ T hücreleri tarafından kontrol edilir çünkü CD8⁺ T hücrelerinin tükenmesi visceral metastazların daha hızlı büyümesine neden olur. Bununla birlikte, tümör hücrelerinin sürekli kontrolü, nihayetinde daha agresif tümör hücrelerini destekleyen seçici bir baskı uygular. Örneğin tümör hücresi varyantları, "immün düzenleme" adı verilen bir işlem yoluyla daha az immünojenik hale gelmek için yüzey antijenlerini mutasyona uğratabilir. Denge fazını takiben, daha agresif ve daha az immünojenik tümör hücreleri immün gözetimden "kaçış fazı"na geçerek sonuçta bir tükenme durumuna ulaşacaktır (Eyles et al., 2010).

2.7.2. Tümör Gelişimini ve İlerleyişini Teşvik Etmede Enflamatuvar Mikroçevrenin Rolü 'Kaçış Fazı'

İmmün gözetimden kaçmanın önemli bir mekanizması, zayıf immünojenik tümör hücrelerinin seçimidir (Browning et al., 1992). Bunun yanı sıra mikroçevrenin modifikasyonu, tümör büyümesini teşvik eden bir "pro-kanser" profilinin edinilmesine yol açabilir. Bu pro-kanser modifikasyonları arasında; tümör hücrelerinin ölümünü önleyen anti-apoptotik moleküllerin ekspresyonu, tümör büyümesini teşvik eden büyüme faktörleri, VEGF, transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), IL-10, indolamin2, 3-dioksijenaz (IDO) gibi immünosüpresif mediatörler ve anti-tümör immünitesini baskılayan programlanmış hücre ölümü ligandı 1 (PD-L1) gibi bileşenlerin ekspresyonları yer alır (Reed, 1999).

Tümör hücrelerinde TLR4 aktivasyonu gibi TLR yolaklarının da tümör gelişimini doğrudan teşvik ettiği gösterilmiştir. Ayrıca pro- ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengesizliklerden dolayı tümör içinde oluşan mikro damar sistemi genellikle sızdıran yapıda

olup işlevsizdir. Bu da T hücre infiltrasyonunu ve tümöre ilaç difüzyonunu sınırlayabilen bir durumdur (Goel et al., 2011). Tümör mikroçevresi, yerleşik lökositler ve farklı immün hücre alt gruplarının bölgeye sürekli olarak toplanması ile daha da şekillendirilir. Örneğin, düzenleyici T hücrelerinin (Treg) ve miyeloid türevli baskılayıcı hücrelerin (MDSC) toplanması, tümör mikroçevresi içinde immünosupresyona katkıda bulunur. Örneğin MDSC, doğal T hücresi çoğalmasını ve farklılaşmasını inhibe etmek, T efektör hücre fonksiyonlarını bloke etmek ve IL-10 ve TGF- β ekspresyonu yoluyla Treg'leri indüklemek için birden fazla görevde rol oynar (Ostrand-Rosenberg et al., 2009). TAM (M2 benzeri fenotipe sahip) hücrelerinin mikroçevredeki varlığı, immünbaskılayıcı ve anjiyogenik veya lenfanjiyogenik özelliklerinden dolayı çeşitli kanserlerde kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mantovani et al., 2006).

Tümörögenезin kronik inflamasyonla ilişkili mekanizmaları arasında; hücrel transformasyon, proliferasyon, invazyon, anjiyogenez, kemodirenç, metastaz ve apoptozun inhibisyonu yer alır. IL-6, IL-1 α ve IL-8 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin yanı sıra çeşitli kemokinlerin tümörün büyümesini ve ilerleyişini desteklediği bilinmektedir. TNF- α , hücrel transformasyon, proliferasyon, invazyon ve metastaz dahil olmak üzere tümörögenезin çeşitli aşamaları ile ilişkilidir (Aggarwal et al., 2006). IL-6 ve STAT-3'ün çeşitli kanserlerde anti-apoptotik faktörler olarak rolü de iyi bilinmektedir (Hodge et al., 2005). CXCL1 ve CXCL8 gibi kemokinler, tümör hücresi proliferasyonunu artırabilir, CXCL5 ve CXCL12 nötrofilleri ve MDSC'yi ortama çekerken, CXCL12 aynı kökenli reseptör CXCR4'ü ifade eden tümör hücrelerinin göçünü teşvik eder. Bu immünolojik araçların çoğu, birçok kanserde yapısal olarak aktif olan ve virüsler dahil çeşitli kanserojenler tarafından indüklenebilen transkripsiyon faktörü NF-KB tarafından düzenlenir (Aggarwal et al., 2006).

2.7.3. Yerleşik Tümörlerin İlerleyişini Kontrol Etmede İmmün Mikroçevrenin Rolü

Bağışıklık sistemi tümör oluşumunu kontrol etmekte başarısız olsa bile, yerleşik tümörlerin bulundukları mikroçevre içerisindeki bağışıklık tepkisi, kanserin şekillenmesinde önemli bir faktör olmaya devam etmektedir. Birkaç fare modelinde, peptit bazlı immünoterapi ile CD8+ T hücre yanıtlarının indüksiyonu yoluyla, yerleşik karaciğer tümörlerinde bir gerileme olduğu bildirilmiştir (Belnoue et al., 2004). HCC hastalarında tümör mikroçevresinin önemi birçok çalışma ile vurgulanmıştır. Çalışmalarda intra-tümöral pro-inflamatuar genlerin

ekspresyonunun yüksek oranda hasta sağkalımı ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. 172 HCC hastasında, immünolojik imza niteliğinde 14 genin, özellikle hastalığın erken evrelerinde hasta sağkalımını artırdığı öne sürülmüştür (Balkwill et al., 2001). Bu 14 bağışıklık geni; kemokin ailesi üyelerinden CXCL10, CCL5 ve CCL2'yi, sitokin ailesi üyelerinden IFNG, TNF ve IL6'yı, patern tanıma reseptörlerinden TLR3 ve TLR4'ü, T hücresi markörlerinden CD8A ve TBX21'i ve NK hücre markörü NCR3'ü kodlar. Yapılan çalışmada, IFN-y ve TLR3 ligandının indüklediği tümör içi kemokin ekspresyonunun, tümör hücresi apoptozunu arttırmak ve tümör hücresi proliferasyon oranını düşürmek için sitotoksik T hücreleri ve NK hücreleri tarafından infiltrasyonun teşvik edildiği gösterilmiştir (Chew et al., 2012).

Sitotoksik lenfositlerin aracılık ettiği tümör infiltrasyonu genellikle tümör mikroçevresinde eksprese edilen kemokinler tarafından yönetilmektedir. Kutanöz melanom modelinde kemoterapinin, T hücre infiltrasyonunu ve tümör kontrolünü destekleyen kemokinlerin tümör içi ekspresyonunu indükleyebileceğini gösterilmiştir (Hong et al., 2011). Buna karşın, yapılan birkaç çalışmada kemokinlerin, özellikle kemokin reseptörlerinden CXCR3 ve CXCR4'ü eksprese eden tümör hücrelerinin, metastaz sürecinde rol oynadığı vurgulanmıştır (Koizumi et al., 2007). Bu nedenle, tümör kontrolünde pro-inflamatuvar mikroçevrenin rolü, içeriğe bağlı gibi görünmekte olup daha detaylı araştırmalara gerek duyulmaktadır.

2.7.4. Enflamatuvar Tümör Mikroçevresinin İmmünoterapideki Sınırlılıkları

İmmün mikroçevresindeki bileşenlerin karmaşık rolleri göz önüne alındığında, kanser tedavisi için ilgili efektör molekülleri, hücreleri veya yolları hedeflemeye yönelik yöntemler geliştirmek hala güçtür. Kanser immünoterapisinin bugüne kadarki sınırlı başarısı üç ana sebebi vardır. (1) Tümör antijenlerine karşı immün yanıtın zayıf olması. (2) Efektör hücrelerin katı tümörlere infiltrasyon oranının zayıf olması. (3) Yapısal olarak immünosüpresif karakterde olabilen bir tümör mikroçevresinin varlığı. Etkili bir kanser immünoterapisi için, immün yanıtın dengesini tümörü destekleme durumundan tümör reddine doğru değiştirmek önemli gibi görünmektedir (Quezada et al., 2011). Bu nedenle tümör mikroçevresinin manipülasyonu, gelecekteki tedavilerde optimum anti-tümör yanıtları elde etmek için önemli olacaktır.

Tümörlerde lokal adaptif immün yanıtı aktive etme çabaları bir miktar başarı sağlamıştır ve adaptif T hücre transferi gibi hücre bazlı terapiler, metastatik melanom hastalarının tedavisinde ikna edici kanıtlar sağlamıştır. Özellikle NK hücreleri aracılıklı hücre ölümünü artırmak için tasarlanmış tümöre özgü monoklonal antikoları (mAb'ler) ve mAb sitokin füzyon proteinlerini (immüno sitokinler, IC'ler) kullanan stratejiler, preklinik ve bazı klinik ortamlarda umut verici sonuçlar ortaya koymuştur (Sondel et al., 2011).

Kanser aşıları, tümörle ilişkili antijenlere karşı bağışıklık sistemini uyarmayı amaçlamaktadır. İlk FDA onaylı terapötik kanser aşısı Provenge (Sipuleucel-T), kastrasyona dirençli prostat kanseri terapilerinde ılımlı ama önemli faydalar sağlamaktadır (Handy et al., 2018). Tümör antijenlerinin düşük immünojenisitesi, güçlü kanser aşılarının geliştirilmesinde büyük bir zorluk yaratmaktadır. Bu kanser aşılarının özgüllüğünü ve etkinliğini artırmak için yoğun araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca immüno supresif bir tümör mikroçevresi, kanser aşılarının indüklediği anti-tümör immün yanıtlarının etkinliğini sınırlar. Bu nedenle tümör mikroçevresinin, ya anti-tümör aktivitesini arttırarak ya da immün baskılayıcı yolları bloke ederek manipüle edilmesi, daha etkili tümör tedavisi için izlenen stratejiler arasındadır (Slingluff, 2011).

İmmünoterapiler son birkaç yıldır 'kural bozan' olarak nitelendirilmektedir. Tümörler, birbirleriyle iletişim kuran çeşitli hücre tiplerinden oluşan karmaşık ekosistemlerdir. Bu nedenle immünoterapi alanındaki zorluklardan en önemlisi, tedaviye yanıt verecek olan hücrelerin tahmini biyobelirteçlerini belirlemek olmuştur. Tümör mikroçevresinin karmaşık yapısının anlaşılması, tümör-bağışıklık hücresi etkileşimlerinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilir ve bu da immünoterapi yanıtlarının öngörülmesini sağlayabilir. Stroma, epitel ve bağışıklık hücresi gibi farklı tipteki hücre popülasyonları, tümör mikroçevresini yorumlamak için neredeyse sayısız yol demektir. Bu nedenle hızla büyüyen bir tümörün çoğalmasına kaç hücre sel kombinasyonun katkıda bulunduğu belirsizliğini korumaktadır (Tang et al., 2016).

Enflamatuvar tümör mikroçevresinin heterojenliğinde ve bağışıklık sistemi yanıtında birden fazla faktörün (örneğin bağışıklık hücresi infiltrasyonu) önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Dolayısıyla her kanser türünde, tümör mikroçevresinin heterojenliğine dair derin bir anlayışa sahip olmak ve tümör-konak arasındaki iletişimde yer alan farklı moleküler faktörlerin işlevlerini anlamak, büyük bir önem taşımaktadır. Bu bilgiler, daha iyi terapötik stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır. Bu bağlamda, tümör mikroçevresinde yer

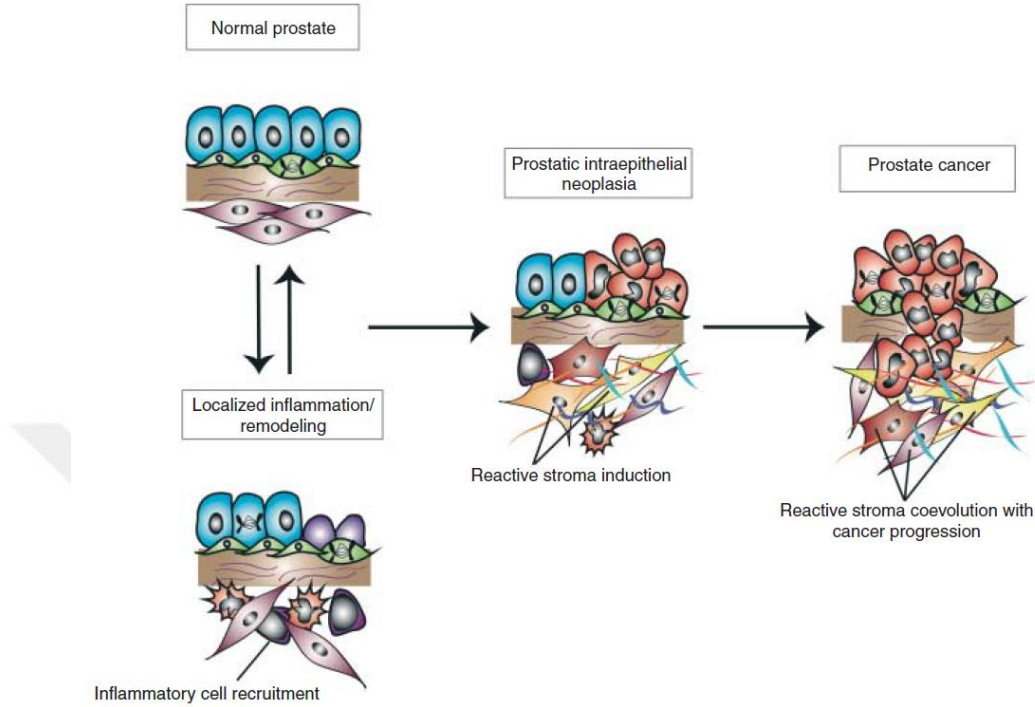
alan çeşitli immün ve immünolojik olmayan faktörler hakkında in situ ve mekansal bilgi sağlayan multipleks dizileme ve görüntüleme platformları, daha etkili kanser immünoterapisi geliştirme yolunda etkili araçlar olacaktır (Sadeghi Rad et al., 2021).

2.8. Enflamasyon ve Prostat Kanseri İlişkisi

Rudolf Virchow, 1863 yılında neoplastik dokularda çeşitli lökositlerin bulunduğunu fark etti ve enflamasyon ile kanser arasında bir bağlantı olabileceğini ortaya koydu. "Lenforetiküler sızıntının" kronik enflamasyon bölgelerindeki kanserin kökenini yansıttığını öne sürdü. Son on yılda enflamatuvar mikro ortamın kötü huylu tümörlerin gelişimine katkıda bulunduğunun anlaşılması, Virchow'un hipotezini desteklemektedir. Kanser ile enflamasyon arasındaki bağlantının anlaşılması, tümör gelişiminin önüne geçme ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından etkili olmaya başlamıştır (Balkwill et al., 2001).

Enflamasyon, ortamdaki toksinlerin artması, fiziksel yaralanma, iskemik yaralanma veya diğer yaralanma türlerinden kaynaklanan akut doku hasarına karşı hızlı, çok aşamalı ve normal bir yanıttır. Normal doku homeostazisindeki herhangi bir bozukluk, bağışıklık savunmasının ilk hattında yer alan makrofajlar, mast hücreleri, dentritik hücreler ve doğal katil hücreleri gibi doğuştan gelen immün hücreleri aktive eder. Bu hücreler sitokin salımı yaparak hücresel proliferasyona katkıda bulunurlar, kemokin salımı ile ortama diğer immün sistem hücrelerini çekerler ve bu şekilde bulundukları dokuda enflamatuvar yanıtları başlatırlar. Matriksi yeniden modelleyen proteazlar ve reaktif oksijen ve nitrojen türevleri, ortamdaki patojenlerin parçalanmasını sağlar. En sonunda dokuda meydana gelen hasarların onarılması başlatılır (Hussain et al., 2007). Enflamasyonun kansere neden olduğu mekanizmalar, içsel ve dışsal yolaklar üzerinden şekillenebilir. İçsel yolaklar, onkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu gibi genetik değişikliklerle aktive edilir. İçsel yolakların aktivasyonu ile transforme olan hücreler, tümör mikroçevresini enflamatuvar bir mikroçevreye dönüştüren inflamatuvar araçlar üretirler. Bunun bir örneği, Virchow tarafından tanımlanan insan meme kanserinde görülen enflamatuvar sızıntıdır. Dışsal yolaklar ise; kolon, pankreas, prostat ve yemek borusu gibi belirli anatomik bölgelerde kanser riskini artıran enflamasyonun tetikleyicileridir. Bu iki ko-opetatif yolağın birleşik etkileri, diğer başka enflamatuvar mediyatörlerin üretimini koordine eden ek transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu yoluyla hücreleri malign bir fenotipe doğru iter. Bu faktörler, birçok tümör teşvik edici etkiye sahip

lökositleri ve makrofajları bölgeye toplamaya ve aktive etmeye devam eder. Sonuç olarak tümör mikroçevresi artık enflamatuvar tümör mikroçevresine evrilmiş olur (Morrison, 2012).



Şekil 2.6. Enflamatuvar prostat tümör mikroçevresindeki histopatolojik değişimler (Barron et al., 2012)

Gün geçtikçe artan çalışmalar, kronik enflamasyonun prostat kanseri gelişimine ve metastaza ilerlemesine katkıda bulunan bir faktör olduğunu göstermektedir. Yakın zamanda yapılan bir meta-analiz, prostatit ve cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların artan prostat kanseri riski ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur (Dennis et al., 2002). Ayrıca aktive edilmiş enflamatuvar hücreleri ve proliferatif epitel hücrelerini içeren proliferatif inflamatuvar atrofi (PIA)'nin, PIN lezyonlarının ve prostat kanserinin patolojik bir öncüsü olarak ortaya çıktığı bilinenler arasındadır. Kronik enflamasyonun, epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) ve reaktif stroma indüksiyonu ile prostat kanseri ilerlemesi ve metastazı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ve tümör mikroçevresinin dinamiklerini etkilediği düşünülmektedir (Barron et al., 2012).

İyi huylu prostat dokusundaki kronik enflamasyon, yüksek dereceli prostat kanseri ile ilişkilidir. Önemli bir enflamatuvar efektör olan Pentraxin 3, yakın zamanda prostat kanseri hastalarında prostat enflamasyonuna bağlı tümör ilerlemesini öngörmek için bir biyobelirteç

olarak tanımlanmıştır (Stallone et al., 2014). Ayrıca, cinsel yolla bulaşan hastalık (STD'ler) öyküsü olan erkeklerde prostat kanseri riskinin artması, prostat tümörü oluşumu ve kronik enflamasyon arasında dolaylı bir bağlantı olduğunu göstermektedir (Hayes et al., 2000). Prostatın kronik iltihaplanması, enfeksiyonla savaşmak üzere ortamda bulunan veya bölgeye göç eden lökositlerin ürettiği reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin kalıcı üretimi nedeniyle, DNA hasarını arttırdığı bilinen sürekli devam eden enflamasyondan kaynaklandığı bilinmektedir. Populasyon bazlı bir çalışmada, prostat kanseri duyarlılık geni olan RNASEL'in aleli Arg462Gln'nin, prostat kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir. Bu aleller, enflamatuvar ilişkili prostat kanseri riskini artıran hatalı, mutant enzimleri kodlamaktadır (MA et al., 2007). Prostat kanserine duyarlılık genlerinden bir diğeri olan MSR1 (enfeksiyona yanıt olarak aktive olan gen) geninin mutantlarını taşıyan bireylerde de aile soylarında artan prostat kanseri riskiyle bağlantılı olduğu gösterilmiştir. MSR1'in ARG293X mutasyonunun, sporadik prostat kanseri olan erkeklerin %2,52'sinde, ancak prostat kanseri olmayanların yalnızca %0,39'unda gözlemlendiği bildirilmiştir (Zheng et al., 2006). Prostat Kanseri Önleme Çalışması (PCPT) veri tabanı ve sonuçları üzerine inşa edilen son epidemiyolojik kanıtlar, kronik enflamasyon ile prostatın agresif duruma ilerlemesi arasındaki ilk etiyolojik bağlantıyı göstermekte ve prostat enflamasyonunu hedef alarak prostat kanseri metastazının önlenmesi için bir platform sağlamaktadır (Gurel et al., 2014).

2.9. Epitelyal Mezenkimal Tranzisyon (EMT) ve Enflamatuvar Koşullarda EMT Aracılıklı Prostat Kanseri Metastazının Gelişimi

EMT, gelişen embriyo içindeki hücrelerin organizasyonunda ve farklılaşmasında, doku hasarı varlığında mezenkimal hücrelerin oluşması aşamasında fonksiyonu olan bir mekanizmadır. Epitelyal kanserlerin invazif ve metastatik potansiyeli kazanmalarında da etkin bir mekanizma olduğu belirlenmiştir (Kalluri et al., 2009). EMT ve mezenkimal epitelyal tranzisyon değişiklikleri (MET), prostat bezinin, seminal veziküllerin ve böbreğin gelişiminde kritik rol oynar (Hayward et al., 2000). EMT-MET süreçlerinin döngüsü, embriyonik gelişim sırasında ürogenital büyümenin damgalanmasında etkilidir. Mezenkimal hücrelerin sinyalizasyon yollarının aktivasyonu ile meydana gelen değişimler, epitel hücrelerinin birbirlerine ve bulundukları yere tutunma yetilerinin azaldığı veya kaybolduğu bir ortamda, hücre göçünü ve hayatta kalmasını destekler.

EMT mekanizmasının, metastatik kastrasyona dirençli prostat kanserinin (mCRPC) gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Kötü prognoz ile ilişkili yüksek dereceli prostat tümörleri sıklıkla EMT programıyla tutarlı moleküler biyobelirteçleri ifade eden hücreler içerir. Mezenkimal özellikleri ifade eden farklılaşmamış kanser kök hücreleri (CSC), tümör büyümesini ve metastazı teşvik eder (Tam et al., 2013).

2.9.1. TGF- β (Dönüştürücü büyüme faktörü- β) Yolağı Aracılı EMT Aktivasyonu

TGF- β , apoptoz, immün yanıtlar ve EMT dahil olmak üzere kritik hücresel süreçleri kontrol eden multifonksiyonel bir sitokindir. Reaktif stroma ortamında salınan enflamatuvar bir sitokin olan TGF- β , EMT sürecini indükleyen başlıca sinyal molekülüdür. Ancak karsinom hücrelerinde EMT programının aktivasyonu, mezenkimal potansiyel kazanmış olan hücrelerde invazif-metastatik kaskadını harekete geçirir (Bierie et al., 2006). Bu sinyal dizisi karsinom hücrelerinin, primer tümörün bulunduğu bölgeyi istila etmelerini, damar içine girerek dolaşıma katılmalarını, dolaşımda hayatta kalmalarını, damar dışına çıkmalarını, uzak organların parankiminde hayatta kalabilmelerini, sonunda gerçek metastatik makrotümörler oluşturabilecek mikrotümörlerin oluşumunu teşvik eder. EMT programlaması aktive olan epitel hücreleri, farklılaşmamış kök hücre benzeri özellikler kazanır ve bu da kanser kök hücrelerinin gelişimine olur. Neoplazm ortamında, kök hücre benzeri özellikleri taşıyan hücreler, tümör gelişimini başlatan ve metastatik potansiyele sahip hücrelere dönüşürler. Kötü prognoz ile ilişkili yüksek dereceli tümörlerin sıklıkla EMT değişiminin belirteci olan moleküler imzaları ifade ettiği bildirilmiştir (Tam et al., 2013).

TGF- β ailesi, serin treonin membran kinazlarıdır. Hücre içi Smad2/3 proteinlerini aktive ederek, TGF- β 'ya yanıt veren genlerin transkripsiyonunu düzenlemek üzere nukleusa transloke olurlar. TGF- β , EMT'yi teşvik eder ve sonuç olarak kök hücre benzeri özelliklere sahip hücrelerin oluşmasına yol açar.

TGF- β , normal ve malign prostatta otokrin büyümeyi inhibe edici bir faktör olarak görev yapar. TGF- β ligandları, iki tip transmembran reseptörü tip I ve II serin treonin kinazın heteromerik kompleks oluşumunu indükler. T β RII kinaz, T β RI'yi fosforile eder, böylece serin-treonin kinaz domainleri aktive olur. Ligand bağlanmasıyla aktive edilen bu reseptörlerin hücre içi domainleri, hücre içi Smad efektörlerinin domain bölgesine toplanmasını ve aktivasyonunu

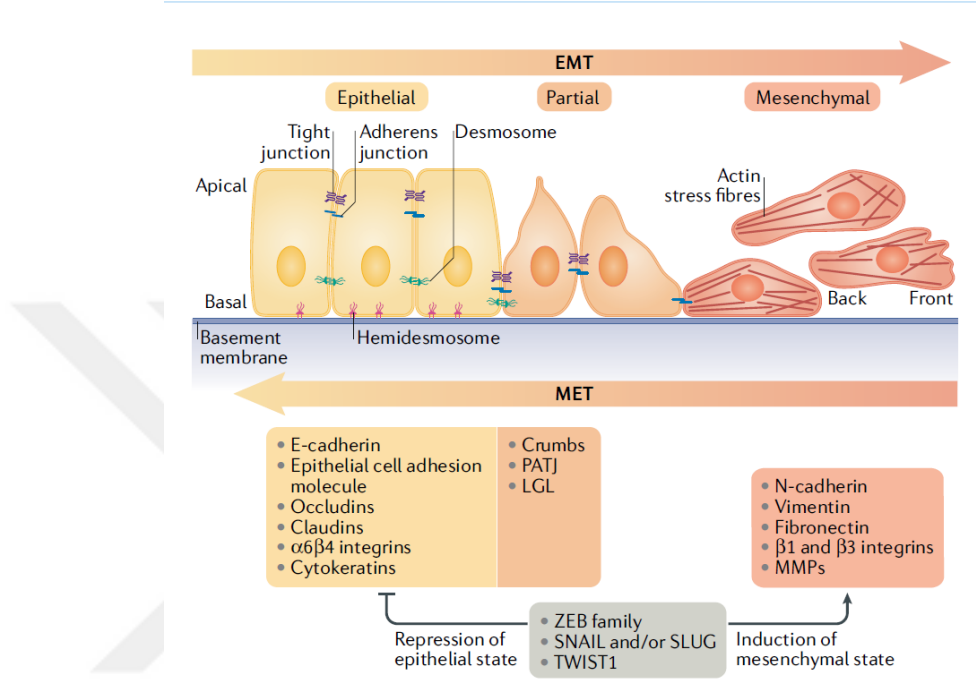
kontrol eder. İlk olarak Smad2 ve Smad3 proteinleri T β RI kinazlarıyla geçici olarak ilişki kurar ve T β RI tarafından fosforile edilir. Smad proteinlerinin aktivasyonu Smad4 ile kompleks oluşturulmasını sağlar ve nükleer translokasyon gerçekleşir. Oluşan kompleks, hedef gen ekspresyonunun transkripsiyonel düzenleyicisi olarak işlev görür (Massagué et al., 2006). Ayrıca, RhoA, AKT/phosphatidylinositol-3-kinase, ERK 1/2 MAPK yolları dahil olmak üzere birçok Smad'dan bağımsız TGF- β sinyal yolu da tanımlanmıştır.

TGF- β 1, pro-invaziv, immünsüpresif tümör mikroçevresinin ana düzenleyicisidir. Tümör mikroçevresindeki hem tümör hücrelerine hem de bağışıklık hücrelerine etki ederek tümör hücresi istilasını ve metastazı teşvik eder. Tümör hücrelerinde TGF- β 1'e yanıt olarak EMT mekanizması uyarılır. TAM'lar (tümör ilişkili makrofajlar), meme kanseri hücrelerinde EMT'yi indüklemek için TGF- β 1 ile iş birliği yapan epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi EMT yanıtlarına aracılık eden büyüme faktörlerini eksprese eder (Fuxe et al., 2012). TAM'lar ayrıca organogenezin kritik araçları olan ve meme, prostat, akciğer ve kolon kansinomları gibi bazı yaygın kansinomların gelişimi için artan kanser riski ile ilişkili olan insülin benzeri büyüme faktörlerini (IGF'ler) de eksprese eder. IGF-1, meme kanserinde ağırlıklı olarak stromal hücrelerde eksprese edilir ve prostat kanseri hücrelerinde TGF- β 1 tarafından indüklenir. TGF- β 1, makrofajlar ve düzenleyici T hücreleri gibi bağışıklık hücreleri, tümör mikroçevresindeki TGF- β 1'in hücrel kaynaklarıdır. Dolayısıyla, TGF- β 'nin indüklediği EMT, kanser ve enflamasyon arasında güçlü bir bağlantı olduğu açıktır (Fuxe et al., 2012).

2.9.2. EMT Mekanizmasının Upstream Regülatör Proteinleri

EMT, epitel hücrelerinin bazal yüzeyleri aracılığıyla bazal membrana tutunmalarını azaltarak, mezenkimal bir fenotip kazanmalarına olanak tanıyan çoklu değişiklikleri başlatır (Dongre et al., 2019) (Şekil 2.7). Mezenkimal fenotip özelliği kazanan hücreler, apoptoza karşı yüksek bir dirence sahiptir ve ECM (ekstrasellüler matriks) bileşenlerinin üretimlerini artırdıkları için bulundukları çevreyi istila etme ve uzak dokulara göç etme yeteneği elde ederler. EMT'yi başlatan ve yöneten ana regülatör proteinlerin fonksiyonları sonucunda, EMT değişimi geçiren mezenkim benzeri morfolojiye sahip hücreler meydana gelir. Bu proteinlerin ekspresyonları ise çoklukla TGF- β yolağı aracılığıyla artmaktadır. Bu transkripsiyon faktörleri, hücre-hücre tutunmalarını kontrol eden proteinleri ve hücrel hareketliliği başlatan bir takım karakteristik sitoskelet proteinlerini transkripsiyonel olarak düzenlemektedir (Fuxe et al., 2012).

E-kaderin (kaderin-1/CDH1) gibi epitelyal genlerin azalan ekspresyon seviyeleri ve vimentin gibi mezenkimal genlerin artan ekspresyon seviyeleri dahil olmak üzere EMT'yi karakterize eden fizyolojik ve morfojenetik değişikliklerin çoğu; Snail (SNAIL1, SNAIL2/Slug ve Smuc), çinko parmak E-box bağlayıcı homeobox Zeb (ZEB1, Zeb-2) ve Twist (Twist-1, Twist-2) aileleri gibi transkripsiyonel regülatör proteinler tarafından düzenlenir.



Şekil 2.7. Tipik bir EMT-MET, MET-EMT mekanizmasının taslağı ve EMT-MET, MET-EMT programlanmasında değişen moleküler faktörler (Dongre et al., 2019)

Bu değişiklikler, epitelyal hücre morfolojisindeki (apikal-bazal polarite kaybı) mezenkimal fenotipe doğru geçiş ile ilişkilidir (Nauseef et al., 2011).

2.9.2.1. TWIST

TWIST1/Twist-1, temel bir helix-loop-helix (bHLH) domaini içeren içeren transkripsiyon faktörüdür. Twist-2, TWIST1 ile bHLH domaini açısından büyük yapısal benzerliği paylaşan Twist ailesinin bir başka üyesidir. Her iki transkripsiyon faktörü de embriyonik gelişim ve organogenezde anahtar düzenleyici proteinlerdir. Çok sayıda çalışma, TWIST1'in çeşitli karsinomlar, sarkomalar ve hematolojik malign tümörlerin köklenmesinde, gelişiminde, anjiyogenezinde, yayılmasında ve kemo-rezistansında rol oynadığını kapsamlı bir

şekilde göstermiştir, Twist-2'nin tümördeki biyolojik fonksiyonları hala oldukça tartışmalıdır veya keşfedilmemiştir (Ansieu et al., 2010).

TWIST1'in kanser biyolojisindeki önemi büyüktür. Aşırı ekspresyonuna bağlı olarak lenf nodu tutulumu veya terapötik başarısızlık, nüksetme ve kötü prognoza işaret eden uzak metastaz içeren yüksek dereceli veya invaziv agresif kanserle ilişkili olduğu bulunmuştur. İlk olarak aynı meme kanserine sahip farklı fare tümör hücre hatlarından izole edilen genlerin profilleri karşılaştırarak Twist1, EMT ve tümör metastazı arasındaki ilişki araştırılmış ve TWIST1 seviyesinin kanserli dokuda oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonraki pek çok çalışma, TWIST1 kaynaklı EMT ve kanser metastazı üzerine araştırmalar yürütmüş, kanserli dokuda TWIST1'in tümör gelişimini teşvik ettiği prostat kanseri (Yuen et al., 2007) de dahil olmak üzere pek çok kanser türünde doğrulanmıştır.

Twist1'in kanserdeki en kritik patolojik işlevi, EMT'yi teşvik ederek tümör istilasını ve metastazı kolaylaştırmaktır. Ayrıca pek çok bulgu, TWIST1'in kanser hücrelerine kök hücre özellikleri kazandırabildiğini göstermiştir. Farklı upstream efektörler ile de transkripsiyonu düzenlenebilen TWIST1, TGF- β sinyal yolağı üzerinden Smad proteinleri aracılığı ile transkripsiyonel olarak düzenlenmektedir (Satoh et al., 2008).

EMT aktivasyonunda TWIST1'in upstream ekektörleri, bir kanser türünden diğerine büyük oranda değişse de downstream efektörleri her zaman N-kaderinin upregülasyonunu ve/veya E-kaderinin downregülasyonunu sağlar. TWIST1'in, prostat kanserinde N-kaderin geninin ilk intronunda yer alan E-box cis-elementi yoluyla mRNA düzeyinde N-kaderini indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca Twist1, E-kaderin promotoruna doğrudan bağlanır ve E-kaderin gen ekspresyonunu baskılar (Alexander et al., 2006).

Eide vd. yaptıkları çalışmalara göre prostat kanseri metastazı ile TWIST1 düzeyi arasında pozitif korelasyon olduğu rapor edilmiştir. Prostata özgül tümör baskılayıcı protein olan NKX3.1'in TWIST1 promotor bölgesine bağlanarak, TWIST1 ekspresyonunu baskıladığı saptanmıştır. Bu da prostat kanserinin metastatik hastalığa ilerlemesi sırasında NKX3.1'in TWIST1 ekspresyonunu düzenlemedeki fonksiyonel önemini vurgulamaktadır (Eide et al., 2013).

2.9.2.2. SNAIL

Yapısal olarak çinko parmak domaini barındıran Snail ailesi üyeleri üzerinde en çok çalışılan EMT transkripsiyonel baskılayıcılarıdır. SNAIL1/Snail-1 ve SNAIL2/Snail-2 ekspresyonlarını indükleyen çok çeşitli sinyal yollarının bulunmasına karşın, daha çok TGF- β sinyal yolağı tarafından etkin bir şekilde düzenlenmektedir. Snail ailesine ait üyeler, Twist ve Zeb ailesi üyeleri dahil olmak üzere, hücre-hücre bağlantılarında önemli bir glikoprotein olan E-kaderin proteini transkripsiyonel düzeyde baskılamak üzere E-kaderin'in promotör bölgesine bağlanırlar (Thuault et al., 2008).

Her2/Neu kaynaklı meme tümörlerinde, nükseden tümörlerin çoğu SNAIL1 gen ekspresyonunu upregüle ettiğinden, Snail1'in meme tümörünün nüksetmesinde önemli olduğu gösterilmiştir. İlginç bir şekilde tekrarlayan tümörlerin aynı zamanda güçlü bir EMT fenotipine sahip olduğu keşfedilmiştir. B16-F10 melanom hücrelerinde SNAIL1'in aşırı ekspresyonu, EMT'yi indüklemekte ve *in vivo*'da tümör metastazını desteklemektedir. Bu etki sadece EMT'nin sağladığı göç ve istila etkilerinden kaynaklanmamaktadır çünkü; EMT değişimi geçiren tümör hücreleri aynı zamanda, ortamda CD4+CD25⁻ Treg immün baskılayıcı hücrelerinin sayısındaki artış sebebiyle dendritik hücre aktivitesinin bozulması yüzünden, tümör hücrelerinin immün sürveyansını da bastırılmaktadır. İmmün düzenleme fonksiyonunun, SNAIL1'in TGF- β ve trombospondin-1 gibi Treg ile indüklenebilir sitokinler üzerindeki etkileri yoluyla elde edildiğine inanılmaktadır (Kudo-Saito et al., 2009).

SNAIL1 proteininin prostat kanserinde de önemli bir rolü olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Mikroarray çalışmalarından elde edilen verilere göre gen ekspresyon profillerini incelendiğinde, normal prostat epiteliyle karşılaştırıldığında SNAIL1'in metastatik PCa'da arttığı belirlendi. İmmünohistokimyasal çalışmalar SNAIL1'in ekspresyon seviyelerinin PCa'nın ilerlemesiyle de arttığını göstermiştir. Ayrıca SNAIL1 transkripsiyon faktörü, PCa'nın ileri aşamaları ve daha yüksek Gleason skoru ile ilişkilendirilmiştir (Heebøll et al., 2009).

SNAIL1, metastatik PCa hücre hatlarında metastazı önleyen protein olarak tanımlanan protein kinaz Raf'ın ekspresyonunu baskılar. Ayrıca SNAIL1, siklin D2 ekspresyonunu baskılayarak hücre proliferasyonunu azaltır. Slug olarak da bilinen SNAIL2, siklin D1 ekspresyonunu baskıladığı için PCa hücre proliferasyonunun negatif bir düzenleyicisidir (Beach et al., 2008). LNCaP ve PC-3 hücrelerinde SNAIL1'in susturulmasının, MET benzeri

bir sürece yol açarak hücrelerdeki epitelyal özelliklerin artmasına, tümör hücresi migrasyonunun ve istilasının azalmasına yol açtığı gözlenmesi, SNAIL1'in metastatik PCa'da terapötik bir hedef olabileceğini ortaya koymuştur (Osorio et al., 2016).

2.9.2.3. ZEB

Yapısal olarak çinko parmak domaini barındıran Zeb ailesi üyeleri ZEB1/Zeb-1 ve ZEB2/Zeb-2'nin Hirschsprung hastalığı ve posterior polimorf kornea distrofisi gibi gelişimsel hastalıklarda mutasyona uğradığı keşfedildiğinden, eksiklikleri durumunda bu hastalıklara sebebiyet verdiği keşfedilmiştir. Patolojik çalışmalar, Zeb-2'nin, EMT'nin yönettiği ve gelişimsel bir süreç olan nöral krest epitel tabakası oluşumu için kritik olduğunu ortaya koymuştur (De Putte et al., 2003). Epitelyal hücrelerde Zeb proteinlerinin ekspresyonu, E-kaderin gen ekspresyonunu güçlü bir şekilde baskılar. Dolayısıyla bu durumun EMT, tümör oluşumu ve metastazda rol önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir.

Zeb proteinlerini transkripsiyon seviyesinde düzenlediği açıkça bilinen sinyal yolları TGF- β , HIF-1a ve Rb tümör baskılayıcı sinyal yollarıdır. Zeb proteinlerinin çeşitli EMT ve tümörle ilişkili genlerin ekspresyonunu da düzenlediği bilinmektedir. Örneğin, plakofilin-2 ve ZO3 gibi epitelyal fenotipi korumada kritik olan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonlarını baskıladıkları gösterilmiştir. Baskılayıcı fonksiyonlarının yanı sıra, MMP ailesi üyelerinden özellikle MMP2 gibi tümör istilasını ve metastazını teşvik eden genlerin ekspresyonunu aktive etmektedir (Zheng et al., 2014).

Zeb ailesi üyeleri, kanser hücrelerinin çoğalmasını ve yaşayabilirliğini önemli ölçüde destekleyebilmektedir. ZEB1 ve Zeb-2'nin, EMT indüksiyonu yoluyla PCa hücrelerinin migrasyonunu ve invazif özelliklerini arttırdığı saptanmıştır. ZEB1 ve Zeb-2'nin fazla ifadesi, PCa'nın kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir. ZEB1 ve Zeb-2'nin seviyesel artışının, PCa ilerlemesi sırasında meydana geldiği ve kanser hücrelerinin tedaviye karşı direnç geliştirmelerine neden olduğu görülmüştür. PRMT1, Smad2 ve kodlamayan RNA'lar, Zeb ailesinin upstream aracıları olarak işlev görebilir. Ayrıca Bax, Bcl-2, MRP1, N-kaderin ve E-kaderin, PCa'da Zeb ailesinin downstream hedefleri arasındadır (soleymani et al., 2021). Androjenlerin neden olduğu yüksek ZEB1 ekspresyonu ile prostat kanserinde yüksek Gleason skorları arasındaki korelasyon, metastatik yayılımın başlangıcını öngörmede biyobelirteç değerinin olduğunu göstermektedir (Anose et al., 2008).

2.9.3. EMT Mekanizmasının Downstream Regülatör Proteinleri

EMT'nin gelişimi sırasında, E-kaderin N-kaderin ile değiştirir, vimentin ve fibronektin, sitokeratinlerin yerini alır. Bu değişiklikler aynı zamanda EMT gözlenen tümörlerde de ortaya çıkar (Usman et al., 2021).

2.9.3.1. Vimentin

Vimentinin metastatik süreçteki rolü *in vitro* çalışmalar ile kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. EMT sırasında, epitelyal hücreler, E-kaderin ve sitokeratinler de dahil olmak üzere epitelyal hücreyle ilişkili genleri downregüle ederek apikobazal polaritelerini ve hücreler arası yapışma özelliklerini kaybederler. Mezenkimal hücre fenotipiyle ilişkili olarak ise N-kaderin ve vimentin gibi genlerin upregülasyonu meydana gelir ve göç etme yeteneğine sahip, istilacı hücrelere dönüşürler (TWIST1, SNAIL1 ve ZEB1'in vimentin genini upregüle ettiği bilinmektedir (Kidd et al., 2014).

Kanser hücresinin bazal membrandan geçerek çevre dokulara istilasını ve kollajen açısından zengin interstisyel boşluk boyunca göçünü kolaylaştıran, proteolitik olarak aktif bir plazma membranı projeksiyonu olan invadopodia'nın oluşumu ve uzaması, vimentin tarafından kontrol edilir. Vimentin, tümör hücrelerinin göçünde gerekli olan ön-arka polaritenin oluşumu için kritik bir öneme sahiptir. Yapılan pek çok çalışma, akciğer, meme, baş ve boyun, kemik kanseri hastalarına ait tümör hücrelerinde, vimentine bağlı mekanizmalar, metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Berr et al., 2023).

Metastatik prostat tümörlerinde gözlemlenen mezenkimal benzeri hücrelerde, vimentin ekspresyonunun EMT gelişimine bağlı olarak arttığı gözlenmiş olup kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. AR nakavt TRAMP tümörleri oluşturulan bir çalışmada, epitelyal belirteçlerden Sitokeratin 8, NKX3.1 ve E-kaderin ekspresyonlarına azalma ve mezenkimal belirteçlerden a-SMA, vimentin ve N-kaderin ekspresyonlarında artış gözlemlenmiş olup, TGF- β 1'in AR nakavt TRAMP tümör hücrelerinde EMT'den sorumlu olduğu ve mezenkimal proteinlerin seviyelerini artırarak hücrelerin metastatik fenotipe dönüşmelerinde belirgin bir etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (Cai et al., 2020).

2.9.3.2. E-kaderin ve N-kaderin

E-kaderin (CDH1) ve N-kaderin (CDH2); P-kaderin, R-kaderin ve M-kaderin ile birlikte klasik tip I kaderinler olarak bilinirler. Olgun E-kaderin proteininin boyutu 120 kDa iken olgun N-kaderin proteininin boyutu 130 kDa'dır. Kaderin sitoplazmik kuyrukları, α -katenin'e bağlanan β -katenin ile bağlanır, böylece kaderin-katenin adezyon kompleksini oluşturarak hücrelerin birbirlerine sıkıca tutunmalarını sağlar. E-kaderin, kaderin süper ailesinin iyi bilinen ana üyelerinden biridir ve güçlü bir tümör baskılayıcıdır, çünkü malign epitelyal kanserlerin çoğunda E-kaderinin downregülasyonu sıklıkla gözlenmektedir. EMT aktivasyonu ile mezenkimal fenotipe dönüşen hücrelerde E-kaderin seviyesinde azalma ve buna karşın N-kaderin seviyesinde artış gözlemlenir, bu EMT fenotipine sahip olan hücreler için karakteristik bir değişimdir. N-kaderin, EMT'nin bir göstergesi olarak hizmet eder ve ekspresyonu, çeşitli karsinom türlerinin gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Loh et al., 2019).

E-kaderin kaybı, ileri prostat tümörlerinde görülür ve yüksek Gleason derecesi ile ilişkili olduğu görülmüştür. EMT biyobelirteçlerinden olan E-kaderin'in, klinikte prostat kanseri hastalığının ilerlemesine sebep olan ekspresyonunun azalması durumu, prognostik bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, radikal prostatektomiye takiben prostat kanseri hastalarında, hastalığın klinik olarak nüksetmesinde, artan N-kaderin'in önemli bir belirleyicisi faktör olduğu ve CRPC'de etkili bir terapötik hedef olduğu gösterilmiştir (Grant et al., 2013). Epitel hücreleri EMT boyunca hücre-hücre yapışma yapılarını gevşetir. Polaritelerini, hücre iskeleti organizasyonunu modüle ederler ve tipik olarak vimentin filamentlerini eksprese ederler ve sitokeratinleri aşağı doğru düzenlerler.

2.9.3.3. Sitokeratinler

Epitel hücreleri EMT boyunca hücre-hücre adezyon yapılarını kaybederek polaritelerini, hücre iskeleti organizasyonunu modüle ederler. Tipik olarak vimentin filamentlerini eksprese ederler ve sitokeratinleri downregüle ederek düzenlerler. Sitokeratin ve vimentin ara filamentleri benzer işlevlere sahiptir. Bu filamentler stres direnci sağlar, sinyal yollarında rol oynar, hücre iskeleti ve hücresel protein komplekslerini destekler. Ancak etkileşim halindeki farklı ortaklardan ve yapılardan kaynaklanan farklılıklar, farklı işlev göstermelerine yol açmaktadır. Epitelyal ve mezenkimal özelliklere sahip kanser hücrelerinin karsinom ilerlemesi ve metastazındaki önemi nedeniyle, vimentin ve sitokeratini birlikte eksprese eden nadir

hücrelerdeki ara filamentlerin özelliklerinin anlaşılması, yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi için kritik öneme sahip olduklarını göstermektedir.

Prostat kanserinde EMT sürecinde sitoskelet elemanlarının organizasyonlarının değişimi üzerine yapılan bir çalışmada, CK8 (sitokeratin8)/vimentin'in (EMT skoru) birlikte ifadesi artan Gleason skoru ile ilişkili bulunmuştur (Cheaito et al., 2019).

2.9.3.4. Fibronektin

Fibronektin (FN), EMT geçiren hücrelerde gözlenen en iyi bilinen biyobelirteçlerden birisidir. Çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda hücresel adezyonu ve migrasyonu düzenler. Fibronektin ECM'de ve plazmada bulunabilir. Fibronektinin EMT sırasında hücrenin nukleusunda lokalize olduğu bulunmuştur. Hücre dışı bir glikoprotein olan fibronektinin, hepatositler tarafından sentezlenip salınan plazma formunda çözünebilir halde bulunabildiği ve fibroblastlar da dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından üretilip salgılanan hücre dışı formda bulunabileceği bilinmektedir (Yamada et al., 1979). EMT biyobelirteçlerinden biri olan artan fibronektin seviyeleri, embriyogenez, yara iyileşmesi ve doku fibrozisinin yanı sıra metastaz ile ilişkilendirilmiştir.

Prostat kanserinde tümöral hücrelerinin agresifliğini artıran fenomen, ECM molekülleri ve bunların parçalayıcı ürünlerinin, hücre yüzeyi integrin ve integrin olmayan reseptörler yoluyla tümör hücrelerinin hareketliliğini ve göçünü artırmasıdır. Hücresel hareketliliği indükleyebilen matris proteinleri arasında, vitronektin, trombospondin, laminin ve tip I ve IV kolajenin yanı sıra fibronektin glikoproteininin seviyesel artışıdır (Ingber, 2002).

2.9.3.5. α -SMA

Normalde epitelyal hücrelerde eksprese edilen α -SMA, embriyogenezde ve yara iyileşmesinde EMT'ye katkıda bulunur. α -SMA'nın ekspresyonu, büyüme faktörleri ve özel ECM proteinleri tarafından kontrol edilir. α -SMA, fibroblastların strese dirençli lifleri olarak bilinir ve doku yeniden yapılanması için kritik olan kasılma yeteneklerini artırır, EMT biyobelirteç proteinlerinden birisidir (Scanlon et al., 2013).

Prostat kanserinde TGF- β 1 aracılı EMT ve AR sinyal yolağı arasındaki moleküler etkileşimleri anlamaya yönelik yapılmış olan bir çalışmada; TRAMP (Fare Prostatı Transgenik Adenokarsinoma Modeli) prostat tümör hücrelerinde AR sinyal yoksunluğunun, E-kaderin seviyesinin azalmasına, vimentin, N-kaderin ve α -SMA seviyelerinin artmasına sebep olduğu gözlenmiştir. Bunun sonucunda, hücre morfolojisinde mezenkimal benzeri değişimler meydana geldiği, yüksek hücre hareketliliği, artan migrasyon yeteneği ve anoikis direncinde artış olduğu bulgulanmıştır (Cai et al., 2020).

2.10. NKX3.1 Proteini ve Prostat Kanserindeki Rolü ve EMT İlişkisi

NKX3.1, bir homeobox genidir ve insanlarda 8. kromozom üzerinde bulunur, 234 amino asitlik bir protein kodlar. Prostatın gelişimi için gereklidir, embriyogenez ve onkogeneze için kritik bir öneme sahiptir (Antao et al., 2021). NKX3.1 alellerinden birinin veya her ikisinin kaybı, prostat tümör oluşumunun hızlanmasına ve daha agresif tümörlerin gelişimine neden olur. NKX3.1'in sağlam kalan allelinde ise herhangi bir mutasyon tespit edilmediğinden, haployetmezlik durumu oluşmakta ve bu nedenle yetersiz bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev gördüğü bilinmektedir (Bowen et al., 2000). NKX3.1, prostatın farklılaşmasındaki tüm evrelerde eksprese edilir ve büyük ölçüde prostat bezinin luminal hücreleriyle sınırlıdır. Androjen spesifik bir şekilde eksprese olur, AR yolağı üzerinden transkripsiyon düzeyinde protein ekspresyonu kontrol edilmektedir. Ekspresyonunun kaybı, prostatik protein sekresyonunda ve kanal morfogenezisinde kusurlara yol açar ve prostat karsinogenezine katkıda bulunur. Allel gen delesyonları, promotör metilasyonu veya post-transkripsiyonel olarak baskılanma nedeniyle, NKX3.1 ekspresyonu genellikle prostat karsinomlarında ve PIN lezyonlarında kayıptır.

NKX3.1, bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilmektedir çünkü ilerlemiş PCa vakalarında ekspresyonunun azaldığı ya da hiç olmadığı görülmektedir. Bu etki insan neoplastik prostat epitelinin immünohistolojik analiziyle de doğrulanmıştır (Shen et al., 2003). Prostat gelişiminin bilinen en eski belirteçlerinden biridir. PCa, diğer epitelyal kanserler gibi öncül lezyonlardan gelişir (prostat için PIN lezyonları). Enflamatuvar mitojenik faktörler tarafından etkilenebilir ve sonuçta lokal invaziv hastalık ve metastaza dönüşebilir. Bu süreçte NKX3.1 geninin kaybı veya fonksiyon yetersizliği prostat kanseri gelişimini güçlü bir şekilde tetiklemektedir (Bowen et al., 2000).

NKX3.1, AR ile düzenlendiği gibi kendisi de AR'nin transkripsiyonunu düzenler ve dolayısıyla PCa hücresinin hayatta kalmasını desteklemede rol oynar. Ayrıca prostat dışı bazı dokularda ve kök hücre özelliklerinin düzenlenmesinde de aktiftir. Prostat rejenerasyonunda kök hücre özelliklerine sahip olan CARN'ler (Kastrasyona dirençli NKX3.1 eksprese eden hücreler) adı verilen nadir bir luminal epitelial hücre popülasyonunda NKX3.1 ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yeniden programlama sırasında Oct4'ü düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon gösterdiği keşfedilmiştir (Antao et al., 2021) Oct4, pluripotensinin devamlılığını sağlayan ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (iPSC'ler) üretiminde ana düzenleyici faktör olarak işlev görür (Kim et al., 2020). Dolayısıyla bir tümör baskılayıcı genin, onkogenik Oct4'ün yerini alması, iPSC'lerin klinik uygulamalarında faydalı olabilecek birçok araştırma yolunu açmıştır (Antao et al., 2021).

Enflamatuvar dokuda, enflamatuvar hücrelerin bol bulunduğu bir mikroçevrede, enflamatuvar sitokinlerden özellikle TNF- α ve IL-1 β aracılıklı olarak NKX3.1'in Serin-195 ve serin-196 rezidülerinden fosforlanarak ubiquitinlendiği ve proteozomal degradasyona giderek parçalandığı bilinmektedir (Markowski et al., 2008). Enflamatuvar mikroçevredeki NKX3.1 kaybının, β -kateninin membran lokalizasyonunu bozucu ve nüklear translokasyonunu artırıcı etkisi ve prostat kanseri hücrelerinin migrasyonunu artırdığı bulunmuştur (Debele-Butuner et al., 2014). Ayrıca, NKX3.1'in bir transkripsiyon faktörü olarak, TWIST1 gibi EMT ana regülatör proteinini transkripsiyonel olarak baskıladığı gösterilmiştir (Eide et al., 2013). NKX3.1 geni susturulduğunda göç etme potansiyelinin arttığı gözlemlenen hücreler, NKX3.1 genini ifade edenlere göre daha agresif fenotipe sahip olduğundan, NKX3.1 kaybının prostat hücrelerinde EMT'nin ileri aşamaları ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca enflamasyon koşullarında, prostat kanseri hücre hattı lenf nodu metastazı olan LNCaP hücrelerinde, EMT sürecinin vimentin ve NKX3.1 ekspresyonları üzerinden düzenlendiği gözlenmiştir (Saydullaeva et al., 2023). Ancak, NKX3.1 kaybının, kronik enflamatuvar tümör mikroçevresinde gerçekleşmesi durumunda, bir hücredeki NKX3.1 ekspresyon düzeyi ile EMT fenotipinin doğrudan korelasyon gösterip göstermediği, ekspresyonunu kontrol ettiği EMT ilişkili başka faktörler olup olmadığı ve EMT sonrası anoikis direncindeki olası rolü hala araştırma konusudur.

2.11. Tümör Mikroçevresindeki Epitelyal-Stromal Hücre Etkileşimleri

Tümörün ilerlemesi ve metastazının, tümör hücrelerinin bulunduğu doku stroması ile etkileşimlerinden kaynaklanan, doku yeniden yapılanması ile yakından bağlantılı olduğu bilinmektedir. Sağlıklı bir epitel dokuda bazal membran, epitel hücreleri ile stroma arasında doğal bir bariyer sağlamaktadır. Transforme olan epitel hücrelerinin çoğalması başlangıçta epitelyal bölmeyle sınırlıdır ve *in situ* karsinomun gelişimine yol açar. İnvazyon, tümör hücresi ile bazal membran arasındaki bağlantının bozulmasına neden olan ve membrana bağlı matriks metaloproteinazların (MT-MMP'ler) aracılık ettiği bir süreçtir (Hotary et al., 2006).

Tümör hücreleri ilk kez bazal membranı aştıklarında ECM ve stromal hücrelerle fiziksel temasa geçerler, tümör ve stromal hücreler arasındaki birtakım moleküler etkileşimleri başlatırlar. Bu durum lokal tümör büyümesi ve tümör hücresinin invazyonunu tetikleyen başlangıç aşamasıdır. Stromal dokunun ana hücre tipleri; fibroblastlar, lökositler, dendritik hücreler ve endotelyal hücrelerdir (Olumi et al., 2000).

Yapılan pek çok araştırmaya göre, tümör hücreleri tarafından salgılanan sitokinler, kemokinler ve proteolitik enzimler, lokal makrofajların, fibroblastlar ve endotelyal hücrelerin aktivasyonuna aracılık etmektedir ve çeşitli lökosit alt gruplarının tümör mikroçevresinde toplanmasını sağlamaktadır (Planche et al., 2011). Aktive olan makrofajlar ve bölgeye toplanan lökositler sitokin, kemokin ve proteolitik enzimlerini hücre dışına salgılayarak ECM bozulmasına yol açar ve bu da bir dizi büyüme faktörünün salınmasına neden olur. Bu büyüme faktörlerinden bazıları anjiyogenezin desteklenmesine katılırken diğerleri fibroblastları ve miyofibroblastları ECM proteinlerini sentezlemeleri ve salgılamaları için uyarır. Bu süreç, yaralanmadan sonraki doku onarımını karakterize eden 'yeniden yapılanma' sürecinden neredeyse ayırt edilemez. Salınan büyüme faktörleri ve ECM bozunma ürünleri, tümör hücrelerinin migrasyon potansiyelinin artmasını, hayatta kalmasını ve çoğalmasını sağlayan kaynaklar sağlar, bu da dokunun yeniden yapılanmasını sürdürür. İnvaziv tümörlerin "asla iyileşmeyen yaralar" olarak nitelendirilmesinin sebebi bu süreçtir (Planche et al., 2011).

Normal prostat dokusu ve prostat adenokarsinomunun her ikisi de oldukça heterojen dokulardır. Luminal epitelyal hücreler, bazal hücreler, az sayıdaki nöroendokrin hücreleri ve tümör hücrelerinin de bir arada bulunduğu bu heterojen tümör dokusu, stromal doku ile çevrelenmiştir. Prostat stromal dokusu, kanser hücrelerinin gelişimi ve hayatta kalmasında,

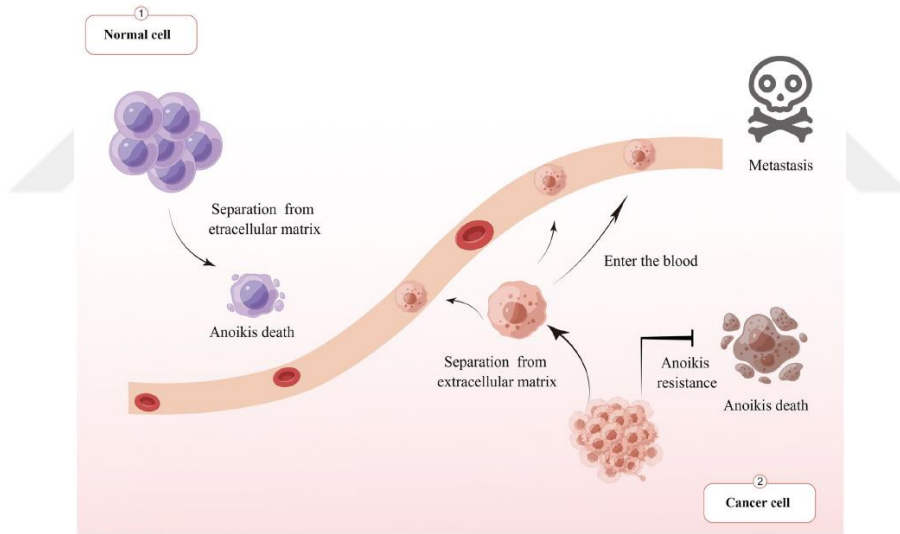
çoğalmasında, invazyonunda ve metastazın gelişiminde önemli bir rol oynar (Taylor et al., 2008). Prostatik stroma çoğunlukla düz kas ve ECM'den oluşur, aynı zamanda sinirleri, lenfatikleri ve kan damarlarını da içerir. Mevcut diğer hücre tipleri arasında stromal hücreler (fibroblastlar ve miyofibroblastlar), endotelyal hücreler, perisitler ve enflamatuvar hücreler (yerleşik mast hücreleri) bulunur ve tümü prostat mikroçevresini oluşturmaktadır. PCa tümör gelişimi, ilerlemesi, invazyonu ve tümör hücrelerinin çeşitli terapötiklere yanıt verme potansiyelini belirleyen, bu bileşenlerin birleşik etkisi ve etkileşimidir (Joesting et al., 2005).

Prostat tümör mikroçevresinin doğru bir şekilde modellenmesi, kanser hücrelerinin birbirleriyle ve ECM ile olan etkileşimlerinin anlaşılması için kritik öneme sahiptir. PC-3, LNCaP ve DU 145 gibi metastatik hücre hatları, kolaylıkla temin edilebilir, kültürleri kolaydır. Hücresel davranışları ve tepkileri açısından tutarlılık sergiler. Bu hücrelerin klasik 2D kültürleri, araştırma bulgularının farklı laboratuvarlarda kolaylıkla çoğaltılmasına olanak tanır, elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği yüksektir. Ayrıca PCa hücre hatlarının 2D kültürü, olası gen hedeflerinin hızlı ve etkili bir şekilde belirlenmesinin yanı sıra parakrin etkilerin haricinde hücre içi moleküler mekanizmaların tanımlanması için faydalı modellerdir (Ellem et al., 2014). Fakat 2D kültürler tümör mikroçevresinin incelenmesi konusunda yetersiz modellerdir. Çünkü spesifik olarak bu sistemler tek hücrelidir, bir bazal membrandan yoksundur, ECM içeriği defektlidir veya hiç yoktur. Üçüncül yapı yoktur, stromal ve enflamatuvar bileşenler yoktur. Hücre davranışı, hücre morfolojisi, polarite, reseptör ekspresyonu, proliferasyon, migrasyon, apoptoz, hücre farklılaşması, onkogen aktivasyonları, ECM (bazal membran dahil) ile etkileşimlerin anlaşılması için 3D gibi *in vivo* kültürlerle oldukça yakın olan daha gelişmiş kültür modellemelerine ihtiyaç duyulmaktadır (Baker et al., 2012).

Epitelyal-stromal hücre etkileşimi ve ECM'nin rolünün araştırılması açısından klasik 2D mono kültürlerinin biraz daha gelişmiş modeli olarak 2,5D kültür modeli olarak da bilinen ko-kültür çalışmaları ve 3D kültür modelleri, PCa tümör mikroçevresinin etkileşimini anlama açısından önemlidir. Bu tür kültür modelleri, epitelyal ve stromal hücreler arasındaki parakrin faktörlerin aracılık ettiği etkileşimlerin anlaşılması açısından kritiktir. Prostat tümör mikroçevresinin ve tümör dokusu mimarisinin anlaşılması için daha pek çok kültür modellerinin ortaya konulmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Ellem et al., 2014).

2.12. EMT Değişimi Geçiren Hücrelerin Apoptoz Direnci: “Anoikis”

Anoikis, yetersiz hücre-matriks etkileşimleri üzerine meydana gelen apoptotik hücre ölüm yolağı olarak tanımlanmaktadır. Etimolojik olarak anoikis terimi, Yunanca “anoikos, evsiz kalmak” yani evsiz kelimesinden türemiştir. Mikroçevredeki yetersiz hücre-matriks etkileşimlerinin sonucu olarak ECM’den ayrılan epitel ve endotel hücrelerin programlı ölümünü tanımlamak için kullanılır (Frisch et al., 2001). Anoikis, kanser metastazının gelişiminde kritiktir, çünkü tümör epitel hücreleri primer tümör bölgesinden çıktıklarında, dolaşımda gezinti sırasında apoptoza uğrayabilir ve metastatik yolculuktan önce ölebilir (Han et al., 2023) (Şekil 2.8). Anoikis'e karşı direncin gelişimi ve süreci yönlendiren mekanik ve fenotipik kontroller, tümör anjiyogenezi ve metastazı ile ilişkilendirilmiştir, çünkü anoikis gibi hücre ölümüne karşı direnç kazandıran mekanizmalar, metastatik lezyonlar oluşturmak için tümör hücrelerinin göçmen ve invazif özelliklerinin kazanılmasını sağlar (Tan et al., 2013).



Şekil 2.8. Hücre dışı matrikse tutunmayı kaybeden normal hücrelerin ve metastatik tümör hücrelerinin kaderi. 1) Hücre dışı matriksten kopan anoikise duyarlı hücrelerin ölümü: Anoikis 2) Hücre dışı matriksten kopan, anoikise dirençli kanser hücrelerinin sağkalımı: Anoikis direnci (Han et al., 2023)

EMT süreci ve MET bağlı hücresel trans-diferansiyasyonlardan kaynaklanan plastisite, tümörün ilerlemesine ve metastaza kritik bir şekilde katkıda bulunur. EMT'nin kanserdeki rolü, tümör hücrelerinin fiziksel olarak birbirlerinden ayrılması gerektiği için kritiktir. Primer tümörler, mikroçevreyi istila eder, damar içine girer, kan akışındaki dolaşımın türbülansına katlanır, damar dışına çıkar ve ikincil bölgelere geçer. Anoikis ve EMT arasında bir ilişki

olduğu ve kanser hücrelerinin hayatta kalmalarını teşvik ettiği düşünölmektedir (Rennebeck et al., 2005).

Androjen bağımsız prostat tümörleri, EMT sürecinde kazanılan invaziv ve metastatik özellikler nedeniyle anoikis direnci göstererek, anti-androjen tedavisi ve radyoterapi gibi standart tedavi yöntemlerine karşı direnç geliştirir. CRPC'nin ortaya çıkışı, apoptozun baskılanması, anoikis direnci, anormal androjen sinyalinin varlığı ve artan neovaskülarizasyon dahil olmak üzere hayatta kalma yollarının aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. Apoptotik sinyal yollarının moleküler keşfi, ileri metastatik CRPC'nin tedavisi için etkili farmakoterapilerin geliştirilmesini hızlandırmıştır (Cao et al., 2016).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Cihaz

- Sınıf II güvenlik kabini (Esco-Sentinel Gold)
- CO₂'li inkübatör (NUAIRE)
- Etüv (NUVE-FN120)
- Otoklav (HIRAYAMA)
- Bakteri inkübatörü (Innova 42, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, ABD)
- Floresan ekli invörted ışık mikroskobu (Leica DMIL)
- Floresan mikroskobu (Leica)
- Soğutmalı santrifüj (Thermo Fisher SL16R)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich-Mikro 200R)
- Soğutmalı santrifüj (Allegra X-15R)
- Mini benchtop santrifüj (Hoefer)
- pH metre (Seven Go Duo SG 23, Mettler Toledo, Schwerzenbach, İsviçre)
- Manyetik karıştırıcı (Wisd, MSH-20A)
- Blok ısıtıcı (BioTDB-100)
- Agaroz jel elektroforez sistemi (Benchmark Scientific, My gel mini model))
- Spektrofotometre (Thermo Fisher, Varioscan Flash)
- Nanodrop (Nano-400A)
- PCR cihazı (TECHNE TC-3000X)
- RT-PCR LC-480 II (Roche, Almanya)
- SDS jel Ekipmanı (BioRad-1658000)
- Güç kaynağı (Thermo Fisher, EC1000-90)
- Güç kaynağı (EC1000-XL)
- Western blot transfer aparatı (C.B.S. Scientific, EBX-700)
- Çalkalayıcı (Basic 2, IKA-Werke, Jake & Kunkel Str., Almanya)
- Çalkalayıcı (Heidolph, DUOMAX 1030)
- Sonikatör (HD 270-MS 72 prob)
- Vorteks (MS 1 minishaker, IKA-Werke, Staufen, Almanya)

- Agaroze jel görüntüleme cihazı (Syngene)
- Syngene-analiz laptop (Acer)
- FusionX7 western blot görüntüleme cihazı
- Soğutmalı santrifüj (Sigma 4K15)
- Su banyosu (Memmert- WNB 10)
- Su banyosu (E 100 RE 107, Lauda, Königshofen, Almanya)
- Hassas terazi (BP121S ve BL600, Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, Almanya)
- Hassas terazi (Shimadzu-ATX224)
- Ultra saf su cihazı (Millipore, MiliQ)
- Mikrodalga fırını (MW211W, Ariston, İtalya)
- Buzdolabı (4 adet; Samsung, Regal, Thermo Fisher, Ariston)
- (-)86°C derin dondurucu (3 adet; NUAIRE, New Brunswick Scientific-U410)

3.1.2. Sarf Malzemeler

- Cell proliferation reagent WST-1 (Roche, 0015944001)
- RNase inhibitörü (Promega- N251B)
- Hemositometre (Neubauer)
- pcDNA3.1/HisMax vector
- pcDNA3.1/HisMaxNKX3.1 vector
- si/shRNA diluent RNase-free water (C2714)
- siNKX3.1 (Santa Cruz, sc-36077)
- scrRNA (Dharmacon)
- DNase I (Qiagen)
- %0,4 Tripan mavisi solüsyonu (Sigma, T-8154)
- Plazmid izolasyon kiti (Qiagen, 12643)
- Plazmid izolasyon kiti (GeneJET, 12643)
- TNF- α elisa kit (Invitrogen, KHC3011)
- TGF- β 1 elisa kit (EK0392)
- Anoikis kiti (Abcam, ab211153)
- RNeasy RNA izolasyon mini kiti (Qiagen, 74104)
- Omniscript cDNA çevirim kiti (Qiagen, 205111)
- RT-PCR (EMT) kit (Qiagen, SaBiosciences- 330502)

- RT² Real time SYBR green PCR master mix (SaBiosciences, PA-010)
- Memeli hücreleri için besiyeri RPMI 1640 (Gibco, 52400)
- Memeli hücreleri için besiyeri DMEM:F12 (Gibco, 31330)
- Fötal dana serumu (FBS) (Gibco, 10270)
- Trypsin-EDTA (Gibco, 3103382)
- Pensilin/Streptomisin (Gibco15140)
- L-Glutamin (Gibco, 25030)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate PMA (Sigma, P1585)
- Lipopolisakkarit LPS (Sigma, L3024)
- DMSO (Merck, A3672)
- Ampisilin (Mustafa Nevzat İlaç San.)
- LB besiyeri (Bioshop, LBL405.500)
- Agar (Millipore, 05039-500G)
- Gliserol (Sigma, G5150)
- Jel elektroforesi için Agaroza (Biomax, 000525PR)
- Formaldehit (Sigma,15512-2.5L-R)
- 22X22 mm No: 1 lamel (Marienfeld, 0101050)
- PolyHEMA (Sigma, P3932-10G)
- Poly-D Lysine (Gibco, A38904-01)
- Dharmafect-I (Dharmacon, T-2001-02)
- Dharmafect-II (Dharmacon, T-2002-02)
- Lipofectamine RNAiMAX (P/N56531)
- Trizol
- Kloroform
- Resazurin
- Filtreler-0,2µm-0,4µm (Sartorius Minisart, Sartorius Biotech GmbH, Goettingen, Almanya)
- Proteaz inhibitor kokteyli (LSG-A32961)
- Fosfataz inhibitör kokteyli (Roche, 04906837001)
- NaF 100X (100mM), (Merck, B815549 606)
- NaVO₃ 100X (200mM) (Fluka, 72060)
- PMSF 100X (100 mM) (Fluka, 93482)

- 15 ml ve 50 ml'lik falkon tüpleri (Jet Biofil, CFT-011-150)
- 10 cm'lik hücre kültürü kapları (Greiner Bio-one CELLSTAR),
- 6 cm'lik hücre kültürü kapları (Greiner Bio-one CELLSTAR),
- 6 kuyucuklu hücre kültürü kapları (Biofil)
- 24 kuyucuklu hücre kültür kapları
- 0,4 um por çapına sahip ko-kültür transwell kültür kapları
- 8 mm por çapına sahip migrasyona uygun transwell kültür kapları
- 1 litrelik mezur (IsoLab)
- 500 mililitrelik mezür (IsoLab)
- 250 mililitrelik Mezür (IsoLab)
- 100 mililitrelik mezür (IsoLab)
- 500 mililitrelik erlen (IsoLab)
- 250 mililitrelik erlen (IsoLab)
- 2,5- 5- 10 ve 25 ml hacimli steril pipetler (Orange)
- Kriyotüp (Nest, 607001)
- Pastör pipeti (Superior, 323140)
- 1-10, 20-200 ve 100-1000 µl otomatik pipetler
- Pipet uçları (Nest)
- Eppendorf tüpler (Nest)
- 10 cm bakteriyel kültür kabı (IsoLab)
- Microplaka
- Supersignal West Pico Plus (LSG-34577)
- iBright protein marker (LC5615)
- 1 kb ve 100 kb DNA marker
- 5X Loading dye (Bioline- BIO-37045)
- 5X Loading dye (Fermentas-R0611)
- Hücre kazıyıcı (Nest, 710011)
- Parafilm (Bemis)
- Otoklav bandı (VM00402)
- Blotting paper (MN, 742115)
- BioRad Mini SDS-gel ekipmanları
- Tween-20 (Sigma, E1383)

- Triton X-100 (Sigma, T8787)
- Sodyum deoksikolat (Sigma, D6750)
- Tris Bazı (Sigma, T-1503-500G)
- Glisin (Sigma, 1.00590.1000)
- SDS (Sigma, L3771-100G)
- Yağsız süt tozu (AppliChem, A0830,0500)
- BSA (Sigma)
- EDTA (Sigma, E5134-250G)
- EGTA (Sigma, E3889-10G)
- NaCl (Sigma, 1.06404.1000)
- IGEPAL (Sigma, 18896-50ml)
- KCl (Atabay, AT072-S50)
- Na₂HPO₄.2H₂O (Merck, K22287176)
- Polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membranı (Roche, 03010040001)
- Polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membranı (Thermo Fisher, 88518)
- Asetat kağıtları
- 5, 20 ml steril enjektör (GeneJet)
- Adi etanol (Tekkim, TK.200650.02501)
- Absolute Etanol (Tekkim, TK911015.02501)
- İzopropanol (Tekkim, TK.090250.02501)
- Glasiyel asetik asit (Merck, 1.00063.2511)
- % 4 Paraformaldehit pH:7.8 (AppliChem, A3813)
- %100 Methanol (Tekkim, TK.120320.02501)
- %37'lik HCl (Sigma, 07102-2.5L)
- Gliserol (AppliChem, A2926,0500)
- Etidyum Bromür (Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Almanya)
- TAE tamponu, pH: 8,0 (4,84 gr Trizma bazı, 1,41 ml glasiyal asetik asit, 3,7 gr Na₂EDTA, 1 l L-dH₂O)
- 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Biolegend, 422801)
- 30nM DAPI (% 30 gliserol %70 PBS içerisinde hazırlanan mounting medium)
- RIPA Tamponu (10 mM TrisCl pH: 8,0 %0.1 SDS, % 1 Triton X-100, % 0.1 Sodyum Deoksikolat, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 140 mM NaCl)

- RIPA Modified Tamponu (50 mM TrisCl, pH: 7.4, 1% NP-40 (IGEPAL), 0.25% Sodyum Deoksikolat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)
- BCA kiti (Sigma, QPBCA)
- Acrylamide-Bisacrylamide/%40 solution (Bioshop, ACR003.500)
- 4X SDS-PAGE ayırma jel tamponu (1.5 M Tris/HCl %0.4 SDS, pH: 8.8)
- 4X SDS-PAGE depolama jel tamponu (0.5 M Tris/HCl %0.4 SDS, pH: 6.8)
- Amonyum Persülfat (APS) (Sigma, A3638-100G)
- TEMED (Sigma, T9281)
- Brom fenol mavisi (Merck, L54971322-525)
- Coomassie Brilliant Blue R (Sigma, B-8647)
- 1X, 1L SDS-PAGE jeli yürütme tamponu (3.0 gr Trizma bazı, 14,4 gr Glisin, 1.0 gr SDS)
- 4X Yükleme tamponu (40 mM Tris HCl (pH:8.0) 0.4 mM EDTA, % 4 SDS, % 20 Gliserol, Brom fenol mavisi 200 µl).
- 1X, 1L SDS-PAGE jel transfer tamponu (%20 metanol, 3.0 gr Tris bazı, 14,4 gr Glisin)
- Beta-mercaptoetanol (Sigma, M3148)
- 10X, 1 L TBS, pH:8.0 (2,1 gr Tris bazı, 80.0 gr NaCl)
- Membran yıkama tamponu (% 0.1 Tween 20 içeren 1X TBS-T tamponu)
- 1X Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline/PBS-pH: 7.4) (8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1,57 gr Na₂HPO₄·2H₂O)
- Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (JIR-111-035-003)
- Peroxidase-conjugated AffiniPure Sheep Anti-Mouse IgG(H+L) (JIR-515-035-003)
- Anti-mouse IgG horse radish peroxidase (HRP) (Jackson Immunoresearch)
- Anti-mouse IgG (Invitrogen Molecular Probes, Alexa Fluor 594) (Invitrogen, A11005)
- Alexa Fluor™ 594 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen-A-11012)
- Alexa Fluor™ 594 Donkey anti-Mouse IgG (H+L) (Invitrogen-A-21203)
- NKX3.1 antikoru (Santa Cruz, sc-393190 ve Dr. F. Saatçioğlu Lab Oslo Üniversitesi)
- TWIST1 antikoru (Santa Cruz, sc-81417)

- TWIST1 antikoru (Invitrogen-MA5-17195)
- SNAIL1 antikoru (Santa Cruz, sc-271977)
- SNAIL1 antikoru (Invitrogen-MA5-14801)
- SNAIL2 antikoru (Santa Cruz-sc-166476)
- ZEB1 antikoru (Santa Cruz-sc-515797)
- Vimentin antikoru (Santa Cruz-sc-32322)
- Fibronektin antikoru (Santa Cruz-sc-8422)
- E-kaderin antikoru (Santa Cruz, sc-8426)
- N-kaderin antikoru (Santa Cruz)
- Sitokeratin-8 antikoru-CK-8 (Santa Cruz-sc-8020)
- α -SMA antikoru (Santa Cruz-sc-53142)
- FAK antikoru (Santa Cruz-sc-1688)
- p-FAK antikoru (Santa Cruz-sc-81493)
- GAPDH antikoru (Ambion, AM4300)
- β -aktin antikoru (Sigma, A3854)
- AR antikoru (Millipore, 06-680)
- . LNCaP (insan prostat karsinomu lenf nodu metastazı hücre hattı-yüzeye bağlı-anrojene yanıt oluşturan hücre hattı) (ATCC)
- PC-3 (insan prostat karsinomu kemik metastazı hücre hattı-yüzeye bağlı-kastrasyon dirençli hücre hattı) (ATCC)
- DU 145 (insan prostat karsinomu beyin metastazı hücre hattı-yüzeye bağlı-kastrasyon dirençli hücre hattı) (ATCC)
- WPMY-1 (prostat miyofibroblastı, kanserli olmayan-yüzeye bağlı normal hücre hattı) (ATCC)
- U937 (monosit hücre hattı- süspande) (ATCC)

3.2. Metot

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Hücrelerin bakımı ve pasajlanması

LNCaP hücre hatları, içerisine % 10 FBS, %1 L-glu, %1 P/S eklenen RPMI ile; WPMY1, DU 145 ve PC-3 hücre hatları, içerisine %5 FBS, %1 L-glu, %1 P/S eklenen DMEM:F12 ile; U937 monosit hücre hatları, içerisine % 10 FBS, %1 L-glu, %1 P/S eklenen RPMI besi yeri ile beslenerek 37°C ısıtmalı ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edildi. U937 hücrelerinin kültüre edildiği RPMI içerisindeki FBS 2 kez inaktive edildi. Hücrelerin ortamı iki günde bir taze besi ortamı ile tazelandı. Hücreler, 10 cm ebatlarındaki kültür kaplarında 8 mililitre, 6 cm ebatlarındaki hücre kültür kaplarında 2 mililitre, 6 kuyucuklu kültür kaplarında ise 1 mililitre besiyeri içinde, 37°C ısıtmalı %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Hücreler, kültür kabının tüm yüzeyini kaplayacak kadar çoğaldıklarında pasajlandı. Yüzeye tutunarak çoğalan monolayer hücrelerin pasajlanması için aşağıdaki adımlar uygulandı:

- Steril cam pastör pipetleri kullanarak aspiratör cihazı ile hücrelerin eski besi ortamı uzaklaştırıldı.
- Kültür kaplarının yüzeyi tripsin uygulamasının etkisini arttırmak üzere steril PBS (Ca⁺² ve Mg⁺² negatif) ile bir defa yıkandı.
- PBS uzaklaştırıldıktan sonra 700µl (10 cm kültür kapları için) tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37°C ısıtmalı, %5 CO₂ içeren inkübatörde, hücreler yüzeyden kalkıncaya kadar yaklaşık 1-7 dakika bekletildi. (Tripsin ile muamele hücreler arası fark göstermektedir).
- Tripsini nötralize etmek üzere hücrelerin üzerine, hücre konsantrasyonuna uygun olacak hacimde taze besiyeri eklendi ve hücreler pipet yardımıyla resüspande edildi.
- Resüspande edilen hücreler yeni kültür kabına alınarak üzerine teze besiyeri ilave edildi ve büyümeleri için 37°C ısıtmalı, %5 CO₂ içeren inkübatörde büyümeye bırakıldı.

3.2.1.2. Hücrelerin (-)86°C'de saklanması ve çözündürülmesi

Hücrelerin uzun süre kültürü yapıldığında karyotipik olarak değişime uğramaktadırlar ve morfolojileri çok fazla değişmektedir. Bu da normal büyüme rutinlerinde ve fonksiyonlarında

farklılıklara sebep olmaktadır. Dondurulan hücreler ise özelliklerinde değişim olmadan 3-5 sene boyunca saklanabilmektedir. Aynı pasaj sayısına ait hücreler farklı zamanlarda kullanılabilir. Bu nedenle çalışma süresinde hücreler belirli pasaj sayılarında donduruldu. Hücre dondurulması prosedüründe, buzlanmanın sebep olduğu patlatıcı etkiden hücreleri korumak üzere kriyoprotektan olarak DMSO kullanıldı. Hücreler pasajlandıktan sonra dondurulacak olan hücreler, %30 FBS içeren taze besiyerine alındılar ve ortam içerisine %5 DMSO eklendi. Kriyotüplere 1-1,5ml hacimde paylaştırıldıktan sonra (-)86°C derin dondurucuya koyuldu. Çözdürülmek istenen hücrelerin bulunduğu kriyotüpler, (-)86°C derin dondurucudan çıkarıldıktan sonra hızlı bir şekilde 37°C su banyosuna yerleştirildi. Bu aşamanın hızlı bir şekilde yapılması, hücrelerin osmotik şoktan ölmemesi için kritiktir. Çözdürülen hücreler, 8 mililitre taze besi ortamı koyulan petri kaplarına aktarıldı ve nazıkçe çalkalanarak hücrelerin petri içerisinde eşit dağılımları sağlandı. Kültür kaplarına tutunmaları ve çoğalmaları için 37°C ısıtılmalı, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

3.2.1.3. Hücrelerin mikroskopta sayımı

Farklı deney prosedürlerinin önerdiği sayılarda hücre ekiminin yapılabilmesi için, stok kültür petrisinde büyüyen hücrelerin sayısının bilinmesi gerekmektedir. Kültür kabının her yerini dolduracak şekilde yoğunlaşan hücrelerin pasajı yapıldıktan sonra hemositometre ile mikroskopta sayımları gerçekleştirildi.

- Tripsin ile kültür yüzeyinden kaldırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak üzerine 90 µl tripan mavisi eklendi ve hacim 100 µl'ye tamamlandı. Yani 10¹ katlık bir seyreltme yapılmış oldu.
- Hücreler tripan mavisi ile birkaç kez pipetle karıştırılarak resüspande edildi.
- Karışımdan 10 µl hacim alınarak hemositometre üzerindeki her iki alana eklendi.
- Hemositometrenin her iki alanında yer alan, 9 adet farklı boyutlardaki kareler üzerine düşen parlak hücreler sayıldı. Parlak hücreler canlı hücreleri temsil etmektedir, ölü hücreler ise membran bütünlükleri bozulduğu için boyayı içerisine alan mavi renkte gözlenen ölü hücreleri temsil ettiğinden bu hücreler sayıma dahil edilmedi.
- Mililitre başına denk düşen hücre sayısını belirleyen formül aşağıda yer almaktadır:

$$\text{Mililitredeki hücre sayısı} = \text{Sayılan canlı hücre sayısı} \times \text{Seyreltme faktörü} (10^1) \times (10^4)/9$$

3.2.2. Transfeksiyon

234 aminoasitlik NKX3.1 açık okuma çerçevesini (open reading frame) içeren cDNA dizisinin klonlanmış olduğu pcDNA3.1/HisMax-TOPO (Invitrogen) ekspresyon plazmidi kullanılarak NKX3.1 ektopik ekspresyonu gerçekleştirildi.

Transfeksiyon işleminden iki saat önce hücrelerin bulunduğu eski besiyeri uzaklaştırıldı. Serum ve L-glutamin içeren fakat antibiyotik içermeyen besi ortamı ile hücrelerin ortamı tazelendi. Bir tüp içerisinde Dharmafect-I veya Dharmafect-II (transfeksiyon reaktifi) ile serum, L-glutamin ve antibiyotik içermeyen besi ortamı karışımı hazırlandı. İkinci bir tüp içerisinde vektör DNA ile serum, L-glutamin ve antibiyotik içermeyen besi ortamı karışımı hazırlandı ve tüpler nazikçe çalkalanarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından tüpler içerisindeki karışımlar birleştirildi ve tek bir tüpte toplandı, oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda oluşan kompleks hücrelerin üzerine mikropipet ile damla damlatıldı ve hafifçe çalkalanarak 24-48 saat inkübasyon için 37°C ısıtmalı, %5 CO₂ içeren inkübatöre koyuldu (Overekspresyon deneyleri için, transfeksiyon reaktifi/vektör oranı; 3(reagent):1(vektör DNA) olarak optimize edildi).

3.2.3. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi, RT-PPCR (EMT) Array

Madde uygulamaları ile ilişkili deneysel aşamalar tamamlandıktan sonra, RNA izolasyonu için hücrelerin besiyeri atıldı ve PBS ile bir kez yıkama yapıldı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelletleri RLT tamponu ile eppendorf tüplere alındı. Sonrasında RNeasy (Qiagen) kiti kullanıldı ve total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların miktarı ve saflığı nanodrop cihazında ölçüldü. Elde edilen RNA (500 ng) örnekleri, agaroz jelinde (%2 konsantrasyonunda ve %1 formaldehit ile hazırlanan) yürütüldü. Tipik bir RNA agaroz jelinde gölzenmesi gereken 28S ve 18S ribozomal RNA'ların kontrolü yapıldı. mRNA'lar smear şeklinde gözlendi. İzole edilen RNA örneklerinden cDNA üretimi için, Qiagen markanın Omniscript cDNA sentezleme kiti kullanılarak, 2 µg RNA'dan cDNA üretimi gerçekleştirildi. First strand cDNA sentez kiti ile cDNA çevrimi kitin önerdiği protokole uygun olarak yapıldı. Ekspresyon düzeylerinin analizlenebilmesi için SABiosciences RT² Profiler™ Human EMT-PCR arrayleri ve analizleri firmanın önerdiği protokole göre 3 tekrarlı olarak uygulandı. LC-480 RT-PCR cihazında okumalar gerçekleştirildi.

Elde edilen Ct değerlerinden öncelikli olarak ΔCt değerleri hesaplandı. Bunun için hücrelerdeki ekspresyonu her zaman aynı olan ve örnekler arası fark göstermeyen GAPDH “housekeeping” genine ait Ct değerleri örnek gruplarının Ct değerlerinden çıkarıldı. Daha sonra test grubuna ait ΔC değerlerinden kontrol grubu ΔCt değerleri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değerleri hesaplandı. Kat değişimleri ise $2^{\Delta\Delta Ct}$ hesaplaması üzerinden logaritmik olarak elde edildi. Uygulanan EMT-RT-PCR array’in içerdiği EMT ilişkili gen listesi tablo 3.1’de görülmektedir.

Tablo 3.1. RT² Profiler™ PCR Array (Human-EMT) ile analiz edilen genlerin olduğu tablo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AHNAK	AKT1	BMP1	BMP2	BMP7	CALD1	CAMK2N1	CAV2	CDH1	CDH2	COL1A2	COL3A1
B	COL5A2	CTNBN1	DSC2	DSP	EGFR	ERBB3	ESR1	F11R	FGFBP1	FN1	FOXC2	FZD7
C	GNG11	GSC	GSK3B	IGFBP4	IL1RN	ILK	ITGA5	ITGAV	ITGB1	JAG1	KRT14	KRT19
D	KRT7	MAP1B	MMP2	MMP3	MMP9	MSN	MST1R	NODAL	NOTCH1	NUDT13	OCLN	PDGFRB
E	PLEK2	PPPDE2	PTK2	PTP4A1	RAC1	RGS2	SERPINE1	SIP1	SMAD2	SNAI1	SNAI2	SNAI3
F	SOX10	SPARC	SPP1	STAT3	STEAP1	TCF3	TCF4	TFPI2	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TIMP1
G	TMEFF1	TMEM132A	TSPAN13	TWIST1	VCAN	VIM	VPS13A	WNT11	WNT5A	WNT5B	ZEB1	ZEB2
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

3.2.4. RNA İzolasyonu cDNA Kütüphanesi Oluşturma ve Illumina ile Yeni Nesil Sekanslama

Yeni nesil sekanslama analizlerinde DU 145 hücreleri kullanıldı. Hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonunda Trizol/kloroform yöntemi kullanıldı. İzole edilen RNA'ların miktarı ve saflığı nanodrop cihazında ölçüldü. Elde edilen RNA (500 ng) örnekleri, agaroz jelinde (%2 konsantrasyonunda ve %1 formaldehit ile hazırlanan) yürütüldü. Tipik bir RNA agaroz jelinde gölzenmesi gereken 28S ve 18S ribozomal RNA'ların kontrolü yapıldı. mRNA'lar smear şeklinde gözlemlendi. RNA örneklerinden cDNA kütüphanesi oluşturmak için hizmet alımı yapıldı ve RNA örnekleri 'Agrigenomiks'e gönderildi. Illumina cihazı ile ekspresyonları farklılaşmış genlerin (DGE) analizleri gerçekleştirildi. Ham veriler ileri biyoinformatik analizleri için toplandı. Referans genom ve anotasyon kullanılarak elde edilen RNA dizileme verilerini analiz etmek için tasarlanmış bir işlem akışı uygulandı. Bu akış, örnekleme tablosu ve FASTQ formatındaki dizileme verilerini girdi olarak almakta ve ardışık adımlarla veri kalitesini kontrol etmektedir (FastQC). Verileri kırpma (UMI-tools, Trim Galore) ve (psödo-) hizalama işlemleri gerçekleştirildikten sonra, okumaların hangi gen veya

transkriptlerden geldikleri belirlendi (STAR -> Salmon). Ardından veri kalitesi değerlendirilerek olası hatalar, kontaminasyonlar veya teknik sorunlar tespit edildi. Gen ekspresyonunu gösteren bir matriks oluşturularak kapsamlı bir QC raporu sunuldu. İşlem adımlarında; tekrar dizilenen FASTQ dosyalarının birleştirilmesi, alt-örneklem alma, otomatik yönlendirme çıkarılması, okuma kalitesinin kontrol edilmesi, UMI çıkarma, adaptör ve kalite kırpma, genom kontaminantlarının temizlenmesi ve ribozomal RNA'nın kaldırılması gibi adımlar bulunmaktadır (SAMtools, UMI-tools, picard MarkDuplicates, picard MarkDuplicates, StringTie, BEDTools, bedGraphToBigWig). Ayrıca çeşitli hizalama ve niceliklendirme yöntemleri seçilerek transkript birleştirme ve gen ekspresyonu niceliklendirmesi yapıldı (RSeQC, Qualimap, dupRadar, Preseq, DESeq2). Son olarak kalite kontrolü için çeşitli araçlar kullanılarak detaylı QC analizleri gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar raporlandı (Salmon and 'Kallisto', MultiQC, R).

3.2.5. İmmünofloresan

3.2.5.1. Hücrelerin hazırlanması

%70 etanol ile temizlenen lameller, 6 gözlü kültür kaplarına yerleştirildi. LNCaP hücreleri 5×10^5 , PC-3 hücreleri $2,5 \times 10^6$, DU 145 hücreleri 5×10^5 yoğunluğunda olacak şekilde sayılarak lameller üzerine ekildi. LNCaP hücreleri 48 saat, PC-3 ve DU 145 hücreleri 24 saat olmak üzere inkübatörde kültür edilerek hücrelerin lamel yüzeyine tutunmaları sağlandı. Madde ve transfeksiyon uygulamaları belirlenen doz ve sürelerde yapıldıktan sonra kültür sonlandırıldı.

3.2.5.2. Hücre fiksasyonu ve bloklama işlemi

- Hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile bir defa yıkandı.
- Fiksatif olarak %100 metanol eklendi ve (-20°C) 'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bazı işaretlemeler için fiksatif olarak metanol yerine %4 paraformaldehit kullanıldı, oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- PBS ile 1 defa yıkama yapıldı.
- %0,2 Triton X-100 eklendi, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- PBS ile bir defa yıkama yapıldı.

- Bloklama işlemi için %1 BSA eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon yapıldı.

3.2.5.3. Antikor işaretleme

- Uygulama dilüsyonları optimize edilen primer antikorlar, %1 BSA içeren PBS içine uygun hacimlerde eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan primer antikor solüsyonundan 50'şer µl alınarak lameller üzerine damlatıldı. Kuruma olmaması için lamellerin üzerine, lamel boyutunda kesilen parafilmli kapatıldı ve 37°C'de 1 saat inkübasyon gerçekleştirildi.
- Süre sonunda 4 defa PBS yıkaması yapıldı.
- Uygulama dilüsyonları optimize edilen sekonder antikorlar (Alexa Fluor) %1 BSA içeren PBS içine uygun hacimlerde eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan sekonder antikor solüsyonundan 50'şer µl alındı ve lameller üzerine damlatıldı. Kuruma olmaması için lamellerin üzerine, lamel boyutunda kesilen parafilmli kapatıldı ve 37°C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda 4 defa PBS yıkaması yapıldı.
- %70 etanol eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bir dakika sonra %70 EtOH uzaklaştırıldı.
- %100 etanol eklendi, oda sıcaklığında birkaç dakika bekletildi.

3.2.5.4. DAPI ile lamellerin lam ile kapatılması

- %100 etanol uzaklaştırıldı ve lamellerin kuruması bekledi.
- Hücrelerin bulunduğu lamel yüzeyine, mounting medium içinde hazırlanan 30nM DAPI solüsyonundan 10 µl, damlatıldı ve damlatılan yüzey, lamaların üzerine gelecek şekilde ters çevrilerek kapatıldı.
- Hazırlanan lamalar floresan mikroskobu ile incelendi.

3.2.6. SDS-page ve Western Blot

3.2.6.1. Protein izolasyonu

Hücreler bulundukları kültür kabının yüzeyinden hücre kazıyıcısı ile nazikçe kazınarak kaldırıldı. Besiyerini uzaklaştırmak üzere 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı ve supernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 1 ml PBS eklendi ve pipet yardımı ile homojenize edildi. Bir

önceki adımda uygulanan santrifüj hızı ve süresinde santrifüj yapıldı ve supernatant atıldı. Hücre pelletleri üzerine uygun hacimde RIPA tamponu (inhibitörleri içeren) eklendi ve vorteksleme yapıldıktan sonra örnekler buz üzerinde 45 dk bekletildi. 15 dakika aralıklarla vorteksleme işlemi tekrarlandı. Süre sonunda %40 güçle, %50 aralıkla 20 sn sonikasyon yapıldı. Son adımda örnekler, 12.000 rcf'de 10 dakika santrifüj edildi. Protein dışı yapıları içeren pellet atıldı. Supernatant fazında kalan proteinler ise yeni tüplere aktarıldı ve (-)86°C derin dondurucuda saklandı.

3.2.6.2. Protein konsantrasyonu ölçümü

Protein konsantrasyonlarının analizinde rutin olarak BCA ölçüm prosedürü uygulandı. Bunun için Sigma-QPBCA kiti kullanıldı. Öncelikle kitin sağladığı BSA (sığır serum albumini) kullanılarak bir seri dilüsyon olacak şekilde protein standartları hazırlandı ve spektrofotometrede 562 nm dalgaboyunda okutuldu. Elde edilen absorbanslar üzerinden, semi-log eğri grafiği çıkarıldı. R^2 değerinin 1'e yakın olduğu kaydedildi. Protein konsantrasyon tayininde her zaman RIPA-modified tamponu ve aynı BCA kiti kullanıldığı için standart eğri grafiği bir defa oluşturulduktan sonra o grafikten elde edilen denklem diğer ölçümlerde de kullanıldı. Bilinmeyen proteinlerin konsantrasyonu, standart eğri grafiğinden elde edilen denklemde yerine koyularak excel yardımı ile hesaplandı. Örneklerin hazırlanışı bir sonraki alt başlıkta özetlenmiştir.

3.2.6.3. BCA karışımı ve örneklerin hazırlanışı

Kit içeriğinde yer alan QA ve QB tamponundan örnek sayısı başına 75 µl, QC tamponundan 3 µl eklenerek BCA solüsyonu hazırlandı. Kör (Blank) için yalnızca 150 µl BCA ve 150 µl RIPA Modified tamponu içeren karışım hazırlandı. Konsantrasyonları bilinmeyen protein lizatlarından 1 µl alındı, 150 µl BCA ve 149 µl RIPA Modified tamponu ile karıştırıldı. Örnekler kör ile birlikte 60°C ısı bloğunda 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde örnekler hızlı ayarda kısa süreyle santrifüjlendi (Spin-down). Her bir örnek karışımından 100 µl hacim çekilerek, 96 gözlü ölçüm plakalarına ikişer replika olacak şekilde eklendi ve spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda okutuldu. Kör absorbansı örneklerin absorbansından çıkarıldı ve elde edilen değerler denklemde yerine koyularak protein lizatlarına ait konsantrasyon değerleri belirlendi.

3.2.6.4. Proteinlerin SDS-page ile ayrılması

- BioRad camları; deiyonize su, etanol ve izopropanol ile temizlendikten sonra jel dökme aparatına yerleştirildi. Belirlenen yüzdede ayırma jeli hazırlandı ve camlar arasına döküldü (Tablo 3.2). Jelin düzgün donması ve oluşan hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için, 1 mililitre izopropanol jelin üzerine eklendi.
- Jel donduktan sonra üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldı ve ön ayırma jeli hazırlandı (Tablo 3.3). Ön ayırma jeli döküldükten hemen sonra camlar arasına tarak yerleştirildi.
- 20 µg-50 µg protein lizatı hazırlandı ve örneklerin hacimleri su ile eşitlendi.
- Proteinlerin elektroforetik yürüyüşünü takip edebilmek ve kuyucuklara oturmalarını sağlayabilmek için, son hacmin 1/3'i oranında 4X yükleme tamponu (Loading Buffer/Laemli Buffer) örnekler üzerine eklendi. 4X yükleme tamponuna %10 β-merkapto-etanol taze olarak eklendi.
- Hazırlanan karışım resüspande edildikten sonra 95°C ısı bloğunda, 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Örnekler hemen buz üzerine alınarak ısı şoku ile proteinlerin denatüre olması sağlandı. Örnekler buz üzerinde birkaç dakika bekletildikten sonra kısa süreli santrifüj yapıldı (spin down).
- Bir kuyucuğa 2-5 µl protein standardı (Protein Ladder) yüklendi.
- Örnekler 80 Volt'da, 3-4 saat boyunca yürütüldü.

Tablo 3.2. Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları

Ayırma Jeli (10 ml for 1,5 mm spacers)	6%	8%	10%	12%	15%
1) dH ₂ O	5.4 ml	4.7 ml	4.1 ml	3.4 ml	2.4 ml
2) 4X Ayırma Tamponu	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
3) % 30 (29:1) Akrilamid/Bisakrilamid Karışımı	2.0 ml	2.7 ml	3.3 ml	4 ml	5 ml
4) TEMED	8 µl	6 µl	5 µl	5 µl	5 µl
5) APS (%10)	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl

Tablo 3.3. Ön ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları

Ön Ayırma Jeli	2.5 ml	5 ml	10 ml
1) dH ₂ O	1.425 ml	2.85 ml	5.7 ml
2) 4X Ön Ayırma Tamponu	625 µl	1.25 ml	2.5 ml
3) % 30 (29:1) Akrilamid/Bisakrilamid Karışımı	425 µl	850 µl	1.7 ml
4) TEMED	5 µl	5 µl	10 µl
5) APS (% 10)	38 µl	75 µl	150 µl

3.2.6.5. Membrana transfer

- BioRad sandviç aparatının siyah tarafı (- kutup) üzerine transfer tamponunda ıslatılmış olan süngerlerden bir tanesi yerleştirildi.
- Sünger üzerine yine transfer tamponu ile ıslatılan vatman kâğıdı yerleştirildi.
- Jel camlar arasından çıkarıldıktan sonra, ön ayırma jeli kesilerek atıldı ve ayırma jeli, yürütme biçiminin tersi yönde vatman kâğıdı üzerine koyuldu.
- Jel boyutuna uygun biçimde kesilen PVDF membran, %100 Metanol ile ıslatılarak aktive edildikten sonra jelin üzerine serildi.
- Membranın üzerine transfer tamponu ile ıslatılan vatman kâğıdı koyuldu. İkinci sünger koyulmadan önce cam çubuk ile rulo yapılarak, jel ile membran arasında oluşan hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Transfer tamponu ile ıslatılan ikinci sünger, vatman kâğıdı üzerine yerleştirildikten sonra sandviç aparatı kapatıldı.
- Sandviç aparatı, anot-katot uçları doğru pozisyonlarda olacak şekilde transfer kasetine yerleştirildi.
- Transfer kaseti tank içerisine oturtuldu ve transfer tamponu 4 jel çizgisine gelecek şekilde tank içine eklendi. Transfer işlemi için, (+)4°C’de 90 mA’de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

3.2.6.6. Western blot prosedürü

3.2.6.6.1. Primer ve sekonder antikor işaretlemeleri

- Transfer işlemi tamamlandıktan sonra sandviç aparatı açıldı ve membran ile jel ayrı kaplara alındı. Membran TBS-T solüsyonu ile çalkalanarak transfer tamponu uzaklaştırıldı.
- Jel, commessie blue (CB) boyası ile çalkalayıcıda 15 dakika banyo edildi. Süre sonunda boya uzaklaştırıldı ve jel üzerine destain tamponu eklendi.
- Membran bloklama solüsyonu (%5 yağsız süt tozu) içerisine alınarak oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 1 saat boyunca inkübe edildi.
- Membran TBS-T tamponu ile bir kez yıkandı.

- Membran üzerine primer antikor solüsyonu eklendi ve çalkalayıcıda, oda sıcaklığında, 1 saat inkübasyona bırakıldı. (Primer antikorlar, %0,5 süt tozu içeren TBS-T içerisinde hazırlandı). Görüntülemesi güç olan proteinler için, membrana primer antikor eklendikten sonra (+)4°C’de, çalkalayıcı üzerinde gece boyu inkübasyon yapıldı.
- Bağlanmayan primer antikorları membran üzerinden uzaklaştırmak için TBS-T tamponu ile yıkamalar gerçekleştirildi. Yarım saatlik yıkama rutini; 15-5-5-5 dakika olacak şekilde parçalı olarak yapıldı.
- Sekonder antikor solüsyonu eklendi ve çalkalayıcıda, oda sıcaklığında, 1 saat inkübasyona bırakıldı. (Sekonder antikorlar da %0,5 süt tozu içeren TBS-T içerisinde hazırlandı).
- Bağlanmayan sekonder antikorları membran üzerinden uzaklaştırmak için TBS-T tamponu ile yıkamalar gerçekleştirildi. Yarım saatlik yıkama rutini, primer antikor yıkamalarında olduğu şekilde; 15-5-5-5 dakika parçalı olarak yapıldı.

3.2.6.6.2. Görüntüleme

- Membran, CCD tip kamera sistemine sahip FusionX7 cihazındaki tabla üzerine yerleştirildi.
- Hazırlanan kemilüminesans substrat solüsyonu (Supersignal West Pico Plus-1:1 oranı) membran üzerine pipet ile gezdirildi.
- Bilgisayar üzerinde FusionX7 programı açıldı ve kameranın ısınması beklendi.
- Protein bantlarının görüntülenmesi için uygun sürelerde pozlamalar yapıldı.
- Membran görüntüleri program üzerinde ‘TIF image’ olarak kaydedildi.

3.2.7. U937 Monosit Hücrelerinin Makrofajlara Farklılaştırılması ve Conditioned Media/CM (Şartlandırılmış Ortam) Üretimi

Bu tez çalışmasında kullanılan CM’ler, çalışma ekibinin daha önceki araştırmalarında üretilen ve derin dondurucuda saklanan CM örnekleridir. CM üretimi aşağıda özetlenmiştir:

U937 monosit hücre hatları, 2 kez inaktive 10% FBS içeren RPMI 1640 besi ortamında, 37°C ısıtmalı, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edildi. Hücreler çoğaldıktan sonra, 8x10⁶ yoğunluğunda olacak şekilde 75 cm²’lik flasklara paylaştırıldılar. İki saat sonra 16nM PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) uygulaması 16 saat süresince uygulanarak hücrelerin makrofajlara farklılaşmaları teşvik edildi. Normalde süspande halde olan U937 monosit

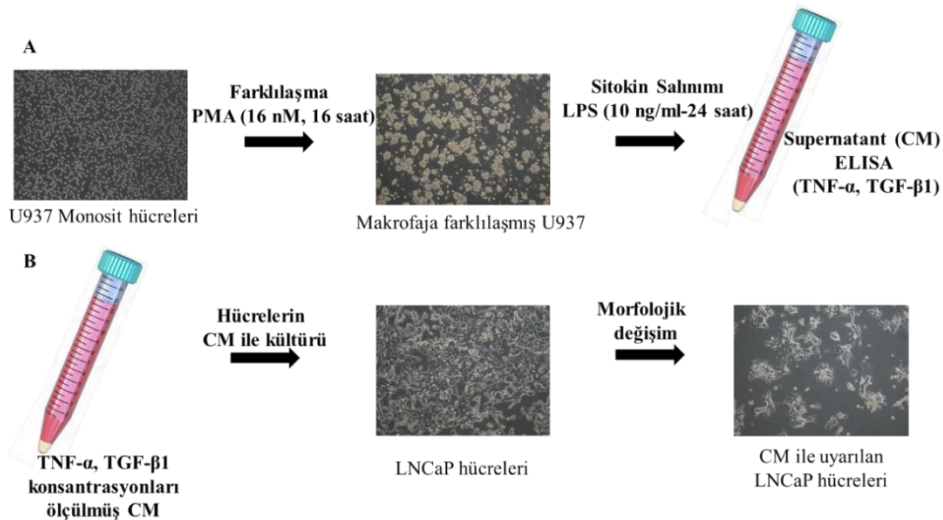
hücrelerinin farklılaşarak kümeler oluşturdıkları mikroskop ile gözlemlendi ve fotoğraflandı. Hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırılıp steril PBS ile yıkama yapıldıktan sonra flask içerisine 20 mililitre taze besiyeri eklendi. Hücreler 3 saat boyunca dinlendirildi. Üç saat sonra hücrelere 10 ng/ml LPS (lipopolisakkarit) uygulaması yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücreler üzerindeki besiyeri yani CM, santrifüj ile toplanarak 0,2 µm filtre ile filtreden geçirildi, (-)86°C derin dondurucuda saklandı.

3.2.8. CM İçerisindeki TNF-α ve TGF-β1 Sitokin Konsantrasyonlarının Ölçümü

LNCaP, PC-3 ve DU 145 hücrelerine CM uygulaması yapılmadan önce, uygulanacak CM'lerin TNF-α ve TGF-β1 içeriği, sitokin-spesifik elisa kitleri kullanılarak ölçüldü. CM üretim basamakları ve LNCaP hücrelerinin CM ile kültürünü içeren *in vitro* enflamatuvar hücre kültürü modeli şematize edilmiştir (Şekil 3.1).

LNCaP ve diğer PCa hücre hatları ile tasarlanan enflamatuvar hücre kültürüne, uygun TNF-α ve TGF-β1 konsantrasyonu içeren CM'ler besiyerinde seyreltilerek eklenir. Örnek olarak 2ml besiyerinde büyütülen hücrelere, 250 pg/ml TGF-β1 uygulanacak ise 5337 pg/ml TGF-β1 stok konsantrasyona sahip CM'den 94 µl alınır, 1906 µl besiyeri içerisine eklenir. 94 µl hacim içerisindeki TNF-α konsantrasyonunun ne olduğu, kullanılan CM'in stok TNF-α konsantrasyonu üzerinden hesaplanır. Stok TNF-α konsantrasyon değeri, alınan hacim (94µl) ile çarpılarak besiyeri hacmine (2ml) bölünür. Bu şekilde CM uygulamaları yapılan hücrelerin belirlenen doz ve sürelerde kültürleri yapılır.

CM Üretimi ve Prostat Kanseri Hücrelerinde Enflamatuvar Mikroçevre Oluşturulması



Şekil 3.1. *In vitro* enflamasyon modeli basamaklarının şematik olarak gösterimi. A. U937 monosit hücrelerinin makrofaj hücrelerine farklılaştırılması ve sitokin salınımı indüksiyonu sonrasında CM'lerin toplanması. B. CM ortamları ile LNCaP hücrelerinin kültürü.

3.2.8.1. ELISA yöntemi ile TNF- α ölçümü

- CM örnekleri içerisindeki bilinmeyen TNF- α konsantrasyonlarını ölçmek üzere Human TNF alpha Uncoated ELISA kiti (marka/katalog numarası: Invitrogen/88-7346) kullanıldı.
- Corning™ Costar™ 9018 ELISA plaka kuyucuklarına, kaplama tamponu ile seyreltilen yakalama antikoru (TNF- α), 100 μ L/kuyu olacak şekilde eklendi. Plaka yüzeyi kaplanarak (+)4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
- Yıkamalar, kitin yönlendirdiği şekilde, kit içerisinde çıkan yıkama tamponu ile yapıldı, kuyucukların kurumamasına özen gösterildi.
- Taze hazırlanan 1X EEDB tamponu kuyucuklara eklendi ve çalkalayıcı üzerinde 200 rpm'de 1 saat inkübe edildi.
- Standart eğri grafiği için standart protein örnekleri 1:2 dilüsyon ile hazırlandı ve elisa plakaya eklendi.
- Örnekler 100 μ L/kuyucuk olacak şekilde eklendi, diğer kuyucuklara eklendi.
- Kör okutması için 1X EEDB tamponu eklendi.
- Plaka yüzeyi kaplandı ve 2 saat inkübasyona bırakıldı.
- Kuyucuklar yıkama tamponu ile 3-5 defa yıkandı.
- Deteksiyon antikoru eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonunda yıkama tamponu ile 3-5 defa yıkama yapıldı.
- Kuyucuklara 100 μ L/kuyu olacak şekilde streptavidin-HRP solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Kuyucuklar yıkama tamponu ile 5-7 defa yıkandı.
- Kuyucuklara 100 μ L/kuyu olacak şekilde 1X TMB tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- Kuyucuklara 100 μ L/kuyu olacak şekilde Stop solüsyonu eklendi.

- Elisa plaka çok geçmeden spektrofotometrede analiz edildi. 570ve 450 nm’lerde okumalar gerçekleştirildi ve 570nm absorbans değerleri 450nm absorbans değerlerinden çıkarıldı.
- Oluşturulan standart grafiğindeki denklemden yararlanılarak, örnekler içerisindeki bilinmeyen TNF- α konsantrasyon değerleri hesaplandı.

3.2.8.2. ELISA yöntemi ile TGF- β 1 ölçümü

- CM örnekleri içerisindeki bilinmeyen TGF- β 1 konsantrasyonlarını ölçmek üzere TGF- β 1 Human Uncoated ELISA kiti (marka/katalog numarası: Invitrogen/88-50390) kullanıldı.
- Corning™ Costar™ 9018 ELISA plaka kuyucuklarına, kaplama tamponu ile seyreltilen yakalama antikoru (TGF- β 1), 100 μ L/kuyu olacak şekilde eklendi. Plaka yüzeyi kaplanarak (+)4°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı.
- Kuyucuklar yıkama tamponu ile yıkandı.
- Kitin yönlendirdiği şekilde bloklama tamponu hazırlandı ve 250 μ L/kuyu olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Plaka, oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası kuyucuklar yıkama tamponu ile 2 defa yıkandı.
- Standart eğri grafiği için standart protein örnekleri, Sample Diluent Z tamponu ile 1:2 dilüsyon oranında hazırlandı ve elisa plakaya eklendi.
- Kör okutması için Sample Diluent Z tamponu eklendi.
- Örnekler kitte yönlendirildiği şekilde diğer kuyucuklara eklendi ve plaka yüzeyi kaplanarak oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 400 rpm ayarında, 1 saat çalkalanarak inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda yıkama tamponu ile 4 kez yıkama yapıldı.
- Kuyucuklara 100 μ L/kuyu olacak şekilde streptavidin-HRP solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında, çalkalayıcıda 400 rpm ayarında, 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.
- Substrat solüsyonu, 100 μ L/kuyu olacak şekilde kuyucuklara eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Stop solüsyonu, 100 μ L/kuyu olacak şekilde kuyucuklara eklendi ve plaka çok geçmeden spektrofotometrede okutuldu.
- 570ve 450 nm’lerde okumalar gerçekleştirildi ve 570nm absorbans değerleri 450nm absorbans değerlerinden çıkarıldı.

- Oluşturulan standart grafiğinden elde edilen denklemden yararlanılarak, örnekler içerisindeki bilinmeyen TGF- β 1 konsantrasyon değerleri hesaplandı.

3.2.9. WST-1 Prosedürü ile Hücre Canlılığı Ölçümleri

Uygun doz ve sürelerde CM uygulaması ve NKX3.1 transfeksiyonu yapılmış olan hücreler 3×10^4 /kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaka içerisine, 100 μ l/kuyucuk olacak şekilde kültür ortamı ile ekildi. 24 saat sonra 10 μ l/kuyucuk olacak şekilde WST-1 reaktifi uygulanarak hücreler 3-4 saat boyunca 37°C ısıtmalı, %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi. Ardından 450 ve 690 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı. A450 absorbans değerlerinden A690 absorbans değerleri çıkarıldı. Kontrole göre yapılan normalizasyonlar % canlılık olarak grafik üzerinde ifade edildi.

3.2.10. Anoikis Assay Analizleri

Uygun doz ve sürelerde CM uygulaması ve NKX3.1 transfeksiyonu yapılmış olan hücreler; poly-hema kaplaması yapılmayan (kontrol plaka) ve poly-hema kaplaması yapılan (anchorage bağımsız plaka) 96-kuyucuklu hücre kültürü kaplarına replikalı olacak şekilde ekildi. 24 saat kültür edildikten sonra hücre canlılığını ölçmek üzere canlı hücre boyaması yapan Calcein AM, 100 μ l besi ortamı içerisine eklendi. Hücre ölümünü ölçmek üzere EthD-1 aynı 100 μ l besi ortamı içerisine eklendi ve 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda Calcein AM için Ex/Em = 485/515 nm değerlerinde, EthD-1 için Ex/Em = 525/590 nm değerlerinde florimetrik okumalar yapıldı. Anoikis kiti içerisinde çıkan floresan özellikli boyalar bittiğinde hücre canlılığını tayin etmek üzere resazurin reaktifi ile deneyler devam ettirildi. 96-kuyucuklu hücre kültürü kaplarına replikalı olacak şekilde ekilen hücreler 24 saat kültür edildi. Ardından hücre canlılığını analiz etmek üzere, 100 μ l besi ortamı içerisine 20 μ l resazurin solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hem 570 nm dalga boyunda fotometrik olarak hem de Ex/Em = 560/590 nm dalga boylarında florimetrik olarak okumalar yapıldı. Her bir örnek için, düşük bağlanma özellikli plakadaki (poly-hema kaplı) hücre canlılığı, poly-hema kaplanması yapılmamış plakadaki hücre canlılığı değerlerine oranlandı. Hücrelerin anoikis dirençleri yani canlılık oranları relatif kat sayısı olarak grafik üzerinde gösterildi (Tan et al., 2018).

3.2.11. Ko-kültür Analizi

LNCaP hücreleri ve WPMY1 prostat myofibroblast hücreleri, 0.4 µm por çapına sahip transwell/insert içeren hücre kültür kaplarına ekildi. 6-gözlü hücre kültür kabına LNCaP hücreleri 3×10^5 yoğunluğunda ekildi. 24 saat sonra transwell/insert'ler içerisine WPMY1 myofibroblast hücreleri 3×10^5 yoğunluğunda ekildi, tutunmaları için 24 saat beklendi. Daha sonra WPMY1 hücrelerini içeren transwell/insert'ler, 6-gözlü hücre kültür kabında kültüre edilen LNCaP hücrelerinin üzerine yerleştirildi. Hücreler bu şekilde bir araya getirildikten sonra inkübatöre kaldırılarak ko-kültür başlatıldı. Bu şekilde iki hücre tipi direk temas etmeden enflamatuvar mikroçevrede kültür edilerek, tümör-stroma etkileşimi modellenmesi yapıldı. Hücreler, 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 CM koşullarında 8 gün kültür edildi. Kültür sonunda hücreler tripsinize edilerek eppendorf tüplerinde toplandı. Protein izolasyonundan sonra SDS-page jelinde yürütülerek EMT biyobelirteç proteinlerinin analizleri gerçekleştirildi.

3.2.12. Migrasyon Analizi

LNCaP hücreleri 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 CM koşullarında 8 gün kültür edildi. Hücreler kültür sonunda FBS negatif besiyeri eklenen, 8 µm por çapına sahip transwell/insertler içerisine alındı. 24-kuyucuklu kültür kabının zeminine de %10 FBS içeren besiyeri koyuldu. Bu uygulamalardaki FBS, kemoatraktan olarak kullanıldı. Bu şekilde migrasyon potansiyeli kazanmış olan hücrelerin, transwell/insert membranından alt bölmeğe geçmesi beklendi. 24 saatlik inkübasyon sonrasında transwell/insert membranları sırasıyla, steril PBS ve steril saf su ile yıkandı. Yıkama işlemlerinden sonra kristal viyole boyaması yapılarak membranlar boyandı. Kristal viyole boyası asetik asit ile elüe edildi. Örnek gruplarına ait elüsyonlar, 3 replikalı olacak şekilde 96-kuyucuklu plakalara aktarıldı ve spektrofotometrede 590 nm dalga boyunda okutuldu. Aynı bir 96-kuyucuklu plakaya belirli sayılarda ekilen hücrelere de aynı işlemler uygulandıktan sonra bir standart grafik oluşturuldu. Bu şekilde elüsyonların absorbans ölçümlerinden elde edilen ve migrasyon oranı olarak belirlenen grafikte, göç eden hücre sayılarının belirlenmesi sağlandı.

3.2.13. İstatistiksel Analizler

Hücre canlılığı, anoikis, RT-PCR ve migrasyon deneylerinde, grupların kıyaslanmasında en az iki ve en fazla beş tekrarlı verilerin istatistiksel analizleri, Graphpad-Prism5 software programında student's t test ile yapılmıştır (p değeri; *:<0.05, **:<0.01, ***:<0.001).



4. BULGULAR

4.1. Epitelyal-Mezenkimal Belirteçlerin *in vitro* Enflamatuvar Mikroçevre Modelinde Değişimini Gösteren Ön Denemeler

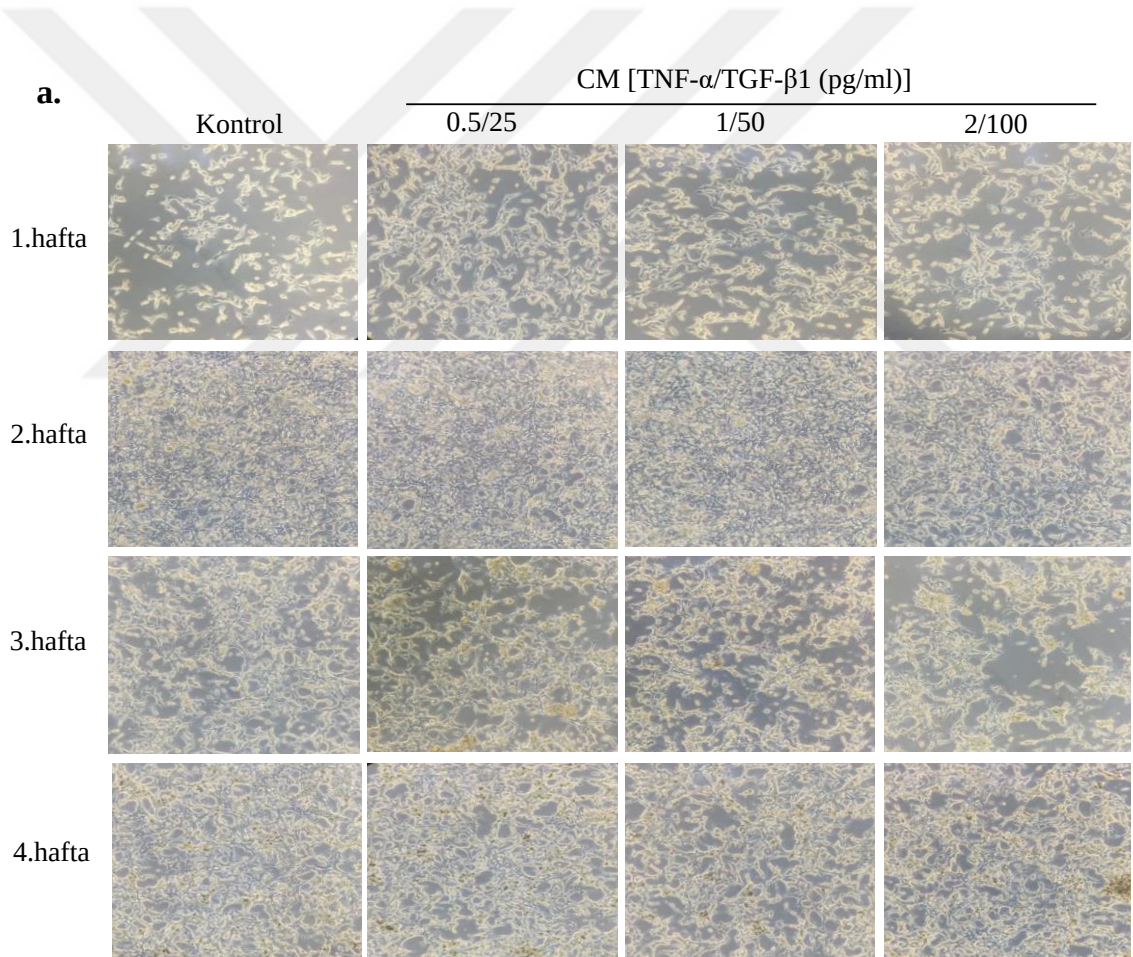
In vitro enflamatuvar mikroçevre modelinin uygulanmasında tümörijenik etkilere sorumlu oldukları daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan TNF- α ve TGF- β 1 sitokinlerinin U937 hücrelerinden elde edilen şartlandırılmış ortam içerisindeki (conditioned media/CM) konsantrasyonları ELISA yöntemi ile ölçüldü ve 4.1’de sunuldu. Prostat kanseri hücrelerine CM uygulanması esnasında, hedeflenen konsantrasyonlarda sitokin kombinasyonu uygulaması için uygun CM serileri normal besi ortamı ile seyreltilerek kullanıldı.

Tablo 4.1. Makrofajlardan elde edilen CM serilerinde ELISA ile belirlenen TNF- α ve TGF- β 1 konsantrasyon değerleri

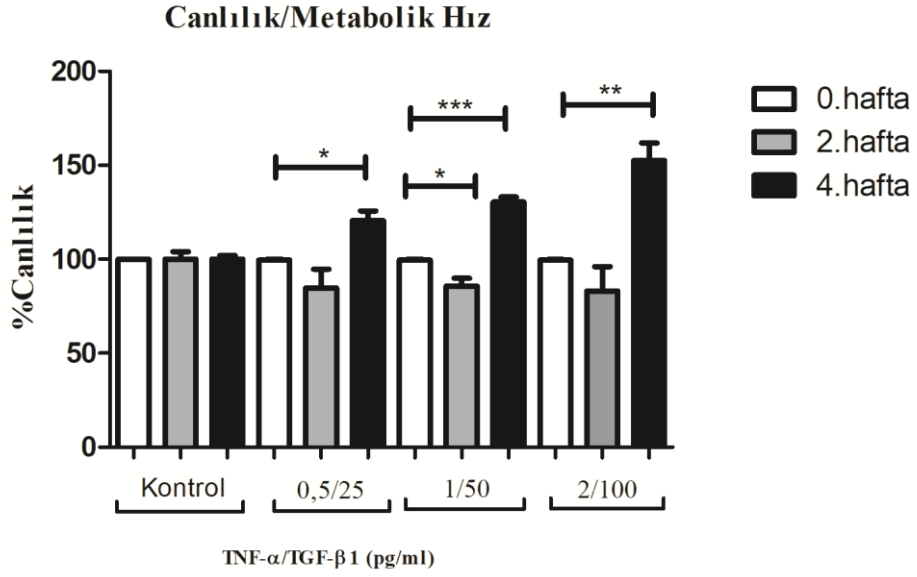
	TNF- α	TGF- β 1		TNF- α	TGF- β 1
CM-1	397,31	3332,29	CM-11	62,37	1814,95
CM-2	3375,89	6153,66	CM-12	11,44	2108,58
CM-3	3101,13	8620,33	CM-13	49,73	4664,72
CM-4	19,21	5978,38	CM-14	12,78	5615,10
CM-5	1853,28	3629,88	CM-15	64,99	3018,18
CM-6	858,06	5336,77	CM-16	26,47	2898,24
CM-7	55,74	2563,78	CM-17	15,30	3067,36
CM-8	874,63	5798,91	CM-18	1884,72	2762,89
CM-9	3836,66	1639,08	CM-19	4850,47	2625,89
CM-10	1599,22	1562,47	CM-20	4842,28	4173,77

In vitro enflamatuvar mikroçevre modelinin TNF- α ve TGF- β 1 sitokinlerinin etkileri çerçevesinde optimize edilmesi ve hücre canlılığını baskılamayarak epitelyal-mezenkimal geçiş

mekanizmalarının aktifleştirdiği konsantrasyon ve süreyi tanımlamak amacıyla, farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonlarını içeren CM serileri, androjen-bağımlı LNCaP prostat kanseri hücrelerine uygulandı. TGF- β 1'e bağlı etkinin değerlendirilmesi için, 0.5/25, 1/50 ve 2/100 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM, 1, 2, 3, ve 4 hafta süreyle hücrelere uygulandı. *In vitro* enflamatuvar mikroçevrede, hücre morfolojisi gözlenerek (Şekil 4.1a) hücre canlılığı WST-1 yöntemi ile analizlendi (Şekil 4.1b). Faz kontrast mikroskopik görüntülerde, 2 haftaya kadar artan hücre sayısının, 3. haftada baskılandığı ve 4. haftada tekrar arttığı gözlemlendi. Bazı hücrelerde EMT ile örtüşen bir morfoloji gözlemlendi. Hücre canlılığının 2. haftada anlamlı şekilde değişmediği ancak 4. haftada 2/100 TNF- α /TGF- β 1 içeren CM uygulamasının hücre canlılığını artırdığı belirlendi. 4. haftada NKX3.1'in TNF- α 'ya bağlı proteozomal degradasyonunun, doz bağımlı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 4.1c).



b.

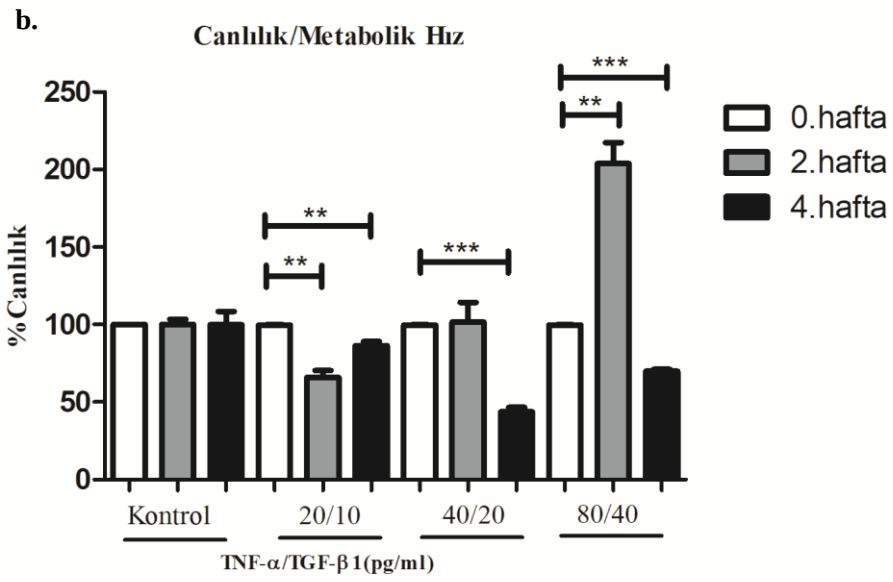
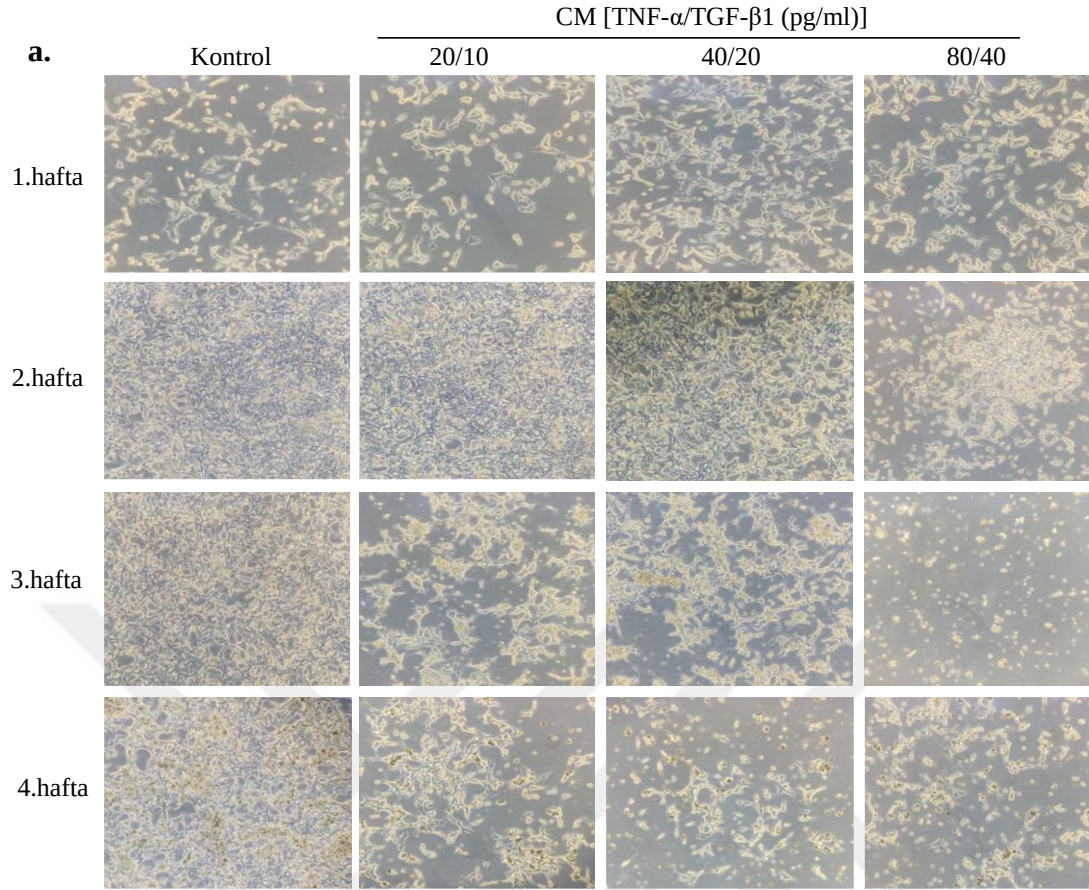


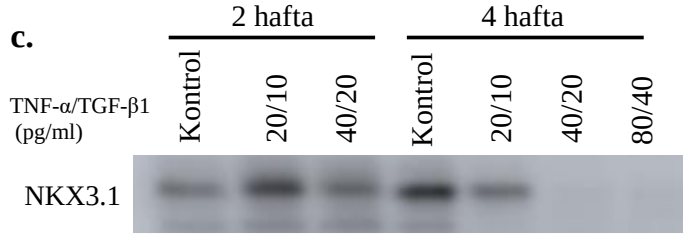
c.



Şekil 4.1. 0.5/25, 1/50 ve 2/100 pg/ml TNF-α/TGF-β1 içeren CM ile kültürü yapılan LNCaP hücrelerinin a. 1, 2, 3 ve 4 hafta kültür sonunda çekilen, hücrelerin morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri b. 2. ve 4. haftanın bitiminde hücrelerin canlılık/metabolik hızlarını gösteren WST-1 ölçüm grafiği c. NKX3.1 protein seviyesini gösteren western blot görüntüsü. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001.

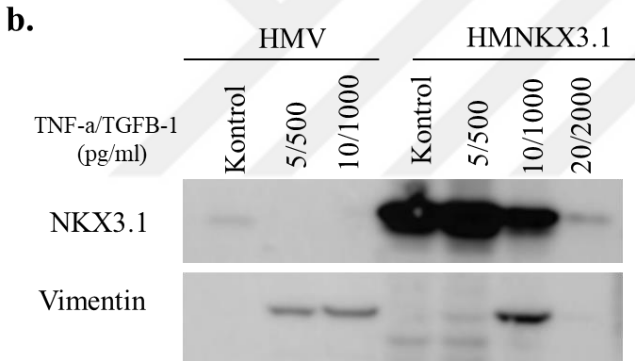
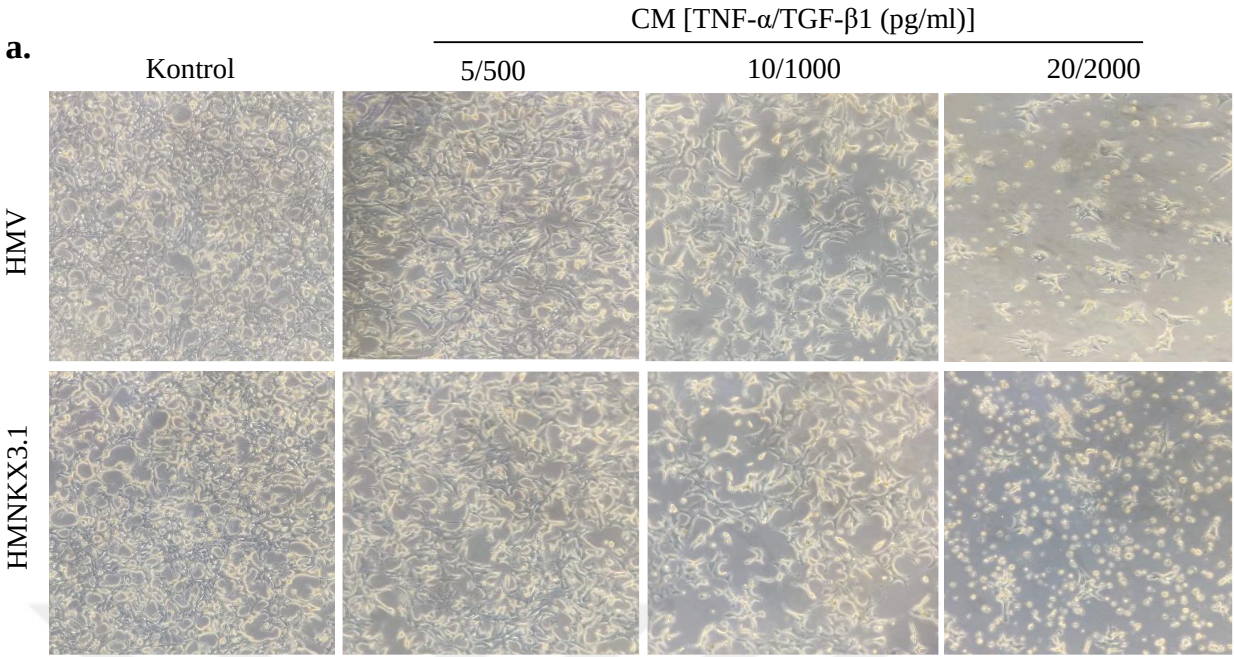
TGF-β1 etkisi ile birlikte TNF-α'nın LNCaP hücrelerindeki bazal seviyesinden daha yüksek konsantrasyonlarının etkisini belirlemek amacıyla; 20/10, 40/20 ve 80/40 pg/ml TNF-α/TGF-β1 içeren CM, 1, 2, 3, ve 4 hafta süreyle hücrelere uygulandı. Faz kontrast mikroskopik görüntülerde hücre sayısının doz ve süre bağımlı olarak azaldığı gözlemlendi, ancak hücrelerde belirgin bir EMT morfolojisi görülmedi (Şekil 4.2a). Hücre canlılığı analizi sonucunda, 40/20 pg/ml TNF-α/TGF-β1 içeren CM uygulamasının 4. haftada canlılığı baskıladığı, 80/40 pg/ml sitokin içeren CM'in ise 2. haftada canlılığı artırırken 4. haftada baskıladığı belirlendi (Şekil 4.2b). NKX3.1 protein seviyesinin ise doz ve süre bağımlı olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.2c).

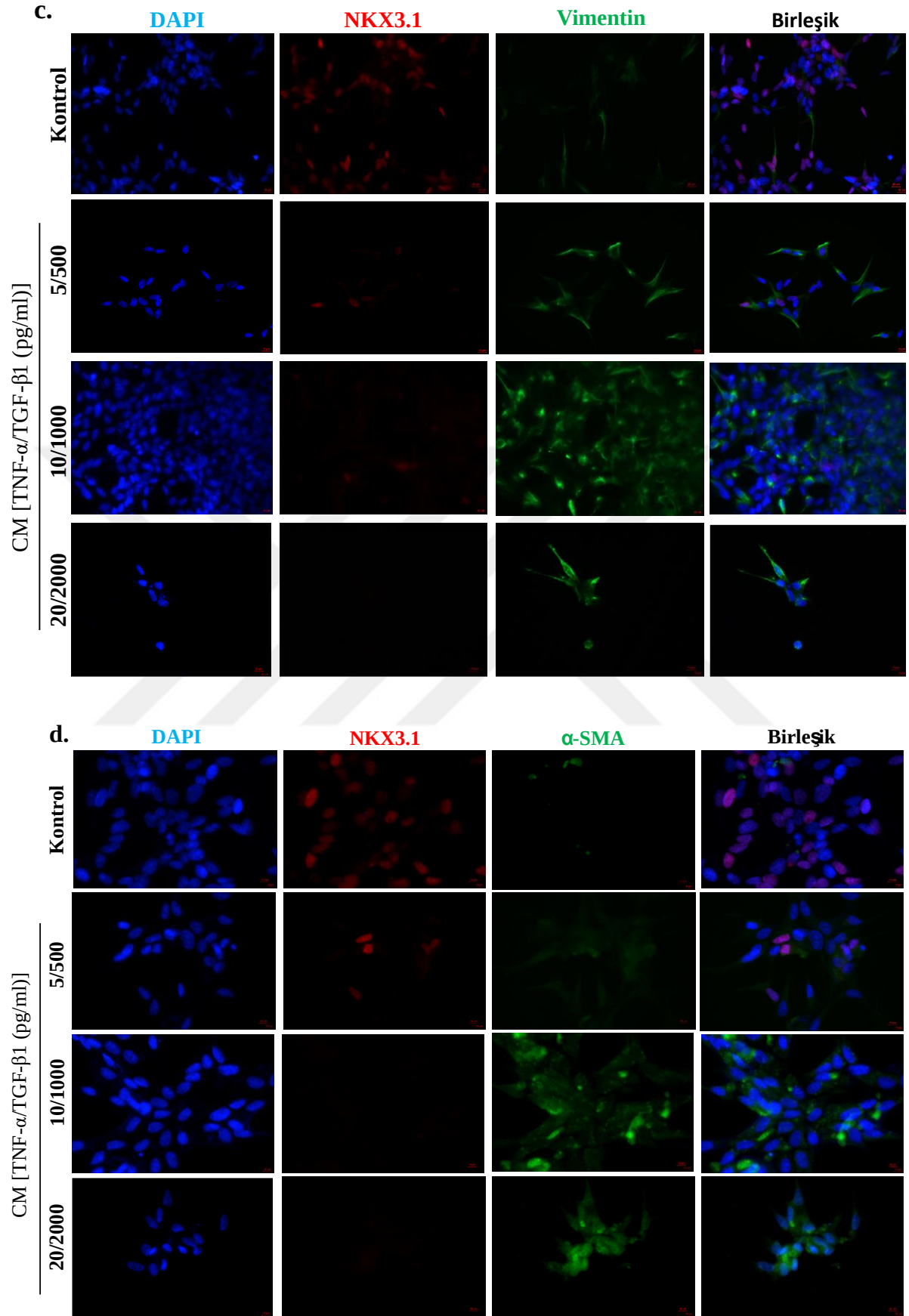


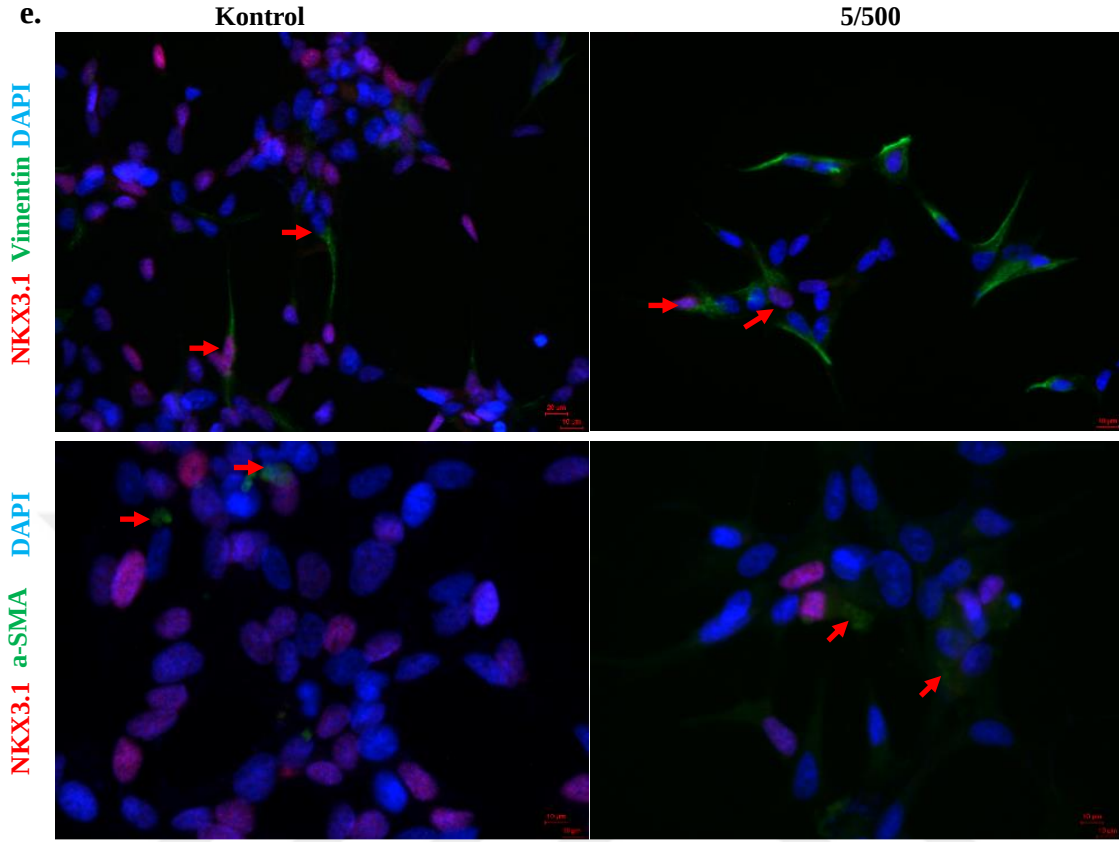


Şekil 4.2. 20/10, 40/20 ve 80/40 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile kültürü yapılan LNCaP hücrelerinin a. 1, 2, 3 ve 4 hafta kültür sonunda çekilen, hücrelerin morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri b. 2. ve 4. haftanın bitiminde hücrelerin canlılık/metabolik hızlarını gösteren WST-1 ölçüm grafiği. c. NKX3.1 protein seviyesinin doz ve süre bağımlı azaldığını gösteren western blot görüntüsü. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001.

Ön denemelerdeki deney sonucunda, önceki TNF- α /TGF- β 1 kombinasyonlarında belirgin bir mezenkim-benzeri morfoloji gözlenmediğinden ve literatüre göre EMT mekanizmalarında TGF- β 1 etkisi majör olduğundan, yüksek TGF- β 1 konsantrasyonu ile 5/500, 10/1000 ve 20/2000 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM, LNCaP hücrelerine 1 hafta süreyle uygulandı. CM uygulamalarını 4 haftalık prosedürden daha kısa sürede gerçekleştirerek hücresel değişimleri inceleyebilmek amacıyla uygulama süresinin kısaltılması ve sitokin konsantrasyonlarının artırılması yoluna gidildi. Ek olarak, CM uygulamasının son 48 saatinde NKX3.1 ektopik ekspresyonu gerçekleştirildi. Doza bağlı olarak hücre sayısının azaldığı ve belirgin bir mezenkim-benzeri hücre morfolojisi değişimi olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3a). NKX3.1'in enflamatuvar ortamdaki protein seviyesinin doğal ve ektopik ekspresyonda artan sitokin konsantrasyonu ile azaldığı belirlendi (Şekil 4.3b). EMT belirteçlerinden vimentin ve α -SMA'nın ekspresyonu ve NKX3.1 ile kolokalizasyonları immünfloresan işaretleme ile incelendi ve enflamatuvar ortama bağlı olarak ekspresyon artışı gözlemlendi (Şekil 4.3c ve 4.3d). Ayrıca hücrelerin çoğunda NKX3.1 ile kolokalize olmadıkları, özellikle enflamatuvar ortamda vimentin filamentlerinin NKX3.1 ekspresyonu bulunmayan hücrelerde daha yoğun olduğu görüldü (Şekil 4.3e).





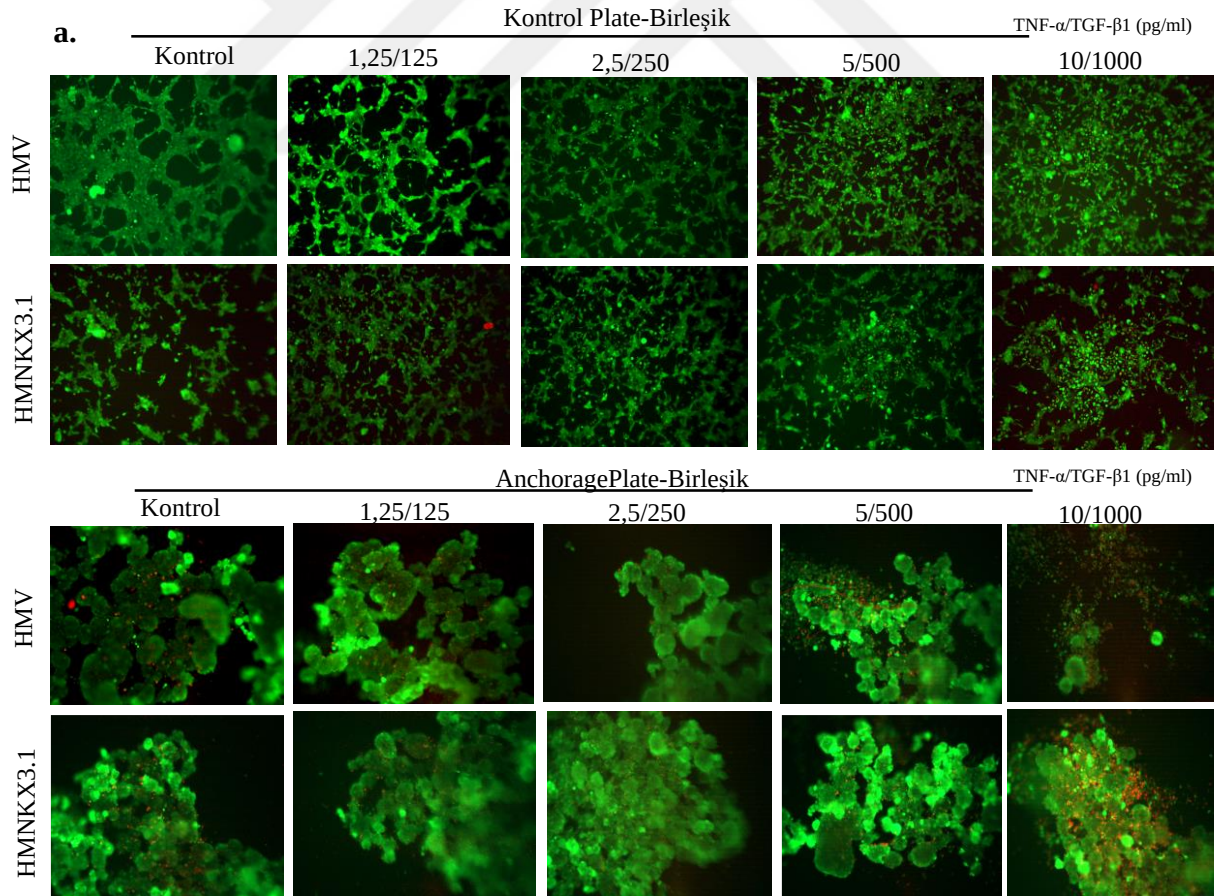


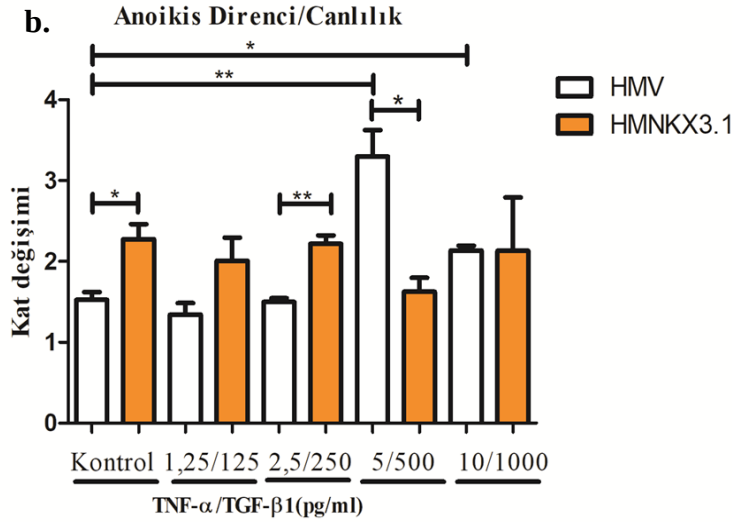
Şekil 4.3. 1 hafta boyunca 5/500, 10/1000 ve 20/2000 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile büyütülen LNCaP hücrelerinin a. morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri b. NKX3.1 ve Vimentin protein seviyelerini gösteren western blot görüntüleri. Mezenkimal belirteç proteinlerinden olan c. Vimentin d. α -SMA proteinlerinin bazal NKX3.1 proteini ile hücre içi lokalizasyonlarını e. Vimentin ve α -SMA proteinlerinin NKX3.1 ile kolokalizasyonunu gösteren immünfloresan mikroskobu görüntüleri.

4.2. Enflamatuvar Mikroçevre ve NKX3.1 Ekspresyonunun Anoikis Direncine Etkisi

Tümör hücrelerinin bulundukları dokudan ayrılarak metastaz yapmaları sürecinde, hücre-hücre bağlantıları olmaksızın hücre canlılığını devam ettirmelerine ve apoptoza gitmemelerine neden olan anoikis direnci, enflamatuvar koşullarda ve NKX3.1 ektopik ekspresyonuna bağlı olarak incelendi. Normal koşullarda adhere olan hücrelerin, yüzeye tutunamadıkları durumdaki canlılıkları adhere koşullardaki canlılıklarına normalize edilerek, farklı sitokin konsantrasyonlarının ve sürelerin uygulandığı enflamatuvar koşullar ve NKX3.1 ekspresyonunun anoikis direncine etkisi araştırıldı. Bunun için LNCaP hücrelerine; 1.25/125,

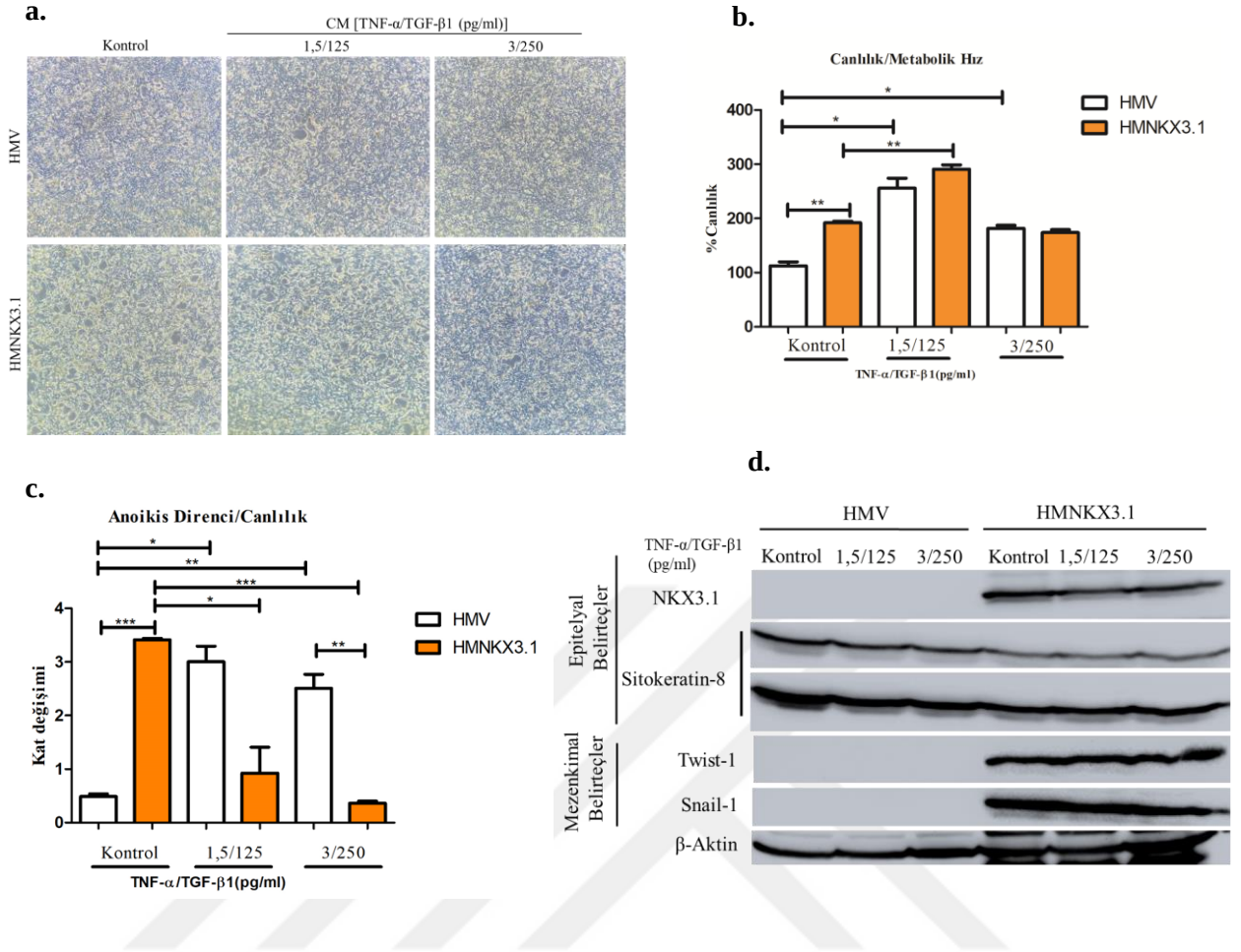
2.5/250, 5/500 ve 10/1000 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM uygulaması (72 saat) ve geçici HMNKX3.1 ekspresyonu (son 48 saat) gerçekleştirildi. Ekzitasyon dalgaboyu 485 nm olan ve yalnızca canlı hücreler tarafından hücre içine alınan Calcein AM yeşil, ekzitasyonu 525 nm olan ve ölü hücreleri gösteren EthD-1 kırmızı floresan olarak floresan mikroskopta görüntülendi. Kontrol petride yüzeye tutunan canlı hücreler yeşil floresanda gözlemlendi. Anoikis petride ise yüzeye tutunamayan canlı hücreler yeşil floresanda, ölü hücreler ise kırmızı floresanda görüntülendi (Şekil 4.4a). Ek olarak, aynı dalga boylarında florimetrik ölçüm ile olası değişim kantitatif olarak analiz edildi. Sonuçların analizinde, her örnek için anoikis petrideki ölçümler kontrol petridekilere normalize edildikten sonra, enflamatuvar CM uygulaması ve NKX3.1 ekspresyonuna bağlı değişiklikler kat değişimi olarak belirlendi. 72 saatlik uygulamada, enflamatuvar mikroçevrenin doz bağımlı olarak anoikis direncini artırdığı tespit edildi. NKX3.1 ektopik ekspresyonunun anoikis direncini, normal durumda ve düşük konsantrasyonda sitokin içeren enflamatuvar koşullarda artırdığı, yüksek sitokin konsantrasyonlarında ise baskıladığı görüldü (Şekil 4.4b).





Şekil 4.4. 72 saat boyunca 1.25/125, 2.5/250, 5/500 ve 10/1000 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile büyütülen ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinde a. Kontrol ve anoikis (anchorage-independent) petride canlı ve ölü hücreleri gösteren floresan mikroskop görüntüleri b. Hücrelerin anoikis direncini gösteren canlılık grafiği. Calcein AM: Canlı hücreleri boyayan yeşil floresan işaretleme. EthD-1: Ölü hücreleri boyayan kırmızı floresan işaretleme. Birleşik: Calcein AM ve EthD-1 birleşik görüntüleri temsil etmektedir. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001.

Anoikis direncinin daha uzun süreli enflamatuvar koşullardaki değişimini ve EMT belirteçlerinin ekspresyon düzeyi ile korelasyonunun belirlenmesi için, LNCaP hücrelerine 1.5/125, 3/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM uygulaması (2 hafta) ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 transfeksiyonu gerçekleştirildi. 2 haftalık enflamatuvar uygulamanın hücre canlılığını artırdığı ve NKX3.1 ekspresyonunun normal koşullar ve düşük sitokin konsantrasyonunda canlılığı pozitif yönde, daha yüksek konsantrasyonda negatif yönde etkilediği görüldü (Şekil 4.5b). Önceki sonuçlar ile örtüşen şekilde, uzun süreli enflamatuvar ortamda anoikis direncinin arttığı belirlendi. NKX3.1 varlığının normal koşullarda direnci artırdığı ancak 2 haftalık enflamatuvar koşullarda baskılandığı görüldü (Şekil 4.5c). Anoikis direncinin değiştiği koşullarda epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin ekspresyon seviyeleri immünoyotlama ile analiz edildi. Epitelyal belirteç sitokeratin-8 düzeyinin enflamatuvar durumda ve NKX3.1 varlığına bağlı olarak değişmediği, mezenkimal belirteçler TWIST1 (TWIST1) ve SNAIL1 (SNAIL1)'in NKX3.1 ektopik ekspresyonu durumunda arttığı belirlendi (Şekil 4.5d).

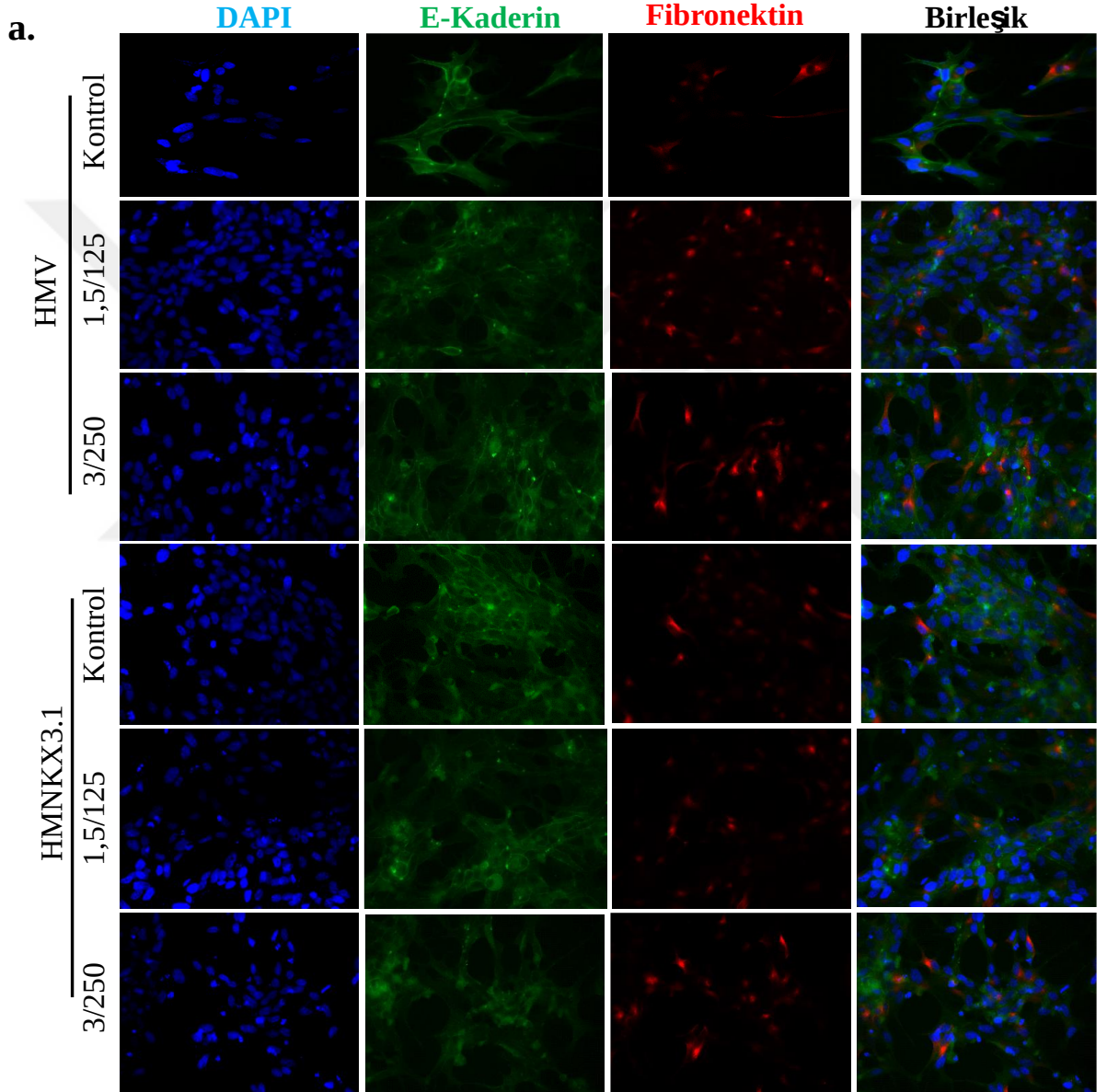


Şekil 4.5. 2 hafta boyunca 1,5/125, 3/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile büyütülen ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinin a. morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri b. hücrelerin canlılık/metabolik hızlarını gösteren WST-1 ölçüm grafiği c. hücrelerin anoikis direncini gösteren canlılık grafiği. d. epitelyal belirteçler; NKX3.1 ve sitokeratin-8 (CK8), mezenkimal belirteçler; TWIST1-1 ve SNAIL1 proteinlerinin seviyelerindeki değişimi gösteren western blot görüntüsü. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001.

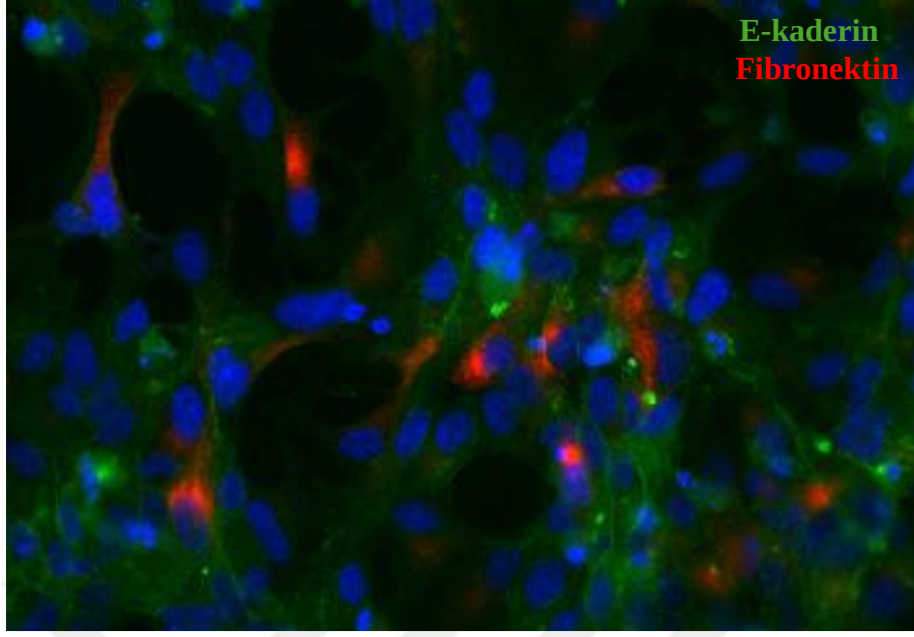
4.3. Enflamatuvar Mikroçevre ve NKX3.1 Ekspresyonunun EMT Belirteçlerinin Ekspresyon ve Hücre içi Lokalizasyonlarına Etkisi

Ön sonuçlarda EMT belirteçlerinde enflamatuvar koşullar ve NKX3.1 ekspresyonuna bağlı görülen değişimlerin detaylı analizi için, EMT belirteçlerinin ekspresyonları ve NKX3.1 ile kolokalizasyonları immünofloresan işaretleme ile görüntülendi. Bunun için, LNCaP hücrelerine 2 hafta süreyle 1,5/125, 3/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM uygulaması ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 transfeksiyonu gerçekleştirildi. Epitelyal belirteç E-kaderin ve mezenkimal belirteç fibronektin işaretlemeleri sonucunda E-kaderin ekspresyonunun

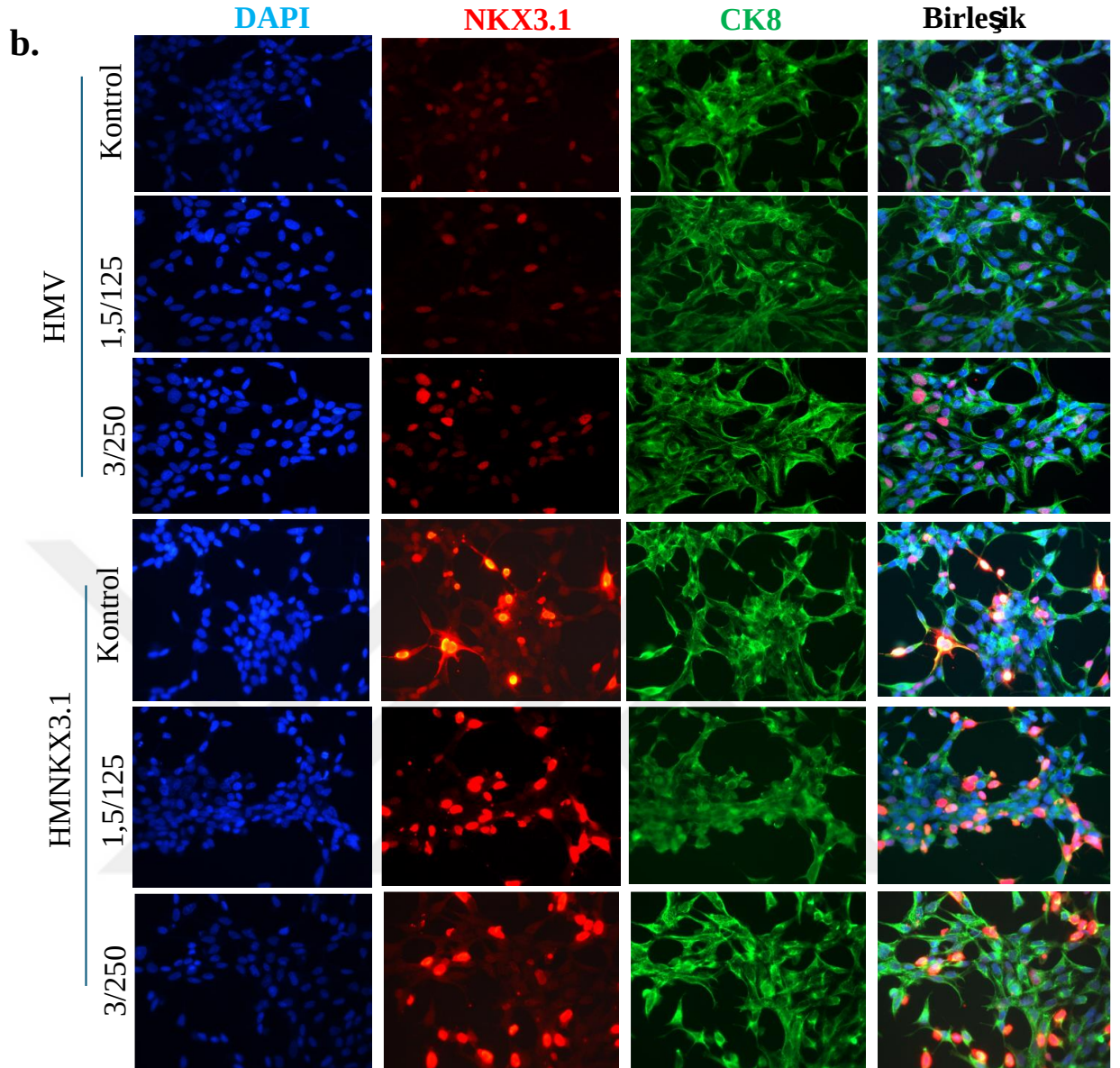
değişmediği, fibronektin ekspresyonunun enflamatuvar koşullarda arttığı gözlemlendi (Şekil 4.6a). Ayrıca E-kaderin tüm hücrelerde eksprese edilirken, fibronektin ekspresyonunun enflamatuvar koşullarda bazı hücrelerde bulunduğu belirlendi. Bu sonuçlar, uygulanan sitokin konsantrasyonu ve süredeki enflamatuvar koşulların mezenkimal belirteç fibronektinin düzeyini EMT ilişkili hücrelerde artırdığı ve bu koşulların NKX3.1 ilişkili etkilerin analizi için uygun olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.6g).

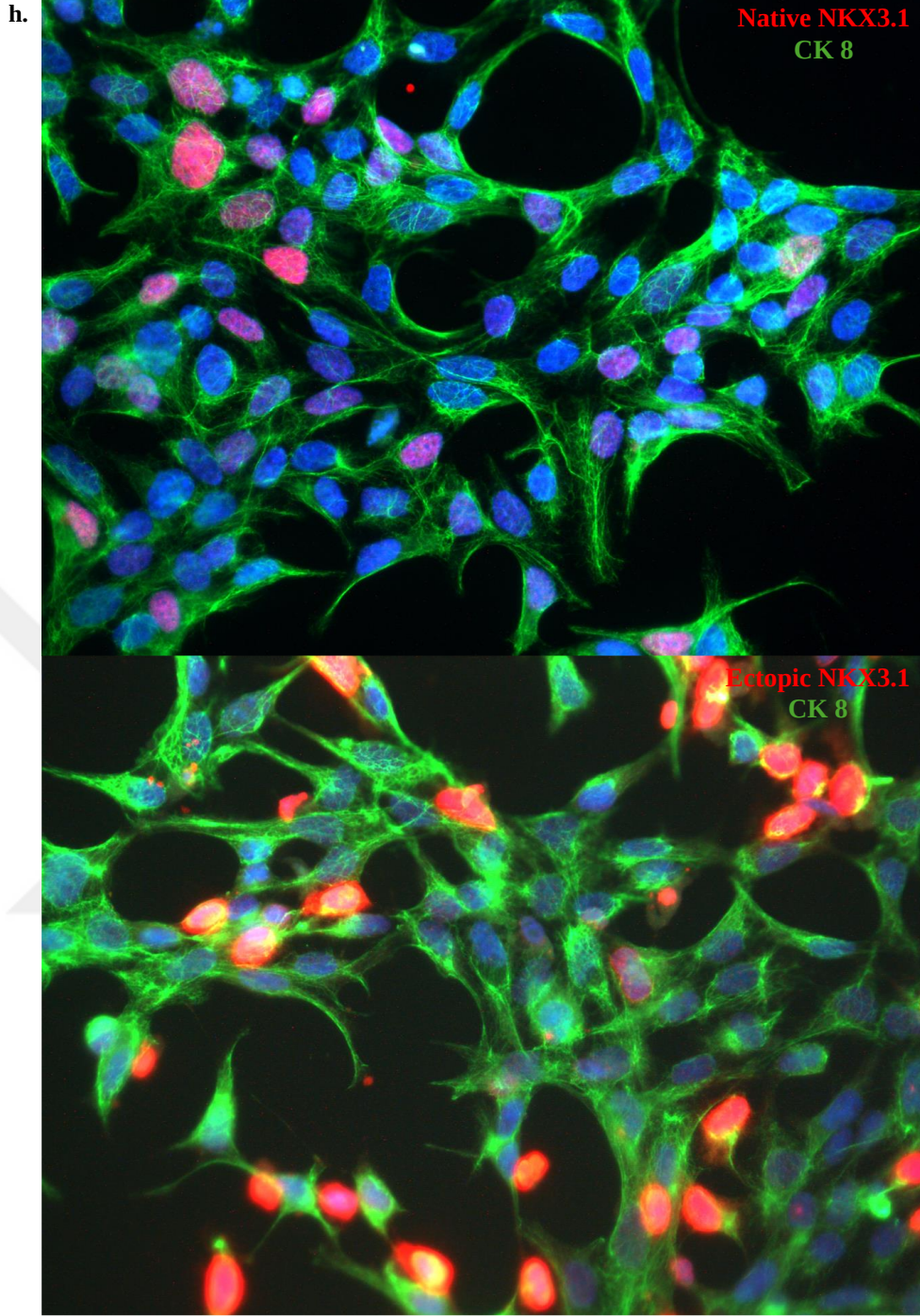


g.

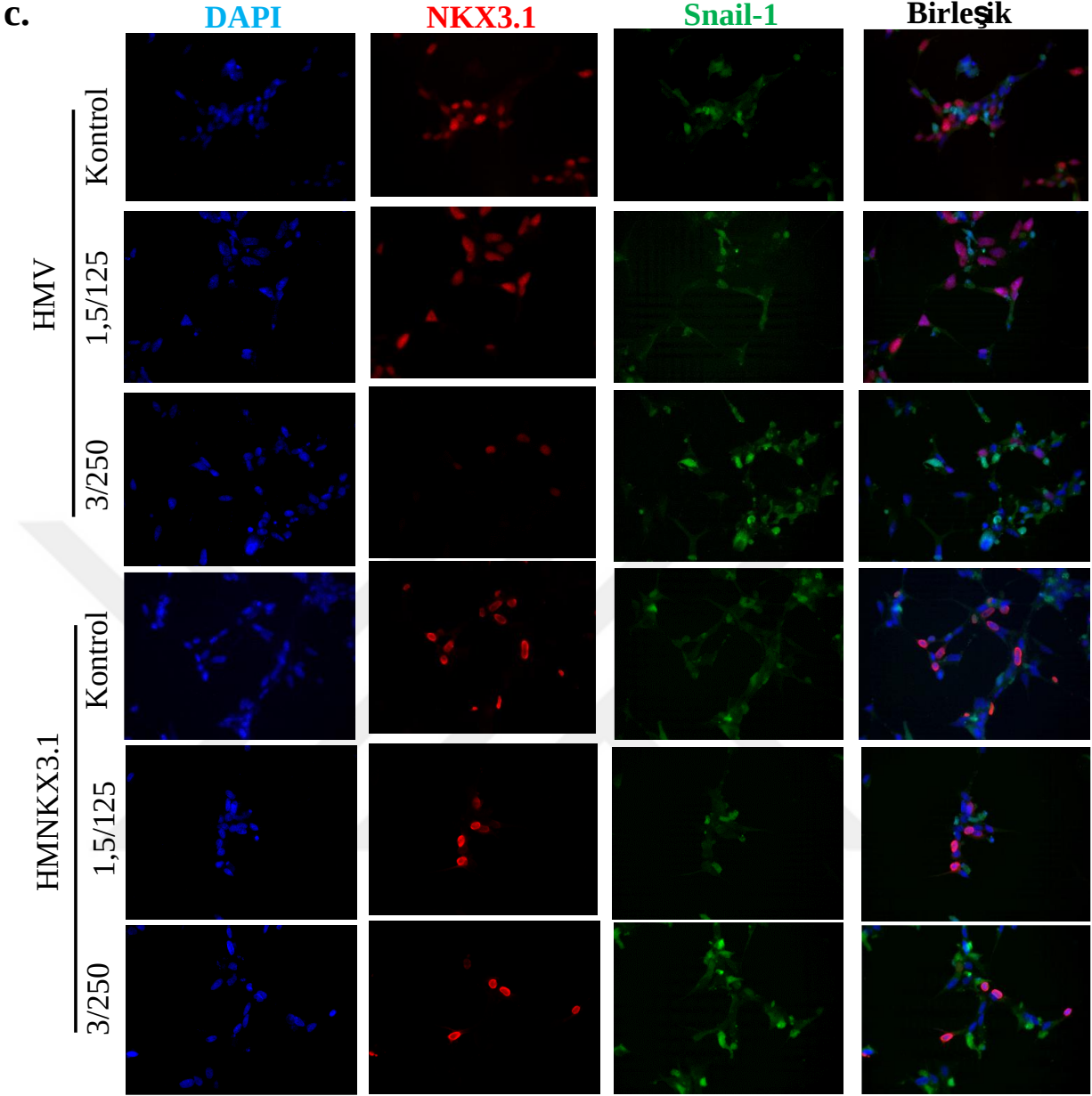


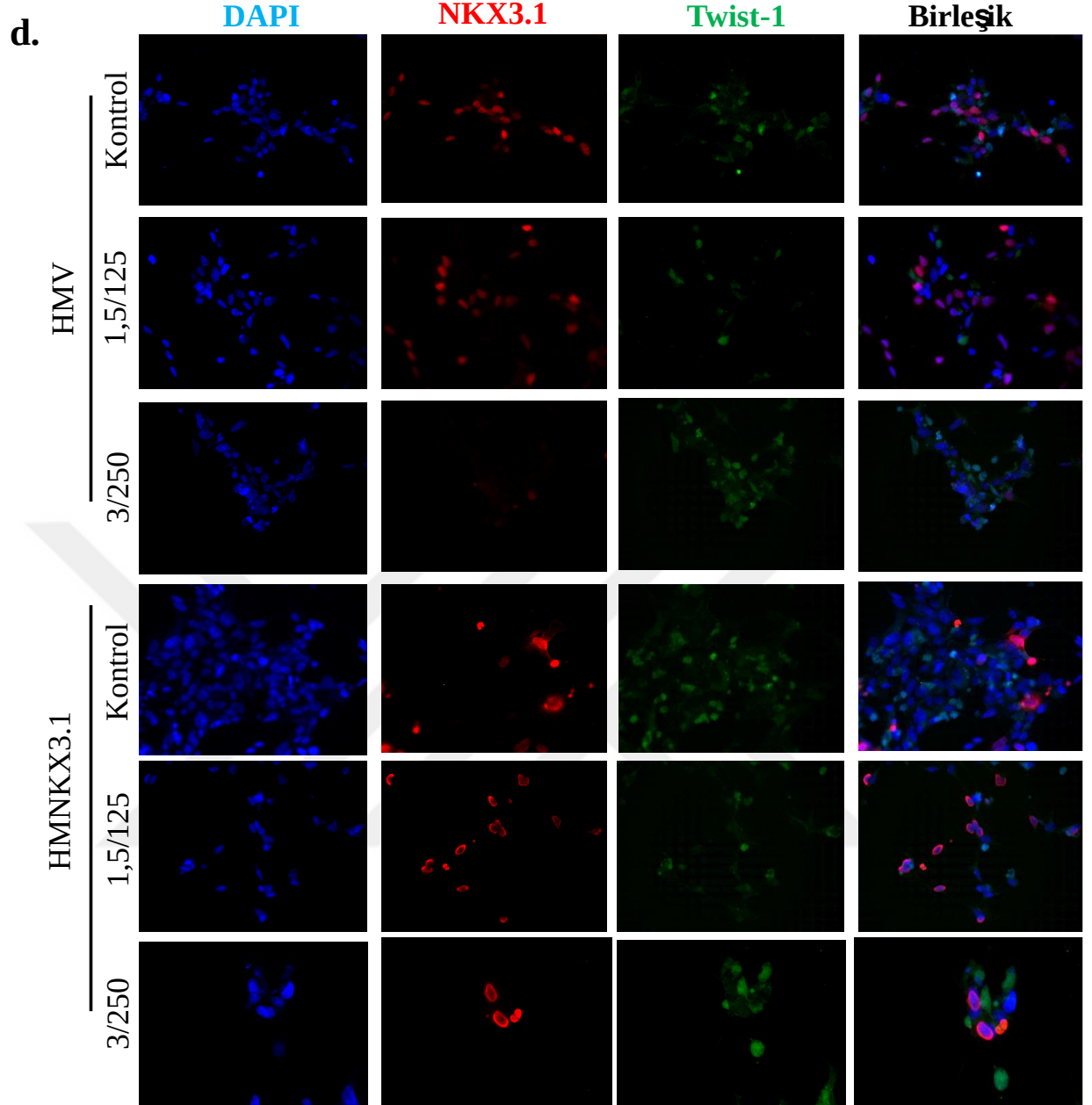
Epitelyal hücrelerde eksprese edilen NKX3.1 ve epitelyal belirteç CK8 işaretlemeleri sonucunda, immün blotlama sonuçları ile uyumlu olarak, CK8 ekspresyonunun enflamatuvar uygulamalar ve NKX3.1 ektopik ekspresyonuna bağlı olarak değişmediği gözlemlendi (Şekil 4.6b). CK8'in tüm hücrelerde ekspresyonu bulunmasına karşın, epitelyal hücrelerde hücre döngüsü fazına bağlı olarak düzeyi değişen NKX3.1 ile kolokalizasyonlarında, enflamatuvar koşullarla ve ektopik NKX3.1 varlığıyla değişen bir durum gözlemlenmedi (Şekil 4.6h).

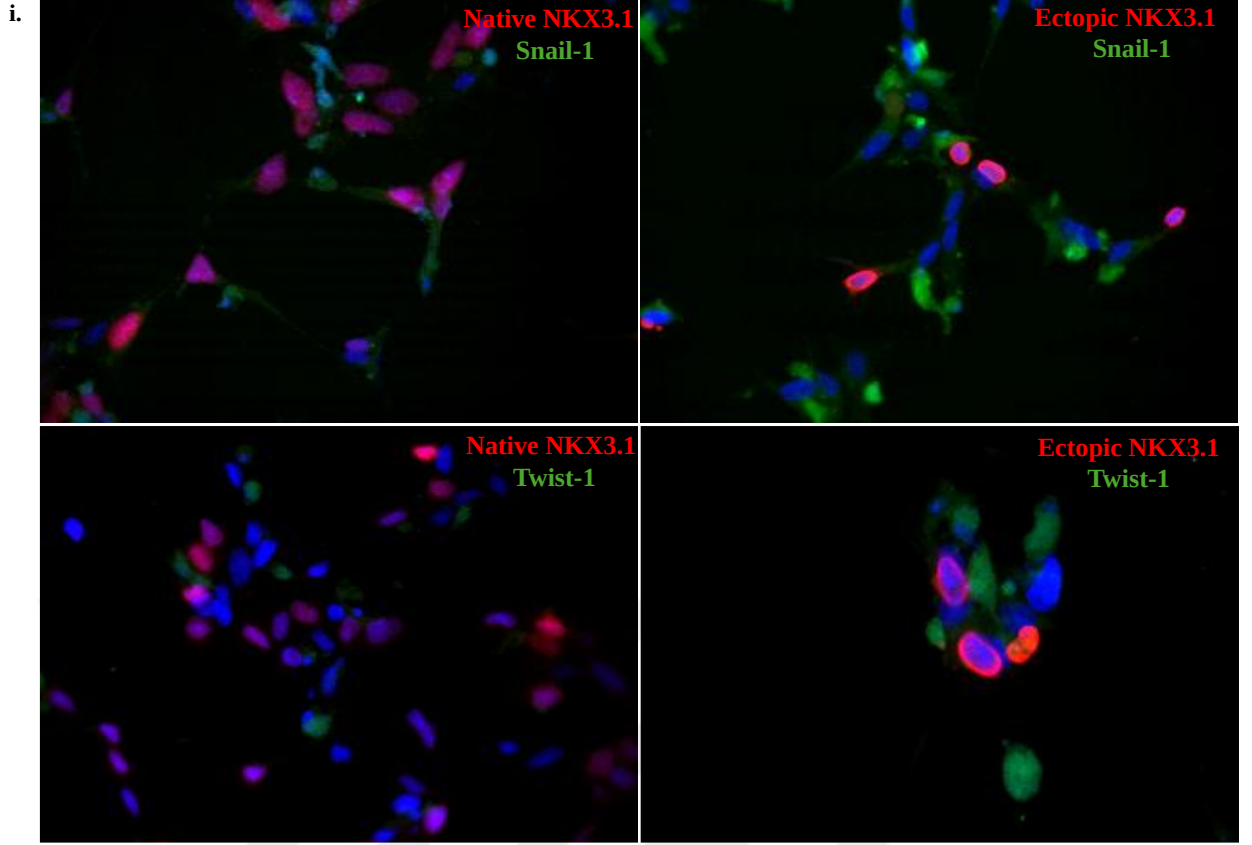




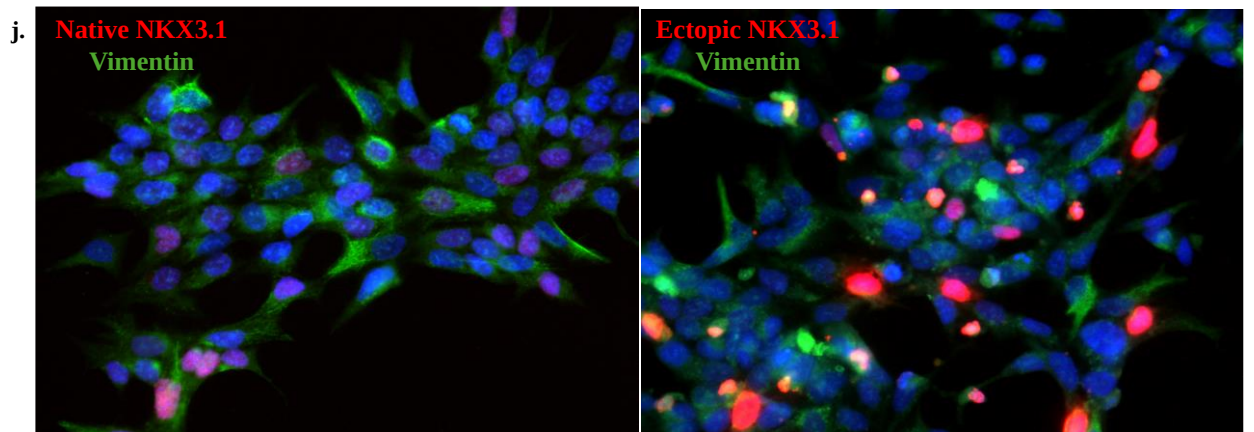
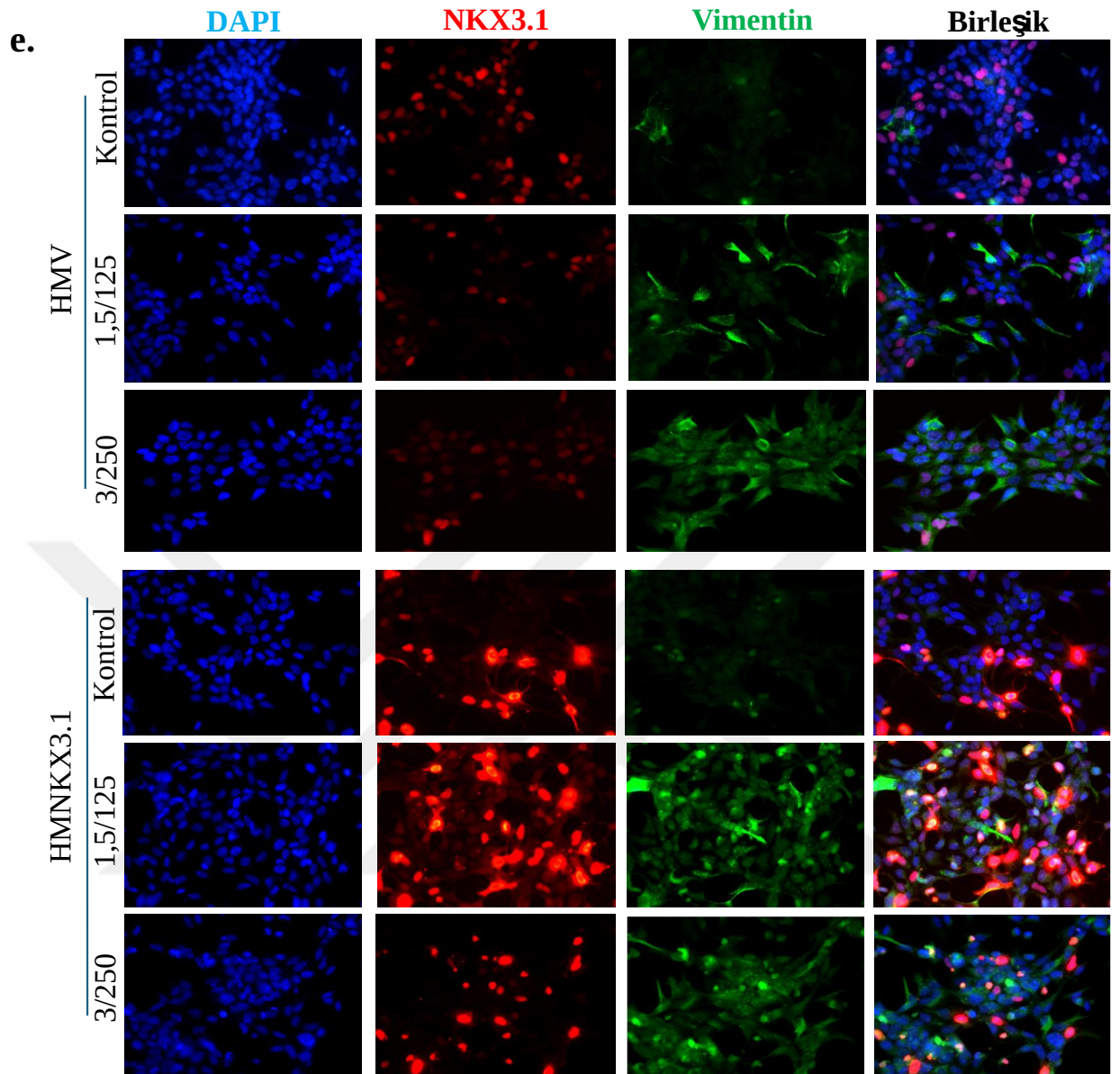
Mezenkimal belirteç SNAIL1 ve TWIST1 ile NKX3.1 çapraz işaretlemeleri sonucunda hem doğal hem de ektopik NKX3.1 ekspresyonu bulunan hücrelerde, genel olarak NKX3.1'in mezenkimal belirteçlerle kolokalize olmadığı belirlendi. Aynı hücrede eksprese edildikleri gözlenen sınırlı sayıda hücre bulunmasına karşın, SNAIL1 ve TWIST1 ekspresyonunun yüksek olduğu hücrelerde NKX3.1 ekspresyonunun bulunmadığı görüldü. Benzer şekilde, ektopik NKX3.1 ekspresyonunun bulunduğu hücrelerde de mezenkimal belirteçlerin bulunmadığı belirgin şekilde gözlemlendi (Şekil 4.6c, 4.6d ve 4.6i).



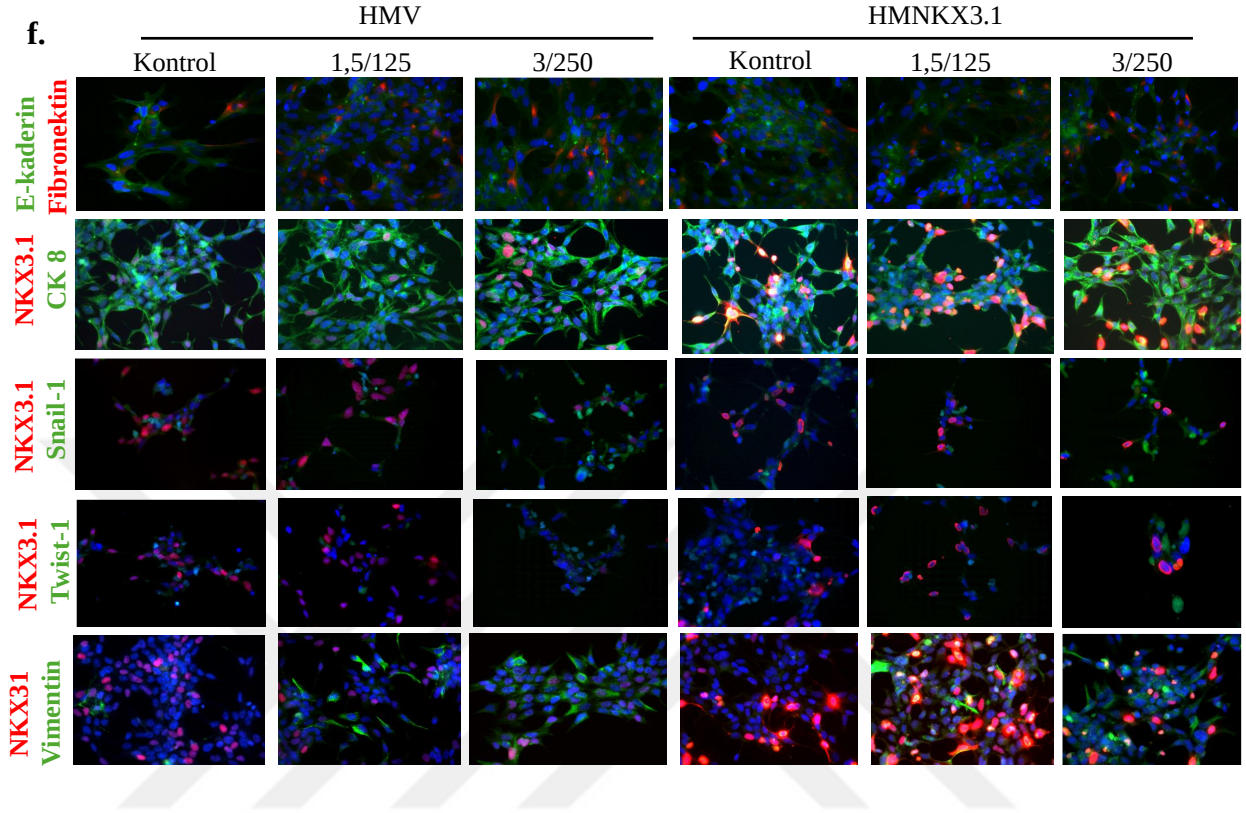




Mezenkimal belirteç vimentin ve NKX3.1 çapraz işaretlemesi sonucunda, enflamatuvar koşullara bağlı belirgin bir vimentin artışı tespit edildi (Şekil 4.6e). TWIST1 ve SNAIL1 sonuçlarına benzer şekilde, vimentin ile NKX3.1'in kolokalize olmadığı, görece düşük NKX3.1 bulunan bazı hücrelerde vimentin ekspresyonu görülmesine karşın, vimentinin belirgin şekilde yüksek olduğu hücrelerde NKX3.1 ekspresyonu bulunmadığı gözlemlendi. NKX3.1 ektopik ekspresyonu bulunan hücrelerde de vimentin ekspresyonu görülmedi (Şekil 4.6e ve 4.6j).



Yukardaki işaretlemelerin birleşik görüntüleri özet halinde Şekil 4.6f’de bir arada sunulmuştur.



Şekil 4.6. LNCaP hücrelerine 1.5/125, 3/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM uygulaması (2 hafta) ve son 48 saat geçici HMTKX3.1 transfeksiyonu gerçekleştirildi. Epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin ekspresyonlarını ve hücre içi lokalizasyonlarını gösteren immünfloresan mikroskop görüntüleri a. E-kaderin (epitelyal belirteç) ve Fibronektin (mezenkimal belirteç) b. NKX3.1 (epitelyal belirteç) ve CK8 (epitelyal belirteç) c. NKX3.1 (epitelyal belirteç) ve SNAIL1 (mezenkimal belirteç) d. NKX3.1 (epitelyal belirteç) ve TWIST1 (mezenkimal belirteç) e. NKX3.1 (epitelyal belirteç) ve Vimentin (mezenkimal belirteç) proteinlerinin ekspresyonlarını ve hücre içi lokalizasyonlarını gösteren immünfloresan mikroskopu görüntüleri. f. EMT belirteçlerinin birleşik görüntülerin bir arada sunulduğu özet görüntü. g, h, i ve j. a, b, c, d ve e’de sunulan birleşik görüntülerden seçilenler kolokalizasyonların daha net gösterilmesi amacıyla büyütülerek sunulmuştur.

4.4. Enflamatuvar Mikroçevrede EMT İlişkili TNF- α ve TGF- β 1 Aracılıklı Etkilerin Belirlenmesi

Enflamatuvar mikroçevrede EMT ilişkili proteinlerin ekspresyon değişimleri ve nihai hücrel değişimler, tek bir sitokin konsantrasyonu değişimine ya da ilişkili bir protein düzeyi değişime bağlı olarak değil, ilişkili sitokinlerin belli düzeylerinin eş zamanlı olarak

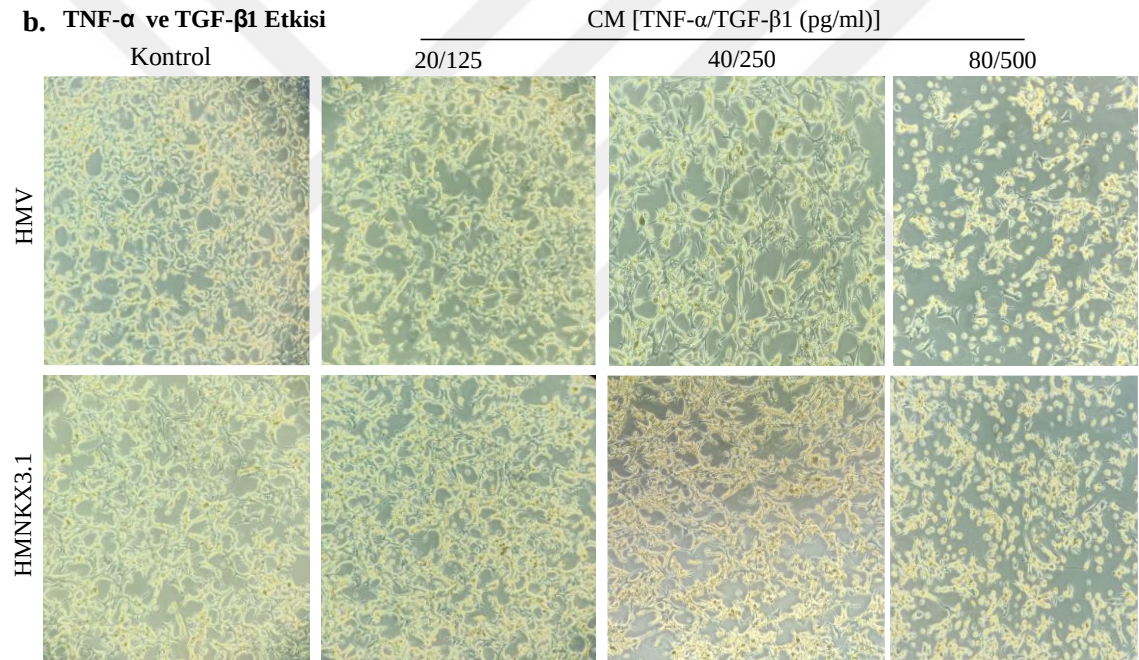
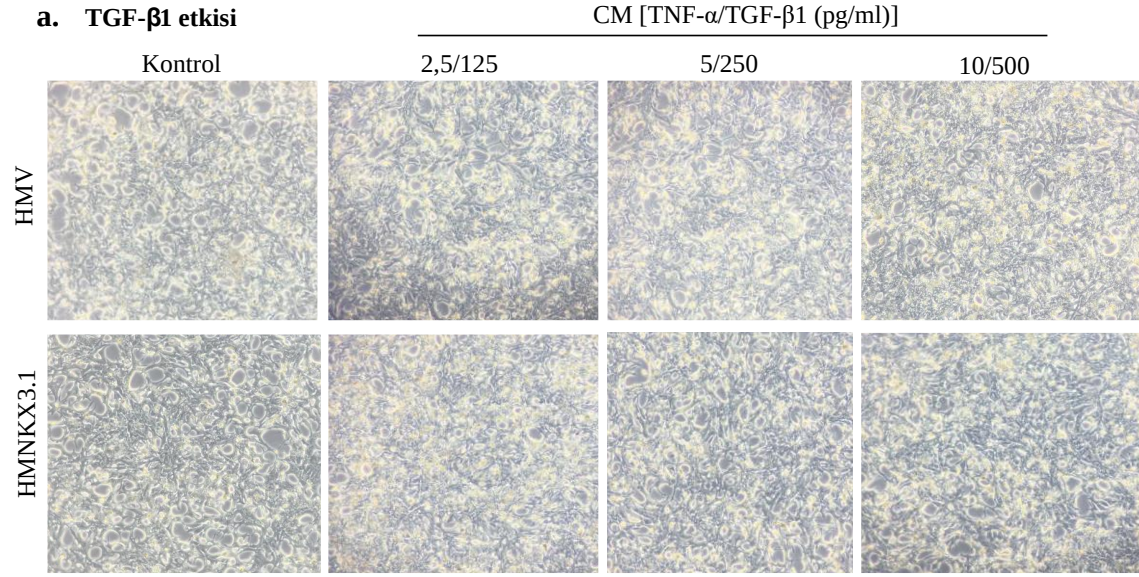
aktifleştirdikleri mekanizmaların aracılığıyla gerçekleşmektedir. Buradan yola çıkılarak enflamatuvar mikroçevreyi temsil etmesi amacıyla kullanılan ve tümörijeniz ilişkili TNF- α ve TGF- β 1 sitokinlerinin bilinen konsantrasyonlarını içeren CM uygulaması ile EMT ilişkili değişimlerin bütüncül bir yaklaşımla modellenmesi amaçlandı. Ancak, enflamatuvar mikroçevredeki EMT süreçlerinin anlaşılması açısından, bu belirteçlerin değişiminde hangi sitokin etkisinin belirleyici olduğunu ayırsamak da gereklidir. Bu yaklaşımla, TNF- α 'nın NKX3.1 protein kaybından sorumlu olması ve TGF- β 1'nin da EMT ilişkili majör sitokin olması sebebiyle, EMT belirteçleri üzerindeki TNF- α ve TGF- β 1 aracılıklı etkilerin ayırmsanması ve birarada bulundukları durumdaki etkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için farklı konsantrasyonlarda TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile 8 gün kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinin faz kontrast mikroskopisi görüntüleri ve EMT ilişkili proteinlerin ekspresyon değişimleri analizlendi. CM uygulamasında kullanılan TNF- α /TGF- β 1 konsantrasyonları aşağıda belirtilmiştir:

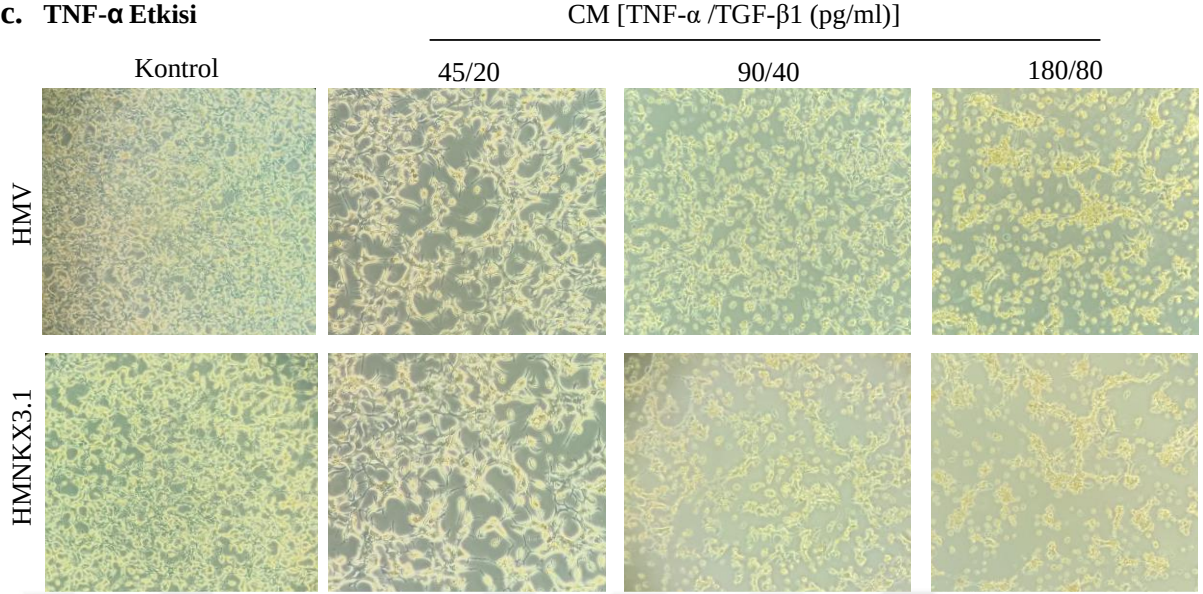
a. 2,5/125, 5/250 ve 10/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 (TGF- β 1 etkisi)

b. 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 (TNF- α ve TGF- β 1 etkisi)

c. 45/20, 90/40 ve 180/80 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 (TNF- α etkisi)

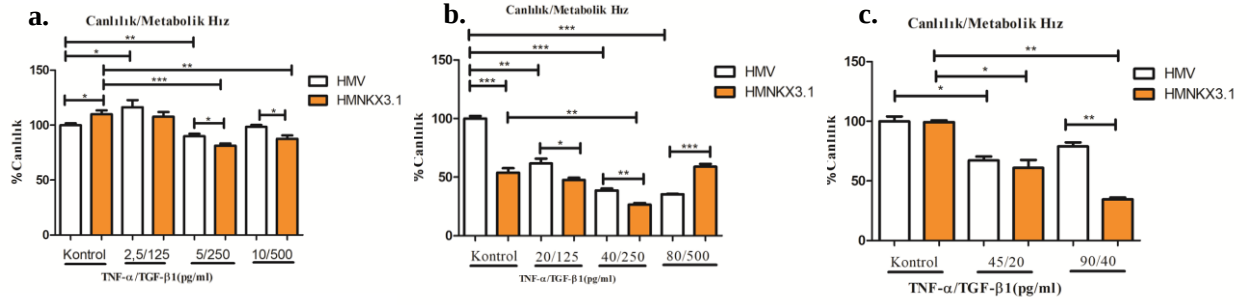
Belirtilen sitokin konsantrasyonlarının hücre morfolojisi üzerindeki etkileri incelendiğinde, TGF- β 1 etkisinin gözlemlendiği CM uygulamasında belirgin bir mezenkim-benzeri morfoloji ve hücre canlılığı değişimi gözlenmedi (Şekil 4.7a). TNF- α ve TGF- β 1'in etkin konsantrasyonlarda bulunduğu CM uygulamasında, hücre canlılığının doz bağımlı azaldığı gözlemlendi ve önceki uygulamaya göre yüksek konsantrasyonda bulunan TNF- α 'nın bu etkiden sorumlu olduğu değerlendirildi. 20/125, 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 uygulanan, HM vektör transfekte edilmiş hücrelerde mezenkim-benzeri morfoloji gözlemlendi (Şekil 4.7b). TNF- α etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen CM uygulamasında, TNF- α etkisine bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.7c).



c. TNF- α Etkisi

Şekil 4.7. Enflamatuvar mikroçevrede EMT ilişkili belirteçler üzerindeki TNF- α ve TGF- β 1 aracılıklı etkilerin ayırmsanması amacıyla farklı konsantrasyonlarda TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile 8 gün kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinin a. 2,5/125, 5/250 ve 10/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 b. 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 c. 45/20, 90/40 ve 180/80 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 uygulanan kültür modeline ait hücrelerin morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri.

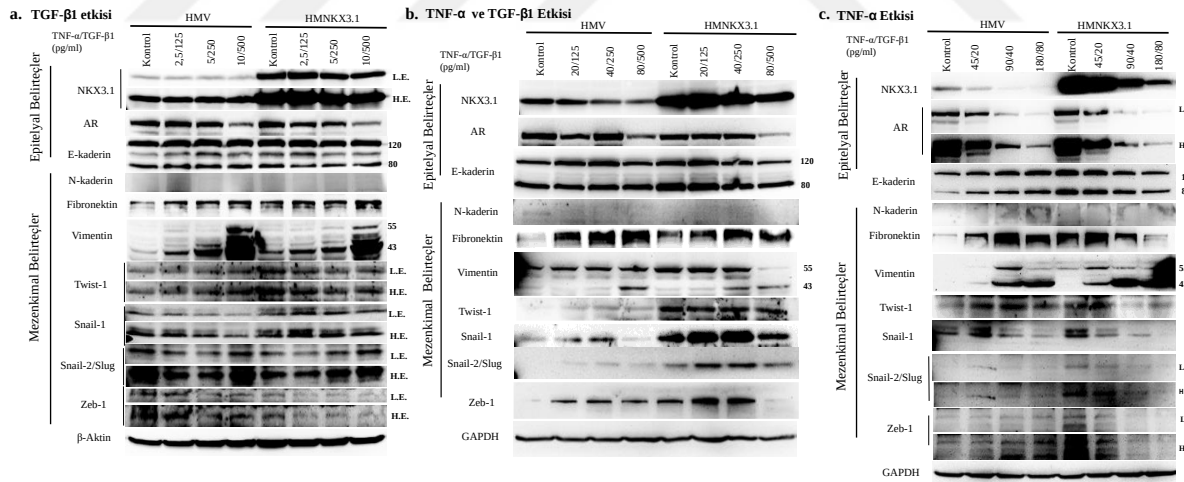
Hücre canlılığı anlizleri sonucunda, mikroskopi görüntülerini doğrular şekilde yalnız TGF- β 1 baskın uygulamada hücre canlılığının düşük konsantrasyonda hafifçe artarken yüksek dozda hafifçe baskılandığı görüldü (Şekil 4.8a). Ancak TNF- α 'nın etkin konsantrasyonlarını içeren (b) ve (c) uygulamalarında enflamatuvar koşullara bağlı olarak azalan hücre canlılığı tespit edildi. TNF- α ve TGF- β 1 aracılı etki değerlendirildiğinde hücre canlılığını azaltan majör sitokin TNF- α olduğu değerlendirildi (Şekil 4.8b ve 4.8c).



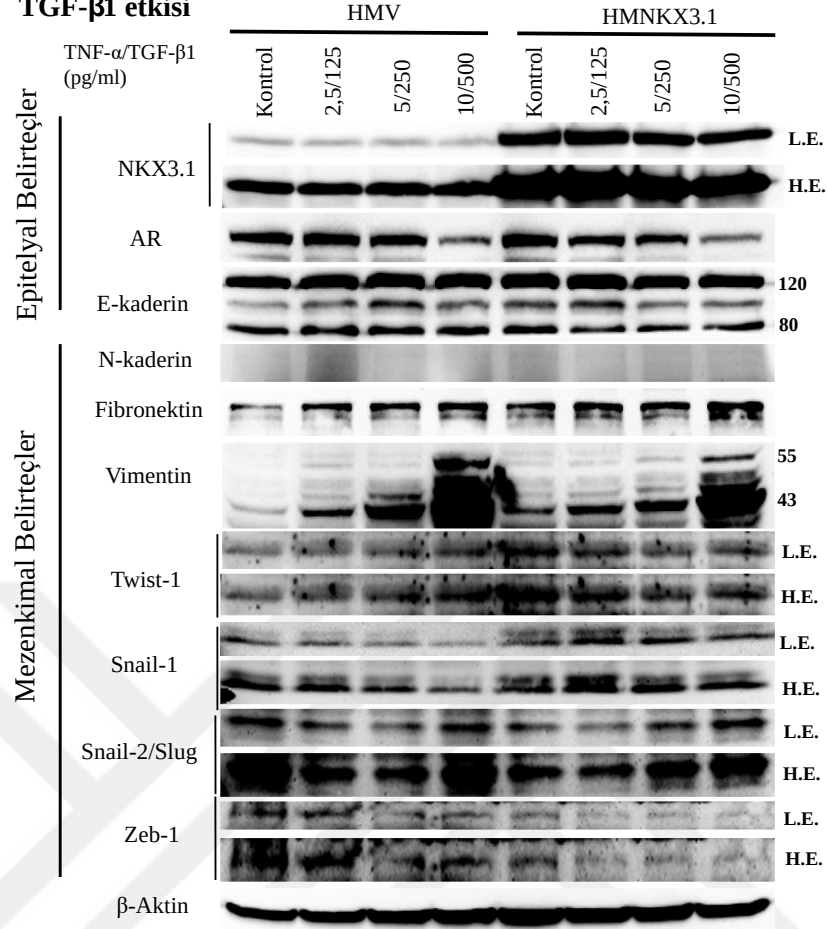
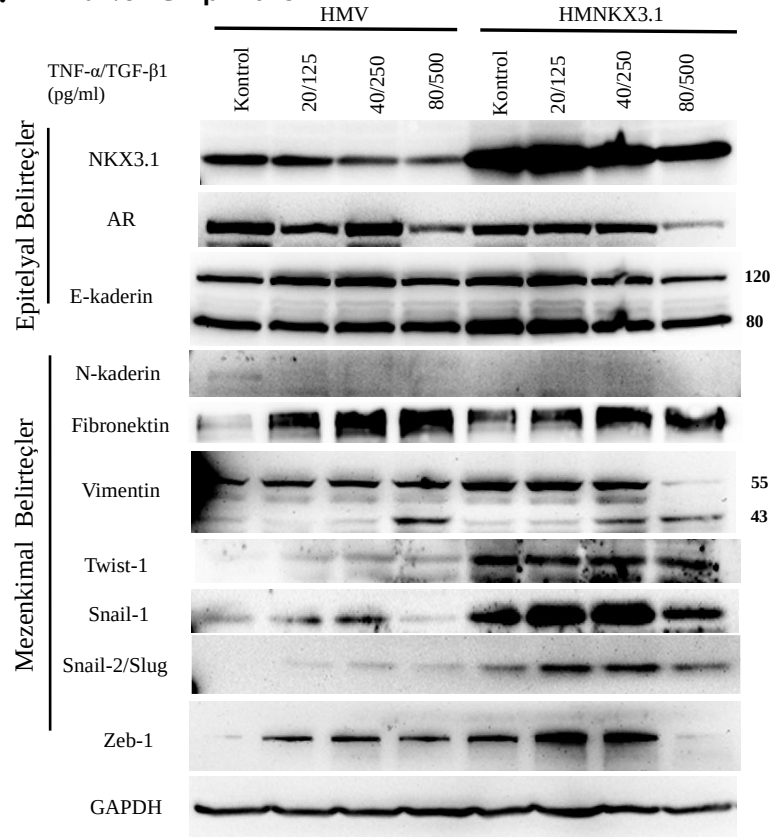
Şekil 4.8. TNF- α /TGF- β 1 aracılıklı etkileri gözlemlemek üzere farklı dozlarda TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile 8 gün kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinin a. 2,5/125, 5/250 ve 10/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 b. 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 c. 45/20, 90/40 ve 180/80 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 uygulanan kültür modeline ait hücrelerin canlılıklarını gösteren WST-1 grafikleri. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001.

Yukarda belirtilen CM uygulamaları tamamlandıktan sonra, EMT belirteçlerindeki olası protein seviyesi değişimleri immünoiblotlama ile analiz edildi ve sonuçlar daha etkin karşılaştırma yapılabilmesi için bir arada şekil 4.9'da ve detaylı inceleme için ayrı ayrı olarak şekil 4.10a-c'de sunuldu. TGF- β 1'e bağlı olarak (Şekil 4.9a) NKX3.1 seviyesinin değişmediği ancak artan TNF- α konsantrasyonuna bağlı olarak (Şekil 4.9b ve 4.9c) protein seviyesinin azaldığı doğrulandı. AR'nin, TGF- β 1'in ve TNF- α 'nın yüksek konsantrasyonunda azaldığı görüldü. EMT aktivasyonu olan hücrelerde yaygın olarak değiştiği bilinen, E-kaderin azalışı ve eş zamanlı N-kaderin artışı araştırıldığında, TGF- β 1'in (a) E-kaderin seviyesini değiştirmede ve bu uygulamada LNCaP hücrelerinde bazal ekspresyonu bulunmayan N-kaderin seviyesinde de artış olmadığı belirlendi. TNF- α /TGF- β 1 (b) uygulamasında da 120 kDa boyutundaki membran lokalize olgun E-kaderin seviyesinin enflamatuvar ortama bağlı olarak değişmediği ancak NKX3.1 ektopik ekspresyonuna bağlı olarak kontrol ve 20/125 TNF- α /TGF- β 1 uygulamasında arttığı belirlendi. Ancak bu uygulamalarda kanser olgularında arttığı bilinen ve 80 kDa boyutunda olan çözünür formunun seviyesinin de arttığı gözlemlendi. TNF- α 'ya (c) bağlı olarak olgun ve çözünür formunun konsantrasyon ilişkili olarak arttığı, NKX3.1 ektopik ekspresyonunun ise çözünür formunun seviyesinde daha yüksek bir artışa neden olduğu belirlendi. Fibronektin düzeyinin TGF- β 1 aracılı (a) enflamatuvar koşullarda doz bağımlı arttığı, TNF- α /TGF- β 1 (b) ve TNF- α (c) aracılı koşullarda ise dozla korele artışının daha yüksek olduğu tespit edildi. Vimentinin TGF- β 1 etkisi ile arttığı ancak TGF- β 1 aracılı enflamatuvar koşulun vimentin kesimini ve 43 kDa boyutundaki kesilmiş formunu da artırdığı belirlendi. TNF- α /TGF- β 1 aracılı koşullarda vimentin seviyesinin ve kesilmiş formunun hafif arttığı, TNF- α

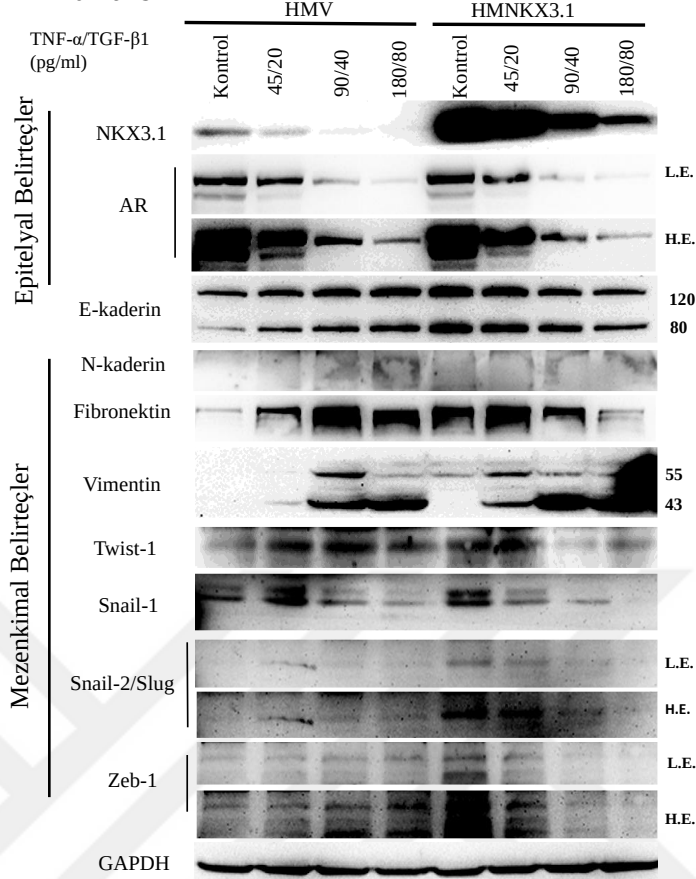
aracılı koşullarda ise 90/40 pg/ml konsantrasyona kadar arttığı belirlendi. Yalnız NKX3.1 ektopik ekspresyonunun olduğu ve enflamatuvar uygulamanın bulunmadığı hücresel durumda ise üç deneysel durumda da vimentin seviyesinin NKX3.1'e bağlı olarak arttığı tespit edildi. TWIST1 seviyesinin 3 farklı konsantrasyondaki enflamatuvar durumda da doz bağımlı olarak arttığı görüldü. Yalnızca NKX3.1 ektopik ekspresyonu olan hücrelerde TWIST1 seviyesinin enflamasyondan bağımsız olarak arttığı belirlendi ve önceki sonuçlar doğrulandı. Ayrıca NKX3.1 transfekte hücrelerde artan TWIST1 seviyesinin, düşük sitokin konsantrasyonları içeren CM uygulamalarında korunduğu ancak yüksek sitokin düzeylerinde azaldığı belirlendi. SNAIL1 seviyesinin TGF- β 1 aracılı koşulda artmazken, TNF- α /TGF- β 1 ve TNF- α ağırlıklı CM uygulamalarının düşük sitokin içeriği durumunda arttığı belirlendi. Ayrıca TWIST1 ile benzer şekilde SNAIL1'in de NKX3.1 ektopik ekspresyonu ile enflamatuvar koşullardan bağımsız olarak arttığı görüldü. SNAIL2'nin TNF- α /TGF- β 1'in eş zamanlı etkinliği ile artış gösterdiği ve NKX3.1 ektopik ekspresyonu durumunda bu etkinin arttığı tespit edildi. ZEB1'in de benzer bir profil gösterdiği, yalnız NKX3.1 transfeksiyonu durumunda ve ayrıca TNF- α /TGF- β 1 ve TNF- α aracılı enflamatuvar koşullarda arttığı belirlendi (Şekil 4.9 ve 4.10).



Şekil 4.9. TNF- α /TGF- β 1 aracılıklı etkileri gözlemlmek üzere farklı dozlarda TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile 8 gün kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinin a. 2,5/125, 5/250 ve 10/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 b. 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 c. 45/20, 90/40 ve 180/80 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 uygulanan kültür modeline ait hücrelerdeki epitelial ve mezenkimal belirteçlerinin seviyesel analizlerini gösteren western blot görüntüleri.

a. TGF- β 1 etkisi**b. TNF- α ve TGF- β 1 Etkisi**

C. TNF- α Etkisi

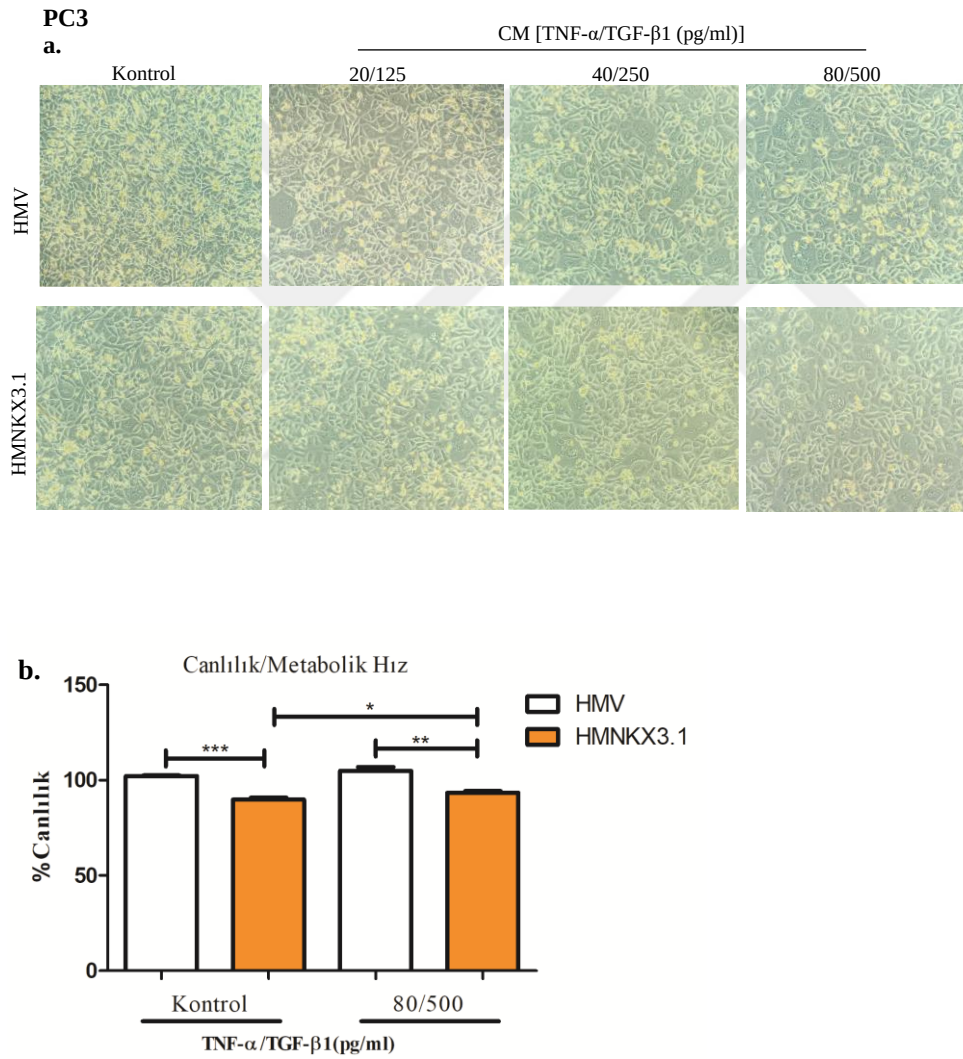


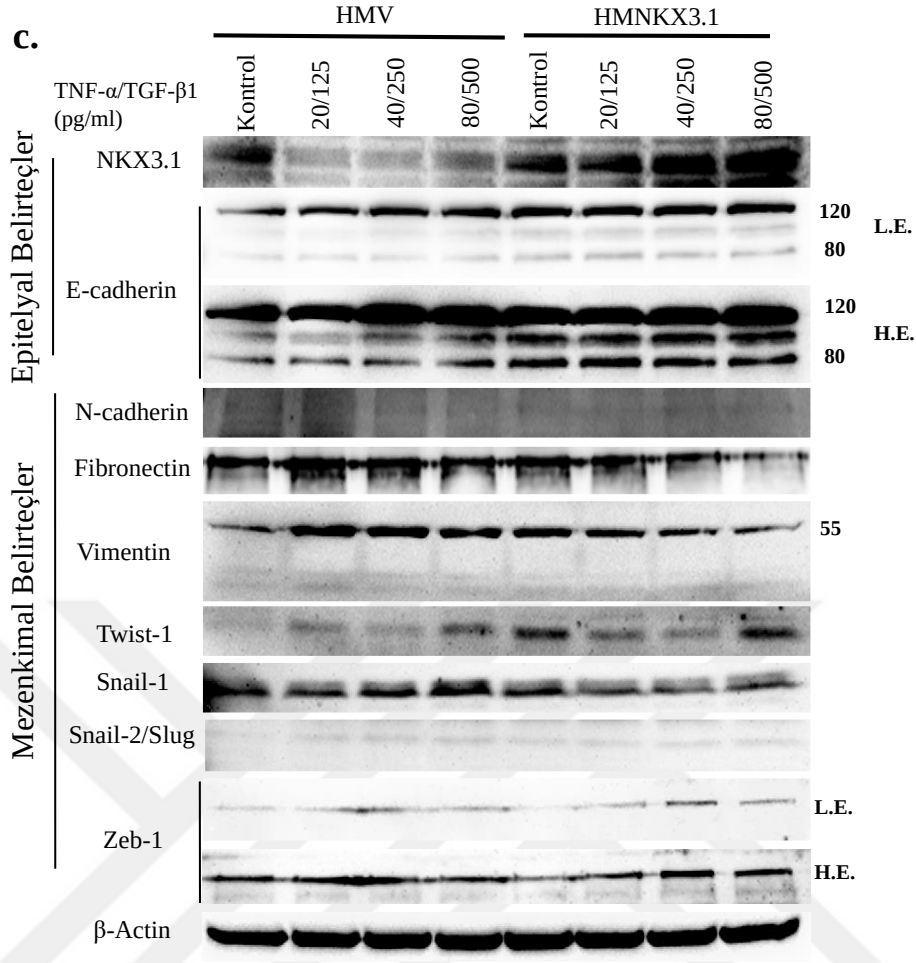
Şekil 4.10. Şekil 4. 9’da bir arada verilen sonuçların detaylı incelenebilmesi amacıyla büyük versiyonları ayrı ayrı sunuldu. TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile 8 gün kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinin a. 2,5/125, 5/250 ve 10/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 b. 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 c. 45/20, 90/40 ve 180/80 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içerikli CM uygulanan kültür modeline ait hücrelerdeki epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin seviyesel analizlerini gösteren western blot görüntüleri.

NKX3.1 ekspresyonunun EMT belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisini, fonksiyonel NKX3.1 ekspresyonu bulunmayan PC-3 ve DU 145 hücrelerinde, geçici NKX3.1 transfeksiyonu yoluyla analizlemek amacıyla, bu hücrelere 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM (8 gün) uygulaması yapılarak, son 48 saat geçici HMNKX3.1 transfeksiyonu gerçekleştirildi. Morfolojik olarak hücre çoğalmasında bir değişiklik ve belirgin bir mezenkim-benzeri morfoloji gözlenmedi (Şekil 4.11a). Hücre canlılığının ise enflamatuvar mikroçevrede değişmediği, NKX3.1 ektopik ekspresyonu ile azaldığı belirlendi (Şekil 4.11b).

PC-3 hücrelerindeki NKX3.1 ektopik ekspresyonu doğrulandı. E-kaderin olgun membran bağlı formunun (120 kDa) protein seviyesinde değişmediği ancak çözünür formunun (80 kDa)

enflamatuvar koşullara ve NKX3.1 varlığına bağlı olarak arttığı tespit edildi. Görüntülenebilir bir N-kaderin ekspresyonu gözlenmedi. Fibonektin seviyesinde belirgin bir değişim görülmezken vimentin ve TWIST1 düzeylerinin enflamatuvar mikroçevreden bağımsız olarak NKX3.1 ekspresyonu ile arttığı belirlendi. Ayrıca her ikisinin de enflamatuvar durumda arttığı ancak enflamatuvar durumda NKX3.1 eksprese eden hücrelerde baskılandığı tespit edildi. SNAIL1 seviyesinde hafif bir baskılanma görülürken, SNAIL2 ve ZEB1 protein seviyelerinde bir değişim gözlenmedi (şekil 4.11c).





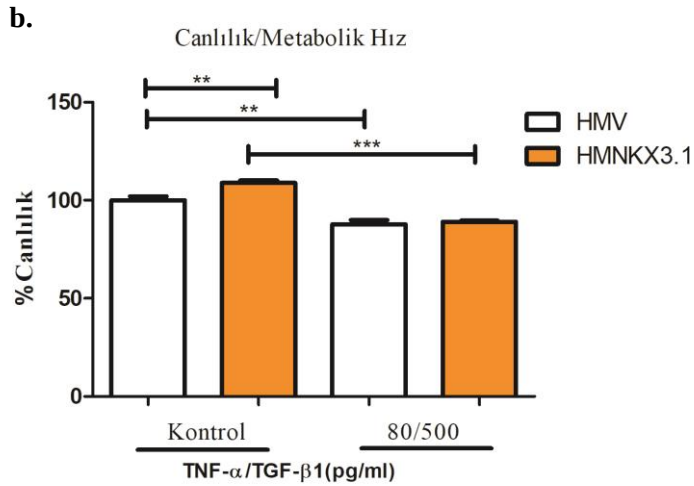
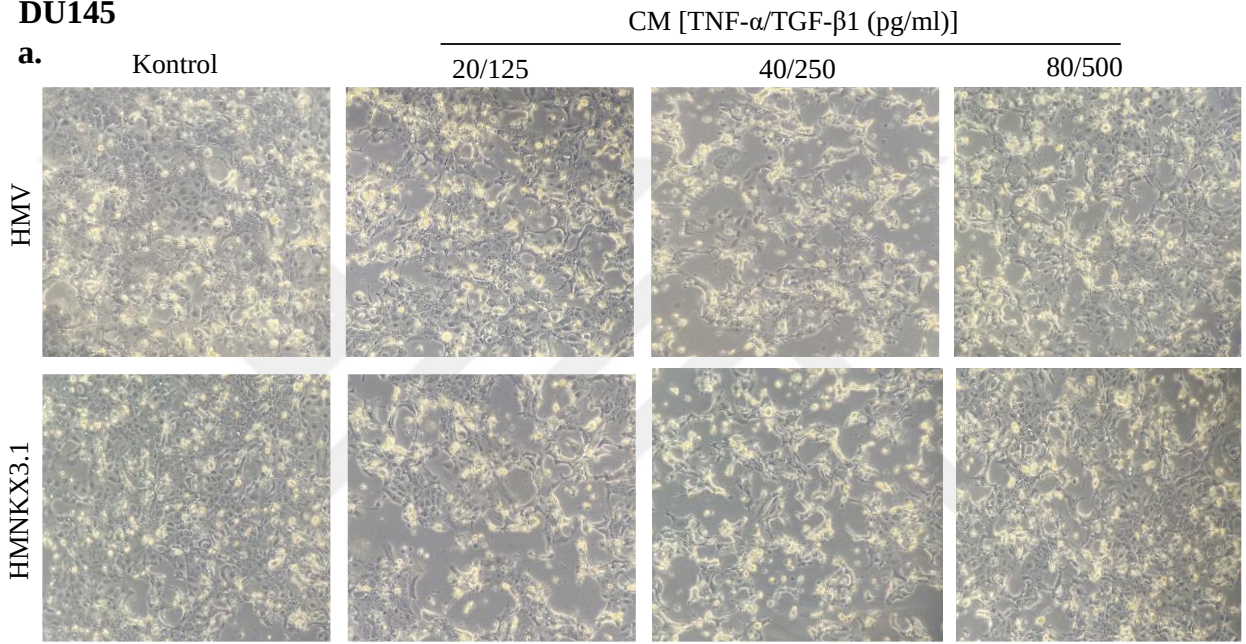
Şekil 4.11. 8 gün boyunca 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren ile CM ile kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan PC-3 hücrelerinin a. morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri b. hücrelerin canlılık/metabolik hızlarını gösteren WST-1 ölçüm grafiği c. epitelyal ve mezenkimal belirteçlerinin seviyesel analizlerini gösteren western blot görüntüsü. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001.

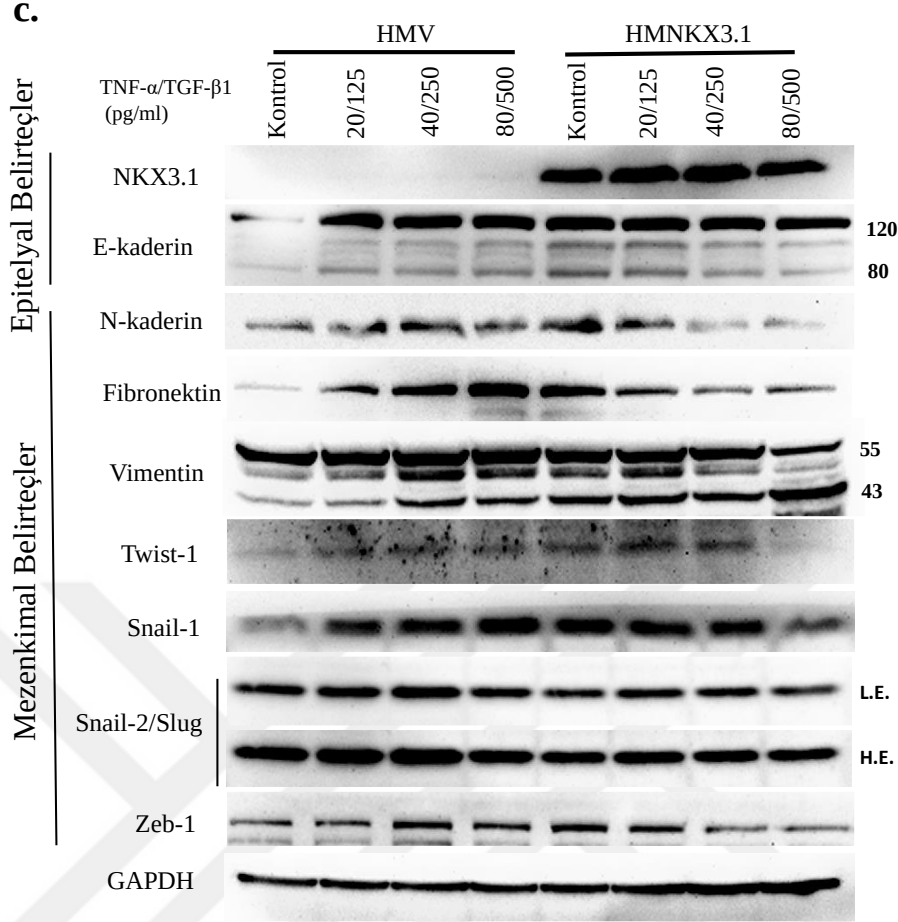
DU 145 hücrelerinde faz kontrast mikroskopi görüntülerinde, enflamatuvar duruma bağlı olarak hücre sayısında hafif bir azalma olduğu ve mezenkim-benzeri morfolojiye sahip hücrelerin olduğu tespit edildi (Şekil 4.12a). Enflamatuvar koşulların hücre canlılığını düşük düzeyde baskıladığı, normal durumda NKX3.1 ektopik ekspresyonunun hücre canlılığını desteklediği fakat enflamatuvar koşullarda azalttığı belirlendi (Şekil 4.12b).

EMT belirteçlerinin protein seviyelerinin analizinde öncelikle NKX3.1 ektopik ekspresyonu doğrulandı. E-kaderin seviyesi değişmezken, mezenkimal belirteçler N-kaderin ve fibronektinin enflamatuvar koşullarda arttığı belirlendi. NKX3.1 ekspresyonunun diğer

sonuçlarla örtüşen şekilde enflamatuvar ortamdan bağımsız olarak N-kaderin ve fibronektin ekspresyonunu artırdığı, ancak enflamatuvar koşullarda baskılandığı tespit edildi. Vimentin seviyesinde belirgin bir değişiklik gözlenmezken, TWIST1 ve SNAIL1'in enflamatuvar koşullarda ve yalnızca NKX3.1 ekspresyonu durumunda arttığı ancak, enflamatuvar koşullarda NKX3.1 ekspresyonu varlığında baskılandığı belirlendi. SNAIL2 ve ZEB1 düzeylerinde enflamatuvar mikroçevrede görülen hafif artışın NKX3.1 ektopik ekspresyonu ile azaldığı görüldü (Şekil 4.12c).

DU145

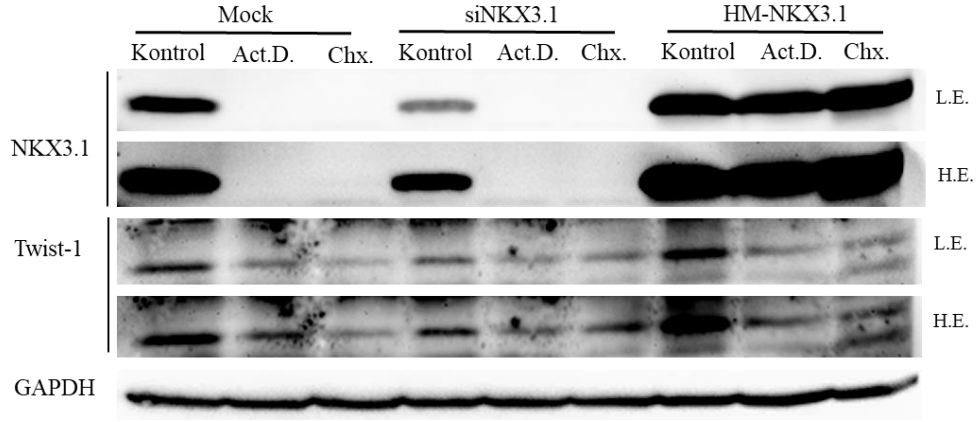




Şekil 4.12. 8 gün boyunca 20/125, 40/250 ve 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren ile CM ile kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan DU 145 hücrelerinin a. morfolojik değişimlerini gösteren ışık mikroskobu görüntüleri b. 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren ile CM ile kültürü yapılan hücrelerin canlılık/metabolik hızlarını gösteren WST-1 ölçüm grafiği c. epitelyal ve mezenkimal belirteçlerinin seviyesel analizlerini gösteren western blot görüntüsü. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001.

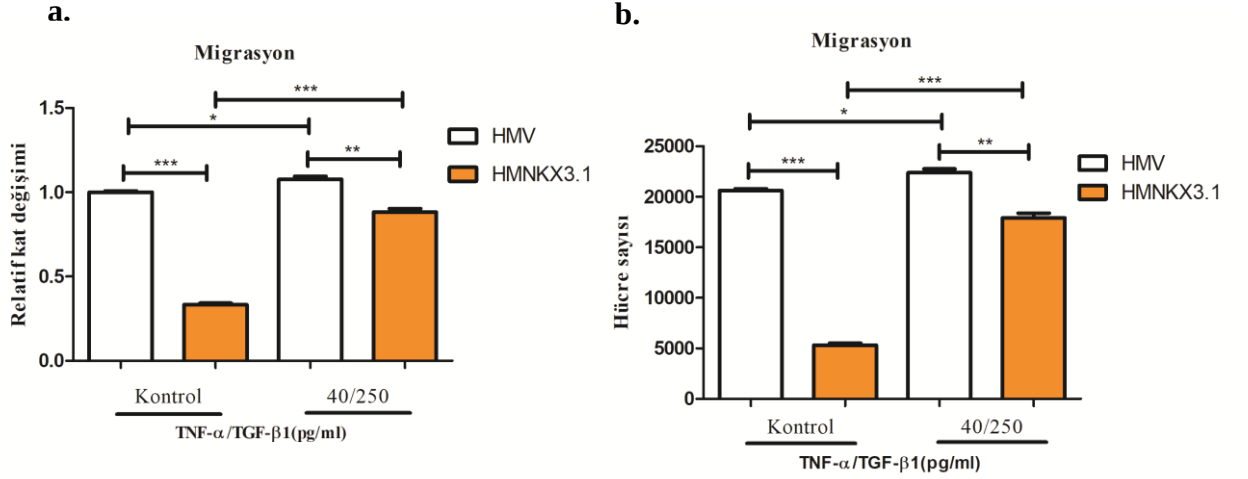
LNCaP, PC-3 ve DU 145 hücrelerinde, ektopik NKX3.1 ekspresyonunun enflamatuvar koşullardan bağımsız olarak TWIST1 seviyesinde neden olduğu artışın doğrulanması ve transkripsiyonel olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, endojen NKX3.1 ekspresyonu siNKX3.1 ile baskılandı ve HMNKX3.1 transfeksiyonu ile artırıldığı durumlarda, transkripsiyon inhibitörü aktinomisin D (Act.D.) ve translasyon inhibitörü sikloheksimid (Chx) uygulamaları gerçekleştirilen hücrelerde, NKX3.1 ve TWIST1 protein seviyeleri karşılaştırmalı olarak analiz edildi. LNCaP hücrelerinde NKX3.1 susturulması ile TWIST1 seviyesinin azaldığı, ektopik ekspresyon durumunda ise arttığı tespit edildi. Transkripsiyon ve translasyonun inhibe edildiği hücresel koşullarda, NKX3.1'in susturulduğu ve ektopik olarak eksprese edildiği hücrelerde, kontrole göre belirgin bir TWIST1 değişimi gözlenmedi. Ancak

NKX3.1 susturulduğu durumda Chx uygulaması ile TWIST1 seviyesinin korunduğu tespit edildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Mock kontrol, endojen NKX3.1 ekspresyonu baskılanan ve HMNKX3.1 vektörü ile ektopik NKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinde, NKX3.1 ve TWIST1 proteinlerinin transkripsiyonel (Act.D.) ve translasyonel inhibisyon (Chx) sonucu protein seviyelerini gösteren western blot görüntüsü. Act.D. (Actinomycin D): transkripsiyon inhibitörü, Chx (Cycloheximide):translasyon inhibitörü.

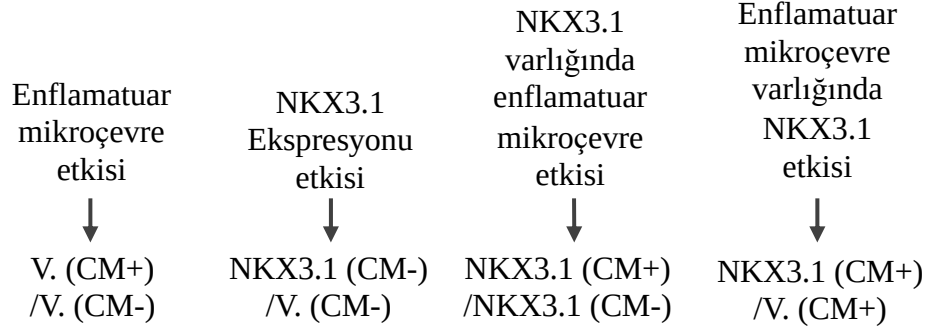
EMT belirteçlerinde değişimin görüldüğü enflamatuvar mikroçevre koşullarında, LNCaP hücrelerinin migrasyon özelliklerinin araştırılması amacıyla hücreler, 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile 8 gün boyunca kültür edildi ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırıldı. Migrasyon analizi için transwell insertden geçiş düzeyleri ölçülerek kontrole göre relatif kat değişimi (Şekil 4.14a) ve migrasyonla membrandan geçen hücre sayısı (Şekil 4.14b) olarak grafikleldi. Enflamatuvar mikroçevre ile hücre migrasyonun az miktarda arttığı belirlendi. NKX3.1 ekspresyonunun ise normal ve enflamatuvar koşullarda migrasyonu baskıladığı görüldü.



Şekil 4.14 . 8 gün boyunca 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile kültürü yapılan ve son 48 saat geçici HMNKX3.1 ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerinde a. migrasyon oranını b. göç eden hücre sayısını gösteren grafik. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001.

4.5. Enflamatuvar Mikroçevre ve NKX3.1 Ekspresyonu Sonucu Epitelyal-Mezenkimal Transizyon İlişkili Genlerin Ekspresyon Değişimleri

Normal ve enflamatuvar hücrel koşullarda NKX3.1 aracılığıyla değişen EMT faktörlerinin bütüncül olarak ele alınması, tümör mikroçevresindeki heterojen ve birbiri ile yoğun bir etkileşimde olan tümörjenik faktörlerin belirlenebilmesi açısından gerekli ve önemlidir. Bu yaklaşımla EMT ilişkili gen ekspresyon değişikliklerinin bir array platformunda araştırılması amaçlandı. Enflamatuvar mikroçevre ve NKX3.1 ekspresyonuna bağlı olarak EMT sürecinde rol oynayan faktörlerin gen ekspresyon değişikliklerinin, mRNA düzeyinde araştırılması amacıyla “RT² Profiler™ PCR Array Human Epithelial to Mesenchymal Transition” array seti ile çalışıldı. LNCaP hücrelerine, 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM 8 gün süreyle uygulandı ve son 48 saat HMNKX3.1 ektopik ekspresyonu kazandırıldı. Şekil 4.10.b’de immünoiblot sonuçları gösterilen deney seti ile eş zamanlı olarak transfeksiyon ve CM uygulamaları gerçekleştirilen ve RNA izolasyonu yapılan deney setinde, protein düzeyinde NKX3.1 ektopik ekspresyonu ve CM etkisi Şekil 4.10.b’de görülmektedir. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR denemeleri array protokolünde belirtilen yöntemlere uygun olarak gerçekleştirildi. Analiz sonuçlarındaki genlerin ekspresyon düzeyleri, gruplar arasında oranlanarak grafiklendi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar şekil 4.15’deki şemada özetlenmiştir.



Şekil 4.15. Enflamatuvar mikroçevre etkisi, NKX3.1 etkisi, NKX3.1 varlığında enflamatuvar mikroçevre etkisi ve enflamatuvar mikroçevre varlığında NKX3.1 etkisini gösteren gruplar arası karşılaştırmaları açıklayan şema.

EMT array setindeki önemli sayıda genin ekspresyon düzeyinin enflamatuvar mikroçevreden etkilendiği ve arrayde analiz edilen 84 genden 22 tanesinin uygulanan enflamatuvar mikroçevre modelinde değiştiği ve böylece EMT artışına neden olabilecek global bir ekspresyon değişiminin gerçekleştiği belirlendi. Bu genler arasında FOXC2'nin 33.1 kat arttığı ve önceki deneylerde protein düzeyindeki değişimi araştırılan SNAIL2 ve vimentin EMT belirteçlerinin transkripsiyonel düzeyde değiştiği doğrulandı (Tablo 4.2 ve Şekil 4.16A).

NKX3.1 ektopik ekspresyonuna bağlı olarak ekspresyonu değişen EMT ilişkili genler Şekil 4.16 B'de sunuldu. Önceki denemelerde SNAIL1'in protein düzeyindeki değişiminin transkripsiyonel seviyede gerçekleştiği belirlendi. Ayrıca NKX3.1'in aktive ettiği literatürde bilinen IGFBP ailesinden IGFBP3'ün yanında, IGFBP4'ün de ekspresyonunu artırdığı görüldü. Artan NKX3.1 seviyesine bağlı olarak ekspresyonu değişen genlerin tümü değerlendirildiğinde, NKX3.1'in EMT'yi aktive eden ve inhibe eden iki yönlü etkisinin olduğu görüldü.

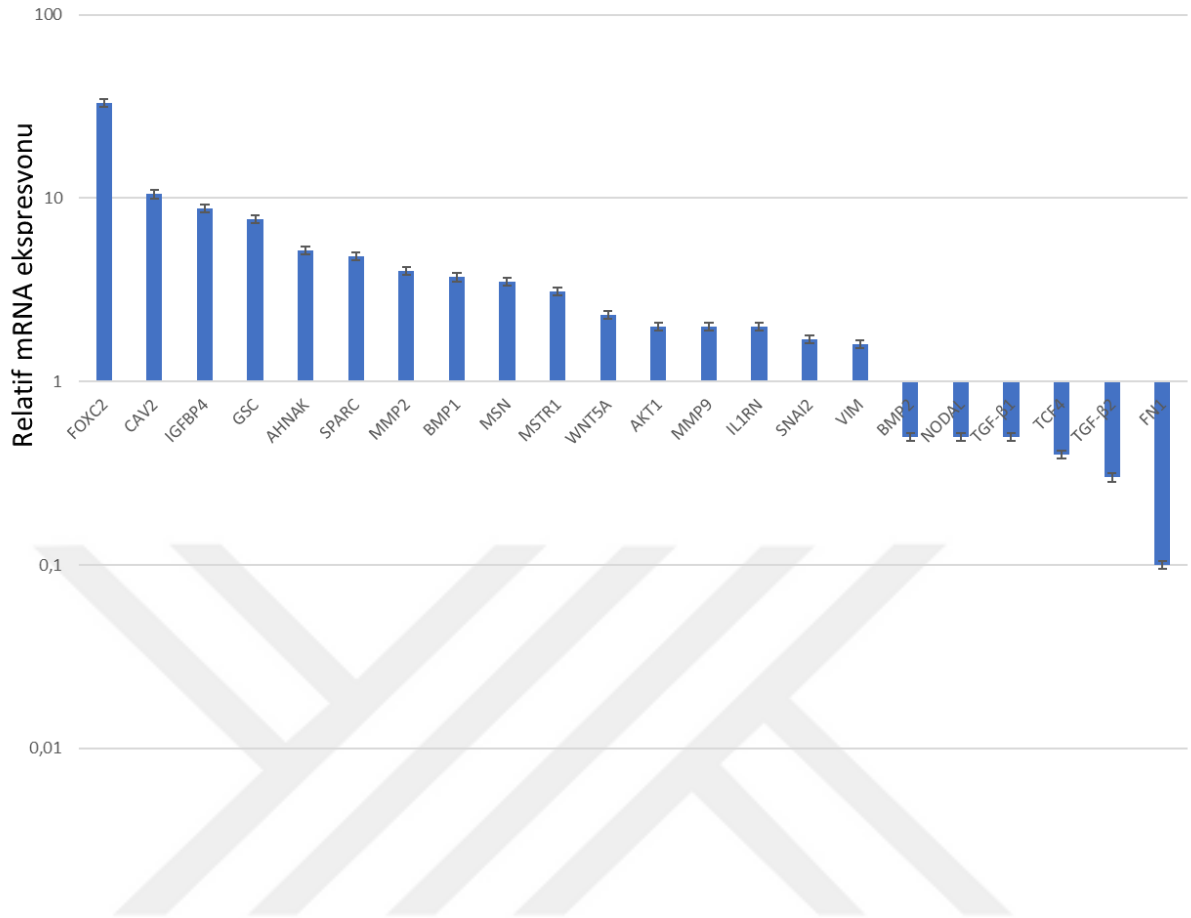
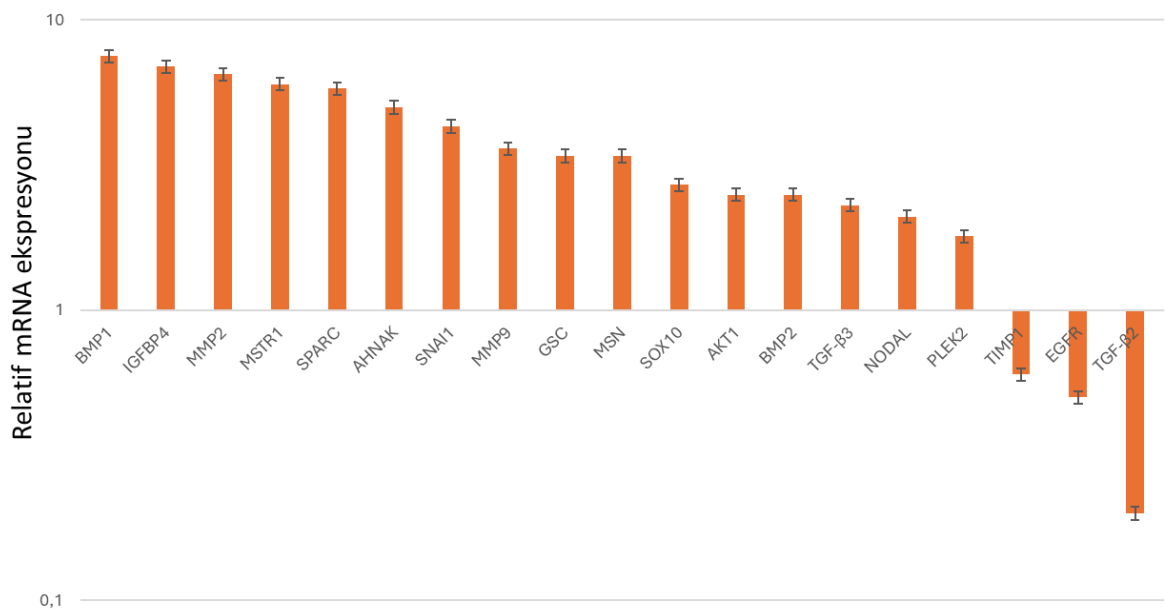
Literatürde bilinen tümör baskılayıcı rolünün yanı sıra son yıllarda, NKX3.1'in kök hücre fenotipini destekleyici fonksiyonunun da olduğu keşfedildi. Kök hücre fenotipinin EMT ile benzer hücrel mekanizmalar aracılığıyla oluştuğu dikkate alındığında, NKX3.1'in tümör baskılayıcı veya EMT fenotipini destekleyici rolünden hangisinin ortaya çıkacağını, enflamasyon gibi hücrel koşullara ve EMT ile ilişkili diğer gen ve mekanizmaların eş zamanlı etkileşimine bağlı olduğu değerlendirildi. Bu yaklaşımla, gruplar arası karşılaştırmalarda "NKX3.1 varlığında enflamatuvar mikroçevre etkisi" ve "enflamatuvar mikroçevre varlığında NKX3.1 etkisini" gösteren gen ekspresyon değişimleri Tablo 4.2 ile Şekil 4.16C ve 4.16D'de sunuldu.

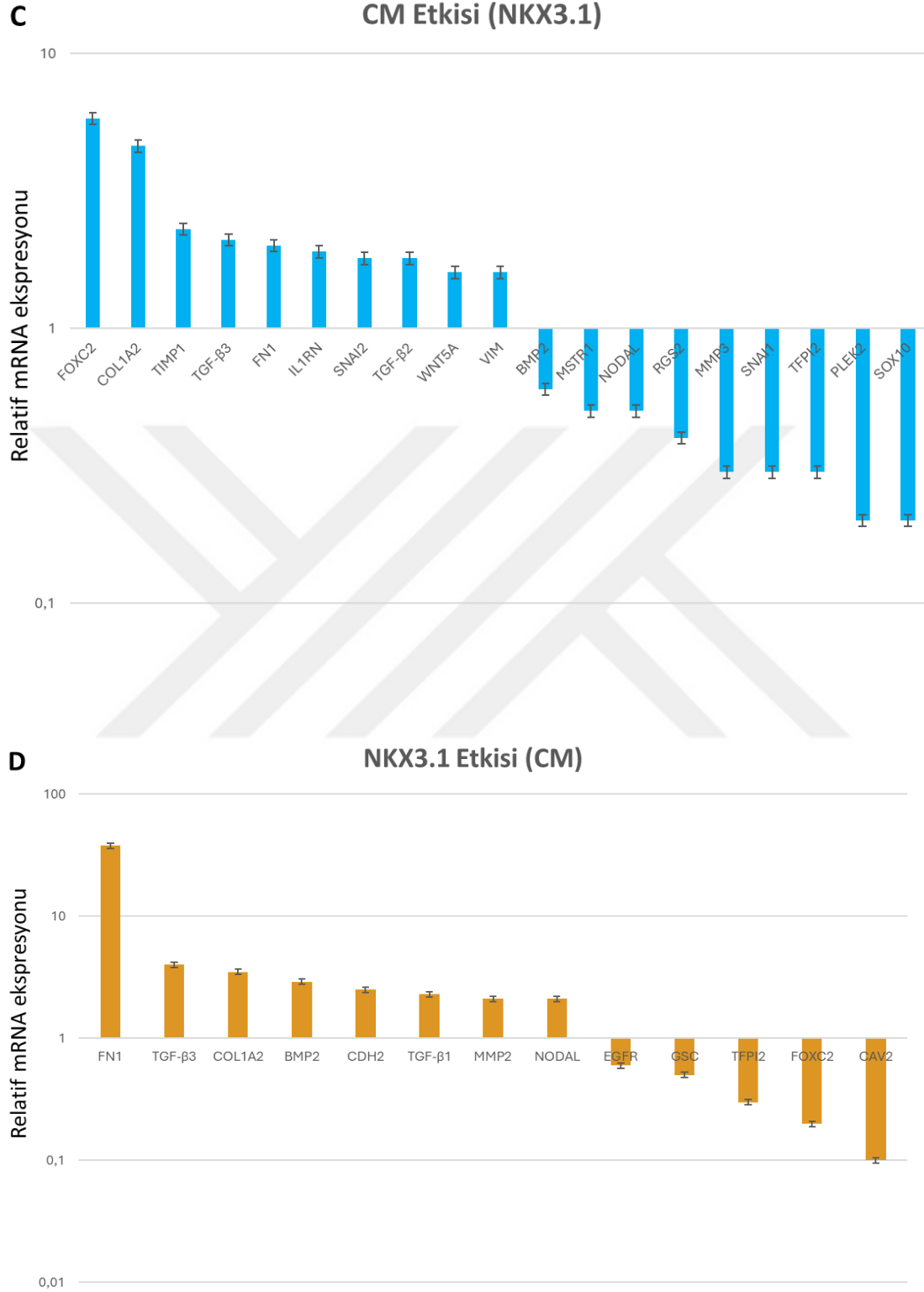
Enflamatuvar mikroçevreye bağılı vimentin artışının NKX3.1 varlığında da gerçekleştiği belirlendi. Enflamasyonda 33.1 kat artan FOXC2 ekspresyonunun NKX3.1 varlığında 5.8 kata kadar gerilediği belirlendi. MSTR1'in 3.1 kattan 0.5 kata gerilediği ve IL1RN ve SNAI2'nin enflamasyona bağılı artışının NKX3.1 ile değişmediği, enflamatuvar durumda baskılanan NODAL'ın NKX3.1'e bağılı olarak arttığı tespit edildi. Ayrıca önceki verilerle örtüşen şekilde, yalnızca NKX3.1 ekspresyonuna bağılı SNAI1 artışının, NKX3.1 varlığında CM uygulaması durumunda baskılandığı görüldü (Tablo 4.2 ve Şekil 4.16C).

NKX3.1 ektopik ekspresyonunun normal ve enflamatuvar koşullarda neden olduğu değişimler incelendiğinde, normal hücrel koşullarda MMP2 seviyesini 6.5 kat artırırken enflamatuvar durumda 2.1 kat artış olduğu görüldü. NKX3.1'in enflamatuvar ortamdan bağımsız olarak NODAL artışına ve EGFR baskılanmasına sebep olduğu belirlendi. Ayrıca enflamatuvar koşullarda NKX3.1'in CDH2 (N-kaderin) artışına neden olduğu gözlemlendi. COL1A2 ekspresyonunun enflamatuvar koşullar ve NKX3.1 ektopik ekspresyonunun bir arada olduğu iki durumda da arttığı belirlendi (Tablo 4.2 ve Şekil 4.16D).

Tablo 4.2. Grup karşılaştırmaları sonucu enflamatuvar mikroçevre (CM), NKX3.1 ekspresyonu (NKX3.1), enflamatuvar mikroçevrenin NKX3.1 varlığındaki etkisi ve NKX3.1 ekspresyonunun CM durumundaki etkisini gösteren ekspresyonu değişen EMT genlerinin listesi. Koyu mavi renk enflamatuvar mikroçevreyi, koyu turuncu renk NKX3.1 ekspresyonunu temsil etmektedir. Açık mavi renk enflamatuvar mikroçevrede NKX3.1 etkisini, açık turuncu renk NKX3.1 ekspresyonunun enflamatuvar mikroçevre koşullarındaki etkisini temsil etmektedir. 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM (8 gün) ile kültürü yapılan, son 48 saat HMNKX3.1 ektopik ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerine ait RT-PCR (EMT) array analizi sonuçları.

CM Etkisi		NKX.1 Etkisi		CM etkisi (NKX3.1 varlığında)		NKX3.1 Etkisi (CM varlığında)	
FOXC2	33,1	BMP1	7,5	FOXC2	5,8	FN1	37,7
CAV2	10,5	IGFBP4	6,9	COL1A2	4,6	TGF- β 3	4
IGFBP4	8,8	MMP2	6,5	TIMP1	2,3	COL1A2	3,5
GSC	7,7	MSTR1	6	TGF- β 3	2,1	BMP2	2,9
AHNAK	5,2	SPARC	5,8	FN1	2	CDH2	2,5
SPARC	4,8	AHNAK	5	IL1RN	1,9	TGF- β 1	2,3
MMP2	4	SNAI1	4,3	SNAI2	1,8	MMP2	2,1
BMP1	3,7	MMP9	3,6	TGF- β 2	1,8	NODAL	2,1
MSN	3,5	GSC	3,4	WNT5A	1,6	EGFR	0,6
MSTR1	3,1	MSN	3,4	VIM	1,6	GSC	0,5
WNT5A	2,3	SOX10	2,7	BMP2	0,6	TFPI2	0,3
AKT1	2	AKT1	2,5	MSTR1	0,5	FOXC2	0,2
MMP9	2	BMP2	2,5	NODAL	0,5	CAV2	0,1
IL1RN	2	TGF- β 3	2,3	RGS2	0,4		
SNAI2	1,7	NODAL	2,1	MMP3	0,3		
VIM	1,6	PLEK2	1,8	SNAI1	0,3		
BMP2	0,5	TIMP1	0,6	TFPI2	0,3		
NODAL	0,5	EGFR	0,5	PLEK2	0,2		
TGF- β 1	0,5	TGF- β 2	0,2	SOX10	0,2		
TCF4	0,4						
TGF- β 2	0,3						
FN1	0,1						

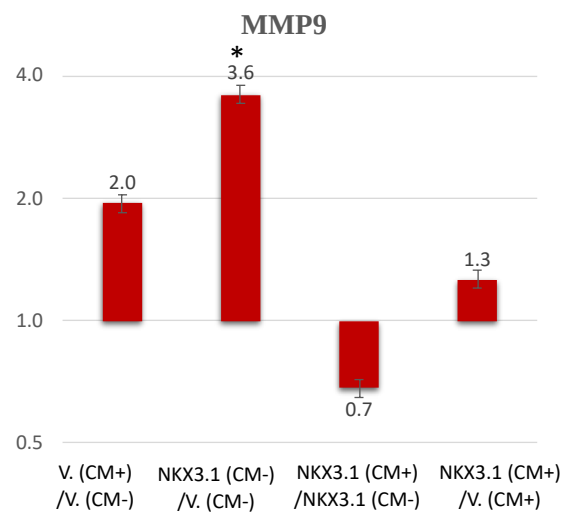
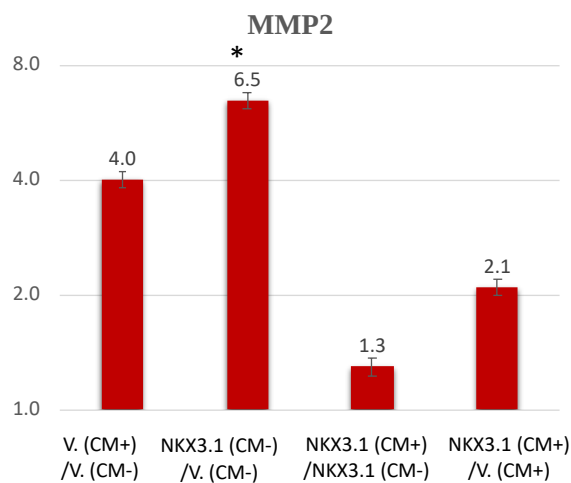
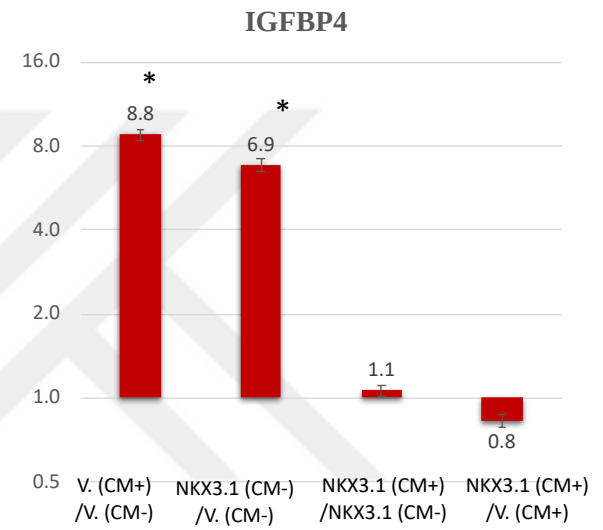
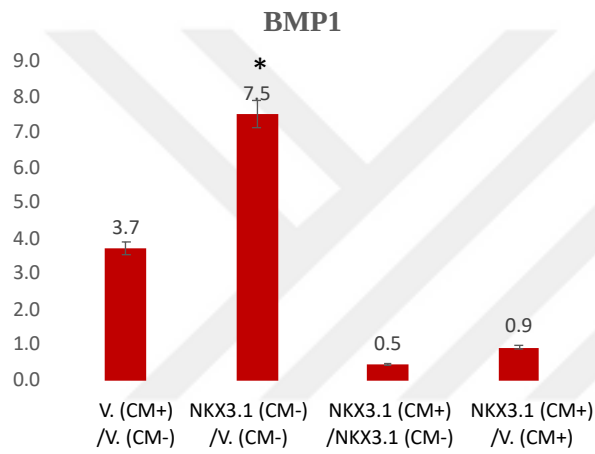
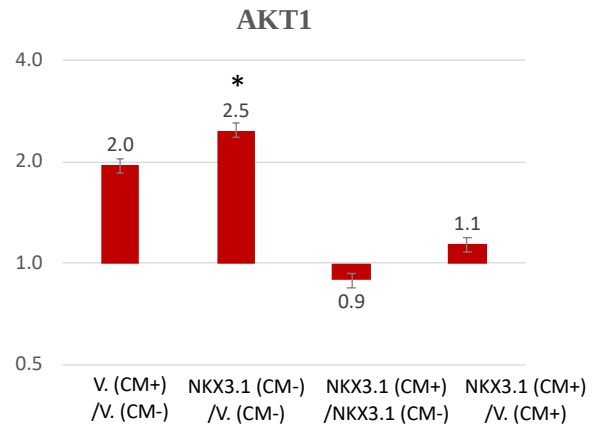
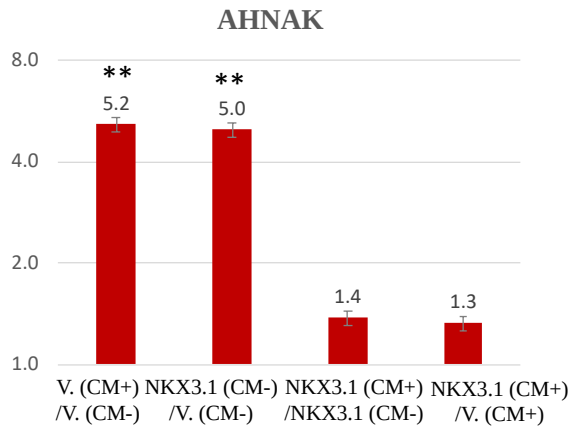
A**CM Etkisi****B****NKX3.1 Etkisi**

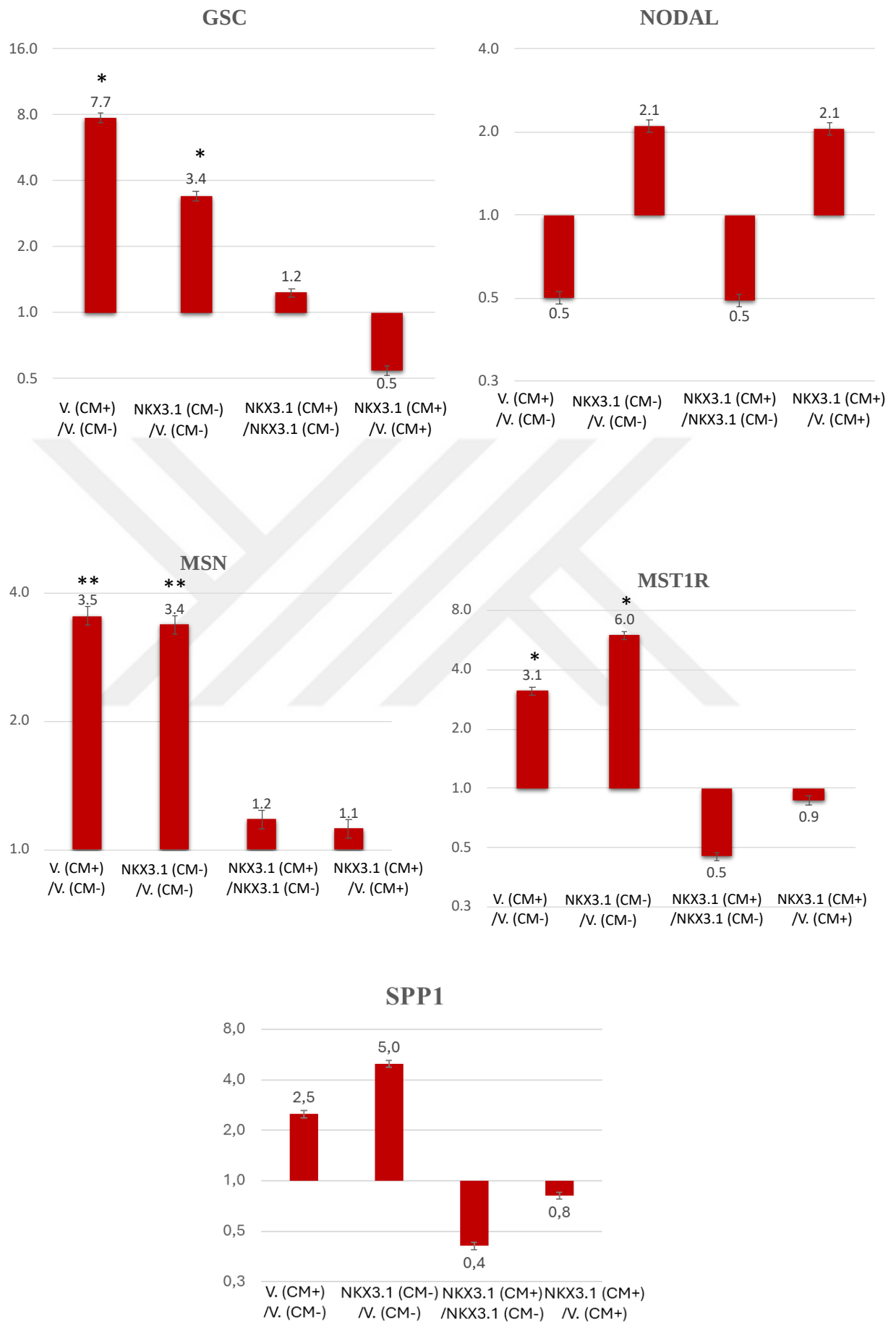


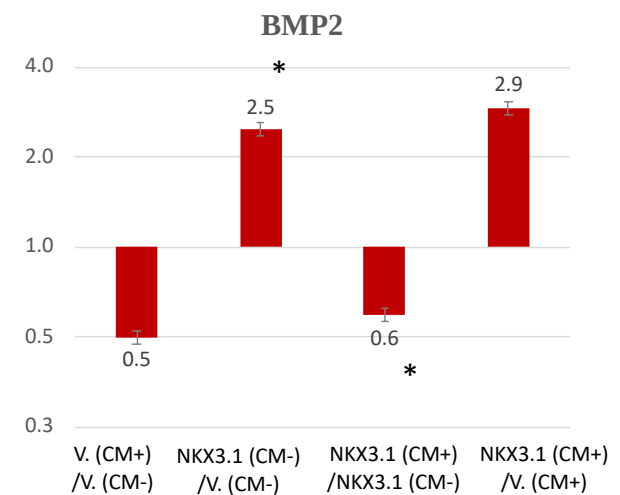
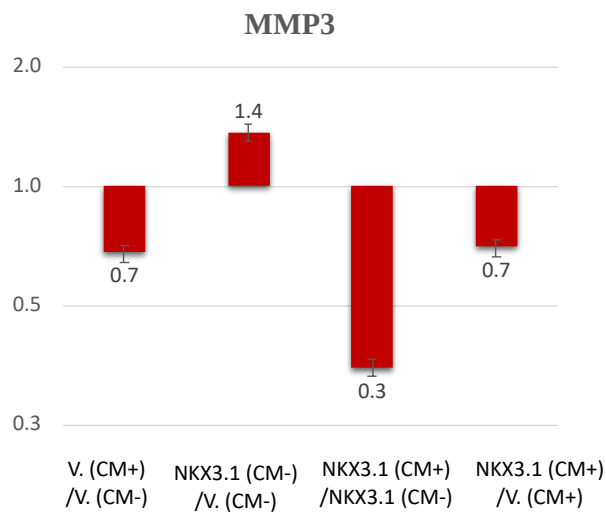
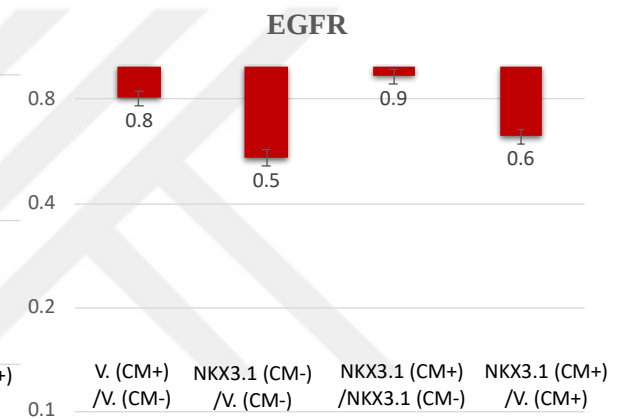
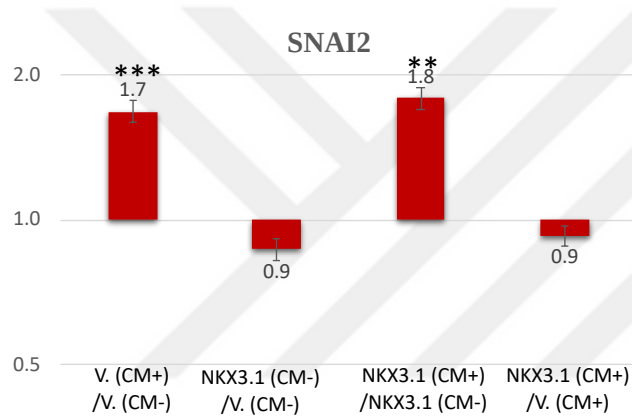
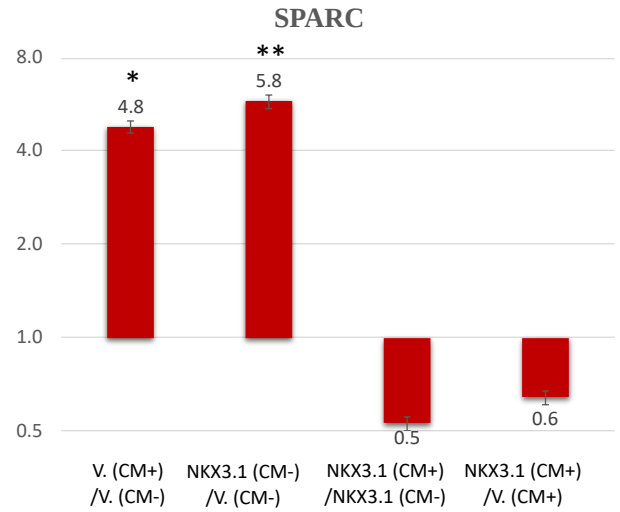
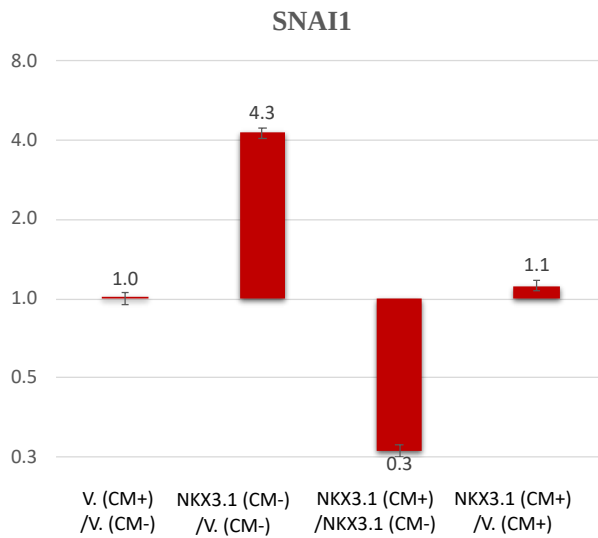
Şekil 4.16. 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM (8 gün) ile kültürü yapılan, son 48 saat HMNKX3.1 ektopik ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerine ait RT-PCR (EMT) array analiz sonuçları. Grup karşılaştırmaları

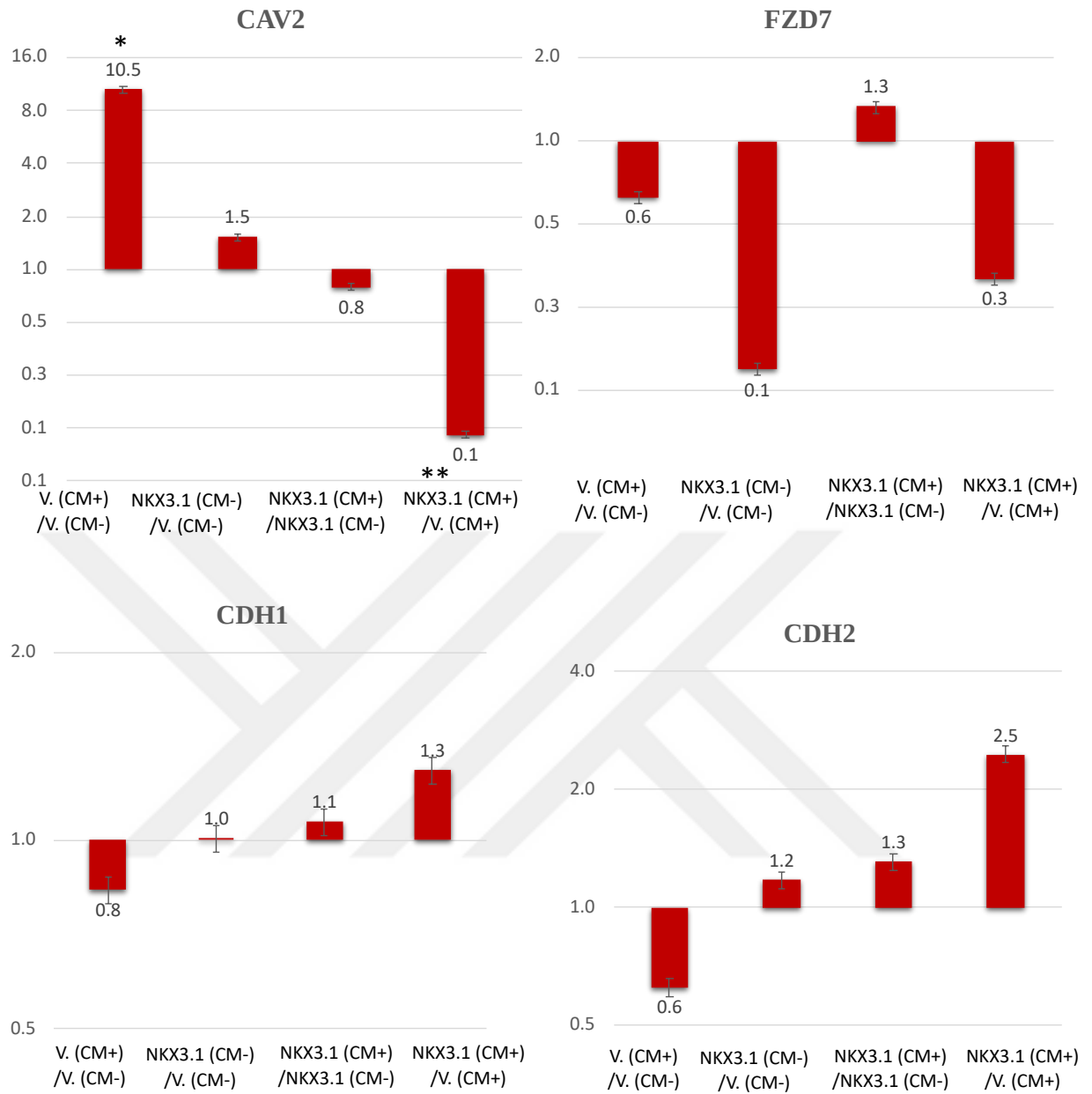
sonucu A. enflamatuvar mikroçevre (CM), B. NKX3.1 ekspresyonu (NKX3.1), C. enflamatuvar mikroçevrenin NKX3.1 varlığındaki etkisi (CM (NKX3.1)) ve D. NKX3.1 ekspresyonunun CM durumundaki etkisini (NKX3.1 (CM)) gösteren gen ekspresyonu değişim grafikleri. Koyu mavi renk enflamatuvar mikroçevreyi, koyu turuncu renk NKX3.1 ekspresyonunu temsil etmektedir. Açık mavi renk enflamatuvar mikroçevre koşullarındaki NKX3.1 etkisini, açık turuncu renk NKX3.1 ekspresyonu durumunda enflamatuvar mikroçevre etkisini temsil etmektedir.

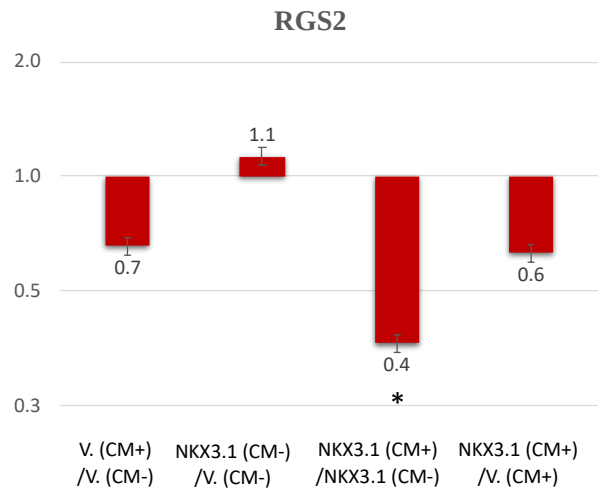
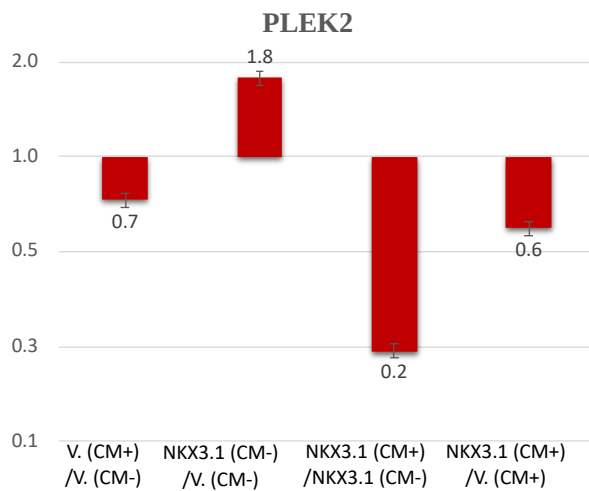
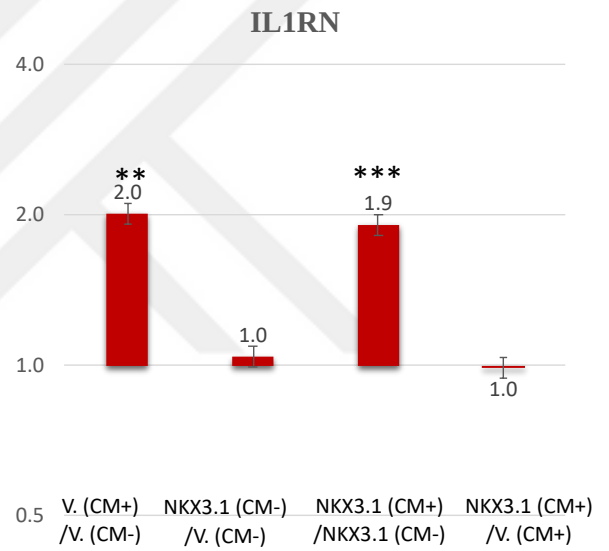
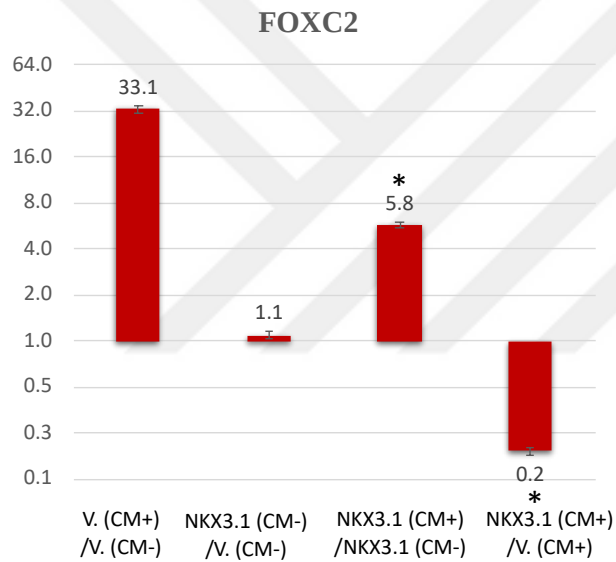
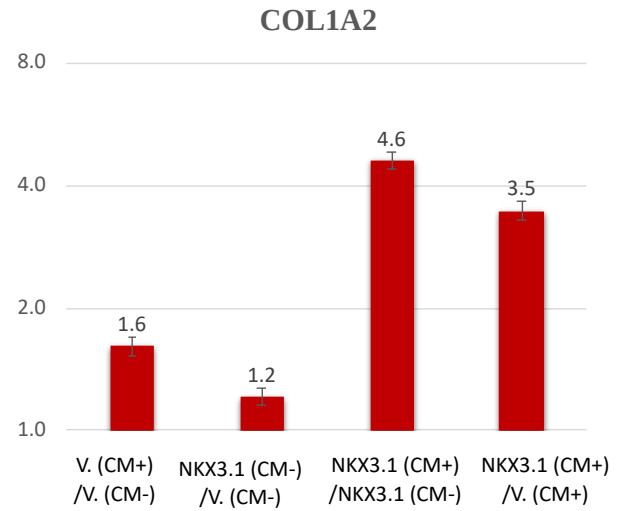
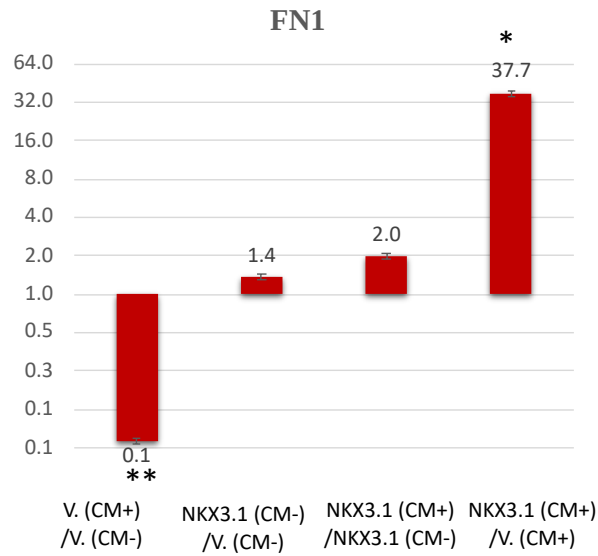
Her genin farklı hücresel durumlara (enflamasyon varlığı/yokluğu, NKX3.1 ektopik ekspresyonu varlığı/yokluğu) bağlı ekspresyon değişimini bütüncül olarak inceleyip değerlendirebilmek amacıyla, her genin gruplar arası 4 karşılaştırma sonucu gösterdiği değişimler ayrı ayrı grafiklendi. AHNK, AKT1, BMP1, IGFBP4, MMP9, MSN, GSC, MST1R ve SPARC'nin enflamatuvar koşullar ve yalnız NKX3.1 ekspresyonu durumunda artarken, MSN'nin diğer koşullarda değişmediği, GSC, MST1R ve SPARC'nin ise baskılandığı gözlemlendi. MMP2'nin enflamasyon ve NKX3.1'e bağlı koşullarda arttığı, NODAL'ın ise enflamatuvar koşullarda azalırken NKX3.1 ekspresyonu ile arttığı belirlendi. SNAI1 ve SNAI2'nin enflamatuvar koşullar ve NKX3.1 varlığında birbirine göre ters regüle edildikleri, SNAI1'in yalnız NKX3.1 etkisi ile artarken, NKX3.1 varlığında CM uygulaması durumunda baskılandığı, SNAI2'nin ise enflamatuvar koşullara bağlı olarak arttığı görüldü. SOX10'un da SNAI1 ile benzer değişim paterni gösterdiği belirlendi. TWIST1'in tüm koşullarda transkripsiyonel olarak değişmediği, WNT5A ve VIM (vimentin)'in enflamatuvar koşullarda arttığı, NKX3.1 etkisi ile değişmediği, ZEB1'in ise NKX3.1'e bağlı olarak artış eğiliminde olduğu tespit edildi (Şekil 4.17).

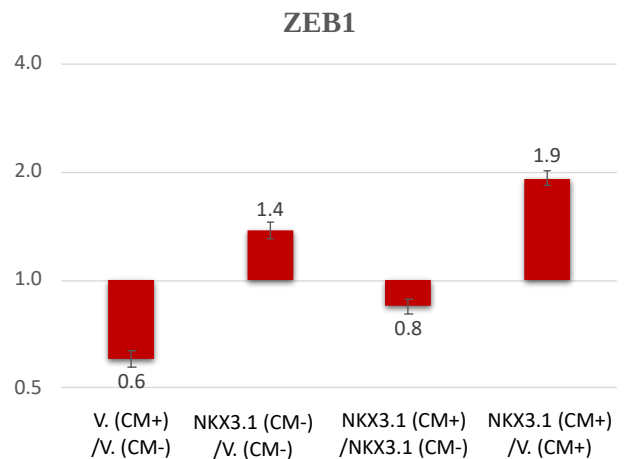
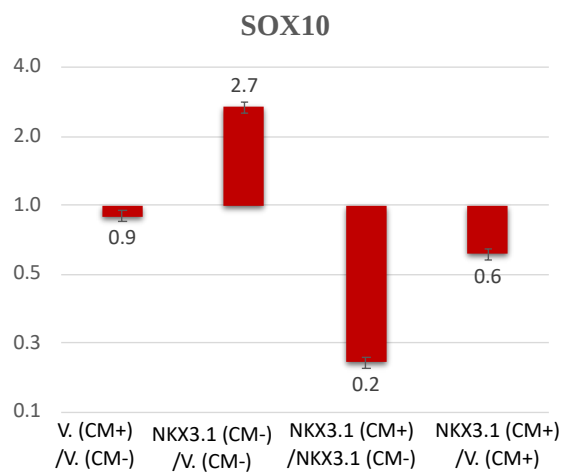
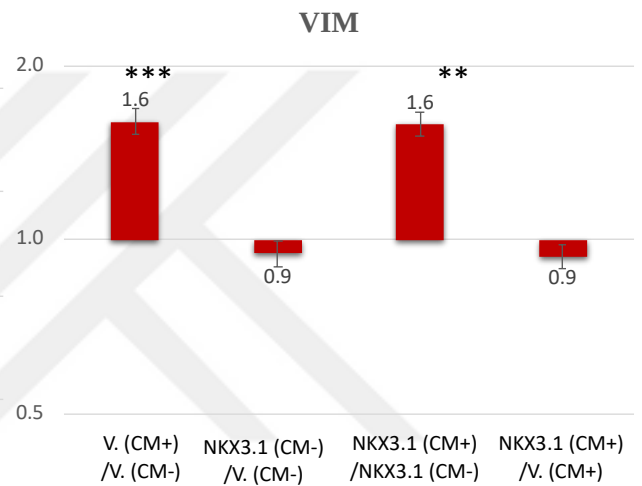
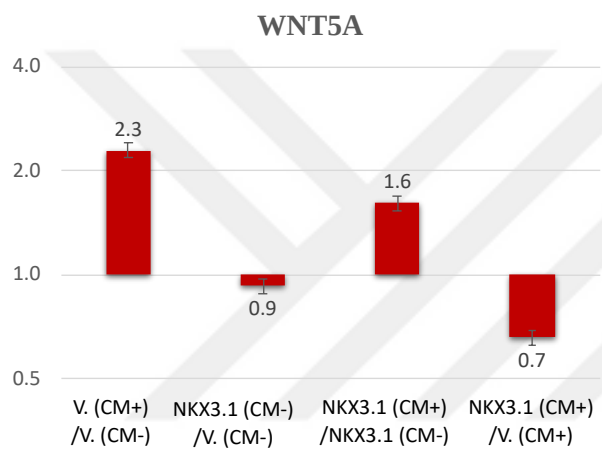
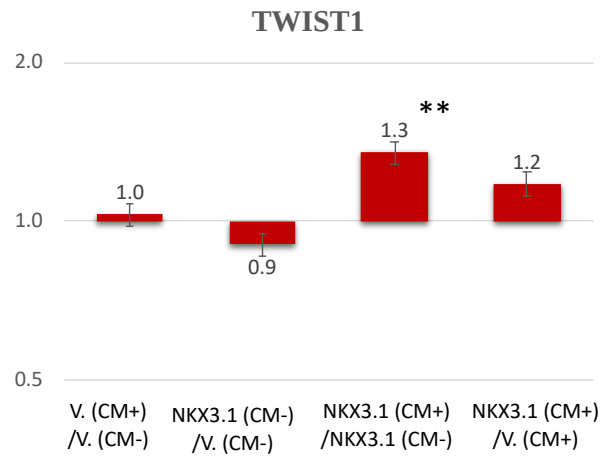
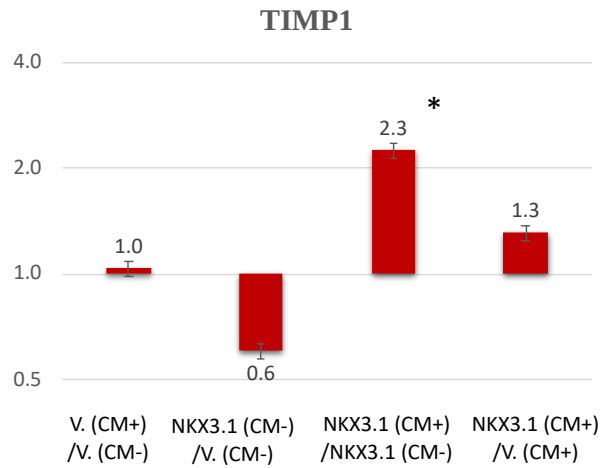


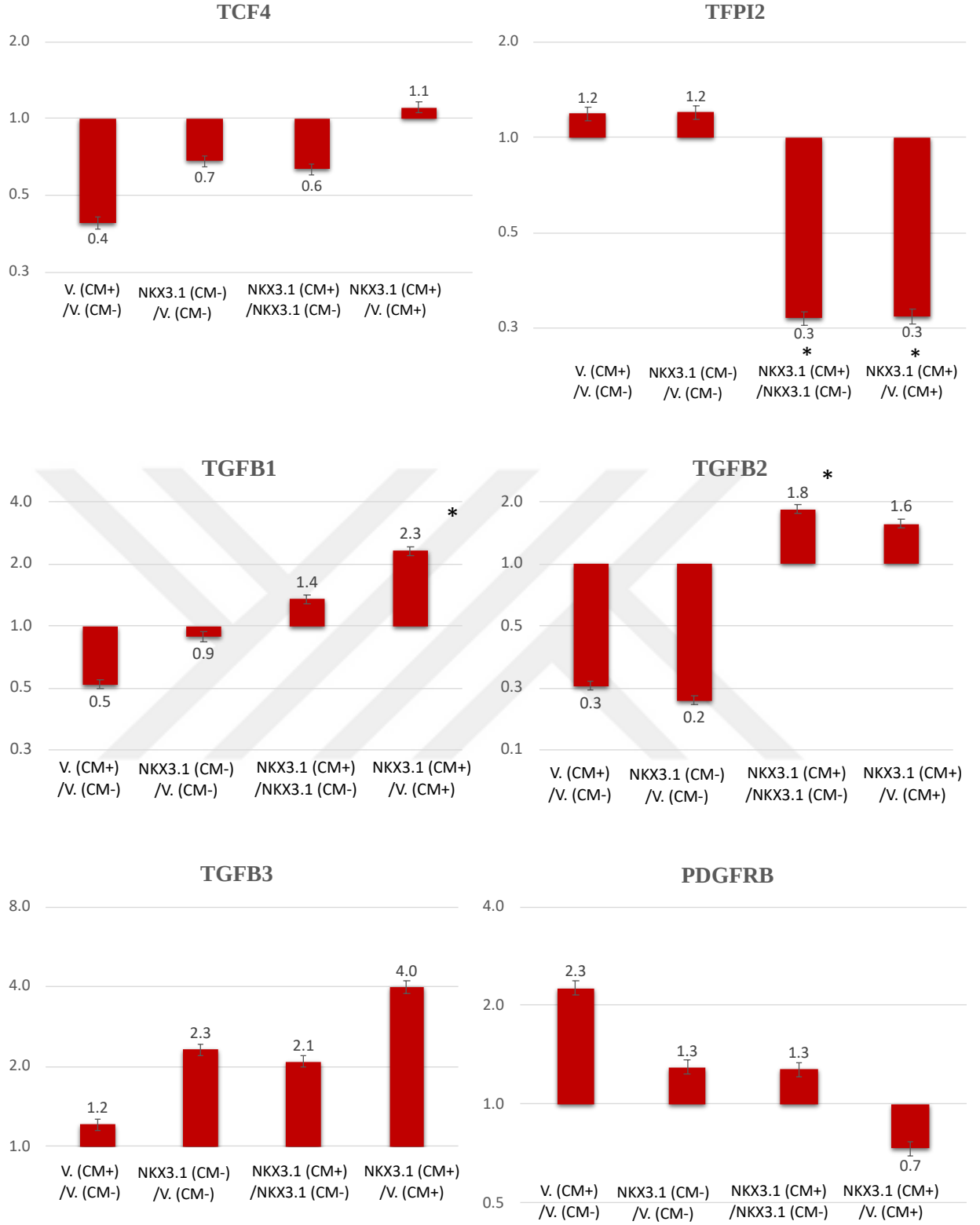








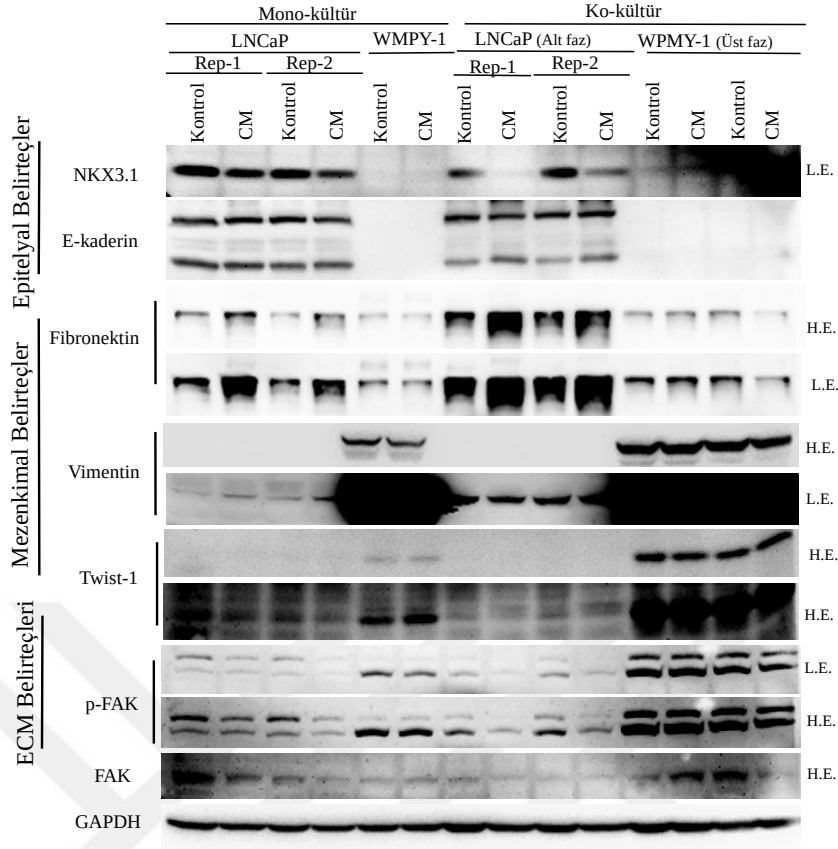




Şekil 4.17 . 8 gün boyunca 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile kültürü yapılan, son 48 saat HMNKX3.1 ektopik ekspresyonu kazandırılan LNCaP hücrelerine ait EMT ilişkili 39 genin transkripsiyon düzeyindeki seviyesel değişimlerini gösteren RT-PCR (EMT) array grafikleri. p değeri; *: <0,05, **: <0,01, ***: <0,001.

4.6. Tümör-Stroma Etkileşimin, Enflamatuvar Mikroçevre ve NKX3.1 Ekspresyonu Sonucu Görülen EMT Değişimlerine Etkisi

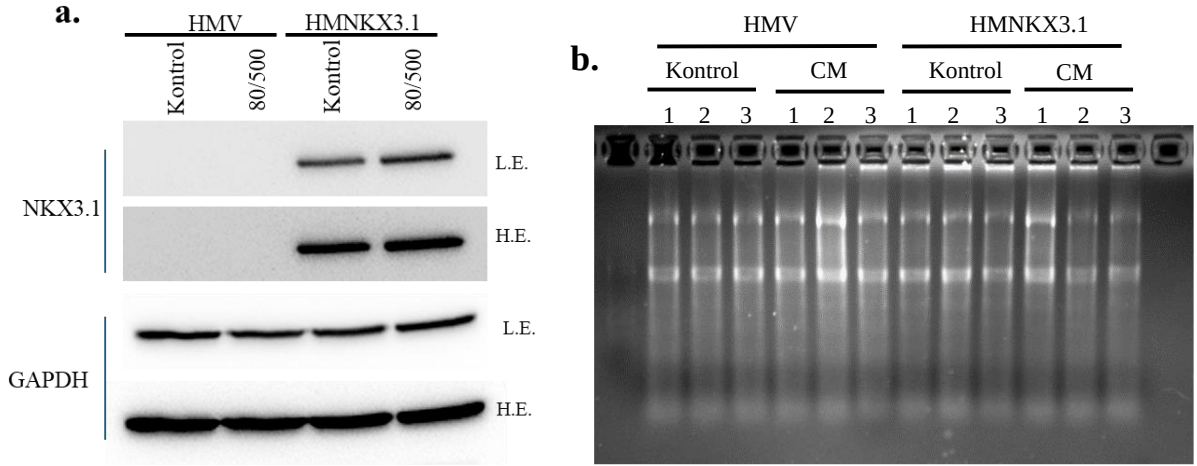
Kanser-ilişkili fibroblastların enflamatuvar tümör mikroçevresinde EMT'yi ve metastazı destekledikleri bilinmektedir. Bunun yanında enflamatuvar mikroçevrede tetiklenen reaktif stroma yapısının da EMT ve metastazda rolü bulunmaktadır. NKX3.1 ilişkili değişimlerin, stromal etkileşimlerden ne ölçüde etkilendiğini araştırmak amacıyla LNCaP hücreleri, WPMY1 prostat myofibroblast hücre hattı ile transwell ko-kültür sistemi kullanılarak enflamatuvar varlığında/yokluğunda kültür edildi. Önceki sonuçlarda değiştiği belirlenmiş olan EMT ilişkili belirteçlerin protein seviyelerindeki olası değişimler analiz edildi. Enflamatuvar koşullara bağlı NKX3.1 degradasyonunun, ko-kültür koşullarında daha yüksek olduğu tespit edildi. E-kaderin seviyesinin değişmediği, enflamasyona bağlı fibronektin artışının ko-kültürde daha yüksek olduğu belirlendi. Vimentin protein seviyesinin ko-kültür koşulunda yüksek olduğu ancak enflamasyona bağlı olarak değişmediği görüldü. TWIST1 seviyesi değişmezken, p-FAK'ın enflamatuvar koşullarda azaldığı belirlendi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. 8 gün boyunca 40/250 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM ile kültürü yapılan LNCaP hücrelerinde, kontrole karşı enflamasyon durumunda ve bazal NKX3.1 ekspresyonu varlığında, epitel-stromal hücre etkileşiminin sağlandığı ko-kültürde (2 replika), epitelyal ve mezenkimal proteinler ile ECM biyobelirteci olan p-FAK ve FAK proteinlerinin seviyesel analizlerini gösteren western blot görüntüsü.

4.7. Yeni Nesil Dizileme Örnek Setinin Doğrulanması

Yeni nesil dizileme için hizmet alımı firmasına gönderilen RNA örneklerinde, DU 145 hücrelerindeki NKX3.1 ektopik ekspresyonunun doğrulanması amacıyla, RNA izolasyon örnekleri ile eş zamanlı (3 replika) olarak hazırlanan örneklerden protein izolasyonu gerçekleştirildi ve HMNKX3.1 transfeksiyonu yapılmış örneklerde NKX3.1 ekspresyonu protein düzeyinde doğrulandı (Şekil 4.19a). Ayrıca, izole edilen RNA örneklerinin bütünlüğü, formaldehitli agaroz jel elektroforezi ile 28S ve 18S ribozomal RNA'ların bütünlüğünün gözlenmesi ile doğrulandı (Şekil 4.19b).



Şekil 4.19. DU 145 hücrelerinde 4 gün süreyle 80/500 pg/ml TNF- α /TGF- β 1 içeren CM uygulaması yapıldı, son 48 saat geçici HMNKX3.1 ektopik ekspresyonu kazandırıldı. a. Ektopik NKX3.1 ekspresyonunu gösteren western blot görüntüsü b. Trizol ile izole edilen RNA örneklerinin görüntülendiği %1 Formaldehit içeren % 1'lik agaroz jel görüntüsü.

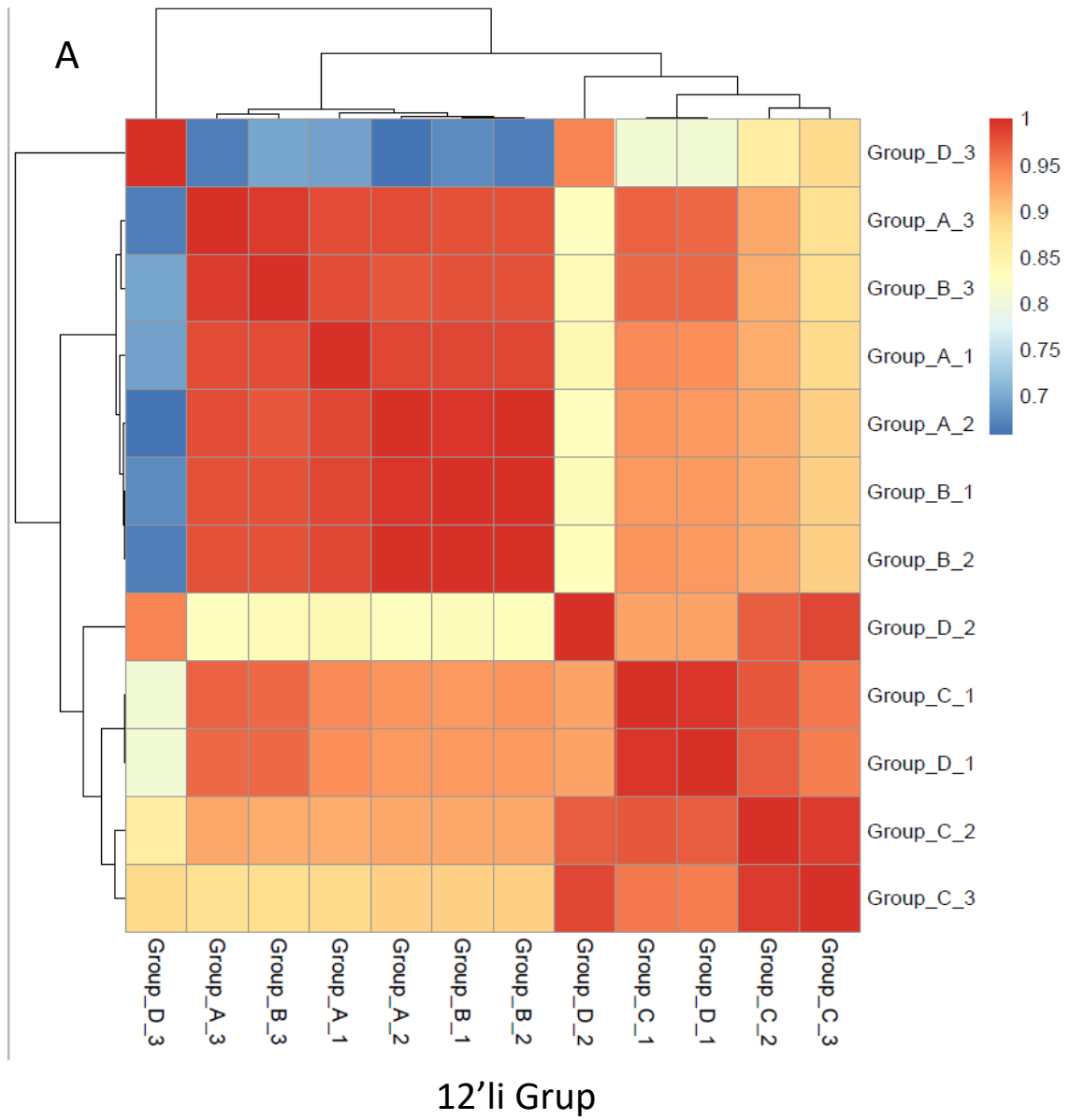
4.8. Gruplar Arası Karşılaştırma Analizleri Sonucunda Ekspresyon Düzeyi Değişen Genler

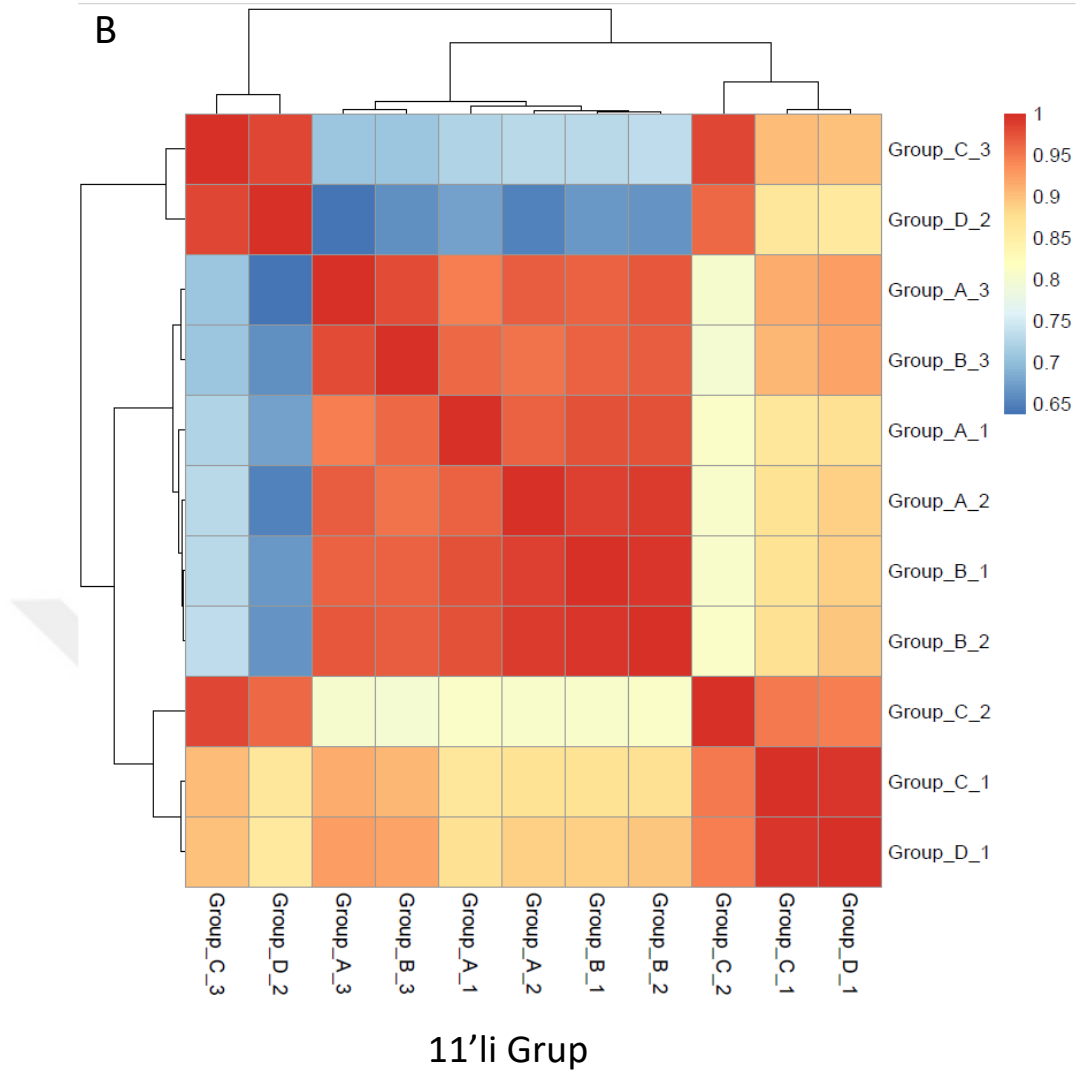
NKX3.1 ekspresyonunun, normal koşullarda ve enflamasyon durumunda, hangi genlerin ekspresyon seviyesinin düzenlenmesinde fonksiyon gösterdiğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Örnek grupları 3 adet teknik replika olacak şekilde hazırlanmıştır. A Grubu (normal hücresel koşullar): HMV Kontrol (3 replika), B Grubu (enflamatuvar koşullar): HMV CM (3 replika), C Grubu (NKX3.1 ektopik ekspresyonuna bağlı değişen koşullar): HMNKX3.1 Kontrol (3 replika) ve D Grubu (enflamasyonda NKX3.1 ektopik ekspresyonuna bağlı olarak değişen koşullar): HMNKX3.1 CM (3 replika) olarak gruplandırılan örnekler Tablo 4.3'de sunulmuştur. Ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişen genler ise Tablo 4.4'de yer almaktadır.

Tablo 4.3. DU 145 hücrelerinde yeni nesil dizileme sonuçlarının analizi için kullanılan grup isimleri. Grup A: HM vektör-kontrol, Grup B: HM vektör-CM, Grup C: HMNKX3.1-kontrol, Grup D: HMNKX3.1-CM.

A Grubu	HMV Kontrol Replika-1
	HMV Kontrol Replika-2
	HMV Kontrol Replika-3
B Grubu	HMV CM Replika-1
	HMV CM Replika-2
	HMV CM Replika-3
C Grubu	HMNKX3.1 Kontrol Replika-1
	HMNKX3.1 Kontrol Replika-2
	HMNKX3.1 Kontrol Replika-3
D Grubu	HMNKX3.1 CM Replika-1
	HMNKX3.1 CM Replika-2
	HMNKX3.1 CM Replika-3

Değişen gen analizleri sonucunda oluşturulan ısı haritası grafikleri ile replika örnekler ve deney grupları arasındaki ekspresyon değişim profili haritalandı (Şekil 4.20A ve 4.20B). 12'li gruba ait ısı haritası incelendiğinde; A, B ve C grupları içindeki replika örneklerin değişim profillerinin örtüştüğü ancak D grubu içinde D3 örneğinin değişim profilinin diğer örneklerden farklı olduğu değerlendirildi. Sonuç olarak D3 grubu çıkarılarak oluşturulan ısı haritası Şekil 4.20B'de sunuldu. Sonraki analizler 11'li grup üzerinden gerçekleştirildi.





Şekil 4.20. Değişen gen ekspresyon analizleri sonucu oluşturulan ısı haritaları. A. 4 deneysel grupta 3 replika ile analizlenmiş 12'li örnek grubunun ısı haritası B. D3 örneği çıkarılarak oluşturulmuş 11'li örnek grubunun ısı haritası.

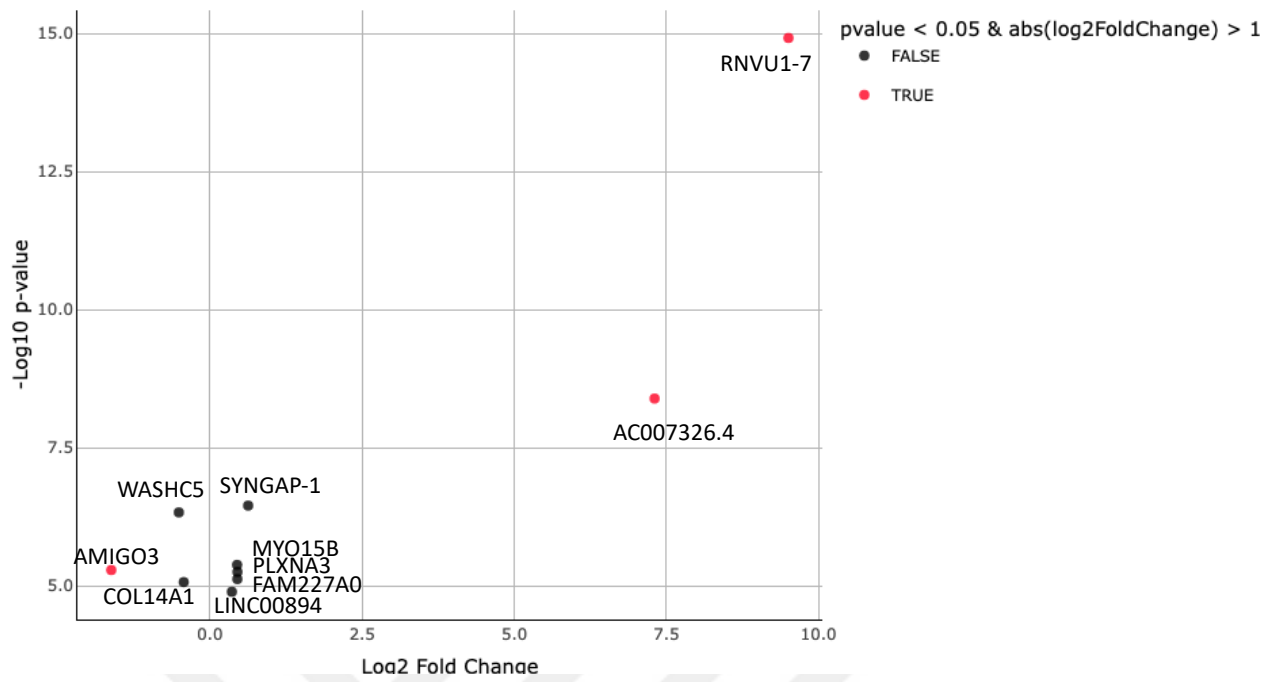
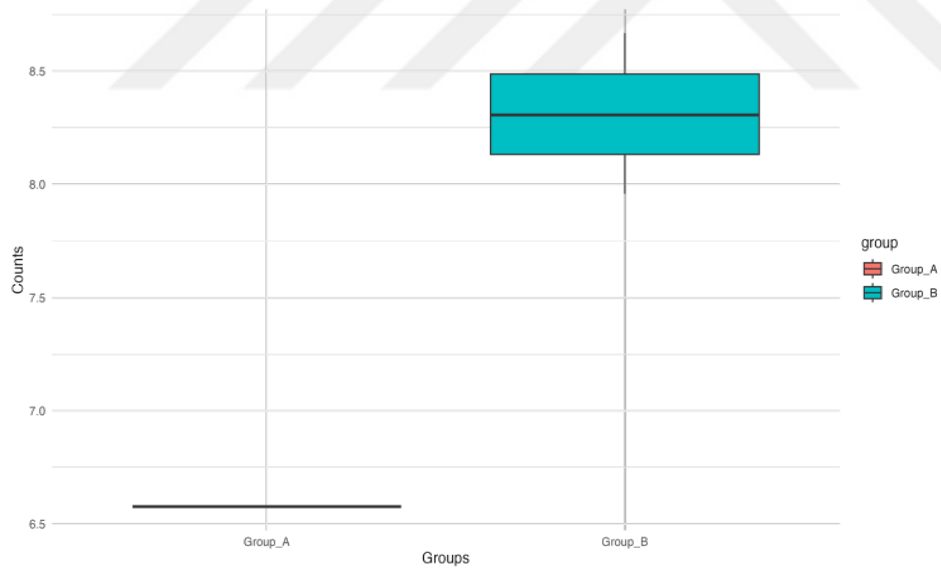
Gen ekspresyon değişimi analizleri sonucu karşılaştırılan gruplar ile p değeri anlamlı olarak ekspresyonu artan ve azalan genlerin listesi Tablo 4.4'de sunulmuştur. Grup B/Grup A (HNV -CM/HNV-Kontrol) karşılaştırması enflamatuvar mikroçevrenin etkisini, Grup C/Grup A (HMNKX3.1-Kontrol/ HNV-Kontrol) karşılaştırması normal hücrel koşullarda NKX3.1 ektopik ekspresyonu etkisini, Grup D/Grup B (HMNKX3.1-CM/ HM-CM) enflamatuvar mikroçevre koşullarında NKX3.1 ektopik ekspresyonu etkisini göstermektedir. Ayrıca yolak analizlerinde Grup D/Grup C (HMNKX3.1-CM/HMNKX3.1-Kontrol) karşılaştırması ile NKX3.1'in yüksek ekspresyonu durumunda enflamatuvar mikroçevre etkisi ile değişen gen

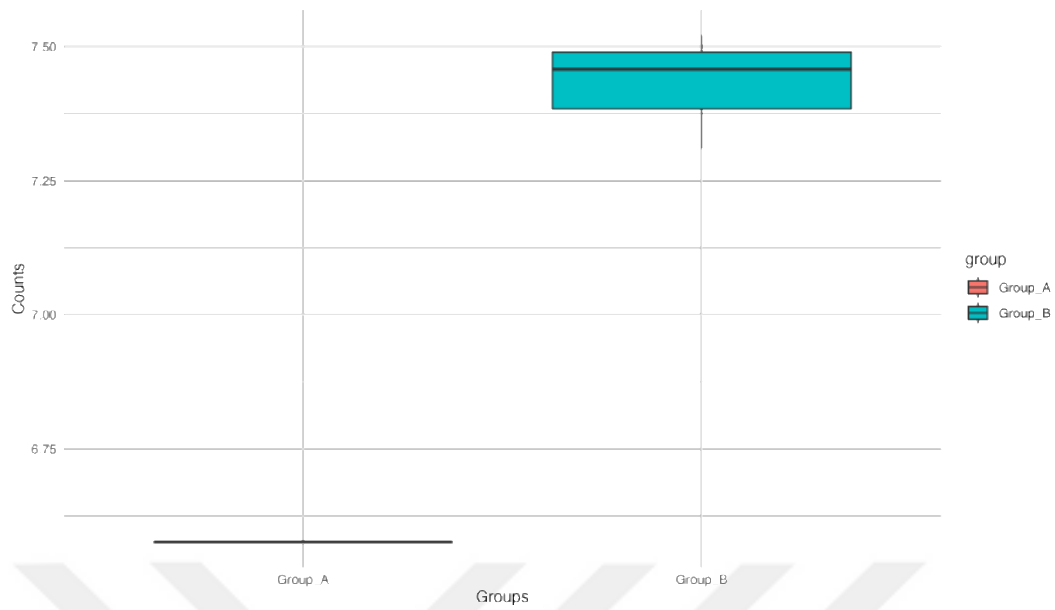
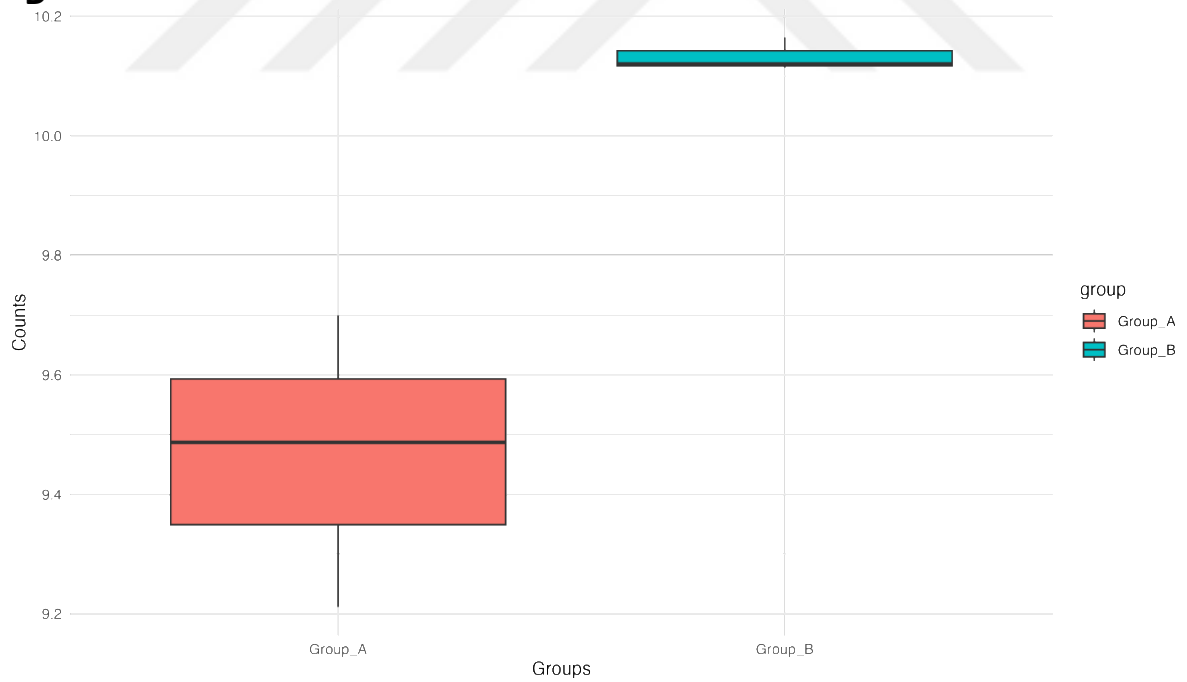
grupları da gösterilmiştir. HMNKX3.1 transfekte deney gruplarında NKX3.1 ekspresyonunun arttığı, gen ekspresyon değişim sonuçlarında da doğrulanmıştır.

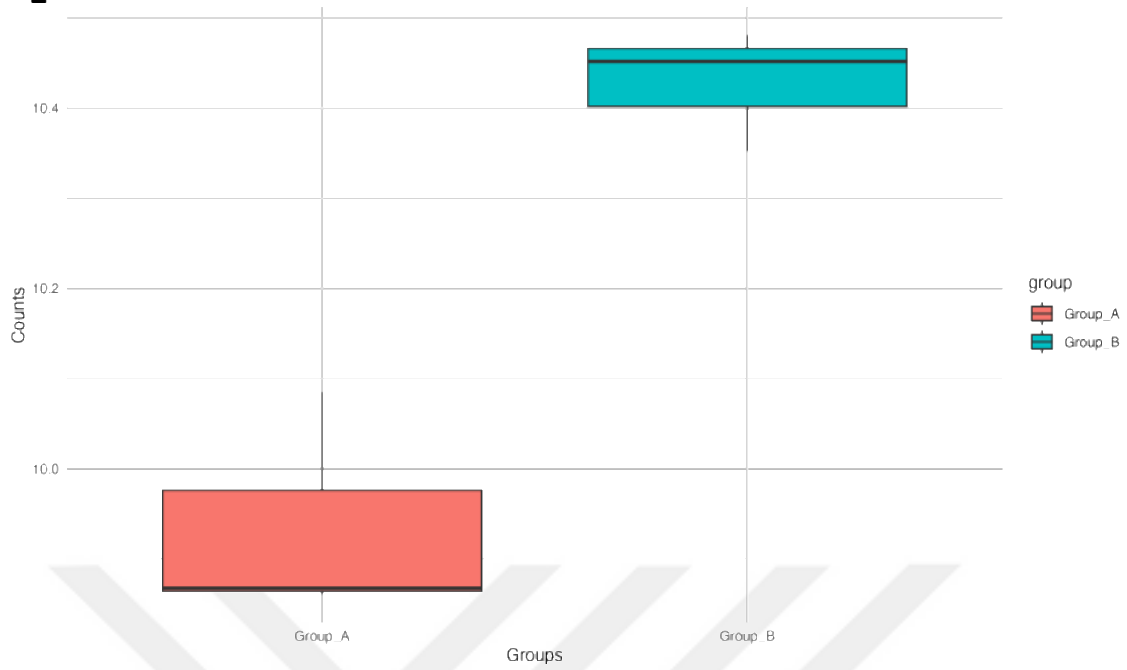
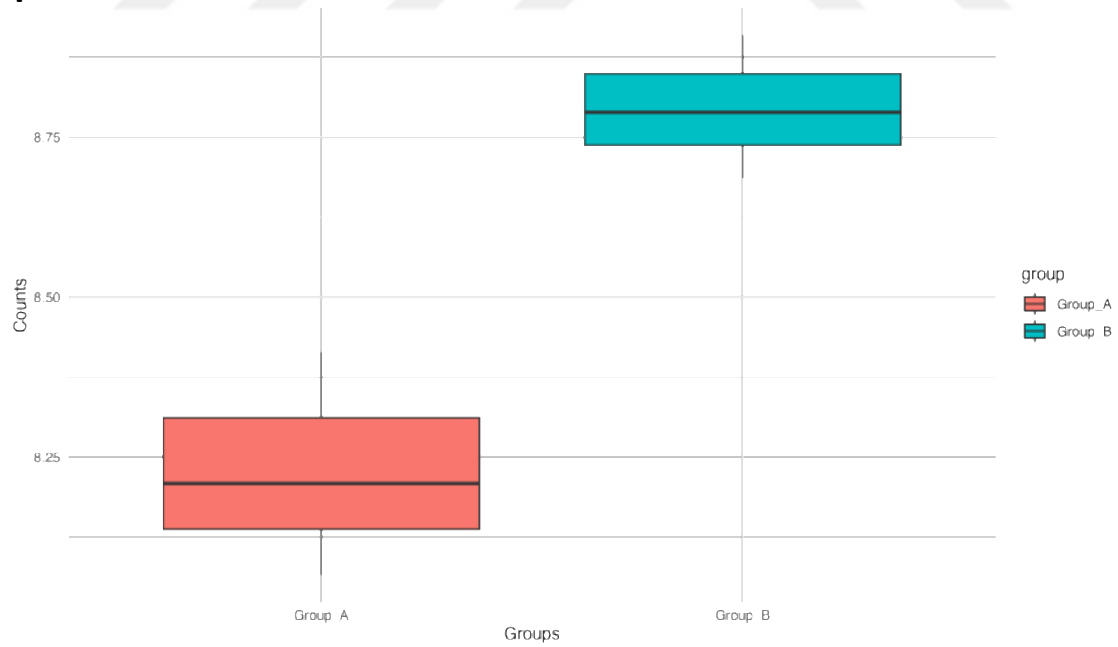
Tablo 4.4. Gruplar arası karşılaştırma analizleri sonucu farklı şekilde eksprese edilen genleri (differentially expressed genes) gösteren tablo. $p < 0.05$. Grup A: HM vektör-kontrol, Grup B: HM vektör-CM, Grup C: HMNKX3.1-kontrol, Grup D: HMNKX3.1-CM.

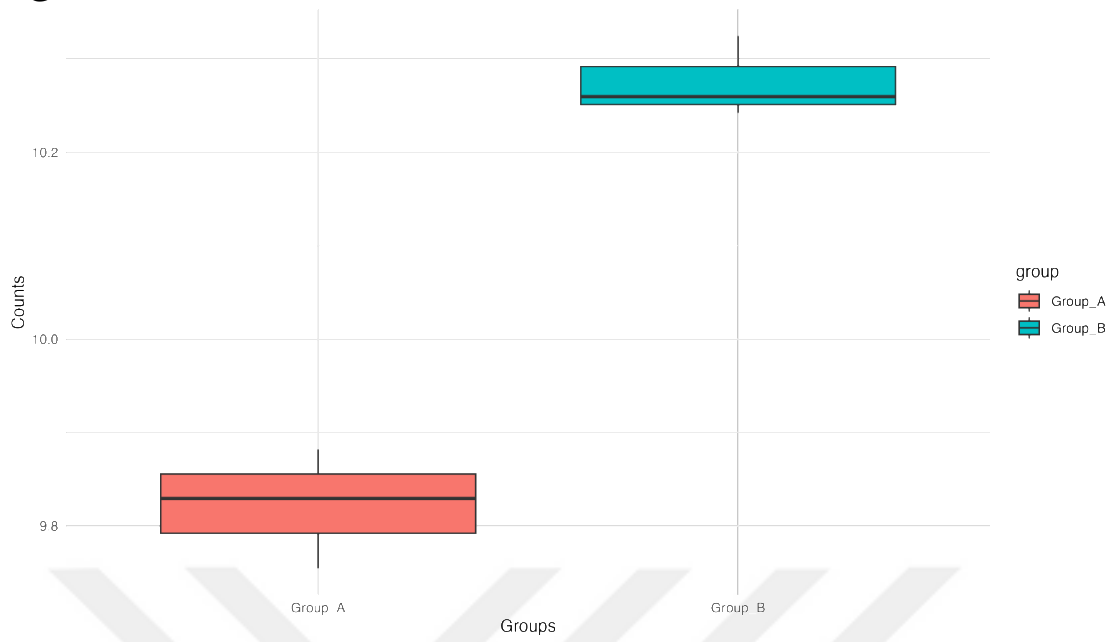
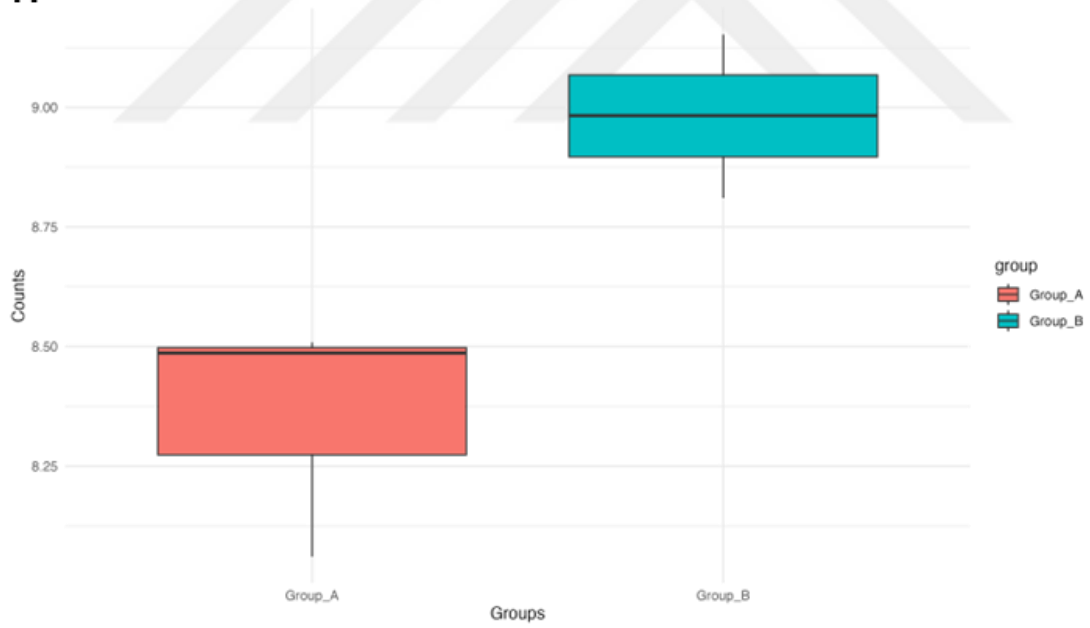
Enflamatuvar mikroçevre etkisi		NKX3.1 ekspresyonunun etkisi		Enflamatuvar mikroçevrede NKX3.1 ekspresyonunun etkisi	
Test Grup/Kontrol Grup		Test Grup/Kontrol Grup		Test Grup/Kontrol Grup	
HMF-CM (B)/HMF-Kontrol (A)		HMNKX3.1-Kontrol (C)/HMF-Kontrol		HMNKX3.1-CM (D)/HMF-CM (B)	
Artan	Azalan	Artan	Azalan	Artan	Azalan
RNVU1-7	COL14A1	NKX3.1	AC131160.1	NKX3.1	MTND2P28
AC007326.4	WASHC5	AC007326.4		RN7SL2	AP002748.5
SYNGAP-1	AMIGO3	SYNGAP1			AC092143.1
PLXNA3					
FAM227A					
MYO15B					
LINC00894					

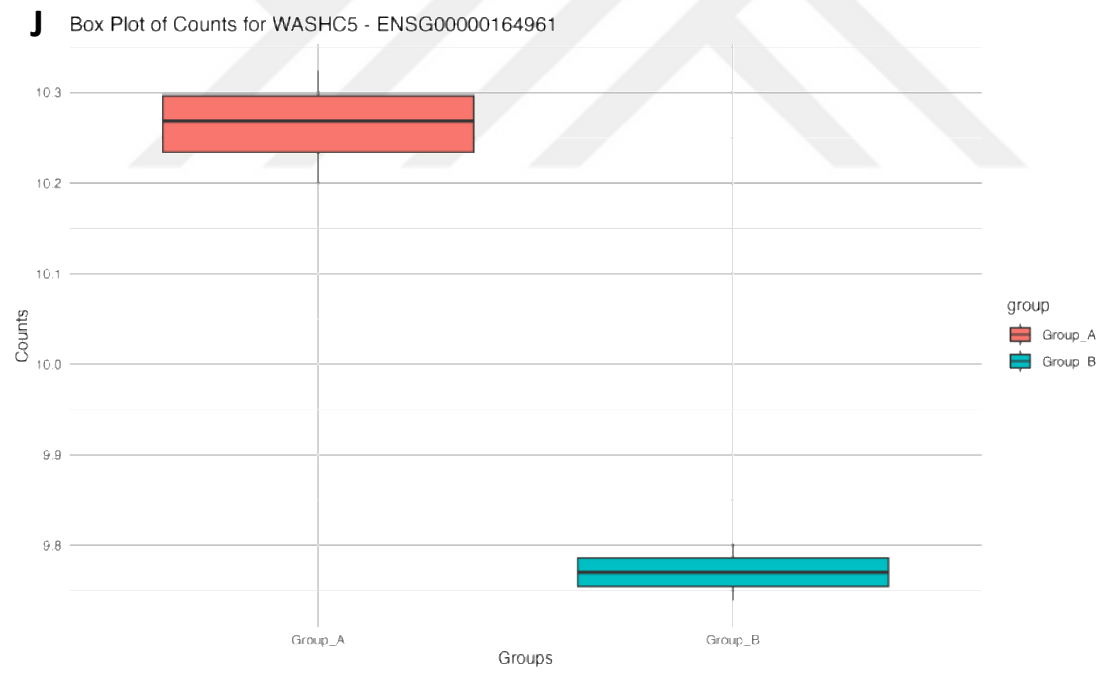
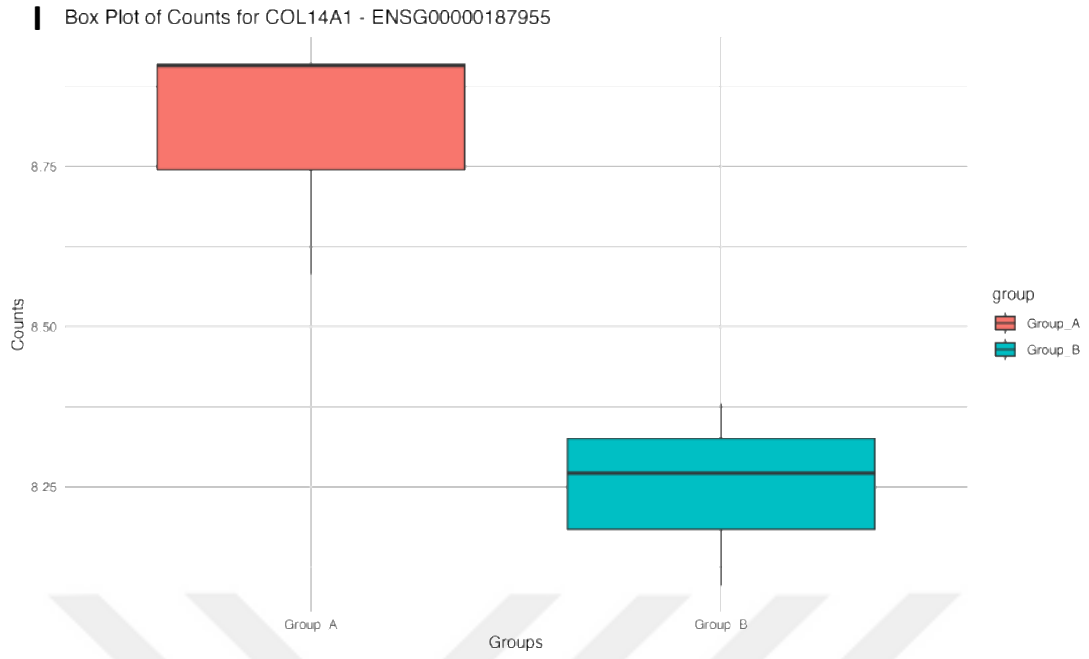
Gruplar arası karşılaştırma sonucunda yalnızca p değeri anlamlı olan gen ekspresyon değişimi sonuçları dikkate alınmıştır ve farklı eksprese edilen genleri gösteren volkan grafikleri ve azalan/artan genleri gösteren kutu grafikleri, Grup B/Grup A karşılaştırması için Şekil 4.21’de, Grup C/Grup A için Şekil 4.22’de, Grup D/Grup B için Şekil 4.23’de gösterilmektedir. Dağılım grafiğinde, elde edilen gen listesinde bulunan her bir genin ortalama log₂ kat değişimi verilmektedir. Grup B/Grup A (HMF-CM/HMF-Kontrol) karşılaştırması sonucu, enflamatuvar mikroçevrenin etkisi ile RNVU1-7 ve AC007326.4 genlerinin ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı, AMIGO3 ekspresyonunun ise azaldığı tespit edildi (Şekil 4.21A, 4.21B, 4.21C 4.21K). SYNGAP-1, PLXNA3, FAM227A, MYO15B, LINC00894, COL14A1, WASHC5 gen ekspresyon değişimlerinin düşük düzeyde olduğu ve yanlış pozitif olabilecekleri sonucuna varıldı (Şekil 4.21A, 4.21D, 4.21E, 4.21F, 4.21G, 4.21H, 4.21I, 4.21J).

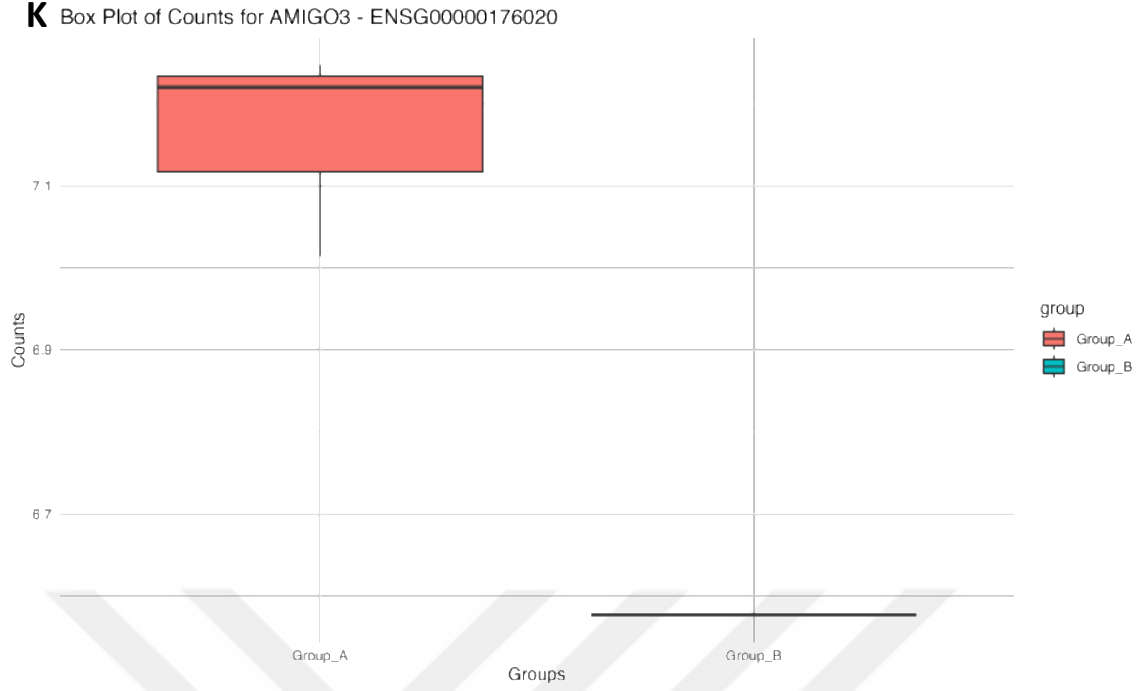
A HMv-CM / HMv-Kontrol (B vs A)**B** Box Plot of Counts for RNVU1-7 - ENSG00000206585

C Box Plot of Counts for AC007326.4 - ENSG00000283809**D** Box Plot of Counts for SYNGAP1 - ENSG00000197283

E Box Plot of Counts for PLXNA3 - ENSG00000130827**F** Box Plot of Counts for FAM227A - ENSG00000184949

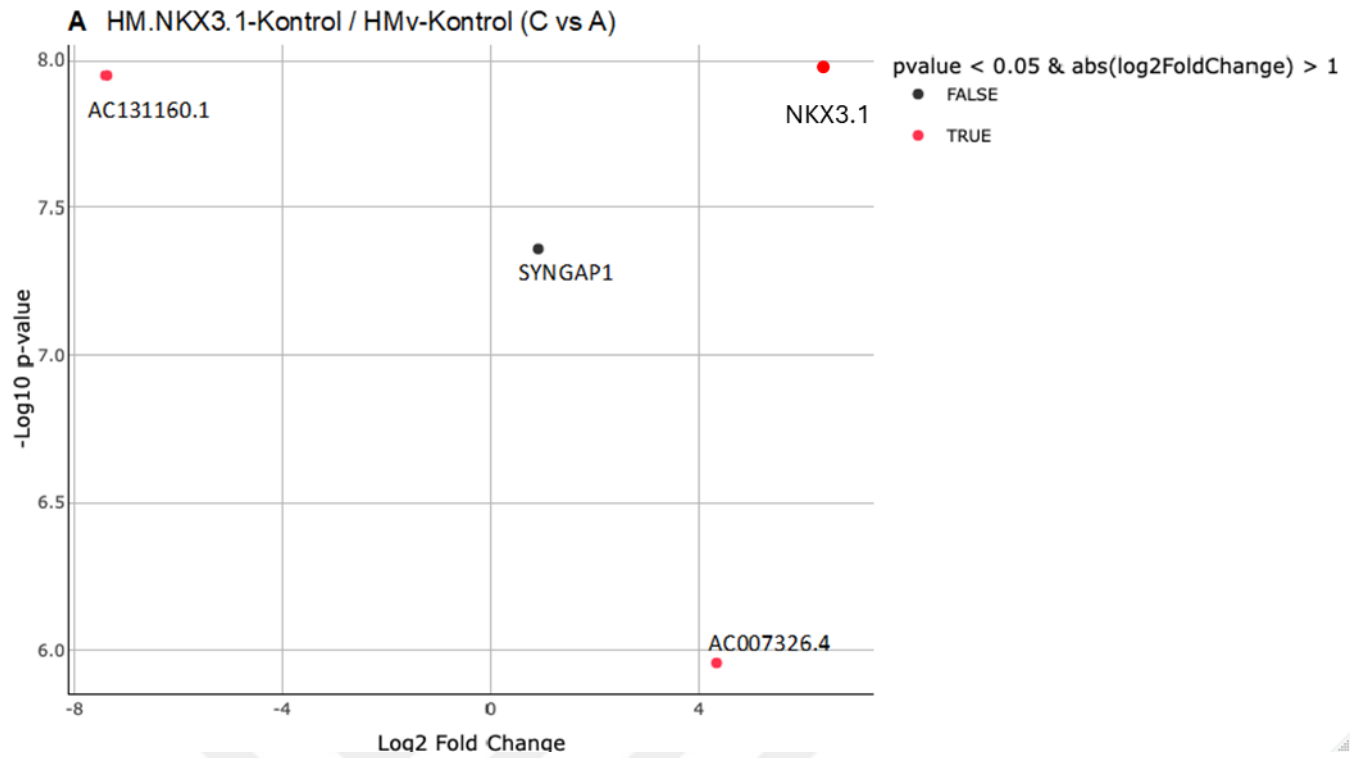
G Box Plot of Counts for MYO15B - ENSG00000266714**H** Box Plot of Counts for LINC00894 - ENSG00000235703



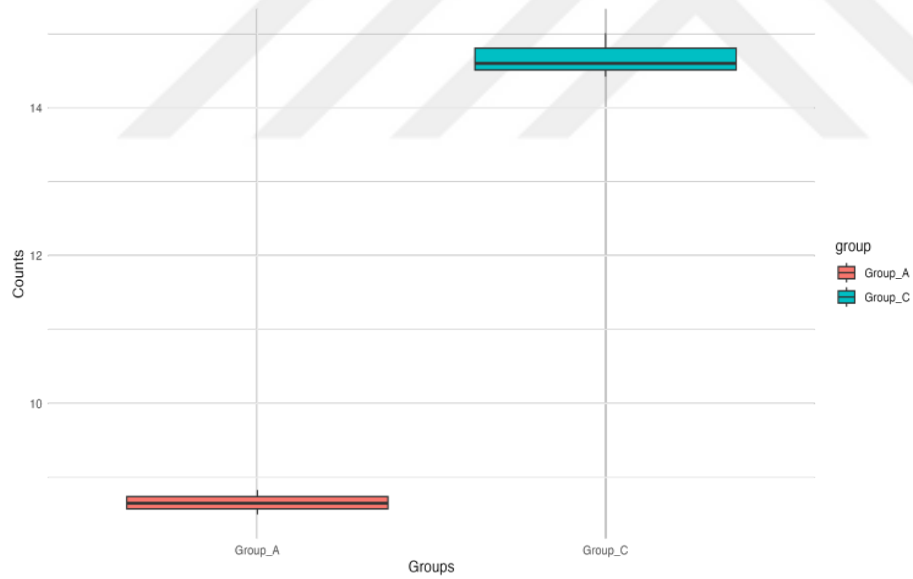


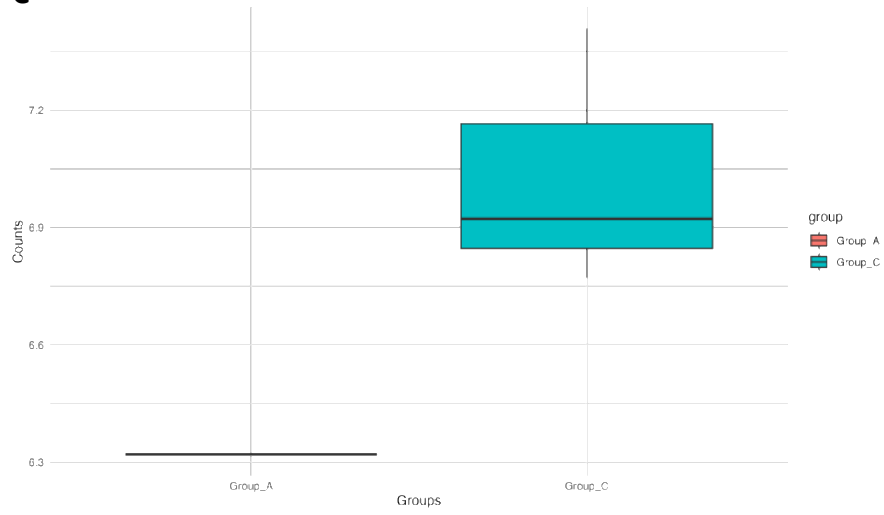
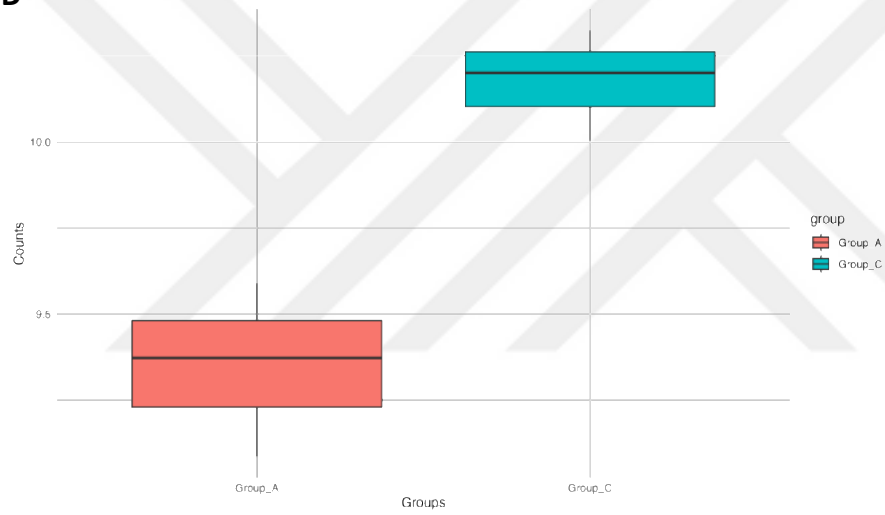
Şekil 4.21. Grup B/Grup A (HM vektör-CM/ HM vektör-kontrol) karşılaştırması için A. Volkan grafiği, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K. ekspresyonu azalan ve artan genlerin değişimini gösteren kutu grafikleri, $p < 0.05$.

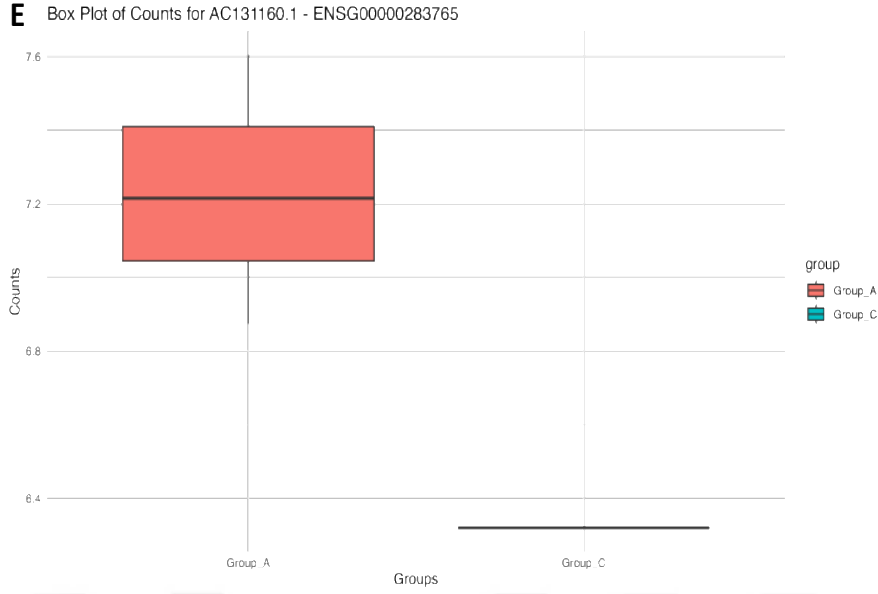
Normal hücrel koşullarda NKX3.1 ektopik ekspresyonu etkisini gösteren Grup C/Grup A (HMNKX3.1-Kontrol/ HMV-Kontrol) karşılaştırması sonucunda, NKX31 ekspresyon artışı ile birlikte AC007326.4 ve SYNGAP1'in arttığı ve AC131160.1 geninin baskılandığı belirlendi (Şekil 4.22A-E).



B Box Plot of Counts for NKX3-1 - ENSG00000167034

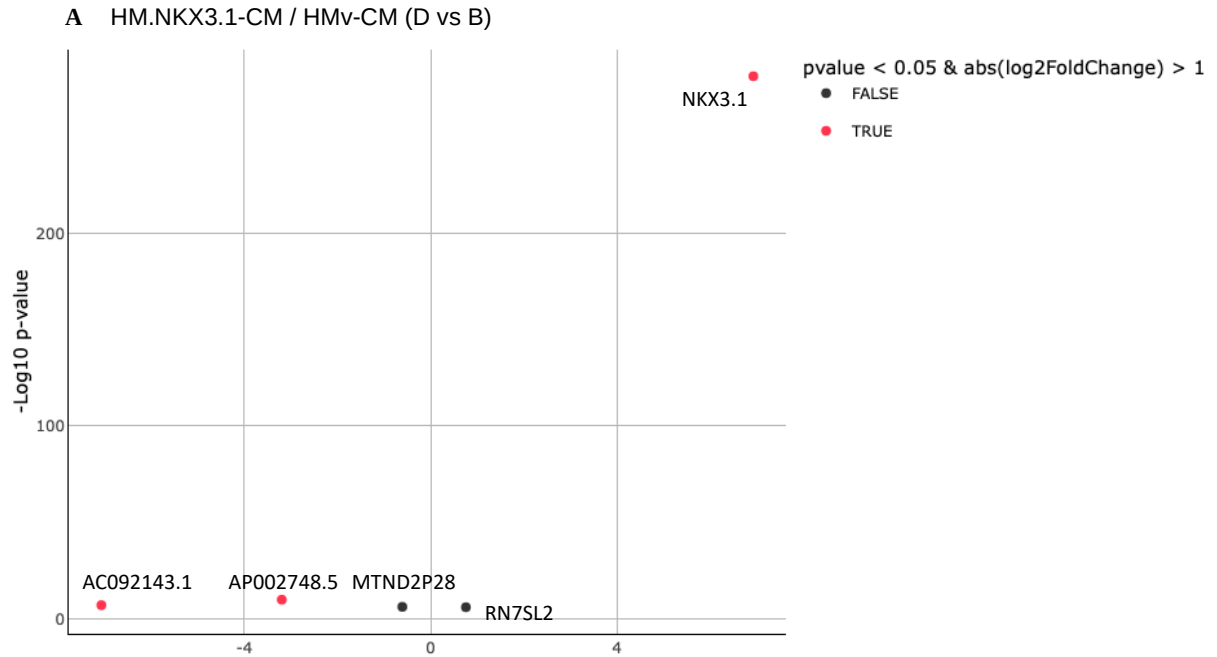


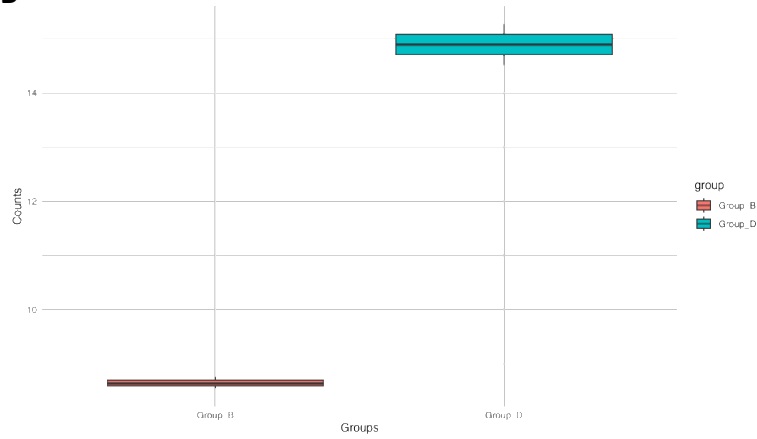
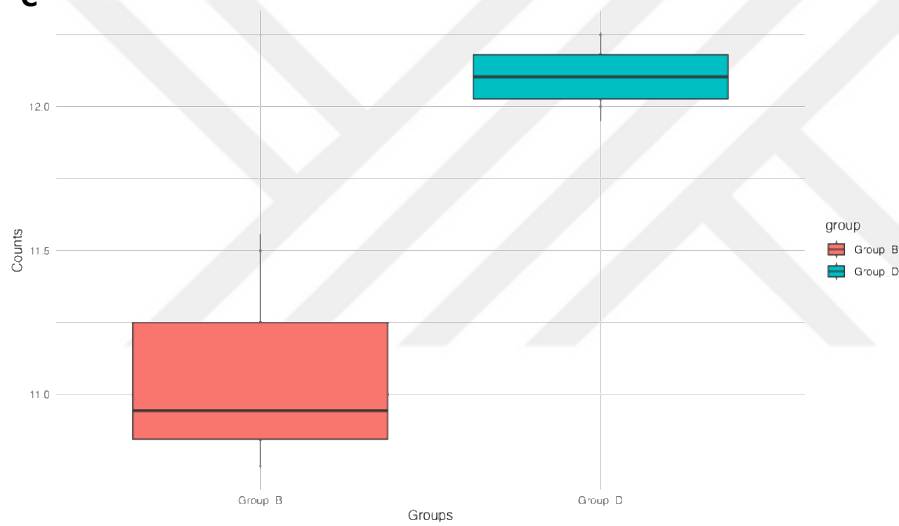
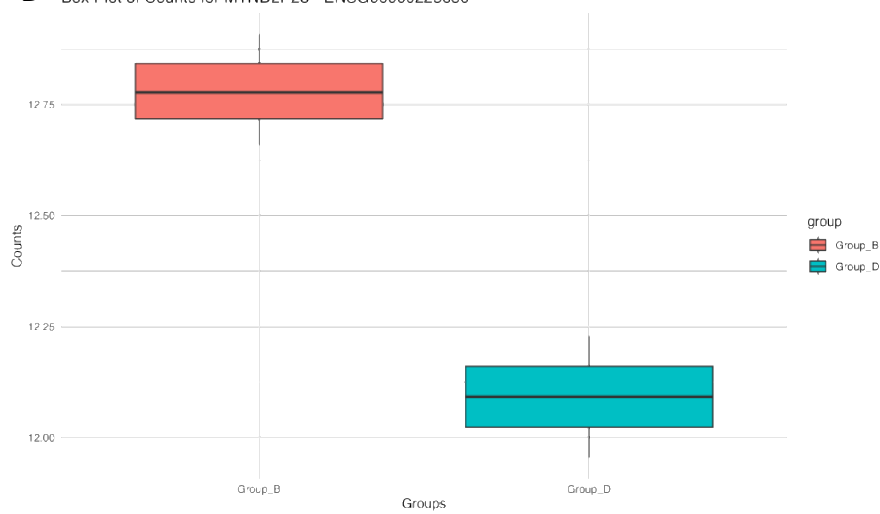
C Box Plot of Counts for AC007326.4 - ENSG00000283809**D** Box Plot of Counts for SYNGAP1 - ENSG00000197283

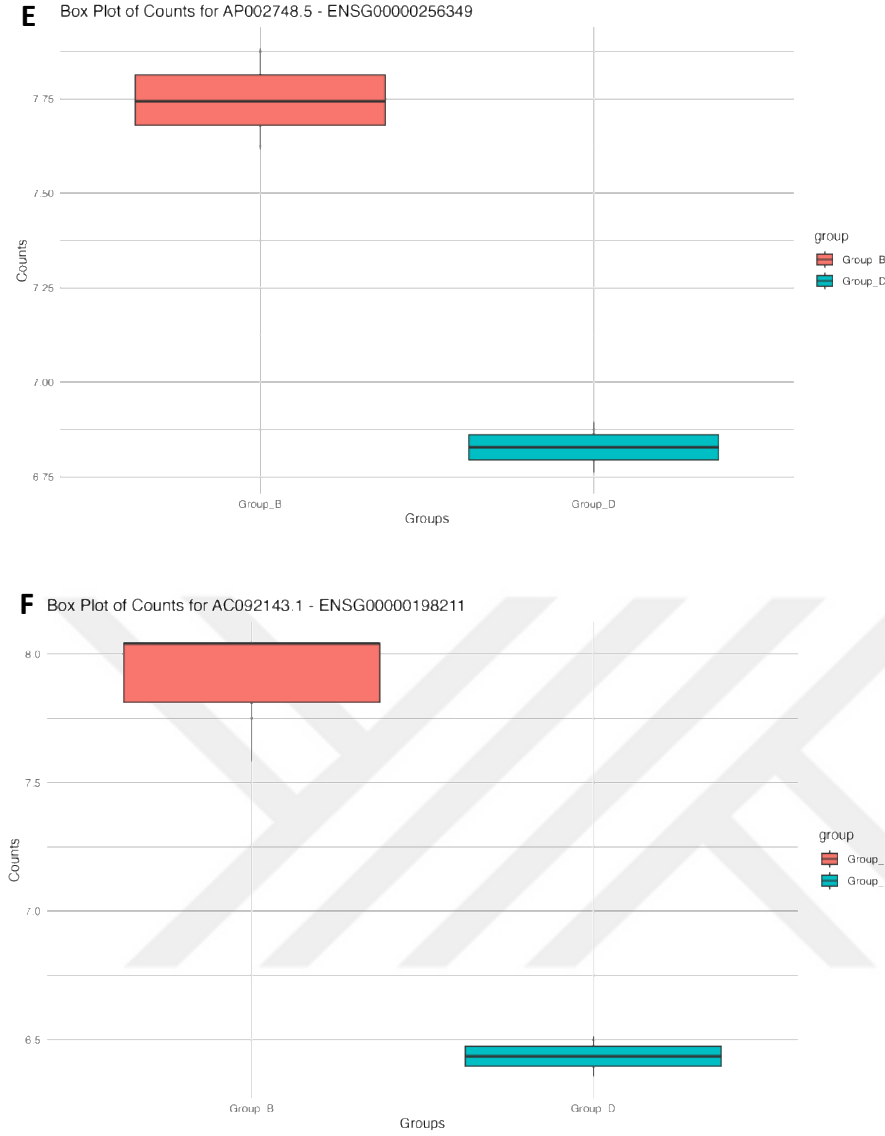


Şekil 4.22. Grup C/Grup A (HMNKX3.1-kontrol/ HM vektör-kontrol) karşılaştırması için A. Volkan grafiği, B, C, D ve E. ekspresyonu azalan ve artan genlerin değişimini gösteren kutu grafikleri, $p < 0.05$.

Enflamatuvar mikroçevre koşullarında NKX3.1 ektopik ekspresyonu etkisini gösteren Grup D/Grup B (HMNKX3.1-CM/ HM vektör-CM) karşılaştırması sonucunda, NKX3.1 ekspresyon artışının doğrulanmasının yanında, RN7SL2 ekspresyonunun arttığı, MTND2P28, AP002748.5 ve AC092143.1 ekspresyonlarının ise azaldığı görülmüştür (Şekil 4.23A-F).

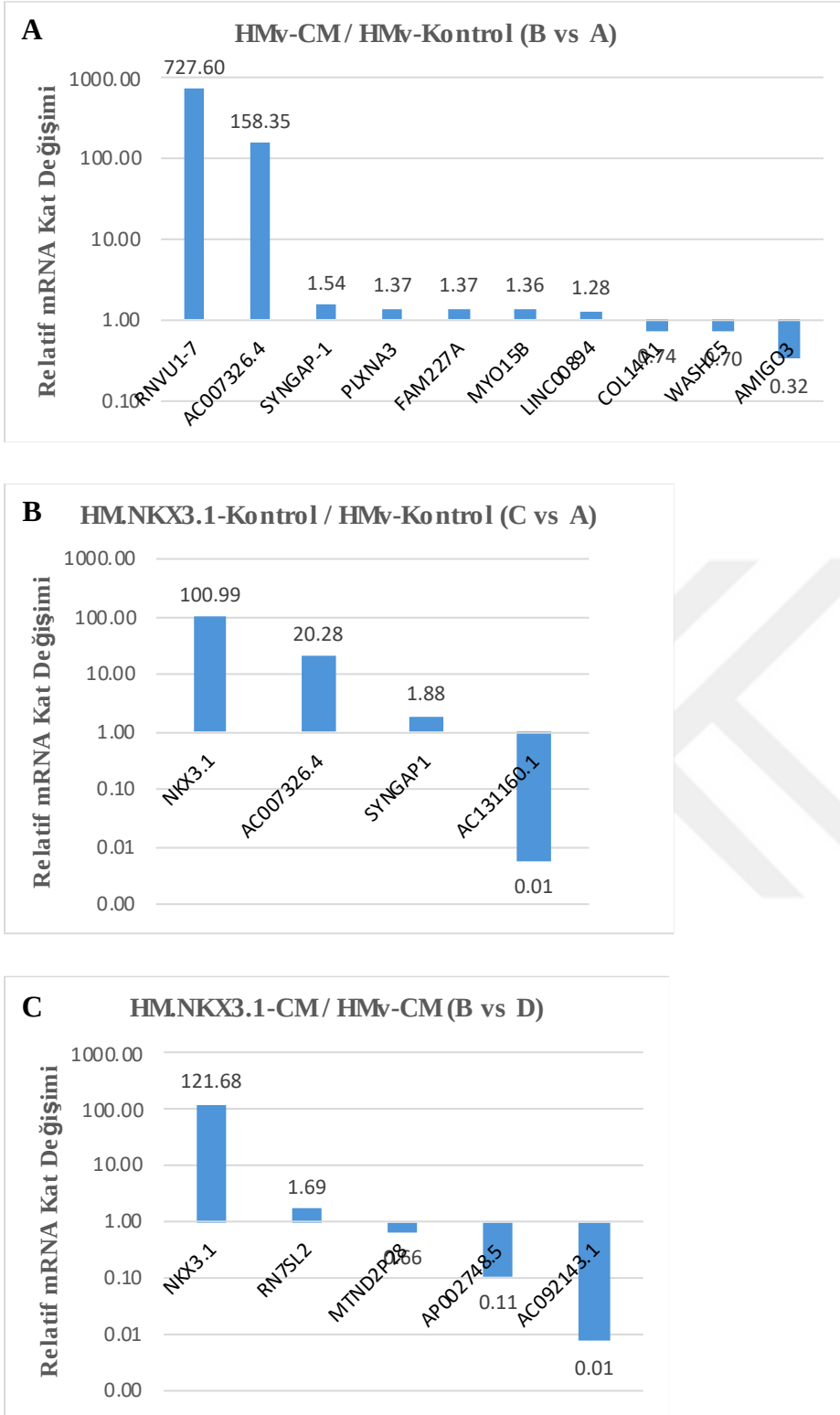


B Box Plot of Counts for NKX3-1 - ENSG00000167034**C** Box Plot of Counts for RN7SL2 - ENSG00000274012**D** Box Plot of Counts for MTND2P28 - ENSG00000225630



Şekil 4.23. Grup D/Grup B (HMNKX3.1-CM/ HM vektör-CM) karşılaştırması için A. Volkan grafiği, B, C, D, E ve F. ekspresyonu azalan ve artan genlerin değişimini gösteren kutu grafikleri, $p < 0.05$.

Gruplar arası karşılaştırma analizleri sonucunda, gen ekspresyon kat değişimleri, relatif mRNA kat değişimi olarak Şekil 4.24A-C’de gösterilmiştir. Enflamatuvar mikroçevre etkisi ile RNVU1-7’nin 727.6 kat, AC007326.4’ün 158.35 kat arttığı, AMIGO3’ün 0.32 kat azaldığı belirlenmiştir. NKX3.1 ektopik ekspresyonu sonucu, NKX3.1’in 100.99 kat, AC007326.4’ün 20.28 kat, SYNGAP1’in 1.88 kat arttığı ve AC131160.1’in 0.01 kat baskılandığı gözlenmiştir. Enflamatuvar mikroçevre varlığında NKX3.1 ektopik ekspresyonu etkisi ile tespit edilen gen ekspresyon değişimleri; 121.68 kat artan NKX3.1, 1.69 kat artan RN7SL2 ekspresyonu ve 0.11 kat azalan AP002748.5 ve 0.01 kat azalan AC092143.1 ekspresyonu olarak belirlenmiştir.

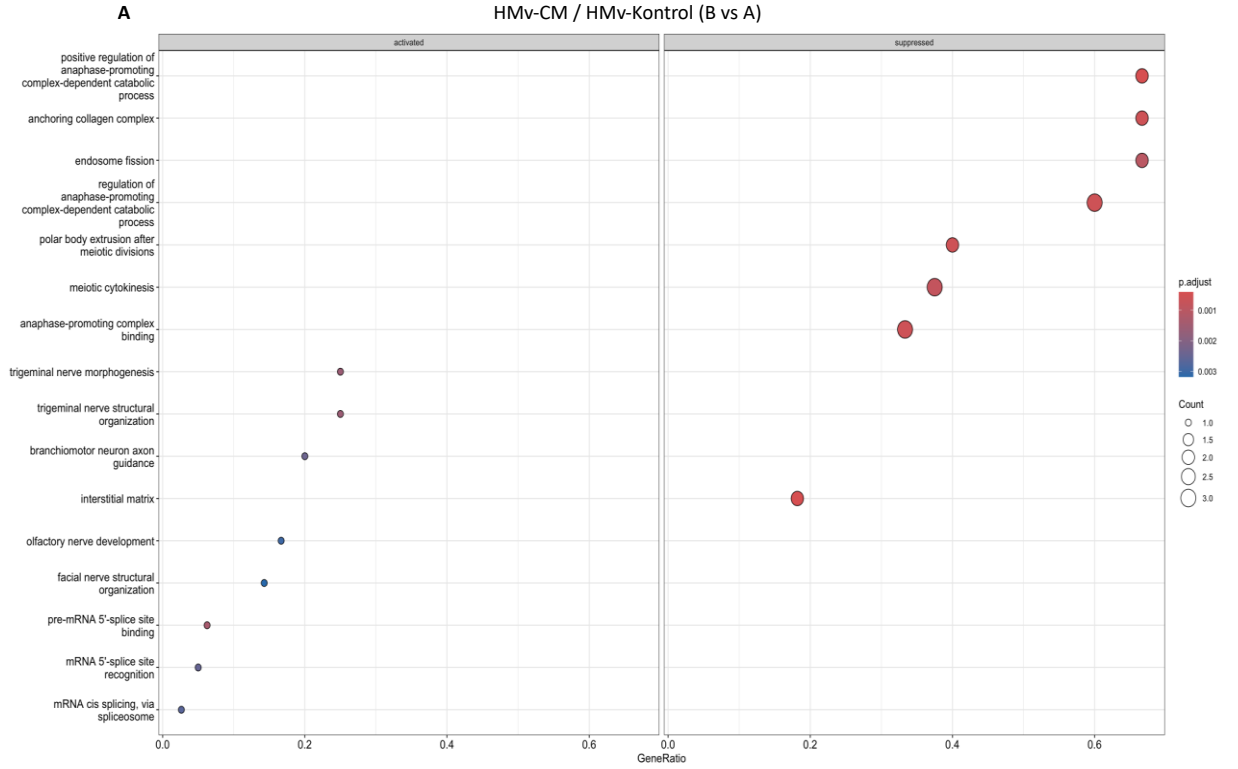


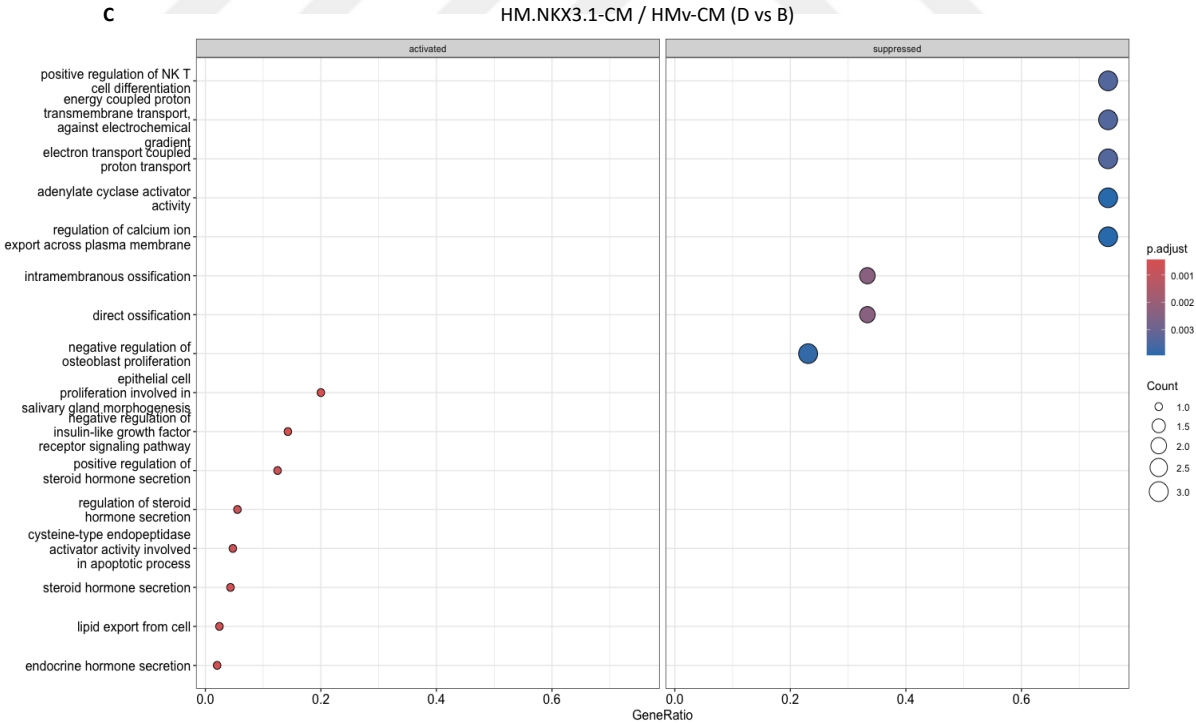
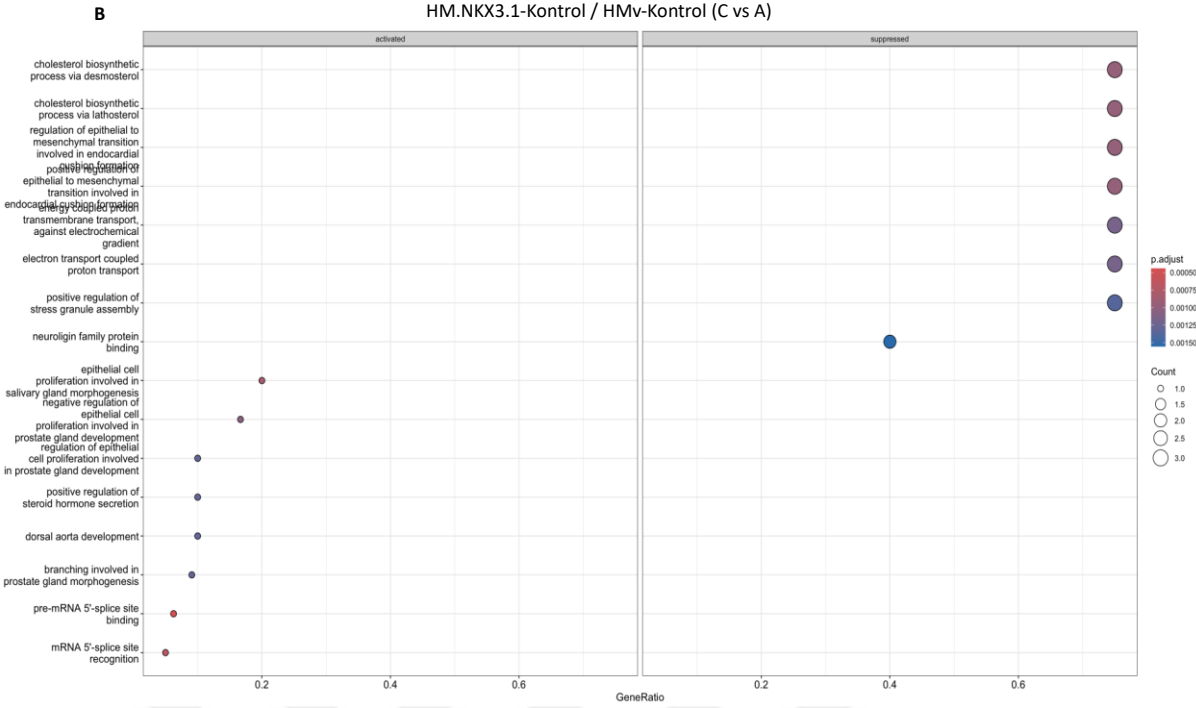
Şekil 4.24. Gruplar arası karşılaştırma analizleri sonucu farklı şekilde eksprese edilen genlerin (differentially expressed genes) kat değişimleri, $p < 0.05$. Grup A: HM vektör-kontrol, Grup B: HM vektör-CM, Grup C: HM.NKX3.1-kontrol, Grup D: HM.NKX3.1-CM.

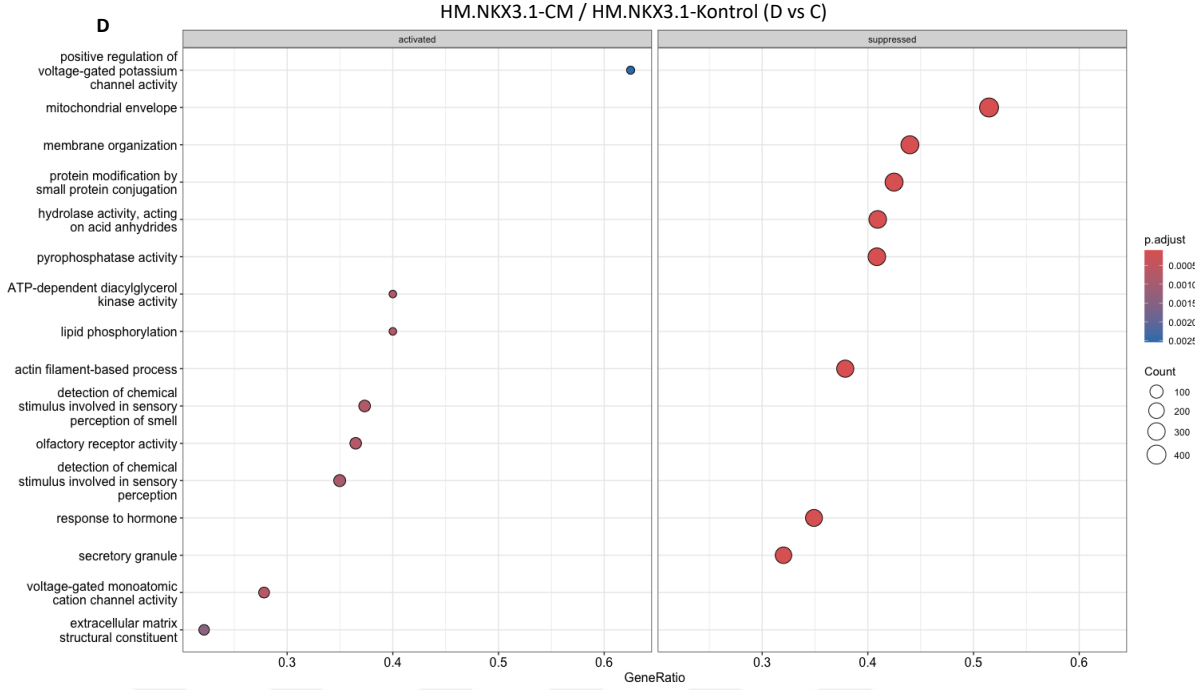
Enflamatuvar mikroçevre ve NKX3.1 ekspresyonu sonucu gerçekleşen nihai hücrel durumların, örneğin EMT, migrasyon vs, bireysel gen ekspresyon değişimlerinin yanı sıra, belirli hücrel fonksiyonlar ile ilişkili gen gruplarının global olarak ekspresyon değişiminin de önemli olduğu bilinmektedir. Bu yaklaşımla, grup karşılaştırmaları sonucunda, EMT ya da migrasyon gibi belirli bir hücrel durumun oluşması için birden fazla gen ve sinyal iletim mekanizmasının fonksiyon gösterdiği durumlarda eş zamanlı olarak ekspresyon değişimi görülen gen setleri ve fonksiyonlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. DU 145 hücrelerinde enflamatuvar mikroçevre ve NKX3.1 ekspresyonu varlığına bağlı olarak, ekspresyonu artan/azalan gen gruplarının fonksiyonel analizleri, gen seti fonksiyonel zenginleştirme (Functional enrichment analysis) analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

Enflamatuvar mikroçevre etkisi ile p değeri anlamlılığına göre ekspresyonu en çok artan gen grupları, üçlü sinir morfogenezi (trigeminal nerve morphogenesis) ve üçlü sinir yapısal organizasyonu (trigeminal nerve structural organization), ekspresyonu azalan gen grupları ise katabolik proses (positive regulation of anaphase-promoting complex-dependent catabolic process), bağlayıcı kolajen kompleksi (anchoring collagen complex), endozom birleşmesi (endosome fission), polar tanecik ekstrüzyonu (polar body extrusion), mayotik sitokinez (meiotic cytokinesis), anafaz-tetikleyici kompleks bağlanması (anaphase-promoting complex binding) ve interstisyel matriks (interstitial matrix) ilişkili gen grupları olarak belirlendi (Şekil 4.25A). NKX3.1 ekspresyon artışına bağlı değişen gen setleri olarak; epitel hücre proliferasyonu, prostat bezinde epitel hücre proliferasyonu ve prostat bezi gelişimindeki epitel hücre proliferasyonu gen gruplarının (negative regulation of epithelial cell proliferation involved in prostate gland development), (regulation of epithelial cell proliferation involved in prostate gland development) arttığı, kolesterol biyosentezi (cholesterol biosynthetic process), endokardial yastıkların oluşumunda epitelyal mezenkimal transizyon düzenleyici (regulation of epithelial-mesenchymal transition involved in endocardial cushion formation), neuroligin ailesi protein bağlanması (neuroligin family protein binding) ilişkili gen gruplarının ise azaldığı tespit edildi (Şekil 4.25B). NKX3.1 ekspresyonunun enflamatuvar mikroçevre durumunda ekspresyonunu değiştirdiği gen gruplarından; epitel hücre proliferasyonu, insülin-benzeri büyüme faktörü reseptör ailesi sinyal yolağı ve steroid hormon sekresyonu pozitif düzenleyici gen setlerinin arttığı, NK T hücre farklılaşması pozitif düzenleyici, transmembran transport, adenilat siklaz aktivatör ve plazma membranı kalsiyum iyonu eksportu düzenleme gen setlerinin ise baskılandığı tespit edildi (Şekil 4.25C). Enflamatuvar mikroçevrede NKX3.1 ekspresyonunun yüksek olduğu durumda ekspresyonunu etkilediği gen gruplarından; voltaj

kapılı potasyum kanal aktivitesi, ATP-bağımlı diaçilgliserol kinaz aktivitesi gen setlerinin ekspresyonunun arttığı, mitokondriyal zarf, membran organizasyonu, küçük protein konjugasyonunda protein modifikasyonu, hidrolaz ve fosfataz aktivitesi ile aktin filament proses gen setlerinin baskılandığı belirlendi (Şekil 4.25D).



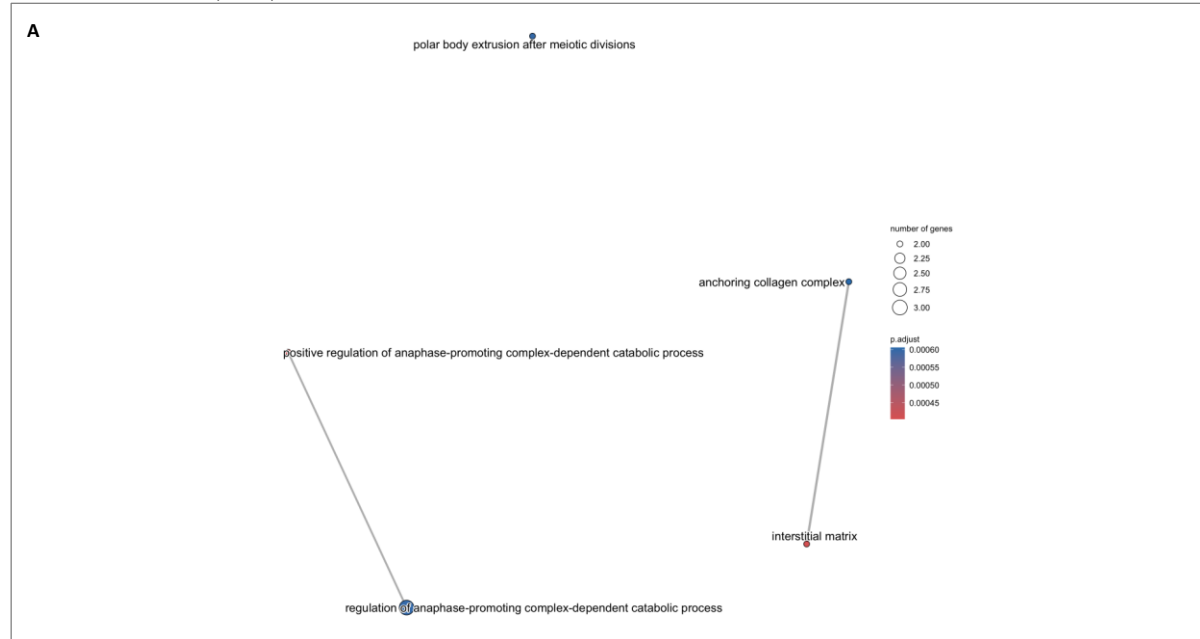




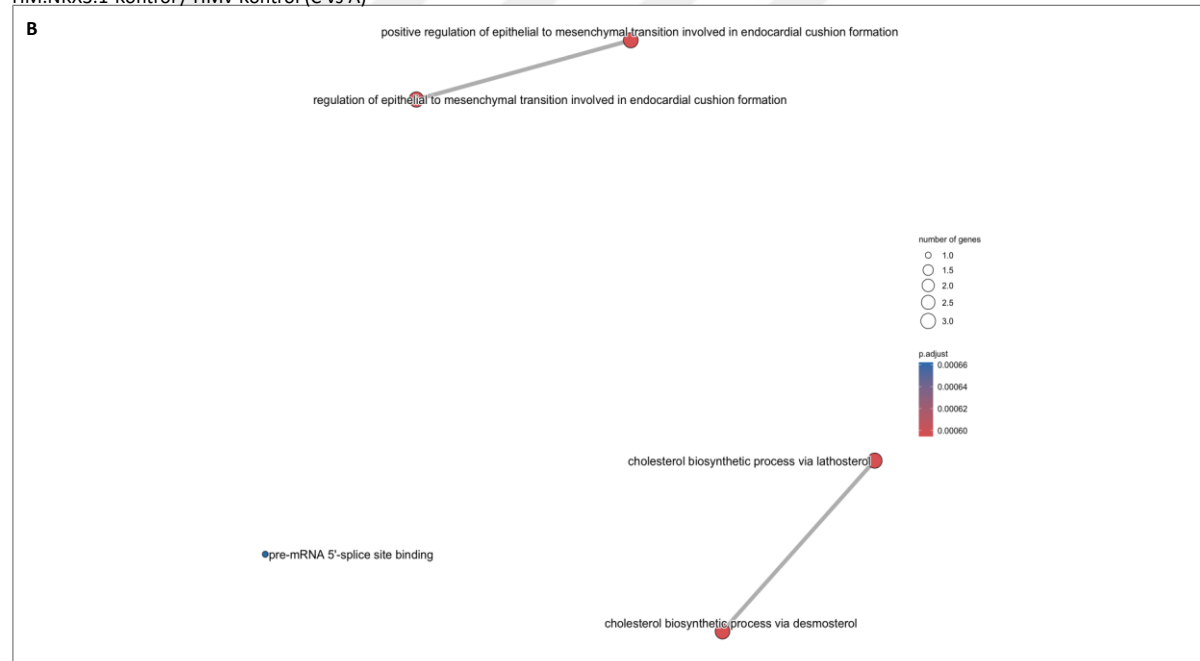
Şekil 4.25. Gen seti zenginleştirme analizlerinde (“All Gene Sets”) çeşitli metabolik yollarda aktive olan ve baskılanan gen gruplarının (count değerleri) p değerlerine göre dağılımını gösteren dot plot grafiği. Soldaki sütun aktifleşen, sağdaki sütun baskılanan gen setlerini göstermektedir. A. Grup B/Grup A (HNV-CM/HNV-Kontrol), B. Grup C/Grup A (HMNKX3.1-Kontrol/ HM vektör-Kontrol), C. Grup D/Grup B (HMNKX3.1-CM/ HM vektör-CM), D. Grup D/Grup C (HMNKX3.1-CM / HMNKX3.1-Kontrol) karşılaştırması.

Ayrıca değişen gen gruplarının ilişkilendirilmesine yönelik ema plot grafikleri, enflamatuvar mikroçevre etkisi sonucu (Şekil 4.26A) bağlayıcı kolajen kompleksi ve interstisyel matriks gen setlerinin bir arada değişiminin, ek olarak anafaz tetikleyici kompleks bağımlı katabolik proses gen setlerinin bir arada değişiminin anlamlı olduğunu göstermiştir. NKX3.1 ektopik ekspresyonu sonucu, normal hücresel koşullarda epitelyal mezenkimal transizyon ve kolesterol biyosentezi gen setlerinin bir arada değiştiği (Şekil 4.26B), enflamatuvar koşullarda ise epitel hücre proliferasyonu, insülin-benzeri büyüme faktörü reseptör ailesi sinyal yolağı, steroid ve endokrin hormon sekresyonu ve lipid eksportu gen setlerinin bir arada değiştiği gösterilmektedir (Şekil 4.26C).

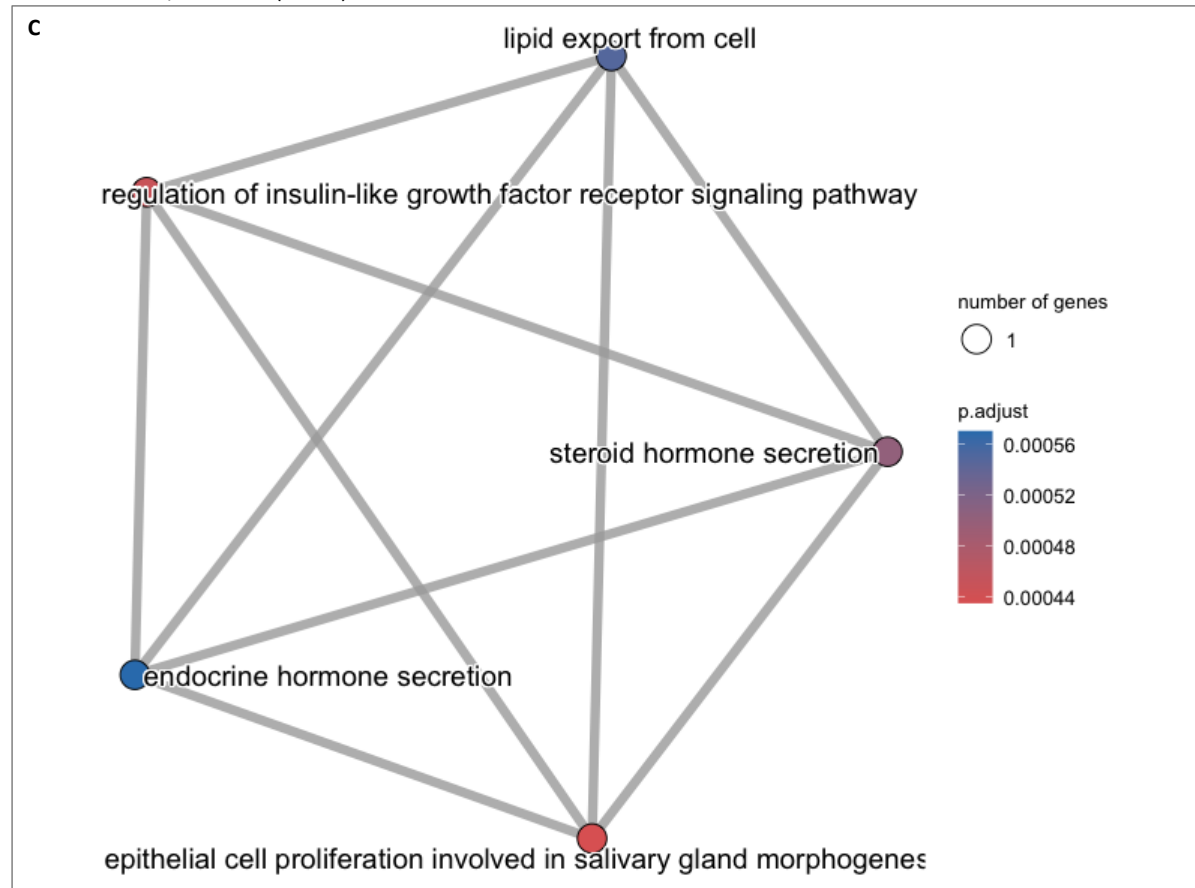
HMv-CM / HMv-Kontrol (B vs A)



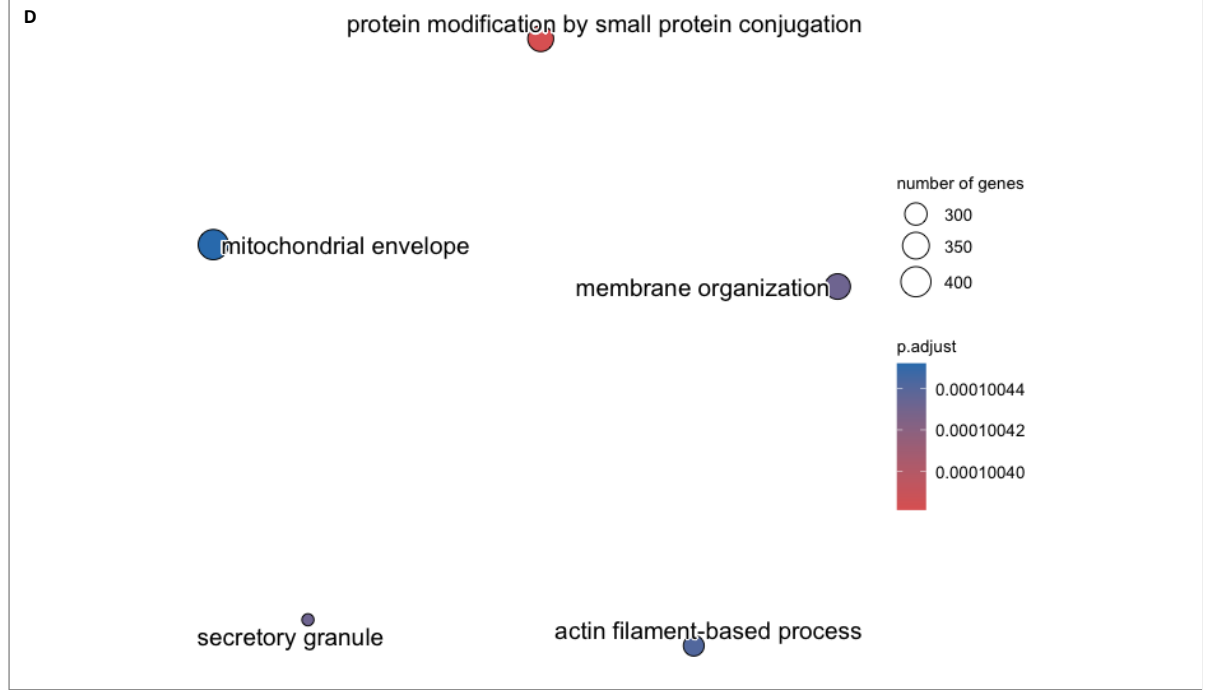
HM.NKX3.1-Kontrol / HMv-Kontrol (C vs A)



HM.NKX3.1-CM / HMv-CM (D vs B)



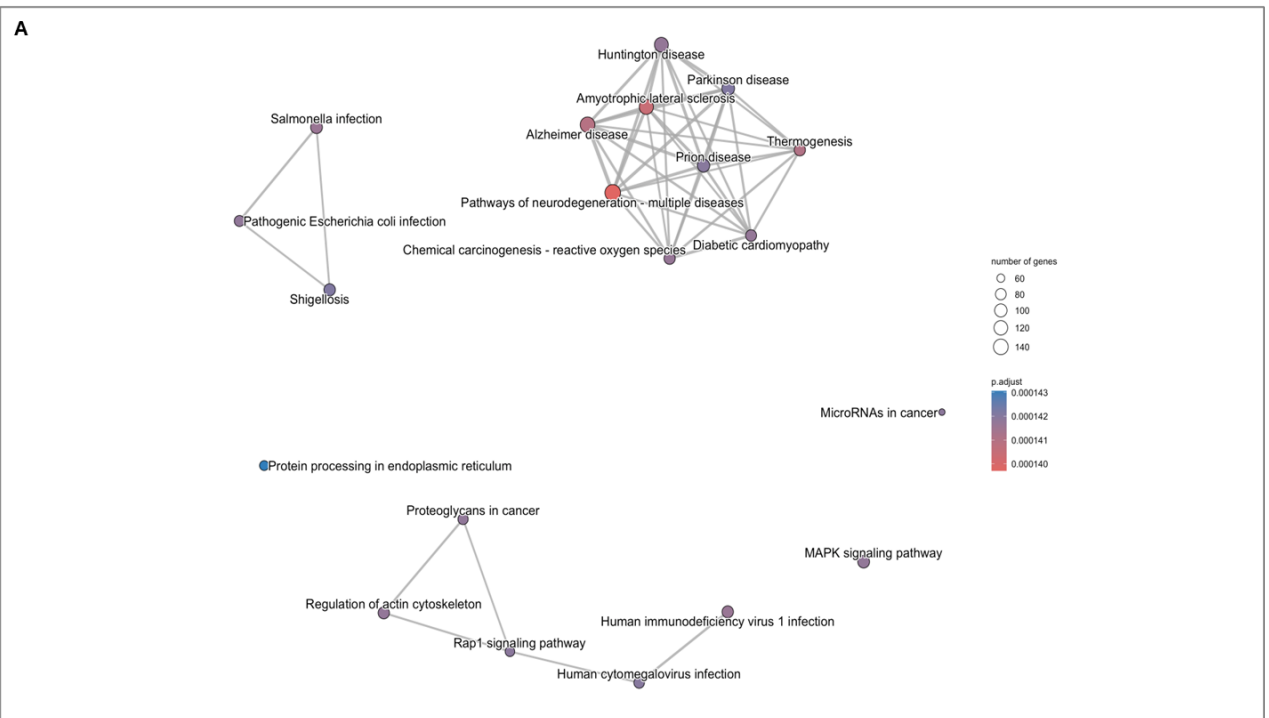
HM.NKX3.1-CM / HM.NKX3.1-Kontrol (D vs C)



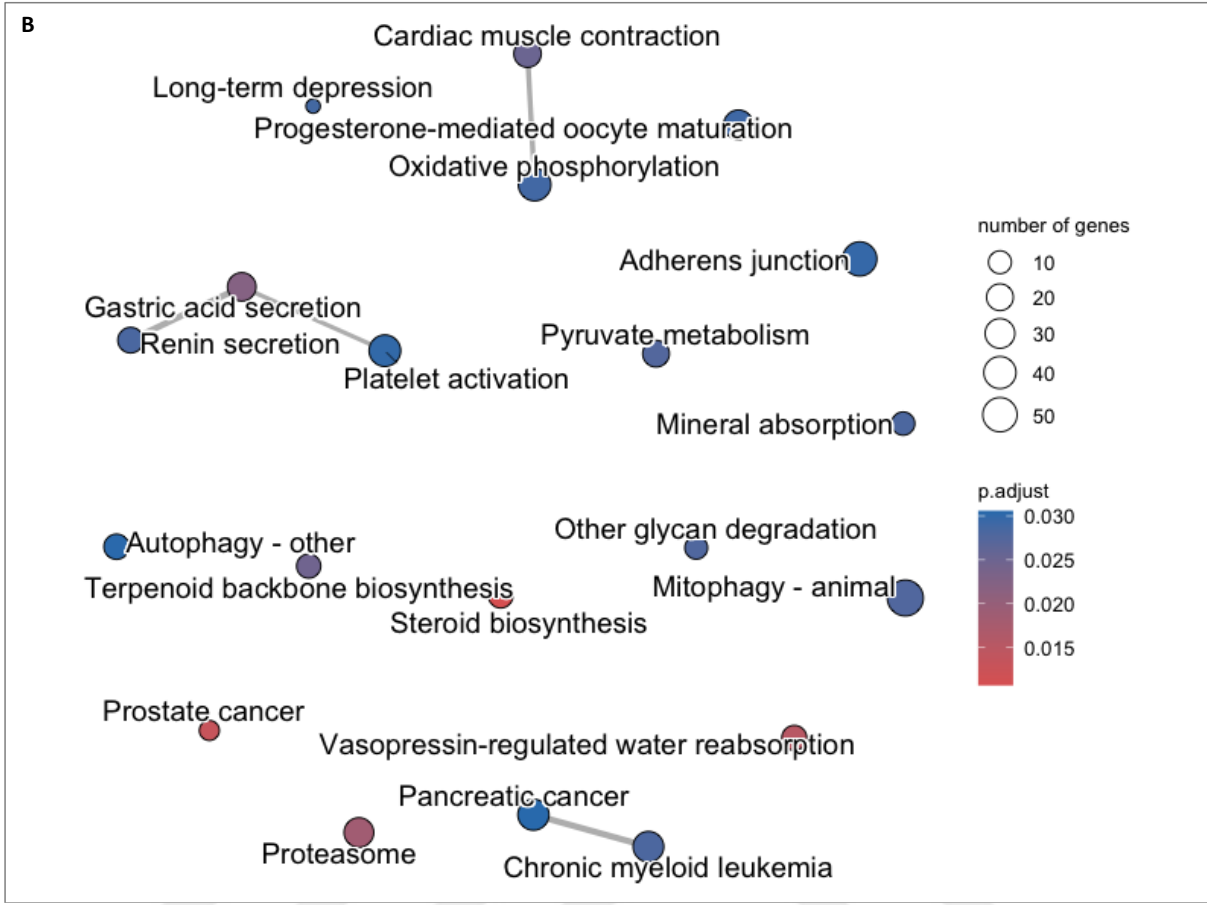
Şekil 4.26. Gen seti zenginleştirme analizlerinde (“All Gene Sets”) elde edilen verilere göre, değişkenlik gösteren gen gruplarının çoğunlukla hangi hücrel metabolik yollarla ilişkili olduğunu gösteren ema plot grafiği. A. Grup B/Grup A (HNV -CM/HNV-Kontrol), B. Grup C/Grup A (HMNKX3.1-Kontrol/ HM vektör-Kontrol), C. Grup D/Grup B (HMNKX3.1-CM/ HM vektör-CM), D. Grup D/Grup C (HMNKX3.1-CM/HMNKX3.1-Kontrol) karşılaştırması.

KEGG analizleri sonucunda, NKX3.1 ekspresyonunun normal ve enflamatuvar koşullarda olası farklı hücrel fonksiyonlarına göre, farklı gen gruplarının ekspresyonunu etkileyebileceği yaklaşımı ile (C vs A) ve (D vs B) karşılaştırmaları ile değişen gen setleri Şekil 4.27A ve 4.27B’de sunulmuştur.

HM.NKX3.1-Kontrol / HMv-Kontrol (C vs A)



HM.NKX3.1-CM / HMv-CM (D vs B)



Şekil 4.27. KEGG analizleri sonucu elde edilen verilere göre, değişkenlik gösteren gen gruplarını gösteren ema plot grafiği. A. Grup C/Grup A (HMNKX3.1-Kontrol/ HM vektör-Kontrol), B. Grup D/Grup B (HMNKX3.1-CM/ HM vektör-CM) karşılaştırması.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, metastatik prostat kanseri gelişiminde enflamasyon ilişkili epitelyal mezenkimal transizyon mekanizmalarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda *in vitro* enflamatuvar mikroçevre modeli aracılığıyla modellenen enflamasyon koşullarının etkisi ve pro-enflamatuvar sitokinler aracılığıyla proteozomal degradasyona uğrayan NKX3.1 proteininin bu mekanizmalar üzerindeki rolü, metastatik prostat kanseri hücreleri LNCaP, DU 145 ve PC-3 hücrelerinde incelenmiştir. Ön çalışmalarda, farklı sitokin konsantrasyonları içeren enflamatuvar koşulların değişen sürelerde uygulamalarının, EMT belirteçleri üzerinde protein seviyesi değişimi üzerindeki etkisi belirlenerek, *in vitro* enflamatuvar mikroçevre modelinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Böylece, EMT mekanizmalarında fonksiyon gösteren belirteçlerin mRNA ve protein seviyesi değişimleri, hücre morfolojisindeki mezenkim-benzeri değişimler, hücre canlılığı değişimleri, anoikis direnci gelişimi ile ilişkisi ve migrasyon değişimi analiz edilmiştir. Ek olarak, tümör baskılayıcı rolü bulunan ve son yıllarda yapılan çalışmalarda kök hücre fenotipine de katkıda bulunabileceği gösterilmiş olan NKX3.1 proteininin, bu mekanizmalardaki rolü de araştırılmıştır.

Tümör dokusunun neden olduğu enflamatuvar mikroçevre, hücre iskeletinin bozulmasına, değişmesine, yeniden şekillenmesine sebep olur ve sonuç olarak ekstraselüler matriksin değişmesine neden olur (Wagenlehner et., 2007). Ayrıca, tümörün ilerlemesini ve metastazı kolaylaştıran bazı moleküler faktörlerin dokuda bulunan immün ve stromal hücreler tarafından salınımını tetikler. Kansereleşme mekanizmalarında birçok rolü olduğu bilinen TNF- α ve TGF- β sitokinleri, hücre proliferasyonunun teşvik edilmesi ve reaktif stroma oluşumu gibi tümörleşmeyi destekleyen etkilere katkıda bulunurlar. Bu tümörijenik sitokinlerin salımından sorumlu olan tümör ilişkili makrofajlar (TAM), tümörlerde yüksek seviyede bulunurlar ve tümör mikroçevresindeki enflamasyonun temel destekleyicileridir. TAM'lar tarafından sitokin salımının ilk etkisi tümör hücrelerinin öldürülmesi olmakla birlikte, bu sitokinlerin düşük düzeyde uzun süreli salımı paradoksal olarak, artan proliferasyona, anjiyogeneze ve metastaza neden olur (Stark et., 2015). Bu bilgilerden yola çıkılarak, tümör dokusundaki enflamatuvar mikroçevrenin modellenmesinde prostat kanseri hücre hatlarının, makrofaj hücrelerinden elde edilen, TNF- α ve TGF- β 1 sitokin konsantrasyonları bilinen şartlandırılmış besi ortamı ile belirli süre kültür edilmesi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem uygulanırken, tümörleşmede rol oynayan sitokinlerden iki majör sitokin olan TNF- α ve TGF- β 1'in farklı konsantrasyonlarını kombine olarak içeren besi ortamı ile EMT'de fonksiyon gösteren belirteçlerin değişimleri

incelenmiş ve böylece kanser epitel hücrelerinin aktifleşen EMT ile kazandıkları mezenkimal özelliklerden sorumlu fizyolojik uyaranlar aydınlatılmaya çalışılmıştır. Şartlandırılmış besi ortamı uygulamalarında içerdiği sitokin konsantrasyonları belirlenirken, EMT aktivasyonu açısından görece daha az etkin ya da daha çok etkin olabilecek konsantrasyonlarının kombinasyonları kullanılmış ve bu aralık TNF- α için 0.5-180 pg/ml ve TGF- β 1 için 20-2000 pg/ml arasında, 72 saat ile 4 hafta arasında değişen sürelerde uygulanmıştır. Tez çalışması kapsamındaki ön denemelerde, bu konsantrasyonlarda enflamatuvar mikroçevredeki NKX3.1 protein kaybı da incelenmiştir. Bu şekilde uygulama konsantrasyon ve süreleri, sonraki denemelerde NKX3.1 ektopik ekspresyonun artışı ile görülen hücresel etkilerle birlikte, NKX3.1'in enflamatuvar koşullara bağlı EMT gelişimindeki olası rolünün araştırılması için optimize edilmiştir. Ön denemelerde TGF- β 1'in görece yüksek konsantrasyonunun kısa sürede mezenkim-benzeri morfolojiye neden olduğu gözlemlendi. Ancak, TNF- α 'nın görece yüksek konsantrasyonlarının sitotoksik etki gösterdiği, EMT ilişkili etkilerin görece düşük konsantrasyonda ve uzun süre maruziyet sonucu ortaya çıktığı belirlendi. NKX3.1 protein kaybının ise literatürle uyumlu olarak TNF- α kaynaklı olduğu, TGF- β 'nin yüksek konsantrasyonlarında sitoksisite kaynaklı bir NKX3.1 azalışı olduğu değerlendirildi. Prostat kanseri hücrelerinde EMT'nin enflamatuvar mikroçevre kaynaklı aktifleştirilmesini modelleyen denemelerde, mezenkim-benzeri morfolojiyle birlikte, EMT belirteçlerinden vimentin ve α -SMA'nın enflamatuvar ortama bağlı olarak TGF- β 1'in yüksek konsantrasyonlarında ekspresyon artışı olduğu gözlemlendi ve böylece EMT aktivasyonu doğrulandı. Bunun yanında, hücrelerin çoğunda NKX3.1 ile kololokelize olmadıkları, özellikle enflamatuvar ortamda NKX3.1 ekspresyonu bulunmayan hücrelerde vimentin filamentlerinin daha yoğun olduğu belirlendi. Bu sonuçlar dikkate alınarak ileri denemeler planlanmıştır. Epitel hücrelerinde çeşitli etkenler sonucu aktifleşen EMT, fenotipik olarak kalıcı değildir ve hücrelerin epitelial karakterden tümüyle mezenkimal bir karaktere farklılaşması ile sonuçlanmamaktadır. Bunun yerine EMT'nin aktifleştiği koşullara bağlı olarak, hücreler epitelial ve mezenkimal özelliklerin bir spektrumunu gösterir. Bu nedenle EMT'nin aktifleştiği sitokin konsantrasyon ve süre uygulamaları optimize edilirken, hücre canlılıkları da izlenerek, canlılığın baskılanmadığı ve böylece EMT aktivasyonu sonucu anoikis direnci ve migrasyon gibi nihai hücresel etkilerin izlenebileceği bir optimizasyon gerçekleştirilmiştir.

EMT'nin TGF- β 1 tarafından aktivasyonu, tümör mikroçevresinde ECM profili ve mikroçevresi ile olan yapısal etkileşiminin de değişmesine neden olur. Migrasyon davranışının başlangıcı olan bu profilde ECM bağlantısı azalan hücre metastaz potansiyeline sahiptir. Bu

aşamada metastazı destekleyen hücresel olaylardan biri, tümör hücrelerinin metastaz sürecinde hücre-hücre bağlantılarını kaybetmelerine rağmen, hücre canlılığını devam ettirmeleri ve apoptoza gitmemelerine neden olan anoikis direnci kavramıdır. Optimize edilen enflamatuvar koşullarda, doz ve süre bağlı olarak anoikis direncinin arttığı, ancak hücre canlılığının, enflamatuvar koşullardaki sitokin konsantrasyon ve süresinin sitotoksik etkilerine karşı hassas olduğu ve ancak belirli bir düzeydeki sitokin maruziyetinin anoikis direnci gelişimine neden olduğu sonucuna varıldı. NKX3.1 ektopik ekspresyonunun, anoikis direncini, normal durumda ve düşük konsantrasyonda sitokin içeren enflamatuvar koşullarda artırdığı, yüksek sitokin konsantrasyonlarında ise NKX3.1 varlığının artan anoikis direncini geri döndürdüğü belirlendi.

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, immün sistemin tümör hücrelerini elimine etmesi için fonksiyon gösteren hücre gruplarından biri olan makrofajlardan salınan pro-enflamatuvar sitokinlerin, başlangıçta yüksek konsantrasyonlarının sitotoksik etki göstermeleri ancak daha sonra ECM bozulması ve metastazı desteklediklerini gösteren literatür ile uyumlu olduğu sonucuna varıldı (Mantovani et al., 2006).

Anoikis direncinin değiştiği koşullarda epitelyal ve mezenkimal belirteçlerin ekspresyon seviyeleri ve NKX3.1 varlığındaki değişimleri ile kolokalizasyonları, immüno blotlama ve immüno floresan işaretlemeleri ile analiz edildi. Epitelyal belirteç E-kaderin ekspresyonunun değişmediği ve mezenkimal belirteç fibronektin ekspresyonunun enflamatuvar koşullarda arttığı belirlendi. Ayrıca E-kaderin tüm hücrelerde eksprese edilirken, fibronektin ekspresyonunun enflamatuvar koşullarda bazı hücrelerde bulunması nedeniyle, enflamatuvar koşulların aktifleştirdiği EMT hücrelerinde, mezenkimal fenotip ile ilişkili fibronektin düzeyini artırdığı değerlendirildi. Epitelyal belirteç sitokeratin-8 düzeyinin her iki yöntemde elde edilen sonuçlara göre, enflamatuvar durumda ve NKX3.1'e bağlı olarak değişmediği, mezenkimal belirteçler TWIST1, SNAIL1 ve vimentinin ise enflamatuvar koşullarda arttığı belirlendi. Ek olarak, NKX3.1 ile kolokalize olmadıkları, ektopik NKX3.1 ekspresyonunun bulunduğu hücrelerde de mezenkimal belirteçlerin bulunmadığı belirgin şekilde gözlemlendi. Bu durum, özellikle NKX3.1 ektopik ekspresyonu ile protein düzeyi artan TWIST1 ve SNAIL1 için, farklı koşullar ve farklı hücre hatlarında NKX3.1'e bağlı değişimin analiz edilmesi gerektiğini doğruladı.

Enflamatuvar mikroçevredeki EMT sürecinde mezenkimal fenotipin bileşenlerinin daha iyi anlaşılması ve bu değişimde hangi sitokinin etkisinin belirleyici olduğunu ayırtmak amacıyla LNCaP hücrelerine, TNF- α ve TGF- β 1'in farklı konsantrasyon kombinasyonları

uygulanarak mezenkimal fenotip ve belirteçlerin ekspresyonel değişimleri incelendiğinde, TNF- α 'nın NKX3.1 protein kaybı üzerindeki etkisine TGF- β 1'in doğrudan katkıda bulunmadığı değerlendirildi. TGF- β 1'in de literatürde EMT aktivasyonundaki en önemli aracı olması sebebiyle, EMT belirteçleri üzerindeki TNF- α ve TGF- β 1 aracılıklı etkilerin ayırmsanması ve bir arada bulundukları durumdaki etkilerin belirlenmesi amaçlandı. Bu çerçevede, prostat hücrelerinde proliferasyon ve birçok metabolik olayda rolü bulunan AR'nin TGF- β 1'in ve TNF- α 'nın yüksek konsantrasyonunda azaldığı görüldü. EMT aktivasyonunun belirteçlerinden biri olan E-kaderin azalışı ve N-kaderin artışı incelendiğinde, LNCaP hücrelerinde TGF- β 1 etkisinin E-kaderin seviyesini değiştirmedığı ve N-kaderin seviyesinde de artış olmadığı belirlendi. TNF- α /TGF- β 1 ve majör TNF- α etkisiyle ise, 120 kDa boyutundaki membran lokalize olgun E-kaderin seviyesinin ve 80 kDa boyutunda olan çözünür formunun enflamatuvar ortamda arttığı, ancak NKX3.1 ektopik ekspresyonuna bağlı olarak baskılandığı görüldü. Ayrıca TNF- α etkisiyle N-kaderin seviyesinde artış görülmesiyle, androjen-bağımlı LNCaP hücrelerinde TGF- β 1'in EMT aktivasyonu ve mezenkimal fenotipten tek başına sorumlu olmadığı, TNF- α 'nın da belirli bir düzeydeki varlığının bu fenotip için gerekli olduğu değerlendirildi. E-kaderin'in 80 kDa boyutundaki formunun kanser olgularında yüksek olduğu bilindiğinden (David et al., 2012) bu sonuçlara göre, TNF- α 'nın membran lokalize E-kaderin formunun azalışına ve çözünür formun artmasına katkıda bulunduğu sonucuna varıldı. Fibronektin düzeyinin üç sitokin kombinasyon modelinde de dozla korele olarak arttığı ancak TNF- α etkisinin bu artışta daha ağırlıklı olduğu değerlendirildi. EMT aktivasyonu faktörlerinden biri olan vimentinin üç enflamatuvar durumda da genel olarak arttığı ancak kaspazlar tarafından kesimi (Byun et al., 2001) sonucu oluşan 43 kDa boyutundaki kesilmiş formunu da artırdığı belirlendi. Bu durumda enflamatuvar koşullarda hücrelerin önemli bir kısmında apoptozun da aktifleştirebildiği ancak immünfloresen denemelerinde de görüldüğü gibi, bazı hücrelerde vimentin filamentlerinin belirgin olduğu, sonuç olarak EMT aktivasyonu sonucu vimentin artışı ile görülen ve NKX3.1 ekspresyonu bulunmayan mezenkimal özelliklere sahip bu hücrelerin, metastazdan sorumlu olabilecekleri sonucuna varıldı.

TWIST1 seviyesinin 3 enflamatuvar durumda da doz bağımlı olarak arttığı görüldü. SNAIL1 ve SNAIL2 seviyesi, TGF- β 1 aracılı koşulda artmazken, TNF- α /TGF- β 1 ve TNF- α etkisi ile sitotoksik olmayan durumdaki artışı nedeniyle bu etkiden TNF- α 'nın sorumlu olduğu değerlendirildi. Bunun yanında, ZEB1'in yalnızca TNF- α /TGF- β 1'in eş zamanlı etkinliği ile artış gösterdiği gözlemlendi. Androjene yanıt veren LNCaP hücrelerindeki bu sonuçlara ek olarak, kastrasyon-dirençli hücrelerden PC-3'de vimentin, TWIST1 ve SNAIL1 artışının önceki

sonuçlara benzer olduğu görüldü. DU 145 hücrelerinde ise enflamatuvar uyarıya bağlı olarak diğer hücre hatları ile benzer şekilde artan fibronektin, TWIST1, SNAIL1 ve ZEB1'in yanında N-kaderin seviyesinin de arttığı görüldü. Mezenkimal belirteçlerin, hücre hattına özgü olarak değişkenlik göstermekle birlikte, TNF- α ve TGF- β 1'in belirli düzeylerinin bir arada etki gösterdiği bir enflamatuvar mikroçevrede arttığı sonucuna varıldı.

EMT aktivasyonu ve mezenkimal fenotipten sorumlu olan bu faktörlerin, farklı sitokin konsantrasyonu ve kombinasyonları uygulanan modellerdeki farklı değişimleri, tümör mikroçevresinin değişken ve heterojen ortamında, bu sitokin düzeylerinin de yüksek değişkenlikte olabileceğini ve sonuç olarak bu belirteçlerin oldukça hassas sitokin düzeyi ve kombinasyonları varlığında EMT aktivasyonu ve mezenkimal özellikleri düzenlediklerini gösterdi.

Enflamatuvar duruma bağlı değişimlerin karakterize edilmesi yanında, NKX3.1'in mezenkimal belirteçlerin değişimindeki etkisi de NKX3.1 kaybının EMT aktivasyonundaki rolü açısından önemlidir. Bu sonuçlara göre, TWIST1, SNAIL1 ve SNAIL2 protein düzeylerinin, enflamatuvar mikroçevreden bağımsız olarak yüksek NKX3.1 ekspresyonu durumunda arttığı belirlendi. Ek olarak, mezenkimal belirteçlerin yalnızca NKX3.1 ekspresyonuna bağlı artışı, PC-3'lerdeki artan vimentin ve TWIST1; DU 145 hücrelerinde artan N-kaderin, fibronektin, TWIST1, SNAIL1 ve ZEB1 sonuçları ile doğrulandı. Bu sonuçlar hem NKX3.1'in klasik tümör baskılayıcı fonksiyonu açısından, hem de bu faktörlerin NKX3.1 varlığında enflamatuvar koşullarda baskılandıkları halde enflamasyon olmayan koşullarda artmaları açısından beklenmedik bir durum olarak değerlendirildi. Ayrıca literatürde TWIST1'in NKX3.1'in transkripsiyonel hedefi olduğu ve NKX3.1'in susturulması durumunda TWIST1 relatif mRNA seviyesinin arttığını gösteren çalışma ile de örtüşmediği değerlendirilmiştir (Eide vd., 2013). Ancak bu literatürdeki veriler daha detaylı incelendiğinde, bulgularan temel sonuçların, (i) TWIST1'in sentetik androjen uygulaması ile arttığı ve AR susturulması ile NKX3.1 (AR hedefi olan NKX3.1 için beklenen sonuç) ve TWIST1 protein seviyelerinin azaldığı, (ii) TWIST1 promotorunda belirlenen NKX3.1 bağlanma bölgelerinden birinde, kromatin immünopresipitasyonu ile NKX3.1'in presipite olduğu, (iii) NKX3.1 ektopik ekspresyonu ile TWIST1 promotorunda lusiferaz aktivitesi artışı ve NKX3.1 susturulması durumunda TWIST1 mRNA seviyesinin arttığı şeklinde özetlenebilecek sonuçlarda, TWIST1 düzeyi değişiminin, promotor bölgesine bağlanan NKX3.1 regülasyonu ile mRNA değişimi seviyesinde olduğu, aynı deney setlerinde NKX3.1 seviyesine bağlı olarak değişen TWIST1

protein seviyesinin gösterilmediği belirlendi. Bu sonuçlar tez çalışmasında yapılan EMT-PCR array sonuçlarında, mRNA seviyesinde bir TWIST1 değişimi gözlenmemiş olması, NKX3.1 susturulması ve ektopik ekspresyonu durumunda protein seviyesinde elde edilen sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde, NKX3.1'in TWIST1'i transkripsiyonel düzeyde regüle etmesi yerine, protein düzeyinde stabilizasyonuna neden olabileceği değerlendirildi. Bu yaklaşımla ilişkili olarak yapılan literatür araştırmasında, Zhao ve ark. tarafından yapılan çalışmada, deubikütine edici enzim ailesi üyesi ubikülin spesifik peptidaz-13'ün (USP13), TWIST'i deubikütine ederek protein seviyesinde stabilize ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, SNAIL1 düzeyinin de USP13 ile arttığı ancak SNAIL2 ve ZEB1'in değişmediği gösterilmiştir. Bunun yanında, USP13'e bağlı stabilizasyonu sonucunda, TWIST1 hedef genleri olan E-kaderin, N-kaderin, vimentin ve MMP9'un ekspresyon seviyelerinin de değiştiği belirlenmiştir (Zhao et al., 2023). Ek olarak, USP13 ekspresyonunun bazı AR-ilişkili gen ekspresyonları ve NKX3.1 ekspresyonu ile pozitif korelasyona sahip olduğu da gösterilmiştir (Cui et al., 2022). Bu bilgiler dikkate alındığında tez çalışması kapsamında, NKX3.1 ektopik ekspresyonu durumundaki TWIST1 artışının, NKX3.1'in USP13 aracılığıyla TWIST1'in deubikütinasyonu ve protein stabilizasyonuna sebep olmasının sonucu olabileceği düşünüldü.

LNCaP hücrelerinde enflamatuvar mikroçevrede artan EMT belirteçleri ve anoikis direncine ilişkin sonuçlarla birlikte, migrasyon düzeyinin de arttığı ancak hem normal hem enflamatuvar durumda NKX3.1 ekspresyonunun migrasyon düzeyini azalttığı belirlendi. Bu sonuçların, NKX3.1'in literatürde bilinen tümör baskılayıcı fonksiyonu ve daha önce yüksek TNF- α konsantrasyonu içeren enflamatuvar koşullarda artan migrasyonu baskıladığı sonuçlarıyla (Debelec-Butuner et al., 2014) uyumlu olduğu görüldü. Tez çalışması kapsamında elde edilen ve literatürde NKX3.1 ile ilişkisi bilinmeyen mezenkimal belirteçler ve anoikis direncine ilişkin verilerle birarada değerlendirilmesinin önemli olduğu sonucuna varıldı. NKX3.1'in normal hücrel koşullar ve düşük sitokin düzeyi içeren enflamatuvar koşullarda anoikis direncini artırdığı ancak sitokin konsantrasyonu veya süresinin görece yüksek olduğu durumlarda anoikis direncini azalttığı dikkate alındığında, hücre migrasyonunu baskılamasının, migrasyonda rol oynayan diğer faktörlerin de etkisi ile nihai bir hücrel sonuç olarak ortaya çıktığı değerlendirildi. Ancak NKX3.1 ekspresyonuna bağlı artan EMT belirteçlerinin, NKX3.1'in kök hücre fenotipine katkısının mekanizmasını açıklamaya katkıda bulunabileceği düşünüldü. Literatürde NKX3.1'in kök hücre fenotipindeki etkisi ile ilgili olarak, NKX3.1'in, fibroblastların yeniden programlanmasında, IL-6-Stat-3 sinyal yolunun alt basamağında, transkripsiyonel olarak Oct4 ekspresyonunu aktiveleştirerek, indüklenmiş pluripotent kök hücre

(iPSC) oluşumuna katıldığı bilinmektedir (Mai et al., 2018). Ayrıca kastrasyon dirençli kanser olgularında, androjen yokluğunda NKX3.1 eksprese eden bir lümen hücresi popülasyonunun kendini yenileme kapasitesine sahip olduğu (Wang et al., 2009) ve prostat organoidleri oluşturabildiği (Chua et al., 2014) belirlenmiştir. Literatürde yapılan değerlendirmelerde NKX3.1'in kök hücre fonksiyonunu destekleyen rolünün, DNA onarım mekanizması ve oksidatif stres regülasyonu üzerindeki fonksiyonları ile hücre canlılığını artıran etkisinden kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir. Ancak bu tez çalışmasındaki sonuçlar, EMT belirteçlerini protein seviyesinde artırmasında da rolü olabileceğini göstermektedir. Cai ve ark.'nın araştırmasında, epitel hücrelerde AR protein kaybının, kastrasyon dirençli kök hücre benzeri hücrelerin sayısını artırdığı ve TGF- β 1/EMT aracılığıyla metastazı teşvik ettiği, ayrıca anoikis direncini artırdığı ortaya çıkarılmıştır (Cai et al., 2020). Bu tez çalışmasındaki sonuçlar da NKX3.1'in (AR'nin hedef geni olarak), AR'nin bu fonksiyonuna aracılık edebileceğini ancak NKX3.1'in AR tarafından regüle edilmesi dışında da EMT ve anoikisi etkilediğini göstermektedir.

EMT sinyali alan epitel hücreleri, farklılaşmış kök hücre benzeri özellikler kazanarak kanser kök hücrelerine dönüşebilirler ve bu nedenle prostat kanseri kök hücreleri, protein ekspresyonu açısından EMT aktivasyonu ile örtüşen bir protein profili sergilerler. Ayrıca EMT ile örtüşen kök hücre benzeri özellikler, hedef dokuda tümör hücrelerine tümör başlatıcı bir özellik ve migrasyon potansiyeli kazandırır (Moltzahn et al., 2013; Luo et al., 2014; Li et al., 2019). Bu bilgiler dikkate alındığında NKX3.1'in tümör baskılayıcı fonksiyonu ile EMT'yi destekleyici fonksiyonu arasındaki dengenin kanser kök hücrelerindeki rolü açısından önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

EMT'yi aktive eden enflamatuvar mikroçevreyle birlikte hem enflamasyona bağlı NKX3.1'in protein kaybı hem de NKX3.1'in majör EMT belirteçleri üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, enflamatuvar ve NKX3.1'e bağlı değişen EMT belirteçlerinin profillemesi ve NKX3.1 etkisi ile değişen faktörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu yaklaşımla EMT PCR array profillemesi sonucunda CM etkisine bağlı olarak önemli sayıda EMT faktörünün mRNA düzeyinin değiştiği belirlendi. EMT'deki fonksiyonuna bağlı olarak invazyon, metastaz (Mani et al., 2007) ve kemoterapi direncinde (Hargadon et al., 2023) rol oynayan FOXC2'nin enflamatuvar mikroçevrede 33 kat arttığı gözlemlendi. Enflamasyonda ekspresyonu artan (de Almeida, 2017) ve invazyon/metastazı teşvik ettiği bilinen (Wang et al., 2022 b) Caveolin2 (CAV2) 10.5 kat artış gösterdi. Ekspresyon artışı fokal adezyon, ekstraselüler

matriks ve yapısal elementlerde fonksiyon bozulmasına sebep olan IGFBP ailesi (Savas et al., 2021) üyelerinden IGFBP4'ün 8.8 kat, metastaz ilişkili protein Goosecoid (GSC) (Nieto et al., 2012) 7.7 kat artış gösterdiği görüldü. 5.2 kat artan AHNK'ın kök hücre özelliği ilişkili faktörler üzerinde p53'ün transkripsiyon represyonu fonksiyonunda kofaktör olarak fonksiyon göstermesine rağmen, yüksek ekspresyon düzeyinin kanseri baskıladığı (Cai et al., 2021) ve teşvik ettiğini (Sudo et al., 2013) gösteren çalışmalar bulunmaktadır. TGF- β 1, TGF- β 2, NODAL, BMP2 gibi bazı EMT faktörlerinin de baskılandığı ve bunlar arasında fibronektin (FN1)'in de olduğu belirlendi. Ancak FN1'in NKX3.1 ektopik ekspresyonu bulunan hücrelerde CM etkisi ile 2 kat, enflamatuvar mikroçevrede kültür edilmiş (CM) hücrelerde ise NKX3.1 etkisi ile 37 kat artış gösterdiği görüldü. Bu sonuçlar, enflamatuvar mikroçevre modelinin EMT ilişkili proteinlerde önemli düzeyde transkripsiyonel aktivasyona sebep olmasıyla birlikte, enflamasyona bağlı FN1 artışının protein stabilizasyonuna da bağlı olabileceğini düşündürdü.

Yalnızca NKX3.1 ektopik ekspresyonuna bağlı olarak aktive olan EMT ilişkili faktörlerin özellikle NKX3.1'in kanser kök hücre fenotipindeki rolü ile ilişki olabileceğinden, başta BMP1 olmak üzere AHNK, MMP2, MMP9, SPARC, IGFBP4, MSTR1, MSN, NODAL ve SNAI1 mRNA seviyesi artışlarının enflamasyon bağımsız NKX3.1-aracılı EMT ve kök hücre fenotipini kontrol edebilecekleri, ancak bazılarının doğrudan NKX3.1'in transkripsiyonel hedefi olmayabileceği sonucuna varıldı. Örneğin embriyonik gelişimde normal hücre invazyonunu kontrol eden ancak prostat kanseri olgularında metastazı destekleyici etkisi olan NODAL'ın (Alwhaibi et al., 2019) embriyonik dönemde hücre proliferasyonunu kontrol eden NKX3.1'in hedefi olabileceği, ek olarak iki ayrı enflamatuvar ortam koşulunda baskılanmasına rağmen, NKX3.1 ektopik ekspresyonu bulunan iki durumda da artmış olması nedeniyle doğrudan NKX3.1'in kontrolünde bir EMT aracısı olabileceği değerlendirildi. Benzer şekilde BMP2 ve TGF- β 3'ün de her iki durumda artması dikkat çekici bulundu.

NKX3.1 ektopik ekspresyonu bulunan hücrelerde enflamatuvar koşullar ile artan FOXC2, COL1A2 faktörlerinin ve enflamatuvar mikroçevrede EMT aktivasyonuna uğramış hücrelerde NKX3.1 ektopik ekspresyonu ile artan FN1, COL1A2, CDH2 (N-kaderin) ve BMP2 düzeylerinde enflamatuvar koşullarda değişen NKX3.1 fonksiyonunun etkisi olabileceği düşünüldü.

NKX3.1 etkisi ile azalan faktörlerin ise NKX3.1 ekspresyonu ile migrasyonun baskılanmasına sebep olabilecek EMT faktörleri olabileceği değerlendirildi. Bu durumda,

FZD7 ve EGFR her 2 koşulda, CAV2, GSC'nin yalnız enflamatuvar koşulda baskılandığı belirlendi.

Enflamatuvar koşullarda artmış olup NKX3.1 ektopik ekspresyonu ile baskılanan faktörlerin de NKX3.1'in tümör baskılayıcı ve migrasyonu inhibe eden fonksiyonu üzerinden katkıda bulunabileceği değerlendirildi. Bu yaklaşımla, CAV'nin enflamasyonda 10.5 kat artmışken NKX3.1 ektopik ekspresyonu ile 0.1 kata baskılanmış olması, FOXC2'nin enflamatuvar koşulda 33 katlık artışının, NKX3.1 yüksek ekspresyonuna sahip hücrelerde 5.8 kat ve enflamatuvar koşullardaki hücrelerin NKX3.1 eksprese etmesi durumunda 0.2 kat oranında baskılanması, bu faktörlerin enflamatuvar koşullarda NKX3.1 ile baskılanan EMT ve migrasyonun aracıları olduğu sonucuna varıldı. AHNK, MMP2, MMP9 genlerinin enflamatuvar durumda NKX3.1 varlığında mRNA seviyelerinin belirgin şekildeki azalışı da yine NKX3.1'in stres koşullarında migrasyonu baskıladığını düşündürmektedir.

PLXNA3 (Shancheng et al., 2018), FAM227A (Lulu et al., 2024) genleri, prostat kanseri vakalarında yüksek düzeyde eksprese olduğu bilinen ve hücre hareketliliği teşvik eden genlerdir. DU 145 hücrelerinin kullanıldığı RNA dizileme sonuçlarında, enflamatuvar mikroçevrede bu genlerin ekspresyon düzeylerinin arttığı görüldü. Ayrıca hücre adezyon molekülü olarak bilinen AMIGO3 (Goto et al., 2022) geninin azaldığı görüldü. Enflamatuvar ortamda ekspresyonları değişen bu genlerin, prostat tümör hücrelerinin enflamatuvar mikroçevre ilişkili migrasyonuna aracılık eden genler olabileceği sonucuna varıldı. Uzun kodlanmayan düzenleyici RNA'lardan olan RNVU1-7'nin prostat kanseri vakalarında ekspresyon seviyesi düşük olduğu bilinmektedir (Ye et al., 2022) ve malignite ile ilişkilendirilmiştir. RNVU1-7, 5' pre-mRNA sprints bölgesinin tanınmasında fonksiyonu olan bir RNA molekülüdür. LINC00894 ise gen ve proteinlerin fonksiyonlarına aracılık eden bir RNA molekülü olarak bilinmektedir. RNA dizileme sonuçlarında enflamatuvar mikroçevrede RNVU1-7 ve LINC00894'ün ekspresyonlarının arttığı görüldü. Bu ekspresyon değişimlerinin, enflamatuvar ortama maruz kalan hücrelerdeki sağkalım yollarını aktive ederek, enflamatuvar tümör mikroçevresindeki 'denge fazı' homeostazisindeki fonksiyonları açısından önemli olabileceği değerlendirildi. RNA dizileme sonuçlarında WASH5C ve COL14A1'in enflamatuvar koşullarda ekspresyon düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. WASHC5, endozom transportunda rolü olan bir gendir ve prostat kanseri vakalarında yüksek seviyede eksprese olduğu (çoğunlukla gen duplikasyonları) bilinmektedir. COL14A1, matriks molekülleri ve hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime giren tip14 alfa zincirini kodlayan

gendir. Prostat kanserinde yüksek seviyedeki ekspresyonu, yüksek gleason skoru ve migrasyon ile ilişkilendirilmiştir (Rasmussen et al., 2024). SYNGAP-1, Ras GTPaz aktive edici protein kodlayan bir gendir. Prostat kanseri vakalarında çoğunlukla hipermetile olduğu ve düşük ekspresyon profili gösterdiği bilinmektedir (Peter et al., 2021). Düşük eksprese olması artan Ras aktivasyonuna sebep olmakta ve hücreler kontrolsüz çoğalmaktadır. RNA dizileme sonuçlarında yalnızca enflamasyon durumunda ve yalnızca NKX3.1 ektopik ekspresyonu varlığında SYNGAP1'in ekspresyonunda artış gözlemlendi. Bu etkinin, NKX3.1'in tümör baskılayıcı fonksiyonu ile ilişkili olabileceği değerlendirildi.

RN7SL2, salgı proteinlerin endoplazmik retikulumun lümenine geçişinde rol oynayan, sitoplazmik ribonükleoprotein kompleksi üyesi olan bir proteini kodlar. Prostat kanseri vakalarında AR'nin baskılandığı durumda düşük düzeyde eksprese edildiği bilinmektedir (Ghafouri-Fard et al., 2022). RNA dizileme sonuçlarında enflamatuvar mikroçevrede ektopik NKX3.1 varlığında RN7SL2'nin ekspresyonunda artış görülmüştür. AR ekspresyonunun DU145 hücrelerinde bulunmadığı bilindiğinden, AR'nin RN7SL2 gen ekspresyonu üzerindeki kontrolünün NKX3.1 aracılı olabileceği değerlendirildi.

RNA dizileme analizi yapılacak olan her bir deney grubu için yalnızca 3 adet teknik replikanın hazırlanmış olması, p değeri anlamlılığına göre analiz edilen, değişen genlerin sayıca düşük çıkmasına neden olmuştur. Bu nedenle gen zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiştir. Gen zenginleştirme analizlerinin sonuçlarında (KEGG analizleri) da görüldüğü gibi, enflamatuvar koşullarda ve ektopik NKX3.1 varlığında, bireysel olarak değişen genlerin yanı sıra, belirli bir hücresel fonksiyonla ilişkili gen gruplarının bir arada değişiminin de önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Metastatik prostat kanseri gelişiminde, diğer kanser olgularına benzer şekilde, hücrelerin bulundukları dokuda, EMT aktivasyonu ile başlayan süreç, uygun mikroçevre koşullarında metastazla sonuçlanabilir. İmmün hücre infiltrasyonu ve kronik sitokin maruziyeti sonucu gelişen enflamatuvar tümör mikroçevresinde, enflamasyon ilişkili tümörleşme mekanizmalarından biri de EMT'dir. Enflamasyon ile tetiklenen kanserleşme, prostat kanserinin yalnızca başlangıç ve ilerleme aşamalarında değil, metastatik kastrasyon dirençli prostat kanseri evresine geçişte de önemli rol oynamaktadır. Kronik enflamatuvar tümör mikroçevresinde, bölgeye göç etmiş makrofajlar gibi immün sistem hücreleri ve parakrin etki göstererek tümör hücrelerinde moleküler değişimleri tetikleyen tümör stroma hücreleri bulunur. Makrofajlar, işlevsel olarak aktif bir stromaya yol açan ve tümör büyümesini ve metastazı destekleyen sitokinleri salgılayarak, tümör hücrelerinin metastatik özellik kazanmasında rol oynamaktadır. Sonuç olarak kronik enflamasyon ile artmış sitokin konsantrasyonları ve stroma kaynaklı tümörjenik etkiler, hücre dışı matriksi yeniden modelleyerek ve EMT'yi başlatarak, tümör mikroçevresindeki modifikasyonlar yoluyla, metastatik evreye geçişe de katkıda bulunur. EMT, epiteliyal kanser gelişiminin belirteçlerinden biridir. Tümör hücrelerinin hücre-hücre bağlantılarını ve polaritelerini kaybetmeleri, birçok mezenkimal özellikleri kazanmaları sonucunda ECM invazyonu ve hücre metastazı gerçekleşir. Enflamatuvar mikroçevre ilişkili tümörjenik değişimlerden biri de prostat kanseri gelişiminde tümör baskılayıcı fonksiyon gösteren NKX3.1'in protein kaybıdır. DNA hasarı ve oksidatif stres regülasyonu fonksiyonları dışında metastatik olgularda, NKX3.1 ekspresyonunun dikkat çeken özelliği, metastatik hücrelere progenitör/kök hücre özelliği kazandırmasıdır. Bu nedenle, NKX3.1 fonksiyon kaybının prostat kanseri hücrelerinin metastatik özellik kazanması öncesinde, artan EMT sürecinde etkili olabileceği gibi, kazandırdığı kök hücre benzeri özelliklerin, metastatik olgularda klasik tümör baskılayıcı rolüne ters bir fonksiyon olarak ortaya çıkabileceği değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında aşağıdaki temel hedefler araştırılmıştır:

- Tümörün enflamatuvar mikroçevresinde EMT ve metastazda etkili majör sitokinler olan TNF- α ve TGF- β 'nın EMT belirteçleri üzerindeki ayrı ve kombine etkilerinin tanımlanması.

- Enflamatuvar mikroçevrenin EMT'nin hücresel sonuçlarından biri olan anoikis direncine etkisinin belirlenmesi.
- NKX3.1'in anoikis direnci gelişindeki olası rolünün belirlenmesi
- NKX3.1'in hangi gen ekspresyon değişimleri aracılığıyla tümör baskılayıcı etkisi ve kanser kök hücre fenotipini destekleyici fonksiyonlarının düzenlendiğinin belirlenmesi

Elde edilen bulgular ve literatür değerlendirmeleri sonucunda varılan sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- TNF- α ve TGF- β 'nın belirli konsantrasyon düzeylerinin kombinasyonu EMT'yi aktiveleştirerek tümörijenik etkilere sebep olur.
- Enflamatuvar mikroçevrede EMT'yi aktiveleştirecek ancak hücreler üzerinde yüksek sitotoksosite göstermeyecek belirli bir aralıktaki TNF- α ve TGF- β 1'in maruziyeti, anoikis direnci gelişimine neden olur.
- NKX3.1'in tümör baskılayıcı fonksiyonu ile EMT'yi destekleyici fonksiyonunda aynı ve farklı EMT araçları fonksiyon göstermektedir ve bu fonksiyonlar arasındaki denge, kanser kök hücre fenotipindeki rolü açısından önemlidir. NKX3.1'in hangi fonksiyonunun baskın olacağının, tümör mikroçevresindeki enflamatuvar sitokinler gibi stres koşullarına ve diğer EMT bileşenleri ile etkileşimine bağılı olması muhtemeldir.
- Enflamatuvar koşullarda azalan NODAL ve BMP2 seviyelerinin, NKX3.1 ektopik ekspresyonu ile artması nedeniyle bu faktörler, NKX3.1'e bağılı EMT/kök hücre fenotipinin aracısı olabilirler.
- Enflamatuvar koşullarda artan AHNK, MMP2, MMP9, FOXC2 ve CAV2 seviyelerinin, NKX3.1 ile azalması nedeniyle, bu faktörler, normal ve enflamatuvar koşullarda NKX3.1'e bağılı migrasyon düşüşünün aracısı olabilirler.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, ileride yapılabilecek çalışmalar için öneriler aşağıda özetlenmiştir:

- Çalışmalarımızda, normal hücresel durumda, enflamasyon stresi olmayan koşullarda NKX3.1 ektopik ekspresyonuna bağlı olarak TWIST1 proteininin seviyesindeki belirgin artış dikkate değer bulunmuştur. NKX3.1, TWIST1 ve bunun yanında SNAIL1 gibi bazı mezenkimal belirteçleri hücrede stabilize ediyor olabilir. Bu proteinlerin ubiquitinasyon aracılığıyla olarak degradasyonunun regülasyonunda fonksiyon gösteriyor olabilir. Bunun için IP (immünopresipitasyon) incelemeleri yapılabilir. Kontrol durumunda ve CM koşullarında büyütülen hücrelerden (HNV/HMNKX3.1 transfeksiyonu-48 saat) izole edilen total protein içeriğindeki TWIST1, beadler ile çöktürölüp ubiquitin antikoru ile işaretlenerek western blot metoduyla incelenebilir.
- IF incelemelerinde çoğunlukla NKX3.1 ile kolokelize olmayan TWIST1, SNAIL1 ve vimentin gibi mezenkimal proteinlerin, hücre döngüsü aracılığıyla kontrollerinin olup olmadığı senkron/asenkron hücre kültürü ve flow sitometri analizi ile incelenebilir.
- Organogeneziste luminal epitelyal hücrelerdeki NKX3.1 ekspresyonunu başlatan sinyallerin stroma kaynaklı AR ekspresyonuna bağlı gerçekleştiği bilindiğine göre WPMY-1 hücrelerinde siAR ile AR geni susturularak PCa hücre hatlarının, kontrol/enflamasyon koşullarında ko-kültürü denenerek EMT profilinin nasıl değişiyor olduğu inceleme konusu olabilir.
- NKX3.1'in kök hücre fonksiyonunu göstermesini tetikleyen ve EMT profili ile örtüşen hücrelerin incelenebilmesi için IL-6 sitokin etkili CM *in vitro* kültürleri tasarlanabilir ve kök hücre biyobelirteç proteinlerinin (Oct4, Sox2, Nanog ve Klf4) seviyesel analizleri araştırılabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdou, N.; Alavi, J.; Abdou, N.**, 1976: Human bone marrow lymphocytes: B and T cell precursors and subpopulations. *Blood.*, **47**, 423–430.
- Abidi, A.**, 2013, October: Cabazitaxel: A novel taxane for metastatic castration-resistant prostate cancer-current implications and future prospects. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*.
- Adami, H. O.; Kuper, H.; Andersson, S. O.; Bergström, R.; Dillner, J.**, 2003: Prostate cancer risk and serologic evidence of human papilloma virus infection: A population-based case-control study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.*, **12**, 872–875.
- Aderem, A.; Ulevitch, R. J.**, 2000, August 17: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*.
- Adeshakin, F. O.; Adeshakin, A. O.; Afolabi, L. O.; Yan, D.; Zhang, G.; Wan, X.**, 2021: Mechanisms for Modulating Anoikis Resistance in Cancer and the Relevance of Metabolic Reprogramming. *Frontiers in Oncology*.
- Aggarwal, B. B.**, 2003: Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*.
- Aggarwal, B. B.; Shishodia, S.; Sandur, S. K.; Pandey, M. K.; Sethi, G.**, 2006: Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochemical Pharmacology.*, **72**, 1605–1621.
- Aleman, M.**, 2022: The Roles of Androgens in Humans: Biology, Metabolic Regulation and Health. *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 11952.*, **23**, 11952.
- Alexander, N. R.; Tran, N. L.; Rekapally, H.; Summers, C. E.; Glackin, C.; Heimark, R. L.**, 2006: N-cadherin Gene Expression in Prostate Carcinoma Is Modulated by Integrin-Dependent Nuclear Translocation of Twist1. *Cancer Research.*, **66**, 3365–3369.
- Allott, E. H.; Masko, E. M.; Freedland, S. J.**, 2013: Obesity and Prostate Cancer: Weighing the Evidence. *European Urology.*, **63**, 800–809.
- Alwhaibi, A.; Verma, A.; Artham, S.; Adil, M. S.; Somanath, P. R.**, 2019: Nodal pathway activation due to Akt1 suppression is a molecular switch for prostate cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis. *Biochemical Pharmacology.*, **168**, 1–13.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Anassi, E.; Anadu Ndefo, U.**, 2011: Sipuleucel-T (Provenge) Injection. *Drug Forecast.*, **36**, 197–202.
- Anderson, P. R.; Hanlon, A. L.; Patchefsky, A.; Al-Saleem, T.; Hanks, G. E.**, 1998: Perineural invasion and Gleason 7-10 tumors predict increased failure in prostate cancer patients with pretreatment PSA <10 ng/ml treated with conformal external beam radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics.*, **41**, 1087–1092.
- Anose, B. M.; Lagoo, L.; Schwendinger, J.**, 2008: Characterization of androgen regulation of ZEB1 and PSA in 22RV1 prostate cancer cells. *Advances in experimental medicine and biology.*, **617**, 541–546.
- Ansieau, S.; Morel, A. P.; Hinkal, G.; Bastid, J.; Puisieux, A.**, 2010, April 12: TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein. *Oncogene*.
- Antao, A. M.; Ramakrishna, S.; Kim, K. S.**, 2021: The Role of Nkx3.1 in Cancers and Stemness. *International Journal of Stem Cells.*, **14**, 168–179.
- Arslan, K.**, 2024: Transurethral Resection of the Prostate (TURP) Syndrome: A Review of Perioperative Management. *Comprehensive Medicine.*, **16**, 123–127.
- Baker, B. M.; Chen, C. S.**, 2012: Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of cell science.*, **125**, 3015–3024.
- Balkwill, F.; Mantovani, A.**, 2001, February 17: Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet*.
- Barron, D. A.; Rowley, D. R.**, 2012, December: The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocrine-Related Cancer*.
- Beach, S.; Tang, H.; Park, S.; Dhillon, A. S.; Keller, E. T.; Kolch, W.; Yeung, K. C.**, 2008: Snail is a repressor of RKIP transcription in metastatic prostate cancer cells. *Oncogene.*, **27**, 2243–2248.
- Becher, B.; Spath, S.; Gorman, J.**, 2017, January 1: Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Belnoue, E.; Guettier, C.; Kayibanda, M.; Le Rond, S.; Crain-Denoyelle, A. M.; Marchiol, C.; Ziol, M.; Fradelizi, D.; Rénia, L.; Viguier, M.,** 2004: Regression of Established Liver Tumor Induced by Monoepitopic Peptide-Based Immunotherapy. *The Journal of Immunology.*, **173**, 4882–4888.
- Berr, A. L.; Wiese, K.; dos Santos, G.; Koch, C. M.; Anekalla, K. R.; Kidd, M.; Davis, J. M.; Cheng, Y.; Hu, Y. S.; Ridge, K. M.,** 2023: Vimentin is required for tumor progression and metastasis in a mouse model of non–small cell lung cancer. *Oncogene.*, **42**, 2074–2087.
- Bhowmick, N. A.; Neilson, E. G.; Moses, H. L.,** 2004, November 18: Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.*
- Bierie, B.; Moses, H. L.,** 2006: TGF- β and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews.*, **17**, 29–40.
- Bowen, C.; Bubendorf, L.; Voeller, H. J.; Slack, R.; Willi, N.; Sauter, G.; Gasser, T. C.; Koivisto, P.; Lack, E. E.; Kononen, J.; Kallioniemi, O. P.; Gelmann, E. P.,** 2000: Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Research.*, **60**, 6111–6115.
- Briukhovetska, D.; Dörr, J.; Endres, S.; Libby, P.; Dinarello, C. A.; Kobold, S.,** 2021: Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nature Reviews Cancer.*, **21**, 481–499.
- Browning, M. J.; F. Bodmer, W.,** 1992: MHC antigens and cancer: implications for T-cell surveillance. *Current Opinion in Immunology.*, **4**, 613–618.
- Butterfield, T. A.; Best, T. M.; Merrick, M. A.,** 2006, October 1: The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: A critical balance between tissue damage and repair. *Journal of Athletic Training.*
- Byun, Y.; Chen, F.; Chang, R.; Trivedi, M.; Green, K. J.; Cryns, V. L.,** 2001: Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. *Cell Death and Differentiation.*, **8**, 443–450.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cai, Q.; Chen, Y.; Zhang, D.; Pan, J.; Xie, Z.; Ma, S.; Liu, C.; Zuo, J.; Zhou, X.; Quan, C.; Xin, Z.; Niu, Y.,** 2020: Loss of epithelial AR increase castration resistant stem-like prostate cancer cells and promotes cancer metastasis via TGF- β 1/ EMT pathway. *Translational Andrology and Urology.*, **9**, 1013–1027.
- Cai, Y.; Hu, Y.; Yu, F.; Tong, W.; Wang, S.; Sheng, S.; Zhu, J.,** 2021: AHNK suppresses ovarian cancer progression through the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Aging.*, **13**, 23579–23587.
- Cao, Z.; Livas, T.; Kyprianou, N.,** 2016: Anoikis and EMT: Lethal ‘Liaisons’ during Cancer Progression. *Critical reviews in oncogenesis.*, **21**, 155–168.
- Cheaito, K. A.; Bahmad, H. F.; Hadadeh, O.; Saleh, E.; Dagher, C.; Hammoud, M. S.; Shahait, M.; Mrad, Z. A.; Nassif, I. S.; Tawil, A.; Bulbul, M.; Khaul, R.; Wazzan, W.; Nasr, R.; Shamseddine, A.; Temraz, S.; El-Sabban, M. E.; El-Hajj, A.; Mukherji, D. et al.,** 2019: EMT markers in locally-advanced prostate cancer: Predicting recurrence? *Frontiers in Oncology.*, **9**, 1–9.
- Chew, V.; Chen, J.; Lee, D.; Loh, E.; Lee, J.; Lim, K. H.; Weber, A.; Slankamenac, K.; Poon, R. T. P.; Yang, H.; Ooi, L. L. P. J.; Toh, H. C.; Heikenwalder, M.; Ng, I. O. L.; Nardin, A.; Abastado, J. P.,** 2012: Chemokine-driven lymphocyte infiltration: An early intratumoural event determining long-term survival in resectable hepatocellular carcinoma. *Gut.*, **61**, 427–438.
- Chu, W. M.,** 2013, January 28: Tumor necrosis factor. *Cancer Letters.*
- Chua, C. W.; Shibata, M.; Lei, M.; Toivanen, R.; Barlow, L. J.; Bergren, S. K.; Badani, K. K.; McKiernan, J. M.; Benson, M. C.; Hibshoosh, H.; Shen, M. M.,** 2014: Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nature Cell Biology* 2014 16:10., **16**, 951–961.
- Clinton, S. K.; Giovannucci, E. L.; Hursting, S. D.,** 2020, April 1: The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. *Journal of Nutrition.*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Costello, A. J.**, 2020, February 21: Considering the role of radical prostatectomy in 21st century prostate cancer care. *Nature Reviews Urology*.
- Cotter, K.; Rubin, M. A.**, 2022, August 1: The evolving landscape of prostate cancer somatic mutations. *Prostate*.
- Crowley, F.; Sterpi, M.; Buckley, C.; Margetich, L.; Handa, S.; Dovey, Z.**, 2021, June 30: A review of the pathophysiological mechanisms underlying castration-resistant prostate cancer. *Research and Reports in Urology*.
- Crum, N. F.; Spencer, C. R.; Amling, C. L.**, 2004: Prostate carcinoma among men with human immunodeficiency virus infection. *Cancer.*, **101**, 294–299.
- Cui, X.; Yu, H.; Yao, J.; Li, J.; Li, Z.; Jiang, Z.**, 2022: ncRNA-mediated overexpression of ubiquitin-specific proteinase 13 contributes to the progression of prostate cancer via modulating AR signaling, DNA damage repair and immune infiltration. *BMC Cancer.*, **22**, 1–21.
- David, J. M.; Rajasekaran, A. K.**, 2012: Dishonorable discharge: The oncogenic roles of cleaved e-cadherin fragments. *Cancer Research.*, **72**, 2917–2923.
- de Almeida, C. J. G.**, 2017: Caveolin-1 and Caveolin-2 Can Be Antagonistic Partners in Inflammation and Beyond. *Frontiers in Immunology.*, **8**.
- de Jong, T. D.; Vosslander, S.; Mantel, E.; de Ridder, S.; Wesseling, J. G.; van der Pouw Kraan, T. C. T. M.; Leurs, C.; Hegen, H.; Deisenhammer, F.; Killestein, J.; Lundberg, I. E.; Vencovsky, J.; Nurmohamed, M. T.; van Schaardenburg, D.; Bultink, I. E. M.; Voskuyl, A. E.; Pegtel, D. M.; van der Laken, C. J.; Bijlsma, J. W. J. et al.**, 2016: Physiological evidence for diversification of IFN α - and IFN β -mediated response programs in different autoimmune diseases. *Arthritis Research and Therapy.*, **18**, 1–10.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Debelec-Butuner, B.; Alapinar, C.; Ertunc, N.; Gonen-Korkmaz, C.; Yörükoğlu, K.; Korkmaz, K. S.,** 2014: TNF α -Mediated Loss of β -Catenin/E-Cadherin Association and Subsequent Increase in Cell Migration Is Partially Restored by NKX3.1 Expression in Prostate Cells. *PLoS ONE*., **9**.
- DeMarzo, A. M.; Nelson, W. G.; Isaacs, W. B.; Epstein, J. I.,** 2003: Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *The Lancet*., **361**, 955–964.
- Denmeade, S. R.; Isaacs, J. T.,** 2002: A history of prostate cancer treatment. *Nature reviews. Cancer*., **2**, 389.
- Dennis, L. K.; Lynch, C. F.; Torner, J. C.,** 2002: Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology*., **60**, 78–83.
- DiLillo, D. J.; Yanaba, K.; Tedder, T. F.,** 2010: B Cells Are Required for Optimal CD4+ and CD8+ T Cell Tumor Immunity: Therapeutic B Cell Depletion Enhances B16 Melanoma Growth in Mice. *The Journal of Immunology*., **184**, 4006–4016.
- Ding, H.; Zhang, J.; Zhang, F.; Zhang, S.; Chen, X.; Liang, W.; Xie, Q.,** 2021: Resistance to the Insulin and Elevated Level of Androgen: A Major Cause of Polycystic Ovary Syndrome. *Frontiers in Endocrinology*., **12**, 1–14.
- Dongre, A.; Weinberg, R. A.,** 2019: New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*., **20**, 69–84.
- Eide, T.; Ramberg, H.; Glackin, C.; Tindall, D.; Taskén, K. A.,** 2013: TWIST1, A novel androgen-regulated gene, is a target for NKX3-1 in prostate cancer cells. *Cancer Cell International*., **13**, 1–6.
- Eldred-Evans, D.; Burak, P.; Connor, M. J.; Day, E.; Evans, M.; Fiorentino, F.; Gammon, M.; Hosking-Jervis, F.; Klimowska-Nassar, N.; McGuire, W.; Padhani, A. R.; Prevost, A. T.; Price, D.; Sokhi, H.; Tam, H.; Winkler, M.; Ahmed, H. U.,** 2021: Population-Based Prostate Cancer Screening with Magnetic Resonance Imaging or Ultrasonography: The IP1-PROSTAGRAM Study. *JAMA Oncology*., **7**, 395–402.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ellem, S. J.; De-Juan-Pardo, E. M.; Risbridger, G. P.**, 2014: In vitro modeling of the prostate cancer microenvironment. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, **79–80**, 214–221.
- Engel, A. M.; Svane, I. M.; Rygaard, J.; Werdelin, O.**, 1997: MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scandinavian Journal of Immunology.*, **45**, 463–470.
- Eyles, J.; Puaux, A. L.; Wang, X.; Toh, B.; Prakash, C.; Hong, M.; Tan, T. G.; Zheng, L.; Ong, L. C.; Jin, Y.; Kato, M.; Prévost-Blondel, A.; Chow, P.; Yang, H.; Abastado, J. P.**, 2010: Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *Journal of Clinical Investigation.*, **120**, 2030–2039.
- Flinsenbergh, T. W. H.; Compeer, E. B.; Boelens, J. J.; Boes, M.**, 2011, June 2: Antigen cross-presentation: Extending recent laboratory findings to therapeutic intervention. *Clinical and Experimental Immunology.*
- Frisch, S. M.; Screaton, R. A.**, 2001: Anoikis mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology.*, **13**, 555–562.
- Fujita, K.; Nonomura, N.**, 2019: Role of androgen receptor in prostate cancer: A review. *World Journal of Men's Health.*, **37**, 288–295.
- Fuxe, J.; Karlsson, M. C. I.**, 2012: TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition: A link between cancer and inflammation. *Seminars in Cancer Biology.*, **22**, 455–461.
- Gay, H. A.; Michalski, J. M.**, 2018: Radiation Therapy for Prostate Cancer. *Missouri medicine.*, **115**, 146–150.
- Ghafouri-Fard S, Safarzadeh A, Hussen BM, Taheri M, Rashnoo F.** In silico characterization of competing endogenous RNA network in castration-resistant prostate cancer cells in presence of the natural compound atraric acid using RNA-seq analysis. *Pathol Res Pract.* 2022 Dec;240:154198.
- Girardi, M.; Oppenheim, D. E.; Steele, C. R.; Lewis, J. M.; Glusac, E.; Filler, R.; Hobby, P.; Sutton, B.; Tigelaar, R. E.; Hayday, A. C.**, 2018: Regulation of cutaneous malignancy by $\gamma\delta$ T cells. *Journal of Immunology.*, **200**, 3031–3035.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ghosh, S.; May, M. J.; Kopp, E. B.**, 1998, April 1: NF- κ B and rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*.
- Goel, S.; Duda, D. G.; Xu, L.; Munn, L. L.; Boucher, Y.; Fukumura, D.; Jain, R. K.**, 2011: Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiological Reviews*.
- Goto K, Osaki M, Izutsu R, Tanaka H, Sasaki R, Tanio A, Satofuka H, Kazuki Y, Yamamoto M, Kugoh H, Ito H, Oshimura M, Fujiwara Y, Okada F.** Establishment of an antibody specific for AMIGO2 improves immunohistochemical evaluation of liver metastases and clinical outcomes in patients with colorectal cancer. *Diagn Pathol*. 2022 Jan 30;17(1):16.
- Grant, C. M.; Kyprianou, N.**, 2013: Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Translational andrology and urology.*, **2**, 202–211.
- Gurel, B.; Lucia, M. S.; Thompson, I. M.; Goodman, P. J.; Tangen, C. M.; Kristal, A. R.; Parnes, H. L.; Hoque, A.; Lippman, S. M.; Sutcliffe, S.; Peskoe, S. B.; Drake, C. G.; Nelson, W. G.; De Marzo, A. M.; Platz, E. A.**, 2014: Chronic inflammation in benign prostate tissue is associated with high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.*, **23**, 847–856.
- Han, Y. H.; Wang, Y.; Lee, S. J.; Jin, M. H.; Sun, H. N.; Kwon, T.**, 2023: Regulation of anoikis by extrinsic death receptor pathways. *Cell Communication and Signaling.*, **21**, 1–14.
- Handy, C. E.; Antonarakis, E. S.**, 2018: Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: Novel insights and future directions. *Future Oncology.*, **14**, 907–917.
- Hargadon, K. M.; Strong, E. W.**, 2023: The FOXC2 Transcription Factor: A Master Regulator of Chemoresistance in Cancer. *Technology in cancer research & treatment.*, **22**.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Harris, W. P.; Mostaghel, E. A.; Nelson, P. S.; Montgomery, B.,** 2009: Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nature clinical practice. Urology.*, **6**, 76–85.
- Hayes, R. B.; Pottern, L. M.; Strickler, H.; Rabkin, C.; Pope, V.; Swanson, G. M.; Greenberg, R. S.; Schoenberg, J. B.; Liff, J.; Schwartz, A. G.; Hoover, R. N.; Fraumeni, J. F.,** 2000: Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer. *British Journal of Cancer.*, **82**, 718–725.
- Hayward, S. W.; Cunha, G. R.,** 2000: The prostate: Development and physiology. *Radiologic Clinics of North America.*, **38**, 1–14.
- Heebøll, S.; Borre, M.; Ottosen, P. D.; DyrskjØt, L.; Ørntoft, T. F.; TØrring, N.,** 2009: Snail1 is over-expressed in prostate cancer. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica.*, **117**, 196–204.
- Hibino, S.; Kawazoe, T.; Kasahara, H.; Itoh, S.; Ishimoto, T.; Sakata-Yanagimoto, M.; Taniguchi, K.,** 2021: Inflammation-induced tumorigenesis and metastasis. *International Journal of Molecular Sciences.*, **22**, 1–37.
- Hill, P.; Wynder, E. L.; Garnes, H.; Walker, A. R. P.,** 1980: Environmental factors, hormone status, and prostatic cancer. *Preventive Medicine.*, **9**, 657–666.
- Hodge, D. R.; Hurt, E. M.; Farrar, W. L.,** 2005: The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *European Journal of Cancer.*, **41**, 2502–2512.
- Honrado, E.; Benítez, J.; Palacios, J.,** 2006: Histopathology of BRCA1- and BRCA2-associated breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.*, **59**, 27–39.
- Hotary, K.; Li, X. Y.; Allen, E.; Stevens, S. L.; Weiss, S. J.,** 2006: A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes and Development.*, **20**, 2673–2686.
- Hu, C.; Rusin, C. G.; Tan, Z.; Guagliardo, N. A.; Barrett, P. Q.,** 2012: Zona glomerulosa cells of the mouse adrenal cortex are intrinsic electrical oscillators. *The Journal of Clinical Investigation.*, **122**.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huncharek, M.; Sue Haddock, K.; Reid, R.; Kupelnick, B.**, 2010: Smoking as a risk factor for prostate cancer: A meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *American Journal of Public Health.*, **100**, 693–701.
- Hussain, S. P.; Harris, C. C.**, 2007, December 1: Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. *International Journal of Cancer.*
- Hwang, C.**, 2012: Overcoming docetaxel resistance in prostate cancer: A perspective review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology.*, **4**, 329–340.
- Ingber, D. E.**, 2002: Cancer as a disease of epithelial-mesenchymal interactions and extracellular matrix regulation. *Differentiation; research in biological diversity.*, **70**, 547–560.
- Joesting, M. S.; Perrin, S.; Elenbaas, B.; Fawell, S. E.; Rubin, J. S.; Franco, O. E.; Hayward, S. W.; Cunha, G. R.; Marker, P. C.**, 2005: Identification of SFRP1 as a Candidate Mediator of Stromal-to-Epithelial Signaling in Prostate Cancer. *Cancer Research.*, **65**, 10423–10430.
- Kalluri, R.; Weinberg, R. A.**, 2009, June 1: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation.*
- Kidd, M. E.; Shumaker, D. K.; Ridge, K. M.**, 2014: The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *American journal of respiratory cell and molecular biology.*, **50**, 1–6.
- Kim, K. P.; Wu, Y.; Yoon, J.; Adachi, K.; Wu, G.; Velychko, S.; MacCarthy, C. M.; Shin, B.; Röpke, A.; Arauzo-Bravo, M. J.; Stehling, M.; Han, D. W.; Gao, Y.; Kim, J.; Gao, S.; Schöler, H. R.**, 2020: Reprogramming competence of OCT factors is determined by transactivation domains. *Science Advances.*, **6**, 1–16.
- Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Horii, A.; Miyoshi, Y.; Nakamura, Y.**, 1992: Disruption of the APC Gene by a Retrotransposal Insertion of LI Sequence in a Colon Cancer. *Cancer Research.*, **52**, 643–645.
- Koizumi, K.; Hojo, S.; Akashi, T.; Yasumoto, K.; Saiki, I.**, 2007, November 1: Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Science.*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kotenko, S. V.; Rivera, A.; Parker, D.; Durbin, J. E.,** 2019, June 1: Type III IFNs: Beyond antiviral protection. *Seminars in Immunology*.
- Kudo-Saito, C.; Shirako, H.; Takeuchi, T.; Kawakami, Y.,** 2009: Cancer Metastasis Is Accelerated through Immunosuppression during Snail-Induced EMT of Cancer Cells. *Cancer Cell.*, **15**, 195–206.
- Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R.,** 2014: Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **15**, 178–196.
- Lee, Y. T.; Tan, Y. J.; Oon, C. E.,** 2018, September 5: Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European Journal of Pharmacology*.
- Leitzmann, M. F.; Rohrmann, S.,** 2012: Risk factors for the onset of prostatic cancer: Age, location, and behavioral correlates. *Clinical Epidemiology*.
- Li, J. J.; Shen, M. M.,** 2019: Prostate stem cells and cancer stem cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.*, **9**.
- Loh, C. Y.; Chai, J. Y.; Tang, T. F.; Wong, W. F.; Sethi, G.; Shanmugam, M. K.; Chong, P. P.; Looi, C. Y.,** 2019: The e-cadherin and n-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: Signaling, therapeutic implications, and challenges. *Cells*.
- Lulu Fan, Hao Wang, Shuai Ben, Yifei Cheng, Silu Chen, Zhutao Ding, Lingyan Zhao, Shuwei Li, Meilin Wang, Gong Cheng.** Genetic variant in a BaP-activated super-enhancer increases prostate cancer risk by promoting AhR-mediated FAM227A expression[J]. *The Journal of Biomedical Research*, 2024, 38(2): 149-162.
- Luo, Y.; Cui, X.; Zhao, J.; Han, Y.; Li, M.; Lin, Y.; Jiang, Y.; Lan, L.,** 2014: Cells susceptible to epithelial-mesenchymal transition are enriched in stem-like side population cells from prostate cancer. *Oncology Reports.*, **31**, 874–884.
- MA, G.; JM, F.; RS, K.,** 2007: What is the role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer? *BJU international.*, **99**.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Man, Y. G.; Stojadinovic, A.; Mason, J.; Avital, I.; Bilchik, A.; Bruecher, B.; Protic, M.; Nissan, A.; Izadjoo, M.; Zhang, X.; Jewett, A.,** 2013: Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: Existing theories. *Journal of Cancer.*, **4**, 84–95.
- Markowski, M. C.; Bowen, C.; Gelmann, E. P.,** 2008: Inflammatory cytokines induce phosphorylation and ubiquitination of prostate suppressor protein NKX3.1. *Cancer research.*, **68**, 6896–6901.
- Massagué, J.; Gomis, R. R.,** 2006, May 22: The logic of TGF β signaling. *FEBS Letters.*
- Mateo, J.; De Bono, J. S.; Fizazi, K.; Saad, F.; Shore, N.; Sandhu, S.; Chi, K. N.; Agarwal, N.; Olmos, D.; Thiery-Vuillemin, A.; Özgüroğlu, M.; Mehra, N.; Matsubara, N.; Young Joun, J.; Padua, C.; Korbenfeld, E.; Kang, J.; Marshall, H.; Lai, Z. et al.,** 2024: Olaparib for the Treatment of Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer and Alterations in BRCA1 and/or BRCA2 in the PROfound Trial. *Journal of Clinical Oncology.*, **42**, 571–583.
- Menche, N.; Munk, K.; Renz-Polster, H.; Prudhomme, C.; Raichle, G.,** (n.d.) Biologie, anatomie, physiologie : ouvrage d’enseignement synthétique pour les métiers de la santé, 469.
- Merrill, D. C.,** 1988: Treatment of metastatic prostate cancer. Factors that influence treatment selection and methods to increase acceptance of orchiectomy. *Urology.*, **32**, 408–412.
- Mertowska, P.; Smolak, K.; Mertowski, S.; Grywalska, E.,** 2023, June 1: Immunomodulatory Role of Interferons in Viral and Bacterial Infections. *International Journal of Molecular Sciences.*
- Milenkovic, V. M.; Stanton, E. H.; Nothdurfter, C.; Rupprecht, R.; Wetzel, C. H.,** 2019: The role of chemokines in the pathophysiology of major depressive disorder. *International Journal of Molecular Sciences.*, **20**, 1–17.
- Mohseny, A. B.; Hogendoorn, P. C. W.,** 2011, March 1: Concise review: Mesenchymal tumors: When stem cells go mad. *Stem Cells.*
- Moltzahn, F.; Thalmann, G. N.,** 2013: Cancer stem cells in prostate cancer. *Translational Andrology and Urology.*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Morrison, W. B.**, 2012, January 1: Inflammation and cancer: A comparative view. *Journal of Veterinary Internal Medicine*.
- Nader, R.; El Amm, J.; Aragon-Ching, J.**, 2018, May 1: Role of chemotherapy in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*.
- Nauseef, J. T.; Henry, M. D.**, 2011: Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle? *Nature reviews. Urology.*, **8**, 428–439.
- Nelson, C. J.; Lee, J. S.; Gamboa, M. C.; Roth, A. J.**, 2008: Cognitive effects of hormone therapy in men with prostate cancer: A review. *Cancer.*, **113**, 1097–1106.
- Nieto, M. A.; Cano, A.**, 2012: The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Seminars in cancer biology.*, **22**, 361–368.
- Nissinen, L.; Kähäri, V. M.**, 2014, August 1: Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*.
- O'Donnell, A.; Judson, I.; Dowsett, M.; Raynaud, F.; Dearnaley, D.; Mason, M.; Harland, S.; Robbins, A.; Halbert, G.; Nutley, B.; Jarman, M.**, 2004: Hormonal impact of the 17 α -hydroxylase/C17,20-lyase inhibitor abiraterone acetate (CB7630) in patients with prostate cancer. *British Journal of Cancer.*, **90**, 2317–2325.
- Olumi, A.; Grossfeld, G.; Hayward, S.; Carroll, P.; Cunha, G.; Hein, P.; Tlsty, T.**, 2000: Carcinoma-associated fibroblasts stimulate tumor progression of initiated human epithelium. *Breast Cancer Research.*, **2**.
- Opal, S. M.; DePalo, V. A.**, 2000: Anti-inflammatory cytokines. *Chest.*, **117**, 1162–1172.
- Osorio, L. A.; Farfán, N. M.; Castellón, E. A.; Contreras, H. R.**, 2016: SNAIL transcription factor increases the motility and invasive capacity of prostate cancer cells. *Molecular medicine reports.*, **13**, 778–786.
- Ostrand-Rosenberg, S.; Sinha, P.**, 2009: Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *The Journal of Immunology.*, **182**, 4499–4506.
- Osuchowski, M.; Bartusik-Aebisher, D.; Osuchowski, F.; Aebisher, D.**, 2021: Photodynamic therapy for prostate cancer – A narrative review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.*, **33**, 102158.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pagès, F.; Galon, J.; Dieu-Nosjean, M. C.; Tartour, E.; Sautès-Fridman, C.; Fridman, W. H.**, 2010, November 30: Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*.
- Peter, Madonna R., et al.** "Distinct DNA methylation patterns associated with treatment resistance in metastatic castration resistant prostate cancer." *Scientific Reports* 11.1 (2021): 6630.
- Planche, A.; Bacac, M.; Provero, P.; Fusco, C.; Delorenzi, M.; Stehle, J. C.; Stamenkovic, I.**, 2011: Identification of prognostic molecular features in the reactive stroma of human breast and prostate cancer. *PLoS ONE.*, 6.
- Plaskon, L. A.; Penson, D. F.; Vaughan, T. L.; Stanfordz, J. L.**, 2003: Cigarette smoking and risk of prostate cancer in middle-aged men. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.*, 12, 604–609.
- Preisser, F.; Cooperberg, M. R.; Crook, J.; Feng, F.; Graefen, M.; Karakiewicz, P. I.; Klotz, L.; Montironi, R.; Nguyen, P. L.; D’Amico, A. V.**, 2020, June 1: Intermediate-risk Prostate Cancer: Stratification and Management. *European urology oncology*.
- Punchard, N. A.; Whelan, C. J.; Adcock, I.**, 2004, September 27: The Journal of Inflammation. *Journal of Inflammation*.
- Quezada, S. A.; Peggs, K. S.; Simpson, T. R.; Allison, J. P.**, 2011: Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunological Reviews.*, 241, 104–118.
- Radisky, D. C.**, 2005: Epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science*.
- Raja, T.; Sud, R.; Addla, S.; Sarkar, K. K.; Sridhar, P. S.; Talreja, V.; Jain, M.; Patil, K.**, 2022, March 1: Gonadotropin-releasing hormone agonists in prostate cancer: A comparative review of efficacy and safety. *Indian Journal of Cancer*.
- Rasmussen, M., Fredsøe, J., Salachan, P.V. et al.** Stroma-specific gene expression signature identifies prostate cancer subtype with high recurrence risk. *npj Precis. Onc.* 8, 48 (2024).
- Reed, J. C.**, 1999: Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Current Opinion in Oncology*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rennebeck, G.; Martelli, M.; Kyprianou, N.**, 2005: Anoikis and survival connections in the tumor microenvironment: Is there a role in prostate cancer metastasis? *Cancer Research.*, **65**, 11230–11235.
- Rohleder, N.**, 2019, July 1: Stress and inflammation – The need to address the gap in the transition between acute and chronic stress effects. *Psychoneuroendocrinology*.
- Sarkar, D.; Jain, P.; Gupta, P.; Pal, D. K.**, 2022: Correlation of digital rectal examination and serum prostate-specific antigen levels for detection of prostate cancer: Retrospective analysis results from a tertiary care urology center. *Journal of Cancer Research and Therapeutics.*, **18**, 1646–1650.
- Sartor, O.; de Bono, J. S.**, 2018: Metastatic Prostate Cancer. (Longo, D. L., Ed.) *The New England journal of medicine.*, **378**, 645–657.
- Satoh, K.; Hamada, S.; Kimura, K.; Kanno, A.; Hirota, M.; Umino, J.; Fujibuchi, W.; Masamune, A.; Tanaka, N.; Miura, K.; Egawa, S.; Motoi, F.; Unno, M.; Vonderhaar, B. K.; Shimosegawa, T.**, 2008: Up-regulation of MSX2 enhances the malignant phenotype and is associated with twist 1 expression in human pancreatic cancer cells. *The American journal of pathology.*, **172**, 926–939.
- Savas, I. N.; Ozturk, A.; Kavas, M.; Bulut, I.; Alparslan, S.; Eroglu, S. A.; Baytemir, C. A.; Kolay, M.; Coskun, A.**, 2021: IGFBP-4: A promising biomarker for lung cancer. *Journal of medical biochemistry.*, **40**, 237–244.
- Saydullaeva, I.; Butuner, B. D.; Korkmaz, K. S.**, 2023: NKX3.1 Expression Contributes to Epithelial-Mesenchymal Transition of Prostate Cancer Cells. *ACS Omega.*, **8**, 32580–32592.
- Scanlon, C. S.; Van Tubergen, E. A.; Inglehart, R. C.; D'Silva, N. J.**, 2013: Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Journal of Dental Research.*, **92**, 114–121.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Scher, H. I.; Halabi, S.; Tannock, I.; Morris, M.; Sternberg, C. N.; Carducci, M. A.; Eisenberger, M. A.; Higano, C.; Bubley, G. J.; Dreicer, R.; Petrylak, D.; Kantoff, P.; Basch, E.; Kelly, W. K.; Figg, W. D.; Small, E. J.; Beer, T. M.; Wilding, G.; Martin, A. et al.,** 2008: Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: Recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. *Journal of Clinical Oncology.*, **26**, 1148–1159.
- Shah, S. H.; Gupta, A. K.,** 2020: Protection of the Rectum during Prostate Radiation. *Seminars in Interventional Radiology.*, **37**, 324–329.
- Shancheng Ren, Gong-Hong Wei, Dongbing Liu et al.,** 2018: Whole-genome and Transcriptome Sequencing of Prostate Cancer Identify New Genetic Alterations Driving Disease Progression, *European Urology*, Volume 73, Issue 3, 322-339.
- Shen, M. M.; Abate-Shen, C.,** 2003: Roles of the Nkx3.1 Homeobox Gene in Prostate Organogenesis and Carcinogenesis. *Developmental Dynamics.*, **228**, 767–778.
- Shepherd, D.; Keetch, D. W.; Humphrey, P. A.; Smith, D. S.; Stahl, D.,** 1996: Repeat biopsy strategy in men with isolated prostatic intraepithelial neoplasia on prostate needle biopsy. *The Journal of urology.*, **156**, 460–462.
- Shill, D. K.; Roobol, M. J.; Ehdaie, B.; Vickers, A. J.; Carlsson, S. V.,** 2021: Active surveillance for prostate cancer. *Translational Andrology and Urology.*, **10**, 2809819–2802819.
- Simard, J.; Dumont, M.; Soucy, P.; Labrie, F.,** 2002: Perspective: Prostate Cancer Susceptibility Genes. *Endocrinology.*, **143**, 2029–2040.
- Singh, N.; Baby, D.; Rajguru, J.; Patil, P.; Thakkannavar, S.; Pujari, V.,** 2019: Inflammation and Cancer. *Annals of African Medicine.*, **18**, 121.
- Slingluff, C. L.,** 2011: The present and future of peptide vaccines for cancer: single or multiple, long or short, alone or in combination? *Cancer journal (Sudbury, Mass.).*, **17**, 343–350.
- Smyth, M. J.; Dunn, G. P.; Schreiber, R. D.,** 2006, January 1: Cancer Immunosurveillance and Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development and Shaping Tumor Immunogenicity. *Advances in Immunology.*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Soleymani, L.; Zarrabi, A.; Hashemi, F.; Hashemi, F.; Zabolian, A.; Banihashemi, S. M.; Moghadam, S. S.; Hushmandi, K.; Samarghandian, S.; Ashrafizadeh, M.; Khan, H.,** 2021: Role of ZEB Family Members in Proliferation, Metastasis, and Chemoresistance of Prostate Cancer Cells: Revealing Signaling Networks. *Current Cancer Drug Targets.*, **21**, 749–767.
- Sondel, P. M.; Alderson, K. L.,** 2011: Clinical cancer therapy by NK cells via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.*
- Stallone, G.; Cormio, L.; Netti, G. S.; Infante, B.; Selvaggio, O.; Di Fino, G.; Ranieri, E.; Bruno, F.; Prattichizzo, C.; Sanguedolce, F.; Tortorella, S.; Bufo, P.; Grandaliano, G.; Carrieri, G.,** 2014: Pentraxin 3: A novel biomarker for predicting progression from prostatic inflammation to prostate cancer. *Cancer Research.*, **74**, 4230–4238.
- Sternberg, C. N.; Fizazi, K.; Saad, F.; Shore, N. D.; De Giorgi, U.; Penson, D. F.; Ferreira, U.; Efstathiou, E.; Madziarska, K.; Kolinsky, M. P.; Cubero, D. I. G.; Noerby, B.; Zohren, F.; Lin, X.; Modelska, K.; Sugg, J.; Steinberg, J.; Hussain, M.,** 2020: Enzalutamide and Survival in Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England journal of medicine.*, **382**, 2197–2206.
- Strauss, D. C.; Thomas, J. M.,** 2010, August 1: Transmission of donor melanoma by organ transplantation. *The Lancet Oncology.*
- Sudo, H.; Tsuji, A. B.; Sugyo, A.; Abe, M.; Hino, O.; Saga, T.,** 2013: AHNK is highly expressed and plays a key role in cell migration and invasion in mesothelioma.
- Suzuki, K.,** 2019: Chronic inflammation as an immunological abnormality and effectiveness of exercise. *Biomolecules.*, **9**.
- Tam, W. L.; Weinberg, R. A.,** 2013, November 7: The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature Medicine.*
- Tan, K.; Goldstein, D.; Crowe, P.; Yang, J. L.,** 2013: Uncovering a key to the process of metastasis in human cancers: A review of critical regulators of anoikis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.*, **139**, 1795–1805.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T.**, 2014: Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.*, **6**.
- Taylor, R.; Risbridger, G.**, 2008: Prostatic Tumor Stroma: A Key Player in Cancer Progression. *Current Cancer Drug Targets.*, **8**, 490–497.
- Tecchio, C.; Micheletti, A.; Cassatella, M. A.**, 2014, October 21: Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. *Frontiers in Immunology*.
- Thakur, A.; Roy, A.; Ghosh, A.; Chhabra, M.; Banerjee, S.**, 2018, May 1: Abiraterone acetate in the treatment of prostate cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.
- Thompson, I. M.; Pauler, D. K.; Goodman, P. J.; Tangen, C. M.; Lucia, M. S.; Parnes, H. L.; Minasian, L. M.; Ford, L. G.; Lippman, S. M.; Crawford, E. D.; Crowley, J. J.; Coltman, C. A.**, 2004: Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter. *New England Journal of Medicine.*, **350**, 2239–2246.
- Thuault, S.; Tan, E. J.; Peinado, H.; Cano, A.; Heldin, C. H.; Moustakas, A.**, 2008: HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry.*, **283**, 33437–33446.
- Toivanen, R.; Shen, M. M.**, 2017: Prostate organogenesis: Tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development (Cambridge).*, **144**, 1382–1398.
- Urabe, F.; Kimura, S.; Yamamoto, S.; Tashiro, K.; Kimura, T.; Shin Egawa, •**, 2021: Impact of family history on oncological outcomes in primary therapy for localized prostate cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases.*, **24**, 638–646.
- Usman, S.; Waseem, N. H.; Nguyen, T. K. N.; Mohsin, S.; Jamal, A.; Teh, M. T.; Waseem, A.**, 2021, October 1: Vimentin is at the heart of epithelial mesenchymal transition (Emt) mediated metastasis. *Cancers*.
- Van Den Broek, M. F.; Kägi, D.; Ossendorp, F.; Toes, R.; Vamvakas, S.; Lutz, W. K.; Melief, C. J. M.; Zinkernagel, R. M.; Hengartner, H.**, 1996: Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine.*, **184**, 1781–1790.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Verma, S.; Rajesh, A.**, 2011: A clinically relevant approach to imaging prostate cancer: Review. *American Journal of Roentgenology.*, **196**, 1–10.
- Ye Z, Bing A, Zhao S, Yi S, Zhan X.** Comprehensive analysis of spliceosome genes and their mutants across 27 cancer types in 9070 patients: clinically relevant outcomes in the context of 3P medicine. *EPMA J.* 2022 May 10;13(2):335-350
- Wang, L.; Lu, B.; He, M.; Wang, Y.; Wang, Z.; Du, L.**, 2022a: Prostate Cancer Incidence and Mortality: Global Status and Temporal Trends in 89 Countries From 2000 to 2019. *Frontiers in Public Health.*, **10**.
- Wang, Y.; Chen, F.; Ye, L.; Zirkin, B.; Chen, H.**, 2017: Steroidogenesis in leydig cells: Effects of aging and environmental factors. *Reproduction.*, **154**, R111–R122.
- Wang, Y.; Wang, Y.; Liu, R.; Wang, C.; Luo, Y.; Chen, L.; He, Y.; Zhu, K.; Guo, H.; Zhang, Z.; Luo, J.**, 2022b: CAV2 promotes the invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas by regulating S100 proteins. *Cell Death Discovery* 2022 8:1., **8**, 1–11.
- Wang, Z.; Li, Y.; Wang, Y.; Wu, D.; Lau, A. H. Y.; Zhao, P.; Zou, C.; Dai, Y.; Chan, F. L.**, 2020: Targeting prostate cancer stem-like cells by an immunotherapeutic platform based on immunogenic peptide-sensitized dendritic cells-cytokine-induced killer cells. *Stem Cell Research and Therapy.*, **11**, 1–15.
- Weigelin, B.; Krause, M.; Friedl, P.**, 2011, July 1: Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment. *Immunology Letters*.
- Weis, S. M.; Cheres, D. A.**, 2011, November: Tumor angiogenesis: Molecular pathways and therapeutic targets. *Nature Medicine*.
- Wever, E. M.; Draisma, G.; Heijnsdijk, E. A. M.; Roobol, M. J.; Boer, R.; Otto, S. J.; De Koning, H. J.**, 2010: Prostate-specific antigen screening in the United States vs in the European randomized study of screening for prostate cancer-Rotterdam. *Journal of the National Cancer Institute.*, **102**, 352–355.
- Yamada, K. M.; Kennedy, D. W.**, 1979: Fibroblast cellular and plasma fibronectins are similar but not identical. *Journal of Cell Biology.*, **80**, 492–498.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yazawa, T.; Sato, T.; Nemoto, T.; Nagata, S.; Imamichi, Y.; Kitano, T.; Sekiguchi, T.; Uwada, J.; Islam, M. S.; Mikami, D.; Nakajima, I.; Takahashi, S.; Khan, M. R. I.; Suzuki, N.; Umezawa, A.; Ida, T., 2021:** 11-Ketotestosterone is a major androgen produced in porcine adrenal glands and testes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.*, **210**, 105847.
- Yuen, H. F.; Chua, C. W.; Chan, Y. P.; Wong, Y. C.; Wang, X.; Chan, K. W., 2007:** Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. *Histopathology.*, **50**, 648–658.
- Zhang, J. M.; An, J., 2007, March:** Cytokines, inflammation, and pain. *International Anesthesiology Clinics.*
- Zhao, B.; Huo, W.; Yu, X.; Shi, X.; Lv, L.; Yang, Y.; Kang, J.; Li, S.; Wu, H., 2023:** USP13 promotes breast cancer metastasis through FBXL14-induced Twist1 ubiquitination. *Cellular Oncology.*, **46**, 717–733.
- Zhao, X.; Bausano, B.; Pike, B. R.; Newcomb-Fernandez, J. K.; Wang, K. K. W.; Shohami, E.; Ringger, N. C.; Deford, S. M.; Anderson, D. K.; Hayes, R. L., 2001:** TNF- α stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. *Journal of Neuroscience Research.*, **64**, 121–131.
- Zhao, Z.; Zheng, L.; Chen, W.; Weng, W.; Song, J.; Ji, J., 2019, November 28:** Delivery strategies of cancer immunotherapy: Recent advances and future perspectives. *Journal of Hematology and Oncology.*
- Zheng, H.; Kang, Y., 2014:** Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene.*, **33**, 1755–1763.
- Zheng, S. L.; Liu, W.; Wiklund, F.; Dimitrov, L.; Bälter, K.; Sun, J.; Adami, H. O.; Johansson, J. E.; Sun, J.; Chang, B.; Loza, M.; Turner, A. R.; Bleecker, E. R.; Meyers, D. A.; Carpten, J. D.; Duggan, D.; Isaacs, W. B.; Xu, J.; Grönberg, H., 2006:** A comprehensive association study for genes in inflammation pathway provides support for their roles in prostate cancer risk in the CAPS study. *Prostate.*, **66**, 1556–1564.
- Zhu, X.; Shi, Z.; Gao, S.; Wang, X.; Wang, P.; Kang, C.; Zhao, F.; Hou, P., 2021:** Prednisone reduction for metastatic castration-resistant prostate cancer with recurrent pulmonary tuberculosis: Case report. *Medicine (United States).*, **100**, E25584.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zielinski, C. E.**, 2017: Human T cell immune surveillance: Phenotypic, functional and migratory heterogeneity for tailored immune responses. *Immunology Letters.*, **190**, 125–129.
- Zorlu, F.; Divrik, R. T.; Eser, S.; Yorukoglu, K.**, 2014: Prostate Cancer Incidence in Turkey: An Epidemiological Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.*, **15**, 9125–9130.



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmamın şekillenmesinde ve sonuçlandırılmasında hiçbir desteğini esirgemeyen, sorgulamanın ne kadar kıymetli olduğunu ve öğrenilen bilginin nasıl kullanılıp ortaya bir ürün koyulabileceğini bana öğreten, bu süreçte kendimi geliştirmemi sağlayan ve en önemlisi, benim için yalnızca bir danışman niteliğinde olmayan, hayatıma sihirli dokunuşlar yapmış, idealist bir öğretim üyesi olan sevgili tez danışmanım Doç. Dr. Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER'e teşekkürü bir borç bilirim. Tez izleme toplantılarımıza değerli vakitlerinden ayırıp katılan ve önerilerinden faydalandığım değerli hocalarım, Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ ve Prof. Dr. Ezgi TURUNÇ ÖZOĞLU hocalarıma çok teşekkür ediyorum. ÖNAP projemizin RNA sekanslama çalışmalarında ve analizinde birlikte çalıştığımız, biyoinformatik alanında kendisinden pek çok şey öğrendiğim Dr. Öğr. Ü. Yasin KAYMAZ ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım laboratuvar çalışanı Elif DUYSMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu sürece birlikte başladığımız sevgili dostum Gülseren ÖZDUMAN'a teşekkür ediyorum. Kemal Sami Hocam'ın kanser biyolojisi laboratuvarında başladığım araştırma yolculuğuma Bilge Hocam ile Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Bölümü'nde devam ettim. Laboratuvar imkanlarını bizlere sunduğu için emekli Prof. Dr. Zeki TOPÇU'ya teşekkür ediyorum. Yeni ortamıma alışma sürecimde hep yanımda olan, beraber çokça vakit geçirdiğimiz ve sevdiğim arkadaşım Melike ÖZDER'e çok teşekkür ediyorum. Laboratuvarda çalıştığı sırada talihsiz bir şekilde rahatsızlanan ve kısa süre sonra kaybettiğimiz Selen İSAR'ı sevgiyle anıyorum. Zamanla Farmasötik Biyoteknoloji ailemiz genişledi ve çok değerli insanlar tanıdım. Ailemizden daha çok bir arada olduğumuz iş ortamımızda huzur ve mutluluk içerisinde çalışmamı sağlayan Farmasötik Biyoteknoloji ABD hocalarımıza çok teşekkür ediyorum. Aramıza sonradan katılan ve kısa zaman içerisinde kaynaştığımız sevgili arkadaşlarım; sohbetinden her zaman keyif aldığım Ayşenur KAYMAZ'a, eğlenceli ve pozitif kişiliği ile kendini sevdiren Deniz ONAN'a, zihni sinir sorularıyla farkını ortaya koyan, uzak da olsak her zaman yanımda olan laotongum Fersu Gül Asya ÇALIŞIR'a, neşeli tavırları ve tatlı Türkçesi ile beni çok güldüren Shahrzad Mirbaha'ya, anlayışlı bir dost olan Seher TARKAVAN'a, pek çok el işinde becerikli olan Sıla ÖZDEMİR'e, yağmurlu günlerde SDS-page yapan Çağla DİŞEL'e, hayatın tüm zorluklarına rağmen bilim aşkıyla vazgeçmeyen ve her zaman yanımda olan Vedat GÜNDOĞDU'ya, titiz çalışmaları ve beyefendi tavırlarıyla kendisini sevdiren, aramıza en son katılan Süleyman ARZIMAN'a çok teşekkür ediyorum. Türkiye ziyareti sırasında bana Almanya'dan kocaman bir langırt standı getirmeye üşenmeyen Gülevin

TAKIR’a teþekkür ediyorum. Bir doktora dersinde tanıştığım ve dost olduğum Beste Yurdacan YAŞAR’a ve bu dostluğu pekiştiren Doç. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ’a da ayrıca teþekkür ediyorum.

7-9 Eylül 2023 tarihlerinde Mokad’ın düzenlediği kongreye katılmak üzere İstanbul’a gittiğimde beni evinde ağırlayan ve kısa süre içerisinde büyük İstanbul turu attıran Fersu’nun çılgın teyzesi Hatice POLAT’a çok teþekkür ederim. Kısa bir dönem, projesinde çalıştığım Dr. Öğr. Ü. Uğur KARAGÖZ’e teþekkür ediyorum. Deney uygulamaları sürecimde laboratuvar imkanlarını sunan E.Ü. FABAL’a ve oradaki tüm değerli çalışanlara teþekkürlerimi sunuyorum. Destek ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen ve beni her zaman her konuda yüreklendiren, her derdime katlanan, adeta benimle birlikte doktora yapan başta canım abim Mustafa İŞEL, canım ablam Emel İŞEL AKBAL ve canım ablam Hatice İŞEL AKDÜLGER olmak üzere biricik aileme teþekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamı, öğretmen okulunu kazanan fakat dedesinin baskısıyla bu imkanı elinden alınıp genç yaşta evlendirilen, gerçekleştiremediği hayallerini çocuklarında yaşamak üzere her zaman eğitimimize destek veren, 4 çocuğunu da üniversite mezunu yapmış olan biricik annem Necla İŞEL’e armağan ediyorum.

Bu tez çalışması, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje no: 23063, Proje no: 23389) tarafından desteklenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı: Elif İŞEL

Uyruk: Türkiye Cumhuriyeti

Eğitim

Doktora (2018-2024)

Biyoteknoloji, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Yüksek Lisans (2015-2018)

Biyoteknoloji Bölümü, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Lisans (2009-2014)

Biyoloji Bölümü (Moleküler Biyoloji ve Genetik Ağırlıklı), Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Araştırma Deneyimleri

Doktora araştırması (2018-2024)

Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ABD., Farmasötik Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı, Doç. Dr. Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER;

Metastatik prostat kanseri gelişiminde enflamasyon ilişkili epitelyal mezenkimal geçiş mekanizmasının araştırılması

Yüksek Lisans Araştırması (2015-2018)

Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ABD., Kanser Biyolojisi Laboratuvarı, Doç. Dr. Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER, Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ;

OGG1'in Doğasal Formunun ve Ser326Cys Polimorfik Varyantının AR ve NKX3.1 ile Etkileşimi

Lisans Araştırması (2013-2014)

Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Biyoloji Bölümü, Prof. Dr. Ataç UZEL;

Mitokondriyal Yaşlanma Teorisi

Yaz stajı (2013)

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye

Moleküler Biyoloji ve genetik, Maya Laboratuvarı, Prof. Dr. Ahmet KOÇ;

D. melanogaster Organizmalarında Mitokondriyal Yaşlanmanın Araştırılması, Bor Metabolizması ve Redoks Biyolojisi

Laboratuvar Deneyimleri

Memeli ve Bakteri Hücre Kültürü, Hücre Ekstraksiyonu, DNA, RNA ve Protein izolasyonu SDS-Page, Agaroz Jel Elektrophorezi, Western Blot, İmmünfloresan İşaretleme Yöntemleri, İmmünopresipitasyon ve GST Pull Down, Konvensiyonel PCR ve RT-PCR Analizleri.

Yayınlar

- ✓ Butuner BD., Hasbal NE., İşel E., Roggenbuck D., Korkmaz KS.; Androgen receptor contributes to repairing DNA damage induced by inflammation and oxidative stress in prostate cancer; Turkish Journal of Biology, 2023 Oct.
- ✓ Karagöz U., Bahadır R.K., İşel E., Kantarcı A.G., Uludağ H; Evaluation of a Synthetic PEI-based Polymeric Vector for ING4 Gene Delivery to MCF-7 Breast Cancer Cells; Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 2023 Dec.

- ✓ Isel E., and Butuner BD.; Interaction of OGG1 with NKX3.1 due to oxidative DNA damage; Journal of Research in Pharmacy, 2020 Feb.
- ✓ Isel E., Butuner BD., Korkmaz KS.; OGG1 Does not Interact with NKX3.1 and AR to Repair 8-OHdG Base Damage in LNCaP Cells; MDPI, 2018 Dec.

Başarılar ve Sertifikalar

- ✓ Hücre Ölümü ve Araştırma Derneği, Temel Hücre Kültürü ve Hücre Ölümü Analiz Yöntemleri Uygulamalı Kursu, Katılım ve Görevli Sertifikası, İzmir, 2017
- ✓ Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Laboratuvar Uygulamalarında Gönüllü Asistanlık Sertifikası, İzmir, 2017
- ✓ Gastroenterolojide Uygulamalı Temel Hücre Kursu Katılım Sertifikası, İzmir, 2018
- ✓ Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü BD Akan Hücre Ölçer Çalıştayı Katılım Sertifikası, İzmir, 2018
- ✓ İkinci Uluslararası Hücre Ölümü Araştırma Kongresi, Poster Sunumu, İzmir, 2018
- ✓ Web od Science Core Collection Katılım Sertifikası, İzmir, 2020
- ✓ Uluslararası Farmasötik Biyoteknoloji Sempozyumu Katılım Sertifikası, İzmir, 2021
- ✓ Dördüncü Uluslararası Hücre Ölümü Araştırma Kongresi, Poster Sunumu, İzmir, 2022
- ✓ E.Ü Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (EGEHAYMER), Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, İzmir, 2022
- ✓ Üçüncü Uluslararası Multidisipliner Kanser Araştırmaları Kongresi, Poster Sunumu ve Poster Birincilik Ödülü, İstanbul, 2023

Aldığı Burslar

- ✓ 100/2000 YÖK Doktora Bursu, 2018-2022 (4 sene)
- ✓ Tübitak 3501 Projesi, Proje No: 221S212, 2022-2023 (11 ay)
- ✓ Tübitak 1001 Projesi, Proje No: 221Z202, 2024 (4 ay)

Doktora Tez Çalışmaları Desteği

- ✓ E.Ü. BAP Dr. Tez Projesi, Proje No: 23063, 2021-2024
- ✓ E.Ü. BAP ÖNAP Projesi, Proje No: 23389, 2022-2024

