

EGE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROSTAT KANSERİ GELİŞİMİNDE
İNFLAMASYON ARACILIKLI MİGRASYONUN
PROTEİN PROFİLİNİN TANIMLANMASI**

Iroda SAYDULLAEVA

Danışman: Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

Biyomühendislik AB
Biyomühendislik Doktora Programı

İzmir

2020



DOKTORA TEZ SAVUNMA SINAVI JÜRİ TUTANAĞI (ONLINE)

Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ Danışmanlığında İroda SAYDULLAEVA tarafından hazırlanan “Prostat Kanseri Gelişiminde İnflamasyon Aracılıklı Migrasyonun Protein Profilinin Tanımlanması” adlı doktora tezini değerlendirmek ve adayı tez savunmasına tabi tutmak üzere, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'na oluşturulan jüri 29/06/2020 tarihinde saat 10:00'da ZOOM online platformu aracılığı ile Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ Başkanlığında toplanmıştır.

Jüri üyeleri tarafından hazırlanan ve ekte sunulan kişisel raporlar ayrıntılı şekilde tartışılmış, intihal yazılım programında belirlenen benzerlik oranları incelenmiş ve aday tez savunma sınavına alınmıştır. Yapılan sınavın sonucunda ve değerlendirmede tez oybirliği/oyçokluğu ile **başarılı bulunarak kabul edilmiştir.**

Jüri Başkanı (*)

Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

Üye

Doç. Dr. Buket KOSOVA

Üye

Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY

Üye

Prof. Dr. Şernin GENÇ

Üye

Prof. Dr. Bünyamin AKGÜL

* Lisansüstü tez savunma sınavlarında danışman öğretim üyesi jüri başkanı olabileceği gibi jürinin kendi arasında seçeceği bir üye de başkan olabilir.



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Prostat kanseri gelişiminde inflamasyon aracılıklı migrasyonun protein profilinin tanımlanması” 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.

29/06/2020

Iroda SAYDULLAEVA

ÖZET**PROSTAT KANSERİ GELİŞİMİNDE İNFLAMASYON
ARACILIKLI MİGRASYONUN PROTEİN PROFİLİNİN
TANIMLANMASI**

SAYDULLAEVA, Iroda

Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

Haziran 2020. 179 sayfa

Proteinler, kanserle ilişkili biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynarlar. Proteinlerin değişmiş ekspresyon seviyeleri, kritik hücreyel yolakları ve etkileşimli ağları regülasyonunu etkileyebilirler. İnflamasyonla ilişkili diferansiyel olarak eksprese edilen proteinler, PKa hücre göçünü ve istilasını teşvik etmede önemli bir rol oynar, ama mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Bu proteinlerin proteomik analizi, metastaz mekanizmasını açıklığa kavuşturmaya, terapötik hedefleri keşfetmeye ve protein varyasyonları yoluyla tanı için biyobelirteçler üretmeye yardımcı olabilir.

Bu tez çalışması kapsamında inflamatuvar mikroçevrede metastatik özellik kazanan prostat kanseri hücrelerindeki fonksiyonel değişiklikleri karakterize etmek için protein profillemeye analizi gerçekleştirildi ve bu süreçte prostat kanserinde tümör baskılayıcı fonksiyona sahip NKX3.1 geninin önemi araştırıldı.

Anahtar kelimeler: Prostat kanseri, inflamasyon, invazyon, metastaz, NKX3.1, E-kaderin, vimentin.

ABSTRACT**PROTEIN PROFILING OF INFLAMMATION-MEDIATED
MIGRATION IN PROSTATE CANCER**

SAYDULLAEVA Iroda

Ph.D. in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ

June 2020 , 179 pages

Proteins play an essential role in the biological processes associated with cancer. Their altered expression levels can deregulate critical cellular pathways and interactive networks. Inflammation related differentially expressed proteins play an important role in promoting prostate cancer (PCa) cell migration and invasion, though the mechanism of action is not fully known. Proteomic analysis of these proteins could help elucidate the mechanism of metastasis, discover therapeutic targets, and generate biomarkers for diagnosis through protein variations.

In this study, protein profiling analysis was performed to characterize the functional changes in prostate cancer cells which acquired metastatic features in the inflammatory microenvironment and the importance of NKX3.1 gene with tumor suppressor function in prostate cancer was investigated.

Key words: Prostate cancer, inflammation, invasion, metastasis, NKX3.1, E-cadherin, vimentin

İÇİNDEKİLER

ÖZET	İ
ABSTRACT	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR	xiii
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Prostat Kanseri Gelişiminde İnflamasyonun Etkisi	3
2.1.1 Hücrenin Kaderini Değiştirmede İnflammatuar Tümör Mikroçevresinin Rolu	4
2.2. Tümör Gelişimi ve Migrasyonda İnflammatuar Sitokinlerin Rolu	5
2.2.1 Tümör Nekroz Faktörü (TNF- α).	6
2.2.2. İnterleukin 6 (IL-6).	8
2.2.3. Transforming Growth Factor (TGF- β)	8
2.2.4. İnterlökin-10 (IL-10)	9
2.2.5. İnflamasyonla İlişkili Tümör Büyümesi	11
2.3. NKX3.1'in Kararlılığının ve Fonksiyonunun Düzenlenmesi	12
2.3.1 NKX3.1'in Post-translasyonel Değişimi ve Kararlı Dönüşümü	15
2.3.2 İnflamasyonda NKX3.1'in Post-translational Düzenlenmesi	17
2.3.3 NKX3.1'in DNA Hasarı Varlığında Post-translational Olarak Düzenlenmesi	18
2.3.4 NKX3.1'in Kararlılık ve İşlevlerinin Yapısal Belirleyicileri	19
2.4 Kaderin Aracılıklı Hücre-Hücre Bağlantıları: Adezyon Yapısı ve Sinyalizasyon	21

2.4.1	E-kaderin Aracılıklı Hücre Adezyonunun Yapısı ve Dinamikleri	24
2.4.2	Kanserde Kaderinlerin Rolü	25
2.5	Vimentinin Kanser İle İlişkisi	26
2.5.1	Vimentinin Yapısı ve Regülasyonu	27
2.5.1.1	Vimentin Geni, Transaktivasyonu ve Epigenetik Modifikasyonu	27
2.5.1.2.	Vimentinin Fosforilasyonu	29
2.5.1.3.	Vimentinin Post-translasyonel Modifikasyonları	30
2.5.2	Hücre Sinyalizasyonunda Vimentinin Rolü	31
2.5.3	PKa’da Vimentinin Rolü	34
2.6	PKa Gelişiminde EMT’nin Rolü ve Mekanizması	34
2.6.1	PKa’da EMT’ye Yol Açan Sinyal Yolları	36
2.6.2	EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörleri	41
2.6.3	EMT'nin epigenetik olarak düzenlemesi	44
2.6.4	Kanser progresyonu ve metastaz ile ilişkili EMT sinyal yolları	44
3	GEREÇ ve YÖNTEM	51
3.1	Gereçler	51
3.1.1	Cihaz	51
3.1.2	Sarf Malzemeler	52
3.2	Yöntem	58
3.2.1	Hücrelerin bakımı ve pasajlanması	58
3.2.2	Hücre hatlarının dondurulması ve çözündürülmesi	59
3.2.3	Hücre sayımı	59
3.2.4	Makrofaj farklılaşması ve şartlandırılmış ortamın (CM-Conditioned Media) toplanması	60
3.2.5	Madde uygulamaları ve migrasyon deneyi	61
3.2.6	WST-Hücre proliferasyon deneyi	61
3.2.7	İmmünofloresan İşaretleme ve Mikroskopi	62
3.2.8	İmmünoblotlama (Western Blot) analizi	62
3.2.8.1	Protein izolasyonu	62

3.2.8.2	Protein miktarının belirlenmesi	63
3.2.8.3	Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması	63
3.2.8.4	Membrana transfer	64
3.2.8.5	Primer antikor ile işaretleme	64
3.2.8.6	Sekonder antikor ile işaretleme	65
3.2.8.7	Bantların görüntülenmesi	65
3.2.9	Subselüler fraksiyonlama deneyi	65
3.2.10	Reporter Gen analizi	66
3.2.11	shRNA lentiviral partiküller transdüksiyonu	68
3.2.12	NKX3.1 CRISPR KO plazmidin LNCaP hücrelerine transfeksiyonu	68
3.2.13	İmmünofloresan işaretleme (96 kuyulu hücre kültürü kabında)	69
3.2.14	Akış Sitometrisi Analizi	70
3.2.15	Crystal violet boyası ile koloni oluşturma sayımları	70
3.2.16	Nano-LC-MS/MS ile örneklerde proteinlerin belirlenmesi (IN SOLUTION DIGEST)	71
3.2.16.1	Numune Hazırlama, indirgeme ve alkilasyon, enzimatik reaksiyon	71
3.2.16.2	SPE (Katı Faz Ekstraksiyon) Sistemi 1cc veya 3cc Sep-pak	72
3.2.16.3	nLC-MS / MS analizleri ve sonuçları	73
3.2.17	Veri analizi	73
3.2.18	Protein verilerinin biyoinformatik analizi	73
4	BULGULAR	75
4.1	LNCaP Hücrelerinde CM Aracılıklı Migrasyonun Tetiklenmesi ve aracılığıyla Morfolojik Değişikliklerin Oluşturulması	75
4.2	İnflamasyon Aracılıklı Migrasyon Sonrasında Hücrelerin Proliferasyon Hızının Araştırılması	78
4.3	Reporter Gen ile Göç Eden Hücrelerde AR Transaktivasyonunun Araştırılması	82

4.4	LNCaP Hücrelerinde, İnflamasyon Varlığında EMT Geçişinin N-kaderin ve Vimentin Markerleri ile Kontrol Edilmesi	84
4.5	İnflamasyon Varlığında Vimentinin Fonksiyon Kazanması ve Hücre Morfolojisindeki Rolü	87
4.6	İnflamasyona Yanıt Olarak Göç Eden Hücrelerde Çoklu Antikor İşaretlemesi İle Protein Seviyelerinin Araştırılması	88
4.7	LNCaP Hücrelerinde NKX3.1 ifadesinin susturulması	92
4.8	İnflamasyon Varlığında NKX3.1 Fonksiyon Kaybının Hücre Göçüne Etkisinin Araştırılması	95
4.9	NKX3.1 KO LNCaP Hücrelerinde CM Uygulaması Sonucu Göç Eden Hücre Klonlarında Proliferasyon Düzeyindeki Değişimin Araştırılması	98
4.10	İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde Koloni Oluşumundaki Değişimin İzlenmesi	101
4.11	İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde AR Sinyalizasyonunun Araştırılması	104
4.12	İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde Migrasyon ve Hücre Döngüsünün HN1 ile İlişkisi	106
4.13	Göç Eden Hücrelerde EMT Fonksiyonunun Vimentin Aracılığı ile Tekrar Kontrol Edilmesi	107
4.14	Nano LC-MS/MS Analizi ve Protein Tanımlaması	108
4.15	Farklı İfade Edilen Proteinlerin Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi	110
4.15.1	Diferansiyel olarak eksprese edilen proteinlerin protein-protein etkileşim analizi.	116
4.16	Prostat Kanserinde Diferansiyel Olarak Eksprese Edilen Proteinlerin Ve TCGA Kohortunun cBioPortal Analizi	118
4.17	Perseus 1.6.6.0 Aracılığı İle Data Analizi	120
4.17.1	Principal komponent analizi (PCA)	123

4.17.2	Değişen protein değerinin Çoklu dağılım analizi ile değerlendirilmesi	124
5	TARTIŞMA	129
5.1	CM, LNCaP Hücrelerinde Migrasyonu Tetikler ve Hücrede Morfolojik Değişikliklere Neden Olur	130
5.2	İnflamasyon ile göç eden LNCaP hücrelerinde proliferasyon hızının yükselmesi	133
5.3	İnflamasyon Sonucu Göç Eden Hücrelerde AR Transaktivasyonunun Artması	134
5.4	İnflamatuvar Sitokinlerin LNCaP hücrelerinde EMT'yi Tetiklemesi ve Fizyolojik Değişimle	135
5.5	LNCaP Hücrelerinde NKX3.1 gen fonksiyonunun susturulması ve bu Hücrelerde Migrasyonun Tetiklenmesi	137
5.6	İnflamasyon Varlığında NKX3.1 ekspresyonunun Susturulması ile Artan Proliferasyon Hızı ve Koloni Oluşumu	139
5.7	İnflamasyon Varlığında AR Seviyesindeki Azalmanın Artan DNMTα ile İlişkisi	140
5.8	İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde β-katenin Seviyesinde Artış	141
5.9	İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde NKX3.1 Kaybına İle HN1 seviyesinde Artış	142
5.10	İnflamasyon Varlığında Göç Eden Hücrelerde Protein Profilinin Tanımlanması Aracılığı İle Aradaki Farkların Bulunması	143
5.11	Fonksiyonel Zenginleştirme Analiz Yöntemleri ile İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde Heterogenisitenin Belirlenmesi	144
5.12	İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde Ortak Eksprese Edilen Proteinlerin Birbiri İle İlişkisinin Biyoinformatik Analizi	146

5.13	Göç Eden Hücrelerdeki Proteinlerin log2 Değerine Göre Biyoportal Analizi	147
5.14	Perseus Yazılımı Kullanarak Göç Eden Hücre Örneklerine Ait Proteomik Verilerinin Çoklu Analizi	149
6	Sonuç	152
Kaynaklar Dizini		154
Teşekkürler		177
Özgeçmiş		178

ŞEKİLLER DİZİNİ

şekil		Sayfa
2.1	İnflamatuar tümör ilişkili makrofajların PKa gelişimindeki rolü.	3
2.2	Karsinogeneizde sitokinlerin rolünün şematik olarak gösterimi	11
2.3	E-Kaderin İlişkili Hücre-Hücre Adezyonu	23
2.4	Vimentinin kanserdeki rolü	27
2.5	Vimentin dimerinin (a) ve vimentin tetramerinin (b) moleküler yapısının şemaları	29
2.6	Vimentinin hücre sinyalindeki rolü	33
2.7	PKa'da EMT ile ilişkili düzenleyici mekanizmalar	35
3.1	<i>In vitro</i> inflammatuar mikroçevre modeli basamaklarının şematik gösterimi	60
3.2	Kemotaksi yaratılan durum ve kontrol çemberi.	61
4.1	Boyden çemberi ve yerleştirilen membran yapı	75
4.2	İnflamasyon ile uyarılan migrasyon deneyi sonucunda elde edilen LNCaP hücrelerinin ışık mikroskobu ile çekilmiş görüntüsü	76
4.3	Pasajlama Sürecinde Farklılık Gösteren Hücrelerin Hiyerarşisi	77
4.4	500 pg/ml TNFα içeren inflammatuar mikroçevrede metastatik özellik kazanarak membranı geçmiş olan LNCaP hücreleri protein ekspresyonundaki değişiklikler	78

4.5	CM uygulaması sonrasında metastatik değişim gösteren 12h.5(NA) hücre örneğinin, CM uyarısı yapılmayan kontrol hücrelerine karşı proliferasyon kapasitelerindeki değişiminin WST-1 yöntemi ile değerlendirilmesi	79
4.6	Farklı sürelerde 500 pg/ml TNF α içeren CM uygulaması sonrasında metastatik özellik kazanan hücrelerin, proliferasyon kapasitelerindeki değişiminin WST-1 yöntemi ile değerlendirilmesi	81
4.7	Subselüler fraksiyon deneyinde diferansiyel olarak ayrılmış protein fraksiyonlarının western blot görüntüsü	82
4.8	Migrasyona uğramış hücrelerde AR transaktivasyonu	83
4.9	CM uygulaması sonrası yapılan migrasyon deneyinde elde edilen LNCaP hücre klonlarda, N-kaderin ekspresyonunun artışı gösteren western blot görüntüsü	84
4.10	İnflamasyona yanıt olarak göç eden hücre serilerinde EMT markerlerinin kontrolü	85
4.11	İnflamatuvar mikroçevreye yanıt olarak migrasyon özelliğini kazanmış hücrelerde; β -katenin, E-kaderin ve artan vimentin protein ekspresyonlarının görüldüğü western blot görüntüsü	86
4.12	A. İnflamatuvar mikroçevreye yanıt olarak migrasyon özelliği kazanmış olan hücrelerde, kontrol hücrelerine kıyasla membranlarda β -katenin ve E-kaderin seviyelerinin azaldığını B. Vimentin ve N-kaderin seviyelerinin arttığını gösteren immunoflöresan mikroskobu görüntüleri	88
4.13	CM.6h hücrelerindeki proteinlerin fluorimetrik değerlerinin kantitatif olarak karşılaştırılması	90
4.14	12h.5(NA) hücrelerindeki proteinlerin fluorimetrik değerlerinin kantitatif olarak karşılaştırılması	91
4.15	NKX3.1 ekspresyonunun baskılanması ve zaman içerisinde geri kazanılması	93
4.16	NKX3.1 CRISPR KO plazmidinin yapısı	94

4.17	NKX3.1 CRISPR KO plazmidinin LNCaP hücrelerine transfeksiyonunu gösteren immünoflöresan mikroskobu görüntüsü	95
4.18	CM (TNF α 500 pg/ml) uygulaması sonrasında migrasyon özelliğini kazanmış NKX3.1-KO LNCaP hücreleri	96
4.19	A) 6 ve 12 saat ve B) 3 saat CM (TNF α 500 pg/ml) uygulaması sonrasında migrasyon özelliği kazanan NKX3.1 KO LNCaP hücre klonlarındaki morfolojik değişiklikler	97
4.20	Kontrol olarak kullanılan LNCaP hücrelerine nazaran CM uygulanmış örneklerde EMT evresindeki vimentin interfilamentinin hücre sitozolundaki lokalizasyonunu gösteren bitişik görüntü	98
4.21.	CM (TNF α 500 pg/ml) uygulaması sonrasında migrasyon özelliği kazanmış NKX3.1 KO LNCaP hücrelerindeki hücre döngüsü fazlarındaki değişim	100
4.22	İnflamatuar mikroçevrede migrasyon özelliği kazanmış, NKX3.1 baskılanmış PKa hücrelerinin 3, 6, 9, 12 gün sürelerle koloni oluşturma yeteneğinin gözlenmesi	101
4.23	Kontrol grubuna karşı NKX3.1 geni baskılanmış ve 3, 6, 12 saat ile CM uygulanması sonrasında migrasyon özelliği kazanan hücre klonlarında farklı boyutlardaki koloni miktarının değerlendirilmesi	102
4.24	Kontrol grubuna karşı migrasyon özelliği kazanmış hücre klonlarında farklı boyutlardaki koloni miktarının değerlendirilmesi	103
4.25	İnflamasyona bağlı göç eden hücre klonlarında AR ve DNMT3a protein ekspresyonunun western blot görüntüsü	105
4.26	İnflamasyon koşullarında göç eden hücrelerde AKT'ye bağlı AR sinyalizasyonunun kontrolü	105
4.27	İnflamasyona yanıt olarak göç eden hücrelerde HN1, PLK- 1, Aurora A ve β -aktin seviyelerinin araştırılması	106
4.28	İnflamasyon varlığında ortaya çıkan vimentin ekspresyonunun zamanla stabilite kazanması	107

4.29	Kontrol (mavi) hücrelerinde, inflamatuvar ortamda değişen (kırmızı) hücre klon örneklerinde eksprese edilen protein sayıları gösterilmektedir	109
4.30	Farklı ifade edilen proteinlerin başka kanserdeki mutasyonlar ile karşılaştırması	111
4.31	a) Splisozom oluşum yolu ve b) splisozom komplekslerinin içeriği.	113
4.32	PANTHER GO-Slim biyolojik işlem analizi	114
4.33	PANTHER yol analizi	115
4.34	Diferansiyel olarak eksprese edilen proteinlerin protein-protein etkileşimi ağ analizinin k-mean kümeleme sonrasında gruplandırılmış hali	117
4.35	Örnek grupların karşılaştırmaları arasında gözlenen ve farklılaşmış olarak yüksek eksprese edilen proteinleri gösteren Venn Diyagramı	120
4.36	Hiyerarşik kümeleme analizi. Tüm örnek gruplarında tanımlanan, diferansiyel olarak eksprese edilen proteinlerden (n = 1773) ısı haritası hiyerarşik kümelemesi	121
4.37	Hücre örneklerinin protein PSM değerine göre karşılaştırılması	122
4.38	İnflamasyon varlığında göç eden hücrelerin PCA analizi	123
4.39	Hücre grupları arasında karşılaştırmalı çoklu saçılım (scatter plot) grafiği. Belirli proteinlerin farklı grup karşılaştırmalarındaki yerini belirlemek amacıyla farklı renk ile işaretlenmiştir	125
4.40	İnflamasyon varlığında göç eden hücrelerdeki doğrusal pozitif ilişkiyi gösteren hiyerarşik ısı haritası	126

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge		
2.1.	NKX3.1'de Tanımlanan Post-Translasyonel Değişiklik Sitelerinin Listesi	14
2.2	Vimentin ile etkileşime giren moleküller ve olası fonksiyonları	31

2.3	PKa'da EMT İlerlemesine Sebep olan Tümör Mikroçevresindeki Çözünür Faktörler	39
3.1	Jel hazırlama tablosu	64
3.2	Transfeksiyon karışımının hazırlanışı	67
3.3	Protein örneklerinin kitle tayını için hazırlama aşamaları	71
4.1	n-LC MS/MS analizi sonrası hücre örneklerinde belirlenen proteinlerin miktarı	109
4.2	KEGG yolu verilerine göre kontrol hariç tüm hücre örneklerinde ortak eksprese edilen 99 proteinin taraması sonucu tespit edilen biyolojik yollar	112
4.3	TCGA verilerinde öneme sahip, prostat kanseri ile ilişkili genler ile örtüşen proteinler	119
4.4	Pearson değerine göre inflamasyon varlığında göç eden hücreler arasında pozitif doğrusal ilişki anlamlılığı	126

KISALTMALAR

ABT- Androjen baskılayıcı tedavi

AKT- RAC-alfa serin / treonin-protein kinaz

AP-1- Aktivatör protein 1

AR- Androjen reseptörünün

ATM-Ataxia Telangiectasia Mutated

Bcl-2- B hücre lenfoma 2 (B-cell lymphoma 2)

CAF - kansere bağlı fibroblast

cIAP-1- apoptoz protein-1'in hücrel inhibitörü (cellular inhibitor of apoptosis protein-1)

CKI - sikline bağımlı kinaz inhibitörü

CM - şartlandırılmış ortam

CRPC- Kastrasyona dirençli prostat kanseri

DDR- DNA hasar yanıtı (DNA damage response)

ECM - ekstraselüler matriks

EMT-epitelyal-mezenkimal tranzisyon

FADD- Fas-iliskili ölüm domeni (Fas-associated death domain)

FBS - fetal sığır serumu

FDR - yanlış keşif oranı

FGF -fibroblast büyüme faktörü

FOX - Forkhead box

GSK3 β - Glycogen synthase kinase 3 beta

HDAC1 -histon deasetilaz 1

Hh- Hedgehog

HIF-1 α -hipoksiyaya bağı faktör 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α)

IF-intermediate filament

IL6 -interlökin-6

IL8 -interlökin-8

JAK - Janus kinaz

JNK- Jun N-terminal kinaz

LEF - lenfoid güçlendirici faktör

LINE-1 - uzun serpiştirilmiş nükleer element-1' retrotransposonu (long interspersed nuclear element-1)

LOX - lizil oksidazın

LPS – lipopolisakarit

LRP - low-density lipoprotein receptor-related protein

MAD - mothers against dpp

MAPK - mitojen ile aktive olan protein kinaz

MET- Mezenkimal – Epitelyal Geçiş

MHC-I- Major Histocompatibility Complex

MMP- Matris metaloproteinaz

NA - non-adhesive, adhezyon özelliğini kaybetmiş olan

NF κ B -nükleer faktör beta

NKX3.1- NK3 homeobox 1

PDEF -prostat türevli Ets faktörü (prostate-derived Ets factor)

PIN- prostatik intraepitelyal neoplazi

PKa- Prostat Kanseri

PMA - Phorbol myristate acetate

PTCH1 - patched homolog 1

Rb1- Retinoblastom

RIP- reseptöre etki eden protein (receptor interacting protein)

RNS - reaktif nitrojen türleri

ROS - reaktif oksijen türleri

STAT- Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyon Aktivatörü

TAM - tümörle ilişkili makrofaj

TAM- tümör ilişkili makrofaj

TCF -T-hücre faktörü

TGF- β - dönüştüren büyüme faktörü-beta

TIL - tümör içine sızan lenfositler

TNF- tümör nekroz faktörü

TNF- α R-1 -TNF- α reseptör-1

TRAF2 -TNF- α -R ile ilişkili faktör 2 (TNF- α Rassociated factor 2)

VEGF - vasküler endotelyal büyüme faktörü

ZEB- Çinko parmak E-kutu bağlayıcı homeobox



1. GİRİŞ

PKa batılı ülkelerde ve Amerikan kökenli erkeklerde son yıllarda en sık görülen malinite ve ikinci sıradaki kanser haline gelmiştir (Siegel et al., 2016). Her yıl dünyada yaklaşık 1.3 milyon yeni prostat kanseri vakası görülmektedir. Dünya Kanser İstatistikleri verilerine göre her yıl yaklaşık 310.000 kişi prostat kanserinden hayatını kaybetmektedir. Bu sebeple PKa'da etkili tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

PKa, erkek üreme bezlerinden biri olan prostat bezindeki hücrelerin kontrolsüz büyümesiyle ortaya çıkan bir durumdur. Hücreler kontrol dışı büyüyüp PKa'nı oluşturduğunda öncelikle prostat içine yayılır ve sonra prostatı çevreleyen kapsülü aşarak prostat dışı çevre dokulara yayılabilir. Kanserleşmiş prostat hücreleri büyümek için androjenler olarak adlandırılan hormonal uyarılara ihtiyaç duyarlar. Erkeklerde esas androjen hormonu testosterondur. ABT ile vücutta testosteronun ya üretimi durdurulur ya da testosteronun etkisi engellenmiş olur.

PKa tanısı konulduktan sonra kastrasyon dirençli aşamaya kadar olan gelişim / ilerleme sürecinde, çok aşamalı ve çok patojen bir süreç olduğu ve bu süreçte büyük miktarlarda risk faktörlerinin rol oynayabileceği bilinmektedir. Yağ, alkol tüketimi, sigara, hormon ve vücut boyutu gibi genetik ve çevresel risk faktörlerinin, prostat kanseri riskinin artması ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Ekman et al., 1999; Siegel et al., 2016). Fakat PKa'nın etiyoloji ve patogenezi ise hala belirsizdir. Bugüne kadar yapılmış olan birçok çalışmada çevresel etmenlerden daha çok genetik etmenlerin PKa gelişimi üzerindeki etkilerine odaklanılmıştır.

PKa'nın heterojen hücre popülasyonuna sahip multifokal bir hastalık olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, EMT gibi PKa'nın metastatik oluşunun altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmaları anlamak, PKa ile ilişkili mortaliteyi önlemek için potansiyel terapötik stratejiler üretebilir. PKa tipik androjene bağımlı hastalıktır ve ABT metastatik hastalığı olan hastalar için standart bir tedavidir.

Çoğu kanserde olduğu gibi, prostat kanseri gelişimi, hem germlin hem de somatik mutasyonlar dahil olmak üzere genom seviyesinde birkaç değişiklikle karakterize edilir (Boyd LK et al, 2012). Prostat karsinogenezi ile ilişkili genetik değişiklikler, RNASEL, AR, CYP17A1, CYP3A, TP53, EFGR, KRAS, BRAC1 / 2, CHEK2 ve HOXB13 gibi çeşitli genlerdeki tek ve çoklu nükleotid polimorfizmlerini içerir (Boyd LK et al., 2015).

Son çalışmalar HOXB13'ün ailesel prostat kanseri geni olarak tanımlanması için güçlü bir aday olduğunu göstermiştir (Beebe-Dimmer JL et al., 2014). Somatik genlerdeki değişiklikler, kopya sayısı değişiklikleri (8p21, 10p15, 10q21, 13q21, 16q22, 21q22, 22q ve 2p23, 8q24, Xq12 kazanımı gibi), kromozomal translokasyonlar ve gen füzyonu (TMPRSS2: ERG, TMPRSS2: ETV1, TMPRSS2: ETV4, SLC45A3: BRAF) gibi mutasyonları içerir (Wasserman NF et al., 2010).

Somatik telomer kısalması, yüksek dereceli prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) ve prostat karsinomu vakalarında da görülmektedir (Meeker AK et al., 2002). Bunlara ek olarak, GSTP1, MDR1, APC, PTGS2 ve RASSF1a ile ilişkili CpG adalarında hipermetilasyon gibi epigenetik değişiklikler ve global histon modifikasyon paternlerindeki değişiklikler, PKa gelişimi sırasında yüksek frekansta gözlenir (Lee WH et al., 1994).

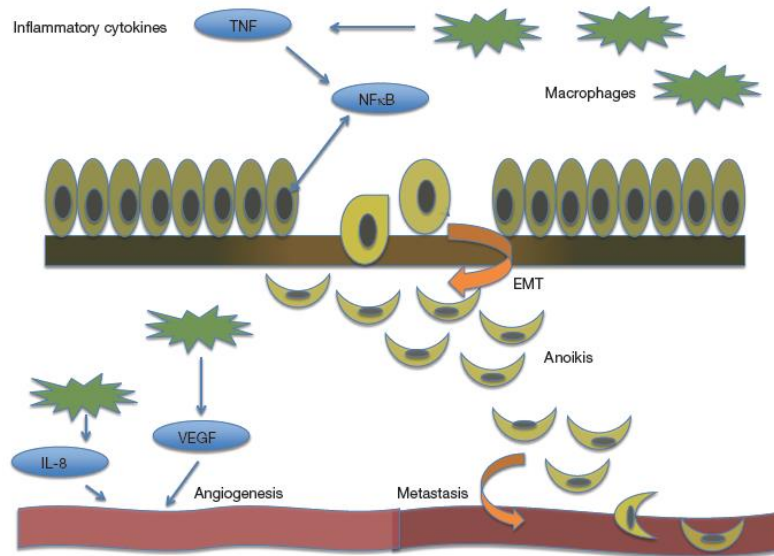
PKa ile ilişkili olan genetik ve epigenetik değişiklikler arasında, insan 8p21 bölgesinin heterozigotitesinin kaybı (LOH-loss of heterozygosity), PIN'deki sıklığı açısından dikkate değerdir (Haggman MJ et al., 1997). 8p21 lokusunda LOH, yüksek dereceli PIN lezyonlarının %12-89'unda ve prostat adenokarsinomlarının %35-86'sında bildirilmiştir (Gurel B et al., 2010). PKa başlangıcına potansiyel olarak katkıda bulunabilecek genler arasında en muhtemel aday olan NK-ailesi homeobox geni NKX3.1'i tanımlanmıştır (He WW et al., 1997). PIN'de meydana gelen diğer iyi belgelenmiş moleküler değişiklikler arasında, MYC mRNA ve proteinin (8q24 kazanımıyla ilgili olmamakla birlikte) oldukça yaygın bir şekilde yukarı regülasyonu ve nispeten nadir durumlarda TMPRSS2: ERG füzyonları bulunur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prostat Kanseri Gelişiminde İnflamasyonun Etkisi

Yapılan araştırmalara göre inflamasyon prostat kanseri gelişimine ve kanserin metastatik seviyeye ulaşmasına sebep olan bir faktördür. Son zamanlarda yapılan meta-analiz sonuçları prostatit ve cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların da prostat kanseri riskinin artması ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (Dennis LK et al., 2002). Bu nedenle anti-inflamatuvar ilaçların ve antioksidanların alımı prostat kanseri riskinin azalması ile ilişkilendirilmiştir.

Aktif inflamatuvar hücreleri ve proliferatif epitel hücreler içeren PIA, PKa ve PIN lezyonlarının patolojik öncülü olarak belirlenmiştir (De Marzo et al., 2007). Kronik inflamasyonun, anjiyogenez ve EMT üzerinden tümör mikro ortamının dinamiğini etkilemesi sebebiyle, prostat kanseri gelişimi ve metastazında önemli bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.1). Prostat kanseri hastalarının tümör profilini tanımlarken ve bireysel tedavi stratejilerini uyarlarken, inflamasyonun tümör mikroçevresindeki önemli işlevsel etkisi göz önünde bulundurulmalıdır.



Şekil 2.1. İnflamatuvar tümör ilişkili makrofajların PKa gelişimindeki rolü. TNF- α (NF κ B sinyalini aktive eder) ve TGF- β (EMT'yi indükler) gibi inflamatuvar sitokinlerin TAM

tarafından salgılanması, tümör mikroçevresini değiştirir. TAM'lar doğrudan endotel hücre büyümesine aracılık eden VEGF'in regülasyonunu yükseltmek yoluyla anjiyogenik yanıtı teşvik eder. Mezenkimal hücreler (anoikise dirençli) hayatta kalır ve invaziv hale gelir, metastaza doğru ilerler.

2.1.1. Hücrenin Kaderini Değiştirmede İnflamatuar Tümör Mikroçevresinin Rolü

Hücreler arasındaki etkileşimler ve bulunduğu mikroçevre, fonksiyonel doku homeostazının korunması için çok önemlidir. Bu etkileşimdeki kusurlar, doku patolojisi ve hastalık gelişimi ile sonuçlanır. Tümörler kanser hücrelerinden ve bu mikroçevredeki tümör hücrelerinden oluşur. Tümör mikroçevresinin hücresel bileşenleri arasında fibroblastlar, endotel hücreleri ve inflammatuar hücreleri bulunur. Fiziksel ve kimyasal bileşenler, ECM ve çözünmüş oksijen, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi çözünebilen molekülleri içerir. Kanser hücreleri birbirleriyle dinamik olarak etkileşir ve bu kompleks mikroçevre ile birlikte gelişir. Kanser hücreleri ve tümör arasındaki kompleks mikroçevre, kanser hücrelerinin davranışını etkileyebilir, kanser hücrelerinin göç etme, invazyon ve metastaz yapma kabiliyetini artırarak tümör gelişimini teşvik edebilir. ECM, normal ve tümörijenik büyümede; hücre çoğalması, hücre göçü, hücre farklılaşması ve hücre sağkalımı için kritik bir düzenleyicidir (Horbinski C et al., 2010). Sağlıklı hücrelerde ECM yapısındaki bozulmalar kaspaz bağımlı apoptoza yol açar.

Farklı nedenlerden dolayı çözünür inflammatuar aracılardan ECM içerisine salınması, ECM'yi çevreleyen stromal hücreleri aktive eder ve reaktif stroma oluşumu ECM'nin çevresini dramatik olarak yeniden düzenler (Cunha GR et al., 2003). İnflamatuar sitokinler bakımından zengin bir mikroçevre, PKa'nın metastaza doğru ilerlemesine aracılık eder (Barron DA et al., 2012). ECM'nin inflamasyon aracılığıyla bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkan anoikise dirençli mezenkimal prostat hücreleri, agresif tümör büyümesi ve metastaza karşı invaziv ve göç özelliklerini kazanır (Şekil 2.1). Kanser, öncelikle metastaz yapma kabiliyeti nedeniyle öldürücüdür (Horbinski C et al., 2010). Normalde, ECM'den ayrılan hücreler hayatta kalamaz ve çoğalamazlar, daha sonra

anoikis fenomeniyle öölürler. Tümör hücrelerinde ise anoikise karşı gösterilen direnç, hücrenin intravazasyon işlemi boyunca hareket etmesini ve yeniden bağlanmasını sağlayan hayatta kalma avantajını sağlar (Frisch SM et al., 2001).

Yeni kan damarlarının oluşumu olan anjiyogenez birçok iltihaplı hastalıkla ilişkilidir. İnflamatuar kaskat tarafından kronik olarak aktive edilen hücreler, yoğun bir anjiyojenik cevap yoluyla vaskülarizasyonu indükleyen sitokinleri serbest bırakır. Tümör hücreleri, VEGF, IL-8 ve bFGF dahil olmak üzere bir dizi büyüme faktörü salgılayarak anjiyogenezi teşvik edebilir, kapiler büyümesini destekler ve damarlanmayı artırır (Timothy S et al., 2015).

2.2. Tümör Gelişimi ve Migrasyonda İnflamatuar Sitokinlerin Rolü

Bilindiği gibi, immüno-inflamatuar reaksiyon sürecinde, onu başlatan uyaranlar ilk önce ortadan kaldırılır ve daha sonra hasar alanında iyileşme (çoğalma) meydana gelir. Böylece bu reaksiyonun gerçek inflamasyon (hasar) ve iyileşme (çözünürlük) olmak üzere iki tarafı da ayırt edilebilir. Yok etme aşamasında bağışıklık sisteminin efektör mekanizmaları yoğun bir şekilde iş görürse, iyileşme sürecinde daha az aktif olurlar ve bu yüzden akut inflamasyon uzun süre iyileştirilemediğinde “iyileşemeyen yara” etkisi meydana gelir. Bu durumda lokal immünbaskılanma oluşur ve bu durum tümörlerin gelişimine katkıda bulunur. Rudolf Virchow, tümör büyümesini, yaranın iyileşmesi sürecinin hatalı bir mekanizması olduğunu varsaymıştı, nitekim modern literatürde tümöre iyileşmeyen bir yara denilmektedir.(Gajewski T.F et al., 2013).

Kronik inflamasyon immün yanıtın baskılanması ve tümör büyümesiyle ilişkiliyse, akut inflamasyon tümörün küçülmesine neden olabilir. Bu nedenle bağışıklık-inflamatuar reaksiyonunun düzenlenme mekanizmalarını anlamak son derece önemlidir.

İnflamasyon doku hasarını ve patojenik ajanları yok etmek için etkinleştirilmiş aktif bir yanıttır. Bununla birlikte inflamasyon kontrol

edilmezse, çevredeki dokuda malign hücre transformasyonunu indükleyerek kronik hale gelebilir. İnflamatuar yanıt, çeşitli moleküler hedef ve sinyal yollarını apoptoz, yüksek proliferasyon oranı ve anjiyogenez gibi karsinojenik süreç ile paylaşır. İnflamatuar cevabın esas amacı, doku homeostazını rahatsız eden yabancı ajanı ortadan kaldırmaktır (R.Medzhitov et al., 2008). Düzgün bir şekilde ortadan kaldırılamayan kronik inflamasyonun kanser riskini artırabileceği durumu yaygın bir görüş olarak kabul edilmektedir. (Glauben Landskron et al. 2014) İnflamasyon sürecinde tümör mikroçevresindeki sitokinler ve bu bölgeye infiltre olan hücreler tarafından salgılanan biyoaktif moleküller kanser riskini artırabilir. Bu moleküller; büyüme faktörleri, hücrelerin proliferatif hızını koruyan kemokinler, apoptozu önlemek için hücre sağkalımını destekleyen sinyaller, proanjiyogenik faktörler ve EMT'yi teşvik eden; genom instabilitesi, enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve immün yanıtın kaçakçılığı gibi diğer karsinogenez programlarını kolaylaştıran metalloproteinazlar gibi hücre dışı matriks modifiye edici enzimleri de içeren moleküllerdir. (D.Hanahan and R. A.Weinberg, 2011).

Sitokinler, hücre-hücre iletişimine aracılık eden düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir. Fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi immün ve stromal hücreler tarafından sentezlenirler ve hücre proliferasyonu, sağkalımı, farklılaşma, immün hücre aktivasyonu, hücre göçü ve hücre ölümü mekanizmalarının düzenlenmesini sağlarlar. Tümör mikroçevresine bağlı olarak, sitokinler antitümöral bir yanıtı modüle edebilir, ancak kronik inflamasyon sırasında pro-ve anti-inflamatuar sitokinlerin dengesine, bunların nispi konsantrasyonlarına, sitokin reseptör ekspresyon içeriğine ve çevredeki hücrelerin aktivasyon durumuna bağlı olarak hücre transformasyonuna ve maligniteye neden olabilirler (B. F. Zamarron and W. Chen, 2011).

2.2.1. Tümör Nekroz Faktörü (TNF- α)

Belirtildiği gibi devam eden inflamasyon süreci maligniteye yol açabilir. TNF- α kronik inflamatuara katılımı nedeniyle karsinogenezde de

önemli rol oynayan inflamatuvar bir mediatördür (C. Popa et al., 2007). TNF- α 'nın, karsinogenez ve invazyon da dahil olmak üzere, erken dönemde karsinogenez gelişimini destekleyerek etki ettiği düşünülmektedir. (P.Szlosarek et al., 2006). TNF- α prototipik proinflamatuvar bir sitokin iken, kanıtlar karsinogenezde iki taraflı bir rolü olduğuna işaret eder. Bu sitokin iki reseptör tarafından tanınır: her yerde yaygın olarak ifade edilen TNF- α R-1 ve temel olarak immün hücrelerde eksprese edilen TNF- α R-2 (G. Chen and D. V. Goeddel, 2002). Trimerizasyon TNF- α 'nın TNF- α -R'lere bağlanmasına ve en az dört sinyalleme yolunun aktive olmasına yol açar: FADD ile kaspaz-8 etkileşimi tarafından indüklenen bir proapoptotik yol; cIAP-1 tarafından aktive edilen ve TRAF2 ile etkileşime giren bir antiapoptotik platform; TRAF2 ve JNK aracılı AP-1 sinyal yolağı; ve RIP ile aktive olan NF- κ B (G. Chen and D. V. Goeddel, 2002).

Bu sitokinin yüksek konsantrasyonları, murin sarkom modelinde antitümöral bir yanıtı indükleyebilir. Ayrıca, William B. Coley, sarkom hastalarında sistemik bakteriyel filtrat enjeksiyonunun güvenilir bir tedavi yanıtı oluşturduğunu keşfetti (B.Wiemann and C. O. Starnes,1994). Bu durumun aksine, düşük miktarda fakat sürekli üretilen TNF- α seviyeleri tümör fenotipini indükleyebilir (F. Balkwill,2006). TNF- α 'nın tümör tetikleme mekanizması, ROS ve DNA hasarını indükleyebilen RNS oluşumuna dayanır, bu da tümör oluşumunu kolaylaştırır (S. P. Hussain et all., 2003). TNF- α aracılı inflamasyon kanserle bağlantılıdır.

Kwong ve ark. kronik TNF- α dozuna maruz kalan normal insan yumurtalık epitel hücrelerinin organoidini kullanarak TNF- α ile ilişkili tümör oluşumunu araştırdı. Oluşturdukları modelde; doku disorganizasyonu, epitelyal polarite kaybı, hücre invazyonu ve kanser markörlerinin aşırı ekspresyonu gibi yapısal ve fonksiyonel değişikliklerle prekanseröz fenotip oluşumu gösterilmiştir (J.Kwong et al., 2009). Bu bulgulara göre, tümör mikroçevresindeki pro- veya antitümöral TNF- α cevabı sadece lokal konsantrasyona değil, aynı zamanda tümör içindeki ekspresyon bölgesine de bağlıdır.

2.2.2. İnterlökin-6 (IL-6)

Tipik pro-tümörijenik etkiye sahip başka bir pro-inflamatuar sitokin IL-6'dır. Sistemik kanser hastalarında, kontrol grubu olan sağlıklı hastalara veya benign hastalara göre serumlarında yüksek IL-6 düzeyleri tespit edilmiştir. IL-6 sırasıyla % 60-70 ve %58-90 arasında duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir malignite belirleyicisi olarak önerilmiştir. IL-6, reseptör (IL-6R α) ve gp130 (glikoprotein 130) koreseptörüne bağlanarak JAK'ın JAK/STAT sinyal yolunu ve STAT1 ve STAT3 (STAT'lar) sinyal aktarıcılarını ve transkripsiyon aktivatörlerini aktive eder, böylece proliferasyonun desteklenmesi ve apoptozun baskılanmasında önemli bir rol oynar (D. R. Hodge et al., 2005). STAT'ler, tümörijenik süreçlerle yakından ilişkili transkripsiyon faktörleri ailesine aittir.

Birçok çalışma, IL-6 /JAK /STAT sinyal yolunun kanser başlangıcı ve ilerlemesi üzerindeki etkisini vurgulamıştır. IL-6, tümör süpresör genlerinin hipermetilasyonu ve aynı zamanda çeşitli insan kanserlerinde sık rastlanan in vitro (J. A. Gasche et al., 2011) oral skuamöz kanser hücre hattındaki LINE-1 hipometilasyonu ile tümörijenezi indükleyebilir. Ayrıca, mide kanseri fare modelinde IL-6'nın esas olarak stromal fibroblastlar tarafından üretildiği gösterilmiştir (H. Kinoshita et al., 2013).

TNF- α gibi IL-6 da kanser olmayan hücrelerin tümör kök hücrelerine dönüşmesini teşvik ederek tümör gelişimini kolaylaştırır. Özellikle düşük bağlanma kültürü koşullarında kansersiz kök hücreleri tarafından IL-6 salgılanması, IL-6R/JAK/STAT3 sinyal yolağını aktive ederek Oct4 gen ekspresyonunun yükselmesini regüle eder (S.-Y. Kim, J. et al., 2013).

2.2.3. Transforming Growth Factor (TGF- β)

TGF- β immün baskılayıcı ve iltihap önleyici özelliklere sahip güçlü bir pleiotropik sitokindir. Fizyolojik koşullar altında embriyogenez, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz, adezyon ve invazyonda iyi belgelenmiş bir role sahiptir (J. F. Santibañez et al., 2011). TGF- β 'nın üç izoformu tanımlanmıştır: TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3. TGF- β 'ler, tip I TGF-

β reseptörü (TGF- β RI) fosforilasyonunu indükleyen ve SMAD-bağımlı transkripsiyonu aktive eden bir heterotetramerik kompleks oluşumuna yol açan kognat tip II reseptörüne (TGF- β RII) bağlanır (J. Massagué, 2008). SMAD transkripsiyon faktörleri yapısal olarak, iki MAD homoloji bölgelerini birleştiren serin ve treonin açısından zengin bir bağlayıcı bölge tarafından oluşturulur. Bu amino asit kalıntılarının farklı fosforilasyonları, sitostatik etkiler, hücre büyümesi, invazyon, hücre dışı matriks sentezi, hücre döngüsü tutulması ve migrasyon gibi çeşitli hücresel fonksiyonlara katkıda bulunur (K. Matsuzaki, 2013). Bu nedenle TGF- β reseptör aktivasyonu ile SMAD2 ve SMAD3'ün farklı fosforilasyonu, nukleusa transloke olmasını sağlar, burada SMAD4 ile bir kompleks oluşturur, daha sonra DNA'ya bağlanır, diğer transkripsiyon faktörleri ile ilişkilendirilir ve gen ekspresyonunu indükler (J. Massagué, 2008).

TGF- β 'nin kanserdeki rolü, hücre tipi ve tümör oluşumu aşaması ile değişen, karmaşık ve paradoksal bir durumdur. Erken evrelerde TGF- β , hücre döngüsü ilerlemesini inhibe ederek ve apoptozu teşvik ederek bir tümör baskılayıcı görevi görür. Daha sonra, TGF- β EMT'yi indükleyerek invazyon ve metastazını artırır (C. D. Morrison et al., 2013). Kanser indüksiyonunda, TGF-cyc, CKI p21 upregülasyonu ve c-Myc aşağıya doğru regülasyonu yoluyla bir tümör baskılayıcı rol oynar (G. Guasch et al., 2007).

TGF- β sinyalizasyon değişikliklerinin insan kanserinde rol oynadığını gösteren tutarlı kanıtlar vardır. Tümör mikroçevresindeki yaygın TGF-kaynakları, bağışıklık hücreleri ve fibroblastlar dahil olmak üzere kanser hücreleri ve stromal hücrelerdir (J. Massagué, 2008). Kemik matriksi de bu sitokinin tümör destekleyici ve invazif etkileri ile korelasyon gösteren birçok kanserde bol miktarda TGF- β ve metastaz için yaygın bir kaynaktır (E. C. Connolly et al., 2012).

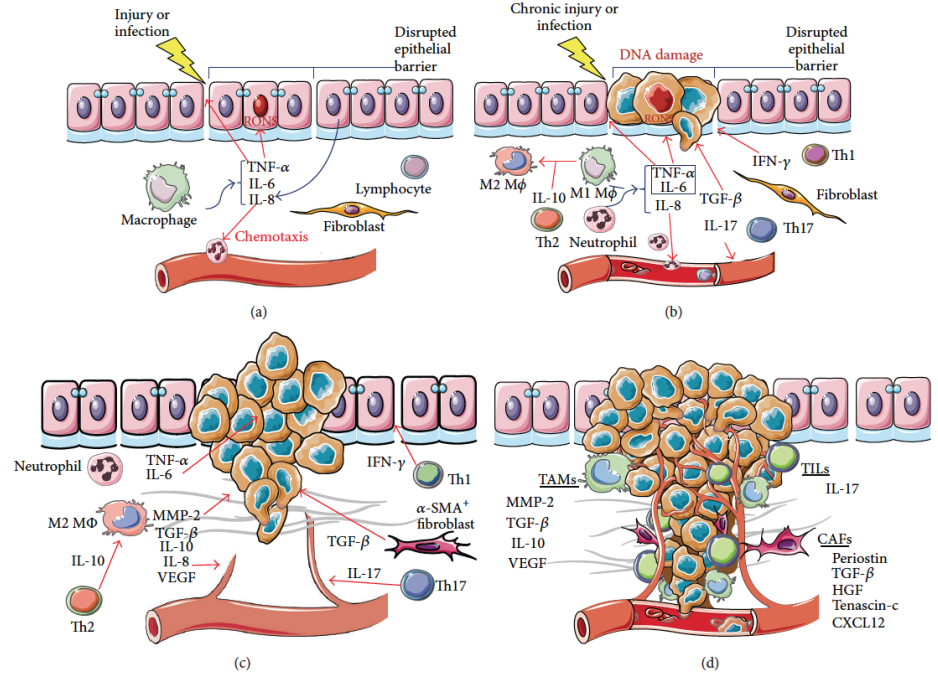
2.2.4. İnterlökin-10 (IL-10)

IL-10 güçlü bir anti-inflamatuvar sitokin olduğu bilinmektedir. T-hücreleri, B-hücreleri, monositler, makrofajlar, mast hücreleri, granülositler, dendritik hücreler ve keratinositler de dahil olmak üzere hemen hemen tüm

immün sistem hücreleri IL-10 üretir (R. Sabat et al., 2010). Tümör hücreleri de tümör infiltre eden makrofajlar gibi IL-10 salgılayabilirler (N. L. Costa et al., 2013).

IL-10 reseptörüne bağlandığında, Jak1 ve Tyk2 tirozin kinazları IL-10R'nın hücre içi alanını fosforile eder ve böylece STAT1, STAT3 ve STAT5 ile etkileşime girmesine izin verir ve nukleusa STAT translokasyonunu sağlar ve hedef gen ekspresyonunun indüklenmesini destekler (D. S. Finbloom and K. D. Winestock, 1995). Birkaç çalışma IL-10'un hem pro- hem de antitümöral etkilere sahip olduğunu göstermiştir. IL-10, NF- κ B sinyalini inhibe eder, bu nedenle proinflamatuvar sitokin ekspresyonunu azaltabilir (A. J. G. Schottelius et al., 1999) ve antitümöral sitokin olarak hareket edebilir. Dahası, IL-10 glioma, melanomlar, meme ve yumurtalık karsinomlarında, MHC-I baskılanmasını içeren bir mekanizma yoluyla, NK-aracılı tümör hücre lizisini indükleyerek antitümöral aktivite gösterebilir (N. Kundu and A. M. Fulton, 1997).

Dendritik hücreler ve makrofajlar üzerindeki immün baskılayıcı etkisi nedeniyle IL-10, antijen sunumunu, hücre olgunlaşmasını ve farklılaşmasını azaltabilir ve tümör hücrelerinin immün gözetim mekanizmalarından kaçmasına olanak tanır (H. Hamidullah et al., 2012). STAT3 ayrıca IL-10 ile aktive edilebilir. Sitokinlerin çelişkili yanıtları reseptör ve STAT aktivasyonunun zaman ayarı tarafından belirlenir. IL-6, geçici hızla azalan bir STAT3 fosforilasyonuna ve nükleer lokalizasyona yol açarken IL-10, sürekli olarak STAT3 fosforilasyonunu indüklemektedir (D. A. Braun et al., 2013). STAT3 aktivasyonu yoluyla IL-10, Bcl-2 upregülasyonu ve apoptoz direnci aktivasyonunu içeren bir otokrin-parakrin döngünün aracılık ettiği pro-tümörijenik etkiye de sahip olabilir.



Şekil 2.2. Karsinogeneizde sitokinlerin rolünün şematik olarak gösterimi. (a) Doku hasarı veya enfeksiyon sırasında immün yanıt, makrofaj ve nötrofillerden $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuar mediatörlerin ekspresyonunu aktive eder. Bu sitokinler epitel bariyerini bozabilir, RONS'yı indükleyebilir ve diğer inflammatuar hücrelerin infiltrasyonunu teşvik edebilir. (b) Kronik inflamasyonda $\text{TNF-}\alpha$ gibi proinflamatuar sitokinler, RONS yoluyla DNA hasarına neden olabilir ve bu da tümör oluşumunun başlamasına neden olur. $\text{TGF-}\beta$ de EMT aktivasyonu aracılığıyla malign dönüşümü teşvik edebilir. $\text{IFN-}\gamma$, IL-10 ve IL-17 gibi CD4^+ lenfositlerden türetilmiş sitokinler sırasıyla; epitelyal bariyer bozulmasına, makrofajların M2 fenotipik geçişlerine ve anjiyogeneze katılabilir. (c) Tümör büyümesi ve invazyon, hücre proliferasyonunu uyararak, apoptozu azaltarak ve EMT ve anjiyogeni artıran proinflamatuar sitokinler tarafından da desteklenir; ve daha sonra VEGF ve IL-8 tarafından kolaylaştırılabilir. IL-10 ve $\text{TGF-}\beta$ gibi anti-inflamatuar sitokinler, tümörün immün yanıttan kaçmasına katkıda bulunur. (d) TAM, TIL ve CAF, immünoşüpresif ortamı korurken, tümör büyümesine ve metastazına katkıda bulunan çeşitli faktörler salgırlar (Glauben Landskronet al., 2014).

2.2.5. İnflamasyonla İlişkili Tümör Büyümesi

Günümüzde proinflamatuar sitokinlerin ekspresyonu ile aynı anda $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ve STAT3 gibi sinyal yollarının sürekli aktivasyonu yoluyla malignite oluşumunda kronik inflamasyonun önemli bir rolü olduğu kabul edilmektedir. Bu sitokinler, malign bölgeye hücre transformasyonunu

desteklemekle birlikte tümör hücrelerinin çoğalmasını uyararak ve immün-kontrolü azaltarak tümör büyümesine katkı sağlar (Şekil 2,2).

TNF- α gibi bazı sitokinler büyüme faktörü aktivitesine sahiptir. Zhu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, safra kesesi hücre hattında TNF- α 'nın susturulmasının, TNF- α /NF- κ B/AKT/Bcl-2'in aktivasyonunu etkileyen bir otokrin etkisi ile hücre proliferasyonunu ve istilasını azalttığını göstermişlerdir (G. Zhu et al., 2014). Aynı şekilde Luo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara göre, NF- κ B sinyalinin inflamatuvar bir uyarıcıya tepki olarak tümör hücresi proliferasyonunu teşvik etmede gerekli olduğu ortaya konmuş ve bu transkripsiyon faktörünün baskılanması, TNF- α /TRAIL tarafından başlatılan antitümör sinyali tetiklemiştir.

Kanserde IL-6/STAT3 sinyal yolunu düzenleyerek tümör büyümesini etkileyebilecek diğer başka moleküllerin de olduğu bildirilmiştir. Farelerdeki melanom modelinde, Hmgb1, IL-23 ve IL17 gibi inflamatuvar mediatörler, IL-6/STAT3 yolunu aktive ederek tümör büyümesini destekleyebilmiştir (Q. Tang et al., 2013). Kolanjiyokarsinomda, tümör baskılayıcı gen regülatörünün yüksek bir ifadesi olan gankirin, IL-6/STAT3 sinyal yolunun aktivasyonu yoluyla tümör proliferasyonu, invazyon ve metastazı desteklemiştir (T. Zheng et al., 2014).

2.3. NKX3.1'in Kararlılığının ve Fonksiyonunun Düzenlenmesi

NKX3.1, normal prostat gelişiminde prostat kanallarının oluşmasında ve prostat glandüler epitelyumun proliferasyonunu düzenlenmede önemli rol oynayan, androjen tarafından regüle edilen homeodomain transkripsiyon faktörüdür. NKX3.1 ekspresyonu ağırlıklı olarak prostat bezindeki lümen hücreleri ile sınırlıdır (Bieberich CJ et al., 1996). Primer prostat adenokarsinomlarında NKX3.1 değeri pozitif olsa da yüksek dereceli lezyonlarda düzeyleri azalmaktadır. İyi karakterize edilmiş ve sağlam bir antikör kullanan son raporlar, metastatik lezyonlarda bile NKX3.1 düzeylerinin azaltılabileceğini, ancak ekspresyonun tamamen yitirilmediğini göstermiştir (Bethel CR et al., 2006). Homozigot NKX3.1 susturulmuş fareler prostat epitelyal hiperplazi ve displaziye geliştirirler, böylece 1-2 yaşlarına

doğru PIN benzeri lezyonlara ilerlerler (Abdulkadir SA et al., 2002). Ayrıca tüysüz farelerde NKX3.1'in ektopik olarak aşırı ekspresyonu sağlandığında, hücre proliferasyonunun ve ankorajdan bağımsız hücre büyümesinin inhibe edildiği ve tümör büyümesinin baskılandığı görülmüştür (Tan PY et al., 2012). Genel olarak bu veriler, NKX3.1'in prostata spesifik tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğünü göstermektedir. Öyle olsa da, NKX3.1'in Rb1 veya TP53 klasik tümör baskılayıcılar gibi davranış sergilemediği görülmüştür. Bunun nedeni olarak NKX3.1 geninde çoğunlukla sadece bir allel kaybolur ve diğeri genellikle mutasyona uğramamıştır (Abate-Shen C et al., 2008). Ayrıca, prostatın çoğu yüksek dereceli primer tümörleri ve metastazlarında, normal prostatik lümen hücrelerine kıyasla NKX3.1 seviyesi bir miktar azalmış olsa bile ekspresyonu korunmuş gibi görünmektedir (Gurel B et al., 2010).

NKX3.1'in tümör baskılayıcı rolüne ek olarak, hayvan modellerinde kastrasyona dirençli olan prostatik hücrelerin bir alt grubunda mevcut olduğu gösterilmiştir. Bu hücreler tümör oluşumu için etkin hedeflerdir (Wang X et al. 2009). Bu gözlem, bazen NKX3.1'in korunmasının, prostat karsinogenezisi ve kastrasyon direnci için gerekli olabileceğini ortaya koymaktadır.

NKX3.1'in prostata özgü önemli bir tümör baskılayıcısı ve erken prostat kanseri markörü olarak ortaya çıkışı, onun regülasyonu ile ilgili araştırmaların artışına katkıda bulunmuştur (Gurel B et al., 2010). Birçok çalışma, transkripsiyonel seviyede NKX3.1'i düzenleyen faktörleri ortaya çıkarmıştır. NKX3.1 ifadesi androjenler tarafından düzenlenir ve NKX3.1'in androjen tepkisi, 3'UTR bölgesinde iki androjen cevap elemanı (ARE- androgen response elements) tarafından aracılık eder (Thomas MA et al, 2010). ETS1 ve Sp1 transkripsiyon faktörlerinin NKX3.1'in 5'promotör bölgesine bağlandığı ve ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir (Preece DM et al., 2011). Kanonik Wnt sinyalinin, NKX3.1'i pozitif düzenleyici döngü üzerinden transkripsiyonel olarak regüle ettiği gösterilmiştir. Wnt sinyal yolu ve NKX3.1 arasındaki etkileşim, prostat tomurcuğu büyümesi ve lümen epitelyal farklılaşmasında önemli bir rol oynar (Kruithof-de JM et al., 2013). NKX3.1 seviyesinin düşük olduğu bazı prostat kanseri vakalarında, NKX3.1

promotörünün CpG metilasyonu geçirdiği bilinmektedir. Son kanıtlar prostat kanseri gelişimi sırasında, NKX3.1 ve MYC seviyeleri arasında ters bir korelasyon olduğunu düşündürmektedir. Ancak bu düzenlemenin moleküler temeli açıkça bilinmemektedir. Zerdeçalda bulunan güçlü bir antioksidanın ve doğal olarak oluşan A vitamini metaboliti olan trans-retinoik asitler de dahil olmak üzere tüm küçük moleküllerin, prostatta yüksek düzeyde biriktiği ve NKX3.1'i transkripsiyonel olarak düzenlediği gösterilmiştir (Zhang HN et al., 2007).

Çizelge 2.1. NKX3.1'de Tanımlanan Post-Translasyonel Değişiklik Sitelerinin Listesi

Site	Değişiklik	Enzim	Bölge	Rol
S48	Fosforil asyon	PKC	N-term	DNA bağlanması
T89	Fosforil asyon	CK2	N-term	Protein stabilitesi-kararlı durumu
T93	Fosforil asyon	CK2, Pim-1	N-term	Protein stabilitesi-kararlı durumu
T134	Fosforil asyon	ATM	Homeo domain	Protein stabilitesi-DNA hasar yanıtı
T166	Fosforil asyon	ATM	Homeo domain	Protein stabilitesi-DNA hasar yanıtı
S185	Fosforil asyon	Pim-1 DYR K1B	C-term	Protein stabilitesi
S186	Fosforil asyon	Pim-1	C-term	Protein stabilitesi-inflamatuar sitokinler
S195	Fosforil asyon	Pim-1	C-term	Protein stabilitesi
S196	Fosforil asyon	Pim-1	C-term	Protein stabilitesi-inflamatuar sitokinler

Y222	Fosforilasyon	Bilinmeyen	C-term	Protein stabilitesi-DNA hasar yanıtı
------	---------------	------------	--------	--------------------------------------

Bazı durumlarda NKX3.1'in transkripsiyonel regülasyonu, onkojenik transformasyon sırasında NKX3.1 seviyelerinde azalmaya katkıda bulunsa da, hastalardan elde edilen normal ve prostat kanseri dokularının karşılaştırılması, NKX3.1 mRNA ve protein seviyeleri arasında açık bir uyumsuzluğun olduğunu göstermiştir. Öyle olsa da NKX3.1 kopya sayısı (8p21) ve NKX3.1 proteini arasında bir korelasyon vardır. Azalmış NKX3.1 protein seviyesi, normal veya artmış mRNA düzeyine sahip altı vakanın dördünde bulundu, bu da NKX3.1'in transkripsiyon sonrası düzenlemesinin, önemli bir oranda prostat karsinomu vakalarında oluştuğunu düşündürmektedir (Bethel CR et al., 2006). Daha sonraki çalışmalar, NKX3.1'i birkaç post-translasyonel modifikasyon için hedef olarak tanımlamıştır (Tablo I).

2.3.1. NKX3.1'in Post-translasyonel Değişimi ve Kararlı Dönüşümü

PKa hastalarının prostat epitelindeki NKX3.1 mRNA ve protein seviyeleri arasındaki korelasyon eksikliğinden yola çıkılarak, prostat kanseri hücresi proteomundaki, NKX3.1'i fosforile eden potansiyel protein kinazları tanımlamayı amaçlayan çalışmalar başlamıştır.

LNCaP hücre lizatlarının kullanıldığı jel-jel kinaz analizinde, NKX3.1'i fosforile edebilen, 42 kDa moleküler ağırlığında bir protein kinaz olduğu ortaya çıkarılmıştır. Daha sonra bu proteinin, protein kinaz CK2 (CK2) olduğu belirlenmiştir. Kütle spektrometresi analizleri, NKX3.1'in PEST dizisinin, N-terminal bölgesinde Thr89 ve Thr93 üzerinden belirgin iki CK2 fosforilasyon bölgesi olduğu ortaya konulmuştur. PEST dizisi protein parçalanması için sinyal peptidleri olarak hizmet eder ve kısa yarı ömre sahip olan proteinler ile ilişkilidir. İlginç olarak CK2 inhibisyonu, artan NKX3.1 ubiquitinasyonu ve dönüşümü (turnover) ile sonuçlanmıştır. Proteazom

inhibitörü MG132, NKX3.1'in sabit durum seviyeleri üzerindeki CK2 inhibisyonu etkisini tersine çevirir, bu da bu bölgelerdeki fosforilasyonun, NKX3.1'i 26S proteazom aracılı degradasyonundan koruduğunu düşündürmektedir. Bireysel CK2 katalitik alt birimlerinin siRNA aracılı susturulması, *in vivo*'da NKX3.1 fosforilasyonundan sorumlu, CK2 izoformu olan CK2a'yı ortaya çıkarmıştır (Li X et al., 2006). Bunun gibi katalitik izoform-spesifik etkiler, diğer protein kinazların yanı sıra diğer CK2 substratlarında da gözlenmiştir.

Son zamanlarda, onkogenik kinaz PIM1'in, NKX3.1 stabilitesini düzenlemek için NKX3.1'in PEST dizisindeki Thr93'i fosforile ettiği bildirilmiştir. Ayrıca PIM1'in, NKX3.1'in C-terminal bölgesindeki Ser-5, Ser186, Ser195 ve Ser196'i de fosforile ettiği bulunmuştur (Padmanabhan A et al., 2013).

Daha önce NKX3.1'in C-terminal bölgesinin (183–234 amino asitler) NKX3.1 sabit durum düzeylerine aracılık etmede önemli olduğu bildirilmiştir. Markowski ve arkadaşları Ser185 fosforilasyonunun, NKX3.1 devinimini tetiklediğini tanımlamıştı (Markowski MC et al., 2008).

Ser185'in alanine mutasyonu, NKX3.1 yarı ömrünü iki katına çıkarmıştır. Daha sonra DYRK1B, NKX3.1'i Ser185 bölgesinden fosforile eden protein kinaz olarak tanımlanmıştır (Song LN et al., 2015). İlginç bir şekilde Padmanabhan ve arkadaşları, NKX3.1 S185A/S186A çift mutantının, PIM1 inhibisyonu aracılı bozulmaya karşı dirençli olduğunu bildirmiş, bu nedenle bu bölgenin PIM1 tarafından fosforilasyonun, NKX3.1'in stabilize edilmesinde önemli olabileceğini düşündürmektedir (Padmanabhan A et al., 2013). Yukarıdaki anlatılanlara göre, PIM1'in NKX3.1'i hem Ser185 hem de Ser186 bölgeleri üzerinden fosforile ettiği varsayılabilir. Ser185'deki tekli fosforilasyon, NKX3.1'i istikrarsızlaştırırsa da Ser186'daki eş zamanlı veya bağımsız fosforilasyon NKX3.1'in stabilitesini arttırır. Ser186'daki tekli fosforilasyon, Ser185'teki destabilize edici fosforilasyonu önleyerek de işlev görebilir. Ser185 ya da Ser186'ın alanine mutasyonu, bitişigindeki PIM1 fosforilasyonu için gerekli tanıma dizisini değiştirebilir ve böylece PIM1 inhibisyonuna duyarsız hale gelebilir. Normal koşullar altında Ser185

PIM1'den başka bir kinaz tarafından fosforile edilebilir bu da NKX3.1'in degradasyonu için hedef sayılabilir. Bununla birlikte, PIM1'in aktivasyonunun ardından bitişindeki Ser186 bölgesindeki fosforilasyon, daha sonra NKX3.1'i stabilize etmeye hizmet edecektir. İlginç bir şekilde bu çalışmalar, NKX3.1'in N-terminal PEST dizisindeki sinyalleme modülleri ile C-terminal bölgesi arasında bir etkileşim olasılığı olabileceğini göstermiştir. Her bir PIM1 fosforilasyon sahası mutantının, N-terminal PEST dizisinde veya NKX3.1'in PIM1 inhibisyonuna karşı C-terminal bölgesindeki tam duyarlılık kaybı, bu iki merkezdeki translasyon sonrası modifikasyonların NKX3.1'in belirlenmesinde birbirleriyle iletişim kurduğunu gösterir. Bununla birlikte, ayrıntılı fonksiyonel analizlerin yokluğunda, bu hipotez spekülasyon olarak kalmaya devam etmektedir. Asıl olarak çoklu sinyal yollarını içeren karmaşık bir düzenleyici ağ, farklı koşullar altında kararlı durum düzeyini belirlemek için NKX3.1'in farklı bölgelerinde birleşmektedir.

2.3.2. İnflamasyonda NKX3.1'in Post-translational Düzenlenmesi

PKa başlangıcı ve ilerlemesinde inflamasyonun katkısına ait veriler giderek artmaktadır (Sfanos KS and De Mazo, 2012). Karsinogenezin erken döneminde tümör bölgelerine inflamatuvar sitokinlerin toplanmasının, tümör mikroçevresinin yeniden şekillenmesi gibi tümör ilerlemesindeki bu kritik süreç için önemli olduğuna inanılmaktadır (Landskron G et al., 2014). İlginç olarak, NKX3.1 seviyeleri, insan prostat kanseri dokusundaki inflamasyon bölgelerinde ve faredeki bakteriel prostatit modelinde anlamlı olarak düşük çıkmıştır (Bethel CR et al., 2006). Prostat kanseri hücrelerinin inflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL1- β ile tedavisi, NKX3.1 ubiquitinasyonunun artışı ve 26S proteazomu aracılığıyla yıkımı ile sonuçlanmıştır. İnflamasyon ve düşük NKX3.1 seviyeleri arasında olası bir mekanik bağlantı olarak, NKX3.1'deki TNF- α kaynaklı Ser196 fosforilasyon bölgesinin bulunmasıdır. Ser196'nın alanine mutasyonu, TNF- α aracılı NKX3.1 ubiquitinasyonu ve yıkım işleminin ortadan kalkmasıyla sonuçlanmıştır (Markowski MC et al., 2008). Ser196, TNF- α uyarımına yanıt olarak NKX3.1 seviyelerinin

düzenlenmesinde önemli bir rol oynasa da, bu cevaba aracılık eden protein kinazın kimliği tanımlanmaya devam etmektedir.

2.3.3. NKX3.1'in DNA Hasarı Varlığında Post-translational Olarak Düzenlenmesi

Birçok çalışma, NKX3.1'in DNA hasar bölgelerine lokalize olduğunu ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ve topoizomerez I inhibitörü dahil kimyasal ajanların neden olduğu DNA hasar cevabının (DDR) düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Son yapılan çalışmalar NKX3.1'in AR aracılı DNA hasarı bağlamında homoloji bazlı DNA onarımı için gerekli proteinler ile etkileşerek TMRSS2: ERG genetik yeniden düzenlemelerini baskıladığını göstermiştir (Bowen C et al., 2015). PC3 ve LNCaP hücrelerinde NKX3.1'in aşırı ekspresyonunun, DNA çift zincir kırıkları için bir belirteç olan γ H2AX odaklarında anlamlı bir düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (Bowen C et al., 2013).

H_2O_2 aracılı DNA hasarı, Ser/Thr protein kinaz ATM'nin NKX3.1 ile etkileşimini teşvik eder ve Tyr222 üzerinden NKX3.1'in hızlı fosforilasyonunu indükler. Tyr222 üzerinden NKX3.1'in fosforile olması, ATM'nin N-terminusu ile etkileşimi için gereklidir. ATM'nin NKX3.1 homeodomain ile etkileşimi ATM fosforilasyonunu teşvik ederek aktif, fosforile edilmiş ATM (p-ATM) formunu üretir. Bu gözleme dayanarak, DDR sırasında NKX3.1'in p-ATM birikimini azalttığı söylenebilir. Aktive edilmiş ATM daha sonra NKX3.1'i homeodomain bölgesinde bulunan Thr134 ve Thr166 kalıntılarından fosforile ederek degradasyonunu tetikler (Bowen C et al., 2013). NKX3.1 fosforilasyonu ve kararlı durum seviyesi bu nedenle DDR ve prostat kanseri hücrelerinin G1/S geçişinde önemli bir rol oynar (Erbaykent-Tepedelen B et al., 2011). DNA hasarı onarım sürecindeki bu karmaşık mekanizma içerisinde, NKX3.1'in hücre içi ömrü prostat kanseri hücrelerinde DDR'nin düzenlenmesinde kritik olabilir. Oksidatif hasarın ve disfonksiyonel DDR'nin prostat kanseri ve prostat kanserinin belirtileri olduğu düşünüldüğünde, bu bulgular bu patolojilerde NKX3.1'in rolünün anlaşılmasına yönelik önemli bilgiler sunmaktadır. Son zamanlarda, genom

bütünlüğü bakımından incelendiğinde, NKX3.1'in üstlendiği rollere ilişkin elde edilen kanıtlar, genomdaki NKX3.1 bağlanma bölgelerinin global analizlerinden ortaya çıkmıştır. NKX3.1 hedef gen ürünlerinin yolak analizleri, NKX3.1 bağlanma bölgelerinin hem in silico tanımında hem de kromatin immünopresipitasyon ürünlerinin derin sekanslarında tanımlanmış kromozom bütünlüğünde yer alan genler için güçlü bir zenginleşme göstermiştir (Thangapazham R et al., 2014).

2.3.4. NKX3.1'in Kararlılık ve İşlevlerinin Yapısal Belirleyicileri

NKX3.1'deki yapısal motifler protein-protein ve protein-DNA etkileşimine aracılık etmede ve NKX3.1 fonksiyon ve stabilitesini etkilemede önemli bir rol oynar. NKX3.1 proteini yapısal olarak üç bölgeye ayrılabilir: N-terminal bölgesi (amino asitler 1–123), homeodomain (amino asitler 124–183) ve C terminali kuyruğu (amino asitler 184–234). Bu bölgelerin her biri çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar geçirir ve NKX3.1 biyolojisinde, NKX3.1'in önemli roller üstlenmesine imkan veren eşsiz özelliklerin ortaya çıkmasını sağlar (Padmanabhan et al., 2016).

NMR analizleri NKX3.1'in N-terminal alanı ve homeo alanı arasındaki moleküller arası etkileşimleri ortaya çıkarmıştır. NKX3.1 N-terminal alanı içerisindeki düzensiz esnek asidik motif (amino asitler 85-96) ve SRF etkileşimli motifi (amino asitler 99-105), homeodomainin stabilize edilmesine hizmet eden NKX3.1 homeodomain ile etkileşir. Bu intramoleküler etkileşim aynı zamanda NKX3.1 protein stabilitesini ve DNA bağlanmasını da artırır. N-terminal asidik motifi ayrıca iyi bir PEST (Pro-Glut-Ser-Thr) sekansı (81-93 amino asitleri) içerir. Protein kinazların yapısında bulunan PEST sekansındaki PST1 ve PIM1 fosforilat, NKX3.1 Thr89 ve Thr93 kalıntılarındaki meydana gelebilecek NKX3.1'i ubiquitinasyon ve 26S proteazom aracılı degradasyona götürecek olan süreçten korur. NMR analizi, bu bölgelerdeki fosforilasyonun N-terminal bölge ve homeodomain arasındaki dengeleyici intramoleküler etkileşimi arttırdığını göstermektedir (Ju JH et al., 2009). NKX3.1'deki farklı bölgeler arasındaki bu etkileşimler, birbirine yakın ve uzak alanlarda etkileşime giren farklı sinyalleme

modüllerini bir araya getirmeye ve böylece bunların koordineli bir şekilde çalışmasına izin verebilir. NKX3.1 N-terminalinin de TOPORS ile etkileşimde önemli olduğu gösterilmiştir. Bu etkileşimin gücü, homeoalanın dahil edilmesiyle daha büyük bulunmuştur. Evrimsel olarak korunan homeodomain yapısı, sarmal dönüm motifi oluşturan 60 aminoasitten meydana gelmektedir (Guan B et al., 2008). Homeodomainler yüzlerce transkripsiyon faktöründe bulunmuştur ve DNA'ya bağlanmayı tetiklemeye önemlidirler. NKX3.1 homeodomain amino asitleri 124-183'ü kapsamaktadır ve NKX3.1'in DNA'ya bağlanmasını mümkün kılmak yanı sıra çeşitli şekillerde etkileşimde olduğu proteinler ile ilişkisini düzenlediği bilinmektedir.

Homeodomain ayrıca nükleer lokalizasyon sinyalini de içerir, bu NKX3.1'in transkripsiyon faktörü olarak iş görmesinde kritik öneme sahiptir. Homeodomain içinde çeşitli uyarılara yanıt olarak hücrelerde NKX3.1 seviyelerini düzenlemeye yardımcı olan birkaç post-translasyonel modifikasyon tanımlanmıştır. Örneğin, DNA hasarına tepki olarak Thr134 ve Thr166'da fosforilasyon, NKX3.1 devir hızını tetikler. PIM1 inhibisyonuna yanıt olarak NKX3.1 devir geçişinde Lys182'in kritik öneme sahip olduğu belirlenmiştir bu da muhtemelen ubiquitinasyon yeri olarak davranmasından kaynaklanır.

NKX3.1'in C-terminal kuyruğunun (amino asitler 184–234) degradasyonu, C-terminalindeki 50 amino asidin bulunduğu yerde, NKX3.1 yapısının düzenlenmesinde önemli olan elementlerin varlığını düşündüren stabil bir izoformu oluşturur.

Ayrıca TNF- α ve IL-1 β tedavisine yanıt olarak, NKX3.1'in degradasyonu için C-terminal alanı varlığının gerekli olduğu bulunmuştur (Markowski MC et al., 2008). İlginç bir şekilde, daha önce PDEF ile etkileşime aracılık ettiği gösterilen korunmuş C-terminal kuyruğundaki 21 amino asitin (amino asitler 213- 234) degradasyonu, NKX3.1'in verimli olarak ubiquitinlenmesini sağlarken, proteazom aracılı bozulmaya direnç gösteren bir izoformunu ortaya çıkarmıştır. Bu bölgenin ayrıntılı sistematik analizi, NKX3.1 C-terminalindeki 21 amino asitin, 26S proteazom

aracılığıyla ubikuitin-bağımsız substrat döngüsüne aracılık eden portatif bir degran olarak işlev gördüğünü ortaya koymuştur. İlginç bir şekilde, DNA hasarı Tyr222'de fosforilasyona neden olsa da, bu kalıntı alanine (T222A) dönüştüğünde, normal büyüme koşulları altında NKX3.1 devrinin değişmediği tespit edilmiştir (Rao V et al., 2012). Proteinler içindeki düzensiz bölgelerin proteazom tarafından parçalanması için tanım bölgesi olarak hizmet ettiği bilinmektedir. Bu yapısal özelliğin sürdürülmesinde, 21 amino asitlik C terminali bölgesindeki prolinin kritik olduğu speküle edilebilir.

NKX3.1'in prostat spesifik ekspresyonu ve tümör süpresör rolü, prostat kanserinde hedefe yönelik tedavi için mükemmel bir fırsat sağlar. Son on yılda NKX3.1 protein stabilitesini düzenleyen faktörlerin anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydetilmesine rağmen, değiştirilmiş NKX3.1 protein stabilitesinin prostat kanseri başlangıcını veya ilerlemesini etkileyip etkilemediği belirsiz kalmıştır. İnflamasyonun hastalığın erken evrelerinde rol oynadığı düşünülürse, değişmiş protein stabilitesinin bazı durumlarda hastalığın erken tezahürüne katkıda bulunabileceğine inanılabilir. Bununla birlikte, NKX3.1 devrinin düzenlenmesinde kritik olan birçok bileşenin bulunması, prostat kanserinde NKX3.1'in yeniden düzenlenmesi için yeni terapötik yollar açmıştır.

2.4. Kaderin Aracılıklı Hücre-Hücre Bağlantıları: Adezyon Yapısı ve Sinyalizasyon

Kaderinler, hücreler arasında ki bağlantıları Ca^{2+} bağımlı bir şekilde modüle ederek doku organizasyonu ve morfogenezinde merkezi rol oynayan, transmembran hücre yüzeyi glikoproteinlerinden oluşan (100'den fazla) büyük bir gruba temsil eder. Kaderin süperailesi klasik ve klasik olmayan kaderinler olarak gruplandırılabilir (Hulpiao P and Redies CM , 2009). Farklı kaderin türleri farklı dokularda ifade edilir ve farklı işlevleri gerçekleştirir. E-kaderin doku yapısını belirlemede önemli rol oynar ve genellikle epitelyal kaynaklı hücrelerde bulunur. Nöronal kaderin olarak da adlandırılan N-kaderin, sinaptik kavşakların korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Tanaka H et al., 2000) ve nöronlarda, kalpte, iskelet kasında

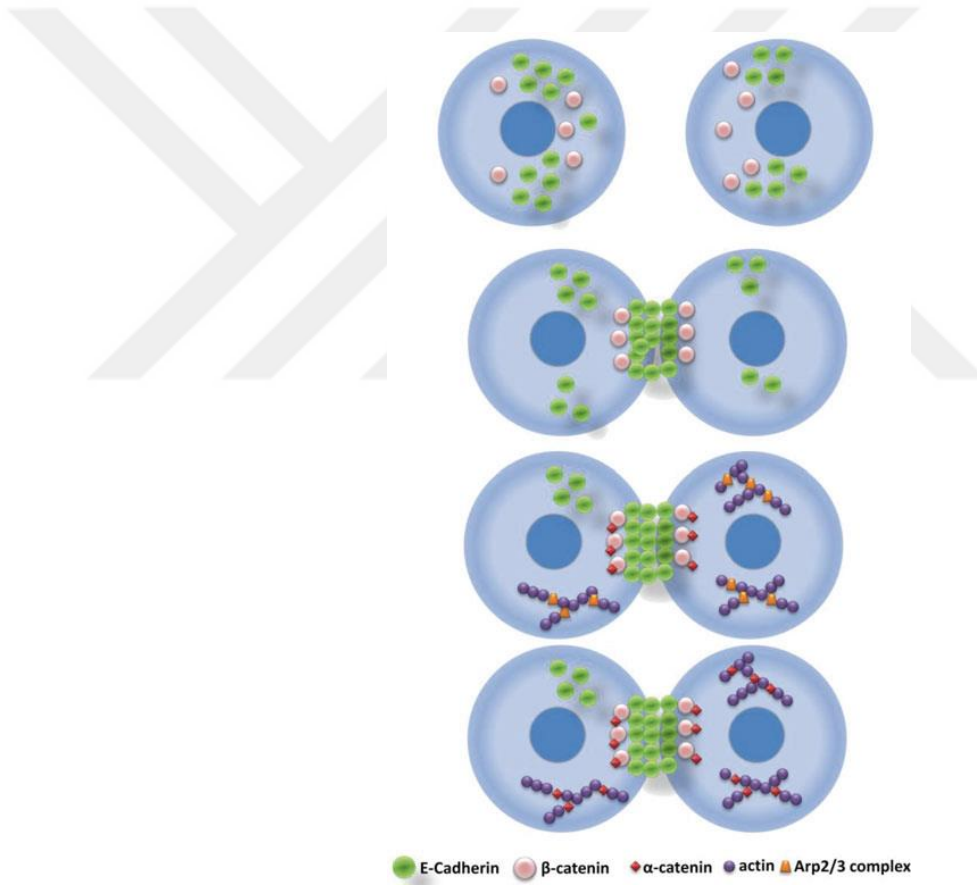
ve fibroblastlarda bulunur. N-kaderin aracılı hücre-hücre iletişimi, embriyonik gelişim sırasında çok önemli bir rol oynar (Takeichi M, 1990). P-kaderin meme kanseri hücrelerinde migrasyon ve invazyonun artmasından sorumludur ve tümör saldırganlığı ile ilişkilendirilmiştir (Falagas ME et al., 2007) P-kaderin genellikle plasenta, epidermis ve meme epitelinde bulunur. Vasküler endotelial kaderin olarak da isimlendirilen VE-kaderin, endotel hücrelerinde bulunur, damar geçirgenliği ve vasküler yeniden biçimlenmede önemli rol oynar ve TGF- β sinyali tetikleyerek tümör hücre çoğalmasını ve invazyonunu teşvik eder (Rezaei M et al., 2012). Hücre iskeletine bağlı olan E, N ve VE kaderinlerine karşın T-kaderin, hücre iskeleti ile bağlı değildir. T-kaderin migrasyon ve fenotipik değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (Rubina K et al., 2005). Genellikle nöronal hücrelerde ve kaslarda bulunur. Tüm kaderinler arasında en uzun ekstrasellüler domaine sahip olan Fat kaderin, epitel dokularda ve merkezi sinir sisteminde bulunur. Hücre çoğalmasını ve düzensel hücre polaritesini düzenler (Takuji T, Masatoshi T 2005). Son olarak, kaderin süper ailesinin en büyük alt ailesi olan proto-kaderinler, omurgalıların gelişimi sırasında doku morfogenezisi ve nöronal devrelerin oluşumu için gerekli hücre-hücre iletişimini kolaylaştıran kaderin türüdür.. Ek olarak, proto-kaderinlerin meme kanserinde tümör baskılayıcı gibi davrandığı gözlemlenmiştir (Yu J et al., 2009).

Klasik kaderinler 5 ekstrasellüler domain (EC1-EC5) ve ardından tek geçişli transmembran domaininden oluşur. Ekstrasellüler domain, Ca^{2+} konsantrasyonuna duyarlıdır ve Ca^{2+} kaybı, E-kaderin'in ekstrasellüler domainine esneklik kazandırır ve Ca^{2+} 'de artış ile ekstrasellüler domain daha sert hale gelir (Courjean O et al., 2008).

Bireysel kaderin moleküllerinin EC1 domainleri arasındaki homofilik bağlanma hareketleri, etkileşimlerinin spesifik olmasına katkı sağlamaktadır ve bunu destekleyen bazı ilginç veriler bulunmaktadır. İlk olarak, iki farklı kaderin türünü ifade eden bir hücre popülasyonunda, aynı kaderin agregatına sahip hücreler birlikte toplanır ve böylece iki hücre popülasyonunun sınıflandırılmasını sağlar (Nose A. et al., 1990). İkincisi, aynı kaderinin farklı seviyelerini ifade eden bir hücre popülasyonunda, hücreler protein seviyelerine dayalı olarak ayrılırlar. Homofilik etkileşimlerden çok daha zayıf

olan heterotipik etkileşimlerin, N-kaderin ve R-kaderin ile N-kaderin ve E-kaderin eksprese eden hücreler arasında olduğu bildirilmiştir (Katsamba P et al., 2009). Bu zayıf etkileşimler, bir hücrenin kendisinden farklı karaktere sahip olan diğer hücrelerin bulunduğu farklı dokulara geçişine aracılık edebilir.

Şekil 3’de iki ana bileşenden oluşan E-kaderin aracılı hücre-hücre bağlantılarının yapısı gösterilmektedir. β -katenin, α -katenin ve E-kaderin arasında köprü görevi görürken; α -katenin, β -katenin ile aktin yapıları hücre iskeletini birbirine bağlar.



Şekil 2.3. E-kaderin İlişkili Hücre-Hücre Adezyonu. E-kaderin aracılıklı hücrelerarası bağın oluşması, yeterli adezyon potansiyeline sahip (yeterli miktarda E-kadherin ve β -katenin) iki hücre temas ettiğinde başlar. İki hücre temas ettiğinde (yani hücreler arasındaki temas yüzey alanı sıfır olmadığında) her iki hücredeki E-kaderin de temas yerine yerleşmeyi başlatır ve E-kaderin esaslı homofilik bağlanma meydana gelir. Homofilik bağın oluşmasının ardından β -katenin, E-kaderinin intraselüler domanine yakın bir yere lokalize olmaya başlar ve sonunda E β kompleksini oluşturur. E β yakınında α -katenin lokalizasyonu artar. Arp2/3

kompleksi α -katenin ile yer değiştirir, artmış lokasyona bağlı olarak da α -katenin konsantrasyonundaki artış, E β 'ya dayalı hücre-hücre birleşimindeki aktin ağı oluşumunu bozar (S.Kumar and Sh.Senç, 2015).

β -katenin dinamiğinin kontrolü, diğer birçok sinyal molekülünün kaderin aracılı hücre-hücre adezyonlarının kontrol edilmesini sağlayan temel mekanizmalardan biridir (Ratheesh A, Yap AS , 2012). Örneğin, β -katenin'in JNK yoluyla fosforilasyonu hücre-hücre adezyonunun bozulmasına neden olur (Lee M-h et al., 2009). Ayrıca β -katenin sayesinde kaderin-bağlanma kinetiği, önemli kanser sinyal yollarından biri olan Wnt sinyal yolağı ile bağlanır.

2.4.1. E-kaderin Aracılıklı Hücre Adezyonunun Yapısı ve Dinamikleri

E-kaderin bazlı tutunma oluştuğunda, E-kaderinin intrasellüler alanı etrafında β -katenin konsantrasyonunda hızlı bir artış meydana gelir. Daha sonra E-kadherin- β -katenin (E β) bağlantısı oluşur. Oluşan bu kompleks daha sonra α -katenin düzeyinde lokal olarak artışa neden olur. Kritik bir konsantrasyona ulaştığında α -katenin, aktin ağına bağlanmak üzere aktin dallanma molekülü Arp2/3 ile yarışmaya başlar. α -kateninin konsantrasyonu daha da arttığında, aktin ağı içindeki Arp2/3 kompleksinin yerini almaya başlar. α -katenin aktin ağına bağlandığında o bölgede aktin polimerizasyonunu durdurur, aktin dinamiklerinde ve hücre göçü gibi bağımlı süreçlerde pertürbasyonlara neden olur. E-kaderin, α ve β -katenin dışında hücrelerarası iletişimle ilişkili başka bir protein olan p120 ile de etkileşime girer. E-kaderin aracılıklı hücre-hücre adezyonunda, p120-katenin birlikteliğindeki p120'nin katkısı çok net değildir ancak, daha güçlü hücre-hücre tutunmasının olması için kaderinin desteğini arttırmada önemli rol oynamaktadır (Davis M et al., 2003).

2.4.2. Kanserde Kaderinlerin Rolü

Kanserde kaderinlerin rolü üzerine yapılan çalışmalar, tümör hücrelerinin davranışını etkilemek üzere birden fazla kaderinin rol aldığını göstermiştir (Jeanes A et al., 2008). Kanserlerin çoğunluğu epitel dokularında ortaya çıktığı için E-kaderinin ekspresyonu ve/veya hücre-hücre birleşimindeki lokalizasyonu, kanser progresyonuyla ilişkili kaderin disfonksiyonu kanser vakalarında sıklıkla değişir (Oikawa T., et al., 2013). Bu hem hücre hatlarında hem de hayvan modellerinde gösterilmiştir. Epitel hücrelerinde E-kaderin proteininin (gen seviyesinde veya protein seviyesinde) baskılanması hücrelerarası tutunmanın bozulmasına neden olur ve EMT'ye yol açar. Aksine, E-kaderinin aşırı ekspresyonunun, EMT'yi ve kanser progresyonunu kontrol altına almanın yollarından biri olduğu ön görülmüştür (Tripathi V, et al., 2014). Rac, JNK, WNT yolaklarının aktivasyonunun E-kaderin bazlı hücrelerarası tutunmanın bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir (Heuberger J et al., 2010). Hücreler arası iletişimin engellenmesi, epitel fenotipine sahip hücreleri mezenkimal fenotipe sahip olan hücrelere dönüştüren bir dizi olayı tetikler. Bu değişen hücrelerin migrasyon potansiyeli, proliferasyon hızı, doku bölgesinden kaçma eğilimi yüksektir ve düşük ölüm oranına sahiptirler (Hanahan D, Weinberg R, 2011). Ayrıca, bir popülasyondaki bir hücrenin, hücre-hücre tutunmasının bozulmasının, tüm popülasyonda “EMT dalgası”nın oluşmasına yol açabileceği de gösterilmiştir. Adezyonun bozulması da ECM özelliklerinin değişimine neden olabilir. Örneğin meme kanseri hücre hattı MCF-7'nin ligand yoğunluğundaki artışın hücre adezyonunu olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Kumar S et al., 2014). Tüm bu sonuçlar, E-kaderin ifadesi ile kanser progresyonu arasında ters bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Değişen E-kaderin sinyali kanser progresyonunu çeşitli şekillerde etkiler. Birkaç araştırmada epitel hücrelerindeki hücre adezyonu ile proliferasyon arasında sıkı bir ilişki olduğu belirlenmiştir. E-kaderine dayalı hücre-hücre adezyonlarının bozulması, hücre proliferasyonunu artırarak kanser büyümesini indükleyebilir. Liu ve arkadaşları Rac1'i hücre-hücre adezyonunu ve hücre proliferasyonunu birbirine bağlayan ara molekül olarak

belirlemişlerdir (Liu WF et al., 2006). Aynı çalışma, E-kaderine dayalı hücre adezyonu gücünün populasyon yoğunluğuna duyarlı olduğunu, bazı orta yoğunluktaki populasyonlarda maksimum hücre adezyonuna bağlı çoğalmanın olduğunu göstermiştir.

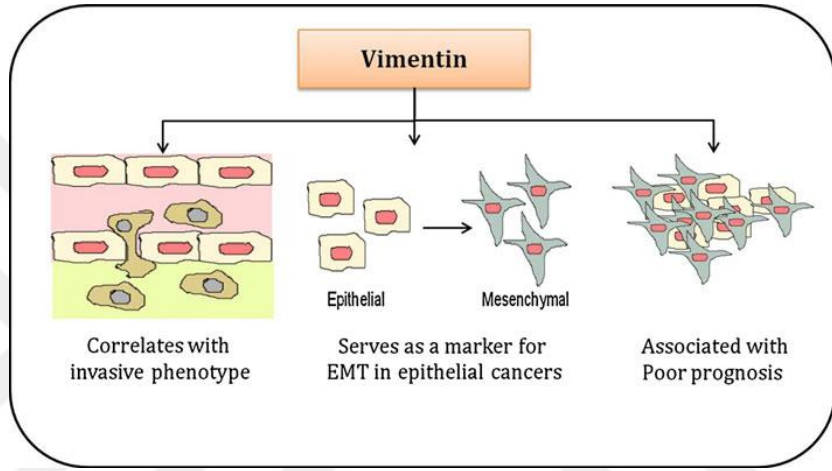
E-kaderinin baskılanması durumunun kanser progresyonu ile ilişkili olmasına rağmen, E-kaderin yıkımının tümörögenezi indüklemek için yeterli olmadığını belirtmek de önemlidir. Bunun yerine, E-kaderin kaybı genellikle kaderin-anahtarlama olarak adlandırılan N-kaderinin ekspresyonu ile ilişkilendirilir. E-kaderinin N-kaderine geçişi kanser hücrelerindeki EMT ile ilişkilidir (Tiwari N, et al., 2012), bu da daha sonra hücrede kanser ilerlemesini destekleyen birçok fenotipik değişikliği beraberinde getirir (Hirohashi S, 1998). Meme epitel hücrelerinde N-kaderinin aşırı ekspresyonu, E-kaderin varlığında bile yayılmayı indükleme yeteneğine sahiptir. Bu sonuçlar prospektif terapötik hedef olarak N-kaderini etkilese de, nöroblastom hücrelerinde N-kaderin supresyonunun metastatik yayılım ile korelasyon yaptığını öne süren çelişkili sonuçlar gözlemlenmiştir (Kotb AM et al., 2011).

2.5. Vimentinin Kanser İle İlişkisi

Ara filament proteinler ailesinin önemli bir bileşeni olan vimentin, 57-kDa ağırlığında, normal mezenkimal hücrelerde yaygın olarak eksprese edilen ve yüksek oranda korunmuş proteinlerinden biridir. Vimentinin hücresel bütünlüğü muhafaza ettiği ve strese karşı direnç sağladığı bilinmektedir. Vimentin, PKa, gastrointestinal tümörler, merkezi sinir sistemi tümörleri, meme kanseri, malign melanoma ve akciğer kanseri dahil olmak üzere çeşitli epitelial kanserlerde aşırı eksprese edilir. Vimentinin kanserdeki aşırı ekspresyonu, hızlandırılmış tümör büyümesi, invazyon ve kötü prognoz ile iyi bir korelasyon gösterir.

Pankreatik prekürsör hücreleri, Sertoli hücreleri, nöronal prekürsör hücreler, dev trofoblast hücreleri, fibroblastlar, kan damarlarını kaplayan endotelial hücreler, renal tübüler hücreler, makrofajlar, nötrofiller, mesangiyal hücreler, lökositler ve renal stromal hücreleri dahil olmak üzere

çok çeşitli hücre tiplerinde vimentin ekspresyonunun olduğu bildirilmiştir (Carter V et all., 2005) Vimentin proteininin, epitelyal hücrelerin şekillerini dramatik olarak değiştirmesine ve artan motiliteye sahip olmalarına neden olan bir mezenkimal fenotip elde ettikleri hücresel bir yeniden programlama işlemi olan EMT'nin (Thiery JP , 2002), kanonik bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu süreçte hücre epitelyal fenotipten mezenkimal ya da fibroblast fenotipine doğru yeniden programlanır.



Şekil 2.4. Vimentinin kanserdeki rolü. Vimentin'in aşırı ekspresyonu, sıklıkla kanser hücrelerinin artan migrasyon/invaziv kapasitesi ile ilişkilidir. Çoğu zaman vimentin, diğer bilinen işaretleyicilerle birlikte epitelyal-mezenkimal geçiş için belirteç olarak kullanılır. Birçok kanserde vimentin aşırı ifade edilir ve kötü prognozun bir göstergesi olarak kullanılır.

2.5.1 Vimentinin Yapısı ve Regülasyonu

2.5.1.1 Vimentin Geni, Transaktivasyonu ve Epigenetik Modifikasyonu

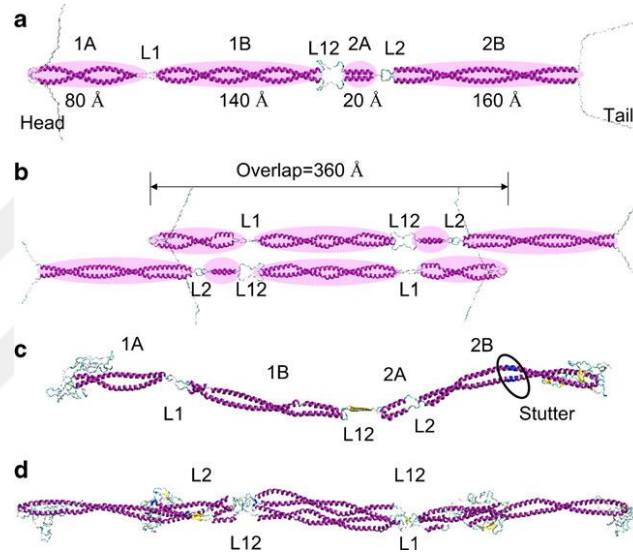
Vimentin, kromozom üzerinde 10p13'de bulunan tek bir gen tarafından kodlanır. Başlangıçta vimentin promotorunun vimentin ekspresyonunu düzenleyen üç elementten oluştuğu gösterilmiştir. Daha sonra, insan vimentin promotoru içinde birkaç *cis*-elementi ve ilişkili faktörler tespit edilmiştir, bu da vimentin geninin karmaşık bir kontrole tabi olduğunu düşündürmüştür. Vimentin promotorunda bulunan ek unsurlar; TATA kutusu, sekiz adet olası

GC kutusu (Rittling SR, Baserga R, 1987), NF- κ B bağlanma bölgesi, AP-1 bağlayıcı bölgeler , PEA3 bağlayıcı bölge, Sp/XKLF bağlama bölgesi ve ZBP-89 bağlayıcı bölgelerini (Zhang X et al., 2003) içerir.

β -katenin/TCF'in Vimentin geni promotorunun transkripsiyonel başlangıç bölgesinden 468 bp bölgesine bağlanması ve böylece tümör hücresinin invaziv potansiyelini artırması ile vimentinin transaktif olabildiği gösterilmiştir (Gilles C, et al., 2003). Bağışıklık ve iltihaplanma sürecini düzenleyen önemli bir protein olan NF- κ B'nin de EMT sürecini düzenlemede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir ve mezenkimal hücrelerde NF- κ B inhibisyonunun EMT sürecini tersine çevirebileceğini düşündürmektedir (Min C et al., 2008). NF- κ B, EMT'nin hem aktivasyonu hem de kontrolünde önemlidir. Vimentin, EMT işlemi sırasında aşırı ifade edilmektedir ve NF- κ B, vimentin promotoruna bağlanan transkripsiyon faktörlerinden birisidir. Bundan dolayı, vimentinin aşırı ekspresyonunun, kanser hücrelerinde NF- κ B'nin aktivasyonundan kaynaklandığını söylemek olasıdır. Ayrıca TGF β 1 yanıt elementinin, vimentin promotorunun aktive protein kompleksi-1 bölgesi içinde bulunduğu, miyoblastlar ve miyotüplerdeki vimentin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Wu Y et al., 2007).

Vimentin geninin bir de epigenetik modifikasyon hedefi olduğu gösterilmiştir. Gelişmiş kolorektal karsinomlarda sıklıkla metillenmektedir. Kolorektal hücrelerde vimentin transkripsiyonunu aktive etmek için yeterli olduğu düşünüldüğünde, kolorektal karsinomun saptanması ve izlenmesi için incelenmesi önerilmiştir (Shirahata A et al., 2009). Kolon kanseri hücrelerinde vimentin transkripsiyonunu aktive etmek için DNA demetilasyonu yeterlidir. Ayrıca transkripsiyon faktörü ZBP-89'un, HDAC1 vimentin promotoruna yönlendirdiği ve bunun da vimentin ekspresyonunda bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Wu Y et al., 2007). Bu çalışmalar, belirli bir hücre tipinde vimentin ekspresyonunu düzenleyebilen endojen transkripsiyonel aktivatörlerin veya baskılayıcıların çoğunlukta olduğunu kanıtlamakta ve bu faktörlerin hücre göçü sırasında meydana gelen EMT ile ilişkili olayları düzenlediğini açıkça göstermektedir.

Vimentin protein yapısı yüksek ölçüde korunmuştur; bir “ α -sarmal çubuk” alanına hemde onu çevreleyen, “ α -sarmal olmayan”, baş (77 kalıntı) ve “kuyruk” domaininden (61 tortu) oluşan N ve C-terminal uçlarından oluşmaktadır (Goldie KN et al., 2007). Birlikte bu moleküller paralel olarak ve yan yana birleşerek, tüm IF ailesi proteinleri için temel yapı bloğu olan “çift kıvrımlı tel” yapısını oluştururlar (Şekil 2.5). Çift kıvrımlı tel yapısındaki α -heliks alanı, yüksek kararlı polimerlerin oluşumuna katkıda bulunur, bu da stabilite ve integral proteinlerin fosforilasyon durumu tarafından kontrol edilir (Ku NO et al., 1996).



Şekil 2.5. Vimentin dimerinin (a) ve vimentin tetramerinin (b) moleküler yapısının şemaları. Grafik, çeşitli bölümleri ve bağlayıcı alanları, ayrıca baş ve kuyruk alanını tanımlayan etiketleri içerir. Panel c ve d, dimer ve tetramerin dengelenmiş yapılarını göstermektedir (Qin Z et al., 2009).

2.5.1.2. Vimentinin Fosforilasyonu.

Vimentin, in vitro çalışmalarda bir dizi kinaz için mükemmel bir substrat görevi görmüştür ve vimentin üzerindeki çoklu fosforilasyon alanları tanımlanmıştır. Vimentin fosforilasyonu, IF yapısının ve birkaç sinyal yolunun düzenlenmesi de dahil olmak üzere fonksiyonel düzenlenme ile ilişkilidir. Örneğin, vimentin, S38 ve S72 bölgeleri üzerinden protein kinaz A tarafından fosforile edilir ve bu da in vivo filament oluşumunun azalmasına neden olur ancak sonraki çalışmalarda fosforilasyonun öncelikle vimentin

IF'lerinin demontajını düzenlediğini göstermiştir (Eriksson JE et al., 2004). p21 ile aktive olan kinazın, vimentini farklı bölgeler üzerinden fosforile ettiği ve yapısal olarak yeniden düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Goto H et al., 2002). Mitotik süreçlerde önemli regülatör olan Aurora B kinazın, sitokinetik süreçte, vimentin fosforilasyonu ve vimentin filament segregasyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Goto H et al., 2003). Protein fosfataz 2A'nın vimentin ile birleşerek fosforilasyonunu önlediği, protein fosfataz 2A'nın interfaz IF dinamiklerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Turowski P et al., 1999). Hücre büyümesi ve farklılaşmasının kontrolünde merkezi rol oynayan bir sinyal transdüksiyon protein kinazı olan Src'nin, vimentin ekspresyonunu aktive ettiği bulunmuştur. Araştırmalarda insan prostat kanseri hücrelerinde vimentinin ve C-src kinaza fiziksel olarak bağlanmış olduğu, fonksiyonel olarak çiftlik oluşturduğu belirlenmiş ve vimentinin C-src aracılığıyla, E-kaderin/ β -katenin kompleksini etkileme olasılığı olduğu vurgulanmıştır (Juncheng Wei. 2008).

2.5.1.3. Vimentinin Post-translasyonel Modifikasyonları

Vimentin işlevinin kontrol edilmesinde post-translasyonel modifikasyonlar önemli rol oynar ve hücre-ve dokuyaspesifiktir. Bunlar sitrullinasyon, sumolasyon ve O-GlcNAc modifikasyonlarını içerir. Sitrullinasyon, arjinin kalıntılarının, peptidil arjinindeiminaz ile sitriline enzimatik olarak dönüştüğü bir translasyon sonrası modifikasyon çeşitidir (Van Venrooij WJ and Pruijn GJ, 2000). Vimentinin apoptoza yol açan makrofajlarda sitrülünlendiği ve bu sitrülünli vimentin antikollarının apoptotik materyalin uygunsuz şekilde imha edilmesi durumunda ortaya çıktığı gösterilmiştir (Vossenaar ER et al., 2004). Glial vimentinin O-GlcNAsilasyonunun, hiperfosforilasyonunu önlediği ve böylece vimentinin sabit/sert yapısını ve nöronal migrasyon için bir iskele sağlama yeteneğini korumaya izin verdiği öne sürülmüştür (Farach AM, Galileo DS 2008). Vimentin, aktive edilmiş STAT3'ün (PIAS3) protein inhibitörü ile stimülasyonu üzerine, çekirdeğin 354 bölgesinde sumolasyona uğradığı ve glioblastoma multiforme hücrelerinin yapısını ve hareketliliğini düzenlemek

için bu modifikasyonun gerekliliğinin öne sürüldüğü bilinmektedir (Liming Wang JZ et al., 2010).

2.5.2. Hücre Sinyalizasyonunda Vimentinin Rolü

Vimentin IF'leri, mezenkimal hücrelerin sitoplazmasında bulunur, hücre yapısı ve doku bütünlüğünü korur. Vimentinin çizelge 2.2'de görüldüğü gibi çok sayıda proteinle etkileşime girdiği ve çeşitli hücresel fonksiyonlara katıldığı bilinmektedir.

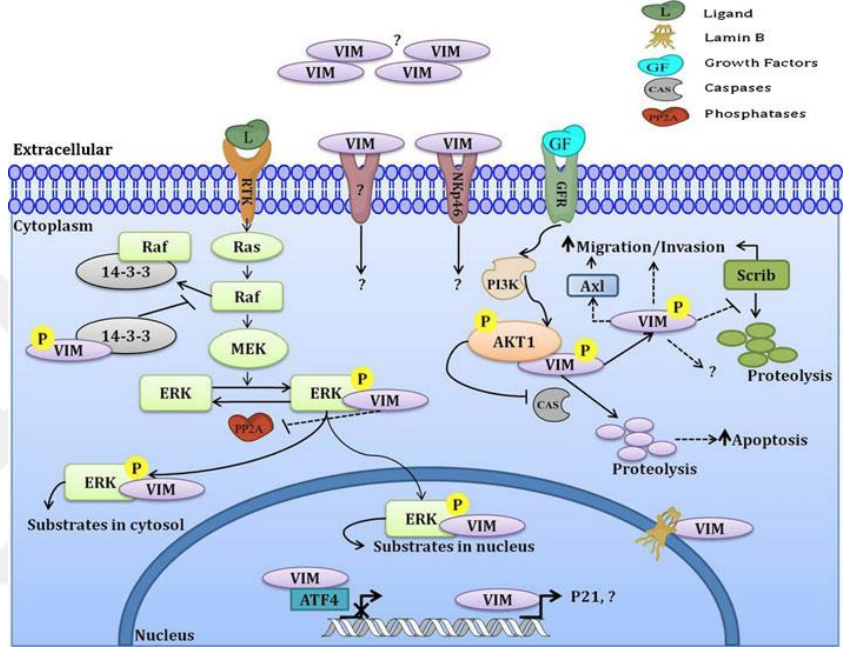
Çizelge 2.2. Vimentin ile etkileşime giren moleküller ve olası fonksiyonları (Satelli A. and Li S., 2011)

ETKİLEŞEN PROTEİN	FONKSİYON
TSGA10	Antijen sunan hücre(APC)lerin işlevini etkileme
AptA (A. phagocytophilum toxin A)	Memeli Erk1/2 mitojeni ile aktive olan protein kinazı aktive etme
Scrib	Hücre göçü ve toplanması
Rab9	Hücre içi lipid transportu
Caveolin-1	Transmigrating hücrelerinde caveolin-1 anterior polarizasyonu
Plectin	Sitoplazmanın entegrasyonu
IFAP-300	Lens hücresi farklılaşması
hsc70	Isı şoku genlerinin düzenlenmesi
Filamin	Hücre uzantılarının oluşumu
Alpha-crystallin	Gelişmiş vimentin agregasyonu

cGMP kinase	Vimentin fosforilasyonu
Yes kinase	Yes kinazın moleküler tetiklenmesi
Desmoplakin	Desmozom ile IF'lerin bağlanması
Periplakin	Hücrel lokalizasyona aracılık etme
Aktin içeren yapılar	Vimentin filament organizasyonu
hnRNP	Viral çoğalma
Uridine phosphorylase	Bilinmiyor
Formiminotransferase Cyclodeaminase	Golgi kompleksini IF hücre iskeleti ile entegre etme

Vimentin ayrıca, hücre sinyal molekülleri ve diğer adaptör proteinleri ile komplekslerin oluşumunu içeren diğer süreçlerde de yer alır (Şekil 2.6). Örneğin vimentinin, fosforile Erk ile etkileşime girerek onu defosforilasyondan koruduğu tespit edilmiştir (Perlson E et al., 2006). Fosforile Erk bağının, vimentinin ikinci çift kıvrımlı tel alanına lokalize olduğu ve bu bağlanmanın kalsiyum bağımlı olduğu gözlenmiştir. Yumuşak doku sarkom hücrelerinde AKT1 kinazın fosforillenmiş vimentine bağlandığı ve böylece vimentini kaspaz ilişkili proteolizden koruduğu, bunun da artan motilite ve invazyona yol açtığı gösterilmiştir (Zhu QS et al., 2011). Fosforlanmış vimentinin, çok sayıda hücre sinyalleme ve hücre döngüsü işlemine katılan 14-3-3 proteinleri ile etkileştiği gösterilmiştir. Hücre göçünde yer alan Scrib proteini vimentin ile etkileşime girerek proteazomal degradasyondan korunur ve bu şekilde EMT sırasında vimentin upregülasyonunun Scrib'in stabilizasyonuna yol açtığı ve böylece de hücre migrasyonunu teşvik ettiği ve hücrelerin invaziv kapasitesini artırdığı öne sürülmektedir (Phua DC et al., 2009). Ek olarak vimentinin, reseptör tirozin kinaz Axl'in regülatörü olarak işlev gördüğü ve Axl ekspresyonunu

indükleyerek hücre göçünü arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, Slug ve Ras indüklü EMT değişikliklerinin vimentin upregülasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Vuoriluoto K et al., 2011). Vimentin, PI3K γ sinyallemesinin aşağı akım hedefi olarak bildirilmiştir, PI3K γ 'nın aktivasyonu etkin lökosit transendotelial migrasyonu için gerekli olan vimentin fosforilasyonu ile sonuçlanmaktadır (Barberis L et al., 2009).



Şekil 2.6. Vimentinin hücre sinyalindeki rolü. Sitosolde, vimentinin fosforillenmiş Erk ile etkileştiği ve fosfatazları inhibe ederek Erk fosforilasyonunu koruduğu ve bu proteinin hücre içinde uzun mesafelere gitmesine izin verdiği gösterilmiştir. Ayrıca vimentinin 14-3-3 proteinleri ile etkileşimi, 14-3-3-Raf kompleksinin oluşumunu önler ve böylece 14-3-3'in mevcudiyetini azaltarak birçok hücre işlemini düzenler. Ayrıca AKT1'in vimentini fosforile ettiği ve kaspaz kaynaklı proteolizden koruduğu gösterilmiştir. Bu nedenle serbestçe temin edilebilen vimentin, hücrelerin artan migrasyon ve invaziv kapasitesine yol açan süreçlere katılır. Çekirdekte, vimentinin p21 ekspresyonunu düzenlediği, ATF4 ve vimentin arasında oluşan kompleks ATF4 ile aktif transkripsiyonu önlediği gösterilmiştir. Ekstrasellüler olarak, vimentin-spesifik reseptörler henüz tanımlanmamıştır; bununla birlikte vimentinin, doğal öldürücü hücreler üzerinde olası bir reseptör olan NKp46'ya spesifik bir ligand olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. Raporların, vimentinin de salgılandığını göstermesine rağmen, ne salgılanmış proteinin işlevi ne de salgılama mekanizması açık değildir.

2.5.3. PKa'da Vimentinin Rolü.

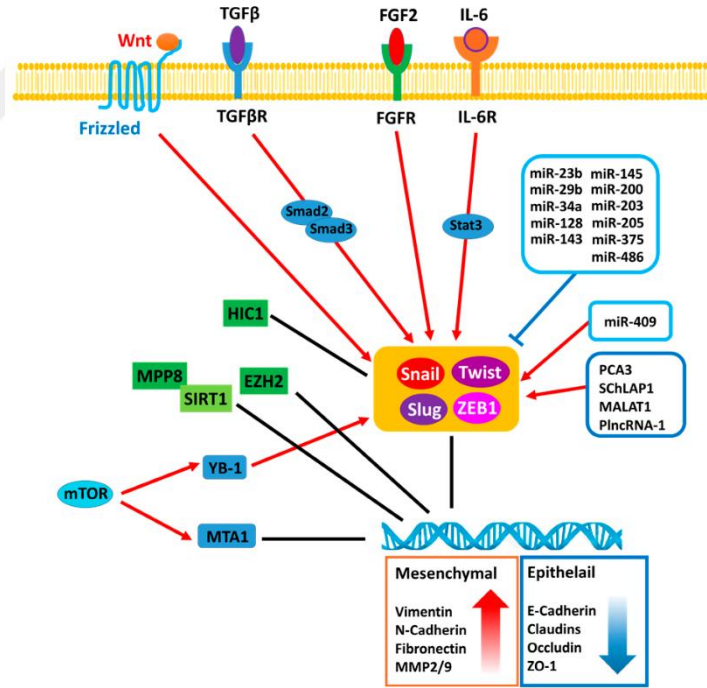
Prostat kanserinde vimentin esas olarak yetersiz farklılaşma gösteren prostat kanseri metastazlarında ve kemik metastazlarında saptanmıştır ve iyi veya orta derecede farklılaşmış tümörlerde neredeyse tespit edilememektedir (Zhao Y et al., 2008). Ayrıca vimentin ekspresyonu, hareketli prostat kanseri hücre hatları ile ilişkilidir ve PC-3 hücrelerindeki düşük regülasyonu, tümör hücresi hareketinde ve invaziv aktivitede önemli bir azalmaya yol açmaktadır (Zhao Y et al., 2008). Vimentin eksprese eden agresif tümörden türevlenmiş CL1 PKa hücre hattında vimentin ekspresyonunun deneysel olarak ortadan kaldırılmasından sonra, hücre invazyonunda anlamlı bir düşüş gözlenmiştir (Singh S et al., 2003). Ancak LNCaP hücrelerinde vimentin ekspresyonu indüklendikten sonra invazyonda bir değişiklik olmamıştır. Araştırmacılar vimentin ekspresyonunun, belirli olmayan diğer proteinlerle birlikte invaziv bir fenotip gelişimine katkıda bulunduğunu öne sürmüşlerdir. Vimentin inhibisyonu, yüksek oranda tümörojenik ve metastatik M12 alt hattının tümör büyümesini önemli ölçüde azaltmıştır (prostat epitelyal p69 hücre hattından türetilmiştir) (Zhang X et al., 2009).

Başka bir çalışmada, yüksek metastatik özellikte olan insan prostat epitelyal kanser hücre hattı PC-3M-1E8'de, aşırı vimentin ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Bundan dolayı vimentinin hücrenin invazivitesini modüle etmesindeki rolü, c-Src regülasyonu aracılığıyla E-kaderin/ β -katenin kompleksini düzenleme yeteneği ile ilişkilendirilmiştir. PKC ϵ 'nin vimentini fosforile ederek hücre motilitesini artırdığı bilinmektedir ve son zamanlarda PKC ϵ ablasyonunun prostat kanseri gelişimi ve metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir (Hafeez BB et al., 2011). Bu veriler PKC ϵ 'nin prostat kanseri hücrelerinde vimentin kaynaklı tümörojenik olayları önlemek için iyi bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.

2.6. PKa Gelişiminde EMT'nin Rolü ve Mekanizması

EMT orijinal olarak embriyo gelişimi sırasında hücre trans-diferansiyasyonu için kritik bir aşama olarak karakterize edilir ve karsinom

hücrelerinin mezenkimal hücrelerine dönüşümünde yüksek mobilite ve migrasyon yeteneklerine sahip olmaları nedeniyle, kanser hücrelerinin invazivliğini desteklemesiyle bilinir. EMT, polarize epitelyum tabakasında hücre-hücre veya ECM bağlarının bozulmasıyla ortaya çıkar. E-kaderin, epitel adezyon bağlantısının ana bileşenidir. EMT'yi başlatmak için önemli bir adım olarak görülen E-kaderin kaybı, hücreler arası mekanik iletişimin çökmesine yol açar. Buna karşılık, vimentin ve N-kaderin gibi kritik mezenkimal belirteçler ve çinko parmak proteinleri; Snail / SNAI1 ve Slug / SNAI2, bükümle ilişkili protein 1 (Twist 1-twist-related protein 1) ve çinko parmak E-box dahil olmak üzere birkaç E-kaderin, transkripsiyonel baskılayıcıya bağlanan homeobox 1 ve 2 (ZEB1 ve ZEB2 -zinc finger E-box-binding homeobox 1 and 2) proteinleri, EMT sırasında yüksek oranda yükselir (Şekil 2.7), gelişmiş hücre mobilitesinin mezenkimal fenotipinin oluşmasına yol açar.



Şekil 2.7. PKa'da EMT ile ilişkili düzenleyici mekanizmalar. MPP8: M-fazlı fosfoprotein 8; SIRT1: NAD-bağımlı deasetilaz sirtuin-1; HIC1: Kanser 1'de hipermetile; EZH2: Zeste homologu 2'nin arttırıcısı; YB-1: Y-kutu bağlayıcı protein 1; MTA1: Metastaz ilişkili protein1 mTOR: Rapamisin memeli hedefi; TGFβR: Dönüştürme büyüme faktörü beta reseptörü; FGFR: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü; IL-6R: İnterleukin 6 reseptörü;

Salyangoz: Çinko parmak proteini SNAI1; Sülük: Çinko parmak proteini SNAI2; ZEB1: Çinko parmak E-kutusu-bağlayıcı homeobox 1; Twist: Twist-ilişkili protein 1.

Primer karsinoma hücreleri, epitelyal karakteristiklerden mezenkimal benzeri fenotipe geçerken, intrinsik genetik ve moleküler değişikliklere veya ekstrinsik mikroçevresel uyaranlara yanıt verirken, çevresel stromaya ve daha sonraki vaskülatüre invazyona, sonuçta uzak metastatik bir bölgede kolonizasyona yol açar (Lee, J.M et al., 2006). Özellikle metastazdaki EMT'nin rolü, prostat kanseri dahil olmak üzere birçok kanser tipinde metastatik potansiyellerini ortaya çıkarmak için gösterilmiştir (Fan L et al., 2012), bu da PKa hastalarının dolaşım sistemindeki prostat kanseri hücrelerinde saptanan TGF- β ve EMT ile ilişkili genler arasında anlamlı korelasyon ile desteklenir (Chen C.L et al., 2013).

Bu konu üzerine yapılan bir çok çalışma, EMT transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunun, epitelyal hücrelerde kök hücre özelliklerinin ortaya çıkışını indüklediğini meme ve pankreatik kanser gibi çeşitli kanser türlerinde tümör başlatıcı hücre popülasyonunun ortaya çıkmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir (Wellner, U. et al., 2009). PKa'da yapılan bir çalışmada, N-kaderinin ErbB sinyal yolu ile c-Myc, Klf4, Sox2 ve Oct4 gibi kök hücre belirtecilerinin ifadesini artırarak prostat tümörü sferoid oluşumunu artırabildiği gösterilmiştir (Wang, M et al., 2016). Ek olarak, Semaphorin 3C'nin ektopik ekspresyonunun, normal prostat epitelyal hücrelerindeki invazivliği ve sapmayı eş zamanlı olarak arttırabildiği ayrıca N-kaderin ve vimentin gibi mezenkimal belirleyicilerin, CD44-negatif olanlara kıyasla CD44-pozitif popülasyonlarda yüksek ölçüde düzenlendiği bilinmektedir (Tam, K.J. et al., 2017).

2.6.1.PKa'da EMT'ye Yol Açan Sinyal Yolları

Tümör mikroçevresinin parakrin/endokrin sinyal iletimi aracılığıyla, karsinoma hücrelerindeki EMT'nin ortaya çıkarılmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Birçok hücre-hücre iletişiminden sorumlu olan hücre dışı sinyaller, PKa hücre davranışını reseptöre bağlı bir şekilde değiştirebilir. Prostatik stromal hücrelerde tespit edilen TGF- β , IL-6, FGF ve Wnt gibi

birçok peptid hormonlarının kanser ilerlemesi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (çizelge 2.3)(Yu S.H. et al., 2015).

TGF- β , PKa'daki en iyi karakterize edilen EMT indükleyicilerinden biridir. TGF- β ile ilgili yapılan *in vitro* çalışmalarında vimentinin, fibronektini indükleyerek ve E-kaderin seviyesini baskılayarak EMT'yi destekleyebildiği bilinmektedir (Chen, X.H. et al., 2015). TGF- β standart yolunun, Snail 1/2 veya ZEB1 gibi EMT transkripsiyonel faktörünün ekspresyonunu artırmada önemli bir rol oynadığı anlaşılmaktadır. İlginç bir şekilde bu proteinin ifadesi PKa örneklerinde E-kaderin ekspresyonu ile ilişkilidir (Yao B. et al., 2015). Kanonik yola ek olarak, PC3 ve DU145 gibi PKa hücre hatlarında TGF- β ile indüklenen Twist ifadesinin, STAT-3'ün standart yolu üzerinden aracılık ettiği görülmektedir (Hu, Q. et al., 2015).

PKa invazivliğine yol açan EMT indükleyicilerinden birinin de IL-6 olduğu bilinmektedir (Nguyen, D.P et al., 2014) ve PKa hastalarının metastatik örneklerinde yüksek seviyede bulunmuştur (Gu, L. et al., 2014). IL-6'nın susturulması E-kaderin ekspresyonunu artırabilmekte ve STAT3 yolu üzerinden vimentin ekspresyonunu azaltabilmektedir, bu da tümör invazyonunu *in vivo* olarak azaltmaktadır (Wu, C.T. et al., 2012). LNCaP hücre hatlarında IL-6'ın devamlı olarak hücre göçünü ve değişmiş mezenkimal morfolojiyi indükleyebildiği bilinmektedir. Mekanistik olarak IL-6, STAT3 yolu üzerinden Twist ekspresyonunu indükleyebilmekte ve fibronektin ekspresyonunun artmasına ve E-kaderin ekspresyonunun inhibe edilmesine yol açabilmektedir. IL-6'nın EMT üzerindeki benzer bir etkisi, BPH hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar vasıtasıyla bildirilmiştir (Rojas, A. et al., 2011).

Çalışmalardan elde edilen kanıtlar, FGF ailesinin PKa'de EMT ile ilişkili olduğunu göstermiştir. PKa hücre hatları kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalarda, FGF2'nin mezenkimal belirteçler olan N-kaderin ve vimentinin miktarını artırdığı ve E-kaderin epitelyal belirtecini azalttığı, böylece hücre invazyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Liu, C. et al., 2015). Mekanistik olarak, LNCaP hücrelerinden türetilen FGF9'un, prostatik stromal hücrelerden c-

Jun'a bağı TGF- β sekresyonunu aktive ettiği gösterilmiştir ki bu da LNCaP hücrelerinin EMT'sini parakrin olarak tetikler (Huang, Y. et al., 2015).

AR- MMP2/9 ve TMPRSS2 gibi hücre invazyonunun altında yatan birkaç proteazın ekspresyonunu indükleyebildiği bilinmektedir (Yang, Y. et al., 2013). Aksine, AR ablasyonunun EMT genlerini indüklediği gösterilmiştir. Mekanistik olarak AR, Snail geni promoter bölgesindeki yanıt elamanlarına doğrudan bağlanarak gen ekspresyonunu baskılar. Benzer şekilde, AR-negatif PKa hücre hatları PC3 ve DU145, androjene bağımlı PKa hücre hattı LNCaP'e göre daha yüksek mezenkimal gen ekspresyonu ve daha düşük epitelyal özellikler gösterir (Tran, N.L. et al., 1999). Hastadan türetilen ksenograft modeli kullanılmış olan çalışma, ADT(Androjen Deprivasyon Terapisi)'den sonra hem N-kaderin hem de vimentinin seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Wang, M. et al., 2015). ADT, AR varyantlarının varlığında kısmen EMT gen ekspresyonunu etkileyebilir (Ware, K.E. et al., 2014). Örneğin, AR-V7 gibi AR varyantlarından birinin, ZEB1 ve vimentin gibi mezenkimal genleri ve metastaza yol açan kök hücre markeri Nanog'u indüklediği gösterilmiştir (Sun, F. et al., 2014). Klinik olarak, yüksek dereceli PKa'da AR ve β -katenin arasında pozitif korelasyonun var olduğu biliniyor. Bu durum kesinlikle Wnt / β -katenin sinyalinin PKa ile ilişkili olduğunu ima etmektedir (Baruah M.M et al., 2016). Gerçekten de güçlü bir tümör baskılayıcı olan DAB2IP, β -kateninin bozulmasını kolaylaştırarak Wnt-indüklü EMT'yi bloke edebilir ve kanonik yolla E-kaderin ekspresyonunu arttırır. Wnt ailesi reseptörünün bir alt tipi olan Frizzled 8 (FZD8)'in yukarı regülasyonunun, PKa'nın kemik metastazı oluşumunu indüklediği bildirilmiştir (Li, Q et al., 2017). Osteoblasttan türevlenen, Wnt-indüklü salgılanan protein-1 (WISP1- Wnt-induced secreted protein-1), VCAM-1'in yukarı regülasyonu yoluyla PC3 ve DU145 invazyonunu kolaylaştırır (Tai, H.C. et al., 2014). Ek olarak, kanonik olmayan Wnt sinyalleme EMT'ye katkıda bulunabilir örneğin, yüksek dereceli PKa örneklerinde fazla miktarda Wnt5A, N-kaderin ve vimentin ekspresyonu bulunur ancak, E-kaderin ekspresyonunda bir değişiklik olmaz (Sandsmark, E. et al., 2017).

Çizelge 2.3. PKa'da EMT İlerlemesine Sebep olan Tümör Mikroçevresindeki Çözünür Faktörler

Çözünür Faktörler	EMT'deki Rolü	PKa Gelişimindeki Etkiler
TGF- β 1	Uyarıcı	İnvazyon, Göç, Metastaz, sferoid oluşumu
BMP	Uyarıcı	Sferoid oluşumu
IL-6	Uyarıcı	İnvazyon, Metastaz, Sferoid oluşumu, Tümör insidansı
FGF	Uyarıcı	İnvazyon, Metastaz
AR	Baskılayıcı	EMT Bastırma
AR çeşitleri	Uyarıcı	Metastaz
Wnt/ β -katenin	Uyarıcı	İnvazyon, Metastaz, Köklülük

Elde edilen kanıtlar, dış uyaranlara yanıt olarak sinyal iletim yolları arasındaki etkileşimin, metastatik CRPC'nin gelişimini yönlendirmek için kritik bir mekanizma olduğunu göstermiştir. EMT'nin başlatılmasında yer alan sinyal yolları çoğunlukla, hücre çoğalması ve metastazının artmasıyla sonuçlanan E-kaderinin baskılanmasına yol açar. Özellikle, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) -Akt sinyal yolağı, dışsal büyüme faktörü stimülasyonlarını hücre içi süreçlerle bütünleştirir. TGF- β , PI3K/Akt sinyal yolağı aracılığıyla E-kaderin / β -katenin komplekslerinin, aktin hücre iskeletinden ayrılmasıyla EMT'yi başlatabilir.

Fosforile olan α - veya β -katenin moleküllerinin E-kaderinden ayrılması, hücreler arası adezyonunun azalmasına, hücre göçü ve invazyonunun artmasına neden olur. Ayrıca, TGF- β tedavisi E-kaderin protein düzeyinin önemli ölçüde azalmasına yol açmakta ve buna ek olarak, kanser hücresi şeklinin epitelyal yapıdan iğ iplikli morfolojiye kadar dramatik değişimine neden olmaktadır. Aksine, PI3K-Akt sinyal düzenleyicisi olan

PTEN ise β -katenin defosforilasyonu yoluyla hücreler arası bağlantıların stabilizasyonunda rol oynar.

TGF- β uyarısı, β -kateninin PTEN'den ayrılmasına neden olur ve bu nedenle indirgenmiş β -katenin defosforilasyonu, PI3K ile indüklenen β ve α -katenin fosforilasyonunu kolaylaştırır, bu da hücreler arası birleşme yerinde E-kaderin/ β -katenin kompleksinin azalmasına ve daha fazla mezenkimal benzeri fenotipe dönüşümüne neden olur.

Prostatın tümör oluşumu sırasında, Akt'ın başka bir baskılanma efektörü olan memeli hedefi rapamisin (mTOR- mammalian target of rapamycin) kinazı kritik öneme sahiptir. mTOR'un hiperaktivasyonu, ilerlemiş PKa'nın yaklaşık % 100'ünde görülür (Kaarbo, M. et al., 2010). Ribozomal profillemeye yaklaşımını kullanan bir çalışmada, mTOR sinyalinin hücre çoğalması, metabolizması ve istilasına ile ilgili PKa genlerinin translasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir. Profil oluşturma sonuçlarına göre mTOR, YB-1 (Y-box binding protein 1), vimentin ve MTA1 (metastaz associated 1) dahil olmak üzere PKa invazyonu ve metastazında rol oynayan genleri translasyonel olarak düzenler (Hsieh, A.C. et al., 2012). Özellikle YB-1'in ektopik ifadesi Snail ve Twist'in translasyonel aktivasyonunu artırır, bu da E-kaderin ifadesinin baskılanması ve gelişmiş hücre göçü hareketliliğine yol açar. Aksine, YB-1 kaybı Twist, N-kaderin ve Snail gibi bazı mezenkimal faktörlerin önemli ölçüde azalmasına neden olur. MTA1, PKa invazivliğinde önemli bir rol oynayan kromatin remodeleridir. MTA1 transgenik *knock-in* fare modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada, murin prostat dokusunda MTA1 ve E-kaderin seviyesi arasında ters bir korelasyonun olduğu ve MTA1'in post-transkripsiyonel seviyede E-kaderinin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Klinik örnekler ve tümör modelini kullanarak yapılan çalışmalarda, yüksek agresif PKa'da MTA1'in belirgin bir yükselmesi ve MTA1 kaybının PKa invazyonu, kemik metastazı ve anjiyogenezini azalttığı gösterilmiştir (U-Ging Lo et al., 2017).

2.6.2. EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörleri

Snail, E-kaderin promotorunun E-box sekanslarına bağlanan çinko-parmak yapıya sahip bir proteindir (Batlle, E. et al., 2000). Meme kanseri, yumurtalık kanseri, kolorektal kanser ve PKa gibi malignitelerde Snail regülasyonunun anormal olduğu gözlenmiştir. Özellikle de hem enzalutamide dirençli PKa hücre hatlarında hem de yüksek metastatik PKa hasta örneklerinde Snail protein ekspresyonunda artış görülmüştür (Ware, K.E. et al., 2016). Snail'in ektopik ekspresyonu hem AR hem de AR varyantlarının artışına neden olur. Metastatik CRPC'nin yenilenmesinde Snail'in etkisi dikkate alındığında, PKa hücre hatlarında enzimutamid direncinin başlangıç sebebinin Snail olabileceği düşünülebilir. Baskılayıcı işlevine ek olarak Snail, PKa hücre hatlarında artmış motiliteye yol açan ürokinaz tipi plazminojen aktivatörünün (uPA) protein ekspresyonu ve enzim aktivitesini artırarak kanser metastazını kolaylaştırabilir (Randle, D.D. et al., 2013). Snail klauudin ve okludin genlerinin promoter aktivitesini baskılayarak ve transkripsiyon sonrası Zona occludin 1 (ZO-1) ekspresyonunu inhibe ederek sıkı birleşmeyi sağlayan birkaç protein bileşeninin ekspresyon seviyesini etkiler (Ohkubo, T and Ozawa, M, 2004). Genel olarak Snail'in EMT süreci ve hücre adezyon molekülleri üzerindeki etkisi, PKa hastalığının ilerlemesinde önemli düzenleyici rolünü ortaya koymaktadır.

Slug, PKa dahil birçok kanserde EMT'nin baskın düzenleyicisidir. E-kaderinin transkripsiyonel olarak baskılanmasını sağlamasının yanı sıra, PKa'da EMT'ye yol açan diğer faktörleri de düzenler. *In vitro* çalışmalarda Slug'un hem CXCL12 hem de CXCR4'ün regülasyonunu artırdığı ve PKa'nın yüksek düzeyde yayılmasına yol açan CXCL12 / CXCR4'ün sinyal alt akış hedef geni MMP9 üzerinde etki gösterdiği gösterilmiştir (Uygur B. and Wu W.S., 2011) ve bu da otokrin CXCL12'nin yukarı regülasyonunun Slug aracılı göç ve PKa invazyonu altında yatan kritik bir mekanizma olduğunu göstermektedir. Primer PKa'da Slug/SNAI2 gen ekspresyonu promotor metilasyonundan dolayı sıklıkla baskılanmış durumdadır; Slug ekspresyonu yüksek dereceli PKa ve lenf nodu metastazlarının invazyon cephesinde restore edilir veya yükseltilir (Esposito S. et al., 2015). Ek olarak, Slug KISS1

gibi çeşitli metastaz baskılayıcı genleri baskılayabilir. Özellikle KISS1, N-kaderin ve vimentini baskılayarak ve E-kaderin ekspresyonunu artırarak EMT'yi inhibe edebilir, ardından tümör hücresinin göçünü ve invazyon motilitesini azaltır (Song G.Q. et al., 2015). Klinik olarak benign doku ile karşılaştırıldığında KISS1 kaybı, primer ve metastatik PKa'da yaygın olarak görülmektedir. Yüksek metastatik PKa hücre hatlarında KISS1 ekspresyonunun geri kazanılması, hücre invazyon motilitesinin azalmasına neden olur (Wang, H. et al., 2012). Birlikte ele alındığında, Slug EMT indüksiyonu, sitokin üretimi ve metaloproteaz salgılanması yoluyla PKa metastazı için oldukça güçlü bir promotordur.

Twist, gelişim ve tümör oluşumunda kritik rol oynayan heliks-turn-helix yapısına sahip temel bir proteindir. Birçok çalışma Twist'in EMT'yi aktive edebildiğini ve E-kaderin geninin promotoruna bağlanarak hücre göçünü geliştirdiğini göstermiştir. Twist E-kaderin represörü olarak hareket etmenin yanı sıra, N-kaderin ifadesini düzenleyerek EMT'yi de kolaylaştırır (Alexander, N.R et al., 2006). Bu çalışma, Twist'in β 1-integrin aracılı nükleer translokasyonunun, N-kaderin genindeki E-box düzenleyici elementine bağlanarak N-kaderinin transkripsiyonel aktivasyonunu indükleyebileceğini göstermektedir, bu da Twist'in PKa metastatik progresyonunda esas transkripsiyon faktörü olarak hareket ettiğini göstermektedir.

ZEB1, gelişim sırasında iskelet paternini düzenleyen ve çoklu malignitelerde E-kaderinin transkripsiyonel aktivitesini baskılayan bir çinko parmak homeodomain transkripsiyon baskılayıcısıdır. Klinik olarak, yüksek dereceli prostatik tümörlerde ZEB1 değeri benign veya düşük dereceli PKa örneklerine göre yüksektir (Graham, T.R et al., 2008). Yakın zamanda yapılan bir çalışma ZEB1'in fiziksel olarak histon H4K20'ye özgü bir metiltransferaz olan SET8 ile ilişkili olduğunu göstermiştir. SET8 ile indüklenen H4K20 metilasyonunun, ZEB1 ile düzenlenen gen ekspresyonunda ikili bir fonksiyon gösterdiği kastedilmektedir. Fonksiyonel olarak ZEB1 ve SET8 PKa hücrelerinde, E-kaderinin baskılanması ve vimentin indüksiyonu ile EMT'yi koordine olarak tetiklerler ve bu da PKa'nın invaziv potansiyelinin açığa çıkmasına yol açar. PC3 hücrelerinin bir alt

populasyonu ile yapılan bir *in vitro* çalışmada ZEB1 artışı ve E-kaderin kaybı olduğu gösterilmiştir ve bu durum da alt popülasyona sahip bu hücrelerin ana hücre hattına göre *in vitro* trans-endothelial migrasyon karakteristiklerini kazandığını belirler. Aksine, ZEB1 kaybı kısmen epitelyal fenotip oluşumunu geri çağırır ve PC3 hücrelerinin trans-endothelial ekstrasvazyonunu azaltır. Genel olarak, bu çalışma ZEB1'in EMT'nin kritik bir regülatörü olduğunu ve hastalık ilerlemesi sırasında PKa hücrelerinin vasküler ekstrasvazyonuna aracılık ettiğini ileri sürmektedir (U-Ging Lo et al.,2017).

FOX proteinleri, evrimsel olarak korunan, DNA bağlanma alanı içeren 19 alt gruba sahip transkripsiyon düzenleyicilerinin büyük bir ailesini oluşturur. Bunlar arasında FOXA1, AR için öncü bir transkripsiyon faktörü olarak bilinir. FOXA1 kaybı sıklıkla metastatik PKa örneklerinde saptanmıştır (Jin, H.J. et al., 2013). PKa hücrelerinde FOXA1 AR'dan bağımsız halde Slug'u düzenler ve EMT'yi baskılar.

Aksine, FoxO ailesi çoklu kanserlerin malign hücrelerinde EMT'yi bloke edebilir. Klinik olarak elde edilen kanıtlar, FoxO düzeyi ile PKa derecesi ve tümör yayılımı arasında ters bir ilişki olduğunu ve bunun da PKa metastazı üzerinde baskılayıcı bir rol oynadığını göstermiştir (Shukla S. et al., 2009). FoxO3a'nın transkripsiyonel aktivitesi post-translasyonel fosforilat modifikasyonu yoluyla, PI3K/Akt sinyal yolağı tarafından negatif olarak regüle edilir. PKa ilerlemesi sırasında Akt'ın progresif aktivasyonu, nükleer lokalizasyonunu etkileyen FoxO3a'un fosforilasyonunun artmasına yol açar ve dolayısıyla FoxO3a'ya bağımlı transkripsiyonel aktivite inhibe olur. Fonksiyonel olarak FoxO3a β -katenin ile etkileşim için TCF ile doğrudan rekabet edebilir, bu da β -katenin/TCF transkripsiyonel aktivitesinin inhibisyonuna ve dolayısıyla ZEB1 ve Snail gibi β -katenin-hedef genlerin ekspresyonunda azalmaya yol açabilir. Ayrıca, PC3 hücrelerinde FoxO3a'nın baskılanması, yüksek metastatik N-kadherin, fibronektin, ZEB1 ve vimentinin seviyelerinin yükselmesine yol açar (Liu H. et al., 2015).

2.6.3. EMT'nin epigenetik olarak düzenlenmesi

Elde edilen tüm kanıtlar, DNA'nın hem hiper hem de hipometilasyonun birkaç genin deregülasyonu ile ilişkili olduğunu ve PKa gelişimine katkıda bulunduğunu göstermiştir (Angulo J.C. et al., 2016). Kanserde anormal DNA hipermetilasyonu, tümör süpresör genlerinin inaktivasyonuna yol açarak, PKa'nın invazyonuna neden olabilir. HIC1, 17p13.3 kromozom bölgesinde bulunan tümör süpresör genidir ve insan tümörlerinde sıklıkla hiper-metile olmuş veya delesyona uğramış haldedir. HIC1, SIRT1'in baskılanması ve TP53'e bağlı apoptotik DNA hasarı tepkilerinin düzenlenmesinde rol alan transkripsiyon baskılayıcısı olarak görev yapar (Chen, W.Y. et al., 2005).

PKa hücrelerinde HIC1 geninin hipermetilasyonu, PKa metastazı için çok önemli olan Slug ve CXCR4 ekspresyonunu artırarak ve EMT'yi teşvik ederek hücre göçü ve metastaz indüksiyonuna yol açar (Hao M. et al., 2017). HIC1 promotorunun epigenetik modifikasyonu, PKa'da EMT indüksiyonunu etkileyebilir. Histon metiltransferaz, MMSET / WHSC1 (Multiple Miyelom SET alanı), Twist1 indüksiyonu yoluyla PKa hücrelerinde EMT'yi kolaylaştırabilir ki bu da E-kaderin ifadesini bastırır. EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörü, EMT sürecini düzenlemek için bir epigenetik regülatör olabilir. SIRT1 III. sınıf Histon deasetilaz olarak bilinir, ayrıca EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörü olarak da karakterize edilir. SIRT1'in susturulması ZEB1'in baskılanmasına neden olabilir. PKa hücrelerinde E-kaderin promotor bölgesine SIRT1'in bağlanması, ZEB1 varlığıyla kolaylaştırılabilir ve bu da E-kaderinin transkripsiyonel baskılanmasına yol açar. Günümüzde yapılan çalışmalarda SIRT1'in susturulmasının, Vimentin ve N-kaderinin baskılanmasına yol açarak PKa hücre göçü ve invazyonunu baskılayabildiği ve E-kaderinin ardışık düzenlenmesine neden olduğu gösterilmiştir (U-Ging Lo et al., 2017).

2.6.4. Kanser progresyonu ve metastaz ile ilişkili EMT sinyal yolları

TGF- β Sinyali: Hücrenin farklı fonksiyonlarında ve gelişim sürecinde önemli rol oynayan TGF- β sinyalleme, EMT'yi tetikleyen en iyi karakterize

edilmiş yoldur (Yola and Medici, 2014; Moustakas and Heldin, 2009). Bu sinyallenme TGF- β süperfamilya ligandları olan TGF- β 'nin üç izoformu (TGF- β 1, 2 ve 3) ve BMP(bone morphogenetic protein)'nin altı izoformu (BMP2'den BMP7'ye) aracılığıyla indüklenir. Bunların arasında çoğunlukla TGF- β 1 ve BMP 2 ve 4'ün kanserde EMT'yi indüklediği gözlemlenmiştir (Akhurst and Derynck, 2001; Kang et al., 2009; Rothhammer et al. 2005). TGF- β sinyalleme TGF- β ligandlarının tip II ve tip III reseptörlerine (TGF β RII ve TGF- β RIII) bağlanarak gerçekleşir, bu da tip I reseptörüne (TGF- β RI) bağlanmasına ve fosforilasyonuna yol açar. Fosforile edilmiş TGF- β RI, SMAD2/3, Ras ve PI3K tarafından indüklenmiş olanlar da dahil olmak üzere birkaç sinyal yolunu aktive eder, sonrasında devamlı olarak Snail 1/2, Twist ve ZEB 1/2 gibi EMT indükleyici transkripsiyon faktörlerin ekspresyonunu indüklenmesine sebep olan sinyal yollarını aktive eder.

SMAD-bağımlı sinyallemede, fosforile olan TGF- β RI SMAD2 ve SMAD3'ü kullanır, daha sonra koaktivatör SMAD4 ile bir kompleksi oluşumu için fosforile edilir. R-SMAD'lar (SMAD2/3) ve SMAD4'ün kompleksi sonradan importin β 1, 7 ve 8'e bağlanır ve çekirdeğe translokasyon yapar (Kurisaki et al., 2001; Yao et al, 2008).

Çekirdeğe giren SMAD kompleksleri, promotora bağlanarak Snail 1'in transkripsiyonunu indükleyebilir ve sonraki aşamalarda Snail 1 proteiniyle kompleks oluşturarak E-kaderin transkripsiyonunun bastırılmasına yol açabilir (Vincent et al., 2009). R-SMAD kompleksleri ayrıca, ZEB ve Twist'in yanı sıra E-kaderin baskısını tetikleyen yüksek hareketlilik grubu faktörü (HGMA2) gibi diğer transkripsiyon faktörlerini de düzenlemektedir (Gonzalez and Medici, 2014). Bunun dışında EMT'yi tetikleyen transkripsiyon faktörleri üzerinde miRNA'ların düzenleyici etkilerini uyarıcı ve böylece miR-34 gibi düzenleyici miRNA'ların işlevini inhibe ederek Snail1 aracılı EMT'yi teşvik eden ve p53'ün parçalanmasını destekleyen E3 ubiquitin ligaz HDM2'nin transkripsiyonunu indükleyebilirler (Chang ve diğ., 2011, Siemens ve diğ., 2011).

SMAD-bağımsız sinyallemede TGF- β , PI3K mekanizmasını ve Akt sinyalini aktive eder. Akt ise NF- κ B'nin aktivasyonu yoluyla EMT'yi

indükleyen Snail 1'in transkripsiyonunu indükler (Julien et al., 2007). Akt ayrıca Snail'in fosforile olmasını sağlayarak, bozulmasına yol açan ve nükleer translokasyonunu inhibe eden GSK-3 β 'yi de inhibe eder (Zhou et al., 2004).

TGF- β 1, hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz (ERK-extracellular signal regulated kinase), c-JNK ve MAPK dahil olmak üzere diğer kinaz yollarını da aktive edebilir. Bu kinaz yolları EMT transkripsiyon faktörlerini indükleyerek EMT aktivasyonuna katkıda bulunurlar (Gonzalez and Medici, 2014). Ayrıca TGF- β 1 RhoA GTPaz'ın bozunmasına neden olarak sıkı bağlantıların kopması ve birleşme noktalarının ayrılması yoluyla EMT'yi destekler (Özdamar ve ark., 2005).

Wnt Sinyal Yolu: Wnt/ β -katenin yolağı hücre proliferasyonunu, apoptozu ve EMT'yi düzenleyen, böylece kanser başlangıcına ve ilerlemesine aracılık eden önemli sinyal yollarından biridir (Arend et al., 2013). Wnt sinyalleri, plazma membranındaki Frizzled ve LRP reseptörleri tarafından transdüksiyona tabi tutulur; bu sitoplazmik β -katenin'i bozabilen kinaz GSK-3 β 'yi inhibe eder ve böylece artan sitoplazmik β -katenin nükleusa transloke olur ve EMT'ye bağlı çeşitli hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır (Gilles et al., 2003). β -katenin spesifik genlerin ekspresyonunu teşvik etmek ve doğrudan SNAIL1 ve SNAIL2 ekspresyonunu indüklemek için TCF/LEF ailesi ile etkileşir (Easwaran et al., 1999; Bachelder ve et al., 2005). Wnt- β -katenin aktivasyonunun Twist ekspresyonunu düzenlediği ve meme hücresi farklılaşmasını önlediği bulunmuştur (Howe et al., 2003). Wnt/ β -katenin yolağına göre nükleusta β -katenin birikmesi EMT'nin indüklenmesine, ayrıca E-kaderin değerinin azalması ve fibronektinde artışa sebep olur (Brabletz et al., 2001). Ek olarak, Wnt- β -katenin aktivasyonu ile sitoplazmada GSK-3 β 'nin kısıtlanması, aynı zamanda EMT sürecini kolaylaştırarak, Snail 1'in stabilize edici fosforilasyonunu da önler (Yook et al., 2006). Bu, iki aşamada gerçekleşir. Nükleusta olduğu gibi Snail1, GSK3 β tarafından fosforile edilir ve çekirdekten sitosole nakledilir ve sitosolde GSK3 β tarafından nihai bozulma için tekrar fosforile edilebilir (Yook et al., 2006). Bu nedenle GSK3 β 'nin aktif formunun bastırılması, EMT'nin indüksiyonuna yol açan Snail 1'in ekspresyonunu ve stabilizasyonunu artırabilir.

TGF- β ve Wnt sinyal yolları arasındaki bağlantı, EMT dahil çeşitli süreçlerde iyi tanımlanmıştır. Tümör baskılayıcı GSK3 β ve aktivatör β -katenin bu sinyalizasyonlar arasında iki önemli elemandır ve LEF-1, SMAD proteinlerinde olduğu gibi β -katenine bağlanarak da aktive edilebilir (Nishita et al., 2000; Labbe et al. 2000).

Notch Sinyal Yolu: Notch sinyal yolu, apoptoz, göç, invazyon ve anjiyogenez dahil olmak üzere birçok hücrel sürecin düzenlenmesinde önemli role sahiptir (Miele and Osborne, 1999; Miele et al., 2006). Notch sinyal yolları beş ligand (Jagged-1, Jagged-2, Delta-like-1 (Dll-1), Delta-like-3 (Dll-3) ve Delta-like-4 (Dll-4)) ve dört reseptörden (Notch-1, Notch-2, Notch-3 ve Notch-4) oluşmaktadır (Al-Hussaini et al., 2011). Notch ligandının Notch transmembran reseptörü ile etkileşimi bir dizi proteolitik sindirime ve Notch hücre içi dumaninin (NotchIC) salınmasına ve onun çekirdeğe girmesine neden olur. Çekirdek içinde NotchIC, Notch baskılayıcı hedef genlerinin ifadesini kontrol eder ve böylece çeşitli hücrel süreçleri düzenler (Leong and Karsan, 2006). Epitelyal kanserlerde, ligand tarafından indüklenmiş Notch aktivasyonu Slug'u aktive ederek EMT'yi destekler (Leong et al., 2007). NotchIC, Snail 1 gibi EMT ilişkili hedef genleri doğrudan aktive edebilir (Leong et al., 2007). Dolaylı olarak da NotchIC, HIF-1 α 'nın indüklenmesi, sitoplazmik β -katenin stabilizasyonu ve miR-200 bağlı yol gibi başka yolların aktivasyonu yoluyla EMT'yi de teşvik edebilir (Sahlgren et al., 2008; Yang et al., 2011). Hipoksik uyarının EMT'ye geçmesinin ardından Notch sinyalleme, HIF-1 α 'nın LOX'un promotor bölgesine alımını hızlandırır, LOX regülasyonunun artması da Snail 1'in LOX aracılığı ile stabilizasyonuna yol açar (Sahlgren et al., 2008). Notch sinyallemedeki Jagged-2 ligandı, metastazı teşvik ederek miR-200 ekspresyonunu baskılar ve EMT ve metastaz üzerinde ters etki gösterir (Yang et al., 2011; Gibbons et al., 2009). Bu nedenle miR-200 regülasyonunda Notch sinyallemesinin rolü kanser çalışmalarında vurgulanmaktadır.

Hedgehog (Hh) Sinyal Yolu: Hh sinyal yolu embriyogenez, yetişkin doku homeostazisi ve karsinogenezi düzenleyen anahtar bir yoldur (Katoh and Katoh, 2008). Hh-duyarlı hücrelerde EMT'yi düzenleyerek hücre canlılığı ve

göç etme kabiliyetini, ayrıca tümör metastazını düzenleyerek doku yapımını ve yeniden biçimlenmesini etkilemektedir (Omenetti et al., 2008).

Memelilerde Hh'in üç tane homoloğu bilinir, bunlar: Desert (Dhh), Indian (Ihh) ve Sonic (Shh)'dir.(Marigo et al., 1995). Shh'nin anormal ifadesinin çeşitli kanser türlerinin ilerlemesiyle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir ve bu yapının bozulması, pankreatik kanser hücrelerinin EMT sürecinin engellenmesine yol açmıştır (Pasca di Magliano and Hebrok, 2003; Hay, 1995). Hh ligandları, hücre içi sinyalleri uyarmak için PTCH1 ve PTCH2 olarak adlandırılan hücre yüzeyi transmembran proteinlerine bağlanır (Johnson et al, 1996). Hhs'nin yokluğunda PTCH1 ve PTCH2 yedi geçişli membran reseptörü olan Smoothed (Smo)'un fazla eksprese olmasını ve aktivitesini önler (Chen ve ark., 2004). Hücre dışında Hh mevcut olup PTCH 1/2'ye bağlandığında, Smo etkinleştirilir ve Gli ailesinin transkripsiyon faktörleri daha sonra SNAI1 gibi hedef genlerin transkripsiyonunu uyarmak için aktive edilir (Li et al, 2006).

Hh sinyalleme ayrıca, Notch ve TGF- β sinyalleri ve miRNA ağları aracılığıyla EMT'yi dolaylı olarak indüklemektedir (Katoh and Katoh, 2008). Notch aracılı SNAI1 upregülasyonu için JAG2 ekspresyonunu yukarı regüle edebilir ve ayrıca ZEB1 ve ZEB2'nin NF-kB aracılı transkripsiyonel yukarı regülasyonu için TGF- β 1 sekresyonunu indükleyebilir (Chua ve ark., 2007, Yoo ve ark., 2008). Ek olarak, mi-RNA 200 dahil olmak üzere düzenleyici mi-RNA'ların TGF- β aracılıklı susturulması, ZEB1 ve ZEB2 ekspresyonunun artmasına neden olarak, EMT artışına yol açmaktadır.

microRNA Sinyal Yolu: Son zamanlarda mikroRNA'ların EMT sürecinin düzenlenmesinde önemli olduğu ortaya çıkmıştır. miRNA'lar yaklaşık 19-25 nükleotitten oluşan kodlayıcı olmayan RNA'lardır ve hedef mRNA'larını destabilize etme ve translasyonel inhibisyon yoluyla baskılayabilir. Lamouille ve arkadaşları tarafından yapılan incelemeye göre, çoğu EMT mekanizması, çeşitli miRNA'lar tarafından kontrol edilmektedir (Lamouille et al., 2013).

Çeşitli mikroRNA'ların ZEB1/2 ve Snail/Slug gibi EMT transkripsiyon faktörlerini hedeflediği bilinmektedir. miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-

141, miR-429 ve miR-205 dahil olmak üzere miR-200 ailesi EMT'yi baskılamak için ZEB1 ve SIP1'i (ZEB2 olarak da bilinir) hedefleyerek EMT'yi düzenler (Gregory et al., 2008). miR-29b, Snail ve Twist'i aşağı doğru düzenleyerek prostat kanseri metastazını baskılar (Ru et al., 2012) ve miR-30, Snail1 ekspresyonunu negatif olarak düzenleyerek TGF- β 1 ile indüklenen hepatosit göçünü inhibe eder (Zhang et al., 2012). Mezenkimal belirleyicileri hedefleyen mikroRNA'lar olarak, miR-194 ve miR-138, N-kaderin ve vimentini hedeflerler, sırasıyla EMT'yi baskılar ve MET programlarını geliştirir (Meng et al., 2010; Zhang et al., 2016). Diğer taraftan miR-9, VEGF geninin yukarı regüle edilen ekspresyonuna ve kanser metastazına katkıda bulunan, β -katenin sinyalleşmesinin aktivasyonu ile sonuçlanan, epitelyum markörü olan E-kaderini aşağı regüle eder (Ma et al., 2010). Bazı mikroRNA'lar EMT sinyal yollarının birden fazla bileşenini hedefleyerek EMT işlemini düzenler. miR-302 ve miR-372, TGF- β RII'yi hedefleyerek TGF- β 'nın neden olduğu EMT'yi baskılar, bu insan keratinositlerinde Snail ifadesi ile ilişkilidir (Subramanyam et al., 2011). Ayrıca, çeşitli mikroRNA türlerinin, hücre-hücre tutunması ve epitel bağlantıları gibi hücresel mimari yapı bileşenlerini hedefleyerek EMT programını etkilediği bulunmuştur. EMT'yi düzenlemede farklı mikroRNA'ların hareketleri, çeşitli yollar aracılığıyla gerçekleşir; iki ayrı mikroRNA, tek bir EMT bileşeninin ekspresyonunu düzenlemek için işbirliği yapabilir veya tek bir mikroRNA EMT'nin çoklu hedeflerini kontrol edebilir (Lamouille et al., 2013).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihaz

- 1-10, 20-200 ve 100-1000 µl otomatik pipetler (Brand-Transferpette S, Almanya)
- 15 ml ve 50 ml'lik falkon tüpleri (Jet Biofil, İtalya)
- 2.5- 5- 10 ve 25 ml hacimli steril pipetler (Orange, İtalya)
- 22x22 mm no:1 lamel (Marienfeld-0101050, Germany)
- Asetat kağıtları
- Blok ısıtıcı (Grant-QBA2, İngiltere)
- Buz makinesi (ITV, USA)
- Çalkalayıcı (Heidolph- ROTAMAX 120, Almanya)
- CO₂'li inkübatör (Sanyo-MCO- 18AIC, Japonya)
- Enjektörler (Ayset, Türkiye)
- Eppendorf tüpler (Grainer- Almanya)
- Erlen
- Film (Kodak, 8143059)
- Filtre başlıkları 45 mm
- Fluoroskan Ascent Mikroplate Okuyucu (Thermo Fischer Scientific, ABD)
- Hemositometre (Neubauer)
- Hücre kazıyıcı (Cell Scraper- TPP 9903, İsviçre)
- Hücre kültür kapları ve flasklar (Greiner, Almanya)

- İnvörted ışık mikroskobu (Leica DMIL, Almanya)
- Kuars küvet (Hellma-105.202QS, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Wisd-MSH20A, Almanya)
- Mini soğutmalı santrifüj (Sigma- B6916, Almanya)
- Orbital çalkalamalı inkubatör (Biosan-ES20)
- Pastör pipetler
- pH metre (Hanna- HI221, Almanya)
- Pipet uçları (VWR, ABD)
- Polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membranı (Roche-03010040001, Almanya)
- Pozlamanın gerçekleştiği kaset (Amersham Hypercassette, RPN 11643)
- Protein jel elektroforez sistem (BioRad, ABD)
- Santrifüj (Eppendorf 5415D ve 5415R, ABD)
- Sınıf II güvenlik kabini (Esco, Hollanda)
- Sonikasyon
- Spektrofotometre (Amersham Biosciences-Ultrspec 100 Pro., ABD)
- Su banyosu (GFL Model: 1008)
- Transfer aparatı (C.B.S. Scientific- EBX 700, ABD)
- Whatman kağıtları
- Jel Yürütme aparatı (C.B.S. Scientific- MG V 202, ABD)

3.1.2 Sarf Malzemeler

- TNF- α ELISA kit (Invitrogen, KHC3011)

- R1881 (Sigma, R0908)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate –PMA (Sigma, P1585)
- Lipopolisakkarit –LPS (Sigma, L3024)
- Propodyum iyodür (DB Pharmingen 51-66211E)
- Crystal Violet boya
- TEMED (Sigma,T9281)
- Aminoasetik asit AOAA (sigma-329781398, Almanya)
- DMSO (Merck- K33960212-504, ABD)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Fluka- 93482, Almanya)
- Fosfataz inhibitör kokteyl (Roche- 04906837001, Almanya)
- Fötal dana serumu (FBS) (Gibco- 10270, ABD)
- Gosipol (Santa Cruz, sc-200501A, Almanya)
- K₂HPO₄ (Sigma- 7758-11-4, Almanya)
- L-glutamin (Gibco- 25030, ABD)
- NaF 100X (100 mM), (Merck- B815549 606, ABD)
- NaHS (Sigma- 207683-19-0, Almanya)
- NaVO₃ 100X (200 mM) (Fluka- 72060, Almanya)
- Penisilin/Streptomisin (Gibco- 15140, ABD)
- Proteaz inhibitör kokteyl (PIC) (Roche- 04693159001, Almanya)
- RPMI 1640 (Gibco-11875127, ABD)
- Tripsin-EDTA (Gibco- 3103382, ABD)
- WST1 Reagent (Roche- 05015944001, Almanya)
- □ KH₂PO₄ (Sigma- 7778-77-0, Almanya)

- Modifiye RIPA tamponu
- 10 mM trima baz pH=8.0 (Sigma- T5941, Almanya)
- % 0.1 SDS (Sigma- L4390, Almanya)
- % 1 triton x-100 (Sigma- T8787, Almanya)
- % 0.1 sodyum deoksikolat (Sigma- D6750, Almanya)
- 1 mM EDTA (Sigma- K5134, Almanya)
- 1 mM EGTA (Sigma- E3889, Almanya)
- 140 mM NaCl (Sigma- S3014, Almanya)
- BCA kiti (Sigma- 088K6138, Almanya)
- % 4 Paraformaldehit (AppliChem- A3813, Almanya) pH:7.8
- Methanol (Merck- 1552608034, ABD)
- Etanol (Merck- K41414186 038, ABD)
- BSA (USB- 10857, ABD)
- % 30 akrilamid karışımı için
- % 29 akrilamid (Sigma- A9099, Almanya)
- % 1 N, N- metilenbisakrilamid (Sigma- M2022, Almanya)

karışımı hazırlanarak filtrelendi ve gazı alınarak kullanıldı.

- 4X SDS-PAGE ayırma jel tamponu
- 1.5 M trizma baz (pH: 8.8) (Sigma- T5941, Almanya)
- % 0.4 SDS (Sigma- L4390, Almanya), pH 8.8
- 4X SDS-PAGE depolama jel tamponu
- 0.5 M trizma baz (pH: 6.8) (Sigma- T5941, Almanya)
- % 0.4 SDS (Sigma- L4390, Almanya), pH 6.8
- Amonyum persülfat sol (% 10) (Sigma- A9164, Almanya)

- TEMED (Sigma- T9281, Almanya)
- 10X yürütme tamponu (1X olarak kullanılır)
- 30 g trizma baz (Sigma- T6066, Almanya)
- 144 g glisin (Biochemika/FLUKA- 50046, Almanya)
- 10.0 g SDS (Sigma- L4390, Almanya) ile 1 lt dH₂O içerisinde hazırlanılmıştır.

- 4X yükleme tamponu
- 40 mM trizma baz (pH 8.0) (Sigma- T6066, Almanya)
- 0.4 mM EDTA (Sigma- K5134, Almanya)
- % 4 SDS (Sigma- L4390, Almanya)
- % 20 gliserol (Sigma- G5150, Almanya)
- Brom fenol mavisi 200 µl (Merck- L54971322 525, ABD)
- 10X transfer tamponu (1X olarak kullanılır)
- % 20 metanol (Merck- K34212908503, ABD)
- 30.0 g trizma baz (Sigma- T6066, Almanya)
- 144.0 g glisin (Biochemika/FLUKA- 50046, Almanya) ile 1 lt dH₂O içerisinde hazırlanılmıştır.

- Beta-mercaptoetanol (Sigma, M3148)
- 10 X TBS (pH 7.6), toplam hacim 1L
- 12.1 g trizma baz (Sigma, T6066)
- 80.0 g NaCl (Sigma, S3014)
- TBS-T için 1X TBS içine % 0.1 Tween 20 (Sigma, E1383) ilave edilmiştir.

- Yağsız süt tozu (Saliler, Almanya)

- Anti-rabbit IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham-NA934, ABD)
- Anti-mouse IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham-NA931, ABD)
- Anti- β -Aktin antikoru (Sigma- A5316, Almanya)
- Anti- CBS antikoru (Santa Cruz-sc-67154-GTX106585, ABD)
- Anti-CSE antikoru (Abnova, H00001491-M02)
- Anti-MPST antikoru (Novus Biologicals® NBP1-54734)
- Anti-GAPDH antikoru (Ambion, 447288, ABD)
- ECL PLUS kiti (GE Healthcare Amersham Western Blot detection system, RPN2132, ABD)
- Developer (Kimetsan- Fast X-Ray Developer Sol., Türkiye)
- Fikser (Kimetsan- Fast X-Ray Fikser Sol., Türkiye)
- % 0.4 Tripan mavisi solüsyonu (Sigma- T6146, ABD)
- Crystal Violet boyası. Toplam hacim 50 ml.
- 0.025 g Crystal Violet tozu
- %1 paraformaldehid
- %1 metanol
- Total hacim 50 ml olacak şekilde PBS
- Fosfat tamponu (Phosphate Buffered Saline / PBS)
- 8 g NaCl (Sigma- S3014, ABD)
- 0.2 g KCl (Merck- 1049360250, ABD)
- 1.57 g Na₂HPO₄·2H₂O (Merck- K22287176, ABD) ile 1 lt dH₂O içerisinde hazırlanarak 6M HCl ile pH 7.4'e ayarlandı.

- Deneylerde ATCC'den temin edilen 2 farklı hücre hattı kullanılmıştır.

- LNCaP(insan prostat karsinomu lenf nodu metastazı hücre hattı -yüzeye bağımlı)

- U937 (monosit hücre hattı -süspande)

n-LC MS/MS analizi için Stoklar ve çözeltiler

- ABC: Amonyum Bikarbonat (1M ve 100mM, taze hazırlanmış ve 4 ° C'de saklanmış)

- ACN: HPLC Grade Acetonitrile

- DTT: Dithiothreitol (1M çözeltide stokla, -20°C'de saklanır)

- IAA: Iodoacetamide (taze kullanır, 1M çözeltide stokla, -20°C'de karanlıkta saklanır)

- ChloroIodoacetamide: (taze kullanır, 1M çözeltide stokla, -20°C'de güçlü olmayan ışıktaki saklanır)

- A Kademe Tamponu: %0.1 FA suyunda

- B Kademe Tamponu: %0.1 FA %80 CAN'da

- MS Yükleme Tamponu: %5 Formic Acid %5 CAN'ın içinde

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücrelerin bakımı ve pasajlanması

Araştırmalarda esas olarak yüzeye tutunma özelliğine sahip, androjene duyarlı insan prostat adenokarsinoma hücre hattı olan LNCaP ve süspanse özelliğine sahip U937 monosit hücre hattı kullanıldı. Hücreler %10 FBS, %1 L-glutamin (2mM), %1 pencilin (100 U/ml) ve streptomisin (100 ug/ml) içeren RPMI ortamında %5 CO₂ varlığında 37°C sıcaklıkta inkübatörde kültüre edildi. U937 hücre hattı için 2 kez inaktive edilmiş FBS kullanıldı.

Hücrelerin kültür ortamı 2 günde bir taze ortam ile değiştirildi. Yüzeye tutunan hücreler için ortam steril cam pastör pipeti kullanılarak vakum yardımı ile uzaklaştırıldı ve üzerine taze ortam eklendi. Eklenecek ortam miktarı 10 cm'lik plateler için 6 ml ve 6 cm plateler için 3 ml olarak belirlendi.

Süspanse hücreler 75 cm²'lik flasklarda büyütüldü. Kültür ortamını değiştirmek için hücreler ortam içerisinde falkon tüpe aktarıldı 130 g'de 5 dk. santrifüj yapılarak eski ortam uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine taze ortam eklendi. Hücreler tüm yüzeyi kaplayacak kadar çoğaldıkları zaman pasajlanarak yeni kültür platelerine aktarıldı.

Yüzeye tutunan hücrelerin pasajlanması için yine öncelikle eski ortam uzaklaştırıldı. Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen steril PBS ile bir defa yıkandıktan sonra plate boyutuna göre 250 µl-1 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi ve hücrelerin kalkmasını sağlamak için 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 3-4 dakika bekletildi. Tripsin-EDTA inaktivasyonu için eklenen miktarın 7 katı kadar taze ortam hücrelerin üzerine eklendi. Pipet yardımı ile hücreler homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra belli bir kısmı yeni kültür ortamına aktarıldı ve büyümeleri için 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre yerleştirildi.

3.2.2. Hücre hatlarının dondurulması ve çözündürülmesi

Hücre kültürü araştırmalarında, hücre hattının belirli bir pasaj aralığında kullanılması önerilmektedir. Uzun vadeli kültüre edildiğinde hücrelerde morfolojik değişim gibi bir takım fenotipik değişikliklerin ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu nedenle hücrelerin, yapısal olarak sağlam kalmaları ve canlılık özelliklerini idame ettirebilmeleri için uygun sıcaklıklarda saklanmaları gerekmektedir. Dondurma sırasında hücreleri korumak için DMSO ve gliserol gibi kriyoprotektan ajanlar kullanılmaktadır. Hücreyi saklamak üzere dondurmadan önce normal pasajlama prosedüründe olduğu gibi işlem yapıldı ve hücreler homojenize edildi. %5 DMSO eklenmiş hücreler kriyotüplere aktararak -86 °C’de veya azot tankında saklandı. Hücreleri hızlı bir şekilde çözündürmek amacıyla 37 °C’lik su banyosunda (yaklaşık 1-2 dk) bekletildi. Ardından hücre kültür kabındaki 37°C’ye ısıtılmış taze ortam üzerine dikkatli bir şekilde ilave edildi.

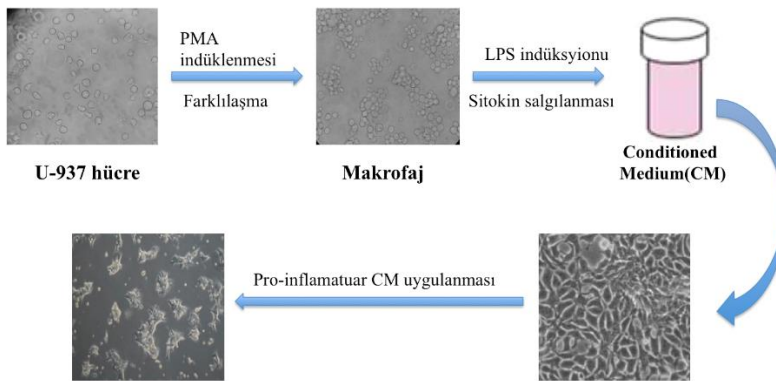
3.2.3 Hücre sayımı

Hücre yoğunluğunu belirlemek üzere hücre sayımı yapılır. Hücreler pasajlanırken, yeni kültüre istenen miktarda hücre alabilmek amacıyla hemositometreyle sayılırlar. Sayım için hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp tripan mavisile 100 µl’ye tamamlanmıştır (10 kat dilüye edilmiş olundu). Karışım pipetle homojenize edilmiştir. Hemositometre üzerine bir lamel koyulmuş ve sayılacak hücre süspansiyonu bu ikisi arasına pipetle kenardan verilerek yayılmıştır. Hemositometre üzerinde yer alan 9 büyük kare içindeki hücre miktarı sayılmıştır. Hücre yoğunluğunu (hücre sayısı/ml) belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

$$\text{Hücre sayısı/ml} = \frac{\text{Sayılan hücre miktarı} \times \text{Dilüsyon oranı} (10) \times 10^4}{9}$$

3.2.4. Makrofaj farklılaşması ve şartlandırılmış ortamın (CM-Conditioned Media) toplanması

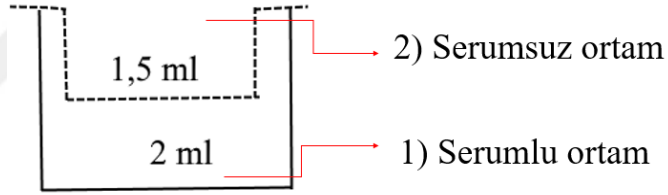
Makrofaj farklılaşması ve sitokin üretimini uyarmak için, U937 monosit hücreleri (8×10^6) 20 ml ortam içerisinde, 75 cm^2 flasklarda kültüre edildi ve 2 saat boyunca inkübatörde bekletildi. Daha sonra konsantrasyon 16 nM olacak şekilde PMA ilave edildi ve 16 saat içerisinde hücrelerin adesif kümeler oluşturması takip edildi. Ardından hücre ortamı 20 ml taze ortam ile değiştirildi. Hücreler 2 saat dinlenmeye bırakıldıktan sonra, son konsantrasyonu 10 ng/ml olacak şekilde LPS ilave edildi ve hücreler 24 saat süreyle inkübe edildi. Son olarak, üst faz CM toplandı ve daha sonra kullanılmak üzere önce 0.8 mm, ardından 0.22 mm por çapındaki filtreden geçirildi. Böylelikle hücrelerden toplanan ve hücreler ayrıldıktan sonra kalan filtratta bulunan $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ ve IL6 sitokinlerinin seviyeleri ELISA yöntemi ile belirlendi. İçerisinde bilinen seviyelerde pro-inflamatuar sitokinlerin olduğu bu ortam (şartlandırılmış ortam/conditioned media/CM olarak tanımlanır), prostat hücrelerinde inflammatuar mikroçevre oluşturmak amacıyla besi ortamı olarak kullanıldı. Ancak bilinen ko-kültür çalışmalarından farklı olarak, $\text{TNF}\alpha$ 'nın hedeflenen konsantrasyonunu elde etmek üzere konsantrasyonu bilinen bir CM ortamı, normal besi ortamı ile seyreltilerek kullanıldı.



Şekil 3.1. *In vitro* inflammatuar mikroçevre modeli basamaklarının şematik gösterimi

3.2.5. Madde uygulamaları ve migrasyon deneyi

ATCC (American Type Culture Collection) tarafından elde edilen LNCaP hücreleri gerekli yoğunluğa ulaştığında akut inflamatuvar yanıt oluşturmak için 3, 6 ve 12 saat aralıklar ile CM (500pg/ml TNF a) uygulandı. Oniki saat sonrasında hücre ortamı uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Hücreler tripsin uygulaması ile kaldırıldıktan sonra serumlu ortam aracılığıyla tripsin inaktivasyonu sağlandı. 4°C, 1000 rpm'da 5 dakika santrifüj edilerek serumlu ortam serumsuz ortam ile değiştirildi. Migrasyon deneyi için 6 well plate kullanıldı. Rezervuara 2 ml serumlu ortam eklendi. Üzerine 8 µm por çapına sahip Boyden chamber konulduktan sonra insertlere 1.5 ml serumsuz ortam içerisinde 2×10^5 hücre ekildi. İnflamatuvar ortamın etkisi nedeniyle migrasyon özelliğine sahip olan hücrelerin membranı geçmesi için 62 saat boyunca inkübe edildi (Şekil 3.1 ve 3.2).



Şekil 3.2. Kemotaksi yaratılan durum ve kontrol çemberi.

3.2.6. WST-Hücre proliferasyon deneyi

Migrasyon özelliği göstermiş olan kontrol ve CM uygulanmış hücrelerin proliferasyon özelliklerini göstermek için hücreler WST ile analiz edildi. Hücreler 1×10^4 /well olacak şekilde 96 well plate 100 µl/well kültür ortamı içine ekildi. Örneklerin bir kısmına 10 nM R1881 uygulandı. 24 saat sonra 10 µl/well hücre proliferasyon reagenti WST-1 uygulanarak hücreler 3 saat boyunca (37°C, %5 CO₂) inkübe edildi. Zemin (background) kontrola göre örnek absorbansı 450 nm'de hesaplandı. Referans dalga boyu 650 nm olarak değerlendirildi.

3.2.7. İmmüno Floresan İşaretleme ve Mikroskopi

Deney tasarımı için kontrol grubu olarak inflamatuvar ortamda migrasyon geçirmiş LNCaP hücreleri kullanıldı. Hücrelerin yüzeye tutunma olasılığını arttırmak için lameller poly-D-lysine ile kaplandı. Analiz süreci boyunca lameller PBS ile çalkalandı, -20° C’de 30 dakika boyunca metanol ile fikse edildi, PBS içinde %0,2 triton X-100 ile 5 dakika boyunca çalkalanarak permeabilize edildi ve PBS içinde %1 BSA ile 5 dakika boyunca bloklandı. Antikorlar BSA: Triton X-100 (50:50) solusyonu içinde hazırlandı. Primer antikor eklendikten sonra lameller parafilm ile kaplanarak 1 saat boyunca (37°C, %5 CO₂) inkübe edildi. Sonrasında 4 kez PBS ile yıkandı. Sekonder antikor uygulamasında Alexafluor 594 (anti-mouse veya anti-rabbit) ve/veya Alexafluor 488 (anti-mouse veya anti-rabbit) kullanıldı ve 20 dakika boyunca (37°C, %5 CO₂) inkübe edildi. Sonunda hücreler 4 kez PBS ile, ardından %70 etanolda 5 dakika ve %100 etanolda 5 dk yıkandı ve lameller 0,5 µg/ml DAPI içeren %30 glycerol’li PBS solusyonundan 10 µl damlatarak lam’a kaplandı. Hücre görüntüsünü analiz etmek için Leica DM4000B LED floresan mikroskop ve sistemi kullanıldı.

3.2.8. İmmünoblotlama (Western Blot) analizi

3.2.8.1. Protein izolasyonu

RIPA modified tamponu kullanarak protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, hücre kazıyıcı yardımıyla hücreler ortam içindeyken kaldırıldı ve 15 ml tüplere toplandı. 300 g’de santrifüj edilerek ortam uzaklaştırıldı. Hücreler, 1 ml soğuk PBS ile süspande edildi ve tekrar santrifüjlenerek PBS uzaklaştırıldı. Hücre miktarına uygun miktarda modifiye RIPA tamponu (proteaz ve fosfataz inhibitörleri içeren) ile süspande edildikten sonra buz üzerinde 45 dk bekletildi. Sonra %30 güçle, %50 aralıkla 20 sn sonikasyon yapıldı ve 12.000 g’de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant yeni tüpe alındı, protein lizatı -86°C’ye kaldırıldı.

3.2.8.2. Protein miktarının belirlenmesi

Elde edilen lizatlardaki protein miktarı BCA protein miktarı ölçüm kiti kullanılarak belirlendi. Eppendorf tüplere 149 μ l RIPA tamponu ve 1 μ l protein lizatı örneği eklendi. BCA çalışma reaktifi; her örnek başına 75 μ l QA, 75 μ l QB ve 3 μ l QC olacak şekilde bütün örnekler ve kör için gerekli toplam karışım hazırlandı. Hazırlanan BCA çalışma reaktifi vortekslenerek örneklerin bulunduğu tüplere her örnek için 150 μ l eklendi. Kör olarak protein lizatı bulunmayan 150 μ l RIPA kullanıldı. Tüpler vortekslenip, kısa santrifüjden sonra 60°C’de ısıtıcı blokta 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenip spektrofotometrede 562 nm’de absorbansları ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri protein standart eğrisine göre hesaplanarak protein miktarları μ g / μ l olarak belirlendi.

3.2.8.3. Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması

Camlar sırasıyla su-etanol-izopropanol ile silindi, hazırlanan ayırma jeli iki cam aparatın arasına aşağıdaki tabloda belirlenen oranlar kullanılarak uygun yüzdede döküldü. Jelin düzgün bir biçimde donabilmesi için üzerine izopropanol eklendi. Ayırma jeli donduktan sonra, üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldı ve depolama jeli dökülerek tarak yerleştirildi. Kullanılmadan önce gerekli hacimde 4×yükleme tamponu içerisine %10 oranında β -merkaptoetanol eklendi ve karıştırıldı. 50 μ g miktarlarına karşılık gelen hacimlerde her bir protein lizatından yeni tüplere örnek alındı ve su ile eşit hacme tamamlandı. Hazırlanan protein örnekleri 95°C’ de 5 dakika denatüre edildi. Denatürasyonun hemen ardından örnekler buz üzerine alındı ve jele yüklemeyen önce kısa bir santrifüj yapıldı. Kuyucuklara yüklenen örnekler uygun voltajda (80 V) ve sürede (3-4 saat) yürütüldü.

Çizelge 3.1. Jel hazırlama tablosu

Ayırma jeli (Separating) (10 ml)	%6	%8	%10	%12	%15	%20
1) 4x ayırma-jel tamponu	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5
2) 30% akrilamid karışımı	2.0	2.7	3.3	4	5	6.6
3) H₂O	5.4	4.7	4.1	3.4	2.4	0.8
4) 10% APS	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
5) TEMED	0.008	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005

Depolama (Stacking) Jeli		10 ml	5ml	2.5 ml
	1) 4x ön ayırma jeli tamponu	2.5 ml	1.25	0.625
	2) 30% akrilamid karışımı	1.7 ml	0.85	0.425
	3) H₂O	5.7 ml	2.85	1.425
	4) 10% APS	0.15 ml	0.075	0.038
	5) TEMED	0.010 ml	0.005	0.005

3.2.8.4. Membrana transfer

PVDF membran metanol ile ıslatılarak aktive edildi. Western-blot transfer kaseti içine sırasıyla sünger, Whatman kağıdı, proteinlerin yürüdüğü jel, PVDF membran, Whatman kağıdı ve sünger yerleştirilerek transfer düzeneği hazırlandı. Transfer kaseti, transfer tankına yerleştirilerek gece boyu +4°C’de 90 mA’de transfere bırakıldı.

3.2.8.5. Primer antikor ile işaretleme

Transfer tankından çıkarılan membran 2 kez TBS-T ile yıkandı. TBS-T'de hazırlanan %5 yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Bloklamadan sonra membran TBS-T ile 2 defa yıkandı. Daha önce kullanım oranı optimize edilmiş primer antikor, % 0,5 süt tozu içeren TBS-T'de hazırlandı. Membran primer antikor solüsyonu içinde, oda sıcaklığında 1 saat ya da +4°C'de gece boyu yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. Membran 1 kez 15 dk ve 3 kez 5 dk TBS-T ile yıkandı.

3.2.8.6. Sekonder antikor ile işaretleme

Kullanım oranı 1/5000 veya 1/10.000 olarak optimize edilmiş HRP-bağlı tavşan, fare ya da keçi sekonder antikorları % 0,5 süt tozu içeren TBS-T içinde hazırlandı. Membran sekonder antikor solüsyonunda, oda sıcaklığında 1 saat yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. Membran 1 kez 15 dk ve 3 kez 5 dk TBS-T ile yıkandı.

3.2.8.7. Bantların görüntülenmesi

Karanlık odada membran üzerine ECL-plus kiti solüsyonu (A: B solüsyonu 1:1 oranında membran büyüklüğüne uygun hacimde hazırlandı) döküldü ve 4 dakika inkübe edildi. Kasetin içinde iki asetat kağıdı arasına yerleştirilen membranın üzerine film konularak farklı sürelerde pozlama gerçekleştirildi. Film 1 dakika developer ve 30 saniye fikser solusyonundan geçirildi, bantlar X-Ray film üzerinde görüntülendi.

3.2.9. Subselüler fraksiyonlama deneyi

Tüm inkübasyonlar ve santrifüjler 4°C 'de gerçekleştirildi ve 1x proteaz inhibitörü kokteyli (Roche GmbH, Almanya) ve 1 mM DTT eklenmiş tamponlarla (lisis) subselüler fraksiyonlama yapıldı. Kontrol ve CM uygulaması sonrası değişmiş olan hücreler 10 cm² platelerde çoğaltıldı. Hücre sayısı 1 x 10⁷ ulaştığında PBS ile yıkandı ve 4000 rpm'de 3 dakika santrifüjle hücre çökelti elde edildi. Hücre çökelti 500 ul buffer A (250 mM sucrose, 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂) ile resuspende edildi. Buz üzerinde sonikasyon

(2 kez, 10 sn cont., 30 sn ara, %40 güç) yapıldı. Lizat örnekleri 800g de 15 dakika santrifüj edildi. Çökelti A nukleus izolasyonu için ayrıldı, üst faz A tekrar 1000 g 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen üst faz B sitozol proteinlerini ayırmak için saklandı. Nukleus izolasyonu için ayrılmış olan çökelti A 500 ul buffer A ile tekrar çözündürüldü ve 1000 g 15 dakika santrifüj edildi. Üst faz C sitozolik protein izolasyonu için üst faz B'nin üzerine eklenerek buzda saklandı. Çökelti C 500 ul Buffer B1 (1 M sucrose, 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂) ile resüspande edildi ve 1.5 ml buffer B2 (2 M sucrose, 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂) tamponunun üzerine dikkatlice eklendi. Sonra 2100 g'de 1 saat boyunca santrifüj edildi. Üst faz atılıp çökeltinin üzerine 500 ul buffer D (20 mM HEPES, pH: 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 M NaCl, 0.2 mM EDTA, % 20 glycerol, % 1 Triton X-100) eklendikten sonra 1400 rpm, +4 °C, 1 saat rotarde inkübe edildi. Süspansiyon buz üzerindeyken sonikasyon (3 kez, 10 sn cont., 30 sn ara, % 40 güç) yapıldı ve 9000xg 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Nüklear lizat üst faz olarak elde edildi. Buz üzerinde beklemekte olan B ve C üst fazları sitozol proteinlerini elde etmek için 16000xg de 120 dk boyunca santrifüj edildi. Üst faz sitoplazma fraksiyonu olarak saklandı, çökeltinin üzerine 500 ul buffer C (20 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl, % 15 glycerol, % 1.5 Triton X-100) ekledikten sonra 1400 rpm ve +4 °C de 1 saat rotarda inkübe edildi ve membran bileşenlerini izole etmek için 9000xg de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen protein örnekleri sonraki araştırmalar için -86 °C saklandı.

3.2.10. Reporter Gen analizi

2,5x10⁴ kontrol ve 12h.5(NA) hücreler 24 gözlü hücre kültürü kaplarına ekildi ve 2 gün boyunca 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde büyütüldüler. İki gün sonra, kültür ortamı (RPMI), serumsuz (FBS) ve antibiyotik içermeyen yeni ortam (500 µl) ile değiştirildi ve hücreler 2 saat 37 °C'de % 5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Daha sonra, hücreler üzerine transfeksiyon reaktifi ile sinyal raportör (DNA yapısı) eklendi.

Çizelge 3.2. Transfeksiyon karışımının hazırlanışı.

RPMI (FBS ve Pen./Strep.içermeyen)	198,7 µl
Transfection Reagent	0,3 µl (3:1 ratio)
DNA Konstraktı	1 µl (100 ng)
Toplam	200 µl

1 µg (1 µl) DNA konstraktı ile 0,3 µl FuGene transfeksiyon reaktifi 100 µl negatif RPMI içerisinde ayrı tüplerde hazırlandı ve 5 dakika bekletildi. Reaktif karışımı DNA konstraktı üzerine eklendi, hafifçe karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 20 dakika boyunca bekletildi. Transfeksiyon karışımı kuyulara damlatılarak uygulandı. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücrelere 10^{-5} M sentetik androgen (R1881) uygulandı ve 6 saat süreyle 37 °C’de % 5 CO₂’li inkübatörde inkübe edildi. Uygulamadan sonra hücreler PBS (fosfat tamponu salin) içerisinde santrifüj tüplerine toplandı ve 13.200 rpm, 4 °C’de, 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Her eppendorfe 100 µl PLB (pasif lizis tamponu) eklendi ve döndürücü (rotor) içinde oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübe edildi. Örnekler 4 °C’de 2 dakika boyunca 13.200 rpm’de santrifüjlendi. Üst faz yeni eppendorf tüplerine aktarıldı (Opsiyonel: Örnekler bu aşamada -86 °C’de saklanabilir). BCA testi ile protein konsantrasyonu ölçüldü. 95 µl numune özel beyaz, 96 gözlü kaplara yerleştirildi (buz üzerinde). Sonra kap luminometreye yerleştirildi. Luminometre dağıtıcı oda sıcaklığına getirilmiş 100 ul Luciferase Assay Reagent II (LAR II) için ayarlandı ve ölçüm işlemi gerçekleştirildi (Hacim: 100 ul, Lüminesans, Entegrasyon süresi: 2000 ms, Aralık zamanı: 2 sn., Filtre: 538, Gecikme Süresi: 2 sn.) Sonra dağıtıcı % 70 alkol ve distile su ile temizlendi. Bu deneyde spesifik olarak prostat hücrelerinde eksprese olan, 20-22 kDa civarındaki, androjenle regüle edilen ‘Probasinin vektörü’ ve kontrol olarak ‘pGL-Basik vektörü’ kullanıldı. Ölçüm işlemleri Fluoroskan Ascent (ThermoFisher) florimetre cihazında yapıldı. Elde edilen veriler Microsoft Excel’de değerlendirildi.

3.2.11. shRNA lentiviral partiküller transdüksiyonu

2×10^4 LNCaP hücreler 6 gözlü hücre kültürü kaplarına ekildi ve 2 gün boyunca 37°C 'de % 5 CO_2 'li inkübatörde yoğunlukları % 50-65 ulaşana kadar büyütüldüler. 2 gün sonra, % 10 serumlu (FBS), antibiyotik (penisilin/streptomisin) içeren kültür ortamı (RPMI) içerisine polibren (5 $\mu\text{g/ml}$) eklendikten sonra yeni ortam var olan hücre kültür ortamı ile değiştirildi. shNKX3.1 ve sh.kontrol lentiviral partikülleri oda sıcaklığında çözdürüldü ve kullanmadan önce hafifçe karıştırıldı. Uygun kaptaki hücreler 20 μl miktarda lentiviral partiküller ile enfekte edildi. 24 saat sonra hücre kültürü ortamı normal RPMI ortamı ile değiştirildi ve gece boyu inkübe edildi. shRNA ifade eden klonları seçmek için için sh.NKX3.1 ve sh.kontrol uygulanmış hücreler 1:3 şeklinde bölündü ve RPMI ortamında 48 saat büyütüldü. Puromisin dihidroklorür uygulaması yoluyla shRNA ifade eden kararlı klonlar seçildi. Transdüksiyona uğramayan hücreleri öldürmek için yeterli optimize edilmiş konsantrasyonlarda puromisin kullanıldı. Puromisin konsantrasyonu başlangıçta 2 $\mu\text{g/ml}$ eklenerek zamanla miktarı 10 $\mu\text{g/ml}$ 'e kadar yükseltildi ve bu şekilde her 3-4 günde bir ortam değiştirildikten sonra sabit klonlar seçildi.

3.2.12. NKX3.1 CRISPR KO plazmidin LNCaP hücrelerine transfeksiyonu

Transfeksiyondan iki gün önce LNCaP hücre yoğunluğu 5×10^5 olacak şekilde 3 cm^2 platelerde 2 ml RPMI ortam içerisinde kültüre alındı. Transfeksiyon yapmadan önce hücre yoğunluğunun % 60-90 oranında olması kontrol edildi. Transfeksiyon sırasında NKX3.1 CRISPR KO Plazmid (Sc-401789)-transfeksiyon ortamı ile transfeksiyon ajanının ortamı ayrı ependorf tüplerinde hazırlandı. DNA karışımı için 1 μg DNA 100 μl Opti-MEMTM içerisinde hazırlandı. Transfeksiyonu ajanı olarak 4 μl Lipofectamine 2000 (kat.no. 11668-019) 100 μl Opti-MEMTM içerisinde seyreltildi. Karışımlar yavaşça karıştırıldıktan sonra 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. İki tüp karışımı birleştirildi ve 15 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu arada hücreler, serumu uzaklaştırmak için Opti-MEMTM besi ortamı ile yıkandı. Hücrelere 1 ml Opti-MEMTM eklendi ve hazırlanmış DNA karışımı yavaşça

ilave edildi. Sonrasında DNA-Lipofectamine karışımının tüm yüzeye yayılması için plate yavaşça karıştırıldı. Hücreler % 5 CO₂, 37 °C inkübatörde 3 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süreci bitince hücrelerin üzerindeki tüm besi ortamı yeni RPMI ortamı ile değiştirildi. RPMI ortamında 48 saat boyunca inkübe edildikten sonra transfeksiyon verimliliği GFP ekspresyonu aracılığıyla İmmünofloresan mikroskopta kontrol edildi.

3.2.13. İmmünofloresan işaretleme (96 kuyulu hücre kültürü kabında)

NOT: Tüm işlemler yavaş ve dikkatli bir şekilde buz üzerinde yapıldı.

Kuyulara hücre kültür edilmeden önce, hücrelerin tutunma kapasitesini yükseltmek için poly-D-lysine ile kaplandı. Her bir plakaya 1x10⁴ hücre 100 µl ortam içerisinde ekildi ve 2 gün boyunca % 5 CO₂, 37 °C inkübatörde inkübe edildi.

Fiksasyon. Ortam uzaklaştırıldı ve her plakaya 100 µl %100 metanol eklendi ve -20 °C'de 30 dk bekletildi. Metanol yavaşça uzaklaştırıldıktan sonra hücrelere 100 µl % 70 etanol eklendi ve +4 °C da 30 dk çalkalamalı ortama bırakıldı. Etanolu uzaklaştırıp her bir kuyucuğun üzerine 50 µl % 0.2 triton X-100 içeren PBS eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon yapılarak hücrelerin permeabilize olması sağlandı.

Antikor İşaretlemesi. Triton X-100 uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya 50 µl % 1 BSA içeren PBS eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı, ardından bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak hücrelere sırasıyla primer (1 saat, % 5 CO₂, 37 °C'de) ve sekonder (20 dakika, %5 CO₂, 37 °C'de) antikor (30 µl/plate) uygulaması yapıldı. Antikor uygulamalarından sonra hücreler PBS ile yıkandı. Son olarak 100 µl dH₂O eklenen hücreler Fluoroskan Ascent (ThermoFisher) cihazında fluorimetrik olarak okundu.

3.2.14. Akış Sitometrisi Analizi

6 cm² platelerde büyütülmüş olan hücreler tripsin yardımıyla toplandı ve falkon tüplere alındı. 1200 rpm (290g)'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra üst faz atıldı ve çökelti 5 ml PBS ile yıkandı. Aynı hızda santrifüj yapılarak çökelti elde edilmesinin ardından hücre çökelti 1 ml PBS ile çözündürüldü. % 100 etanol (4 ml olacak şekilde) düşük güçte vortekslenmekte olan hücreler üzerine damlalar halinde eklendi. Hücreler işlem süresine kadar -20 °C'de saklandı (en az gece boyu, en fazla 1 ay). İşlem yapılacağı gün hücreler 1200 rpm'de 10 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı (etanolu tamamen uzaklaştırmak için). Çökelti 1 kere 5 ml PBS ile yıkandı ve 1200 rpm 10 dk +4 °C'de santrifüj yapılarak çökelti toplandı. 1 ml % 0.1 triton X-100 içeren PBS ekleyip 2-8 dk karıştırıcıda karıştırılarak hücreler permeabilize edildi. Kontrol grubundaki örneğin yarısı boyanmamış örnek olarak kullanmak amacıyla ayrıldı ve hacim 1 ml'e kadar tamamlandı.

Antikor İşaretlemesi. Hücreler 2000 rpm'de (300 g) 10 dk, +4 °C'de santrifüj yapılarak üst faz atıldı. 500 µl PBS içerisinde 20 µg/ml RNase A eklendi ve 30 dk boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Buz üzerinde bulunan örnekler üzerine 5 µg/ml PI boya eklendi ve 15 dk boyunca inkübe edildikten sonra 'Akış Sitometrisi' cihazında okuma yapıldı.

3.2.15. Crystal violet boyası ile koloni oluşturma sayımları

Kontrol olarak LNCaP ve NKX3.1 geni baskılanmış, inflamatuvar mikroçevrede migrasyon tetiklenmiş olan 3h(2)², 3h(2)³, 6h-1 ve 12h(2)² hücreler dört tekrarlı olacak şekilde 3 cm²'lik hücre kültür kaplarında 1x10⁴ hücre 2 ml RPMI ortamı içerisine ekildi ve 3 gün aralıklar ile her bir hücre kolonisinden birer örnek ayrıldı ve crystal-violet boyası ile boyanarak oluşan hücre koloni sayısı tespit edildi. Böylece 12 günün sonunda her bir hücre çeşidinde devamlı olarak kolonilerin oluşum dinamiğine bakıldı.

Crystal Violet ile hücreleri boyama. 3 cm²'lik plakalardaki hücre büyüme ortamı uzaklaştırıldı, hücreleri yıkamadan hücre kültür kabını kaplayacak kadar boya eklendi ve oda sıcaklığında 20 dk bekletildi. Zamanın

dolmasının ardından boya uzaklaştırılarak tekrar kullanılmak üzere tüpe toplandı. Fazla boyayı uzaklaştırmak için hücreler su ile yıkandı. Hücrelerin kurumaması için oda sıcaklığında hava ile kurumaya bırakıldı. Koloni sayısını hesaplamak için fotoğraf makinesi aracılığıyla kolonilerin görüntüleri çekildi ve ImageJ uygulaması ile değerlendirildi. Elde edilen veriler MS Excell ile grafiğe dönüştürüldü.

3.2.16. Nano-LC-MS/MS ile örneklerde proteinlerin belirlenmesi (IN SOLUTION DIGEST)

3.2.16.1. Numune Hazırlama, indirgeme ve alkilasyon, enzimatik reaksiyon

Hücre pelleti üzerinde izolasyon lizis tamponu uzaklaştırılır ve yerine Digest Lysis Buffer solüsyonu eklenir. Lizis Tamponu: 8M Üre + 50mM NH_4CO_3 (Ambic) + 1 fosfo tablet + 1 EDTA içermeyen tablet, 0,197 g ABC, 50 ml suda (50 mM) çözülür; 4,8 g Üre 10 ml 50mM ABC'de çözülür; ve sonra tabletler eklenir. 1.5 ml jumbo için 2 ml Lizis Tamponu eklenir. Tümü adım adım uygulanır.

Çizelge 3.3. Protein örneklerinin kitle tayını için hazırlama aşamaları

	Ekleme	Zaman, Sıcaklık	Santrifüj
1	Üre Lizis Tamponu	20 dak, buzda	
2	Vorteks		
3	7 numaralı siklus sonike edilir, Güç % 25-50, 100ul şırınga ile çekilir	2x60 s, buzda	

4	Santrifüj	45 dk	14000, 4°C
5	Protein Konsantrasyonunu ölçün 1 jumbo plaka 3-4 mg protein		
6	1:100 1M DTT	30-45dk, 56 °C	
7	1:50 1M CholoroAA veya IAA (karanlıkta)	30 dk, RT	
8	1:100 1M DTT	15 dk, RT, karanlık	
9	7 birim ABC ekle (1:8 50mM ABC)		
10	1: 100 Tripsin	12-16 saat, 37 °C	inkübatörde
11	Kitle tayini için asitleştirmeden önce alikotlamayı unutmayın		
12	% 10 FA ile asitleştirin (~ pH 2-3)		

3.2.16.2. SPE (Katı Faz Ekstraksiyon) Sistemi 1cc veya 3cc Sep-pak

Sep-pak bağlama kapasitesi

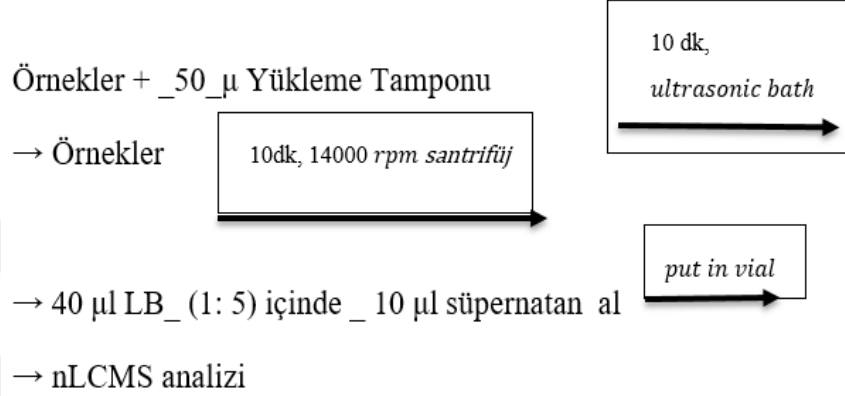
3cc: 3-4 mg

1cc: 1-2 mg

Sep-pak'lar ve çözümler hazırlanır. Numuneler kurduğunda, numuneleri alınır ve 1 ml Aşama Tampon A'da tekrar çözünür. Tamamen çözüldüklerinden emin olmak için numuneler sonike edilir (2-3 dk; numuneleri, bekletmek gerektiğinde 40 °C'de tutabilirsiniz). Sep-pak' şartlandırılır. Sonra 1 ml ACN ile ıslatılır ve 1 ml Stage Buffer A (x2) ile yıkanır. Sep-pak üzerine yeniden çözülmüş örnekler eklenir (1 ml içinde),

Sep-pak'a yüklemeden önce daima örnekleri vortekslenmesi gerekiyor. 3 ml Stage Buffer A yıkama tamponu ile yıkanır (x2). Sonra, 1 ml Örnek Tampon B ile elüt edilir. Elütler vakumda kurutulur (ısı yok). Kurutulmuş örnekleri -20 °C'de saklanabilir.

3.2.16.3. nLC-MS / MS analizleri ve sonuçları



Kütle Spektinde Toplam Çalışma Süresi: 75 veya 90 dk

3.2.17. Veri analizi

MS analizi sonrasında elde edilen başlangıç veri analizi için Thermo Discoverer 1.4 uygulaması kullanıldı. Bilgi servisi için 'Mascot & Sequest'den faydalandı. MS/MS spektrumları, insan Uniprot veritabanına karşı arandı. Her iki peptide % 0,01 FDR kullanıldı. Biyoinformatik analizinden önce, ortaya çıkan protein listesi, yaygın kirletici maddeleri elemek ve veri tabanı isabetlerini ortadan kaldırmak için filtrelendi.

3.2.18. Protein verilerinin biyoinformatik analizi

Farklı eksprese edilen proteinleri belirlemek için Venn diagramı (<http://bioinformatics.psb.ugent.be>) kullanıldı. İnflamatuvar ortama yanıt olarak değişen örneklerde ortak eksprese edilen proteinlerin fonksiyonel analizi için 'FunRich' uygulaması aracılığı ile yapıldı. Diğer zenginleştirilmiş analizler için DAVID 6.8 ve PANTER veritabanlarından faydalandı.

Hücre örnekleri arasındaki protein ekspresyonu değişiklikleri, dokular arasında en büyük farkları elde etmeyi amaçlayan, log2 kat değişim kısıltması 1.5'e (kat değişim 2.8'e eşdeğer) ile değerlendirildi.

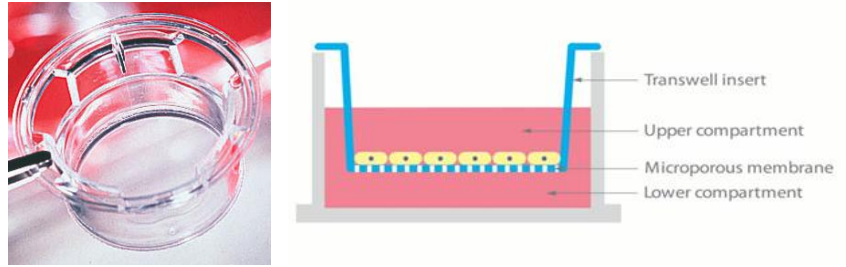
Log2 kat değişim kısıltmasına göre filtrelenmiş hücre örneklerinin biyoinformatik protein analizleri Perseus yazılımında yapıldı (<http://www.perseus-framework.org/>). Tüm analizler için, verileri yalnızca numunelerin >% 70'inde ölçülen proteinleri içerecek şekilde filtrelendi. İç standarda yönelik oranlar, her numunede en sık değerin çıkarılmasıyla normalleştirildi ve eksik veri noktaları, 0.3 genişliğinde ve 1.5'lik bir küçültülmüş normal dağılım oluşturularak elde edildi.



4. BULGULAR

4.1. LNCaP Hücrelerinde CM Aracılıklı Migrasyonun Tetiklenmesi ve aracılığıyla Morfolojik Değişikliklerin Oluşturulması

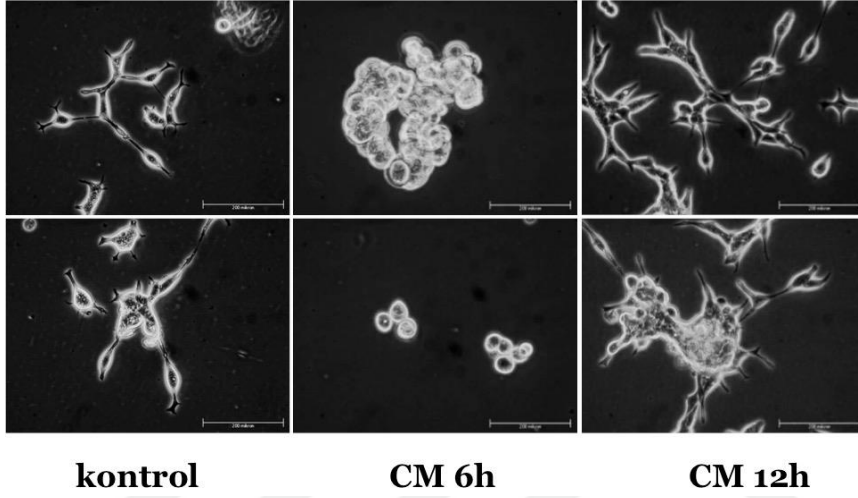
Bu çalışmada, prostat kanserinin inflamasyon aracılıklı gelişim sürecinde hücrelerin migrasyon yeteneklerinin araştırılması ve ilişkili olası protein hedeflerin tanımlanması amaçlandı. Bu hedef doğrultusunda, deneylerde androjen yanıtı oluşturan LNCaP hücre hattı kullanıldı. Deneyde, öncelikle inflamatuvar mikro çevrede migrasyon özelliği gösteren hücreleri elde etmek için Boyden çemberi kullanıldı. İçerisine $8 \mu\text{m}$ ($1 \times 10^5/\text{cm}^2$) boyutunda deliklere sahip olan, 24 mm çapındaki, 6 kuyucuklu hücre kültür kapları için “Polycarbonate Transwell Inserts”ler (Corning) yerleştirildi (Şekil 4.1). Migrasyon yeteneği yüksek olan hücrelerin kemotaksis yetenekleri aracılıklı seçilebilmeleri için gen ekspresyonu değişiklikleri ve diğer uygulamalar öncesinde serum aracılığıyla gradyan oluşturularak hücrelerin kemotaksi ile migrasyon yapmaları tetiklendi.



Şekil 4.1. Boyden çemberi ve yerleştirilen membran yapı

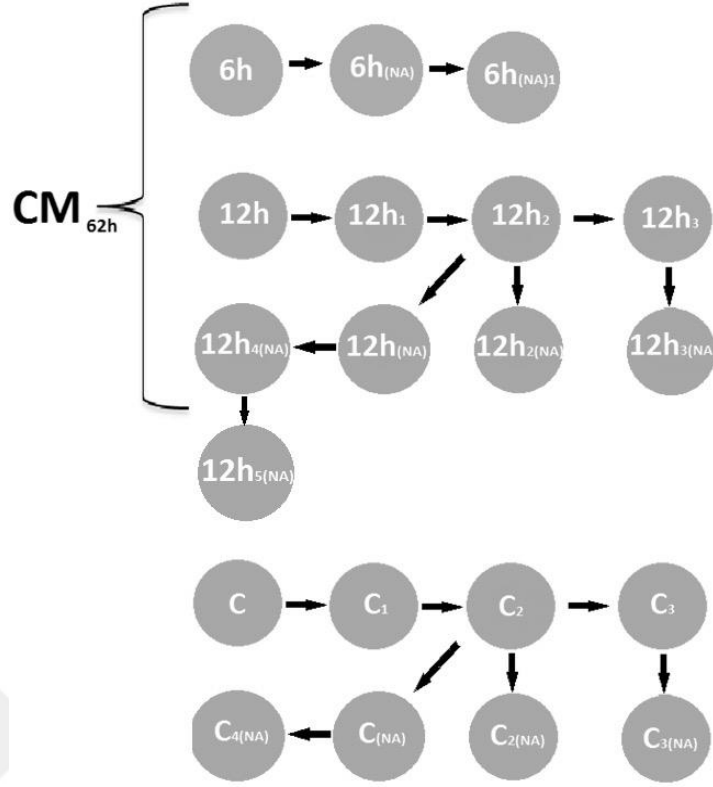
İnflamatuvar mikroçevrenin etkisiyle migrasyon yeteneği kazanan hücrelerin membranı geçebilmeleri için hücreler 62 saat boyunca inkübe edildi. İnvazyon sonrasında kültür kabının alt bölümüne dökülen hücreler koloni oluşturmaya başlayınca, klonların bir birine karışmadan büyümeleri için her bir klon 96 kuyucuklu hücre kültür kabının farklı kuyucuklarına

aktarılarak büyütüldü. Burada CM uygulaması yapılmamış kontrol hücrelerinde de migrasyon tespit edildi. Göç eden kontrol hücrelerine karşı kısa süreli CM uygulaması (3, 6 ve 12 saat) sonrası göç eden hücreler morfo-fizyolojik farklılık gösterdi (Şekil 4.2). Migrasyon deneyi sonrası büyütülen örneklerde, kontrol hücresinin oluşturduğu koloniler küçük, 6 saat CM uygulanmış örnekler nonadhesif ve 12 saat CM uygulanmış örneklerin oluşturduğu kolonilerin daha büyük olduğu gözlemlendi.



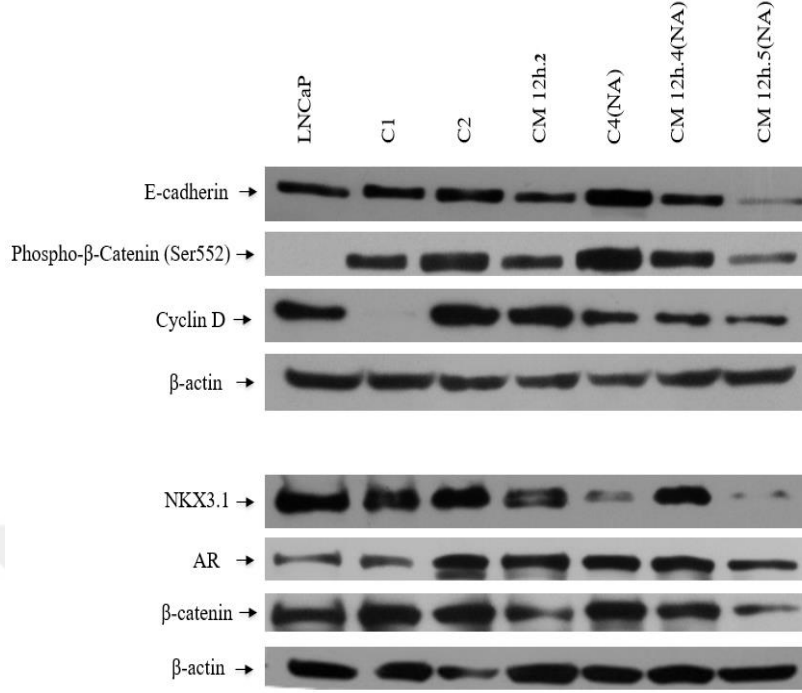
Şekil 4.2. İnflamasyon ile uyarılan migrasyon deneyi sonucunda elde edilen LNCaP hücrelerinin ışık mikroskobu ile çekilmiş görüntüsü

LNCaP hücrelerinin kültür edilme sürecinde bazı hücrelerde nonadhesif özellikler gözlemlendi ve buna göre hücreler şekil 4.3’de görüldüğü gibi sınıflandırıldı.



Şekil 4.3. Pasajlama Sürecinde Farklılık Gösteren Hücrelerin Hiyerarşisi C: Kontrol hücreleri, C(NA)-yüzeye bağlanma özelliği düşük olan kontrol hücreleri. 12h: 12 saat CM uygulanmış ve 12h(NA)-yüzeye bağlanma özelliği düşük olan hücreler. 6h: 6 saat CM uygulanmış hücre örnekleri.

Sınıflandırılmış hücre örnekleri ayrı kültür kaplarında büyütüldü. Kontrol ve CM12h grubundaki hücrelere karşı CM6h hücre örnekleri çok yavaş büyüdü. Hızlı büyüyen hücre klonlarındaki protein değişikliklerini kontrol etmek ve en çok değişim gösteren klonu seçmek için SDS-PAGE ve Western Blot deneyi yapıldı. Ek olarak kontrol LNCaP hücreleri de deneye dahil edildi. Epitelyal marker olan E-kaderin, ve E-kaderine bağlanan β -katenin prostat hücrelerine özgü metastatik kanser örneklerinde ekspresyonu baskılanan NKX3.1 ve diğer mitotik antikörler ile işaretleme yapıldı (şekil 4.4). Sonuçlara göre; kontrol ile karşılaştırıldığında göç eden hücrelerin protein seviyelerinde değişimlere rastlandı. Aynı anda, göç eden hücre klonlarında kendi aralarında farklılıklar gösterdikleri bulguları. Bir sonraki deney için en fazla değişiklik gösteren 12h.5(NA) hücre klonu seçildi.



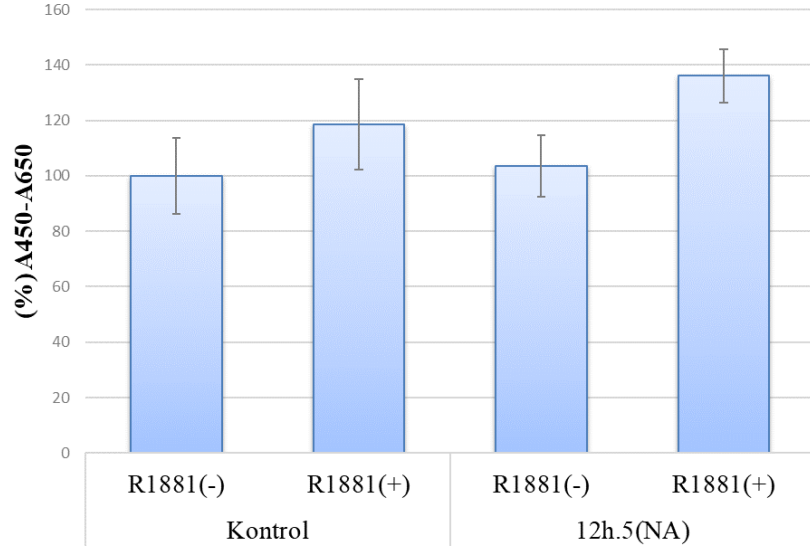
Şekil 4.4. 500 pg/ml TNFα içeren inflamatuvar mikroçevrede metastatik özellik kazanarak membranı geçmiş olan LNCaP hücreleri protein ekspresyonundaki değişiklikler. Kontrol grubuna göre protein ekspresyon seviyesinde belirgin farklar gözlemlendi. En fazla değişiklik gösteren 12h.5(NA) hücre klonlarında E-kaderin, β-katenin ve NKX3.1 proteinlerinde yıkımın gerçekleştiği, β-katenin^(S552) ekspresyonunun da arttığı gözlemlendi.

4.2 İnflamasyon Aracılıklı Migrasyon Sonrasında Hücrelerin Proliferasyon Hızının Araştırılması

İnflamatuvar mikroçevrenin tetiklemesiyle migrasyon yaparak alt tabakaya geçmiş olan LNCaP hücrelerinin, değişen proliferasyon hızını ve androjen varlığındaki proliferasyon kapasitesini araştırmak amacıyla, bu hücreler ve kontrol hücreleri kullanılarak WST-1 deneyi yapıldı. 96 kuyucuklu hücre kültür kabında büyütülen hücrelerde, R1881 (sentetik androjen) varlığında ve yokluğunda proliferasyon hızının değişimini belirlemek için her bir kuyucuğa 10 µL WST-1 reaktifi eklendikten sonra hücreler 3 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra spektrofotometre cihazında 450 ve 650 nm dalga boylarında ölçümler alındı. Deney üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı. Ölçüm kitinin yöntemine

uygun olarak yapılan WST-1 analizinden sonra elde edilen sonuçlar MS Excel’de grafiğe dönüştürüldü (şekil 4.5). Öncelikle tüm örneklerdeki uyarma dalga boyu değerinden emisyon değerini ayırarak proliferasyon hızı bulundu, R1881 uyarısı yapılmamış kontrol hücrelerini esas alarak tüm değerler yüzdeye çevrildi ve üç tekrardan oluşan her bir deney setinin ortalama değeri bulundu. Histogramdaki değerler, 12 saat CM uygulaması sonrası göç eden hücre klonunun proliferasyon hızını starvasyona bağlı göç eden kontrol hücrelerin proliferasyon hızına oranlanması ile elde edildi.

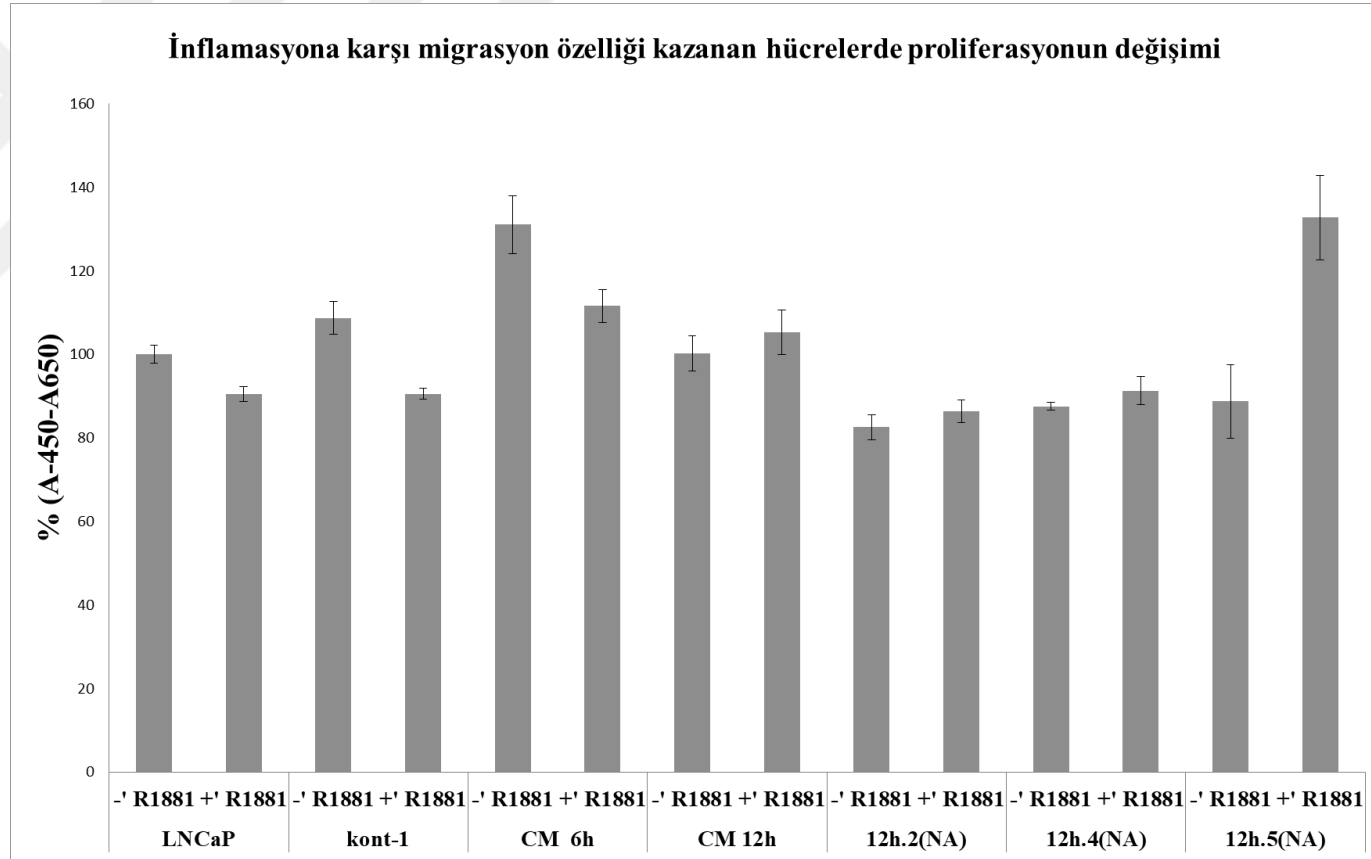
Migrasyon özelliği taşıyan hücrelerde proliferasyon değişimi



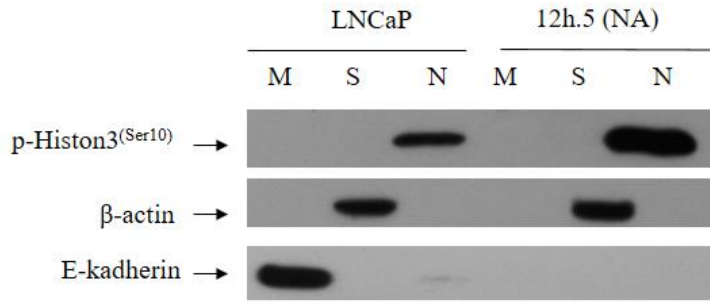
Şekil 4.5. CM uygulaması sonrasında metastatik değişim gösteren 12h.5(NA) hücre örneğinin, CM uyarısı yapılmayan kontrol hücrelerine karşı proliferasyon kapasitelerindeki değişiminin WST-1 yöntemi ile değerlendirilmesi. Kontrol hücrelerine kıyasla, 12h5(NA) hücrelerde proliferasyon hızının yüksek olduğu, androjen varlığında ise bu farkın daha da arttığı belirlendi ($p < 0,01$).

Daha önce yapılan çalışmalarda androjenin prostat hücrelerinde proliferasyon hızını yükselttiği bilinmektedir (Xin Yuang, et. al., 2006). Deneyde R1881 uygulaması sonrası proliferasyonun yükseldiği görüldü. Androjen yokluğunda göç eden kontrol ve 12h.5(NA) hücreleri arasında büyük bir fark gözlenmezken (% 3,5), androjen varlığında bu farkın R1881 uygulanmış örnekler arasında % 17,5 ‘e varan oranda yükseldiği tespit edildi.

Daha sonra, kontrol olarak seçilen LNCaP hücrelerine karşı migrasyon deneyi sonrasında göç eden hücrelerdeki proliferasyon farkını araştırmak için yapılan deneyde sadece starvasyona bağlı olarak göç eden kontrol hücrelerinde proliferasyonun, inflamasyonun yaptığı etkiye göre düşük olduğu görüldü. Laboratuvarımızda yapılan daha önceki çalışmalarda gözlemlendiği (Debeleç-Bütüner ve ark 2015) ve beklendiği üzere hücrelerin proliferatif kapasitesinin değişmesinde inflamasyona maruz kalma süresinin de önemli olduğu görüldü. Sadece anlamlı artışın 12h.5(NA) hücrelerinde androjen varlığında olduğu, ancak ‘CM 6h’ ve ‘kontrol-1’ hücre serisinde marjinal aralıkta ters bir etki gözlemlendi. Bu örneklerde R1881 varlığında görülen proliferasyon hızının R1881 yokluğuna göre daha düşük olduğu görüldü.



Şekil 4.6. Farklı sürelerde 500 pg/ml TNF α içeren CM uygulaması sonrasında metastatik özellik kazanan hücrelerin, proliferasyon kapasitelerindeki değişiminin WST-1 yöntemi ile değerlendirilmesi. Microsoft Excel programı kullanılarak elde edilen sonuçlardan grafik oluşturuldu.



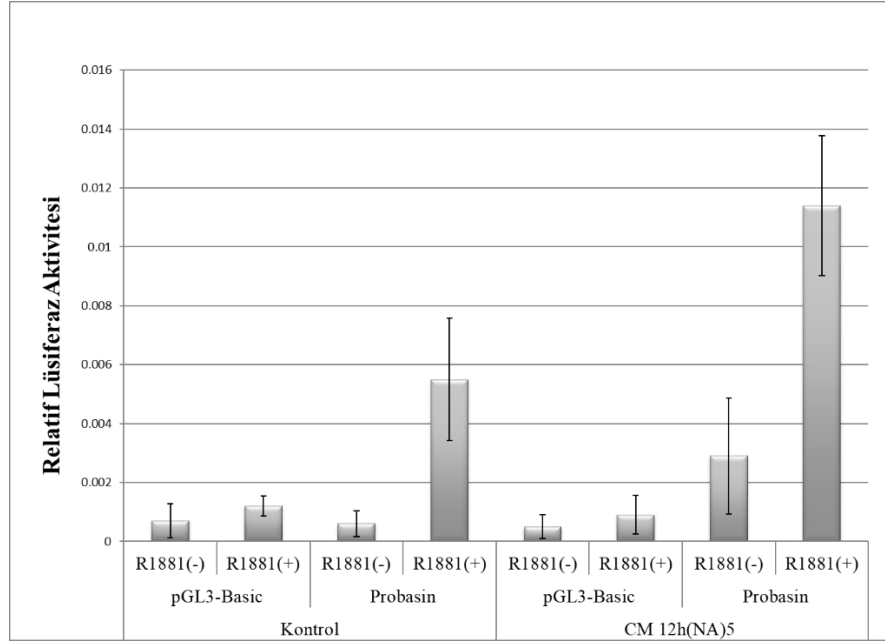
Şekil 4.7. Subselüler fraksiyon deneyinde diferansiyel olarak ayrılmış protein fraksiyonlarının western blot görüntüsü.

Pro-inflamatuar sitokinlere (CM ortamı) maruz kalarak migrasyon yeteneği kazanan LNCaP hücrelerinin, proliferasyon oranını protein ekspresyonu seviyesinde gözlemlemek üzere diferansiyel santrifügasyon yöntemi uygulandı ve bu şekilde subselüler fraksiyonlama gerçekleştirildi. Proliferasyon markeri olan p-Histon3^(Ser10) ile hücrelerin proliferasyon düzeyleri ve epitel hücrelerine özgü olan membrana bağlı E-kaderin proteininin ekspresyon düzeyleri araştırıldı. Western Blot yöntemi ile elde edilen sonuçlarda Histon3^(Ser10) fosforilasyon seviyesinin kontrol hücrelerine göre fazla eksprese olması ve E-kaderin proteininin internalizasyonu ve sonucunda yıkımı, bu hücrelerin EMT geçişi aşamasında olduğuna dair ön bilgi vermektedir.

4.3. Reporter Gen ile Göç Eden Hücrelerde AR Transaktivasyonunun Araştırılması

Kontrol grubu hücrelerine karşı değişim derecesi yüksek olduğu düşünülen 12h.5(NA) hücrelerindeki Androjen reseptörü aracılıklı transaktivasyon yanıtını incelemek amacıyla reporter assay deneyi tasarlandı. Her bir hücre serisine negatif kontrol olarak pGL3Basic reporter vektörü (promoter bölgesi içermeyen) ve pozitif kontrol olarak androjen ile düzenlenerek prostatta eksprese olduğu bilinen, lüsiferaz aktivitesine sahip

pProbasin reporter vektörü transfekte edildi. Hem negatif hem pozitif kontrol transfeksiyonu yapılmasının ardından hücrelerde AR transaktivasyonunu kontrol etmek için R1881 (+/-) uygulaması yapıldı. Daha sonra androjen varlığında ve yokluğunda probasin lüsiferaz aktivitesi ölçüldü. Elde edilen ateş böceği lüsiferaz aktivitesi örnek protein konsantrasyonuna bölünerek normalize edildi ve Microsoft Excel’de grafiğe dönüştürüldü (Şekil 4.8).



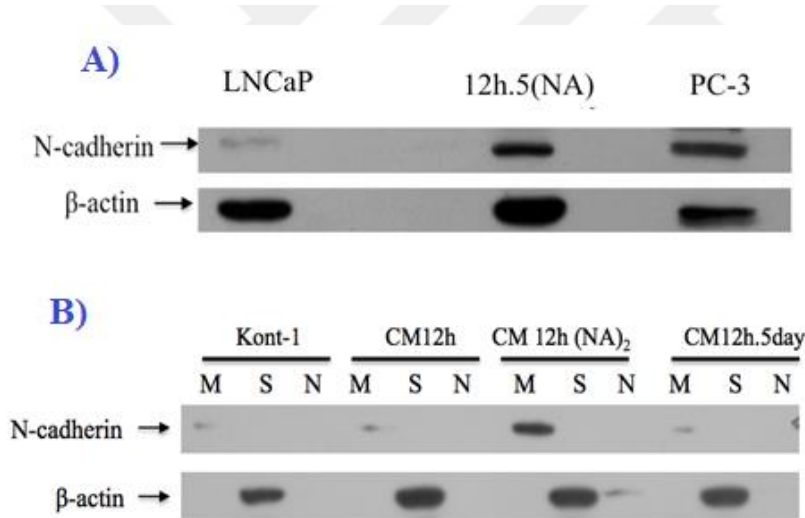
Şekil 4.8. Migrasyona uğramış hücrelerde AR transaktivasyonu.

pGL3Basic vektörü transfekte edilen kontrol hücrelerinde önemli bir fark gözlenmezken, pProbasin transfekte edilen ve R1881 uygulanmış hücre grubunda bir aktivite gözlenmektedir. Bu reporterin kontrol aktivitesini temsil etmektedir. pGL3Basic’e göre Lüsiferaz Reporter taşıyan ve promotörü minimal promotörden sıçan Probasin’e değiştirilmiş reporter plazmid transfeksiyonu durumunda hücrelerde AR transaktivasyonunun yüksek olması deneyin çalıştığının kanıtı olarak değerlendirilmiştir. Ancak, bu aşamadan sonra elde edilmek istenen; inflamasyona bağlı göç eden 12h.5(NA) hücre serisinde androjen varlığında probasin aktivitesinin durumu olup, bu deney setinde hem pGL3Basic vektörüne göre hem de kontrol grubuna göre yüksek

aktivite saptanmıştır. Bu durum hücrelerde inflamasyona bağlı değişikliklerin androjen yolağı dışında da AR transaktivasyonunun artabiliyor olduğunu göstermektedir.

4.4. LNCaP Hücrelerinde, İnflamasyon Varlığında EMT Geçişinin N-kaderin ve Vimentin Markerleri ile Kontrol Edilmesi

Migrasyon deneyi sonrasında elde edilen hücre serilerinde, epitelyal hücre adezyon molekülü olan E-kaderin kaybının ardından, *de novo* N-kaderin protein ekspresyonunun var olup olmadığını kontrol etmek için Western Blot analizi yapıldı.



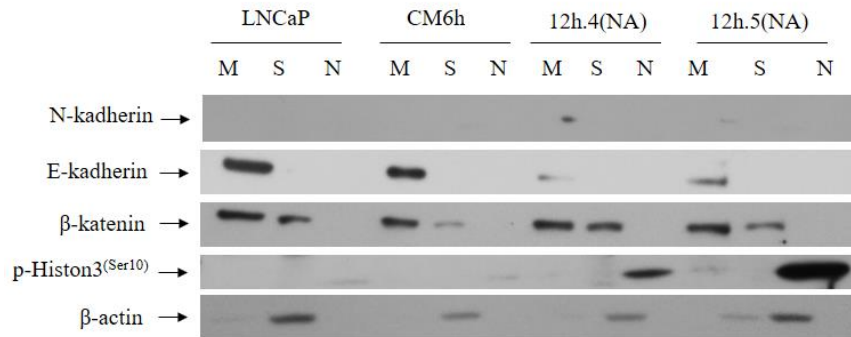
Şekil 4.9. CM uygulaması sonrası yapılan migrasyon deneyinde elde edilen LNCaP hücre klonlarda, N-kaderin ekspresyonunun artışını gösteren western blot görüntüsü.

A. LNCaP negatif kontrol hücre hattı ve N-kaderin ekspresyonuna sahip olan kemik metastazı hücre hattı PC3 pozitif kontrol olarak kullanılmış ve inflamasyon varlığında LNCaP hücrelerinden elde edilen 12h.5(NA) serisinde N-kaderin ekspresyonu incelenmiştir. 12h.5(NA) serisinde N-kaderin ekspresyonu kontrole göre önemli derecede artmıştır.

B. Kont-1 (kontrol-1) olarak isimlendirilen, CM ile migrasyona uğrayan LNCaP hücreleri ve aynı migrasyon deneyinden elde edilen diğer hücre serilerinin N-kaderin ekspresyonunun subseleler fraksiyonlama sonrasındaki western blot sonucudur.

12h.5(NA) hücrelerinde N-kaderin ekspresyonunun tespit edilmesinin ardından (şekil 4.9. A) migrasyon deneyinde elde edilen diğer klonlarda da (şekil 4.3) aynı şekilde N-kaderin ekspresyonuna bakmak ve aynı anda proteinin lokalizasyonunu tespit etmek için subselüler fraksiyonlama deneyi yapıldı. Bu yöntem ile membran, sitoplazma ve nüklear proteinler ayrıldı. Western Blot analizi sonrasında geri kalan hücre serilerinden farklı olarak 12 saat CM uygulaması sonrası nonadhesif olarak gruplandırılan hücrelerde N-kaderin ekspresyonunun kazanıldığı görüldü (Şekil 4.9).

Yukarıda tespit edilenlerden yola çıkarak bir sonraki deneyler için 12 saat CM uygulaması yapılan ve nonadhesif olarak gruplandırılan hücre örnekleri hem de 6 saat CM uygulaması sonrasında göç eden ve uzun bir süre nonadhesif bulunmanın ardından (şekil 4.2) tekrar tek tabaka hücre morfolojisine geçen ve proliferasyon olmaya başlayan ‘CM6h’ hücreler bir sonraki deneyler için seçildi. İnvazyon ve migrasyon özelliğine sahip olan bu hücreler, normal inkübasyon koşullarında ve RPMI besi ortamında beslendi ve hücreler 2 pasaj geçirdikten sonra N-kaderin ve diğer proteinlerin ekspresyon seviyeleri Western Blot’ta tekrar kontrol edildi.

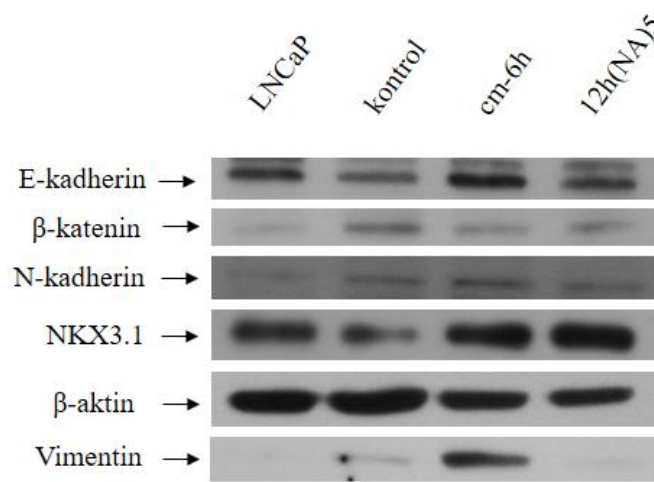


Şekil 4.10. İnflamasyona yanıt olarak göç eden hücre serilerinde EMT markerlerinin kontrolü.

Özellikle 12 saat boyunca CM uygulanmış örneklerde, daha belirgin bir protein ifadesine sahip olduğu western blot’ta görülen (Şekil 4.10), kazanılmış

olan N-kaderin ekspresyonunun, zamanla ne kadar değiştiğini araştırmak amacıyla yapılan deneylerde, N-kaderin seviyesinin azaldığı görüldü. Ancak, aynı örneklerde E-kaderin seviyesinin hala önemli derecede düşük olduğu, β -katenin 'in belli miktarda sitoplazmaya internalize olduğu görüldü Bu sonuçlar daha sonra yapılan IF deneylerinde (şekil 4.12) değişmeyen β -katenin seviyeleri ile de uyumlu bulundu. Ayrıca p-Histon3^(Ser10) proteininin kontrol hücrelerine göre aşırı ekspresyonu, hücrelerin mitotik aktivitelerinin yüksek olduğunu gösterdi.

Yapılan birçok araştırmada, EMT geçişi evresinde, vimentinin predominant olarak aşırı eksprese olduğu bilinmektedir. Buna bağlı olarak EMT özelliği kazandığı düşünülen “12h.5(NA)” ve “CM6h” örneklerinde vimentinin ekspresyon seviyesi kontrol edildi.



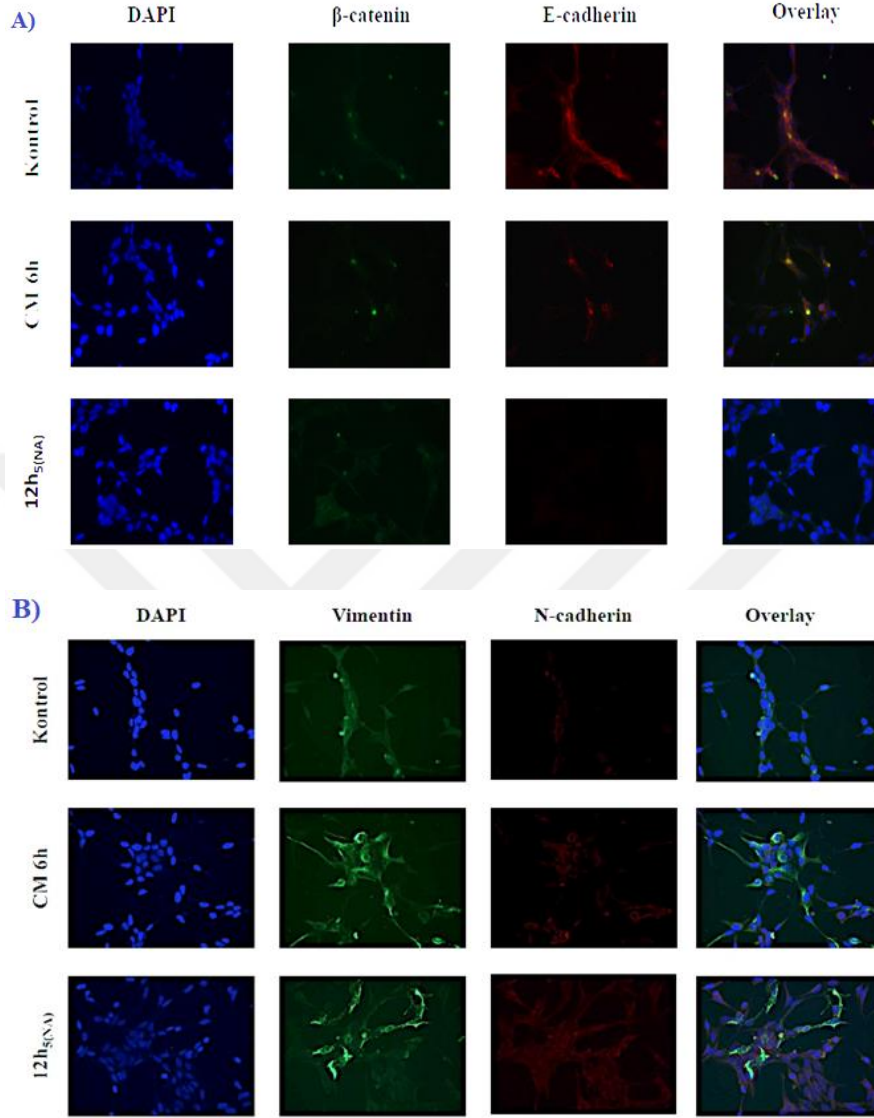
Şekil 4.11. İnflamatuar mikroçevreye yanıt olarak migrasyon özelliğini kazanmış hücrelerde; β -katenin, E-kaderin ve artan vimentin protein ekspresyonlarının görüldüğü western blot görüntüsü

Farklı zamanlarda CM uygulaması yapılmış olan LNCaP hücrelerinde hem morfolojik hem de fizyolojik değişimler olduğu gözlemlenmişti fakat inflamasyon varlığında ekspresyonu baskılanan bazı proteinlerin daha sonra tekrar eksprese olduğu görüldü. Elde edilen western blot sonucuna göre

inflamatuvar mikroçevrede baskılanan E-kaderin ve NKX3.1 proteinlerinin tekrar fonksiyon kazandığı görüldü. LNCaP hücrelerinden farklı olarak seçilmiş örneklerde vimentinin de aşırı eksprese edildiği bulgulandı. Bu gibi değişimler EMT geçiren hücrelerin kısa bir süre sonra tekrar MET geçişine uğradığını düşündürdü.

4.5. İnflamasyon Varlığında Vimentinin Fonksiyon Kazanması ve Hücre Morfolojisindeki Rolü

İnflamasyona yanıt olarak değişen hücrelerde vimentin ekspresyonunu kazandığını gösteren western blot sonuçlarından yola çıkarak (şekil 4.11) bu hücrelerde EMT'e bağlı değişim olabileceği ileri sürüldü. Bu tahmini kanıtlamak için EMT pozitif markeri olan vimentin ve N-kaderin hem de negatif markeri E-kaderin antikorları kullanarak immünofloresan işaretleme yapıldı. Kontrol hücrelerinde, bağlantı bölgelerinde net olarak görülebilen E-kaderin lokalizasyonunun, CM varlığında azaldığı ve hücre bağlantı bölgelerinin bozulduğu gözlemlendi. Vimentin ise kontrol hücrelerinden farklı olarak göç eden örneklerde eksprese edildi. İmmünofloresan işaretleme 'CM 6h' örnek ile ilgili western blot sonucunu kanıtladı. Şekil 4.11'deki western blot analizi sonucundan farklı immünofloresan görüntüsünde 12h.5(NA) hücrelerinde de vimentinin eksprese edildiği gösterildi.

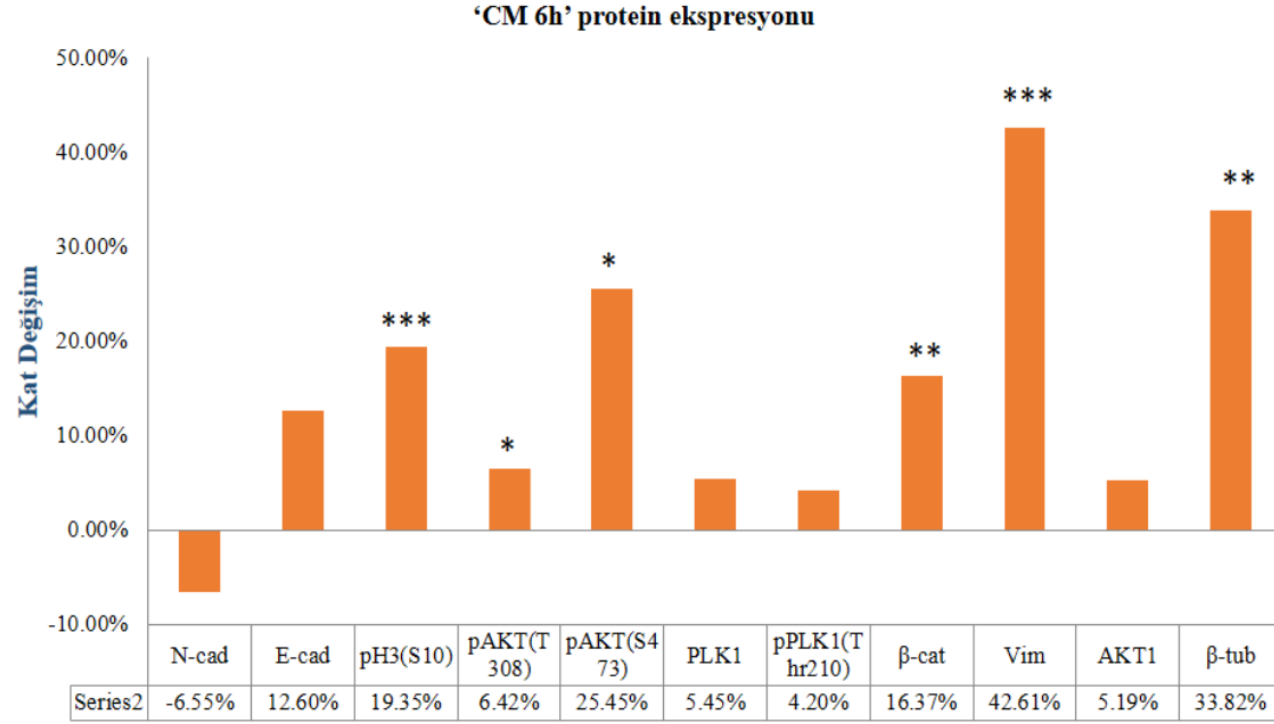


Şekil 4.12. A. İnflamatuvar mikroçevreye yanıt olarak migrasyon özelliği kazanmış olan hücrelerde, kontrol hücrelerine kıyasla membranlarda β -katenin ve E-kaderin seviyelerinin azaldığını B. Vimentin ve N-kaderin seviyelerinin arttığını gösteren immunoflüoresan mikroskobu görüntüleri

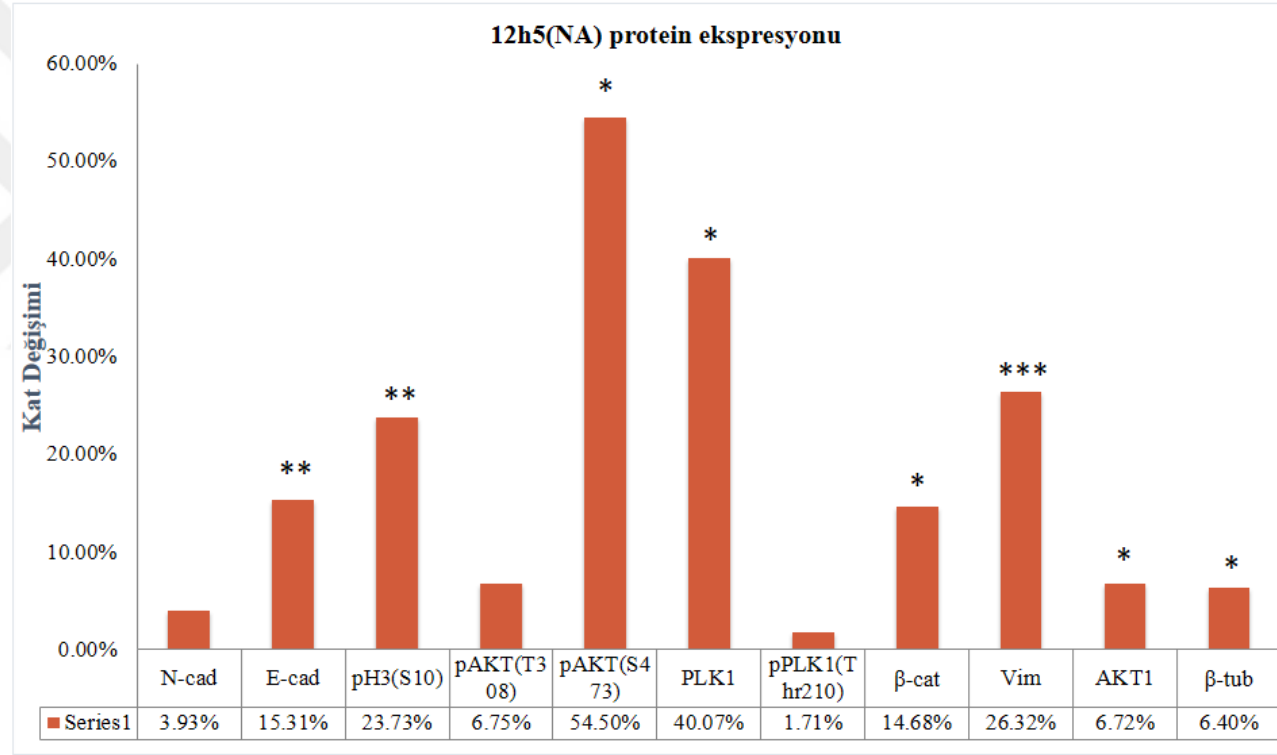
4.6. İnflamasyona Yanıt Olarak Göç Eden Hücrelerde Çoklu Antikor İşaretlemesi İle Protein Seviyelerinin Araştırılması

İnflamatuvar mikroçevrede büyütülen ve metastatik özellik kazanan LNCaP hücrelerinde meydana gelen değişiklikleri doğrulamak için cam tabanlı

96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında immunoflöresan işaretlemler yapıldı. Dört tekrardan oluşan kontrol ve CM uygulanmış hücrelerde 12 farklı proteinin ekspresyon seviyelerine bakıldı. Tüm örnekler ilgili primer antikorlar ve sekonder antikor Alexa488 (yeşil) ile işaretlendiler. A485-A538 dalga boyunda fluorimetrik okuma yapıldı. Sonra hücre kültür kabındaki sıvı % 70 alkol aracılığı ile uzaklaştırılarak cam taban kurumaya bırakıldı. Fluorimetrik okuma sonuçlarını normalize etmek için hücreler DAPI ile boyandı ve A355-A460 dalga boyunda okuma yapıldı. Elde edilen sonuçlar Microsoft Excel programında normalize edildi ve grafiğe dönüştürüldü (Şekil 4.13/4.14)



Şekil 4.13. CM.6h hücrelerindeki proteinlerin fluorimetrik değerlerinin kantitatif olarak karşılaştırılması (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

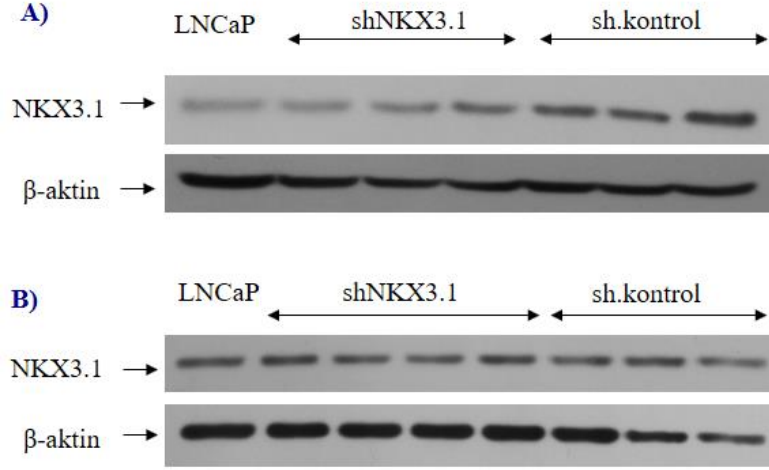


Şekil 4.14. 12h.5(NA) hücrelerindeki proteinlerin fluorimetrik değerlerinin kantitatif olarak karşılaştırılması (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Sekonder antikor olarak seçilen 488 dalga boyundaki antikorun farklı primer antikorlarda farklı verimlilik ile çalıştığını ve primer antikorun hedeflediği proteinin hücrede bulunma oranının farklı olabileceği göz önünde bulundurularak grafik görüntüsü aynı protein grubundaki kontrol örneğine göre değerlendirildi. ‘CM.6h’ hücre örneği sonuçlarında (şekil 4.13) kontrole karşı değişim oranı yüksek olan proteinlerin kat değişim değeri pHiston3^(Ser10) (19,35%), pAKT1/2/3^(Ser473) (25,45%), β -katenin (16,37%), vimentin 42,61%) ve β -tubulin (33,82%) oldu. 12h.5(NA) hücre örneğinde (şekil 4.14) kontrole karşı değişen proteinlerin kat değişim oranı E-kadherinde (15,31%), pHiston3^(Ser10)de (23,73%), p-AKT^(Ser473)(54,5%), PLK-1 (40,07%), β -kateninde (14,68%), vimentinde (26,32%), AKT-1’de (6,72%), β -tubulinde (6,4%) olarak tespit edildi.

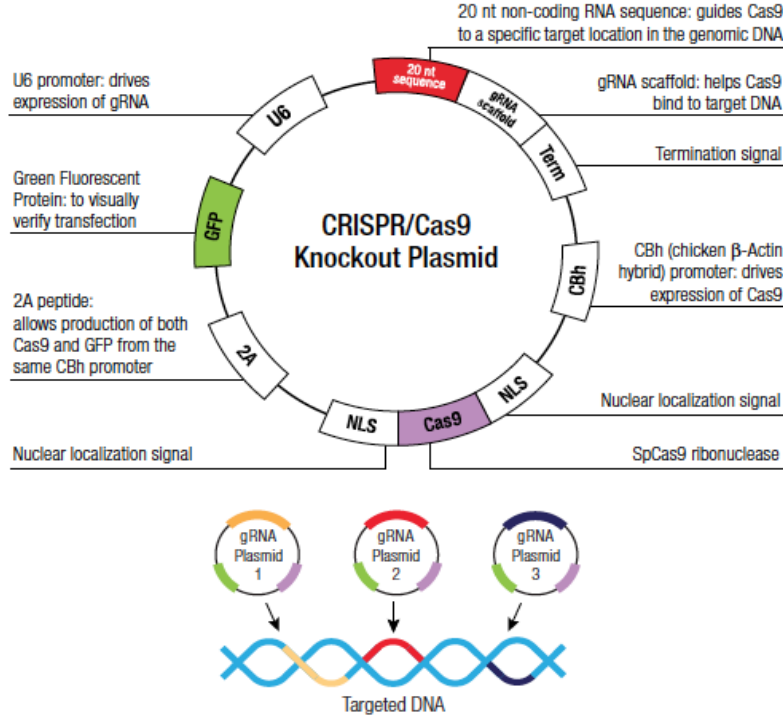
4.7. LNCaP Hücrelerinde NKX3.1 ifadesinin susturulması

Prostat hücrelerinde spesifik olarak eksprese olan NKX3.1 proteininin, inflamatuvar mikroçevrede oluşan migrasyonu baskıladığı ortaya konmuştur. Ayrıca yapılan çalışmalarda, NKX3.1 yıkımının doğrudan veya dolaylı olarak β -kateninin membran yerleşimini önemli derecede değiştirdiği ve hücrelerin migrasyon kapasitelerinin artmasına dolayısıyla yeni bir fenotipin oluşumuna aracılık ettiği gösterilmiştir (Debelec-Butuner et al.,2014). Buna bağlı olarak inflamatuvar mikroçevrede NKX3.1 LNCaP hücrelerinde ortaya çıkan değişiklikleri NKX3.1 yoksunluğu durumunda araştırmak amacıyla shNKX3.1 lentiviral partikülleri kullanılmış ve elde edilen klonlardaki NKX3.1 ekspresyon seviyeleri Western Blot ile analiz edilmiştir (Şekil 4.15)



Şekil 4.15. NKX3.1 ekspresyonunun baskılanması ve zaman içerisinde geri kazanılması. A) Transdüksiyon yapıldıktan sonraki ilk hafta ve B) iki hafta sonra elde edilen sonuçlar

Şekil 4.15'deki western blot sonucuna göre viral transdüksiyondan hemen sonra yapılan analizlerde sh.kontrole karşı sh.NKX3.1 örneklerinde protein yıkımının marjinal bir miktarda başarılı olduğu görülmüştür. Transdüksiyon verimliliğini stabilize etmek için aynı sh.kontrol ve sh.NKX3.1 örnekler normal RPMI ortamında 10 gün boyunca beslenerek tekrar analiz edildiklerinde, NKX3.1 ekspresyonunun zaman içerisinde geri kazanıldığı belirlenmiştir. Bu durumda, mevcut yöntem NKX3.1 yıkımının inflamasyon üzerindeki etkisini araştırmak için etkili bir yöntem olmadığı düşünülmüş, LNCaP hücrelerinde NKX3.1 genini kalıcı olarak baskılamak için CRISPR-Cas9 sistemi kullanılmıştır.

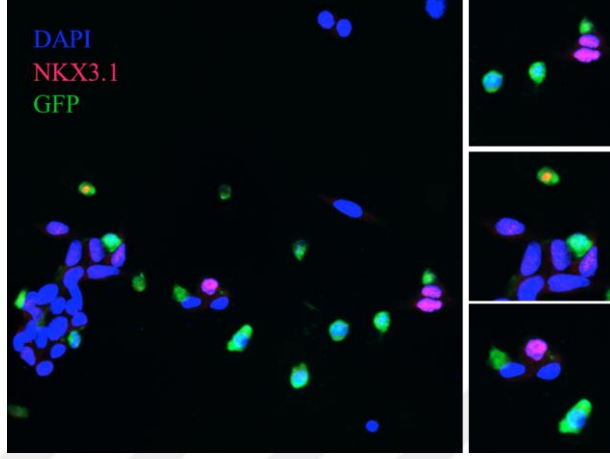


Şekil 4.16. NKX3.1 CRISPR KO plazmidinin yapısı

Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (CRISPR-Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) ve CRISPR-ilişkili protein (Cas9) sistemi, arkea ve bakteriler tarafından kullanılan adaptif immün yanıt savunma mekanizmasıdır ve hücreye giren yabancı genetik materyalin bozulması için iş görür. Bu mekanizmanın, gen mühendisliği dahil olmak üzere birkaç genom düzenleme yönteminde, memeli hücrelerinde gen susma (KO) işleminde kullanılabildiği ortaya konulmuştur. CRISPR/Cas9 KO Plazmid ürünleri rehber RNA (guided RNA-gRNA) kullanılarak spesifik genleri tanıır ve parçalara ayırır (<https://www.scbt.com/scbt/product/nkx-3-1-crispr-knockout-and-activation-products-h>).

NKX3.1 CRISPR/Cas9 KO plazmidi, insan NKX3.1 geninde 5' yapısal ekzonunda çift zincir kırığına (DSB) neden olarak gen ekspresyonunu engellemek üzere tasarlanmıştır. NKX3.1 CRISPR/Cas9 KO Plazmid vektörü her biri GFP ve Cas9 nükleazını kodlayan ve hedefe özgü 20 nükleotit gRNA içeren, 3 farklı plazmid havuzundan oluşmaktadır.

LNCaP hücrelerine NKX3.1 CRISPR KO plazmidi transfeke edildikten sonra NKX3.1 antikoru ile işaretleme yapıldı ve transfeksiyon verimliliği immünoflöresan mikroskop ile kontrol edildi. Transfeke olan hücreler GFP ekspresyonu aracılığı ile belirlendi (Şekil 4.17).



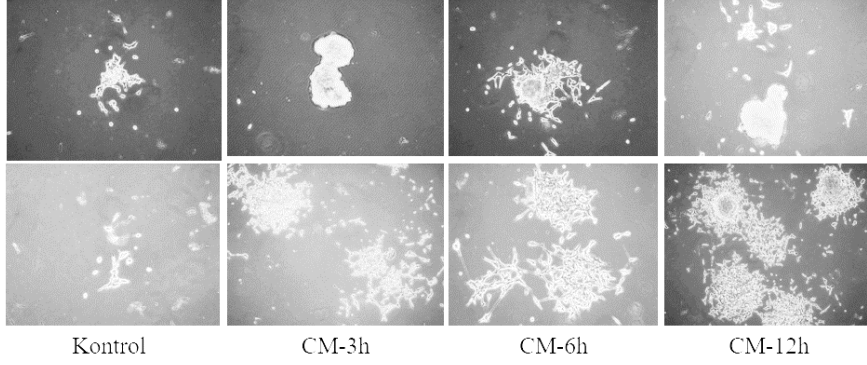
Şekil 4.17. NKX3.1 CRISPR KO plazmidinin LNCaP hücrelerine transfeksiyonunu gösteren immünoflöresan mikroskobu görüntüsü

DAPI ile GFP ekspresyonunun karşılaştırılması sonrasında transfeksiyon verimliliğinin %30-40 civarında olduğu tespit edildi. Transfeke olan hücrelerin antibiyotikli ortamda seçimi, deney tasarımını etkileme olasılığını bertaraf etmek amacıyla yapılmadı ve total hücre kolonisi bir sonraki migrasyon deneyi için kullanıldı.

4.8. İnflamasyon Varlığında NKX3.1 Fonksiyon Kaybının Hücre Göçüne Etkisinin Araştırılması

NKX3.1 geni baskılanmış LNCaP hücrelerine 3, 6 ve 12 saat boyunca CM (TNF α 500 pg/ml) uygulanması yapıldıktan sonra migrasyon deneyi yapıldı. Deneyde membranı geçen hücrelerden oluşan koloniler birbirinden farklı morfolojiye sahip oldukları görüldü (şekil 4.18). İlk gözlemlere göre LNCaP hücrelerinde yapılan migrasyon deney sonrasında elde edilen hücrelere karşı Crispr/Cas9 sistemi ile NKX3.1-KO hücreler hızlı bir şekilde büyüyüp çoğalmaya başladılar. Membranı geçen hücreler deneyden

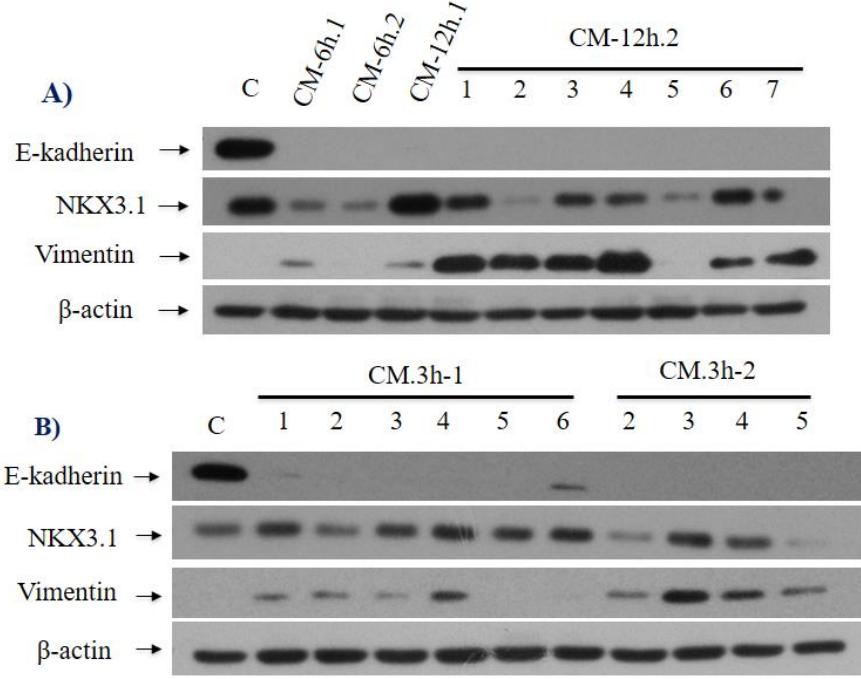
10 gün sonra ayrı koloniler halinde yeni kültür kabına aktarıldı ve büyütüldü.



Şekil 4.18. CM (TNF α 500 pg/ml) uygulaması sonrasında migrasyon özelliğini kazanmış NKX3.1-KO LNCaP hücreleri

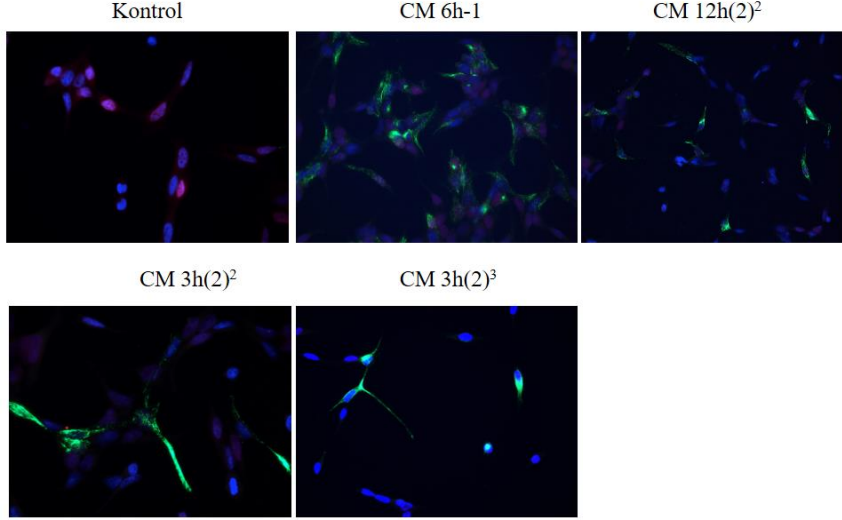
Kontrol grubundaki hücrelerin oluşturduğu koloniler küçük ve büyüme oranı düşük oldu. Zaman içerisinde bu hücreler çoğalmadı ve öldüler. 3 saat CM uygulaması sonrasında göç eden hücreler kontrole göre daha fazla koloni oluşturdu, 12 saat CM uygulaması yapılmış hücre örnekleri de aynı şekilde koloniler oluşturdular. Ancak, 6 saat CM uygulanmış hücrelerden göç eden örneklerde koloni sayısı fazla olmadı ve sonuçta iki tane farklı klon elde edilebildi.

Membranı geçen hücrelerin oluşturduğu koloniler büyüdüktan sonra, seçilmiş olan klonlarda oluşan değişimi görmek için ilk olarak hücre lizatları oluşturuldu. Total protein izolasyonu yapıldıktan sonra da western blot yöntemi ile E-kaderin, NKX3.1, vimentin ve yükleme kontrolü olarak β -aktin proteinlerinin seviyelerine bakıldı (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. A) 6 ve 12 saat ve B) 3 saat CM (TNF α 500 pg/ml) uygulaması sonrasında migrasyon özelliği kazanan NKX3.1 KO LNCaP hücre klonlarındaki morfolojik değişiklikler

Elde edilen klonlarda, E-kaderin seviyesindeki belirgin azalma ve vimentin ekspresyonunun kazanılması, hücrelerin EMT özelliklerini ortaya koyduklarını göstermektedir. NKX3.1 protein seviyesindeki düşüşe bakılarak, NKX3.1 CRISPR KO transfeksiyonu başarılı olan klonların seçimi yapıldı. 3 saat CM uygulaması yapılmış hücre serilerinde, CM 3h(2)² örnekte NKX3.1 diğer hücre örneklerine göre en düşük, ancak vimentin ekspresyonu yüksek değildi. CM 3h(2)³ örnekte vimentin ekspresyonu en yüksek, ancak NKX3.1 belirgin derecede yüksek olduğu görüldü ve buna göre aynı seriden bu iki klon örnekleri seçildi. 6 saat CM uygulaması yapılan seride vimentin ekspresyonu mevcut ve NKX3.1 baskılanmış CM.6h-1 ve aynı şekilde 12 saat CM uygulanmış grup için CM.12h(2)² hücre en uygun olarak seçildi. Seçilen hücrelerde ekspresyonu kazanılan vimentinin lokalizasyonuna ve NKX3.1'e bakmak için immüno Floresan işaretlemeler yapıldı (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Kontrol olarak kullanılan LNCaP hücrelerine nazaran CM uygulanmış örneklerde EMT evresindeki vimentin interfilamentinin hücre sitozolundaki lokalizasyonunu gösteren bitişik görüntü. Kırmızı-NKX3.1, yeşil- vimentin, mavi-DAPI.

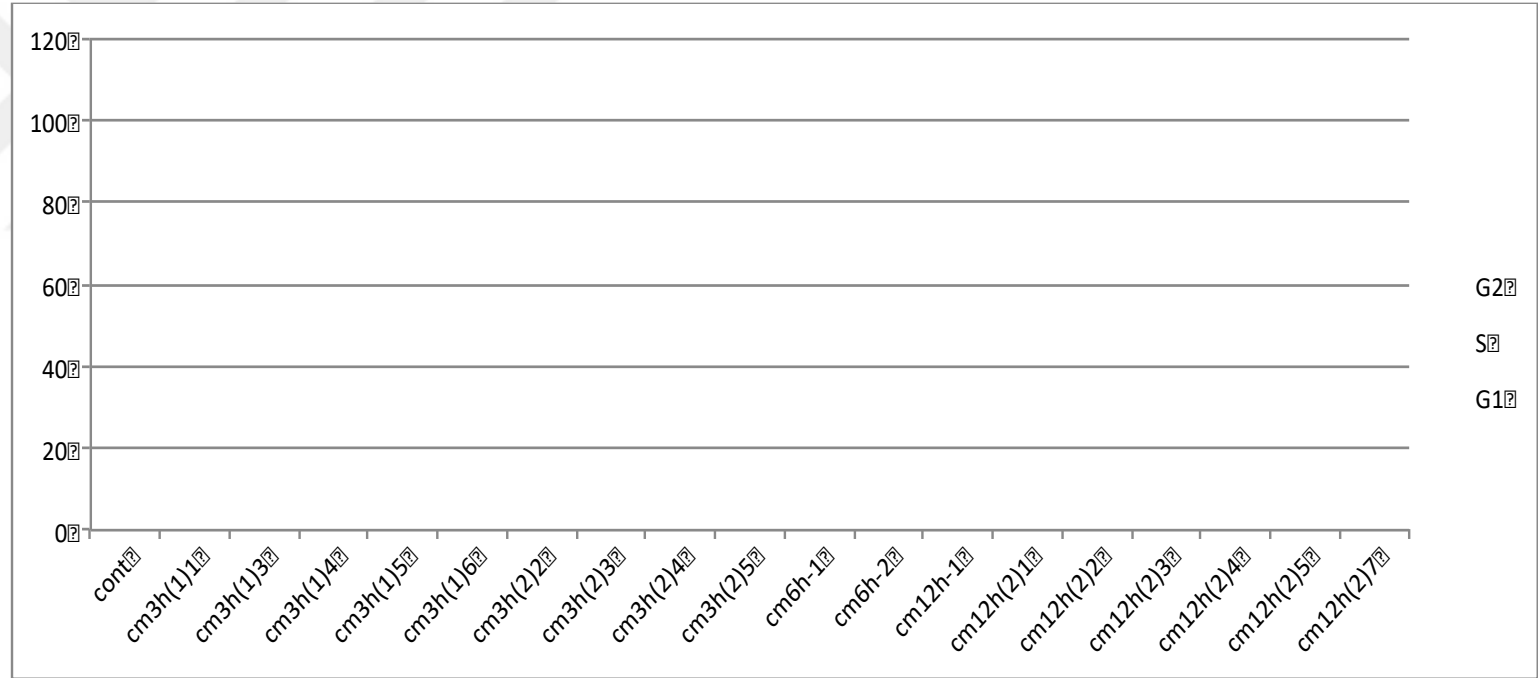
İmmünblotlama sonuçlarının değerlendirilmesi sonrasında en fazla değişiklik gösteren CM.3h(2)², CM.3h(2)³, CM6h-1 ve CM12h(2)² hücreleri bir sonraki araştırmalar için belirlendi. İnflamasyon aracılıklı migrasyonda ortaya çıkan vimentin ekspresyonunun hücredeki lokalizasyonuna bakmak için seçilmiş olan hücrelerde vimentin ve NKX3.1 protein işaretlemesi yapıldı (şekil 4.20). İmmüno Floresan mikroskop görüntüleri western blot analizi sonuçları ile uyumlu bulundu.

4.9. NKX3.1 KO LNCaP Hücrelerinde CM Uygulaması Sonucu Göç Eden Hücre Klonlarında Proliferasyon Düzeyindeki Değişimin Araştırılması.

İnflamasyon aracılıklı EMT özelliği kazanmanın, NKX3.1 nakavt hücrelerinin hücre döngüsü fazları üzerindeki etkisinin araştırılması için, hücre DNA'sı propidium iyodür (PI) ile boyanarak Flow sitometri yöntemi ile ölçüldü. Elde edilen sonuçlar FlowJo uygulaması ile analiz edildi ve Microsoft Excel'de değerlendirildi (Şekil 4.21). Kontrol grubuna karşı göç eden hücre örneklerinin çoğunda G1'de hafif bir azalmanın olduğu, S ve G2/M evresindeki hücre oranının ise daha fazla olduğu belirlendi. S

fazındaki hücrelerin fazla olması DNA ikilenme sürecinin ortasında büyüyüp-çoğalan hücrelerin daha fazla olduğu veya duraklamaya uğradıkları (örn., DNA hasarı nedeniyle) anlamına gelebileceği düşünüldü. G2/M fazındaki hücreleri ise mitotik hücreler olarak belirlendiler. Sonuç olarak, inflamasyonda artan oksidatif stres ve DNA hasarına karşılık, NKX3.1 ekspresyonunun kaybı ile beraber, hücrelerde apoptotik mekanizmaların aktive olamadığı, proliferasyonun devam etmesi nedeniyle de hasarlı hücrelerde genomik kararsızlığın artmış olabileceği sonucuna varıldı. En büyük farklar CM.3h(1)⁵ ve CM.12h(2)² hücre klonlarında tespit edildi.

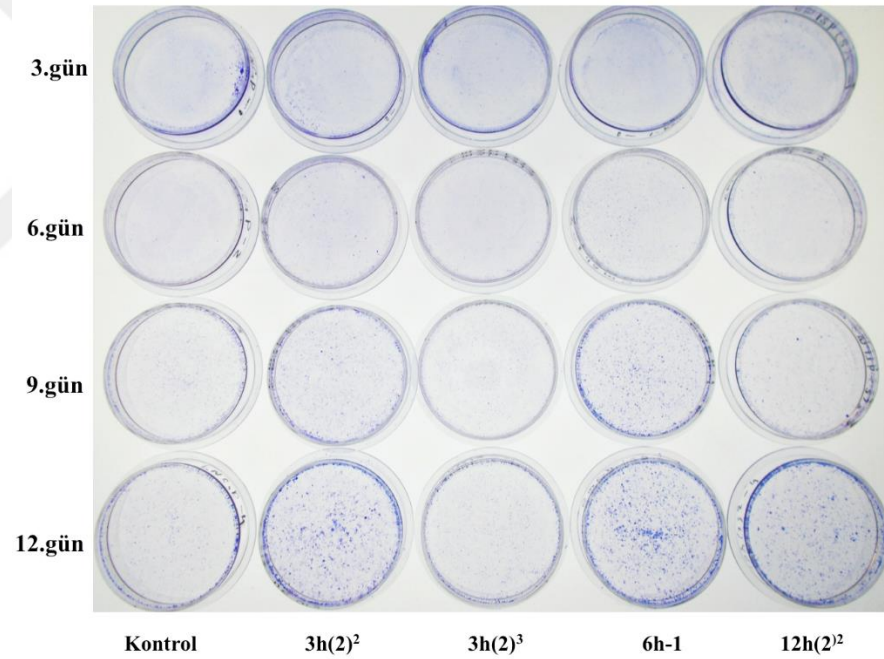




Şekil 4.21. CM (TNF α 500 pg/ml) uygulaması sonrasında migrasyon özelliği kazanmış NKX3.1 KO LNCaP hücrelerindeki hücre döngüsü fazlarındaki değişim

4.10. İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde Koloni Oluşumundaki Değişimin İzlenmesi

Koloni formasyonu (klonojenisite) tek bir hücrenin klonal genişleme yoluyla büyük bir koloni haline gelme kapasitesini incelemek için kullanılan *in vitro* kantitatif bir tekniktir. Klonojenik aktivite, farklılaşmamış kanser hücrelerinin hassas bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Franken NA et. al.,2006). Bu nedenle çalışmalarımızda, NKX3.1 gen ekspresyonu baskılanmış LNCaP hücrelerinin inflamasyon varlığında oluşan migrasyonun ardından seçilen klonlardaki koloni oluşturma yeteneği değerlendirildi (şekil 4.22).

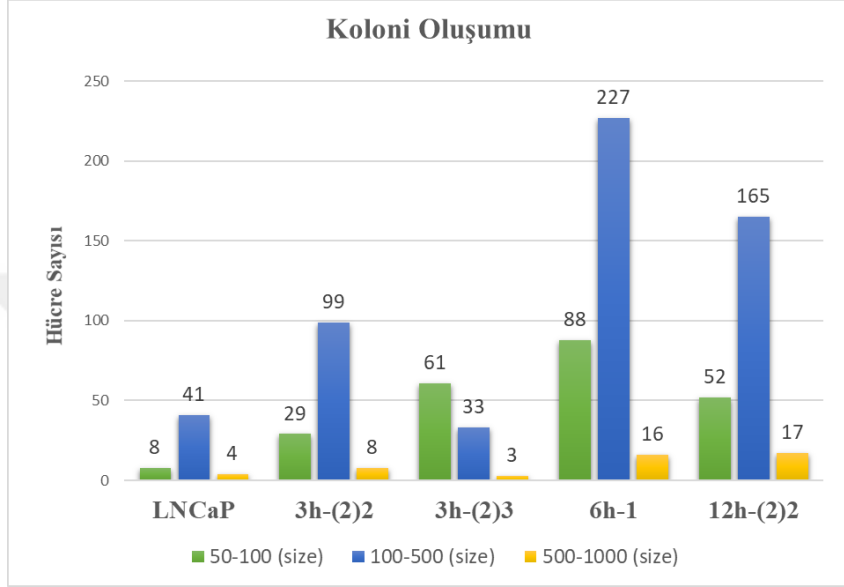


Şekil 4.22. İnflamatuar mikroçevrede migrasyon özelliği kazanmış, NKX3.1 baskılanmış PKa hücrelerinin 3, 6, 9, 12 gün sürelerle koloni oluşturma yeteneğinin gözlenmesi.

İnflamasyonun hücre koloni oluşumu ve aynı anda proliferasyon hızına etkisini valide etmek için tasarlanmış bu deneyde ilk 3 ve 6 günde büyük bir farklar gözlenmezken sonraki günlerde kontrol grubuna karşı

$3h(2)^2$, $6h-1$ ve $12h(2)^2$ belirgin farklılıklar saptandı. Ancak, $3h(2)^3$ ile kontrol grubu olan LNCaP hücreleri arasında belirgin bir fark gözlenmedi (şekil 4.22).

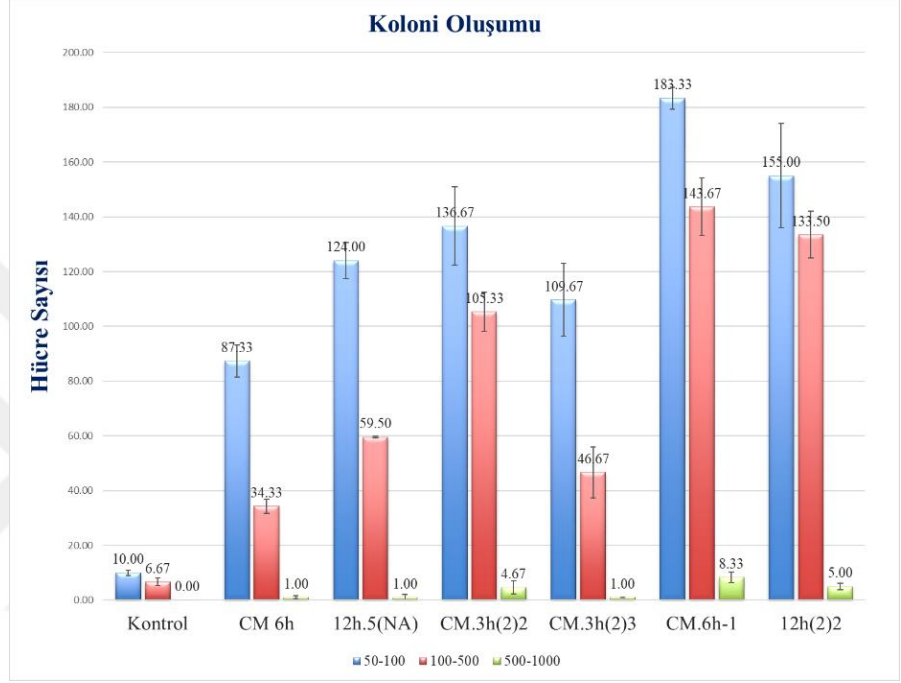
Daha sonra, 12.günde oluşan koloni miktarını kantitatif olarak hesaplamak için 3 farklı boyuttaki koloniler ImageJ uygulaması ile sayıldı.



Şekil 4.23. Kontrol grubuna karşı NKX3.1 geni baskılanmış ve 3, 6, 12 saat ile CM uygulanması sonrasında migrasyon özelliği kazanan hücre klonlarında farklı boyutlardaki koloni miktarının değerlendirilmesi.

Farklı guruplardaki kolonilerde hem miktar hem de boyut olarak belirgin farklar olduğu gözlemlendi. Oluşan kolonilerin büyük bir kısmı 100-500 pixel boyutu aralığında oldu. Bu verilere göre; kontrol grubu hücrelerine karşı farklı zaman aralıklarında inflamasyona maruz bırakılması sonrasında, migrasyon geçirmiş klonlardaki kolonilerin daha fazla olduğu görüldü. Özellikle en çok koloni '6h-1' klonunda oluştu (toplamda 331 koloni), ancak en büyük koloniler '12h(2)²' klonunda (500-1000 pixel boyutunda sayımı yapılan 17 koloni) gözlemlendi (Şekil 4.23). Bu yöntem ile elde edilen verilere göre; inflamasyonla metastatik özellik kazanan hücrelerin hayatta kalma ve koloni oluşturma yeteneklerinin yüksek olduğu sonucuna varıldı.

NKX3.1 geni baskılanan örnekler ile beraber CM6h ve 12h.5(NA) hücrelerde koloni oluşturma etkisini araştırmak ve deneye bağlı standart hataları belirlemek amacıyla her bir hücre örneğinden 3 tekrar içerecek şekilde deney tasarlandı. 12 gün sonra örnekler kristal viole boyası ile boyandıktan sonra koloni boyutuna göre sayım İmage J uygulaması aracılığı ile yapıldı.



Şekil 4.24. Kontrol grubuna karşı migrasyon özelliği kazanmış hücre klonlarında farklı boyutlardaki koloni miktarının değerlendirilmesi.

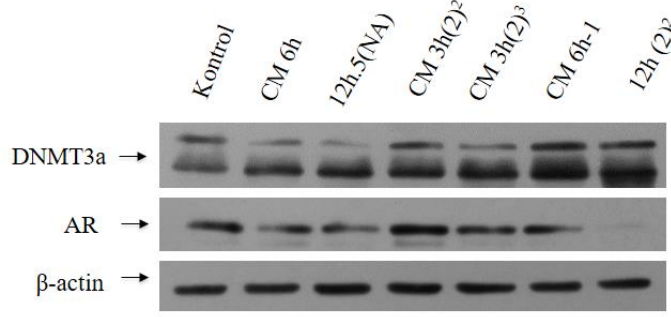
Şekil 4.24'e göre, kontrol olarak seçilen LNCaP hücrelerine karşı inflamasyonla invazif özellik kazanan tüm hücrelerde koloni sayısında belirgin bir artış olduğu görüldü. NKX3.1 ekspresyonu mevcut olan CM.6h, 12h.5(NA) ve CM.3h.(2)³ hücrelerinde koloni oluşumu, NKX3.1 baskılanmış CM.3h.(2)², CM.6h-1 ve 12h(2)² hücre klonlarına karşı daha düşük olduğu görüldü. Şekil 4.23'de görüldüğü gibi, burada da CM.6h-1 klonu koloni oluşturma özelliği en yüksek olan klon oldu, Şekil 4.23'te en büyük koloni miktarı 12h(2)² klonunda tespit edilmişti, burada boyutu 500-1000 pixel aralığında kaydedilen koloniler CM.6h-1 örneklerinde fazla oldu (ortalama 8,33). Diğer NKX3.1 baskılanmış klonlarda büyük koloni miktarı benzer şekilde CM.3h.(2)²'de 4,67 ve 12h(2)²'de 5 olarak belirlendi.

NKX3.1 ekspresyonuna sahip göç eden hücre örneklerinde 1 taneden büyük koloniler (500-1000 boyutundaki) kaydedildi ve kontrol grubunda gözlenmedi.

Oluşan koloni sayısının kantitatif olarak değerlendirilmesi, inflamatuvar mikroçevrenin kanser hücreleri koloni oluşum miktarını belirgin şekilde etkilediğini göstermektedir. Burada NKX3.1 protein ekspresyonunun baskılanması da bir diğer önemli faktör olabilir. Ayrıca, NKX3.1 baskılanmış ve CM uygulaması sonrası değişmiş klonlarda koloni miktarı aynı zaman aralığında CM uygulaması yapılmış kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

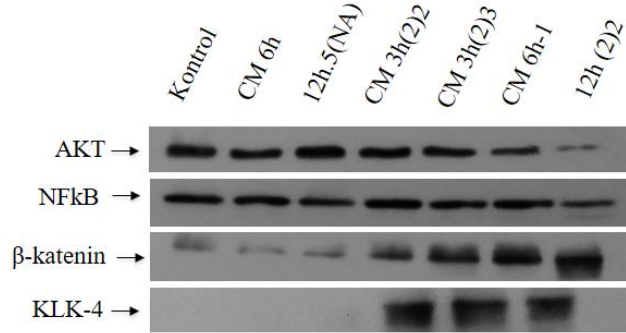
4.11. İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde AR Sinyalizasyonunun Araştırılması

Androjen reseptörü (AR), prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesi sırasında kritik bir rol oynar. AR-negatif PKa hücrelerinde, DNA metil transferazların (DNMT'ler) toplam aktivite seviyeleri yüksek olduğu bilinmektedir (Mingliang Chu et al., 2014). DNA metiltransferaz 3A (DNMT3A), normal gelişimde epigenetik düzenlemenin anahtar bir unsuru olarak kabul edilmiştir ve DNMT3A'nın anormal düzenlemesi birçok kanser tipinde, özellikle hematolojik malin (tümörlerde) yer almaktadır. Hong Fan gurubunun yaptığı araştırmada DNMT3A ailesinin bir üyesi olan DNMT3A'nın *b* izoformu (DNMT3Ab), mide kanserinde EMT ile ilişkili metastazı yönlendirmek için kritik bir öneme sahip olduğu belirlenmiştir. DNMT3Ab, mide kanseri hastalarında tümör nodu metastazı evresi, lenf nodu metastazı ve kötü prognozla pozitif olarak bağlantılı olmuştur. DNMT3Ab'nin aşırı ekspresyonu, E-kaderinin baskılanması yoluyla mide kanseri hücre göçünü ve istila edilmesinin yanı sıra EMT'yi de desteklediğini bildirmişlerdir (He Cui et al., 2018). Buna bağlı olarak inflamasyon varlığında göç eden hücrelerde AR ve onunla ters ilişkide olan DNMT3a seviyesine bakmak için western blot analizi yapıldı (şekil 4.25).



Şekil 4.25. İnflamasyona bağlı göç eden hücre klonlarında AR ve DNMT3a protein ekspresyonunun western blot görüntüsü

DNMT3a ekspresyonunun kontrol grubuna karşı invazif özellik kazanan hücre klonlarının karşılaştırılması sonucunda göç eden hücrelerde daha yüksek olduğu, aynı anda CM6h ve 12h.5(NA)'ya karşı NKX3.1 ekspresyonu baskılanan ve göç eden hücrelerde daha yüksek olduğu tespit edildi. AR ekspresyonunun ise göç eden hücre örneklerinde kontrole karşı azaldığı görüldü. Ancak CM.3h(2)² hücre örneğinde AR seviyesinin yüksek, 12h(2)² hücrelerinde önemli oranda baskılanmış olduğu gözlemlendi. β-aktin jele yükleme kontrolü olarak kullanıldı.



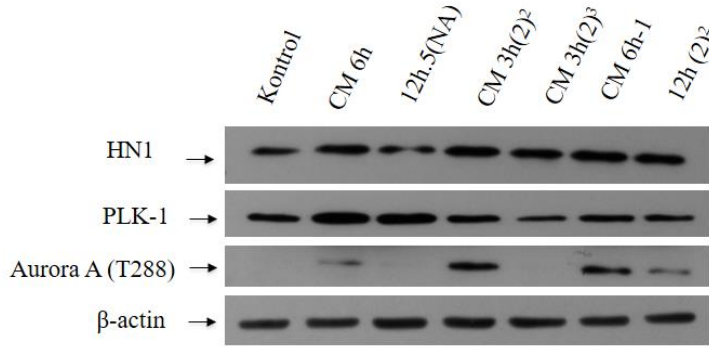
Şekil 4.26. İnflamasyon koşullarında göç eden hücrelerde AKT'ye bağlı AR sinyalizasyonunun kontrolü

Yapılan bir diğer çalışmada PI3K/Akt sinyal yolunun AR'ın ekspresyonu, stabilitesi ve fonksiyonunda önemli olduğu göz önünde bulundurularak, inflamasyon koşullarında LNCaP hücrelerinin göç etmesi sonrasında elde edilen hücre klonlarında AKT seviyesine bakıldığında

kontrol grubuna karşı kısmen azalmanın olduğu, 12h(2)² hücrelerinde ise yıkımının gerçekleştiği görüldü, NFkB seviyesinde belirgin bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. β -katenin'in özellikle NKX3.1 baskılanan hücre örneklerinde yüksek ifade edildiği gözlemlendi. Aynı şekilde KLK-4 CM.3h(2)³, CM.6h-1 ve 12h(2)² hücre klonlarında ifade kazandı (şekil 4.26).

4.12. İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde Migrasyon ve Hücre Döngüsünün HN1 ile İlişkisi

HN1 ile ilgili araştırmalarda HN1'in ektopik ekspresyonu hücre migrasyonunu pozitif yönde etkilediği belirlenmiştir. Göç eden hücre klonlarında HN1 ve migrasyon ile doğrudan ilişkili olan hücre döngüsü proteinlerinin ekspresyon seviyeleri western blot'ta araştırıldı.

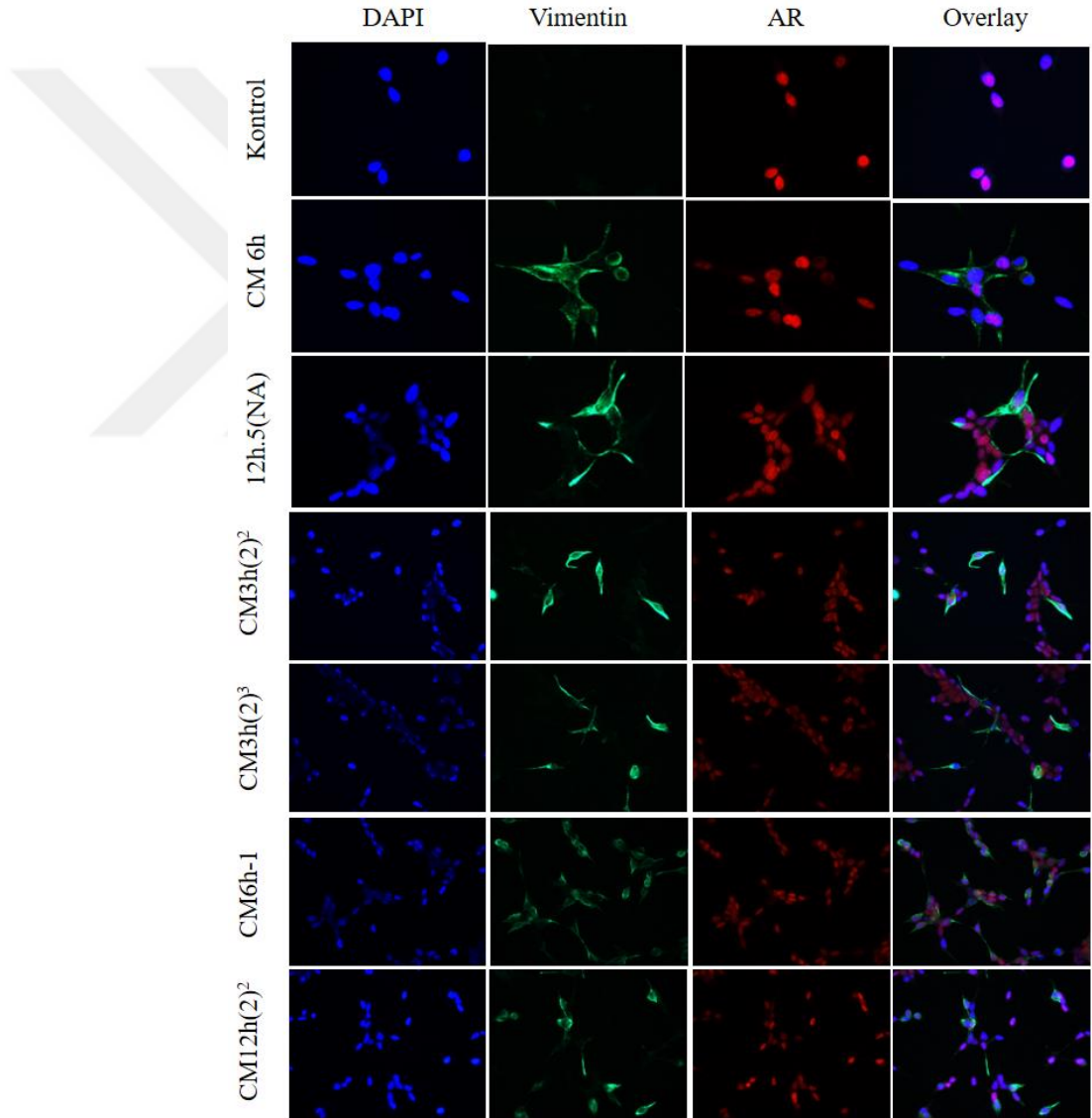


Şekil 4.27. İnflamasyona yanıt olarak göç eden hücrelerde HN1, PLK- 1, Aurora A ve β -aktin seviyelerinin araştırılması

Kontrol grubuna karşı göç eden hücre örneklerinde HN1 protein seviyesinin yükseldiği tespit edildi. PLK-1 seviyesi NKX3.1 ekspresyonunu geri kazanan CM.6h ve 12h.5(NA) hücrelerinde yüksek ve NKX3.1 gen ifadesi susturulan örneklerde, kontrole karşı daha düşük oldu. Mitotik protein kinaz olan Aurora A Treonin 288 fosforilasyonunun kontrol, 12h.5(NA) ve CM.3h(2)³ hücreleri hariç diğer örneklerde arttığı görüldü.

4.13. Göç Eden Hücrelerde EMT Fonksiyonunun Vimentin Aracılığı ile Tekrar Kontrol Edilmesi.

Daha önce yapılan deneylerde EMT markeri olan N-kaderinin 12 saat CM uygulanmış, inflamasyon varlığında göç eden LNCaP hücrelerinde ekspresyon kazandığı ve kısa bir süre sonra tekrar sustuğu (şekil 4.10) gösterilmişti. Belirlenen başka bir EMT markeri olan vimentin protein ekspresyonunun invazif özellik kazanan klonlarda çalışmalar sırasındaki değişimini belirlemek için immüno Floresan işaretlemeler yapıldı.



Şekil 4.28. İnflamasyon varlığında ortaya çıkan vimentin ekspresyonunun zamanla stabilite kazanması.

Şekil 4.20’de gösterilen ilk vimentin işaretlemesine kıyasla son yapılan immünoflöresan görüntülerinde vimentin protein ekspresyonunun daha fazla hücrede eksprese olduğu saptandı. AR ekspresyonunun kontrol grubuna karşı göç eden hücrelerde önemli oranda düşük olduğu belirlendi.

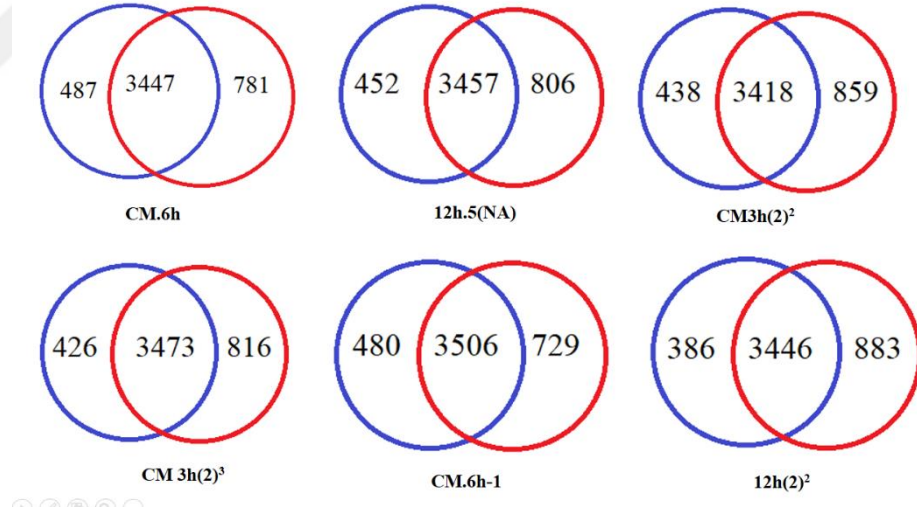
4.14. Nano LC-MS/MS Analizi ve Protein Tanımlaması

İnflamatuvar mikroçevrede prostat tümör hücrelerinde metastatik özelliklerin kazanılması ve burada NKX3.1 geninin rolünü araştırmak amacıyla yapılan inflamatuvar mikroçevre ve migrasyon deneyleri sonrasında, elde edilen farklı klonlarda ortaya çıkan değişimleri araştırmak amacıyla nano-LC MS/MS analizi yapıldı. Bunun için kontrol olarak LNCaP ve örnek klonlar olan; CM-6h, 12h.5(NA), CM.3h(2)², CM.3h(2)³, CM.6h-1, 12h.(2)² olarak adlandırılan hücreler parçalandı, çözelti özünde (in solution digest) yöntemi ile proteinleri elde edildi ve n-LC MS/MS (Thermo Scientific Q Exactive HF Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer with nano Liquid Chromatography, UltiMate 3000 NCS-3500RS) cihazı aracılığı ile proteome analizi yapıldı. Her bir örnek için okuma iki tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Bu işlemlerde FDR (False Discovery Rate) oranı 0.01% olarak belirlendi. Elde edilen veriler Thermo Discoverer 1.4 yazılımları kullanılarak işlendi ve MS/MS spektrumları Uniprot veri tabanında (<http://Uniprot.org>) İnsan (Human Uniprot) verilerine karşı araştırıldı. Tüm örneklerde toplam 4715 protein tespit edildi (şekil 4.25). Elde edilen proteinler fazladan tanımlanmış olanlar da dahil olmak üzere, protein için tanımlanmış peptid dizilerinin toplam sayısına göre seçildi (peptid spektrum eşleşmeleri-PSM değerleri).

Çizelge 4.1. n-LC MS/MS analizi sonrası hücre örneklerinde belirlenen proteinlerin miktarı

Hücre	Eksprese Edilen total Protein Sayısı	Örneğe özgü eksprese edilen protein sayısı
12h(2) ²	2585	358
12h.5(NA)	2442	256
3h(2) ²	2509	270
3h(2) ³	2478	267
CM6h	2382	274
CM6h-1	2337	213
Kontrol	2088	161

Tablo 4.1’de her bir örnekte ifade edilen toplam protein sayısı ve örneğe spesifik olarak ifade edilen protein sayısı belirlendi. İnflamasyon varlığında “farklılaşmış” hücrelerde eksprese edilen protein sayısının (2300 ve 2600 aralığında) kontrol grubuna göre (2088) fazla olduğu ortaya konuldu.



Şekil 4.29. Kontrol (mavi) hücrelerinde, inflamatuvar ortamda değişen (kırmızı) hücre klon örneklerinde eksprese edilen protein sayıları gösterilmektedir. Örtüşen bölgede değişmemiş, mavi alanda örnek hücre klonunda baskılanmış, kırmızı alanda kazanılmış olan protein sayısı gösterilmektedir.

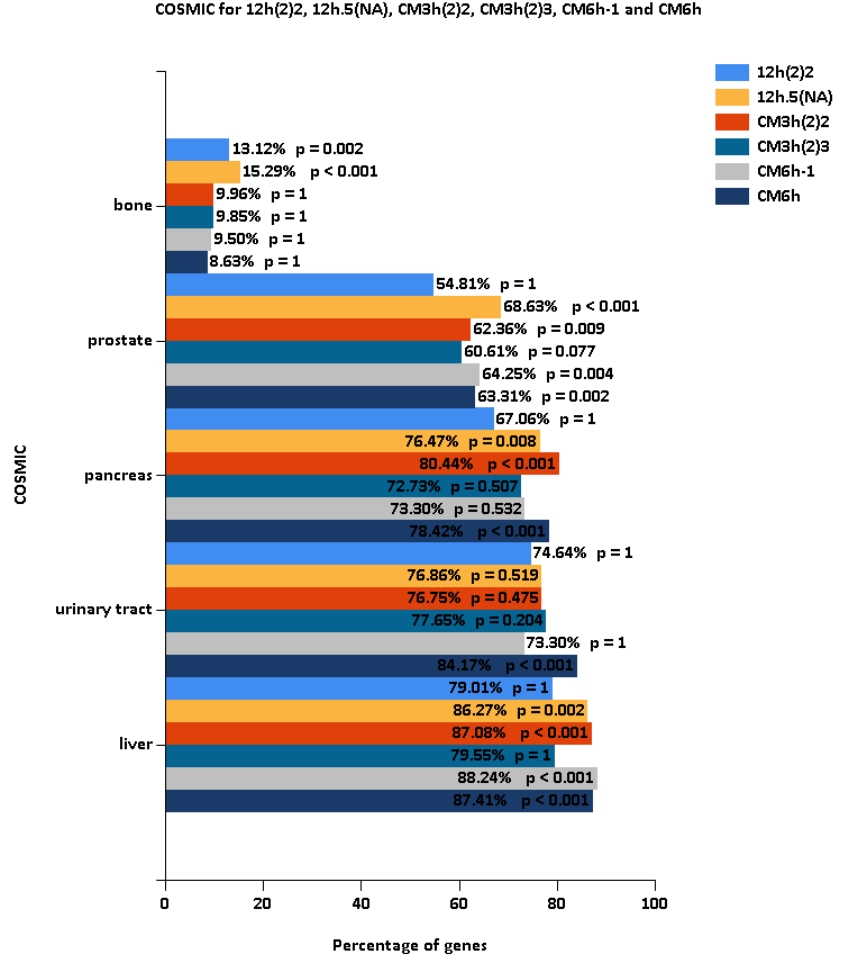
İnflamasyon varlığında farklılaşan hücrelerde kontrol grubu ile benzer şekilde ifade edilen protein sayısının 3500 civarında olduğu tespit

edildi ve kontrol grubuna karşı baskılanmış proteinlerin sayısının (mavi bölge) 400-500 arasında, ifadesi kazanılan proteinlerin ise (kırmızı bölge) 800-900 arasında olduğu görüldü. Farklı ifade edilen proteinlerin sayısı fazla olsa da (şekil 4.25), 161 proteinin kontrol grubuna karşı tüm örneklerde baskılandığı görüldü. <http://bioinformatics.psb.ugent.be> sayfasını kullanarak yapılan Venn diyagramı sonuçlarına göre her bir hücre örneğine özgü olarak farklı eksprese edilen proteinler belirlendi (tablo 4.1).

4.15. Farklı İfade Edilen Proteinlerin Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi

Her bir örnekte tespit edilen, farklı ifade edilen proteinler “FunRich” uygulaması aracılığı ile analiz edildi. FunRich (Functional Enrichment analysis tool) genlerin ve proteinlerin fonksiyonel zenginleştirme ve etkileşim ağı analizi için kullanılan bağımsız bir yazılım aracıdır.

Kanserdeki Somatik Mutasyonların Kataloğu COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer), somatik mutasyonların insan kanserindeki etkisini araştırmak için dünyanın en büyük ve en kapsamlı kaynağı sayılır (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). Protein profillemeye sonrasında tespit edilen, farklı ifade edilen proteinlerin COSMIC veri tabanı kullanılarak onkogenler ile karşılaştırılması için FunRich aracı kullanıldı.



Şekil 4.30. Farklı ifade edilen proteinlerin başka kanserdeki mutasyonlar ile karşılaştırması

Her bir örnekte farklı ifade edilen proteinlerin COSMIC veri tabanındaki 6 mln.dan fazla onkogen verileri ile karşılaştırılması sonrası elde edilen sonuçlar yüzde olarak ve *p*-değeri ile birlikte verilmektedir (şekil 4.26). Sonuçlara göre, 12h(2)² –kemik (p=0,002), 12h.5(NA) – prostat (p<0,001), CM3h(2)² –pankreas (p<0,001), CM3h(2)³ –prostat (p=0,077), CM6h-1 –karaciğer (p<0,001) ve CM6h idrar yolunda (p<0,001), tespit edilen mutasyonlara göre anlamlı bulundu (Tespit edilen total 39 COSMIC veri analizi FunRich Excel dosyasında bulunmaktadır).

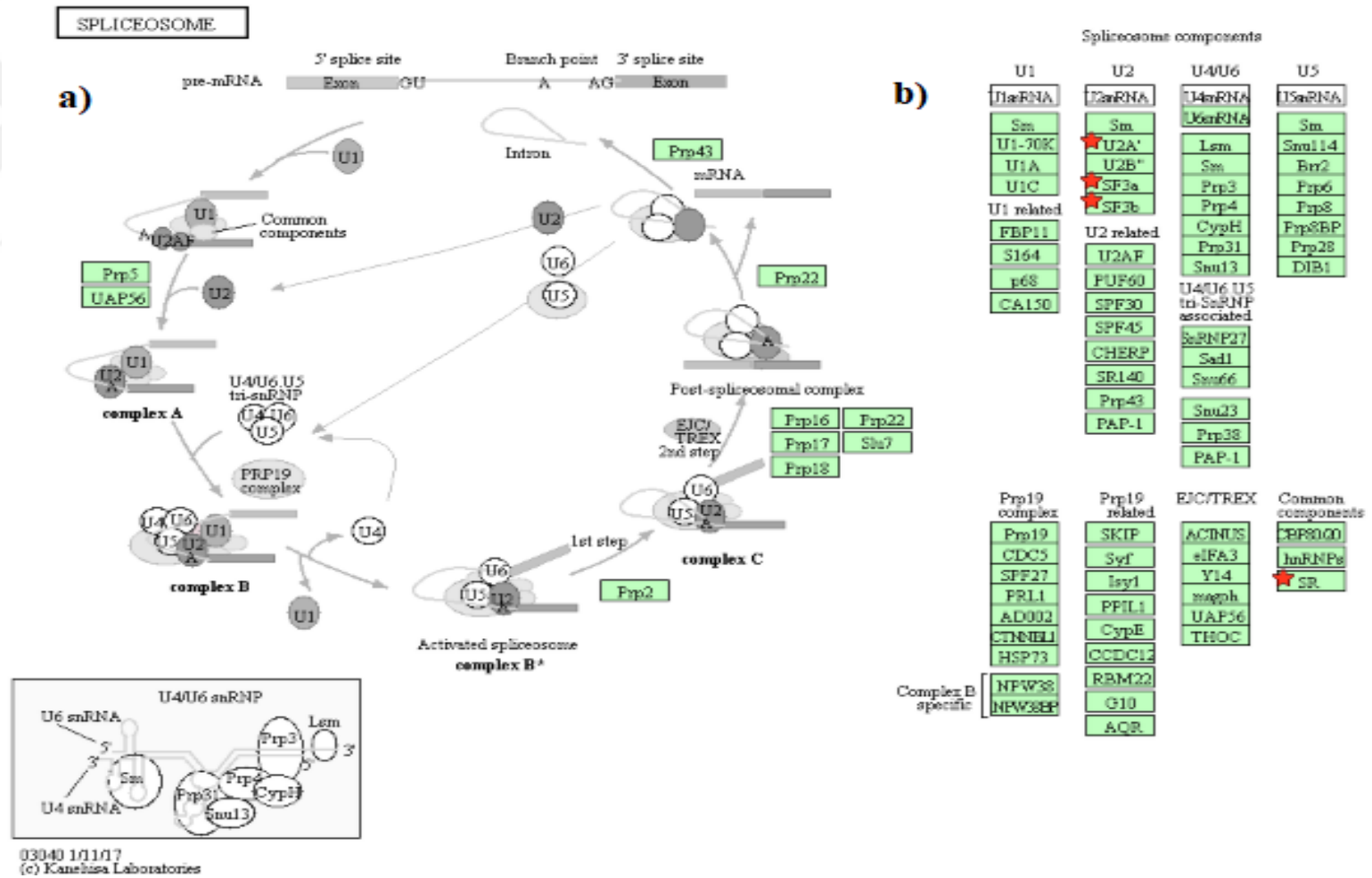
İnflamasyon varlığında metastatik özellik kazanan tüm hücre örneklerinde ortak ifade edilen 99 proteinin fonksiyonel karakterizasyonu

için DAVID 6.8 (<http://david.ncifcrf.gov>) veri tabanı kullanıldı. KEGG yolak analizlerinde 99 proteinden 18 tanesinin ait olduğu 3 yolak belirlendi.

Çizelge 4.2. KEGG yolu verilerine göre kontrol hariç tüm hücre örneklerinde ortak eksprese edilen 99 proteinin taraması sonucu tespit edilen biyolojik yollar.

Term	Miktar	Genlar	P-değer	Benjamini
Metabolik yollar	14	O75306, O00483, Q9Y697, P30520, P05091, Q16850, P23919, Q7Z4W1, Q9UHY7, P07686, P49585, Q10471, Q96C36, P52788	1,7E-2	6,7E-1
Arginin ve prolin metabolizması	3	P05091, Q96C36, P52788	3,4E-2	6,7E-1
Splisozom	4	Q13242, P09661, Q12874, Q15393	4,2E-2	6,0E-1

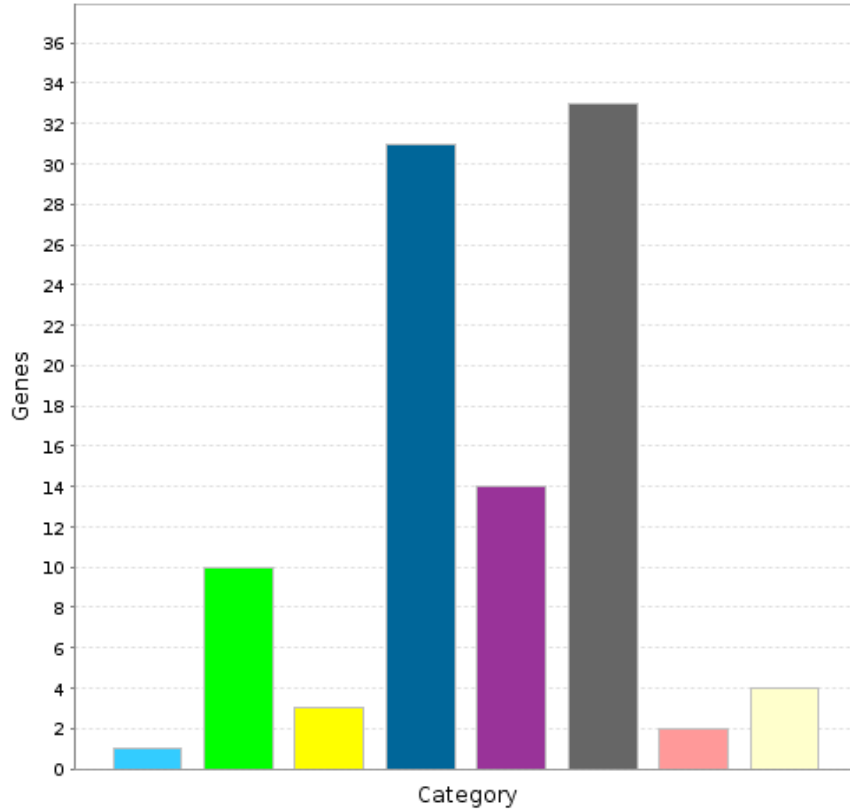
Tablo 4.2'ye göre bu üç yoldan ikisi metabolik ve biri splisozom'a ait bulunmuştur. mRNA işlenmesi kompleksi olan splisozom, ökaryotik çekirdeklerde bulunan dev, multimegadalton ribonükleoprotein (RNP) kompleksleridir. İntronlar olarak adlandırılan RNA sekanslarını çıkardıkları ve ekzonlar olarak adlandırılan komşu sekansları bir araya getirdikleri RNA polimeraz II transkriptleri üzerinde birleşirler.



Şekil 4.31. a) Splisozom oluşum yolu ve b) splisozom komplekslerinin içeriği. Tarama sonucu bu yola ait olarak tespit edilen proteinler kırmızı yıldız ile işaretlenmektedir

KEGG veri tabanı kullanılarak elde edilen Splisozom oluşum yolunda yer alan proteinler ile göç eden hücrelere özgü, mevcut 99 proteinin karşılaştırılması sonucunda üç tane protein (U2A, SF3a, SF3b) U2-splisozom kompleksi içinde ve bir tanesi (SR) yaygın komponentler içinde yer aldığı belirlendi.

PANTHER (**P**rotein **A**nalysis **T**hrough **E**volutionary **R**elationships- Evrimsel İlişkilerle Protein Analizi, <http://pantherdb.org>), kapsamlı olarak proteinleri evrimsel ve fonksiyonel sınıflandırma için yaygın olarak kullanılan çevrimiçi kaynak sayılmakta olup büyük ölçekli biyolojik veri analizi için araçlar içermektedir. Yukarıda analizi yapılan, inflamatuvar mikroçevrede göç eden hücre klonlarında ifade edilen 99 protein PANTHER veri tabanında analiz edilmiştir.





Şekil 4.33. PANTHER yol analizi.

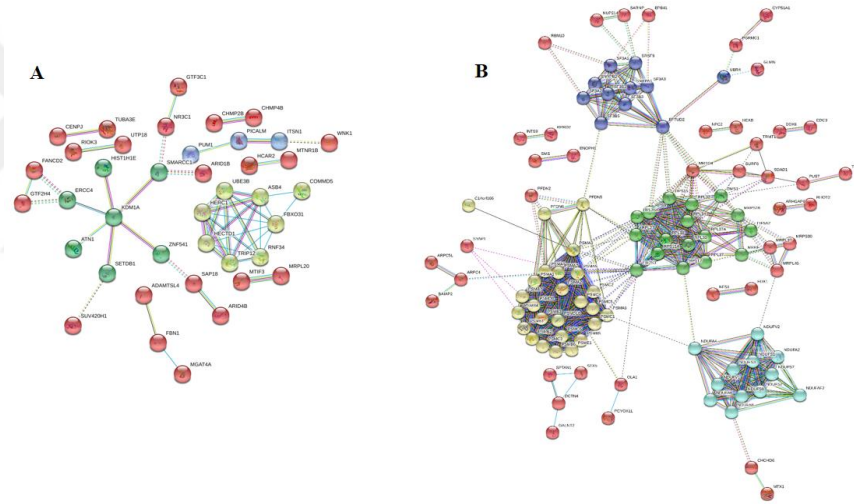
Analiz edilen 99 protein dizisinden Wnt sinyal yoluna ait kazein kinaz-2 ve NFAT hedef genleri, inflamasyonla uyarılmış sitokin ve kemokin sinyal yoluna ait aktin ilişkili 2/3 protein kompleksinin olası hedefler olduğu saptandı.

4.15.1. Diferansiyel olarak eksprese edilen proteinlerin protein-protein etkileşim analizi.

Venn diyagramı sonuçlarına göre sadece kontrol grubunda tespit edilmiş, inflamasyona bağlı göç eden hücrelerde baskılandığı düşünülen 161 protein ve tüm göç etmiş örneklerde ifade edilen 99 proteinin protein-protein etkileşimini araştırmak için STRING 11.0 biyoinformatik programı kullanıldı. STRING (Etkileşen Genlerin / Proteinlerin Alınması için Arama Aracı) veri tabanı, deneysel verilerden hesaplama tahmin yönteminden ve protein-protein etkileşim ağını göstermek için GO, KEGG ve Pfam gibi çeşitli sınıflandırma sistemlerinin kullanılmasından oluşmaktadır. STRING, protein ağlarını görselleştirir ve bu gen ürünlerinin biyolojik ilişkilerini gösterir (Szklarczyk et al., 2016).

STRING PPI (protein-protein interaction) analizinde 161 kontrol grubu proteinlerinden 158'i tanımlandı (p -değer: 0.0546), göç eden örneklerinde ise 99 proteinden 98'i tanımlandı (p -değeri $1.63e^{-07}$). Birbiri ile ilişkisi olmayan proteinler filtreledi ve etkileşim skoru yüksek güvenilirlik (0,700) olarak seçildi.

Birbiri ile bağlı olan proteinlerin anlamlı olup olmadığını belirlemek için k-means kümeleme aracılığı ile kümelere ayrıldı ve birden fazla protein ile ağ oluşturan proteinler filtreledi. Daha sonra 'K-means' kümeleme aracı ile proteinler gruplara ayrıldı.



Şekil 4.34. Diferansiyel olarak eksprese edilen proteinlerin protein-protein etkileşimi ağ analizinin k-mean kümeleme sonrasında gruplandırılmış hali. A-kontrol B-göç eden hücre örnekleri.

STRING'da yapılan PPI analizi sonucunda göç eden hücrelerde baskılanan proteinler k-mean kümeleme ile dört ayrı gruba ayrıldı. Buna göre, kırmızı renkte birçok transkripsiyon faktörü ve onunla ilişkili proteinler ve kinazlar (140 adet), sarı renkte E3 ubiquitin ligazı proteinleri (8 adet), yeşil renkte histon metilasyonu ile ilişkili, transkripsiyonu ko-baskılayıcı ve aktivatör proteinleri (7 adet), mavi renkte membran ve sitoskelet proteinleri (3 adet) yer almaktadır.

Göç eden hücrelere özgü ekspresyonu kazanılan 99 proteinden birbiri ile çoklu etkileşimde olan dört ana kümeler tespit edildi. Bu kümelerde sarı renk ile belirlenen proteozomu oluşturan proteinleri (26 adet), yeşil renkte ribozomal proteinleri (17 adet), açık mavi renkte mitokondriyal membran solunum zinciri proteinlerini (12 adet) ve lacivert renk ile de splisozom faktörlerini (11 adet) göstermektedir. Yukarıda sayılan mekanizmaların inflamatuvar mikroçevreye yanıt olarak göç eden hücrelerde baskın olarak ifade edildiği sonucuna varıldı.

4.16. Prostat Kanseri Diferansiyel Olarak Eksprese Edilen Proteinlerin ve TCGA Kohortunun cBioPortal Analizi

Protein ekspresyonundaki değişiklikler, dokular arasında en büyük farkları elde etmeyi amaçlayan, log₂ kat değişim kısaltması 1.5'e (kat değişim 2.8'e eşdeğer) dayanmaktadır. Aşağıdaki karşılaştırma grupları log₂ kat değişim değerine göre değerlendirilmiştir; kontrol grubu (LNCaP) ve inflamatuvar ortamda farklılaşmış örnekler (CM6h, 12h.5(NA), 3h(2)², 3h(2)³, 6h-1, 12h(2)²). Değerlendirme sonrasında total 4715 proteinden, kat değişikliği 1.5'in üzerinde olanlar seçildi ve sayı 1773'e kadar düştü.

Bu numunelerdeki proteinleri doğru bir şekilde değerlendirmek amacıyla Kanser Genom Atlas (TCGA) veri portalından moleküler değişiklikleri tanımlamak için “cBioPortal for Cancer Genomics” platformunda (<http://www.cbioportal.org/>) daha önce yayımlanmış verilerle karşılaştırıldı. cBioPortal'da prostat kanserine ait mutasyon verilerine sahip 4607 örnek mevcut olup, 17.827 mutasyona uğramış gen verilerini içermektedir. Bizim n-LC MS/MS protein verilerini mevcut mutasyonlara karşı taramak için “UniProt Mapping” veri tabanında gen adına dönüştürüldü, burada 1.773 tanımlayıcıdan 1.770'i başarıyla 1.794 GeneCards ID ile eşlendi ve 3 protein (Q13748, A6NIZ1, A6NM15) örneği eşleştirilemedi. Ölçülen toplam protein sayısında

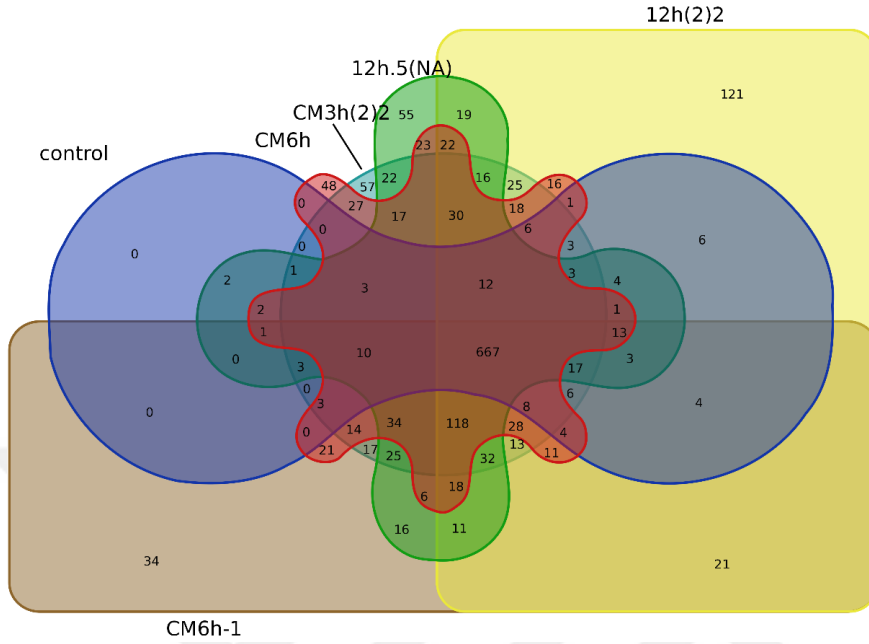
genel bir benzerlik kaydedildi, 1794 genin cBioPortal verileri ile karşılaştırılması sonrasında %89,4 oranında benzerlik olduğu saptandı.

TCGA veri analizine göre prostat kanserinde olumsuz prognoz ile ilişkili en yüksek öneme sahip 20 gen ile mevcut protein listesi karşılaştırıldığı zaman 4 (LMNB2, RAN, RBM8A, ZNF330) protein eşleşti. Bu sonuçlar, tanımlanmış proteinlerin teknik doğruluğunu ve prostat kanseriyle ilgisini sağlaması olarak verileri desteklemektedir.

Çizelge 4.3. TCGA verilerinde öneme sahip, prostat kanseri ile ilişkili genler ile örtüşen proteinler

Protein	Tanımı	Yerleşimi	mRNA (kanseri)	p değeri
LMNB2	lamin B2	Hücre içi	9.3	9.53E-05
RAN	RAN, member RAS oncogene family	Hücre içi	41.1	7.86E-05
RBM8A	RNA binding motif protein 8A	Hücre içi	17.8	0.000155
ZNF330	zinc finger protein 330	Hücre içi	11.7	3.66E-06

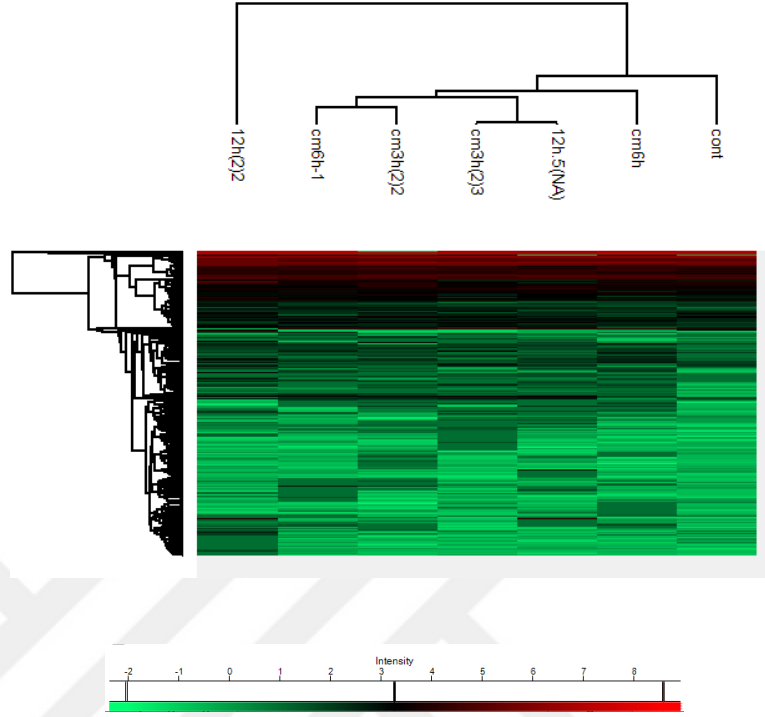
Gruplar arasındaki nicel karşılaştırmalar “Bioinformatics and Evolutionary Genomics” portalını kullanarak yapıldı (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn>). Venn diyagram sonuçlarına göre 118 protein kontrol grubuna göre örnek diğer klonlarda farklı eksprese edilmiştir. 23 protein CM uygulaması sonrasında LNCaP hücrelerinden farklılaşmış ve metastatik özellik kazandığı düşünülen CM6h ve 12h.5(NA) hücre klonlarına ve 13 protein NKX3.1 geni baskılanması sonrasında inflamatuvar mikroçevreye maruz bırakılması sonrasında elde edilmiş 12h(2)², CM3h(2)², CM6h-1 hücre klonlarına özgü olarak eksprese edilmiştir.



Şekil 4.35. Örnek grupların karşılaştırmaları arasında gözlenen ve farklılaşmış olarak yüksek eksprese edilen proteinleri gösteren Venn Diyagramı.

4.17. Perseus 1.6.6.0 Aracılığı İle Data Analizi

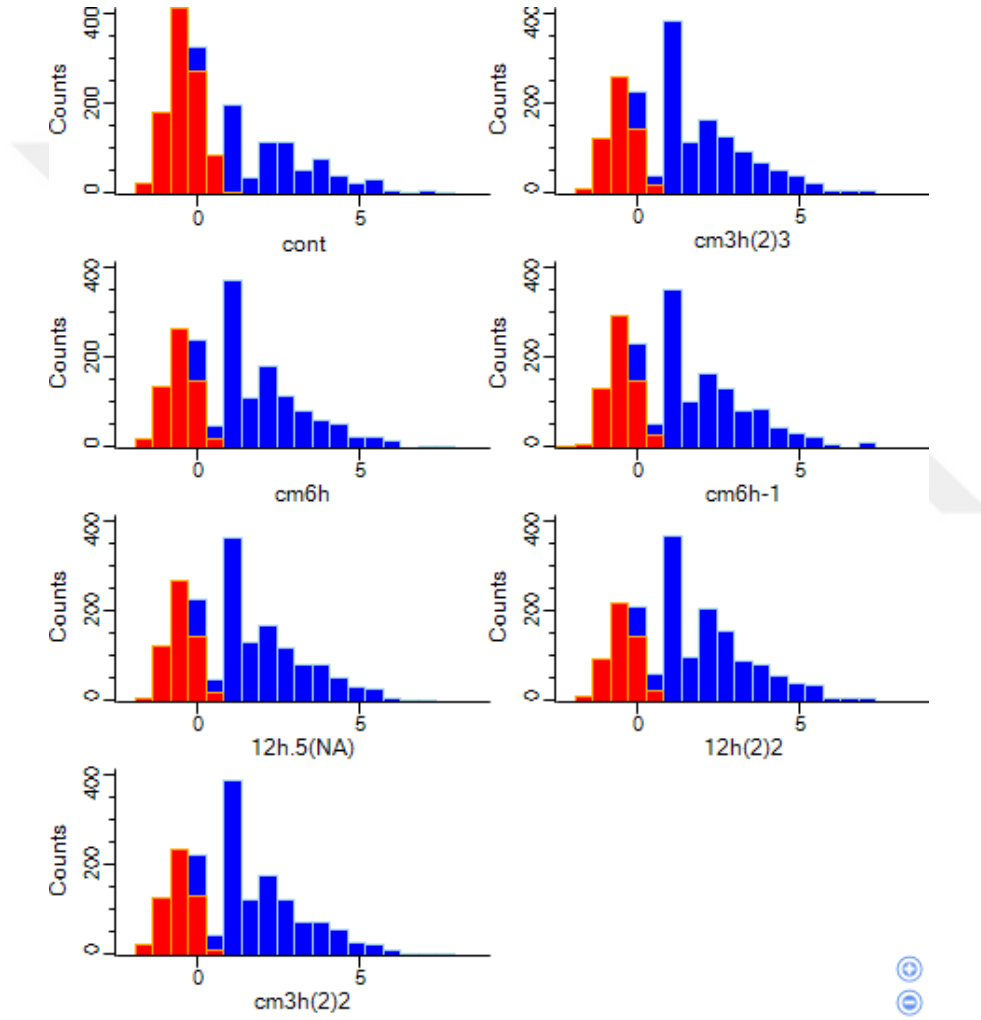
Perseus'e verileri yüklemek için .txt formatı kullanıldı. Analize başlamadan önce mevcut toplam 4715 protein değerleri $\log_2(x)$ değerine dönüştürüldü ve bundan sonra yapılacak işlemlere işbu değer ile devam edildi. Histogram görüntüsü çıkarılmadan önce normal örnekte bulunan ve diğer örneklerde bulunmayan eksik değerler değiştirildi ve protein yoğunluğuna göre PSM değeri görüntülendi. Şekil 4.36'de kontrol grubuna göre CM uygulaması sonrası farklılaşmış hücre klonlarının protein ekspresyon seviyelerinde belirgin farkların ortaya çıktığı görülmektedir.



Şekil 4.36. Hiyerarşik kümeleme analizi. Tüm örnek gruplarında tanımlanan, diferansiyel olarak eksprese edilen proteinlerden ($n = 1773$) ısı haritası hiyerarşik kümelemesi. Numunelerin kümelenmesi Perseus v.1.6.6.0'da yapıldı.

Hiyerarşik kümeleme analizi kontrol grubu ve klonlar arasındaki protein ekspresyonu değişiklerini ve örneklerin birbirlerine olan uzaklıklarını göstermektedir. Açık yeşil renk ile ekspresyon seviyesi düşük olan, koyu renkte orta seviyede eksprese edilen ve kırmızı ile ekspresyon seviyesi yüksek olan proteinler ifade edilmektedir. Histogram görüntüsünde kontrol hücrelerinin proteinlerinin yoğunluk olarak düşük ekspresyona sahip oldukları, göç eden hücre örneklerinde ise aynı proteinlerin koyu ve kırmızı renkler ile ifade edildiği tespit edilmiştir. Hiyerarşik kümeleme bu hücre örneklerinin birbirine hangi derecede benzer ya da farklı olduğunu göstermektedir. Filogenetik ağaç görüntüsü $12h(2)^2$ hücre örneklerinin kontrol grubundan ilk olarak ayrıldığını ve aynı anda en uzak bölgede yer aldığını, $CM.3h(2)^2$ ve $CM.6h-1$ ile $CM.3h(2)^3$ ve $12h.5(NA)$ klonlarının birbirine yakın olduklarını ifade etmektedir. PSM medyan analizlerinde, örnek klonlarda saptanan protein

hedeflerinin bir çoğunun değerin kontrol örneğinde daha düşük olduğu bulgulanmıştır (Şekil 4.37). Spesifik olmayan, eksik değerleri filtrelemek amacıyla eşik değeri belirlendi. Burada anlamlılığı %70'den yüksek olan proteinler seçildi. Eşik değeri belirlenerek ayrılan hedeflerin histogramları aşağıda, listeleri ise tablolarda verilmiştir.

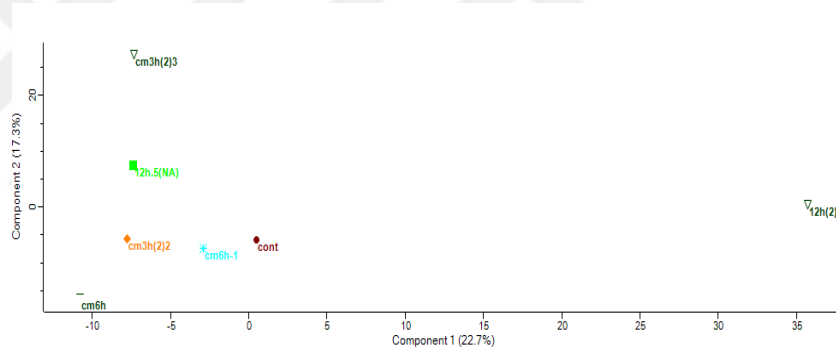


Şekil 4.37. Hücre örneklerinin protein PSM değerine göre karşılaştırılması. Kırmızı ile işaretlenmiş bölge eşik değeri altında kaldığı için sonraki analiz işlemleri için filtelenmiştir.

4.17.1. Prinsipal komponent analizi (PCA).

Kat değişim değerine göre seçilmiş kantitatif protein verileri ana bileşen analizi (PCA) aracılığıyla karşılaştırmak için kullanıldı ve sonuç şekil 4.38'de gösterildi.

PCA proteomik araştırma da dahil olmak üzere birçok alanda kullanılan istatistiksel bir analiz tekniğidir. Çok sayıda değişkeni daha kolay görselleştirilebilen ve anlaşılabilen daha az sayıda gruba indirgeyen sezgisel bir yöntemdir. Numuneler arasında maksimum değişkenlik sağlayan iki ana bileşen (PSM artışının lineer kombinasyonu), şekil 4.38'teki iki eksen üzerinde çizilmiştir.



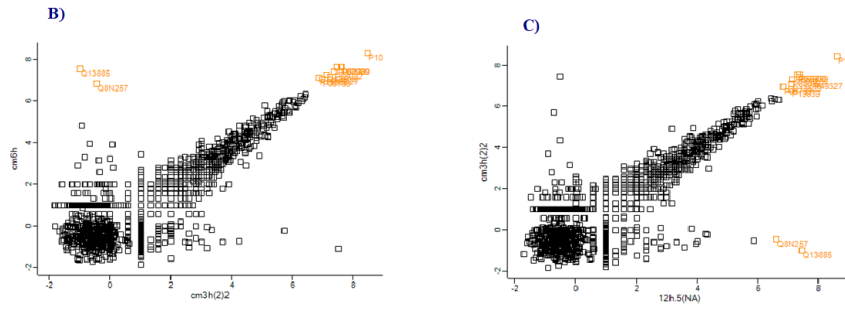
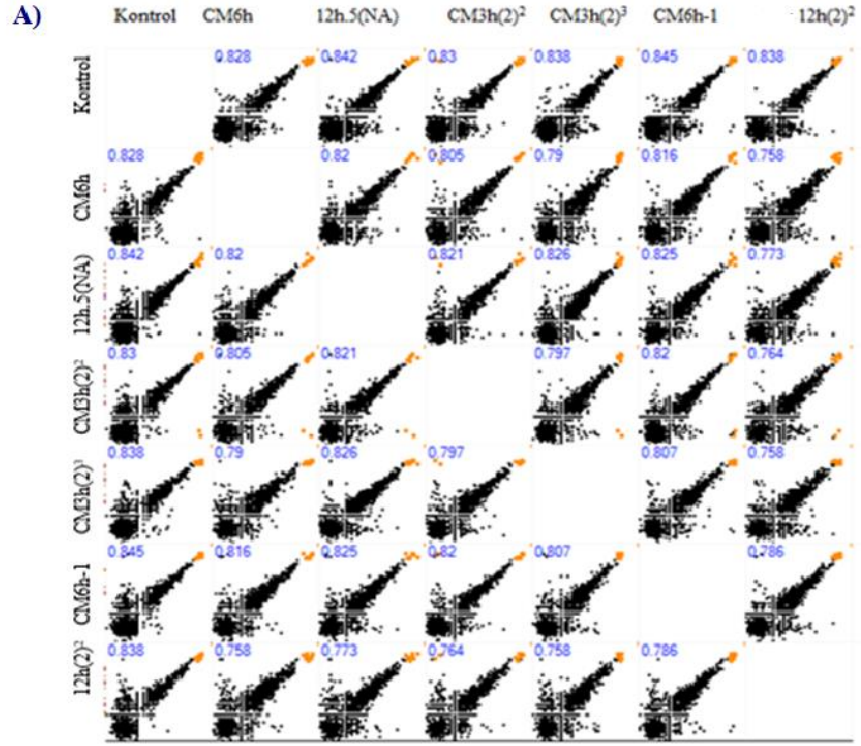
şekil 4.38. İnflamasyon varlığında göç eden hücrelerin PCA analizi

Perseus'da PCA analizini yapılabilmesi için geçerli değerlerin belirl nmiş olması lazım. Bu işlem bir önceki aşamada yapıldığı için doğrudan analiz edildi. şekilde kontrol örneğinin 12 saat boyunca CM uygulaması sonrasında değişen örneklere doğru ayrıldığı görülmektedir. Bununla birlikte, PCM analizleri CM.3h(2)² ve CM6h-1 hücre örneklere doğru kontrol hücreleriyle yakınsak olduğunu da göstermektedir.

4.17.2. Değişen protein değerinin Çoklu dağılım analizi ile değerlendirilmesi

Pearson korelasyon katsayısı, iki değişken arasındaki doğrusal ilişkinin gücünün ölçüsü olarak kullanılmaktadır. Pearson korelasyonu veya basitçe korelasyon katsayısı olarak adlandırılır. Değişkenler arasındaki ilişki doğrusal değilse, o zaman korelasyon katsayısı değişkenler arasındaki ilişkinin gücünü yeterince gösteremez. Bu nedenle, Pearson değeri, -1 ile 1 arasında değişebilir. -1, değişkenler arasında mükemmel bir negatif doğrusal ilişki olduğu, 0, değişkenler arasında doğrusal bir ilişki olmadığı ve 1, değişkenler arasında mükemmel bir pozitif doğrusal ilişki olduğu anlamını taşır.

Pearson değerini içeren çoklu dağılım grafiği hücre örneklerini farklı şekilde karşılaştırarak protein açılımında oluşan farkları araştırma imkanını verir. Belli protein grubunun seçilmiş olması (P10809, P49327, P60709, P68032, Q13509, P07900, P08238, Q13885, P06733, Q8N257, P13639) farklı hücrelerde bulunduğu noktayı inceleme imkanını sağlar (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. Hücre grupları arasında karşılaştırmalı çoklu saçılım (scatter plot) grafiği. Belirli proteinlerin farklı grup karşılaştırmalarındaki yerini belirlemek amacıyla farklı renk ile işaretlenmiştir. B ve C) Çoklu dağılım grafiğinden elde edilmiş ayrıntılı grafik görünüşleri. Her bir grafikte o gruba ait Pearson korelasyon katsayı miktarı belirlenmiştir.

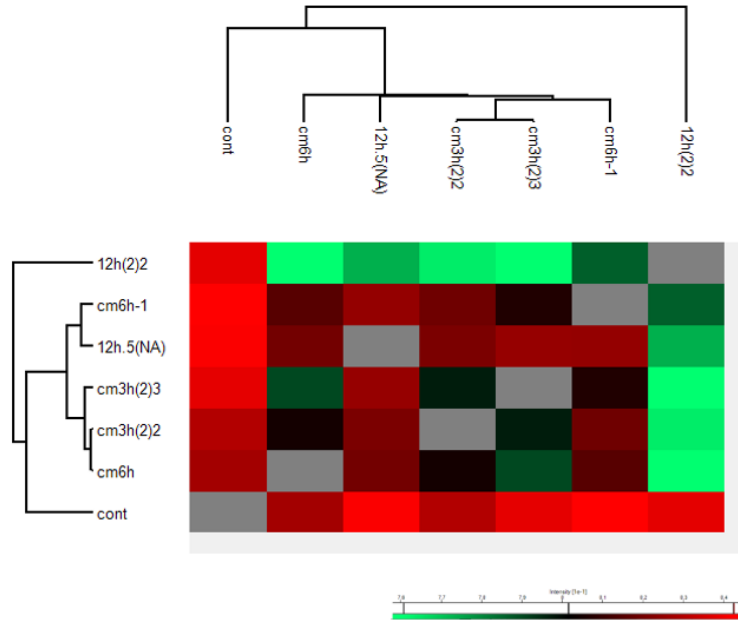
Turuncu renk ile işaretlenen proteinlerin, farklı örnek karşılaştırmalarında yoğunluk olarak benzer yerlerde bulunduğu belirlendi. Ancak, bazı proteinlerin ‘saçılım’ yaptığı tespit edildi. Şekil 4.39’un B ve C

kısımlarında görüldüğü gibi Q13885 ve Q8N257 proteinleri farklı saçılım (scatter plot) analizinde farklı bölgede yer almaktadır.

Çoklu saçılım analizinde belirlenen Pearson değerleri tabloya dönüştürülerek kümeleme analizi yapıldı.

Çizelge 4.4. Pearson değerine göre inflamasyon varlığında göç eden hücreler arasında pozitif doğrusal ilişki anlamlılığı.

	Kont	CM.6h	12h.5(NA)	CM3h(2)2	CM.3h(2)3	CM.6h-1	12h(2)2
Kont	NaN	0.828	0.842	0.830	0.838	0.845	0.838
CM.6h	0.828	NaN	0.820	0.805	0.790	0.816	0.758
12h.5(NA)	0.842	0.820	NaN	0.821	0.826	0.825	0.773
CM.3h(2)2	0.830	0.805	0.821	NaN	0.797	0.820	0.764
CM.3h(2)3	0.838	0.790	0.826	0.797	NaN	0.807	0.758
CM.6h-1	0.845	0.816	0.825	0.820	0.807	NaN	0.786
12h(2)2	0.838	0.758	0.773	0.764	0.758	0.786	NaN



Şekil 4.40. İnflamasyon varlığında göç eden hücrelerdeki doğrusal pozitif ilişkiyi gösteren hiyerarşik ısı haritası.

Pearson değerine göre oluşturulan hiyerarşik kümeleme histogramında pozitif doğrusal ilişkiye yakın olan korelasyonlar kırmızı ve en düşük olan değerler yeşil ile ifade edilmiştir. Klonlar arasındaki ilişkide en düşük değer $(0,758) 12h(2)^2$ hücreleri ile CM.3h(2)³ ve CM.6h arasındaki ilişkide bulundu. En yüksek değerler ise tüm hücre klonları ile kontrol grubu arasında gösterildi.





5. TARTIŞMA

Prostat kanseri büyümesi ve gelişimi hem androjene bağımlı olarak hem de androjenden bağımsız sinyal yolları üzerinden, androjen reseptörü aracılığı ile geliştiği düşünülen kanserlerden biridir. Ayrıca, prostat dokusu, prostat kanserinde sürekli olarak artan lenfosit infiltrasyonu ve bunun nedeni/sonucu olarak gelişen proinflatuar sitokinler aracılığı ile prostatik epitelin yeniden programlanmasına katkıda bulunan, hem sistemik hem de lokal inflamatuvar değişiklikleri taşıyan immün yetkin bir organdır. Prostat tümör mikroçevresi ile androjen reseptörü sinyalizasyon mekanizmaları arasındaki ilişki, gözlenen hem protümörigenik hem de antitümörigenik roller taşıyor olmaları açısından benzerlikler içerir.

Kanser nüksü ve metastaz ise kanser tedavisinde önemli klinik zorlukları temsil eder. Yapılan çalışmalarla ortaya koyulan kanıtlar, tümör hücrelerinin migrasyonları ve invazyonunun oluşması için EMT geçirmesinin, önemli bir önkoşul olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra, birçok kanser tipleri için mevcut immün kontrol noktası inhibitörlerinin bulunmuş olması, dolayısıyla inflamatuvar sinyal yollarının blokajlarındaki artışa rağmen, henüz prostat kanseri tedavisinde bu anlamda önemli ilerleme kaydedilememiştir.

Bu tez çalışmasında prostat kanseri gelişimi sürecinde, organ dışı tümör gelişimine neden olan faktörlerin tanımlanabilmesi için, androjen duyarlı prostat kanserinin gelişiminden invazif adenokarsinom ve kastrasyon dirençliliğe geçişin temel moleküler mekanizmalarını da içerisine alan, özellikle inflamatuvar mikroçevrede artan migrasyonun gözlemlendiği durumlarda protein profillerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

5.1 CM, LNCaP Hücrelerinde Migrasyonu Tetikler ve Hücrede Morfolojik Değişikliklere Neden Olur

Öncelikle, U937 hücrelerinin farklılaşması ve sitokin salınımları optimize edildikten sonra elde edilen TNF α dozu ayarlanarak inflamatuvar mikroçevre uyarıları gerçekleştirilen LNCaP prostat kanseri hücre hatlarında hücrelerde önemli morfolojik değişiklikler saptanmış, daha sonra ilk migrasyon klonlarının eldesi gerçekleştirilmiştir. Migrasyonun tetiklenmesinde inflamasyon ile aynı anda starvasyonun da önemli olduğu bulgulanmıştır. Migrasyon deneyinde hücrelerin serumsuz ortamda beslenmesi de invazyona katkı sağlamıştır. Buna bağlı olarak CM uygulaması yapılmayan kontrol örneklerinde de migrasyon kaydedilmiştir. Ancak, kontrol hücrelerinin migrasyon özelliğinin çok düşük olduğu, fakat proliferatif özelliklerinin yeterli olduğu görülmektedir. CM ortamında bulunan pro-inflamatuvar sitokinlerin EMT'yi tetikleyerek invazyona yol açtığı düşünülebilir. Örneğin, TGF- β standart yolunun, Snail 1/2 veya ZEB1 gibi EMT transkripsiyonel faktörünün ekspresyonunu artırmada önemli bir rol oynadığı anlaşılmaktadır. Dikkat çekici bir şekilde, bu proteinin ifadesi PKa örneklerinde E-kadherin ekspresyonu ile ilişkilidir (Yao B. et al., 2015). E-kaderin kaybına karşılık, vimentin ve N-kadherin gibi kritik mezenkimal belirteçler ve çinko parmak proteinleri Snail/SNAI1 ve Slug/SNAI2, bükümle ilişkili protein 1 (Twist 1-twist-related protein 1) ve çinko parmak E-box dahil olmak üzere birkaç E-kadherin transkripsiyonel baskılayıcı bağlanan homeobox 1 ve 2 (ZEB1 ve ZEB2 -zinc finger E-box-binding homeobox 1 and 2) EMT sırasında yüksek oranda yükselir, gelişmiş hücre mobilitesinin mezenkimal fenotipinin edinilmesine yol açar (Chen C.L et al., 2013).

Migrasyon deneyinde kontrol olarak kullanılan, CM uyarısı yapılmayan LNCaP hücrelerinin göç etmesi sonrasında elde edilen klonlar migrasyonu tetiklemek amacıyla kullanılan serumsuz besi ortamının invazyon ve migrasyonu uyardığını gösterdi. Hücrelerin büyüme aşamasında görece olarak

az sayıda göç eden kontrol hücrelerinin CM uyarısı yapılan hücre örneklerine karşı hızlı çoğalması, ancak zaman içerisinde hücrelerin kriyo koruma amacıyla -80 °C’de saklanması sonrasında tekrar kültür edildiğinde kontrol hücrelerinin yaşamlarını devam ettiremedikleri, bu nedenle starvasyon aracılıklı oluşan değişimlerin metastatik hücrelerin oluşumu için tek bağıl faktör olarak yetersiz olduğu şeklinde değerlendirildi. Kısa süreli (3, 6 ve 12 saat) CM uyarısından sonra, migrasyon deneyinde göç eden hücre sayısı kontrole karşı fazla olsa da, proliferasyonun uzun bir süre düşük kalması bu hücrelerde inflamasyonla tetiklenmiş farklılaşmanın olduğunu ve daha sonra bu hücrelerin hızlı bir şekilde çoğalmaya başlamalarıyla oluşan değişimlerin inflamasyona bağlı migrasyonu hem de bu hücrelerin apoptoz yolağını baskılayarak hayatta kalmalarına bağlı olarak gerçekleşmiş olabilir.

Araştırmalarda proinflamatuvar sitokinlerin zamana bağlı farklı etki gösterdiği belirlenmişti (Butuner B.D et.al., 2014). 500 pg/ml TNF α içeren CM farklı süreler ile LNCaP hücrelerine uygulandığında farklı etki gösterdi. 3 saat CM uyarısı sonrasında göç eden hücreler miktar olarak fazla olsa da, proliferasyon özelliğinin düşük olduğu ve uzun süre hücre kültür ortamında beslemenin sonunda yaşamını bitirmesi kısa süre yüksek miktarda proinflamatuvar sitokinlere maruz kalmanın hücrelerde farklılaşmaya neden olduğunu ve bu değişimlerin hücre invazyon özelliğini olumlu yönde etkilediğini, ancak hücrelerde mitotik aktiviteyi baskıladığını göstermektedir. 6 saat CM uyarısı yapılan örneklerde göç eden hücre miktarı daha az oldu. Ancak bu hücreler morfolojik olarak diğer tek tabaka çoğalan hücrelerden farklı bir şekilde süspansiyon büyüme yeteneğine sahip oldular (şekil 4.2). Tek bir koloni halinde yaşamını sürdüren bu hücreler, rutin olarak hücre kültür ortamının değiştirilmesi ile 2 ay boyunca aynı boyutta süspande olarak hayatlarına devam ettiler ve daha sonra yine tek tabaka adhesif karakter geliştirdiler ve tutunmaya bağımlı büyümeye devam ettiler. Hücrelerde gözlenen bu değişimlere göre 6 saatlik CM uygulaması sonrasında proinflamatuvar kemokinler ve sitokinlerin çoklu proinflamatuvar yolları

aktive ederek hücre iskeletinde yapısal değişikliklere neden olabilecekleri düşünüldü. 12 saatlik CM uyarısının ardından göç eden hücre klonları 3 ve 6 saat CM uyarısı yapılan örneklerle karşılaştırılarak adaptasyon sürecini daha hızlı geçtiler. Sonuç olarak; hücrelerin inflamatuvar mikroçevrede bulunma süresi yani diğer bir deyişle, inflamatuvar sitokinlere maruziyet süreleri, hücrelerin yaşamdaki kaderinin belirlenmesinde yönlendirici bir rol oynamaktadır.

Kanser hücrelerine özgü olan heterojenlik inflamatuvar mikroçevrede göç eden hücre örnekleri içinde de tespit edildi. Prostatta oluşan inflamasyonun hücre kültüründe modellenmesini hedefleyerek yapılan *in vitro* inflamasyon modeli ile oluşturulan inflamatuvar mikroçevrede indüklenen moleküler değişimlerin hücre göçüne neden olduğunu araştırmak için yapılan deneylerde elde edilen hücre klonları büyüme aşamasında birbirinden farklı morfolojik değişimlere sahip oldular ve hücre klonları bu farklara göre ayrıldı (şekil 4.3). Morfolojik değişim süresi içinde süspansiyon hücre evresini geçiren hücreler nonadhesif (NA), aynı tek tabaka hücre halinde büyümeye devam eden hücreler CM uyarısı yapılan zamana göre adlandırıldı. Gruplara ayrılan hücre klonlarındaki değişimleri protein seviyesinde ayrıntılı incelemek amacıyla yapılan western blot analizinde öncelikli olarak epitelyal hücre adezyonunda hücrelerin birbirine bağlanmasında rol oynayan ve hücre iskeletine bağlanan protein kompleksi olan E-kadherin ve β -katenin proteininin seviyesine bakıldı. E-kadherinin klasik bir epitelyal hücre markeri olması ve azalmasının hücre polaritesinin ortadan kalkmasına neden olabileceği gösterilmiştir. β -katenin işlevinin bozulmasının ise hücre göçünü artırmakla birlikte, molekülün nükleusa translokasyonu sonrasında transkripsiyon faktörü olarak c-myc ve cyclin D ekspresyonlarını artırdığı ve tümör oluşumuna katkı sağladığı bilinmektedir. Benzer şekilde, AR transaktivasyonunu destekleyebilir. E-kadherin ve β -katenin ekspresyon seviyelerindeki azalmanın hücre iskeletinde yeniden yapılanmayı desteklediği ve hücrelerin EMT geçirdiğinin önemli bir kanıtı olarak kabul edilmektedir.

β -katenin hedef genlerinden biri olarak Siklin D ifadesinin yükselmesi prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) benzeri bir fenotipin oluşumuna yol açmaktadır (Gounari F et. al., 2002). β -katenin'in AKT aracılığı ile Ser552 bölgesinden fosforilasyonu hücre hücre yapışmalarından ve sitozol ve nükleustaki birikimden ayrılmasına neden olur ve Ser552'yi içeren bir bağlayıcı motif vasıtasıyla 14-3-3 ζ ile etkileşimini artırır. AKT aracılı β -katenin fosforilasyonu transkripsiyon aktivitesini artırarak tümör hücreleri büyümesini ve invazyonunu teşvik eder, AKT'a bağımlı β -katenin düzenlenmesinin tümör istilasında ve gelişiminde kritik bir rolünün olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Dexing Fang et. al., 2007).

Benzer şekilde ekspresyon seviyesi kontrol edilen bir başka protein olan NKX3.1, prostat gelişiminde önemli roller oynar. Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda, tümör baskılayıcı fonksiyonu belirlenmiş ve metastatik PKa örneklerinde protein yıkımının gerçekleştiği belirlenmiş olan NKX3.1'in inflamasyon varlığında protein ekspresyon seviyesinin azaldığı ve bunun hücre istilasına aracılık ettiği gösterilmiştir (Debelec-Butuner et. al., 2014).

Sonuç olarak, western blot'ta kontrol edilen proteinlerin her bir hücre klonunda farklı seviyede eksprese edilmesi aynı deneyden elde edilen hücre klonlarındaki heterojenitenin bir belirteci olabilir (şekil 4.4). Bu verilere göre değişim oranı yüksek olan ve en fazla metastatik özellik gösteren hücre klonlarından 12h.5(NA) bir sonraki validasyon deneyleri için seçilmiştir.

5.2. İnflamasyon ile göç eden LNCaP hücrelerinde proliferasyon hızının yükselmesi.

Artmış hücre proliferasyonu, iyi huylu prostat hiperplazisi (BPH) ve prostat kanseri dahil olmak üzere prostat bozukluklarının en önemli özelliklerinden biridir. Bu bozukluklar tipik olarak yaş ilerledikçe ilerler. Tanımlanan bu faktörlerin çoğu artmış inflamasyonla ilişkilidir (Woods JA

et.al., 2012). Makrofajlar, iltihaplanma sırasında aktive olan önemli immün hücre tipleridir. Makrofaj infiltrasyonları (inflamasyon), prostatit, prostat hiperplazisi ve prostat kanseri gibi prostat bozuklukları ile ilişkilidir ve yüksek hücre proliferasyonuna sahiptir.

CM (500 pg/ml TNF α) uygulaması sonrasında göç eden hücre örneklerinde farklılaşma sonrasında hücrelerin hızlı bir şekilde çoğaldığı belirlenmişti. Bu bilgiyi kanıtlamak için yapılan WST-1 hücre proliferasyon deney sonuçları 12h.5(NA) hücre klonunun kontrol ve diğer göç eden hücre örneklerine karşı yüksek proliferasyon özelliğine sahip olduğunu kanıtlamış oldu. 12h.5(NA)'ın büyüme hızı sentetik androjen R1881 varlığında, 1) kontrol gurubu olarak seçilen LNCaP hücrelerine göre ($p < 0,006$) ve 2) göç eden kontrol hücrelerine göre ($p < 0.02$) anlamlı olarak farklı bulundu. Hücrelerin mitotik kapasitesinin bir göstergesi olan Histon3^(Ser10) fosforilasyonundaki artış ile birlikte E-kadherin fonksiyonunun kaybı dahil, 12h.5(NA) hücre örneklerinde inflamasyon ile tetiklenen moleküler değişimlerin hücre proliferasyonunu artırdığı saptandı (şekil 4.7).

5.3. İnflamasyon Sonucu Göç Eden Hücrelerde AR Transaktivasyonunun Artması

Prostat kanseri büyümesi, hem androjene bağımlı hem de androjenden bağımsız yollar ile androjen reseptörü sinyalleriyle kontrol edilir. Ayrıca prostat, prostat kanserinde sürekli olarak artan lenfosit infiltrasyonu ve proinflatuar sitokinlerle prostatik epitelin yeniden programlanmasına katkıda bulunan immün yetkin bir organdır. Hem sistemik hem de lokal inflamatuvar değişiklikler yolaklar aracılığı ile düzenlenir. Tümör mikroçevresi ile androjen reseptörü sinyalleşmesi arasındaki ilişki, gözlenen hem protümörigenik hem de antitümörigenik roller içerir.

Androjen yoksunluğu tedavisinden sonra nüks eden prostat kanserlerinin çoğunluğu (androjenden bağımsız PKa) androjen reseptörünü (AR) eksprese

etmeye devam ederler. İnflamasyon varlığında LNCaP hücrelerinden geliştirilmiş klonlar arasında en büyük değişim gösteren 12h.5(NA) hücre klonlarında AR'in fonksiyonel önemini incelemek amacıyla yapılan reporter gen analizi deneyinde kontrol grubuna karşı belirgin bir artışın olduğu görülmüştür (şekil 4.8). Özellikle, sentetik androjen varlığında kontrol grubuna karşı 12h.5(NA) seviyesinde AR transaktivasyonunu artırdığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, inflamasyon varlığında migrasyon özelliği kazanan hücrelerin androjen varlığında AR transaktivasyonunun androjene karşı duyarlı kontrol hücrelerine (LNCaP) göre daha yüksek olduğu söylenebilir.

5.4. İnflamatuvar Sitokinlerin LNCaP hücrelerinde EMT'yi Tetiklemesi ve Fizyolojik Değişimler

Son zamanlarda, bazı makaleler EMT'nin kanser ilerlemesi ve metastaz oluşumunda önemli rol oynadığını ve EMT'nin metastatik süreci tetiklemekten sorumlu önemli bir olay olduğunu vurgulamaktadır (Smith BN, Bhowmick NA, 2016). Tümörlerde, lokal kanser ortamı epitel hücrelerinin “geçici olarak” mezenkimal duruma dönmelerini gerektirir. EMT sırasında polarize epitel hücrelerin bazı özellikleri (hücre-hücre yapışması ve hücre polaritesi) kaybolurken, metastatik gelişmeyi destekleyen çok sayıda önemli değişimlerin sonucu olarak invazif, iyi tanımlanmış bir mezenkimal fenotip ortaya çıkar. Farklı epitel markerlerin kaybı (β -katenin, E-kadherin) ve mezenkimal markerlerin (vimentin, N-kadherin, fibronektin ve α -düz kas aktin) sırasıyla, invazif ve metastatik yeteneklerin, yükselen apoptoz direnci ve hücre dışı matris elemanlarının üretimi gibi faktörlerin arttığı insan tümör örneklerinde gösterilmiş ve metastatik ilerlemeyle ilişkilendirilmiştir (Kalluri R, Weinberg RA, 2009).

CM (500 pg/ml TNF α içeren) uygulaması sonrasında yapılan migrasyon deneyinde elde edilen hücre klonlarında migrasyonu tetikleyen değişimleri araştırmak amacıyla yapılan western blot analizinde, 12h.5(NA) hücre

örneklerinin E-kadherin kaybının ardından N-kadherin ekspresyonunu kazandığını göstermiştir. N-kadherin ekspresyonu ile bağlı kazancın tüm göç eden hücre klonlarında ortaya çıktığını araştırmak için yapılan analizlerde proteinin sadece 12 saat CM uyarısı yapılması sonrasında göç eden hücre örneklerine özgü olduğunu göstermiştir.

Uzun süreli değişim sonrasında analiz için hazır hale gelen CM.6h hücre klonlarında yapılan western blot analizi sonrasında ise bu hücrelerde N-kadherin ekspresyonu kaydedilmemiştir. Ancak, başka bir EMT markeri olan vimentin interfilamentinin CM.6h hücre örneklerinde yüksek seviyede bulunmuş olması verileri destekleyici niteliktedir.. 12h.5(NA) hücrelerinde ise vimentin ekspresyonu düşük seviyede bulunmuştur. Kısa bir dönem kültüre edilen ortamlardaki hücrelerden tekrar yapılan western blot analizlerinde 12 saat CM uygulaması sonucunda kazanılan N-kadherin ekspresyonunun yıkıma uğradığı kaydedilmiştir. Bu değişikliğin, bir şekilde hücrelerin epitelyal karaktere geri dönüşlerinin tetiklenmekte olabileceği ve mezenkimal fenotipin geçici olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

EMT süreci, birçok fizyolojik ve patolojik koşullarda hücrelerin yaşamlarının devamını sağlayarak onlara hareketlilik ve invazif özellik kazandırır ve kanserlerde dolaşımdaki hücrelerin oluşumuna katkıda bulunur, böylece tümör hücrelerinin (belkide normal hücreleri oranla daha fazla) hayatta kalmasını sağlar. Ancak, EMT bir geçici süreç olarak kabul edilmektedir. Bu hipoteze göre dolaşımdaki kanser hücreleri ‘uygun’ ortam buldukları zaman tekrar MET geçirebilir ve yeni ortamda tümör büyümesine devam edebilirler. 12h.5(NA) hücre örneklerinde kazanılan N-kadherin ekspresyonunun zaman içerisinde kaybolmasının kısa süreli EMT/MET geçişinin belirtisi olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Bu hücre tipinin E-kadherin ekspresyonunu tekrar kazanması da (şekil 4.11) bu hücrelerde polaritenin yeniden ortaya konduğunu göstermekte olabilir, veriler birbirleriyle hipotez çerçevesinde uyumludur. Ancak, CM.6h hücrelerinde E-kadherin ekspresyonunun kazanılması ile vimentin ekspresyonu aynı anda yüksek seviyede bulunmuştur. Aynı anda,

proinflamatuar sitokin maruziyeti durumunda baskılanan NKX3.1 ifadesinin 12h.5(NA) ve CM.6h hücre örneklerinde geri kazanılması bu hücrelerde yeni bir fenotipin oluştuğunu göstermektedir.

Invazif olarak seçilen CM.6h ve 12h.5(NA) hücre klonlarında EMT markerleri dışında değişen başka fizyolojik yolları araştırmak amacıyla yapılan çoklu antikör işaretlemeleri sonrasında p-Histon3^(Ser10), pAKT1/2/3^(Ser473), β -katenin ve vimentin'in kontrol grubuna karşı her iki klondada yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun dışında CM.6h hücrelerde β -tubulin ve 12h.5(NA) hücre örneklerinde PLK-1'in yüksek olduğu da ayrıca gözlenmiştir (şekil 4.13/4.14).

Çoğu kanserde aktivitesi düzensiz kontrol edilen AKT protein kinazın tümör hücrelerinin büyümesinde ve hayatta kalmasında önemli bir faktör olduğu kabul edilmektedir. İnflamasyon varlığında AKT'nın Ser473 bölgesinden fosforilasyonu sitoplazmik β -katenin seviyesinin yükselmesine neden olur ve böylelikle difüzyon ile nükleuse daha fazla transloke olan β -katenin TCF transkripsiyon faktörü olarak etki ederek proliferasyonu uyaran c-myc gibi bir takım hedef genleri uyatarak onkojenik etki gösterir (Bilge D.Butuner, 2011). PLK-1 ise hücre döngüsünde G2/M geçişinin gerekli kinazlarından biri olarak, artan seviyesi ile mitoz geçişini hızlandırarak hücre proliferasyonuna katkıda bulunabilir.

5.5. LNCaP Hücrelerinde NKX3.1 gen fonksiyonunun susturulması ve bu Hücrelerde Migrasyonun Tetiklenmesi

Prostatın oluşumu ve gelişiminde önemli sayılan, tümör baskılayıcı fonksiyona sahip NKX3.1 homeobox geni hücre farklılaşması ve plastisitenin teşvikinde önemli rol oynar. Fare ve insan prostat hücreleri örneklerinde yapılan araştırmalar inflamasyonun NKX3.1 fonksiyonunun kaybı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Clémentine Le Magnen et al.,2018). NKX3.1'in kaybı ise prostat kanserinde migrasyonun başlatılmasını hızlandırır.

NKX3.1'in inflamasyon kaynaklı prostat karsinogenezindeki rolünün araştırılması amacıyla androjen yanıtı oluşturabilen LNCaP hücre hattında NKX3.1 fonksiyonunun kalıcı olarak susturulması ve bu hücrelerde inflamasyon aracılıklı migrasyon deneyi yapılarak ortaya çıkan değişimleri araştırmak amaçlanmıştır. Bunun için, öncelikle shRNA teknolojileri kullanılarak gen susturma denenmiş, ancak NKX3.1 tümör baskılayıcı geninin ekspresyon seviyesini değiştirmeye yönelik çalışmalar sonuç vermemiştir. Daha sonra bu nedenle çalışmalarda CRISPR/Cas9 sistemi kullanımına gidilmiştir. Sonuçlar daha umut verici olduklarından, bu hücreler kullanılarak migrasyon deneyleri yapılmıştır. NKX3.1 ekspresyonu düşük klonların seçimi migrasyon tetiklemesi sonrasında western blot ile ekspresyon paternleri karşılaştırılarak belirlenerek yapıldı.

LNCaP hücrelerinde yapılan migrasyon deneyinden farklı olarak NKX3.1 geni baskılanan hücrelerde yapılan bu deneylerde göç eden hücre sayısı daha fazla ve farklılaşma süresi daha kısa sürdü. Üç farklı zamanda CM uygulaması yapılan (3, 6, 12 saat) hücrelerde yapılan migrasyon deneyi sonrasında her üç gruba ait klonlar elde edildi. LNCaP hücreleri ile yapılan önceki deneylerde üç saatlik CM uygulaması yapılan klonlar zaman içerisinde kültürde devam edemediler. Ayrıca, NKX3.1 fonksiyonu baskılanmış kontrol hücreleri de (inflamasyon uyarısı yapılmayan) migrasyon deneyinde az miktarda olsa da göç etmelerine rağmen, oluşan koloniler büyümediler. Bu gözlemler, inflamasyona bağlı NKX3.1 kaybının ardından yükselen migrasyonda NKX3.1'in dışında başka faktörlerin de önemli olduğunu düşündürmektedir. Sadece NKX3.1'in susturulması hücre yaşamını olumsuz yönde etkilemektedir. Ancak, CM uygulaması sonrasında yapılan aynı migrasyon deneylerinde elde edilen klonların ise daha agresif oldukları ve oluşan klonların morfolojilerinin birbirinden farklı oldukları gözlemlendi (şekil 4.18).

EMT'nin negatif markeri olan E-kadherin ve pozitif markeri olan vimentin ile beraber NKX3.1 seviyesine bakmak için yapılan western blot

analizleri kontrolün dışında tüm göç eden hücre klonlarında E-kadherinin baskılandığını ve bazı örneklerde vimentin ekspresyonunun kazanıldığını gösterdi. Yapılan NKX3.1 susturmasının ardından NKX3.1 fonksiyonu baskılanmış klonları seçmek için NKX3.1 ekspresyon seviyesine bakıldı (şekil 4.19). Western blot analizi sonuçlarına göre EMT markeri yüksek ifade edilen ve NKX3.1 ekspresyonu baskılanan hücre klonları bir sonraki analizler için seçildi.

5.6. İnflamasyon Varlığında NKX3.1 ekspresyonunun Susturulması ile Artan Proliferasyon Hızı ve Koloni Oluşumu

İnflamasyon aracılıklı EMT özelliği kazanmanın, NKX3.1 susturulmuş hücrelerin hücre döngüsü fazları üzerindeki etkisinin araştırılması için, hücre DNA'sı propidium iyodür (PI) ile boyanarak Flow sitometri analizinde yapıldı. Kontrol grubuna karşı göç eden hücre örneklerinde mitotik hücrelerin daha fazla olduğu tespit edildi (şekil 4.21). Bu durum yüksek proliferasyonun veya artan genetik heterojenliğin sonucu olarak mitotik yavaşlamanın bir göstergesi olarak yorumlanabilir. Ayrıca, S fazındaki hücrelerin kontrole karşı fazla olması bu hücrelerde DNA ikilenme süreci ya da DNA hasarından dolayı o fazda tutuklandıklarının bir belirtisi olabilir. Buradan yola çıkarak, ileriki çalışmalarda olası genetik değişikliklerin kontrollü değişiklikler mi yoksa rastgele gerçekleşmekte olup hücre döngüsünün kontrol noktalarına fazlaca yük getirmekte, bu nedenle gerçekleşen döngü yavaşlamanın temelinin araştırılması gerekmektedir.

Flow sitometri ve western blot sonuçlarından yola çıkılarak 3, 6 ve 12 saatlik CM uygulamasına bağlı göç eden hücre örneklerinden birer klon seçilerek sonraki validasyon işlemlerinde kullanılmak üzere karar verildi. 3 saat CM yapılan örneklerde vimentin ekspresyonu yüksek olan ve NKX3.1 düşük olan durum farklı klonlarda tespit edildiği için her iki klon da deneylere dahil edildi.

Kontrol gurubu ile birlikte seçilen CM3h.(2)², CM3h.(2)³, CM.6h-1, 12h.(2)² ve daha önce deneylerde kullanılan CM.6h ve 12h.5(NA) hücre klonlarında koloni oluşumunu araştırmak için yapılan deneyler, inflamasyona metastatik özellik kazanan hücrelerin hayatta kalma ve koloni oluşturma yeteneklerinin yüksek olduğunu gösterdi.

Oluşan koloni sayısının kantitatif olarak değerlendirilmesi, inflamatuvar mikroçevrenin kanser hücreleri koloni oluşum miktarını belirgin şekilde etkilediğini göstermektedir (Şekil 4.23). Burada NKX3.1 protein ekspresyonunun baskılanması da önemli faktör olabilir. Ayrıca, NKX3.1 baskılanmış ve CM uygulaması sonrası değişmiş klonlarda koloni miktarı aynı zaman aralığında CM uygulaması yapılmış kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, NKX3.1 kaybı kanser hücre migrasyonunu tetiklemekle beraber koloni oluşumunu da olumlu yönde etkiler, inflamasyona maruz kalma süreci arttıkça oluşan koloni miktarı da artar (şekil 4.24).

5.7. İnflamasyon Varlığında AR Seviyesindeki Azalmanın Artan DNMTα ile İlişkisi

Prostat kanseri hücrelerinde inflamasyona bağlı NKX3.1 ekspresyonundaki azalmanın AR'daki azalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Khalili ve arkadaşları tarafından, farelerde üretal bölgeye patolojik E.coli enjekte edilerek *in vivo* inflamasyon modeli oluşturulmuş ve inflamatuvar atrofi ve invazif kanser bölgelerinde NKX3.1 ile AR ekspresyon seviyelerinde azalma kaydetmişlerdir. Ayrıca, bu hücrelerde proliferasyon miktarının arttığı da rapor edilmiştir (Khalili et al.,2010). Tez çerçevesinde yapılan deneylerde, inflamasyon varlığında göç eden hücrelerdeki proliferasyon ile koloni oluşumlarındaki artışlar bir önceki bölümde gösterilmişti. Mevcut klonlarda AR seviyesinin araştırılması ve son zamanlarda hematolojik ve mide kanseri gibi birkaç kanser türlerinde EMT ve malignite ile ilişkilendirilmiş ve AR ile ters ilişkide olan DNMT3α ekspresyonuna bakmak için yapılan western blot

analizinde inflamasyona bağı AR seviyesinde azalma ve DNMT3 α ekspresyonunda önemli bir yükseliş olduğu tespit edilmiştir.

Bulgularımızla benzer şekilde, Yue-feng Du ve arkadaşlarının TSU-PR1 hücre hattında yaptığı çalışmalarda DNMT3 ailesi üyelerinin konservatif homoloji bölgesinin siRNA ile hedeflenmesi sonucunda proliferasyon, invazyon ve migrasyonun etkili bir şekilde baskılandığı gösterilmiştir. Araştırmacılar yayınlarında bu gen ailesinin prostat kanseri hücrelerinde önemli rolünden yola çıkarak, DNMT3 ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu belirtmişlerdir (Yue-feng Du et. al., 2012).

5.8. İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde β -katenin Seviyesinde Artış

İnflamatuvar süreçte artan β -katenin seviyesi, hem hücrelerarası bağlantı noktalarındaki aktivite hem de transkripsiyonel aktivite açısından önemlidir. Wnt sinyal yolağının önemli moleküllerinden biri olan β -katenin çok işlevli bir proteindir. Birçok çalışma, β -katenin sinyalizasyonunun aktive olmasının kanser gelişimine katkıda bulunduğunu göstermiştir (o halde referanslar). Yüksek seviyeli β -katenin ekspresyonu her zaman tümörijenik özellikleri indükler ve kanser hücresi proliferasyonunu teşvik eder, bu kanser hücrelerinin hayatta kalması ile doğru ilişkidir. Ayrıca, β -katenin sinyali, hem normal hem de kanser kök hücresi olarak adlandırılan hücrelerin pluripotent fenotipleri ve kendi kendini yenilemesi için oldukça önemlidir. ‘Kanser kök hücresi’(KKH) klasik kemoterapi ve radyoterapiye dirençlidir. Prostat kanserinde, bu hücrelerin androjen ablasyon tedavisi sonrası hayatta kalabildikleri ve kastrasyon dirençli prostat kanserine (CRPC) neden olmaları mümkündür. Artan kanıtlar, Wnt/ β -katenin sinyalinin KKH'lerde oldukça aktif olduğunu ve prostat kök hücresinin kendini yenilemesinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Ek olarak, AR ve β -katenin androjenden bağımsız büyüme ve ilerlemeyi teşvik etmek için hedef genleri tetiklemekte

birbirini uyarabilir (Zhuangzhuang Zhang et.al.,2018). KLK ailesi üyesi olan diğer bir gen KLK-4 androjenler tarafından kontrol edilir ve prostatta yüksek ekspresyona sahiptir. Normal prostat ile karşılaştırıldığında malign prostat hücrelerinde KLK-4 proteini aşırı eksprese edilir (Klokk TI et.al., 2007).

PI3K/Akt sinyal yolunun aktive olması, tümör hücresi invazyonuna katkıda bulunur. NKX3.1 gen ekspresyonu mevcut ve baskılanan (+/-) hem de inflamasyona bağlı göç eden hücrelerde AKT aktivitesinin kontrole göre, özellikle NKX3.1 gen ifadesi susturulan hücrelerde azalmış olması bu hücrelerde invazyon özelliğinin tekrar azaldığı anlamına gelebilir (şekil 4.26). Deneylerimizde aynı hücrelerde β -katenin ve KLK-4 protein ekspresyonunun kontrol ve NKX3.1 ifade edilen ve inflamasyona bağlı göç eden hücrelere göre fazla olduğu tespit edilmişti. Bu durum inflamasyona maruz kalan prostat hücrelerinde NKX3.1 ifadesinin azalmasının veya yokluğunun ardından zaman içerisinde ekspresyonunu tekrar kazanabildiğini ve NKX3.1 ifade edilen bu hücrelerde proliferasyonun ve koloni oluşturma yeteneklerinin NKX3.1 yoksun hücrelere göre daha düşük olduğunu göstermiştir.

5.9. İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde NKX3.1 Kaybına İle HN1 seviyesinde Artış

Hematolojik ve nörolojik ekspressed 1 (HN1) geninin birçok tümörde ifadesinin yüksek olduğu gösterilmiştir. HN1'in yıkımının, *in vivo*'da tümör büyümesini inhibe ettiği, fakat *in vitro*'da hücre proliferasyonunu etkilemediği gösterilmiştir. HN1'in aşırı ekspresyonu β -katenin yıkımını arttırarak β -katenin/E-kadherin etkileşimini negatif olarak etkiler. Koloni oluşumu ve migrasyon yeteneği artar (Varisli L et. al., 2015). İnflamasyona bağlı göç eden hücre klonlarında HN1 seviyesinin yüksek bulunması bu hücrelerin metastatik karaktere sahip olduklarını göstermektedir.

5.10. İnflamasyon Varlığında Göç Eden Hücrelerde Protein Profiline Tanımlanması Aracılığı İle Aradaki Farkların Bulunması

Kütle spektrometresi (MC) enstrümanlarındaki son gelişmeler ve yeni analitik, biyoinformatik yöntemler proteomik ve büyük veri bilimi arasındaki ilişkiyi arttırmaktadır. Ek olarak, biyoinformatik analiz yöntemleri giderek daha karmaşıklılaşarak çoklu algoritma ve araçları içine kapsamakta büyük veri analizlerine yardımcı olmaktadır. Son yıllarda biyoinformatik yöntemler ile proteomik ve genoma dair büyük verilerin analizi için çok çeşitli yöntemler ve yazılım araçları geliştirilmiştir. Tez çalışma süresinde inflamasyon varlığında değişmiş ve migrasyon deneyinde invazyon membranını geçmesi sonrasında elde edilen NKX3.1 pozitif ve negatif hücre klonlarında yapılan validasyon deneyleri sonrasında değişim oranı yüksek olduğu düşünülen CM6h, 12h.5(NA), CM3h(2)², CM3h.(2)³, CM6h-1 ve 12h(2)² hücre örnekleri protein profillemeye için seçilmiştir. Bunun için proteinlerin iyon yüküne göre küçük konsantrasyonda bile ölçülmesini sağlayan nano-LC-MS/MS (Nano ölçeğinde çalışabilen- High-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry) analiz yöntemi olarak kullanılmıştır. Burada proteinler yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılarak ve kütle detektörü ile analiz edilirler. İlk filtrede kütle/yük oranına göre moleküller ayırıldıktan sonra Collision Gaz adındaki spesifik bir gaz ile parçalanmaya tabii tutulur. İkinci filtrede parçalanma sonrada oluşan iyonlar teşhis edilerek miktar tayini yapmak için kullanılırlar. Bu şekilde analiz edilen örnekler ‘Human Uniprot’ veri tabanındaki verilere göre değerlendirilerek, her bir hücre örneğine ait tanımlanmış proteinlerin kapsama yüzdesi, okunan peptit ve protein sayıları hem de protein için tanımlanmış peptit dizilerinin toplam sayısı (peptit spektrum eşleşmeleri - PSM değerleri) belirlenmiştir. İnflamasyona bağlı göç eden hücre örneklerinde karşılaştırmalı validasyon işlemleri için PSM değerinin seçilmesi uygun bulunmuştur. Kontrol örneğinde elde edilen peptidlerden ulaşılan tanımlanmış protein sayısının 2088, göç eden hücrelerde 2300 ile 2600 aralığında olduğu bu hücrelerin

fenotipik olarak da birbirinden farklı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, göç eden hücrelerde örneğe özgü eksprese edilen protein sayısı 231-358 aralığındayken, kontrol hücrede 161 tane olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1).

5.11. Fonksiyonel Zenginleştirme Analiz Yöntemleri ile İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde Heterogenisitenin Belirlenmesi

Fonksiyonel zenginleştirme analizi, büyük bir gen veya protein veri setinde fazlaca temsil edilen genlerin veya proteinlerin sınıflarını tanımlamak için uygun bir yöntemdir. Hastalık fenotipleriyle olası ilişkiye sahip proteinlerin belirlenmesinde kullanılabilir. Yöntem, önemli ölçüde zenginleştirilmiş veya tükenmiş gen gruplarını tanımlamak için istatistiksel yaklaşımları kullanır. Tez çalışmasına ilişkin elde edilen her bir örnekte tespit edilen farklı ifade edilen proteinlerde biyoinformatik yöntemler ile fonksiyonel zenginleştirme analizinin yapılması için ‘FunRich’ uygulaması ve DAVID, PANTHERA veri tabanlarına başvurulmuştur.

FunRich aracılığı ile COSMIC –Kanserdeki Somatik Mutasyonların Kataloğu verilerine karşı göç eden hücre örneklerinde farklı ifade edilen proteinlerin karşılaştırması sonrasında elde edilen her bir klonun birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Veri tabanında mevcut farklı kanser hastalıklarına ait somatik mutasyonlar ile karşılaştırma sonrasında göç eden altı hücre örneğinden sadece 12h.5(NA) klonu p değerine göre ($p < 0,001$) prostat kanseri hastalığına %68,63 oranında benzer bulundu (şekil 4.30). Tüm göç eden hücre klonları benzer şekilde, LNCaP hücre hattının NKX3.1 varlığı ve yokluğu durumunda inflamasyona belli sürelerde maruz bırakılması sonrasında elde edilmiş olmasına rağmen, bu hücrelerde ortaya çıkan değişikliklerin farklı yollarda olması klonların birbirlerinden de farklı olmak üzere değişime uğradığını, yani hücresel heterogenisiteyi göstermiştir.

Venn diyagramına göre tüm göç eden hücre örneklerinde ortak eksprese edilen 99 tane proteinin fonksiyonel zenginleştirme analizi için DAVID veri tabanı aracılığı ile yolak analizi yapılarak KEGG verilerine göre bu proteinlerin rol oynadığı üç sinyal yolu tespit edilmiştir. Üç sinyal yolundan ikisinin metabolizma ile ilişkili olması bu hücrelerde daha önce tespit edilen yüksek proliferasyon ile anlamlı bulunmaktadır. Üçüncü yolak splisozom yolağıdır.

Splisozom, intronların çıkarılmasını ve ekzonların birleştirilmesini içeren pre-mRNA'nın işlenmesiyle olgun mRNA'nın oluşturulmasında önemli bir ara basamağı oluşturmaktadır. mRNA işlenmesi, ökaryotik hücrelerde genetik temele dayalı doğru bir fenotipin oluşturulabilmesi için gereklidir. Ek olarak, alternatif ekleme genetik çeşitliliğe büyük katkı sağlar. Splisozom, yüz elliden fazla farklı protein içerir (ekleme faktörleri), yapısı ve bileşimi oldukça dinamiktir. Splisozom' un çekirdek bileşenleri U1, U2, U4, U5 ve U6 küçük nükleer ribonükleoprotein (snRNP) parçacıklarıdır. Her bir snRNP'nin küçük bir nükleer RNA (snRNA) içerdiği ve splisozomun snRNA'nın ilişkili proteinleri tarafından yönlendirilen katalitik bir rol oynayan ribozim olduğu düşünülmektedir. *In vitro* çalışmalar U1 snRNP'nin 5' ekleme bölgesi ile etkileşime girdiğini ve U2 snRNP'nin intronik dallanma noktası ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu U4/U6.U5 tri-snRNP kompleksinin oluşumu ara basamağı ile devam eder. U1 ve U4 snRNP'ler kararsız hale getirilir ve splisozom iki transesterifikasyon reaksiyonunu katalize eder. Dallanma noktasında 5' ekleme bölgesi ile bir adenosin arasında intronun kesilmesine neden olan bir bağ oluşturulurken bunu 5' ve 3' ekleme yerlerinin ligasyonu takip eder (Lee SC, Abdel-Wahab O, 2016). Son zamanlarda kanser tedavisinde splisozomları hedef olarak kullanmaya dair artan bir ilgi vardır. Splisozom, normal hücrelerdeki önemi nedeniyle şaşırtıcı bir terapötik hedef olarak görünebilir. Bununla birlikte, kanserler, diğer hücrelere göre splisozom inhibisyonuna karşı daha duyarlı olabilirler.

KEGG yolak analizi verilerinin doğruluğunu kanıtlamak için PANTHER veri tabanında biyolojik işlem analizi yapıldı ve metabolik süreç en yüksek aktive edilen süreç olarak belirlendi (şekil 4.32).

5.12. İnflamasyona Bağlı Göç Eden Hücrelerde Ortak Eksprese Edilen Proteinlerin Birbiri İle İlişkisinin Biyoinformatik Analizi

Protein-protein etkileşimleri (PPI'ler), hücre-hücre etkileşimleri, metabolik ve gelişimsel kontrol dahil olmak üzere birçok çeşitli biyolojik işlemleri içerir. Protein-protein etkileşimi sistem biyolojisinin temel hedeflerinden biri haline gelmektedir. Kalıntı yan zincirleri arasındaki kovalent olmayan bağlar, protein katlanması, protein montajı PPI için temel oluşturur. Bu bağlar, proteinler arasında çeşitli etkileşimleri ve ilişkileri uyarır. Zıt yapısal ve fonksiyonel özelliklerine bağlı olarak PPI'ler çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. Tipik olarak proteinler, işlevlerini yerine getirirken izole edilmiş türler gibi davranmazlar. Proteinlerin %80'den fazlasının tek başına çalışmadığı, ancak komplekslerde olduğu ortaya konmuştur (T. Berggård et al., 2007). Kimliği doğrulanmış proteinlerin analizi, aynı hücresel işlemlere katılan proteinlerin tekrar birbirleriyle etkileşime girdiğini ortaya koymaktadır.

Proteinler arasındaki ilişkinin önemini göz önünde bulundurarak, inflamasyona bağlı göç eden hücre örneklerinin tümünde ekspresyon kazanan ve baskılanan proteinlerin protein-protein etkileşim analizi STRING veri tabanı aracılığı ile gerçekleştirildi.

İnflamatuvar ortama maruz bırakılması sonrasında göç eden LNCaP hücre klonlarında ekspresyonu baskılanan proteinlerin çoğu apoptozu tetikleyen (ADAMTS-like protein 4), kromozomal stabiliteyi destekleyen, mayoz sırasında homologların doğru ve etkili bir şekilde eşleştirilmesini, hem homolog rekombinasyon hem de DNA tek ve çift zincirli kopmalarının onarımında rol oynayan (Fanconi anemia group D2 protein) ve daha fazla

transkripsyon faktörü ve onunla ilişkili proteinler, birçok kinazlar olduğu belirlendi. Çoklu etkileşim grafiğinde bu proteinler kırmızı renk ile işaretlenmiştir.

Dış stres sinyallerine ve DNA hasarına hücresel tepki, homeostaz, metabolizma ve hücre döngüsü ilerlemesi dahil olmak üzere çok sayıda hücresel işlemi düzenleyen ubiquitin ligazlarının (E3'ler) aktivitesine bağlıdır. Ubikitin ligazları (E3'ler) çeşitli mekanizmalarla kanserde deregülasyona uğrar, bu da hedef proteinlerinin ekspresyonu ve/veya aktivitesinde değişikliğe yol açar. Düzensiz E3'ler, malign transformasyonu, tümör ilerlemesini ve tedavi direncini yönlendiren kontrolsüz proliferasyona ve genomik instabiliteye katkıda bulunur. İnflamasyona bağlı ekspresyonu baskılanmış protein grupları arasında bulunan E3 ubiquitin ligazlar sarı renk ile ayrılmıştır. Onun dışında, histon metilsyonu ve transkripsyon ko-baskılayıcı ve aktive edici protein grupları belirlendi.

Çoklu etkileşimde olan dört: proteazomal, ribozomal, mitokondriyal membran solunum zinciri ve splisozom faktörü proteinleri grupları tespit edildi (şekil 4.34). Elde edilen veriler ve bir önceki fonksiyonel zenginleştirme analizi sonuçları, çalışılan hücre örneklerinde metabolizmanın baskın bir şekilde aşırı aktive olduğunu göstermektedir.

5.13. Göç Eden Hücrelerdeki Proteinlerin log₂ Değerine Göre Biyoportal Analizi

Tez çalışması sırasında elde edilen, inflamasyona bağlı göç eden hücre örneklerinin nanoLC-MS/MS cihazında protein profilinin tespit edilmesi sonrasında elde edilen total 4715 proteinden log₂ kat değişim kısaltması 1.5'e (kat değişim 2.8'e eşdeğer) göre anlamlı bulunan 1773 protein, bugüne kadar araştırması yapılan ve online ulaşımı sağlanabilen mutasyona uğramış gen

verileri ile karşılaştırmak üzere seçildi. Karşılaştırma işlemlerini gerçekleştirmek amacıyla birden fazla veri portalı kullanıldı.

‘cBioPortal’da yapılan analizde %89.4 oranında benzerlik bulundu. Kanser Genom Atlası (TCGA) portalında mevcut veriler prostat kanserinde yüksek öneme sahip olan 20 genden dört tanesi ile eşleşti (tablo 4.3). Eşleşmiş proteinler: lamin B2, RAS onkojen aile üyesi RAN, RNA bağlayıcı 8A motif proteini ve 330 çinko parmak proteini.

Laminler, nükleer lamina olarak bilinen iskele oluşturan ara filament proteinleridir. Laminler, normal gen transkripsiyonu ve susturması, DNA replikasyonu ve onarımı, nükleer gözenek komplekslerinin konumlandırılması, kromatinin yeniden şekillenmesi ve bölünme sırasında nükleer zarfların parçalanması ve yeniden birleştirilmesi için gerekli olan genomun organizasyonunu düzenlemektedirler. Lamin mutasyonları ayrıca artan DNA hasarı ile ilişkilidir. Karşılık gelen lamin B2 genindeki (LMNB2) mutasyonlar, bilateral olarak simetrik bir şekilde ilerleyen subkutan yağ kaybıyla karakterize edilen nadir bir hastalık olan kazanılmış kısmi lipodistrofinin gelişmesine yatkınlıkla oluşturabilir. Ran, RNA ve proteinlerin nükleer gözenek kompleksi boyunca translokasyonu için gerekli olan küçük bir G proteini. Ran proteini ayrıca DNA sentezinin ve hücre döngüsü ilerlemesinin kontrolüne de dahil edilmiştir, çünkü Ran'daki mutasyonların DNA sentezini bozduğu tespit edilmiştir. RNA bağlayıcı 8A motif proteini spliceosome bileşeni olarak mRNA eklenmesi için gereklidir. 330 çinko parmak proteini ise (diğer adı ile nükleolar sistein açısından zengin protein) çoğunlukla nükleolusta ifade edilir, mitozda sentromerler ile ilişkili ve sitokinezde ortada yoğunlaşmıştır. Sayılan bu proteinlerin veri portalındaki değişen gen listesi ile eşleşmesi ve fonksiyonel olarak yukarıda yapılan analiz sonuçları ile örtüşmesi, tanımlanmış proteinlerin teknik doğruluğunu ve prostat kanseriyle ilgisini sağlaması olarak verileri desteklemektedir.

5.14. Perseus Yazılımı Kullanarak Göç Eden Hücre Örneklerine Ait Proteomik Verilerinin Çoklu Analizi

Perseus yazılım platformu, biyolojik ve biyomedikal araştırmacılara proteinlerin ölçümü, etkileşimi ve post-translasyonel modifikasyon verilerini yorumlamada yardımcı olmaktadır.

Log2' değerine göre anlamlı bulunan 1773 protein Perseus platformuna yüklendi ve proteinlerin doğruluğunu bir kez daha kontrol etmek ve olası yanlışlardan kurtulmak için veriler filtrelendi. Binlerce proteinin diferansiyel ekspresyonunun test edilmesi, çoklu hipotez test sorunları tarafından engellenebilir. Bu durum ekspresyonda ciddi bir fark olmadığı halde, bir proteinin önemli bir isabet (hit) olarak adlandırılması olasılığının artmasına düzeltme yöntemlerinin kullanılması gerekmektedir. Uygun düzeltme yönteminin seçimi, bir deneycinin kabul etmek istediği yanlış kabul edilen isabetler ve yanlış reddedilen isabetler arasındaki dengeye bağlıdır. Buna durum göz önüne alınarak yapılan analizlerde sisteme yüklenen proteinlerin geçerlilik değeri en az %70 ve üzeri olacak şekilde filtrelenmiştir. Şekil 4.37'deki histogramda turuncu ile işaretlenmiş protein grupları değeri %70'tan düşük olan proteinleri temsil eder. Bundan sonraki yapılan analizlerde bu gruptaki veriler dışlanmıştır.

Hiyerarşik kümeleme metodolojisi, proteomik verilerin ilk keşfi için güçlü bir veri yaklaşımıdır. Numunelerin veya proteinlerin ekspresyon profillerine göre kör olarak gruplandırılmasını sağlar. Bununla birlikte, kümeleme sonuçları veri ön işleme, profiller arası benzerlik ölçümü ve dendrogram yapım prosedürü gibi parametrelere bağlıdır. Perseus'da yapılan ısı haritasının hiyerarşik kümeleme analizi genel bir bakışla kontrol hücrelerinde düşük ekspresyon seviyesine sahip olan proteinlerin göç eden hücre örneklerinde yukarı seviyede ekspresyona sahip olduklarını göstermektedir.

Temel bileşen analizi (PCA), kantitatif proteomik sonuçlardaki kopyalar ve koşullar arasındaki altta yatan farkları araştırmanın bir yoludur. İki boyutlu bir dağılım grafiğindeki ilk iki ana bileşene bakmak genellikle en yararlı olanıdır. PCA biplotları, kopyaların çoğaltılabilir olup olmadığını ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında farklılık gösterip göstermediğini gösterir. Göç eden hücre örnekleri ile yapılan PCA analizi protein içeriğine göre bu hücrelerin birbirine ne kadar yakın yada farklı olduğunu belirlemiş olur. Şekil 4.38’de gösterilen PCA sonucu 12h.(2)² hücre klonlarının kontrol örneğine karşı en uzak bölgede yer aldığını göstermiştir. Bu daha önce yapılan hiyerarşik kümeleme sonuçları ile örtüşmektedir. Aynı zamanda, tüm görüntü, inflamasyon zamanı ve NKX3.1’in var ya da yokluğuna bağlı olarak, tek bir hücre hattından farklılaşan hücre klonlarının farklı yönlerde değişimlere uğrayabildiklerini göstermektedir.

Dağılım Analizi (scatter plot), iki veri setindeki ilişkiyi karşılaştırmak gerektiğinde kullanılır. Dağılım grafikleri, ilişkiyi görselleştirmenin bir yoludur; veri noktalarını çizerek, grafik üzerinde noktalara saçılma elde edilir. Analiz, eğer varsa ne tür ilişkinin olduğunu ve bu kalıbın ne anlama geldiğini gösterir. Dağılım diyagramları, iki tür veri arasındaki “sebe-sonuç” ilişkisini göstermek ve bir süreci anlamak, hakkında daha faydalı bilgiler sağlamak için kullanılır.

Perseus yazılım platformu kullanarak yapılan çoklu dağılım analizinde (şekil 4.39) kontrol dahil olmak üzere göç eden hücre örnekleri birbiri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen çoklu dağılım grafiğinde her bir nokta bir proteini temsil etmektedir. Perseus’un sağladığı imkanlara göre normal dağılımın dışına sıçrayan proteinlerin diğer örneklerde hangi bölgelerde yer aldığını incelemek mümkün olabilmektedir. Buna göre, Q13885 ve Q8N257 proteinleri farklı saçılım (scatter plot) analizinde farklı bölgede yer almaktadır. Uniprot veri tabanında Q13885 olarak işaretlenmiş olan tubulin beta-2A zinciri proteininin fonksiyonu hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. Q8N257 diğer adı ile histon H2B tip 3-B proteinini göstermektedir. Araştırmalarda histon

H2B hakkında yeterince veri olmasına rağmen tip3-B histon h2B hakkında yeterince bilgi bulunmamaktadır. Çoklu dağılım analizine bağılı olarak elde edilen Pearson korelasyon verileri hücre örneklerinin pozitif ilişkide olduğunu göstermektedir.



6. SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında inflamatuvar mikroçevrenin prostat kanseri metastazı üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Buna bağlı olarak, prostat gelişiminde önemli etkisi olan ve prostat bezindeki pro-inflamatuvar etkiyi azaltan NKX3.1 geni ekspresyonuna sahip ve mutant LNCaP hücreleri üzerinde yapılan CM uygulamaları sonrasında elde edilen invazif özelliğe sahip hücre klonları ile çalışmalar yapıldı. Yapılan çalışmada *in vitro* prostatik inflamasyon modeli aracılığı ile yapılan migrasyon deneyinde göç eden hücreler ilk defa klon olarak büyütüldü ve klonlarının proteomik analizi gerçekleştirildi.

Göç eden hücrelerin hücre morfolojisi, apoptoz, proliferasyon ve invazyon/metastaz yollarındaki değişimleri araştırıldı. LNCaP hücrelerinin inflamatuvar ortam ile beslenmesi sonrasında invazif özelliklere sahip oldukları, elde edilen klonlarda E-kaderin, AR ve NKX3.1 proteinlerinin doz ve süreye bağımlı olarak proteozomal degradasyona uğradığı hem de vimentin ekspresyonunun kazanıldığı belirlendi. Aynı zamanda, seçilmiş klonlar kontrol örneklerine kıyasla yüksek proliferatif özelliklere sahip olmuştur.

Belli bir doz ve sürede inflamatuvar ortam ile beslenen LNCaP hücrelerinden elde edilen klonların birbirinden farklı olması kanser hücrelerindeki heterogenisiteyi göstermektedir ve akut inflamasyona maruz kalma süresinin hücre “kaderi”ni belirlemede önemli rol oynadığını göstermektedir. 12 saat CM uygulaması sonrasında göç eden hücre klonlarında kısa bir süre için N-kaderin ekspresyonu kazanımı ve daha sonra tekrar kaybolması bu hücrelerin EMT-MET geçirdiğinin belirtisi olarak kabul edilmektedir. 6 saat CM uygulamasının ardından göç eden hücre klonlarında vimentinin baskın olarak ifade edilmesi bu hücrelerin EMT evresinde olduğunu gösterdi.

Vimentin ekspresyonuna sahip hücre klonlarında inflamasyona bağı ekspresyonu baskılanan NKX3.1'in zaman içerisinde tekrar kazanılması bu hücrelerin kastrasyon dirençli NKX3.1 ifade eden prostat kanseri (Castration Resistant NKX3.1 expressing prostate cancer-CARN) ile benzer özellikte olabildiğini gösterdi. Aynı zamanda, inflamasyona bağı göç eden, NKX3.1 mutant LNCaP hücrelerinden elde edilen hücre klonlarında, zaman içerisinde NKX3.1 ifadesi geri kazanılmış hücre klonlarına göre invazif/ migrasyon ve proliferasyon özelliklerinin daha baskın olduğu belirlendi.

İnflamasyona bağı göç eden hücre klonlarında farklı ifade edilen proteinler ve ekspresyonu baskılanan proteinleri belirlemek için yapılan protein profillemeye analizi, hücrede DNA hasarının giderilmesi, apoptozun tetiklenmesi ve hücre döngüsünde öneme sahip olan transkripsiyon faktörleri ve diğere önemli proteinlerinin tüm göç eden hücre klonlarında baskılandığını gösterdi.

Farklı veritabanları kullanılarak yapılan biyoinformatik analizler sonrasında, göç eden hücre klonlarında metabolik yolak ve splisozom proteinlerinin aşırı ifade edildiği gösterildi.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında inflamasyona bağı prostat kanseri progresyonunun derin proteomik analizi gerçekleştirildi. İnflamasyona bağı NKX3.1 proteini fonksiyon kaybının, bazı hücre örneklerinde geri kazanıldığı *in vitro* verileri aracılığıyla pekiştirildi. Proteomik analizde farklı ifade edilen proteinlerin kansere bağı sinyal yollarına ve biyolojik fonksiyonlara dahil edilmesi, etkileşimli ağlarının anlaşılmasına ve potansiyel tümör biyolojik belirteçlerinin tanımlanmasına katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Pienta KJ, Abate-Shen C, Agus DB, Attar RM, Chung LW, Greenberg NM, et al. The current state of preclinical prostate cancer animal models. *Prostate* 2008;68(6):629–639. DOI: 10.1002/pros.20726.
- Božo Krušlin, Monika Ulamec, Davor Tomas. Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. *BOSNIAN JOURNAL OF BASIC MEDICAL SCIENCES*. 2015; DOI: <http://dx.doi.org/10.17305/bjbms.2015.449>
- Condon MS. The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Semin Cancer Bio* 2005;15(2):132-137. DOI: 10.1016/j.semcancer.2004.08.002.
- Berry PA, Maitland NJ, Collins AT. Androgen receptor signaling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 2008;288(1-2):30–37. DOI: 10.1016/j.mce.2008.02.024.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2016. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J. Clin.* 66, 7–30
- Ekman, P.G.H., Matsuyama, H., Kivineva, M., Bergerheim, U.S., Li, C., 1999. Links between genetic and environmental factors and prostate cancer risk. *Prostate* 39, 262–268
- Juncheng Wei, Ding Ma et.al. Overexpression of Vimentin Contributes to Prostate Cancer Invasion and Metastasis via Src Regulation. *ANTICANCER RESEARCH* 28: 327-334 (2008)
- Boyd LK, Mao X, Lu YJ. The complexity of prostate cancer: Genomic alterations and heterogeneity. *Nat Rev Urol* 2012;9: 652–664
- Robinson D, van Allen EM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 2015;161:1215–1228.

- Beebe-Dimmer JL, Isaacs WB, Zuhlke KA, Yee C, Walsh PC, Isaacs SD, Johnson AM, Ewing CE, Humphreys EB, Chowdhury WH, Montie JE, Cooney KA. Prevalence of the HOXB13 G84E prostate cancer risk allele in men treated with radical prostatectomy. *BJU Int* 2014;113:830–835.
- Wasserman NF, Aneas I, Nobrega MA. An 8q24 gene desert variant associated with prostate cancer risk confers differential in vivo activity to a MYC enhancer. *Genome Res* 2010;20:1191–1197.
- Meeker AK, Hicks JL, Platz EA, March GE, Bennett CJ, Delannoy MJ, de Marzo AM. Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 2002;62:6405–6409.
- Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Isaacs WB, Nelson WG. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11733–11737.
- Haggman MJ, Wojno KJ, Pearsall CP, Macoska JA. Allelic loss of 8p sequences in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Urology* 1997;50:643–647.
- Gurel B, Ali TZ, Montgomery EA, Begum S, Hicks J, Goggins M, Eberhart CG, Clark DP, Bieberich CJ, Epstein JI, de Marzo AM. NKX3.1 as a marker of prostatic origin in metastatic tumors. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1097–1105.
- He WW, Sciavolino PJ, Wing J, Augustus M, Hudson P, Meissner PS, Curtis RT, Shell BK, Bostwick DG, Tindall DJ, Gelmann EP, Abate-Shen C, Carter KC. A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. *Genomics* 1997;43:69–77.

- Bieberich CJ, Fujita K, He WW, Jay G. Prostate-specific and androgen-dependent expression of a novel homeobox gene. *J Biol Chem* 1996;271:31779–31782.
- Bethel CR, Faith D, Li X, Guan B, Hicks JL, Lan F, Jenkins RB, Bieberich CJ, de Marzo AM. Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: Association with gleason score and chromosome 8p deletion. *Cancer Res* 2006;66:10683–10690.
- Abdulkadir SA, Magee JA, Peters TJ, Kaleem Z, Naughton CK, Humphrey PA, Milbrandt J. Conditional loss of Nkx3.1 in adult mice induces prostatic intraepithelial neoplasia. *Mol Cell Biol* 2002;22:1495–1503.
- Tan PY, Chang CW, Chng KR, Wansa KD, Sung WK, Cheung E. Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival. *Mol Cell Biol* 2012;32: 399–414.
- Abate-Shen C, Shen MM, Gelmann E. Integrating differentiation and cancer: The Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Differentiation* 2008;76:717–727.
- Wang X, Kruithof-de JM, Economides KD, Walker D, Yu H, Halili MV, Hu YP, Price SM, Abate-Shen C, Shen MM. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature* 2009;461:495–500.
- Thomas MA, Preece DM, Bentel JM. Androgen regulation of the prostatic tumour suppressor NKX3.1 is mediated by its 3' untranslated region. *Biochem J* 2010;425:575–583.
- Preece DM, Harvey JM, Bentel JM, Thomas MA. ETS1 regulates NKX3.1 5' promoter activity and expression in prostate cancer cells. *Prostate* 2011;71:403–414.

- Kruithof-de JM, Shibata M, Desai N, Reynon M, Halili MV, Hu YP, Price SM, Abate-Shen C, Shen MM. Canonical Wnt signaling regulates Nkx3.1 expression and luminal epithelial differentiation during prostate organogenesis. *Dev Dyn* 2013;242:1160–1171.
- Zhang HN, Yu CX, Zhang PJ, Chen WW, Jiang AL, Kong F, Deng JT, Zhang JY, Young CY. Curcumin downregulates homeobox gene NKX3.1 in prostate cancer cell LNCaP. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:423–430.
- Li X, Guan B, Maghami S, Bieberich CJ. NKX3.1 is regulated by protein kinase CK2 in prostate tumor cells. *Mol Cell Biol* 2006;26:3008–3017.
- Padmanabhan A, Gosc EB, Bieberich CJ. Stabilization of the prostate-specific tumor suppressor NKX3.1 by the oncogenic protein kinase Pim-1 in prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 2013;114:1050–1057.
- Markowski MC, Bowen C, Gelmann EP. Inflammatory cytokines induce phosphorylation and ubiquitination of prostate suppressor protein NKX3.1. *Cancer Res* 2008;68:6896–6901.
- Song LN, Silva J, Koller A, Rosenthal A, Chen EI, Gelmann EP. The tumor suppressor NKX3.1 is targeted for degradation by DYRK1B kinase. *Mol Cancer Res* 2015;13:913–922.
- Sfanos KS, De Marzo AM. Prostate cancer and inflammation: The evidence. *Histopathology* 2012;60:199–215.
- Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* 2014;149:185.
- Bowen C, Zheng T, Gelmann EP. NKX3.1 suppresses TMPRSS2- ERG gene rearrangement and mediates repair of androgen receptor-induced DNA damage. *Cancer Res* 2015;75:2686–2698.

- Bowen C, Ju JH, Lee JH, Paull TT, Gelmann EP. Functional activation of ATM by the prostate cancer suppressor NKX3.1. *Cell Rep* 2013;4:516–529.
- Erbaykent-Tepedelen B, Ozmen B, Varisli L, Gonen-Korkmaz C, Debelec-Butuner B, Muhammed Syed H, Yilmazer-Cakmak O, Korkmaz KS. NKX3.1 contributes to S phase entry and regulates DNA damage response (DDR) in prostate cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;414:123–128.
- Thangapazham R, Saenz F, Katta S, Mohamed AA, Tan SH, Petrovics G, Srivastava S, Dobi A. Loss of the NKX3.1 tumorsuppressor promotes the TMPRSS2-ERG fusion gene expression in prostate cancer. *BMC Cancer* 2014;14:16.
- Ju JH, Maeng JS, Lee DY, Piszczek G, Gelmann EP, Gruschus JM. Interactions of the acidic domain and SRF interacting motifs with the NKX3.1 homeodomain. *Biochemistry* 2009;48:10601– 10607.
- Rao V, Guan B, Mutton LN, Bieberich CJ. Proline-mediated proteasomal degradation of the prostate-specific tumor suppressor N KX3.1. *J Biol Chem* 2012;287:36331–36340.
- Gajewski T. F. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment / T. F. Gajewski, H. Schreiber, Y. X. Fu // *Nat. Immunol.*— 2013.— № 14 (10).—P. 1014–1022.
- Dennis LK, Lynch CF, Torner JC. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology* 2002;60:78-83.
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7:256-69.
- Timothy Stark, Lydia Livas, Natasha Kyprianou. Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting. 2223-4683.2015.

- Horbinski C, Mojesky C, Kyprianou N. Live free or die: tales of homeless (cells) in cancer. *Am J Pathol* 2010;177:1044-52.
- Cunha GR, Hayward SW, Wang YZ, et al. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer* 2003;107:1-10.
- Barron DA, Rowley DR. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer* 2012;19:R187-204.
- Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:555-62.
- R. Medzhitov, "Origin and physiological roles of inflammation," *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 428–435, 2008.
- D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- B. F. Zamarron and W. Chen, "Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 7, no. 5, pp. 651–658, 2011.
- C. Popa, M. G. Netea, P. L. C. M. Van Riel, J. W. M. Van Der Meer, and A. F. H. Stalenhoef, "The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk," *Journal of Lipid Research*, vol. 48, no. 4, pp. 751–762, 2007.
- P. Szlosarek, K. A. Charles, and F. R. Balkwill, "Tumour necrosis factor- α as a tumour promoter," *European Journal of Cancer*, vol. 42, no. 6, pp. 745–750, 2006.
- G. Chen and D. V. Goeddel, "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway," *Science*, vol. 296, no. 5573, pp. 1634–1635, 2002.

- B. Wiemann and C. O. Starnes, “Coley’s toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective,” *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 64, no. 3, pp. 529–564, 1994.
- F. Balkwill, “TNF- α in promotion and progression of cancer,” *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 25, no. 3, pp. 409–416, 2006.
- S. P. Hussain, L. J. Hofseth, and C. C. Harris, “Radical causes of cancer,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 4, pp. 276–285, 2003.
- J. Kwong, L. C. Franky, K.-K. Wong et al., “Inflammatory cytokine tumor necrosis factor α confers precancerous phenotype in an organoid model of normal human ovarian surface epithelial cells,” *Neoplasia*, vol. 11, no. 6, pp. 529–541, 2009.
- D. R. Hodge, E. M. Hurt, and W. L. Farrar, “The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer,” *European Journal of Cancer*, vol. 41, no. 16, pp. 2502–2512, 2005.
- J. A. Gasche, J. Hoffmann, C. R. Boland, and A. Goel, “Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells,” *International Journal of Cancer*, vol. 129, no. 5, pp. 1053–1063, 2011.
- H. Kinoshita, Y. Hirata, H. Nakagawa et al., “Interleukin-6 mediates epithelial-stromal interactions and promotes gastric tumorigenesis,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 4, Article ID e60914, 2013.
- S.-Y. Kim, J. W. Kang, X. Song et al., “Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells,” *Cell Signaling*, vol. 25, no. 4, pp. 961–969, 2013.
- J. F. Santibañez, M. Quintanilla, and C. Bernabeu, “TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions,” *Clinical Science*, vol. 121, no. 6, pp. 233–251, 2011.

- J. Massagué, “TGFβ in cancer,” *Cell*, vol. 134, no. 2, pp. 215–230, 2008.
- K. Matsuzaki, “Smad phospho-isoforms direct contextdependent TGF-β signaling,” *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 24, no. 4, pp. 385–399, 2013.
- C. D. Morrison, J. G. Parvani, and W. P. Schiemann, “The relevance of the TGF-β Paradox to EMT-MET programs,” *Cancer Letters*, vol. 341, no. 1, pp. 30–40, 2013.
- G. Guasch, M. Schober, H. A. Pasolli, E. B. Conn, L. Polak, and E. Fuchs, “Loss of TGFβ signaling destabilizes homeostasis and promotes squamous cell carcinomas in stratified epithelia,” *Cancer Cell*, vol. 12, no. 4, pp. 313–327, 2007.
- E. C. Connolly, J. Freimuth, and R. J. Akhurst, “Complexities of TGF-β targeted cancer therapy,” *International Journal of Biological Sciences*, vol. 8, no. 7, pp. 964–978, 2012.
- R. Sabat, G. Grütz, K. Warszawska et al., “Biology of interleukin-10,” *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 21, no. 5, pp. 331–344, 2010.
- N. L. Costa, M. C. Valadares, P. P. C. Souza et al., “Tumorassociated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma,” *Oral Oncology*, vol. 49, no. 3, pp. 216–223, 2013.
- D. S. Finbloom and K. D. Winestock, “IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1α and STAT3 complexes in human T cells and monocytes,” *Journal of Immunology*, vol. 155, no. 3, pp. 1079–1090, 1995.
- A. J. G. Schottelius, M. W. Mayo, R. Balfour Sartor, and A. S. Baldwin Jr., “Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of κB kinase activity and

nuclear factor κ B DNA binding,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 45, pp. 31868–31874, 1999.

- N. Kundu and A. M. Fulton, “Interleukin-10 inhibits tumor metastasis, downregulates MHC class I, and enhances NK lysis,” *Cellular Immunology*, vol. 180, no. 1, pp. 55–61, 1997.

- H. Hamidullah, B. Changkija, and R. Konwar, “Role of interleukin-10 in breast cancer,” *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 133, no. 1, pp. 11–21, 2012.

- D. A. Braun, M. Fribourg, and S. C. Sealfon, “Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 5, pp. 2986–2993, 2013.

- G. Zhu, Q. Du, X. Wang et al., “TNF- α promotes gallbladder cancer cell growth and invasion through autocrine mechanisms,” *International Journal of Molecular Medicine*, 2014.

- Q. Tang, J. Li, H. Zhu et al., “Hmgb1-IL-23-IL-17-IL-6-Stat3 axis promotes tumor growth in murine models of melanoma,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2013, Article ID 713859, 13 pages, 2013.

- T. Zheng, X. Hong, and J. Wang, “Gankyrin promotes tumor growth and metastasis through activation of IL-6/STAT3 signaling in human cholangiocarcinoma,” *Hepatology*, vol. 59, no. 3, pp. 935–946, 2014.

- Hulpiao P, Redies CM (2009) Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* 41:349–369

- Tanaka H, Shan W, Phillips GR, Arndt K, Bozdagi O, Shapiro L, Huntley GW, Benson DL, Colman DR (2000) Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. *Neuron* 25(1):93–107

- Takeichi M (1990) Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 59:237–252
- Falagas ME, Zarkadoulia E a, Ioannidou EN, George P, Christos C, Rafailidis PI (2007) P-cadherin expression in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res* 9(5):214
- Rezaei M, Katrin F, Ben W, Aleksandar K, Antje K-t (2012) Interplay between neuralcadherin and vascular endothelial-cadherin in breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 14(6):R154
- Rubina K, Talovskaya E, Cherenkov V, Ivanov D, Stambolsky D, Storozhevyykh T (2005) LDL induces intracellular signalling and cell migration via atypical LDL-binding protein T-cadherin. *Mol Cell Biochem* 273(1–2):33–41
- Takuji T, Masatoshi T (2005) New insights into fat cadherins. *J Cell Sci* 118(11):2347–2353
- Yu J, Cheng YY, Tao Q, Cheung KF, Lam CN, Geng H, Tian L-W, Wong YP, Tong JH, Ying J-M, Jin H, To KF, Chan F-c K, Sung JJ (2009) Methylation of protocadherin 10, a novel tumor suppressor, is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer. *Gastroenterology* 136(2):640–651.e1
- Courjean O, Guillaume C, Emilie P, Anne M, Sarah S, Noelle P, Jurgen E, van Dorsselaer A, Hel'ene F (2008) Modulation of E-cadherin monomer folding by cooperative binding of calcium ions. *Biochemistry* 47(8):2339–2349
- Nose A, Tsuji K, Takeichi M (1990) Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 61:147–155
- Katsamba P, Carroll K, Ahlsen G, Bahna F, Vendome J, Posy S, Rajebhosale M, Price S, Jessell TM, Ben-Shaul A, Shapiro L, Honig BH

(2009) Linking molecular affinity and cellular specificity in cadherin-mediated adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(28):11594–11599

- Ratheesh A, Yap AS (2012) A bigger picture: classical cadherins and the dynamic actin cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:673–679

- Lee M-h, Piyush K, Jun Q, Andreadis ST (2009) JNK phosphorylates β -catenin and regulates adherens junctions. *FASEB J* 09(0023):3874–3883

- Davis M a, Ireton RC, Reynolds AB (2003) A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* 163(3):525–534

- Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS (2008) Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 27:6920–6929

- Oikawa T, Atsuko N, Nobuyuki O (2013) Acquired expression of NFATc1 downregulates E-cadherin and promotes cancer cell invasion. *Cancer Res* 73:5100–5109

- Tripathi V, Popescu NC, Zimonjic DB (2014) DLC1 induces expression of E-cadherin in prostate cancer cells through Rho pathway and suppresses invasion. *Oncogene* 33(6):724–733

- Heuberger J, Walter B (2010) Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(2):a002915

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

- Kumar S, Alakesh D, Shamik S (2014) Extracellular matrix density promotes EMT by weakening cell-cell adhesion. *Mol Biosyst* 10(4):838–850

- Liu WF, Nelson CM, Pirone DM, Chen CS (2006) E-cadherin engagement stimulates proliferation via Rac1. *J Cell Biol* 173(3):431–441

- Tiwari N, Gheldof A, Tatari M, Christofori G (2012) EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin Cancer Biol* 22(3):194–207
- Hirohashi S (1998) Inactivation of the E-cadherin-mediated cell. *Am J Pathol* 153(2):333–339
- Kotb AM, Hierholzer A, Kemler R (2011) Replacement of E-cadherin by n-cadherin in the mammary gland leads to fibrocystic changes and tumor formation. *Breast Cancer Res* 13:R104
- Springer Science+Business Media Dordrecht 2015 M. Kandouz (ed.), *Intercellular Communication in Cancer*, DOI 10.1007/978-94-017-7380-5_5
- Carter V, Shenton BK, Jaques B, Turner D, Talbot D, Gupta A, Chapman CE et al (2005) Vimentin antibodies: a non-HLA antibody as a potential risk factor in renal transplantation. *Transplant Proc* 37:654–657
- Thiery JP (2002) Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2:442–454
- Goldie KN, Wedig T, Mitra AK, Aebi U, Herrmann H, Hoenger A (2007) Dissecting the 3D structure of vimentin intermediate filaments by cryo-electron tomography. *J Struct Biol* 158:378–385
- Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli AV, Harmala-Brasken AS, Hellman J, Chou YH, Goldman RD (2004) Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci* 117:919–932
- Goto H, Tanabe K, Manser E, Lim L, Yasui Y, Inagaki M (2002) Phosphorylation and reorganization of vimentin by p21-activated kinase (PAK). *Genes Cells* 7:91–97

- Goto H, Yasui Y, Kawajiri A, Nigg EA, Terada Y, Tatsuka M, Nagata K et al (2003) Aurora-B regulates the cleavage furrowspecific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem* 278:8526–8530
- Turowski P, Myles T, Hemmings BA, Fernandez A, Lamb NJ (1999) Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55. *Mol Biol Cell* 10:1997–2015
- van Venrooij WJ, Pruijn GJ (2000) Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2:249–251
- Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A, van Mansum MA, Dieteren C, de Rooij DJ, Barrera P et al (2004) Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* 63:373–381
- Farach AM, Galileo DS (2008) O-GlcNAc modification of radial glial vimentin filaments in the developing chick brain. *Brain Cell Biol* 36:191–202
- Liming Wang JZ, Banerjee Sipra, Barnes Laura, Sajja Venkateswara, Liu Yiding, Guo Baochuan, Yuping Du, Agarwal MukeshK, Wald DavidN, Wang Qin, Yang Jinbo (2010) Sumoylation of vimentin³⁵⁴ is associated with PIAS3 inhibition of Glioma cell migration. *Oncotarget* 1:620–627
- Rittling SR, Baserga R (1987) Functional analysis and growth factor regulation of the human vimentin promoter. *Mol Cell Biol* 7:3908–3915
- Zhang X, Diab IH, Zehner ZE (2003) ZBP-89 represses vimentin gene transcription by interacting with the transcriptional activator, Sp1. *Nucleic Acids Res* 31:2900–2914

- Gilles C, Polette M, Mestdagt M, Nawrocki-Raby B, Ruggeri P, Birembaut P, Foidart JM (2003) Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res* 63:2658–2664
- Min C, Eddy SF, Sherr DH, Sonenshein GE (2008) NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *J Cell Biochem* 104:733–744
- Wu Y, Zhang X, Salmon M, Lin X, Zehner ZE (2007) TGFbeta1 regulation of vimentin gene expression during differentiation of the C2C12 skeletal myogenic cell line requires Smads, AP-1 and Sp1 family members. *Biochim Biophys Acta* 1773:427–439
- Shirahata A, Sakata M, Sakuraba K, Goto T, Mizukami H, Saito M, Ishibashi K et al (2009) Vimentin methylation as a marker for advanced colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 29:279–281
- Wu Y, Zhang X, Salmon M, Zehner ZE (2007) The zinc finger repressor, ZBP-89, recruits histone deacetylase 1 to repress vimentin gene expression. *Genes Cells* 12:905–918
- Phua DC, Humbert PO, Hunziker W (2009) Vimentin regulates scribble activity by protecting it from proteasomal degradation. *Mol Biol Cell* 20:2841–2855
- Perlson E, Michaelevski I, Kowalsman N, Ben-Yaakov K, Shaked M, Seger R, Eisenstein M et al (2006) Vimentin binding to phosphorylated Erk sterically hinders enzymatic dephosphorylation of the kinase. *J Mol Biol* 364:938–944
- Zhu QS, Rosenblatt K, Huang KL, Lahat G, Brobey R, Bolshakov S, Nguyen T et al (2011) Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion. *Oncogene* 30:457–470

- Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi JP, Nevo J, Gjerdrum C, Tiron C et al (2011) Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene* 30(12):1436–1448
- Barberis L, Pasquali C, Bertschy-Meier D, Cuccurullo A, Costa C, Ambrogio C, Vilbois F et al (2009) Leukocyte transmigration is modulated by chemokine-mediated PI3Kgamma-dependent phosphorylation of vimentin. *Eur J Immunol* 39:1136–1146
- Zhao Y, Yan Q, Long X, Chen X, Wang Y (2008) Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochem Funct* 26:571–577
- Singh S, Sadacharan S, Su S, Beldegrun A, Persad S, Singh G (2003) Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer. *Cancer Res* 63:2306–2311
- Zhang X, Fournier MV, Ware JL, Bissell MJ, Yacoub A, Zehner ZE (2009) Inhibition of vimentin or beta1 integrin reverts morphology of prostate tumor cells grown in laminin-rich extracellular matrix gels and reduces tumor growth in vivo. *Mol Cancer Ther* 8:499–508
- Hafeez BB, Zhong W, Weichert J, Dreckschmidt NE, Jamal MS, Verma AK (2011) Genetic ablation of PKC epsilon inhibits prostate cancer development and metastasis in transgenic mouse model of prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 71:2318–2327
- U-Ging Lo, Cheng-Fan Lee, Ming-Shyue Lee and Jer-Tsong Hsieh (2017) The Role and Mechanism of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Progression. doi:10.3390/ijms18102079
- Lee, J.M.; Dedhar, S.; Kalluri, R.; Thompson, E.W. The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* 2006, 172, 973–981

- Fan, L.; Wang, H.; Xia, X.; Rao, Y.; Ma, X.; Ma, D.; Wu, P.; Chen, G. Loss of e-cadherin promotes prostate cancer metastasis via upregulation of metastasis-associated gene 1 expression. *Oncol. Lett.* 2012, 4, 1225–1233.
- Chen, C.L.; Mahalingam, D.; Osmulski, P.; Jadhav, R.R.; Wang, C.M.; Leach, R.J.; Chang, T.C.; Weitman, S.D.; Kumar, A.P.; Sun, L.; et al. Single-cell analysis of circulating tumor cells identifies cumulative expression patterns of emt-related genes in metastatic prostate cancer. *Prostate* 2013, 73, 813–826
- Wellner, U.; Schubert, J.; Burk, U.C.; Schmalhofer, O.; Zhu, F.; Sonntag, A.; Waldvogel, B.; Vannier, C.; Darling, D.; zur Hausen, A.; et al. The emt-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat. Cell Biol.* 2009, 11, 1487–1495.
- Wang, M.; Ren, D.; Guo, W.; Huang, S.; Wang, Z.; Li, Q.; Du, H.; Song, L.; Peng, X. N-cadherin promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like traits via erbb signaling in prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2016, 48, 595–606.
- Tam, K.J.; Hui, D.H.F.; Lee, W.W.; Dong, M.; Tombe, T.; Jiao, I.Z.F.; Khosravi, S.; Takeuchi, A.; Peacock, J.W.; Ivanova, L.; et al. Semaphorin 3 c drives epithelial-to-mesenchymal transition, invasiveness, and stem-like characteristics in prostate cells. *Sci. Rep.* 2017, 7, 11501.
- Yu, S.H.; Zheng, Q.; Esopi, D.; Macgregor-Das, A.; Luo, J.; Antonarakis, E.S.; Drake, C.G.; Vessella, R.; Morrissey, C.; De Marzo, A.M.; et al. A paracrine role for il6 in prostate cancer patients: Lack of production by primary or metastatic tumor cells. *Cancer Immunol. Res.* 2015, 3, 1175–1184.
- Chen, X.H.; Liu, Z.C.; Zhang, G.; Wei, W.; Wang, X.X.; Wang, H.; Ke, H.P.; Zhang, F.; Wang, H.S.; Cai, S.H.; et al. Tgf-beta and egf induced hla-i downregulation is associated with epithelial-mesenchymal transition

(EMT) through upregulation of snail in prostate cancer cells. *Mol. Immunol.* 2015, 65, 34–42.

- Yao, B.; Zhao, J.; Li, Y.; Li, H.; Hu, Z.; Pan, P.; Zhang, Y.; Du, E.; Liu, R.; Xu, Y. ELF5 inhibits TGF-beta-driven epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer by repressing SMAD3 activation. *Prostate* 2015, 75, 872–882.

- Hu, Q.; Tong, S.; Zhao, X.; Ding, W.; Gou, Y.; Xu, K.; Sun, C.; Xia, G. Periostin mediates tgf-beta-induced epithelial mesenchymal transition in prostate cancer cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 2015, 36, 799–809.

- Nguyen, D.P.; Li, J.; Tewari, A.K. Inflammation and prostate cancer: The role of interleukin 6 (IL-6). *BJU Int.* 2014, 113, 986–992.

- Gu, L.; Talati, P.; Vogiatzi, P.; Romero-Weaver, A.L.; Abdulghani, J.; Liao, Z.; Leiby, B.; Hoang, D.T.; Mirtti, T.; Alanen, K.; et al. Pharmacologic suppression of JAK1/2 by JAK1/2 inhibitor AZD1480 potently inhibits IL-6-induced experimental prostate cancer metastases formation. *Mol. Cancer Ther.* 2014, 13, 1246–1258.

- Wu, C.T.; Hsieh, C.C.; Lin, C.C.; Chen, W.C.; Hong, J.H.; Chen, M.F. Significance of IL-6 in the transition of hormone-resistant prostate cancer and the induction of myeloid-derived suppressor cells. *J. Mol. Med.* 2012, 90, 1343–1355.

- Rojas, A.; Liu, G.; Coleman, I.; Nelson, P.S.; Zhang, M.; Dash, R.; Fisher, P.B.; Plymate, S.R.; Wu, J.D. IL-6 promotes prostate tumorigenesis and progression through autocrine cross-activation of IGF-IR. *Oncogene* 2011, 30, 2345–2355.

- Liu, C.; Guan, H.; Wang, Y.; Chen, M.; Xu, B.; Zhang, L.; Lu, K.; Tao, T.; Zhang, X.; Huang, Y. Mir-195 inhibits emt by targeting FGF2 in prostate cancer cells. *PLoS ONE* 2015, 10, e0144073.

- Huang, Y.; Jin, C.; Hamana, T.; Liu, J.;Wang, C.; An, L.; McKeehan,W.L.;Wang, F. Overexpression of FGF9 in prostate epithelial cells augments reactive stroma formation and promotes prostate cancer progression. *Int. J. Biol. Sci.* 2015, 11, 948–960.
- Yang, Y.; Jiao, L.; Hou, J.; Xu, C.;Wang, L.; Yu, Y.; Li, Y.; Yang, C.;Wang, X.; Sun, Y. Dishevelled-2 silencing reduces androgen-dependent prostate tumor cell proliferation and migration and expression of WNT-3a and matrix metalloproteinases. *Mol. Biol. Rep.* 2013, 40, 4241–4250.
- Tran, N.L.; Nagle, R.B.; Cress, A.E.; Heimark, R.L. N-cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines. An epithelial-mesenchymal transformation mediating adhesion withstromal cells. *Am. J. Pathol.* 1999, 155, 787–798.
- Wang, M.; Liu, X.; Guo, J.; Weng, X.; Jiang, G.; Wang, Z.; He, L. Inhibition of lsd1 by pargyline inhibited process of emt and delayed progression of prostate cancer in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015, 467, 310–315.
- Ware, K.E.; Garcia-Blanco, M.A.; Armstrong, A.J.; Dehm, S.M. Biologic and clinical significance of androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 2014, 21, T87–T103
- Sun, F.; Chen, H.G.; Li,W.; Yang, X.; Wang, X.; Jiang, R.; Guo, Z.; Chen, H.; Huang, J.; Borowsky, A.D.; et al. Androgen receptor splice variant ar3 promotes prostate cancer viamodulating expression of autocrine/paracrine factors. *J. Biol. Chem.* 2014, 289, 1529–1539.
- Baruah, M.M.; Khandwekar, A.P.; Sharma, N. Quercetin modulates wnt signaling components in prostate cancer cell line by inhibiting cell viability, migration, and metastases. *Tumour Biol.* 2016, 37, 14025–14034.
- Li, Q.; Ye, L.; Xin, Z.; Wang, M.; Lin, C.; Huang, S.; Guo,W.; Lai, Y.; Du, H.; Li, J.; et al. Fzd8, a target of p53, promotes bone metastasis in

prostate cancer by activating canonical wnt/beta-catenin signaling. *Cancer Lett.* 2017, 402, 166–176.

- Tai, H.C.; Chang, A.C.; Yu, H.J.; Huang, C.Y.; Tsai, Y.C.; Lai, Y.W.; Sun, H.L.; Tang, C.H.; Wang, S.W. Osteoblast-derived wnt-induced secreted protein 1 increases VCAM-1 expression and enhances prostate cancer metastasis by down-regulating mir-126. *Oncotarget* 2014, 5, 7589–7598.

- Sandsmark, E.; Hansen, A.F.; Selnaes, K.M.; Bertilsson, H.; Bofin, A.M.; Wright, A.J.; Viset, T.; Richardsen, E.; Drablos, F.; Bathen, T.F.; et al. A novel non-canonical wnt signature for prostate cancer aggressiveness. *Oncotarget* 2017, 8, 9572–9586.

- Kaarbo, M.; Mikkelsen, O.L.; Malerod, L.; Qu, S.; Lobert, V.H.; Akgul, G.; Halvorsen, T.; Maelandsmo, G.M.; Saatcioglu, F. Pi3k-akt-mtor pathway is dominant over androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Cell Oncol.* 2010, 32, 11–27

- Hsieh, A.C.; Liu, Y.; Edlind, M.P.; Ingolia, N.T.; Janes, M.R.; Sher, A.; Shi, E.Y.; Stumpf, C.R.; Christensen, C.; Bonham, M.J.; et al. The translational landscape of mtor signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* 2012, 485, 55–61.

- Batlle, E.; Sancho, E.; Franci, C.; Dominguez, D.; Monfar, M.; Baulida, J.; Garcia De Herreros, A. The transcription factor snail is a repressor of e-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2000, 2, 84–89.

- Ware, K.E.; Somarelli, J.A.; Schaeffer, D.; Li, J.; Zhang, T.; Park, S.; Patierno, S.R.; Freedman, J.; Foo, W.C.; Garcia-Blanco, M.A.; et al. Snail promotes resistance to enzalutamide through regulation of androgen receptor activity in prostate cancer. *Oncotarget* 2016, 7, 50507–50521.

- Randle, D.D.; Clarke, S.; Henderson, V.; Odero-Marah, V.A. Snail mediates invasion through upa/upar and the mapk signaling pathway in

prostate cancer cells. *Oncol. Lett.* 2013, 6, 1767–1773.

- Ohkubo, T.; Ozawa, M. The transcription factor snail downregulates the tight junction components independently of e-cadherin downregulation. *J. Cell. Sci.* 2004, 117, 1675–1685.
- Uygur, B.; Wu, W.S. Slug promotes prostate cancer cell migration and invasion via cxcr4/cxcl12 axis. *Mol. Cancer* 2011, 10, 139.
- Esposito, S.; Russo, M.V.; Airoidi, I.; Tupone, M.G.; Sorrentino, C.; Barbarito, G.; Di Meo, S.; Di Carlo, E. Snai2/slug gene is silenced in prostate cancer and regulates neuroendocrine differentiation, metastasis-suppressor and pluripotency gene expression. *Oncotarget* 2015, 6, 17121–17134.
- Song, G.Q.; Zhao, Y. Kisspeptin-10 inhibits the migration of breast cancer cells by regulating epithelial-mesenchymal transition. *Oncol. Rep.* 2015, 33, 669–674.
- Wang, H.; Jones, J.; Turner, T.; He, Q.P.; Hardy, S.; Grizzle, W.E.; Welch, D.R.; Yates, C. Clinical and biological significance of kiss1 expression in prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 2012, 180, 1170–1178.
- Alexander, N.R.; Tran, N.L.; Rekapally, H.; Summers, C.E.; Glackin, C.; Heimark, R.L. N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of twist1. *Cancer Res.* 2006, 66, 3365–3369.
- Graham, T.R.; Zhau, H.E.; Odero-Marah, V.A.; Osunkoya, A.O.; Kimbro, K.S.; Tighiouart, M.; Liu, T.; Simons, J.W.; O'Regan, R.M. Insulin-like growth factor-i-dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2008, 68, 2479–2488.
- Jin, H.J.; Zhao, J.C.; Ogden, I.; Bergan, R.C.; Yu, J. Androgen receptor-

independent function of foxa1 in prostate cancer metastasis. *Cancer Res.* 2013, 73, 3725–3736

- Shukla, S.; Shukla, M.; MacLennan, G.T.; Fu, P.; Gupta, S. Deregulation of FOXO3a during prostate cancer progression. *Int. J. Oncol.* 2009, 34, 1613–1620
- Liu, H.; Yin, J.; Wang, H.; Jiang, G.; Deng, M.; Zhang, G.; Bu, X.; Cai, S.; Du, J.; He, Z. FOXO3a modulates WNT/beta-catenin signaling and suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells. *Cell Signal.* 2015, 27, 510–518.
- Angulo, J.C.; Andres, G.; Ashour, N.; Sanchez-Chapado, M.; Lopez, J.I.; Roper, S. Development of castration resistant prostate cancer can be predicted by a DNA hypermethylation profile. *J. Urol.* 2016, 195, 619–626.
- Chen, W.Y.; Wang, D.H.; Yen, R.C.; Luo, J.; Gu, W.; Baylin, S.B. Tumor suppressor hic1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 2005, 123, 437–448.
- Hao, M.; Li, Y.; Wang, J.; Qin, J.; Wang, Y.; Ding, Y.; Jiang, M.; Sun, X.; Zu, L.; Chang, K.; et al. Hic1 loss promotes prostate cancer metastasis by triggering epithelial-mesenchymal transition. *J. Pathol.* 2017, 242, 409–420.
- Qin Z, Kreplak L, Buehler MJ (2009) Hierarchical structure controls nanomechanical properties of vimentin intermediate filaments. *PLoS ONE* 4(10):e7294
- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al (2016). The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*, 45, 362–8
- Mingliang Chu, Yyunli Chang, Ping li, Yanjing Guo, Kaiqing Zhang, Weiqiang Gao (2014). Androgen receptor is negatively correlated with the methylation-mediated transcriptional repression of miR-375 in

human prostate cancer cells [Oncol Rep](#).31(1): 34–40.

- He Cui, Ying Hu¹, Didi Guo¹, Aifeng Zhang Uuejun Gu¹, Shaodan Zhang, Chengcheng Zhao, Pihai Gong, Xiaohui Shen, Yiping Li, Huazhang Wu, Ling Wang, Zhujiang Zhao, Hong Fan (2018) DNA methyltransferase 3A isoform b contributes to repressing E-cadherin through cooperation of DNA methylation and H3K27/H3K9 methylation in EMT-related metastasis of gastric cancer. *Oncogene*, 37:4358–4371
- Dexing Fang, David Hawke, Yanhua Zheng Yan Xia, Jill Meisenhelder, Heinz Nika, Gordon B. Mills, Ryuji Kobayashi, Tony Hunter, and Zhimin Lu. Phosphorylation of β -catenin by Akt promotes β -catenin transcriptional activity. *J Biol Chem*. 2007 Apr 13; 282(15): 11221–11229.
- Gounari F, Signoretti S, Bronson R, Klein L, Sellers WR, et al. (2002) Stabilization of beta-catenin induces lesions reminiscent of prostatic intraepithelial neoplasia, but terminal squamous transdifferentiation of other secretory epithelia. *Oncogene* 21: 4099–4107.
- Woods JA, Wilund KR, Martin SA, Kistler BM. Exercise, inflammation and aging. *Aging Dis*. 2012;3:130–140.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315-9.
- Milly J. McAllister, Mark A. Underwood, Hing Y. Leung, Joanne Edwards. (2019) A review on the interactions between the tumor microenvironment and androgen receptor signaling in prostate cancer. *Volume* 206, *Pages* 91–106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.11.004>
- Smith BN, Bhowmick NA. Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *J Clin Med*. 2016;5:17.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal

transition. *J Clin Invest.* 2009;119:1420–1428.

- Yue-feng Du, Liang Liang, Ying Shi, Qing-zhi Long, Jin Zeng, Xin-yang Wang, and Da-lin He Multi-target siRNA based on DNMT3A/B homologous conserved region influences cell cycle and apoptosis of human prostate cancer cell line TSU-PR1. *Genet Mol Biol.* 2012 Jan-Mar; 35(1): 164–171
- Zhuangzhuang Zhang, Lijun Cheng, Jie Li, Elia Farah, Nadia M. Atallah, Pete E. Pascuzzi, Sanjay Gupta and Xiaoqi Liu. Inhibition of the Wnt/ β -Catenin Pathway Overcomes Resistance to Enzalutamide in Castration-Resistant Prostate Cancer.DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3006 Published June 2018
- Klok TI, Kilander A, Xi Z, Waehre H, Risberg B, Danielsen HE, Saatcioglu F. Kallikrein 4 is a proliferative factor that is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007 Jun 1;67(11):5221-30.
- Varisli L, Ozturk BE, Akyuz GK, Korkmaz KS. HN1 negatively influences the beta-catenin/E-cadherin interaction, and contributes to migration in prostate cells. *J Cell Biochem.* 2015;116(1):170–178. doi: 10.1002/jcb.24956

TEŞEKKÜRLER

Öncelikle doktora eğitimi için beni laboratuvarına kabul eden, doktora süreci boyunca her konuda bana destek olan, tez çalışmalarımnda sonsuz sabır gösteren ve motivasyon sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ'a teşekkür ederim.

Hücre kültürü çalışmalarına başlamamda sağladığı katkı ve yardımları dışında iyi bir arkadaş da olan, her konuda desteğini ihmal etmeyen sevgili Dr. Öğr. Üyesi Bilge DEBELEÇ BÜTÜNER'e teşekkür ederim.

Tez izleme toplantılarında araştırmamın doğru yönde ilerlemesi için yaptıkları eleştiri, öneri ve destekleri için Doç. Dr. Buket KOSOVA'ya, Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY'a ve ayrıca Doç. Dr. Sultan GÜLÇE İZ'e teşekkür ederim.

Laboratuvar ortamını sadece iş ortamı değil bir aile ortamı gibi hissetmeme katkı sağlayan, iyi ve kötü günlerimde hep yanımda olan, birlikte güzel zaman geçirdiğimiz Kanser Moleküler Biyoloji laboratuvarı ekibi, çok sevdiğim arkadaşlarım Elif İŞEL, Gülseren ÖZDUMAN, Gizem Gülevin TAKIR, Aykut BOSTANCI, Öznur SİNGİN, Bilge Esin ÖZTÜRK, Aadil JAVED, Gizem ÖRS KUMOĞLU, Dilan YERLİ, Doğan DURAN, Sevda ALTUN'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışması 117S289 nolu TÜBİTAK projesinin sağladığı destekle tamamlanmış olup, sağladığı katkılardan dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Asıl teşekkürü uzakta olsa da benim tüm başarılarıma benden çok sevenen, her zaman desteklerini esirgemeyen canım aileme, hayatta kazandığım en büyük nimetim, canım kızıma sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı: Iroda SAUDULLAEVA

Uyruk: Özbekistan

Doğum tarihi: 08/09/1986

Doğum yeri: Taşkent/ÖZBEKİSTAN

Eğitim

Lisans (2004-2008)

Biyoloji Bölümü, Özbekistan Milli Üniversitesi, Taşkent, Özbekistan

Yüksek Lisans (2008-2010)

Biyofizik Bölümü, Özbekistan Milli Üniversitesi, Taşkent, Özbekistan

Doktora (2014-2020)

Biyomühendislik, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Araştırma Deneyimleri

Doktora araştırması (2015-2020)

Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

Biyomühendislik Bölümü, Kanser Biyolojisi Labı, Prof. Kemal S. Korkmaz;

Prostat kanseri gelişiminde inflamasyon aracılıklı migrasyonun protein profilinin tanımlanması

Yüksek lisans araştırması (2012)

Özbekistan Cumhuriyeti Bilimler Akademisi Fizyoloji ve Biyofizik Enstitüsü

Alkaloidlerin kalp papiller kas hareketi üzerindeki etkisinin araştırılması

Lisans araştırması (2006-2008)

Özbekistan Cumhuriyeti Bilimler Akademisi Fizyoloji ve Biyofizik Enstitüsü

Biyofizik laboratuvarı, Prof. Sabirov Ravshan Zairovich;

Tibbi biyolojik maddelerin kalp papiller kas hahaketi üzerindeki etkisinin araştırılması.

Çalışma

Biyoloji Öğretmeni (2008-2009)

72 no'lu İhtisas Okulu, Taşkent (Özbekistan)

Biyoloji Öğretmeni (2009-2010)

Sosyal ve ekonomik meslek yüksek okulu, Taşkent (Özbekistan)

Araştırma Görevlisi (2010-2014)

"Biyofizik" Bölümü Asistanı, Özbekistan Milli Üniversitesi, Taşkent (Özbekistan)

Yayınlar

Saydullaeva, I.; Bütüner, B.D.; Korkmaz, K.S. Inflammatory Microenvironment-Mediated E-Cadherin Decrease Induces Migration in LNCaPs. *Proceedings 2018*, 2(25), 1540; <https://doi.org/10.3390/proceedings2251540>

Konferanslar

Katılım: 4-7 Mayıs 2016. 1. Hücre Ölüm Araştırmaları Derneği tarafından düzenlenen 1. Uluslararası Hücre Ölüm Araştırmaları Kongresi

▪ Sözlü sunum: 5-6 Mayıs 2017. *"STAMP2 Prostat Kanserinin Gelişiminde İnflamatuvar Mikroçevre Üzerine Etkisi"*. Uluslararası Öğrenci Bilim Konferansı, İzmir, Türkiye.

▪ Sözlü sunum: 1-4 Kasım, 2018. *"İnflamatuvar Mikro Ortam Aracılı E-kaderin Azalması LNCaP'lerde Göçü Artırır"*. 2. Hücre Ölüm Araştırmaları Derneği tarafından düzenlenen 2. Uluslararası Hücre Ölüm Araştırmaları Kongresi