

**NSCLC Hücreslerinde TGF- β /p38/RUNX2/RANKL/NF κ B Yolağının EMT Sürecindeki
Rolünün Araştırılması**

Program Kodu: 1002

Proje No: 114S007

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Hakan AKÇA

Bursiyer:

Hakan KÜÇÜKSAYAN

HAZİRAN 2015

DENİZLİ

ÖNSÖZ

Akciğer kanseri, yüksek metastatik kapasiteye ve yüksek tekrarlama riskisine sahip olmasıyla en agresif kanser türlerinden biridir. Dolayısıyla kanser ilişkili ölümlerin en yaygın nedeni durumundadır. Günümüzde kanser progresyonundaki rolleri nedeniyle tümör mikroçevresinde aktif roller üstlenen sitokinler, kanser araştırmalarının odak noktası haline gelmiştir. Son bulgular, tümörgenezin büyük oranda tümör ilişkili stromadan (tümör mikroçevresi) alınan büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinlere bağımlı olduğunu önermektedir. Sonuç olarak bu sinyaller, tümör progresyonunu modüle eden çeşitli patofizyolojik süreçler aracılığıyla karsinoma hücrelerine devamlı ve aktif bir destek sağlamaktadır. Bunlardan en önemlisi ise sitokinlerin, kanser hücrelerinin invazyon yeteneklerinin ve invazyonunun en önemli tetikleyici unsurlarından olan EMT sürecini indükleyebilmeleridir.

EMT süreci K-Ras (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) ve Her2 (Human epidermal growth factor receptor 2) gibi onkogenik aktivasyonlarla tetiklenebilmektedir. Ayrıca, tümör mikroçevrelerinde bulunan kanser-ilişkili fibroblastlar ve immün hücreler gibi stromal hücreler tarafından salınan Wnt, TGF- β (Transforming growth factor beta), Hedgehog, EGF (Epidermal growth factor), HGF (Hepatocyte growth factor) ve TNF- α (Tumor necrosis factor alpha), IL-6 (Interleukin 6) gibi çeşitli sitokinler aracılığıyla da tetiklenebilmektedir. TGF- β , bu faktörler arasında en önemli EMT indükatörlerinden biridir. Güncel çalışmalarla TGF- β tarafından indüklenen EMT sürecinde kilit role sahip birçok hedef molekül tanımlanmaktadır. Gerçekleştirmiş bu proje, KHDAK kanser hücrelerinde TGF- β ile indüklenen EMT ve invazyon süreçlerinin moleküler mekanizmasını, bilinmeyen yönleriyle araştırarak aydınlatılabilmeyi amaçlamıştır.

TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı kapsamında yapmış olduğumuz bu çalışma SAĞLIK BİLİMLER ARAŞTIRMA GRUBU (SBAG) tarafından 114S007 kodu ile desteklenmiştir. TÜBİTAK Sağlık Bilimler Araştırma Grubuna destekleri için teşekkürlerimizi sunuyoruz.

Prof. Dr. Hakan AKÇA

ÖZET

İnvazyonun tetikleyici mekanizmalarından olan epitelden-mezenkimala geçişin (EMT), KHDAK invazyonu ve metastazında kilit bir öneme sahiptir. EMT, tümör mikroçevresinde bulunan birçok sitokin tarafından indüklenebilmektedir. Bu sitokinler arasından TGF- β 'nın, diğer kanser türlerinin yanısıra KHDAK hücrelerinde de EMT'nin en önemli indükleyicilerinden biri olduğu belirtilmektedir. TGF- β kanser hücrelerinde MAPK (p38), JNK, Rho GTPase ve PI3K/Akt yolları gibi birbirinden farklı birçok farklı yolak aracılığıyla EMT'i indükleyebilmektedir. Bu yollardan PI3K/Akt yolağı, en önemli EMT organizatörlerinden NF- κ B'nin primer düzenleyici olması bakımından EMT sürecinde seçkin bir özelliğe sahiptir. Ancak; NF- κ B, PI3K/Akt yolağının haricinde farklı yollar tarafından da regüle edilebilmektedir. Bu nedenle KHDAK hücrelerinde PI3K/Akt yolağının yanısıra NF- κ B'i regüle ederek EMT'i aktive edebilecek ve daha önce araştırılmamış farklı yollara odaklandık. Bu bağlamda, TGF- β /p38/Runx2/RANKL/NF- κ B sinyal yolağının KHDAK hücrelerinde EMT sürecini indükleyebileceğini hipotez ettik. Öncelikle, TGF- β 'nin A549 hücrelerinde EMT sürecini indüklediği, H1650 hücrelerinde ise indükleyemediği görülmüştür. NF- κ B aktivasyonunun TGF- β tarafından indüklenemediğini ve NF- κ B'nin, TGF- β ile indüklenen EMT sürecinde kritik bir role sahip olmadığı gösterilmiştir. TGF- β 'nin, RANKL ekspresyonunu p38 yolağı üzerinden indüklediği tespit edilmiştir. TGF- β tarafından indüklenen RANKL ekspresyonunun EMT süreci üzerinde bir etkisi olmadığı, invazyon kapasitesi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Ayrıca çalışmamızda KHDAK hücrelerinin EMT ve invazyon süreçlerinde SATB2'nin kilit bir molekül olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; TGF- β 'nin, KHDAK hücreleri A549 ve H1650'de NF- κ B'i aktive etmediği ve TGF- β tarafından indüklenen EMT sürecinde p38/Runx2/RANKL/NF- κ B yolağının düzenleyici bir rolü olmadığı saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: KHDAK, EMT, TGF- β , p38, Runx2, RANKL, NF- κ B, SATB2

ABSTRACT

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), which is a triggering mechanism of invasion, has a key importance in invasion and metastasis. EMT could be induced by many cytokines in tumour microenvironment. In among these cytokines, it has been stated that TGF- β is one of the most significant inducators in NSCLC as well as other cancers. TGF- β can induce EMT through many different signaling pathways such as MAPK (p38), JNK, Rho GTPase and PI3K/Akt pathway in cancer cells. In among these signaling pathways, because of PI3K/Akt pathway is primer regulator of NF- κ B, which is most significant promoter of EMT, it has an exclusive feature in EMT process. However, NF- κ B can also be regulated by different signaling pathways as well as PIK3/Akt signaling pathway. Therefore, we focused on different pathways that had not been previously investigated and can activate EMT by regulating NF- κ B. In this regard, we hypothesized that TGF- β /p38/Runx2/RANKL/NF- κ B signaling pathway might induce EMT in NSCLC. We firstly found that TGF- β can induce EMT on A549 cells but not on H1650 cells. Then, we also found that TGF- β can not induce NF- κ B activity on NSCLC cells. Therefore, we showed that NF- κ B has a critical role on TGF- β -induced EMT on NSCLC cells. Our results indicated that TGF- β can induce RANKL expression via p38 signaling pathways, but TGF- β -mediated induction of RANKL expression has no effect on EMT but on cellular invasion on NSCLC cells. Moreover, in our study we found that SATB2 is a critical key molecule on EMT and invasion of NSCLC cells. In conclusion, TGF- β can not induce NF- κ B activity and p38/Runx2/RANKL/NF- κ B signaling pathway has no role TGF- β -induced EMT in A549 and H1650 cells.

Key words: NSCLC, EMT, TGF- β , p38, Runx2, RANKL, NF- κ B, SATB2

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
3. GEREÇ ve YÖNTEM	8
3.1. Hücre Kültürü	8
3.2. Proliferasyon Deneyi	8
3.3. İnvazyon Deneyi.....	8
3.4. SDS-PAGE ve Western blot	9
3.5. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	10
3.6. Dual luciferase gene reporter assay	11
4. BULGULAR	12
4.1. Bay11-7082, LY294002, SB203580 İnhibitörlerinin Hücre Canlılığına Etkileri ...	12
4.2. TGF- β uygulamasının A549 ve H1650 hücre morfolojileri ve EMT belirteçlerinin ekspresyonları üzerindeki etkileri	14
4.3. TGF- β uygulamasının A549 ve H1650 hücrelerinde Akt ve p38 yolaklarının aktivasyonları üzerine etkisi	15
4.4. Bay 11-7082, LY294002, OPG ve SB203580 inhibitörlerinin TGF- β -tarafından indüklenen p-Akt ve p-p38 seviyelerine etkileri	16
4.5. NF- κ B inhibitörü BAY 11-7082 ve PI3K/Akt yolağı inhibitörü LY294002'nin EMT belirteçleri, Runx2 ve RANKL ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri	17
4.6. RANKL/RANK/NF- κ B yolağı inhibitörü osteoprotegerin (OPG) ve p38 inhibitörü SB203580'nin, EMT belirteçleri, Runx2 ve RANKL ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri 20	
4.7. IKB α /NF- κ B, PI3K/Akt, RANKL/RANK/NF- κ B ve p38 yolaklarının TGF- β ile indüklenen hücre invazyonundaki rolleri	22
4.8. Bay 11-7082, LY294002, OPG ve SB203580 inhibitörlerinin NF- κ B lusiferaz aktivitesine üzerine etkileri	24
4.9. Runx2 aktivasyonunun EMSA yöntemi ile gösterilmesi	25
4.10. SATB2'nin KHDAK hücre morfolojisi ve EMT sürecindeki rolü	26
5. TARTIŞMA/SONUÇ	28
6. KAYNAKLAR	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Epitel kökenli kanserlerde metastatik kaskatın şematik gösterimi (Thompson ve Haviv 2011).....	3
Şekil 2.2. TGF- β 'nin PI3K/Akt/NF- κ B sinyal yolağı aracılığıyla Snail ekspresyonunu indüklemesi (Chen vd 2013).....	4
Şekil 2.3. TGF- β tarafından indüklenen Runx2 fosforilasyona bağlı aktivasyonunun p38 aracılığıyla düzenlenmesi (Hattori vd 2007).....	6
Şekil 4.1. NF- κ B inhibitörü Bay 11-7082'nin uygulamanın 72. saatinde A549 ve H1650 hücre canlılıkları üzerine etkisi.	12
Şekil 4.2. PI3K inhibitörü LY294002'nin uygulamanın 72. saatinde A549 ve H1650 hücre canlılıkları üzerine etkisi.	13
Şekil 4.3. p38 inhibitörü SB203580'nin uygulamanın 72. saatinde A549 ve H1650 hücre canlılıkları üzerine etkisi.	14
Şekil 4.4. TGF- β muamelesinin A549 ve H1650 hücre morfolojileri üzerine etkisi.	15
Şekil 4.5. TGF- β muamelesinin A549 ve H1650 hücrelerindeki EMT belirteçlerinin ekspresyonları üzerine etkisi.	15
Şekil 4.6. TGF- β uygulamasının A549 ve H1650 hücrelerinde Akt ve p38 yolaklarının aktivasyonları üzerine etkisi.....	16
Şekil 4.7. Bay 11-7082 ve LY294002 inhibitörlerinin TGF- β -tarafından indüklenen p-Akt ve p-p38 seviyelerine etkileri.	17
Şekil 4.8. Osteoprotegerin (OPG) ve SB203580 inhibitörlerinin TGF- β -tarafından indüklenen p-Akt ve p-p38 seviyelerine etkileri.	17
Şekil 4.9. NF- κ B inhibitörü BAY 11-7082 ve PI3K/Akt yolağı inhibitörü LY294002'nin EMT belirteçleri, Runx2 ve RANKL ekspresyon seviyeleri üzerine etkilerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi	19
Şekil 4.10. RANKL/RANK/NF- κ B yolağı inhibitörü osteoprotegerin (OPG) ve p38 inhibitörü SB203580'nin, EMT belirteçleri, Runx2 ve RANKL ekspresyon seviyeleri üzerine etkilerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi.	21
Şekil 4.11. I κ B α /NF- κ B, PI3K/Akt, RANKL/RANK/NF- κ B ve p38 yolaklarının TGF- β ile indüklenen hücre invazyonundaki rolleri.	23
Şekil 4.12. Bay 11-7082, LY294002, OPG ve SB203580 inhibitörlerinin NF- κ B lusiferaz aktivitesine üzerine etkileri.....	25
Şekil 4.13. Runx2 ve NF- κ B probları kullanılarak gerçekleştirilen EMSA deneyi sonuçları.	26
Şekil 4.14. siRNA aracılı SATB2 downregülasyonunun hücre morfolojisi üzerine etkisi ..	27
Şekil 4.15. SATB2'nin siRNA-aracılı susturulmasının A549 ve H1650 hücrelerinin EMT süreçlerindeki rolü.	27
Şekil 5.1. TGF- β /p38/Runx2/RANKL/NF- κ B sinyal yolağının şematik gösterimi.	29
Şekil 5.2. A549 hücrelerinde Runx2'nin nükleusa translokasyonu üzerinde, TGF- β ve p38'in düzenleyici rolü.	34

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

NF-κB.....	Nuclear Factor Kappa B
PI3K.....	Phosphoinositide 3-kinase
p38.....	p38 mitogen-activated protein kinases
Runx2.....	Runt-related transcription factor 2
RANKL.....	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
EMT.....	Epitelyal-Mezenkimal Transisyon
OPG.....	Osteoprotegerin
Bay.....	BAY 11-7082
Ly.....	LY294002
SB.....	SB203580
NSCLC.....	Non-small-cell lung carcinoma
KHDAK.....	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
KKH.....	Kanser Kök Hücre
ml.....	Mililitre
mM.....	Milimolar
μM.....	mikromolar
nM.....	Nanomolar
PVDF.....	Poliviniliden diflorid
SATB2.....	Special AT-rich sequence-binding protein 2
SDS.....	Sodyum Dodesil Sülfat
siRNA.....	Small interfering RNA
TGF-β.....	Transforme Edici Büyüme Faktörü
μl.....	Mikrolitre
μg.....	Mikrogram

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, yüksek metastatik kapasiteye ve yüksek tekrarlama riskisine sahip olmasıyla en agresif kanser türlerinden biridir. Dolayısıyla kanser ilişkili ölümlerin en yaygın nedeni durumundadır. Günümüzde kanser progresyonundaki rolleri nedeniyle tümör mikroçevresinde aktif roller üstlenen sitokinler, kanser araştırmalarının odak noktası haline gelmiştir. Hem normal hücresel olaylarda, hem de kanser progresyonunda oynadığı önemli roller ile TGF-B, sitokinler içerisinde kilit bir yere sahiptir. Yapılan araştırmalar TGF-B'nin, akciğer kanseri, meme kanseri gibi birçok kanser türünün tümörgenezinde, invazyonunda, metastazında ve kemoterapik ilaçlara dirençlilik kazanması gibi süreçlerindeki rollerini göstermiştir.

Çeşitli kanser hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda TGF-B, invazyonun kilit bir adımı olan Epidermal Mezenkimal Transisyon (EMT) sürecini tetiklediği bilinmektedir. Son güncel araştırmalar; TGF-B ile indüklenen EMT sürecinde birçok yolağın, aktif roller üstlendiklerini göstermektedir. Bu nedenle, TGF- β ile indüklenen EMT ve invazyon süreçlerinde rol alan yolakların moleküler mekanizmalarının aydınlatılması önem arz etmektedir. Bu bağlamda projemiz, daha önce ilişkisi kurulmamış olası TGF- β /p38/RUNX2/RANKL/NF κ B yolağının KHDAK hücre EMT ve invazyonundaki rolünü aydınlayabilmeyi amaçlamıştır.

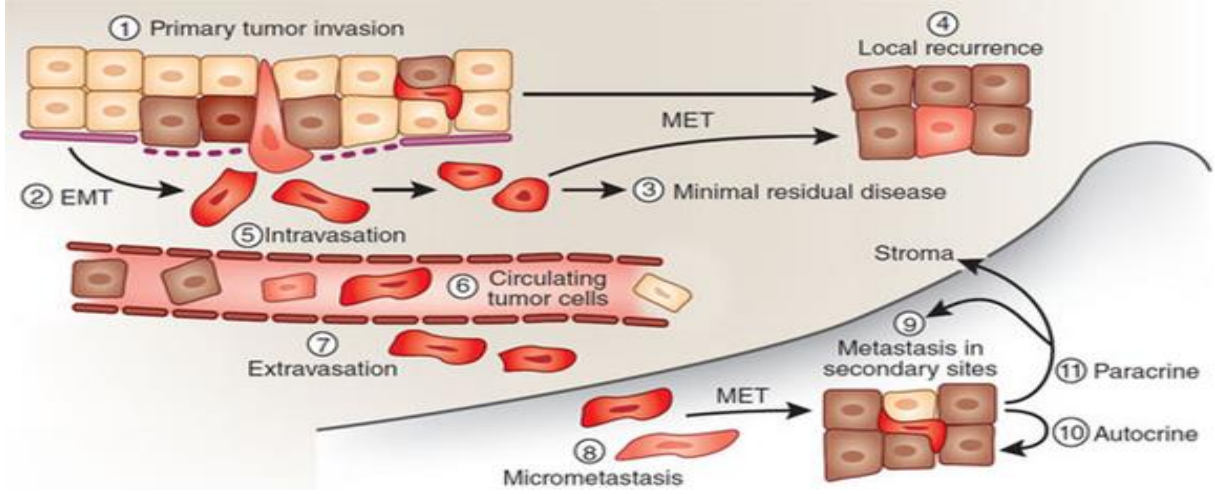
Akciğer kanseri, yüksek invaziv yeteneklere sahip olmasıyla en agresif kanser türlerinden biridir. Dolayısıyla kanser ilişkili ölümlerin en yaygın nedeni durumundadır. İnvazyonun gerçekleşebilmesi için gerekli en önemli adımı ise, epitel kökenli kanser hücrelerinin hücre-hücre bağlantıları gibi epitelyal özelliklerini kaybettiği, artan migrasyon ve invazyon yeteneği gibi mezenşimal özellikleri kazanılmaları ile sonuçlanan EMT sürecidir. Günümüzde kanser invazyonu ve metastazındaki rolleri nedeniyle tümör mikroçevresinde aktif roller üstlenen sitokinler, kanser araştırmalarının odak noktası haline gelmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Akciğer kanseri, dünya genelinde 5 yıllık sağkalım oranınının 10-15%'den daha az olması ile, kanser ilişkili ölümlerin en yaygın nedenidir. Bu kötü netice, sıklıkla ilerlemiş lezyonlara ve metastaza sahip hastaların geç teşhisi ile ilişkilidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) güncel sınıflandırmasına göre; akciğer kanserinin bir alt türü olarak küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu (KHDAK), akciğer kanseri vakalarını, yaklaşık olarak 80% oranında temsil ettiği ifade edilmektedir. Ayrıca; KHDAK, özellikle yüksek invaziv özelliklere ve metastatik potansiyele sahip olmasıyla agresif bir tümördür (Dauphin vd 2013) .

Kanser metastazı, akciğer kanseri hastalarının kötü prognozlarının başlıca nedenidir. Cerrahi olarak tümörün tamamen resekte edildiği hastalarda bile kanser, sıklıkla metastaz ile nüksetmektedir. İşte bu nedenle, akciğer kanserinin etkili tedavisi için metastaz gelişiminin mekanizmaları, en çok araştırılan konuların başında gelmektedir (Hanahan ve Weinberg 2000). Ancak tüm bu yoğun araştırmalara karşın, metastaz süreci hala yeteri seviyede anlaşılabilmiş değildir (Bhowmick vd 2004). Dolayısıyla; bu problemlerin çözümü için, akciğer kanser hücrelerinin yayılımının moleküler mekanizmalarını, tüm ayrıntılarıyla anlamaya ihtiyacımız vardır (Hanahan ve Weinberg 2000).

Kanser metastazının patogenezi, birbirleriyle bağlantılı ve birbiri ardınca gelen bir seri aşamadan oluşan kompleks bir süreçtir (Hanahan ve Weinberg 2000). Metastazın gerçekleşmesi için gerekli adımlar; tümör hücrelerinin birbirlerinden ve kendilerini çevreleyen ECM'den ayrılması, çeşitli proteazlarla ECM'nin degrades edilmesi, bazal membranın degrades edilmesi ve komşu dokulara invazyon, endotel hücrelerindeki çeşitli adezyon moleküllere bağlanmaları aracılığıyla kan veya lenf damar sistemine giriş, damar sisteminde sağ kalım ve yine damar sistemi aracılığıyla metastaz yapacağı bölge taşınması, metastatik lezyon oluşturacağı bölgede damar sisteminden çıkış ve son olarak metastatik lezyonun oluşumudur. Bu metastatik kaskat içerisinde en kritik adımlardan birisi invazyon sürecidir. İnvazyonun gerçekleşebilmesi için gerekli en önemli adımı ise, epitel kökenli kanser hücrelerinin hücre-hücre bağlantıları gibi epitelyal özelliklerini kaybettiği, artan migrasyon ve invazyon yeteneği gibi mezenşimal özellikleri kazanılmaları ile sonuçlanan EMT sürecidir (Bissell MJ ve Radisky 2001, Bhowmick vd 2004, Mueller vd 2004, Polyak vd 2009, Shimoda vd 2010).



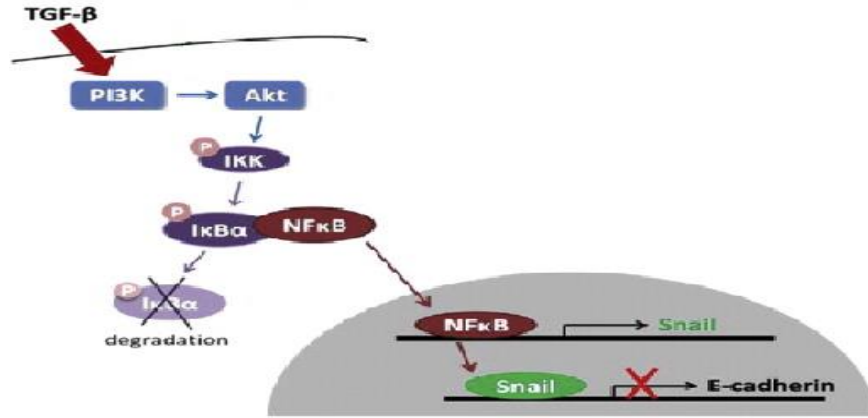
Şekil 2.1. Epitel kökenli kanserlerde metastatik kaskatın şematik gösterimi (Thompson ve Haviv 2011).

EMT sürecinde ekspresyonu baskılanan epitelial proteinler ve eksprese olmaya başlayan mezenşimal proteinler çeşitli EMT yürütücü transkripsiyon faktörleri tarafından yürütülür. Bunlar; zinc finger proteini ailesi içinde yer alan Snail1, Snail2 (Slug), Zeb1, Zeb2/SIP1 ve basic helix-loop-helix faktörleri olarak adlandırılan Twist1 ve E47 transkripsiyon faktörleridir (Coussens ve Werb 2002, Orimo ve Weinberg 2006). Bu transkripsiyonel faktörler EMT'yi gerçekleştirmek üzere E-kaderin, kludinler, okludinler, plakofilinler, MUC1 ve sitokeratin gibi çeşitli epitelial markırları kodlayan bir takım genlerin ekspresyonlarını baskılamaktadırlar (Kalluri ve Zeisberg 2006)

EMT; hem embriyonik gelişim sırasında, hem de kanser hücrelerinde birçok sinyal yolağı tarafından yürütülmektedir (Xiao ve He 2010). Bu sinyal yolları çoğunlukla TGF- β süper ailesi üyeleri, epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), fibroblast growth factor (FGF) kollejen gibi ekstraselüler matriks bileşenleri, EMT'nin başlıca indükleyicileridir. TGF- β süper ailesinin önemli bir üyesi olan TGF- β 1, sadece embriyonik gelişim sırasında değil, aynı zamanda kanser progresyonunda EMT'yi indükleyebilmektedir. Çeşitli araştırmalar TGF- β 1'i, akciğer ve böbrek fibrozisinde, pankreas kanseri, meme kanseri ve KHDAK hücrelerinde EMT'nin esas indükleyicisi olarak tanımlamaktadır. TGF- β 1 sinyal yolağı, EMT sürecini yöneten p38, JNK, Rho GTPase ve PI3K/Akt sinyal iletim ağlarında merkezi bir yer işgal etmektedir (Chen vd 2012). Bu yollar arasında PI3K/Akt yolağının KHDAK hücrelerinde NF- κ B'nin aktivitesini düzenleyen en kritik yollardan biri olması nedeniyle (Akca vd 2011), KHDAK hücrelerinde TGF- β 1 ile indüklenen

EMT'i, PI3K/Akt yolağının haricinde NF-κB aracılığıyla yönetebilecek literatürde çalışılmamış yeni potansiyel yollara odaklanmıştık.

Litaratürdeki çeşitli kanser türlerinde NF-κB EMT ilişkisini gösteren çalışmalardan bahsedecek olursak; mesane kanser hücre dizilerinde yapılan bir çalışmada, NF-κB'nin EMT yürütücü transkripsiyon faktörü Snai1'in ekspresyonunu promotor bölgesine bağlanarak doğrudan düzenlediği ve PI3K/Akt yolağına EMT'i indükleyerek destek verdiği gösterilmiştir (Julien vd 2007). Kolorektal kanser hücrelerinde yapılan bir çalışma, NF-κB'nin Snai1'i regüle ederek EMT'i yürüttüğü gösterilmiştir (Zhu vd 2013). Meme kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise Insulin-Like Growth Factor Receptor (IGFR)'nin ısrarlı aktivasyonu sonucunda aktive olan PI3K/Akt/NF-κB yolağının Snai1'i regüle ederek EMT'i yürüttüğü gösterilmiştir (Kim vd 2007). Bir diğer meme kanseri hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada da ise EMT'nin, TGF-β aracılı NF-κB aktivasyonu ile indüklendiği gösterilmiştir (Huber vd 2004). Hepatoselüler karsinoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise Toll-like receptor 4 (TLR4)'in EMT sürecini NF-κB aracılığıyla yönettiği gösterilmiştir (Jing vd 2012).



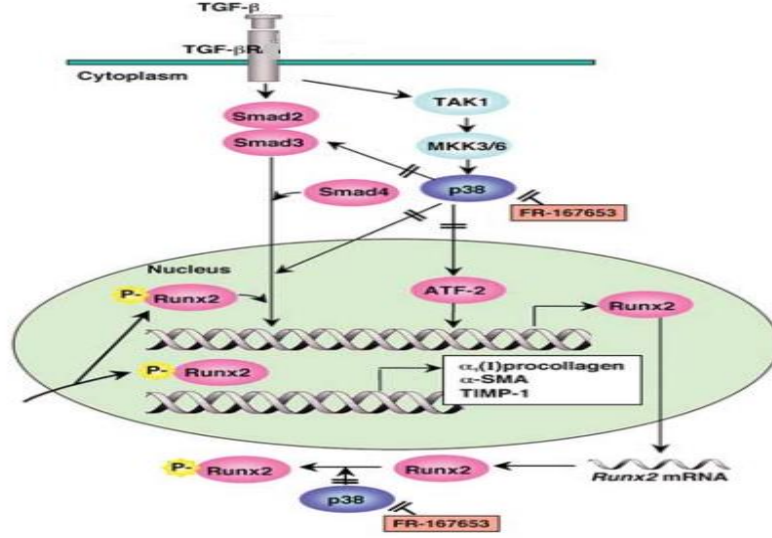
Şekil 2.2. TGF-β'nin PI3K/Akt/NF-κB sinyal yolağı aracılığıyla Snail ekspresyonunu indüklemesi (Chen vd 2013).

KHDAK'deki EMT, yukarıda bilgilerini verdiğimiz farklı kanser türlerinde üzerinde yapılan araştırmalarda, başta TGF-β üzere EMT sürecinin birçok farklı yolak üzerinden yürütüldüğünü gösteren çalışmalar bulunmaktadır. KHDAK hücrelerindeki bir araştırmada TGF-β'nin, EMT'i PI3K/Akt ve MEK/Erk1/2 yolları üzerinden tetiklediği gösterilmiştir [14]. Farklı bir çalışmada, NF-κB'nin KHDAK hücrelerinde EMT'i TWIST1, Snail1, Slug and ZEB2 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırarak indüklediği gösterilmiştir (Kumar vd 2013). Bir diğer araştırmada TNF-α'nın NF-κB bağımlı Slug aktivasyonu aracılığıyla EMT'nin indüklendiği kanıtlanmıştır (Wang vd 2013). Yapılan tüm bu çalışmalar gösteriyor ki; birçok epitel kökenli kanser türünde EMT'nin indüklenmesi, gerek TGF-β gerekse diğer başka faktörlerle

indüklenen EMT sürecinin yönetiminde ve düzenlenmesinde NF- κ B'nin kritik rolü açıkça görülmektedir. Bu nedenle, yukarıda da ifade ettiğimiz üzere KHDAK hücrelerinde NF- κ B aktivasyonunu kontrol ederek bağlı olarak EMT'i indükleyebilecek farklı yollara odaklandık. Literatür taramalarımız sonucu, önemli bir NF- κ B aktivatörü olan tumor necrosis factor (TNF) süper ailesine mensubu hücre yüzey proteini olan Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand (RANKL)'nin ve bu genin ekspresyonu promotör bölgesine bağlanarak doğrudan düzenleyen Runt-related transcription factor 2 (Runx2)'nin, KHDAK hücrelerinde EMT'i indüklediğine dair bir çalışmanın olmadığını gördük.

RANKL ve bu ligandın reseptörü Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B (RANK) başlıca osteoblast ve kemik iliği stromal hücrelerinde eksprese olmaktadır (Santini vd 2011, Tan vd 2011). RANKL'nin osteoklast öncü hücrelerinin yüzeyindeki RANKL reseptörü RANK'a bağlanmasıyla osteoklast öncüleri aktif osteoklast hücrelerine farklılaşırlar. RANK/RANKL yolağının aktivasyonu neticesinde fonksiyonel osteoklast hücreleri kemik yıkımını gerçekleştirmektedirler (Peters ve Meylan 2013). Ancak yakın zamanda RANKL ve RANK'nin kanser hücrelerinde de eksprese oldukları gösterilmiştir (Tsubaki vd 2013). Dahası, RANKL/RANK yolak aktivasyonunun prostat, renal, meme ve akciğer kanser hücrelerinde metastazı desteklediği gösterilmiştir (Santini vd 2011). Peng ve arkadaşları; RANKL'nin KHDAK hücre migrasyonu ve invazyon özellikleri üzerine etkilerini ortaya koymuşlardır (Peng vd 2013), ancak bizim teklif ettiğimiz proje önerisindeki amacımız, Runx2/RANKL/NF- κ B ilişkisinin KHDAK hücrelerinde EMT'yi ve EMT işaretçilerini indüklediğini göstermektir. Bu nedenle projemiz, Peng ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmadan farklıdır ve bu çalışma proje önerimizin özgün değerini etkilememektedir. Ayrıca hipotezimizi destekleyecek şekilde, RANKL'nin KHDAK hücre dizisi olan A549 hücrelerinde JNK, p38, PI3K/Akt ve NF- κ B yollarını regüle ettiği gösterilmiştir (Chen vd 2011). Literatür taramalarımızda, RANKL'nin KHDAK hücrelerinde EMT'i indüklediğine dair bir çalışmanın olmamasına ilaveten diğer kanser türlerinde de bu yöndeki çalışmaların oldukça sınırlı olduğunu gördük. "Tsubaki ve arkadaşları yaptığı çalışmada; meme kanseri hücrelerinde, RANKL'nin NF- κ B aktivasyonuna bağlı olarak Snail1 ve Twist1 aracılığıyla EMT'i indüklediği göstermişlerdir (Tsubaki vd 2013). Ancak, Tsubaki ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada, EMT sürecindeki NF- κ B ve RANKL ilişkisinde, TGF- β tarafından indüklenen Runx2'nin düzenleyici rolü araştırılmamıştır. Projemiz, KHDAK hücrelerinin EMT sürecinde TGF- β /p38/Runx2/RANKL/NF- κ B yolağında, özellikle Runx2'nin, RANKL ve NF- κ B arasındaki ilişkinin düzenleyici rolünü araştırarak aydınlatmayı ve KHDAK tedavisi için yeni etkili hedefler tespit etmeyi amaçlamaktadır. Bu nedenle teklif ettiğimiz proje önerisi, Tsubaki ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadan farklıdır ve bu çalışma projemizin özgün değerini etkilememektedir. Bir diğer çalışma ise prostat kanseri hücrelerinde, RANKL'nin Snail1 aracılığıyla EMT'i tetiklediği ifade edilmektedir (Odero-Marah vd 2008).

Ancak bu çalışmada da NF- κ B'nin rolünden bahsedilmemektedir. Tekrar belirtmek gerekirse; KHDAK hücrelerinde EMT süreciyle RANKL'nin ilişkisini ve bu ilişkide Runx2'nin düzenleyici rolünü araştıran bir çalışma mevcut değildir.



Şekil 2.3. TGF- β tarafından indüklenen Runx2 fosforilasyona bağlı aktivasyonunun p38 aracılığıyla düzenlenmesi (Hattori vd 2007).

Araştırmamızın bir ayağında, KHDAK hücrelerinde daha önce ilişkisi kurulmamış RANKL, NF- κ B ve EMT arasındaki ilişkiyi açıklamaya, araştırmamızın bir diğer ayağında ise RANKL'nin transkripsiyonel regülatörü Runx2'nin bu süreçteki rolünü açıklayabilmeyi amaçlamaktayız. Runx2, hem kemik hücrelerinin farklılaşmasında kilit bir role sahip, hem de kemik metastazı yapan meme ve prostat kanser hücrelerinde over-eksprese olan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Chimge vd 2011). Runx2, farklı biyolojik sistemlerde ve fonksiyonlarda, TGF- β /SMADs yollarının tamamlayıcı bir parçası olarak görev almaktadır (Ito ve Miyazono 2003). Runx2'nin TGF- β /SMADs yolağını kullanarak kanser progresyonunda oynadığı rollere örnek olarak; prostat kanseri üzerine yapılan bir araştırmada, Runx2'nin TGF- β yolağının kilit bir faktörü olan SMAD3'ün transkripsiyonel regülatörü olarak invazyonda ve metastazda önemli bir görev üstlendiği ifade edilmektedir (Baniwal vd 2010). Ayrıca, SMAD transkripsiyon faktörleri üyeleriyle fiziksel bir etkileşim yaparak hedef genlerin (örn. RANKL) transkripsiyonlarında da görev aldıkları gösterilmiştir (Gupta vd 2012). Şekil 3'de görüldüğü üzere; Runx2, TGF- β 'nin SMAD dışı yollarla regüle edilmektedir. Fosforlanarak aktif hale geçen ve TGF- β 'nin EMT'i yönetmek için kullandığı önemli yollarla biri olan p38, sitozolde inaktif Runx2 proteinindeki Prolin/Serin/Treonin domainindeki Ser(301) ve Ser(319) bölgelerini fosforlayarak Runx2'nin aktivasyonunu düzenler ve böylece Runx2 hücre çekirdeğine geçerek, hedef genlerin transkripsiyonlarını düzenlemektedir (Hattori vd 2007). Runx2'nin transkripsiyonlarını doğrudan regüle ettiği genler arasında; kanser progresyonunda EMT'i

regüle eden Sox9, LCN2, Snai2 (Slug); ekstraselüler matriks degradasyonu ve invaziv fenotipte rol alan MMP9, MMP13, PGC; anjiyogenezde kilit rol alan VEGFA, EDN2; kemik dokusuna metastaz yapan kanser hücrelerinde osteolitik fenotipe katkı sağlayan **RANKL**, PTHrP, IL8, SPHK1, EDG3 ve CSF2 gibi çeşitli genler yer almaktadır (Pratap vd 2008). Bu bağlamda; TGF- β tarafından aktive olan Runx2'nin, EMT'i indüklemesinde kilit bir role sahip olduğu kanısındayız. Bu kanımıza destek olarak; meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada, Runx2'nin EMT'i indüklediğinin yanısıra, TGF- β ile indüklenen Slug ekspresyonunda Runx2'nin önemli bir yere sahip olduğu ve Slug promotor bölgesinde Runx2 bağlanma motiflerinin olduğu belirtilmektedir. Runx2'nin akciğer, meme ve tiroid kanserlerindeki EMT süreciyle olan ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. Chimge ve arkadaşları; Runx2'nin, meme kanser hücrelerinde Slug ekspresyonunu regüle ederek EMT'i indüklediğini göstermişlerdir (Chimge vd 2011). Niu ve arkadaşları; tiroid karsinoma hücrelerinde arkadaşları; Runx2'nin siRNA ile Runx2'nin susturulmasıyla Snai1, Slug ve Twist1 ekspresyon seviyelerinin azaldığını göstermişlerdir (Niu vd 2012). Tandon ve arkadaşları; Runx2'nin, BMP-3B'nin epigenetik olarak susturulmasını yöneterek KHDAK hücre migrasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Tandon vd 2012). Hsu ve arkadaşları ise; akciğer kanserinde Runx2'nin hücre invazyonu ve metastazı üzerindeki etkisi ortaya koymuş ve EMT işaretçilerinden E-kaderin ve Snail ile ilişkisi göstermişlerdir (Hsu vd 2011). Ancak; projemizde amacımız, KHDAK hücre EMT'sinde Runx2 tarafından regüle edilen RANKL-bağımlı NF- κ B'nin rolünü aydınlatmaktır. Bu doğrultuda literatürde, KHDAK hücrelerinde Runx2/RANKL/NF- κ B ilişkisinin varlığı ve fonksiyonel etkileri ile hastalık progresyonu ve prognozuyla olan bağlantıları ortaya konulmamıştır. Tüm bu bilgiler ışığı altında; KHDAK hücrelerinin EMT sürecinde ilk kez TGF- β /p38/Runx2/RANKL/NF- κ B yolağının rolünü araştırarak aydınlatmayı ve KHDAK tedavisi için yeni etkili hedefler tespit etmeyi amaçlamaktayız.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

A549 hücre dizisi %10 Fetal Bovine Serum ve % 0,5'lik penisilin/streptomisin içeren DMEM besi ortamında, H1650 hücre dizisi ise %10 Fetal Bovine Serum ve % 0,5'lik penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640 besi ortamında 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava ortamında kültüre edilmiştir.

3.2. Proliferasyon Deneyi

p38 inhibitörü SB203580, PI3K inhibitörü LY294002, NF-κB inhibitörü Bay11-7082'in ve RANKL inhibitörü osteoprotegerinin , hiçbir şey muamele edilmemiş kontrol grubuna oranla hücre proliferasyonu üzerine etkilesi olup olmadığını göstermek için uygulandı. Dolayısıyla invazyondaki düşüşün invazyon yeteneği baskılarıyla mı, yoksa proliferasyonun baskılanmasıyla mı olduğunu tespit etmek amacıyla kullanıldı. Toksik olmayan inhibitör konsantrasyonları saptanarak diğer deney aşamalarında bu tespit edilen inhibitör konsantrasyonları kullanılacaktır. Hücreler tripsinize edilerek sayılacak ve 96 kuyucuklu plaklara 1x10³ hücre/ml olacak şekilde ekilecek, ardından bu hücrelere Bay 11-7082 inhibitörü için; 100-50-25-10-7,5-5-2,5-1-0,5-0,1 µM konsantrasyonlarında, LY294002 inhibitörü için; 100-50-25-10-5-2,5-1-0,5-0,1 µM konsantrasyonlarında, SB203580 inhibitörü için ise 200-100-50-25-10-5-2,5-1-0,5 µM konsantrasyonlarında uygulanarak, bu şekilde hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava içeren ortamda 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit kullanılarak Glomax Multi Detection System cihazı ile 0. ve 72. saatlerdeki hücre canlılığı ölçülmüştür.

3.3. İnvazyon Deneyi

Planlanan bu deneyde ilk olarak hiçbir şey uygulanmamış kontrol grubu, TGF-β (10 ng/ml), p38 inhibitörü SB203580 (10 µM) , PI3K inhibitörü LY294002 (20 µM), NF-κB inhibitörü Bay11-7082 (A549 için 10 µM; H1650 için 5 µM) ve RANKL inhibitörü osteoprotegerin (100 ng/ml) ile muamele edilen hücrelerin ve TGF-β'nın p38 inhibitörü SB203580, PI3K inhibitörü LY294002, NF-κB inhibitörü Bay11-7082 ve RANKL inhibitörü osteoprotegerin ile birlikte muamele edildiği hücrelerin invazyon kapasitelerindeki değişimler tespit edilmiştir. Bunun için BioCoat Matrigel İnvazyon Chamber-İnvazyon odaları (BD Biosciences, Clontech) kullanıldı. Bu invazyon odacıklarının hücrelere sağladıkları özel şartlar sayesinde biz in vitro koşullar

altında hücrelerin invaziv özelliklerini saptayabilmekteyiz. Bu invazyon odacıkları 8 mikron çaplı porlar içeren bir membran ile örtülüdür ve bu porlu membran ayrıca bir matrijel matrix ile kaplıdır. Bu matrigel matrix bize bazal membranı invitro koşullarda oluşturma imkanı sağlar. Bu membran sayesinde invasive özelliği olmayan hücrelerin membranın diğer yüzeyine geçmesi engellenmektedir. Bu membrandan diğer yüze ancak invaziv hücreler geçebilmektedir. Dolayısı ile matrijel membran bize invaziv ve invaziv olmayan hücrelerin birbirinden ayırabilme imkanı sunar. Farklı muamelelere maruz bıraktığımız hücreler, $1,25 \times 10^5$ olacak şekilde invazyon odalarına ekilecek üzerlerine 0.5ml besiyeri (serum içermeyen) konuldu, invazyon odacığının dışına 0.75 ml %10 FBS içeren besiyeri konulacak hücreler 24 saat 37C de CO₂'li inkübatörde inkübe edildiler. İnkübasyon saatinin sonunda invaziv özellikte olan hücreler invazyon odacığının porlu olan membranının dış yüzeyine geçeceklerinden invazyon odacığının içindeki besi yeri uzaklaştırılacak ve ardından spatülle içyüzeyindeki hücreler kazınıp atıldı. Dış yüzeydeki hücreler önce metanol ile fixe edilip, ardından da Toludine (%1) ile boyanıp, kurutuldu ve mikroskop altında invaziv hücreler sayıldı.

3.4. SDS-PAGE ve Western blot

Planlanan bu deneyde ilk olarak hiçbir şey uygulanmamış kontrol grubu, TGF- β (10 ng/ml), p38 inhibitörü SB203580 (10 μ M) , PI3K inhibitörü LY294002 (20 μ M), NF- κ B inhibitörü Bay11-7082 (A549 için 10 μ M; H1650 için 5 μ M) ve RANKL inhibitörü osteoprotegerin (100 ng/ml) ile muamele edilen hücrelerin ve TGF- β 'nin p38 inhibitörü SB203580, PI3K inhibitörü LY294002, NF- κ B inhibitörü Bay11-7082 ve RANKL inhibitörü osteoprotegerin ile birlikte muamele edildiği hücrelerde; Akt, p-Akt, p38, p-p38, Runx2, RANKL, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, Snail, Slug, Zeb1, SATB2 ve kontrol olarak GAPDH protein seviyelerini tespit etmek için kullanıldı. Bunun için; %70 yoğunluğa erişen hücreler seru-free besiyeri ile 24 saat inkübe edildiler. İnkübasyonun sonunda belirtilen dozlarda inhibitörler, TGF- β muamelesinden 1 önce uygulandı ve TGF- β muamelesi yapıldı ve ardından hücreler serum-free besi ortamında 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava ortamında 24 saat inkübe edildi. Bu hücre protein özütleri RIPA (0.15 molar NaCl, % 10 SDS, 0,05 molar tris-HCl pH: 7,65, % 1 NP-40 ve % 0,5 deoxycholate) tamponu içerisinde toplanacak, ardından 16000 x g'de, 4 °C'de 15 dakika santrifüj edilerek istenmeyen hücre artıklarının ortamdan uzaklaştırıldı. Toplanan protein örneklerinin konsantrasyonu Bradford yöntemi ile tayin edildi. Daha sonra örneklerden, mikrolitrede 100 mikrogram protein olacak şekilde alındı. Bunların üzerlerine protein yükleme boyasından da (100 mM Tris-HCL (pH6.8), %12 betamerkaptoetanol, 2% SDS, 1% Bromofenol blue, 20% gliserol) 1:1 oranında eklenip, örnekler 5 dakika 95°C'de kaynatıldı. Kaynatma işleminin hemen ardından 10 mikrolitrelik otomatik pipet kullanılarak, ependorf tüp

içindeki örnekler %10'luk manuel SDS jele yüklendi ve yürüme tamponu (Tris baz 0.1 M, HEPES 0,1 M, SDS 3 mM) ile 100 voltta 90 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez işleminin ardından proteinler transfer tamponu (20% metanol, 50 mM Tris, 40 mM glisin) içinde 4 °C'de 90 mA akım şiddetinde bir gece boyunca immünobolin membran (Millipore) üzerine transfer edildi. Bu işlemden sonra membran, %5'lik kuru süt tozu içeren TBST (34 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH:7,6 %1 Tween 20) çözeltisi içinde oda sıcaklığında 2 saat blokladı. Ardından aynı membran %5 kuru süt içinde 1:5000 (Akt, p-Akt, p38, p-p38, Runx2, RANKL, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, Snail, Slug, Zeb1 ve SATB2) ve 1:50.000 (GAPDH) oranlarında bulunan primer antikolarla oda sıcaklığında 1 saat işaretlendi. Membran üzerindeki spesifik proteinlerin ilgili primer antikolarla işaretlenmesinin ardından, membran 1 saat TBST ile oda sıcaklığında yıkandı. Yıkama işleminden sonra membran primer antikoların immüno globulinlerine karşı spesifik olarak geliştirilmiş olan ve 1:10000 oranında HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor bulunduran %5 kuru sütlü TBST çözeltisi içerisinde tekrar işaretlendi. İşaretleme oda sıcaklığında 1 saat yapıldıktan sonra, ECL (Enhanced Chemiluminescence) solüsyonu kullanılarak kemilümines reaksiyonu başlatıldı ve spesifik protein bantları kemilüminesansa duyarlı film kullanılarak karanlık odada bekletilerek tamamlanan bu protokol ile ilgili proteinlerin seviyeleri tespit edildi.

3.5. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Planlanan bu deneyde ilk olarak hiçbir şey uygulanmamış kontrol grubu, TGF- β (10 ng/ml), p38 inhibitörü SB203580 (10 μ M), PI3K inhibitörü LY294002 (20 μ M), NF- κ B inhibitörü Bay11-7082 (A549 için 10 μ M; H1650 için 5 μ M) ve RANKL inhibitörü osteoprotegerin (100 ng/ml) ile muamele edilen hücrelerin ve TGF- β 'nın p38 inhibitörü SB203580, PI3K inhibitörü LY294002, NF- κ B inhibitörü Bay11-7082 ve RANKL inhibitörü osteoprotegerin ile birlikte muamele edildiği hücrelerde; Akt, p-Akt, p38, p-p38, Runx2, RANKL, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, Snail, Slug, Zeb1, SATB2 ve kontrol olarak GAPDH protein seviyelerini tespit etmek için kullanıldı. Bunun için; %70 yoğunluğa erişen hücreler serum-free besiyeri ile 24 saat inkübe edildiler. İnkübasyonun sonunda belirtilen dozlarda inhibitörler, TGF- β muamelesinden 1 önce uygulandı ve TGF- β muamelesi yapıldı ve ardından hücreler serum-free besi ortamında 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava ortamında 24 saat inkübe edildi. EMSA metodu için; hücreler Runx2 aktivite tayini için, 40 mM HEPES, pH 7.0, 100 mM KCL, %1 Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mikrogram aprotinin, 1 mikrogram pepstatin A, ve 1 mikrogram leupeptin çözeltisi içerisinde lizis edildi ve bu lizattan 6 mikrogram protein izole edilerek Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) uygulandı. Hücresel protein non-radyoaktif olarak işaretlenmiş double strand Runx2 probu (5'-

CAGAAACCAACCACAGGACCCAAACCACAGCCTCCAC-3') ile 1 X Tris-EDTA, 1 mM KCl, %10 gliserol, 1 mM dithiothreitol, ve 1 mg/ml polydeoxycytosine-deoxyinosine içeren çözelti içerisinde 30 dakika oda sıcaklığında reaksiyona bırakıldı. Ardından örnek %5 polyacrylamid jele yüklenip elektroforez yapıldı. Elektroforez işleminin bitiminde jel nylon membrana blotlanarak ve oluşan DNA-protein kompleksi non-radyoaktif detektör kit (PIERCE) kullanılarak tespit edildi.

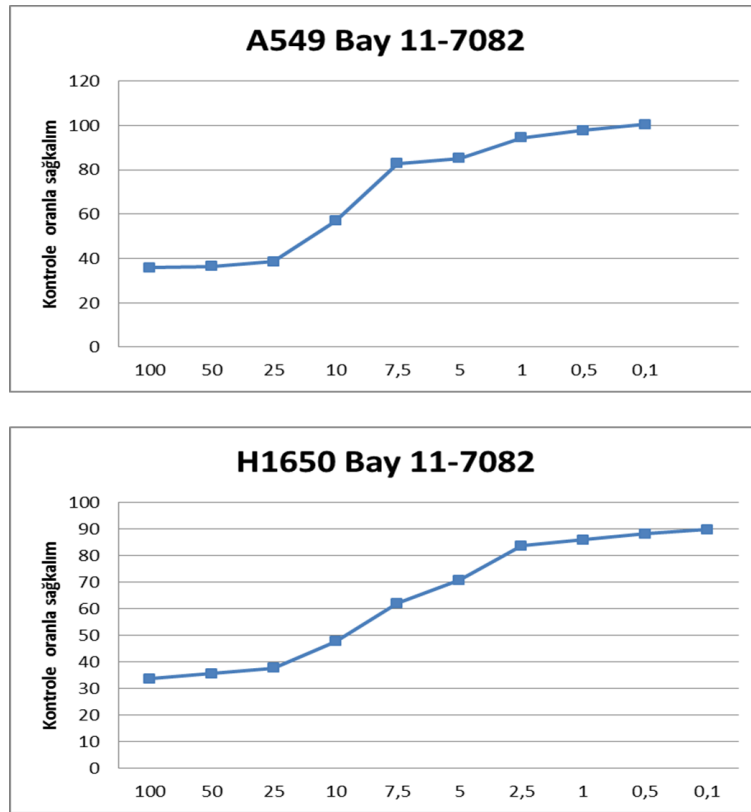
3.6. Dual luciferase gene reporter assay

Planlanan bu deneyde ilk olarak hiçbir şey uygulanmamış kontrol grubu, TGF- β , p38 inhibitörü SB203580, PI3K inhibitörü LY294002, NF- κ B inhibitörü Bay11-7082 ve RANKL inhibitörü osteoprotegerin ile muamele edilen hücrelerde ve TGF- β 'nin p38 inhibitörü SB203580, PI3K inhibitörü LY294002, NF- κ B inhibitörü Bay11-7082 ve RANKL inhibitörü osteoprotegerin ile birlikte muamele edilen hücrelerde, NF- κ B aktivitesinin tayini için lusiferaz aracılı gen reporter sistem kullanılarak yapıldı. Bu yöntem için; NF- κ B reporter vektörü Prof.Dr. David Donner'dan alınmıştır. (University of California, USA) Dolayısı ile NF- κ B reporter vektörü ve transfeksiyon verimliliğini gösterecek olan kontrol vektörü renilla lusiferaz ile birlikte lipofectamine 2000 transfeksiyon ajanı kullanılarak transfekte edildi. 24 saat sonra hücreler, serumsuz besiyeri ile değiştirilip ve 24 saat daha inkübe edildi. Böylece tüm hücrelerin G₀ fazına gelmelerinin sağlanmasının ardından, hiçbir şey uygulanmamış kontrol grubu, TGF- β , p38 inhibitörü SB203580, PI3K inhibitörü LY294002, NF- κ B inhibitörü Bay11-7082 ve RANKL inhibitörü osteoprotegerin ile muamele edilen hücrelerde ve TGF- β 'nin p38 inhibitörü SB203580, PI3K inhibitörü LY294002, NF- κ B inhibitörü Bay11-7082 ve RANKL inhibitörü osteoprotegerin ile birlikte muamele edilen hücrelerdeki NF- κ B aktivitesi promega luciferase detection kit kullanılarak luminometre yardımı ile tespit edilmiştir.

4. BULGULAR

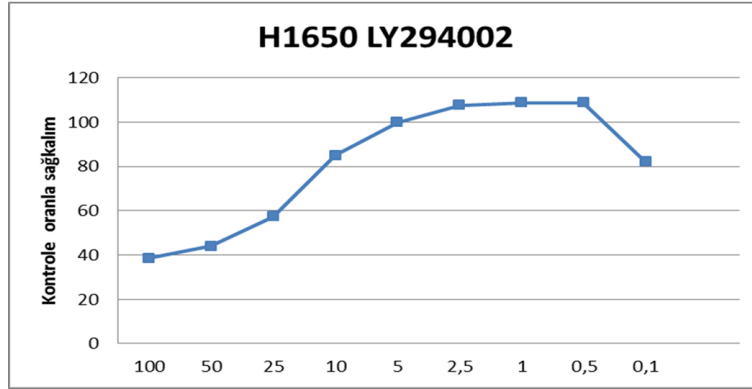
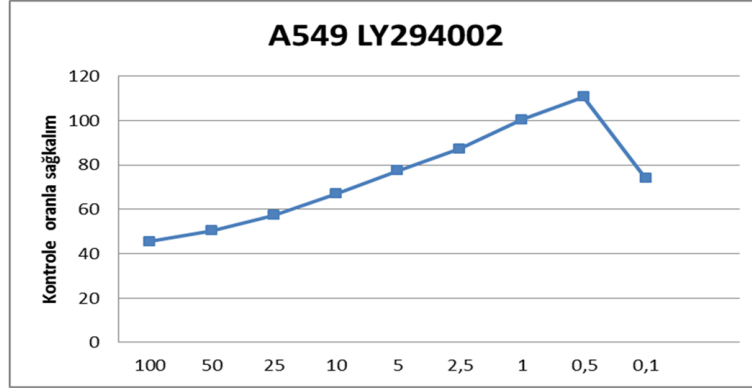
Çalışmamızda kullanacağımız spesifik inhibitörlerin A549 ve H1650 hücre dizileri üzerine sitotoksik etkisi olup olmadığını saptamak için hücreleri BAY 11-7082, LY294002 ve SB203580 inhibitörleri ile değişik dozlarda 72 saat inkübe ettik. Ardından bu inhibitörlerin hücre canlılığına etkilerini luminometrik yöntemle saptadık. Bu deneydeki amacımız literatürde kullanılan etkin inhibitör konsantrasyonlarının A549 ve H1650 hücreleri üzerinde aşırı derecede sitotoksik olup olmadığını saptamaktır. Sitotoksikite deneylerimizin ardından Literatürde NF- κ B'nin baskılanması için kullanılan (bu bağlamda projemizde de kullanmış olduğumuz) A549 hücresi için 10 μ M ve H1650 hücresi için ise 5 μ M Bay 11-7082 dozunun, A549 ve H1650 hücreler için IC₅₀ değerlerinin üstünde (72 saatlik inkübasyonun ardından) olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1).

4.1. Bay11-7082, LY294002, SB203580 İnhibitörlerinin Hücre Canlılığına Etkileri



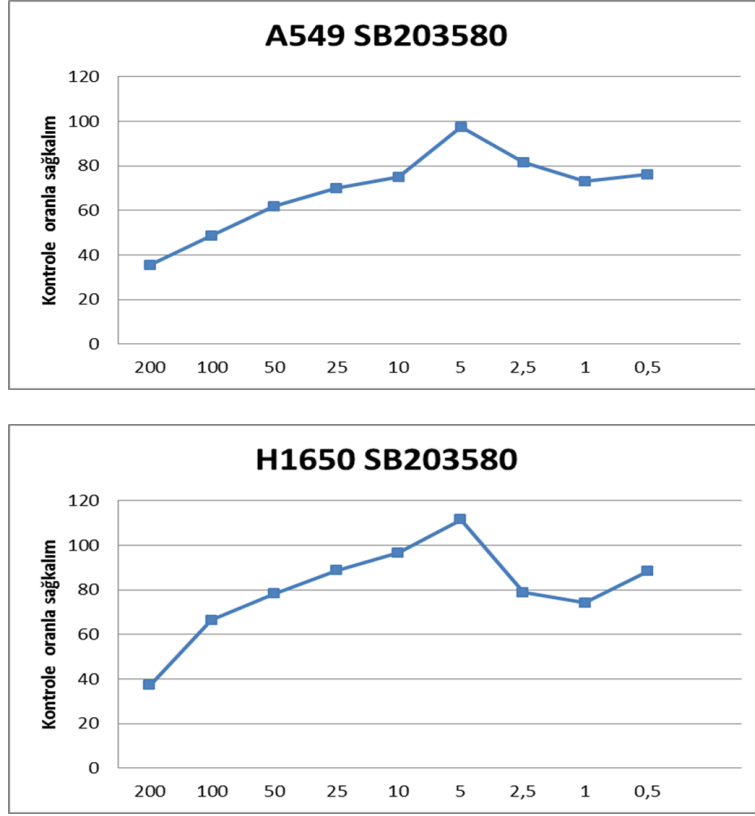
Şekil 4.1. NF- κ B inhibitörü Bay 11-7082'nin uygulamanın 72. saatinde A549 ve H1650 hücre canlılıkları üzerine etkisi.

PI3K/AKT spesifik inhibitörü LY294002'nin AKT inaktivasyonu için literatürde kullanılan etkin 20 μ M dozunun A549 ve H1650 hücreleri için IC₅₀ değerlerinin üzerinde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. PI3K inhibitörü LY294002'nin uygulamanın 72. saatinde A549 ve H1650 hücre canlılıkları üzerine etkisi.

p38 spesifik inhibitörü SB203580'nin Literatürde p38'in baskılanması için kullanılan ve bu bağlamda projemizde de kullanmış olduğumuz 10 μM SB203580 dozunun, A549 ve H1650 hücreler için IC₅₀ değerlerinin üstünde (72 saatlik inkübasyonun ardından) olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3).

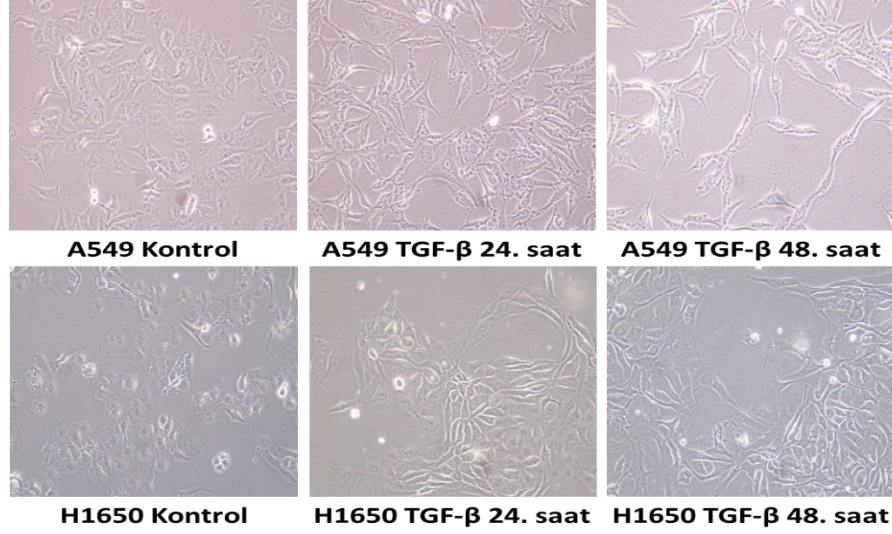


Şekil 4.3. p38 inhibitörü SB203580'nin uygulamanın 72. saatinde A549 ve H1650 hücre canlılıkları üzerine etkisi.

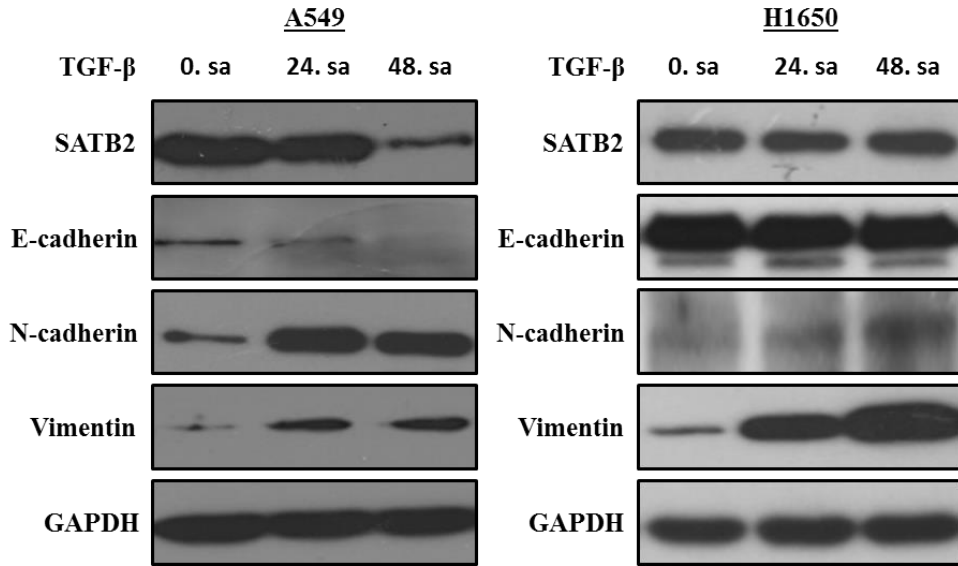
4.2. TGF- β uygulamasının A549 ve H1650 hücre morfolojileri ve EMT belirteçlerinin ekspresyonları üzerindeki etkileri

Projemizde EMT indüksiyonu için TGF- β seçilmiştir. Hücrelerinin epitel morfolojiden mezenşimal morfolojiye geçip geçmedikleri TGF- β (10 ng/ml) uygulamasının ardından 24. ve 48. saatlerinde hücreler fotoğraflanarak saptanmıştır. Şekil 4.4'de görüldüğü üzere; TGF- β muamelesi A549 hücrelerini epitel karakterlerinden mezenkimal karaktere dönüşümünü indüklemiştir. Ancak; H1650 hücrelerinin A549 hücrelerinde olduğu gibi TGF- β uygulamasına iyi yanıt veremediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Bununla bağlantılı olarak; TGF- β muamelesi A549 hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunu azaltıp, N-kaderin ve Vimentin ekspresyon seviyelerini artırarak EMT sürecini indüklemiştir. TGF- β muamelesi H1650 hücrelerinde N-kaderin ve Vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonlarını artırsa da, E-kaderin ekspresyon seviyesini düşürmediği için, TGF- β uygulaması H1650 hücrelerinde EMT sürecini tam olarak indükleyememiştir (Şekil 4.5). İlginçtir ki; TGF- β muamelesine yanıt olarak E-kaderin ekspresyon seviyesinin azaldığı A549 hücrelerinde SATB2 ekspresyonunun da azaldığı ve buna karşın E-kaderin seviyesinin düşmediği, H1650 hücrelerinde ise SATB2 ekspresyon seviyesinin de azalmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). Bu bakımından, KHDAK

hücrelerinde TGF- β ile indüklenen EMT sürecinde SATB2'nin kilit bir molekül olabileceği öngörülmüştür.



Şekil 4.4. TGF- β muamelesinin A549 ve H1650 hücre morfolojileri üzerine etkisi.

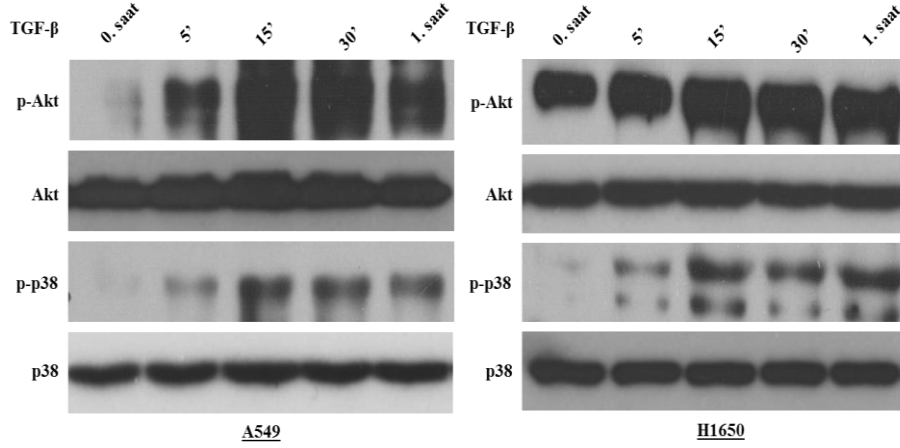


Şekil 4.5. TGF- β muamelesinin A549 ve H1650 hücrelerindeki EMT belirteçlerinin ekspresyonları üzerine etkisi.

4.3. TGF- β uygulamasının A549 ve H1650 hücrelerinde Akt ve p38 yollarının aktivasyonları üzerine etkisi

Çalışmamızın bu kısmında, TGF- β muamelesinin A549 ve H1650 hücrelerinde Akt ve p38 yollarını aktive edebildiğini göstermek amacıyla, hücreleri 0 dk, 5 dk, 15 dk, 30 dk ve 1 saat sürelerince TGF- β ile muamele ettik ve bu hücrelerdeki p-Akt ve p-p38 seviyelerini Western Blot analizi ile tespit ettik. TGF- β muamelesi her iki hücrede de 5 dk'dan itibaren p-

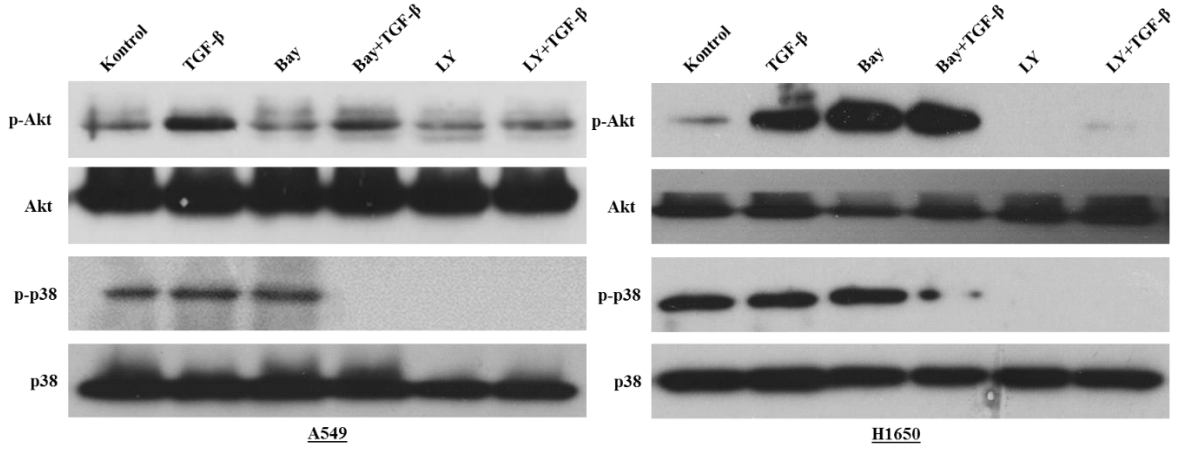
Akt ve p-p38 seviyeleri artmıştır (Şekil 4.6). Sonuç olarak; literatür ile uyumlu olarak TGF-β'nin Akt ve p38 yollarını A549 ve H1650 hücrelerinde de aktive ettiği saptanmıştır.



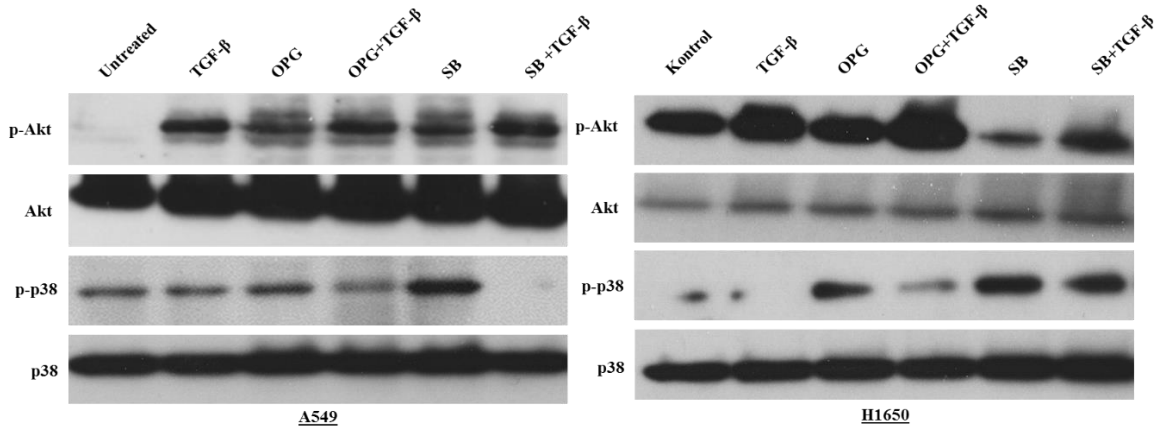
Şekil 4.6. TGF-β uygulamasının A549 ve H1650 hücrelerinde Akt ve p38 yollarının aktivasyonları üzerine etkisi.

4.4. Bay 11-7082, LY294002, OPG ve SB203580 inhibitörlerinin TGF-β-tarafından indüklenen p-Akt ve p-p38 seviyelerine etkileri

Hipotezimizin doğrultusunda; TGF-β ile indüklenen EMT sürecinde Akt ve p38 gibi SMAD-dışı yolların etkilerini araştırdık. Bunun için; PI3K/Akt yolağın inhibitörü LY294002'nin, TGF-β ile indüklenen p-Akt seviyesi üzerindeki etkisi Western Blot analizi ile tespit ettik. Şekil 4.7'de görüldüğü üzere LY294002 inhibitörünün hem tek başına hem de TGF-β'nin varlığında p-Akt seviyesini her iki hücrede de inhibe etmiştir. Projemizde NF-κB aktivasyonunu inhibe etmek için kullanılan Bay 11-7082 inhibitörünün, A549 hücrelerinde TGF-β ile indüklenen p-Akt seviyesini azaltsa da kontrole oranla p-Akt seviyesi yüksek olduğu görülmektedir. Sonuç olarak; NF-κB spesifik inhibitörü Bay 11-7082'nin, p-Akt seviyesi üzerinde inhibe edici bir etkisinin olmadığı görülmektedir. p38 yolağı inhibitörü olan SB203580'nin p-p38 seviyesine etkisine bakıldığında her iki hücrede de anlamlı bir sonuç görülmemiştir (Şekil 4.8). Bunun nedeni; p38 inhibitörü olan SB203580'nin, p38'i inhibe etme mekanizması üst yolağı tarafından fosfatlanmasını değil, kinaz aktivitesini inhibe ederek alt yollarındaki hedeflerini fosfatlamasını engellemesidir.



Şekil 4.7. Bay 11-7082 ve LY294002 inhibitörlerinin TGF- β -tarafından indüklenen p-Akt ve p-p38 seviyelerine etkileri.



Şekil 4.8. Osteoprotegerin (OPG) ve SB203580 inhibitörlerinin TGF- β -tarafından indüklenen p-Akt ve p-p38 seviyelerine etkileri.

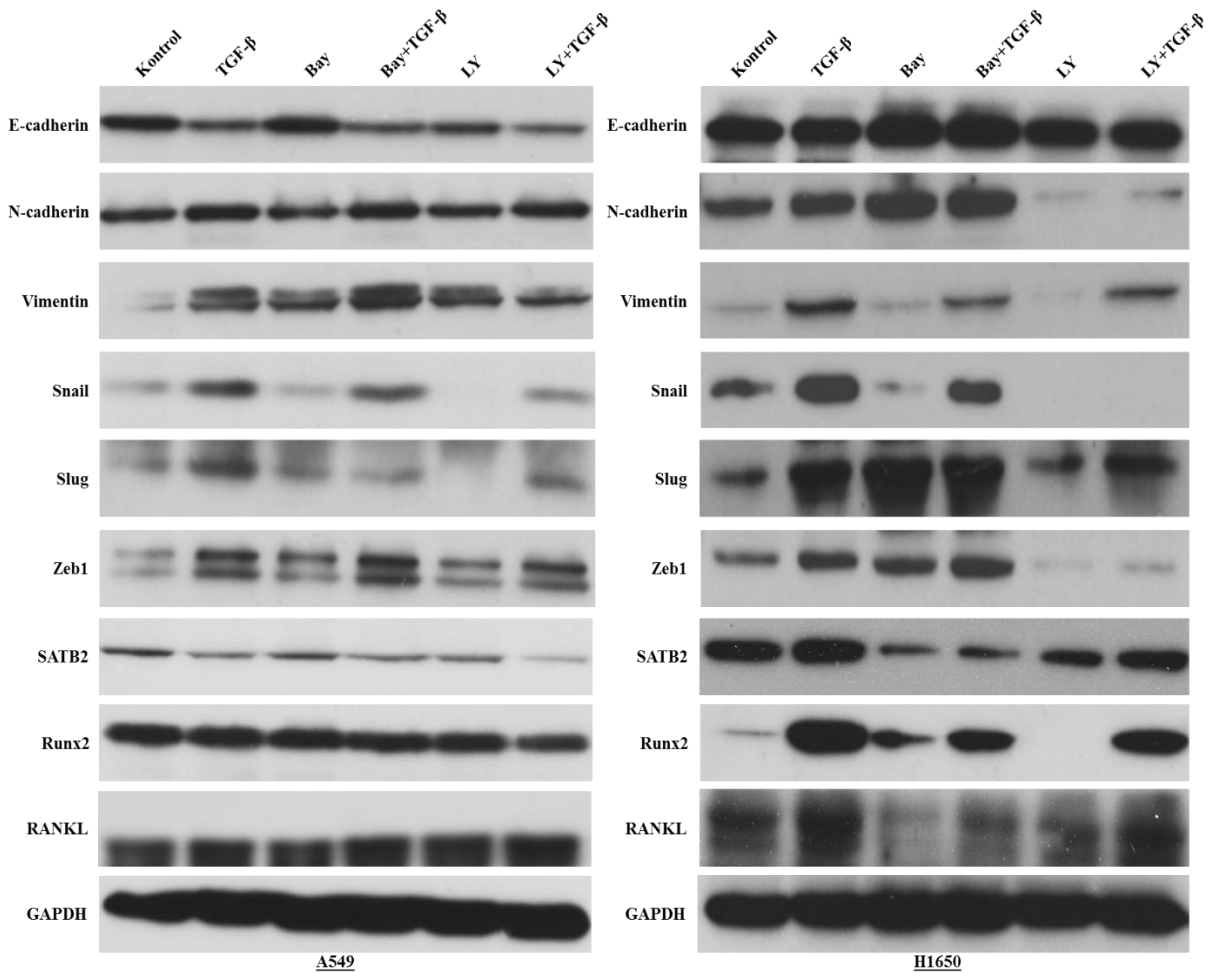
4.5. NF- κ B inhibitörü BAY 11-7082 ve PI3K/Akt yolağı inhibitörü LY294002'nin EMT belirteçleri, Runx2 ve RANKL ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri

Çalışmamızın bu bölümünde, projede kullanmış olduğumuz I κ B α /NF- κ B yolağı inhibitörü Bay 11-7082, PI3K/Akt yolağı inhibitörü LY2094002'nin, EMT belirteçleri olan E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, Snail, Slug, Zeb1 ve projede taahhüt etmiş olduğumuz üzere Runx2 ve RANKL ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerini Western Blot analizi ile tespit ettik. Daha önceki sonuçlarımızdan, TGF- β 'nin A549 hücrelerinde EMT sürecini indükleyebildiğini göstermiştik. Ancak; TGF- β muamelesi, H1650 hücrelerinde N-kaderin ve Vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonlarını artırır da E-kaderin seviyesini inhibe edememişti ve bu nedenle EMT süreci tam olarak indüklenememişti (Şekil 4.5). Şekil 4.9'da görüldüğü üzere; bağımsız olarak yapmış olduğumuz bu deneyde de aynı tablo ile karşılaşılmıştır. TGF- β , A549 hücrelerinde E-kaderin seviyesini azaltmış ve N-kaderin, Vimentin, Snail, Slug ve Zeb1 gibi

mezenkimal belirteçlerin ekspresyonlarını artırmıştır (Şekil 4.9). Ayrıca; TGF- β muamelesi her iki hücre de RANKL ekspresyon seviyesini artırmıştır (Şekil 4.9). Runx2 seviyesi, TGF- β uygulamasına karşı A549 hücrelerinde değişmezken, H1650 hücrelerinde dramatik bir şekilde artmıştır (Şekil 4.9). Bu farklılık, iki hücrenin TGF- β uyarımına karşı verdikleri farklı tepkinin nedeni olabilir. A549 hücrelerinde Bay 11-7082 inhibitörü, TGF- β ile indüklenen Snail ve Slug ekspresyon artışını azaltsa da E-kaderin, N-kaderin, Vimentin ve Zeb1 gibi kritik EMT belirteçlerinin ekspresyonları etkilememiştir, ayrıca NF- κ B inhibitörü Bay 11-7082, A549 hücrelerinin Runx2 ve RANKL ekspresyon seviyeleri üzerinde de bir etkisi görülmemiştir (Şekil 4.9). Bu sonuç; hipotezimizde öngörmüş olduğumuz TGF- β ile indüklenen EMT sürecinde NF- κ B'nin düzenleyici bir rolü olduğu görüşünü çürütmüştür. LY294002 inhibitörü, A549 hücrelerinin Zeb1 ekspresyon seviyesini etkilemese de, Snail ve Slug ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Bu sonuç, PI3K/Akt yolağının Snail ve Slug gibi EMT yürütücü transkripsiyon faktörleri üzerinde düzenleyici olduğunu göstermektedir. A549 hücrelerinde, PI3K/Akt yolağının TGF- β -indüklü N-kaderin ekspresyon artışını inhibe edememesine karşın, Vimentin ekspresyon seviyesini azaltabilmiştir. A549 hücrelerinde, LY2094002 inhibitörünün tek başına muamelesi E-kaderin ekspresyonunu düşürmesi ve TGF- β -indüklü E-kaderin down-regülasyonunu artırması ilginç bir sonuç olmuştur. A549 hücrelerinde LY294002 inhibitörünün varlığı, RANKL ve Runx2 ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Tüm bu sonuçlar; A549 hücrelerinde PI3K/Akt ve I κ B α /NF- κ B yollarının, Snail ve Slug gibi önemli EMT sürecini yöneten transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarının regülasyonunda rollerinin olmasına karşın, TGF- β tarafından indüklenen EMT sürecindeki düzenleyici rollerinin olmadığını ifade etmektedir.

TGF- β , H1650 hücrelerinde N-kaderin, Vimentin, Snail, Slug ve Zeb1 gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonlarını artırmasına rağmen, E-kaderin seviyesini azaltmış ve bu nedenle EMT sürecini tam olarak indükleyememişti (Şekil 4.9). H1650 hücrelerinde Bay 11-7082 inhibitörü, TGF- β ile indüklenen Snail ve Vimentin ekspresyonunu azaltmıştır. Bu nedenle; H1650 hücrelerinde Snail ve Vimentin ekspresyonu NF- κ B tarafından düzenlenmektedir. Ancak; H1650 hücrelerinde E-kaderin, N-kaderin ve Zeb1 gibi kritik EMT belirteçlerinin ekspresyonları Bay 11-7082 inhibitörü tarafından azaltılamamıştır (Şekil 4.9). H1650 hücreleri, zaten TGF- β tarafından EMT sürecine giremedikleri için, NF- κ B'nin bu süreçteki rolünden bahsedemeyiz. Bu sonuç da, hipotezimizde öngörmüş olduğumuz TGF- β ile indüklenen EMT sürecinde NF- κ B'nin düzenleyici bir rolü olduğu görüşünü çürütmüştür. Bay 11-7082 inhibitörünü, H1650 hücrelerinin Runx2 ve RANKL ekspresyon seviyeleri üzerinde düzenleyici bir role sahip olduğu açıkça ise görülmektedir (Şekil 4.9). Bu nedenle; bu hücrelerdeki Runx2 ve RANKL ekspresyonları NF- κ B bağımlı olarak düzenlendiği sonucu ortaya çıkmaktadır. LY294002 inhibitörü, H1650 hücrelerinin N-kaderin, Vimentin, Snail, Slug ve Zeb1 ekspresyon

seviyelerini azaltmıştır. Bu sonuç, PI3K/Akt yolağının H1650 hücrelerinin mezenkimal karakterinin en önemli düzenleyici yolağı olduğunu açıkça göstermektedir. H1650 hücrelerinde, PI3K/Akt yolağının inhibitörü LY2094002'nin, E-kaderin ekspresyonunu üzerinde bir etkisinin olmadığı da tespit edilmiştir. H1650 hücrelerinde LY294002 inhibitörünün varlığı, RANKL ve Runx2 ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Tüm bu sonuçlar; A549 hücrelerinde PI3K/Akt ve IKB α /NF- κ B yolaklarının, Snail ve Slug gibi önemli EMT sürecini yöneten transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarının regülasyonunda rollerinin olmasına karşın, TGF- β tarafından indüklenen EMT sürecindeki düzenleyici rollerinin olmadığını ifade etmektedir.



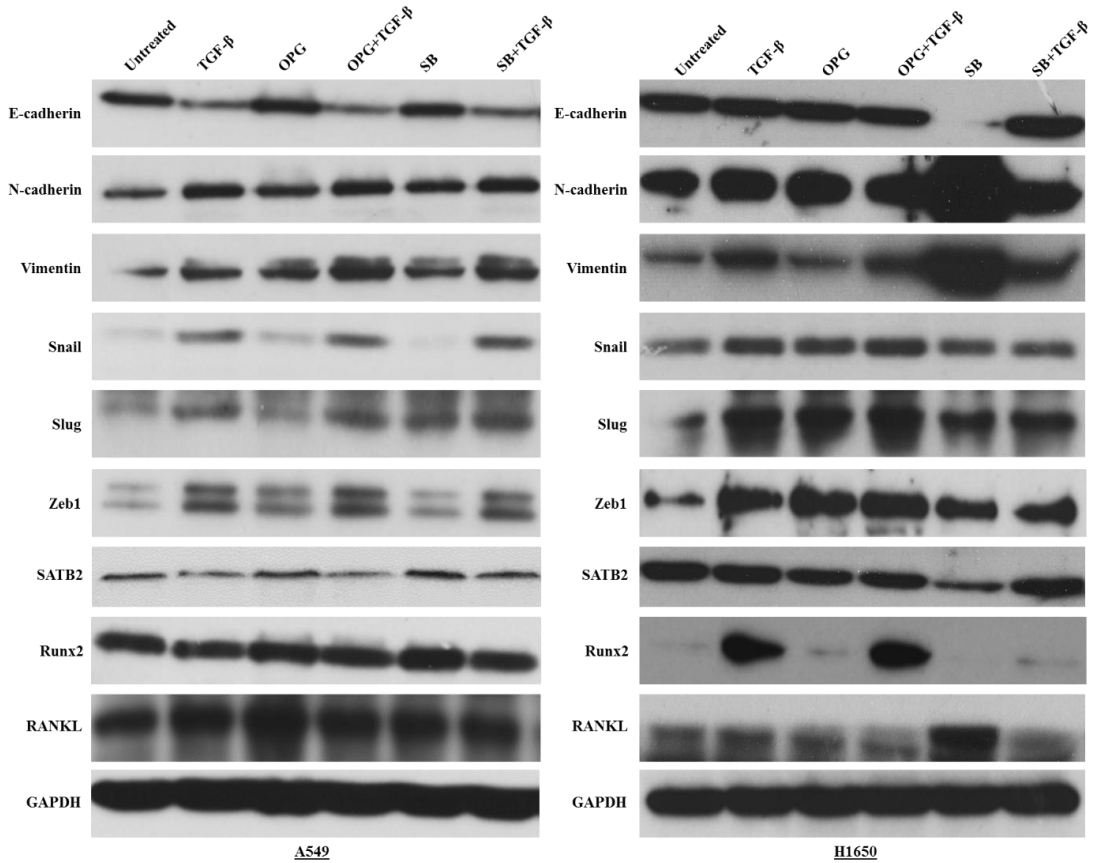
Şekil 4.9. NF- κ B inhibitörü BAY 11-7082 ve PI3K/Akt yolağı inhibitörü LY294002'nin EMT belirteçleri, Runx2 ve RANKL ekspresyon seviyeleri üzerine etkilerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi

4.6. RANKL/RANK/NF-κB yolağı inhibitörü osteoprotegerin (OPG) ve p38 inhibitörü SB203580'nin, EMT belirteçleri, Runx2 ve RANKL ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri

Çalışmamızın bu bölümünde, projede kullanmış olduğumuz RANKL/RANK//NF-κB yolağı inhibitörü Osteoprotegerin (OPG), p38 yolağı inhibitörü SB203580'nin, EMT belirteçleri olan E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, Snail, Slug, Zeb1 ve projede taahhüt etmiş olduğumuz üzere Runx2 ve RANKL ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerini Western Blot analizi ile tespit ettik. Daha önceki verilerimizden, Bay 11-7082 ile inhibe edilen NF-κB aktivasyonunun, Snail ve Slug gibi çeşitli EMT sürecini yöneten transkripsiyon faktörlerin ekspresyonları için gerekli olsa da, TGF-β tarafından indüklenen EMT sürecinde düzenleyici rolü olmadığı görülmüştür (Şekil 4.9). Bu nedenle; RANKL/RANK yolağı üzerinden gerçekleşen NF-κB aktivasyonunun OPG tarafından inhibisyonunun EMT sürecinde rolünün olmayacağı kanısında vardık. Şekil 4.10'da görüldüğü üzere; RANKL/RANK/NF-κB yolağı inhibitörü OPG'nin, TGF-β tarafından indüklenen N-kaderin ve Vimentin ekspresyonları ve TGF-β tarafından inhibe olan E-kaderin (yalnızca A549 hücrelerinde) ekspresyonu üzerinde bir etkisi olmadığı görülmüştür. Ayrıca, OPG'nin EMT sürecini yöneten transkripsiyon faktörler, RANKL ve Runx2 protein seviyelerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. A549 hücrelerindeki, TGF-β ile indüklenen EMT sürecindeki p38 yolağının etkisini, p38 yolağı inhibitörü SB203580'i kullanarak inceledik. Ancak, Şekil 4.10'da da görüldüğü gibi, p38 yolağının inhibisyonu da TGF-β ile indüklenen EMT sürecinde bir rolü olmadığı sonucuna vardık. Çünkü bu inhibitörün A549 hücrelerinde, TGF-β ile indüklenen E-kaderin ekspresyon seviyesinin düşüşü, N-kaderin ve Vimentin gibi mezankimal belirteçlerin ekspresyonlarının artışı üzerinde bir etkisini göremedik. SB203580 inhibitörünün varlığı TGF-β ile indüklenen RANKL ekspresyon seviyesindeki artışı inhibe etmiştir. Bu sonuç TGF-β'nin RANKL ekspresyon seviyesini artıracağı ve bu artışın p38 yolağı üzerinden gerçekleşebileceği hipotezimizi doğrulamaktadır. Ancak; daha önce de belirttiğimiz üzere, RANKL/RANK/NF-κB yolağının spesifik inhibitörü OPG'nin varlığı, A549 hücrelerinin TGF-β ile indüklenen EMT sürecinde bir etkiye sahip olmamıştır. Tüm bu sonuçlar, A549 hücrelerinin TGF-β ile indüklenen EMT sürecinde, SMAD dışı sinyal yollarının düzenleyici etkilerinin olmadığını göstermektedir.

RANKL/RANK/NF-κB yolağının spesifik inhibitörü OPG'nin, H1650 hücrelerinde etkilerini incelediğimizde, A549 hücrelerinden aksine farklı yanıt verdikleri görülmüştür. İlginç bir biçimde; OPG, H1650 hücrelerinde E-kaderin, Vimentin gibi EMT belirteçlerinin ekspresyonlarını etkilemese de, N-kaderin, Snail, Slug ve Zeb1 gibi EMT sürecinin dışında hücre invazyonu için de önemli olan proteinlerin ekspresyonlarını artırmıştır. Ayrıca, OPG'nin H1650 hücrelerine muamelesi, bu hücrelerdeki RANKL ekspresyonunu azaltırken, Runx2

seviyesini etkilememiştir. p38 yolağının SB203580 ile inhibisyonunun H1650 hücrelerinde çok farklı bir yanıtı yol açtığı görülmektedir (Şekil 4.10). Çok kuvvetli bir EMT uyarıcı olan TGF- β tarafından bile EMT'nin indüklenmediği H1650 hücrelerinin, p38 yolağının SB203580 ile inhibisyonunun, bu hücrelerde ilginç bir biçimde EMT'yi indüklediği tespit edilmiştir. Bunun nedeni; H1650 hücrelerinde TGF- β uyarımı neticesinde bile ekspresyonu azalmayan SATB2'nin, SB203580 ile muamelesi sonucu bu hücrelerde ekspresyonunun azalması olabilir. Bu sonuç; Şekil 4.5'deki sonuçlarımızda varsaymış olduğumuz, SATB2'nin KHDAK hücrelerinin EMT süreçlerinde anahtar bir molekül olabileceği hipotezimizi destekler niteliktedir. Ayrıca, yalnızca SB203580 muamelesi sonucu EMT süreci indüklenen H1650 hücre grubunda, RANKL ekspresyon seviyesinin de dramatik şekilde arttığı görülmektedir. SB203580 inhibitörünün H1650 hücrelerinde EMT sürecini indüklemesinden, RANKL ekspresyon seviyesinin bu dramatik artışı da sorumlu olabilir. Ayrıca, H1650 hücrelerinde SB203580 inhibitörünün varlığı TGF- β ile indüklenen Runx2 ekspresyon artışını inhibe etmektedir.



Şekil 4.10. RANKL/RANK/NF- κ B yolağı inhibitörü osteoprotegerin (OPG) ve p38 inhibitörü SB203580'nin, EMT belirteçleri, Runx2 ve RANKL ekspresyon seviyeleri üzerine etkilerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi.

4.7. IKB α /NF- κ B, PI3K/Akt, RANKL/RANK/NF- κ B ve p38 yolaklarının TGF- β ile indüklenen hücre invazyonundaki rolleri

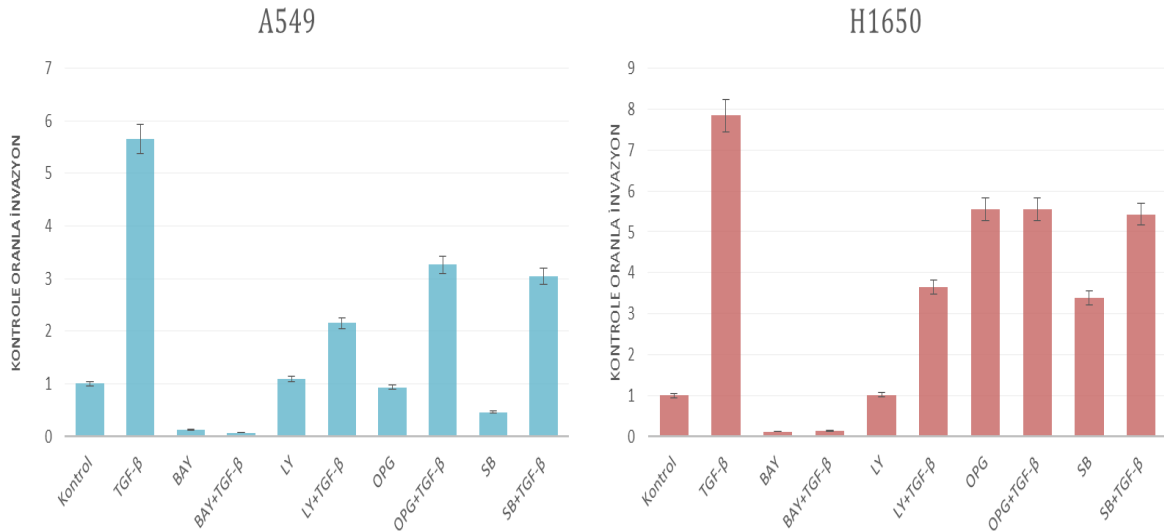
Projemizin bu kısmında, TGF- β 'nin A549 ve H1650 hücrelerinin invazyon kapasiteleri üzerine etkilerini ve TGF- β tarafından indüklenen SMAD-dışı sinyal yollarının inhibisyonunun bu süreçteki rolünü tespit etmeyi amaçladık. Western Blot analizi sonuçlarımız, SMAD-dışı yolların inhibisyonlarının, TGF- β -tarafından indüklenen EMT (yalnızca A549 hücreleri) sürecinde kritik bir öneme sahip olmadığını göstermektedir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Ancak; EMT süreci, kanser hücrelerinin invazyon mekanizmalarından yalnızca bir tanesidir. Yani, kanser hücreleri EMT sürecine girmeden dahi, invazyon kapasitelerini artırabilirler. TGF- β muamelesi hem A549, hem de H1650 hücrelerinin invazyon kapasitelerini güçlü bir şekilde artırmıştır (Şekil 4.11). Bay 11-7082 ile IKB α /NF- κ B yolağının inhibisyonu, hem TGF- β ile uyarılan hem de uyarılmayan A549 ve H1650 hücrelerinde invazyonu baskılamaktadır (Şekil 4.11). Bu sonuç, A549 ve H1650 hücrelerinde NF- κ B'nin EMT süreci üzerine kritik etkilerinin olmamasına karşın, KHDAK hücre invazyonu için anahtar bir eleman olduğunu göstermektedir. Bu durum, NF- κ B'nin MMP-2 ve MMP-9 gibi hücre invazyonunun önemli elemanlarının transkripsiyonel regülatörü olmasından kaynaklanıyor olabilir.

LY294002 ile PI3K/Akt yolağının inhibisyonu, TGF- β ile uyarılmayan A549 ve H1650 hücrelerinde invazyon kapasitesi üzerine anlamlı bir azalmaya neden olmazken, her iki hücre de TGF- β ile indüklenen hücre invazyonunu anlamlı şekilde azaltabilmiştir (Şekil 4.11). Bu sonuç, PI3K/Akt sinyal yolağının NF- κ B aktivasyonunu sağlayan en önemli yollardan biri olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ancak NF- κ B aktivasyonunun yalnızca bu yolak üzerinden olmamasından dolayı, NF- κ B'nin Bay 11-7082 tarafından direkt inhibisyonu ile benzer bir invazyon inhibisyonu gerçekleşmemektedir.

OPG ile RANKL/RANK/NF- κ B yolağının inhibisyonu, her iki hücrede invazyonu farklı şekilde etkilemiştir (Şekil 4.11). A549 hücrelerinde, hipotezimiz doğrultusunda, RANKL/RANK/NF- κ B yolağının inhibisyonu EMT sürecinde etkili olmamasına karşın, TGF- β ile indüklenen hücre invazyonunu anlamlı şekilde azaltmıştır (Şekil 4.11). Proje önerimizde, NF- κ B aktivasyonunun yalnızca PI3K/Akt sinyal yolağı tarafından gerçekleşmediği, RANKL/RANK gibi yolların da NF- κ B aktivasyonu için KHDAK hücrelerinde önemli olabileceği ve bu hücrelerin EMT süreçleriyle, invazyon kapasiteleriyle ilişkili olabileceği hipotezi kurulmuştu. OPG'nin A549 hücrelerinde invazyon kapasitesini azaltması bu hipotezimizi destekler niteliktedir (Şekil 4.11). A549 hücrelerinde, gerek NF- κ B'nin direkt inhibisyonu, gerekse de PI3K/Akt ve RANKL/RANK gibi aktivasyonunu sağlayan yolların inhibisyonu EMT süreciyle ilişkili olmasa da, hücre invazyonu ile direkt ilişkili olduğu

görülmektedir. OPG muamelesi H1650 hücrelerinde, A549 hücrelerinin aksine hücre invazyonunu ilginç bir biçimde artırmıştır (Şekil 4.11). Bu durum daha önceki sonuçlarımızda bahsettiğimiz üzere, OPG ile uyarılan H1650 hücrelerinde, N-kaderin, Snail, Slug ve Zeb1 gibi invazyon ile ilişkili proteinlerin ekspresyonlarını artırmıştı (Şekil 4.10). H1650 hücrelerinde, OPG uyarımının invazyon kapasitesi artışına neden olması bu invazyon ile ilişkili proteinlerin ekspresyonlarının artışıyla kaynaklanıyor olabilir.

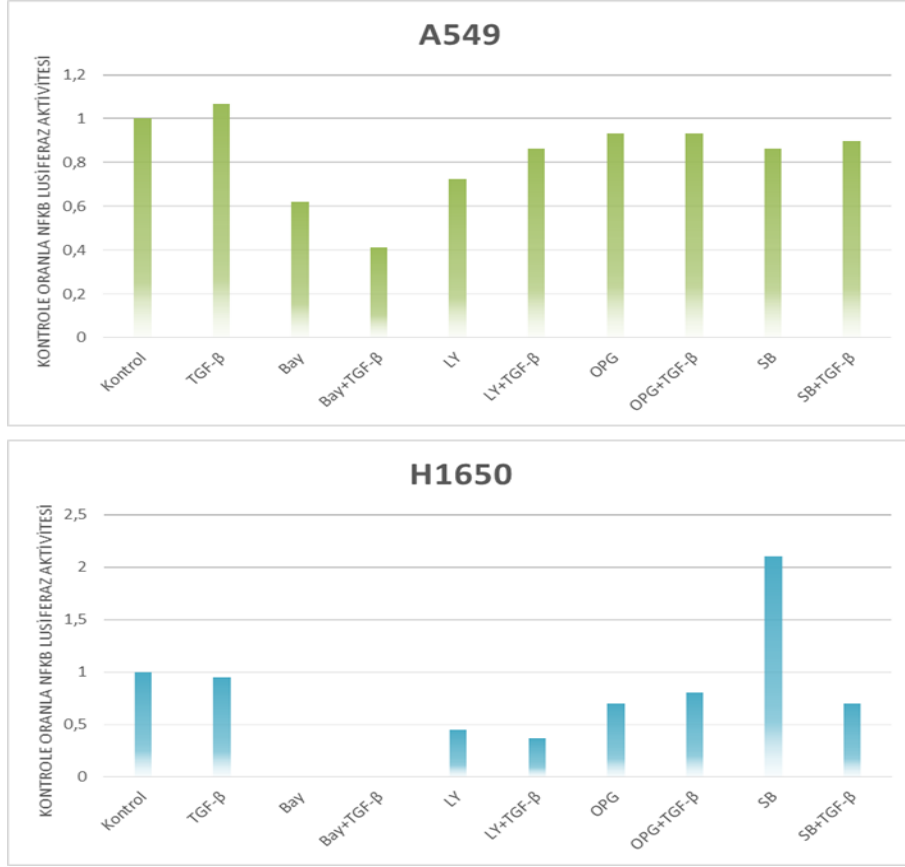
Son olarak; p38 yolağının SB203580 aracılı inhibisyonunun A549 ve H1650 hücrelerinin invazyon kapasiteleri üzerine etkilerine bakacak olursak, aynı OPG uyarımında olduğu gibi farklı bir tablo ile karşılaşmaktayız. Hipotezimizde p38 yolağının inhibisyonunun hücre invazyonunu baskılayabileceğini öngörmüştük. Bu doğrultuda, A549 hücrelerinde p38 inhibisyonunun hem de tek başına hem de TGF- β varlığında hücre invazyonunu önemli ölçüde azalttığı görüldü (Şekil 4.11). Bu duruma, SB203580 uygulanan A549 hücrelerinde TGF- β uyarımı ile artan RANKL ekspresyon seviyesinin inhibe olması yol açmış olabilir (Şekil 4.10). Çünkü, OPG'nin varlığında TGF- β ile indüklenen hücre invazyonu azalmıştı. Tüm bu sonuçlardan; A549 hücrelerinde hipotez ettiğimiz üzere, TGF- β /p38/RANKL/NF- κ B EMT sürecinde kritik bir rol oynamasa da, hücre invazyonu ile yakından ilişkili olduğu görülmektedir. H1650 hücrelerinde SB203580 muamelesi hücre invazyonunu artırıcı bir etki oluşturmuştur (Şekil 4.11). Bunun nedeni, p38 inhibisyonu sonucu SATB2 ekspresyonunun down-regüle olmasından ve EMT sürecinin indüklenmesi olabilir (Şekil 4.10). Tüm bu sonuçlar, SATB2'nin KHDAK hücrelerinin EMT süreçlerinde kritik bir molekül olabileceği görüşümüzü daha da güçlendirmektedir.



Şekil 4.11. IKBa/NF- κ B, PI3K/Akt, RANKL/RANK/NF- κ B ve p38 yollarının TGF- β ile indüklenen hücre invazyonundaki rolleri.

4.8. Bay 11-7082, LY294002, OPG ve SB203580 inhibitörlerinin NF-κB lusiferaz aktivitesine üzerine etkileri

Projemizin bu bölümünde, çalışmamız kapsamında kullanmış olduğumuz Bay 11-7082, LY294002, OPG ve SB203580 inhibitörlerinin NF-κB aktivitesi üzerine etkilerini, dual luciferase reporter assay yöntemi kullanarak tespit ettik. A549 hücrelerinde kullanmış olduğumuz inhibitörlerin hiçbiri NF-κB lusiferaz aktivitesi üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.12). TGF-β muamelesi bile bu hücrelerde NF-κB lusiferaz aktivitesini artıramamıştır. Western Blot analizi sonuçlarımızda; NF-κB inhibisyonu, TGF-β ile indüklenen EMT sürecinde Snail ve Slug gibi hem EMT hem de hücre invazyonu ile ilişkili bazı transkripsiyon faktörlerin ekspresyonlarını azaltsa da, sonuç olarak EMT sürecinde etkili olmamıştı. Lusiferaz sonuçlarında TGF-β'nin NF-κB aktivasyonuna neden olmaması bu durumu açıklamaktadır. H1650 hücrelerinde de, A549 hücrelerinde olduğu gibi TGF-β'nin NF-κB lusiferaz aktivitesini artırmadığı görülmektedir (Şekil 4.12). A549 hücrelerinde olduğu gibi, H1650 hücrelerinde de NF-κB inhibitörü Bay 11-7082 ve PI3K/Akt yolağı inhibitörü LY294002'nin NF-κB lusiferaz aktivitesini anlamlı ölçüde azaltabilmiştir (Şekil 4.12). H1650 hücrelerinde, OPG NF-κB lusiferaz aktivitesini ancak %30 oranında azaltırken, p38 inhibitörü SB203580 aktiviteyi 2 kat artırmıştır (Şekil 4.12). İki hücredeki bu ayrım; bu hücrelerdeki kanserleşme nedenlerinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Çünkü; A549 hücrelerinde KRAS mutasyonu bulunurken, H1650 hücrelerinde EGFR mutasyonu bulunmaktadır. Ayrıca H1650 hücreleri PTEN geni taşımadıkları için, p38 yolağının inhibisyonu, bu hücrelerdeki Akt yolağının daha da aktive olmasına ve dolayısıyla NF-κB'nin aktivasyonunu artırmış olabilir.

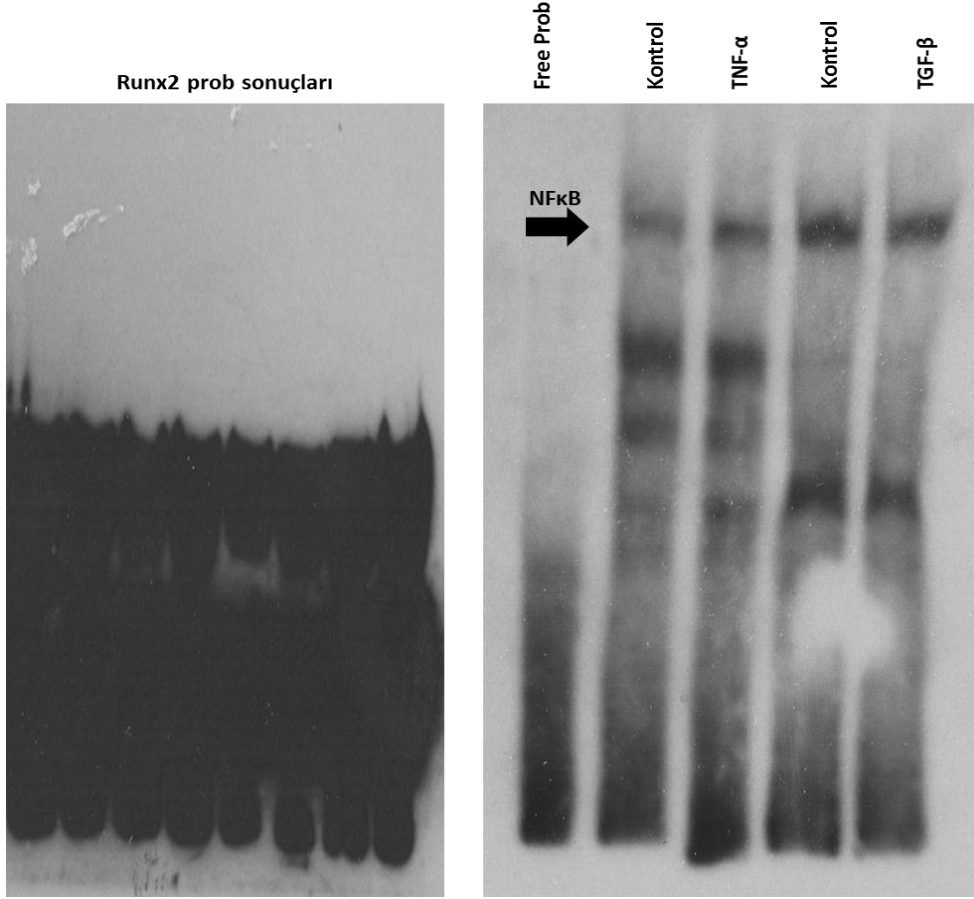


Şekil 4.12. Bay 11-7082, LY294002, OPG ve SB203580 inhibitörlerinin NF-κB lusiferaz aktivitesine üzerine etkileri

4.9. Runx2 aktivasyonunun EMSA yöntemi ile gösterilmesi

Projenin bu kısmındaki amacımız; TGF-β ile indüklenen p38 yolağının, Runx2 transkripsiyon faktörünü aktive etmesini ve hedef geni olarak hipotez ettiğimiz RANKL'nin promotor bölgesine bağlanıp bağlanmadığını tespit etmektir. Bunun için; Runx2 için spesifik bağlanma bölgeleri içeren RANKL promotor bölgesinin bir bölümünü içeren yaklaşık 30 nükleotid uzunluğunda 5' uçları biotinlenmiş çift zincirli oligonükleotid dizayn ettik ve Viagene firmasına sentez ettirdik. Ancak defalarca denememize karşın, RANKL EMSA deneyinden olumlu bir sonuç alamadık. (Şekil 4.13). Proje bütçemizin tamamını kullandığımızdan dolayı da, tekrardan bir prob satın alamadık. Deney prosedürü açısından bir hatamızın olup olmadığını tespit etmek için, labımızda mevcut bulunan 5' uçları biotinlenmiş çift zincirli NF-κB EMSA probu ile Runx2 için kullandığımız lizatlarla deneyi tekrarladık. NF-κB EMSA deneyinin başarı ile çalıştığını fakat RANKL EMSA deneyinin çalışmadığını görünce sorunun probtan olduğunu anladık. Sonuç olarak; deneysel prosedürümüzde herhangi bir yanlış olmadığını gördük (Şekil 4.13). NF-κB probu kullanarak gerçekleştirdiğimiz EMSA deneyi sonuçlarında, önemli bir NF-κB aktivatörü olarak bilinen TNF-α'nın, NF-κB'i aktive ettiği, ancak TGF-β'nin

NF- κ B'i aktive edemediği görülmektedir. Bu sonuç, NF- κ B lusiferaz reporter deneyi sonuçları ile örtüşmektedir. Sonuç olarak; A549 ve H1650 hücrelerinde NF- κ B aktivasyonu için TGF- β önemli bir uyarıcı olmadığı ortaya çıkmaktadır.

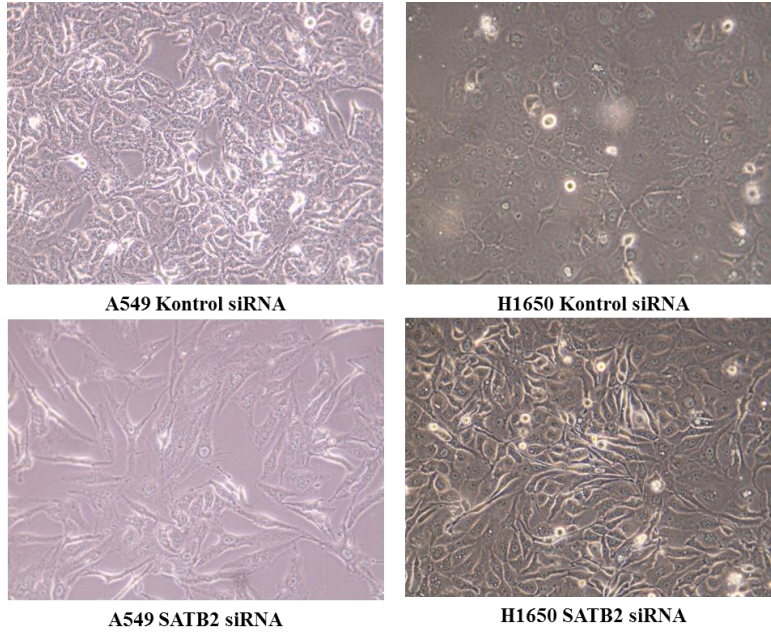


Şekil 4.13. Runx2 ve NF- κ B problemleri kullanılarak gerçekleştirilen EMSA deneyi sonuçları.

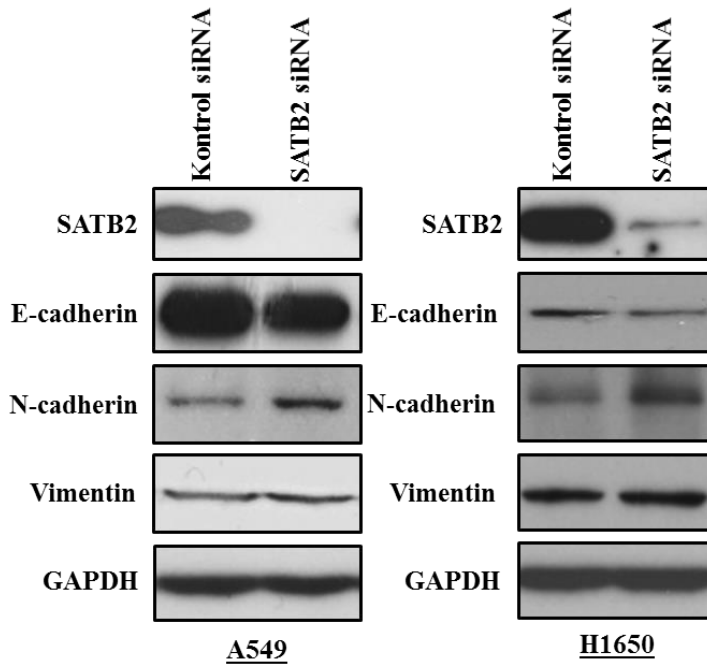
4.10. SATB2'nin KMDAK hücre morfolojisi ve EMT sürecindeki rolü

Western blot analizi sonuçlarımız, hipotez ettiğimiz gibi KMDAK hücrelerinin TGF- β ile indüklenen EMT süreçlerinde SMAD-dışı sinyal yollarının düzenleyici role sahip olmadığını gösterdi. Şekil 5'de görüldüğü üzere; TGF- β muamelesi sonucu A549 hücrelerinde EMT süreci indüklenirken, H1650 hücrelerinde indüklenememişti. Bununla paralel olarak; TGF- β muamelesinin, SATB2 ekspresyonunu A549 hücrelerinde baskılamak, H1650 hücrelerinde baskılayamaması, iki hücre bu farklılığın belirleyici unsur olabileceğini göstermişti. p38 inhibitörü SB203580'nin H1650 hücrelerinde EMT sürecini indüklemesi ve bu süreçte SATB2 ekspresyonunun da baskılanması bu görüşümüzü daha da güçlendirmişti (Şekil 4.10). Bu doğrultuda, proje kapsamında olmamasına karşın, bu iki hücrede TGF- β uyarımı yapmaksızın labimizde var olan SATB2 siRNAlar kullanılarak SATB2 ekspresyonunu baskıladık. Hipotez

ettiğimiz üzere; uyarı olmaksızın tek SATB2 ekspresyonunun baskılanması, her iki hücrede de EMT sürecini indükleyebilmiştir (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).



Şekil 4.14. siRNA aracılı SATB2 downregülasyonunun hücre morfolojisi üzerine etkisi

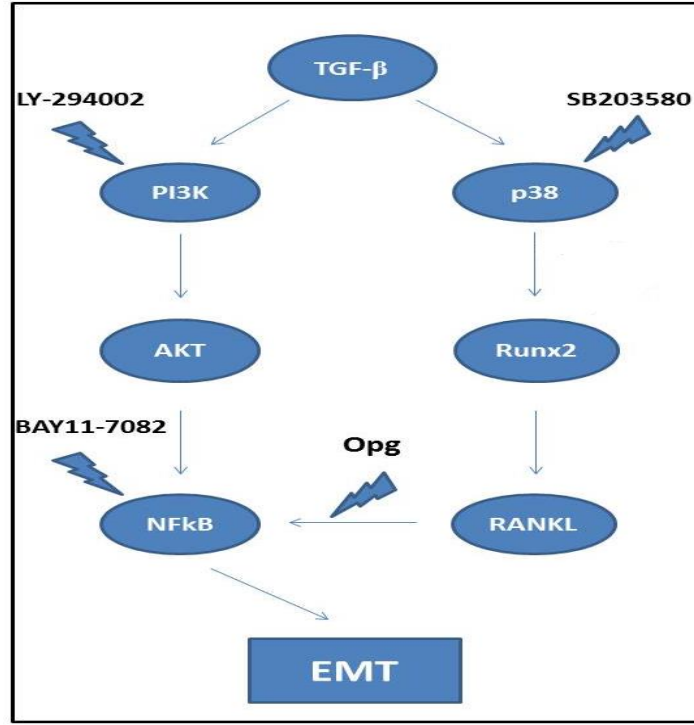


Şekil 4.15. SATB2'nin siRNA-aracılı susturulmasının A549 ve H1650 hücrelerinin EMT süreçlerindeki rolü.

Bu sonuçlar TGF beta'nın NSCLC hücreleri A549 ve H1650 hücreleri üzerinde EMT sürecinde NF- κ B/RANX2/RANKL yolağını kullanmadığını fakat SATB2'nin EMT düzenlenmesinde kritik bir rolü olduğunu açıkça göstermektedir.

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Proje kapsamında, KHDAK hücrelerinin TGF- β tarafından indüklenen EMT süreçlerinde, SMAD-dışı yolların, olası düzenleyici rollerini araştırmayı amaçladık. Çeşitli kanser türü hücrelerinde p38, JNK, Rho GTPase ve PI3K/Akt gibi sinyal yollarının EMT sürecinde düzenleyici rolleri olduğu ve TGF- β 'nın, bu yolları aktive edebildiği de bilinmektedir. Proje önerimizde, bu yollar arasında EMT ve invazyon süreçleriyle yakından ilişkili olan NF- κ B'nin aktivitesini düzenleyen en kritik yollardan biri olması nedeniyle PI3K/Akt sinyal yolağı hedef alınmıştır. Çeşitli kanser türlerinde NF- κ B EMT ilişkisini gösteren çalışmalardan literatür özetinde bahsedilmiştir. Literatüre göre; gerek TGF- β gerekse diğer EMT indikatörlerinin aracılığıyla indüklenen EMT sürecinde, NF- κ B'nin önemli bir yere sahip olduğu açıktır. Ancak; KHDAK hücrelerinin TGF- β tarafından indüklenen EMT süreçlerinde, NF- κ B'nin ne kadar etkili ve önemli bir yere sahip olduğu net değildir. Ayrıca; TGF- β 'nın, NF- κ B'i PI3K/Akt sinyal yolağının dışında aktive edebileceği başka yolların varlığı ve bu yolların TGF- β tarafından indüklenen EMT sürecindeki rolü de belirsizdir. Bu nedenle NF- κ B'i, PI3K/Akt sinyal yolağı dışında aktive ederek kanser hücrelerinin EMT ve invazyon süreçleriyle ilişkili olabilecek farklı bir yolk taradık. Literatür taramalarımızda, RANKL/RANK yolağının NF- κ B'nin aktivasyonunu sağladığı, EMT ve invazyon ile ilişkili olduğunu belirledik (Tsubaki vd 2013). İlginçtir ki; TGF- β tarafından indüklenen EMT ve invazyonda önemli bir yere sahip olan Runx2 transkripsiyon faktörünün de, RANKL geninin promotor bölgesine bağlanarak bu genin transkripsiyonu için bir aktivatör olduğunu gördük (Byon vd 2011). Literatürde TGF- β /Runx2/RANKL/NF- κ B ilişkisinin ve bu olası ilişkinin EMT ve invazyon süreçlerindeki rolü üzerine yapılmış bir araştırma bulunmamaktadır. Bu projede, Şekil 5.1'de görüldüğü üzere; literatürde daha önce araştırılmamış olan TGF- β /p38/Runx2/RANKL/NF- κ B sinyal yolağının KHDAK hücrelerinin EMT ve invazyon süreçlerindeki olası düzenleyici rolünü açıklamayı amaçladık.



Şekil 5.1. TGF-β/p38/Runx2/RANKL/NF-κB sinyal yolağının şematik gösterimi.

Bu amaç doğrultusunda ortaya çıkan sonuçlarımızı literatür ile karşılaştırarak tartışacak olursak; projemizde, A549 ve H1650 hücrelerinin 24 ve 48 saat süresince TGF-β ile muamelesi sonucunda EMT sürecinin indüklenip indüklenmediğini tespit ettik. Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te görüldüğü üzere; TGF-β'nın, A549 hücrelerinde EMT sürecini indükleyebilmesine karşın, H1650 hücrelerinde indükleyememiştir. TGF-β, H1650 hücrelerinde N-kaderin ve Vimentin gibi mezankimal belirteçlerin ekspresyonlarını arttırmasına rağmen, EMT'nin en önemli belirteçlerinden olan E-kaderin ekspresyon seviyesinin düşürülememesi sebebiyle, bu hücrelerde tam anlamıyla bir EMT süreci indüklenememiştir (Şekil 4.5). Literatüre bakıldığında, KHDAC hücrelerinde EMT süreci için, TGF-β'nın önemli bir indükleyici olduğu görülmektedir (Liu vd 2013). Ancak bazı çalışmalarda da; TGF-β'nın, KHDAC hücrelerinde N-kaderin ekspresyonunu arttırırsa da E-kaderin ekspresyonunu baskılayamadığını gösterilmektedir (Cao vd 2012). Bu nedenle sonuçlarımız literatür ile uyumludur. TGF-β'nın H1650 hücrelerinde EMT sürecini indükleyememesi, bu hücrelerdeki TGF-β reseptörlerinin ekspresyonunun ve/veya E-kaderin ekspresyonunun baskılanması için gerekli HDAC gibi epigenetik faktörlerin ekspresyonlarının yetersiz olmasından kaynaklanabilir. Çünkü, E-kaderin ekspresyonunun baskılanması için yalnızca EMT sürecini yöneten transkripsiyon faktörleri yeterli değildir. Bunun yanında birçok HDAC'lar ve kromatin yeniden modelleme proteinleri gibi epigenetik mekanizmalarda rol alan moleküllerin de ekspresyonları ve/veya aktivasyonları, E-kaderin ekspresyonunun baskılanması için kritik öneme sahiptir (Liu vd 2013). A549 ve H1650 hücreleri, KHDAC grubuna dahil olmalarına karşın birbirlerinden çok farklı karakterlere sahip

hücrelerdir. Örneğin; A549 hücreleri alveolar bazal epitel hücrelerden köken alırken, H1650 hücreleri bronşioalveolar hücrelerden köken almıştır. A549 hücreleri KRAS geninde G12S mutasyonu bulunurken, H1650 hücrelerinde EGFR geninde E746-A750del mutasyonu bulunmaktadır (Pallier vd 2012, Wu vd 2012). Ayrıca; H1650 hücreleri, A549 hücrelerinde farklı olarak PTEN geninden yoksundur. A549 ve H1650 hücrelerindeki tüm bu farklılıklar, TGF- β uyarımına karşı farklı yanıtlar oluşmasına neden oluyor olabilir. Bu çelişkiyi aydınlatmak için, H1650 hücre dizisine benzer şekilde EGFR mutasyonu taşıyan KHDAK hücrelerinde de, TGF- β uygulaması yapılarak hücrelerin EMT profillerini tespit etmek yararlı olabilir. Ayrıca H1650 hücrelerinin PTEN genini taşıması da (Takeda vd 2013), TGF- β 'nin EMT sürecini indüklemesini engelleyici bir faktör olabilir. Çünkü, bazı çalışmalarla sürekli Akt aktivasyonunun EMT için negatif bir unsur olabileceği gösterilmiştir (Irie vd 2005). Bu hücreler PTEN geni taşımadıkları için sürekli Akt aktivasyonuna sahiptir. Bu hücrelere PTEN ekspresyon vektörü transfekte edilerek, TGF- β 'nin bu hücrelerdeki EMT süreci üzerindeki etkileri incelenebilir. Bir diğer önemli etmen, TGF- β uyarımı sonucu EMT sürecinin indüklendiği A549 hücrelerinde SATB2 ekspresyonunun baskılandığı, ancak EMT sürecinin indüklenemediği H1650 hücrelerinde ise SATB2 ekspresyon seviyesinin baskılanmaması olabilir (Şekil 4.5). Bu hipotezin doğruluğu, yapmış olduğumuz deneylerle kanıtlanmış olup, literatürde paylaşılacaktır. Literatürde kolorektal kanser hücrelerinin EMT süreçlerinde SATB2 ekspresyonunun baskılandığını gösteren çalışma mevcuttur (Yang vd 2013). Bu nedenle sonuçlarımız, literatür ile uyumludur.

Hipotezimizin anahtar molekülü olan NF- κ B'nin, TGF- β tarafından indüklenen EMT ve invazyon süreçlerindeki rolünü araştırdık. Bunun için; literatürde yaygın olarak kullanılan NF- κ B inhibitörleri Bay 11-7082, LY294002 ve OPG'nin varlığında A549 ve H1650 hücrelerinde TGF- β uyarımı gerçekleştirdik. H1650 hücrelerinde, E-kaderin seviyesinin baskılanmamasından ötürü, bu hücrelerde TGF- β EMT sürecini tam olarak indükleyememişti (Şekil 4.5). Bu nedenle, NF- κ B'nin bu süreçteki rolünden bahsedilemez. Ancak; TGF- β uyarımı neticesinde E-kaderin ekspresyonu baskılanmamasına karşın, N-kaderin ve Vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonları artmıştır (Şekil 4.5). Bay 11-7082 ve LY294002 inhibitörlerinin varlığının, TGF- β tarafından indüklenen N-kaderin (H1650 hücrelerinde), Vimentin (H1650 hücrelerinde), Snail (A549 ve H1650 hücrelerinde) ve Slug (A549 ve H1650 hücrelerinde) gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonlarını baskıladığı gözlenmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Ayrıca bu NF- κ B aktivasyonunu inhibe eden Bay 11-7082 ve LY294002 inhibitörlerinin KHDAK hücrelerinin invazyon kapasitelerini de önemli ölçüde baskıladıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.11). KHDAK hücrelerinde Bay11-7082 ve LY294002 inhibitörlerinin Snail ekspresyonunu ve hücrelerin invazyon kapasitesini azalttığı literatürde var olan bilgilerdir (Gastonguay vd 2012, Chen vd 2013, Gu vd 2015). Bu bakımdan sonuçlarımız, literatür ile

uyumludur. Bir diğ er NF-κB inhibitör ü olan OPG'nin varlığı ise A549 ve H1650 hücrelerinin EMT belirteçleri ve invazyon kapasiteleri üzerinde farklı sonuçlara yol açmıştır. A549 hücrelerinde OPG'nin varlığı herhangi bir EMT belirtecinin ekspresyonu üzerinde bir etkiye sahip olmamasına karş ın, bu hücrelerin TGF-β tarafından indüklenen invazyon kapasitelerini azaltmıştır (Ş ekil 4.10 ve Ş ekil 4.11). Bu durum; OPG'nin, invazyon süreci için önemli yere sahip metalloproteazların (MMP) ekspresyonları üzerinde inhibe edici bir faktör olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca bu sonuç, literatür için yeni bir bilgidir. H1650 hücrelerinde OPG'nin varlığı ise, bu hücrelerdeki N-kaderin, Snail, Slug ve Zeb1 gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonlarını ve hücrelerin invazyon kapasitelerini arttırmıştır (Ş ekil 4.10 ve Ş ekil 4.11). Literatürde OPG ve invazyon arasındaki ilişkiyi araşt ıran çalış malara bakıld ığında, prostat kanser hücrelerinde OPG'nin invazyonu azaltıcı özelliği, KHDAK hücreleri üzerine yapılan bir çalış mada ise artan OPG ekspresyonu ile invazyon arasında pozitif korelasyonun varlığı belirtilmektedir (Peng vd 2013, Li vd 2014, Russmueller vd 2015). Bu durumun sebebi; OPG'nin invazyon üzerindeki etkisinin, hücre spesifikliği ile ilişkili olması olabilir. Bu mezenkimal faktörler kanser hücrelerinin yalnızca EMT süreçleriyle ilişkili olmayıp, invazyonları ile de ilişkili faktörlerdir. Bu bağ lamda; NF-κB'nin Bay 11-7082, LY294002 ve OPG inhibitörleri tarafından inhibisyonunun, TGF-β ile indüklenen EMT sürecinde düzenleyici bir rolü olmadığı, ancak KHDAK hücre invazyonunda kritik bir role sahip olduğu invazyon deneyi sonuçlarımızla tespit edilmiştir.

Proje kapsamında TGF-β tarafından indüklenen EMT ve invazyon süreçlerinde p38 sinyal yolağ ının rolünü tespit etmeye çalış tık. Bunun için A549 ve H1650 hücrelerinde p38 inhibitör ü SB203580'i kullanarak p38 yolağ ını inhibe ettik. A549 hücrelerinde p38 yolağ ının inhibisyonunun, TGF-β ile indüklenen EMT sürecinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür (Ş ekil 4.10). Ancak; p38 yolağ ının inhibisyonunun, A549 hücrelerinde TGF-β tarafından indüklenen invazyonda düzenleyici bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Ş ekil 4.11). Literatürde TGF-β tarafından indüklenen EMT ve invazyon süreçlerinde p38'in önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir (Son ve Moon 2010, Kolosova vd 2012, Lamouille vd 2014). Sonuçlarımız, p38 yolağ ının TGF-β tarafından indüklenen EMT sürecinde önemli bir rol oynamadığını göstermektedir. Bunun nedeni; TGF-β'nin ile yalnızca SMAD yolağ ını kullanarak EMT sürecini indüklemesi olabilir. Nitekim, TGF-β tarafından indüklenen EMT sürecinde SMAD yolağ ının primer düzenleyici olduğunu gösteren çalış malar bulunmaktadır (Islam vd 2014, O'Kane vd 2014, Yang vd 2015, Thien vd 2015). Bu nedenle sonuçlarımız literatür ile ç eliş memektedir. H1650 hücrelerinde TGF-β tarafından EMT süreci indüklenemediği için p38 yolağ ının bu süreçteki rolünden bahsedilemez. Ancak; TGF-β uyarımı olmadan p38 yolağ ının inhibisyonu, bu hücrelerde EMT sürecini ve invazyonu indüklemiştir (Ş ekil 4.10 ve Ş ekil 4.11). Bir çalış mada p38'in, E-kaderin ekspresyonu için gerekliliği gösterilmiştir (Strippoli vd 2010).

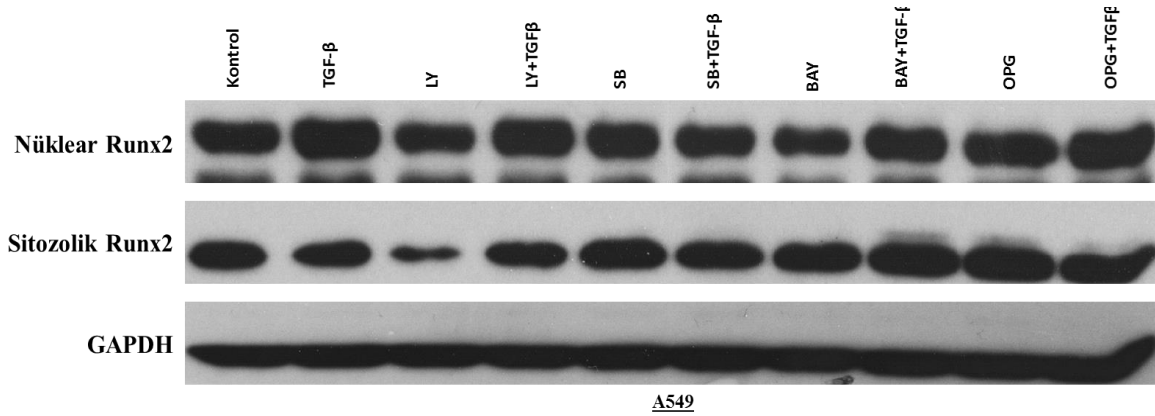
H1650 hücrelerinde p38 yolağının inhibisyonu, E-kaderin ekspresyonunun baskılanmasına ve EMT sürecinin indüklenmesine yol açmış olabilir. Bu nedenle; bu sonuç literatür ile paralellik göstermektedir. Ayrıca; p38 yolağının inhibe edildiği bu hücrelerde SATB2 ekspresyonunun da baskılanması, SATB2'nin KHDAK hücrelerinin EMT süreçlerinde kilit bir molekül olduğunu göstermektedir.

Dual lusiferaz deneyi sonuçlarımız, TGF- β 'nin A549 ve H1650 hücrelerinde NF- κ B aktivasyonuna neden olmadığını göstermiştir (Şekil 4.12). Birçok bağımsız çalışmada TGF- β 'nin, NF- κ B aktivasyonuna yol açtığını gösterilmiş olsa da, bazı çalışmalar ise aksi yönde sonuç ortaya koymuşlardır (Li vd 1998, Freudlsperger vd 2013). Bu bağlamda sonuçlarımız literatür ile çelişmemekle birlikte, TGF- β ile indüklenen NF- κ B aktivasyonunun hücre spesifikliğine bağımlı olması, farklı sonuçların ortaya çıkmasının nedeni olabilir (Gustin vd 2004). Ayrıca, gerek NF- κ B inhibitörünün tek başına, gerekse TGF- β ile birlikte uygulandığı A549 ve H1650 hücrelerindeki invazyon kapasitelerinin aynı oranda baskılanması ve EMSA deneyi sonucumuz, NF- κ B'nin A549 ve H1650 hücrelerinde TGF- β sinyal yolağı tarafından aktive edilmediği görüşümüzü desteklemektedir. Bunun nedeni; TGF- β tarafından NF- κ B aktivasyonu için anahtar bir molekül olan TAK1 molekülünün bu hücrelerde düşük eksprese olması ve/veya aktive olamaması olabilir (Gingery vd 2008, Freudlsperger vd 2013). Onun için bu hücrelerdeki, TAK1 ekspresyon seviyesini ve TGF- β uyarımı sonucu aktivasyonunu tespit etmek yararlı olabilir. Tüm bu sonuçlardan; TGF- β 'nin NF- κ B'den bağımsız olarak EMT ve invazyon süreçlerini indüklediği ve NF- κ B'nin, KHDAK hücrelerinin EMT süreçlerinde kritik bir role sahip olmadıkları, ancak invazyonları için kilit bir molekül olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu durum; NF- κ B'nin, hücre invazyonu için kritik öneme sahip olan MMP-2 ve MMP-9 gibi metalloproteazların ekspresyonlarının primer düzenleyicisi olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu bilinmezliği aydınlatmak için, NF- κ B inhibitörü Bay11-7082 varlığında ilgili MMP seviyelerinin tespiti için jelatin zimografi veya ELISA deneyleri gerçekleştirilebilir.

Hipotez etmiş olduğumuz TGF- β /p38/Runx2/RANKL/NF- κ B yolağına göre, TGF- β 'nin RANKL ekspresyonunu indüklemesi gerekmektedir. Western blot sonuçlarımıza her iki hücrede TGF- β 'nin varlığı RANKL ekspresyonunu indükleyebilmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Bu sonuç, KHDAK hücrelerinde ilk kez gösterilmiştir. Yine hipotez etmiş olduğumuz yolağa göre, bu indüklenmenin p38/Runx2 üzerinden olması gerekmektedir. A549 hücrelerinde, p38 inhibitörü SB203580'nin varlığında TGF- β 'nin RANKL ekspresyonunu indükleyemediği görülmüştür (Şekil 4.10). Bu sonuç hipotezimizi doğrulamaktadır. TGF- β 'nin RANKL ekspresyonunu p38 yolağı üzerinden indüklediğini gösteren bu sonuç, literatürle uyumludur (Ishida vd 2002). Bu hipotezin doğrulunu kesinleştirmek için, proje önerimizde de belirtmiş olduğumuz EMSA deneyi yapılmıştır. Bunun için, Runx2'nin spesifik bağlanma bölgesini

taşıyan, RANKL promotor bölgesinin yaklaşık 30 baz çiftlik bir bölümünü kapsayan prob tasarlanmıştır. Ancak; probdan kaynaklanan problem nedeni ile, bu deney başarıyla gerçekleştirilememiştir. Sonuç bölümünde de belirtmiş olduğumuz üzere; laboratuvarımızda mevcut olan NF- κ B probu kullanarak gerçekleştirdiğimiz EMSA deneylerinin başarıyla gerçekleşmesi, sıkıntının Runx2 probundan kaynaklı olduğunu kanıtlamıştır. Ancak; proje bütçesinin kısıtlı olmasından dolayı tekrar bir Runx2 probu tasarlanarak satın alınamamıştır. p38 yolağının inhibisyonu, H1650 hücrelerinde A549 hücrelerinin aksine çok farklı sonuçlara yol açmıştır. TGF- β uyarımı ile EMT'nin indüklenemediği H1650 hücrelerinde, p38 yolağının inhibisyonu ilginç biçimde EMT sürecini ve invazyonu indüklemiştir (Şekil 10 ve 11). Hatırlanacağı üzere; KHDAK hücrelerinin EMT sürecinde SATB2'nin kritik bir role sahip olduğunu göstermiştik (Şekil 14 ve 15). H1650 hücrelerinde p38 yolağının inhibisyonu, bu hücrelerde SATB2 ekspresyonunu baskılayarak EMT sürecini indüklemiştir (Şekil 4.10). Bir diğer ilginç olan; p38 yolağının inhibe edildiği ve SATB2 ekspresyonunun baskılandığı H1650 hücrelerinde RANKL ekspresyonunun da dramatik şekilde artmasıdır (Şekil 4.10). Ayrıca; Şekil 4.12'de görüldüğü üzere; literatürdeki bazı çalışmaları destekler biçimde, p38 inhibisyonu bu hücrelerde NF- κ B lüsiferaz aktivitesini de artırmıştır (Birkenkamp vd 2000). Tüm bu sonuçlara dayanarak, H1650 hücrelerinin EMT sürecinde p38/SATB2/RANKL/NF- κ B sinyal yolağının kritik bir rol oynadığı söylenebilir.

Hipotezimizde, literatürdeki bazı çalışmalarda olduğu gibi TGF- β muamelesinin hücrelerdeki Runx2 ekspresyonunu indükleyeceğini ve p38 inhibitörünün varlığında da bu indüklenmenin anlamlı derecede inhibe olacağını öngörmüştük. H1650 hücrelerinde TGF- β uyarımı, Runx2 ekspresyonunu dramatik bir şekilde arttırmış olmasına karşın, A549 hücrelerinde anlamlı bir değişime neden olamamıştır (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). "A549 hücrelerinde TGF- β uyarımı, Runx2 ekspresyonu yerine nükleusa translokasyonunu indükleyerek aktivasyonu üzerinden mi etki gösteriyor?" sorusunu cevaplamak istedik. Bu nedenle projede yer almamasına rağmen Runx2'nin, A549 hücrelerinde TGF- β ve p38 inhibitörü varlığında nükleusa translokasyonunu tespit ettik. Sonuç olarak; TGF- β 'nın, A549 hücrelerinde Runx2'nin ekspresyonunu indüklemese de, nükleusa geçişini indüklediği ve bu olayda p38'in primer düzenleyici olduğu görülmektedir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. A549 hücrelerinde Runx2'nin nükleusa translokasyonu üzerinde, TGF- β ve p38'in düzenleyici rolü.

H1650 hücrelerindeki TGF- β /p38/Runx2 ilişkisine bakıldığında; A549 hücrelerinin aksine TGF- β 'nin, Runx2 ekspresyonunu dramatik şekilde indüklediği ve yine p38'in bu olayda primer düzenleyici olduğu görülmektedir (Şekil 4.10). Ayrıca; TGF- β ve Runx2 arasında değişkenlik gösteren ilişkilerini açıklamak adına literatüre bakıldığında; Runx2 ekspresyonunun, TGF- β uyarımının 2. saatinde dramatik bir şekilde indüklendiği, fakat uyarımın 6. saatinden itibaren, ekspresyonun uyarım olmadan önceki seviyeye döndüğü görülmüştür (Lee vd 2000). Western blot sonuçlarımızdaki uyarım saatleri 24 saat olduğu için bir artış gözlenmemesi doğal olduğu görüşündeyiz (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Ancak; A549 hücrelerine zıt bir şekilde, H1650 hücrelerinde uyarımın 24. saatinde bile Runx2 ekspresyonun kontrole oranla yüksek olması, bu hücrelerdeki TGF- β tarafından indüklenen EMT süreci için ayırıcı faktörlerden biri olabilir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Bir çalışmada Runx2 ekspresyonunun TGF- β tarafından baskılandığını gösterilmiştir (Kang vd 2005). Literatür ile deney sonuçlarımızdan edinmiş olduğumuz bilgileri birlikte değerlendirdiğimizde, sonuçlarımızın literatürle uyumludur. TGF- β uyarımının ilk saatlerinde Runx2 ekspresyonunun artışı ve daha sonra inhibisyonu, EMT sürecinin indüklenmesi için gerekli olabilir. Örneğin; TGF- β ile indüklenen EMT sürecinin ilk safhası SMAD3 tarafından yönetilmektedir ve daha sonraki aşamalarda degrade olmaktadır. SMAD3'ün ısrarlı ekspresyonu TGF- β -indüklü EMT belirteçleri için inhibe edici bir unsur olacağı gösterilmiştir (Lamouille vd 2014). Aynı bu çalışmada olduğu gibi Runx2 ısrarlı ekspresyonu TGF- β ile indüklenen EMT için inhibe edici bir faktör olabileceği için, H1650 hücrelerinin TGF- β uyarımı ile EMT sürecine girmemesinin nedeni de olabilir. Bu soruyu aydınlatmak için Runx2'nin over-eksprese yapıldığı A549 hücrelerinde ve Runx2 ekspresyonun ise baskılandığı H1650 hücrelerinde TGF- β uyarımı gerçekleştirilerek hücrelerin EMT profilleri gözlemlenebilir.

Özetle; KHDAK hücrelerinde TGF- β ile indüklenen EMT sürecinde, SMAD-dışı yolların araştırıldığı bu çalışma, hipotez ettiğimiz üzere TGF- β /p38/Runx2/RANKL/NF- κ B yolağının EMT süreci üzerinde düzenleyici bir role sahip olmadığını ortaya koymaktadır. Ancak, KHDAK hücrelerinin EMT süreçlerinde esas düzenleyici molekülün SATB2 olduğu sonuçlarımızla ortaya konmuştur. Özellikle; H1650 hücrelerinde p38 inhibisyonu sonucu, RANKL ekspresyon seviyesinin, NF- κ B lusiferaz aktivasyonunun ve invazyonun kapasitesinin artması ve EMT sürecinin gerçekleşmesi, projede yer almasa da p38/SATB2/RANKL/NF- κ B yolağının EMT ve invazyon süreçlerinde düzenleyici rolü ortaya konulmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Akca, H. 2011. "Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through the PI3K/AKT/NFkB pathway in lung cancer cells", *Lung Cancer*, 73(3):302-9.
- Baniwal, S.K. 2010. "Runx2 transcriptome of prostate cancer cells: insights into invasiveness and bone metastasis", *Mol Cancer*, 23;9:258.
- Bhowmick, N.A. 2004. "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression", *Nature*, 432:332–7.
- Birkenkamp, K.U. 2000. "The p38 MAP kinase inhibitor SB203580 enhances nuclear factor-kappa B transcriptional activity by a non-specific effect upon the ERK pathway", *Br J Pharmacol*,131(1):99-107.
- Bissell, M.J. 2001."Putting tumours in context", *Nat Rev Cancer*,1:46–54.
- Byon, C.H. 2011. "Runx2-upregulated receptor activator of nuclear factor kB ligand in calcifying smooth muscle cells promotes migration and osteoclastic differentiation of macrophages", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,31(6):1387-96.
- Cao, M. 2012. "miR-23a regulates TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition by targeting E-cadherin in lung cancer cells", *Int J Oncol*, 41(3):869-75.
- Coussens, L.M. 2002. "Inflammation and cancer", *Nature*, 420:860–7.
- Chen, L.M. 2011. "RANKL increases migration of human lung cancer cells through intercellular adhesion molecule-1 up-regulation", *J Cell Biochem*, 112(3):933-41.
- Chen, X.F. 2012. "Transforming growth factor-β1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancer cells via PI3K/Akt and MEK/Erk1/2 signaling pathways", *Mol Biol Rep*, 39(4):3549-56.
- Chen, K.C. 2013. "Luteolin attenuates TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells by interfering in the PI3K/Akt-NF-κB-Snail pathway", *Life Sci*, 93(24):924-33.
- Chimge, N.O. 2011. "Regulation of breast cancer metastasis by Runx2 and estrogen signaling: the role of SNAI2", *Breast Cancer Res*,13(6):R127.
- Dauphin, M. 2013. "Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas", *Lung Cancer*, 81(1):117-22.

Freudlsperger, C. 2013. "TGF- β and NF- κ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers", *Oncogene*, 32(12):1549-59.

Gastonguay, A. 2012. "The role of Rac1 in the regulation of NF- κ B activity, cell proliferation, and cell migration in non-small cell lung carcinoma", *Cancer Biol Ther*, 2012 Jun;13(8):647-56.

Gu, K. 2015. "Interleukin-17-induced EMT promotes lung cancer cell migration and invasion via NF- κ B/ZEB1 signal pathway", *Am J Cancer Res*, 15;5(3):1169-79.

Gupta, A. 2012. "Integrin $\alpha\beta$ 3 and CD44 pathways in metastatic prostate cancer cells support osteoclastogenesis via a Runx2/Smad 5/receptor activator of NF- κ B ligand signaling axis", *Mol Cancer*, 11;11:66.

Gustin, J.A. 2004. "Cell type-specific expression of the I κ B kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF- κ B activation", *J Biol Chem*, 279(3):1615-20.

Hanahan, D. 2000. "The hallmarks of cancer", *Cell*, 100:57–70.

Hattori, S. 2007. "FR-167653, a selective p38 MAPK inhibitor, exerts salutary effect on liver cirrhosis through downregulation of Runx2", *Lab Invest*, 87(6):591-601.

Hsu, Y.L. 2011. "Lung tumor-associated osteoblast-derived bone morphogenetic protein-2 increased epithelial-to-mesenchymal transition of cancer by Runx2/Snail signaling pathway", *J Biol Chem*, 286(43):37335-46.

Huber, M.A. 2004. "NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression", *J Clin Invest*, 114(4):569-81.

Irie, H Y. 2005. "Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition", *J Cell Biol*, 171(6):1023-34.

Ishida, A. 2002. "Transforming growth factor-beta induces expression of receptor activator of NF- κ B ligand in vascular endothelial cells derived from bone", *J Biol Chem*, 277(29):26217-24.

Islam, S.S. 2014. "TGF- β 1 induces EMT reprogramming of porcine bladder urothelial cells into collagen producing fibroblasts-like cells in a Smad2/Smad3-dependent manner", *J Cell Commun Signal*, 8(1):39-58.

Ito, Y. 2003. "RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling", *Curr Opin Genet Dev*,13(1):43-7.

- Jing, Y.Y. 2012. "Toll-like receptor 4 signaling promotes epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma induced by lipopolysaccharide", *BMC Med*, 31;10:98.
- Julien, S. 2007. "Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition", *Oncogene*, 26(53):7445-56.
- Kalluri, R. 2006. "Fibroblasts in cancer", *Nat Rev Cancer*, 6:392–401.
- Kang, J.S. 2005. "Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3", *EMBO J*, 24(14):2543-55.
- Kim, H.J. 2007. "Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail", *Mol Cell Biol*, 27(8):3165-75.
- Kolosova, I. 2011. "Role of Smad2/3 and p38 MAP kinase in TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition of pulmonary epithelial cells", *J Cell Physiol*, 226(5):1248-54.
- Kumar, M. 2013. "NF-κB regulates mesenchymal transition for the induction of non-small cell lung cancer initiating cells", *PLoS One*, 8(7):e68597.
- Lamouille, S. 2014. "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3):178-96.
- Lee, K.S. 2000. "Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12", *Mol Cell Biol*, 20(23):8783-92.
- Li, J.M. 1998. "Transforming growth factor beta stimulates the human immunodeficiency virus 1 enhancer and requires NF-kappaB activity", *Mol Cell Biol*, 18(1):110-21.
- Li, X. 2014. "Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis", *Oncol Rep*, 32(6):2605-11.
- Liu, J. 2013. "Suppression of SCARA5 by Snail1 is essential for EMT-associated cell migration of A549 cells", *Oncogenesis*, 23;2:e73.
- Mueller, M.M. 2004. "Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer", *Nat Rev Cancer*, 4:839–49.
- Niu, D.F. 2012. "Transcription factor Runx2 is a regulator of epithelial-mesenchymal transition and invasion in thyroid carcinomas", *Lab Invest*, 92(8):1181-90.

- Odero-Marah, V.A. 2008. "Receptor activator of NF-kappaB Ligand (RANKL) expression is associated with epithelial to mesenchymal transition in human prostate cancer cells", *Cell Res*, 18(8):858-70.
- O'Kane, D. 2014. "SMAD inhibition attenuates epithelial to mesenchymal transition by primary keratinocytes in vitro", *Exp Dermatol*, 23(7):497-503.
- Orimo, A. 2006. "Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type", *Cell Cycle*, 5:1597-601.
- Pallier, K. 2012. "TWIST1 a new determinant of epithelial to mesenchymal transition in EGFR mutated lung adenocarcinoma", *PLoS One*, 7(1):e29954.
- Peng, X. 2013. "Differential expression of the RANKL/RANK/OPG system is associated with bone metastasis in human non-small cell lung cancer", *PLoS One*, 8(3):e58361.
- Peters, S. 2013. "Targeting receptor activator of nuclear factor-kappa B as a new therapy for bone metastasis in non-small cell lung cancer", *Curr Opin Oncol*, 25(2):137-44.
- Polyak, K. 2009. "Co-evolution of tumor cells and their microenvironment", *Trends Genet*, 25:30-8.
- Pratap, J. 2008. "Runx2 transcriptional activation of Indian Hedgehog and a downstream bone metastatic pathway in breast cancer cells", *Cancer Res*, 68(19):7795-802.
- Russmueller, G. 2015. "Upregulation of osteoprotegerin expression correlates with bone invasion and predicts poor clinical outcome in oral cancer", *Oral Oncol*, 51(3):247-53.
- Santini, D. 2011. "Expression pattern of receptor activator of NFkB (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases", *J Cell Physiol*, 226:780-784.
- Shimoda, M. 2010. "Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression", *Semin Cell Dev Biol*, 21(1):19-25.
- Son, H. 2010. "Epithelial-mesenchymal Transition and Cell Invasion", *Toxicol Res*, 26(4): 245-252.
- Takeda, H. 2013. "Vandetanib is effective in EGFR-mutant lung cancer cells with PTEN deficiency", *Exp Cell Res*, 15;319(4):417-23.
- Tan, W. 2011. "Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling", *Nature*, 470:548-553.

- Tandon, M. 2012. "Runx2 mediates epigenetic silencing of the bone morphogenetic protein-3B (BMP-3B/GDF10) in lung cancer cells", *Mol Cancer*, 18;11:27.
- Thien, A. 2015. "TSC1 activates TGF- β -Smad2/3 signaling in growth arrest and epithelial-to-mesenchymal transition", *Dev Cell*, 32(5):617-30.
- Thompson, E.W. 2011. "The social aspects of EMT-MET plasticity", *Nat Med*, 17(9):1048-9.
- Tsubaki, M. 2013. "Activation of NF- κ B by the RANKL/RANK system up-regulates snail and twist expressions and induces epithelial-to-mesenchymal transition in mammary tumor cell lines", *J Exp Clin Cancer Res*, 32(1):62.
- Wang, Y. 2013. "SLUG is activated by nuclear factor kappa B and confers human alveolar epithelial A549 cells resistance to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis", *World J Surg Oncol*, 22;11:12.
- Wu, Y. 2012. "Interplay between menin and K-Ras in regulating lung adenocarcinoma" *J Biol Chem*, 287(47):40003-11.
- Xiao, D. 2010. "Epithelial mesenchymal transition and lung cancer", *J Thorac Dis*, 2(3):154-9.
- Yang, M.H. 2013. "Elevated microRNA-31 expression regulates colorectal cancer progression by repressing its target gene SATB2", *PLoS One*, 8(12):e85353.
- Yang, H. 2015. "Ski prevents TGF- β -induced EMT and cell invasion by repressing SMAD-dependent signaling in non-small cell lung cancer", *Oncol Rep*, 34(1):87-94.
- Zhu, Q.C. 2013. "Epithelial-mesenchymal Transition and Its Role in the Pathogenesis of Colorectal Cancer", *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(5):2689-98.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. HAKAN AKÇA
Proje No:	114S007
Proje Başlığı:	NSCLC Hücrelerinde TGF-β/p38/RUNX2/RANKL/NFκB Yolağının EMT Sürecindeki Rolünün Araştırılması
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	PAMUKKALE Ü. TIP F. TEMEL TIP BİLİMLERİ B. TIBBİ BİYOLOJİ ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/05/2014 - 01/05/2015
Onaylanan Bütçe:	29970.0
Harcanan Bütçe:	29966.38
Öz:	<p>İnvazyonun tetikleyici mekanizmalarından olan epitelden-mezenkimala geçişin (EMT), KHDAK invazyonu ve metastazında kilit bir öneme sahiptir. EMT, tümör mikroçevresinde bulunan birçok sitokin tarafından indüklenebilmektedir. Bu sitokinler arasında TGF-β'nin, diğer kanser türlerinin yanısıra KHDAK hücrelerinde de EMT'nin en önemli indükleyicilerinden biri olduğu belirtilmektedir. TGF-β kanser hücrelerinde MAPK (p38), JNK, Rho GTPase ve PI3K/Akt yolakları gibi birbirinden farklı birçok farklı yolak aracılığıyla EMT'yi indükleyebilmektedir. Bu yolaklardan PI3K/Akt yolağı, en önemli EMT organizatörlerinden NF-κB'nin primer düzenleyici olması bakımından EMT sürecinde seçkin bir özelliğe sahiptir. Ancak; NF-κB, PI3K/Akt yolağının haricinde farklı yolaklar tarafından da regüle edilebilmektedir. Bu nedenle KHDAK hücrelerinde PI3K/Akt yolağının yanısıra NF-κB'yi regüle ederek EMT'yi aktive edebilecek ve daha önce araştırılmamış farklı yolaklara odaklandık. Bu bağlamda, TGF-β/p38/Runx2/RANKL/NF-κB sinyal yolağının KHDAK hücrelerinde EMT sürecini indükleyebileceğini hipotez ettik. Öncelikle, TGF-β'nin A549 hücrelerinde EMT sürecini indüklediği, H1650 hücrelerinde ise indükleyemediği görülmüştür. NF-κB aktivasyonunun TGF-β tarafından indüklenemediğini ve NF-κB'nin, TGF-β ile indüklenen EMT sürecinde kritik bir role sahip olmadığı gösterilmiştir. TGF-β'nin, RANKL ekspresyonunu p38 yolağı üzerinden indüklediği tespit edilmiştir. TGF-β tarafından indüklenen RANKL ekspresyonunun EMT süreci üzerinde bir etkisi olmadığı, invazyon kapasitesi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Ayrıca çalışmamızda KHDAK hücrelerinin EMT ve invazyon süreçlerinde SATB2'nin kilit bir molekül olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; TGF-β'nin, KHDAK hücreleri A549 ve H1650'de NF-κB'yi aktive etmediği ve TGF-β tarafından indüklenen EMT sürecinde p38/Runx2/RANKL/NF-κB yolağının düzenleyici bir rolü olmadığı saptanmıştır.</p>
Anahtar Kelimeler:	TGF-Beta, NFκB, SATB2, RANKL, NSCLC, EMT
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır