T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KHDAK HÜCRE İNVAZYONUNDA IL-6/SATB2/CD44 YOLAĞININ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hakan KÜÇÜKSAYAN

Aralık 2014
DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KHDAK HÜCRE İNVAZYONUNDA IL-6/SATB2/CD44 YOLAĞININ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hakan KÜÇÜKSAYAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hakan AKÇA

Denizli, 2014

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Hakan KÜÇÜKSAYAN tarafından Prof. Dr. Hakan AKÇA yönetiminde hazırlanan **"KHDAK Hücre İnvazyonunda IL-6/SATB2/CD44 Yolağının Etkilerinin Araştırılması"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:	Doç. Dr. Gamze GÖKOZ DOĞU (Pamukkale Üniversitesi)	.....
Danışman:	Prof. Dr. Hakan AKÇA (Pamukkale Üniversitesi)	.....
Üye:	Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ (Pamukkale Üniversitesi)	.....
Üye:	Prof. Dr. Gülseren BAĞCI (Pamukkale Üniversitesi)	.....
Üye:	Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ (Pamukkale Üniversitesi)	.....

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15./1./15 tarih ve 2-5 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Melek BOR-KÜÇÜKATAY
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Hakan KÜÇÜKSAYAN

İmza :

ÖZET

KHDAK HÜCRE İNVAZYONUNDA IL-6/SATB2/CD44 YOLAĞININ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hakan KÜÇÜKSAYAN
Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji AD
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Hakan AKÇA

Aralık 2014, 78 Sayfa

Akciğer kanseri, dünya genelinde 5 yıllık sağkalım oranının 10-15%'den daha az olması ile kanser ilişkili ölümlerin en yaygın nedenidir. EMT (Epitelden Mezenkimale Geçiş), kanser invazyonunda kilit bir süreçtir. EMT ve Kanser Kök Hücre (KKH) özellikleri, benzer düzenleyici proteinler tarafından düzenlenmektedir. EMT sürecinde KKH özelliklerinden sorumlu birçok düzenleyici protein vardır ve çoğunluğunun mekanizmaları hala bilinmemektedir. SATB2, nükleer matriksle ilişkili transkripsiyon faktördür ve osteoblastik farklılaşmasında epigenetik bir düzenleyici olarak işlev göstermektedir. SATB2'nin kolorektal kanser hücrelerinde EMT ve invazyonu baskıladığı bilinmesine rağmen, aksiyon mekanizması hala bilinmemektedir. IL-6, akciğer kanserin malignant dönüşümünde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle araştırmamızda, KHDAK (Küçük hücre-dışı akciğer kanseri) hücrelerinde IL-6 tarafından indüklenen EMT sürecinde, invazyonda ve kanser kök hücre fenotipinin kazanılmasında, SATB2'nin düzenleyici rolünü belirlemeyi amaçladık. IL-6'nın SATB2 ekspresyonunu artırarak KHDAK hücre invazyonunu artırdığını gösterdik. SATB2'nin siRNA aracılı susturulması IL-6 tarafından indüklenen N-kaderin ekspresyonunu ve invazyonu, Twist ve Zeb1 ekspresyonunu azaltarak inhibe etti. TGF-β ise SATB2 ekspresyonunu azaltarak KHDAK hücre invazyonunu artırmıştır. SATB2'nin susturulması TGF-β tarafından indüklenen invazyonu artırmıştır. Ayrıca çalışmamız, KHDAK hücrelerinde CD44 ve Sox-2 ekspresyonlarını regüle ederek kanser kök hücre özelliklerinin düzenlenmesinde kritik bir role sahip olduğunu ilk kez belirtmektedir. Dahası, SATB2'nin susturulması Fokal Adezyon Kinaz (FAK) ekspresyonun artmasına yol açtığı da KHDAK hücrelerinde ilk kez gösterilmiştir. Çalışmamız, IL-6 ve TGF-β'nın SATB2'nin ekspresyonunu düzenleyerek farklı mekanizmalar aracılığıyla invazyonu indüklediğini ilk tanımlamıştır. Sonuç olarak; SATB2'nin, KHDAK hücrelerinde invazyon ve kanser kök hücre özellikleri üzerine kilit bir düzenleyici olabileceği sonucuna vardık.

Anahtar Kelimeler: KHDAK, İnvazyon, EMT, KKH, IL-6, SATB2

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2013SBE011).

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF IL-6/SATB2/CD44 PATHWAY ON NSCLC INVASION

KÜÇÜKSAYAN, Hakan
M.Sc. Thesis in Medical Biology
Supervisor: Prof. Dr. Hakan AKÇA (PhD)

December 2014, 78 Pages

Lung cancer is one of the most common causes of death by cancer worldwide with less than 10–15% of survival rate at 5 years. EMT (Epithelial–mesenchymal transition) is a key event in invasion of cancer. EMT and Cancer Stem Cell (CSC) properties are regulated by similar regulatory proteins. There are lots of regulator proteins responsible for EMT and CSC properties, but underlying mechanisms are still unknown. SATB2 is a nuclear matrix-associated transcription factor and epigenetic regulator that is involved in osteoblastic differentiation. Although, SATB2 was reported to suppress EMT and invasion in colorectal cancer cells, the mechanism of action of SATB2 is still unknown. IL-6 plays an important role in the malignant progression of lung cancer. Therefore, in this study, we aim to determine regulatory role of SATB2 in EMT process, invasion and the acquisition of CSC phenotype induced by IL-6 on NSCLC (non-small-cell lung carcinoma) cells. We showed that IL-6 induces invasion of NSCLC cells by increasing SATB2 expression. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of SATB2 inhibits IL-6-induced invasion and N-cadherin expression by reducing Twist and Zeb1 expression levels. TGF-β enhances invasion of NSCLC by decreasing SATB2 expression. Knockdown of SATB2 increases TGF-β-induced invasion of NSCLC cells. Furthermore, our study firstly indicated that SATB2 has a critical role in modulating CSC properties by regulating CD44 and Sox-2 expressions in NSCLC cells. We also firstly showed that knockdown of SATB2 leads to up-regulation of Focal Adhesion Kinase (FAK) expression. Our study firstly illustrated that IL-6 and TGF-β induce invasion depend on different mechanisms by regulating SATB2 expression in NSCLC cells. Consequently, we concluded that SATB2 could be a key regulator on invasion and CSC properties in NSCLC cells.

Keywords: NSCLC, Invasion, EMT, CSC, IL-6, TGF-β, SATB2

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers 2013SBE011.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince tecrübelerinden yararlandığım başta tez danışman hocam Prof. Dr. Hakan AKÇA'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel alt yapımın gelişmesinde katkıda bulunan değerli bölüm hocalarıma,

Ve beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan canım aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET v
ABSTRACT vi
TEŞEKKÜR vii
İÇİNDEKiLER viii
ŞEKİLLER DİZİNİ x
TABLOLAR DİZİNİ xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xiv

1. GİRİŞ 1
1.1 Amaç 2
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI 3
2.1 Akciğer Kanserleri 3
2.1.1 Etiyolojisi 3
2.1.2 Histolojik Sınıflandırma 5
2.2 İnvazyon ve Metastaz 7
2.3 Epitelyal Mezenkimal Transisyon 9
2.3.1 EMT'nin Sınıflandırılması 10
2.3.2 EMT Sürecinde Hücresel Kompenentler 11
2.3.3 EMT Sürecinde Transkripsiyon Faktörleri 11
2.3.4 EMT ve Kanser Kök Hücre Fenotipinin Kazanılması 12
2.3.5 Tümör Mikroçevresi 13
2.3.6 Sitokinler ve Sinyal Yolakları 14
2.4 İnterlökin-6 ve Kanser 14
2.4.1 IL-6/STAT3 Sinyal Yolağı 15
2.4.2 IL-6'nın EMT'deki Rolü 16
2.4.3 IL-6'nın Kanser Kök Hücre Fenotipinin Kazanılmasındaki Rolü 16
2.5 SATB2 Kromatin Yeniden Modelleme Proteini 18
2.5.1 SATB2'nin EMT Sürecindeki Rolü 18
2.5.2 SATB2'nin Kök Hücre Fenotipinin Kazanılmasındaki Rolü 19
2.6 Hipotez 20
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 21
3.1 Hücre Kültürü 21
3.2 Hücrelerden TRIZOL ile RNA İzolasyonu 21
3.3 İzole Edilen RNA'yı cDNA'ya Dönüştürme Reaksiyonu 22
3.4 Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) Yöntemi 22
3.5 Hücrelere IL-6 Muamelesi 23
3.6 Hücre Lizatı Hazırlanması 23
3.7 Protein Miktarının Bradford ile Belirlenmesi 23
3.8 Western Blot Yöntemi 25
3.8.1 Kullanılan Solüsyonlar 25
3.9 siRNA Transfeksiyon Yöntemi 26
3.10 İnvazyonun Saptanması 27
3.11 İstatistiksel Analiz 27
4. BULGULAR 28

4.1 Çeşitli İnsan Kanser Hücrelerinde Endojen SATB2 Ekspresyon Seviyesinin Western Blot Analizi İle Gösterilmesi 28
4.2 IL-6'nin A549 ve H1650 Hücrelerine Uygulamasının Bu Hücrelerdeki STAT3 ve AKT Yolaklarının Aktivasyonları Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi 28
4.3 IL-6'nin A549 ve H1650 Hücrelerine Uygulamasının Bu Hücrelerdeki EMT Yönetici Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyonları Üzerine Olan Etkilerinin Western Blot Analizi İle Belirlenmesi 30
4.4 IL-6'nin A549 ve H1650 Hücrelerine Uygulamasının Bu Hücrelerdeki EMT Yönetici Transkripsiyon Faktörlerinin ve Kök Hücre Belirteçlerinin Ekspresyonları Üzerine Olan Etkilerinin GZ-PZR ile Belirlenmesi 31
4.5 A549 ve H1650 Hücrelerinin Transfeksiyon Verimliliğinin Ölçülmesi 32
4.6 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının Hücrelerin Morfolojileri Üzerine Olan Etkileri 33
4.7 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının EMT Belirteçleri Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi 35
4.8 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının EMT Transkripsiyon Faktörleri Üzerindeki Etkilerinin Western Blot ile Belirlenmesi 37
4.9 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının EMT Yürütücü Transkripsiyon Faktörleri Üzerindeki Etkilerinin GZ-PZR ile Belirlenmesi 39
4.10 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının Kök Hücre Belirteçleri Üzerindeki Etkilerinin Western Blot ile Belirlenmesi 41
4.11 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının Kök Hücre Belirteçleri Üzerindeki Etkilerinin GZ-PZR ile Belirlenmesi 42
4.12 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının Fokal Adezyon Kinaz Protein Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi 44
4.13 TGF-β Tarafından İndüklenen EMT Sürecinde SATB2'nin Durumu 45
4.14 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının, IL-6 ve TGF-β Uygulamasının Hücre İnvazyonu Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi 47
5. TARTIŞMA 50
6. SONUÇ 65
7. KAYNAKLAR 68
8. ÖZGEÇMİŞ 78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Metastatik kaskatın belli başlı aşamalarının şematik gösterimi (Scheela ve Weinberg 2012) 8
Şekil 2.2 EMT süreci boyunca kaybedilen ve kazanılan hücresel kompenentler (Tiwari vd 2012)..... 10
Şekil 2.3 EMT sürecinin transkripsiyonel düzenleyicileri ve kanser progresyonu üzerine etkileri (Shih ve Yang 2011). 12
Şekil 2.4 IL-6/JAK2/STAT3 yolağı ve hücredeki bazı mekanizmalar üzerine etkileri (Hodge vd 2005)..... 15
Şekil 2.5 EMT süreci ve kanser kök hücre fenotipinin kazanılmasında rol alan sinyal yolakları ve aralarındaki etkileşimler (Yu ve Jove 2004)..... 17
Şekil 2.6 Trofoblast kök hücrelerinde ve bu hücrelerin farklılaşma sürecinde SATB2 ekspresyon seviyesi (Asanoma vd 2012)..... 20
Şekil 3.1 BD Biocoat Matrigel İnvasion Chamber Genel Görünümü..... 27
Şekil 4.1Çeşitli İnsan Kanser Hücrelerindeki endojen SATB2 ekspresyon seviyelerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi. A549, II-18, H1650, H1703, H1975, Hcc78 (Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanser Hücreleri), HeLa (Servikal Karsinoma) ve Mcf-7 (Metastatik Olmayan Meme Kanseri)..... 28
Şekil 4.2 IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde STAT3 ve AKT yolaklarının zamana bağlı aktivasyonlarının Western Blot analizi ile gösterilmesi..... 29
Şekil 4.3 IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde STAT3 ve AKT yolaklarının zamana bağlı aktivasyonlarının Western Blot analizi ile gösterilmesi..... 29
Şekil 4.4 IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde EMT belirteçlerinin zamana bağlı ekspresyon seviyelerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi..... 30
Şekil 4.5 IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde EMT belirteçlerinin zamana bağlı ekspresyon seviyelerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi..... 30
Şekil 4.6 IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde hedef gen ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin GZ-PZR analizi ile gösterilmesi ($p<0,05$)..... 31
Şekil 4.7 IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde hedef gen ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin GZ-PZR analizi ile gösterilmesi ($p<0,05$)..... 31
Şekil 4.8 A549 hücrelerinin FITC kontrol siRNA ile transfekte edilmesiyle transfeksiyon verimliğinin belirlenmesi (transfeksiyon oranı: %90)..... 32

Şekil 4.9 H1650 hücrelerinin FITC kontrol siRNA ile transfekte edilmesiyle transfeksiyon verimliğinin belirlenmesi (transfeksiyon oranı: %85) 32
Şekil 4.10 Kontrol siRNA ile transfekte edilen A549 hücrelerinin IL-6 ile muamele edilen ve edilmeyen grupların ışık mikroskobu görüntüsü 33
Şekil 4.11 SATB2 siRNA ile transfekte edilen A549 hücrelerinin IL-6 ile muamele edilen ve edilmeyen grupların ışık mikroskobu görüntüsü 33
Şekil 4.12 Kontrol siRNA ile transfekte edilen H1650 hücrelerinin IL-6 ile muamele edilen ve edilmeyen grupların ışık mikroskobu görüntüsü 34
Şekil 4.13 SATB2 siRNA ile transfekte edilen H1650 hücrelerinin IL-6 ile muamele edilen ve edilmeyen grupların ışık mikroskobu görüntüsü 34
Şekil 4.14 A549 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatinde EMT belirteçlerindeki ekspresyon değişimlerinin Western Blot analizi ile belirlenmesi 35
Şekil 4.15 H1650 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatinde EMT belirteçlerindeki ekspresyon değişimlerinin Western Blot analizi ile belirlenmesi 36
Şekil 4.16 A549 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatinde EMT yönetici transkripsiyon faktörlerindeki ekspresyon değişimlerinin Western Blot analizi ile belirlenmesi 38
Şekil 4.17 H1650 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatinde EMT yönetici transkripsiyon faktörlerindeki ekspresyon değişimlerinin Western Blot analizi ile belirlenmesi 38
Şekil 4.18 A549 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 4. ve 8. saatlerinde EMT yönetici transkripsiyon faktörlerindeki ekspresyon değişimlerinin GZ-PZR ile belirlenmesi ($p<0,05$) 40
Şekil 4.19 H1650 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 4. ve 8. saatlerinde EMT yönetici transkripsiyon faktörlerindeki ekspresyon değişimlerinin GZ-PZR ile belirlenmesi ($p<0,05$) 40
Şekil 4.20 A549 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatinde kanser kök hücre belirteçlerindeki ekspresyon değişimlerinin Western Blot analizi ile belirlenmesi 41
Şekil 4.21 H1650 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatindeki kanser kök hücre belirteçlerindeki ekspresyon değişimlerinin Western Blot analizi ile belirlenmesi 42

Şekil 4.22 A549 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 4. ve 8. saatlerinde kök hücre belirteçlerinin ekspresyon değişimlerinin GZ-PZR ile belirlenmesi (p<0,05) 43

Şekil 4.23 H1650 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 4. ve 8. saatlerinde kök hücre belirteçlerinin ekspresyon değişimlerinin GZ-PZR ile belirlenmesi (p<0,05) 43

Şekil 4.24 A549 ve H1650 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatinde FAK ekspresyon seviyelerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi 44

Şekil 4.25 TGF-β ile muamele edilen A549 hücrelerinde SATB2'nin, EMT belirteçlerinin, EMT yönetici transkripsiyon faktörlerinin ve kanser kök hücre belirtecinin ekspresyonlarının zamana bağlı değişiklerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi 46

Şekil 4.26 TGF-β ile muamele edilen H1650 hücrelerinde SATB2'nin, EMT belirteçlerinin, EMT yönetici transkripsiyon faktörlerinin ve kanser kök hücre belirtecinin ekspresyonlarının zamana bağlı değişiklerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi 46

Şekil 4.27 Kontrol siRNA ve SATB2 siRNA ile transfekte edilen A549 hücrelerindeki IL-6 ve TGF-β muamelesinin hücre invazyonuna etkisi (p<0,05) 47

Şekil 4.28 Kontrol siRNA ve SATB2 siRNA ile transfekte edilen H1650 hücrelerindeki IL-6 ve TGF-β muamelesinin hücre invazyonuna etkisi (p<0,05) 48

Şekil 4.29 Kontrol siRNA ve SATB2 siRNA ile trasnfekte edilen A549 hücrelerindeki IL-6 ve TGF-β muamelesiyle invaziv hücrelerin ışık mikroskobundaki görüntüleri 48

Şekil 4.30 Kontrol siRNA ve SATB2 siRNA ile trasnfekte edilen H1650 hücrelerindeki IL-6 ve TGF-β muamelesiyle invaziv hücrelerin ışık mikroskobundaki görüntüleri 49

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1 A549 hücrelerinin Bradford sonucu protein miktarları ve R^2 değeri..... 24

Tablo 3.2 H1650 hücrelerinin Bradford sonucu protein miktarları ve R^2 değeri..... 24

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS……..Amonyum Persülfat
BSA……..Dana Serum Albumin
cDNA……...Komplementer DNA
CSC……Cancer Stem Cell
ECM……Ekstraselüler Matriks
EMT……..…Epitelyal-Mezenkimal Transisyon
FAK……..……..….Fokal Adezyon Kinaz
FBS……...……..Fetal Dana Serumu
GZ-PZR……..……Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
HRP……..Horseradish Peroksidaz
IL-6……...İnterlökin-6
KHDAK……Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
KKH……..Kanser Kök Hücre
ml……..Mililitre
mM……Milimolar
mRNA……..……..Mesajcı RNA
nM……Nanomolar
NSCLC……Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
PVDF……...Poliviniliden diflorid
RTK……..Reseptör Tirozin Kinaz
SATB2……..…….Special AT-rich sequence-binding protein 2
SDS……Sodyum Dodesil Sülfat
siRNA…….……Small interfering RNA
Sox-2……..…SRY (sex determining region Y)-box 2
STAT3……..Signal transducer and activator of transcription 3
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 IL-6, sitokinler içerisinde kilit bir yere sahiptir. Yapılan araştırmalar IL-6'nın, akciğer kanseri, meme kanseri gibi birçok kanser türünün tümörgenezinde, invazyonunda, metastazında ve kemoterapik ilaçlara dirençlilik kazanması gibi süreçlerindeki rollerini göstermiştir. Akciğer adenokarsinomalı hastaların malign karakterdeki plevral sıvılarında yüksek seviyedeki IL-6 varlığı dikkatimizi çeken bir bulguydu.

Çeşitli kanser hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda IL-6, invazyonun kilit bir adımı olan Epidermal Mezenkimal Transisyon (EMT) sürecini tetiklediği gösterilmiştir. Son güncel araştırmalarla; IL-6'nın, metastaz ve kanserin nüksetmesiyle ilişkili olan kanser kök hücrelerinin oluşumlarında önemli bir yere sahip olduğu kanıtlanmıştır. Bu bulguları destekleyecek şekilde, EMT süreciyle kanser hücrelerinin kanser kök hücrelerine dönüşmesiyle paralellik olduğu belirtilmektedir. Bu iki ayrı süreci yöneten transkripsiyon faktörlerinin de büyük oranda ortak olduğu araştırmalarla gösterilmiştir. Son olarak bir EMT indükleyicisi olan IL-6'nın, kanser kök hücre fenotipinin kilit bir belirteci olan CD44 ekspresyon artışına neden olduğu da kanıtlanmıştır. İşte araştırmamızın çıkış noktası, EMT ve kök hücre fenotipinin kazanılması arasındaki bu sıkı ilişkinin varlığıydı. Son güncel araştırmalarda, hücre farklılaşmasının kilit bir düzenleyicisi olarak tanımlanan kromatin yeniden modelleme proteini olan SATB2 araştırmamızın baş faktörü olarak seçilmiştir

1.1 Amaç

Bu projemizle, KHDAK hücre dizilerinde IL-6 tarafından indüklenen EMT sürecini ve kök hücre fenotipinin kazanılmasını göstermek ve SATB2'nın bu süreçlerdeki potansiyel düzenleyici rolünü ilk kez araştırarak ortaya çıkarabilmeyi amaçlamaktayız.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Akciğer Kanserleri

Dünya Sağlık Örgütünün 2012 verilerine göre; dünya genelindeki kanser nedenli ölüm sayısı 8 milyon 200 bin olarak açıklanmıştır. Akciğer kanseri ise, bu kanser nedenli ölümlerin içinde 1 milyon 690 bin ile tüm kanser türleri içerisinde en agresif kanser türüdür (Web_1).

KHAK tüm akciğer kanserlerinin %20'sini kapsar ve vücutta birçok bölgeye metastaz yapabilir. KHAK direkt sigara kullanımı ile ilişkilidir ve sadece %1 oranında sigara içmeyenlerde görülür.

KHDAK akciğer kanserinin daha yaygın olarak görülen tipidir ve tüm akciğer kanserlerinin %80'i oranında görülür. KHDAK tümörde bulunan hücre tiplerine bağlı olarak üç ana tipte görülür.

- Bronşioloalveolar kanser
- Skuamoz hücre karsinoma
- Büyük hücre karsinoma

Akciğer kanseri kontrol edilemeyen büyüme, apoptoza direnç, tümör anjiyogenezi, doku invazyonu ve uzak metastaz ile sonuçlanan genetik değişikliklerin kazanılmasıyla adım adım gelişir.

2.1.1 Etiyolojisi

Akciğer kanserinin meydana gelmesinde birçok risk faktörü rol almaktadır. Sigara kullanımı, akciğer kanseri için en önemli risk faktörlerinden biridir ve akciğer kanserlerinin büyük bir bölümünden aktif sigara içiciliği sorumlu tutulmaktadır. Bunun yanında akciğer kanserlerinin ¼"ünün sigara içme öyküsü bulunmayan bireylerde meydana gelmesi, pasif sigara içiminin de akciğer kanser oluşumunda önemli bir risk

faktörü olabileceğini göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, pasif sigara içicilerinde akciğer kanser oluşum riskinin 3.5 kat arttığı belirtilmiştir (Maghfoor ve Perry 2005, Vineis vd 2005, Müsellim 2007). Sigara ve akciğer kanserinin ilişkisi 1950'lili yıllardan beri kanıtlanmış olup, sigara kullanan kişilerde akciğer kanseri görülme sıklığı 24-36 kat artmaktadır (Müsellim 2007). Dumanında 4000'den fazla kimyasal madde bulunduran sigarada, 60'dan fazla kimyasal maddenin, radyoaktif özellikteki radon, kurşun, bizmut ve polonyumun karsinojen oldukları ispatlanmıştır (Boffetta 2006). Ayrıca sigara içme süresi, içilen sigara sayısı, içilen sigara tipi ve sigaraya başlama yaşı akciğer kanseri oluşumunu etkilemektedir. Bunun yanında, sigaranın filtresiz olması ve yoğun katran içermesi de ilave risk faktörleri arasındadır (Müsellim 2007).

Beslenme ve diyetteki eksiklikler de akciğer kanseri gelişimine neden olabilmektedir. Antioksidan vitaminlerin ve özellikle karotenoidden zengin meyve ve sebzelerin, akciğer kanseri ile birlikte diğer kanser türlerinin oluşum riskini azalttığı düşünülmektedir (Krinsky ve Johnson 2005, Ruano-Ravina vd 2006). İnsanlarda da β-karoten/retinolden zengin olan diyetle beslenen kişilerin akciğer kanserine %40 oranla daha az yakalandığı bulunmuştur (Müsellim 2007). Sigara içme durumuna bakılmaksızın, total veya spesifik tip yağların alınımı ve akciğer kanseri riski arasında ilişkiye rastlanılmamıştır. Buna karşın kurutulmuş et (sosis, preslenmiş ördek ve kurutulmuş domuz gibi), yağda kızartarak pişirilen gıda ürünleri ve artan akciğer kanser riski arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Krinsky ve Johnson 2005, Ruano-Ravina vd 2006).

Freudenheim ve ark. (2005)'nın yaptığı 399.767 gönüllü ve 3137 akciğer kanseri olgusunu içeren kapsamlı bir araştırmada, günde en az 30 g alkol tüketen insanlarda alkol tüketmeyenlere göre akciğer kanseri oluşumu açısından yüksek riske sahip oldukları belirlenmiştir.

Mevcut veriler, fiziksel olarak aktif bireylerin düşük akciğer kanseri riskine sahip olduklarını ileri sürmektedir. Gün boyu düzenli fiziksel aktiviteye sahip bireylerde, akciğer kanser riskinde %13-30 azaltma olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda, fiziksel aktivitenin, ağır sigara içiciler arasında da akciğer kanser riskini azaltmaya yardımcı olabileceği öngörülmektedir (Lee 2003, Alfano vd 2004)

Akciğer kanseri riskinin, çeşitli polisiklik aromatik hidrokarbon bileşiklerinden zengin hava kirliliğinin olduğu bölgelerde daha yüksek sıklıkta gözlenmesi, bu bileşiklerin de akciğer kanser oluşumunda rol oynayabildiklerini göstermektedir. Boffetta ve ark. (2006), Avrupa şehirlerinde hava kirliliğinin akciğer kanser oluşum nedenlerinin %11'ini oluşturduğunu belirlemişlerdir. Hava kirliliğine benzer olarak, bazı kimyasal maddelere

mesleki maruziyetin de akciğer kanser oluşumunda önemli olduğu görülmektedir. İyi bilinen insan karsinojenleri arasında kristallin silis ve krizotil asbesttir. Silis tozuna ve asbeste maruz kalan işçiler, akciğer kanserinin gelişimi için yüksek riske sahiptirler (Molina vd 2008). Aynı zamanda, uranyum madenlerinde ve nükleer alanda çalışan işçiler, radyoaktif maddelere maruz kaldıklarından akciğer kanseri için daha yüksek riske sahiptirler (Boffetta 2004)

Geçen 60 yıllık sürede akciğer kanserinin ailesel olarak da gözlenmesi, hastalığın oluşumunda kalıtsal bir yatkınlığın varlığını desteklemektedir (Molina vd 2008). Akciğer kanseri öyküsü bulunan ailelerde, kanser riskinin birinci derece akrabalarda yaklaşık 2 buçuk kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (Müsellim 2007). Akciğer kanserli ailelerde, özellikle eşey hücrelerinde p53 geninde ve epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR)'nü kodlayan genlerde oluşabilecek genetik değişikliklerin akciğer kanser riskini arttırdığı bildirilmiştir (Hwang vd 2003, Li ve Hemminki 2004). Bailey-Wilson ve ark. (2004) 52 ailede yaptıkları kapsamlı linkaj analizi ile, 6q23-25'eki değişimler ve akciğer kanseri arasında önemli bir ilişkinin varlığını göstermişlerdir.

Akciğer kanseri ile ilgili yapılan çalışmalarda, akciğer kanseri oluşum riskinin artmasında "*Ras*" (*Kras, Hras, Nras*) ve "*Myc*" (*C-myc, L-myc, N-myc*) gibi onkogenlerde, *p53* ve *retinoblastoma (Rb)* gibi tümör baskılayıcı genlerde ve EGFR gibi büyüme faktörleri ve reseptörleri kodlayan genlerde meydana gelen genetik değişiklikler de sorumlu tutulmaktadır.

2.1.2 Histolojik Sınıflandırma

Akciğer tümörlerinin histolojik sınıflandırılması ışık mikroskobu görüntülerine ve standart histolojik boyama tekniklerine göre yapılmaktadır. DSÖ'nün akciğer kanseri sınıflamasına göre akciğer tümörleri 2 ana tipte bulunmaktadır. Bunlar, küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC, Small Cell Lung Cancer) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC, Nonsmall Cell Lung Cancer)'dir.

I) Küçük Hücre Dışı Akciğer Karsinomu (KHDAK)

KHDAK, KHAK"den daha yaygındır ve akciğer kanserlerinin yaklaşık % 80'ini oluşturur. KHDAK"nin en sık gözlenen histolojik alt tipleri arasında skuamöz hücreli karsinom, bronşioloalveolar karsinoma ve büyük hücreli karsinom yer almaktadır (Travis vd 2004).

a) Skuamöz (Yassı hücreli, Epidermoid) Hücreli Karsinom

Epitel hücrelerinden köken alan farklı derecelerde keratinizasyon ve hücresel bağlantılar meydana getiren malign bir tümördür (Travis vd 2004, Yılmazbayhan 2007). KHDAK'lerinin yaklaşık olarak %25-30'unu oluşturmaktadır. Sıklıkla erkeklerde görülen bir tümör olup, sigara içimi ile birlikte görülme sıklığı artmaktadır (Karlıkaya 2005). Skuamöz hücreli karsinomun %90'nından fazlası sigara içen kişilerde görülmektedir (Spiro ve Porter 2002). Bu karsinom, büyük bronşların merkezinden çıkma eğilimindedir ve lokal hiler lenf nodlarına kolay yayılmakla birlikte diğer histolojik tiplere oranla toraks dışına daha geç metastaz yapmaktadır (Kumar vd 2000). Skuamöz hücreli karsinomun papiller, berrak hücreli, küçük hücreli ve bazaloid olmak üzere alt tipleri de bulunmaktadır (Travis vd 2004).

b) Büyük Hücreli Karsinom

Belirgin nükleolus, büyük nükleus ve orta derecede sitoplazma bulunduran, büyük hücrelerden meydana gelen bir tümördür. Büyük hücreli karsinomlar az diferansiye olmuşlardır ve skuamöz hücreli karsinom, bronşioloalveolar kanser ve küçük hücreli karsinom özelliklerini barındırmazlar (Yılmazbayhan 2007). Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %9"unu oluşturmaktadırlar (Travis vd 2004). Erken evrede uzak metastaz yapma özellikleri nedeni ile, diğer histolojik alt tiplere göre daha kötü prognoza sahiptirler (Kumar vd 2000).

c) Bronşioalveolar kanser (BAK)

Asiner, papiller, bronkioalveolar, müsin büyüme paternli solid tip veya bunların kombine formlarını gösteren, glandüler diferansiasyonlu veya müsin üretimli bir malign epitelyal tümördür. Birçok ülkede Bronşioloalveolar kanser, akciğer kanserinin en sık histolojik alt-tipi olarak skuamöz hücreli karsinomu geride bırakmıştır (Travis vd 2004). KHOAK içerisinde %30-35 oranında Bronşioloalveolar kanserler görülmektedir. Genellikle 40 yaşın altındaki kadınlarda görülmektedir (Kumar vd 2000). Bronşioloalveolar kanser, diğer histolojik alt-tiplere oranla sigara içmeyenlerde daha fazla sıklıkta gözlenmektedir (Travis vd 2004). Bronşioloalveolar kanserler, skuamöz hücreli karsinoma benzer şekilde santral yerleşimli olabildiği gibi, çoğunlukla perifere yerleşmektedir. Genellikle yavaş büyüyen bu tümörler, daha küçük kitle oluştururlar ve diğer alt-tiplere oranla daha erken evrede metastaz yaparlar (Kumar vd 2000). Bronkioalveolar karsinom, akciğerin periferal bölgelerine yerleşen, tek veya daha sıklıkla çoklu diffüz tümör oluşumudur. Histolojik olarak akciğer parankim yapısını bozmaksızın duvar boyunca yayılmaktadır (Karlıkaya 2005).

II) Küçük Hücreli Akciğer Karsinomu (KHAK)

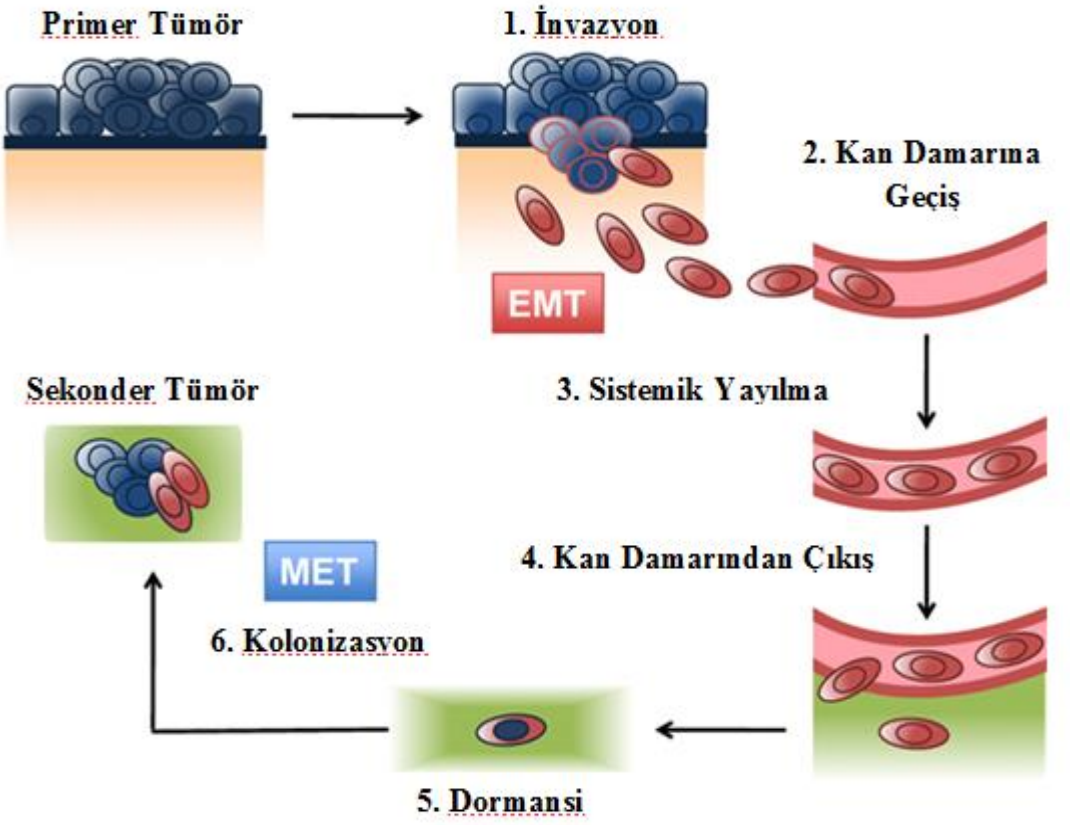
Dar sitoplazmalı, sitoplazma sınırları iyi seçilemeyen, ince granüler kromatin yapısına sahip, nükleolusu olmayan veya fark edilemeyen bir malign epitelyal tümördür. Tümör hücreleri yuvarlak, oval veya iğsi hücrelerdir. "Nüklear molding" olarak adlandırılan nükleusların birbirlerinin yüzey biçimlerini alacak şekilde sıkışık dizilimi belirgindir. Nekroz tipik olarak belirgindir ve mitoz sayısı yüksektir (Travis vd 2004). Küçük hücreli akciğer karsinomu, sigara içen kişilerde daha sık meydana gelmektedir ve erkeklerde kadınlara oranla daha fazla görülmektedir. KHAK, akciğer kanserinin yaklaşık olarak %20-25'ini oluşturmaktadır. Soluk gri renkte, santral lokalizasyonda kitlelerdir. Hiler ve mediastinal lenf nodlarını erken fazda tutarlar. KHAK hızlı büyüyen, geniş infiltrasyon yapan ve erken yayılan lezyonlar olup, nadiren rezekte edilebilir durumda yakalanırlar (Kumar vd 2000).

2.2 İnvazyon ve Metastaz

İnvazyon, neoplazm gösteren hücre ya da hücre grubunun proliferasyon veya hücre göçü yoluyla bulunduğu bölgeye komşu olan dokuya penetre olarak işgal etmesi olarak tanımlanırken, metastaz; uzak dokularda, tümör ile devamlılığı olmayan sekonder implantların gelişmesi olarak tanımlanır. Kanser metastazı, diğer kanser türlerinde de olduğu üzere akciğer kanseri hastalarının da kötü prognozlarının başlıca nedenidir (Shih ve Yang 2011) Cerrahi olarak tümörün tamamen rezekte edildiği hastalarda bile kanser, sıklıkla metastaz ile nüksetmektedir (Shih ve Yang 2011). İşte bu nedenle, akciğer kanserinin etkili tedavisi için metastaz gelişiminin mekanizmaları, en çok araştırılan konuların başında gelmektedir (Shih ve Yang 2011). Ancak tüm bu yoğun araştırmalara karşın, metastaz süreci hala yeteri seviyede anlaşılamamıştır (Leber ve Efferth 2009). Dolayısıyla; bu problemlerin çözümü için, akciğer kanser hücrelerinin yayılımının moleküler mekanizmalarını, tüm ayrıntılarıyla anlamaya ve aydınlatmaya ihtiyacımız vardır (Shih ve Yang 2011).

Kanser metastazının patogenezi, birbirleriyle bağlantılı ve birbiri ardınca gelen bir seri aşamadan oluşan kompleks bir süreçtir (Shih ve Yang 2011). Metastazın gerçekleşmesi için gerekli adımlar; tümör hücrelerinin birbirlerinden ve kendilerini çevreleyen ECM'den ayrılması, çeşitli proteazlarla ECM'nin degrede edilmesi , bazal membranın degrede 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 sistemin çıkış ve son

olarak metastatik lezyonun oluşumudur (Mehlen ve Puisieux 2006, Youlden vd 2008, Leber ve Efferth 2009). Bu metastatik kaskat içerisinde en kritik adım invazyon sürecidir . İnvazyon, kendilerini çevreleyen mikroçevre ile birlikte etkileşimleri de içine alan bir seri biyolojik aktivitelerden oluşmaktadır (Woodhouse vd 1997). İnvazyonun gerçekleşmesi için gerekli olan ilk adım, hücreleri birbirine ve ECM'ye bağlı tutan kaderinler, integrinler, sıkı bağlantı proteinleri, selektinler ve immünoglobin süper ailesi üyelerini içine alan hücre adezyon moleküllerindeki değişimlerle hücrenin serbest kalmasıdır (Perlikos vd 2013). Bu adezyon moleküllerin arasında E-kaderin kaybı, kanser hücresinin primer tümörden ayrılması ve hareket yeteneği kazanabilmesi için gerçekleşmesi gereken en önemli olaydır (Yang vd 2008). Bu nedenle, E-kaderin proteinini kodlayan CDH1 geni invazyon baskılayıcı gen olarak tanımlanmaktadır. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar, KHDAK hastalarında kötü prognoz ile E-kaderin seviyesinin sıkı bir ilişki içinde olduğunu göstermiştir (Wu vd 2012).



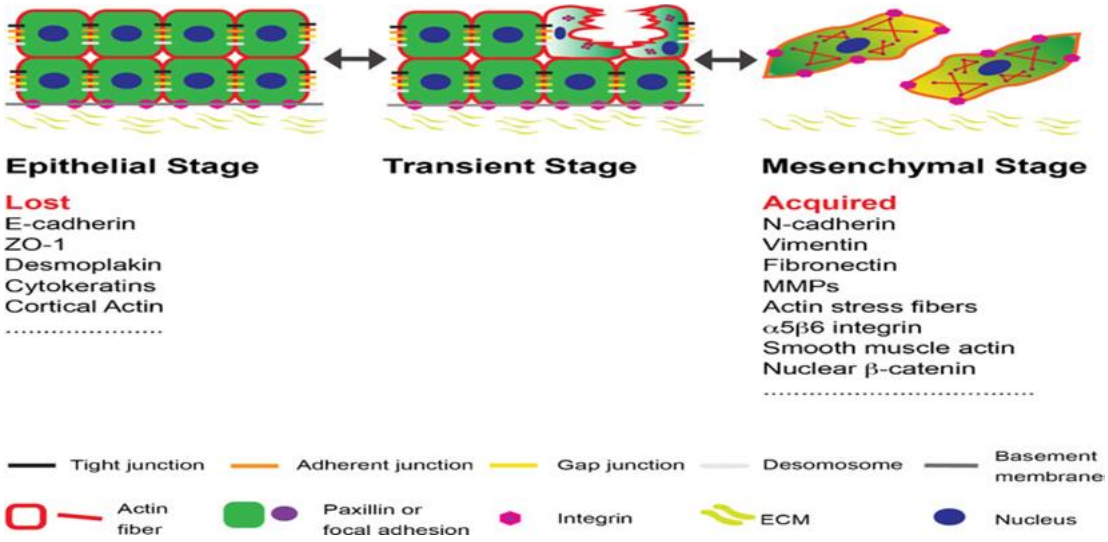
Şekil 2.1 Metastatik kaskatın belli başlı aşamalarının şematik gösterimi (Scheela ve Weinberg 2012)

Hücre-hücre ve hücre-matriks bağlantılarının değişmesinin yanısıra invazyon için gerekli diğer bir önemli mekanizma hücre hareketinin sağlanması yani hücre göçüdür. İnvazyon süreci geçiren kanser hücrelerinde tanımlanan başlıca 3 hücre hareketi yolu vardır. Bunlardan birincisi, hücrenin lokal olarak çevresindeki ECM'yi salgıladıkları proteazlarla degrede edip, bir yandan hem spesifik ECM ligandlarında çapalanacak lamelipoda oluşturarak hem de aktin bazlı hücre kasılması yardımıyla hücre kendisini stromaya doğru bir yönde hareket ettirmesidir. Bu tip bir hücre hareketini EMT sürecinde görmekteyiz. İkinci tip hücre hareketi ise bir önceki tarzdan daha agresif bir karaktere sahip olan amipsi tarzdaki hücre hareketidir. Bu tarz bir hücre hareketinde, hücre küresel bir morfolojiye sahip olarak, salgıladıkları proteazlarla ECM'de açtıkları izler boyunca kayarak hareket ederler. Son olarak invazyon sürecinde karşımıza çıkan hücrelerin başvurdukları hücre hareketi de, hücrelerin tabakalar veya kümeler şeklinde bireysel olarak değil, toplu bir şekilde gerçekleştirilen hücre göçüdür (Hanahan ve Weinberg 2000, Yilmaz ve Christofori 2010).

2.3 Epitelyal Mezenkimal Transisyon

Epitel hücreler; adherens bağlantılar, dezmozomlar, sıkı bağlantılar ve gap bağlantılarından oluşan özelleşmiş bağlantı yapıları tarafından sağlanan lateral ve sıkı bir şekilde birbirlerine bağlı hücre tabakaları oluştururlar. Ayrıca epitel hücreleri, bu düzgün bağlantı yapılarından ve bazal yüzeylerindeki bazal membrana olan bağlantılarından dolayı belli bir apiko-bazal bir polariteye sahiptirler. Normal şartlar altında epitel hücreleri bu bazal membran yapısını geçemezler (Yang ve Weinberg 2008). Epitel hücrelerin aksine, mezenkimal hücreler ön-arka polaritesine sahip ve komşu mezenkimal hücreler ile zayıf bir şekilde bağlantı yapan bir görüntü sergilerler. İlaveten, epitel hücrelerinden farklı olarak, mezenkimal hücreler bireysel olarak bu basal membranı geçebilmektedirler. Embriyonik gelişim boyunca, bu iki farklı hücre tipinin organizmayı programlandığı plan içerisinde çeşitli yapıları, dokuları ve organları oluşturmak üzere birbirlerine dönüşüm geçirdikleri bilinmektedir. Epitel bir hücrenin apiko-bazal hücre polaritesi ve hücre-hücre bağlantıları gibi önemli epitelyal özelliklerini kaybettiği, hücre-hücre bağlantılarının kaybolduğu, ön-arka polaritesi, artan hücre hareketi ve invazyon yeteneği gibi mezenkimal özelliklerin de kazanılması ile sonuçlanan morfogenetik sürece Epitelyal Mezenkimal Transisyon (EMT) adı verilmektedir. EMT, daha önce de değindiğimiz üzere başta embriyonik gelişim sürecinde olmak üzere, yetişkin bireylerde gerçekleşmek üzere doku tamiri sürecinde

ve patolojik olarak doku fibrozis olaylarında da gözlenmektedir. Ancak yapılan çalışmalar gösterdi ki; EMT'nin, kanser progresyonunda da önemli bir rolü vardır. EMT'nin kanser progresyonundaki başlıca invazyon, metastaz, kemoterapik ilaçlara direnç ve en önemlisi de kanser kök hücrelerinin oluşumunda rol almaları ile kanser progresyonu için kilit bir mekanizmadır. Kanser kök hücrelerinin varlığı, tümör oluşumunun tetiklenmesi ve ilerlemesini yanısıra metastaz için de kritik olduğu düşünülmektedir (Hay 1995, Berx vd 2007, Morel vd 2008, Xiao ve He 2010).



Şekil 2.2 EMT süreci boyunca kaybedilen ve kazanılan hücresel kompenentler (Tiwari vd 2012)

2.3.1 EMT'nin Sınıflandırılması

Mekanizmalarına bağlı olarak, EMT 3 farklı sınıfta değerlendirilir. Tip 1 EMT olarak adlandırılan embriyonik dönemdeki EMT, tip 2 EMT olarak adlandırılan fibrozis ve yara iyileşmesi süreçlerinde görülen EMT ve son olarak da tip 3 EMT olarak anılan kanser progresyonundaki EMT sürecidir (Kalluri ve Weinberg 2009, Thiery vd 2009).

Tip 1 EMT, embriyonik gelişim sürecinin yanısıra doğum sonrası büyüme boyunca da meydana gelmektedir. Ayrıca epitelyal homeostazının sürdürülmesinde de rol oynamaktadır (Ksiązkiewicz vd 2012). EMT süreci boyunca değişen hücre fenotipi dolayısıyla, hücreler birbirlerinden ayrılarak, stromaya doğru invazyona başlarlar (Haraguchi vd 2008). EMT yoluyla epitel hücrelerden oluşan primer mezenkimal hücreler, akabinde EMT'nin tersi olan MET (Mezenkimal Epitelyal Transisyon) geçirme potansiyeline sahiptir ki; bu yolla sekonder epitel hücreleri oluşturulabilmektedir (Chaffer vd 2007). Embriyonik gelişim ve sonrasındaki süreçler esnasında epitel hücreler, ardından MET'in takip ettiği birçok EMT geçirebilmektedir (Ksiązkiewicz vd 2012). Tip 2 EMT, yara iyileşmesinde, doku yenilenmesi ve organ fibrozis süreçleriyle

ilişkili olan EMT tipidir (Kalluri ve Weinberg 2009). Tip I EMT'nin aksine, tip II EMT inflamasyon ile ilişkili olup ve inflamasyon ortadan kalkar kalkmaz kaybolur (Nurwidya vd 2012). Fibrozise benzer biçimde, onkogenik süreç hücrede homeostazı bozabilir ve tip 3 EMT olarak adlandırılan onkogenik EMT'yi indükleyebilir (Książkiewicz vd 2012). Onkogenik EMT, metastatik kaskatın en önemli adımı olup mezenkimal hücreler için karakteristik olan invaziv ve hareketliliğe sahip fenotipi kazanması için karsinoma hücrelerine imkan sağlamaktadır (Thiery 2002).

2.3.2 EMT Sürecinde Hücresel Kompenentler

EMT sadece basit bir morfolojik değişim süreci olmanın yanında, çok çeşitli epitelyal ve mezenkimal genlerin transkripsiyonel, post-translasyonel, translasyonel ve post-translasyonel değişimleriyle ilişkili olan, oldukça karmaşık ve çok adımlı bir süreçtir (Yang vd 2006). *E-kaderin, Okludin, Klaudin, Desmoplakin, Tip IV kollejen, Laminin 1, Sitokeratin, Katenin, ZO-1 ve Musin-1* gibi epitelyal belirteçlerinin ekspresyonları azalırken, *N-kaderin, vimentin, α5β1 integrin, α5β6 integrin, Tenascin C, Laminin β1, β5, VIα kollejen, Fibronektin, FSP-1 ve α-SMA* gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonları artmaktadır. (Jechlinger vd 2003, Christofori 2006, Xiao ve He 2010, Soini 2012). EMT sürecinde gerçekleşen değişimlerin en önemlileri *E-kaderin* ekspresyonunun azalmasından sonra en önemlisinin *N-kaderin* ekspresyon artışı olarak belirtilmektedir ki; N-kaderin hücrelerin stromaya afinitelerini sağlamaktadır (Perlikos 2013). N-kaderin ekspresyon artışı sonucunda kanser hücrelerinin stromaya doğru göçleri artmaktadır (Leber ve Efferth 2009).

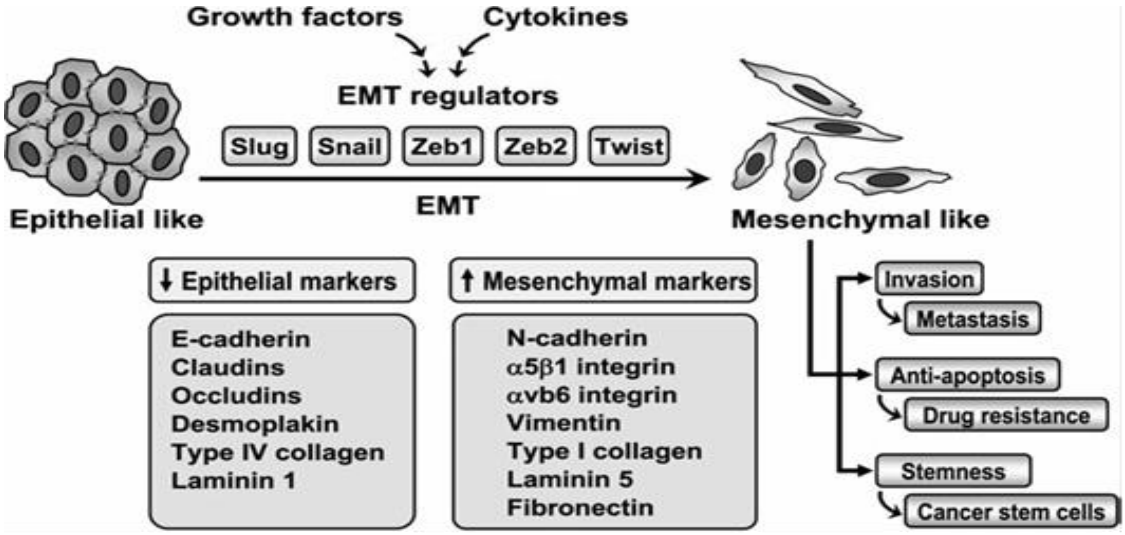
2.3.3 EMT Sürecinde Transkripsiyon Faktörleri

EMT'nin kanserde en önemli ayırıcı özelliği, invazyon ve metastazın bir baskılayıcısı olarak kabul gören *E-kaderin* ekspresyonunun azalmasıdır (Thiery 2012). E-kaderin, epitelyal adherens bağlantıları oluşturmak içim kalsiyuma bağımlı olarak etkileşen homotipik bir hücre adezyon molekülüdür (Shih ve Yang 2011). Çeşitli transkripsiyon faktörler, *E-kaderin* geninin ekspresyonunu transkripsiyonel olarak baskılayabilmektedir. Bunlar; zinc finger proteini ailesi içinde yer alan *Snail1, Snail2 (Slug), Zeb1, Zeb2/SIP1* ve basic helix-loop-helix faktörler olarak adlandırılan *Twist1* ve *E47* transkripsiyon faktörleridir (Peinado vd 2007, de Herreros vd 2010). Bu transkripsiyonel faktörler EMT'i gerçekleştirmek üzere *Kaderinler, Klaudinler, Okludinler, Plakofilinler, MUC1 ve sitokeratin* gibi çeşitli epitelyal belirteçleri kodlayan bir takım genleri baskılamaktadırlar (Shih ve Yang 2011). Bunun yanısıra; bu transkripsiyonel faktörler; *PTEN, p53, Bid, PUMA ve DFF40* gibi pro-apoptotik genlerin

ekspreyonlarını da baskılayabilirler. Bu nedenle; radyoterapi, kemoterapi, endokrin terapi ve hedeflenmiş terapilere direnç ile sıkı ilişkilidirler (de Herreros vd 2010, Singh ve Settleman 2010). Ayrıca, EMT indükleyici bu transkripsiyonel faktörlerin, ALDH1 (aldehyde dehydrogenase 1) proteini gibi kök hücre markırlarının sentezi için gerekli olan Sox-2, Nanog, KLF4 ve T cell factor-4 gibi kök hücre fenotipinin karunmasında rol alan genlerin ekspresyonlarını da indükledikleri gösterilmiştir (Kurrey vd 2009). Tüm bu bilgiler bize, EMT'nin kanser progresyonundaki rollerinin sadece invazyon ve metastazla kısıtlı olmayıp, kanser kök hücre oluşumu ve terapiye dirençlilik gibi önemli süreçlerde de rol aldıkları gösterilmektedir.

2.3.4 EMT ve Kanser Kök Hücre Fenotipinin Kazanılması

Kanser kök hücre özellikleri, kendini sonsuz yenileyebilme ve farklılaşabilme yeteneğine sahip, ayrıca kemoterapiye ve radyoterapiye direnç gibi kanser progresyonunda önemli özellikleri içine almaktadır (Santisteban vd 2009). Kanser kök hücreleri, ilk olarak hematopoietik kanser türlerinde tanımlanmışlardır (Bonnet ve Dick 1997). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda meme, kolon, ve beyin gibi solid tümörlerde de tanımlanmışlardır (Al-Hajj vd 2003, McDonald vd 2009). Al-Hajj ve arkadaşları, ilk olarak CD44(+)/CD24(-) fenotipini meme kanser kök hücrelerinin belirteci olarak belirtmişlerdir (Al-Hajj vd 2003). Okudela ve arkadaşları ise akciğer kanserinde kök hücre belirteçleri üzerine yaptıkları çalışmada, *CD44* ekspresyonu yüksekliğinin, akciğer kanseri için de önemli bir belirteç olduğunu göstermişlerdir (Okudela vd 2012).



Şekil 2.3 EMT sürecinin transkripsiyonel düzenleyicileri ve kanser progresyonu üzerine etkileri (Shih ve Yang 2011).

Yakın zamanda yapılan araştırmalar EMT'nin, sadece kanser hücrelerinin invazyonuyla ilişkili olamayan, aynı zamanda yukarıda ifade ettiğimiz gibi kanser hücrelerinin kemoterapik ilaçlara direnç kazanmaları ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Daha da önemlisi, EMT sürecini yöneten transkripsiyon faktörlerinin, kök hücrelere ait hücrelerin kendi kendine yenileme (self-renewal) gibi karakteristik özelliklerin kanser hücrelerine kazandırılmasında rol aldıkları belirtilmektedir (Scheela vd Weinberg 2012). EMT ile CD44(+)/CD24(-) fenotipinin kazanılması arasındaki ilişkiye gelince; EMT düzenleyici transkripsiyonel faktörler, kök hücre özelliklerini sağlayan proteinleri düzenleyebilirken, bunun tersi olarak kök hücre özelliklerinde rol alan proteinler ve sinyal yolakları EMT düzenleyici transkripsiyonel faktörleri direkt olarak düzenleyebilmektedir (Mani vd 2008, Morel vd 2008, Scheela vd Weinberg 2012). Örneğin; Wnt/β-katenin sinyal yolağının indükleyicisi olan β-katenin proteininin nükleer lokalizasyonunun, spesifik olarak EMT'nin gerçekleştiği invaziv bölgelerinde göterilmiştir (Brabletz vd 1998). CD44(-)/CD24(+) tipi hücrelere nazaran CD44(+)/CD24(-) kök hücre fenotipine sahip hücrelerin, EMT fenotipinin belirteci olan *CDH2 (N-cadherin), VIM (Vimentin), FN1 (Fibronectin), ZEB1, FOXC2, SNAI1 (Snail), SNAI2 (Slug), TWIST1* ve *TWIST2* genlerinin ekspresyonlarının yüksek olduğu ve CDH1 (E-kaderin) geninin ekspesyonun düşük olduğu belirtilmektedir (Mani vd 2008).

2.3.5 Tümör Mikroçevresi

Kanserin, sağlıklı bir hücrenin proto-onkogenlerinde ve/veya tümör baskılayıcı genlerinde genetik ve/veya epigenetik anormallikler ile transforme olmuş hücrelerden oluştuğu uzun zamandan beri bilinmektedir. Bu anormal değişimlerin birikimi, hücre otonom tarzında önemli bir proliferatif, invaziv ve sağkalım özelliklerini kanser hücrelerine bahşetmektedir. Ancak tümör dokusu, kanser hücrelerine ilaveten, çok fazla sayıda ve çeşitte transforme olmamış hücrelerden, büyüme faktörelerinden, sitokinlerden ve özelleşmiş bir ECM (ekstra-selüler matriks)'den oluşan stromanın da varolduğu kompleks bir dokudur. Stroma içerisinde bulunan bu destekleyici hücreler başlıca; fibroblastlar, miyofibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, perisit hücrelerini, lökositler, endotel hücreleri, kemik iliği-kökenli hücreleridir. Tüm bu hücrelerin hepsi tümör mikroçevresinin kompleks yapısını meydana getirmek üzere işbirliği yapmaktadırlar. Son bulgular, tümörgenezin büyük oranda tümör ilişkili stromadan (tümör mikroçevresi) alınan içeriksel sinyallere bağımlı olduğunu önermektedir. Kanser ilişkili stroma, tümör progresyonunu modüle eden çeşitli patofizyolojik süreçler aracılığıyla karsinoma hücrelerine devamlı ve aktif bir destek sağlamaktadır (Hanahan

ve Weinberg 2000, Bissell ve Radisky 2001, Bhowmick vd 2004, Polyak vd 2009, Shimoda vd 2010). Birçok kanser türünün gelişiminde, stromanın bu önemli katkısı geniş kapsamlı klinik kanıtlarla da desteklenmektedir (Orimo ve Weinberg 2006). Yapılan birçok çalışma, tümör stromasının metastazı desteklenmesindeki rolünü göstermiştir. Tümör stromasında bulunan kanser hücreleri ve stromal hücreler tarafından salınan kemokinlerin ve sitokinlerin çoğunun, kanser progresyonunun çeşitli aşamalarında önemli rol oynadıkları belirtilmektedir. Sitokinler, hem otokrin hem de parakrin tarzda etki gösteren çeşitli hücre tiplerinden salınan, çözünür faktörlerin geniş bir ailesidir (Ao vd 2007).

2.3.6 Sitokinler ve Sinyal Yolakları

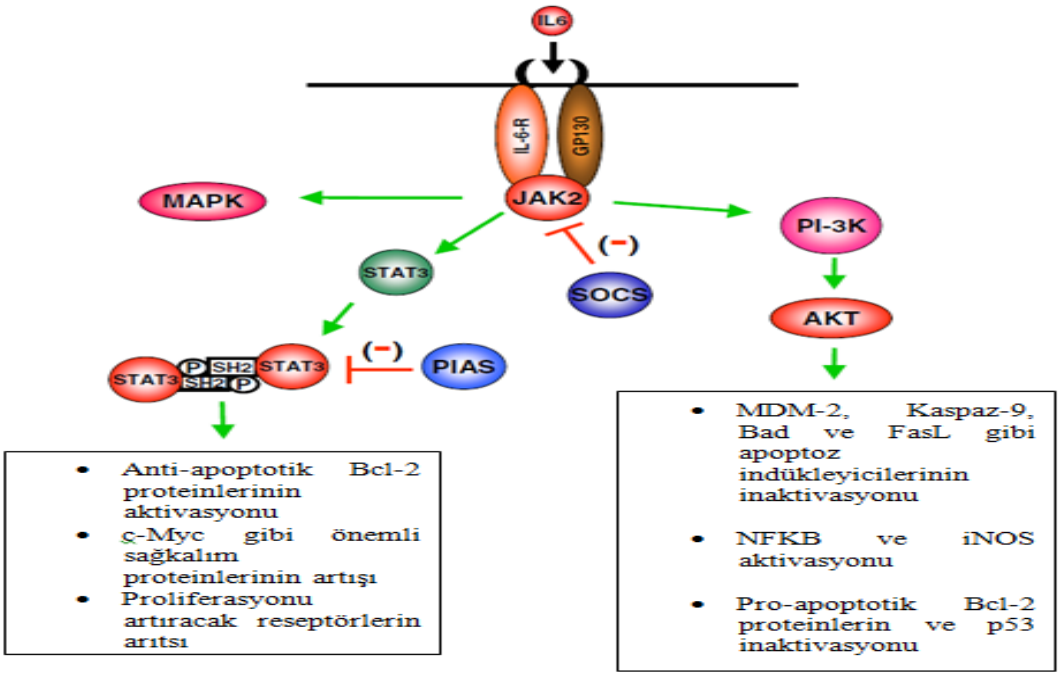
EMT süreci K-Ras (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) ve Her2 (Human epidermal growth factor receptor 2) gibi onkogenik aktivasyonlarla tetiklenebilmektedir. Ayrıca, tümör mikroçevrelerinde bulunan kanser-ilişkili fibroblastlar ve immün hücreler gibi stromal hücreler tarafından salınan Wnt, TGF-β (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 (Edme 2002, Jenndahl vd 2005, Thiery vd 2009).

2.4 İnterlökin-6 ve Kanser

IL-6; hücre çoğalması, hücre sağ kalımı, hücre farklılaşması ve immün-inflamasyon yanıtın regülasyonu gibi hücre fizyolojisi olaylarında önemli etkileri olan çok yönlü ve çok fonksiyonlu bir sitokindir (Heinrich vd 1998, Kamimura vd 2003, Steelman vd 2004, Kishimoto 2005). Bu önemli hücresel fonksiyonlarına ilaveten IL-6; kemik oluşumu, metabolizma ve endokrin fonksiyonlar üzerine de önemli etkilere sahiptir (Hodge vd 2005). Bu bilgiler ışığında, IL-6'nın kanser dahil olmak üzere birçok patofizyolojik olaylarda önemli rollere sahip olması sürpriz değildir. Bu doğrultuda gerçekleştirilen birçok araştırmanın sonuçları, IL-6'nın tümör oluşumunun tetiklenmesini, tümör büyümesini, metastazı ve tümör progresyonunu desteklemek üzere, tümör mikroçevresinin malign bir değişim geçirmesi olaylarına iştirak ettiğini ortaya koymaktadır (Hsu vd 2012, Chang vd 2013).

2.4.1 IL-6/STAT3 Sinyal Yolağı

IL-6, hedef hücrede ligand bağlayan IL-6α zinciri ve en yaygın sitokin reseptör sinyal iletici alt ünite olan gp130 reseptör proteininden oluşan heterodimerik bir reseptöre bağlanır. Bu reseptör kompleksine IL-6 bağlanması neticesinde tetiklenen IL-6 Reseptörünün aktivasyonu, sonrasında MAPK, AKT, STAT ve diğer sinyal iletim proteinlerini içeren birçok yolağı stimüle edecek olan reseptör olmayan tirozin kinaz olan JAK (Janus Kinase) ailesi üyelerinin aktivasyonuna yol açmaktadır (Hong vd 2007). Son güncel çalışmaların sonuçları, IL-6/Signal transducer and activator of transcription 3 (IL-6/STAT3) sinyal yolağı anormal aktivasyonlarının çeşitli kanser tiplerinin onkogenezleriyle yakından ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır (Du vd 2012). Prostat, meme, akciğer, baş-boyun, pankreas ve lösemi gibi birçok malign kanser türünde devamlı bir STAT3 aktivasyonunun varlığı bilinmektedir (Sano vd 2008).



Şekil 2.4 IL-6/JAK2/STAT3 yolağı ve hücredeki bazı mekanizmalar üzerine etkileri (Hodge vd 2005).

Onkogenik bir transkripsiyon faktörü olarak STAT (Signal transducer and activator of transcription) proteinlerinin, hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, ölümü anjiyogenez gibi hücre homeoztazında farklı rolleri olan hedef genlerini direkt olarak DNA üzerindeki düzenleyici bölgelerine bağlanarak veya dolaylı olarak ekspresyon seviyelerini düzenleyerek etki eder. Ancak gerçekleştirilen araştırmalarla rapor edilen STAT hedef genlerinin sayısı her geçen gün artmaktadır (Karamouzis vd 2007). STAT ailesi üyesi olan STAT3 proteinin de, hücrenin kaderini belirleyecek birçok hedef geni bulunmaktadır. Bu genler arasında; anti-apoptotik *Survivin*, *Cyclin D*, *c-Myc*, *Fas* ve

p53 gibi hücre döngüsünde ve ölümünde rol alan genlerin ekpresyonlarını etkileyerek kanser hücresinin çoğalmasını ve sağ kalımını sağlamaktadır (Yu ve Jove 2004, Niu vd 2005, Gritsko vd 2006, Leslie vd 2006, Saxena vd 2007, Avalle vd 2012). STAT3 proteinin hücre sağ kalımı ve çoğalmasındaki rollerine ilaveten, hücre göçü, invazyon, metastaz, anjiyogenez ve immün sistemden kaçış gibi kanser progresyonunu belirleyen diğer süreçlerde de rol alan genlerin ifadelerini kontrol etmektedir (Avalle vd 2012). Bu bağlamda aktive olan STAT3 dimerinin hedef genleri arasında invazyonda rol alan *MMP-9*, anjiyogenezde rol alan *VEGF* ve EMT indükleyicisi *Twist1* yer almaktadır (Hsieh vd 2005, Cheng vd 2008, Song vd 2008). İnvaziv meme kanser hücresinde STAT3 inhibisyonu, en önemli EMT indükleyicilerinden olan Twist1 geninin ekspresyon seviyesinin azalması ve akabinde invaziv meme kanser hücrelerinin migrasyon, invazyon ve koloni oluşturma yetenekleri kaybolmuştur (Lo vd 2007, Cheng vd 2008).

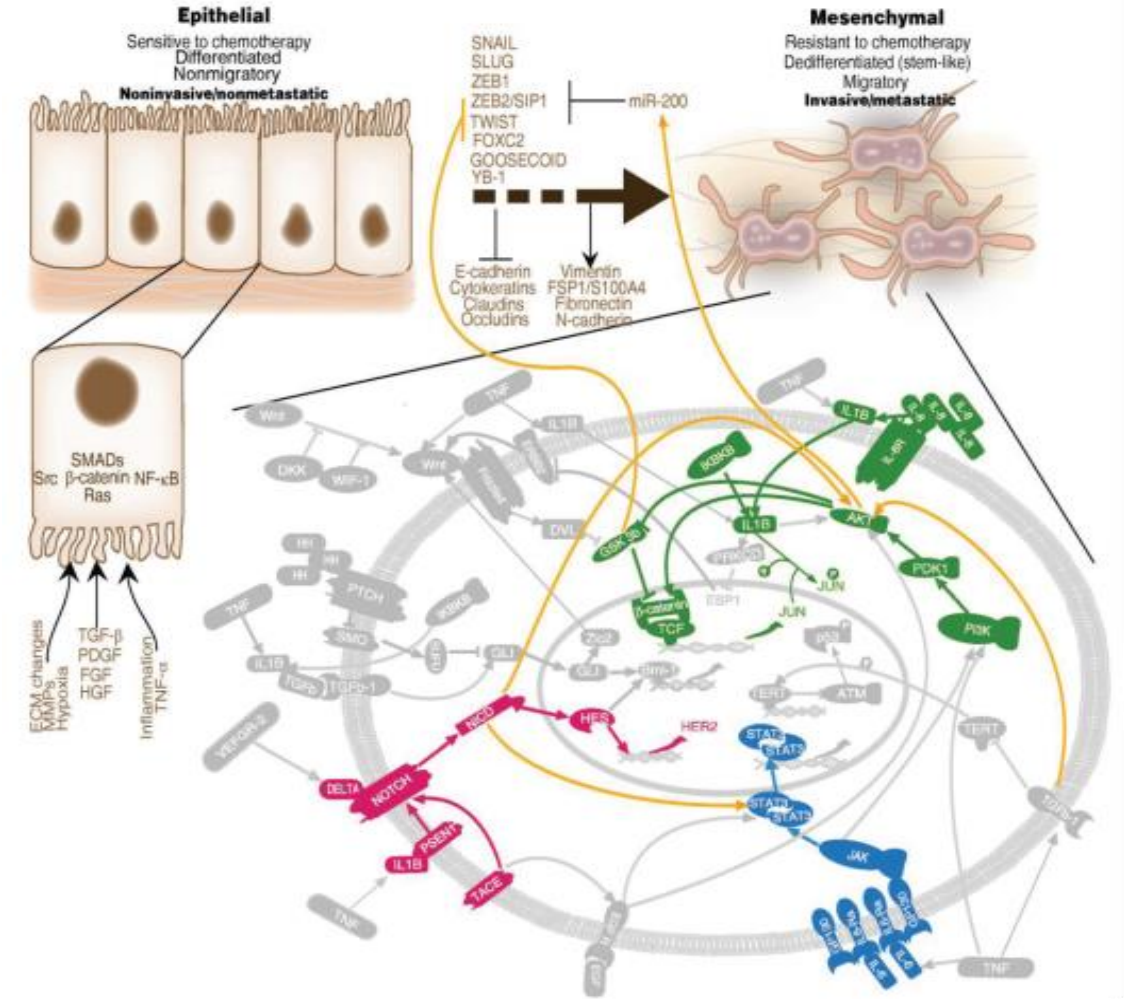
2.4.2 IL-6'nın EMT'deki Rolü

Son zamanlarda yapılan birçok araştırma çeşitli kanser türlerinde EMT'nin IL-6 tarafından indüklenerek invazyon kapasitelerini artırdıklarını göstermiştir. Sullivian ve arkadaşları, meme kanserinde IL-6'nın Twist ekspresyonunu artırarak EMT'yi desteklediğini göstermişlerdir (Sullivan vd 2009). Yadav, Kumar ve arkadaşları ise baş-boyun kanserinde IL-6 tarafından indüklenen EMT'nin bu kanserin metastaz yapma yeteneğini artırdığını göstermişlerdir (Yadav vd 2011). Colomiere ve arkadaşları IL-6 tarafından EMT indüklenmesini yumurtalık kanserinde göstermişlerdir (Colomiere vd 2009). Ayrıca, akciğer kanseri vakalarında IL-6'nın invazyon ve metastaz süreçlerinde rol aldıkları gösterilmiştir (Kishimoto 2005, Yeh vd 2006). Yang CL. ve arkadaşları ise KHDAK hücrelerinde IL-6'nın JAK2/STAT3 yolağı aktivasyonu aracılığıyla hücre migrasyonunu ve invazyonu artırdığını göstermişlerdir (Yang vd 2012). KHDAK hücrelerinde IL-6'nin EMT'-in indüklediğini gösteren çalışmalar hipotezimizi kurduğumuz zaman mevcut değildi. Ancak yakın zamanda gerçekleştirilen iki bağımsız çalışma ile gösterilmiştir (Chen vd 2014, Zhao vd 2014)

2.4.3 IL-6'nın Kanser Kök Hücre Fenotipinin Kazanılmasındaki Rolü

IL-6 tarafından tetiklenen JAK2/STAT3 yolağının aktivasyonu ile çeşitli kök hücre belirteçlerinin kazanıldığını kanıtlayan araştırmalar bulunmaktadır. Xie ve arkadaşları, IL-6'nın önemli bir kök hücre markırı olan CD44 ekspresyonuyla ilişkisini ortaya koymuşlardır (Gritsko vd 2006). Ayrıca, IL-6'nın KHDAK hücre dizilerinde Sox-2, Oct4 ve Nanog kök hücre belirteçlerinin ekspresyonlarını tetiklediğini göstermişlerdir (Hsu vd 2012). Yukarıda belirtilen kök hücre belirteçlerinin, akciğer adenokarsinoma hücre

dizilerinde EMT üzerine olan etkileri de araştırılmış durumdadır. Örneğin; Chiou ve arkadaşları, akciğer adenokarsinoma hücrelerinde Oct4 ve Nanog genlerinin ektopik ekspresyonlarının EMT'i desteklediğini, baskılanmalarının ise EMT sürecini geriye çevirdiğini göstermişlerdir (Chiou vd 2010). Bir diğer çalışma olarak Han ve arkadaşları, yüksek seviyede Sox-2 eksprese eden SW620 kolorektal kanser hücrelerinde, siRNA yöntemi ile Sox-2'i susturarak EMT'i tersine çevirmeyi başarmışlardır. Yine aynı çalışmada Sox-2'nin susturulduğu SW620 hücrelerinde, yüksek seviyede eksprese olan Snail1, Snail2 (Slug) ve Zeb1 gibi EMT yürütücü transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını baskılandığını da göstermişlerdir (Saxena vd 2007). Tüm bu bulgular bize, kök hücre belirteci olarak görev yapan proteinler ile EMT sürecinde görev alan protenlerin sıkı bir ilişki içinde olduğunu göstermektedir. Ancak KHDAK hücre dizilerinde, IL-6 aracılığıyla kök hücre belirteçlerinin kazanılması sürecinde, hangi aracı moleküllerin aktive edilerek bu belirteçlerin eksprese olmaya başladıkları net değildir. Bu nedenle; planladığımız bu çalışmada, kök hücre belirteçlerinin regülasyonunu sağlayan proteinlere odaklandık.



Şekil 2.5 EMT süreci ve kanser kök hücre fenotipinin kazanılmasında rol alan sinyal yolakları ve aralarındaki etkileşimler (Yu ve Jove 2004)

2.5 SATB2 Kromatin Yeniden Modelleme Proteini

Gen ekspresyonun düzenlenmesi işine karışan mekanizmaların anlaşılması konusunda, onların kompleks ve ince detaylara sahip özelliklerinin değerlendirilmesi ile günümüzde sınırlar aşılmış durumdadır. Dokuya spesifik transkripsiyon, genin "enhancer" ve "promotor" bölgelerine bağlanarak o genin ekspresyonunu gerek artırarak gerekse de baskılayarak kontrol eden transkripsiyon faktörler tarafından düzenlenmektedir (Patani vd 2009). Gen ekspresyonlarının düzenlenmesi işinde, transkripsiyon faktörlere ilavaten DNA'nın kromatin olarak paketlenmesi ve akabinde kromatin organizasyonu da genlerin ekspresyonlarını düzenlemede önemli role sahiptir (Fry ve Peterson 2001). Bu nedenle transkripsiyon faktörlerin fonksiyonları; hem aracı komplekslerle olan etkileşimleri aracılığıyla RNA polimerazın uyarımını, hem de histon modifiye eden enzimlerin ve nükleozom yeniden modelleme komplekslerinin çalıştırılması aracılığıyla gerçekleştirilen kromatin erişilebilirliğini kapsamaktadır (Zhang ve Reinberg 2001, Freiman ve Tjian 2003). Güncel çalışmalar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde yüksek düzeyde organize olmuş kromatin yapısının önemini ortaya koymaktadır (Schubeler vd 2000, Spector 2003). Birçok genin ekspresyonunun düzenlenmesinde kromatin yapısının yeniden modellenmesinin önemini de kanıtlanmıştır (Brown 2003, de Laat ve Grosveld 2003, Ho ve Crabtree 2010). Human special AT-rich sequence-binding protein-2 (SATB2), DNA'nın AT bazlarınca zengin bölgelerine bağlanan ve kromatinin yapısını değiştirerek gen ekspresyonlarını kontrol eden bir protein grubudur (Dobreva vd 2003, Szemes vd 2006). SATB2 direkt olarak yüz-kafatası gelişimi ve kortikal nöron farklılaşmasını düzenlemektedir (Dobreva vd 2006, Leoyklang vd 2007, Britanova vd 2008, Gyorgy vd 2008). Ayrıca iskelet gelişimini, osteoblast farklılaşmasını ve immünoglobin gen ekspresyonlarını düzenlemektedir (Dobreva vd 2003, 2006).

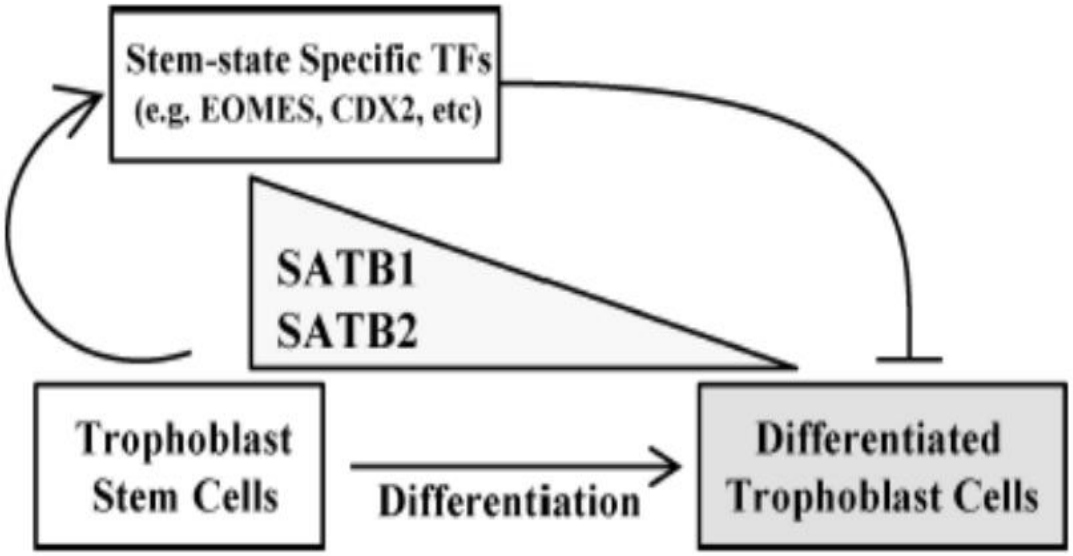
2.5.1 SATB2'nin EMT Sürecindeki Rolü

Bizim hipotezi kurduğumuz dönemde, hiçbir kanser türünde SATB2'nin EMT sürecindeki rolünü araştıran bir çalışma mevcut değildi. Ancak yakın zamanda kolorektal kanser hücrelerinde yapılan iki çalışma SATB2'nin EMT'deki rolünü ortaya koymuştur. Bu çalışmalardan birinde mir-31'in hücrelere transfekte edilmesiyle SATB2 ekspresyonunun düştüğü ve hücrelerin EMT sürecine girdiği, hem mir-31'in hem de SATB2'nin transfekte edildiği hücrelerin ise EMT sürecine giremediği gösterilmiştir. Diğer çalışmada ise aynı yol izlenmiştir. Bu çalışmada diğer çalışmadan farklı olarak mir-31 yerine mir-182 hedef alınmıştır (Yang vd 2013). Diğer çalışmayla aynı şekilde mir-182'in hücrelere transfekte edilmesiyle SATB2 ekspresyonunun düştüğü ve

hücrelerin EMT sürecine girdiği, hem mir-182'in hem de SATB2'nin transfekte edildiği hücrelerin ise EMT sürecine giremediği gösterilmiştir (Yang vd 2014). Fakat, bu iki çalışmada da SATB2'nin direkt olarak susturulması yerine, SATB2'i hedef alan miRNA'ların hücrelere transfekte edilmesiyle ekspresyonunu susturma yolu izlenmiştir. Bu izlenen strateji, çalışılan hedef proteinin rolünü net olarak ortaya koymaktan uzaktır. Çünkü miRNA'ların hücrede birçok hedefi bulunmaktadır. Transfekte edilen miRNA'nın hücrenin hangi proteinlerin mRNA'larını hedef aldığı net değildir. Onun için SATB2'nin spesifik olarak susturulması yolu daha sağlıklıdır. Biz de bu yolu izledik. Böylelikle hiçbir kanser türünde SATB2'nin spesifik olarak susturularak EMT sürecindeki değişimlerin araştırıldığı bir çalışma mevcut değildir. Ayrıca; gerek SATB2'nin spesifik olarak, gerekse de miRNA'lar aracılığıyla susturulması ya da transfekte edilmesi de dahil olmak üzere, SATB2'nin KHDAK hücrelerinin EMT sürecinde oynayabileceği rol şu ana kadar araştırılmamaştır.

2.5.2 SATB2'nin Kök Hücre Fenotipinin Kazanılmasındaki Rolü

Kök hücre fenotipinin kazanılması ve farklılaşması süreçleri için de kromatin yapısının yeniden modellenmesi ve organizasyonu, bu süreçlerin gerektirdiği gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Ho vd 2010, Lessard vd 2010). Kromatin yapısının düzenlenmesini yönlendirme aksiyonuna sahip sayısız protein arasında, SATB1 ve SATB2 adı verilen iki proteinin ayrı bir yeri bulunmaktadır (Dickinson vd 1992, Dobreva vd 2003, Britanova vd 2005). Bu iki protein, transkripsiyon faktörlerin ve diğer kromatin yeniden modelleme proteinlerinin toplanmalarına olanak sağlanmaktadır ve böylelikle transkripsiyon faktörlerin ilgili gen ekspresyonlarını aktive etmek veya baskılamak üzere promotor bölgelerine bağlanmalarına olanak sağlamak için kromatinin yapısını yeniden düzenlemektedirler (Yasui vd 2002, Gyorgy vd 2008). Embriyonun beslenmesini temin eden blastosist hücrelerinin dış tabakasında bulunan trofoblast kök hücreleri üzerine yapılan çalışmalarda, bu tip hücrelerin kök hücre fenotipinin korunmasında ve farklılaşmasında SATB2'nin rolü gösterilmiştir. Trofoblast kök hücrelerinde SATB2'nin ekspresyon seviyesi yüksek iken, hücre farklılaşması sürecinde ekspresyon seviyesi giderek düşmektedir (Asanoma vd 2012).



Şekil 2.6 Trofoblast kök hücrelerinde ve bu hücrelerin farklılaşma sürecinde SATB2 ekspresyon seviyesi (Asanoma vd 2012).

2.6 Hipotez

Vermiş olduğumuz tüm bu literatür bilgilerinin ışığında, IL-6'nın KHDAK hücrelerinde EMT'i ve kanser kök hücre fenotipinin kazanılmasını indükleyeceğini, bu süreçlerde de SATB2'nin düzenleyici bir rol üstenebileceğini hipotez ettik.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Hücre Kültürü

Çalışmamızda Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanser (KHDAK) hücre dizilerinden A549 ve H1650 hücreleri kullanılmıştır. A549 hücreleri %10 Fetal Bovine Serum ve % 0,5'lik penisilin/steptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besi ortamında, H1650 hücreleri ise %10 Fetal Bovine Serum ve % 0,5'lik penisilin/steptomisin içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium 1640) besi ortamında 37°C'de, %5 CO_2 ve %95 nemli hava ortamında inkübe edilmiştir. Hücre kültüründe kullanılan petri kapları Sarstedt'den temin edilmiştir.

3.2 Hücrelerden TRIZOL ile RNA İzolasyonu

Hücrelerden total RNA izolasyonu için şu adımlar izlenmiştir;

1. Hücre kültürü kabından besi ortamı uzaklaştırıldı
2. Hücreler %0,09'luk NaCl çözeltisi olan serum fizyolojik ile yıkandı ve serum fizyolojik de uzaklaştırıldı.
3. Petriye 1 ml olacak şekilde TRIZOL eklendi.
4. TRIZOL ile muamele edilen hücreler pipetle ependorf tüplere toplanir kısaca vorteks yapıldı.
5. Homojenize olan hücreler 5 dk oda ısısında bekletilerek nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışması sağlandı.
6. 1 ml TRIZOL reaktifi için 0.2 ml kloroform eklenir. Tüplerin kapakları iyice kapatılıp kısaca maksimum hızda vorteks yapıldı. 2-3 dk oda ısısında bekletildi.
7. 20 dk 4 °C'de 15000 rpm'de santrifüj edildi.

8. Üstteki sıvı faz yeni bir tüpe aktarıldı ve 0,5 ml isopropil alkolle karıştırılarak RNA'nın çökmesi sağlandı. (homojenizasyon esnasında kullanılan TRIZOL reaktifinin yarısı kadar isopropil alkol eklendi). Örnekler oda ısısında 10 dk bekletildi.

9. 15000 rpm'de 4°C'de 10 dk santrifuj edildi.

10. RNA çökeltisi %75'lik etanol ile bir kez yıkandı (kullanılan her 1 ml TRIzol reaktifi için 1 ml etanol eklendi).

11. Örnekler vorteks ile karıştırılarak 5 dk 10000 rpm'de 4°'de santrifuj edildi ve etanol uzaklaştırıldı.

12. Tüm bu işlemler sonunda RNA çökeltisi 5-10 dk kurumaya bırakıldı.

13. RNA çökeltisi 30 µl RNAz içermeyen H_2O ile çözüldü. 10 dk 60°C de bekletildi ve -80°C buzdolabında saklandı.

3.3 İzole Edilen RNA'yı cDNA'ya Dönüştürme Reaksiyonu

Bu işlem için Applied Biosystem firmasının ürettiği High-Capacity RNA-to-cDNA™ kiti kullanıldı. Kitin içerisinde 20X hacimde enzim tampon karışımı ve 2X RT tampon karışımı bulunmaktadır. Reaksiyon 20 µl hacminde hazırlandı. Bunun için total RNA'dan 2 µg olacak şekilde alındı ve 0,2 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. 10 µl 2X RT tampon karışımdan eklendi. 1 µl 20X enzim tampon karışımdan eklendi ve son olarak RNAz içermeyen H_2O ile 20 µl'e tamamlandı. Reaksiyon, termal cycler cihazında 37 ^{0}C'de 1 saat ve 95 ^{0}C'de 5 dk şartlarında gerçekleştirildi ve kullanılıncaya kadar -20 ^{0}C'de saklandı.

3.4 Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) Yöntemi

Satb2, CD44, Sox-2, Snail, Twist, Zeb1 ve normalizatör olarak GAPDH genlerinin ekspresyon seviyelerinin tespiti, üretici firma Applied Biosystem tarafından dizayn edilmiş olan taqman gen ekspresyon analizi kullanılarak gerçekleştirildi. GZ-PZR, 20 µl hacminde ve her örnek ve gen için iki tekrarlı olarak hazırlandı. Her bir tüpteki reaksiyon; 10 µl TaqMan® Universal Master Mix II'dan, 8 µl RNAz içermeyen H_2O'dan, 1 µl primer ve taqman prob karışımdan ve son olarak cDNA'dan da 1 µl ilave edilerek hazırlandı. Reaksiyon; üretici firma tarafından önerilen 95 ^{0}C'de 10 dk ön denatürasyon, 40 döngü olmak üzere 95 ^{0}C'de 15 sn ve 60 ^{0}C'de 1 dk reaksiyon koşullarında StepOnePlus™ Real-Time GZ-PZR System cihazında gerçekleştirildi. Tüm sonuçlar, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile hesaplanmış ve yorumlanmıştır.

3.5 Hücrelere IL-6 Muamelesi

Hücreler %70-80 yoğunluğa erişinceye kadar %10 FBS içeren besi ortamında %5 CO2 inkübatörde kültüre edildi. Hücreler istenilen yoğunluğa eriştiklerinde besiyeri uzaklaştırıldı. Akabinde hücreler serum fizyolojik ile yıkandı ve bu da uzaklaştırıldı. Ardında A549 hücreleri için %2 FBS içeren DMEM besiyerinde, H1650 hücreleri için ise %0,1 BSA içeren RPMI 1640 besiyerinde 24 saat %5 CO_2 inkübatörde kültüre edildiler. 24 saatin sonunda besiyerlerine 50 ng/ml konsantrasyonunda olacak IL-6 eklendi ve 30 dk,1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 ve 72 saat sürelerince %5 CO_2 inkübatörde kültüre edildiler.

3.6 Hücre Lizatı Hazırlanması

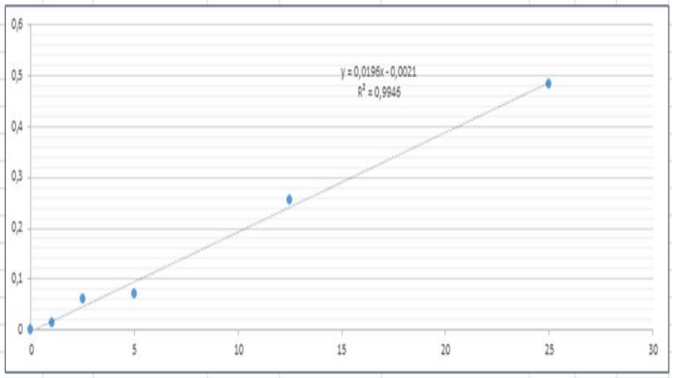
Belirli sürelerde IL-6'ya maruz kalmış hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından 10 ml soğuk 1X PBS ile yıkandı ve PBS'de uzaklaştırıldı. 500 µl proteaz ve fosfataz inhibitör içeren soğuk RIPA tamponu (10 mM Tris-HCl pH:7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, sodyum deoksikolat, %10 SDS, NP 40) ilave edildi ve hücreler buzda 5 dk bekletildi. Hücre kazıyıcı yardımı ile lize olan hücreler toplandı ve steril ependorf tüpüne aktarıldı. Örnekler 30 dk buzda bekletildikten sonra -80 ^{0}C'e kaldırıldı. Örnekler donduktan sonra 37 ^{0}C'deki su banyosunda örnekler çözdürüldü ve kısaca vorteks yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Buzun üstüne alınan örnekler sırasıyla 1000'lik, 200'lük ve 100'lük pipetler yardımıyla 15-20 kez pipetaj yapıldı. Son olarak örnekler 16000 g'de 4°C'de 15 dk santrifuj edildi. Sitozolik ve nükleer proteinleri içeren süpernatant yeni steril bir ependorf tüpüne aktarılarak kullanılıncaya kadar -80 ^{0}C buzdolabında saklandı.

3.7 Protein Miktarının Bradford ile Belirlenmesi

Her bir örnek distile H_2O ile 1/1000 sulandırıldı. Sulandırılan örneklere Bradford reaktifi (BioRad 500-0006) eklendi. Örneklerdeki protein miktarları 25, 12,5, 5, 2,5 ve 1 µg BSA standartlarına karşı tespit edildi. Öçlümler 595 nm dalga boyunda Glomax Multi Detection System (Promega) cihazı aracılığıyla gerçekleştirildi.

Tablo 3.1 A549 hücrelerinin Bradford sonucu protein miktarları ve R^2 değeri

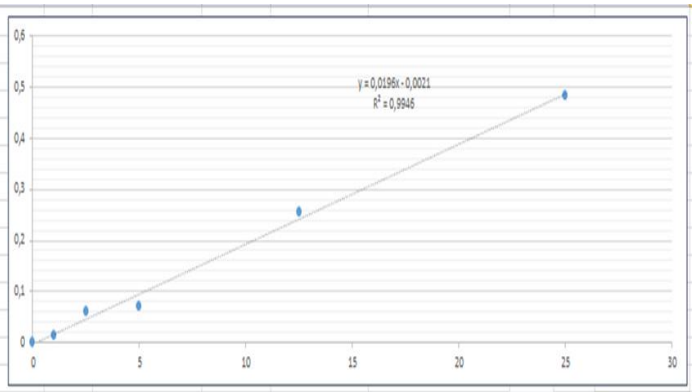
Bradford Assay	Absorbans 1	Absorbans 2	Abs. Ort.	Ort.-Kor
0	0,379	0,387	0,383	0
1	0,408	0,386	0,397	0,014
2,5	0,438	0,451	0,4445	0,0615
5	0,468	0,443	0,4555	0,0725
12,5	0,644	0,633	0,6385	0,2555
25	0,86	0,874	0,867	0,484



Örnek	Absorbans 1	Absorbans 2	Abrorbans 3	absorbans 4	Abs. Ort.	Ort.-Kor	Sulandırma Faktörü	Conc.	Sul. Fakt. * Conc.		50 ug	75 ug	100 ug
A549 0. saat	0,523	0,533	0,533	0,527	0,529	0,146	1000	7,568742031	7,568742031	A549 0. saat	6,61	9,91	13,21
A549 IL-6 0,5. saat	0,514	0,515	0,51	0,516	0,51375	0,13075	1000	6,789602543	6,789602543	A549 IL-6 0,5. saat	7,36	11,05	14,73
A549 IL-6 1. saat	0,508	0,519	0,516	0,516	0,51475	0,13175	1000	6,840693657	6,840693657	A549 IL-6 1. saat	7,31	10,96	14,62
A549 IL-6 2. saat	0,504	0,519	0,516	0,514	0,51325	0,13025	1000	6,764056986	6,764056986	A549 IL-6 2. saat	7,39	11,09	14,78
A549 IL-6 4. saat	0,513	0,512	0,527	0,528	0,52	0,137	1000	7,108922005	7,108922005	A549 IL-6 4. saat	7,03	10,55	14,07
A549 IL-6 8. saat	0,521	0,531	0,53	0,537	0,52975	0,14675	1000	7,607060367	7,607060367	A549 IL-6 8. saat	6,57	9,86	13,15
A549 IL-6 16. saat	0,542	0,549	0,545	0,55	0,5465	0,1635	1000	8,462836527	8,462836527	A549 IL-6 16. saat	5,91	8,86	11,82
A549 IL-6 24. saat	0,538	0,545	0,541	0,548	0,543	0,16	1000	8,284017628	8,284017628	A549 IL-6 24. saat	6,04	9,05	12,07
A549 IL-6 48. saat	0,489	0,506	0,508	0,513	0,504	0,121	1000	6,291464181	6,291464181	A549 IL-6 48. saat	7,95	11,92	15,89
A549 IL-6 72. saat	0,512	0,519	0,524	0,546	0,52525	0,14225	1000	7,377150354	7,377150354	A549 IL-6 72. saat	6,78	10,17	13,56

Tablo 3.2 H1650 hücrelerinin Bradford sonucu protein miktarları ve R^2 değeri

Bradford Assay	Absorbans 1	Absorbans 2	Abs. Ort.	Ort.-Kor
0	0,379	0,387	0,383	0
1	0,408	0,386	0,397	0,014
2,5	0,438	0,451	0,4445	0,0615
5	0,468	0,443	0,4555	0,0725
12,5	0,644	0,633	0,6385	0,2555
25	0,86	0,874	0,867	0,484



Örnek	Absorbans 1	Absorbans 2	Abrorbans 3	absorbans 4	Abs. Ort.	Ort.-Kor	Sulandırma Faktörü	Conc.	Sul. Fakt. * Conc.		50 ug	75 ug	100 ug
H1650 0. saat	0,517	0,524	0,526	0,528	0,52375	0,14075	1000	7,300513683	7,300513683	H1650 0. saat	6,85	10,27	13,70
H1650 IL-6 0,5. saat	0,489	0,498	0,513	0,514	0,5085	0,1205	1000	6,265918624	6,265918624	H1650 IL-6 0,5. saat	7,98	11,97	15,96
H1650 IL-6 1. saat	0,484	0,501	0,501	0,521	0,50175	0,11875	1000	6,176509174	6,176509174	H1650 IL-6 1. saat	8,10	12,14	16,19
H1650 IL-6 2. saat	0,5	0,512	0,513	0,512	0,50925	0,12625	1000	6,559692529	6,559692529	H1650 IL-6 2. saat	7,62	11,43	15,24
H1650 IL-6 4. saat	0,51	0,514	0,515	0,515	0,5135	0,1305	1000	6,776829764	6,776829764	H1650 IL-6 4. saat	7,38	11,07	14,76
H1650 IL-6 8. saat	0,5	0,506	0,516	0,518	0,51	0,127	1000	6,598010865	6,598010865	H1650 IL-6 8. saat	7,58	11,37	15,16
H1650 IL-6 16. saat	0,495	0,504	0,511	0,525	0,50875	0,12575	1000	6,534146972	6,534146972	H1650 IL-6 16. saat	7,65	11,48	15,30
H1650 IL-6 24. saat	0,498	0,507	0,505	0,503	0,50325	0,12025	1000	6,253145845	6,253145845	H1650 IL-6 24. saat	8,00	11,99	15,99
H1650 IL-6 48. saat	0,498	0,491	0,502	0,5	0,49775	0,11475	1000	5,972144718	5,972144718	H1650 IL-6 48. saat	8,37	12,56	16,74
H1650 IL-6 72. saat	0,487	0,504	0,51	0,504	0,50125	0,11825	1000	6,150963617	6,150963617	H1650 IL-6 72. saat	8,13	12,19	16,26

3.8 Western Blot Yöntemi

3.8.1 Kullanılan Solüsyonlar

1. Resolving (Ayrıştırma) Tamponu: 1,5 M Tris Base pH:8,8. 1 lt.'siiçin 181,64 gr Tris Base tartıldı ve distile H_2O ile çözüldü.
2. Stacking (Yükleme) Tamponu: 0,5 M Tris Base pH:6,8. 1 lt'si için 60,5 gr Tris Base tartıldı ve distile H_2O ile çözüldü.
3. Running (Yürüme) Tamponu: 3,03 gr Tris Base, 14,26 gr Glisin ve 1 gr SDS tartıldı ve distile H_2O ile çözüldü. Solüsyon pH ayarı gerektirmemektedir.
4. Transfer Tamponu: 3,03 gr Tris Base, 14,26 gr Glisin ve 0,5 gr SDS tartıldı ve distile H_2O ile çözüldü. Son olarak üstüne 250 ml metanol eklendi.
5. 1X TBS-T: 20mM Tris Base ve 150mM NaCl çözeltisi hazırlandı 750 ml distile H_2O ile çözüldü. pH: 7,5 olarak ayarlandı ve çözelti distile H_2O ile 1 lt'e tamamlandı.
6. SDS yükleme tamponu: Bio Rad 4X Laemli Buffer (100 mM Tris-HCL (pH6.8), %12 betamerkaptoetanol, 2% SDS, 1% Bromofenol blue, 20% gliserol) solüsyonu kullanıldı.
7. %10 Amonyum persülfat (APS): 0,1 gr APS tartıldı ve 1 ml distile H_2O ile çözüldü. Taze hazırlandı ve +4 ^{0}C 'de saklandı.
8. Akrilamid/Bisakrilamid (29/0,8): 29 gr Akrilamid ve 0,8 gr Bisakrilamid tartıldı ve 100 ml distile H_2O ile çözüldü. Hazırlandıktan sonra ışık görmeyen bir şişeye filtre ile aktarıldı ve +4 ^{0}C'de saklandı.

Örneklerden, mikrolitrede 100 mikrogram protein olacak şekilde alınmıştır. Bunların üzerlerine protein yükleme boyasından da (100 mM Tris-HCL (pH6.8), %12 betamerkaptoetanol, 2% SDS, 1% Bromofenol blue, 20% gliserol) 1:1 oranında eklenerek, örnekler 5 dakika 95°C"de kaynatılmıştır. Kaynatma işleminin hemen ardından 10 mikrolitrelik otomatik pipet kullanılarak, ependorf tüp içindeki örnekler %10 SDS jele (PIERCE) yüklenmiş ve yürüme tamponu ile sabit 100 voltta 90 dakika elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforez işleminin ardından proteinler, transfer tamponu içinde +4 ^{0}C'de 90 mAmp'de 16 saat süresince PVDF (Polyvinylidene flüoride, Millipore) membrana transfere tabi tutulmuştur. Bu işlemden sonra membran, %5'lik yağsız kuru süt tozu içeren TBS-T çözeltisi içinde oda sıcaklığında 2 saat bloklanmıştır. Ardından aynı membran %5'lik yağsız kuru süt tozu içeren TBS-T çözeltisi içinde 1:10.000 (E-Kaderin Cell Signaling), 1:1.000 (N-Kaderin Cell Signaling), 1:10.000 (Vimentin Cell Signaling), 1:1.000 (Snail Cell Signaling), 1:1.000 (Zeb1 Cell Signaling), 1:1.000 (FAK Cell Signaling) 1:1.000 (CD44 Millipore), 1:500 (Satb2 Santa

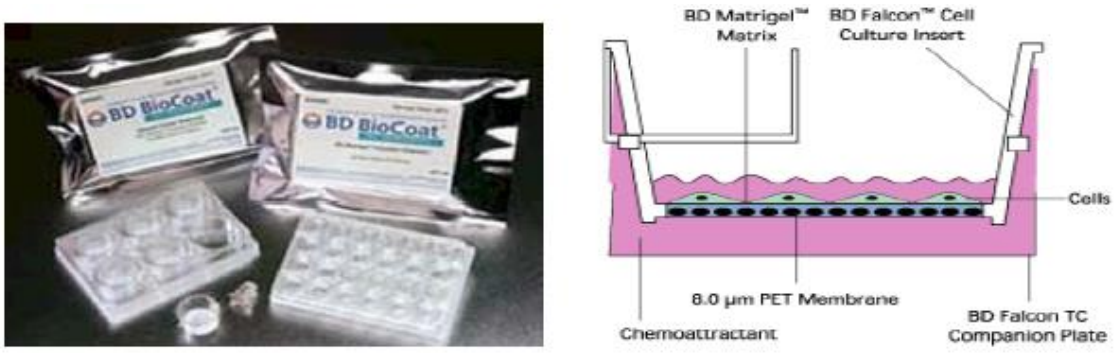
Cruz), 1:500 Twist Santa Cruz), 1:500 (Sox-2 Santa Cruz) ve 1:20.000 GAPDH (Cell Signaling) oranlarında bulunan primer antikorlarla oda sıcaklığında 2 saat işaretlenmiştir. Membran üzerindeki spesifik proteinlerin primer antikorlarla işaretlemesinin ardından, membran 30 dk TBS-T ile oda sıcaklığında yıkanmıştır. Yıkama işleminin bitmesiyle membran primer antikorların immünoglobilinlerine karşı spesifik olarak geliştirilmiş olan ve 1:7.500 oranında HRP (Horseradish Peroksidaz Cell Signaling) bağlı sekonder antikor bulunduran %5'lik yağsız kuru süt tozu içeren TBS-T içerisinde tekrar işaretlenmiştir. İşaretleme oda sıcaklığında 1 saat yapıldıktan sonra, ECL (Enhanced Chemiluminescence) solüsyonu (PIERCE) kullanılarak kemilümines reaksiyonu başlatılmış ve spesifik protein bantları kemilüminesansa duyarlı film kullanılarak karanlık odada belirlenmiştir.

3.9 siRNA Transfeksiyon Yöntemi

Petri kabında % 80 yoğunluğa ulaşmış olan A549 ve H1650 hücreleri 6 kuyucuklu plaklara sırasıyla %10 FBS içeren fakat antibiyotik içermeyen 2'şer ml DMEM ve RPMI 1640 besiyerlerinde 2x105 hücre olacak şekilde ekilmiştir ve 37°C'de, %5 CO_2 ve %95 nemli hava ortamında bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından her bir kuyucuk için 2 ayrı ependorf tüpü hazırlandı. Birine A, diğerine B yazıldı. A tüpüne 10 µM stok solüsyonunlarından, kontrol grubu için Kontrol siRNA ve SATB2'nin susturulacağı hücrelere ise SATB2 siRNA'sından 4 µl (15nM) eklendi ve OPTİMEM ile 250 µl'e tamamlandı. B tüpene ise 5 µl Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (İnvitrogen) aktarıldı ve OPTİMEM ile 250 µl'e tamamlandı. Ardından 5 dk oda ısısında ünkübe edildiler. İnkübasyondan sonra A tüpü nazikçe B tüpüne aktarıldı ve tekrar oda ısısında 15 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra total 500 µl'lik OPTİMEM+siRNA+lipozom karışımı 6 kuyucuklu hücrelerdeki besiyerine ilave edildi ve yavaşça sağ-sol, yukarı-aşağı sallandı ve 37°C'de, %5 CO_2 ve %95 nemli hava ortamında 5 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücrelerin besiyerleri tekrar antibiyotiksiz %10 FBS içeren besiyerleri ile değiştirildi ve 1 gece 37°C'de, %5 CO_2 ve %95 nemli hava ortamında kültüre edildiler. siRNA çalışmalarında deney süreci transfeksiyondan itibaren 24-72 saat ile sınırlıdır.

3.10 İnvazyonun Saptanması

Planlanan çalışmada SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL6 ile muamelesinin hücrelerin invazyon kapasiteleri üzerine olan etkilerinin saptanması için BioCoat Matrigel Invasyon Chamber-invazyon odaları (BD Biosciences, Clontech) kullanılmıştır. Bu invazyon odacıklarının hücrelere sağladıkları özel şartlar sayesinde "*in vitro*" koşullar altında hücrelerin invaziv özellikleri saptanabilmektedir. 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 bazal membranı "*in vitro*" koşullarda oluşturma imkanı sağlamaktadır. Bu membran sayesinde invaziv özelliği olmayan hücrelerin membranın diğer yüzeyine geçmesi engellenmektedir. Bu membrandan diğer yüze ancak invaziv hücreler geçebilmektedir. Dolayısı ile matrijel membran, invaziv olan ve olmayan hücrelerin birbirinden ayırabilme imkanı sunmaktadır.



Şekil 3.1 BD Biocoat Matrigel İnvasion Chamber Genel Görünümü

$$\%\,\text{İnvazyon} = \frac{\text{matrijel matriks bazal membranındaki hücre sayısı}}{\text{Kontrol membranındaki hücre sayısı}} X\,100$$

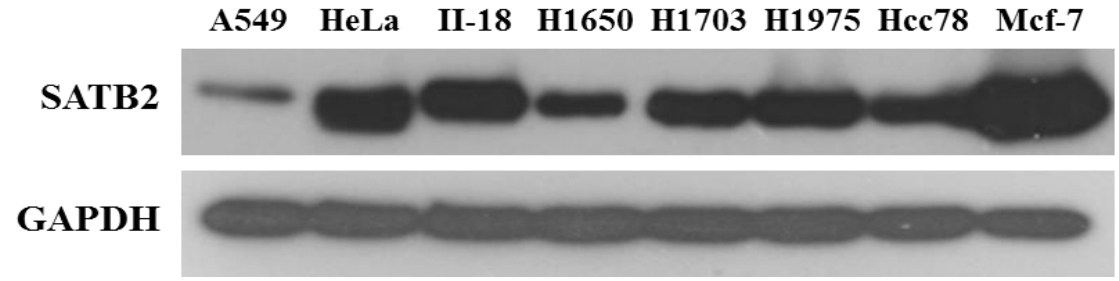
3.11 İstatistiksel Analiz

GZ-PZR ve invazyon deneylerinden elde edilen sonuçlar istatistiksel analiz program olan SPSS'in (Statistical Package for the Social Sciences) 17.0 sürümündeki ilişkilendirilmiş örneklemler için *t* testi (paired sample *t* test) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu testler sayesinde gruplarımızın hem kontrol hem de birbirleri arasındaki farkın istatistiksel olarak $p<0,05$ düzeyinde anlam taşıyıp taşımadığı test edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Çeşitli İnsan Kanser Hücrelerinde Endojen SATB2 Ekspresyon Seviyesinin Western Blot Analizi İle Gösterilmesi

Proje çalışmasında ilk olarak sahip olduğumuz çeşitli insan kanser hücre dizilerindeki endojen SATB2 ekspresyon seviyesini Western Blot analizi ile tespit ettik. Şekil 4.1'de görüldüğü üzere proje hücreleri olan A549 ve H1650 dahil kanser hücrelerindeki endojen SATB2 ekspresyon seviyeleri görülmektedir.

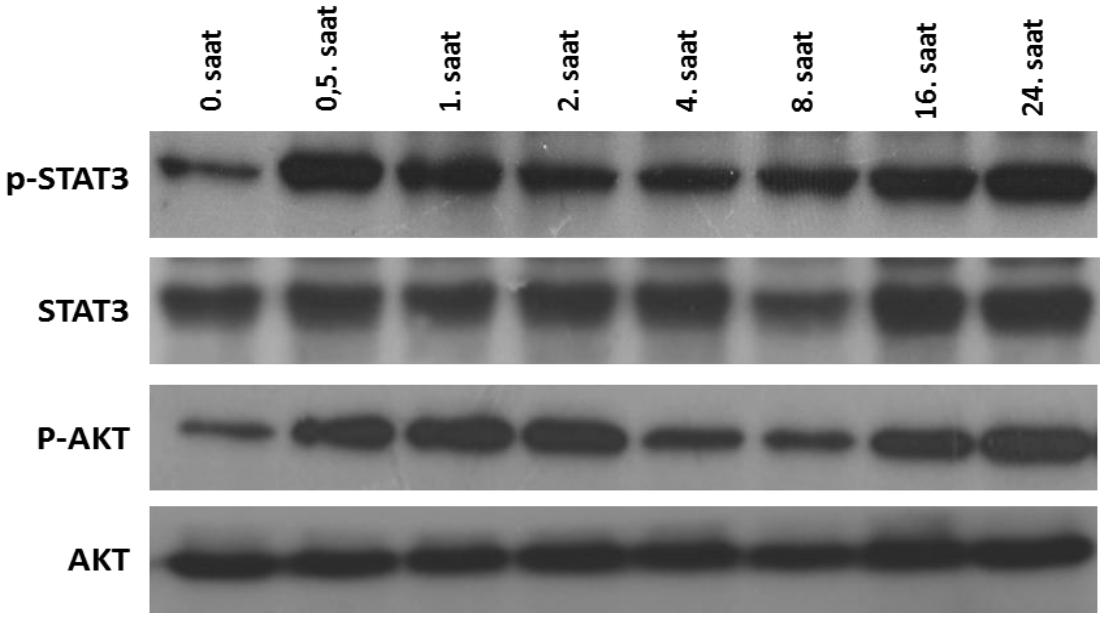


Şekil 4.1 Çeşitli İnsan Kanser Hücrelerindeki endojen SATB2 ekspresyon seviyelerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi. A549, II-18, H1650, H1703, H1975, Hcc78 (Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanser Hücreleri), HeLa (Servikal Karsinoma) ve Mcf-7 (Metastatik Olmayan Meme Kanseri)

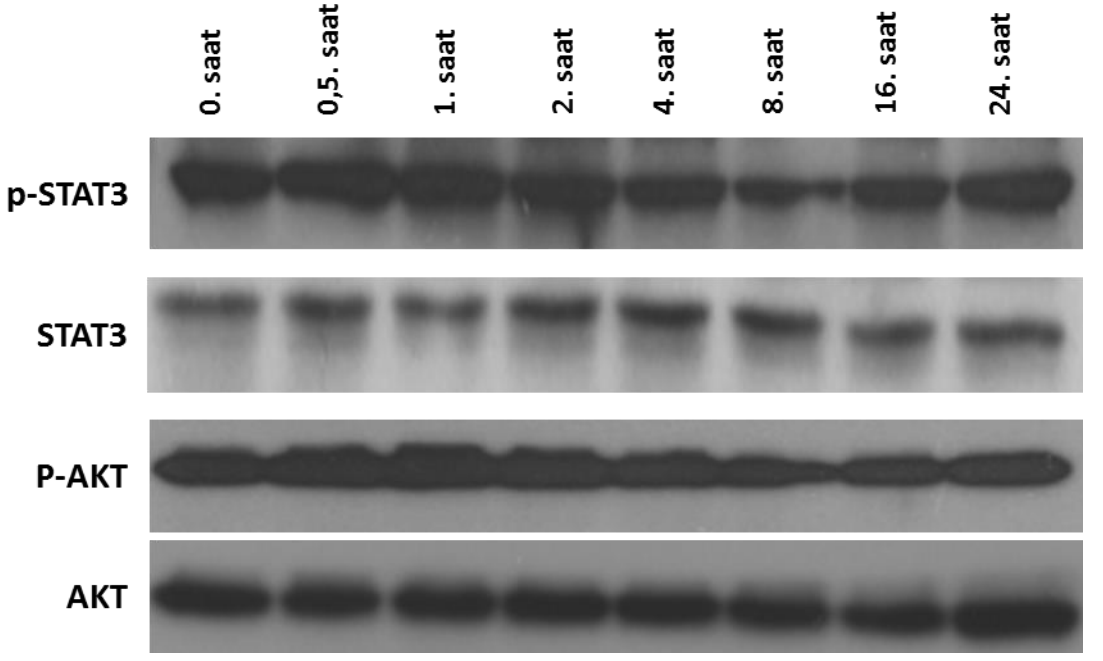
4.2 IL-6'nin A549 ve H1650 Hücrelerine Uygulamasının Bu Hücrelerdeki STAT3 ve AKT Yolaklarının Aktivasyonları Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

Yukarıda genel bilgide de bahsetmiş olduğumuz üzere, IL-6'nın hücre yüzey reseptörü olan gp130'a bağlanması sonucu, hücre içinde reseptöre bağlı iki JAK2 proteininin birbirlerini çapraz olarak fosfatlamaları ve akabinde iki STAT3 proteininin birbirini çaprazlamaları ve p-STAT3'lerin dimer oluşturarak hücre çekirdeğine göçmeleri ve hedef gen bölgelere bağlanmaları ile sonuçlanmaktadır. Bizim de çalışmamızda; IL-6 uygulamasının ardından IL-6'nın hücrede işlevini gerçekleştirdiğini yani STAT3'lerin aktivasyonlarına neden olduğunu göstermek zorundaydık. Bunun için her iki hücre dizisinde de çeşitli zaman aralıklarında IL-6 uygulamasına maruz tuttuğumuz hücrelerdeki p-STAT3 ve p-Akt seviyelerini Western Blot analizi ile tespit ettik. Şekil 4.2

ve Şekil 4.3'de görüldüğü üzere IL-6 uygulamamız her iki hücre hattında da p-STAT3 ve p-Akt seviyesini dolayısıyla bu yolakları aktive ettiği görülmektedir.



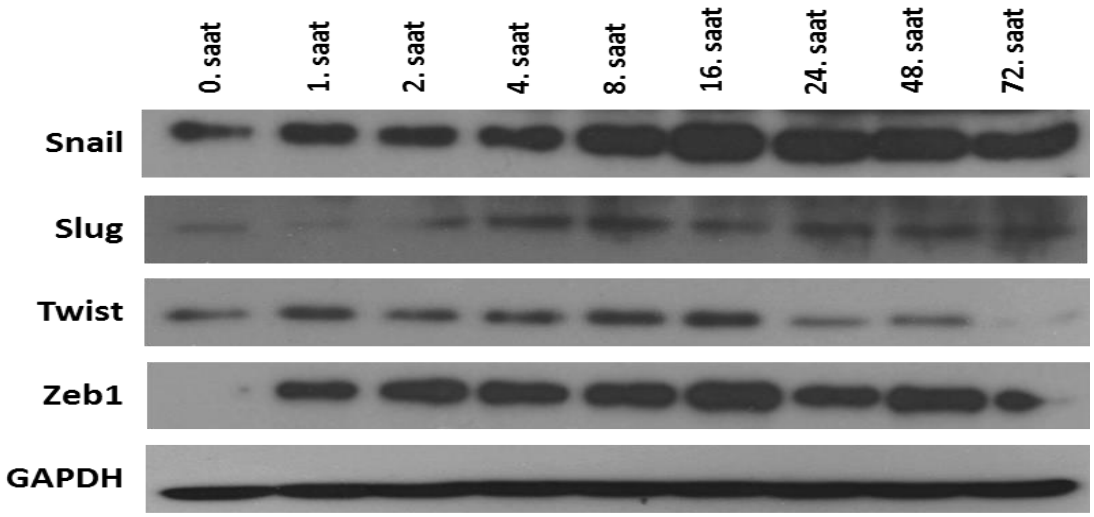
Şekil 4.2 IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde STAT3 ve AKT yolaklarının zamana bağlı aktivasyonlarının Western Blot analizi ile gösterilmesi



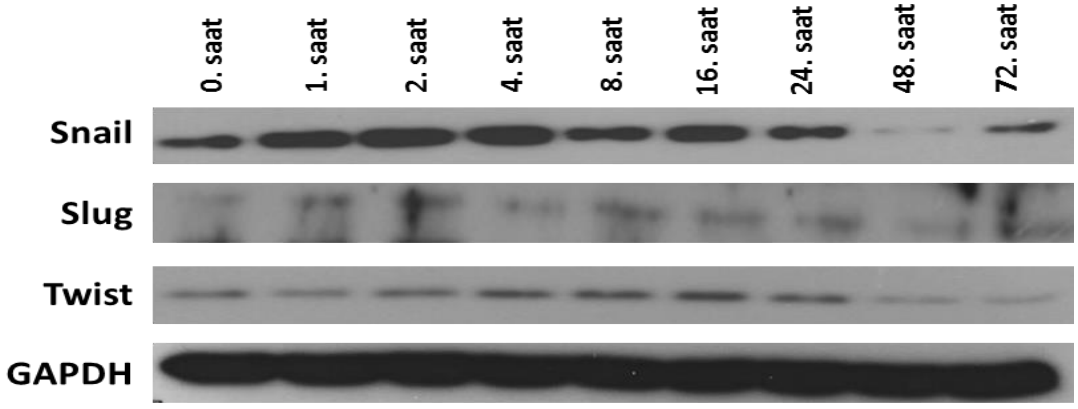
Şekil 4.3 IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde STAT3 ve AKT yolaklarının zamana bağlı aktivasyonlarının Western Blot analizi ile gösterilmesi

4.3 IL-6'nin A549 ve H1650 Hücrelerine Uygulamasının Bu Hücrelerdeki EMT Yönetici Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyonları Üzerine Olan Etkilerinin Western Blot Analizi İle Belirlenmesi

Projemizin bu ayağında, IL-6 uygulamasının hem invazyon sürecini, hem de EMT'i yöneten transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları üzerine olan etkilerini tespit etmeyi amaçladık. Bunun için 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 ve 72 saat sürelerinde IL-6 ile muamele edilen hücrelerde Snail, Slug, Twist ve Zeb1 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarındaki değişimleri Western Blot analizi ile tespit ettik. Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de görüldüğü üzere her iki hücre hattında da bu belirtilen transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları zamana bağlı olarak artmıştır.



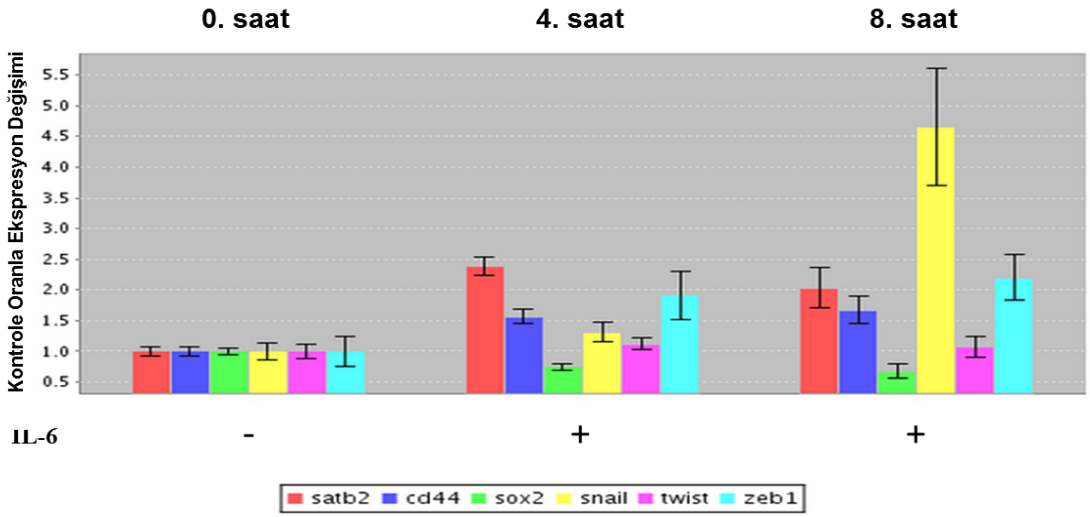
Şekil 4.4 IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde EMT belirteçlerinin zamana bağlı ekspresyon seviyelerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi



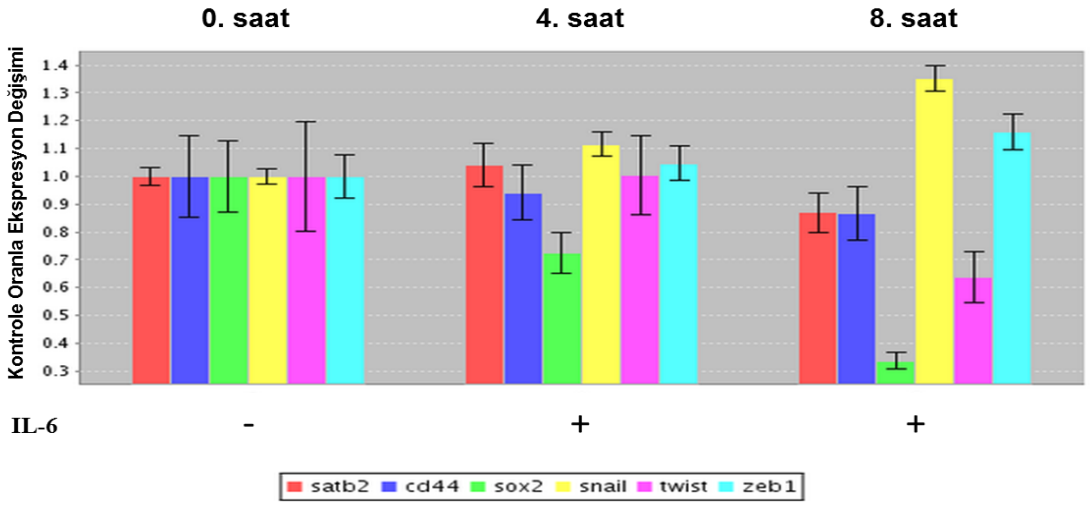
Şekil 4.5 IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde EMT belirteçlerinin zamana bağlı ekspresyon seviyelerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi

4.4 IL-6'nin A549 ve H1650 Hücrelerine Uygulamasının Bu Hücrelerdeki EMT Yönetici Transkripsiyon Faktörlerinin ve Kök Hücre Belirteçlerinin Ekspresyonları Üzerine Olan Etkilerinin GZ-PZR ile Belirlenmesi

Projemizin bu ayağında, IL-6 uygulamasının A549 ve H1650 hücrelerinde EMT ve kök hücre belirteçlerinin transkripsiyonel olarak etkilerini tespit etmek için, her iki hücre hattını 4 ve 8 saat sürelerince IL-6 ile muamele ettik ve hedef genlerin transkripsiyonları üzerine olan etkilerini, ilgili genlere spesifik dizayn edilen taqman prob ve primerler ile gerçekleştirilen GZ-PZR ile belirledik. Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de görüldüğü üzere IL-6 muamelesinin 4 ve 8. saatlerindeki hedef genlerimizin ekspresyonları üzerine olan etkileri görülmektedir.



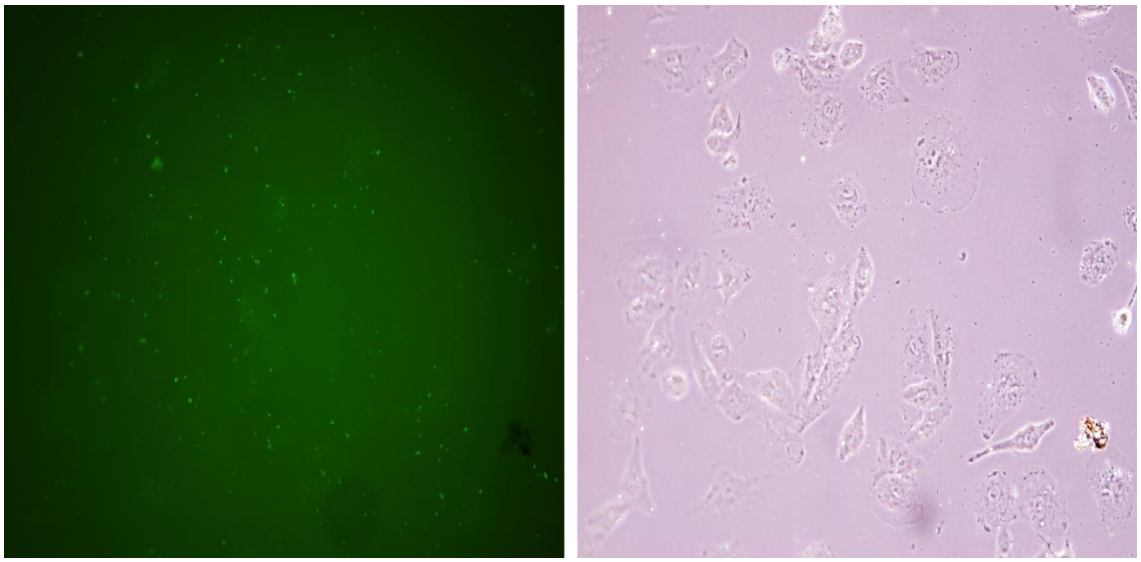
Şekil 4.6 IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde hedef gen ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin GZ-PZR analizi ile gösterilmesi ($p<0,05$)



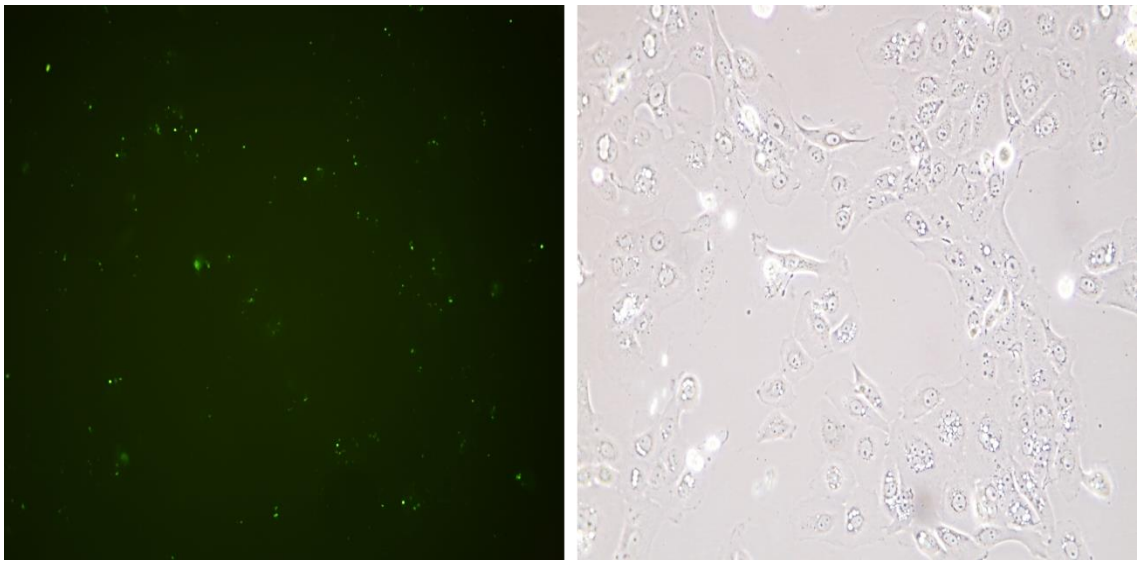
Şekil 4.7 IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde hedef gen ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin GZ-PZR analizi ile gösterilmesi ($p<0,05$)

4.5 A549 ve H1650 Hücrelerinin Transfeksiyon Verimliliğinin Ölçülmesi

Çalışmamızın bundan sonraki aşamalarında, SATB2'nin siRNA ile susturulması gerçekleşen değişimlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için; çalışmamızda gerçekleştirilen transfeksiyon işlemlerinin yeterli kalite olduğunu göstermemiz gerekmekteydi. Bu amaçla A549 ve H1650 hücrelerinin floresan mikroskobunda görülebilen FITC konjuge kontrol siRNA ile transfekte ettik ve floresans mikroskobunda transfekte edilen hücrelerin tespiti ve aynı bölgenin ışık mikroskobu ile de gözlenmesiyle transfekte olan hücrelerin yüzdeleri tespit edildi.



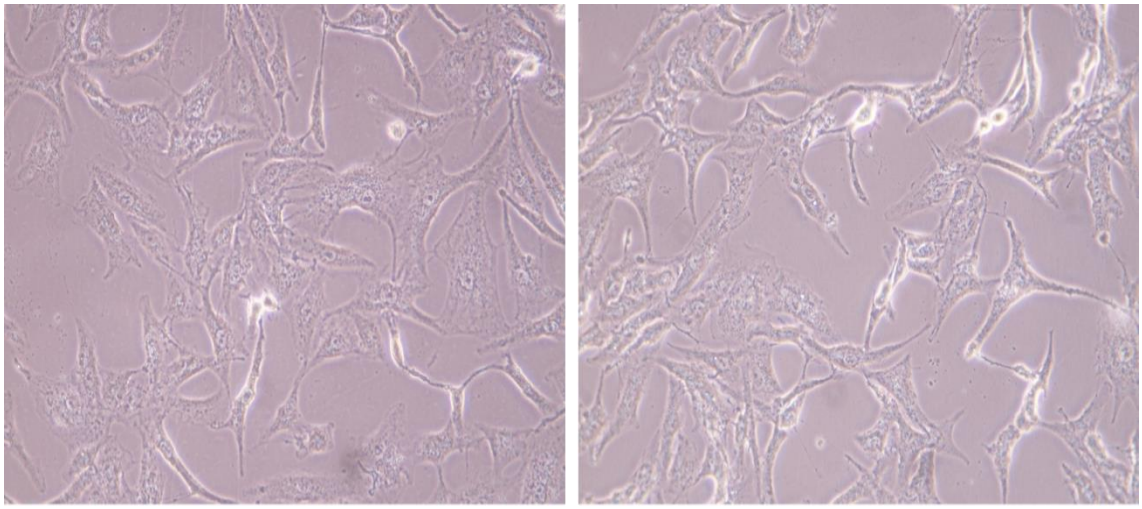
Şekil 4.8 A549 hücrelerinin FITC kontrol siRNA ile transfekte edilmesiyle transfeksiyon verimliğinin belirlenmesi (transfeksiyon oranı: %90, 20X büyütme)



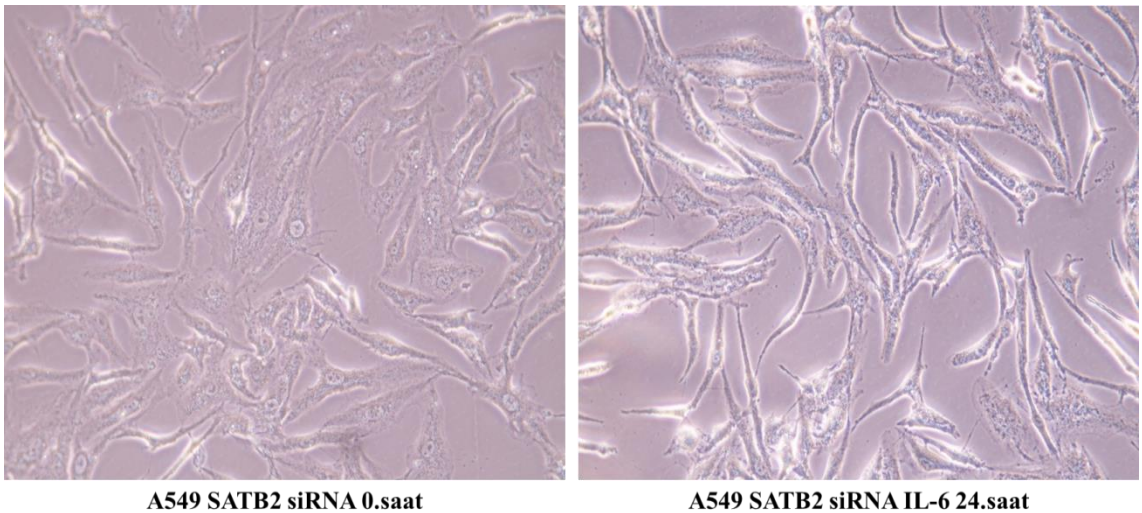
Şekil 4.9 H1650 hücrelerinin FITC kontrol siRNA ile transfekte edilmesiyle transfeksiyon verimliğinin belirlenmesi (transfeksiyon oranı: %85, 20X büyütme)

4.6 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının Hücrelerin Morfolojileri Üzerine Olan Etkileri

Çalışmamızda SATB2'nin ve IL-6 uygulamasının A549 ve H1650 hücrelerinin morfolojileri üzerine olan etkilerini tespit ettik. A549 hücresini incelediğimizde, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de görüldüğü üzere yalnızca IL-6 uygulaması hücre morfolojisi üzerine pek etkili olmazken, SATB2'nin susturulması, hücreleri mezenkimal bir forma dönüştürmüştür. Ayrıca hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6'nın uygulandığı hücrelerdeki mezenkimal forma geçişin daha da net olduğu gözlendi.

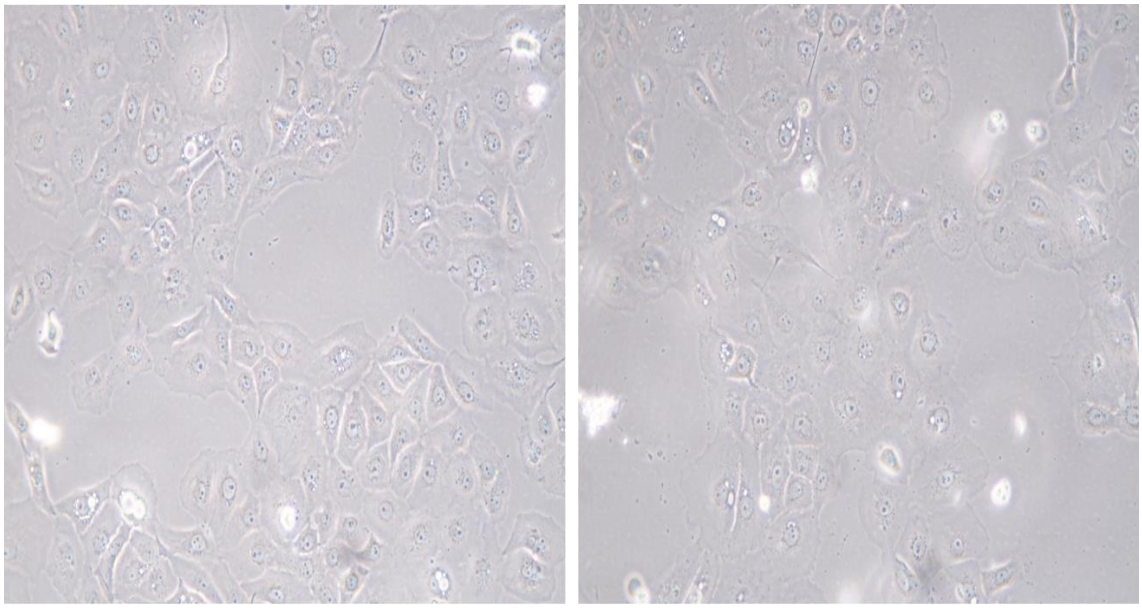


Şekil 4.10 Kontrol siRNA ile transfekte edilen A549 hücrelerinin IL-6 ile muamele edilen ve edilmeyen grupların ışık mikroskobu görüntüsü (20X büyütme)

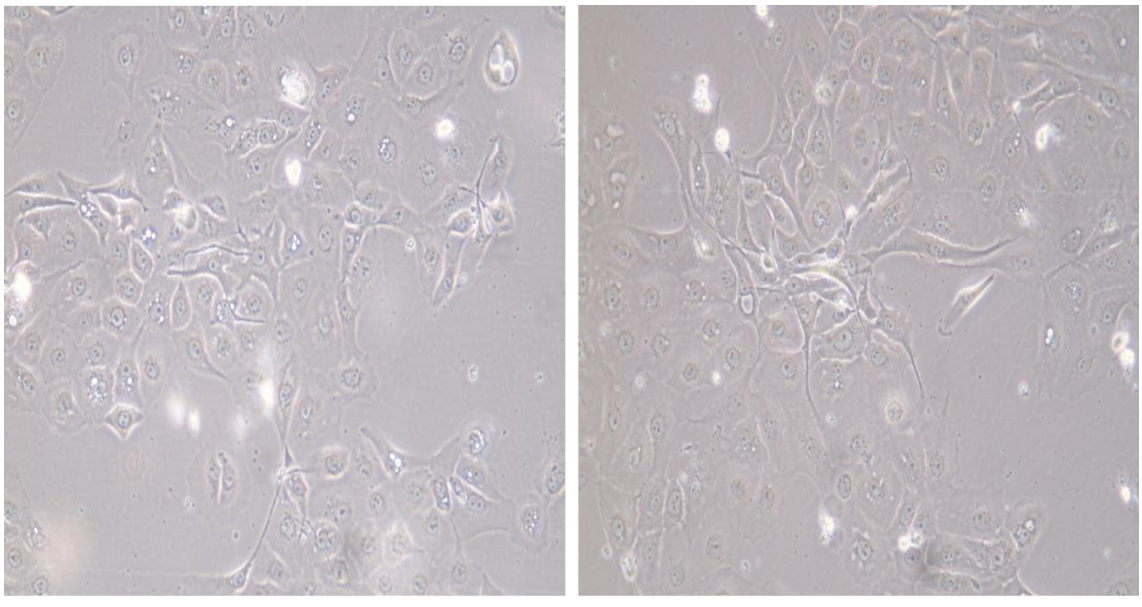


Şekil 4.11 SATB2 siRNA ile transfekte edilen A549 hücrelerinin IL-6 ile muamele edilen ve edilmeyen grupların ışık mikroskobu görüntüsü (20X büyütme)

H1650 hücrelerinde, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de görüldüğü üzere IL-6 uygulaması hücre morfolojisi üzerine hiçbir etkisi olmazken, sadece SATB2'nin susturulduğu ve hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 uygulamasının yapıldığı hücre gruplarında çok net olmayan bir mezenkimal forma dönüş gözlemlenmiştir.



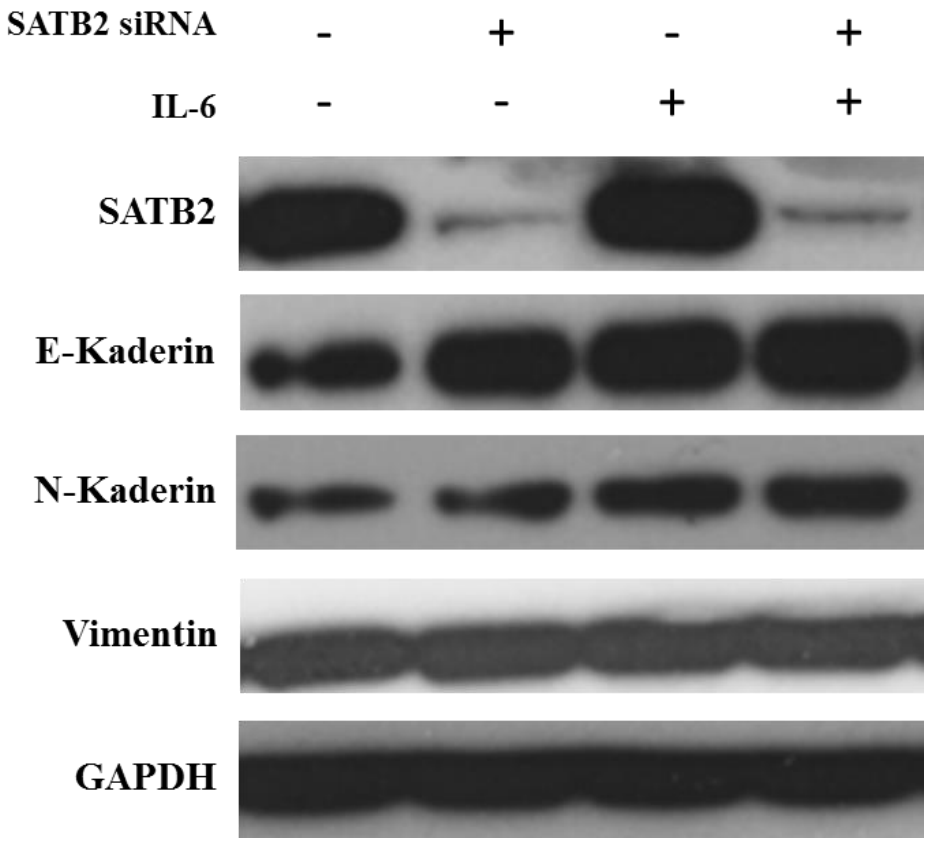
Şekil 4.12 Kontrol siRNA ile transfekte edilen H1650 hücrelerinin IL-6 ile muamele edilen ve edilmeyen grupların ışık mikroskobu görüntüsü (20X büyütme)



Şekil 4.13 SATB2 siRNA ile transfekte edilen H1650 hücrelerinin IL-6 ile muamele edilen ve edilmeyen grupların ışık mikroskobu görüntüsü (20X büyütme)

4.7 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının EMT Belirteçleri Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

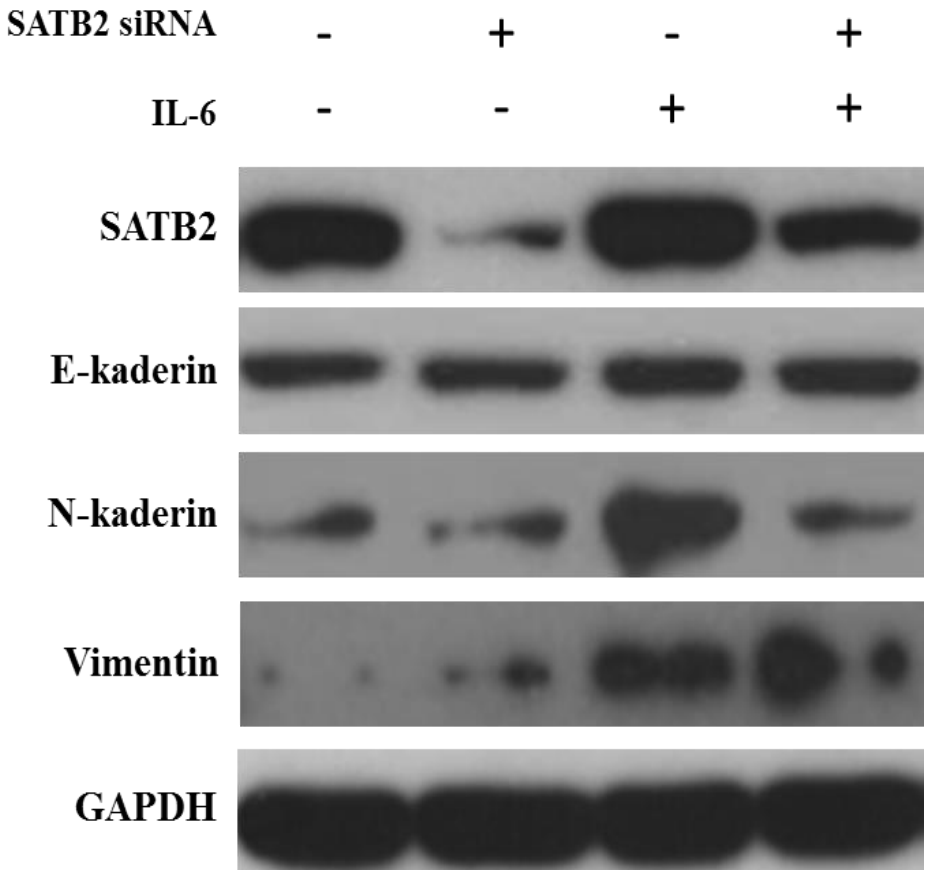
Çalışmamızda hücrelere IL-6 uygulamasının ve SATB2'nin susturulmasının A549 ve H1650 hücrelerindeki EMT sürecinde nasıl bir rol oynadığını tespit etmeye çalıştık. Bunun için, EMT belirteçleri olan E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişimleri araştırdık. Şekil 4.14'de görüldüğü üzere A549 hücrelerinde karşılaştığımız sonuçlar bize yalnızca IL-6'nın 24 saatlik uygulamasının hücrelerdeki E-kaderin ve N-kaderin seviyesini artırdığı, ancak Vimentin üzerinde bir etkisi olmadığını gösterdi. A549 hücrelerinde tek başına SATB2'nin susturulmasının E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin proteinlerinin ekspresyonları üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını gözlemledik. A549 hücrelerinde hem SATB2 susturulması hem de IL-6'nın uygulanması, E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin ekspresyonları yalnızca IL-6'nın uygulandığı gruptaki ekspresyonlarına denk olduğu gözlemlenmiştir. Buradan A549 hücrelerinde SATB2'nin susturulmasının E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin ekspresyonları üzerine bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.14 A549 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatinde EMT belirteçlerindeki ekspresyon değişimlerinin Western Blot analizi ile belirlenmesi

Şekil 4.14'de görüldüğü üzere A549 hücrelerinde IL-6'nın 24 saatlik uygulamasının hücrelerdeki E-kaderin ve N-kaderin seviyesini artırdığı, ancak Vimentin üzerinde bir etkisi olmamış ve SATB2'nin IL-6'nın etkisini bastıramamıştır.

H1650 hücrelerinde SATB2'nin susturulması sonucu ise E-kaderin ve N-kaderin proteinlerinin ekspresyonları üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını, Vimentin ekspresyonu üzerinde ise kısmi bir artış gözlemledik. Şekil 4.15'de görüldüğü üzere H1650 hücrelerinde hem SATB2 susturulması hem de IL-6'nın uygulanması, E-kaderin ekspresyonu üzerinde bir etkisi olmadığı gözlendi. N-kaderin ekspresyon seviyesinde ise yalnızca IL-6 uygulanan grupta artmıştır. Vimentin ekspresyonları yalnızca IL-6'nın uygulandığı gruptaki ekspresyonlarına denk olduğu gözlemlenmiştir. SATB2, IL-6 tarafından indüklenen Vimentin ekspresyonunu azaltamamıştır. Buradan H1650 hücrelerinde SATB2'nin susturulmasının IL-6 tarafından indüklenen N-kaderin artışını inhibe ettiği sonucuna varılmıştır.

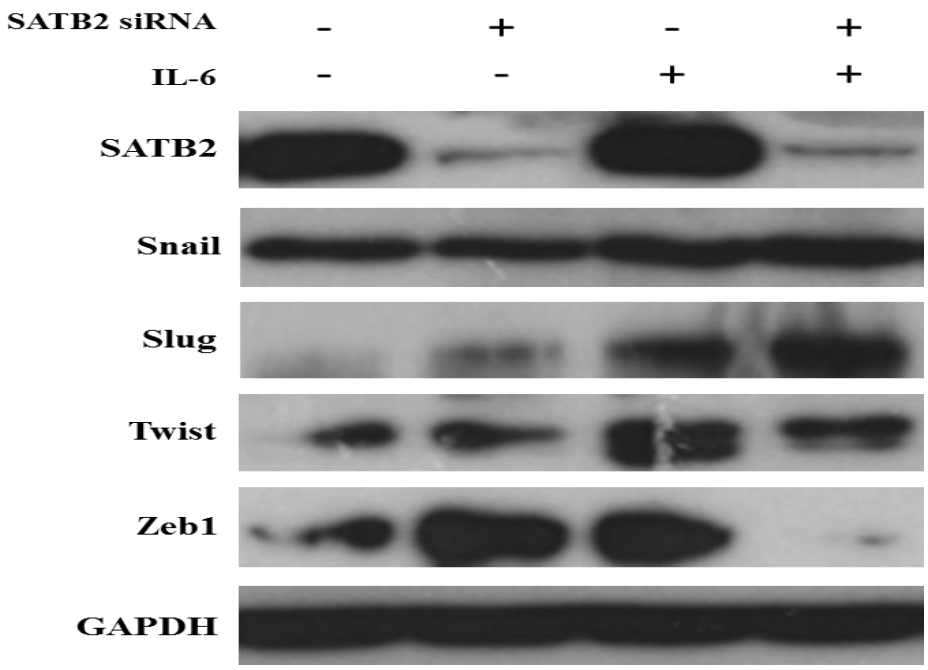


Şekil 4.15 H1650 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatinde EMT belirteçlerindeki ekspresyon değişimlerinin Western Blot analizi ile belirlenmesi

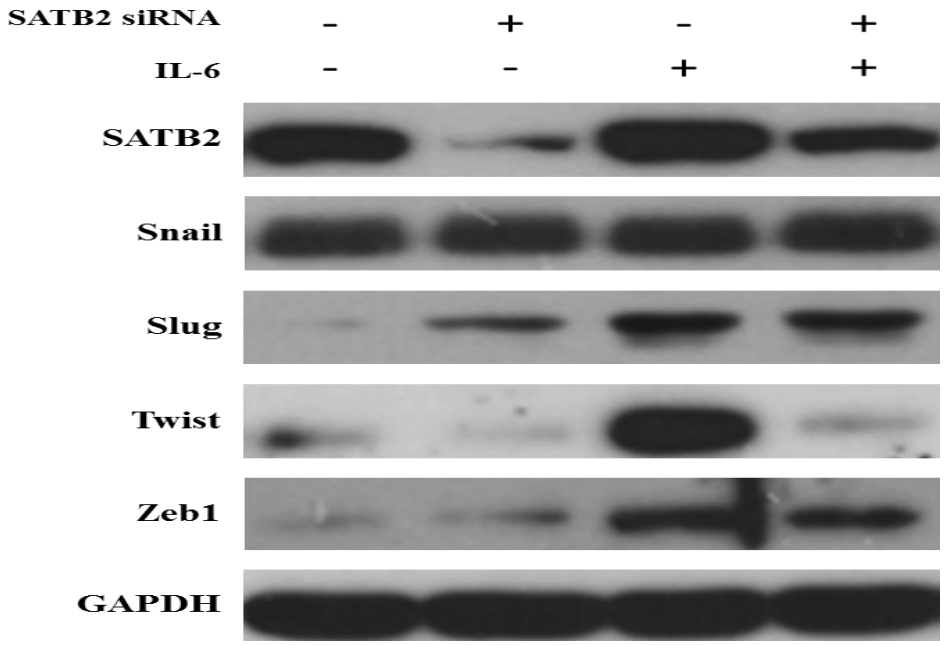
4.8 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının EMT Transkripsiyon Faktörleri Üzerindeki Etkilerinin Western Blot ile Belirlenmesi

Çalışmamızda hücrelere IL-6 uygulamasının ve SATB2'nin susturulmasının A549 ve H1650 hücrelerindeki EMT'i yöneten transkripsiyon faktörleri üzerine nasıl bir etki yaptığını tespit etmeye çalıştık. Şekil 4.16'da görüldüğü üzere, A549 hücrelerinde IL-6 uygulaması Snail, Slug, Twist ve Zeb1 protein seviyelerini anlamlı bir şekilde artırmıştır. SATB2'nin susturulması, Snail ve Twist ekspresyonları üzerinde anlamlı bir etkiye sahip değilken, Slug ve Zeb1 ekspresyonlarını anlamlı bir şekilde artırmıştır. Hem SATB2'nin susturulduğu, hem de IL-6 uygulanan grup A549 hücrelerinde de Snail ekspresyonunda bir artış gözlendi. Ancak bu artış IL-6'den kaynaklanmaktadır. Hem SATB2'nin susturulduğu, hem de IL-6 uygulanan grup hücrelerde Slug ekspresyonundaki artışın, yalnızca SATB2'nin susturulduğu ve yalnızca IL-6'nın uygulandığı hücrelerdeki Slug ekspresyonu artışından daha fazla olduğu gözlendi. Buradan SATB2'nin Slug proteinin negatif düzenleyici olduğu ve IL-6 tarafından indüklenen Slug ekspresyon artışını daha da artırdığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Hem SATB2'nin susturulduğu, hem de IL-6 uygulanan grup A549 hücrelerinde, Twist ve Zeb1 ekspresyonlarındaki değişimlere bakacak olursak; SATB2'nin, IL-6 tarafından indüklenen Twist artışını anlmlı şekilde azalttığı ve Zeb1 ekspresyon seviyesini ise neredeyse tamamen inhibe ettiği gözlendi.

Şekil 4.17'de görüldüğü üzere, H1650 IL-6 uygulaması Snail ekspresyonu üzerine bir etkisi olmazken, Slug, Twist ve Zeb1 protein seviyelerini anlamlı bir şekilde artırdığı gözlendi. SATB2'nin susturulması ise aynı A549 hücrelerinde olduğu gibi Slug ekspresyonunu artırdığı, Twist ekspresyon seviyesinin azaldığı, Snail ekspresyon seviyesinin aynı A549 hücrelerinde olduğu gibi bir etkisi olmadığı ve Zeb1 ekspresyon seviyesinin ise A549 hücrelerinde olduğu gibi arttığı gözlendi. Hem SATB2'nin susturulduğu, hem de IL-6 uygulanan grup H1650 hücrelerinde; Snail ekspresyonu değişmediği, Slug ekspresyonu Slug ekspresyonundaki artışın, yalnızca SATB2'nin susturulduğu ve yalnızca IL-6'nın uygulandığı hücrelerdeki Slug ekspresyonu artışından kısmen daha fazla olduğu görüldü. Hem SATB2'nin susturulduğu, hem de IL-6 uygulanan grup H1650 hücrelerinde, Twist ve Zeb1 ekspresyonlarındaki değişimlere bakacak olursak; SATB2'nin, IL-6 tarafından indüklenen Zeb1 ekspresyon artışının azaldığı, Twist ekspresyonunun ise neredeyse tamamen inhibe ettiği gözlendi.



Şekil 4.16 A549 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatinde EMT yönetici transkripsiyon faktörlerindeki ekspresyon değişimlerinin Western Blot analizi ile belirlenmesi



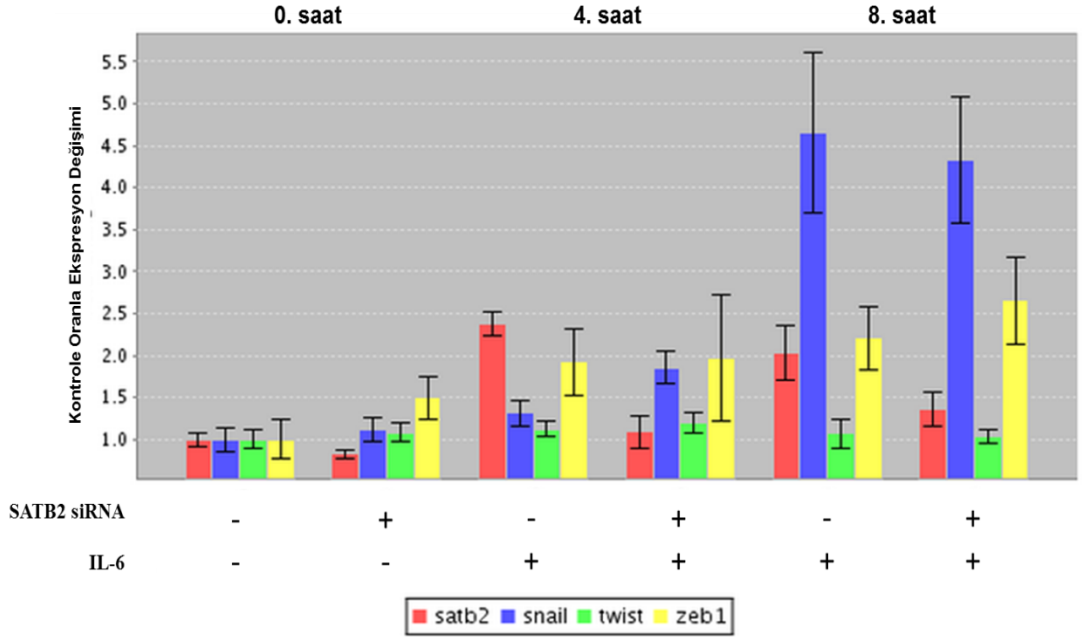
Şekil 4.17 H1650 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatinde EMT yönetici transkripsiyon faktörlerindeki ekspresyon değişimlerinin Western Blot analizi ile belirlenmesi

4.9 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının EMT Yürütücü Transkripsiyon Faktörleri Üzerindeki Etkilerinin GZ-PZR ile Belirlenmesi

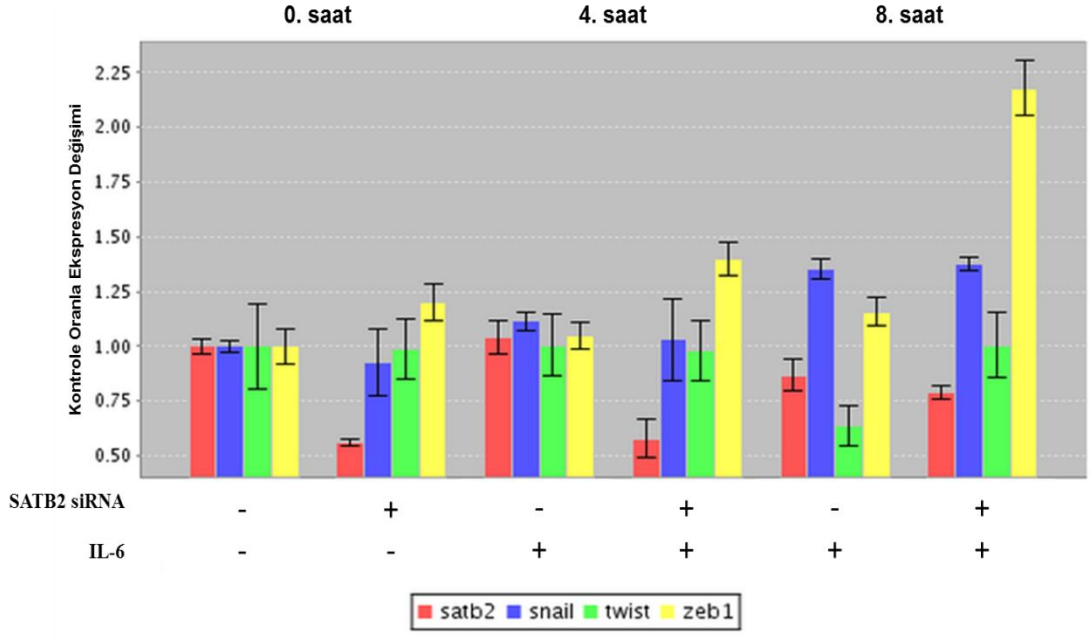
SATB2'nin susturulmasının ve IL-6 uygulamasının EMT yürütücü transkripsiyon faktörleri üzerine olan etkilerini Western Blot analizi ile belirledikten sonra, SATB2'nin ve IL-6'nın bu transkripsiyon faktörleri üzerine olan etkilerini belirlemek için GZ-PZR yöntemini de kullandık. Bunu yapmamızın nedeni; IL-6 uygulamasının, SATB2'nin ve IL-6 tarafından indüklenen veya baskılanan bu EMT yürütücü transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonları üzerindeki olası düzenleyici etkilerini belirlemekti. Şekil 4.18'de görüldüğü üzere; tek başına gerçekleştirilen IL-6 uygulaması A549 hücrelerinde, Snail ve Zeb1 mRNA seviyeleri 4. saatte ve 8. saatte anlamlı bir şekilde artırdığı, Twist mRNA seviyelesi üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı ve ilginç bir şekilde SATB2'nin mRNA seviyesini de artırdığı gözlendi. Tek başına SATB2'nin susturulduğu A549 hücrelerinde, Snail ve Twist mRNA seviyeleri üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı, ancak ilginç bir biçimde Zeb1 mRNA seviyesini anlamlı derecede artırdığı gözlendi. Hem SATB2'nin susturulduğu, hem de IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde uygulamanın 4. saatinde Snail mRNA seviyesinin, tek başına IL-6 uygulanan gruba göre daha fazla olduğu, Twist mRNA seviyesinde anlamlı bir farklılığın olmadığı ve uygulamanın 8. saatinde Zeb1 mRNA seviyesinin, tek başına IL-6 uygulanan gruba göre daha fazla olduğu gözlendi. Hem SATB2'nin susturulduğu, hem de IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde uygulamanın 8. saatindeki Snail mRNA seviyesindeki artış ise IL-6'dan kaynaklanmaktadır.

Şekil 4.19'da görüldüğü üzere; tek başına gerçekleştirilen IL-6 uygulaması H1650 hücrelerinde, uygulamanın 4. saatinde EMT sürecini yöneten transkripsiyon faktörlerinin hiçbirinin mRNA'sında anlamlı bir değişiklik olmazken, 8. saatte ise Snail ve Zeb1 mRNA seviyelerinde anlamlı artış gözlenirken, Twist mRNA seviyesinin düştüğü gözlendi. Tek başına SATB2'nin susturulduğu H1650 hücrelerinde, Snail ve Twist mRNA seviyesinde anlamlı bir değişim olmazken, Zeb1 mRNA seviyesinin A549 hücresinde olduğu gibi anlamlı bir şekilde arttığı gözlendi. Hem SATB2'nin susturulduğu, hem de IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde uygulamanın 4. saatinde Zeb1 mRNA seviyesinin, tek başına IL-6 uygulanan gruba göre daha fazla olduğu, diğer transkripsiyon faktörlerde herhangi bir değişim olmadığı gözlendi. Hem SATB2'nin susturulduğu, hem de IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde uygulamanın 8. saatinde ise yine Zeb1 mRNA seviyesinin 4. saatte olduğu gibi tek başına IL-6 uygulanan gruba göre daha fazla olduğu, Snail seviyesinde bir farklılık olmadığı ve tek başına IL-6 uygulanan grupta azalan Twist mRNA seviyesinin kontrol

grubundaki seviyesinde olduğu gözlendi. A549 hücrelerinin aksine, IL-6 uygulaması SATB2 mRNA seviyesini etkilememiştir. Hem SATB2'nin susturulduğu, hem de IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde uygulamanın 8. saatinde SATB2 mRNA seviyesinde bir düşüş gözlendi



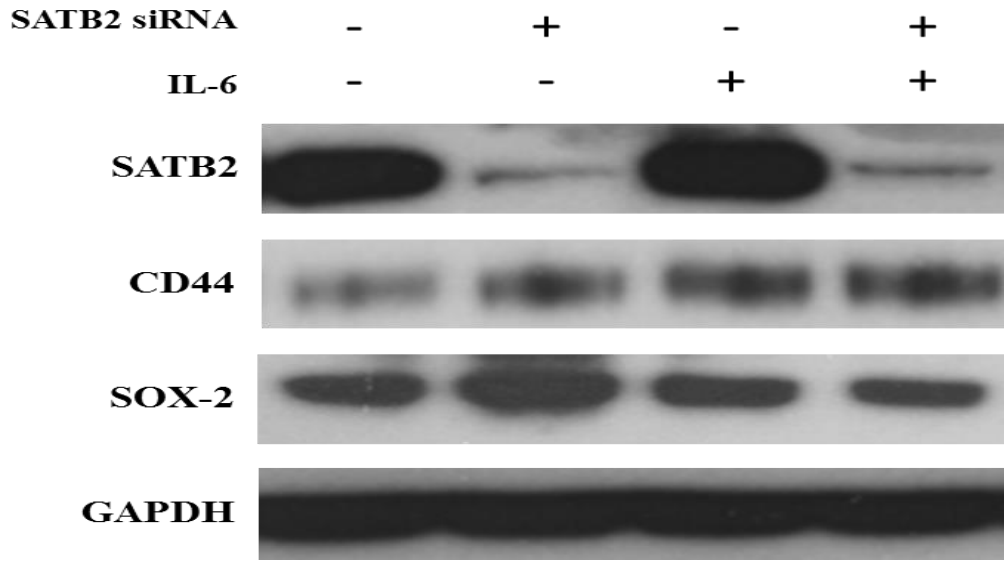
Şekil 4.18 A549 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 4. ve 8. saatlerinde EMT yönetici transkripsiyon faktörlerindeki ekspresyon değişimlerinin GZ-PZR ile belirlenmesi ($p<0,05$)



Şekil 4.19 H1650 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 4. ve 8. saatlerinde EMT yönetici transkripsiyon faktörlerindeki ekspresyon değişimlerinin GZ-PZR ile belirlenmesi ($p<0,05$)

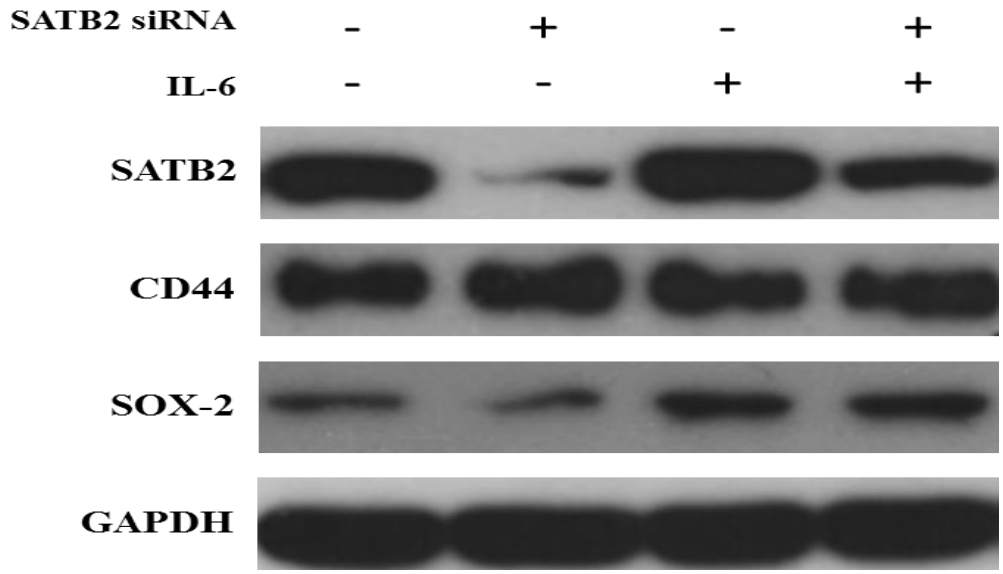
4.10 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının Kök Hücre Belirteçleri Üzerindeki Etkilerinin Western Blot ile Belirlenmesi

Çalışmamızın bu kısmında, IL-6'nın ve SATB2'nin susturulmasının A549 ve H1650 hücrelerinin kök hücre belirteçlerinin ekspresyonları üzerinde nasıl bir etkiye sahip olabileceğini araştırdık. Bunun için araştırmamızda, kök hücre belirteci olarak CD44 ve Sox-2 proteinlerini seçildi. Şekil 4.20'de görüldüğü üzere, IL-6'nın A549 hücrelerinde muamelesi sonucu CD44 protein seviyesi artarken, Sox-2 proteinin seviyesinde bir değişim gözlenmedi. SATB2'nin susturulduğu A549 hücrelerinde ilginç bir biçimde hem CD44, hem de Sox-2 protein seviyelerinde anlamlı artışlar gözlendi. Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde CD44 artışının, yalnızca SATB2'nin susturulduğu ve yalnızca IL-6 ile muamele edilen hücrelerdeki CD44 artışından daha fazla olduğu gözlendi. Bu sonuçlardan SATB2'nin susturulması CD44 ekspresyonunu artırdığı, hem de IL-6 tarafından indüklenen CD44 seviyesini artırdığı anlaşılmıştır. Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde Sox-2 ekspresyonu, sadece SATB2'nin susturulduğu A549 hücrelerindeki Sox-2 artışının iptal olduğu ve kontrol hücrelerindeki seviyesine döndüğü gözlendi.



Şekil 4.20 A549 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatinde kanser kök hücre belirteçlerindeki ekspresyon değişimlerinin Western Blot analizi ile belirlenmesi

Şekil 4.21'da görüldüğü üzere, IL-6 uygulaması H1650 hücrelerindeki CD44 seviyesi üzerinde bir etkisi görülmediği, yalnızca SATB2'nin susturulduğu ve hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 uygulamasının yapıldığı H1650 hücrelerinde CD44 seviyelerinde artış olduğu görüldü. Ayrıca; yalnızca IL-6 uygulandığı ve hem IL-6'nın uygulandığı H1650 hücrelerinde Sox-2 seviyesinin arttığı, sadece SATB2'nin susturulduğu H1650 hücrelerinde Sox-2 ekspresyonunun kısmi bir şekilde azaldığı gözlendi.

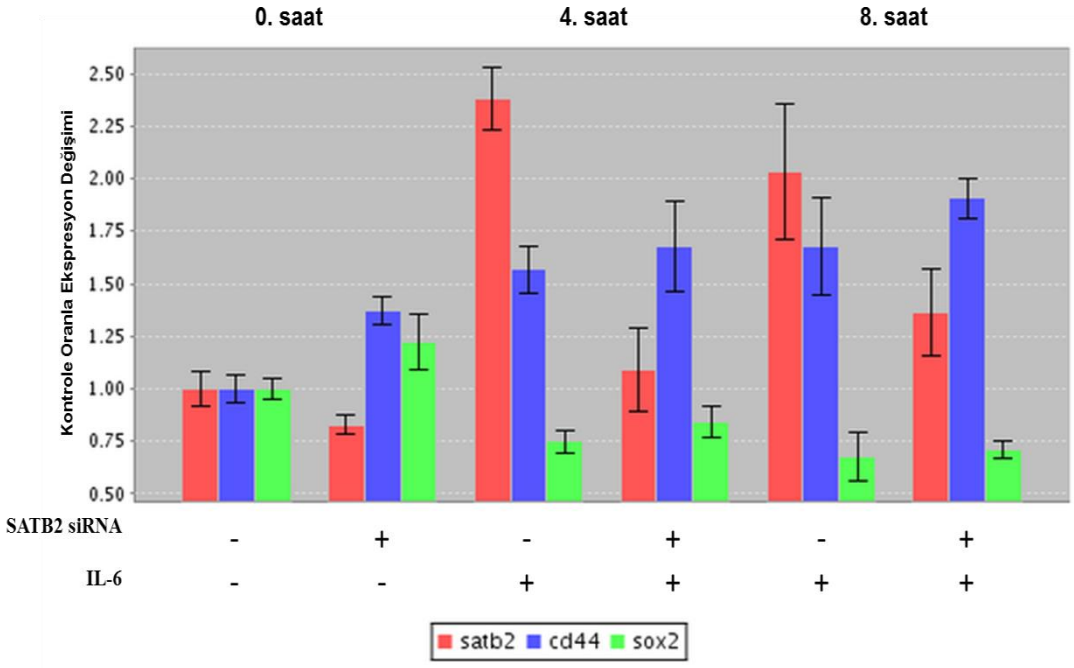


Şekil 4.21 H1650 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatindeki kanser kök hücre belirteçlerindeki ekspresyon değişimlerinin Western Blot analizi ile belirlenmesi

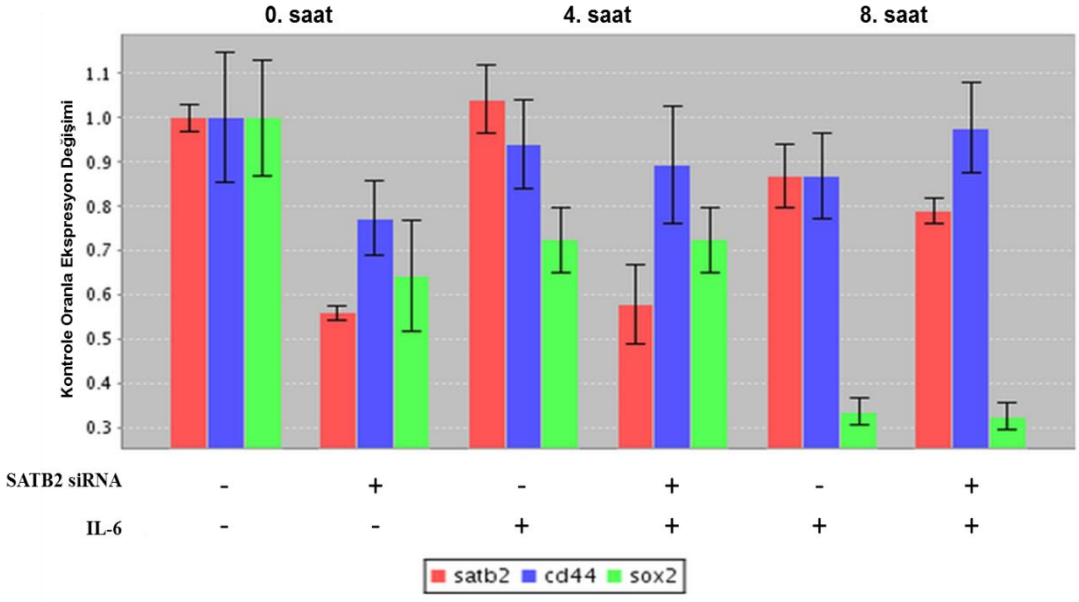
4.11 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının Kök Hücre Belirteçleri Üzerindeki Etkilerinin GZ-PZR ile Belirlenmesi

Şekil 4.22'de görüldüğü üzere; tek başına gerçekleştirilen IL-6 uygulaması A549 hücrelerinde, CD44 mRNA seviyesini hem 4. saatte hem de 8. saatte artırırken, Sox-2 mRNA seviyesini her iki saatte de azalttığı gözlendi. Tek başına SATB2'nin susturulduğu A549 hücrelerinde, CD44 ve Sox-2 mRNA seviyesi anlamlı bir şekilde artmıştır. Hem SATB2'nin susturulduğu, hem de IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde uygulamanın 4. ve 8. saatlerinde, CD44 mRNA seviyesinin tek başına IL-6 uygulanan gruba göre daha fazla olduğu, Sox-2 mRNA seviyesininde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Şekil 4.23'de görüldüğü üzere; tek başına gerçekleştirilen IL-6 uygulaması H1650 hücrelerinde, CD44 mRNA seviyeside anlamlı bir değişim olmazken Sox-2 mRNA seviyesinin zamana bağlı olarak düştüğü gözlendi. Tek başına SATB2'nin

susturulduğu H1650 hücrelerinde, CD44 ve Sox-2 mRNA seviyesi anlamlı bir şekilde azalmıştır. Hem SATB2'nin susturulduğu, hem de IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde uygulamanın 4. ve 8. saatlerinde CD44 ve Sox-2 mRNA seviyelerinin tek başına IL-6 uygulanan gruba göre anlamlı bir farka sahip olmadığı gözlendi.



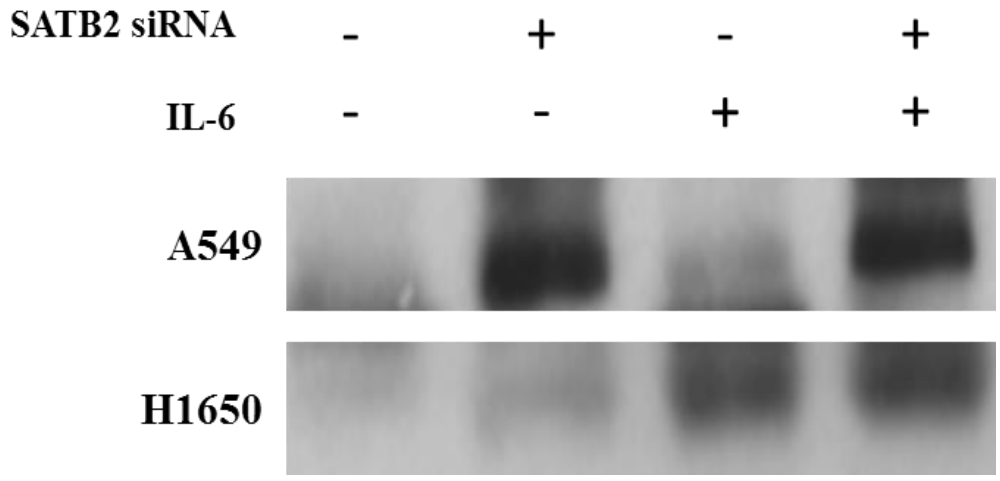
Şekil 4.22 A549 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 4. ve 8. saatlerinde kök hücre belirteçlerinin ekspresyon değişimlerinin GZ-PZR ile belirlenmesi ($p<0,05$)



Şekil 4.23 H1650 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 4. ve 8. saatlerinde kök hücre belirteçlerinin ekspresyon değişimlerinin GZ-PZR ile belirlenmesi ($p<0,05$)

4.12 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının ve IL-6 Uygulamasının Fokal Adezyon Kinaz Protein Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

Araştırmamızın bu ayağında, IL-6'nın ve SATB2'nin susturulmasının özellikle A549 hücrelerinde meydana gelen mezenkimal forma geçişin pek EMT ile ilgili olmadığı sonucuna vardık. Bunun için, bu mezenkimal formun bir etkeni daha olarak hücre iskeleti elemanlarına odaklandık. Bunun için laboratuvarımızda mevcut olan, hücre iskeletinin önemli bir faktörü olup, hücre migrasyonu ve invazyonu önemli bir faktör olan Fokal Adezyon Kinaz (FAK) proteinin ekspresyonunu araştırdık. Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.24'de görüldüğü üzere, SATB2'nin susturulduğu ve mezenkimal forma geçişin çarrpıcı bir biçimde belli olduğu A549 hücrelerde FAK proteininin ekspresyonunun dramatik bir şekilde arttığı, IL-6 uygulamasında kısmi bir artış olduğu, hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 uygulanan A549 hücrelerinde de aynı çarpıcı artışın gerçekleştiği görüldü. H1650 hücrelerinde ise Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.20'de görüldüğü üzere, A549 hücrelerindeki mezenkimal forma geçişin daha az belli olduğu hücrelerde bu FAK artışının A549 hücrelerininkinden daha az olmasını bekledik. Beklediğimiz üzere SATB2'nin susturulduğu H1650 hücrelerinde FAK artışının kısmi olduğu, yalnızca IL-6 verilen ve hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6'nın uygulandığı H1650 hücrelerinde FAK ekspresyon artışının daha belirgin olduğu gözlendi. IL-6'nın FAK ekspresyonu için pozitif bir uyaran olduğu ve SATB2'nin ise FAK ekspresyonu için negatif düzenleyici olduğu KHDAK hücrelerinde ilk kez gösterildi.

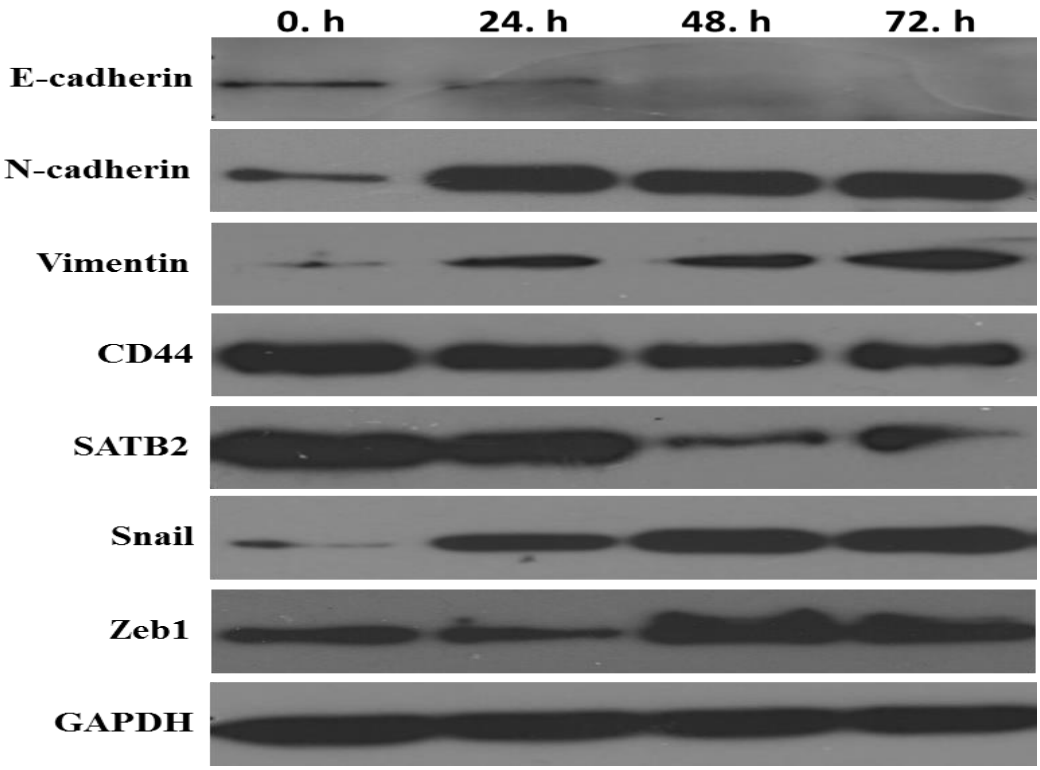


Şekil 4.24 A549 ve H1650 hücrelerinde SATB2'nin siRNA ile susturulmasının ve IL-6 muamelesinin 24. saatinde FAK ekspresyon seviyelerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi

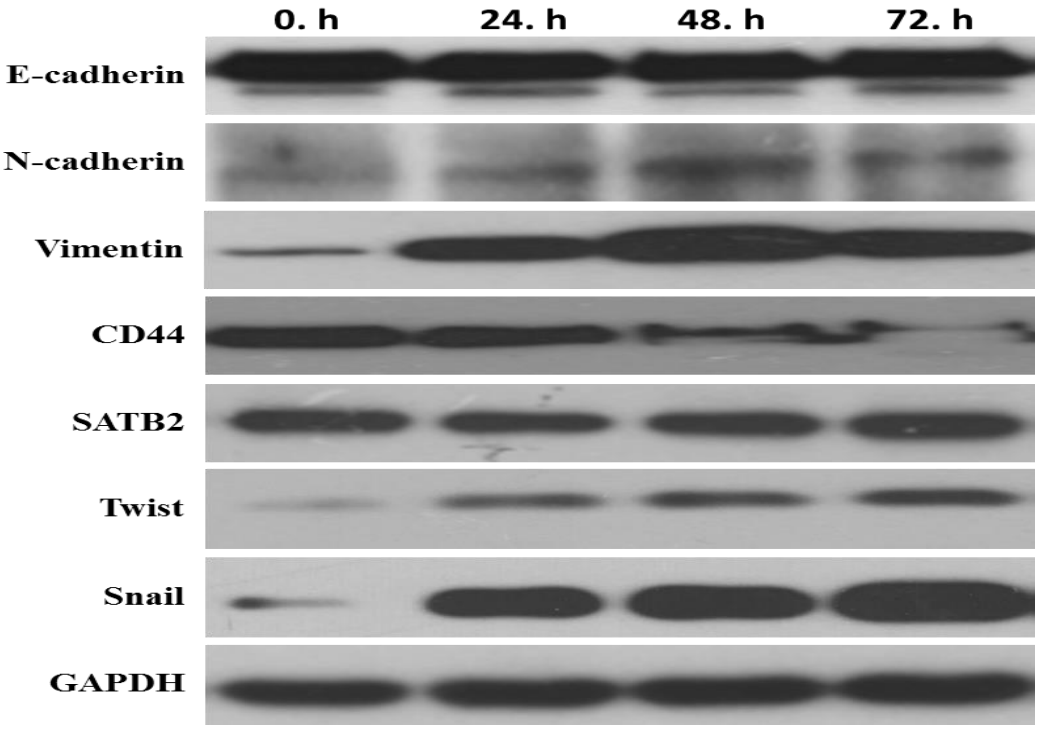
4.13 TGF-β Tarafından İndüklenen EMT Sürecinde SATB2'nin Durumu

Çalışmamızda hipotez ettiğimiz üzere SATB2'nin KHDAK hücrelerinin EMT sürecinde düzenleyici bir rol oynadığını öngörmüştük. Her ne kadar sonuçlarımızda H1650 hücrelerinde IL-6 tarafından önemli EMT belirteci olan N-kaderinin arttığı, hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 uygulanan H1650 hücrelerinde N-kaderin ekspresyonundaki artışın iptal olduğu gözlense de, E-kaderin ekspresyonunda azalma olmaması hücrelerin tam olarak EMT sürecine giremedikleri sonucuna vardık. Ayrıca her iki hücre dizimizde de yaptığımız çalışmalarda SATB2'nin özellikle Slug, Twist ve Zeb1 üzerinde düzenleyici rollerinin olması bütün kanser hücreleri dahil olmak üzere ilk kez çalışmamızla gösterilmiş olsa da E-kaderin/N-kaderin değişimine neden olmaması ilginç veriler olmuştur. Bu sonuçlardan SATB2'nin EMT için kritik bir rolü olduğu ancak bunun ekspresyonu ile değil, ya fosfatlanması ya da sumolasyon gibi protein aktivasyonu veya inhibisyonu ile ilişkili olabileceği kanısına vardık. Ancak bunu mevcut konumda araştırabilmemiz mümkün değildir. Onun yerine proje hücrelerimizi önemli EMT indükleyicisi olan TGF-β ile muamele ettiğimizde EMT sürecine olan etkisini ve bu süreçte SATB2'nin durumunu araştırdık.

Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'de görüldüğü üzere 24,48 ve 72 saat sürelerince TGF-β ile muamele edilen A549 ve H1650 hücrelerinde EMT sürecinin gerçekleştiği gözlendi. A549 hücrelerinin TGF-β uygulamasına daha iyi yanıt vererek EMT sürecine çarpıcı bir biçimde girdiği, H1650 hücrelerinin ise TGF-β muamelesine A549 hücrelerinden daha zayıf bir yanıt verdiği ve EMT sürecine kuvvetli bir şekilde giremediği gözlendi. Bu sonuçlar ile paralel olarak EMT sürecine dramatik bir şekilde giren A549 hücrelerinde zamana bağlı olarak SATB2 ekspresyonunun yine dramatik olarak azaldığı görülmüştür. EMT sürecinin zayıf bir şekilde yaşandığı H1650 hücrelerinde ise buna mukabil SATB2 ekspresyonunda kısmi bir azalış olduğu gözlendi.



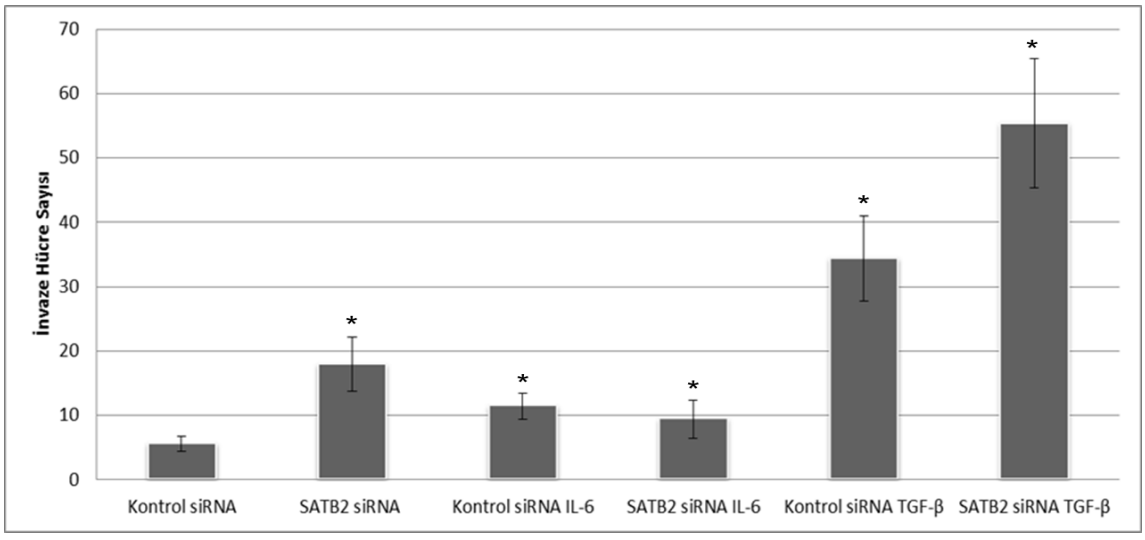
Şekil 4.25 TGF-β ile muamele edilen A549 hücrelerinde SATB2'nin, EMT belirteçlerinin, EMT yönetici transkripsiyon faktörlerinin ve kanser kök hücre belirtecinin ekspresyonlarının zamana bağlı değişiklerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi



Şekil 4.26 TGF-β ile muamele edilen H1650 hücrelerinde SATB2'nin, EMT belirteçlerinin, EMT yönetici transkripsiyon faktörlerinin ve kanser kök hücre belirtecinin ekspresyonlarının zamana bağlı değişiklerinin Western Blot analizi ile gösterilmesi

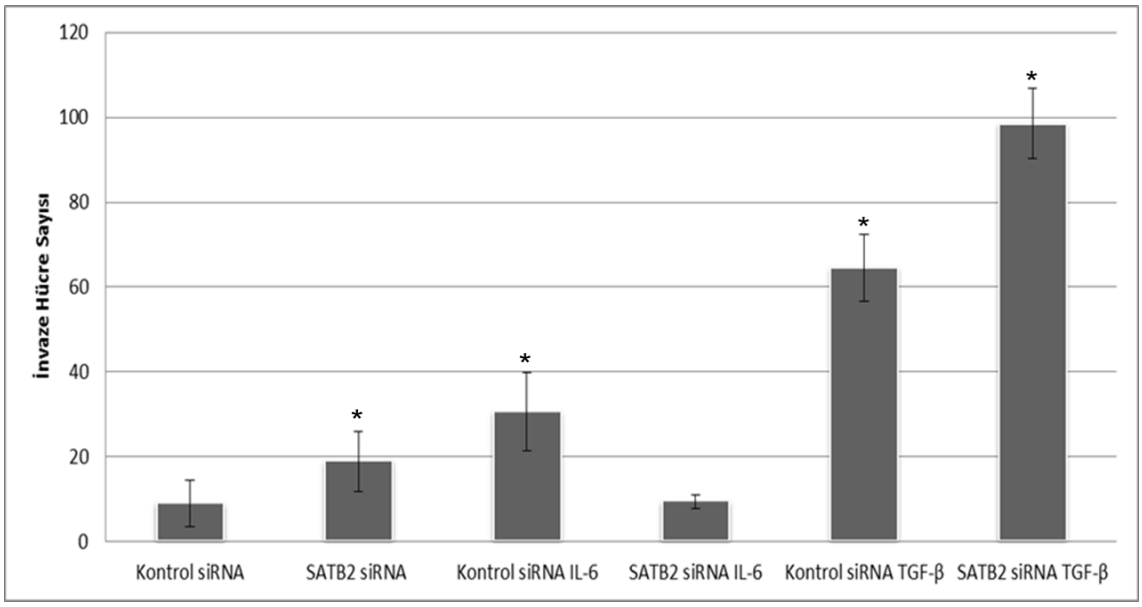
4.14 SATB2'nin siRNA ile Susturulmasının, IL-6 ve TGF-β Uygulamasının Hücre İnvazyonu Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi

IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde ortalama invaziv hücre sayısı 2 kat artarken, H1650 hücrelerinde ortalama invaziv hücre sayısında 3 kattan daha fazla bir artış gözlendi. TGF-β ile muamele edilen A549 hücrelerinde ortalama invaziv hücre sayısında 6 kattan daha fazla bir artış gözlenirken, H1650 hücrelerinde ortalama invaziv hücre sayısında kontrole oranla 7 kattan daha fazla bir artış gözlendi. Yalnızca SATB2'nin susturulduğu A549 hücrelerinde ortalama invaziv hücre sayısında kontrole oranla 3 kattan daha fazla bir artış olurken, H1650 hücrelerinde ortalama invaziv hücre sayısında 2 katlık bir artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p<0,05$). Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinin ortalama invaziv hücre sayısında 1,5 katlık bir artış olurken, H1650 hücrelerinin ortalama invaziv hücre sayısı kontrol grubundaki kadar belirlenmiştir. Hem SATB2'nin susturulduğu hem de TGF-β ile muamele edilen A549 hücrelerinin ortalama invaziv hücre sayısında nerdeyse 10 katlık bir artış yaşanırken, H1650 hücrelerinin ortalama invaziv hücre sayısında da 11 katlık bir artış yaşanmıştır. Bu sonuçların hepsi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve Şekil 4.30'da görüldüğü üzere; IL-6'nın ve TGF-β'nın invazyonu artırdığı, SATB2'nin susturulması ile invazyonunu arttığı, SATB2'nin susturulmasının IL-6 tarafından indüklenen invazyon artışını azalttığı ortaya çıkmaktadır. İlginç bir şekilde SATB2'nin susturulması TGF-β tarafından indüklenen invazyon artışını daha da artırdığı sonucuna varılmıştır.



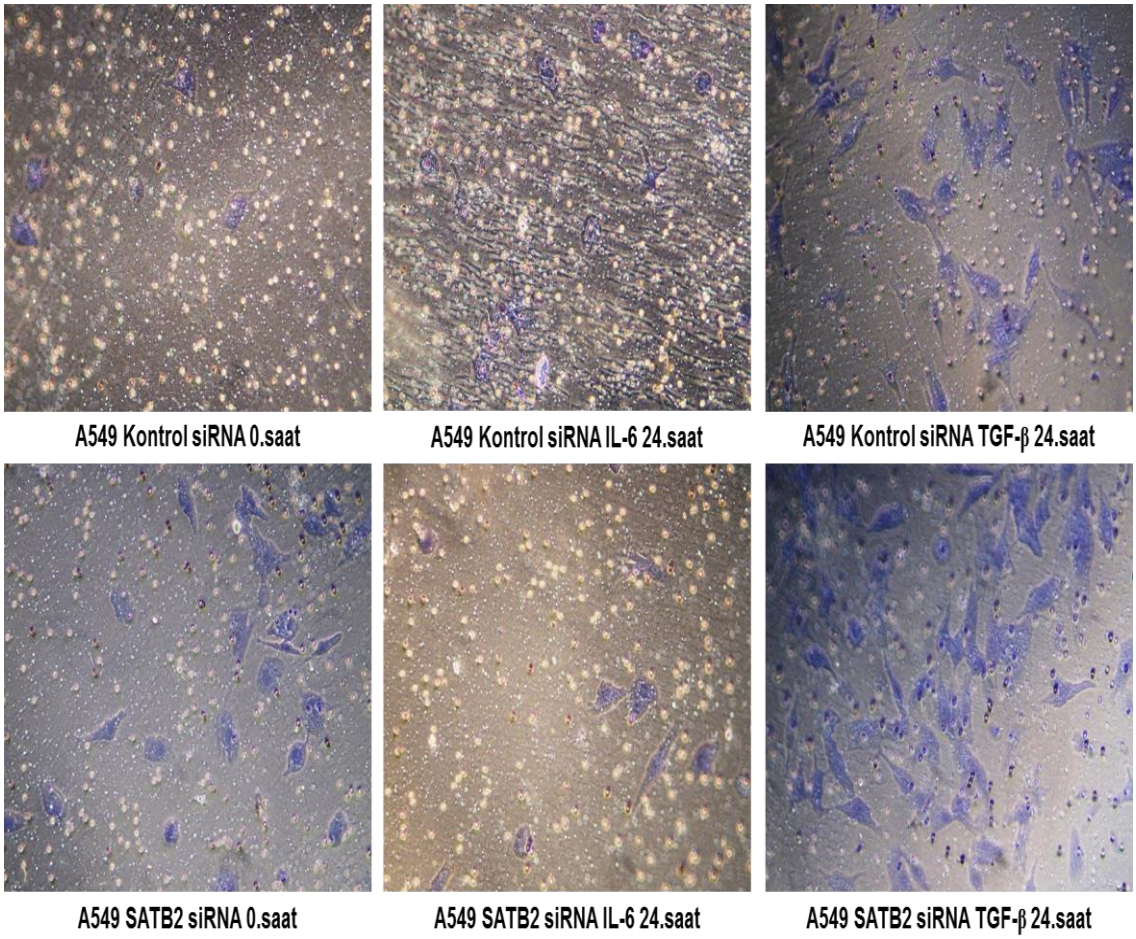
Şekil 4.27 Kontrol siRNA ve SATB2 siRNA ile transfekte edilen A549 hücrelerindeki IL-6 ve TGF-β muamelesinin hücre invazyonuna etkisi

Ortalama±standart hata, "*" ile gösterilen grupların, kontrol siRNA grubuna oranla farkları $p<0,05$

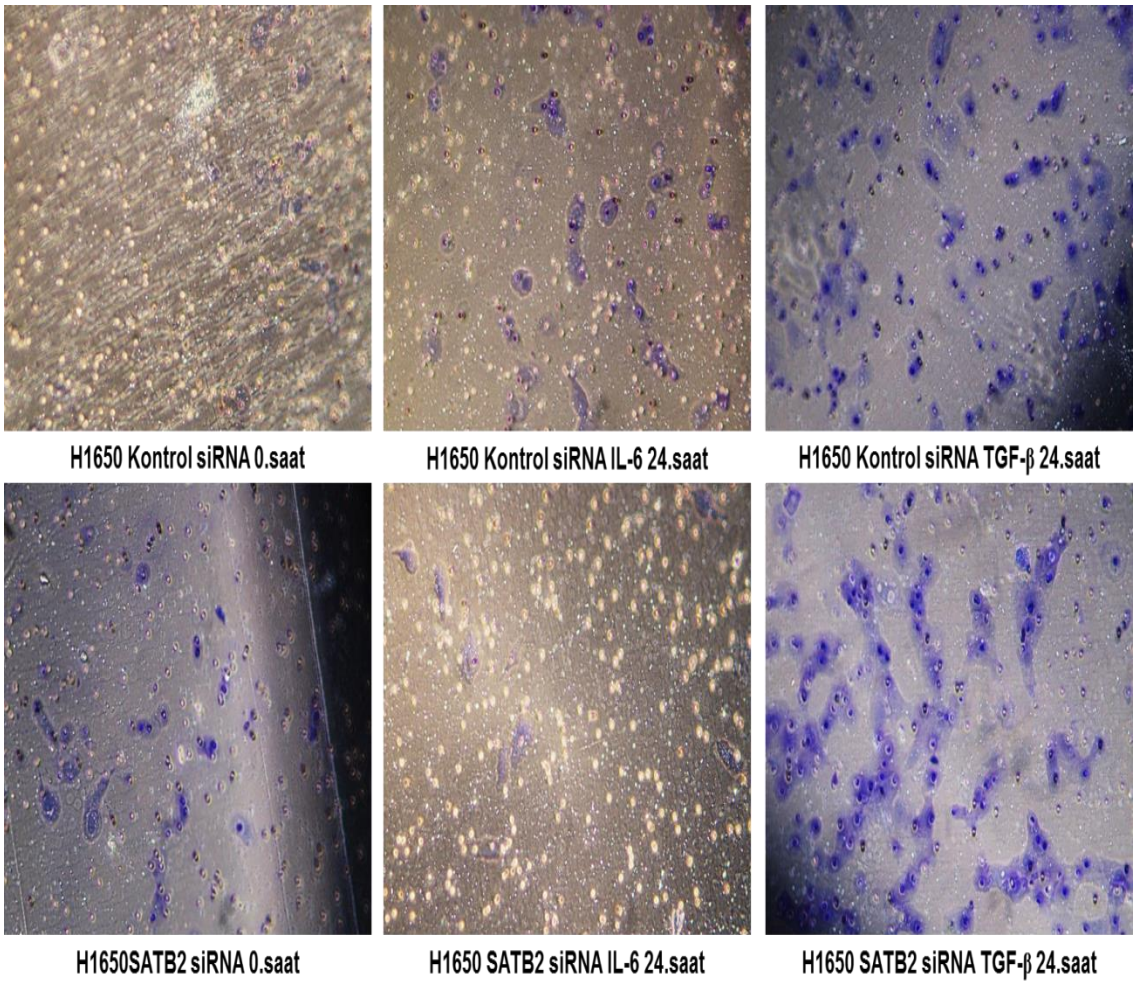


Şekil 4.28 Kontrol siRNA ve SATB2 siRNA ile transfekte edilen H1650 hücrelerindeki IL-6 ve TGF-β muamelesinin hücre invazyonuna etkisi

Ortalama±standart hata, "*" ile gösterilen grupların, kontrol siRNA grubuna oranla farkları p<0,05



Şekil 4.29 Kontrol siRNA ve SATB2 siRNA ile trasnfekte edilen A549 hücrelerindeki IL-6 ve TGF-β muamelesiyle invaziv hücrelerin ışık mikroskobundaki görüntüleri (20X büyütme)



Şekil 4.30 Kontrol siRNA ve SATB2 siRNA ile trasnfekte edilen H1650 hücrelerindeki IL-6 ve TGF-β muamelesiyle invaziv hücrelerin ışık mikroskobundaki görüntüleri (20X büyütme)

5. TARTIŞMA

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, karsinogenezde kilit roller üstlenen bir İnterlökin ailesi üyesi olan IL-6'nın ve kromatin yeniden modelleme proteini SATB2'nin kanser progresyonunda önemli bir yere sahip olan EMT ve kanser kök hücre fenotipinin kazanılmasındaki rolü ve aralarındaki ilişki araştırılmıştır.

Tümör stromasında bulunan kanser hücreleri ve stromal hücreler tarafından salınan kemokinlerin ve sitokinlerin çoğunun, kanser progresyonunun çeşitli aşamalarında önemli rol oynadıkları belirtilmektedir. Önemli bir İnterlökin ailesi üyesi olan IL-6, kanser progresyonunun birçok basamağında merkezi bir yer tutmaktadır (Ao vd 2007). Çeşitli pre-klinik modellerde IL-6'nın tümörgenezi, anjiyogenezi, invazyonu ve metastazı desteklediği gösterilmiştir (Sansone vd 2007). IL-6'nın kanser progresyonundaki rolleri (örn. metastaz ve ilaç dirençliliği), meme ve akciğer kanseri gibi çeşitli adenokarsinomalarda ilişkisi klinik gözlemlerle rapor edilmiştir (Wang vd 2013, Sun vd 2014).

Metastatik yayılımının en önemli adımlarından birisi, epitel bir hücrenin apiko-bazal hücre polaritesi ve hücre-hücre bağlantıları gibi önemli kanser hücrelerinin epitelyal özelliklerini kaybederek, ön-arka polaritesi kazandığı, hücre-hücre bağlantılarının kaybolduğu, artan hücre göçü ve invazyon yeteneği gibi mezenşimal özelliklerin edinilmesi ile sonuçlanan morfogenetik EMT sürecidir (Mani vd 2008). EMT, sadece basit bir morfolojik bir değişim süreci olmanın yanında, çok çeşitli epitelyal ve mezenkimal genlerin transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel değişimleriyle ilişkili olan, oldukça karmaşık ve çok adımlı bir süreçtir (Yang vd 2006).

IL-6'nın, meme ve baş-boyun kanserleri gibi çeşitli kanser türlerinde EMT'i indükleyerek invazyon ve metastazı desteklediğine dair çalışmalar olmasına rağmen, proje teklifimizi sunduğumuz zaman diliminde IL-6'nın KHDAK hücrelerinde EMT'i indükleyerek invazyonu artırdığına dair bir çalışma mevcut değildi. Yakın zamanda yapılan çalışmalarla IL-6'nın KHDAK hücrelerinde EMT'i indükleyerek hücre invazyonunu artıracağı yönündeki hipotezimizin doğruluğu kanıtlamıştır. Ancak bu

durum hipotezimizin özgünlüğünü azaltmamıştır. Çünkü projemiz, sadece IL-6'nın KHDAK hücrelerinde EMT'i indükleyeceği üzerine kurulu değildi.

Çeşitli transkripsiyon faktörler, bir yandan E-kaderinin gibi epitelyal belirteçlerin ekspresyonlarını transkripsiyonel olarak baskılanmasını sağlarken, diğer taraftan da N-kaderin ve Vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonlarını artırmaktadırlar. EMT sürecini yöneten bu transkripsiyon faktörler arasında; zinc finger proteini ailesi içinde yer alan Snail1, Snail2 (Slug), Zeb1, Zeb2/SIP1 ve basic helix-loop-helix faktörler olarak adlandırılan Twist1 ve E47 transkripsiyon faktörleri, EMT çalışmalarıda en çok araştırılandır (Peinado vd 2007, de Herreros vd 2010). Projemizde IL-6 ile muamele edilen A549 ve H1650 hücrelerinin EMT sürecine girip girmedikleri, E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin EMT belirteçlerinin ve Snail, Slug, Twist, Zeb1 EMT yönetici transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenerek değerlendirilmiştir.

Yapılan araştırmalar, EMT indükleyici bu transkripsiyonel faktörlerin, ALDH1 (aldehyde dehydrogenase 1) proteini gibi kök hücre belirteçlerinin sentezi için gerekli olan *Sox-2, Nanog, KLF4 ve T cell factor-4* gibi kök hücre destekleyici genlerin ekspresyonlarını da indüklediklerini göstermiştir (Kurrey vd 2009). Akciğer kanser kök hücrelerinin en önemli karakteristik özelliklerden biri, hücrelerin CD44+/CD24- fenotipine sahip olmasıdır. Yapılan çalışmalarla; IL-6'nın, kanser kök hücre fenotipinin kilit bir belirteci olan CD44 ekspresyon artışına neden olduğu da kanıtlanmıştır. (Okudela vd 2012). Araştırmamızın çıkış noktası da kanser hücrelerinde EMT ve kök hücre fenotipinin kazanılması arasındaki bu ilişkiydi. Bu nedenle projemizde, IL-6 uygulanan A549 ve H1650 hücrelerinin EMT sürecine girip girmedikleri, diğer taraftan da kök hücre belirteçleri olan CD44 ve Sox-2'nin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesiyle bu hücrelerin kök hücre fenotipi kazanıp kazanmadıkları araştırılmıştır.

Kök hücre fenotipinin kazanılması ve farklılaşması süreçleri için de kromatin yapısının yeniden modellenmesi ve organizasyonu, bu süreçlerin gerektirdiği gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Ho vd 2010, Lessard vd 2010). Kromatin yapısının düzenlenmesini yönlendirme aksiyonuna sahip sayısız protein arasında, SATB1 ve SATB2 adı verilen iki proteinin ayrı bir yeri bulunmaktadır (Dickinson vd 1992, Dobreva vd 2003, Britanova vd 2005). Bu iki protein, transkripsiyon faktörlerin ve diğer kromatin yeniden modelleme proteinlerinin toplanmalarına olanak sağlanmaktadır ve böylelikle transkripsiyon faktörlerin ilgili gen ekspresyonlarını aktive etmek veya baskılamak üzere promotor bölgelerine bağlanmalarına olanak sağlamak için kromatinin yapısını yeniden düzenlemektedirler

(Yasui vd 2002, Gyorgy vd 2008). Çeşitli hücre tiplerinde kök hücre fenotipinin korunmasının ve farklılaşmasının kilit bir düzenleyicisi olan kromatin yeniden modelleme proteini olan SATB2 ilgimizi çekmiştir. Bu nedenle SATB2'nin KHDAK hücrelerinde EMT süreci ve kök hücre fenotiplerinin kazanılmasında kilit bir role sahip olması pek sürpriz değildi. Projemizde, daha önce hiçbir kanser türünde araştırılmamış olan IL-6 tarafından indüklenen EMT sürecinde ve kök hücre fenotipinin kazanılmasında SATB2'nin düzenleyici rolünü açığa çıkarmayı amaçladık.

Çalışmamızda öncelikle elimizde mevcut bulunan çeşitli kanser hücre dizilerindeki SATB2 ekspresyon seviyelerini Western Blot analizi ile gösterdik. Sonuçta; diğer kanser hücrelerine nazaran, meme kanser hücre dizisi MCF-7 hücrelerindeki aşırı SATB2 ekspresyonunun, meme kanser hücreleri için SATB2'nin gerekli olabileceğini söyleyebiliriz (Şekil 4.1). Bu bilgi, meme kanser hastalarının kötü prognozları ile SATB2'nin yüksek ekspresyonu ilişkilendiren çalışmayı destekler niteliktedir (Patani vd 2009).

IL-6 uygulaması sonucu hücre içinde aktive ettiği yolakların aktivasyonunu göstermeyi amaçladık. Literatürle uyumlu olarak, IL-6'nın A549 ve H1650 hücrelerinde STAT3 ve AKT yolaklarını aktive ettiğini, bu proteinlerin aktif formları olan p-STAT3 ve p-AKT protein seviyelerini zamana bağlı olarak Western Blot analizi ile gösterdik. Elde ettğimiz bu sonuçlarda p-STAT3 protein seviyesinin 30. dakikada ve p-AKT protein seviyesinin ise 1. saatte en yüksek seviyesine ulaştığı görülmüştür (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Elde etmiş olduğumuz bu sonuçlar, literatür ile uyumludur (Zhao vd 2014).

IL-6 uygulamasının, A549 ve H1650 hücrelerinde EMT yönetici trasnkripsiyon faktörlerinin zamana bağlı ekspresyon seviyelerine etkisini göstermek amacıyla, bu hücreleri IL-6 ile 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 ve 72 saatler boyunca muamele ettik. Belirtilen sürelerce IL-6 ile muamele ettiğimiz A549 ve H1650 hücrelerinde EMT'i yöneten transkripsiyon faktörlerin ekspresyonlarını Western Blot ile tespit ettik. A549 hücrelerinde 1. saatten itibaren 72. saate kadar zamana bağımlı olarak sürekli artan Snail, Slug ve Zeb1 protein seviyelerini gördük (Şekil 4.4). Ancak H1650 hücrelerinde, A549 hücrelerinde görüldüğü kadar net artışlar gözlenmemiştir. Bunun nedeni hücrelerdeki IL-6 reseptörü veya daha alt yolaklarda bulunan bu transkripsiyon faktörlerin ekspresyonlarını düzenleyici proteinlerin ekspresyon farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir. Twist ekspresyonu ise 8. ve 16. saatlerde maksimum seviyesine ulaşarak ekspresyonunun giderek azalmaya başladığı gözlendi (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Bu elde ettiğimiz sonuçlar IL-6 Twist protein seviyesini transkripsiyonel olarak değil, post-translasyonel olarak düzenlendiğini gösteren daha önceki bir çalışmayla

uyuşmaktadır (Su vd 2011). Bu çalışmamızdan, literatürde daha önce tespit edilmemiş veriler de elde ettik. IL-6 muamelesinin 1,2 ve 4. saatlerde bile artan Snail ve Zeb1 protein seviyeleri, bu proteinlerin de IL-6 tarafından post-translasyonel olarak düzenlenebileceğini göstermektedir. Bu bilgi, literatürde olmayan bir bilgi olup, daha detaylı araştırmalara ihtiyaç duymaktadır.

H1650 hücrelerinde ise A549 hücrelerinden farklı olarak Zeb1 protein seviyesi belirlenememiştir. Ancak, Snail ve Slug protein seviyelerindeki artışlar A549 hücrelerindeki kadar net olmasa da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.5). Bunun nedeni yukarıda da ifade ettiğimiz gibi, H1650 hücrelerindeki IL-6 reseptörünün ekspresyon seviyesinin düşük olması veya daha alt yolaklarda Snail ve Slug ekspresyonlarını düzenleyici proteinlerin ekspresyon farklılığından kaynaklanıyor olabilir. H1650 hücrelerinde IL-6 tarafından indüklenen Twist ekspresyonu, aynı A549 hücrelerinde olduğu gibi 8. ve 16. saatlerde maksimum seviyesine ulaşarak giderek azalmaya başladığı gözlendi (Şekil 4.5).

IL-6'nın SATB2, EMT'i yöneten transkripsiyon faktörleri ve kök hücre belirteçleri üzerine olan transkripsiyonel etkisini gösterebilmek için, her iki hücre hattını da transkripsiyonel etkinin görülebileceği en uygun saatler olan 4 ve 8 saat sürelerince IL-6 ile muamele ettik. Bu gruplardaki hedef genlerin ekspresyon değişimlerini GZ-PZR ile tespit ettik. Elde ettiğimiz sonuçlarda; A549 hücrelerinde IL-6 muamelesi ile *SATB2, CD44, Snail* ve *Zeb1* genlerinin ekspresyonlarının arttığını, *Twist* geninin ekspresyonunda anlamlı bir değişim olmadığını ve *Sox-2* geninin ekspresyonunun ise azaldığını tespit ettik (Şekil 4.6). Sonuçlarımız, bütün kanser türleri dahil olmak üzere IL-6'nın SATB2 mRNA seviyesini artırdığını gösteren literatüdeki ilk çalışmadır. IL-6 ile muamelesi sonucu CD44 mRNA seviyesinin artması, literatürde hiçbir adenokarsinoma hücrelerinde gösterilmiş bir sonuç değildir. Sadece kemik iliği kanser hücreleri üzerine gerçekleştirilen bir araştırmada, IL-6'nın CD44 ekspresyonunu transkripsiyonel düzeyde artırdığı gösterilmiştir (Vincent ve Mechti 2004). IL-6 ile muamelesi sonucu Snail mRNA seviyesinin artması, literatür ile uyumludur. IL-6 uygulanan hücrelerde Zeb1 mRNA seviyesinin artması, kolorektal cancer hücrelerinde gösterilmesine karşın, KHDAK hücrelerinde ilk kez gösterilmiştir (Rokavec vd 2014). Bu nedenle bulduğumuz bu sonuç literatür ile uyumludur.

IL-6 uygulaması sonucu Snail ve Zeb1 mRNA seviyesinin artması, Akt yolağının aktivasyonuna bağlı olarak NF-κB aktifleşerek bu transkripsiyon faktörlerin ekspresyonunu artırdığını düşünmekteyiz. Çünkü, *Snail ve Zeb1* genlerinin promotor bölgelerinde NF-κB bağlanma bölgeleri mevcuttur (Wels vd 2011, Yang vd 2013). Bu

hipotezimizi IL-6 uygulamasını NF-κB spesifik inhibitörü BAY 11-7082 varlığında gerçekleştirerek Snail ve Zeb1 mRNA seviyelerinin, IL-6'nın tek başına uygulandığı gruptaki Snail ve Zeb1 mRNA seviyelerinden daha az olduğunu göstererek kanıtlayabiliriz.

H1650 hücrelerinde ise IL-6 muamelesi ile *SATB2, CD44* ve *Zeb1* gen ekspresyonlarında anlamlı değişimler olmadığını, *Twist* geninin muamelenin ancak 8. saatinde azaldığını, A549 ile benzer şekilde *Snail* gen ekspresyonunun arttığını ve *Sox-2* gen ekspresyonunun azaldığını tespit ettik (Şekil 4.7). Bu sonuçlardan IL-6 uygulamasının A549 ve H1650 hücrelerinde farklı cevaplar verdiği görülmektedir.

Hücrelerin farklı cevaplar vermesinin; ya bu hücrelerin mutasyon profillerinin, ya köken aldıkları doku tipinin ya da evrelerinin farklılığından kaynaklanıyor olabileceği kanısındayız. Çünkü bu saymış olduğumuz durumların hepsi bu hücrelerde farklılık göstermektedir. 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 p.E746-A750del mutasyonu bulunmaktadır (Pallier vd 2012, Wu vd 2012). Bunlardan ziyade; IL-6 uygulaması sonucu A549 hücrelerinde Snail ve Zeb1 mRNA seviyelerindeki artışlar daha dramatik iken, H1650 hücrelerinde Snail mRNA seviyesinindeki artışın A549 hücrelerindeki nazaran daha az olması ve Zeb1 mRNA seviyesinde anlamlı bir artışın olmaması, IL-6 tarafından indüklenen NF-κB aktivasyonunun bu iki hücrede farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızın bundan sonraki kısmı, SATB2'nin siRNA ile susturulduğu hücrelerde EMT ve kök hücre belirteçlerinin ekspresyon değişimlerini ve IL-6'nın bu değişimler üzerine olabilecek etkilerini Western Blot analizi ile tespit etmek oldu. Yalnızca SATB2'nin susturulduğu hücrelerdeki, yalnızca 24 saat süresince IL-6 ile muamele edilen hücrelerdeki ve hem SATB2'nin susturulduğu hem de 24 saat süresince IL-6 ile muamele edilen hücrelerdeki EMT belirteçlerinin ekspresyon seviyelerini Western Blot ile tespit ettik.

A549 hücrelerinde tek başına SATB2'nin susturulması E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin protein seviyelerinde anlamlı bir değişime neden olmadığı gözlendi. Yalnızca IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde ilginç bir biçimde hem E-kaderin seviyesinin hem de N-kaderin seviyesinin arttığı, Vimentin seviyesinin ise değişmediği gözlendi (Şekil 4.14). Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde, tek başına IL-6 uygulanan gruba göre farklı bir etki görülmemiştir (Şekil

4.14). Bu durumun nedeni; IL-6'nın KHDAK hücrelerinde invazyonu EMT aracılığıyla değil, farklı mekanizmalarla artırması olabilir. EMT, invazyonu tetikleyici mekanizmalardan sadece biridir. EMT'nin dışında, kanser hücreleri hücre bağlantılarını kaybetmeyerek hücre grupları şeklinde de invazyon gerçekleştirebilmektedir. IL-6, KHDAK hücrelerinde invazyonu bu yolla artırıyor olabilir. Elde etmiş olduğumuz bu sonuçlar çelişkili görünse de, literatürdeki benzer çalışmaların sonuçları bu çelişkiyi yorumlamamızı kolaylaştıracaktır. Bu proje önerimizi verdiğimiz süre içerisinde IL-6'nın KHDAK hücrelerini EMT sürecine soktuğuna dair bir çalışma mevcut değildi. Yakın zamanda gerçekleştirilen iki farklı çalışma ile IL-6'nın KHDAK hücrelerini EMT sürecine soktuğu kanıtlanmıştır. Ancak, bu iki çalışmada da KHDAK hücrelerini EMT sürecine sokmak için, IL-6 ile hücreleri bir hafta muamele etmişlerdir (Chen vd 2014, Zhao vd 2014). Projemizin deneysel prosedürü, siRNA metoduna dayalıdır. siRNA'nın hedefi olan genin ifadesinin susturması maksimum 96 saat ile sınırlı olduğundan dolayı, SATB2'i susturup bir haftalık IL-6 uygulamasını gerçekleştiremedik.

Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da görüldüğü üzere A549 ve H1650 hücrelerini TGF-β ile uyardığımızda, uyarımın 24. saatinde bile hücrelerin EMT sürecine girdikleri gözükmektedir. Çok ilginçtir ki; her iki sitokin de A549 ve H1650 hücrelerinde EMT sürecini yöneten transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını artırmıştır. Ancak; hücreler TGF-β ile muamele edilen hücreler EMT sürecine girerken, IL-6 ile muamele edilen hücreler EMT sürecine girememektedir. Ancak bir haftalık IL-6 uygulamasıyla girebilmektedirler (Chen vd 2014, Zhao vd 2014). Bunun nedeni; EMT sürecini yöneten bu transkripsiyon faktörlerinin hedef genlerinin regülasyonlarını gerçekleştirmeleri için, SATB2'nin dışında başka bir kromatin yeniden modelleme proteinleri ve/veya HDACs (Histondeasetilaz) proteinlerinin aktifleşmelerine ve/veya inhibisyonlarının sağlanmasının gerekliliği olabilir.

H1650 hücrelerinde tek başına SATB2'nin susturulması E-kaderin, N-kaderin ve Vimentin protein seviyelerinde anlamlı bir değişime neden olmadığı gözlendi (Şekil 4.15). H1650 hücrelerinde tek başına IL-6 muamelesi ise E-kaderin seviyesinde bir değişim olmazken, hem N-kaderin hem de Vimentin seviyesi artmıştır (Şekil 4.15). Bu sonuçlar bize IL-6'nın 24 saat yerine daha uzun süreler ile muamele edilmesinin uygun olduğunu gösteriyor. KHDAK hücrelerinde IL-6 ile EMT'i indüklemeye çalışan araştırmalara bakıldığında, hücrelerin bir hafta süresince IL-6 ile muamele edilerek EMT sürecine girdikleri görülmektedir. Ancak bu bizim çalışmamız için uygun değildi. Çünkü siRNA transfeksiyonları maksimum 96 saat süresince uygulanabilmektedir.

Ancak H1650 hücrelerinde IL-6'nın tek başına verildiği gruptaki N-kaderin artışının, hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen hücrelerde gerçekleşmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.15). Bu veriden, H1650 hücrelerinde SATB2'nin IL-6 tarafından indüklenen N-kaderin artışı için gerekli olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu sonuç literatürde tüm kanser türleri dahil olmak üzere ilk kez elde edilmiştir.

SATB2'nin siRNA ile susturulduğu hücrelerde EMT'i yöneten transkripsiyon faktörleri üzerine olan etkilerini Western Blot analizi ile inceledik. Her iki hücre hattında da SATB2'nin susturulması sonucunda Slug ve Zeb1 protein seviyeleri artmıştır (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). Elde ettiğimiz bu sonuçlar ile Slug ve Zeb1 ekspresyonlarının düzenlenmesinde, SATB2 önemli bir yere sahip olduğu literatürde ilk kez gösterilmiştir. SATB2, bu iki transkripsiyon faktörü degredasyondan koruyor veya trankripsiyonlarını engelleyen başka bir faktörü inhibe ediyor olabilir. Bir diğer ihtimal, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir yere sahip olan HDAC proteinlerinin, SATB2 ile kompleks yaptığı bilinmektedir (Britanova vd 2008). Bazı HDAC proteinleri Slug ve Zeb1 genlerinin transkripsiyonlarını engelliyor olabilir ve bu görev için SATB2'nin gerekli olabilir. Bu nedenle SATB2'nin yokluğunda, HDAC proteinleri Slug ve Zeb1 genlerinin transkripsiyonlarını engellemekte yetersiz kalıyor olabilir.

SATB2'nin siRNA ile susturulduğu hücrelerde Snail protein seviyesi değişmemiştir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). Bu sonuçlara göre, KHDAK hücrelerinde Snail ekspresyonunun ve stabilitesinin kontrolünde SATB2'nin bir görevi bulunmamaktadır.

SATB2'nin siRNA ile susturulması; A549 hücrelerinde Twist protein seviyesi anlamlı bir değişime neden olmazken, H1650 hücrelerinde Twist protein seviyesini azalmıştır (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). Daha önce literatürde benzer bir çalışmanın olmaması bu sonucu açıklamamızı zorlaştırmaktadır. Ancak, iki hücrede ortaya çıkan farklı sonucun nedeni, daha önce değindiğimiz gibi bu hücreler arasındaki farklılık hücrelerin mutasyon profillerinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Tek başına IL-6 muamelesi her iki hücre dizisinde de Slug, Twist ve Zeb1 seviyelerini anlamlı bir şekilde artırmış, Snail seviyesi ise değişmemiştir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). IL-6 ile indüklenen Slug ekspresyonu artışı literatürde sadece kolorektal kanser hücrelerinde gösterilmiştir (Brighenti vd 2014). Bu nedenle IL-6 ile uyardığımız hücrelerde Slug ekspresyon artışı literatür ile uyumludur. IL-6'nın Twist ekpresyonunu artırdığını gösteren benzer çalışmalar bulunmaktadır (Na vd 2013). Bu bakımdan sonuçlarımız literatür ile uyumludur. IL-6 ile muamele edilerek Zeb1 ekspresyon artışını

Western Blot analizi ile gösteren benzer bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Sadece kolorektal kanser hücrelerinde IL-6 ile muamele edilen hücrelerde Zeb1 ekspresyonunun mRNA seviyesinde artırdığını gösteren bir çalışma mevcuttur (Rokavec vd 2014). IL-6'nın bu transkripsiyon faktörlerin ekspresyonunu hangi yolaklar aracılığıyla düzenlediğini, daha ileri çalışmalarda tespit edilecektir.

Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen A549 ve H1650 hücrelerinde yalnızca IL-6 ile muamele edilen hücrelere göre, Snail seviyesinin değişmediği, Slug seviyesinin daha da arttığı, Twist ve Zeb1 seviyelerindeki artışın iptal olduğu gözlendi (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). Bu sonuç literatürde tüm kanser türleri dahil olmak üzere ilk kez elde edilmiştir. Bu sonuçlardan IL-6'nın Twist ve Zeb1 ekspresyonunu indüklemek için SATB2'nin varlığına ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. Ancak ilginç biçimde; hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile uyarılan A549 ve H1650 hücrelerinde Slug ekspresyonunun, IL-6'nın tek başına uygulandığı ve tek başına SATB2'nin susturulduğu A549 ve H1650 hücrelerindeki Slug ekspresyonlarına nazaran daha da arttığı gözlendi (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17). Bu verilerden, IL-6 tarafından indüklenen Slug ekspresyonu için SATB2'nin, bir baskılayıcı olarak davrandığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Sadece SATB2'nin susturulduğu A549 ve H1650 hücrelerinde benzer şekilde Slug ekspresyonunun artması, bu hipotezimizi desteklemektedir. Bunun nedeninin, daha ileri deneysel prosedürlerle anlaşılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Elde etmiş olduğumuz sonuçlardan, SATB2'nin Snail ekspresyonu üzerine düzenleyici bir rolünün olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda daha sonra, SATB2'nin siRNA ile susturulduğu hücrelerde kök hücre belirteçlerinin ekspresyon değişimlerini ve IL-6'nın bu değişimler üzerine olabilecek etkilerini Western Blot analizi ile inceledik. Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de görüldüğü üzere; hem A549, hem de H1650 hücrelerinde SATB2'nin susturulması ile CD44 seviyesini artırması, SATB2 ekspresyonu ve KHDAK hücrelerinde kök hücre fenotipinin kazanılması arasında ters bir ilişki olduğu anlamına gelmektedir. Bir diğer kök hücre belirteci olan Sox-2, SATB2'nin susturulması ile A549 hücrelerinde ekspresyonu artarken H1650 hücrelerinde ekspresyonu azalmıştır (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). Bu sonuç bize, Sox-2 ekspresyonun A549 ve H1650 hücrelerinde farklı mekanizmalar ve yolaklar aracılığıyla düzenlendiğini ifade etmektedir. Bu hipotezi destekler biçimde; Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de görüldüğü üzere, tek başına IL-6'nın uygulanması A549 hücrelerinde Sox-2 ekspresyonunda anlamlı bir değişime neden olmazken, H1650 hücrelerinde Sox-2 ekspresyonunun anlamlı bir şekilde artmıştır. Demek ki, Sox-2

ekspresyonu A549 ve H1650 hücrelerinde farklı yolak ve mekanizmalar aracılığıyla düzenlenmektdir.

IL-6 uygulamasının, A549 hücrelerinde CD44 seviyesini artırdığı, H1650 hücrelerinde ise anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). Benzer şekilde CD44 ekspresyonu da, aynı Sox-2 ekspresyonu gibi bu iki hücre dizisinde farklı yolak ve mekanizmalar ile düzenlenmektedir.

Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen A549 ve H1650 hücrelerinde yalnızca IL-6 ile muamele edilen hücrelere göre Sox-2'nin seviyesi değişmemiştir (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). Tüm bu sonuçları birlikte ele aldığımızda; her iki hücre dizisinde de IL-6 ve SATB2, Sox-2 ekspresyonun düzenlenmesinde zıt görevlere sahip olabilir.

IL-6'nın SATB2, EMT'i yöneten transkripsiyon faktörleri ve kök hücre belirteçleri üzerine olan transkripsiyonel etkilerini GZ-PZR ile tespit ettik. Projemizin bundan sonraki ayağında ise, yalnıca SATB2'nin susturulmasının ve hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6'nın uygulandığı A549 ve H1650 hücrelerinde EMT'i yöneten transkripsiyon faktörleri ve kök hücre belirteçleri üzerine olan transkripsiyonel etkilerini GZ-PZR ile analiz ettik. Bu çalışma da literatürde bütün kanser türleri dahil olmak üzere ilk kez yapılmıştır.

Tek başına SATB2'nin susturulduğu A549 hücrelerinde EMT yönetici transkripsiyon faktörleri olan Snail ve Twist mRNA seviyesinde anlamlı bir değişim olmazken, Zeb1 mRNA seviyesi anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.18). Bu sonuçlar Western Blot analizi sonuçlarıyla uyuşmaktadır.

Tek başına IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde uygulamanın 4. ve 8. saatlerinde de SATB2, Snail ve Zeb1 mRNA seviyeleri anlamlı bir şekilde artarken, Twist mRNA seviyelerinde anlamlı değişim olmamıştır (Şekil 4.18). Bu sonuçları, Western Blot ile sonuçları ile birlikte yorumladığımızda, Snail ve Zeb1 ekspresyonlarının hem transkripsiyonel olarak hem de post-translasyonel olarak, Twist yalnızca post-translasyonel olarak IL-6 tarafından pozitif yönde düzenlendiği sonucuna varmaktayız. Bu varsayımı, IL-6 ile muamele edilen hücrelerde kısa süreli maruziyetlerde bile protein seviyesinin büyük oranda yükselmesinin post-translasyonel olarak düzenlendiğini gösteren çalışma sayesinde söyleyebiliyoruz (Su ve vd 2011).

Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde, uygulamanın 4. Saatinde Twist ve Zeb1 mRNA seviyelerinde, yalnızca IL-6 uygulanan gruptakine göre bir farklılık olmadığı gözlendi (Şekil 4.18). Buradan SATB2'nin IL-6 tarafından indüklenen Twist ve Zeb1 mRNA değişimi üzerine bir etkisinin olmadığı gözlendi. SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde, uygulamanın 8. saatinde Snail mRNA seviyesinin, yalnızca IL-6 uygulanan gruptaki Snail mRNA artışını daha da artırdığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.18). SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde, uygulamanın 8. Saatinde Twist ve Snail mRNA seviyelerinde, yalnızca IL-6 uygulanan gruptakine göre bir farklılık olmadığı gözlendi (Şekil 4.18). Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde, uygulamanın 8. saatinde Zeb1 mRNA seviyesinin, yalnızca IL-6 uygulanan gruptaki Zeb1 mRNA artışını daha da artırdığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.18). Bu sonuçlar Western Blot analizi sonuçları ile uyuşmamaktadır. Bunun nedeni, her iki analizde eş zamanların seçilmemesi olabilir.

Tek başına SATB2'nin susturulduğu A549 hücrelerindeki kök hücre belirteçleri olan CD44 ve Sox-2'nin mRNA seviyeleri anlamlı bir şekilde arttığı gözlendi (Şekil 4.22). Elde edilen bu veriler SATB2'nin tek başına Zeb1, CD44 ve Sox-2 mRNA seviyelerini negatif olarak düzenlediğini literatürde tüm kanser türleri dahil olmak üzere ilk defa göstermektedir. Bu sonuçlar Western Blot sonuçlarımızla da uyuşmaktadır. SATB2'nin; Zeb1, CD44 ve Sox-2 genlerinin transkripsiyonlarının baskılanması sürecinde gerekli bir protein olduğu sonucu çıkmaktadır.

Tek başına IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde uygulamanın 4. ve 8. saatlerinde, CD44 mRNA seviyesi artarken, Sox-2 mRNA seviyesi azalmıştır (Şekil 4.22). Bu sonuçları Western Blot sonuçları ile birlikte yorumladığımızda; IL-6'nın A549 hücrelerinde CD44 ekspresyonunu artırdığını hem GZ-PZR ile hem de Western Blot ile göstermiş olduk. Ancak IL-6 muamelesinin A549 hücrelerinde, Sox-2'nin ekspresyonunu GZ-PZR sonuçlarına göre azalttığı, Western Blot analizine göre ise ekspresyonunu değiştirmediği gösterilmiştir (Şekil 4.22). Buradan bir uyaranın ekspresyonunu değiştirdiği bazı genlerin, o genin mRNA seviyeleri ile protein seviyeleri arasında uyumsuzluk olabileceği bilinen bir durumdur (Li vd 2006).

Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen A549 hücrelerinde, uygulamanın 4. saatinde ne CD44 ne de Sox-2 mRNA seviyesinde, yalnızca IL-6 uygulanan gruptakine göre anlamlı bir değişim olmadığı gözlendi. Ancak 8. saatte CD44 mRNA seviyesinde, yalnızca IL-6 uygulanan gruptakine göre daha fazla bir artış olduğu gözlendi (Şekil 4.22). Böylelikle; SATB2'nin, CD44'ün hem mRNA hem de

protein düzeyinde negatif düzenleyicisi olduğunu ilk kez tüm kanser türleri dahil olmak üzere gösterilmiştir.

Tek başına SATB2'nin susturulduğu H1650 hücrelerinde EMT yönetici transkripsiyon faktörlerinden Snail ve Twist mRNA seviyelerinde anlamlı bir değişim gözükmezken, A549 hücrelerinde olduğu gibi Zeb1 mRNA seviyesinde anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19). Bu sonuçları Western Blot sonuçlarıyla birlikte yorumladığımızda, SATB2'nin her iki hücre dizisinde de Zeb1'in hem mRNA seviyesinde hem de protein seviyesinde negatif düzenleyicisi olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bilgi, literatür için yeni bir bilgidir.

Tek başına IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde uygulamanın 4. saatinde EMT yürütücü transkripsiyon faktörlerinin mRNA seviyelerinde anlamlı bir değişime neden olmazken, uygulamanın 8. saatinde ise Twist mRNA seviyesinin azaldığı, Snail ve Zeb1 mRNA seviyelerinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.19). Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde, uygulamanın 4. saatinde Snail ve Twist mRNA seviyelerinde yalnızca IL-6 uygulanan gruptakine göre bir farklılık olmadığı gözlenmezken, Zeb1 mRNA seviyesinin yalnızca IL-6 uygulanan gruptakine göre arttığı görülmüştür (Şekil 4.19). Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde, uygulamanın 8. saatinde Snail mRNA seviyesinde yalnızca IL-6 uygulanan gruptakine göre bir farklılık olmadığı gözlendi (Şekil 4.19). Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde, uygulamanın 8. saatinde Twist mRNA seviyesi, yalnızca IL-6 uygulanan gruptaki azalan seviyesine karşın bu azalmanın olmadığı gözlendi (Şekil 4.19). Bu sonuçlardan; H1650 hücrelerinin IL-6 uyarımına A549 hücrelerinden daha iyi yanıt verdiği ortaya çıkmaktadır. Bu farklılık A549 hücrelerinin H1650 hücrelerinde daha fazla IL-6 reseptörü eksprese ediyor olmasından kaynaklanıyor olabilir. A549 hücrelerinde olduğu gibi, H1650 hücrelerinde de SATB2'nin susturulması IL-6'nın Zeb1 ekspresyonunu mRNA seviyesinde artırıdığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Ancak bu durum Western Blot analizi sonuçlarıyla uyuşmamaktadır.

Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde, uygulamanın 8. saatinde Zeb1 mRNA seviyesinin aynı 4. saatte olduğu gibi yalnızca IL-6 uygulanan gruptakine göre daha fazla artırdığı gözlendi (Şekil 4.19). Bu sonuçlardan, her iki hücre hattında da SATB2'nin, Zeb1 transkripsiyonunun negatif düzenleyicisi olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu bilgi, literatür için yeni bir bilgidir.

Tek başına SATB2'nin susturulduğu H1650 hücrelerindeki kök hücre belirteçleri olan CD44 ve Sox-2'nin mRNA seviyeleri anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.23). CD44 mRNA seviyesinin azalması Western Blot sonuçları ile çelişirken, Sox-2 mRNA seviyesinin azalması Western Blot sonuçları ile örtüşmektedir. Bu nedenle A549 hücrelerinin aksine, H1650 hücrelerinde SATB2, Sox-2 ekspresyonu için gereklidir sonucuna varmaktayız. Bu farklılığın nedeni hücrelerin köken aldıkları doku veya mutasyon profillerinin farklılığı olabilir. Tek başına IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde uygulamanın 4. ve 8. saatlerinde, CD44 mRNA seviyesinde anlamlı bir değişim olmadığı ve Sox-2 mRNA seviyesinin ise zamanla azaldığı gözlendi (Şekil 4.23). Bu sonuçları Western Blot sonuçları ile beraber yorumladığımızda, IL-6'nın H1650 hücrelerinde CD44 ekspresyonunu hem mRNA hem de protein düzeyinde etkilemediği sonucu ortaya çıkmaktadır. IL-6'nın H1650 hücrelerinde Sox-2 ekspresyonunu ise mRNA düzeyinde azalttığı, ancak protein düzeyinde artırdığı sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.23). Bu çelişkili sonucu açıklamak için, daha önce de değindiğimiz gibi, bir uyaranın ekspresyonunu değiştirdiği bazı genlerin, o genin mRNA seviyeleri ile protein seviyeleri arasında uyumsuzluk olabileceği bilinen bir durum olduğu gerçeğine sığınmaktayız. Hem SATB2'nin susturulduğu hem de IL-6 ile muamele edilen H1650 hücrelerinde, uygulamanın 4. ve 8. saatlerinde ne CD44 ne de Sox-2 mRNA seviyesinde, yalnızca IL-6 uygulanan gruptakine göre anlamlı bir değişim olmadığı gözlendi (Şekil 4.23).

Özellikle SATB2'nin susturulduğu grup A549 hücrelerin mezenkimal forma geçmesinin EMT süreciyle çok ilişkili olmadığını gördük. Ancak bu değişim neden gerçekleşmişti? Bunun nedenini araştırırken hücre iskeleti ve hücre migrasyonunda önemli rollere sahip proteinlere odaklandık. Laboratuvarımızda mevcut bulunan hücre hareketinde önemli bir belirteç olan FAK proteinin ekspresyon seviyelerini inceledik. Elde ettiğimiz sonuçlar çarpıcıydı. A549 hücrelerinde, IL-6 muamelesi FAK ekspresyonunu çok az artırırken, SATB2'nin susturulduğu hücrelerde dramatik FAK ekspresyon artışını gözlemledik (Şekil 4.24). H1650 hücrelerinde ise A549 hücrelerinin tam tersi olarak IL-6 uygulanan gruplarda dramatik FAK artışının olduğu, SATB2'nin susturulmasının çok az artırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.24). A549 ve H1650 hücrelerinde IL-6 uygulamasının ve SATB2'nin susturulmasının bu hücrelerin FAK ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin çarpıcı farklılığı, bize bu iki hücrenin birbirinden ne kadar farklı olduğunu göstermektedir. Ayrıca; SATB2 ve FAK ekspresyonları arasında bulunan bu sonuçlar literatürde KHDAK hücrelerinde ilk kez elde edilmiştir. A549 hücrelerinde gördüğümüz SATB2'nin susturulduğu gruplardaki FAK ekspresyonunun dramatik artışı, literatür ile uyumludur (Seong vd 2014).

IL-6'nın KHDAK hücrelerinde 24 saat süresince uygulanmasının hücreleri tam olarak EMT sürecine sokamadığı sonuçlarımızla gösterilmiştir. Çalışmamızda hipotez ettiğimiz üzere SATB2'nin KHDAK hücrelerinin EMT sürecinde düzenleyici bir rol oynadığını öngörmüştük. Her ne kadar sonuçlarımızda A549 ve H1650 hücrelerinde IL-6 tarafından önemli EMT belirteci olan N-kaderinin arttığı gözlense de, E-kaderin ekspresyonunda azalma olmaması hücrelerin tam olarak EMT sürecine giremedikleri sonucuna vardık (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).

Ayrıca her iki hücre dizimizde de yaptığımız çalışmalarda SATB2'nin susturulması EMT'i indükleyici Slug, Twist ve Zeb1 gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarının artmasına rağmen, hücrelerde E-kaderin/N-kaderin değişiminin gerçekleşmemesi ilginç bir sonuç olmuştur. Bu sonuçlardan SATB2'nin EMT için kritik bir rolü olduğu ancak bunun SATB2'nin ekspresyonu ile ilgili olmayıp, ya fosfatlanması ya da sumolasyon gibi protein aktivasyonu veya inhibisyonu ile ilişkili olabileceği kanısına vardık. Belki de bu transkripsiyon faktörler, E-kaderinin transkripsiyonel olarak baskılayabilmek için SATB2'nin varlığına ve/veya aktivasyonu ihtiyaç duyuyor olabilirler. SATB2'nin çeşitli HDAC proteinleri ile etkileşimlerinin olduğu ve HDAC proteinlerinin E-kaderin ekspresyonunun baskılanması için gerekli olduğunu gösteren çalışmaların varlığı, bizi SATB2'nin de E-kaderin ekspresyonunun baskılanması işine karıştığını düşünmekteyiz (Kim vd 2011, Yiv d 2012). Bu hipotezimizin kanıtlanması, daha ileri çalışmalara ihtiyaç duymaktadır.

Bu nedenle, proje hücrelerimizi önemli EMT indükleyicisi olan TGF-β ile muamele ettiğimizde EMT sürecine olan etkisini ve bu süreçte SATB2'nin durumunu araştırdık. Bu nedenle hücreleri, önemli bir EMT indükleyicisi olan TGF-β ile muamele ettik. Literatürle uyumlu olarak her iki hücre dizisi de EMT sürecine girdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26). İlginç olarak her iki hücre dizisi de EMT sürecinde azalan SATB2 seviyelerini gözlemledik (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26). Elde ettiğimiz bu sonuçlarla IL-6 kısa süreli muamelelerle KHDAK hücrelerini EMT sürecine sokmakta başarısız olmasının yanı sıra SATB2 ekspresyonunu da artırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). TGF-β ise kısa süreli muamelelerinde KHDAK hücrelerini EMT sürecine sokmasının yanı sıra SATB2 ekspresyonunu da azalttığını gösterdik (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26). Elde etmiş olduğumuz bu veriler literatürde tüm kanser türleri dahil olmak üzere ilk kez elde edilmiştir.

Çalışmamızın bundan sonraki kısmında IL-6 uygulamasının, TGF-β uygulamasının, SATB2'nin susturulmasının ve SATB2'nin susturulduğu hücrelere IL-6 ve TGF-β uygulamasının hücre invazyonuna etkisini araştırdık. Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de

görüldüğü üzere; IL-6 ve TGF-β muamelesi her iki hücre dizisinde de hücre invazyonunu literatür ile uyumlu olarak artırdığı gözlemlenmiştir (Liu vd 2014, Zhao vd 2014).

Daha önce hiçbir kanser türünde SATB2'nin siRNA ile direkt susturulmasının hücre invazyonu üzerine etkisi araştırılmamıştı. Literatürde ilk kez yapmış olduğumuz bu deneyle SATB2'nin susturulması A549 hücrelerinde invazyonu arttığını gösterdik (Şekil 4.27). Ancak SATB2'nin tek başına susturulması H1650 hücrelerinde invazyonu artırmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (Şekil 4.28).

SATB2'nin susturulduğu hücrelerde IL-6 muamelesinin hücre invazyonunda etkisi ise yalnızca IL-6 ile muamele edilen hücrelere nazaran azalan invazyon yeteneği ile karşılaştık (Şekil 4.27 ve Şekil 4.28). Bu sonuçlardan IL-6 ile artan hücre invazyonunda SATB2'nin pozitif düzenleyici olduğu, tüm kanser türleri dahil olmak üzere ilk kez gösterilmiştir. Western Blot sonuçları da bu veriyi desteklemektedir. Çünkü her iki hücre hattında da hem EMT için hem de invazyon için önemli transkripsiyon faktörleri olan Twist ve Zeb1 seviyesi IL-6 verilen grup hücrelerde artarken, SATB2'nin susturulduğu ve IL-6 ile muamele edilen hücrelerde ise bu artışın anlamlı şekilde azaldığı gözlendi (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).

İlginç olarak, SATB2'nin susturulduğu hücrelere TGF-β ile muamele edilmesinin, yalnızca TGF-β ile muamele edilen gruba göre hücre invazyonunu daha artırıdığı gözlendi (Şekil 4.27 ve Şekil 4.28). Elde etmiş olduğumuz bu veriler literatürde tüm kanser türleri dahil olmak üzere ilk kez elde edilmiştir. Bunun için şu yorumu yapabiliriz. IL-6'nın hücre invazyonunda artırmada SATB2'nin ekspresyonuna bağlı olduğunu, TGF-β'nın hücre invazyonunu artırmada, SATB2'nin engelleyici bir rolü olduğu görülmektedir. Bunun içindir ki; TGF-β zamana bağlı olarak SATB2'nin ekspresyonunu azaltmaktadır.

Sonuç olarak; Western Blot analizi ve invazyon deneyi sonuçlarını birlikte değerlendirdiğimizde, IL-6 tarafından indüklenen invazyonda Twist ve Zeb1 ekspresyon artışının belirleyici olduğu ve SATB2 ekspresyonun da Twist ve Zeb1 ekspresyonu için gerekli olduğu ortaya çıkmaktadır. Her iki hücre dizisinde de SATB2'nin susturulması Slug ve Zeb1 ekspresyonunu artırmıştır. Bu sonuçlardan, SATB2'nin Slug ve Zeb1 ekspresyonu için baskılayıcı bir faktör olarak davrandığı ortaya çıkmaktadır. SATB2'nin kanser kök hücre fenotipinin kazanılmasındaki rolüne gelince; A549 ve H1650 hücrelerinde SATB2'nin susturulması CD44 ekspresyonunu artırarak, kanser kök hücre fenotipinin kazanılmasında da bir baskılayıcı olarak görev yaptığı sonucu ortaya

çıkmaktadır. Ayrıca SATB2'nin susturulması, A549 hücrelerinde kanser kök hücre belirteci olan Sox-2 ekspresyonunu da artırması bu çıkarımımızı desteklemektedir. Çalışmamızda, hücre migrasyonu ve invazyonu için kritik olan FAK ekspresyonunun, SATB2'nin susturulduğu hücrelerde arttığı tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlardan, SATB2'nin, EMT, kanser kök hücre oluşumu, hücre migrasyonu ve invazyonu gibi kanser progresyonundaki kritik süreçlerde rol alan onkogenler üzerinde düzenleyici bir role sahip olduğu tespit edilmiştir. SATB2'nin, kanser progresyonunda kritik öneme sahip olan IL-6 ve TGF-β sitokinleri tarafından farklı şekilde düzenlendiklerini göstermiş olmamız literatür için yeni bir bulgudur. İnvazyon deneylerimizin sonuçları ortaya koymuştur ki; IL-6 tarafından indüklenen hücre invazyonu artışında, SATB2 gereklidir. Bu çıkarımımızı, IL-6'nın SATB2 ekspresyonunu artırması desteklemektedir. Diğer taraftan, TGF-β tarafından indüklenen hücre invazyonundaki artış için SATB2 bir baskılayıcı olarak görev yapmaktadır. Bu çıkarımımız, TGF-β'nın SATB2 ekspresyonunu baskılaması ile desteklenmektedir. Özetle; SATB2'nin KHDAK EMT'sinde, kanser kök hücre oluşumlarında, hücre migrasyonu ve invazyonları gibi kanser progresyonundaki kritik süreçlerde düzenleyici rollere sahip olduğu, çalışmamız ile gösterilmiştir. Elde etmiş olduğumuz bu bulgular, KHDAK EMT'sinde, kanser kök hücre oluşumlarında, hücre migrasyonu ve invazyonu süreçlerinin anlaşılması için literatüre katkı sağlaması açısından önemlidir.

6. SONUÇ

Yapmış olduğumuz bu proje, birçok yönden tüm kanser türleri dahil olmak üzere literatürde daha önce araştırılmamış ve aydınlatılmamış konuları ele alarak bilim dünyasına katkıda bulunmayı amaçlamıştır.

Deneysel süreçte ilk olarak, projemizin kilit noktası olarak seçilen SATB2 proteininin çeşitli kanser hücrelerindeki ekspresyon seviyeleri Western Blot analizi ile gösterilmiştir.

IL-6 uygulaması sonucu proje hücrelerimizdeki STAT3 ve AKT yolaklarının zamana bağlı aktivasyonları, bu proteinlerin aktif formları olan p-STAT3 ve p-AKT protein seviyeleri Western Blot analizi ile gösterilmiştir.

Ardından IL-6 muamelesi sonucu proje hücrelerimizdeki EMT'i yöneten transkripsiyon faktörleri olan Snail, Slug, Twist ve Zeb1 proteinlerinin zamana bağlı ekspresyon seviyeleri Western Blot analizi ile tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda, IL-6'nın her iki hücre dizisinde de bu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlardan literatürde olmayan bir sonuç olarak, IL-6'nın A549 hücrelerinde 1. saatten itibaren Zeb1 ekspresyonunu dramatik bir şekilde artırdığı gösterilmiştir. Bu şekilde gerçekleşen benzer artışları post-translasyonel olarak düzenlendiği bilinmektedir. Literatürde ilk kez elde edilen bu sonuç; IL-6'nın Zeb1 ekspresyonunu post-translasyonel olarak düzenlendiğini göstermiştir. Ancak bunun hangi mekanizlar ile gerçekleştiği daha ileri deneysel süreçlere ihtiyaç duymaktadır.

IL-6 muamelesinin *SATB2, CD44, Sox-2, Snail, Twist ve Zeb1* genlerinin mRNA seviyeleri üzerine olan etkileri incelendi. Elde ettiğimiz sonuçlarda literatürde tüm kanser hücreleri dahil olmak üzere ilk kez, IL-6'nın SATB2 mRNA seviyesini artırdığı gösterilmiştir.

SATB2'nin siRNA yöntemi ile susturulmasının proje hücrelerimizdeki morfolojik değişimleri incelendi. A549 hücrelerinde SATB2'nin susturulmasıyla mezenkimal bir morfolojiye dönüşümün varlığı belirgin şekilde gözlenirken, H1650 hücrelerinde bu

dönüşümün gerçekleşmediği gözlendi. İnvazyon deneylerimiz de bu durumu anlamlı kılmıştır. Çünkü yalnızca SATB2'nin susturulduğu A549 ve H1650 hücrelerinde invazyon kapasiteleri sonucunda, A549 hücrelerinin invazyon kapasitelerinin anlamlı bir şekilde artırdığı, H1650 hücrelerinin invazyon kapasiteleri üzerinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir.

Çalışmamızda IL-6 muamelesinin, SATB2'nin susturulmasının ve her ikisinin birden uygulanması sonucu EMT belirteçlerinin ekspresyonlarındaki değişimleri Western Blot analizi ile tespit ettik. Elde ettiğimiz sonuçlarda, H1650 hücrelerinde IL-6 uygulaması N-kaderin seviyesini artırırken, SATB2'nin susturulduğu H1650 hücrelerinde bu N-kaderin seviyesindeki artışın gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç, literatürde hiçbir kanser türünde araştırılmamıştır ve ilk kez projemizle aydınlatılmıştır. Çalışmamızda IL-6 muamelesinin, SATB2'nin susturulmasının ve her ikisinin birden uygulanması sonucu EMT'i yöneten transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarındaki değişimleri Western Blot analizi ile tespit ettik. Elde ettiğimiz sonuçlarda, SATB2'nin Slug ve Zeb1 proteininin negatif düzenleyicisi olduğu, IL-6 tarafından indüklenen Twist ekspresyonu için ise pozitif düzenleyici olduğu tüm kanser türleri dahil ilk kez gösterilmiştir.

Çalışmamızda IL-6 muamelesinin, SATB2'nin susturulmasının ve her ikisinin birden uygulanması sonucu kök hücre belirteçlerinin ekspresyonlarındaki değişimleri Western Blot analizi ile tespit ettik. Elde ettiğimiz sonuçlarda, SATB2'nin her iki hücre dizisinde de CD44 üzerinde negatif düzenleyici olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç, KHDAK hücrelerinde ilk kez elde edilmiş bir sonuçtur. Ayrıca SATB2'nin susturulmasının, IL-6 tarafından indüklenen CD44 ekspresyonunu daha da artırdığı gözlendi. Bu sonuç hiçbir kanser türünde gösterilmemiş bir bilgidir. SATB2'nin susturulduğu A549 hücrelerinde Sox-2 protein ve mRNA seviyesinin arttığı bütün kanser türleri dahil olmak üzere ilk kez gösterilmiştir.

Çalışmamızda SATB2'nin nerdeyse bütün EMT'i yöneten transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları üzerinde anlamlı etkilerinin olmasına karşın, tam olarak E-kaderin/N-kaderin değişimi üzerine etkili olamadığı gözlendi. Çünkü bu E-kaderin/N-kaderin değişimini gerçekleştiren EMT'i yöneten transkripsiyon faktörelerinin, bu işlevlerini gerçekleştirebilmeleri için HDAC proteinleriyle etkileşime girmeleri gerekmektedir. İlginç olarak SATB2'nin E-kaderin/N-kaderin değişimine karışan HDAC proteinleriyle etkileştikleri son güncel araştırmalarla gösterilmiştir. Bizim yorumumuz; SATB2'nin de E-kaderin/N-kaderin değişimine ekspresyonu ile değil de, aktivasyonu veya inhibisyonu ile iştirak edebileceği yönündedir.

Çalışmamızda ayrıca SATB2'nin susturulduğu hücre gruplarındaki hücre invazyonu ile yakından ilişkili olan FAK proteininin ekspresyonunu inceledik. Hücre morfolojilerindeki ve invazyon sonuçlarıyla tutarlı bir şekilde, A549 hücrelerinde SATB2'nin susturulması ile dramatik FAK ekspresyon artışı gözlenirken, H1650 hücrelerinde bu artış gözlenmemiştir. İlginç biçimde A549 hücrelerine nazaran IL-6 uygulaması sonucu invazyon yeteneği daha belirgin şekilde artan H1650 hücrelerinde, bu durumu destekler biçimde tek başına IL-6 uygulanan H1650 hücrelerinde FAK ekspresyonu artışı gözlendi. Bu elde edilen sonuçlar KHDAK hücrelerinde ilk kez edinilmiştir.

Araştırmamızda ayrıca önemli bir EMT indükleyicisi olan TGF-β'nın bu hücrelerin EMT sürecine girdiklerini ve bu süreçteki SATB2 ekspresyonunu araştırdık. Elde ettiğimiz sonuçlarda, TGF-β uygulaması sonucu hücrelerin EMT sürecine girdikleri ve ilginç bir biçimde SATB2 ekspresyonunun da azaldığını gösterdik. Bu bilgiler, tüm kanser türleri dahil olmak üzere ilk kez elde edilmiştir.

Projemizin invazyon deneyi sonuçlarında, SATB2'nin susturulduğu A549 hücrelerinde invazyon kapasitesinin arttığı gözlendi. IL-6 uygulaması her iki hücre dizisinde de invazyon kapasitelerini artırdığı gözlendi. Ancak SATB2'nin susturulması IL-6 tarafından indüklenen invazyonu azaltmıştır. Bu sonuç SATB2'nin susturulması IL-6 tarafından indüklenen Twist ekspresyonunu azaltmasıyla uyuşmaktadır. TGF-β uygulaması her iki hücre hattında da, hücrelerin invazyon yeteneklerini dramatik şekilde artırmıştır. İlginç olan SATB2'nin susturulduğu hücrelerde TGF-β'nın uygulanması hücrelerin invazyon kapasitelerini daha da artırmıştır. Elde ettiğimiz bu sonuçlar bütün kanser türleri dahil olmak üzere ilk kez gösterilmektedir. Western Blot sonuçları da bu bulguyu desteklemektedir. Çünkü TGF-β ile muamele edilen hücrelerde hücrelerin EMT sürecine girmeleriyle paralel şekilde SATB2 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir.

Tüm bu sonuçlardan SATB2'nin IL-6 tarafından indüklenen Twist ekspresyonu ve invazyon artışı için gerekli olduğu, ancak TGF-β tarafından indüklenen EMT sürecine girme ve invazyon artışı konusunda negatif bir düzenleyici olduğu yapmış olduğumuz bu proje ile tüm kanser türleri dahil olmak üzere ilk kez gösterilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, kanser progresyonunda önemli yere sahip olan IL-6 ve TGF-β'nın EMT sürecindeki, kök hücre fenotipinin kazanılmasında ve invazyon artışında hücrede hangi yolaklar üzerinden bu etkilerini gösterdiğine dair bilim dünyasına katkıda bulunacağına inanmaktayız.

7. KAYNAKLAR

Alfano CM, Klesges RC, Murray DM, Bowen DJ, McTiernan A, Vander Weg MW, Robinson LA, Cartmel B, Thornquist MD, Barnett M, Goodman GE, and Omenn GS. Physical activity in relation to all-site and lung cancer incidence and mortality in current and former smokers. ***Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*** 2004;13(12): 2233-2241.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: Prospective identifi cation of tumorigenic breast cancer cells. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 2003; 100:3983-3988.

Ao M, Franco OE, Park D, Raman D, Williams K, Hayward SW. Cross-talk between Paracrine-Acting Cytokine and Chemokine Pathways Promotes Malignancy in Benign Human Prostatic Epithelium. ***Cancer Res*** 2007;67:4244-4253.

Avalle L, G, Regis Poli V. "Universal and Specific Functions of STAT3 in Solid Tumours", Jak–Stat Signaling: From Basics to Disease, Decker, T., Muller, M. (Eds.), ***Springer***, 2012, Vienna, pp. 305–333.

Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, de Andrade M, Wiest JS, Fain P, Schwartz AG, You M, Franklin W, Klein C, Gazdar A, Rothschild H, Mandal D, Coons T, Slusser J, Lee J, Gaba C, Kupert E, Perez A, Zhou X, Zeng D, Liu Q, Zhang Q, Seminara D, Minna J, and Anderson MW. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6p23-25. ***Am J Human Genet*** 2004;75(3):460-474.

Berx G, Raspe E, Christofori G, Thiery JP, Sleeman JP. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. ***Clin Exp Metastasis*** 2007;24:587–97.

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. ***Nature*** 2004;432:332–7.

Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. ***Nat Rev Cancer*** 2001;1:46–54.

Boffetta P. Epidemiology of environmental and occupational cancer. ***Oncogene*** 2004;23(38): 6392-6403.

Boffetta P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. ***Mutat Res*** 2006;608(2): 157-162.

Bonnet D, Dick JE: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. ***Nat Med*** 1997; 3:730-737.

Brabletz T, Jung A, Hermann K, Gunther K, Hohenberger W, Kirchner T. Nuclear overexpression of the oncoprotein beta-catenin in colorectal cancer is localized predominantly at the invasion front. ***Pathol Res Pract*** 1998;194(10):701–4.

Brighenti E, Calabrese C, Liguori G, Giannone FA, Trerè D, Montanaro L, Derenzini M. Interleukin 6 downregulates p53 expression and activity by stimulating ribosome biogenesis: a new pathway connecting inflammation to cancer. ***Oncogene*** 2014 ;33(35):4396-406.

Britanova O, Akopov S, Lukyanov S, Gruss P, Tarabykin V. Novel transcription factor Satb2 interacts with matrix attachment region DNAelements in a tissue-specific manner and demonstrates cell-type-dependent expression in the developing Mouse. ***Eur J Neurosci*** 2005;21(3):658-68.

Britanova O, de Juan Romero C, Cheung A, Kwan KY, Schwark M, Gyorgy A, Vogel T, Akopov S, Mitkovski M, Agoston D, Sestan N, Molnár Z, Tarabykin V. Satb2 is a postmitotic determinant for upper-layer neuron specification in the neocortex. ***Neuron*** 2008;57(3):378-92.

Brown KE. Chromatin folding and gene expression: new tools to reveal the spatial organization of genes. ***Chromosome Res*** 2003; 11(5):423-433.

Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED: Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. ***Cells Tissues Organs*** 2007; 185: 7–19.

Chang Q, Bournazou E, Sansone P, Berishaj M, Gao SP, Daly L, Wels J, Theilen T, Granitto S, Zhang X, Cotari J, Alpaugh ML, de Stanchina E, Manova K, Li M, Bonafe M, Ceccarelli C, Taffurelli M, Santini D, Altan-Bonnet G, Kaplan R, Norton L, Nishimoto N, Huszar D, Lyden D, Bromberg J. The IL-6/JAK/Stat3 Feed-Forward Loop Drives Tumorigenesis and Metastasis. ***Neoplasia*** 2013;15(7):848-62.

Chen W, Gao Q, Han S, Pan F, Fan W. The CCL2/CCR2 axis enhances IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition by cooperatively activating STAT3-Twist signaling. ***Tumour Biol*** 2014 Oct 16.

Cheng GZ, Zhang WZ, Sun M, Wang Q, Coppola D, Mansour M, Xu LM, Costanzo C, Cheng JQ, Wang LH. Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function. ***J Biol Chem*** 2008;283(21):14665-73.

Chiou SH, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, Chang HT, Chen YS, Lin TW, Hsu HS, Wu CW. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. ***Cancer Res*** 2010;70(24):10433-44.

Christofori G. New signals from the invasive front. ***Nature*** 2006;441:444–50.

Colomiere M, Ward AC, Riley C, Trenerry MK, Cameron-Smith D, Findlay J, Ackland L, Ahmed N. Cross talk of signals between EGFR and IL-6R through JAK2/STAT3 mediate epithelial–mesenchymal transition in ovarian carcinomas. ***Br J Cancer*** 2009;100(1):134-44.

D'Amato NC, Ostrander JH, Bowie ML, Sistrunk C, Borowsky A, Cardiff RD, Bell K, Young LJ, Simin K, Bachelder RE, Delrow J, Dawson A, Yee LD, Mrózek K, Clay TM, Osada T, Seewaldt VL. Evidence for phenotypic plasticity in aggressive triple-negative breast cancer: human biology is recapitulated by a novel model system. ***PLoS One*** 2012;7(9):e45684.

de Herreros AG, Peiró S, Nassour M, Savagner P. Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. ***J Mammary Gland Biol Neoplasia*** 2010;15(2):135-47.

de Laat W, Grosveld F: Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub. ***Chromosome Res*** 2003, 11(5):447-459.

Dickinson LA, Joh T, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T. A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. ***Cell*** 1992;70(4):631-45.

Du W, Hong J, Wang YC, Zhang YJ, Wang P, Su WY, Lin YW, Lu R, Zou WP, Xiong H, Fang JY. Inhibition of JAK2/STAT3 signalling induces colorectal cancer cell apoptosis via mitochondrial pathway. ***J Cell Mol Med*** 2012;16(8):1878-88.

Dobreva G, Dambacher J, Grosschedl R. SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression. ***Genes Dev*** 2003;17(24):3048-61.

Dobreva G, Chahrour M, Dautzenberg M, Chirivella L, Kanzler B, Fariñas I, Karsenty G, Grosschedl R. SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation. ***Cell*** 2006;125(5):971-86.

Edme,N. Ras induces NBT-II epithelial cell scattering through the coordinate activities of Rac and MAPK pathways. ***J Cell Sci*** 2002;115(Pt 12):2591-601.

Freiman RN, Tjian R: Regulating the regulators: Lysine modifications make their mark. ***Cell*** 2003, 112(1):11-17.

Freudenheim JL, Ritz J, Smith-Warner SA, Albanes D, Bandera EV, van den Brandt PA, Colditz G, Fescanich D, Goldbohm RA, Harnack L, Miller AB, Rimm E, Rohan TE, Sellers TA, Virtamo J, Willett WC, and Hunter DJ. Alcohol consumption and risk of lung cancer: a pooled analysis of cohort studies. ***Am J Clin Nutr*** 2005; 82(3): 657-667.

Fry CJ, Peterson CL: Chromatin remodeling enzymes: who's on first?'. ***Curr Biol*** 2001, 11(5):R185-R197.

Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M, Nam S, Eweis I, Diaz N, Sullivan D, Yoder S, Enkemann S, Eschrich S, Lee JH, Beam CA, Cheng J, Minton S, Muro-Cacho CA, Jove R. Persistent activation of stat3 signaling induce survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. ***Clin Cancer Res*** 2006;12(1):11-9.

Gyorgy AB, Szemes M, de Juan Romero C, Tarabykin V, Agoston DV. SATB2 interacts with chromatin-remodeling molecules in differentiating cortical neurons. ***Eur J Neurosci*** 2008;27(4):865-73.

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

Haraguchi M, Okubo T, Miyashita Y, Miyamoto Y, Hayashi M, Crotti TN, McHugh KP, Ozawa M: Snail regulates cell-matrix adhesion by regulation of the expression of integrins and basement membrane proteins. ***J Biol Chem*** 2008; 283: 23514–23523.

Hay, E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. ***Acta Anat. (Basel)*** 1995;154(1):8-20.

Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6- type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. ***Biochem J*** 1998, 334(Pt 2), 297–314.

Ho L, Crabtree GR. Chromatin remodelling during development. ***Nature*** 2010;463(7280):474-84.

Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. ***Eur J Cancer*** 2005;41(16):2502-12.

Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. ***Cancer*** 2007;110(9):1911-28.

Hsieh FC, Cheng G, Lin J. Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer. ***Biochem Biophys Res Commun*** 2005;335(2):292-9.

Hsu HS, Lin JH, Hsu TW, Su K, Wang CW, Yang KY, Chiou SH, Hung SC. Mesenchymal stem cells enhance lung cancer initiation through activation of IL-6/JAK2/STAT3 pathway. ***Lung Cancer*** 2012;75(2):167-77.

Hwang SJ, Cheng LS, Lozano G, Amos CI, Gu X, and Strong LC. Lung cancer risk in germline p53 mutation carriers: association between an inherited cancer predisposition, cigarette smoking, and cancer risk. ***Hum Genet*** 2003;113(3): 238-243.

Jechlinger M, Grunert S, Tamir IH, Janda E, Lüdemann S, Waerner T, Seither P, Weith A, Beug H, Kraut N. Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. ***Oncogene*** 2003;22:7155–69.

Jenndahl LE, Isakson P, Baeckström D. c-erbB2-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is suppressed by cell-cell contact and initiated prior to E-cadherin downregulation. ***Int J Oncol*** 2005;27(2):439-48.

Kalluri R: EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. ***J Clin Invest*** 2009; 119: 1417–1419.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. ***J Clin Invest***. 2009;119:1420-8.

Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. ***Rev Physiol Biochem Pharmacol*** 2003; 149, 1–38.

Karamouzis MV., Konstantinopoulos PA., Papavassiliou AG. The role of STATs in lung carcinogenesis: an emerging target for novel therapeutics. ***J Mol Med*** 2007 85:427–436.

Karlıkaya, C. (2005) Akciğer Kanseri Ders Notları.

Kim NH, Kim SN, Kim YK. Involvement of HDAC1 in E-cadherin expression in prostate cancer cells; its implication for cell motility and invasion. ***Biochem Biophys Res Commun*** 2011;404(4):915-21.

Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine-40 years in immunology. ***Annu Rev Immunol*** 2005;23:1-21.

Krinsky NI, and Johnson EJ. Caretenoid actions and their relation to health and disease. ***Mol Aspects Med*** 2005 26(6): 459-516.

Książkiewicz M., Markiewicz A., Żaczek AJ. Epithelial-Mesenchymal Transition: A Hallmark in Metastasis Formation Linking Circulating Tumor Cells and Cancer Stem Cells. ***Pathobiology*** 2012;79:195–208.

Kumar V, Cotran RS, and Robbins SL. (2000) Temel Patoloji, (Çev. Ed: Çevikbaş, U.), ***Nobel Tıp Kitabevi***, İstanbul, s132-174.

Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, Bapat SA. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. ***Stem Cells*** 2009 Sep;27(9):2059-68.

Leber MF, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis. ***Int J Oncol***. 2009;34:881–95.

Lee IM. Physical activity and cancer prevention-data from epidemiologic studies. ***Med Sci Sports Exerc*** 2003; 35(11): 1823-1827.

Leoyklang P, Suphapeetiporn K, Siriwan P, Desudchit T, Chaowanapanja P, Gahl WA, Shotelersuk V. Heterozygous nonsense mutation SATB2 associated with cleft palate, osteoporosis, and cognitive defects. ***Hum Mutat*** 2007;28(7):732-8.

Leslie K, Lang C, Devgan G, Azare J, Berishaj M, Gerald W, Kim YB, Paz K, Darnell JE, Albanese C, Sakamaki T, Pestell R, Bromberg J. Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. ***Cancer Res*** 2006;66(5):2544-52.

Lessard JA, Crabtree GR. Chromatin regulatory mechanisms in pluripotency. ***Annu Rev Cell Dev Biol*** 2010;26:503-32.

Li X, and Hemminki K. Inherited predisposition to early onset lung cancer according to histological type. ***Int J Cancer*** 2004;112(3): 451-457.

Li QF, Wang XR, Yang YW, Lin H. Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3alpha expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1alpha. ***Cell Res*** 2006;16(6):548-58.

Liu RY, Zeng Y, Lei Z, Wang L, Yang H, Liu Z, Zhao J, Zhang HT. JAK/STAT3 signaling is required for TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. ***Int J Oncol*** 2014;44(5):1643-51.

Lo HW, Hsu SC, Xia W, Cao X, Shih JY, Wei Y, Abbruzzese JL, Hortobagyi GN, Hung MC. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial–mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. ***Cancer Res*** 2007;67(19):9066-76.

Maghfoor I, and Perry MC. Lung Cancer. ***Ann Saudi Med*** 2005; 25(1): 1-12.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA The epithelial–mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. ***Cell*** 2008;133(4):704–15.

McDonald SA, Graham TA, Schier S, Wright NA, Alison MR: Stem cells and solid cancers. ***Virchows Arch*** 2009, 455:1-13.

Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. ***Nat Rev Cancer*** 2006;6:449–58.

Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, and Adjei AA. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. ***Mayo Clin Proc*** 2008 83(5): 584-594.

Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. ***PLoS One*** 2008;3:e2888.

Na YR, Lee JS, Lee SJ, Seok SH. Interleukin-6-induced Twist and N-cadherin enhance melanoma cell metastasis. ***Melanoma Res*** 2013;23(6):434-43.

Müsellim B. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi. ***İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi***, 2007, 58: 113-118.

Niu G, Wright KL, Ma Y, Wright GM, Huang M, Irby R, Briggs J, Karras J, Cress WD, Pardoll D, Jove R, Chen J, Yu H. Role of Stat3 in regulating p53 expression and function. ***Mol Cell Biol*** 2005;25(17):7432-40.

Notani D, Gottimukkala KP, Jayani RS, Limaye AS, Damle MV, Mehta S, Purbey PK, Joseph J, Galande S. Global regulator SATB1 recruits beta-catenin and regulates T(H)2 differentiation in Wnt-dependent manner. ***PLoS Biol*** 2010;8(1):e1000296.

Nurwidya F, Takahashi F, Murakami A, Takahashi K. Epithelial Mesenchymal Transition in Drug Resistance and Metastasis of Lung Cancer. ***Cancer Res Treat***. 2012;44(3):151-156.

Okudela K, Woo T, Mitsui H, Tajiri M, Masuda M, Kenichi Ohashi. Expression of the potential cancer stem cell markers, CD133, CD44, ALDH1, and b-catenin, in primary lung adenocarcinoma—their prognostic significance. ***Pathol Int*** 2012; 62: 792–801.

Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. ***Cell Cycle*** 2006;5:1597–601.

Pallier K, Cessot A, Côté JF, Just PA, Cazes A, Fabre E, Danel C, Riquet M, Devouassoux-Shisheboran M, Ansieau S, Puisieux A, Laurent-Puig P, Blons H. TWIST1 a new determinant of epithelial to mesenchymal transition in EGFR mutated lung adenocarcinoma. ***PLoS One*** 2012;7(1):e29954.

Patani N, Jiang W, Mansel R, Newbold R, Mokbel K. The mRNA expression of SATB1 and SATB2 in human breast cancer. ***Cancer Cell International*** 2009; 9:18.

Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? ***Nat Rev Cancer*** 2007;7(6):415-28.

Perlikos F, Harrington KJ, Syrigos KN. Key molecular mechanisms in lung cancer invasion and metastasis: A comprehensive review. ***Crit Rev Oncol Hematol*** 2013;87(1):1-11.

Polyak K, Haviv I, Campbell IG. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. ***Trends Genet*** 2009;25:30–8.

Rokavec M, Öner MG, Li H, Jackstadt R, Jiang L, Lodygin D, Kaller M, Horst D, Ziegler PK, Schwitalla S, Slotta-Huspenina J, Bader FG, Greten FR, Hermeking H.

IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. ***J Clin Invest*** 2014;124(4):1853-67.

Ruano-Ravina A, Figuerias A, Freire-Garabal M, Barros-Dios JM. Antioxidant vitamins and risk of lung cancer. ***Curr Pharm Des*** 2006;12(5): 599-613.

Sano S, Chan KS, DiGiovanni J. Impact of Stat3 activation upon skin biology: A dichotomy of its role between homeostasis and diseases. ***J Dermatol*** Sci 2008;50(1):1-14.

Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens MD, Nassar A, Kalli KR, Haluska P, Ingle JN, Hartmann LC, Manjili MH, Radisky DC, Ferrone S, Knutson KL: Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. ***Cancer Res*** 2009; 69:2887-2895.

Saxena NK, Vertino PM, Anania FA, Sharma D. Leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. ***J Biol Chem*** 2007 May 4;282(18):13316-25.

Sansone P, Storci G, Tavolari S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M, Ceccarelli C, Santini D, Paterini P, Marcu KB, Chieco P, Bonafè M. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. ***J Clin Inves*** 2007;117(12):3988-4002.

Scheela C., Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: Concepts and molecular links. ***Semin Cancer Biol*** 2012;22(5-6):396-403.

Schubeler D, Francastel C, Cimbora DM, Reik A, Martin DI, Groudine M: Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human betaglobin locus. ***Genes & Dev*** 2000, 14(8):940-950.

Seong BK, Lau J, Adderley T, Kee L, Chaukos D, Pienkowska M, Malkin D, Thorner P, Irwin MS. SATB2 enhances migration and invasion in osteosarcoma by regulating genes involved in cytoskeletal organization. ***Oncogene*** 2014 Sep 15.

Shih JY. and Yang PC. The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. ***Carcinogenesis*** 2011;vol.32 no.9 pp.1299–1304.

Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. ***Semin Cell Dev Biol*** 2010; 21(1): 19–25.

Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. ***Oncogene*** 2010;29(34):4741-51.

Soini Y. Tight junctions in lung cancer and lung metastasis: a review. International ***Int J Clin Exp Pathol*** 2012;5:126–36.

Song Y, Qian L, Song S, Chen L, Zhang Y, Yuan G, Zhang H, Xia Q, Hu M, Yu M, Shi M, Jiang Z, Guo N. Fra-1 and Stat3 synergistically regulate activation of human MMP-9 gene. ***Mol Immunol*** 2008;45(1):137-43.

Spector DL. The dynamics of chromosome organization and gene regulation. ***Annu Rev Biochem*** 2003; 72:573-608.

Spiro SG, Porter JC. Lung cancer-where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. ***Am J Respir Crit Care Med*** 2002;166:1166-1196.

Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/ MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. ***Leukemia*** 2004;18(2):189-218.

Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F, Raman V, Ramirez N, Oberyszyn TM, Hall BM. Interleukin-6 induces an epithelial–mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. ***Oncogene*** 2009;28(33):2940-7.

Sun X, Mao Y, Wang J, Zu L, Hao M, Cheng G, Qu Q, Cui D, Keller ET, Chen X, Shen K, Wang J. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts induces tamoxifen resistance in luminal breast cancer. ***Oncogene*** 2014.158.

Szemes M, Gyorgy A, Paweletz C, Dobi A, Agoston DV. Isolation and characterization of SATB2, a novel AT-rich DNA binding protein expressed in development- and cell-specific manner in the rat brain. ***Neurochem Res*** 2006 Feb;31(2):237-46.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. ***Nat Rev Cancer*** 2002; 2: 442–454.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. ***Cell*** 2009; 139: 871–890.

Tiwari N, Gheldof A, Tatari M, Christofori G. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. ***Semin Cancer Biol*** 2012;22(3):194-207.

Travis WD, Brambilla E, Muller-Mermelink HK, Haris CC. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. ***IARC Pres*** 2004;Vol: 10: 1-344.

Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. ***J Clin Oncol*** 2013;31(8):992-1001.

Vineis P, Airoldi L, Veglia F, Olgiati L, Pastorelli R, Autrup H, Dunning A, Garte S, Gormally E, Hainaut P, Malaveille C, Matullo G, Peluso M, Overvad K, Tjonneland A, Clavel-Chapelon F, Boeing H, Krogh V, Palli D, Panico S, Tumino R, Bueno-De-Mesquita B, Peeters P, Berglung G, Hallmans G, Saracci R, Riboli E. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmanory disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. ***BMJ*** 2005;330(7486): 277.

Wang YS, Miao LY, Liu L, Cai HR, Ding JJ, Ren SX, Zhou CC, Schmid-Bindert G. Serum cytokine levels in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with clinical outcome of erlotinib treatment. ***Chin Med J (Engl)*** 2013;126(20):3931-5.

Wels C, Joshi S, Koefinger P, Bergler H, Schaider H. Transcriptional activation of ZEB1 by Slug leads to cooperative regulation of the epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in melanoma. ***J Invest Dermatol*** 2011;131(9):1877-85.

Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. ***Cancer*** 1997;80(8 Suppl):1529-37.

Wu Y, Liu HB, Ding M, Liu JN, Zhan P, Fu XS, Lu G. The impact of E-cadherin on non-small cell lung cancer survival: a meta-analysis. ***Mol Biol Rep*** 2012;39(10):9621-8.

Wu Y, Feng ZJ, Gao SB, Matkar S, Xu B, Duan HB, Lin X, Li SH, Hua X, Jin GH. Interplay between menin and K-Ras in regulating lung adenocarcinoma. ***J Biol Chem*** 2012;287(47):40003-11.

Xiao D. and He J. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. ***J Thorac Dis*** 2010; 2: 154-159.

Xiong H, Hong J, Du W, Lin YW, Ren LL, Wang YC, Su WY, Wang JL, Cui Y, Wang ZH, Fang JY. Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition. ***J Biol Chem*** 2012;287(8):5819-32.

Yadav A, Kumar B, Datta J, Teknos TN, Kumar P. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial, äìmesenchymal transition via the JAK–STAT3–SNAIL signaling pathway. ***Mol Cancer Res*** 2011;9(12):1658-67.

Yang CL, Liu YY, Ma YG, Xue YX, Liu DG, Ren Y, Liu XB. Curcumin Blocks Small Cell Lung Cancer Cells Migration, Invasion, Angiogenesis, Cell Cycle and Neoplasia through Janus Kinase-STAT3 Signalling Pathway. ***PLoS One***. 2012;7:e37960

Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. ***Dev Cell*** 2008; 14: 818–829.

Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC, Wu KJ. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. ***Nat Cell Biol*** 2008;10:295–305.

Yang MH, Yu J, Chen N, Wang XY, Liu XY, Wang S, Ding YQ. Elevated microRNA-31 expression regulates colorectal cancer progression by repressing its target gene SATB2. ***PLoS One*** 2013;8(12):e85353.

Yang MH, Yu J, Jiang DM, Li WL, Wang S, Ding YQ. microRNA-182 targets special AT-rich sequence-binding protein 2 to promote colorectal cancer proliferation and metastasis. ***J Transl Med*** 2014;12:109.

Yang Y, Pan X, Lei W, Wang J, Song J. Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis via a cell cycle-dependent mechanism. ***Oncogene*** 2006;25:7235–7244.

Yang Y, Li Y, Wang K, Wang Y, Yin W, Li L. P38/NF-κB/snail pathway is involved in caffeic acid-induced inhibition of cancer stem cells-like properties and migratory capacity in malignant human keratinocyte. ***PLoS One*** 2013;8(3):e58915.

Yasui D, Miyano M, Cai S, Varga-Weisz P, Kohwi-Shigematsu T. SATB1 targets chromatin remodelling to regulate genes over long distances. ***Nature*** 2002;419(6907):641-5.

Yeh HH, Lai WW, Chen HH, Liu HS, Su WC. Autocrine IL-6-induced Stat3 activation contributes to the pathogenesis of lung adenocarcinoma and malignant pleural effusion. ***Oncogene*** 2006;25(31):4300-9.

Yılmazbayhan D. Akciğer Tümörleri ve Plevra Hastalıkları, Temel Patoloji, (Mocan Kuzey G., Özdamar Ş, Zergeroğlu S.), ***Güneş Kitabevi, Ankara***, 2007, s381-390.

Yi TZ, Li J, Han X, Guo J, Qu Q, Guo L, Sun HD, Tan WH. DNMT inhibitors and HDAC inhibitors regulate E-cadherin and Bcl-2 expression in endometrial carcinoma in vitro and in vivo. ***Chemotherapy*** 2012;58(1):19-29.

Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. ***Mol Cancer Res*** 2010;8:629–42.

Youlden DR, Cramb SM, Baade PD. The international epidemiology of lung cancer: geographical distribution and secular trends. ***J Thorac Oncol*** 2008;3:819–31.

Yu H, Jove R. The STATs of cancer–new molecular targets come of age. ***Nat Rev Cancer*** 2004;4(2):97-105.

Zhang Y, Reinberg D: Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. ***Genes & Dev*** 2001, 15(18):2343-2360.

Zhao Z, Cheng X, Wang Y, Han R, Li L, Xiang T, He L, Long H, Zhu B, He Y. Metformin inhibits the IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition and lung adenocarcinoma growth and metastasis. ***PLoS One*** 2014;9(4):e95884.

Web_1. Dünya Sağlık Örgütü. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/, (son güncelleme tarihi: 2014, alındığı tarih: 14.12.2014).

8. ÖZGEÇMİŞ

Hakan KÜÇÜKSAYAN 1987 yılında Denizli'de doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Denizli'de tamamladı. 2006-2010 yılları arasında Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü okudu ve 2010 yılında bu bölümden mezun oldu. 2011 yılında askerlik görevini tamamladı. 2012 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'da yüksek lisans eğitimine başladı.