



**MEZENKİMAL KÖK HÜCRE-KANSER HÜCRESİ KO-  
KÜLTÜRÜ SONRASI TGF-BETA VE CXCL12 SİNYAL  
YOLAKLARINDAKİ DEĞİŞİMİN ARAŞTIRILMASI**

**DETERMINATION OF TGF-BETA AND CXCL12  
SIGNALING PATHWAY CHANGES AFTER  
MESENCHYMAL STEM CELL-CANCER CELL CO-  
CULTURE**

**ŞEFİKA ÖZCAN**

**PROF. DR. MEHMET ALİ ONUR**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

## ÖZET

# MEZENKİMAL KÖK HÜCRE-KANSER HÜCRESİ KO-KÜLTÜRÜ SONRASI TGF-BETA VE CXCL12 SİNYAL YOLAKLARINDAKİ DEĞİŞİMİN ARAŞTIRILMASI

ŞEFİKA ÖZCAN

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. MEHMET ALİ ONUR

15.06.2023, 51 sayfa

Kanser, insan hastalıkları arasında iskemik kalp hastalığından sonra dünya çapında ikinci ölüm nedenidir. Karsinogenez, sağlıklı hücrelerin kötü huylu hücre tipine dönmesi şeklinde tanımlanır. Karsinogenez, genetik/epigenetik ve tümör mikro çevresinin karşılıklı etkileşimi ile kanser oluşmaktadır. Üçlü meme kanseri ve glioblastoma agresif ilerleyen ve yaygın kanser türleri arasındadır. Mezenkimal kök hücreler (MKH) rejeneratif tedavi ve hücresele tedaviye yönelik yapılan araştırmaların temelini oluşturan en önemli hücresele kaynaklar olarak dikkat çekmektedir. MKH'lerin, tümör mikro çevresi (TMÇ) ile etkileşimi tam olarak açıklığa kavuşmamıştır ve bu etkileşimin mekanizmaları oldukça karmaşık aynı zamanda değişkendir.

Bu tez çalışması kapsamında üçlü meme kanseri ve glioblastoma kanseri ile insan kemik iliği MKH'lerin ko-kültürü sonrasında hücrelerin canlılık analizi yapılmıştır. Hücre canlılığına ek olarak dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ) ve kemokin bağımlı ligand 12 (CXCL12) sinyal yollarındaki moleküllerin

ifadesindeki değişim hem kanser hücreleri hem de MKH'ler açısından incelenmesi hedeflenmiştir.

Deneysel çalışmalarda insan kemik iliği kökenli MKH'ler ile kanser hücreleri (T98G ve MDA-MB-231) transwell sistemleri kullanılarak ko-kültüre edilmiştir. Ko-kültür sonrası 24., 48. ve 72. saatler; 4., 7. ve 10. günlerde hücre canlılığı MTT yöntemi ile analiz edilmiştir. TGF- $\beta$  sinyal yolağındaki değişimin değerlendirilmesi için pTGF $\beta$ RI ve pSMAD3 molekülleri; CXCL12 sinyal yolağı için ise pCXCR4 ve pERK1/2 molekülleri seçilmiştir. pTGF $\beta$ RI molekülünün ifadesi immonofloresans, pCXCR4 molekülünün ifadesi immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. pSMAD3 ve pERK1/2 ifadesi ELISA yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir.

Tez çalışmasında gerçekleştirilen analizler sonucunda, ko-kültür sonrası kanser hücreleri kontrol grubuyla kıyaslandığında kanser hücrelerinin canlılığında azalma olduğu görülmüştür. Kanser hücreleri/MKH ko-kültürü sonrası MKH hücre canlılığının kontrol MKH hücrelerinin canlılığına oranla azaldığı görülmüştür. TGF- $\beta$  sinyal yolağı incelendiğinde, kanser hücrelerinde ve MKH'lerde, pTGF $\beta$ RI molekülünün ifadesi kontrol gruplarıyla kıyaslandığında çok fazla değişmediği görülmüştür. Hücre içi sinyal molekülü olan pSMAD3 molekülüne bakıldığında pSMAD3 ifadesinin ko-kültür sonrası gruplarda kontrol gruplarına kıyasla azaldığı görülmüştür. CXCL12 sinyal yolağı incelendiğinde, kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası iki grupta da pCXCR4 ifadesinin zayıf ve orta düzeyde arttığı gözlenmiştir. Kanser hücrelerindeki bu pCXCR4 ifadesindeki artış hücre içi sinyal molekülü pERK1/2 molekülünün aktivitesini arttırırken MKH'lerdeki pCXCR4 ifadesinin artması hücre içi pERK1/2 ifadesini etkilemediği görülmüştür.

Tez çalışması sonucunda elde edilen veriler kanser hücreleri ile ko-kültüre edilen MKH'lerin kanser hücrelerinin canlılığını her iki kanser tipi için de baskıladığını göstermiştir. MKH'lerde ise canlılığın ko-kültür sonrası azaldığı görülmüştür. TGF- $\beta$  sinyal yolağının ko-kültür sonrası reseptör aktivitesinin artması sinyal yolağının MKH'lerle etkileşim sonucu arttığını ancak pSMAD3 ifadesinin azalması MKH'lerden salgılanan aktif moleküllerin bu sinyal yolağını baskıladığını göstermektedir. CXCL12 sinyal yolağı reseptör aktivitesinin zayıf/orta düzeyde artması, pERK1/2 ifadesinin de artması ile sonuçlanmıştır. Bu

durum kanser hücreleri canlılığının MKH'ler tarafından baskılanmasını engellememektedir. Aksine CXCL sinyal yolu aktivitesinin MKH'lerin kanserli bölgede kalmasına ve MKH'lerden salgılanan biyoaktif moleküller aracılığı ile kanser hücreleri canlılığının baskılanmasına katkı sağladığı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Mezenkimal kök hücreler, kanser hücreleri, tümör mikro çevresi, TGF- $\beta$ , CXCL12

## **ABSTRACT**

### **DETERMINATION OF TGF-BETA AND CXCL12 SIGNALING PATHWAY CHANGES AFTER MESENCHYMAL STEM CELL- CANCER CELL CO-CULTURE**

**ŞEFİKA ÖZCAN**

**Master of Science, Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. MEHMET ALİ ONUR**

**15.06.2023, 51 pages**

Cancer is the second leading cause of death worldwide, following ischemic heart disease, among human diseases. During carcinogenesis, healthy cells exhibit similar protective characteristics to malignant cell types. Cancer develops as a result of intricate interactions between genetics/epigenetics and the tumor microenvironment. Breast cancer and glioblastoma are well-known as aggressive and prevalent types of cancer. Mesenchymal stem cells (MSCs) play a critical role in regenerative therapy and are considered a significant cell therapy candidate for cancer research. A variety of studies have been conducted on the interaction between MSCs and the tumor microenvironment, revealing a highly complex and variable relationship.

This thesis focuses on the analysis of cell viability after co-culturing triple-negative breast cancer, glioblastoma cancer, and human bone marrow MSCs.

Additionally, the study aims to investigate changes in the expression changes for the Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) and Chemokine-dependent Ligand 12 (CXCL12) signaling pathways in both cancer cells and MSCs.

The experimental setup consist of co-culturing human bone marrow-derived MSCs with cancer cells (T98G and MDA-MB-231) using transwell systems. Cell viability was analyzed at the 24th, 48th, and 72nd hours and the 4th, 7th, and 10th days after co-culture using the MTT method. Expression changes for the TGF- $\beta$  signaling pathway, pTGF $\beta$ RI, and pSMAD3 molecules were selected, while for the CXCL12 signaling pathway, pCXCR4 and pERK1/2 molecules were chosen. The expression of pTGF $\beta$ RI was measured through immunofluorescence, while the expression of pCXCR4 was observed immunohistochemically. The ELISA method was used to analyze the expression of pSMAD3 and pERK1/2.

The results showed that the viability of cancer cells decreased when compared with the control group after co-culture. After cancer cells/MSc co-culture, MSC cell viability was found to be decreased compared to control MSC cells. The expression of pTGF $\beta$ RI in cancer cells and MSCs did not change significantly compared to the control groups. However, the intracellular signaling molecule pSMAD3 showed a more pronounced expression than in the control group. In the CXCL12 signaling pathway, the expression of pCXCR4 was observed to be weak to moderate in both cancer cells and MSCs. The expression of pCXCR4 in cancer cells and the activity of the intracellular molecule pERK1/2 increased. It was observed that increased pCXCR4 expression in MSCs did not affect intracellular pERK1/2 expression.

This thesis study determined that MSCs can suppress the viability of cancer cells for both cancer types when co-cultured with MSCs. Additionally, the viability of MSCs was maintained after co-culture. The increase in the receptor activity of the TGF- $\beta$  signaling pathway after co-culture indicates that the signaling pathway increases as a result of interaction with MSCs, but the decrease in pSMAD3 expression indicates that active molecules secreted from MSCs suppress this signaling pathway. Weak and to moderate levels of CXCL12 signaling pathway receptors activity resulted in increased expression of pERK1/2. This does not

prevent cancer cell viability from being suppressed by MSCs. On the contrary, it is thought that CXCL signaling pathway activity contributes to the retention of MSCs in the cancerous region and suppression of cancer cell viability through bioactive molecules secreted from MSCs.

**Keywords:** Mesenchymal stem cell, cancer cells, tumor microenvironment, TGF- $\beta$ , CXCL12



## TEŐEKKÖR

Bu alıőmayı, **FHD-2022-19913** proje numarası ile destekleyen **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi**'ne

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kanser .....	3
2.1.1. Epidemiyoloji .....	3
2.1.2. Kanser Nedir? .....	3
2.1.2.1. Tümör Mikro Çevresi .....	4
2.1.2.2. Metastaz .....	5
2.1.2.3. Apoptoz .....	5
2.2. Mezenkimal Kök Hücreler .....	7
2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Pro- ve Anti-tümör Özellikleri .....	8
2.3. Mezenkimal Kök Hücre-Kanser Hücresi Etkileşiminde Aktifleşen Sinyal Yolakları .....	10
2.3.1 TGF- $\beta$ Sinyal Yolağı .....	10
2.3.1.1. SMAD Bağımlı Sinyal Yolağı .....	11
2.3.1.2. SMAD Bağımsız Sinyal Yolağı .....	11
2.3.2. CXCL12 Sinyal Yolağı .....	12
2.3.2.1. CXCL12/CXCR4/CXCR7 Eksenini .....	13
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	16
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARINI .....	16
3.1.1. Hücre Hatları ve Hücre Kültürü .....	16
3.1.2. Ko-Kültür Yöntemi .....	16

3.1.3 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) – Canlılık Analizi .....	17
3.2. SİNYAL YOLAKLARININ İFADESİNİN İNCELENMESİ.....	18
3.2.1 İmmünofloresan Yöntemi.....	18
3.2.2. İmmünohistokimya Yöntemi.....	19
3.2.3. ELISA .....	20
3.3. İstatiksel Analiz.....	21
4. SONUÇLAR .....	22
4.1. Kanser Hücresi-İnsan Kemik İliği Mezenkimal Hücrelerinin Ko-Kültürü Sonrası MTT Sonuçları.....	22
4.2. İmmünofloresans Yöntem Analizi Sonucu: Ko-kültür sonrası kanser hücrelerinde ve MKH'lerde Phospo-TGFβRI (p TGFβRI) ifadesi.....	25
4.3. İmmünositokimyasal Analiz Sonucu: Ko-kültür sonrası kanser hücreleri ve MKH'lerde Phospo-CXCR4 (pCXCR4) reseptörünün ifadesi.....	29
4.4. Ko-kültür sonrası pSMAD3'ün kanser hücreleri ve insan MKH'lerindeki ifadesi .....	33
4.5. Ko-kültür sonrası pERK1/2'ün kanser hücreleri ve insan MKH'lerindeki ifadesi .....	34
5. TARTIŞMA .....	35
6. KAYNAKLAR.....	42
EKLER .....	49
EK 1. IMAGEJ PROGRAMI KULLANILARAK HÜCRE SAYIMI.....	49
EK 2. TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU .....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	51

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> DSÖ, 2016'dan 2060'a önde gelen ölüm nedenlerinin epidemiyolojik eğilimi [1] .....	3
<b>Şekil 2.2.</b> TGF- $\beta$ sinyal yolağı [44] Smad bağımlı-Smad bağımsız sinyal yolağı .....	12
<b>Şekil 2.3.</b> CXCL12 sinyal yolağı [52] .....	13
<b>Şekil 3.1.</b> Transwell ko-kültür sistemi şematik gösterimi.....	17
<b>Şekil 4.1.</b> Ko-kültür sonrası hücre canlılığı sonuçları .....	24
<b>Şekil 4.2.</b> Kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası 4.günde hücrelerdeki pTGF $\beta$ RI ifadesinin yüzde (%) değeri.....	26
<b>Şekil 4.3.</b> Kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası kanser hücreleri ve MKH'deki pTGF $\beta$ RI'in ifadesin immünofloresans görüntüleri (OlympusIX70 Mikroskop,20X).....	27
<b>Şekil 4.4.</b> Kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası 4. günde hücrelerdeki pTGF $\beta$ RI ifadesi.....	28
<b>Şekil 4.5.</b> Kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası 4.günde hücrelerdeki pTGF $\beta$ RI ifadesinin yüzde (%) değeri. ....	30
<b>Şekil 4.6.</b> CXCR4'ün kontrol ve ko-kültür sonrası kanser hücreleri ve MKH'deki ifadesi (OlympusIX70 Mikroskop, 20X) .....	31
<b>Şekil 4.7.</b> Kanser hücresi-MKH hücresi ko-kültürü sonrası 4.gündeki kanser hücreleri, MKH'ler ve kontrol gruplarındaki pSMAD3 ifadesi.....	33
<b>Şekil 4.8.</b> Kanser hücresi-MKH hücresi ko-kültürü sonrası 4.gün kanser hücreleri, MKH'ler ve kontrol gruplarındaki pERK1/2 ifadesi .....	34

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 4.1.</b> Kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası 4. günde pTGFbR1 ifadesi .....	26
<b>Çizelge 4.2.</b> Ko-kültür sonrası 4. gündeki kanser hücreleri ve MKH'lerdeki pCXCR4 ifadesinin istatistiksel olarak incelenmesi.....	29

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\mu\text{L}$	Mikrolitre
mL	Mililitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
mM	Milimolar
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
gr	Gram

### Kısaltmalar

DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
TGF- $\beta$	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
TGF $\beta$ RI	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Reseptörü I
TGF $\beta$ RII	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Reseptörü II
TGF $\beta$ RIII	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Reseptörü III
CXCL12	CXC Motifli Kemokin Ligandı 12
SDF1	Stromal Hücre Kaynaklı Faktör 1
CXCR4	CXC Motifli Kemokin Reseptörü 4
CXCR7	CXC Motifli Kemokin Reseptörü 7
ERK1/2	Hücre Dışı Sinyal Düzenleyici Kinaz 1/2
SMAD3	Suppressor Of Mothers Against Decapentaplegic
PI3K/AKT	Fosfotidilinositol 3-Kinaz/Protein Kinaz B

TNF/TNFR	Tümör Nekroz Faktör/ Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TRAIL	TNF-ilgili Apoptoz İndükleyici Ligand
IFN	İnterferon
HIF	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1
ROR1	Reseptör Tirozin Kinaz-Benzeri Orphan Reseptör 1
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
GPCR	G-protein Bağımlı Reseptör
APAF1	Apoptotik Peptidaz Aktive Edici Faktör 1
ER	Östrojen Reseptörü
PR	Progesteron Reseptörü
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium /F12
DMSO	Dimetilsülfoksit
FBS	Fetal Bovine Serum
PBS	Phosphate-Buffered saline
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
MTT	3-4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide
HRP	Horse Radish Peroksidaz
PBST	Phosphate-Buffered Saline Solüsyonu
BSA	Bovine Serum Albumin
TMÇ	Tümör Mikro Çevresi





# 1. GİRİŞ

Kanser, Dünya'da önde gelen ölüm nedenlerinden birini oluşturmaktadır ve her yıl yüzbinlerce insan bu hastalıktan yaşamını yitirmektedir.

Hücre, bölünebilme ve farklılaşabilme kapasitesine sahip, canlılığın en küçük yapı birimidir. Bu sayede hücreler, dokuları, organları, sistemleri ve organizmaları oluşturmaktadır. Bu bölünebilme ve farklılaşma yeteneği hücreden hücreye farklılık göstermektedir. Hücrelerin bu özellikleri genetik kodlar ile kontrol edilmektedir. Ancak bölünme ve farklılaşmanın kontrolsüz bir şekilde meydana gelmesi sonucunda hücreler ölümsüzleşmeye başlamaktadır. Bu olay "karsinogenez" olarak tanımlanmaktadır.

Karsinogenez, hücrelerin sürekli bölünme eğilimi göstermesidir. Ayrıca bu hücreler göç edebilme, bağışıklık hücrelerinden kaçabilme yeteneğine de sahiptirler. Kanser, karsinogenezi düzenleyen genetik/epigenetik faktörler ve TMÇ'deki hücrelerin birbiriyle etkileşimi sonucunda hücrelerin kötü huylu özellik kazanmasıyla meydana gelmektedir. TMÇ; kanser hücresi, MKH, endotel hücreler, perisit hücreleri, bağışıklık elemanları, ekstraselüler matriks elemanları, kemokinler, sitokinler ve büyüme faktörleri içermektedir. MKH'ler "multipotent" hücrelerdir yani belirli hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler ve çeşitli dokularda bulunmaktadır. TMÇ'deki, kanser hücreleri ile MKH'lerin karşılıklı etkileşimi sonucu, kanser hücreleri indüklenebilmekte ya da baskılanabilmektedir. Bu etkileşim, hücre-hücre etkileşim ya da birtakım salgı faktörleri (sitokin, kemokin, eksozom, büyüme faktörü) aracılığı ile gerçekleşmektedir.

Dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) sinyal yolağı, evrimsel olarak büyük oranda korunmuş ve birçok fizyolojik süreçte (hücre çoğalması, ölümü, farklılaşması gibi) görev almaktadır. Hücre içinde "SMAD bağımlı" ve "SMAD bağımsız" yollar üzerinden gen ifadesini düzenlemektedir.

Aynı şekilde CXCL12 sinyal yolağı da embriyogenez, hematopoez, anjiyogenez ve enflamasyon dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır. CXCL12 ligandının CXCR4'e bağlanması ile birlikte PI3K/AKT,

ERK1/2, MAPK, Rho, cAMP sinyal yolaklarının aŖađı regölasyonunu indükleyerek gen ifadesini düzenlemektedir.

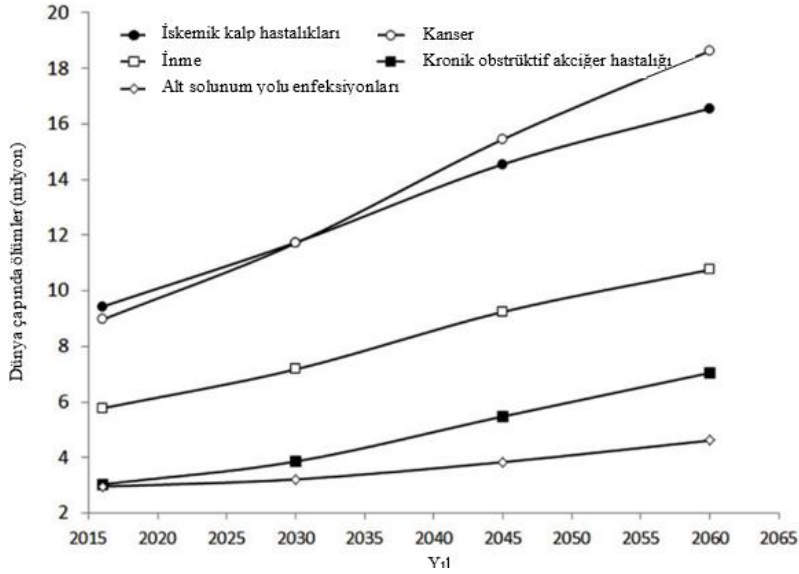
Her iki sinyal yolağı, kanserin oluşumuna, kanserli hücrelerin hayatta kalmasına, ilerlemesine ve göç etmesine etki edebilmektedir. Bu etki kanserin oluştuğu dokuya, bulunduğu evreye göre değişmektedir. Bu nedenle, kanser sürecinde aktif rol alan TGF- $\beta$  ve CXCL12 sinyal yolaklarının hem kanser hücreleri hem de MKH'ler açısından daha fazla incelenmesi gerekmektedir. Böylece daha etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesinin mümkün olacağı düşünölmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

#### 2.1.1. Epidemiyoloji

Kanser, insan hastalıkları arasında en büyük yüzdelik dilimi oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Amerikan Kanser Derneği verilerine göre mortalite (ölüm oranı) olarak kanser, iskemik kalp hastalığından sonra dünya çapında ikinci ölüm nedenidir. 2018 yılında 18,1 milyon yeni vaka ve 9,5 milyon kansere bağlı ölüm meydana gelmiştir. DSÖ, 2016'dan 2060'a kadar önde gelen beş ölüm nedeninin epidemiyolojik eğilimini tahmin etmiştir. Bu tahminler doğrultusunda önümüzdeki kırk yılda, kanser nedeniyle hayatını kaybedecek kişi sayısının 2,08 kat artması beklenmektedir [1].



**Şekil 2.1.** DSÖ, 2016'dan 2060'a önde gelen ölüm nedenlerinin epidemiyolojik eğilimi [1]

#### 2.1.2. Kanser Nedir?

Vücudumuzdaki hücrelerin doku rejenerasyonu ve/veya yara iyileşmesi gibi durumlarda kendilerini yenileyebildikleri ve farklılaşabildikleri bilinmektedir [2]. Ancak bu farklılaşmanın sürekli ve kontrolsüz bir şekilde devam etmesi sonucunda hücrelerin ölümsüzleşmesi ile "karsinogenez" meydana gelmektedir. Karsinogenez, sağlıklı hücrelerin kötü huylu hücre tipine dönmesi olarak

tanımlanmaktadır. Kanser, karsinogenezi düzenleyen genetik/epigenetik ve tümör mikro çevresinin karışık etkileşimi ile ortaya çıkan biyolojik bir hastalıktır [3]. Kanser hücreleri, bir dizi gen değişikliği kazanarak, onkogenleri aktive olan, tümör baskılayıcı genleri inaktive olan ve diğer genlerdeki mutasyonlarını arttırabilme özelliğine sahip, stabil genleri inaktive olmuş hücrelerdir [4]. Normal hücrelerde, özellikle de kök hücrelerde bulunan OCT4, SOX2, KLF4, MYC ve WNT gibi genlerin ifadesi artmaktadır. Bu genlerdeki ifadenin artması sonucunda normal hücreler birtakım özellikler kazanmaktadır. Bunlar; i) normal büyüme sinyallerinden bağımsız hale gelme; ii) büyümeyi inhibe eden sinyallerden ve programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kaçma ve iii) kontrolsüz çoğalma yetenekleri kazanma şeklindedir [5, 6].

#### **2.1.2.1. Tümör Mikro Çevresi**

Tümör mikro çevresi (TMÇ), tümörlerin veya kanser kök hücrelerinin buldukları ortamı ifade etmektedir [7]. TMÇ, tümör hücreleri, mezenkimal kök hücreleri (MKH), kanser ilişkili fibroblast, endotel ve perisit hücreleri dahil olmak üzere stromal hücreleri; T ve B lenfosit, doğal öldürücü hücreler, dentritik hücreler, makrofajlar ve nötrofiller dahil olmak üzere immün hücreleri; ekstraselüler matris elemanları; büyüme faktörleri, sitokinleri, kemokinleri ve hücre dışı veziküller gibi salgılanan molekülleri içermektedir [8, 9]. TMÇ, kanserin evresine ve meydana geldiği organa göre tümör destekleyici veya tümör baskılayıcı hücreler olabilmektedir [8]. TMÇ'de bulunan hücreler salgıladıkları birtakım moleküller (sitokin, büyüme faktörü, kemokin vs..) ile tümör oluşum sürecine yön vermektedir. Örneğin; tümör oluşumu sırasında kanser hücreleri ve stromal hücreler besin ve oksijen açısından yetersiz ortama sahip olabilmektedir. Bu da hücreler tarafından hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) salınmasına yol açmaktadır. HIF1 güçlü bir anjiogenik olan vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) aktivasyonunu sağlayarak kanser hücrelerinin yayılmasına yardımcı olan neovaskülarizasyonu teşvik etmektedir [10]. Tümör hücrelerinden salınan bazı kemokinler (CXC12, CCL2/MCP-1) makrofajların TMÇ'ye alınmasına ve bu hücrelerin aktif tümör ilişkili makrofajlara dönüşmesine teşvik etmektedir. Sonrasında tümör ilişkili makrofajlardan salınan kemokin/sitokinlerin (TGF, IL6, IL10, CCL8) kanser oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir [9].

Literatürde ise ileri pankreatik duktal adenokarsinoma aşamalarında TGF- $\beta$ 'nin epitelyal-mezenkimal geçişi indükleyerek kanserin ilerlemesini teşvik ettiği bulunmuştur [11]. MKH'lerin tümör destekleyici yönde özellikler göstermesine rağmen TMÇ'de bulunan hücrelerin yeniden programlayarak kanser tedavisinde kullanmak umut verici strateji sağlamaktadır [8, 9].

### **2.1.2.2. Metastaz**

Metastaz, kanser hücrelerinin olduğu birincil bölgeden göç ederek ikincil bir noktada tümör oluşturmasıdır [12]. Metastaz, kanser ölümlerinin ve kanser tedavisindeki zorlukların en temel nedenlerinden biridir [12, 13]. Metastaz beş aşamadan oluşmaktadır. Bunlar; invazyon, intravazasyon, dolaşım, ekstrasvazasyon ve kolonizasyondur [12]. Kanser hücreleri tek tek ya da kolektif olarak metastaz yapabilmektedir. Tek hücreli invazyon; hücre-matriks ve mikro çevre sinyallerini içerirken, hücre-hücre etkileşiminden yoksundur. Kolektif invazyon; hücre-hücre etkileşimini ve hücre-matriks etkileşimlerini içermektedir. Ancak her iki invazyon için de ortak olan şeyler mevcuttur. Bunlar, tümör-stroma hücreleri arasındaki karşılıklı etkileşim ve ortamdaki salgı molekülleri ile sinyalleşmedir [14]. Bir kemokin olan CXCL12 (ayrıca SDF1 olarak bilinir) hem stromal hücreler ve hem de kanser hücreleri tarafından üretilmektedir. Bernat-Peguera ve ark. yaptığı bir çalışmada, CXCL12'nin hücre yüzeyinde bulunan ve CXCL12'nin reseptörü olan CXCR4 ve CXCR7'nin hücre yüzeyinde ifadesini arttırdığı ve bu sinyal yolağı üzerinden kanser hücrelerinin hayatta kalmasının ve metastazının arttığını göstermiştir [15].

### **2.1.2.3. Apoptoz**

Evrimsel olarak korunmuş, yaşlanan ya da hasar görmüş hücrelerin genetik olarak belirlenmiş eliminasyonuna "apoptoz/programlanmış hücre ölümü" denmektedir. Apoptoz, embriyonik süreçte ve yetişkin doku homeostazı gibi normal fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak da oldukça önemlidir [16, 17]. Apoptoz, intrinsik ve ekstrinsik yollardan gelen hücre dışı ve içi sinyallerle düzenlenmektedir. İntrinsik

yolakta sinyal mitokondriden başlarken, ekstrinsik yolakta hücre yüzeyi ölüm reseptörleri aracılık etmektedir [18].

Ekstrinsik yolak, membran ölüm reseptörleri; tümör nekroz faktörü (TNF) ve tümör nekroz faktör reseptörü 1 (TNF-R1/DR1), Fas (DR2/CD95), ölüm reseptörü 4 (DR4) ve ölüm reseptörü 5 (DR5)'i içermektedir. Bu reseptörler TNF, FasL ve TNF- ilgili apoptoz indüleyici ligand (TRAIL) gibi özel sinyal molekülleri tarafından aktive edilmektedir. Aktivasyon sonucunda ölüme neden olan sinyal kompleksi oluşmakta ve kaspaz aktivasyonu ile hücre ölümü gerçekleşmektedir [18].

İntrinsik yolak, mitokondriden sitokrom C salınması, apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 (APAF1) ve başlatıcı kaspaz 9 ile apoptozom oluşumunu ve ardından kaspaz 3'ün aktivasyonu ile mitokondriyal dış membran geçirgenliğini (MOMP) içermektedir. Mitokondriden sitokrom C salınımı BAX, BAK, BIM, BID, PUMA gibi proapoptotik BCL-2 aile üyeleri tarafından pozitif; BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1 ve MCL1 gibi anti-apoptotik BCL-2 aile üyeleri tarafından negatif olarak düzenlenmektedir [18].

Apoptoz, TMÇ'nin ortak bir özelliğidir. TMÇ'nin kanser hücresi ile etkileşimi sonucu kanser hücrelerinde, Bcl-2 /Bcl-XL inaktive olabilmekte ve Bax/Bak genlerinin aktivasyonu gerçekleşebilmektedir. Bu etkileşim sonucunda kanser hücrelerinin hayatta kalması artmakta ve apoptoz direnci meydana gelmektedir [18]. Kanser hücrelerinin apoptoz direnci kazanması onların tümör evrimini ve büyümesini desteklemesinin yanında tedavide başarısızlığının da artmasına sebebiyet vermektedir [16, 18].

### **2.1.3. Meme Kanseri**

Meme kanseri, yüzeyinde bulundurduğu östrojen (ER $\alpha$ ) veya progesteron (PR) reseptörleri ve insan epidermal büyüme faktörü 2 (ERBB2; eski adıyla HER2)'ye göre üç ana alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar; HR+ (ER $\alpha$  ve PR reseptörleri bulunan) /ERBB2 negatif (hastaların %70'i), ERBB2 pozitif (hastaların %15-20'i) ve üçlü negatif meme kanseridir (üç ana moleküler belirteçten yoksun tümör; hastaların %15'i). Üçlü negatif meme kanseri diğer iki alt türe göre daha agresiftir ve metastaz özelliği daha fazladır. Hayatta kalma oranı diğer iki alt grupta 5 yıl iken üçlü negatif meme kanserinde 1 yıldır [19].

Kanser araştırmalarında *in vitro* hücre kültürü modellerinde hücre hatları çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Meme kanseri ile yapılan çalışmalarda farklı tipte meme kanseri hücre hattı kullanılmasına karşın bu tez kapsamında kullanılmak üzere MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı seçilmiştir. MDA-MB-231, östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) ekspresyonunun yanı sıra insan epidermal büyüme faktörü 2 (ERBB2) amplifikasyonundan yoksun olduğu için oldukça agresif, ve ileri derecede farklılaşmış üçlü negatif meme kanseri hücre dizisidir [20].

#### **2.1.4. Glioblastoma**

Glioblastoma en yaygın beyin tümör tipinden birini oluşturmaktadır ve tedavisi oldukça zorlayıcıdır. Glioblastomalar, bilinen bir klinik öncüsü olmayan birincil ve zaman içinde daha düşük dereceli bir gliomanın ilerlemesi/dönüştürülmesi sonucu oluşan ikincil glioblastoma ile karakterize edilmektedir. Birincil glioblastomanın özellikleri şunlardır; i) tipik olarak telomeraz ters transkriptaz promotorunda mutasyon; ii) fosfataz ve tensin homolog tümör baskılayıcı gende mutasyon; iii) siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A/B'de mutasyonlar ve proto-onkogen epidermal büyüme faktörü reseptör geninde amplifikasyon ve iv) kromozom 7 kazanımı, kromozom 10 kaybı. İkincil glioblastomaların özellikleri ise; i) izositrat dehidrojenaz 1 ve 2'de (IDH1/2) mutasyonu; ii) tümör proteini P53'de mutasyon ve iii) X'e bağlı a talasemi/mental retardasyon sendromundaki mutasyonlardır [21].

Çalışmamızda ikincil bir glioblastoma hücre hattı olan ve diğer glioblastoma hücre hatlarına göre oldukça agresif, invazif ve istilacı T98G hücre hattı kullanılmıştır. [22] .

#### **2.2. Mezenkimal Kök Hücreler**

Kök hücreler, kendilerini yenileme ve farklılaşabilme yeteneklerine sahip hücrelerdir. Kök hücreler farklılaşabilme kapasitelerine göre 3 alt sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar, ekstra-embriyonik dokulara ve vücuttaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilme kapasitesine sahip "totipotent", vücuttaki tüm hücre tiplerine

farklılaşabilme kapasitesine sahip “pluripotent”, vücutta belli hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip “multipotent” hücrelerdir. Bunun dışında somatik dokudan elde edilen hücrelerin birtakım ajanlar (c-Myc, Klf4, Oct3/4, Sox2) kullanılarak pluripotent hücre özelliği kazandırılmasıyla “indüklenmiş pluripotent kök hücre” elde edilmektedir [23]. Bu tez kapsamında multipotent hücre özelliğine sahip MKH’ler kullanılmıştır.

MKH’ler, ilk olarak kemik iliğinden keşfedilen ve yaklaşık 52 yıl önce Friedenstein ve ark. tarafından rapor edilen kemik iliğinden izole edilmiş, hematopoietik karakterde olmayan, fibroblast benzeri hücrelerdir [24]. MKH’ler, yağ doku, kemik iliği, diş dokusu, deri, umbilikal kord dahil birçok yetişkin dokudan izole edilebilmektedir. 2006 yılından Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği MKH’lerin belirlenmesinde birtakım belirteçler ve hücre özelliği önermiştir. Bu özellikler; i) plastik bir yüzeye tutunabilme, ii) osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyeli ve iii) CD73, CD90 ve CD105 yüzey belirteçlerini ifade ederken, CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR yüzey belirteçlerini ifade etmemesidir [25].

MKH’ler, MHC-II yüzey antijenini ifade etmemektedir. MHC-I’i çok düşük ya da hiç ifade etmemektedir. Ayrıca bu hücreler hasarlı alana göç edebilmektedir. MKH’ler bu sayede benzersiz immünofenotipik kapasiteye, doku onarım kapasitesine ve immün düzenleyici kapasiteye sahiptir. Etik kaygılar olmadan, güvenli ve etkili kök hücre bazlı kaynaklar olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadırlar. MKH’ler, terapötik etkilerini hücre-hücre etkileşimi, hücre-ekstraselüler matriks etkileşimi ya da salgıladıkları birtakım faktörler (büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler ve mRNA, peptitler/proteinler, mikroRNA’lar gibi çok çeşitli molekülleri içeren ekstraselüler veziküller) aracılığı ile sağlamaktadır [26, 27].

### **2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Pro- ve Anti-tümör Özellikleri**

MKH’ler, salgıladıkları biyoaktif faktörler aracılığı ile doku yenilenmesinde-onarımında, immün hücrelerin regülasyonunda rol oynamaktadır. Ayrıca yaralı dokulara da göç edebilmektedir. Bununla birlikte TMÇ’de tümör baskılayıcı ya da destekleyici rol oynayabilmektedir. Ancak MKH’lerin, TMÇ ile etkileşimi tam



olarak açıklığa kavuşmamıştır ve bu etkileşimin mekanizmaları oldukça karmaşık aynı zamanda değişkendir [28]. Waterman ve ark. 2012'de yaptıkları bir çalışmada MKH'lerin tümör içerisindeki pro- ve anti-tümörojenik etkisini kısmen açıklamışlardır. Çalışmalarında MKH'nin iki farklı fenotipini ortaya çıkaran araştırmacılar MKH1 fenotipinin tümör büyümesini zayıflatırken, MKH2'nin fenotipinin tümör büyümesini ve metastazını desteklediğini göstermişlerdir [29]. MKH'lerin pro- ve anti-tümörojenik etkilerini anlamak için *in vivo* ve *in vitro* birçok çalışma yapılmaktadır [28, 30].

Mevcut literatür çalışmalarında MKH'lerin pro-tümörojenik aktiviteye katkı sağladığı sonucuna varılmıştır. Farklı kaynaklardan izole edilen MKH'lerin, kanser hücrelerinin büyümesini, ilerlemesini, istila ve metastazını teşvik ettiği gösterilmiştir. Örneğin; 2013'de Huang W.H. ve ark. tarafından yapılan çalışmada MKH'ler *in vitro* ve *in vivo* olarak kanser ortamına enjekte edilmiştir. Bunun sonucunda MKH'lerden salınan anjiyopöietin-1 (Ang-1) ve IL6'nın kanser endotel hücrelerinde ERK ve AKT yollarının aktivasyonuna neden olarak tümörün büyümesini ve damarlanmasını teşvik ettiği gösterilmiştir [31]. Ayrıca literatürdeki ZEB1 (Zinc finger E-box binding homeobox 1)'in, çeşitli kanser tiplerinde epitel-mezenkimal geçişini ve kanser ilerlemesini desteklediği gösterilmiştir [32]. Karvonen H. ve ark. tarafından yapılan çalışmada Wnt5a-ROR1 sinyal yolunun aktivasyonu sonucunda BMI-1, Hippo-YAP/TAZ aracılığıyla kanser hücrelerinde ilaç direncin olduğu ve metastaz aktivitesinin arttığı gösterilmiştir [33]. Ayrıca literatürde MKH'lerin anti-tümörojenik özellikler gösterdiğine dair de araştırmalar mevcuttur. Örneğin; mezenkimal öncü hücrelerin jelatin matrisi içinde *in vivo* ve *in vitro* da tümör büyümesini baskıladığı bulunmuştur [34]. Du ve ark. tarafından yapılan *in vitro* çalışmada IFN- $\gamma$  ile uyarılmış insan MKH'lerin, kanser hücrelerinde TRAIL yolaklı apoptozu indüklediği gösterilmiştir [35]. Cousin B. ve ark. tarafından yapılan çalışmada adipoz kökenli MKH'leri ve adipoz kökenli MKH-koşullandırılmış besiyerini çeşitli pankreas hücre hatlarına (capan-1, capan-2, BxxPC3, Miapaca-2) ve çeşitli hücre hatlarına (HuH7, HepG2, CaCo-2, PC3, MCF7, HeLa) uyguladıklarında tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği ve tümör hücrelerinin ölümünü teşvik ettiği gösterilmiştir [36]. 2014'de Ryu ve ark. tarafından yapılan çalışmada yüksek yoğunlukta kültüre edilen adipoz kökenli MKH'lerin, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde IFN- $\beta$  salgılamasına bağlı olarak

STAT1 aktivasyon yolu ile tümör hücrelerinin büyümesini baskılayan Tip I interferonları ifade ettiğini göstermiştir [37].

Literatürdeki bu çalışmalar ile MKH'lerin kanserde pro- veya anti-tümörojenik olup olmadığına karar vermek oldukça zordur. Bununla birlikte, MKH'lerin tümör üzerine olan etkisi elde edildiği kaynağa, tümörün evresine, çalışılan kanser modellerine göre değiştiği görülmektedir. MKH'lerin kanser mikro çevresindeki bu davranışını anlamak için daha fazla araştırmalar yapılmalıdır ve altında yatan mekanizmalar aydınlatılmalıdır.

### **2.3. Mezenkimal Kök Hücre-Kanser Hücresi Etkileşiminde Aktifleşen Sinyal Yolakları**

MKH ve kanser hücrelerinin etkileşimi sonucunda TGF-  $\beta$ , CXCL12, PI3K/AKT, ERK, TRAIL, IFN, STAT gibi çeşitli sinyal yolakları etkinleşmektedir [31, 35, 38]. Bu sinyal yolaklarının aktifleşmesi ile kanserin hangi evrede hangi dokuda olduğuna göre cevap değişmektedir. Bu tez kapsamında *in vitro* koşullarda TGF-  $\beta$  ve CXCL12 sinyal yolakları yolaklarının incelenmesi hedeflenmiştir.

#### **2.3.1 TGF- $\beta$ Sinyal Yolağı**

TGF- $\beta$  süper ailesi hayvanlar aleminde yüksek oranda korunmuştur ve çok hücreli evrimin ilk günlerinden itibaren ortaya çıktığı düşünülmektedir [39]. TGF- $\beta$  süper ailesi pek çok türde hücrel farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü, hücre adezyonu, hareketliliği, yetişkin doku homeostazı ve embriyogenezi kaplayan geniş bir hücrel görev ağını kontrol eden çeşitli büyüme faktörlerini içermektedir [39, 40].

Memelilerde, TGF- $\beta$  süper ailesinin üç homologu (TGF-  $\beta$ 1, TGF-  $\beta$ 2 ve TGF-  $\beta$ 3) mevcuttur ve bunlar birim başına 112 amino asit içeren 25 kDa disülfid bağlı dimerik proteinlerdir [40, 41]. TGF- $\beta$  ligandları fizyolojik aktiviteleri düzenlemek için transmembran serin/treonin kinaz reseptörü tip I (T $\beta$ RI), tip II reseptörü (T $\beta$ RII) ve tip III reseptörü (T $\beta$ RIII) ile birleşmektedir [41]. Biyolojik olarak aktif bir reseptör kompleksi, bir dimerik ligand ve bir heterotetramerik reseptör kompleksi içermektedir [39]. TGF-  $\beta$ , ilk önce yüksek afiniteli T $\beta$ RII ile birleşmektedir ve bu

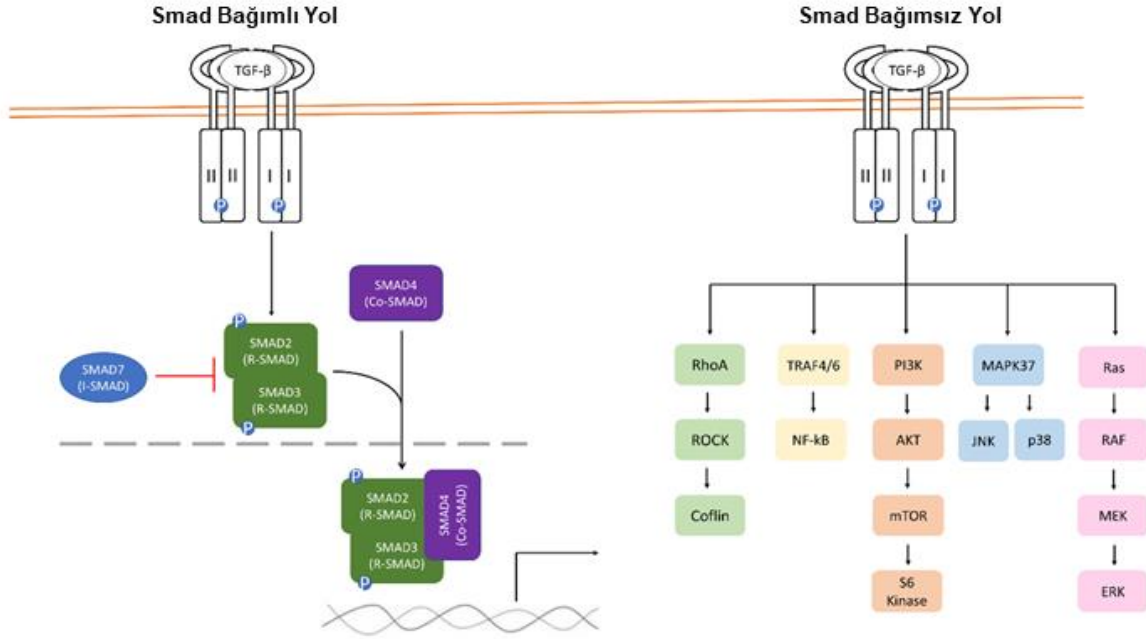
bağlanma sonucu T $\beta$ RII'nin T $\beta$ RI'e bağlanmasını sağlayacak konformasyonel adaptasyon oluşmaktadır. T $\beta$ RII ve T $\beta$ RI'in birleşmesi ve fosforile olması ile reseptörler aktif hale gelmektedir [39, 41]. T $\beta$ RIII, ortak alıcı olarak görev görmektedir ve TGF- $\beta$  sinyal yolunda düzenleyici bir rolü vardır. Reseptörler sitokinler tarafından aktive edildikten sonra TGF- $\beta$  sinyali, SMAD bağımlı veya SMAD bağımsız yollar ile gen ekspresyonunu düzenlemeye başlamaktadır [41].

### **2.3.1.1. SMAD Bağımlı Sinyal Yolağı**

TGF- $\beta$  sinyalleri, SMAD ailesi olarak bilinen bir protein ailesi tarafından plazmadan çekirdeğe iletilmektedir. Omurgalılarda, SMAD ailesi en az 8 üyeden oluşmaktadır. Bunlar üç grupta kategorize edilmektedir; (i) SMAD1, SMAD2, SMAD3 ve SMAD5 içeren R-SMAD (reseptör tarafından düzenlenen SMAD); (ii) SMAD4'ü içeren Ko-SMAD; ve (iii) SMAD6 ve SMAD7'yi içeren antagonist ya da inhibitör SMAD [40]. TGF- $\beta$ 'nin, T $\beta$ RII'ye bağlanması ile aktiveleşen reseptör daha sonra T $\beta$ RI'i fosforile eder ve bu da aşağı akış hedefi olan SMAD2/3'ü fosforile etmektedir. SMAD2/3, korunmuş C-terminal SSXS (S, serin; X, herhangi bir amino asit) motifinden fosforile edilmektedir. Bu fosforilasyon MH2 alanında konformasyonel bir değişikliğe ve ardından reseptör ayrışmasına yol açmaktadır. Fosforile edilmiş SMAD2/3, SMAD4 ile heterodimerik kompleks oluşturmaktadır. Oluşan kompleks doğrudan Smad-bağlayıcı DNA elemanına bağlandığı çekirdeğe girer ve hedef genleri işlemeye geçirmek veya baskılamak için transkripsiyonel faktörleri tekrarlamaktadır [42].

### **2.3.1.2. SMAD Bağımsız Sinyal Yolağı**

TGF- $\beta$  sinyalinin SMAD'den bağımsız biçimleri de mevcuttur. T $\beta$ RII, sıkı bağlantıları ve hücre göçünü düzenleyen hücre polarite düzenleyici PAR6'yı doğrudan fosforile eder. Bu aktivasyondan sonra ERK1/2, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), Rho-benzeri GTPaz (RhoA), AKT/ fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3K) sinyal yolu kaskad üyelerini aktive ederek çekirdekdeki gen ekspresyonunu düzenlemektedir [40, 43, 44].



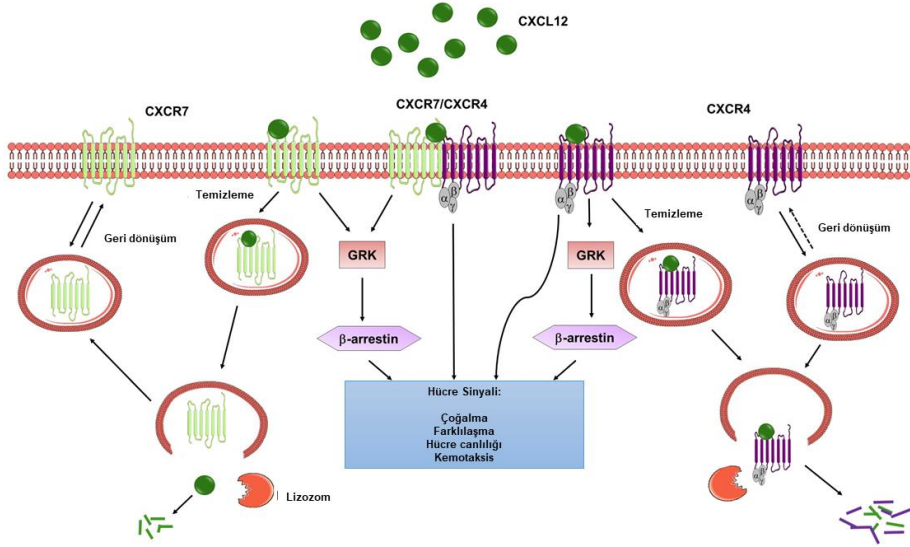
**Şekil 2.2.** TGF- $\beta$  sinyal yolağı [44] Smad bağımlı-Smad bağımsız sinyal yolağı

TGF- $\beta$  kanserde hem bir tümör baskılayıcı hem de tümör oluşumunu destekleyici olarak ikili bir rol oynamaktadır. Tümör büyümesinin erken evresinde, TGF- $\beta$  baskılayıcı olarak, hücre proliferasyonunu inhibe etmek için sikline bağımlı kinaz baskılama faktörleri ekspresyonunu indükleyebilir, bu da hücre döngüsünün durmasına neden olmaktadır ve hücre apoptozunu etkilemektedir. Öte yandan, ilerlemiş tümörlerde, TMÇ'deki TGF- $\beta$  sinyali, kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. TMÇ'deki hücreler tarafından salgılanan TGF- $\beta$ , hücre proliferasyonu, apoptoz ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) gibi kanserle ilgili birçok sürece müdahale ederek paradoksal olarak tümör büyümesini desteklemektedir [41, 45].

### 2.3.2. CXCL12 Sinyal Yolağı

Kemokinler, hematopoietik progenitör ve kök hücrelerin, endotel hücrelerinin ve çoğu lökositin göçünü aktive ettiği ve/veya indüklediği için embriyogenez, hematopoez, anjiyogenez ve enflamasyon dahil olmak üzere fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli bir rol oynamaktadır [46]. Kemotaktik sitokinler/

kemokinler, moleküler ağırlıkları 8-12 kD aralığında olan hedef hücre popülasyonlarının göçünü ve yapışmasını destekleyen küçük protein grubudur [47].



**Şekil 2.3.** CXCL12 sinyal yolağı [52]

Kemokinler, N-terminaldeki sistein kalıntılarının konumuna ve sayısına bağlı olarak XC, CC, CXC ve CX3C (C, sistein ve X, başka bir amino asit; X3, ardışık üç amino asit anlamına gelir) olmak üzere dört alt sınıfa ayrılmaktadır. Pek çok kemokin birden fazla reseptöre bağlanabilmektedir ve kemokin reseptörleri de birden fazla kemokine bağlanabilmektedir [48]. Kemokin reseptörleri, G protein-bağlı reseptör (GPCR) ailesine aittir ve iki alt gruba ayrılmaktadır: Geleneksel kemokin reseptörleri (XCR, CCR, CXCR) ve atipik kemokin reseptörü (CXCR7, ACKR veya RDC1 olarak bilinir) [49]. Her ikisi de ligand bağlanması üzerine G proteinlerinin ayrışmasına izin veren konformasyonel değişikliklere uğramaktadır [50].

### 2.3.2.1. CXCL12/CXCR4/CXCR7 Eksenli

Stromal hücre türevli faktör (SDF-1) olarak da bilinen CXCL12, ilk olarak 1993 yılında cDNA klonlama çalışmalarında tarif edilmiş ve daha sonra yapısı tanımlanmıştır [51]. CXCL12, insanlarda kromozom 10q11 üzerinden kodlanan

ve altı farklı izoforma (CXCL12  $\alpha$ - $\theta$ ) sahip bir homeostatik CXC kemokindir [47]. Monomerik ve dimerik formlarda bulunabilmektedir [50]. CXCL12, kemokin reseptör 4 (CXCR4) ve kemokin reseptör 7 (CXCR7)'ye bağlanmaktadır. CXCL12, CXCR4 için tek kemokin ligandır [47].

CXCL12, CXC motifinden hemen önce ELR (Glu-Leu-Arg) motifinin olup olmamasına göre alt sınıfa ayrılan CXC kemokin ailesindedir. ELR-pozitif CXC kemokinler proanjyogenik bir işleve sahipken, çoğu ELR-negatif CXC kemokinleri anjiyogenezi engelleme (anjiyostatik) özelliğine sahiptir. Bununla birlikte CXCL12, ELR-negatif olmasına karşın proanjyogeniktir [50].

Fusin olarak da bilinen CXCR4, plazma zarında monomer, dimer, oligomer veya nanokümler olarak bulunabilen 352 amino asitlik bir GPCR aile üyesidir [48]. CXCR4, meme, yumurtalık, glioma ve prostat dahil 23'ten fazla insan kanseri arasında en yaygın eksprese edilen kemokin reseptörüdür. Buna karşın normal dokulardaki ekspresyonu düşüktür veya yoktur. CXCL12 ligandının CXCR4'e bağlanması ile birlikte PI3K/AKT, ERK1/2, MAPK, Rho, cAMP sinyal yollarının aşağı regülasyonunu düzenleyerek kanser hücrelerinin hayatta kalmasında, göçünde, çoğalmasında rol oynamaktadır [47, 48].

Bir diğer CXCL12 reseptörü CXCR7'de bir GPCR aile üyesidir. CXCR7, DRYLAIV motifinde hafif bir modifikasyona sahiptir bu da G proteinin aktivasyonunu ve hücre içi  $Ca^{+2}$  salınımını engellemektedir. CXCR7, hücre içi sinyal iletimini  $\beta$ -arrestin molekülü aracılığı ile sağlamaktadır. CXCR7, memeli hücrelerde CXCL12'nin hücre içine alımı ve ortadan kaldırılmasında görev almaktadır. Bu sayede normal hücrelerde CXCL12 seviyelerini düşürmeye yardımcı olmaktadır. CXCL12, ACKR3'e CXCR4'ten daha yüksek afinite göstermektedir, ancak CXCL12'nin ACKR3 ile hem birleşme hem de ayrışma hızları, CXCR4'e göre daha yavaştır [48, 50].

CXCR4, CXCR7 ile heterodimerler oluşturabilmektedir. Heterodimer oluşturan reseptörler CXCL12 kaynaklı sinyalizasyonu G-bağımlı protein aracılığı ile başlatmaktadır [52].

Yukarıda verilen literatür bilgileri ışığında bu tez çalışmasında kanser hücreleri (MDA-MB-231, T98G) ile insan kemik iliği MKH'lerinin ko-kültürü sonrasında TGF- $\beta$  ve CXCL12 sinyal yollarındaki değişimin incelenmesi hedeflenmiştir.

Mevcut yayınlar arasında MKH'ler ile kanser hücrelerinin ko-kültürü sonrası bu hücrelerdeki TGF- $\beta$  ve CXCL12 sinyal yollarındaki değişimlerin ayrı ayrı ele alındığı çalışmalar bulunmaktadır. Fakat MKH'ler ile kanser hücrelerinin ko-kültürü sonrası iki hücrenin seçili sinyal yolları bakımından karşılaştırılmalı olarak incelendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, bu tez çalışması kapsamında TGF- $\beta$  sinyal yolağındaki değişimin değerlendirilmesi için aktif TGF- $\beta$  reseptör 1 (pTGF $\beta$ RI) ve aktif SMAD3 (pSMAD3) molekülleri; CXCL12 sinyal yolağı için ise aktif CXCR4 reseptör (pCXCR4) ve hücre içi molekül olan aktif ERK1/2 (pERK1/2) molekülleri hem kanser hücreleri hem de MKH hücreleri açısından incelenerek değişimlerin gözlenmesi hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kanser tedavisi için hücrenel tedavi yaklaşımlarında MKH'lerin potansiyel bir tedavi ajanı olarak kullanılmasına yönelik katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, bu tez çalışması kanser hücresi-MKH etkileşiminde farklı sinyal yollarının inceleneceği gelecekteki araştırmalara da kaynak sağlayacaktır.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

##### 3.1.1. Hücre Hatları ve Hücre Kültürü

Bu tez kapsamında insan kemik iliği MKH hattı, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı, T98G Glioblastoma hücre hattı kullanılmıştır. İnsan kemik iliği MKH hattı (Lonza, Pt-2501, Swiss) ticari olarak düşük pasajlarda satın alınmıştır. T98G Glioblastoma kanser hücreleri, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri laboratuvarımızdaki hücre bankasından temin edilmiştir (Hacettepe Üniversitesi/Fizyoloji ABD/ Hücre kültürü laboratuvarı).

İnsan kemik iliği MKH'leri, T25 flaska en az  $2 \times 10^5$  olacak şekilde MSCGM™ SingleQuots Supplement Kit (Lonza, PT-4105, Swiss) ile desteklenen MSCBM™ Basal Media (Lonza, PT-3238, Swiss) içerisinde  $37^{\circ}\text{C}$ , %95 hava ve %5  $\text{CO}_2$  içeren ortamda kültüre edilmiştir. Besiyeri 3-4 güne bir değiştirilmiştir. Hücre yoğunluğu %70-80'e ulaştığında hücrelerin bir kısmı pasajlanmış bir kısmı ise erken pasajlarda stoklama amacı ile dondurulmuştur. Ko-kültür çalışmalarında erken pasajlar kullanılmıştır [53].

T98G, MDA-MB-231 kanser hücreleri %10 FBS, 2 mM L-glutamine, %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 esansiyel olmayan amino asit içeren DMEM besiyeri içerisinde,  $37^{\circ}\text{C}$ , %95 hava ve %5  $\text{CO}_2$  nemli inkübatörde standart koşullarda kültüre edilmiştir.

##### 3.1.2. Ko-Kültür Yöntemi

TGF $\beta$  ve CXCL12 sinyal yollarını kanser hücreleri ve insan kemik iliği MKH'sinde karşılaştırmalı olarak incelemek için transwell sistemleri kullanılarak ko-kültür yapılmıştır. Transwell alanı ile kültür kabı yüzey alanının farklı olmasının hücre canlılığını etkileyip etkilenmeyeceğini değerlendirebilmek için hücre ekimi iki şekilde gerçekleştirilmiştir (**Şekil 3.1.**). Ko-kültür için 24 kuyulu kültür kapları ve 0,4 um gözenekli transwell'ler kullanılmıştır. T98G/ MDA-MB 231 kanser hücreleri ( $1,25 \times 10^4$  hücre/kuyucuk) ve insan kemik iliği MKH'leri ( $1,25 \times 10^4$  hücre/kuyucuk) 1:1 oranında MKH besiyeri/Kanser hücresi besiyeri olacak



şekilde ekilmiştir. 37°C, %95 hava ve %5 CO<sub>2</sub> nemli inkübatörde standart koşullarda kültüre edilmiştir [54]. Kontrol grubu olarak hücreler tek başına standart koşullarda kültüre edilmiştir. İnkübasyonun 4, 7 ve 10. gününde analizler gerçekleştirilmiştir. Fosfo-ERK1/2, hem CXCL12 hem de TGF-β sinyal yolağında aktifleşebilen bir hücre içi sinyal molekülüdür. Bu nedenle Fosfo-ERK1/2'nin, CXCL12 sinyal yolağının bir ürünü olduğunu göstermek amacıyla TGF-β sinyal yolağını inhibe etmek için TGFβRII/1 inhibitörü LY2109761 (Cayman, Cat. No. 15409) uygulanmıştır. Bu uygulama ko-kültür sırasında yapılmıştır. Total konsantrasyonu 1 uM /L olarak seçilmiştir [55, 56].



**Şekil 3.1.** Transwell ko-kültür sistemi şematik gösterimi

### 3.1.3 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-YI)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) – Canlılık Analizi

Ko-kültürde MKH ve kanser hücresi etkileşimini incelemek amacıyla öncelikle canlılık analizi deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla MTT testi yapılmıştır. MTT, kolorimetrik olarak hücre canlılığı analiz etmek için indirgeyici bir renklendirme ajanına (tetrazolyum tuzu) ve mitokondriyal dehidrojenaz aktivitelere dayanmaktadır [57].

İnsan kemik iliği MKH'leri ve kanser hücrelerinde 24, 4 ve 72 saatlerine ek olarak 4, 7 ve 10. gün de canlılık analizi yapılmıştır. Karar verilen inkübasyon süreleri sonrası MKH'ler ve kanser hücrelerin üzerindeki besiyeri alınmıştır ve hücrelerin üzerine %10 MTT içeren (nihai konsantrasyon 0,5 mg/ml) 200 ul besiyeri eklenerek karanlık ortamda 37°C'de, 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından MTT-besiyeri ortamdaki uzaklaştırılmıştır. 100 µL izopropil alkol ilavesiyle reaksiyon durdurulmuştur. Hücre canlılığı

spektrofotometrik olarak (ELISA plate reader, Biochrom, EZ Read 400, Cambridge) 570 nm dalga boyunda okunma yapılmıştır.

## 3.2. SİNYAL YOLAKLARININ İFADESİNİN İNCELENMESİ

### 3.2.1 İmmünofloresan Yöntemi

Ko-kültür sonrası hem insan kemik iliği MKH'lerde hem de kanser hücrelerindeki TGF- $\beta$  sinyal yolağındaki değişimi görüntülemek için aktif TGF $\beta$  reseptör 1 (pTGF $\beta$ RI) molekülleri ve çekirdeği görüntülemek için DAPI işaretlemesi yapılmıştır.

İmmünofloresan yöntemi aşamaları aşağıdaki gibidir;

1. Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler fosfat tamponlu salin (PBS) ile bir kez yıkanmıştır.
2. Hücrelerin üzerini kaplayacak şekilde -20°C'lik metanol eklenerek 15 dakika süreyle fiksasyon yapılmıştır. Bu sürenin sonunda metanol uzaklaştırılmıştır. Ardından hücreler 3 kez soğuk PBS ile yıkanmıştır.
3. Hücrelerin spesifik olmayan bağlanmasını engellemek için hücrelere, içinde %10 blocking serum içeren PBS solüsyon ile muamele edilmiştir ve 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda %10 blocking serum içeren PBS solüsyonu ortamdaki uzaklaştırılmıştır. 3 kez PBS ile yıkama yapılmıştır.
4. Hücrelerin üzerine yüzeyini kaplayacak şekilde, %1 BSA içeren PBS içinde 1:100 oranında hazırlanmış anti-TGF $\beta$ RI birincil antikoru solüsyonu (ST. Johns, Cat. No. STJ91351-100) eklenmiştir ve hücreler 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
5. İnkübasyonun sonunda birincil antikor solüsyonu uzaklaştırılmıştır. Her seferde 5'er dakika olmak üzere 3 kez PBS ile yıkama yapılmıştır.
6. Hücrelerin üzerine %1 BSA içeren PBS içinde 1 $\mu$ g/mL olacak şekilde hazırlanmış ikincil antikor (TGF- $\beta$  ve CXCL12 için Goat Anti-RabbitIgG H&L (AlexaFluor® 488) (ST. Johns, Cat. No. STJS000812) solüsyonu eklenmiştir. Karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyonun ardından ikincil antikor uzaklaştırılmıştır. Hücreler, her seferde 5 dakika olmak üzere 3 kez PBS ile yıkanmıştır.

8. Hücre çekirdeğinin işaretlenmesi amacıyla için 1 ug/mL olacak şekilde hazırlanan DAPI solüsyonu hücre yüzeyini kaplayacak şekilde eklenmiştir ve 1 dakika inkübe edilmiştir. DAPI solüsyonu ortamdaki uzaklaştırılmıştır ve hücreler 2-3 kez PBS ile yıkanmıştır.
9. Son olarak hücrelerin yüzeylerini kaplayacak şekilde mounting medium eklenmiştir.
10. Boyanan hücreler floresans aydınlatma (Olympus, Japan) ile inverted mikroskopta (Olympus IX70 490nm dalga boyunda Mikroskop, Japan) görüntülenmiştir.
11. Hücre sayımı **ImageJ** programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (**EK 2**).

### 3.2.2. İmmünohistokimya Yöntemi

Ko-kültür sonrası hem insan kemik iliği MKH'lerde hem de kanser hücrelerindeki CXCR12 sinyal yolağındaki değişimi görüntülemek için aktif CXCR4 reseptörü (pCXCR4) ve çekirdeği görüntülemek için hematoksilin-eozin yöntemi kullanılarak işaretleme yapılmıştır. Histostain® Plus Broad Specturum (DAB) (TF. Cat. No. 85-9643) kit kullanılmıştır.

İmmünohistokimya yöntemi aşamaları aşağıdaki gibidir;

1. Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Fosfat tamponlu salin-Tween™ 20 (PBST) ile hücrelerin yüzeyi yıkanmıştır.
2. Hücrelerin üzerine -20°C'lik metanol eklenmiştir ve 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda metanol uzaklaştırılmıştır. PBST ile 2 kez 5'er dakika yıkama yapılmıştır.
3. Hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde %3'lük hidrojen peroksidaz içeren PBS uygulanmıştır ve 5 dakika inkübe edilmiştir. PBST ile 3 kez 5'er dakika yıkama yapılmıştır.
4. Protein Blocking serum eklenerek hücreler 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır ardından PBST ile 3 kez 5'er dakika yıkama yapılmıştır.
5. %1'lik BSA ile 1:200 sulandırılmış birincil pCXCR4 (ST. Johns, Cat. No. STJ91077-100) antikorunu hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde eklenmiştir ve +4°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Birincil

antikor solüsyonu uzaklaştırılmış ve PBST ile 3 kez 5'er dakika yıkama yapılmıştır.

6. Hücrelerin üzerine yüzeyi kaplayacak şekilde ikincil antikör eklenmiştir ve 30 dakika inkübe edilmiştir. PBST ile 3 kez 5'er dakika yıkama yapılmıştır.
7. Hücrelere peroksidaz uygulaması yapılmıştır ve 30 dakika inkübe edilmiştir. PBST ile bir kez yıkama işlemi yapılmıştır.
8. Hücrelerin üzerine DAB eklenmiştir ve 5 dakika inkübe edilmiştir. Distile su ile 2 kez 5'er dakika al-ver yapılarak yıkama işlemi yapılmıştır.
9. Hematoksilen-eozin ile 10 sn çekirdek işaretlemesi yapılmıştır. Distile su ile birkaç kez yıkama işlemi yapılmıştır.
10. Boyanan hücreler floresans aydınlatma (Olympus, Japan) ile inverted mikroskopta (Olympus IX70 Mikroskop, Japan) görüntülenmiştir.
11. Hücre sayımı **ImageJ** programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (**EK 2**).

### 3.2.3. ELISA

Ko-kültür sonrasında insan kemik iliği MKH'leri ve kanser hücrelerinde TGF- $\beta$  ve CXCL12 sinyal yollarındaki hücre içi aktif moleküller olan, pERK1/2 ve pSMAD3 miktarını tayin etmek için Phospho-Smad3 (Ser423/425) Sandwich ELISA kit (Nepenthe, Cat. No. NE010722501) ve Human pERK1/2 ELISA Kit (Nepenthe, Cat. No. NE010722601) kullanılmıştır.

Protein izolasyonu ve miktar tayini için ko-kültür sonrası hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler PBS ile 2 defa yıkanmıştır. Ardından tripsin EDTA solüsyonu eklenmiştir ve 37°C'de 3-4 dakika inkübe edilerek hücrelerin kalkması sağlanmıştır. Kalkan hücreler 1.5 ml'lik ependorflara alınmıştır ve 800 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından hücreler 1 kez de PBS ile santrifüj edilerek yıkanmıştır. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Peletin üzerine 100 uL RİPA lizis tamponu eklenmiştir. Lizis tamponu içerisindeki hücreler buz içerisinde 30 dakika bekletilmiştir. Bekleme esnasında her 10 dakikada bir hücreler 130W gücündeki sonikatörde 20kHz frekans ve %50 genlikte 1'er dakika olmak üzere toplamda 3 kez sonike edilmiştir. Sonrasında +4°C'de maksimum hızda 30 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı faz steril, yeni ependorflara aktarılmıştır. Bradford analizi ile protein miktarı ölçülmüş ve ELISA analizi aşamasına geçilmiştir.

ELISA analiz aşamaları aşağıdaki gibidir;

1. Kit içeriklerine uygun örnekler ile standart çözeltiler hazırlanmıştır.
2. Kuyucuklara 50 µL standart solüsyonu ve 50 µL (40 ul örnek +10 ul antikor) örnek eklenmiştir.
3. Tüm kuyucuklara 50 µL streptavidin-HPR solüsyonu eklenmiştir ve örnekler 500 rpm'de çalışan karıştırıcı üzerinde (Shaker PSU 2T plus, Boeco, Germany) nazikçe karıştırılmıştır. 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa en az 350 µL 1X yıkama tampunu eklenmiştir ve her yıkamada 1 dakika beklenmiştir. Bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır.
5. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu A ve ardından substrat solüsyon B eklenmiştir. Karanlıkta 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyonunun ardından her bir kuyucuğa 50 µL durma solüsyonu eklenmiştir ve birkaç saniye hafifçe karıştırılmıştır.
7. Örnekler 450 nm'ye ayarlanmış spektrofotometre (Biochrom, EZ Read 400, Cambridge) kullanılarak okuma yapılmıştır.

### 3.3. İstatiksel Analiz

Analizler Statistical GraphPad Prism 5 paket programı ile yapılmıştır. Elde edilen verilerin normal dağılımları Shapiro–Wilk testi ile kontrol edilmiştir. Ko-kültür sonrası hücre canlılığı belirlenmesi için yapılacak canlılık testleri sonucu alınan verilerin normal dağılım gösteren grupları t-test kullanılarak incelenmiştir. Gruplar arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığı incelenmiştir. p değeri 0,05'ten küçükse farklılık anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Kanser Hücresi-İnsan Kemik İliği Mezenkimal Hücrelerinin Ko-Kültürü Sonrası MTT Sonuçları

Kanser hücreleri ve insan kemik iliği MKH'lerinin birbirleri ile etkileşimi sonucunda hücre canlılığındaki değişimi gözlemlemek için hücreler 24, 48 ve 72 saat ko-kültüre edilmiştir. Tez kapsamında tasarlanan 4, 7 ve 10. günlerdeki hücre canlılığındaki değişimlere de bakılmıştır.

24. saatte, kontrol T98G grubuna göre ko-kültür sonrası T98G grubunda hücre canlılığında bir azalma görülmüştür ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir (\*\*;  $p \leq 0,01$ ). Kontrol MDA-MB-231 grubu ile ko-kültüre edilen MDA-MB-231 hücreleri arasında hücre canlılığı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. T98G ile ko-kültüre edilen MKH'lerde, kontrol MKH'ye göre hücre canlılığı bakımından bir azalma gözlenmiş ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (\*;  $p \leq 0,05$ ). Aynı şekilde MDA-MB-231 ile ko-kültüre edilen MKH'lerde, kontrol MKH'ye göre hücre canlılığı bakımından bir azalma gözlenmiş ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (\*\*;  $p \leq 0,01$ ) (**Şekil 4.1.A**).

48. saatte kontrol T98G'ye göre ko-kültür sonrası T98G grubunda hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Hücre canlılığındaki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (\*\*\*) ( $p \leq 0,001$ ). Kontrol MDA-MB-231 ve ko-kültür sonrası MDA-MB-231 grubu arasında hücre canlılığı bakımından bir fark gözlenmemiştir. T98G ile ko-kültür sonrası MKH grubunda kontrole göre hücre canlılığı bakımından bir azalma gözlenirken, MDA-MB-231 ile ko-kültüre edilen MKH'lerde kontrole göre hücre canlılığı bakımından artma gözlenmiştir. Ancak bu azalma ve artma istatistiksel olarak anlamlı değildir (**Şekil 4.1.B**).

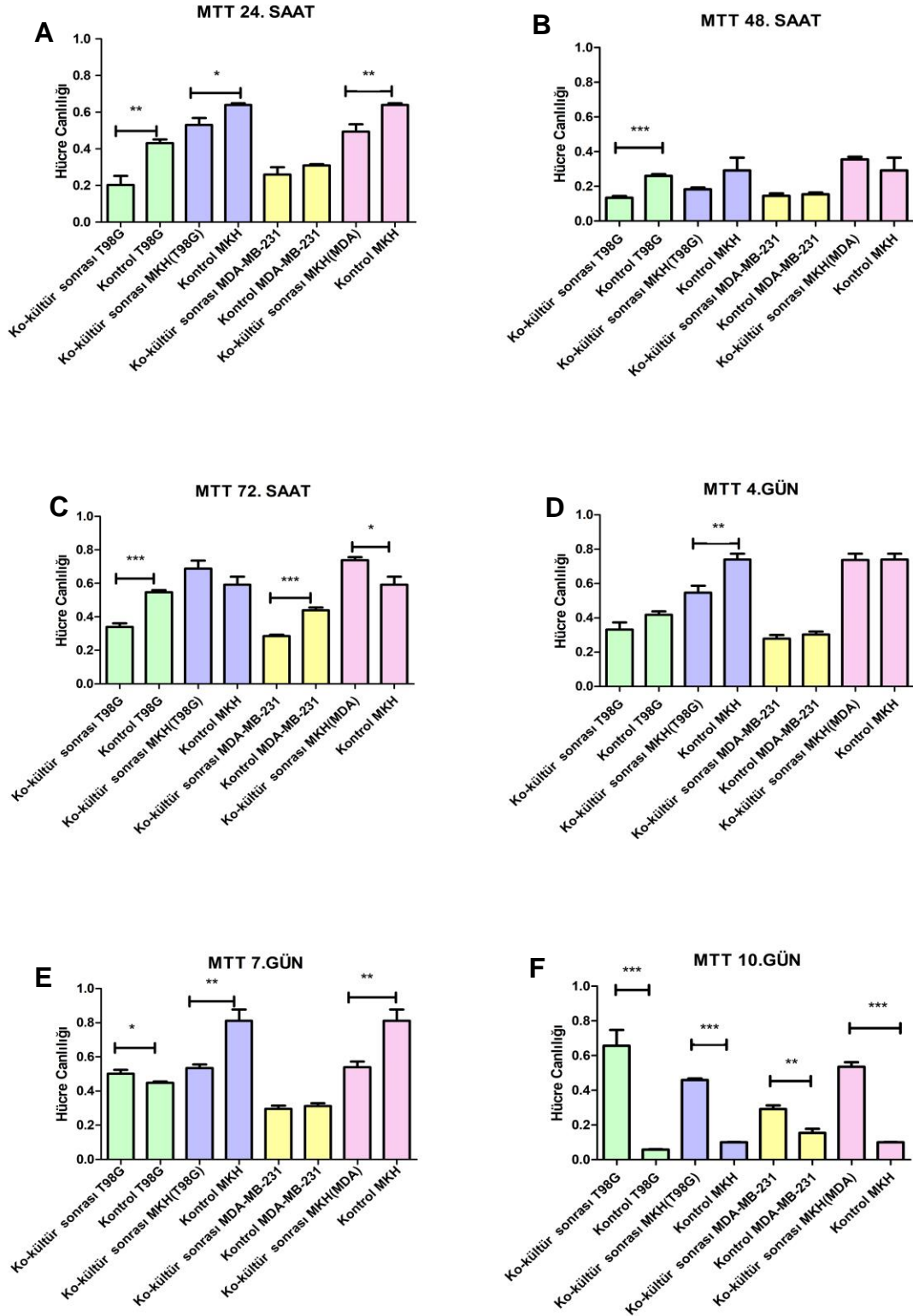
72. saatte kontrol T98G'ye göre ko-kültür sonrası T98G grubunda hücre canlılığı azaldığı gözlenmiştir. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır (\*\*\*) ( $p \leq 0,001$ ). Ko-kültür sonrası MDA-MB-231 grubunda hücre canlılığı kontrole göre azalmıştır ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır (\*\*\*) ( $p \leq 0,001$ ). T98G ve MDA-MB-231 ile ko-kültüre edilen MKH'lerin, kontrol MKH'ye göre hücre canlılığında artış gözlenmiştir. Bu artış sadece MDA-MB-231 ile ko-kültüre edilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (\*;  $p \leq 0,05$ ) (**Şekil 4.1.C**).

4.günde kontrol T98G'ye göre ko-kültür sonrası T98G grubunda hücre canlılığı azalma gösterirken, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ko-kültür sonrası MDA-MB-231 grubunda kontrol MDA-MB-231 grubunda hücre canlılığı bakımından bir fark gözlenmemiştir. T98G ile ko-kültüre edilen MKH'lerin kontrol MKH'ye göre hücre canlılığında bir azalma gözlenmiştir ve bu azalama istatistiksel olarak anlamlıdır (\*;  $p \leq 0,05$ ). MDA-MB-231 ile ko-kültüre edilen MKH'lerde kontrol MKH'ye göre hücre canlılığında bir fark gözlenmemiştir (**Şekil 4.1.D**).

7.günde ko-kültür sonrası T98G grubunda kontrol T98G'ye oranla hücre canlılığının arttığı ve artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. Kontrol MDA-MB-231 ile ko-kültür sonrası MDA-MB-231 grubundan hücre canlılığı bakımından bir farklılık gözlenmemiştir. T98G ve MDA-MB-231 ile ko-kültüre edilen MKH'lerin kontrol MKH'ye göre hücre canlılığında azalma gözlenmiştir. Bu azalmanın iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (\*\*;  $p \leq 0,01$ ) (**Şekil 4.1.E**).

10. günde MTT sonucunda ko-kültür gruplarında kontrol gruplarına oranla hücre canlılığının arttığı görülmüştür (**Şekil 4.1.F**). Bu artışın sebebi ko-kültür süresinin uzamasına bağlı olarak kontrol grubu hücrelerinin aşırı çoğalması ve yeterli alan kalmaması sebebiyle 7. günden itibaren dökülmeye başlaması olarak düşünülmüştür.

Devam eden analizlerde sinyal yolağı ifadesinin incelenmesi için yapılacak analizlerin gününü belirlemek amacıyla, ko-kültür sonrası grupların 3., 4. ve 7. günlerdeki verileri birbirleri ile kıyaslanarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Bu analizler sonucunda günler arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu nedenle protein analizlerinin 4.günde yapılmasına karar verilmiştir.



**Şekil 4.1.** Ko-kültür sonrası hücre canlılığı sonuçları A: T98G-MKH/MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası 24. saat hücre canlılığı sonucu, B: T98G-MKH/MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası 48. saat hücre canlılığı



sonucu, C: T98G-MKH/MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası 72. saat hücre canlılığı sonucu, D: T98G-MKH/MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası 4.gün hücre canlılığı sonucu, E: T98G-MKH/MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası 7.gün hücre canlılığı sonucu, F: T98G-MKH/MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası 10.gün hücre canlılığı. İstatistiksel analizler t-test yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (\*;  $p \leq 0,05$  \*\*;  $p \leq 0,01$  \*\*\*;  $P \leq 0,001$ )

#### **4.2. İmmünofloresans Yöntem Analizi Sonucu: Ko-kültür sonrası kanser hücrelerinde ve MKH'lerde Phospo-TGF $\beta$ RI (p TGF $\beta$ RI) ifadesi**

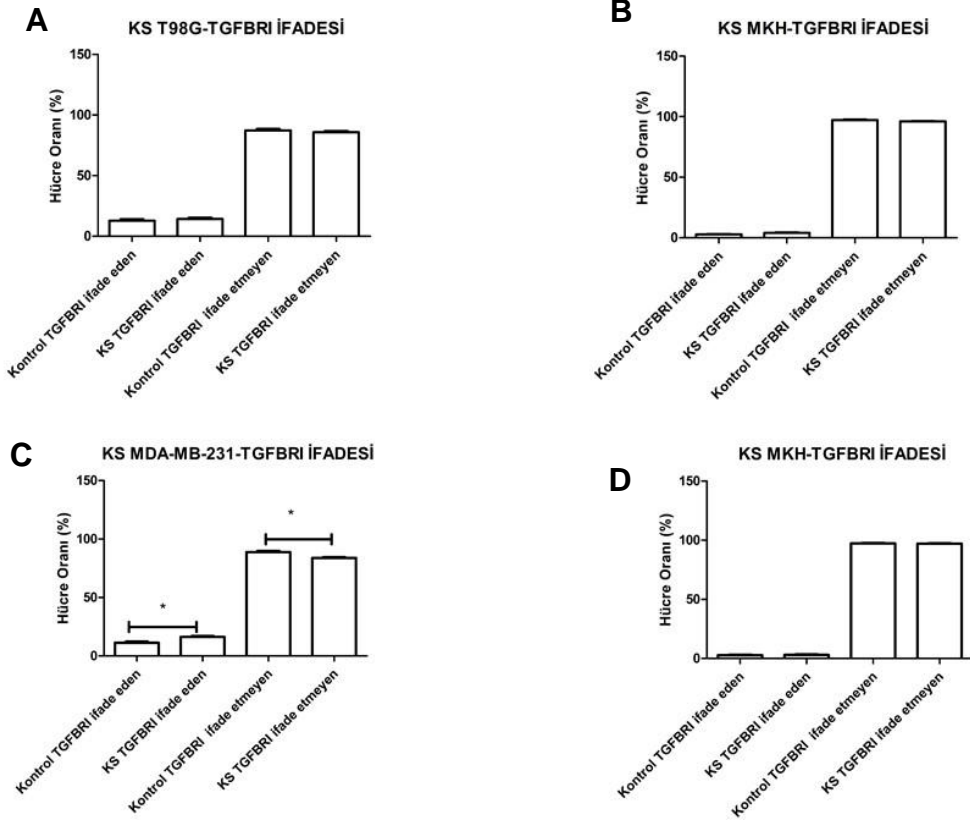
Kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonucunda hücrelerdeki pTGF $\beta$ RI ifadesindeki değişim incelenmiştir (**Şekil 4.3.**). Değerlendirilmesi yapılırken hücrelerin pTGF $\beta$ RI'yi ifadesi yönünden "ifade eden" ve "ifade etmeyen" olarak sınıflandırılma yapılmıştır. Bu sınıflandırma yapılırken sinyal yolağının bu hücrelerde normalde de var olduğu ve ifade edildiği göz önüne alınarak pTGF $\beta$ RI'yi zayıf ifade eden hücreler "ifade etmeyen" kategoride sayılmıştır. Hücre sayımı **ImageJ** programı kullanılarak dört farklı alanda, n=100 olacak gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımı ortalamaları **Çizelge 4.1.**'de verilmiştir. Ek olarak sayım sonunda hücrelerdeki pTGF $\beta$ RI ifadesinin yüzde (%) oranı hesaplanmıştır (**Şekil 4.2.**).

Yapılan analizler sonucunda T98G-MKH ko-kültürü sonrası kanser hücrelerinde ve MKH'lerde kontrol gruplarına göre pTGF $\beta$ RI ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir.

MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası, MDA-MB-231 kanser hücrelerinde ko-kültür sonrası pTGF $\beta$ RI ifadesinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (\*;  $p \leq 0,05$ ). MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası, MKH'lerde kontrol gruplarına göre pTGF $\beta$ RI ifadesinin değişmediği görülmüştür (**Çizelge 4.1.**).

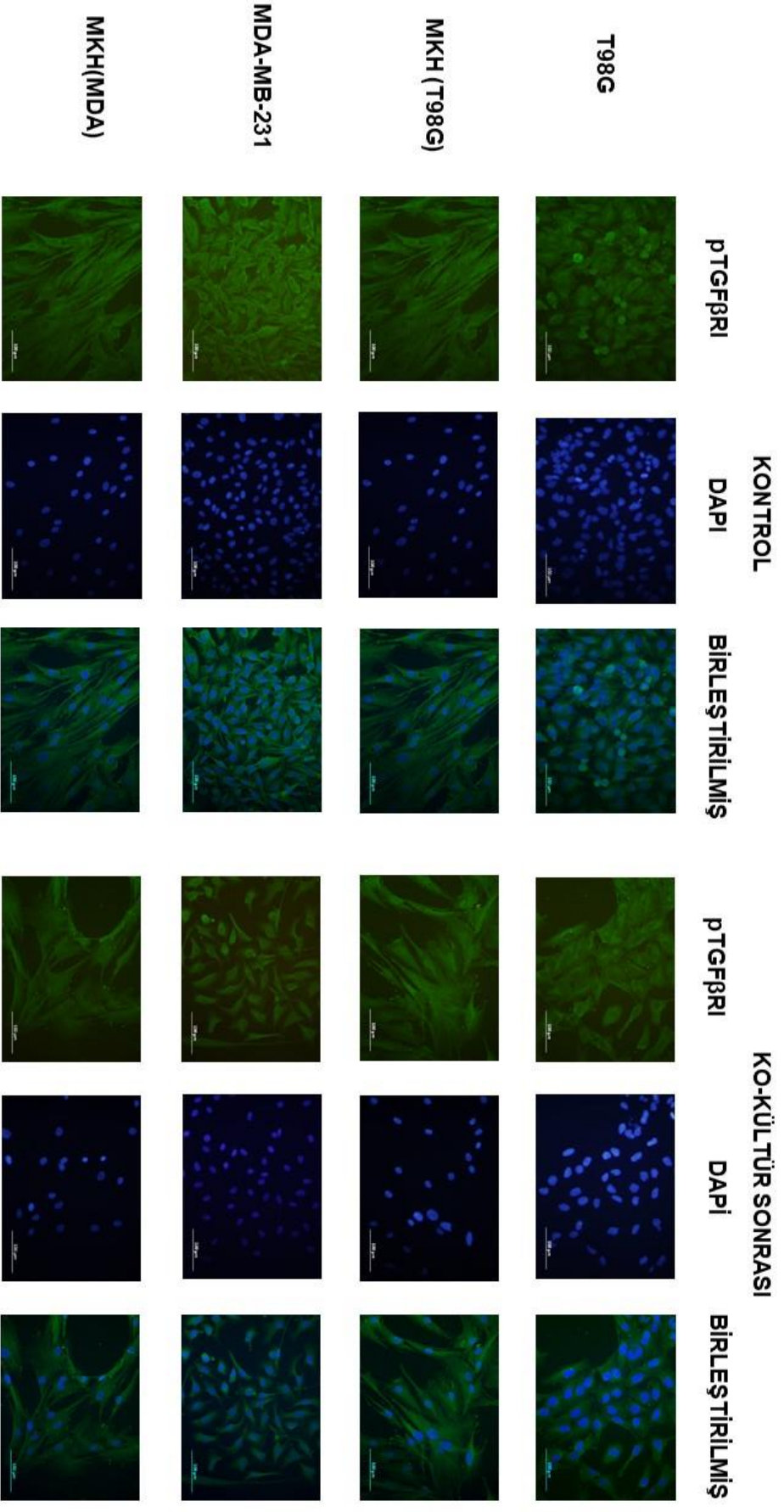
	TGFβRI ifade eden hücre sayısı	TGFβRI ifade etmeyen hücre sayısı
Kontrol T98G	12,75	87,25
Ko-kültür sonrası T98G	14,25	85,75
P değeri	<b>0.416</b>	<b>0,416</b>
Kontrol MKH	2,75	97,25
Ko-kültür sonrası MKH (T98G)	4	96
P değeri	<b>0.094</b>	<b>0,093</b>
Kontrol MDA-MB-231	11,25	88,75
Ko-kültür sonrası MDA-MB-231	16,25	83,75
P değeri	<b>*; p≤ 0,05</b>	<b>*; p≤ 0,05</b>
Kontrol MKH	2,75	97,25
Ko-kültür sonrası MKH (MDA-MB-231)	3	97
P değeri	<b>0.704</b>	<b>0.704</b>

**Çizelge 4.1.** Kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası 4. günde pTGFβR1 ifadesi (Değerler hücre sayısı olarak verilmiştir, \*, p≤ 0,05)



**Şekil 4.2.** Kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası 4. günde hücrelerdeki pTGFβR1 ifadesi; A ve B, T98G-MKH ko-kültürü sonrası hücrelerdeki pTGFβR1 ifadesi, C ve D, MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası

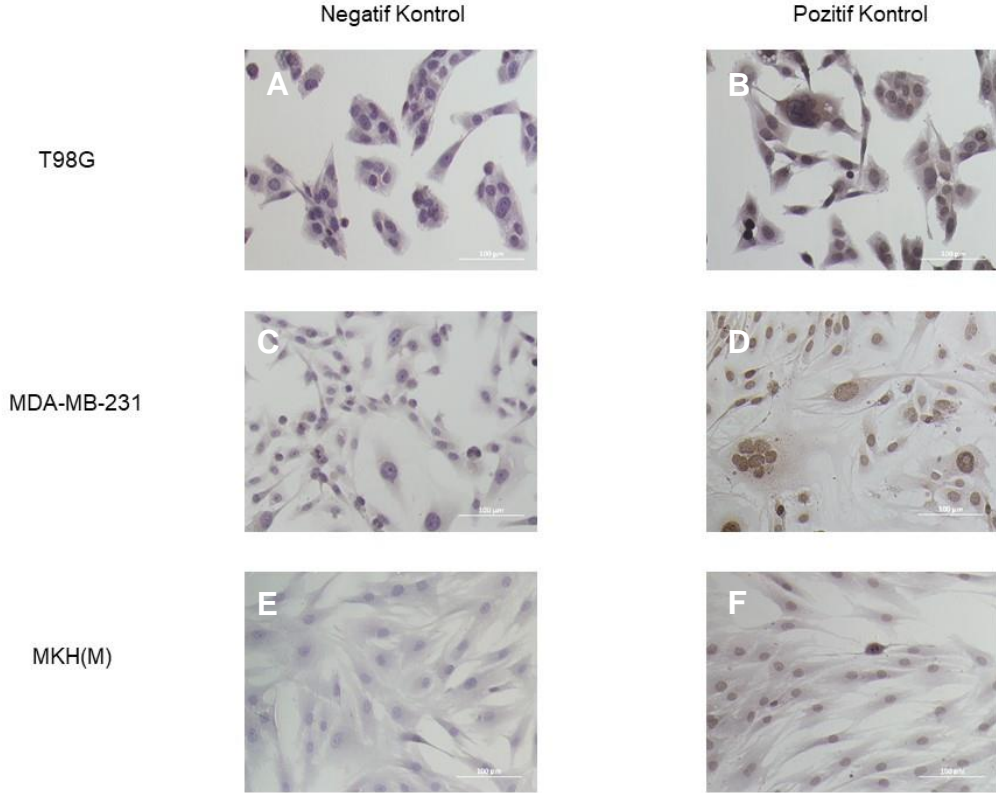
hücrelerdeki pTGF $\beta$ RI ifadesi (KS: ko-kültür sonrası) (Değerler % olarak verilmiştir, \*; p $\leq$  0,05)



**Şekil 4.3.** Kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası kanser hücreleri ve MKH'deki pTGFβR1'in ifadesin immünofloresans görüntüleri (OlympusIX70 Mikroskop, 20X)

### 4.3. İmmünohistokimyasal Analiz Sonucu: Ko-kültür sonrası kanser hücreleri ve MKH'lerde Phospho-CXCR4 (pCXCR4) reseptörünün ifadesi

Çalışma kapsamında kullanılan kanser hücrelerinde ve MKH'de pCXCR4 protein ifadesini değerlendirmek ve deney öncesi antikor optimizasyonunu sağlamak amacıyla kontrol yüzey işaretlemeleri yapılmıştır. Hücreler birincil antikorlarla negatif ve pozitif olarak işaretlenmiştir. Optimizasyon deneyleri sonucunda kanser hücrelerinde ve MKH'de farklı düzeylerde olmakla birlikte pCXCR4 reseptörünün bu hücrelerde ifade edildiği gösterilmiştir (**Şekil 4.4**).



**Şekil 4.4.** pCXCR4'ün kanser hücreleri ve MKH'deki ifadesi, A: T98G hücresi negatif kontrol, B: T98G hücresi pozitif kontrol, C: MDA-MB-231 hücresi negatif kontrol, D: MDA-MB-231 hücresi pozitif kontrol, E: MKH negatif kontrol, F: MKH pozitif kontrol (MKH: Mezenkimal Kök Hücre) (OlympusIX70 Mikroskop, 20X)

Kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası hücrelerdeki pCXCR4 ifadesinin değerlendirilmesi; ifade etmeyen (+), zayıf (++) , orta (+++) ve kuvvetli (++++ ) olarak hücrelerdeki ifadenin yoğunluğuna göre derecelendirilmiştir (**Çizelge 4.2**).

Toplamda n=100 ve dört tekrar olacak şekilde **ImageJ** programı kullanılarak pCXCR'ün kontrol grupları/ko-kültür sonrası kanser hücreleri ve MKH'deki ifadesi açısından değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir (**Şekil 4.6**). Ek olarak sayım sonunda hücrelerdeki pCXCR4 ifadesinin yüzde (%) oranı hesaplanmıştır. İfade düzeyindeki istatistiksel farklılıklar ko-kültür sonrası kanser hücrelerinin kontrol gruplarındaki ifade düzeyleri ile karşılaştırılması sonucu elde edilmiştir. (**Şekil 4.5**).

Bu değerlendirmeler sonucunda; T98G kanser hücre hattında ko-kültür sonrası, pCXCR4'ü ifade eden hücrelerin arttığı ve bu artışın zayıf düzeyde ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (\*\*\*, p≤ 0,001).

T98G ile ko-kültürü sonrası MKH'lerde, pCXCR4'ü ifade eden hücre sayısının arttığı ve bu artışın pCXCR4'ün zayıf düzeyde ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (\*\*\*, p≤ 0,001).

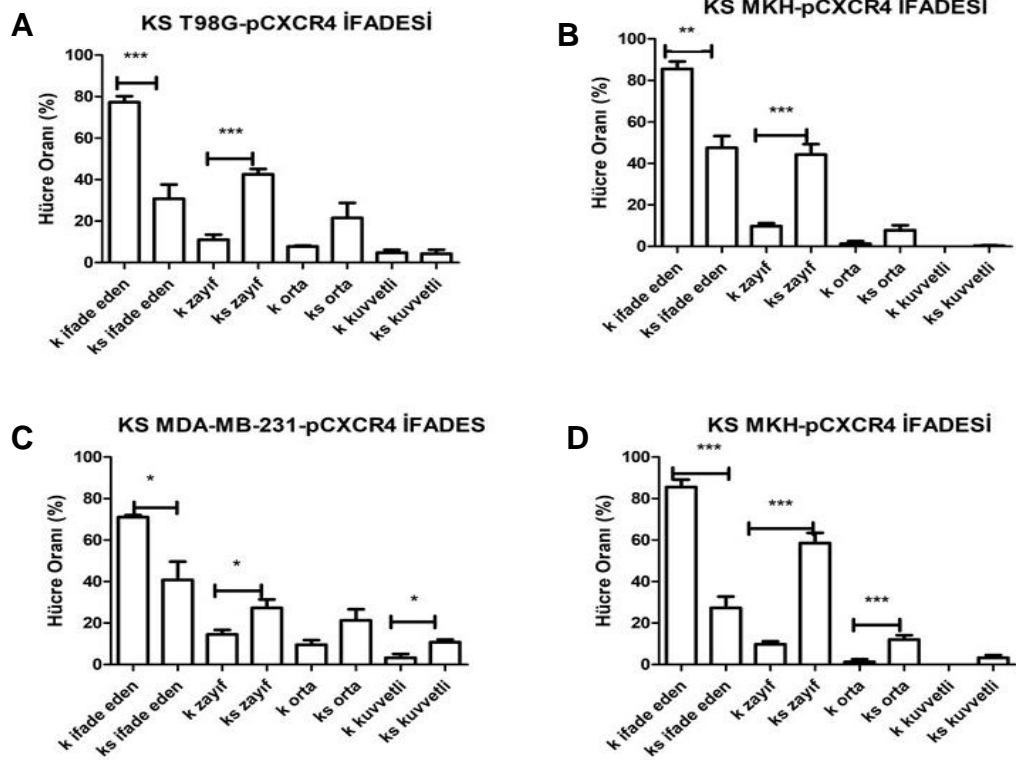
MDA-MB-231 kanser hücre hattında ko-kültür sonrasında pCXCR4'ü ifade eden hücre sayısı artmıştır. Arttan bu ifade, pCXCR4'ü zayıf ve kuvvetli ifade eden hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (\*; p≤ 0,05).

MDA-MB-231 ile ko-kültürü sonucu MKH'deki, pCXCR4'ü ifade eden hücre sayısı artmıştır ve pCXCR4'ü zayıf ve orta düzeyde ifade eden hücre sayısı artış istatistiksel olarak anlamlıdır (\*\*\*, p≤ 0,001).

CXCR4 İfadesi	+	++	+++	++++
Kontrol T98G	77,25	11	7,75	4,25
Ko-kültür sonrası T98G	30,75	43,5	21,5	4,75
P değeri	***; p≤ 0,001	***; p≤ 0,001	0.108	0.842
Kontrol MKH	86,5	9,75	0	0
Ko-kültür sonrası MKH (T98G)	47,5	45,5	7,75	0,25
P değeri	**; p≤ 0,01	***; p≤ 0,001	0.548	
Kontrol MDA-MB-231	71	14,5	9,5	3,25
Ko-kültür sonrası MDA-MB-231	40,75	27,5	21,5	10,75
P değeri	*; p≤ 0,05	*; p≤ 0,05	0.091	*; p≤ 0,05
Kontrol MKH	86,5	9,75	0	0
Ko-kültür sonrası MKH (MDA-MB-231)	27,5	56,75	11,25	0
P değeri	***; p≤ 0,001	***; p≤ 0,001	***; p≤ 0,001	

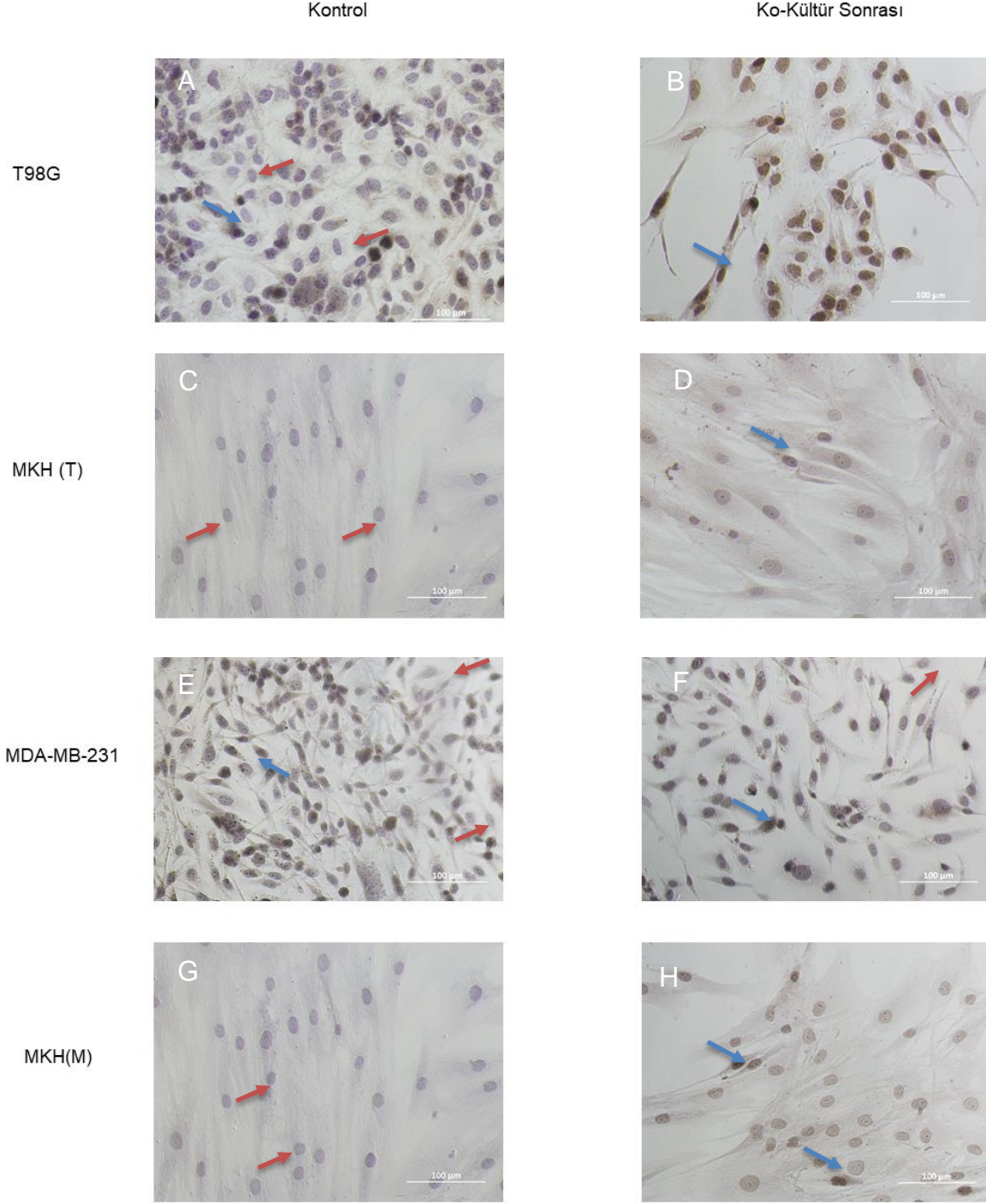
**Çizelge 4.2.** Ko-kültür sonrası 4. gündeki kanser hücreleri ve MKH'lerdeki pCXCR4 ifadesinin istatistiksel olarak incelenmesi (+; ifade

etmeyen, ++; zayıf, +++; orta, ++++; kuvvetli) (\*;  $p \leq 0,05$ , \*\*;  $p \leq 0,01$ , \*\*\*;  $P \leq 0,001$ )



**Şekil 4.5.** Kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası 4.günde hücrelerdeki pTGF $\beta$ R1 ifadesinin yüzde (%) değeri. A ve B, T98G-MKH ko-kültürü sonrası hücrelerdeki pCXCR4 ifadesinin yüzde değeri, C ve D, MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası hücrelerdeki pCXCR4 ifadesinin yüzde değeri (K: kontrol, KS: ko-kültür sonrası) (\*;  $p \leq 0,05$  \*\*;  $p \leq 0,01$  \*\*\*;  $P \leq 0,001$ )





**Şekil 4.6.** CXCR4'ün kontrol ve ko-kültür sonrası kanser hücreleri ve MKH'deki ifadesi (OlympusIX70 Mikroskop, 20X) **A:** Kontrol T98G hücresi, **B:** T98G/MKH ko-kültürü sonrası T98G hücresi **C:** Kontrol MKH hücresi **D:** T98G/MKH ko-kültürü sonrası MKH hücresi, **E:** Kontrol MDA-MB-231 hücresi, **F:** MDA-MB-231/MKH ko-kültürü sonrası MDA-MB-231 hücresi, **G:** Kontrol MKH hücresi, **H:** MDA-MB-231/MKH ko-kültür sonrası MKH



hücresi, Kırmızı okla gösterilen hücreler pCXCR4 negatif, mavi okla gösterilen hücreler pCXCR4 pozitif

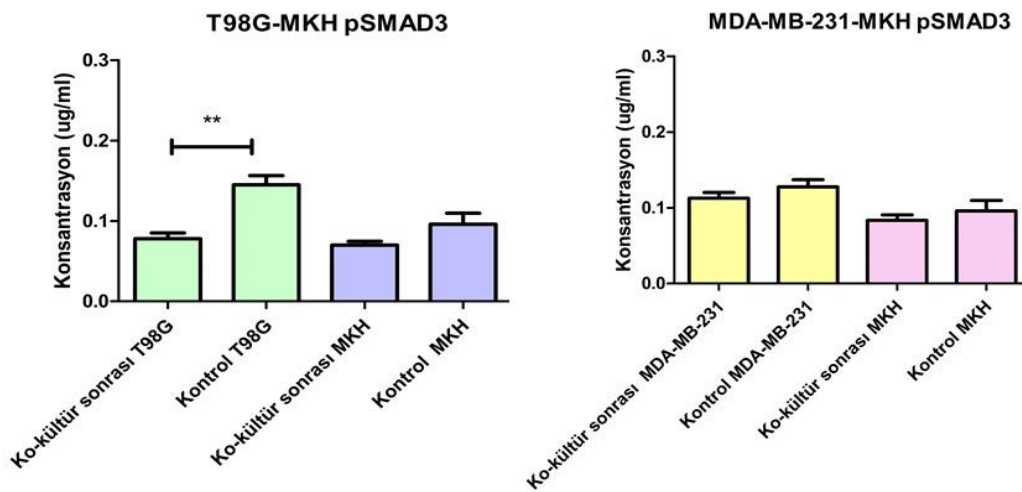
#### 4.4. Ko-kültür sonrası pSMAD3'ün kanser hücreleri ve insan MKH'lerindeki ifadesi

Kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası TGF- $\beta$  sinyal yolundaki değişimi incelemek için pTGF $\beta$ RI ifadesine yanında hücre içi sinyal yolu molekülü olan pSMAD3'ün ko-kültür sonrası hücrelerdeki ifadesi ELISA yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir (**Şekil 4.7.**).

T98G-MKH ko-kültürü sonrası T98G hücrelerinde kontrol hücre gruplarına oranla pSMAD3 ifadesinin azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (\*\*;  $p \leq 0,01$ ). T98G-MKH ko-kültürü sonrası MKH'lerde pSMAD3 ifadesinin azaldığı ancak istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği görülmüştür.

MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol hücre gruplarına oranla pSMAD3 ifadesinin azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği görülmüştür. MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası MKH'lerde pSMAD3 ifadesinin azaldığı ancak bu azalmanın da istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği görülmüştür.

Bu sonuçlar ko-kültür sonrası kanser hücreleri ve MKH'lerdeki pTGF $\beta$ RI ifadesindeki değişim ile de benzerlik göstermektedir (**Çizelge 4.1.**)



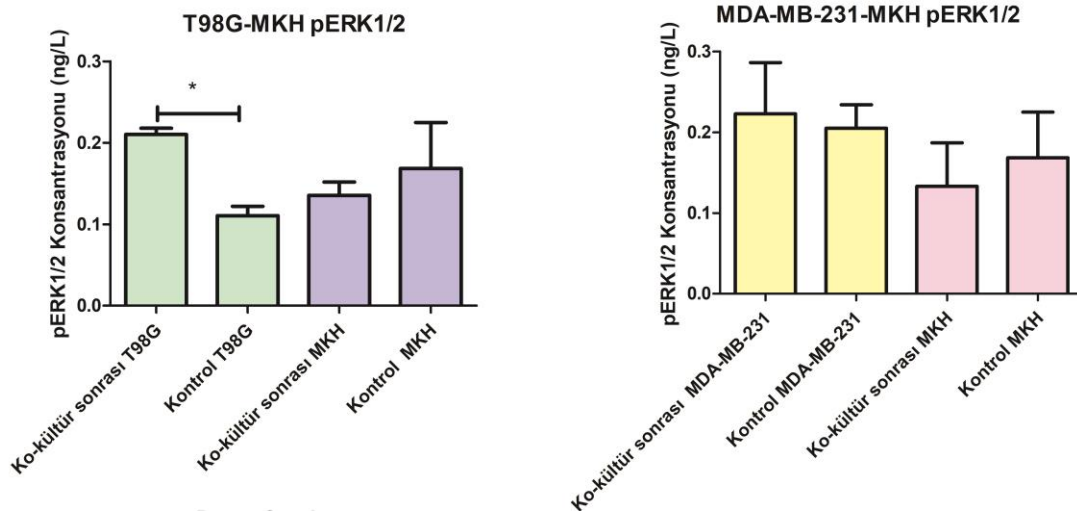
**Şekil 4.7.** Kanser hücresi-MKH hücresi ko-kültürü sonrası 4.gündeki kanser hücreleri, MKH'ler ve kontrol gruplarındaki pSMAD3 ifadesi

#### 4.5. Ko-kültür sonrası pERK1/2'ün kanser hücreleri ve insan MKH'lerindeki ifadesi

Kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası CXCL12 sinyal yolundaki değişimi incelemek için pCXCR4 ifadesine ek olarak hücre içi sinyal molekülü olan pERK1/2 molekülünün ko-kültür sonrası hücrelerdeki ifadesi ELISA yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir (**Şekil 4.8.**).

T98G-MKH ko-kültürü sonrası T98G hücrelerinde kontrol hücre gruplarına oranla pERK1/2 ifadesinin arttığı ve bu artmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (\*;  $p \leq 0,05$ ). T98G-MKH ko-kültürü sonrası MKH'lerde pERK1/2 ifadesinin azaldığı ancak istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği görülmüştür.

MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol hücre gruplarına oranla pERK1/2 ifadesinin arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği görülmüştür. MDA-MB-231-MKH ko-kültürü sonrası MKH'lerde pERK1/2 ifadesinin azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği görülmüştür.



**Şekil 4.8.** Kanser hücresi-MKH hücresi ko-kültürü sonrası 4.gün kanser hücreleri, MKH'ler ve kontrol gruplarındaki pERK1/2 ifadesi (ng/L)

## 5. TARTIŞMA

Kanser dünyada önde gelen ölüm sebeplerinden biridir. Kanser meydana gelme süreci “karsinogenez” olarak tanımlanmaktadır. Bu süreç genetik/epigenetik faktörler ve TMÇ’de hücrelerin birbiriyle etkileşimi sonucunda hücrelerin kötü huylu özellik kazanmasıyla meydana gelmektedir [3]. TMÇ; kanser hücresi, MKH, endotel hücreler, perisit hücreleri, bağışıklık elemanları, ekstrasellüler matriks elemanları, kemokinler, sitokinler ve büyüme faktörlerini içermektedir [7, 8]. Sağlıklı durumda MKH’ler, salgıladıkları biyoaktif faktörler aracılığı ile doku yenilenmesinde, onarımında ve bağışıklık hücrelerinin regülasyonunda rol oynamaktadır. Travma gibi durumlarda hasarlı dokulara da göç edebilmektedir. Bununla birlikte TMÇ’de tümör baskılayıcı ya da destekleyici rol oynayabilmektedir. MKH’lerin, TMÇ ile etkileşimi tam olarak açıklığa kavuşmamıştır ve bu etkileşimin mekanizmaları oldukça karmaşık aynı zamanda değişkendir [28]. Ayrıca TGF-  $\beta$ , CXCL12, PI3K/AKT, ERK, TRAIL, IFN, STAT gibi sinyal yollarının bu etkileşimde etkin rol oynadığı bilinmektedir [31, 35, 38].

Kanser hücresi-MKH etkileşimi sonucu aktifleşen farklı mekanizmaların olmasına karşın bu tez kapsamında TGF- $\beta$  ve CXCL12 sinyal yollarındaki değişimin analiz edilmesi hedeflenmiştir. TGF- $\beta$  sinyal yolağındaki değişimin değerlendirilmesi için aktif TGF $\beta$  reseptör 1 (pTGF $\beta$ RI) ve aktif SMAD3 (pSMAD3) molekülleri; CXCL12 sinyal yolağındaki değişimin değerlendirilmesi için aktif CXCR4 reseptör (pCXCR4) ve aktif ERK1/2 (pERK1/2) molekülleri incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında MKH’lerle etkileşimi incelenen iki tip kanser türü bulunmaktadır. Birincisi; meme kanseri, yüksek ölüm ve hastalık oranı nedeniyle kadınlar arasında önde gelen sağlık sorunudur [58]. Meme kanseri hücreleri, yüzeyinde bulundurduğu östrojen (ER $\alpha$ ) veya progesteron (PR) reseptörleri ve insan epidermal büyüme faktörü 2 (ERBB2; eski adıyla HER2)’ye göre üç ana alt gruba ayrılmaktadır. Üçlü negatif meme kanseri (MDA-MB-231) diğer iki alt türe göre daha şiddetli ilerleyen ve metastaz özelliği daha fazladır [19]. İkincisi: glioblastomadır. DSÖ tarafından IV. derece merkezi sinir sistemi tümörü olarak tanımlanmaktadır. Bu kanser türü de oldukça şiddetli semptomlarla ilerleyen özellik göstermektedir. Mevcut tedaviler arasında, cerrahi işlem sonrası radyoterapi ve kemoterapi dışında etkin alternatif tedavi yöntemleri bulunmamaktadır. Mevcut tedavilerde sağ kalım oranı 14 ay gibi bir süredir.

Tedaviye yönelik alternatif yöntemler denenmekte ve etkinliği incelenmektedir. Bu yöntemlerden biri de MKH'lerin glioblastomalar ile etkileşimi üzerine yapılan çalışmalardır [59]. Kanserde sinyal molekülleri ifadesindeki değişimin tümör destekleyici veya baskılayıcı özellikte olabileceği bilinmektedir [60]. Çalışmamızda MKH'lerin glioblastoma ve meme kanseri canlılığına ve hücreyel sinyal yollarına etkisini değerlendirmek ve tedaviye yönelik alternatif bir kaynak sağlamak amacıyla T98G/MDA-MB-231 ve MKH hücreleri ko-kültüre edilmiş ve ko-kültür sonrası TGF-  $\beta$  ve CXCL12 sinyal yollarının değişimi incelenmiştir.

Çalışmamızda kullanılan ko-kültür sisteminde hücre-hücre etkileşiminde ortaya çıkan hücre canlılığındaki değişiklikleri analiz etmek amacıyla kanser hücreleri ve MKH'ler transwell sistemi kullanılarak ko-kültür edilmiştir. Transwell ve kültür kabı alanı farklı olduğu için bu farkın hücre canlılığını etkileyip-etkilemediğini anlamak amacıyla ko-kültür sistemi iki şekilde oluşturulmuştur (**Şekil 3.1**). Ko-kültür sistemi ile hücre canlılığında oluşan değişikliklerin incelenmesi için MTT yöntemi kullanılmıştır. 24., 48., ve 72. saatte, 4., 7., ve 10. günlerdeki hücre canlılığındaki değişim analiz edilmiştir. Ko-kültür sisteminde, transwell ve kültür kabı alan farklılığından hücre canlılığının etkilenmediğini göstermek amacıyla yapılan MTT analizleri sonucunda her iki durum arasında canlılık açısından bir fark olmadığı görülmüştür. Bu nedenle Şekil 3.1.'de gösterilen ko-kültür sistemlerinden birinci sistem kullanılarak devam eden deneyler yapılmıştır.

Katharina M. ve ark. tarafından yapılan çalışmada MDA-MB-231 kanser hücresi-MKH transwell ko-kültürü sonrası MKH'lerin kanser hücrelerinin canlılığının artışı uyarmadığını ya da bu uyarının çok az olduğunu öne sürülmüştür [61]. Yang, C. ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, insan kemik iliği kökenli ve göbek kordonu kökenli MKH'lerden elde edilen şartlandırılmış ortamın insan glioblastoma hücrelerinin çoğalmasında önemli ölçüde engellediğini ve glioblastoma hücrelerinde apoptozunu indüklediği gösterilmiştir [62]. Bu tez kapsamında seçilen ko-kültür sisteminde hücrelerin bulunduğu yüzeydeki farklılığın hücre canlılığını etkilemediği görülmüştür. Ardından günlere göre hücre canlılığı karşılaştırılması yapılmıştır. Kanseri hücresi-MKH ko-kültürü sonrası yapılan MTT analizi sonucunda MKH'lerin kanser hücrelerinin canlılığını 24., 48., 72. saatte ve 4. günde anlamlı ölçüde baskıladığı görülmüştür. 7.günde T98G/MKH ko-kültürü sonrası T98G grubunda hücre canlılığının artmasına

karşın MDA-MB-231 hücrelerinin MKH ile ko-kültür sonrası hücre canlılığının kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Bulduğumuz sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Canlılıktaki bu azalma MKH'lerin, kanser hücrelerinin çoğalmasını etkileyen etkin faktörler salgılamakta olduğunu göstermektedir. Khalil C. ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, MKH ve MKH'lerden elde edilen şartlandırılmış ortam ile yumurtalık kanseri hücreleri (OVCAR3, CAOV3, IGROV3 ve SKOV3) ko-kültür edilmiştir. Aynı çalışmada ko-kültür sonrası MKH'lerden salgılanan metalloproteinazın doku inhibitörü (TIMP) faktörü aracılığı ile kanser hücrelerinde canlılığın azaldığı ve apoptozun uyarıldığı gösterilmiştir [63]. 2021'de Basmaeil Y. ve ark. tarafından yapılan benzer bir çalışmada, MKH/ MKH'den elde edilmiş şartlandırılmış ortam ile ko-kültüre edilen MDA231 kanser hücrelerinde, hücre canlılığının azaldığı gösterilmiştir [64]. Bu tez kapsamında ayrıca literatürde yapılan ko-kültür çalışmalarında bulunmayan/ az değinilen ko-kültür sonrası MKH hücre canlılığında oluşan değişimler de analiz edilmiştir. Ko-kültür sonrası MKH hücre canlılığının kontrol MKH'ye göre 48. ve 72. saatte arttığı ancak 4. ve 7. günde azalmaya başladığı görülmüştür. Jotzu C. ve ark. yaptıkları çalışmada, MKH-kanser hücresi ko-kültür sonrası MKH'lerde TGFβRII reseptörlerini ifade ettiğini ve hücre içi sinyal molekülü pSMAD ifadesinin arttığını göstermiştir. Aynı çalışmada bu sinyal yolunun MKH'lerin kansinoma ilişkili fibroblastlara farklılaşmasını indüklediğini ileri sürmüşlerdir [65]. MTT analizi sonuçları incelendiğinde 3., 4., ve 7. gündeki ko-kültür sonrası hücre canlılığı karşılaştırılmıştır ve bu zamanlar açısından hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür. Bu nedenle sinyal yolu analizlerinin 4. günde yapılmasına karar verilmiştir.

TGF-β sinyal yolağı evrimsel olarak korunmuş hücresel farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü, hücre adezyonu, hareketliliği, yetişkin doku homeostazı ve embriyogenezi kaplayan geniş bir hücresel görev ağını kontrol eden çeşitli büyüme faktörlerini içermektedir [39] ve tez kapsamında bu özellikleri nedeniyle analiz edilmesi amaçlanmıştır. TGF-β, hücre içinde SMAD bağımlı ve SMAD bağımsız sinyal yolağını aktive edebilmektedir [42]. Çalışmamızda özellikle aktif TGFβRI ve aktif SMAD3 molekülleri üzerinde durulmuştur.

Wu ve ark. 2019'da yaptıkları çalışmada insan yağ doku kökenli MKH'leri meme kanseri hücreleri (MCF-7) ile ko-kültüre etmiş ve TGFβ/Smad-PI3K/Akt yolakları

ile çapraz etkileşime girerek meme kanseri hücrelerinin invazivliğini ve migrasyonunu arttırdığını göstermiştir. Ayrıca ko-kültür sonrası meme kanser hücre hattında pSMAD2/3 ifadesinin arttığını göstermişlerdir [38]. Çalışmamız kapsamında kullandığımız meme kanser hücresi (MDA-MB-231)-MKH hücresi ko-kültür sonrası meme kanseri hücrelerinde TGFβRI'in ifadesinin artmasına karşılık pSMAD3 ifadesinde bir artış olmadığı gözlemlenmiştir. T98G hücrelerinde ise TGFβRI'in ifadesinde bir artış gözlemlenmiştir ancak pSMAD3 ifadesinde bir değişim olmamıştır. T98G hücrelerinde TGFβRI'in ifadesinin artmasına karşılık pSMAD3 ifadesinin değişmemesinin sebebi TGF-β sinyal yolağında "smad bağımsız" yollardan biri üzerinden gen ifadesini düzenlediği düşünülmektedir [42]. Çalışmamızdan farklı olarak, Xu Z. ve ark. gerçekleştirdikleri çalışmada MKH-kolorektal kanser hücrelerinin (SW620, HCT116) ko-kültür sonucunda MKH'lerden salgılanan TGF-β'nin kanser hücrelerinde SMAD2, SMAD3 ifadesinin arttığını göstermişlerdir [66]. Literatürde glioblastoma (T98G)-MKH ko-kültür sonrası incelenen pERK1/2, FAK, VEGF, TRAIL gibi sinyal yolları bulunmakla birlikte [59] çalışmalar arasında doğrudan TGF-β sinyal yolağı üzerine yapılan bir araştırma bulunmamaktadır. Bu bağlamda çalışmamız özgün değer taşımaktadır.

Kanser hücreleri ile ko-kültür sonrası MKH'lerdeki TGFβRI ifadesi analiz edildiğinde, ko-kültür sonrası MKH'lerde TGFβRI ifadesinde bir değişiklik olmadığı ancak pSMAD3 ifadesinde ko-kültür sonrası MKH'lerde azalma olduğu görülmüştür. Çalışmamıza paralel olarak, Paino L. ve ark. tarafından yapılan çalışmada MCF7 ve SAOS2 kanser hücreleri ile ko-kültür sonrasında MKH'lerde pSMAD2/3 ifadesinin kontrol grubuna oranla azaldığını gösterilmiştir [67].

CXCL12, bir kemokin molekülüdür ve stromal hücreler, fibroblastlar, epitel hücreler tarafından çok çeşitli dokularda salgılanmaktadır. CXCL12'nin, bağışıklık hücrelerinin doku içindeki inflamasyon alanına alımına aracılık ettiği bilinmektedir [68]. Buna ek olarak hücrelerin hayatta kalmasını, çoğalmasını, göçünü ve gen transkripsiyonunu düzenleyen PI3K/AKT, ERK1/2, MAPK, Rho, cAMP gibi çeşitli hücre içi sinyal yollarının aşağı regülasyonunu düzenlemektedir [47, 69]. Literatürde CXCR4 reseptörünün, hücre ölümünü düzenleyen Bcl-2 aile üyelerini, PI3K/AKT/NF-κβ gibi sinyal yollarını

düzenleyerek kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğine dair çalışmalar mevcuttur [70, 71]

Rhodes LV. ve ark. tarafından yapılan çalışmada meme kanser hücresi (MCF-7)-MKH ko-kültürü sonrası CXCL12/CXCR4 sinyal yolu üzerinden kanser hücrelerinin hayatta kalmasını ve migrasyon potansiyelini arttırdığı bulunmuştur [72]. Çalışmamız kapsamında incelediğimiz sinyal yollarında pERK1/2' hem CXCL12 hem de TGF- $\beta$  sinyal yolağında aktifleşebilen bir hücre içi sinyal molekülüdür [44, 48]. pERK1/2'nin CXCL12 sinyal yolağının bir ürünü olduğunu göstermek amacıyla ko-kültür sırasında TGF $\beta$ RII/1 inhibitörü LY2109761 kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında MDA-MB-231 meme kanseri-MKH ko-kültürü sonucu pCXCR4'ün kanser hücrelerinde arttığı görülmüştür ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Hücre içi sinyal molekülü pERK1/2 ifadesinin de benzer şekilde meme kanser hücre hattında arttığı görülmüştür ancak artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermemektedir. Ayrıca ko-kültürde MDA-MB-231 hücrelerinde canlılıkta bir azalma söz konusudur. Bu durum reseptörü aktive olan CXCL12/CXCR4 sinyal yolunun hücre içi aktif moleküllerinin (ERK1/2) miktarındaki azalmasının MKH'ler ile etkileşimi sonucu olduğunu düşündürmektedir.

T98G-MKH ko-kültürü sonrası CXCL12 sinyal yolağındaki aktif moleküllerdeki değişim incelendiğinde, ko-kültür sonrası T98G grubunda kontrol grubuna kıyasla pCXCR4 ifadesinin arttığı görülmüştür. pCXCR4'ün hücre içi sinyal molekülü pERK1/2'nin ko-kültür sonrası T98G hücre hattındaki ifadesinin kontrol grubundaki ifadesine oranla arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Pavon L.F. ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, glioblastoma hücrelerinde CXCL12 molekülünün arttığı ve bu molekülün MKH'lerin CD133<sup>+</sup> glioblastoma kök hücresine doğru hareketine aracılık ettiği gösterilmiştir [73].

Kanser hücreleri ile ko-kültür sonrası MKH'lerde CXCL12/CXCR4 sinyal yolağının aktivasyonu incelendiğinde; MKH'lerde pCXCR4 zayıf ve orta düzeydeki ifadesinin önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Buna karşın hücre içi sinyal molekülü pERK1/2 ko-kültür sonrası MKH'lerde kontrole göre kıyasla azalmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlılık göstermemektedir. Literatürdeki çalışmalar MKH'lerdeki pCXCR4 ifadesinin artmasının nedeni

olarak TMÇ'de tümör hücrelerinden kaynaklanan CXCL12'e vurgu yapmaktadır [74]. Kanser hücreleri ve MKH'lerde pCXCR4 ve aşağı akış molekülü pERK1/2 artmasına karşılık hücre canlılığı analiz sonuçları MKH'lerin kanser hücrelerinin, hücre canlılığını baskıladığını göstermiştir. Lou F. ve ark. yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak, MKH'lerin prostat kanseri hücrelerinin CXCR4 aracılı hücre canlılığını ve göçünü arttırdığını göstermiştir [75]. Bulgularımız sonucunda kanser hücrelerinde ve MKH'lerde pCXCR4 ifadesinin ve devamında pERK1/2 ifadesinin arttığı gözlenmiştir. MKH'lerdeki pCXCR4 artması sonucu, tümürlü bölgede kaldıkları ve salgıladıkları CXCL12 molekülleri aracılığı ile kanser hücrelerinde pCXCR4 ifadesini arttırdıkları görülmüştür. pCXCR4 aktivitesindeki bu artışın kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği ve bunun sonucunda kanser hücrelerinin hayatta kalmasını baskıladığı düşünülmektedir [70] [71]. CXCL12 sinyal yolağındaki protein ifadelerindeki değişimin hücre canlılığını baskıladığı varsayımı MTT sonucundaki hücre canlılığı verilerimiz ile paralellik göstermektedir.

MKH'lerin, doku uygunluğu ve rejeneratif etkileri düşünüldüğünde kanser tedavisine yönelik geliştirilecek tedavi yöntemleri için arasında oldukça önemli bir potansiyel taşımaktadır. Chartouni A. ve ark. 2023'de yayınladıkları çalışmada, kanser tedavisinde terapötik genlerin iletiminde taşıyıcı ajan olarak MKH'lerin potansiyeline vurgu yapılmıştır [76]. Park S.A. ve ark. yaptıkları çalışmada CXCL12/CXCR4 sinyal yolunun MKH'lerin glioma hücrelerine doğru göçünde önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir. MKH'lerde CXCR4'ün aşırı ifade olması tümöre; intihar genleri, proapoptotik genler veya immün modülatörleri iletmek için güçlü bir araç olabilme potansiyelini ortaya çıkartmaktadır [77].

Sonuç olarak, çalışmamız kapsamında TMÇ'de bulunan MKH'lerin kanser hücreleri ile olan etkileşimine transwell sistemi kullanılarak bakılmış ve CXCL12 ve TGF- $\beta$  sinyal yollarındaki değişim incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar kanser hücresi açısından literatürdeki çalışmalar ile benzerlikler göstermektedir. Literatürde, kanser hücresi-MKH ko-kültürü sonrası kanser hücrelerinin hücre canlılığına odaklanılmış ve MKH'lerin hücre canlılığına değinilmemiş/çok az değinilmiştir. Çalışmamızda MKH'nin kanser hücresi ile etkileşimi sonucu MKH'lerdeki sinyal yollarındaki değişikliklere odaklanılmış olması ayrıca önem taşımaktadır. İncelenen sinyal yollarının etkinliğinin daha detaylı



araştırılabilmesi için farklı kültür sistemleri kullanılabilir. Literatürde spheroid ve organoid sistemlerin *in vivo* ortamı taklit etme yönünden oldukça avantajlı olduğuna dair çalışmalarda mevcuttur [78, 79].

TM'de çeşitli hücre tipleri ve ekstraselüler matrix elemanları mevcuttur. TM merkezinde ayrıca hipoksik bir ortam bulunmaktadır. Çalışmamızda transwell sistemi kullanılarak yalnızca tek bir hücrenin (MKH) kanser hücreleri ile etkileşimine bakılmıştır ancak TM'nin yapısı çok daha komplekstir. TM ortamını *in vivo* olarak taklit etmek ve ortamdaki hücrelerin etkileşimini ve bu etkileşim sonucunda sinyal yolaklarındaki ifanenin incelenmesi için spheroid, organoid gibi 3D kültür sistemleri kullanılarak incelenmesi MKH-kanser hresi etkileşiminin aydınlatılmasında fayda sağlayacaktır. Ek olarak çalışmamız kapsamında MKH-kanser hücreleri 1:1 oranında kullanılmıştır. İlerde yapılacak çalışmalarda MKH'lerin farklı oranda uygulanması durumundaki kanser hücrelerinin yanıtı ve hücrelerdeki farklı sinyal yolaklarındaki değişimlerinde değerlendirilmesi MKH-kanser hresi etkileşimin anlaşılması bakımından gelecek araştırmalara ışık tutacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] C. Mattiuzzi, and G. Lippi, Current Cancer Epidemiology, Journal of epidemiology and global health, vol. 9, no. 4, pp. 217-222, **2019**.
- [2] P. B. Gupta, I. Pastushenko, A. Skibinski, C. Blanpain, and C. Kuperwasser, Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance, Cell Stem Cell, vol. 24, no. 1, pp. 65-78, Jan 3, **2019**.
- [3] K. Brennan, G. Offiah, E. A. McSherry, and A. M. Hopkins, Tight Junctions: A Barrier to the Initiation and Progression of Breast Cancer?, J Biomed Biotechnol, vol. 2010, pp. 460607, **2010**.
- [4] L. C. Costello, and R. B. Franklin, The Genetic/Metabolic Transformation Concept of Carcinogenesis, Cancer Metastasis Rev, vol. 31, no. 1-2, pp. 123-130, Jun, **2012**.
- [5] J. H. Park, W. Y. Pyun, and H. W. Park, Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets, Cells, vol. 9, no. 10, pp. 2308, **2020**.
- [6] T. Huang, X. Song, D. Xu, D. Tiek, A. Goenka, B. Wu, N. Sastry, B. Hu, and S. Y. Cheng, Stem Cell Programs in Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance, Theranostics, vol. 10, no. 19, pp. 8721-8743, **2020**.
- [7] B. Arneth, Tumor Microenvironment, Medicina (Kaunas), vol. 56, no. 1, Dec 30, **2019**.
- [8] L. Bejarano, M. J. Jordão, and J. A. Joyce, Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment, Cancer discovery, vol. 11, no. 4, pp. 933-959, **2021**.
- [9] R. Baghban, L. Roshangar, R. Jahanban-Esfahlan, K. Seidi, A. Ebrahimi-Kalan, M. Jaymand, S. Kolahian, T. Javaheri, and P. Zare, Tumor Microenvironment Complexity and Therapeutic Implications at a Glance, Cell Communication and Signaling, vol. 18, no. 1, pp. 59, 2020/04/07, **2020**.
- [10] S. Hamada, R. Matsumoto, and A. Masamune, Hif-1 and Nrf2; Key Molecules for Malignant Phenotypes of Pancreatic Cancer, Cancers (Basel), vol. 14, no. 2, Jan 14, **2022**.
- [11] D. D. Cave, M. Di Guida, V. Costa, M. Sevillano, L. Ferrante, C. Heeschen, M. Corona, A. Cucciardi, and E. Lonardo, Tgf-B1 Secreted by Pancreatic Stellate Cells Promotes Stemness and Tumourigenicity in Pancreatic Cancer Cells through L1cam Downregulation, Oncogene, vol. 39, no. 21, pp. 4271-4285, **2020**.
- [12] J. Fares, M. Y. Fares, H. H. Khachfe, H. A. Salhab, and Y. Fares, Molecular Principles of Metastasis: A Hallmark of Cancer Revisited, Signal Transduction and Targeted Therapy, vol. 5, no. 1, pp. 28, 2020/03/12, **2020**.
- [13] X. Jin, Z. Demere, K. Nair, A. Ali, G. B. Ferraro, T. Natoli, A. Deik, L. Petronio, A. A. Tang, C. Zhu, L. Wang, D. Rosenberg, V. Mangena, J. Roth, K. Chung, R. K. Jain, C. B. Clish, M. G. Vander Heiden, and T. R. Golub, A Metastasis Map of Human Cancer Cell Lines, Nature, vol. 588, no. 7837, pp. 331-336, 2020/12/01, **2020**.
- [14] F. Weiss, D. Lauffenburger, and P. Friedl, Towards Targeting of Shared Mechanisms of Cancer Metastasis and Therapy Resistance, Nature Reviews Cancer, vol. 22, no. 3, pp. 157-173, 2022/03/01, **2022**.

- [15] A. Bernat-Peguera, P. Simón-Extremuera, V. da Silva-Diz, M. López de Munain, L. Díaz-Gil, R. M. Penin, E. González-Suárez, D. Pérez Sidelnikova, O. Bermejo, J. M. Viñals, F. Viñals, and P. Muñoz, Pdgfr-Induced Autocrine Sdf-1 Signaling in Cancer Cells Promotes Metastasis in Advanced Skin Carcinoma, *Oncogene*, vol. 38, no. 25, pp. 5021-5037, 2019/06/01, **2019**.
- [16] O. Morana, W. Wood, and C. D. Gregory, The Apoptosis Paradox in Cancer, *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 3, Jan 25, **2022**.
- [17] S. Elmore, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicol Pathol*, vol. 35, no. 4, pp. 495-516, Jun, **2007**.
- [18] B. A. Carneiro, and W. S. El-Deiry, Targeting Apoptosis in Cancer Therapy, *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 17, no. 7, pp. 395-417, Jul, **2020**.
- [19] A. G. Waks, and E. P. Winer, Breast Cancer Treatment: A Review, *Jama*, vol. 321, no. 3, pp. 288-300, **2019**.
- [20] J. Han, W. Lim, D. You, Y. Jeong, S. Kim, J. E. Lee, T. H. Shin, G. Lee, and S. Park, Chemoresistance in the Human Triple-Negative Breast Cancer Cell Line Mda-Mb-231 Induced by Doxorubicin Gradient Is Associated with Epigenetic Alterations in Histone Deacetylase, *Journal of Oncology*, vol. 2019, pp. 1345026, 2019/06/02, **2019**.
- [21] N. A. O. Bush, S. L. Hervey-Jumper, and M. S. Berger, Management of Glioblastoma, Present and Future, *World neurosurgery*, vol. 131, pp. 328-338, **2019**.
- [22] M.-E. Oraiopoulou, M. Tampakaki, E. Tzamali, T. Tamiolakis, V. Makatounakis, A. F. Vakis, G. Zacharakis, V. Sakkalis, and J. Papamatheakis, A 3d Tumor Spheroid Model for the T98g Glioblastoma Cell Line Phenotypic Characterization, *Tissue and Cell*, vol. 59, pp. 39-43, **2019**.
- [23] M. Tewary, N. Shakiba, and P. W. Zandstra, Stem Cell Bioengineering: Building from Stem Cell Biology, *Nature Reviews Genetics*, vol. 19, no. 10, pp. 595-614, 2018/10/01, **2018**.
- [24] A. Friedenstein, R. Chailakhjan, and K. Lalykina, The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells, *Cell Proliferation*, vol. 3, no. 4, pp. 393-403, **1970**.
- [25] D. Mushahary, A. Spittler, C. Kasper, V. Weber, and V. Charwat, Isolation, Cultivation, and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells, *Cytometry Part A*, vol. 93, no. 1, pp. 19-31, **2018**.
- [26] D. E. Rodríguez-Fuentes, L. E. Fernández-Garza, J. A. Samia-Meza, S. A. Barrera-Barrera, A. I. Caplan, and H. A. Barrera-Saldaña, Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review, *Archives of Medical Research*, vol. 52, no. 1, pp. 93-101, **2021**.
- [27] G. J. Jimenez-Puerta, J. A. Marchal, E. López-Ruiz, and P. Gálvez-Martín, Role of Mesenchymal Stromal Cells as Therapeutic Agents: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use, *J Clin Med*, vol. 9, no. 2, Feb 6, **2020**.
- [28] W. Liang, X. Chen, S. Zhang, J. Fang, M. Chen, Y. Xu, and X. Chen, Mesenchymal Stem Cells as a Double-Edged Sword in Tumor Growth: Focusing on Msc-Derived Cytokines, *Cellular & Molecular Biology Letters*, vol. 26, no. 1, pp. 3, 2021/01/20, **2021**.
- [29] R. S. Waterman, S. L. Henkle, and A. M. Betancourt, Mesenchymal Stem Cell 1 (Msc1)-Based Therapy Attenuates Tumor Growth Whereas Msc2-

- Treatment Promotes Tumor Growth and Metastasis, *PLoS One*, vol. 7, no. 9, pp. e45590, **2012**.
- [30] S. Galland, and I. Stamenkovic, Mesenchymal Stromal Cells in Cancer: A Review of Their Immunomodulatory Functions and Dual Effects on Tumor Progression, *J Pathol*, vol. 250, no. 5, pp. 555-572, Apr, **2020**.
- [31] W. H. Huang, M. C. Chang, K. S. Tsai, M. C. Hung, H. L. Chen, and S. C. Hung, Mesenchymal Stem Cells Promote Growth and Angiogenesis of Tumors in Mice, *Oncogene*, vol. 32, no. 37, pp. 4343-4354, 2013/09/01, **2013**.
- [32] P. Zhang, Y. Sun, and L. Ma, Zeb1: At the Crossroads of Epithelial-Mesenchymal Transition, Metastasis and Therapy Resistance, *Cell Cycle*, vol. 14, no. 4, pp. 481-487, **2015**.
- [33] H. Karvonen, H. Barker, L. Kaleva, W. Niininen, and D. Ungureanu, Molecular Mechanisms Associated with Ror1-Mediated Drug Resistance: Crosstalk with Hippo-Yap/Taz and Bmi-1 Pathways, *Cells*, vol. 8, no. 8, Aug 2, **2019**.
- [34] L. B. Ohlsson, L. Varas, C. Kjellman, K. Edvardsen, and M. Lindvall, Mesenchymal Progenitor Cell-Mediated Inhibition of Tumor Growth in Vivo and in Vitro in Gelatin Matrix, *Exp Mol Pathol*, vol. 75, no. 3, pp. 248-255, Dec, **2003**.
- [35] J. Du, L. Zhou, X. Chen, S. Yan, M. Ke, X. Lu, Z. Wang, W. Yu, and A. P. Xiang, Ifn- $\gamma$ -Primed Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Induce Tumor Cell Apoptosis in Vitro Via Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand, *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 44, no. 8, pp. 1305-1314, Aug, **2012**.
- [36] B. Cousin, E. Ravet, S. Poglio, F. De Toni, M. Bertuzzi, H. Lulka, I. Touil, M. André, J. L. Grolleau, J. M. Péron, J. P. Chavoïn, P. Bourin, L. Pénicaud, L. Casteilla, L. Buscail, and P. Cordelier, Adult Stromal Cells Derived from Human Adipose Tissue Provoke Pancreatic Cancer Cell Death Both in Vitro and in Vivo, *PLoS One*, vol. 4, no. 7, pp. e6278, Jul 17, **2009**.
- [37] H. Ryu, J. E. Oh, K. J. Rhee, S. K. Baik, J. Kim, S. J. Kang, J. H. Sohn, E. Choi, H. C. Shin, Y. M. Kim, H. S. Kim, K. S. Bae, and Y. W. Eom, Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Cultured at High Density Express Ifn-B and Suppress the Growth of Mcf-7 Human Breast Cancer Cells, *Cancer Lett*, vol. 352, no. 2, pp. 220-227, Oct 1, **2014**.
- [38] S. Wu, Y. Wang, Z. Yuan, S. Wang, H. Du, X. Liu, Q. Wang, and X. Zhu, Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Breast Cancer MCF7 Cell Epithelial-Mesenchymal Transition by Cross Interacting with the TGF- $\beta$ /Smad and PI3K/Akt Signaling Pathways, *Mol Med Rep*, vol. 19, no. 1, pp. 177-186, Jan, **2019**.
- [39] K. Tzavlaki, and A. Moustakas, TGF- $\beta$  Signaling, *Biomolecules*, vol. 10, no. 3, pp. 487, **2020**.
- [40] S. Aashaq, A. Batool, S. A. Mir, M. A. Beigh, K. I. Andrabi, and Z. A. Shah, TGF- $\beta$  Signaling: A Recap of Smad-Independent and Smad-Dependent Pathways, *Journal of Cellular Physiology*, vol. 237, no. 1, pp. 59-85, **2022**.
- [41] Y. Chen, C. Di, X. Zhang, J. Wang, F. Wang, J. f. Yan, C. Xu, J. Zhang, Q. Zhang, and H. Li, Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling Pathway: A Promising Therapeutic Target for Cancer, *Journal of cellular physiology*, vol. 235, no. 3, pp. 1903-1914, **2020**.

- [42] M. Zhao, L. Mishra, and C.-X. Deng, The Role of Tgf-B/Smad4 Signaling in Cancer, *International journal of biological sciences*, vol. 14, no. 2, pp. 111-123, **2018**.
- [43] E. Battle, and J. Massagué, Transforming Growth Factor-B Signaling in Immunity and Cancer, *Immunity*, vol. 50, no. 4, pp. 924-940, **2019**.
- [44] I. Karnik, R. Sutherland, J. Elson, S. Aspinall, and A. Meeson, Tgf-B, to Target or Not to Target; to Prevent Thyroid Cancer Progression?, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, pp. 188752, **2022**.
- [45] R. Balsano, Z. Kruize, M. Lunardi, A. Comandatore, M. Barone, A. Cavazzoni, A. D. Re Cecconi, L. Morelli, H. Wilmink, and M. Tiseo, Transforming Growth Factor-Beta Signaling in Cancer-Induced Cachexia: From Molecular Pathways to the Clinics, *Cells*, vol. 11, no. 17, pp. 2671, **2022**.
- [46] R. Janssens, S. Struyf, and P. Proost, The Unique Structural and Functional Features of Cxcl12, *Cellular & molecular immunology*, vol. 15, no. 4, pp. 299-311, **2018**.
- [47] Y. Shi, D. J. Riese, and J. Shen, The Role of the Cxcl12/Cxcr4/Cxcr7 Chemokine Axis in Cancer, *Frontiers in pharmacology*, vol. 11, pp. 574667, **2020**.
- [48] T. Khare, M. Bissonnette, and S. Khare, Cxcl12-Cxcr4/Cxcr7 Axis in Colorectal Cancer: Therapeutic Target in Preclinical and Clinical Studies, *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 14, pp. 7371, **2021**.
- [49] K. A. Zielińska, and V. L. Katanaev, The Signaling Duo Cxcl12 and Cxcr4: Chemokine Fuel for Breast Cancer Tumorigenesis, *Cancers*, vol. 12, no. 10, pp. 3071, **2020**.
- [50] R. Mezzapelle, M. Leo, F. Caprioglio, L. S. Colley, A. Lamarca, L. Sabatino, V. Colantuoni, M. P. Crippa, and M. E. Bianchi, Cxcr4/Cxcl12 Activities in the Tumor Microenvironment and Implications for Tumor Immunotherapy, *Cancers*, vol. 14, no. 9, pp. 2314, **2022**.
- [51] J. C. López-Gil, L. Martin-Hijano, P. C. Hermann, and B. Sainz Jr, The Cxcl12 Crossroads in Cancer Stem Cells and Their Niche, *Cancers*, vol. 13, no. 3, pp. 469, **2021**.
- [52] C. Huynh, J. Dingemanse, H. E. M. Zu Schwabedissen, and P. N. Sidharta, Relevance of the Cxcr4/Cxcr7-Cxcl12 Axis and Its Effect in Pathophysiological Conditions, *Pharmacological Research*, vol. 161, pp. 105092, **2020**.
- [53] S. Fan, H. Gao, W. Ji, F. Zhu, L. Sun, Y. Liu, S. Zhang, Y. Xu, Y. Yan, and Y. Gao, Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells Expressing Il-24 Induce Apoptosis in Gliomas, *J Cell Physiol*, vol. 235, no. 2, pp. 1769-1779, Feb, **2020**.
- [54] H. Sevim, Y. Ç. Kocaeffe, M. A. Onur, D. Uçkan-Çetinkaya, and Ö. A. Gürpınar, Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Inflammatory Response in an in Vitro Model of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis 2, *Stem cell research & therapy*, vol. 9, no. 1, pp. 1-10, **2018**.
- [55] X. He, X. Guo, H. Zhang, X. Kong, F. Yang, and C. Zheng, Mechanism of Action and Efficacy of Ly2109761, a Tgf-B Receptor Inhibitor, Targeting

- Tumor Microenvironment in Liver Cancer after Tace, *Oncotarget*, vol. 9, no. 1, pp. 1130-1142, Jan 2, **2018**.
- [56] E. Fransvea, U. Angelotti, S. Antonaci, and G. Giannelli, Blocking Transforming Growth Factor- $\beta$  up-Regulates E-Cadherin and Reduces Migration and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells, *Hepatology*, vol. 47, no. 5, pp. 1557-1566, **2008**.
- [57] M. Xu, D. J. McCanna, and J. G. Sivak, Use of the Viability Reagent Prestoblue in Comparison with Alamarblue and Mtt to Assess the Viability of Human Corneal Epithelial Cells, *J Pharmacol Toxicol Methods*, vol. 71, pp. 1-7, Jan-Feb, **2015**.
- [58] D. Kashyap, D. Pal, R. Sharma, V. K. Garg, N. Goel, D. Koundal, A. Zaguia, S. Koundal, and A. Belay, Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures, *Biomed Res Int*, vol. 2022, pp. 9605439, **2022**.
- [59] B. Nowak, P. Rogujski, M. Janowski, B. Lukomska, and A. Andrzejewska, Mesenchymal Stem Cells in Glioblastoma Therapy and Progression: How One Cell Does It All, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, vol. 1876, no. 1, pp. 188582, **2021**.
- [60] H. Salkin, A. Yay, N. S. Gokdemir, Z. B. Gönen, S. Özdamar, and B. Yakan, Tgf-B1-over-Expressed Adipose Stem Cells-Derived Secretome Exhibits Cd44 Suppressor and Anti-Cancer Properties Via Antagonistic Effects against Smad4 in Breast Cancer Cells, *Am J Stem Cells*, vol. 11, no. 5, pp. 64-78, **2022**.
- [61] K. Mandel, Y. Yang, A. Schambach, S. Glage, A. Otte, and R. Hass, Mesenchymal Stem Cells Directly Interact with Breast Cancer Cells and Promote Tumor Cell Growth in Vitro and in Vivo, *Stem cells and development*, vol. 22, no. 23, pp. 3114-3127, **2013**.
- [62] M. Zhang, S. Kleber, M. Röhrich, C. Timke, N. Han, J. Tuettenberg, A. Martin-Villalba, J. Debus, P. Peschke, and U. Wirkner, Blockade of Tgf-B Signaling by the Tgf $\beta$ -I Kinase Inhibitor Ly2109761 Enhances Radiation Response and Prolongs Survival in Glioblastoma, *Cancer research*, vol. 71, no. 23, pp. 7155-7167, **2011**.
- [63] C. Khalil, M. Moussa, A. Azar, J. Tawk, J. Habbouche, R. Salameh, A. Ibrahim, and N. Alaaeddine, Anti-Proliferative Effects of Mesenchymal Stem Cells (Mscs) Derived from Multiple Sources on Ovarian Cancer Cell Lines: An in-Vitro Experimental Study, *Journal of Ovarian Research*, vol. 12, no. 1, pp. 70, 2019/07/27, **2019**.
- [64] Y. Basmakil, E. Bahattab, A. Al Subayyil, H. B. Kulayb, M. Alrodayyan, M. Abumaree, and T. Khatlani, Decidua Parietalis Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Secretome Diminish the Oncogenic Properties of Mda231 Cells in Vitro, *Cells*, vol. 10, no. 12, pp. 3493, **2021**.
- [65] C. Jotzu, E. Alt, G. Welte, J. Li, B. T. Hennessy, E. Devarajan, S. Krishnappa, S. Pinilla, L. Droll, and Y.-H. Song, Adipose Tissue Derived Stem Cells Differentiate into Carcinoma-Associated Fibroblast-Like Cells under the Influence of Tumor Derived Factors, *Cellular Oncology*, vol. 34, no. 1, pp. 55-67, 2011/02/01, **2011**.
- [66] Z. Xu, H. Gao, Y. Zhang, W. Feng, Y. Miao, Z. Xu, W. Li, F. Chen, Z. Lv, and J. Huo, Ccl7 and Tgf-B Secreted by Mscs Play Opposite Roles in Regulating Crc Metastasis in a Klf5/Cxcl5-Dependent Manner, *Molecular Therapy*, vol. 30, no. 6, pp. 2327-2341, **2022**.

- [67] F. Paino, M. La Noce, D. Di Nucci, G. F. Nicoletti, R. Salzillo, A. De Rosa, G. A. Ferraro, G. Papaccio, V. Desiderio, and V. Tirino, Human Adipose Stem Cell Differentiation Is Highly Affected by Cancer Cells Both in Vitro and in Vivo: Implication for Autologous Fat Grafting, *Cell Death Dis*, vol. 8, no. 1, pp. e2568, Jan 19, **2017**.
- [68] R. Mezzapelle, M. Leo, F. Caprioglio, L. S. Colley, A. Lamarca, L. Sabatino, V. Colantuoni, M. P. Crippa, and M. E. Bianchi, Cxcr4/Cxcl12 Activities in the Tumor Microenvironment and Implications for Tumor Immunotherapy, *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 9, May 6, **2022**.
- [69] Y. Shi, D. J. Riese, 2nd, and J. Shen, The Role of the Cxcl12/Cxcr4/Cxcr7 Chemokine Axis in Cancer, *Front Pharmacol*, vol. 11, pp. 574667, **2020**.
- [70] K. N. Kremer, K. L. Peterson, P. A. Schneider, X. W. Meng, H. Dai, A. D. Hess, B. D. Smith, C. Rodriguez-Ramirez, J. E. Karp, S. H. Kaufmann, and K. E. Hedin, Cxcr4 Chemokine Receptor Signaling Induces Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia Cells Via Regulation of the Bcl-2 Family Members Bcl-Xl, Noxa, and Bak, *J Biol Chem*, vol. 288, no. 32, pp. 22899-22914, Aug 9, **2013**.
- [71] C. Jiang, S. Ma, R. Hu, X. Wang, M. Li, F. Tian, W. Jiang, L. Zhu, and Z. Bian, Effect of Cxcr4 on Apoptosis in Osteosarcoma Cells Via the Pi3k/Akt/Nf-K $\beta$  Signaling Pathway, *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 46, no. 6, pp. 2250-2260, **2018**.
- [72] L. V. Rhodes, J. W. Antoon, S. E. Muir, S. Elliott, B. S. Beckman, and M. E. Burow, Effects of Human Mesenchymal Stem Cells on Er-Positive Human Breast Carcinoma Cells Mediated through Er-Sdf-1/Cxcr4 Crosstalk, *Mol Cancer*, vol. 9, pp. 295, Nov 18, **2010**.
- [73] L. F. Pavon, T. T. Sibov, A. V. de Souza, E. F. da Cruz, S. M. F. Malheiros, F. R. Cabral, J. G. de Souza, P. Bouffleur, D. M. de Oliveira, S. R. C. de Toledo, L. C. Marti, J. M. Malheiros, F. F. Paiva, A. Tannús, S. M. de Oliveira, A. M. Chudzinski-Tavassi, M. A. de Paiva Neto, and S. Cavalheiro, Tropism of Mesenchymal Stem Cell toward Cd133+ Stem Cell of Glioblastoma in Vitro and Promote Tumor Proliferation in Vivo, *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 9, no. 1, pp. 310, 2018/11/09, **2018**.
- [74] C. H. Ryu, S. A. Park, S. M. Kim, J. Y. Lim, C. H. Jeong, J. A. Jun, J. H. Oh, S. H. Park, W.-i. Oh, and S.-S. Jeun, Migration of Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells Mediated by Stromal Cell-Derived Factor-1/Cxcr4 Axis Via Akt, Erk, and P38 Signal Transduction Pathways, *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 398, no. 1, pp. 105-110, **2010**.
- [75] F. Luo, Y. Su, Z. Zhang, and J. Li, Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote the Progression of Prostate Cancer through the Sdf-1/Cxcr4 Axis in Vivo and Vitro, *Clinical and Translational Oncology*, vol. 24, no. 5, pp. 892-901, 2022/05/01, **2022**.
- [76] A. Chartouni, A. Mouawad, M. Boutros, F. Attieh, N. Medawar, and H. R. Kourie, Mesenchymal Stem Cells: A Trojan Horse to Treat Glioblastoma, *Investigational New Drugs*, vol. 41, no. 2, pp. 240-250, 2023/04/01, **2023**.
- [77] S. A. Park, C. H. Ryu, S. M. Kim, J. Y. Lim, S. I. Park, C. H. Jeong, J. Jun, J. H. Oh, S. H. Park, and W. Oh, Cxcr4-Transfected Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Exhibit Enhanced Migratory Capacity toward Gliomas, *International journal of oncology*, vol. 38, no. 1, pp. 97-103, **2011**.

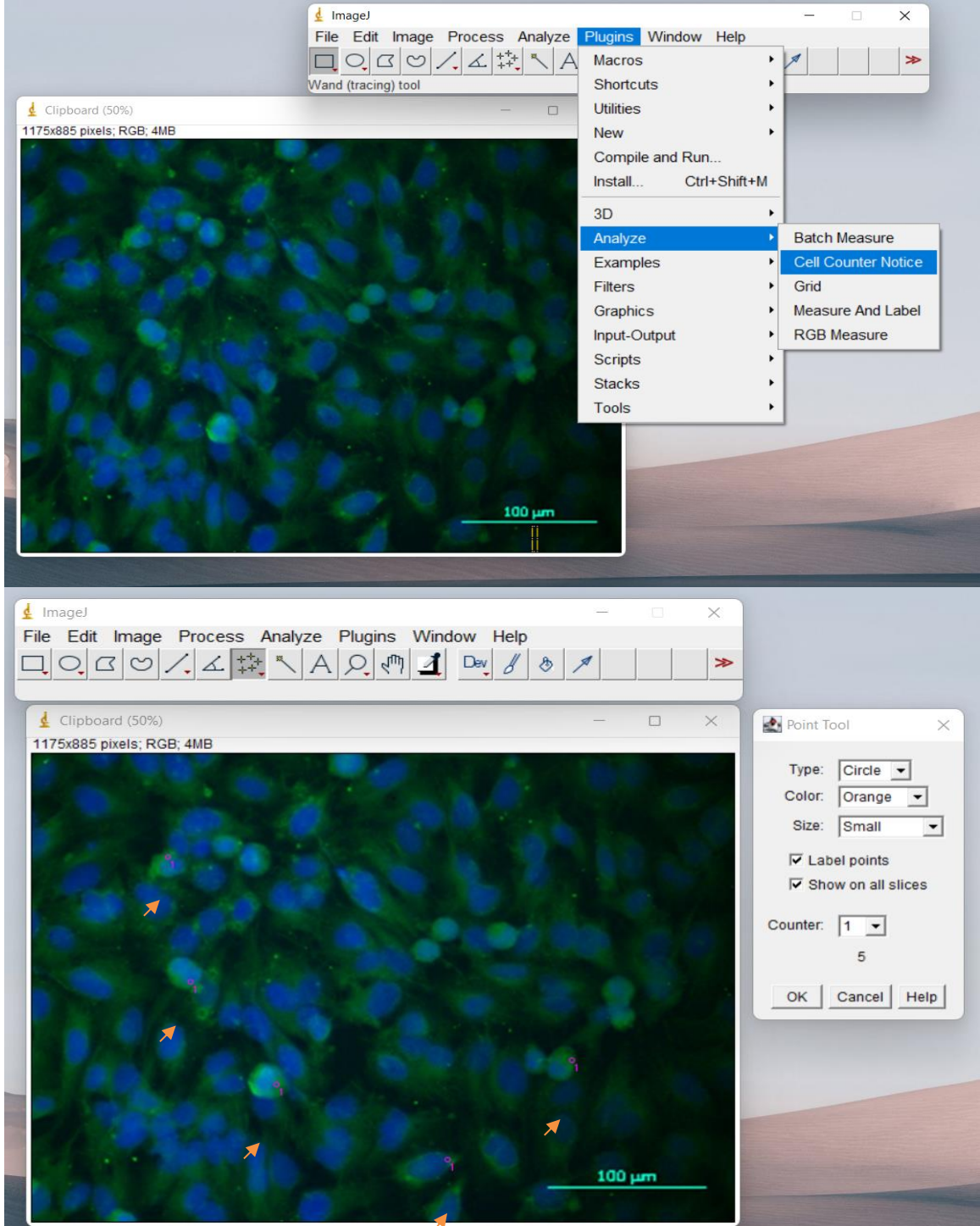
- [78] S. Gunti, A. T. K. Hoke, K. P. Vu, and N. R. London, Jr., Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications, *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 4, Feb 19, **2021**.
- [79] Y. Zhu, E. Kang, M. Wilson, T. Basso, E. Chen, Y. Yu, and Y.-R. Li, 3d Tumor Spheroid and Organoid to Model Tumor Microenvironment for Cancer Immunotherapy, *Organoids*, vol. 1, no. 2, pp. 149-167, **2022**.



## EKLER

### EK 1. IMAGEJ PROGRAMI KULLANILARAK HÜCRE SAYIMI

- ImageJ>file>open>select photograph>plugins>analyze>cell counter notice



ImageJ programı kullanılarak immüno Floresan işaretleme yapılmış hücrelerde sayım

