

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSERİNDE, IL-1 β İLE TETİKLENEN
EPİTELYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜMDE HÜCRE
İSKELETİ DİNAMİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Uzm. Mol. Biol. Hatice TOPRAK DOĞRAMACI

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2023

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MEME KANSERİNDE, IL-1 β İLE TETİKLENEN EPİTELYAL
MEZENKİMAL DÖNÜŞÜMDE HÜCRE
İSKELETİ DİNAMİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Uzm. Mol. Biol. Hatice TOPRAK DOĞRAMACI

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Güneş DİNÇ AKBULUT**

ANKARA

2023

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MEME KANSERİNDE, IL-1 β İLE TETİKLENEN EPİTELYAL MEZENKİMAL
DÖNÜŞÜMDE HÜCRE İSKELETİ DİNAMİKLERİNİN İNCELENMESİ

Öğrenci: Hatice Toprak Doğramacı

Danışman: Prof. Dr. Güneş Esendağlı

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Güneş Dinç Akbulut

Bu tez çalışması 20.02.2023 tarihinde jürimiz tarafından “Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. İ. Çağatay Karaaslan*
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Güneş Esendağlı*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Neşe Ünver*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Füsun Özmen*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Dr. Öğr. Üyesi Diğdem Yöyen Ermiş*
(Uludağ Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

...../...../.....

(İmza)

Öğrencinin Adı SOYADI

/

⁽¹⁾Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılmaması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarılan veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahribat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Güneş ESENDAğLI ve Dr. Öğr. Üyesi Güneş DİN AKBULUT danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Hatice TOPRAK DOğRAMACI

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans tezimin her aşamasında olağanüstü bilgisi veengin tecrübeleri ile bana yol gösteren çok kıymetli danışmanım Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI'ya ve hem akademik hem kişisel anlamda desteğini hep yanımda hissettiğim, varlığıyla güç veren sevgili ikinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Güneş DİNÇ AKBULUT'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yine bu süreçte her soruma güler yüzle cevap veren sevgili ekip arkadaşlarım Ali Mert SENCER, Sibel GÖKŞEN, Anıl IŞIK ve desteklerini esirgemeyen Esendağlı Lab üyesi arkadaşlarım Gizem AKÇA, Tuğçe TEMEL, Mubaida PARVEEN, Sıla ULUTÜRK, Süleyman Can ÖZTÜRK, İzel YILMAZ, Ece TAVUKÇUOĞLU, Hamdullah YANIK, Sakine ULUSOY ve Mehmet Emre ÖZKAN'a çok teşekkür ederim. Ek olarak temel onkoloji ana bilim dalındaki sevgili hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Begüm KOCATÜRK, Doç. Dr. Gürcan GÜNAYDIN, Doç. Dr. Hande CANPINAR ve Doç. Dr. Füsun ÖZMEN'e ve sevgili arkadaşlarım İlknur BAKIRTAS, Gaye PİŞİREN, Rukiye ABANOZ, Hazal KARAKOYUN ve Melek GÜNİNDİ KORKUT'a çok teşekkür ederim.

Bir de emekleri, sabırları ve sevgileri için sevgili annem, Satı TOPRAK ile sevgili babam Satılmış TOPRAK ve canım kardeşlerim Yasemin, Nuray, Murat ve Bilal TOPRAK 'a -yeterli olmayacak olsa da- teşekkür ediyorum. Ve sevgili arkadaşlarım Fatma BARUT, Duygu BANDIRMALI, Aylin DOĞRAMACI, Ayşegül AYDIN ve Bora GEMİCİOĞLU'na kıymetli yardımları için çok teşekkür ederim.

Ve son olarak, cancağızım, şansım, ailem, her şeyim, hayata tutunduğum kıymetli sevdiceğim, sevgili eşim Gürkan DOĞRAMACI'ya var olduğu ve beni hep desteklediği için çok teşekkür ediyorum.

ÖZET

Toprak Doğramacı, H., Meme Kanserinde, IL-1 β ile Tetiklenen Epitelyal Mezenkimal Dönüşümde Hücre İskeleti Dinamiklerinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023. Meme kanseri mikroçevresinde, proinflatuvar bir sitokin olan interlökin (IL) -1 β 'nin varlığı gösterilmiştir. IL-1 β hücre sağ kalımını, proliferasyonunu, adezyonu, invazyonu ve migrasyon mekanizmalarını destekler. İnflamasyonun kronikleşmesine ve devamlılığına katkıda bulunur. Bu durum kanser progresyonunu ve epitelyal-mezenkimal dönüşümü (*Epitelyal-Mezenkimal Transition*, EMT) destekler. EMT'nin ve metastazın gerçekleşebilmesi için hücrelerin hareket kabiliyeti kazanması önemlidir. Hareket yeteneği hücre iskeleti elemanlarının ifadesi ve fonksiyonel etkileşimi ile gerçekleştirilir. Aktin, vinkülin, vimentin gibi konvansiyonel hücre iskeleti elemanlarının yanı sıra *Capping protein regulatory, ARp2/3, MyosinII linker* (CARMIL) proteinleri de hücrenin aktin iskeletin düzenlenmesinde görev alır. CARMIL proteinlerinin hücre hareket yeteneği dolayısıyla da EMT ve metastaz için elzem olduğu söylenebilir. Bu bilgiler ışığında meme kanseri hücrelerinde IL-1 β ile uyarılmış EMT'nin CARMIL protein düzeyi ve hücresel dağılımı ile ilişkili olabileceğine dair bir hipotez oluşturulmuştur. İnsan meme kanseri MCF-7 hücre hattı epitelyal morfolojide, MDA-MB-231 ise mezenkimal morfolojide bulunur. Bu hücreler tümör mikroçevresini taklit edebilmek amacıyla önceden Matrigel™ veya fibronektin ile kaplanmış yüzeylerde yetiştirilmiş ve IL-1 β ile muamele edilerek EMT uyarılmıştır. Elde edilen sonuçlar immünfloresan boyamalar ve qRT-PCR yöntemleri ile analiz edilmiştir. Hücrelerin CARMIL3 ve vinkülin ifade düzeylerinin mezenkimal hücre karakterine bağlı olarak değiştiği ve odak sayılarının arttığı görülmüştür. CARMIL3 mRNA düzeylerindeki artışın meme kanserinde erken metastaz ya da kısmi EMT durumunun bir belirtisi olabileceğine dair bulgular elde edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada CARMIL proteinlerinin IL-1 β ile uyarılan EMT'de, hücre mezenkimal karakteri ile ilişkisi ve IL-1 β aracılı inflamatuvar yanıtların kanserin ilerlemesi üzerine etkisine dair gözlemler yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: CARMIL, metastaz, meme kanseri, IL-1 β , EMT, hücre hareketi

ABSTRACT

Toprak Doğramacı, H., Investigation of Cytoskeletal Dynamics in IL-1 β -Induced Epithelial Mesenchymal Transition in Breast Cancer, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Tumor Biology and Immunology Program, Master of Science Thesis, Ankara, 2023. The presence of interleukin (IL)-1 β , a proinflammatory cytokine, has been demonstrated in the breast cancer microenvironment. IL-1 β supports cell survival, proliferation, adhesion, invasion, and migration mechanisms. It also contributes to the chronicity and persistence of inflammation, therefore promotes cancer progression and epithelial-mesenchymal transformation (EMT). It is important for cells to gain mobility for EMT and metastasis. Cell movement is accomplished by the expression and functional interaction of skeletal elements. In addition to conventional cytoskeletal elements such as actin, vinculin, vimentin, Capping protein regulatory, ARp2/3, MyosinILinker (CARMIL) proteins are also involved in the regulation of the cell's actin skeleton. It can be said that CARMIL proteins are essential for cell motility and therefore EMT and metastasis. In the light of this information, a hypothesis was developed that IL-1 β -induced EMT in breast cancer cells might be affected by CARMIL protein level and cellular distribution. The human breast cancer MCF-7 cell line owns epithelial morphology and MDA-MB-231 possesses mesenchymal morphology. To mimic the tumor microenvironment, these cells were grown on surfaces previously coated with MatrigelTM or fibronectin and treated with IL-1 β to induce EMT. Obtained results were analyzed by immunofluorescent staining and qRT-PCR methods. It was observed that the expression levels of CARMIL3 and vinculin within the cells changed depending on the mesenchymal cell character. Evidence has been obtained that increased CARMIL3 mRNA levels may be a marker of early metastasis or partial EMT status in breast cancer. In conclusion, in this study, observations were made about the relationship of CARMIL proteins with cell mesenchymal character in IL-1 β -induced EMT and the effect of IL-1 β -mediated inflammatory responses on cancer progression.

Keywords: CARMIL, Metastasis, Breast cancer, IL-1 β , EMT, cell migration

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	19
2. GENEL BİLGİLER	22
2.1.Kanser, İnflamasyon ve IL-1 β	22
2.1.1. Kanser	22
2.1.2. İnflamasyon	22
2.1.3. Kanser ve İnflamasyonla ilişkili mekanizmalar	23
2.1.4. İnterlökin-1 β (IL-1 β)	26
2.2. EMT, Metastaz ve Hücre Hareketi	29
2.2.1. Metastaz ve Hücre Hareket Mekanizmaları	29
2.2.2. Hücre Migrasyonu İçin Önemli Yapılar	29
2.2.3. Hücre Migrasyon Çeşitleri	32
2.2.4. EMT ve Metastaz	34
2.2.5. Meme Kanseri ve EMT	36
2.2.6. IL-1 β ve EMT İlişkisi	38
2.3. CARMIL Proteinleri	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Kullanılan Malzemeler	41
3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	41
3.3. Hücre Kültürü	42
3.3.1. Hücrelerin Sıvı Azot Stoğundan Çözülmesi	42
3.3.2. Hücre Pasajlama	42
3.3.3. Hücre sayımı	43

3.4. İmmünfloresan Boyamalar	43
3.4.1. Kaplama	43
3.4.2. IL-1 β uygulaması	43
3.4.3. Hücrelerin Fiksasyonu ve Permeabilizasyonu	44
3.4.4. Bloklama	44
3.4.5. Antikor ile Bağlanma ve DAPI, Falloidin Boyamaları	44
3.4.6. Kapatma ve Görüntüleme	45
3.4.7. Görüntü analizleri	46
3.5. Gen İfadesi Analizleri	48
3.5.1. RNA izolasyonu	48
3.5.2. cDNA Sentezi	49
3.5.3. qRT-PCR Analizleri	50
3.6. İstatistiksel Yöntem	52
4. BULGULAR	53
4.1. Farklı yüzeylerin MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisi	53
4.1.1. MDA-MB-231 hücrelerinin farklı yüzeylerde morfoloji değişimleri	53
4.1.2. Farklı yüzeylerdeki hücrelerde vimentin düzeyleri ve hücresel dağılımı	54
4.1.3. Farklı yüzeylerde vinkülin protein ifade düzeyi, fokal adezyon değişimleri ve membrana yığılma farklılıkları	56
4.1.4. Farklı yüzeylerde büyütülen MDA-MB-231 hücrelerinde CARMIL protein değişimleri	58
4.1.5. Farklı yüzeylerde CARMIL protein odak sayıları	61
4.2. Matrigel kaplı yüzeylerde IL-1 β 'nin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin iskelet dinamiklerine etkisi	63
4.2.1. IL-1 β 'ya bağlı hücre morfoloji değişimleri	63
4.2.2. IL-1 β ile değişen vinkülin protein ifadesi, fokal adezyon sayısı ve hücre içi dağılımı	66
4.2.3. IL-1 β 'nin CARMIL3 protein düzeyi, odak sayısı ve hücresel dağılımı	70
4.3. IL-1 β ile uyarım sonrasında CARMIL3 ve Vinkülin protein düzey ve odak sayıları arasındaki korelasyon analizleri	75
4.4. IL-1 β ile uyarım sonrasında EMT ile ilişkili gen ifadesi düzeyinde qRT-PCR ile analizi	77
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	87
7. REFERANSLAR	90

8. Ekler

EK 1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu

EK 2. Dijital Makbuz

EK 3. Tez Verilerini İçeren Bilimsel Toplantılar ve Projeler

9. ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
<	Küçüktür
>	Büyüktür
Breg	Düzenleyici B hücreler
BSA	Sığır serum albumini
CAM	Hücre adezyon molekülleri
CARMIL	Capping protein regülatör, ARp2/3, MyosinILinker
CC	β kemokin ailesi
CSC	Kanser kök hücresi
CXC	Alfa kemokin ailesi
CCL, CXCL	Kemokin ligandları
COX-2	Siklooksijenaz-2
CP	Capping Protein
DAPI	4',6-diamidino-2-phenilindol
DC	Dentritik hücre
DMEM	Dulbecco Modifiye Kültür Ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
ECM	Ekstraselüler matriks
EGF	Endotel büyüme faktörü
EMT	Epitelyal-mezenkimal dönüşüm
ER	Östrojen reseptör
ERK	Ekstraselüler sinyal-regüle kinaz
FBS	Fötal Buzağı Serumu
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni-stimülasyon faktörü
HER2	İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HGMGB1	Yüksek mobilite grubu 1. kutu
IF	İmmünfloresan
IL	İnterlökin
IL-1β	İnterlökin1-beta
IFN-γ	İnterferon γ

K-Ras	Kirsten sıçan sarkom virüsü geni
MDSC	Myeloid kökenli baskılayıcı hücreler
MET	Mezenkimal-epitelyal dönüşüm
MIF	Makrofaj migrasyon inhibitör faktörü
miR-126	MikroRNA126
miRNA	MikroRNA
MMP	Matriks metalloproteaz
NF-κB	Hücrelerin Kapa-hafif-zinciri-geliştiren Nükleer Faktörü
NK	Doğal öldürücü hücreler
NO	Nitrik oksit
OFY	Ortalama floresan yoğunluğu
PBS	Fosfat Tamponlu Salin tozu
PDAC	Pankreas duktal karsinomu
PGE2	Prostaglandin E2
PR	Progesteron reseptör
ROS/RNS	Reaktif oksijen türleri / reaktif nitrojen türleri
qRT-PCR	Gerçek zamanlı- kantitatif polimer zincir reaksiyonu
SAA	Serum amiloid A
TAM	Tümör ilişkili makrofajlar
TAN	Tümör ilişkili nötrofiller
TGF-β	Transforme edici büyüme faktör beta
Th1	Yardımcı T Hücre Alt-tip 1
Th	Yardımcı T hücre
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
Treg	Düzenleyici T Hücre
V1	Myotrophin
VCAM	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü
WNT	Wingless/Integre
ZEB	Çinko finger ana-sınıf transkripsiyon faktörleri

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. İnflamasyonun kanser üzerindeki ikili rolü ve mekanizmaları. Akut ve kronik İnflamasyon durumlarından kanserin CAF'lar ve immün sistem ile ilişkisi.	26
2.2. IL-1 β üretim, aktivasyon, sinyal iletim ve salgılama mekanizmaları	27
2.3. IL-1 β ve kanser ilişkisi. IL-1 β 'nın hücre sağ kalımını, proliferasyonunu, anjiyogenez, adezyonu, invazyonu ve migrasyonu, bağışıklık hücrelerinin fonksiyonlarını ve matürasyonunu destekleyici özellikler dahil olmak üzere tümöre iki yönlü etkisi vardır.	29
2.4. ECM yapısı.	30
2.5. Aktin iskelet yapılarının (lamelopodya, filodopodya, İnvadopodya, protruding blep ve stres fiberleri) tek bir hücre üzerinde şematik gösterimi.	31
2.6. Fokal adezyonların şematik gösterimi. (A) Aderan bir hücrenin karikatürü, (B) Ana moleküler bileşenlerle odaksal yapışmanın büyütülmüş görünümü.	32
2.7. Hücreler arası bağlantı çeşitleri ve proteinleri.	35
2.8. Mezenkimal hücre hareketinin 4 aşaması; 1. Lamelapodium bölgesinde aktin uzantısı oluşması, 2. yeni fokal adezyon noktasının oluşumu, 3. ara-filamentler yardımıyla hücre gövdesinin translokasyonu, 4. eski fokal adezyondan ayrılma.	34
2.9. EMT'nin şematik gösterimi.	35
2.10. EMT ilişkili sinyal yolları, transkripsiyon faktörleri, hücre yüzey, iskelet ve ECM proteinleri ve miRNA'lar.	36
2.11. Meme kanseri 5 ana moleküler alt tipi. Sağdaki ok rengi koyulaştıkça kötü prognozu göstermektedir. Verilen yüzdeler o tipin görülme sıklığını ifade etmektedir.	38
2.12. Hareket eden mezenkimal bir hücre. CP aktin iskeletin (kırmızı renkli) ucuna bağlanarak, yeni monomer eklenmesini ve dolayısıyla hareketi engeller. CARMIL ise CP'ye bağlanarak, aktin iskeletin ucuna serbest bırakır ve hücre hareketine yardımcı olur.	41
3.1. Hücre bölgelerinin seçilmesi temsili görüntüler. A grafiği tek tek analiz edilen bir hücrenin birleştirilmiş görüntüsünü gösterirken, B grafiği bu hücrenin sitoplazmik bölgesini ve C görüntüsü ise membran bölgesini göstermektedir.	48
3.2. Partikül analizleri ve analizlerin bir hücre üzerinde fonksiyonlar ile birlikte şematik gösterimi.	49

Şekil	Sayfa
4.1. Kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronectin kaplı yüzeylerde yetiştirilen MDA-MB-231 hücrelerinin morfoloji değişimleri. Sonuçlar immünfloresan yöntemle göre analiz edilmiştir. İmmünfloresan boyamasında hücre çekirdeği (DAPI, mavi) ve aktin iskelet (falloidin, yeşil) işaretlendi. A grafiği hücre alanını, B grafiği polarizasyon değerlerini ve C grafiği temsili görüntüleri göstermektedir.	55
4.2. MDA-MB-231 hücreleri, kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronectin kaplı yüzeylerde yetiştirilmiş ve hücre çekirdek boyamaları DAPI, aktin iskelet boyamaları falloidin ve vimentin boyamaları vimentin antikoru kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar IF yöntemle göre analiz edilmiştir. A grafiği Vimentin OFY değerlerini, B grafiği vimentin membran yığılma indekslerini ve C grafiği temsili görüntüleri göstermektedir.	56
4.3. Kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronectin kaplı yüzeylerde yetiştirilen MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin düzey ve hücreyel dağılımı. Sonuçlar IF yöntemle göre analiz edilmiştir. İmmünfloresan boyamasında hücre çekirdeği (DAPI, mavi), aktin iskelet (falloidin, yeşil) ve vinkülin proteini (kırmızı) işaretlendi. A grafiği vinkülin OFY değerlerini, B grafiği vinkülin membran yığılma indekslerini ve C grafiği temsili görüntüleri göstermektedir.	58
4.4. Kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronectin kaplı yüzeylerde yetiştirilen MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin odak sayıları ve odakların hücreyel dağılımı. Vinkülin odakları (beyaz renkli), immünfloresan yöntemle, partikül analizleri sonucu elde edilmiştir. A grafiği vinkülin odak sayısını, B grafiği vinkülin odaklarının membran yığılma indekslerini ve C grafiği temsili görüntüleri göstermektedir.	59
4.5. Kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronectin kaplı yüzeylerde yetiştirilen MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL düzey ve hücreyel dağılımı. Sonuçlar IF yöntemle göre analiz edilmiştir. İmmünfloresan boyamasında CARMIL proteinleri (kırmızı) işaretlendi. A grafiği CARMIL1 OFY değerlerini, B grafiği CARMIL2 OFY değerlerini ve C grafiği CARMIL3 OFY değerlerini ve D grafiği temsili görüntüleri göstermektedir.	61
4.6. MDA-MB-231 hücreleri, kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronectin kaplı yüzeylerde yetiştirilmiş ve hücre çekirdek boyamaları DAPI, aktin iskelet boyamaları falloidin, ve vinkülin boyamaları CARMIL antikorları kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar IF yöntemle göre analiz edilmiştir. A grafiği CARMIL1 membran yığılma indeks değerlerini (OFY'ye göre), B grafiği CARMIL2 membran yığılma indekslerini (OFY'ye göre) ve C grafiği CARMIL3 membran yığılma indeks değerlerini (OFY'ye göre) ve D grafiği temsili görüntüleri göstermektedir.	62
4.7. Kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronectin kaplı yüzeylerde yetiştirilen MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL odak sayıları ve odakların hücreyel dağılımı. CARMIL odakları (beyaz renkli), immünfloresan yöntemle, partikül analizleri sonucu elde edilmiştir. A grafiği CARMIL1 odak sayısı değerlerini, B grafiği CARMIL2 sayısı değerlerini ve C grafiği CARMIL3 odak sayısı değerlerini, D grafiği temsili görüntüleri, E grafiği CARMIL1	

Şekil	Sayfa
odaklarının membran yığılma indeks değerlerini , F grafiği CARMIL2 odaklarının membran yığılma indekslerini ve G grafiği CARMIL3 odaklarının membran yığılma indeks değerlerini göstermektedir.	64
4.8. Kaplanmamış veya Matrigel kaplı yüzeylerde yetiştirilen ve IL-1 β ile uyarılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin morfoloji değişimleri. Sonuçlar immünfloresan yönetime göre analiz edilmiştir. İmmünfloresan boyamasında hücre çekirdeği (DAPI, mavi) ve aktin iskelet (falloidin, yeşil) işaretlenmiştir. A grafiği MCF-7 hücresinin alan değerlerini, B grafiği polarizasyon değerlerini ve C grafiği MDA-MB-231 hücresinin alan değerlerini, D grafiği polarizasyon değerlerini ve E grafiği MCF-7 hücrelerinin, F grafiği ise MDA-MB-231 hücrelerinin temsili görüntüleri göstermektedir.	66
4.9. Kaplanmamış veya Matrigel kaplı yüzeylerde yetiştirilen ve IL-1 β ile uyarılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin düzey ve hücreyel dağılımı. Sonuçlar immünfloresan yönetime göre analiz edilmiştir. İmmünfloresan boyamasında hücre çekirdeği (DAPI, mavi), aktin iskelet (falloidin, yeşil) ve vinkülin (kırmızı) işaretlenmiştir. A grafiği MCF-7 hücresinin vinkülin OFY değerlerini, B grafiği vinkülin membran yığılma indeks değerlerini, C grafiği MDA-MB-231 vinkülin OFY değerlerini, D grafiği vinkülin membran yığılma indeks değerlerini ve E grafiği MCF-7 hücrelerinin, F grafiği ise MDA-MB-231 hücrelerinin temsili görüntüleri göstermektedir.	69
4.10. Kaplanmamış veya Matrigel kaplı yüzeylerde yetiştirilen ve IL-1 β ile uyarılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin odak sayıları ve odakların hücreyel dağılımı. Vinkülin odakları (beyaz renkli), immünflorasan yöntemle, partikül analizleri sonucu elde edilmiştir. A grafiği MCF-7, C grafiği MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin odak sayılarını, B grafiği MCF-7, D grafiği MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin odaklarının membran yığılma indeks değerlerini, ve E grafiği MCF-7 hücrelerinin, F grafiği ise MDA-MB-231 hücrelerinin temsili görüntüleri göstermektedir.	71
4.11. Kaplanmamış veya Matrigel kaplı yüzeylerde yetiştirilen ve IL-1 β ile uyarılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL düzey ve hücreyel dağılımı. Sonuçlar immünfloresan yönetime göre analiz edilmiştir. İmmünfloresan boyamasında hücre çekirdeği (DAPI, mavi), aktin iskelet (falloidin, yeşil) ve CARMIL (kırmızı) işaretlenmiştir. A grafiği MCF-7 hücresinin CARMIL3 OFY değerlerini, B grafiği hücresinin CARMIL3 membran yığılma indeks değerlerini, C grafiği MDA-MB-231 hücresinin CARMIL3 OFY değerlerini, D grafiği hücresinin CARMIL3 membran yığılma indeks değerlerini ve E grafiği temsili görüntüleri göstermektedir.	73
4.12. Kaplanmamış veya Matrigel kaplı yüzeylerde yetiştirilen ve IL-1 β ile uyarılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL odak sayıları ve odakların hücreyel dağılımı. CARMIL odakları (beyaz renkli), immünflorasan yöntemle, partikül analizleri sonucu elde edilmiştir. A grafiği MCF-7 hücresinin CARMIL3 odak sayılarını, B grafiği CARMIL3 membran yığılma indeks değerlerini, C grafiği MDA-MB-231 CARMIL3 odak sayılarını, D	

Şekil	Sayfa
grafiği CARMIL3 membran yığılma indeks değerlerini ve E grafiği MCF-7 hücrelerinin, F grafiği ise MDA-MB-231 hücrelerinin temsili görüntüleri göstermektedir.	76
4.13. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL3 ve Vinkülin protein düzeyleri ve odak sayıları korelasyon analizleri (total-bütün koşulları içerecek şekilde yapılan analizlerin grafikleri)	77
4.13. Matrigel kaplı yüzeyde büyütülen ve IL-1 β ile EMT'ye tetiklenen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin epitelyal (E-kaderin, ve klaudin) ve mezenkimal belirteç (snail, twist, vimentin, ZEB) ifade düzeylerinin qRT-PCR analizleri değişimleri. Elde edilen sonuçlar $-\Delta\Delta\text{CT}$ hesaplanması yoluyla analiz edilmiştir.	78
4.14. Matrigel kaplı yüzeyde büyütülen ve IL-1 β ile EMT'ye tetiklenen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL ifade düzeylerinin qRT-PCR analizleri değişimleri. Elde edilen sonuçlar $-\Delta\Delta\text{CT}$ hesaplanması yoluyla analiz edilmiştir.	79

TABLULAR

Tablo	Sayfa
3.1. IF boyamalarda kullanılan antikorların ve boyaların özellikleri.	46
3.2. PCR içerikleri (Örnek başına).	51
3.3. PCR aşamaları ve süreleri.	51
3.4. qRT-PCR deneylerinde kullanılan primerlerin özellikleri.	52
4.1. Matrigel kaplı yüzeylerde yetişen MCF-7 ve MDA-MB-231 vinkülin proteini OFY ve Membran yığılma indeksleri. (Ortalama \pm SE)	67
4.2. Matrigel kaplı yüzeylerde yetişen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin proteini Odak sayısı ve Membran yığılma indeksleri (Ortalama \pm SE)	69
4.3. Matrigel kaplı yüzeylerde yetişen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri CARMIL3 protein OFY ve membran yığılma indeksleri (Ortalama \pm SE)	71
4.4. Matrigel kaplı yüzeylerde yetişen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL3 protein Odak sayıları ve Membran yığılma indeksleri (Ortalama \pm SE)	74
4.5. Matrigel kaplı yüzeylerde yetişen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL3 ve Vinkülin protein düzeyleri ve odak sayıları korelasyon analizleri	76

1. GİRİŞ

Meme kanseri mikroçevresinde, proinflamatuvar bir sitokin olan interlökin-1 β (*Interleukin-1 beta*, IL-1 β)'nin varlığı daha önce pek çok çalışmada gösterilmiştir (1-4). IL-1 β 'nin hücre sağ kalımını, proliferasyonunu, anjiyogenezi, adezyonu, invazyonu ve migrasyonu, bağışıklık hücrelerinin fonksiyonlarını ve matürasyonunu destekleyici özellikleri vardır (2). Bu sitokin inflamasyonun kronikleşmesine ve devamlılığına da katkıda bulunur. Bu durum, kanser progresyonunu ve epitelyal-mezenkimal dönüşümü (*Epitelial-Mezenkimal Transition*, EMT) destekler. EMT'nin ve metastazın gerçekleşebilmesi için hücrelerin hareket kabiliyeti kazanması önemlidir ve bu hareket hücre iskeleti elemanları tarafından gerçekleştirilir (5). Aktin iskelet, hücre hareketinin başlatılmasında rol alırken vinkülin, integrin başta olmak üzere 100'den çok protein yapıdan oluşan fokal adezyonlar (odaksal yapışmalar) hareketin devamlılığına ve vimentin proteini de içeren ara filamentler ise hareketin tamamlanmasına yardımcı olur. Ayrıca, vimentin proteini literatürde bir mezenkimal belirteç olarak geçer. Aktin, vinkülin, vimentin gibi hücre iskeleti ile ilişkili hücre elemanlarına ek olarak *Capping protein regulatory, ARp2/3, MyosinII linker* (CARMIL) proteinleri de hücre hareketinin düzenlenmesinde rol oynar ve bunu da aktin iskeletin uzamasına yardımcı olarak yapar (6). Dolayısıyla CARMIL proteinlerinin EMT ve metastaz için elzem olduğu söylenebilir. Bu bilgiler ışığında meme kanserinde IL-1 β ile uyarılmış EMT durumunda hücre iskelet dinamiklerinin incelenmesi, IL-1 β ile uyarılmış EMT'nin CARMIL protein düzeyi ve hücresele dağılımı ile ilişkili olduğu ve CARMIL proteinlerinin IL-1 β ile uyarılan EMT'de rol üstlenebileceğine dair gözlem yapılması amacıyla bir çalışma planlanmıştır.

Öncelikle tümör mikro çevresini daha iyi taklit edebilmek adına, MDA-MB-231 (yüksek düzeyde metastatik) insan meme kanseri hücre hattı hücreleri fibronektin veya MatrigelTM kaplı yüzeylerde büyütülmüş ve daha sonra hücrelerdeki aktin, vinkülin, vimentin ve CARMIL1, CARMIL2, CARMIL3 proteinleri immünfloresan yöntem ile boyanarak hücre iskeleti incelenmiştir. Sonuçlar, yüzey kaplanması ile artan hücre alan değerleri sebebiyle, kaplama protokollerinin mezenkimal karaktere katkı sağladığına ve MatrigelTM kaplamanın bu hücrelerde hücre hareketi için daha destekleyici olduğuna işaret etmiştir. Sonuçlar, CARMIL3 proteininin bu hücrelerde

CARMIL proteinleri içerisinde en çok ifade edilen, Matrigel yüzeyde odak sayısı belirgin düzeyde artmış olan ve mezenkimal karakterle en ilişkili izoform olabileceğini göstermiştir. Mezenkimal bir belirteç olan vimentin proteinin kaplanmış yüzeylerde ifadesinin değişmediği ancak membran bölgesine daha çok yığıldığı belirlenmiştir. Hem vinkülin hem de CARMIL1 ve CARMIL3 proteinlerinin odak sayıları kaplama ile dolayısıyla da mezenkimal karakter ile örtüşecek şekilde artmıştır.

İnsan meme kanseri MCF-7 (epitelyal karakterde) ve MDA-MB-231 (mezenkimal karakterde) hücre hatları tümör mikroçevresini taklit edebilmek amacıyla Matrigel ile kaplanmış yüzeylerde yetiştirilmiş ve IL-1 β proteini ile muamele edilerek EMT uyarılmıştır. Mikroskopik analizler sırasında özellikle tek tek düşen yani hareket yeteneği daha yüksek ve metastaza daha yatkın olabilecek hücreler analiz edilmiştir. Aktin, CARMIL3 ve vinkülin proteinleri immünfloresan yöntemi ile boyanmıştır. Epitelyal karakterli MCF-7 hücreleri IL-1 β ile mezenkimal dönüşüme zorlandığında hücre alan değerleri kaplamadan bağımsız artarken, polarizasyon değerleri değişmemiştir. Ancak, mezenkimal karakterli MDA-MB-231 hücrelerinde IL-1 β , kaplanmamış yüzeylerde alan artışına, kaplanmış yüzeylerde ise alan azalmasına sebep olmuştur. Ayrıca sonuçlar bu hücrenin IL-1 β olmaksızın Matrigel kaplı yüzeyde daha mezenkimal bir karaktere sahip olduğunu göstermektedir. MCF-7 hücrelerinde vinkülin ve CARMIL3 protein odak sayıları IL-1 β ile (yani mezenkimal karakter artışına bağlı olarak) artmaktadır. Beklenileceği üzere benzer bir durum, halihazırda mezenkimal özelliğe sahip MDA-MB-231 hücrelerinde görülmemektedir. Vinkülin ve CARMIL3 protein odaklarının mezenkimal karakter ile artması, bu proteinlerin EMT ile dolayısıyla da metastaz ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

IL-1 β ve EMT arasında tespit edilen ilişkiyi mRNA düzeyinde test etmek için MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarından elde edilen transkripler epitelyal (E-kaderin, klaudin-1) ve mezenkimal (snail, ZEB1, twist1, vimentin) belirteçlerin ve CARMIL izoformlarının düzeylerindeki değişimler açısından incelenmiştir. Epitelyal belirteçlerin azaldığı, mezenkimal belirteçlerin arttığı durum yalnızca hücrelerin Matrigel kaplı yüzeylerde yetiştirilip IL-1 β ile EMT'ye

zorlanması ile izlenmiştir. CARMIL mRNA düzeyleri ise, Matrigel kaplı yüzeyde IL-1 β ile azalma eğilimi göstermektedir. CARMIL3 proteinin düzeyleri ve hücre dağılımı MCF-7 hücreleri kaplanmamış yüzeylerde IL-1 β ile, MDA-MB-231 hücreleri ise Matrigel kaplı yüzeylerde IL-1 β yokluğunda daha mezenkimal bir karakter göstermekteydi. Hem MCF-7 hücrelerinde kaplanmamış yüzeylerde IL-1 β ile hem de MDA-MB-231 hücrelerinde Matrigel kaplı yüzeylerde IL-1 β olmaksızın CARMIL mRNA ifadeleri artmaktadır. Bu sonuçlar CARMIL3 mRNA düzeylerinin bir erken EMT belirteci olma potansiyeli taşıdığını gösterebilir. Sonuç olarak, bu çalışma meme kanserinde, IL-1 β ile uyarılmış EMT'nin CARMIL protein düzeyi ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser, İnflamasyon ve IL-1 β

2.1.1. Kanser

Kanser, dünya çapında ölümlerle sonuçlanan hastalıklar arasında, kalp rahatsızlıklarından sonra, ikinci sırada yer almaktadır (7). Kanserin en çok kabul gören karakteristik özellikleri; genetik değişiklikler (özellikle tümör baskılayıcı ve onko-genlerde gerçekleşen mutasyonlar), artmış hücre proliferasyonu, inflamasyon, anjiyogenez, invazyon, metastaz ve bağışıklık sisteminden kaçış olarak sıralanabilir (8). İmmünolojik perspektiften bakıldığında ise; kanser, bir kronik inflamasyon durumudur. İzlenen immün yetmezlik nedeniyle bağışıklık sistemi kanserin oluşumuna ve ilerlemesine yardım etmektedir denilebilir (9).

Bağışıklık sistemi, patojenleri ve tümör hücrelerini tanır ve ortadan kaldırır. Böylece, tümör büyümesini engeller. Kanser oluşumu, immün sisteme bağlı olarak üç ana fazda gerçekleşir (10). Başlangıç evresinde (“eliminasyon fazı”) oluşan kanser hücreleri immün sistem tarafından tanınır ve yok edilir. Daha sonra, tümörün ilerlemediği “denge fazı” vardır. Bu fazda bağışıklık sistemi tümörün yayılmasına ve büyümesine engel olabilmekte ama tümörü tamamen yok edememektedir. Hatta bağışıklık sistemi hücrelerinin immünojenik kanser hücrelerini yok etmesinin daha agresif hücrelerin seçilimine neden olduğu da söylenebilir (*immunosurveillance*). Son evre (“kaçış fazı”) ise bağışıklık sistemi ile kanser arasındaki savaşı kanserin kazandığı, bağışıklık sisteminin doku tamiri, inflamatuvar sitokinlerin, immün baskılayıcı mikroçevre oluşumu dahil birçok aracını kanserin faydasına kullandığı evredir. İmmün sistemin nasıl yetersiz kaldığının ve kansere yardım ettiğinin anlaşılması önemlidir. Günümüzde kullanılan immünoterapi yöntemlerinin gelişimi de bu temel mekanizmaların anlaşılması ile mümkün olabilmiştir (11).

2.1.2. İnflamasyon

Akut inflamasyon, organizma için zararlı uyarılara verilen ilk yanıttır. Bağışıklık sistemimizin temel görevi öz olmayan (*non-self*) hücreler ile öz (*self*) arasındaki ayrımı doğru bir şekilde yaparak organizmanın yabancı tarafından istilasını

engellemektir. İmmün sistemimiz patojenlere karşı ilk cevap olan doğal immünite ve ikincil cevap olan edinsel immünite olmak üzere iki ayaktan oluşur. İnflamasyon immünitenin bir parçası olup vücudun kendini patojenlerden korumada kullandığı süreci temsil eder. İnflamasyon dokuda bulunan (*tissue resident*) makrofaj, dendritik hücre (*Dendritic Cells*, DC) vb. hücrelerin patojeni algılaması, kemokin ve sitokinlerin salgılanması, damar genişliğinin artması (Vazodilatasyon), nötrofil ve kompleman proteinlerin, gerekirse diğer immün sistem elemanlarının inflamasyon bölgesine geçişi, pıhtı oluşumu ve doku tamiri aşamalarından oluşur (12).

İmmün sistemin enfeksiyona cevabı literatürde dört etki ile tanımlanmakta olup, bunlar ağrı, kızarıklık, şişlik ve ateştir. Bütün bu etkiler damar boyutu ve geçirgenliğinin artması sonucu bölgeye sıvı ve lökosit geçişi ile birliktelik gösterir. Doğal bağışıklık hücreleri (endotelial hücreler, nötrofiller, makrofajlar, mast hücreleri, doğal öldürücü (*Natural Killer*, NK) hücreleri ve dendritik hücreler) ve edinsel bağışıklık hücreleri (T ve B lenfositler) yanı sıra pro-inflamatuvar faktörler (vazoaktif aminler, vazoaktif peptitler, kompleman fragmanları, interlökin-1 β (*Interleukin-1 beta*, IL-1 β), IL-6, IL-15, IL-17, IL-23, tümör nekroz faktör alfa (*Tumor Necrosis Factor α* , TNF- α) ve interferon γ (IFN- γ) gibi sitokinler de inflamasyonda görev alır (13). İnflamatuvar hücrelerin inflamasyon bölgesine geçişi için kemokinler (örneğin; CCL2, CXCL12) gereklidir. Bununla birlikte anti-inflamatuvar hücreler (M2 tip makrofajlar, tip 2 yardımcı T hücre (*T helper 2*, Th2) lenfositler, düzenleyici T hücreler (*regulatory T cells*, Treg) ve myeloid kökenli baskılayıcı hücreler (*Myeloid-derived suppressor cells*, MDSC), ve anti-inflamatuvar sitokinler (IL-4, IL-10, IL-13 ve transforme edici büyüme faktörü β (*Transforming Growth Factor β* , TGF- β)) inflamasyonun çözülmesinde rol oynar (14).

2.1.3. Kanser ve İnflamasyonla ilişkili mekanizmalar

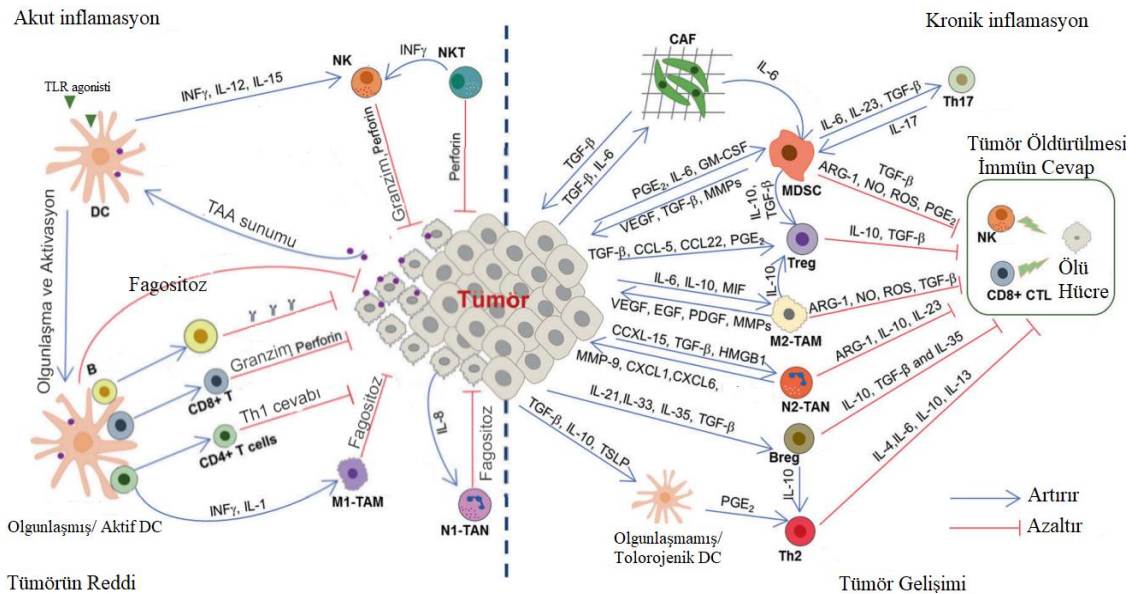
İnflamasyon ve kanserde birçok aşama ve aracı molekül ortaktır. Bu kronik inflamatuvar mikroçevrede bulunan nitrik oksit (*nitric oxide*, NO), sitokinler (IL-1 β , IL-2, IL-6 ve TNF- α), büyüme faktörleri ve kemokinler gibi çeşitli onkojenik araçlar serbestlenir. IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-23 gibi interlökinler ve reaktif oksijen türleri / reaktif nitrojen türleri (*Reaktif Oxygen Species/ Reaktif Nitrogen Species*, ROS/RNS) ile birlikte CXCL1-8 gibi kemokinler, yüksek aktive B hücrelerin kapa-

hafif-zinciri-geliştiren nükleer faktörü (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- κ B) yolağı ve siklooksijenaz-2 (*cyclooxygenase-2*, COX-2) aktivitesine sebep olur ve inflamasyon aracılı tümörögenез desteklenir. TNF- α , vasküler endotel büyüme faktörü (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) ve IL-6'nın nötralizasyonu inflamasyonu ve tümör yükünü birlikte azaltması, ayrıca anti-IL-2'nin tümör büyümesini geriletmesi de kanser ve inflamasyon arasındaki sıkı ilişkinin göstergesidir. Ek olarak, kansere karşı çeşitli anti-inflamatuvar ilaçların etkinlik göstermesi de kanıt niteliğindedir (14-16).

Tümör mikroçevresi, dendritik hücreler, makrofajlar, monositler, T lenfositler ve nötrofiller dahil olmak üzere çeşitli bağışıklık hücreleri, kanserle ilişkili fibroblastlar (*Tumor Associated Fibroblasts*, CAF) ve kanser hücrelerinden oluşur. Tümör-ilişkili makrofajlar ve nötrofiller (*Tumor Associated Macrophages and Tumor Associated Neutrophils*, TAM ve TAN) kanser progresyonuna farklı şekilde etki etmektedir. TAM-1 ve TAN-1, anti-tümör fenotipine sahipken, TAM-2 ve TAN-2 ise pro-tümöröjeniktir. İnflamasyon nedeniyle ROS ve RNS oluşumu, DNA ve protein yapısını değiştirerek mutajenik etki gösterir ve karsinojeneze yol açar (17-19). Akut faz cevabında rol oynayan bir protein olan Serum amyloid A (SAA) seviyesinin artması, nüks olmaksızın sağkalım süresinin azalmasına sebep olmaktadır (20). Benzer şekilde, tümör mikroçevresinde sık görülen oksijence fakir olma durumu (hipoksi) kanserde yaygındır. Tümör ve inflamasyon ilişkisine bir başka örnek olarak miR-126 gibi çeşitli mikroRNA'ların tümör ilerlemesinde ve anjiyogenezde önemli rol oynaması gösterilebilir (21).

Kanser ve inflamasyon karşılıklı etkileşim içerisinde gelişir (10). Akut inflamasyon esnasında, dendritik hücreler (DC'ler), tümörle ilişkili antijenlerin (*Tumor Associated Antigens*, TAA) alımı veya bir *toll-like receptor* (TLR) agonistinin başlattığı bir aktivasyon sonucu, birçok farklı mekanizmayı kullanarak inflamatuvar tepkileri indükleyebilir ve anti-tümör immün cevapta düzenleyici bir rol oynayabilir. Bu mekanizmalara örnek olarak tümör antijenlerinin sunumu ve tümöre özgü sitotoksik T hücrelerin aktifleştirilmesi, interferon γ (IFN- γ) ve IL-1 salgılayarak bağışıklık hücrelerinin tümör baskılanmasına doğru polarize edilmesi (örn. TAM'lerin M1 polarizasyonu) ve tümörle savaşacak immün hücrelerinin

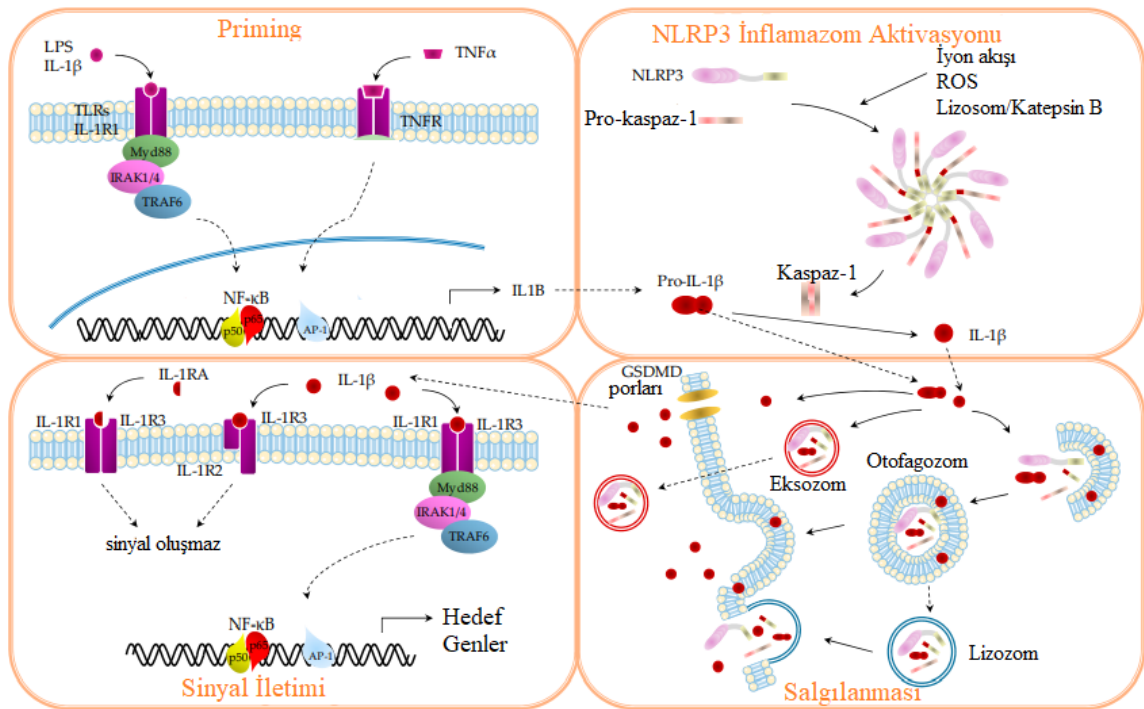
inflamasyon bölgesine çağırılması gösterilebilir. Tümör hücrelerinin TAA sunumuyla aktifleşen anti-tümörojenik immün hücreler kanser hücrelerinin ölümüne yol açar. Bunu NK ve sitotoksik T hücreler perforin ve granzim salgılayarak, M1 ve N1 hücreler fagositoz yoluyla ve diğer pro-tümörojenik hücrelerin inflamasyon bölgesine çağırılmasını sağlayarak, yardımcı T hücreler Th1 cevabı uyararak ve plazma hücreler antikor salgılayarak sağlar. Ancak akut inflamasyon zamanında çözülmezse kronik inflamasyon durumu oluşur ve bu durumda tümör hücreleri yalnızca dentritik hücrelerin yukarıda bahsedilen etkileri ile baş etmekle kalmaz aynı zamanda çeşitli sitokinler, kemokinler ve inflamatuvar mediatörler salgılayarak çok sayıda immünesupresif hücreleri (örneğin MDSC, Treg, düzenleyici B hücre (*regulatory B cells*, Breg), M2-TAM, N2-TAN ve Th2 hücreler) de inflamasyon bölgesine çağırır. Tümör hücreleri bunu TGF- β , prostoglandin E2 (PGE2), granülosit-makrofaj koloni-stimülasyon faktörü (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF), IL-6-10-21-33-35, CCL5-22, makrofaj migrasyon inhibitör faktörü (MIF) ve yüksek mobilite grup 1 proteini (*High-Mobility Group Protein 1*, HGMGB1) aracılığıyla, tümör destekleyici bağışık sistemi elemanları olan MDSC, Treg, M2 ve N2, Breg, Th2 ve tolerojenik dendritik hücreleri aktif hale getirerek yapar. Bu hücrelerse TGF- β , VEGF, endotel büyüme faktörü (*Endotelial Growth Factor*, EGF), PGE2, matriks metalloproteazlar (MMPler), CXCL1-6, arjinaz1 ve elastaz gibi araçlar yoluyla pro-anjiyojenik ve pro-tümöral mikro çevre oluşumuna ve antitümör bağışıklığı önlenmeye katkı sağlayarak tümör gelişimini desteklerler (4) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. İnflamasyonun kanser üzerindeki ikili rolü ve mekanizmaları. Akut ve kronik İnflamasyon durumlarından kanserin CAF'lar ve immün sistem ile ilişkisi. (Zhao ve diğerleri (2021) makalesinden uyarlanmıştır) (14).

2.1.4. İnterlökin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β inflamasyona yardımcı bir sitokin olup bağışıklık sistemi hücreleri, fibroblastlar ve kanser hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre tarafından salgılanır. IL-1 β 'nın da dahil olduğu IL-1 protein ailesinin 4 ana üyesi vardır. Bunlar IL-1 α , IL-1 β , IL-33 ve IL-1 reseptör antagonisti IL-1RA'dır. IL-1RA dışında protein ailesinin tamamı proinflamatuvar etki gösterir. IL-1 α nükleusta lokalizedir ve hücre proliferasyonunda rol oynar. IL-1 β ise ekzositoz ile hücre dışına salgılanır. Pro-IL-1 β aktif hale gelmek için kaspaz aktivasyonuna ihtiyaç duyarken pro-IL-1 α , pro haliyle aktivite gösterir, kaspaz enzimi tarafından aktivitesi düzenlenir. İnaktif halde 31 kilo dalton olan pro-IL-1 β , inflamazom aktivasyonu sonucu, kaspaz1 proteaz aktivitesi ile kesilerek 17 kilo dalton boyutundaki aktif IL-1 β 'ya dönüştürülür (3, 22).



Şekil 2.2. IL-1 β üretim, aktivasyon, sinyal iletim ve salgılama mekanizmaları (Rebe ve diğerleri (2020) makalesinden uyarlanmıştır) (3).

“Priming” olarak adlandırılan pro-IL-1 β üretimi NF- κ B aktivasyonu sonucu gerçekleşir. NF- κ B yolağı, çeşitli sitokin reseptörlerinin ligandları, örüntü tanıma reseptörleri (*Pattern Recognition Receptors*, PRR'ler), TNF reseptörü (TNFR) süper ailelerinin yanı sıra T-hücresi reseptörü (TCR) ve B-hücresi reseptörü dahil olmak üzere çeşitli uyarılara yanıt verir (23). Örneğin, ortamda bulunan lipopolisakkaritler (LPS) sonucu TLR üzerinden NF- κ B transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ve çekirdeğe geçişi mümkün olur (24). NF- κ B yolağını IL-1 β 'nin kendisi de LPS gibi *Myeloid Differentiation Primary Response 88* (MYD88) yolağı üzerinden interlökin-1 reseptör ilişkili kinaz (IRAK1/4) ve TNF reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF6) aracılığıyla aktive eder. Bu yolağın aktivasyonu sonucu hedef genlerden biri olan inaktif haldeki pro-IL-1 β üretilir. Ancak pro-IL-1 β , aktif hale gelebilmek için kaspaz-1 proteaz aktivesi ile kesilmeye ihtiyaç duyar. İnflamasyon durumundan kaynaklı K⁺ iyon akışı, ROS ve lizozom/katepsin B aktivitesi sonucu *Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich-Containing Family, Pyrin Domain-Containing-3* (NLRP3) inflamazom aktif hale gelir ve pro-kaspaz1'i aktif kaspaz-1 haline getirerek IL-1 β 'nin aktif hale gelmesine yardımcı olur. Aktif IL-1 β , gastermin D (GSMD) porları veya kesecikler içerisinde ekzositoz yoluyla hücre dışına salgılanır. Daha sonra IL-1 β , hücrelerin membranlarında bulunan IL-1R1 ve IL-1R3 dimeri halde olan IL-1 reseptörüne bağlanarak sinyal oluşturur ve yine NF- κ B yolağını uyararak P50/P65, aktivatör protein 1 (AP1), IL-1 β gibi NF- κ B hedef genlerin ifadesini uyararak inflamasyona yardımcı olur (25) (Şekil 2.2.).

2.1.4.1.IL-1 β ve İnflamasyon İlişkisi

IL-1 β immün sistemin hem sistematik hem de lokal yanıtlarını oluşturmaya yardımcı olur. İlk olarak epitel hücrelerde adezyon moleküllerinin ve stromal hücrelerin kemokin üretimini sağlayarak bağışıklık sistemi hücrelerinin inflamasyon bölgesine gelmesine yardımcı olur. Ek olarak fosfolipaz A2, siklooksijenaz 2 ve nitrikoksit sentaz gibi enzimlerin ifadesini sağlayarak NO, prostoglandin E2 gibi mediatörlerin salgılanmasını sağlar. IL-1 β cevabı hipertansiyon, ateş, nötrofili, fibrozis ve akut faz proteinlerinin salgılanması gibi sonuçları içerir. Aynı zamanda IL-1 β , tip 17 yardımcı T hücre (Th17) gelişimini ve IL-17 üretimini destekleyerek edinsel immün yanıtlara yön verir (12, 22).

2.1.4.2.IL-1 β ve Kanser İlişkisi

IL-1 β 'nın diğer proinflamatuvar sitokinlerde de gözleendiği gibi kanser üzerinde iki yönlü bir etkisi vardır. Kanseri ilerleten (pro-kanser) yönü daha belirgindir (Şekil 2.3.). Bağışıklık hücrelerinin proliferasyonuna ve matürasyonuna destek olur ve inflamasyon bölgesine infiltrasyonu artırır (3). Ancak, kanser hücrelerinin de çoğalması, sağ kalımı, invazyon/metastazına ve anjiyogenez mekanizmalarına yardımcı olarak kanseri desteklemektedir (2). Kanser hastalarında yüksek IL-1 β seviyesi, kötü prognoz ile ilişkilidir. Ayrıca, bir IL-1 β antagonisti olan KINERET® kullanımı fare kanser modellerinde metastazı azaltmaktadır (15). IL-1 β 'nin akciğer kanserinde MMP üretimini artırması sonucu kanserin invazyon kapasitesi artış gösterir (26). Ayrıca E-selektin artışına bağlı olarak MDSC infiltrasyonunda görülen yoğunluk da IL-1 β 'nin dolaylı olarak bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olduğu bir mekanizmadır (27). IL-1 β 'nin, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) üzerinden anjiyogenezini desteklediği de gösterilmiştir (28).



Şekil 2.3. IL-1 β ve kanser ilişkisi. IL-1 β 'nin hücre sağ kalımını proliferasyonunu, anjiyogenezini, adezyonu, invazyonu ve migrasyonu, bağışıklık hücrelerinin fonksiyonlarını ve matürasyonunu destekleyici özellikler dahil olmak üzere tümöre iki yönlü etkisi vardır.

2.2. EMT, Metastaz ve Hücre Hareketi

2.2.1. Metastaz ve Hücre Hareket Mekanizmaları

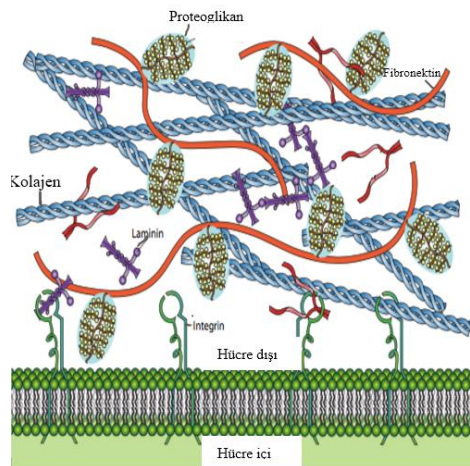
Kansere bağlı ölümlerin %90'ı tümör hücrelerinin metastaz yoluyla köken aldıkları organdan başka bir organa sıçraması nedeniyle olur(7). Kanser hücresinin primer dokudan ayrılıp başka bir dokuya gidebilmesi için hareket kabiliyeti kazanması, hücre adezyon ve migrasyon (göç) mekanizmalarını kullanması gereklidir (29).

2.2.2. Hücre Migrasyonu İçin Önemli Yapılar

Hücre hareketi metastaz için, hücre iskeleti de hücre hareketi için oldukça önemlidir (30). Hücre dışı matriks (*Extracellular Matrix*, ECM), fokal (odaksal) adezyonlar, aktin iskelet uzantıları, hücreler arası bağlantılar ve hücre adezyon molekülleri (*Cell Adhesion Molecules*, CAM) hücrenin hareketi için iskelet yapısı ile ilişkili unsurlardır (31).

2.2.2.1. Hücre Dışı Matriks (ECM)

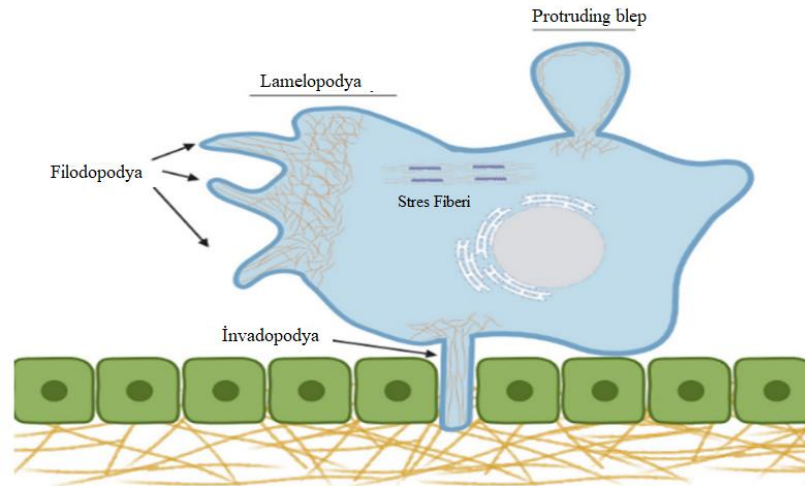
Doku sıvısı olarak da adlandırılan ancak daha çok bir ağ görünümüne sahip olan hücre dışı matriks; kolajen, fibronektin, laminin gibi proteinlerden oluşur. Hücrelerin hareketine yardımcı olan mekanik sinyalleri algıladığı, yani sinyal üretimini uyarabilen doku bileşenidir. Özellikle fibroblastlar olmak üzere neredeyse tüm hücreler tarafından ECM bileşenleri üretilebilir (32) (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. ECM yapısı (Steinbeck ve diğerlerinden (2022) uyarlanmıştır) (33).

2.2.2.2. Aktin İskelet Uzantıları

Stres fiberlerine ek olarak, bir hücrede aktin iskelet yapılı ve harekete yardımcı 4 önemli yapı daha bulunur. Bunlardan i) İnvadopodya, hücrelerin salgıladıkları MMP'ler yardımıyla bazal laminayı aşarak invazyonuna yardımcı olan yapıdır. ii) Lamelopodya, hücrenin yöneldiği uçtaki aktin ağının yoğunlaştığı yaklaşık 1 nm boyutundaki bölümdür. iii) Filopodya; Hücre hareket yönünü belirlemesine yardımcı olan sitoplazmik aktin uzantılarıdır. iiiii) Protruding blep (tomurcuk), uzantıdan çok belli bir kesecikte sitoplazmik yığılma yoluyla hareket eden hücrelerde görülen aktin- sitoplazmik yapılardır (Şekil 2.5.) (34).

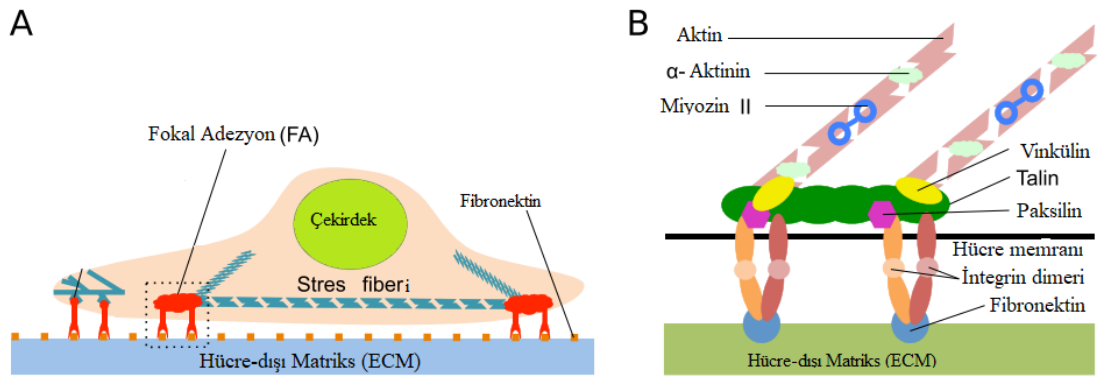


Şekil 2.5. Aktin iskelet yapılarının (lamelopodya, filopodya, İnvadopodya, protruding blep ve stres fiberleri) tek bir hücre üzerinde şematik gösterimi (Biber ve diğerlerinden uyarlanmıştır) (35).

2.2.2.3. Fokal Adezyonlar (odaksal yapışmalar)

Fokal adezyonlar hücrelerin ECM'ye bağlandığı, vinkülin, paksilin, talin başta olmak üzere 100'den çok proteinden oluşan özelleşmiş yapılardır. En dışta membrana gömülmüş durumda olan integrin, fibronektin gibi ECM proteinlerine tutunur. İntegrin ile hücre iskeleti arasında bağlantıyı sağlayan paksilin, talin gibi aracı birçok protein bulunur. Fakat adezyonlar hücre hareketine yardımcı olmanın yanı sıra, fiziksel ve mekanik strese, hücrenin bulunduğu yüzeyin sertliğine ve ECM yapısına bağlı olarak (*outside-in*) sinyal oluşturur ve hücreden hücre dışına (*inside-out*) sinyal iletimine de yardımcı olurlar. Bunun sonucunda hücre iskeleti organizasyonunda değişiklik olabileceği gibi, gen ifade değişiklikleri, hücre hareketi,

hücre büyümesi ya da hücre ölümü de gerçekleşebilir(36). Yayılma ve göç sırasında hücre, yeni oluşan adezyonlar yoluyla ön kenarda hücre dışı matrisin (ECM), örneğin fibronektin ligandlarına yapışır. Lamellipodyumda (LP) fokal kompleksler halinde gelişirler. Transmembran protein integrin, ECM üzerindeki fibronektine bağlanır. Miyosin II motor molekülleri nedeniyle kasılabilen aktin stres liflerine bağlantı talin tarafından yapılır. Bu temel mekanik bağlantı, vinkülin, paksilin veya a-aktinin gibi aracı proteinler tarafından güçlendirilir (Şekil 2.6.) (37).



Şekil 2.6. Fokal adezyonların şematik gösterimi. (A) Aderan bir hücrenin görünümü, (B) Ana moleküler bileşenlerle odaksal yapışmanın büyütülmüş görünümü (Hoffmann ve diğerleri (2013) makalesinden uyarlanmıştır) (37).

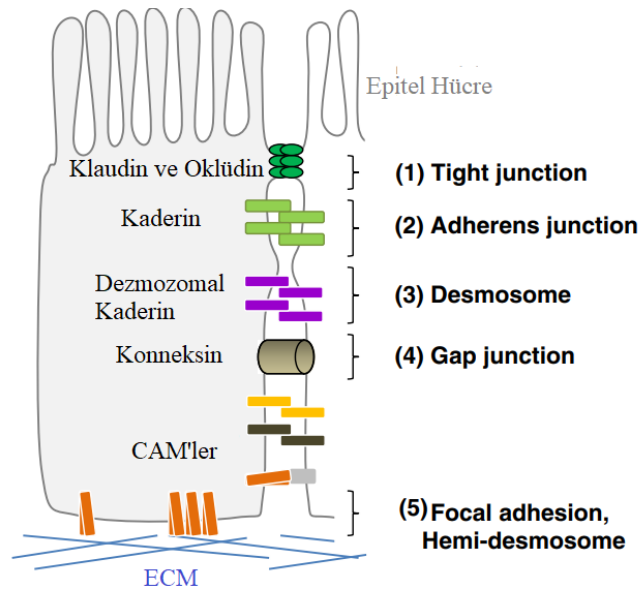
2.2.2.4. Hücre Adezyon Molekülleri

Hücre adezyon molekülleri (*Cell Adhesion Molecules, CAM*), hücre-hücre etkileşimleri ve hücre-matriks etkileşimlerinde görevli transmembran reseptörlerdir. İntegrinler, immunoglobülin süper ailesi CAM'ler, selektinler ve katerinler olmak üzere 4 gruba ayrılabilirler. Hücre sinyal iletiminde ve mobilitesinde işlevseldirler. Ayrıca lökositlerin epitel hücrelerine tutunarak ilerlemesinde (*patrolling*) ve kandan dokuya geçişlerine yardımcı olurlar. Ek olarak kanser hücrelerinin kandan dokuya geçişinde de önemli rol oynarlar (38, 39).

2.2.2.5. Hücreler Arası Bağlantılar

Özellikle epitel hücreler arasında bulunan hücreler arası bağlantılar, hücrelerin birbirleriyle iletişimini sağlarken aynı zamanda da hücreler arasında bir bariyer olarak hücrelerin bir yüzey oluşturmalarını sağlar. Bu bağlantılar 5 alt grupta incelenirler. Genellikle klaudin ve okludin proteinlerinden oluşan sıkı bağlantılar (*tight junctions*),

bitişik hücreler arasında bir sızdırmazlık oluşturur ve aktin filamentlerine bağlanırlar. Aderan bağlantılar (*adherent junctions*) ise aktin hücre iskeletine bağlı klasik kaderin plaklarıdır. Desmozomlar, ara filamentlere bağlı dezmozomal kaderinler tarafından oluşturulur. Boşluk bağlantıları (*Gap junctions*) ise, konneksin proteinlerinden oluşup iki bitişik hücrenin sitoplazmasını birbirine bağlar ve mikrofilamentlere bağlanır. Son olarak hemi-dezmozomlar ise bazal membran ile hücrelerin bağlantı noktalarıdır (Şekil 2.7.).

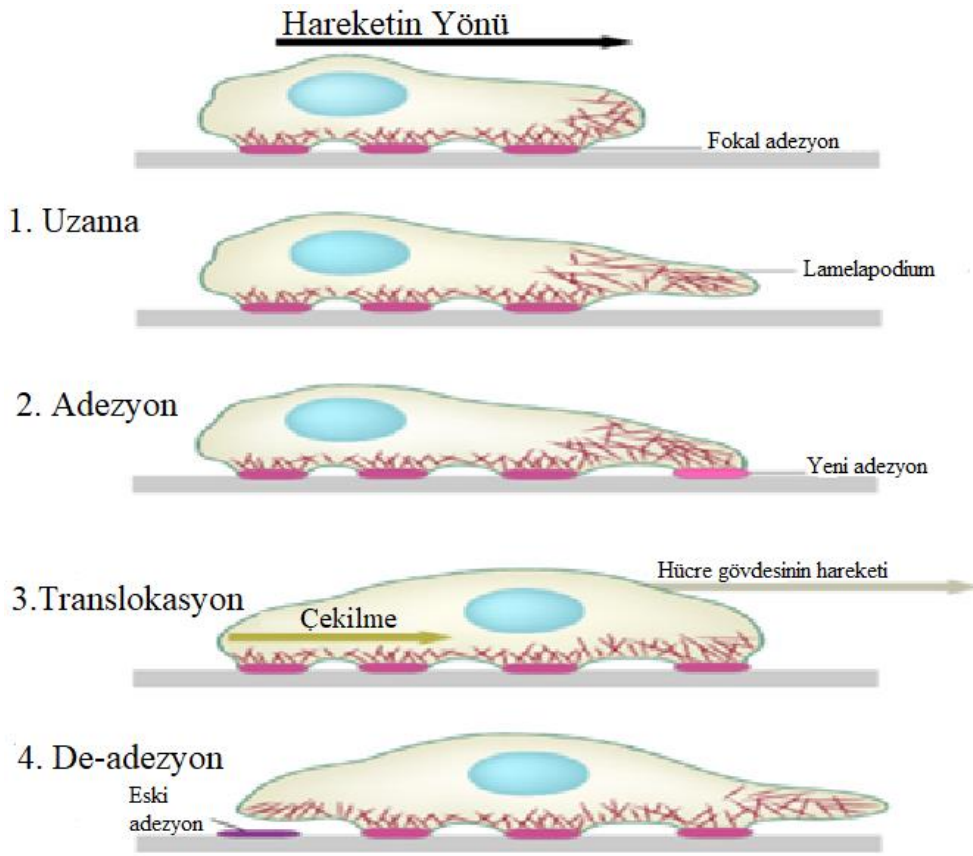


Şekil 2.7. Hücreler arası bağlantı çeşitleri ve proteinleri. (Schnell ve diğerleri (2013) makalesinden uyarlanmıştır (39).

2.2.3. Hücre Migrasyon Çeşitleri

Hücrelerin göç türleri; ameboid, kolektif ve mezenkimal migrasyon olmak üzere üç alt grupta incelenebilir. Ameboid migrasyon, lökositlerde ve protozoalarda görülen hücre göç şeklidir. Ameboid karakterli bir hücre mezenkimal bir hücreye göre daha zayıf yapışma paterni gösterdiği için 10 kata kadar hızlı hareket edebilmektedir. Kolektif migrasyon ise hücrelerin bir katman halinde hareket ettiği, sınır hücrelerinin farklı işlevler kazanabildiği, gastrulasyonda ve bazı kanser çeşitlerinde görülen göç türüdür (38). Mezenkimal migrasyon ise fibroblastlarda ve birçok kanser türünde görülen migrasyon şeklidir. Bu hareketi gösteren hücreler fokal adezyonlar yardımıyla ekstraselüler matriks elemanlarına tutunarak ilerlerler. Ayrıca bu hücrelerde MMP salgılayarak ECM degradasyonu yapılması da yaygındır (40).

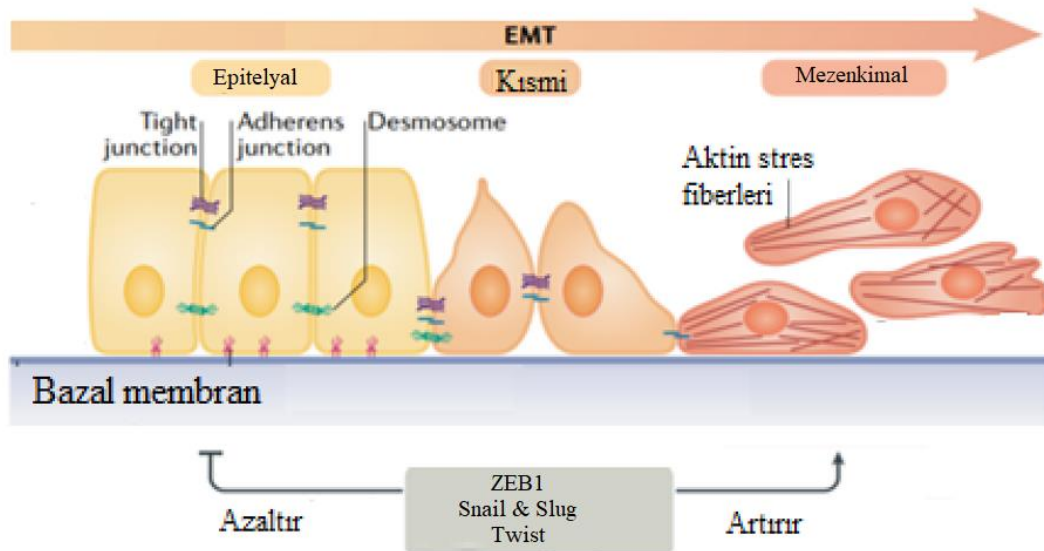
Mezenkimal karakterli bir hücrenin hareketi dört aşamada özetlenebilir (Şekil 2.8.). İlk olarak hücre, hareket edeceği taraftaki uç noktasında aktin hücre iskeleti yardımıyla bir uzama bölgesi (lamelapodium) oluşturur. Daha sonra bu uzama bölgesinin terminalinde hücrenin yüzeyle temas ettiği fokal adezyon noktası denilen yapışma noktası oluşur. Üçüncü adımda, hücrenin hareket edeceği yöne doğru hücre gövdesinin hareketi gerçekleşir. Son adımda ise hücrenin arka tarafında daha önce oluşmuş olan fokal adezyon noktasından ayrılır (31, 41).



Şekil 2.8. Mezenkimal hücre hareketinin 4 aşaması; 1. Lamelapodium bölgesinde aktin uzantısı oluşması, 2. yeni fokal adezyon noktasının oluşumu, 3. ara-filamentler yardımıyla hücre gövdesinin translokasyonu, 4. eski fokal adezyondan ayrılma. Uluslararası Singapur Üniversitesi, Mekanobiyoloji Enstitüsü web sitesinden (2018) uyarlanmıştır (42).

2.2.4. EMT ve Metastaz

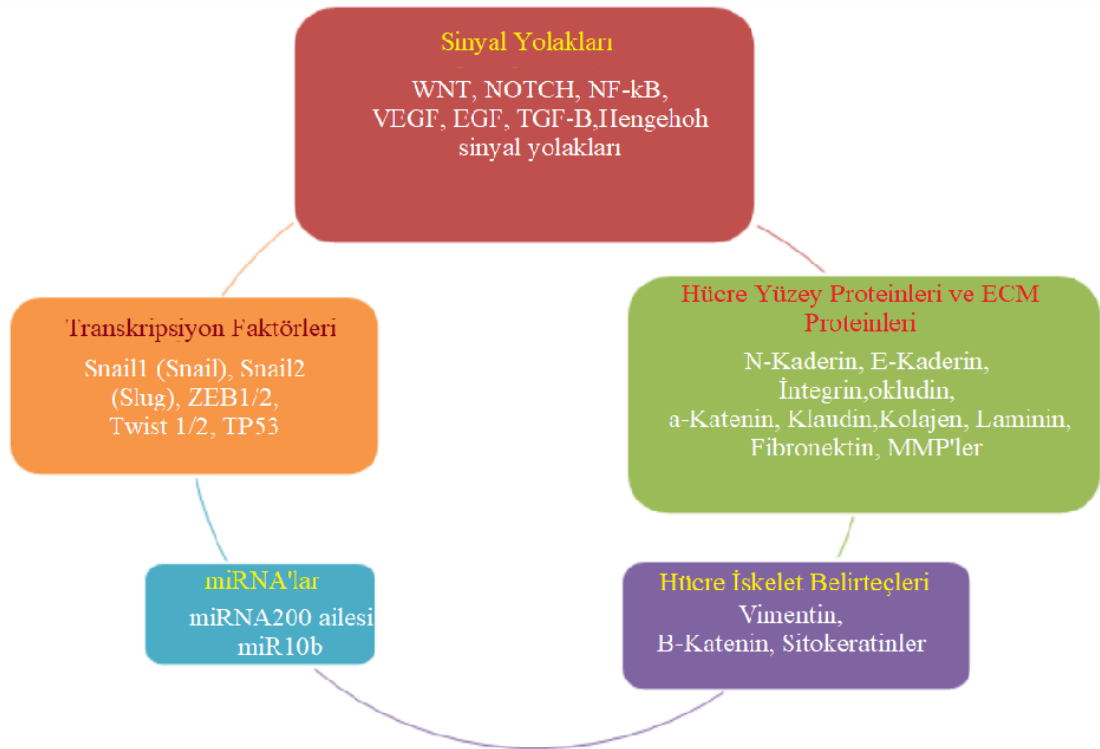
Tümör mikroçevresinde bulunan IL-1 β , IL-6, tümör nekroz faktör alfa (*Tumour Necrosis Factor α* , TNF- α), hepatosit büyüme faktörü (*Hepatocyte Growth Factor*, HGF), TGF- β , endotel büyüme faktörü (*Endotelial Growth Factor*, EGF), ve VEGF gibi büyüme faktörleri ve sitokinler EMT'yi uyarır(43). EMT esnasında, epitelyal karakterli olan hücreler sahip oldukları hücrelerarası bağlantıları (*tight junctions, aderan junctions, desmozom*) kaybederek, adezyon ve migrasyon yeteneği daha yüksek hücreler haline gelirler. Ayrıca bu hücreler, E-kaderin ve klaudin başta olmak üzere epitelyal belirteçleri ifade etmeyi bırakır ve mezenkimal belirteçleri (örneğin; N-kaderin, vimentin, snail, slug, ZEB, twist) ifade etmeye başlarlar. Ek olarak, matriks degradasyonu ve invazyonu sağlayan MMP ifadesinde de yoğun artış görülür(44). Bazı durumlarda ise, kanser hücreleri epitel ve mezenkimal hücre belirteçlerini birlikte ifade ederek kısmi bir EMT gösterirler. Bu durum, hücrelerin bir plastisiteye sahip olmalarını sağlayıp, hücrenin migrasyon türünün değişimini kolaylaştırarak, ortam koşullarına direnç geliştirmelerine yardımcı olur (Şekil 2.9.) (46).



Şekil 2.9. EMT'nin şematik gösterimi. (Dongre ve diğerleri (2019) makalesinden uyarlanmıştır (45).

Metastaz EMT ile doğrudan bağlantılıdır. Epitel karakterli kanserlerin başka dokuya yayılabilmesi için genellikle EMT sürecinden geçtiği bilinmektedir. Tümör mikroçevresindeki faktörler, NF- $\kappa\beta$, WNT, NOTCH, TGF- β , EGF, Hedgehog gibi

EMT ilişkili sinyal yollarını aktive ederek, EMT transkripsiyon faktörlerini (ZEB, TP53 snail, twist) artırır ve epitel karakterdeki hücreleri EMT'ye zorlar (43). Bu aşamada, bazı kanser hücreleri anoikise maruz kalarak ölürlür. Bazı kanser hücreleri ise tümör dokusundan uzaklaşarak komşu dokulara veya kana geçerek (*introvazasyon*) yaşamaya devam ederler. Daha sonra, dolaşımdaki tümör hücreleri lökositlerdeki diapedesis benzeri bir mekanizma olan angiopedesis yoluyla, endotel hücrelere CAM'ler yardımıyla tutunup aralarından sıkışarak hedef dokuya geçerler (ekstravazasyon). Hücreler, hedef dokuda uygun ortamı bulduğunda EMT'nin tam tersi bir mekanizma olan mezenkimal-epitelyal dönüşüm (*Mesenchymal-Epithelial Transition*, MET) ile yeni dokuda kolonizasyon gerçekleştirir ve kanser hücresi metastatik sürecini tamamlamış olur (46).

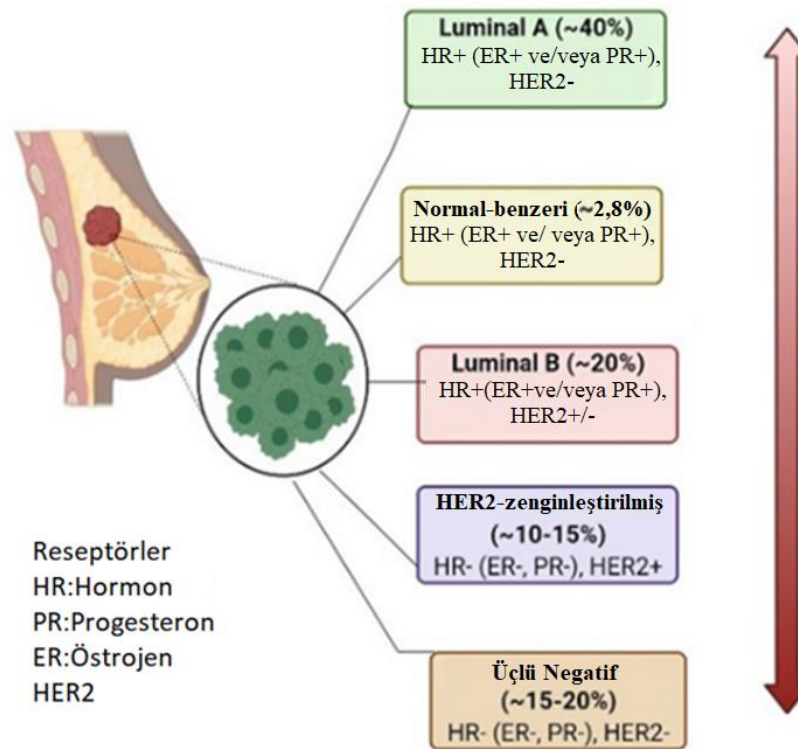


Şekil 2.10. EMT ilişkili sinyal yolları, transkripsiyon faktörleri, hücre yüzey, iskelet ve ECM proteinleri ve miRNA'lar. (Demirkan (2013) makalesinden uyarlanmıştır (46).

Moleküler düzeyde EMT durumu WNT, Hedgehog, TGF-B gibi birçok sinyal yolağının aktifleşmesiyle snail, slug, ZEB ve twist gibi EMT ile ilişkili transkripsiyon faktörleri EMT sürecini başlatır. Bunun sonucunda EMT ile ilişkili çeşitli hücre iskelet belirteçleri, hücre yüzey belirteçleri, bazı miRNA'lar, MMP'ler ve ECM ile ilişkiyi düzenleyen, hücrenin mezenkimal bir karakter almasını sağlayan birçok mekanizma aktifleşir (46).

2.2.5. Meme Kanseri ve EMT

Meme kanseri 2020 yılı verilerine göre bütün kanserler arasında en sık rastlanan kanser türü olup, her 8 teşhisten biri meme kanseridir. Yine 2020 yılında 2,3 milyon yeni meme kanseri teşhisi yapılmış ve meme kanseri 685.000 kişinin ölümüne sebep olmuştur (47). Meme kanserinin genetik profiline göre aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi 5 ana moleküler alt tipi vardır (Şekil 2.11) (48).



Şekil 2.11. Meme kanseri 5 ana moleküler alt tipi. Sağdaki okun rengi koyulaştıkça kötü prognozu göstermektedir. Verilen yüzdeler o tipin görülme sıklığını ifade etmektedir (Wavruszak ve diğerleri (2021) makalesinden uyarlanmıştır) (48).

Luminal A alt tipinden üçlü (*triple*) negatif meme kanseri tipine doğru gidildikçe hasta sağ kalım oranları düşmektedir. Bunun ana sebeplerinden biri luminal tipteki bir kanserde, Tamoksifen® ya da Herseptin® kullanılarak gerçekleştirilen hedefli kemoterapi tedavisi uygulanabilirken, üçlü negatif kanserde östrojen, progesteron ve HER2 reseptörlerinin yokluğu nedeniyle, hedefli terapi yoluyla tedavi uygulanamamasıdır. Yine luminal alt tipten uzaklaştıkça tümör daha agresif karakter göstermekte, daha erken yaşlarda rastlanmakta ve meme kanseri gen 1 (*BReast CAncer gene 1*, BRCA1) mutasyonu ile daha sık ilişkilendirilmektedir. Luminal tipteki meme kanserleri epitel hücre karakteri gösterirken, üçlü negatif tipteki hücreler genellikle mezenkimal karakter sergiler (49). Üçlü negatif tip, moleküler sıralamanın kabulü ile, bazal benzeri ve klaudin-düşük olmak üzere iki alt tipe ayrılmıştır. Bazal benzeri tümörler arasında yapılan bir hiyerarşik kümeleme (*clustering*) çalışmasında, klasik EMT belirteçlerinin (vimentin, aktin, N-kaderin ve kaderin-11), hücre dışı matriks proteinlerinin ve invazyon ile ilişkili genlerin (SPARC, laminin ve fasin) aşırı ifadesi gösterildi. Epitelyal belirteçlerin azaldığı da bildirildi (50).

Meme kanseri örneklerinin gen ifadesi profillemelerinin yapılması, tümörler arası heterojenliğin anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. İnvaziv meme kanserleri bugün kullanılan alt tipler olan lüminal A, lüminal B, HER2 zenginleştirilmiş (*HER2 enriched*), bazal benzeri ve normal meme-benzeri olarak sınıflandırılmaya başlanmıştır. Daha sonra bu kategoriler, EMT ile ilgili olarak daha fazla dikkat gerektiren düşük-klaudin-düzeyle (*klaudin-low*) alt tipi ile genişletilmiştir. Klaudin-düşük olarak sınıflandırılan tümörlerin çoğu, histopatolojik açıdan başka türlü tanımlanamayan invazif karsinomlar olarak sınıflandırılırken, sadece bir kısmı metaplastik veya löbüler karsinom olarak karakterize edilmiştir. Metaplastik karsinomlar ise, genellikle bazal benzeri veya klaudin-düşük tip olarak ele alınır (51).

Klaudin-low meme kanseri alt tipi, i) epitel belirteçlerin (E-kaderin, oklüdin, klaudin 3, 4 ve 7), lüminal belirteçlerin (sitokeratinler 18/19, GATA DNA dizisine bağlanan transkripsiyon faktörü 3 (*GATA binding transcription factor 3*, GATA3)) ve ER, PR, HER2 reseptörlerinin (üçlü negatif) düşük ekspresyonu, ii) klaudin-düşük kanser durumu EMT gen imzasının artışı, iii) üçlü-negatif, bazal-benzeri alt tipe göre

proliferasyon ile ilişkili genlerinin ifadesinin daha az olması ile ayrımlanır. Diğer taraftan, klaudin-düşük tümörler, anjiyogenez, hücre göçü, bağışıklık sistemi tepkisi ve hücre dışı matriks ile ilgili genlerin ekspresyonunda artış gösterir (52). Daha da önemlisi, birkaç çalışma, bu tümörlerin kanser kök hücresi hücre imzaları açısından zengin olduğunu göstermiştir (53). Patolojik tam yanıt, EMT imzası ile negatif ilişkilendirilir ve klaudin-düşük kanserde de kötü prognoz ve kemoterapiye direnç artışı gözlemlenir (54).

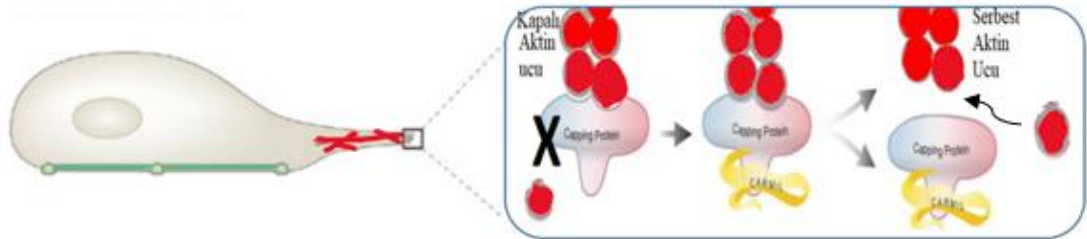
Sınıflandırmalar farklı tümör hücresi alt-popülasyonlarının güncel bir arada var olma potansiyelini yani tümör içi heterojeniteyi hesaba katmaz. Meme kanserinde tümör içi heterojenitesinin kapsamını ve düzeyini ele almak için tek hücre analizi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2.6. IL-1 β ve EMT İlişkisi

IL-1 β 'nın EMT'yi uyararak kanserin bir organdan başka organa sıçramasını yani metastazı desteklediği birçok çalışmada gösterilmiştir (4, 5, 54, 55). İnsan oral skuamöz kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada, IL-1 β 'nın mezenkimal morfolojiyi desteklediği ve mezenkimal belirteçleri arttırarak epitelyal belirteçlerin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (54). Bir başka çalışmada, IL-1 β 'nın β -katenin yolağını uyararak snail, swist ve slug transkripsiyon faktörlerini arttırdığı ve bu yolla EMT'yi tetiklediği gösterilmiştir (56). Ayrıca, kök hücre belirteçlerinden Bmil ve Nestin ifadesinin arttırarak, kanser kök hücrelerinin (CSC'ler) kendi kendini yenilemesini sağlayarak EMT'yi sağladığı gösterilmiştir. IL-1 β 'nın TGF- β 3 ile birlikte MMP üretimini yükseltmesi ile kanser invazyonunu ve dolayısıyla da metastazı ilerlettiği bildirilmiştir. Meme kanserinde yapılan bir çalışmada, IL-1 β 'nın, tamoksifen direncine sebep olarak Twist1 transkripsiyon faktör artışına ve EMT'ye sebep olduğu gözlemlenmiştir (2). Son olarak, pankreas duktal karsinomu modeli üzerinde K-Ras mutasyonu sonucu artan IL-1'in NF- κ β yolağı aktivasyonu yoluyla tümörün invazyonun arttığı gözlemlenmiştir (19).

2.3. CARMIL Proteinleri

Hücre hareketi için hücre iskelet dinamikleri oldukça önemlidir. Özellikle, aktin iskeleti hücrenin ileri doğru hareketi için gerekli olan uzama bölgesini oluşturarak, hareketin gerçekleşmesine yardımcı olur. Bu uzama bölgeleri aktin iskeletin boş uçlarından yeni aktin molekülleri eklenerek oluşturulur. Bu nedenle, hücrede aktin uzamasını, dolayısıyla da hareketi kontrol eden birçok protein mevcuttur. *Capping protein regulator, Arp2/3, Myosin I Linker* (CARMIL) proteinleri aktin hücre iskelet uzamasının düzenleyici proteinlerinden biridir. *Capping protein* (CP) ise aktin uzamasının temel inhibitörlerindedir. CP, aktin iskeletin uzadığı uca (*barbed end*) tutunarak onun uzamasını engeller. CP ile bağlantılı durumda olan bir protein olan CARMIL proteinleri ise CP proteine bağlanarak CP proteininin aktin uzamasını engelleme kapasitesini azaltır. Bu da CARMIL proteinlerinin hücre hareketini düzenlemesini sağlar (Şekil 2.12) (57).



Şekil 2.12. Hareket eden mezenkimal bir hücre. CP aktin iskeletin (kırmızı renkli) ucuna bağlanarak, yeni monomer eklenmesini ve dolayısıyla hareketi engeller. CARMIL ise CP'ye bağlanarak, aktin iskeletin ucuna serbest bırakır ve hücre hareketine yardımcı olur. (Stark ve diğerleri (2017) makalesinden uyarlanmıştır (6)).

CARMIL proteinleri CARMIL1, CARMIL2 ve CARMIL3 olmak üzere üç ayrı protein olarak tanımlanmıştır. CARMIL1-3 farklı dokularda farklı miktarlarda üretilir. Bu proteinlerin hem örtüşen hem de farklılık gösteren görevleri bulunmaktadır. CARMIL proteinlerinin CP'nin etkinliğini düzenlediği bilinmektedir (6). CARMIL proteinlerinin çeşitli özelleşmelerle birlikte vücuttaki neredeyse bütün dokularda az ya da çok ifade edilmekte olduğu ve meme dokusunda da görüldüğü İnsan Protein Atlas internet sitesi üzerinden belirlenmiştir (58).

CARMIL proteinleri ile IL-1'in ilişkisini gösteren bir çalışmada CARMIL1'in ortadan kaldırılmasının IL-1 kaynaklı ERK aktivasyonunu ve MMP3 ifadesini azalttığı gösterilmiş ve CARMIL1'in lösinden zengin tekrarlı (*Luicine Rich Repeat*, LRR) bölgesinin IL-1 sinyal proteinleri ile ilişkisi belirlenmiştir (59). Bir başka çalışmada ise, CP ve CARMIL etkileşiminin myotrophin(V1) proteinini serbest bırakarak NF- κ B yolağı uyarımına yol açtığı gösterilmiştir(60). Son olarak fare tümör modelleriyle yapılan bir çalışmada CARMIL3 proteini susturulduğunda metastazın anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir (61).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması için gerekli deneylerin tamamı Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Ana Bilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Malzemeler

Fibronektin (Merc,Almanya), Matrigel™(Corning, Bileşik Krallık), indium kalay oksit (ITO) cam, Sığır Serum Albumini (*Bovine Serum Albumin*, BSA, Fermentas, Litvanya), formaldehit, Triton X-100, preparat kapatma çözeltisi (Abcam, Bileşik Krallık), rekombinant insan IL-1 β proteini(invivogen,ABD), Lam, Lamel (IsoLab, Almanya), penisilin (10.000 U/mL)/streptomisin (10 mg/mL) çözeltisi (Biological Industries, İsrail), 4',6-diamidino-2-fenilindiol dihidroklorit (DAPI), keçi kökenli anti-fare AlexaFluor-555 işaretli sekonder antikor, fare kökenli anti-insan CARMIL1-3, Vinkülin ve Vimentin primer antikorları, AlexaFluor-488 işaretli falloidin (Thermo Scientific, ABD), immersiyon yağı (Sigma-Aldrich, ABD), yüksek glukozlu Dulbecco Modifiye Kültür Ortamı (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM), Fetal Sığır Serumu (fetal bovine serum, FBS) (Biowest, Fransa; Biochrome, Almanya), Fosfat Tamponlu Salin (PBS) tozu (Advansta, ABD), dimetil sülfoksit (DMSO) (Thermo Fisher, ABD), 10x Tripsin (%0.5) – (%0.2) EDTA, L- glutamin (Biological Industries,İsrail; Biowest, ABD), ezNA Total RNA izolasyon kiti (Omega, ABD), RNA temizleme ve konsantrasyon kiti (Zymo Research, ABD), 2-merkaptetanol, kolonlar, Yıkama Tamponu I-II, Oligo(dT), cDNA Tamponu, cDNA ters-transkripsiyon enzimi (New England BioLabs, ABD), SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix çözeltisi (BioRad, ABD), dH₂O, Etanol %96 (AppliChem, Almanya), Primerler (Sentegen, Türkiye), T25 ve T75 hücre kültürü flaskları, 24 kuyucuklu kültür plakaları, serolojik pipetler (5, 10, 25 mL), santrifüj tüpleri ve diğer plastik laboratuvar gereçleri (Orange Scientific, Belçika; Sarstedt, Almanya; Nest, Çin).

3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Dulbecco Modifiye Kültür Ortamı (DMEM) besiyeri: L-glutamin (1 mM) içeren yüksek glukoz DMEM besiyeri son konsantrasyonu % 10 olacak şekilde ısıyla

inaktive edilmiş (56 °C, 20 dakika) FBS ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin eklenerek tam DMEM besiyeri hazırlanır. Besiyeri 2-8 °C' de saklanır ve raf ömrü 4 haftadır.

Fosfat Tamponlu Salin (*Phosphate-buffered saline, PBS*) çözeltisi (1x): Tek kullanımlık toz formunda temin edilen ve 150 mM sodyum klorür ile 10 mM sodyum fosfat içeren karışım, 500 mL distile suda (dH₂O) çözülerek, 7.2 pH değerinde 1x PBS çözeltisi elde edilir. Çözelti otoklavlanarak sterilize edilir. 2-8 °C sıcaklıkta 2 yıl saklanabilir.

Sığır serum albumini %1 (*Bovine Serum Albumin, BSA*): Liyofilize toz BSA, distile su ile %1 (g/mL) konsantrasyonda çözülür. 2-8 °C sıcaklıkta, ışıktan korunarak 6 ay saklanabilir.

3.3. Hücre Kültürü

Deneyler için meme kanseri hücre hatlarından MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri kullanılmıştır. Aderan özellikte olan bu hücrelerden MCF-7, epitel hücre karakterine sahip ve luminal A tipindedir. MDA-MB-231 hücreleri de aderan hücrelerdir ancak mezankimal karakterli ve üçlü negatif meme kanseri türündendir.

3.3.1. Hücrelerin Sıvı Azot Stoğundan Çözülmesi

Sıvı azot tanklarında (-196 °C sıcaklıkta) kriyojenik tüplerde saklanan hücreler azot tankından alınarak 37 °C 'de su banyosunda buz kristalleri eritildikten sonra tam besiyeri içerisinde 15 mL'lik tüpe alınır. DMSO'nun uzaklaştırılması için 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra laminer kabinde süpernatant uzaklaştırılır ve pelet kısmı 8 mL tam DMEM besiyeri içerisinde süspanse edilir. Hücreler T25 kültür kabına aktararak inkübatöre (37 °C, %5 CO₂) yerleştirilir.

3.3.2. Hücre Pasajlama

İnkübatör içerisinde %5 CO₂ düzeyi ve 37 °C sıcaklıkta büyütülen hücreler %80 yoğunluğa ulaştığında pasaj işlemleri gerçekleştirilir. İşlem hücrelerin içinde bulunduğu besiyerinin çekilmesi ile başlar, daha sonra besiyeri ve FBS kalıntılarından tamamen kurtulmak adına hücreler PBS ile yıkanır. Hücrelerin

üzerine 200-400 uL tripsin-EDTA çözeltisi eklenir. Enzimin etki edebilmesi için hücreler 2 dakika, 37 °C 'de inkübe edilir. İnkübasyondan sonra, enzim reaksiyonunu durdurmak adına %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren, önceden ısıtılmış, 10 mL tam DMEM besiyeri kültür kabına eklenir. Hücrelerin 9 mL'si (9/10) deney kurulumunda ve hücre dondurma işlemlerinde kullanılabilir veya atılır. Kalan hücreler (1/10) hacim 6-12 mL olacak şekilde, besiyeri kullanılarak tamamlanır ve hücreler inkübatörde büyümeye bırakılır.

3.3.3. Hücre sayımı

Hücreler Fuchs-Rosenthal hemositometri (Hausser Scientific, ABD) aparatı aracılığıyla mikroskop altında sayılır. 1 mm²'lik hacme sahip olduğu bilinen 16 küçük-1 büyük- kareden oluşan bölmelerden oluşan kısımlarda en az 2 tane seçilerek hücre sayılır ve ortalaması alınır. Daha sonra 1mm² deki hücre sayısına oranla, istenen ya da var olan hücre sayısı bulunur.

3.4. İmmünfloresan Boyamalar

3.4.1. Kaplama

Son konsantrasyonları sırasıyla 20 µg/mL ve 120 µg /mL olan Fibronektin ve Matrigel™ kaplama solüsyonları önceden ısıtılmış serumsuz DMEM içerisinde hazırlanır. 24 kuyucuklu hücre plakaları tabanına ITO cam yerleştirilir. Her camin üzerine 75 uL uygun kaplama solüsyonu camın tüm yüzeyini kaplayacak şekilde eklenir. 24 kuyucuklu hücre plakaları kaplamanın gerçekleşebilmesi için inkübatörde 37°C'de 4 saat beklemeye bırakılır. Ardından, kuyucukların tabanları 2 defa PBS ile yıkanarak kaplama protokolü tamamlanmış olur. Kaplanmış cam yüzeylerin üzerine her kuyuya 50.000 /2 mL hücre ekilerek (tam medya içinde), hücreler %5 CO₂ seviyesi ve 37°C 'deki inkübatörde 16 saat büyümeye bırakılır.

3.4.2. IL-1β uygulaması

Kaplamanın ardından hücre ekiminden 16 saat sonra, hücrelerin ekildiği kuyucuklara 4 ng/mL (400 ünite) konsantrasyonda IL-1β uygulaması gerçekleştirilir.

IL-1 β 'nin etki etmesi için hücreler 48 saat %5 CO₂ düzeyi ve 37°C ' deki inkübatörde büyümeye bırakılır.

3.4.3. Hücrelerin Fiksasyonu ve Permeabilizasyonu

IL-1 β uygulamasından 48 saat sonra inkübatörden çıkarılan hücrelerin kültür ortamı çekilerek uzaklaştırılır. Cam kaplı yüzeylerde büyümüş olan hücrelerin üzerine fiksasyon (sabitleme) için % 4 konsantrasyona sahip formaldehit çözeltisi yüzeyi kaplayacak şekilde uygulanır. Oda sıcaklığında yarım saat fiksatif içerisinde bekleyen kuyulardaki hücreler formaldehitten uzaklaştırılır ve iki defa 5 dakikalık inkübasyonlarla PBS ile yıkanır.

Sonrasında % 0.1' lik 1xPBS içerisindeki Triton X-100 çözeltisiyle 4 dakika permeabilizasyon yapılır. Bekleme süresinin sonunda permeabilize hale gelmiş olan hücreler iki defa 5 dakikalık inkübasyonlarla PBS ile yıkanarak çözeltiden arındırılır.

3.4.4. Bloklama

Hücrelerin üzerini kaplayacak şekilde % 1 konsantrasyonda 250 uL BSA çözeltisi eklenir. Epitoplarn tamamen kapatılması için bir saat beklenerek daha sonra örnekler 2 defa 5 dakikalık inkübasyonlarla PBS ile yıkanır.

3.4.5. Antikor ile Bağlanma ve DAPI, Falloidin Boyamaları

BSA çözeltisi (%1) ile aşağıdaki tabloda belirtilen oranlarda seyreltilmiş 100 uL primer antikorlar cam yüzeyi kaplayacak şekilde hücrelere uygulanır ve 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. İnkübasyonun ardından PBS ile 2 defa 5 dakikalık inkübasyonlarla yıkama işlemini takiben hücreler ışıktan korunarak %1'lik BSA içerisinde tabloda belirtilen oranlarda seyreltilmiş sekonder antikorlar, DAPI ve konjuge falloidin ile 2 saat muamele edilir. Son olarak hücreler yine 2 defa 5 Dakikalık inkübasyonlarla PBS ile yıkanarak uygun hale getirilir.

Tablo 3.1. IF yöntemde kullanılan antikorların ve boyaların özellikleri

	Klon	Üretici firma	İzotip	Florokrom	Konakçı tür	Seyreltme oranları
Anti-CARMIL1	PA5-56044	Thermo Fisher, ABD	IgG	-	Tavşan	1/400
Anti-CARMIL2	PA5-98503	Thermo Fisher, ABD	IgG	-	Tavşan	1/400
Anti-CARMIL3	PA5-71874	Thermo Fisher, ABD	IgG	-	Tavşan	1/400
Anti-vimentin	EPR3776	Abcam, İngiltere	IgG	-	Tavşan	1/400
Anti-vinkülin	EPR8185	Abcam, İngiltere	IgG	-	Tavşan	1/400
Falloidin	ab176753	Abcam, İngiltere	-	<i>iFluor 488</i>	-	1/500
Sekonder antikorlar;	ab150077	Abcam, İngiltere	IgG	<i>Alexa Fluor 488</i>	Keçi	1/1000
DAPI	ab285390	Abcam, İngiltere	-	-	-	1/1000

3.4.6. Kapatma ve Görüntüleme

Lamlara birer damla kapatma solüsyonu (*mounting medium*) damlatılır. 24 kuyucuklu hücre plakalarının zeminlerinde bulunan ve hücrelerin üzerinde büyümüş olduğu ITO camlar bir cımbız yardımıyla kuyuların içerisinden çıkarılarak, hücreler kapatma solüsyonunun üzerine gelecek şekilde lamlara yerleştirilir. Preparatın kurumaması adına kenarları oje ile kaplanan örnekler, +4°Cde ışıktan korunacak şekilde en az 2 ay saklanabilmektedir. Görüntüleme işlemleri floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) ile 100x objektifte immersiyon yağı kullanılarak gerçekleştirilir. Görüntülemeler soğutmalı 5,0 mega piksel CCD renkli kamera (DC5000i, Euromex, Hollanda) ile alınır.

3.4.7. Görüntü analizleri

Floresan mikroskopuyla 16 bitte 3 kanallı olarak çekilen görüntülerdeki tek tek düşmüş hücreler, ImageJ yazılımı (NIH, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. DAPI için mavi kanal (çekirdek boyamaları), aktin iskelet boyamaları için yeşil kanal, diğer proteinler için ise kırmızı kanalda boyamalar yapılmıştır. Buna uygun olarak tüm görüntüler önce kanallara ayrılmış ve uygun kanal seçilmiştir. Daha sonra 8-bit e çekilmiş ve arka plandaki kirliliklerden kurtulmak adına “Arka Plan Kirliliklerinin Temizlenmesi (*subtract background*)” fonksiyonu çalıştırılmıştır. Ardından seçilen görüntüler “Birleştir (*Merge*)” fonksiyonu ile birleştirilerek resimler morfoloji ve partikül analizlerine uygun hale getirilmiştir. Bütün analizler Horzum ve diğerleri (2014) referans makalesindeki uygun olarak gerçekleştirilmiştir (62). Her grupta en az 30 hücrenin analizi gerçekleştirilmiştir.

Morfoloji analizleri

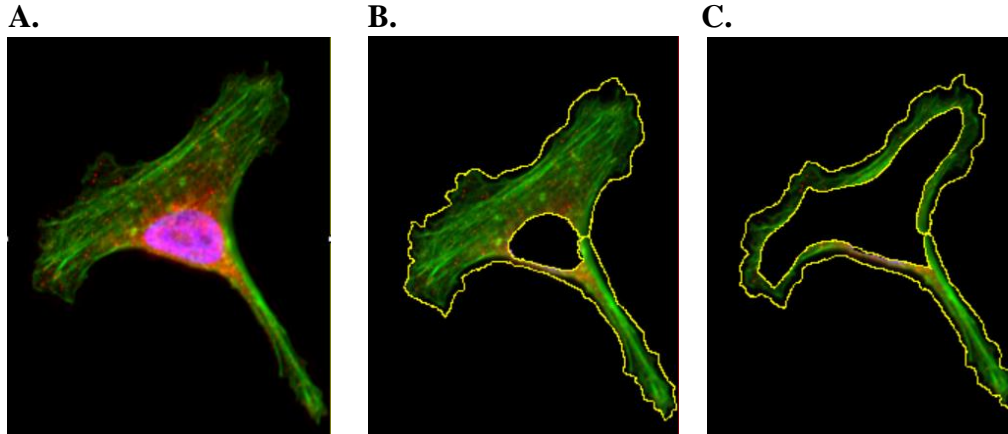
Morfolojik analizler Aktin hücre iskelet boyamaları üzerinden yapıldığı için görüntü tekrar kanalları ayrılmış ve yeşil kanaldan tek tek düşen hücreler seçilerek hücrelerin alan ve çevre değerleri alınmıştır. Ek olarak kutupsallık endeksinin (polarizasyon) hesaplanabilmesi için uygulamada bulunan “Yönlülük (*Directionality*)” fonksiyonu çalıştırılmış ve elde edilen tablodaki değerler kullanılarak aşağıdaki denklem yoluyla kutupsallık endeksi hesaplanmıştır.

$$\text{Polarizasyon} = \frac{\text{Uygunluk (Goodness of fit)} \times \text{Miktar (Amount)}}{[(180 - \text{Yayılma (Dispersion)}) / 180]} \quad (3.1)$$

Ortalama Floresan Yoğunluğu ve Membran Yığılma İndeksi

Öncelikle mavi kanalda DAPI çekirdek bölgesi seçilmiştir. Kanallar birleştirilerek seçilen çekirdek alanı bütün kanallardan silinmiştir. Yeşil kanal (aktin) kullanılarak sitoplazma alanı ve membran alanı şekil 3.1.’de gösterildiği işaretlenmiştir. Bu aşamadan sonra bütün analizlere ilgilenilen asıl proteinlerin bulunduğu kırmızı kanalda devam edilmiştir. Seçilen alanlar için ortalama floresan

yoğunlukları (OFY) ve alan değerleri programdan çekilmiştir. Bu değerler kullanılarak aşağıdaki (3.2) formülüne uygun olarak membran yığılma indeksi hesaplanmıştır.

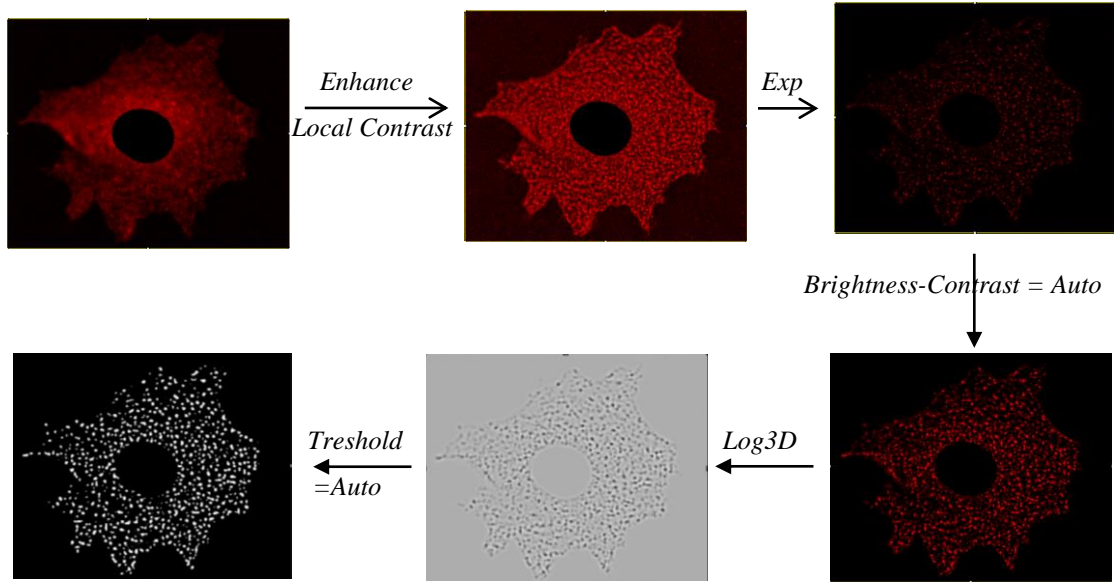


Şekil 3.1. Hücre bölgelerinin seçilmesi temsili görüntüler. A grafiği tek tek analiz edilen bir hücrenin birleştirilmiş görüntüsünü gösterirken, B grafiği bu hücrenin sitoplazmik bölgesini ve C görüntüsü ise membran bölgesini göstermektedir.

$$\begin{aligned} \text{Membran} &= \frac{\text{OFY}_{\text{Membran bölgesi}} / \text{Alan}_{\text{Membran bölgesi}}}{\text{OFY}_{\text{Sitoplazmik bölge}} / \text{Alan}_{\text{Sitoplazmik bölge}}} & (3.2) \\ \text{Yığılma İndeksi} & \end{aligned}$$

Partikül analizleri

Görüntülerden elde edilen OFY değerlerine ek olarak, partikül analizleri yoluyla, protein odak sayısı değerleri de elde edilmiştir. Partikül analizleri için Horzum ve diğerleri(2014) referans makalesine uygun olarak görüntülere aşağıdaki işlemler uygulanmıştır(62). Kullanılan fonksiyonlar sırasıyla “Lokal Karşıtlık Arttırımı (*Enhance Local Contrast*)”, “Arka Temizlenmesi (*Exp*)”, “Otomatik Parlaklık-Karşıtlık Düzenlemesi (*Brightness Contrast = Auto*)”, “Boyuta bağlı *Gaussian Laplассian* Filtrelemesi (*Log3D*)”, Otomatik Eşik Değer Belirlenmesi (*Threshold=Auto*)” ve “Partikül analizleri (*Analyze Particals*)” şeklinde olup fonksiyonların işlevleri şekil üzerinde de gösterilmektedir (Şekil 3.2.). Partikül analizlerinden elde edilen sitoplazmik ve membran alanlarında bulunan protein odak sayıları hem gruplar arası odak sayısı farklarını tespit etmek hem de daha önce anlatılan membran yığılma indeksi hesaplamaları için kullanılmıştır (3.2).



Şekil 3.2. Partikül analizleri ve analizlerin bir hücre üzerinde fonksiyonlar ile birlikte şematik gösterimi.

3.5. Gen İfadesi Analizleri

3.5.1. RNA izolasyonu

Maksimum RNA eldesi için T25'lik flaklara kaplama protokolü sonrası 10×10^6 hücre konsantrasyonunda, tam DMEM besiyeri içerisinde ekilen hücreler gece boyu 37C de inkübasyona bırakılmış daha sonra IL-1 β muamelesi protokolü uygulanmış ve 72 saatin sonunda tripsin-EDTA ile kaldırılmıştır. Bu hücreler 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre peleti, %0.2 oranında β -merkpto-ethanol eklenmesi ile taze hazırlanan, örnek başına 100 mL TRK tampon çözeltisi kullanılarak çözülmüştür. Çözülmemiş hücre kalmaması adına, örneklere dondur-çöz protokolü için örnekler -80 C'ye gece boyu inkübasyona yapılmıştır. Bu aşamadan sonra örnekler buz üzerinde çalışılmıştır. Örnekler maksimum düzeyde 2 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant kısmı eş hacimde % 70 etanol eklenerek RNA izolasyon kolonlara yüklenmiştir. Kolonlar 10.000 g'de 1 dakika santrifüjlenerek örneklerin kolona yüklenmesi sağlanır. Elüsyon işlemine kadar kolon alt haznesine geçen sıvı her zaman atılır. Devamında, kolonlar 250 μ L RNA yıkama tamponu 1 ile 10.000xg' de 1 dakika santrifüjlenerek yıkanır. Bu esnada örnek başına 1,25 ul

DNAase, 1 uL tampon çözelti, 9 uL ddH₂O içerecek şekilde DNAase çözeltisi hazırlanır. Örnek başına 11,25 uL DNAase çözeltisi eklenerek, etki etmesi için 90 dakika inkübasyona bırakılır. DNase I enziminin ve parçalanmış DNA'nın kolonlardan uzaklaştırılması için kolonlara 250 µL RNA yıkama tamponu 1 yüklenir ve 2 dakika inkübe edilen kolonlar 10.000xg' de 1 dakika santrifüjlenerek yıkanır. Ardından kolonlara 2 sefer 500 µL RNA yıkama tamponu 2 ile 10.000xg' de 1 dakikalık santrifüjlerle yıkama yapılır. Yüksek etanol içeriğine sahip RNA yıkama tamponu 2' nin buharlaştırma yoluyla uzaklaştırılması için kolonlar herhangi bir yükleme yapılmadan maksimum g değerinde ağızları açık bir biçimde 2 dakika santrifüjlenir. Son olarak elüsyon aşaması için kolonların üst kısmı örnek toplama tüplerine (1.5 mL' lik tüpler) yerleştirilir, 30 uL ddH₂O eklenerek 1 dakika beklemeye bırakılır. Ardından maksimum g değerinde 2 dakika santrifüjlenerek RNA'nın 1,5 mL tüpe geçmesi sağlanır. RNA moleküllerinin kolondan ayrılmasıyla birlikte stabilitelerinin azalması nedeniyle kalan aşamalara buz üzerinde devam edilir. RNA örnekleri nanodrop cihazı kullanılarak saflık ve miktar tayinleri yapıldıktan sonra -80°C dolabına kaldırılır. RNA için absorbans değeri 280 nm olduğu için, protein kontaminasyonunu tespit etmeye yarayan 260/280 oranının >2, fenol vb. kimyasal kontaminasyonları tespit etmeye yarayan 260/230 oranının ise >1.7 olmasına dikkat edilmiştir. Bütün protokol EzNA total RNA izolasyon kitine uygun olarak uygulanmıştır.

3.5.2. cDNA Sentezi

İzolasyonu yapılan minimum 80 ng / uL konsantrasyondaki RNA örneklerinin mRNA içeriğinden komplementer DNA (cDNA) sentezi ProtoScript II First Strand cDNA Sentez Kiti (New England BioLabs, ABD) kullanılarak buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle miktar ölçümlerine göre uygun RNA hacmi, ddH₂O kullanılarak 6 uL'ye tamamlanır. 2 uL'de oligo d(T) eklenerek PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) cihazına (Thermal Cycler, Thermo Scientific, ABD) yerleştirildi. 65°C'de 5 dakika uygulanan protokol ile oligo d(T)'lerin bağlanması sağlanır. Ardından, cihazdan alınan RNA örneklerine, örnek başına 10X reverse transkriptaz enzim karışımından (MMuLV Reverse Transkriptaz ve RNaz İnhibitörünü) 2 ul, 2x tampon çözeltisinden 10 uL eklenerek tekrar Termocycler

cihazına konulmuştur. cDNA dönüşümünün gerçekleşmesi adına 42 °C’de 1 saat inkübe edilir. Sonrasında 80 °C’de 5 dakika inkübe edilerek enzim inaktivasyonu sağlanır. Böylelikle iki aşamalı bir protokol uygulanır. Son olarak elde edilen cDNA örnekleri saklanmak üzere -20 °C’ye kaldırılır.

3.5.3. qRT-PCR Analizleri

Gen ifadesinin incelenmesinde kullanılan primer çiftleri dizilerine ilişkin bilgiler tabloda paylaşılmıştır. Tüm primer çiftlerden en az bir tanesi, ilgili genin ekzon-ekzon birleşme bölgesine bağlanmaktadır. GAPDH gen ekspresyon düzeyi house-keeping gen olarak kullanılmıştır. PCR deneyleri qRT-PCR reaksiyonları LightCycler-DNA Master SYBR Green I real-time PCR kiti (RocheDiagnostics) kullanılarak Rotor-Gene 6000 TM cyclor (Corbett Research,Avustralya) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR içeriklikleri ve sıcaklıkları aşağıda verildiği gibidir.

Tablo 3.2. PCR içerikleri (Örnek başına)

PCR içerikleri	Miktar	Derişim
SYBR Green Supermix çözeltisi	5 uL	1X
Forward Primer	1 uL	0,5 µM
Reverse Primer	1 uL	0,5 µM
cDNA	1 uL	
ddH ₂ O	1 uL	
Toplam	10 uL	

Tablo 3.3. PCR aşamaları ve süreleri

PCR fazı	PCR sıcaklıkları;	Süre
Polimeraz Aktivasyonu/DNA Denatürasyonu	95 °C	3dk
Denatürasyon	35-40 döngü	95 °C
Bağlanma		63 °C
Uzama		72 °C
Melting-curve analizi	55-95°(0.5 °C artış)	5 sn/adım

Elde edilen sonuçlar $-\Delta\Delta CT$ hesaplanması yoluyla analiz edilir. Bu yöntemle sonuçlar referans gene göre normalize edildikten sonra kontrol durumuna ifade farkına bakılır. $-\Delta\Delta CT$ şu formül ile hesaplanır;

$$-\Delta\Delta CT = (CT_{\text{house-keeping gen}} - CT_{\text{hedef gen}}) - (CT_{\text{house-keeping gen-kontrol}} - CT_{\text{hedef gen-kontrol}}) \quad (3.3)$$

Tablo 3.4. qRT-PCR deneylerinde kullanılan primerlerin özellikleri.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Ürün Uzunluğu	Genbank no.
E-kaderin	CCCTCGACACC CGATTCAA	CAGAAACGGAG GCCTGATGG	192	NM_00131718 5.2
Klaudin	CCCAGTCAATG CCAGGTACG	CAAAGTAGGGC ACCTCCCAG	90	NM_021101.5
Vinkülin	CTCGTCCGGGT TGGAAAAGAG	AGTAAGGGTCT GACTGAAGCAT	142	NM_014000.3
CARMIL1	CTTGATTCATG CCAGCACCG	TGGATTTAGGG GTCATCATACA GG	353	XM_04741899 9.1
CARMIL2	GGAGATTCAGT GGGACGTGG	CCTCAAGGCTC AGCTTCATGT	172	XM_04743364 5.1
CARMIL3	AGCTGCCCACT CATGGTTAC	GAGTCCGGGGG TAGCTAGAA	210	XM_04743189 5.1
Snail	AAGATGCACAT CCGAAGCCA	CAAAAACCCAC GCAGACAGG	573	NM_005985.4
ZEB1	GCACAACCAAG TGCAGAAGA	GCCTGGTTCAG GAGAAGATG	141	XM_04742569 6.1
Twist	GGCTCACCTAC GCCTTCTC	CTAGTGGGACG CGGACAT	65	NM_000474.4
Vimentin	AGATGGCCCTT GACATTGAG	TGGAAGAGGCA GAGAAATCC	80	NM_003380.5
B-aktin	CTGGAACGGTG AAGGTGACA	AAGGGACTTCC TGAACAATGCA	139	NM_001101.5
GAPDH	CCTCAAGATCA TCAGCAATGCC	GGTCATGAGTC CTTCCACGA	100	NM_00135794 3.2

3.6. İstatistiksel Yöntem

Bu çalışmada elde edilen veriler normal dağılım durumlarına bakılarak Graphpad Prism v8 yazılımında istatistiksel testlere tabi tutuldu. İki gruplu normal dağılım veriler için t test kullanılırken, normal dağılmayan veriler Mann-Whitney U testi kullanılarak analiz edildi. İki'den fazla gruplu karşılaştırmalar için ise normal dağılım durumlarında ANOVA, normal dağılımın gözlemlenmediği durumlarda ise Kruskal-Wallis testleri uygulandı. Korelasyon analizleri normal dağılmayan değişkenlerde Spearman, normal dağılım durumunda ise Pearson korelasyon analizleri ile gerçekleştirildi.

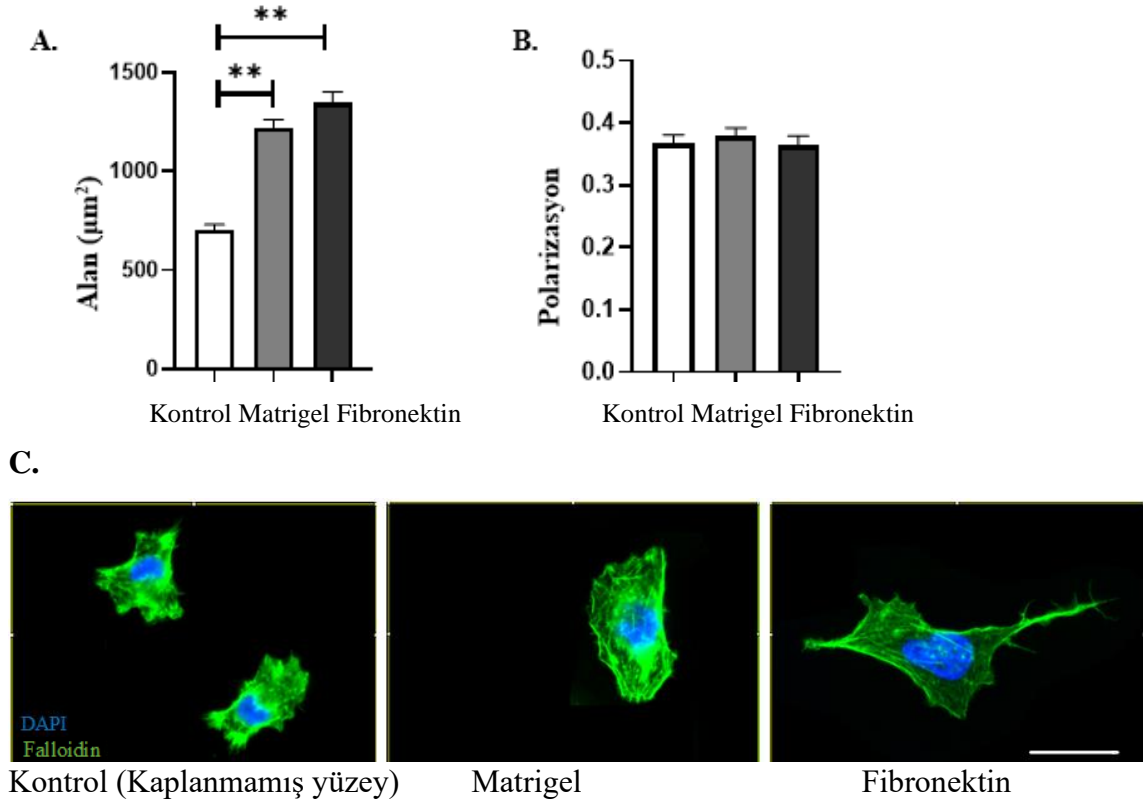
4. BULGULAR

4.1. Farklı yüzeylerin MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki etkisi

Mezenkimal karakterli üçlü negatif türde bir meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 fibronektin veya MatrigelTM kaplı cam yüzeylerde yetiştirilmiştir. Kaplama işlemlerinin amacı tümör mikroçevresinde başlıca bulunan ECM bileşenlerini taklit etmek idi. Fibronektin hücre adezyonunu en güçlü uyaran ECM elemanlarından biridir. MatrigelTM ise Engelbreth-Holm-Swarm fare tümör hücre hattından salınan ECM bileşenlerinin konsantre edilmiş halidir ve tip 4 kolajen, laminin, entaktin, perlekan, heperan sülfat proteoglikan) barındırır (32, 63). Mezenkimal karakteri incelemek üzere hücre iskelet bileşenleri aktin, vinkülin, vimentin, CARMIL1, CARMIL2 ve CARMIL3 immünfloresan ile incelenmiştir. Vinkülin bir fokal adezyon aracı proteini, vimentin bir mezenkimal hücre belirteci, CARMIL proteinleri ise birer aktin hücre iskelet düzenleyicisidir (36).

4.1.1. MDA-MB-231 hücrelerinin farklı yüzeylerde morfoloji değişimleri

Aktin hücre iskeletine göre hücrelerin kaplanmamış yüzeyde, Matrigel kaplı ve fibronektin kaplı yüzeylerde alan ve polarizasyon (kutupsallık indeksi) değerlerindeki değişimler analiz edilmiştir. Hücre alan büyüklükleri ortalamaları kaplı olmayan yüzeylerde(kontrol), Matrigel ve fibronektin kaplı yüzeylerde sırasıyla $703,81 \pm 27,19 \mu\text{m}^2$; $1221,29 \pm 38,78 \mu\text{m}^2$ ve $1347,61 \pm 55,26 \mu\text{m}^2$ şeklindedir (Şekil 4.1. A). Polarizasyon değerleri ise kontrol yüzeyde $0,37 \pm 0,014$; Matrigel için $0,38 \pm 0,01$ ve fibronektin kaplı yüzeylerde $0,36 \pm 0,04$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1. B). Hem Matrigel hem de fibronektin kaplamalarının, hücre alanlarını anlamlı düzeyde arttırdığı, polarizasyon düzeylerinde ise anlamlı bu değişime sebep olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.).

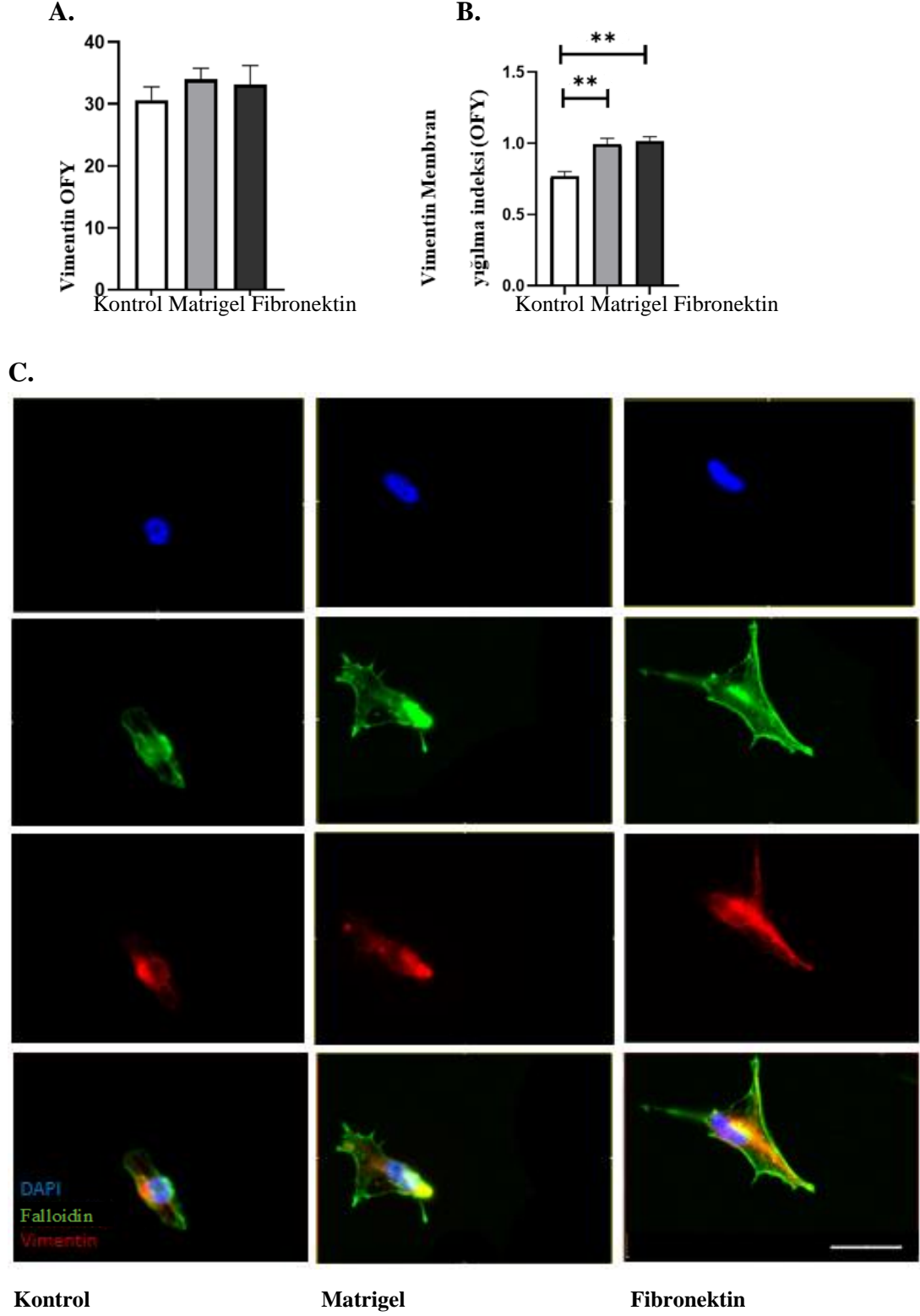


Şekil 4.1. Kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronectin kaplı yüzeylerde yetiştirilen MDA-MB-231 hücrelerinin morfoloji değişimleri. Sonuçlar immünfloresan yöntemle analiz edilmiştir. İmmünfloresan boyamasında hücre çekirdeği (DAPI, mavi) ve aktin iskelet (falloidin, yeşil) işaretlendi. A grafiği hücre alanını, B grafiği polarizasyon değerlerini ve C grafiği temsili görüntüleri göstermektedir. Ölçek çubuğu 30 µm'dir. (* $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)

4.1.2. Farklı yüzeylerdeki hücrelerde vimentin düzeyleri ve hücresel dağılımı

Mezenkimal bir belirteç olan vimentin protein düzeyleri ortalama floresan yoğunluklarına (OFY) göre belirlenmiştir. Vimentin OFY değerleri kontrol yüzeyde $30,63 \pm 2,12$; Matrigel kaplı yüzeyde $33,96 \pm 1,79$ ve fibronektinde kaplı yüzeyde $33,14 \pm 3,03$ olarak belirlendi (Şekil 4.2.A). Farklı yüzeylerde yetişen hücrelerin vimentin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sitoplazmik ve membran bölgeleri seçilerek OFY değerlerinin alana normalizasyonu ile hesaplanan membran yığılma indeksleri sırasıyla kontrol yüzeyde $0,77 \pm 0,03$; Matrigel yüzeyde $0,10 \pm 0,04$ ve fibronectin yüzeyde $1,01 \pm 0,03$ şeklindedir (Şekil 4.2.B). Bu sonuçlar göstermektedir ki; yüzeylerin Matrigel ve fibronectin kaplanması

MDA-MB-231 hücrelerinde vimentin proteininin membran bölgesine yığılma oranını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdı (Şekil 4.2.).

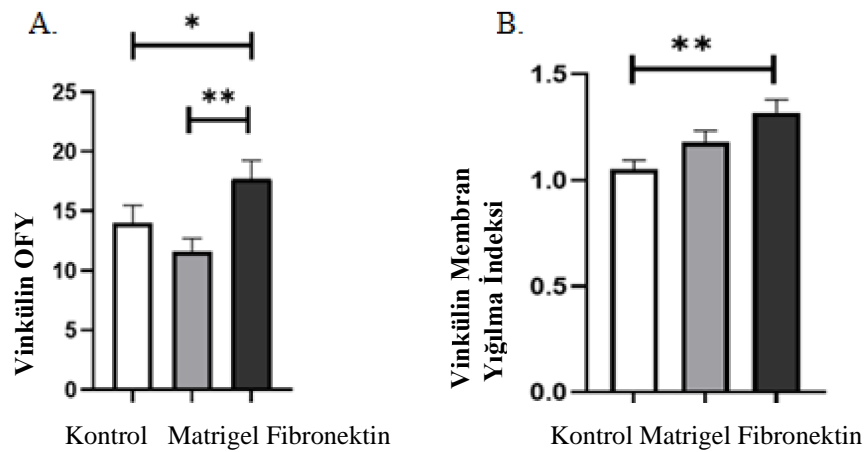


Şekil 4.2. MDA-MB-231 hücreleri, kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronektin kaplı yüzeylerde yetiştirilmiş ve hücre çekirdek boyamaları DAPI, aktin iskelet boyamaları falloidin, ve vimentin boyamaları vimentin antikoru kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar IF yöntemine göre analiz edilmiştir. A grafiği Vimentin OFY değerlerini, B grafiği vimentin membran yığılma indekslerini ve C grafiği temsili görüntüleri göstermektedir. Ölçek çubuğu 30 μm 'dir. (* $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)

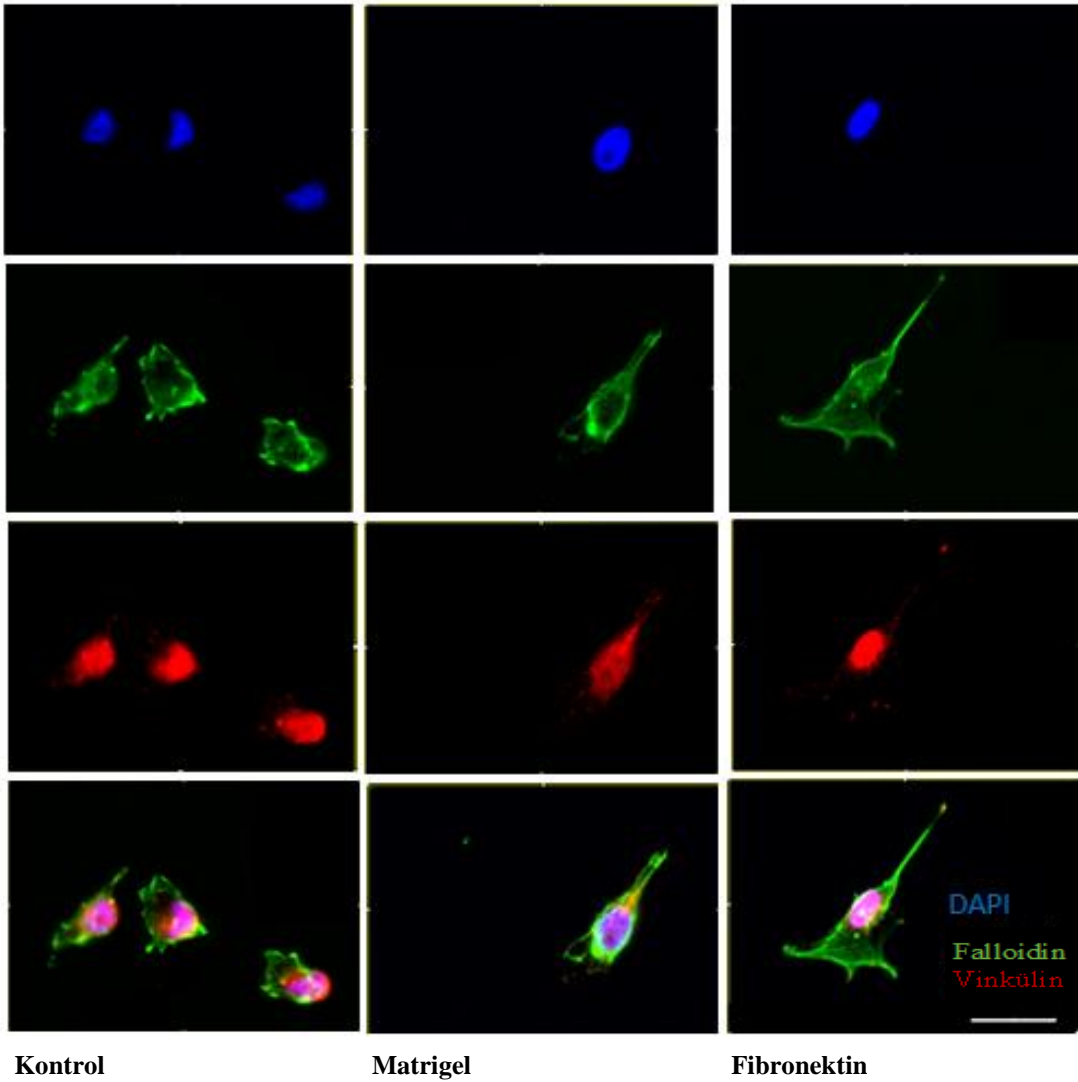
4.1.3. Farklı yüzeylerde vinkülin protein ifade düzeyi, fokal adezyon değişimleri ve membrana yığılma farklılıkları

Fokal adezyon (odaksal yapışma) yapılarında aracı bir protein olan vinkülin proteini ortalama floresan yoğunlukları kontrol, Matrigel kaplı ve fibronektin kaplı yüzeyler için sırasıyla $14,02 \pm 1,45$; $11,61 \pm 1,09$ ve $17,74 \pm 1,50$ olarak bulundu. Sonuç olarak vinkülin protein ifadesinin Matrigel kaplaması ile azaldığı fibronektin kaplaması ile ise arttığı görülmektedir (Şekil 4.3.A.).

OFY değerlerine göre hesaplanan membran yığılma endeksleri ise kontrol yüzeyde $1,05 \pm 0,04$; Matrigel yüzeyde $1,18 \pm 0,05$ ve fibronektin yüzeyde $1,32 \pm 0,06$ şeklindedir. Bu sonuçlara göre, kontrol koşuluna göre Matrigel ve fibronektin yüzeylerde vinkülin proteininin membrana yığılma oranını da artmaktaydı. Kontrol yüzeyler ve Matrigel kaplı yüzeyde büyütülen hücreler arasında istatistiksel anlamlılık 0,06 olarak hesaplandı (Şekil 4.3.B).



C.



Kontrol

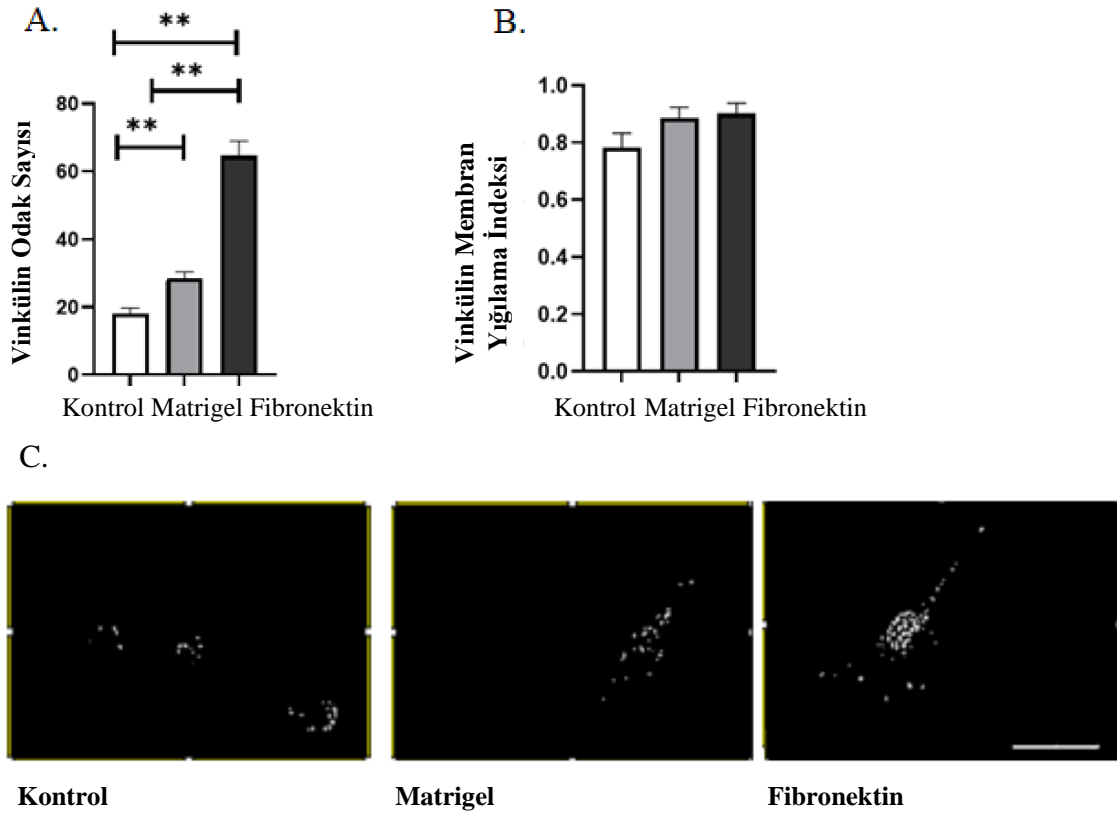
Matrigel

Fibronectin

Şekil 4.3. Kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronectin kaplı yüzeylerde yetiştirilen MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin düzey ve hücreyel dağılımı. Sonuçlar IF yönteme göre analiz edilmiştir. İmmünfloresan boyamasında hücre çekirdeği (DAPI, mavi), aktin iskelet (falloidin, yeşil) ve vinkülin proteini (kırmızı) işaretlendi. A grafiği vinkülin OFY değerlerini, B grafiği vinkülin membran yığılma indekslerini ve C grafiği temsili görüntüleri göstermektedir. Ölçek çubuğu 30 μm 'dir. (* $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)

Partikül analizleri yoluyla elde edilen vinkülin odak sayılarının (fokal adezyon noktaları) ve bu sayıların alana normalizasyonu ile hesaplanan membran yığılma indekslerinin yüzeylere göre değişimi incelenmiştir. Odak sayıları kontrol yüzeyde $18,12 \pm 1,59$; Matrigel yüzeyde $28,36 \pm 2,03$ ve fibronectin yüzeyde $64,56 \pm 4,40$ şeklindedir. Elde edilen verilere göre Matrigel kaplanması ve fibronectin kaplanması vinkülin odak sayısını arttırtır (Şekil 4.4.A). En yüksek oranda odaksal

yapışma ise fibronectin yüzeyde izlendi. Vinkülin proteinin odaklara göre membran bölgesine yığılma indeksleri ise kontrol yüzeyde $0,78 \pm 0,05$; Matrigel yüzeyde $0,90 \pm 0,04$ ve fibronectin yüzeyde $0,90 \pm 0,04$ şeklindedir. Odakların membrana yığılma düzeyleri, kaplama protokolleri ile artmakla birlikte istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır (Şekil 4.4.B).

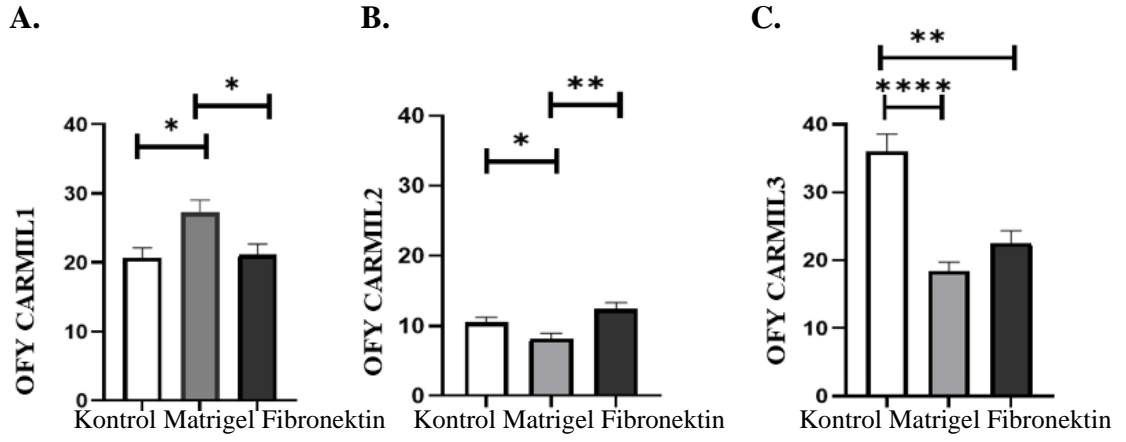


Şekil 4.4. Kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronectin kaplı yüzeylerde yetiştirilen MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin odak sayıları ve odakların hücreyel dağılımı. Vinkülin odakları (beyaz renkli), immünflorasan yöntemle, partikül analizleri sonucu elde edilmiştir. A grafiği vinkülin odak sayısını, B grafiği vinkülin odaklarının membran yığılma indekslerini ve C grafiği temsili görüntüleri göstermektedir. Ölçek çubuğu $30 \mu\text{m}$ 'dir. (* $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)

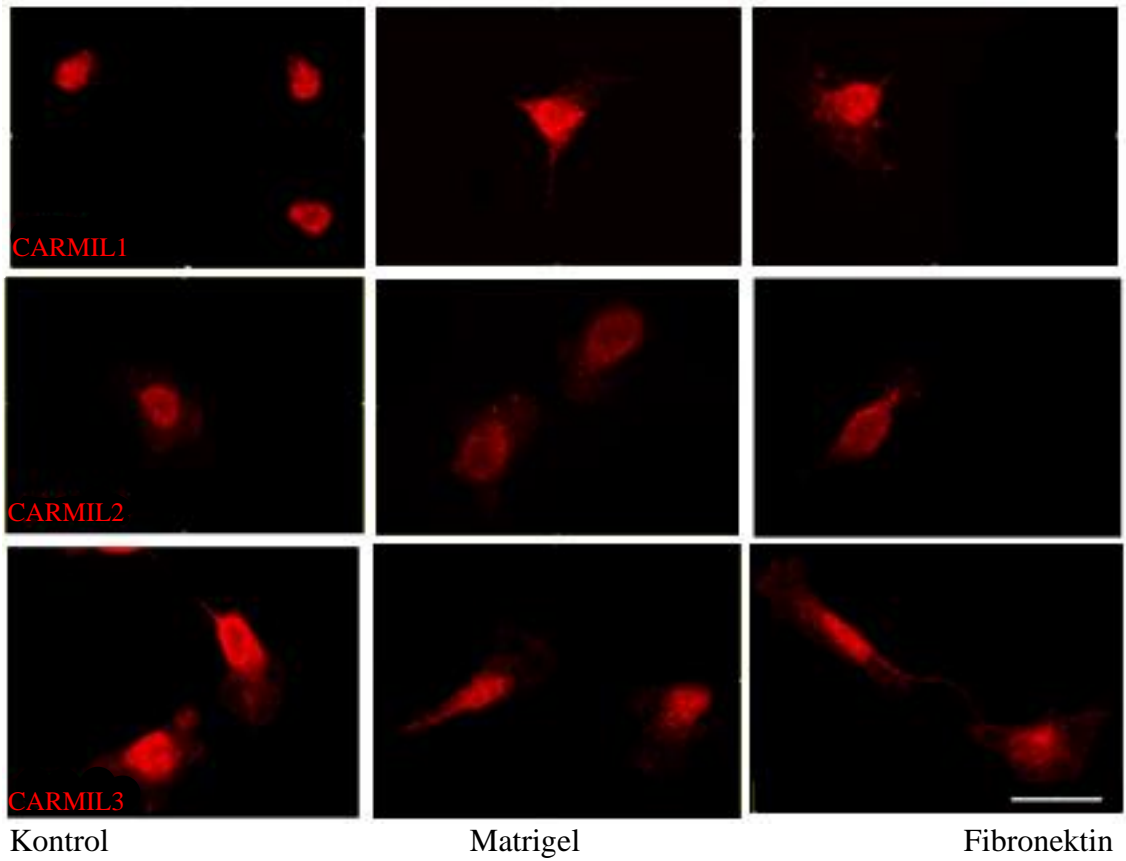
4.1.4. Farklı yüzeylerde büyütülen MDA-MB-231 hücrelerinde CARMIL protein değişimleri

İmmünfloresan boyamalar sonucu elde edilen CARMIL1 OFY değerleri kontrol, Matrigel ve fibronectin kaplı yüzeylerde sırasıyla $20,65 \pm 1,44$; $27,22 \pm 1,83$; $21,10 \pm 1,54$ (Şekil 4.5. A), CARMIL2 OFY değerleri sırasıyla $10,47 \pm 0,73$; $8,15 \pm$

0,85; $12,37 \pm 0,95$ (Şekil 4.5. B) ve CARMIL3 OFY değerleri sırasıyla $35,10 \pm 2,53$; $18,40 \pm 1,33$ ve $22,48 \pm 1,81$ (Şekil 4.5. C) şeklindedir.



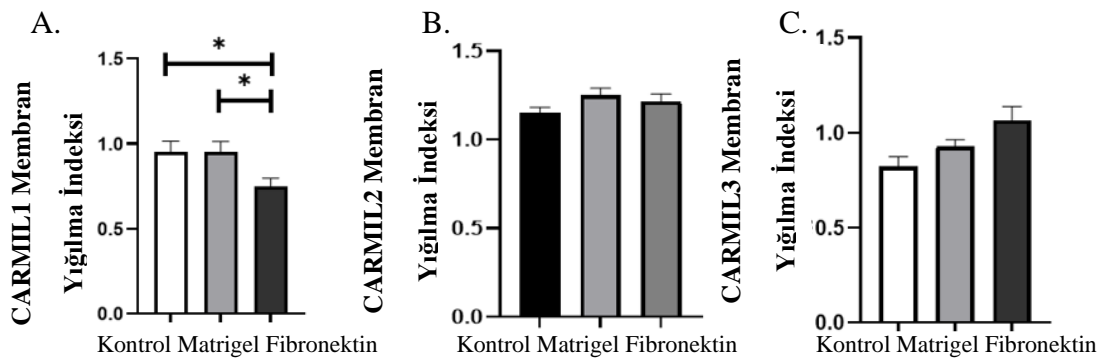
D.



Şekil 4.5. Kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronektin kaplı yüzeylerde yetiştirilen MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL düzey ve hücreyel dağılımı. Sonuçlar IF yöntemine göre analiz edilmiştir. İmmünfloresan boyamasında CARMIL proteinleri (kırmızı) işaretlendi. A grafiği CARMIL1 OFY değerlerini, B grafiği CARMIL2 OFY değerlerini ve C grafiği CARMIL3 OFY değerlerini ve D grafiği temsili görüntüleri göstermektedir. Ölçek çubuğu 30 µm'dir. (* p ≤ 0,05, ** ≤ 0,01)

CARMIL proteinleri arasında kontrol durumlarına göre en çok CARMIL3, orta düzeyde CARMIL1 ve en az CARMIL2 ifadesi görülmüştür. Yüzey kaplama işlemi ile birlikte CARMIL3 düzeyi belirgin bir düşüş göstermiştir (Şekil 4.5.C). Buna ek olarak, fibronektin kaplı yüzeyde Matrigel kaplı yüzeye oranla bir miktar artış olmakla birlikte bu artış istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır. CARMIL1 ifade düzeyi ise Matrigel kaplı yüzeyde artmış ancak fibronektin kaplı yüzeyde kontrol durumuna benzer seyretmiştir (Şekil 4.5.A). En az ifadesi olan CARMIL2 ise Matrigel üzerinde büyütülen hücrelerde azalırken, fibronektinde kontrole oranla anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 4.5.B).

OFY kullanılarak hesaplanan membran yığılma indeksi ortalama değerleri ise CARMIL1'de kontrol yüzeyde $0,95 \pm 0,06$; Matrigel yüzeyde $0,96 \pm 0,06$ ve fibronektin yüzeyde için $0,75 \pm 0,04$ şeklinde, CARMIL2'de kontrol yüzeyde $1,15 \pm 0,03$; Matrigel yüzeyde $1,25 \pm 0,04$ ve fibronektin için $1,21 \pm 0,04$ şeklinde ve son olarak CARMIL3'te kontrol yüzeyde $1,06 \pm 0,04$; Matrigel yüzeyde $1,31 \pm 0,05$ ve fibronektin yüzeyde $1,10 \pm 0,03$ olarak belirlendi (Şekil 4.6.A,B,C). CARMIL3 proteinin Matrigel kaplı yüzeyde anlamlı oranda membrana daha çok yığılma göstermiştir. Fibronektin kaplı yüzeyde ise bir farklılık izlenmedi. CARMIL1, Matrigel kaplı yüzeyde bir farklılık görülmezken fibronektin kaplı yüzeyde ise azalma gözlenmiştir. CARMIL2 düzeylerinde kaplamaya bağlı anlamlı hiçbir değişiklik belirlenmemiştir.

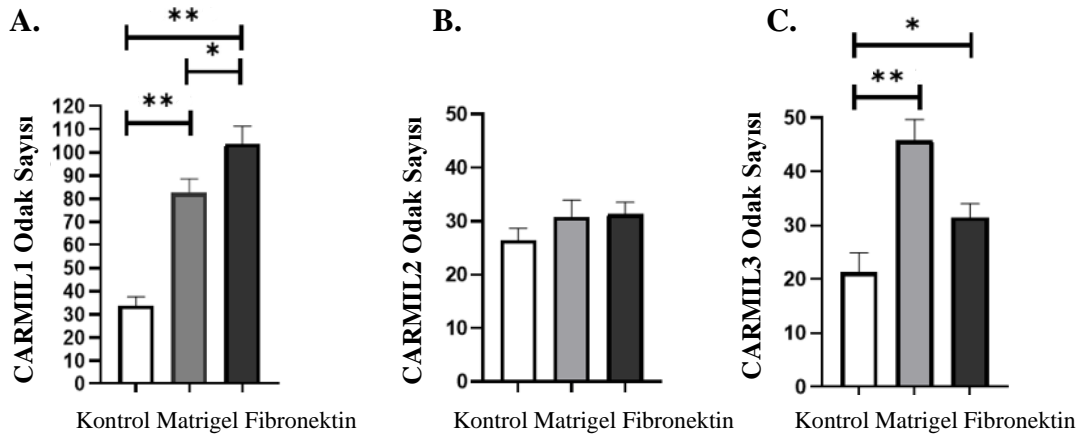


Şekil 4.6. MDA-MB-231 hücreleri, kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronektin kaplı yüzeylerde yetiştirilmiş ve hücre çekirdek boyamaları DAPI, aktin iskelet boyamaları falloidin ve vinkülin boyamaları CARMIL antikoları kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar IF yöntemine göre analiz edilmiştir. A grafiği CARMIL1 membran yığılma indeks değerlerini (OFY'ye göre), B grafiği CARMIL2 membran yığılma indekslerini (OFY'ye göre) ve C grafiği CARMIL3 membran yığılma indeks değerlerini (OFY'ye göre) ve D grafiği temsili görüntüleri göstermektedir. Ölçek çubuğu 30 µm'dir. (* p ≤ 0,05, ** ≤ 0,01)

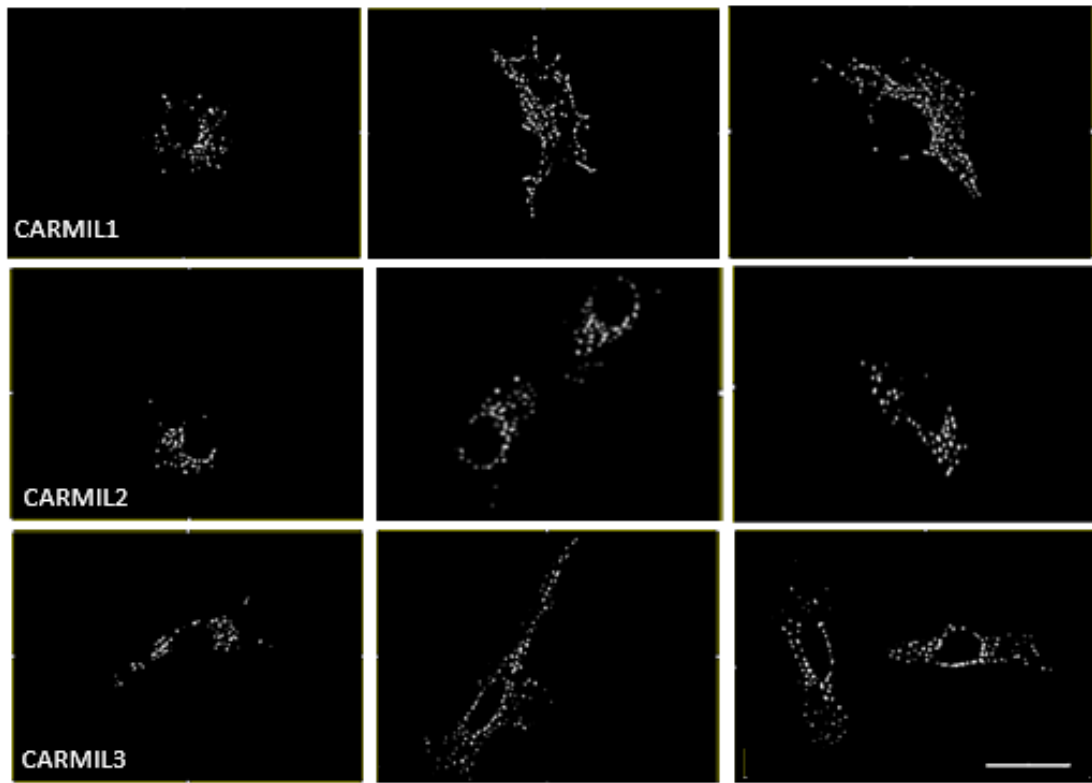
4.1.5. Farklı yüzeylerde CARMIL protein odak sayıları

Partikül analizleri ile elde edilen CARMIL1 odak sayıları ortalamaları kontrol koşulunda $33,84 \pm 3,79$, Matrigel kaplı yüzeyde $82,78 \pm 5,80$ ve fibronektin kaplı yüzeyde $103,65 \pm 7,66$ iken, CARMIL2 odak sayısı ortalamaları kontrol yüzeyde $26,5 \pm 2,15$, Matrigel'de yüzeyde $30,76 \pm 3,15$ ve fibronektinde $31,24 \pm 2,28$ olmuş ve CARMIL3 odak sayısı ortalamaları kontrol yüzeyde $21,31 \pm 3,59$, Matrigel'de $45,78 \pm 3,89$, ve fibronektinde $31,51 \pm 2,55$ olmuştur. Kaplanmış yüzeylerdeki odak sayıları arasında CARMIL2 ve 3 arasında büyük farklar bulunmamaktadır. Ancak CARMIL1 odak sayısı kaplama protokollerinin uygulanması ile birlikte belirgin bir artış göstermektedir. CARMIL2 odak sayısında ise yüzeye bağlı anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir. Son olarak CARMIL3 odak sayısı Matrigel kaplı yüzeyde en çok artmakla birlikte fibronektin kaplı yüzeyde de kontrole göre istatistiksel anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 4.6 A-B-C).

Odak sayıları kullanılarak hesaplanan membran yığılma indeksi; CARMIL1 kontrol koşulunda $1,40 \pm 0,08$, Matrigel yüzeyde $1,41 \pm 0,077$, fibronektin yüzeyde $1,73 \pm 0,25$ olurken CARMIL2 hesaplanan membran yığılma indeksleri kontrol koşulunda $0,62 \pm 0,04$, Matrigel kaplı yüzeyde $0,63 \pm 0,039$ ve fibronektin kaplı yüzeyde $0,70 \pm 0,042$ olmuştur. Ve son olarak CARMIL3 membran yığılma indeks değerleri kontrol, Matrigel kaplı ve fibronektin kaplı yüzeylerde sırasıyla $1,07 \pm 0,07$, $0,93 \pm 0,04$ ve $0,82 \pm 0,05$ olarak gözlenmiştir. Her üç protein için de membran yığılmalarında yüzeye bağlı çeşitli artışlar görülmekle birlikte bu farklılıklar içinde istatistiksel anlamlılık sadece fibronektin kaplı yüzeydeki hücrelerin CARMIL3 odak sayısı ile kontrol arasında vardır. (Şekil 4.7 E-F-G).



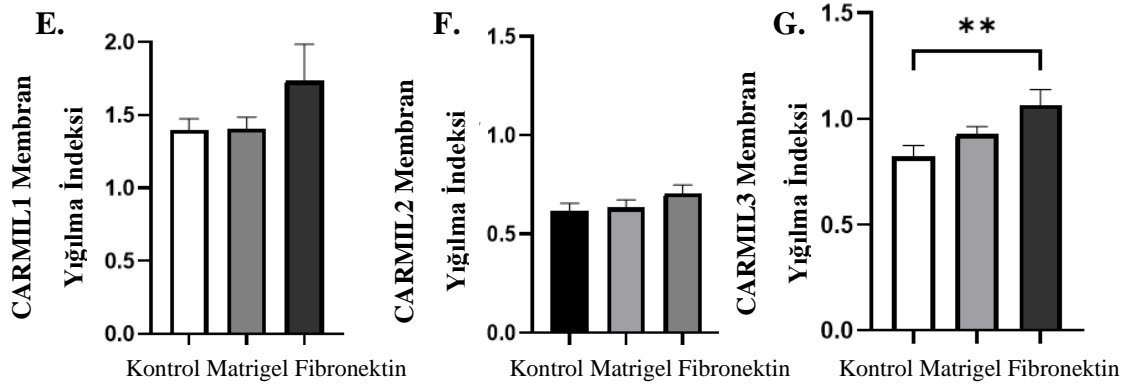
D.



Kontrol

Matrigel

Fibronektin



Şekil 4.7. Kontrol(kaplanmamış), Matrigel ve fibronektin kaplı yüzeylerde yetiştirilen MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL odak sayıları ve odakların hücreyel dağılımı. CARMIL odakları (beyaz renkli), immünflorasan yöntemle, partikül analizleri sonucu elde edilmiştir. A grafiği CARMIL1 odak sayısı değerlerini, B grafiği CARMIL2 sayısı değerlerini ve C grafiği CARMIL3 odak sayısı değerlerini, D grafiği temsili görüntüleri, E grafiği CARMIL1 odaklarının membran yığılma indeks değerlerini, F grafiği CARMIL2 odaklarının membran yığılma indekslerini ve G grafiği CARMIL3 odaklarının membran yığılma indeks değerlerini göstermektedir. Ölçek çubuğu 30 μm 'dir. (* $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)

4.2. Matrigel kaplı yüzeylerde IL-1 β 'nin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin iskelet dinamiklerine etkisi

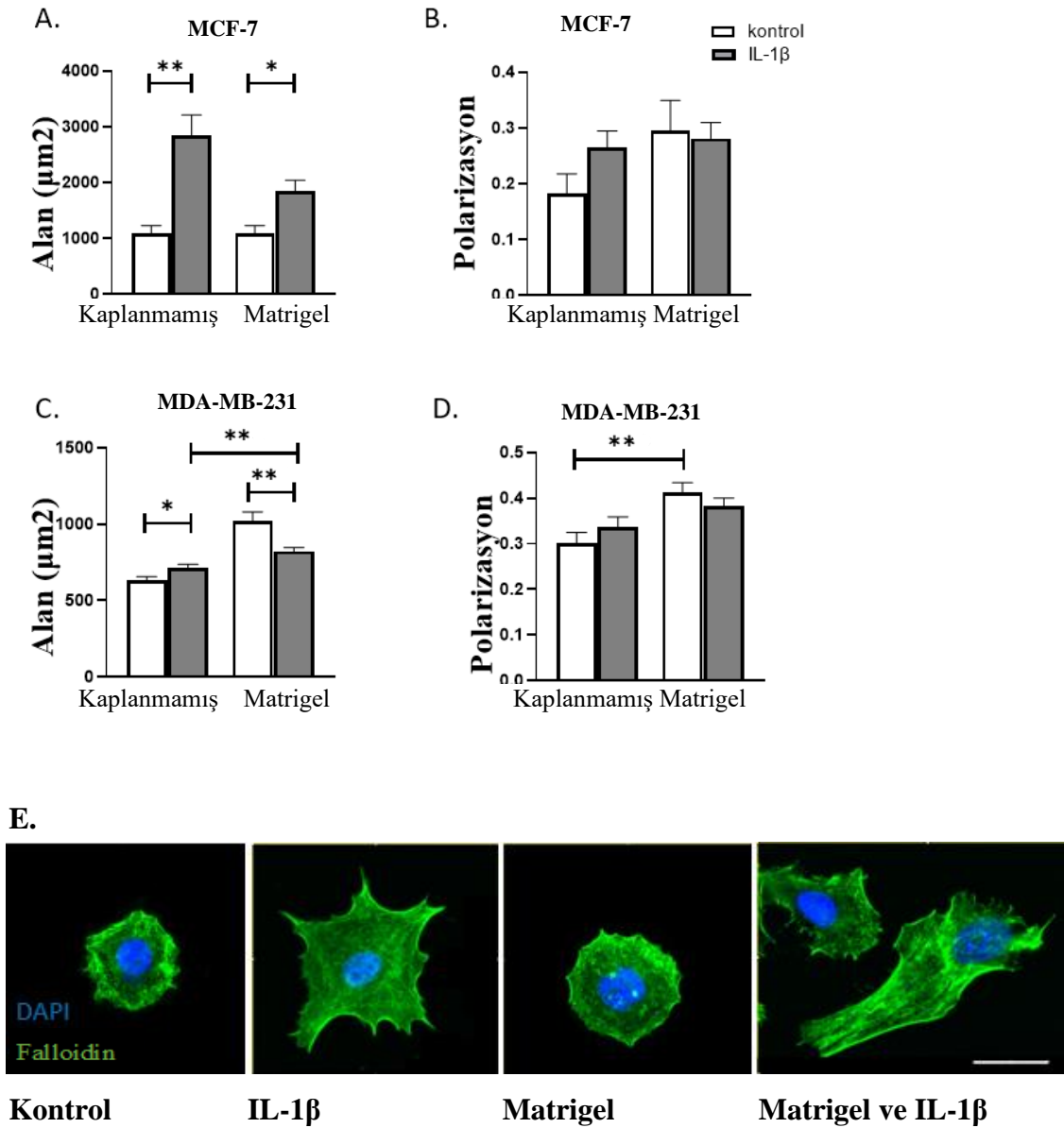
Epitelyal karakterli lüminal A tipinde MCF-7 ve mezenkimal karakterli üçlü negatif tipte MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları Matrigel kaplı yüzeylerde yetiştirilmiş ve IL-1 β kullanılarak epitelyal-mezenkimal dönüşüme teşvik edilmiştir. Daha sonra bu hücrelerde immün floresan boyama yöntemiyle değişen iskelet dinamikleri incelenmiştir. CARMIL proteinleri arasında en çok ifade edildiğini tespit ettiğimiz CARMIL3 proteinine odaklanılmıştır.

4.2.1. IL-1 β 'ya bağlı hücre morfoloji değişimleri

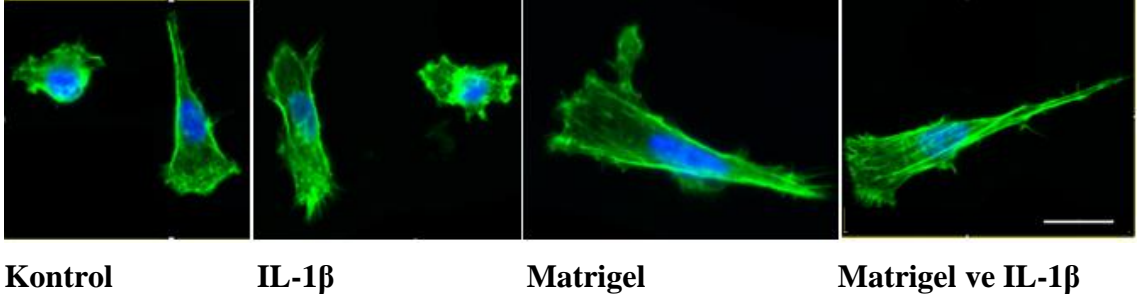
Morfolojik değişimleri incelemek amacıyla yapılan aktin iskelet boyamalarının sonuçları, IL-1 β 'ya bağlı EMT durumu hücre alan ve polarizasyon değişkenlerindeki farklılıklara bağlı olarak incelenmiştir.

MCF-7 hücrelerinin kaplı olmayan cam yüzeylerde IL-1 β uygulanmamış ve uygulanmış durumlardaki alan değerleri sırasıyla $1078,53 \pm 146,2 \mu\text{m}^2$ ve $2849,36 \pm 356,48 \mu\text{m}^2$ olarak bulundu. Matrigel kaplı yüzeyde ise hücrelerin alanı, kontrol koşulda $1078,53 \pm 146,20 \mu\text{m}^2$ ve IL-1 β varlığında $1844,17 \pm 189,853 \mu\text{m}^2$ idi. Polarizasyon düzeyleri ise, kontrol koşulunda $0,18 \pm 0,03$; IL-1 β uygulanmış ve kaplanmamış yüzeyde $0,26 \pm 0,02$; Matrigel kaplı ve IL-1 β uygulanmamış koşulda $0,29511 \pm 0,0516$; ve Matrigel kaplı ve IL-1 β uygulanmış koşulda ise $0,28 \pm 0,02$ şeklindedir. Bu sonuçlara göre IL-1 β 'nin MCF-7 hücre alanını kaplamadan bağımsız olarak arttırdığı görülmüştür. Polarizasyon düzeylerindeki değişimler ise anlamlı düzeyde değildir.

MDA-MB-231 hücrelerinde ise alan değerleri kontrol koşulunda $629,28 \pm 27,69 \mu\text{m}^2$, IL-1 β uygulanmış ve kaplanmamış yüzeyde $710,75 \pm 26,57 \mu\text{m}^2$, Matrigel kaplı ve IL-1 β uygulanmamış koşulda $1023,34 \pm 56,56 \mu\text{m}^2$ ve Matrigel kaplı ve IL-1 β uygulanmış koşulda $821,726 \pm 24,991 \mu\text{m}^2$ olmuştur. Polarizasyon değerleri ise kontrol koşulda $0,30 \pm 0,02$, IL-1 β uygulanmış durumda $0,33 \pm 0,02$, Matrigel kaplı yüzeyde $0,41 \pm 0,02$ ve Matrigel kaplı ve IL-1 β uygulanmış koşulda $0,38 \pm 0,01$ olarak belirlenmiştir.



F.



Şekil 4.8. Kaplanmamış veya Matrigel kaplı yüzeylerde yetiştirilen ve IL-1 β ile uyarılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin morfoloji değişimleri. Sonuçlar immünfloresan yöntemine göre analiz edilmiştir. İmmünfloresan boyamasında hücre çekirdeği (DAPI, mavi) ve aktin iskelet (falloidin, yeşil) işaretlenmiştir. A grafiği MCF-7 hücrelerinin alan değerlerini, B grafiği polarizasyon değerlerini ve C grafiği MDA-MB-231 hücrelerinin alan değerlerini, D grafiği polarizasyon değerlerini ve E grafiği MCF-7 hücrelerinin, F grafiği ise MDA-MB-231 hücrelerinin temsili görüntüleri göstermektedir. Ölçek çubuğu 30 μm 'dir. (* $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)

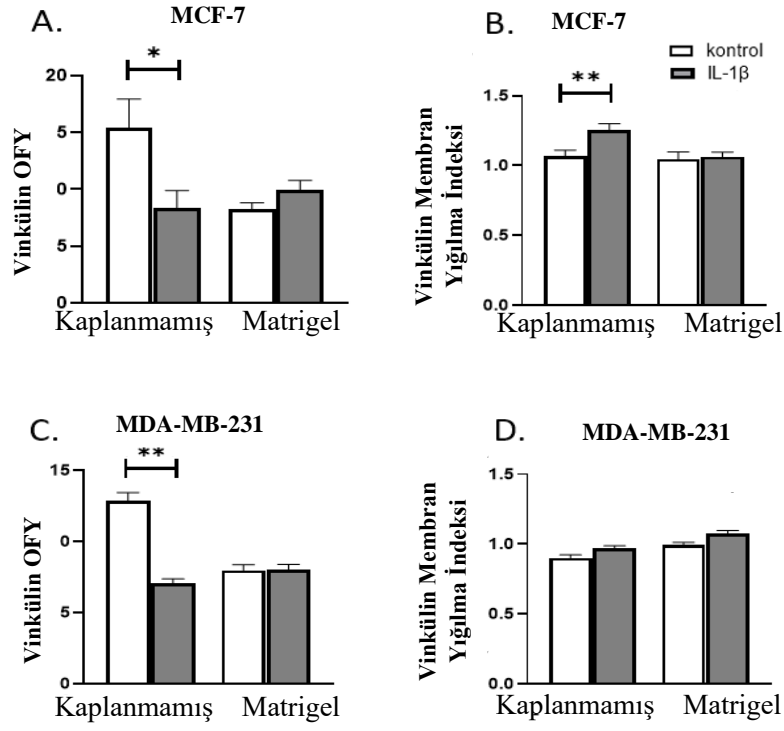
Kaplanmamış yüzeylerde IL-1 β anlamlı alan değişimine sebep olmamış, Matrigel kaplı yüzeyde ise alan düzeyinde azalmaya sebep olmuştur. Polarizasyon düzeyinde de koşullar arası anlamlı değişimler gözlenmemiştir. MDA-MB-231 hücreleri halihazırda mezenkimal olduğu için morfolojik özellikleri IL-1 β ile büyük değişiklikler göstermemiştir (Şekil 4.8).

4.2.2. IL-1 β ile değişen vinkülin protein ifadesi, fokal adezyon sayısı ve hücre içi dağılımı

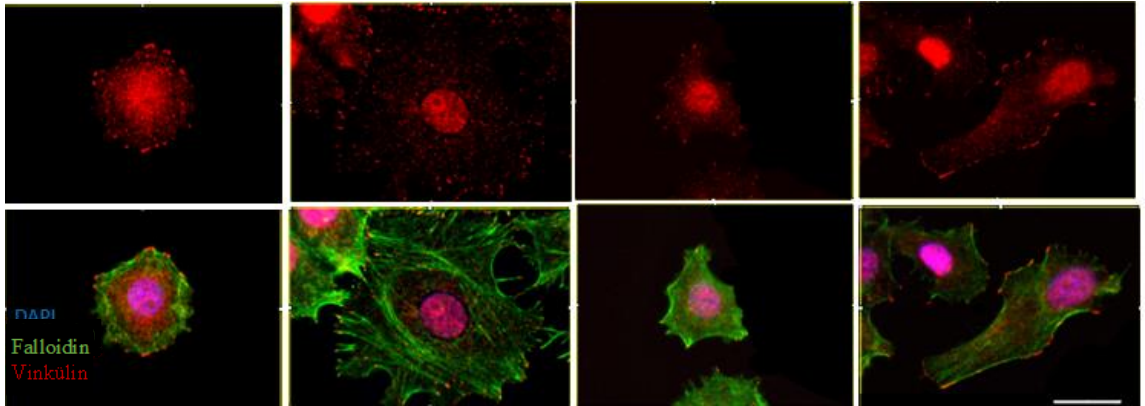
Vinkülin proteinlerinin ifadesi için immünfloresan boyamalar ile, IL-1 β uyarımı varlığına ve yokluğuna bağlı değişen OFY ve membran yığılma indeks değerlerine göre analiz edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Matrigel kaplı yüzeylerde yetişen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin proteini OFY ve Membran yığılma indeksleri. (Ortalama \pm SE)

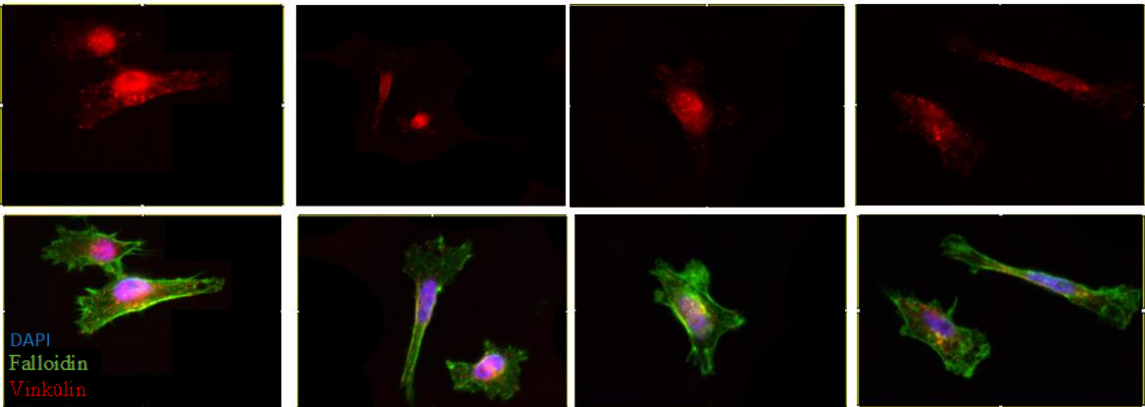
MCF-7 OFY Vinkülin	Kontrol	15,41 \pm 2,39
	IL-1 β	8,39 \pm 1,46
	Matrigel kaplı	8,25 \pm 0,54
	Matrigel kaplı ve IL-1 β	9,95 \pm 0,82
MDA-MB-231 OFY Vinkülin	Kontrol	12,81 \pm 0,63
	IL-1 β	7,04 \pm 0,33
	Matrigel kaplı	7,97 \pm 0,39
	Matrigel kaplı ve IL-1 β	8,01 \pm 0,37
MCF-7 Membran yığılma indeksi	Kontrol	1,07 \pm 0,04
	IL-1 β	1,26 \pm 0,04
	Matrigel kaplı	1,05 \pm 0,05
	Matrigel kaplı ve IL-1 β	1,06 \pm 0,03
MDA-MB-231 Membran yığılma indeksi	Kontrol	0,90 \pm 0,02
	IL-1 β	0,97 \pm 0,02
	Matrigel kaplı	0,99 \pm 0,02
	Matrigel kaplı ve IL-1 β	1,08 \pm 0,02



E.



F.



Kontrol

IL-1 β

Matrigel

Matrigel ve IL-1 β

Şekil 4.9. Kaplanmamış veya Matrigel kaplı yüzeylerde yetiştirilen ve IL-1 β ile uyarılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin düzey ve hücreyel dağılımı. Sonuçlar immünfloresan yöntemle göre analiz edilmiştir. İmmünfloresan boyamasında hücre çekirdeği (DAPI, mavi), aktin iskelet (falloidin, yeşil) ve vinkülin (kırmızı) işaretlenmiştir. A grafiği MCF-7 hücresinin vinkülin OFY değerlerini, B grafiği vinkülin membran yığılma indeks değerlerini, C grafiği MDA-MB-231 vinkülin OFY değerlerini, D grafiği vinkülin membran yığılma indeks değerlerini ve E grafiği MCF-7 hücrelerinin, F grafiği ise MDA-MB-231 hücrelerinin temsili görüntüleri göstermektedir. Ölçek çubuğu 30 μ m'dir. (* $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)

İki hücre tipinde de vinkülin OFY değerleri kaplanmamış yüzeylerde IL-1 β ile anlamlı düzeyde azalmış, Matrigel kaplı yüzeylerde ise IL-1 β anlamlı değişikliklere sebep olmamıştır. Vinkülin proteinlerinin membran yığılma oranları ise, MCF-7 hücrelerinde kaplanmamış yüzeylerde IL-1 β ile artmış, Matrigel kaplı yüzeylerde ise değişmemiştir. MDA-MB-231 hücrelerindeyse vinkülin proteininin membrana yığılma düzeyinde IL-1 β ile birlikte hafif düzeyde artışlar görülmüştür. (Şekil 4.9.)

IL-1 β uyarımına bağlı olarak değişen vinkülin protein odak sayıları (fokal adezyon noktaları) yönünden ve bu noktaların seçilen membran alanlarına yığılma oranları yönünden değerlendirilmiştir. (Tablo 4.2)

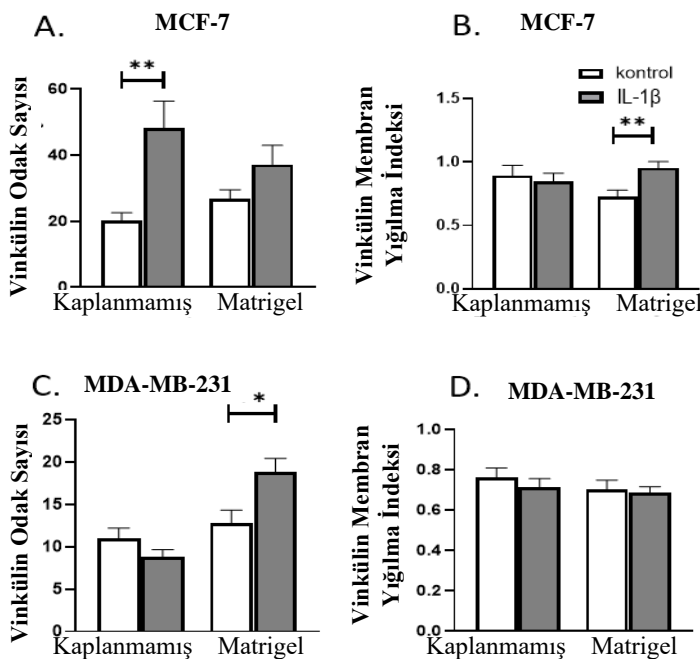
Tablo 4.2. Matrigel kaplı yüzeylerde yetişen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin proteini odak sayısı ve membran yığılma indeksleri (Ortalama \pm SE)

MCF-7 Vinkülin Odak sayısı	Kontrol	20,26 \pm 2,19
	IL-1 β	48,20 \pm 7,99
	Matrigel kaplı	26,76 \pm 2,69
	Matrigel kaplı ve IL-1 β	37,16 \pm 5,74
MDA-MB-231 Vinkülin Odak sayısı	Kontrol	11,04 \pm 1,17
	IL-1 β	8,75 \pm 0,91
	Matrigel kaplı	12,81 \pm 1,54
	Matrigel kaplı ve IL-1 β	18,83 \pm 1,58
MCF-7 Vinkülin Membran yığılma indeksi	Kontrol	0,89 \pm 0,08
	IL-1 β	0,84 \pm 0,06
	Matrigel kaplı	0,72 \pm 0,05
	Matrigel kaplı ve IL-1 β	0,95 \pm 0,05

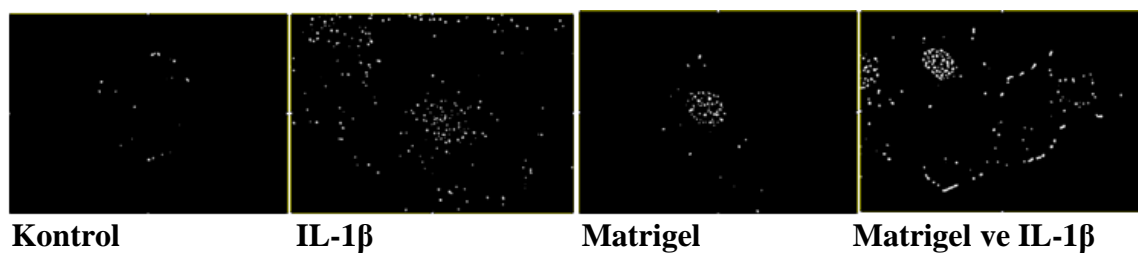
	Kontrol	0,76 ± 0,05
MDA-MB-231	IL-1 β	0,71 ± 0,04
Vinkülin	Matrigel kaplı	0,70 ± 0,05
Membran yığılma indeksi	Matrigel kaplı ve IL-1 β	0,69 ± 0,03

MCF-7 hücrelerinde odaksal yapışma durumu, yüzey Matrigel kaplı olsun ya da olmasın, artmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde ise, IL-1 β 'ya bağlı anlamlı vinkülin odak sayısı artışı yalnızca Matrigel kaplı yüzeylerde yetişen hücrelerde görülmüş, kaplanmamış yüzeyde vinkülin odak sayılarında ise bir değişiklik gözlenmemiştir.

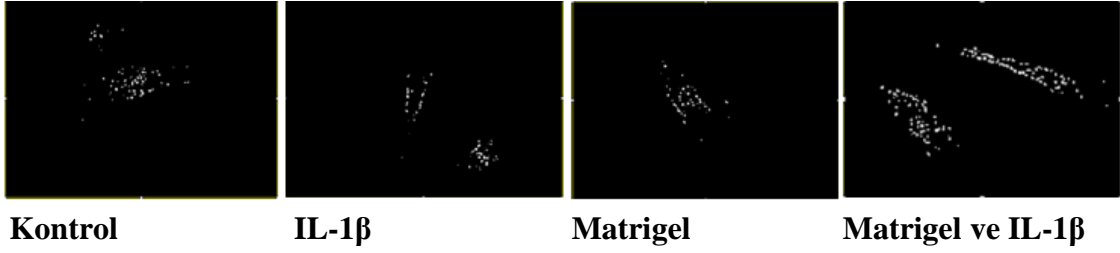
Vinkülin proteininin odak sayısına bağlı hesaplanan membran yığılma indeksleri ise sadece MCF-7 hücreleri Matrigel kaplı yüzeylerde bulunduğunda IL-1 β ile artmış, diğer koşullarda ise anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır (Şekil 4.10).



E.



F.



Şekil 4.10. Kaplanmamış veya Matrigel kaplı yüzeylerde yetiştirilen ve IL-1 β ile uyarılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin odak sayıları ve odakların hücreyel dağılımı. Vinkülin odakları (beyaz renkli), immünflorasan yöntemle, partikül analizleri sonucu elde edilmiştir. A grafiği MCF-7, C grafiği MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin odak sayılarını, B grafiği MCF-7, D grafiği MDA-MB-231 hücrelerinin vinkülin odaklarının membran yığılma indeks değerlerini ve E grafiği MCF-7 hücrelerinin, F grafiği ise MDA-MB-231 hücrelerinin temsili görüntüleri göstermektedir. Ölçek çubuğu 30 μ m'dir. (* $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)

4.2.3. IL-1 β 'nın CARMIL3 protein düzeyi, odak sayısı ve hücreyel dağılımı

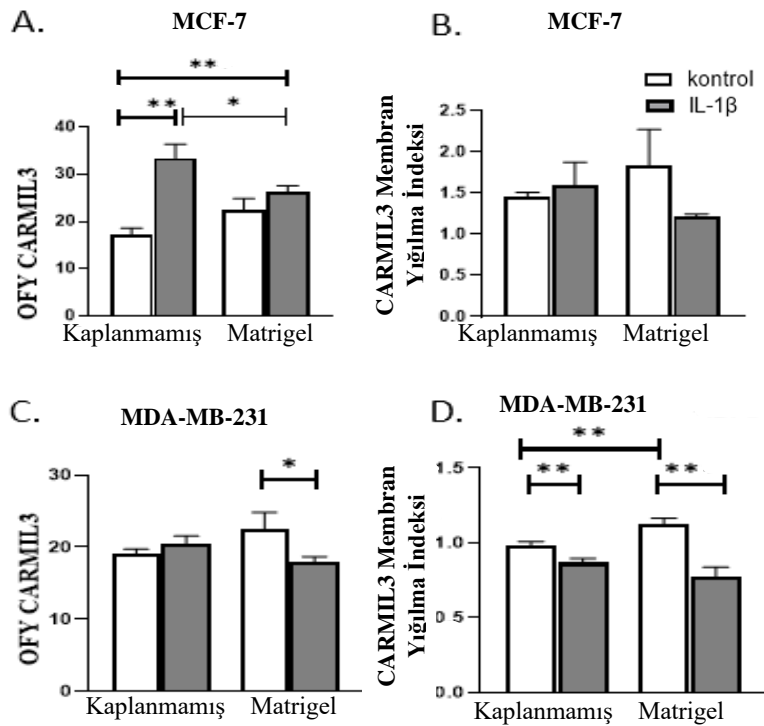
MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde CARMIL3 protein OFY ve OFY değerlerine bağlı membran yığılma indeks değerleri tablo 4.3'te gösterildiği gibidir.

Tablo 4.3. Matrigel kaplı yüzeylerde yetişen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL protein OFY ve membran yığılma indeksleri (Ortalama \pm SE)

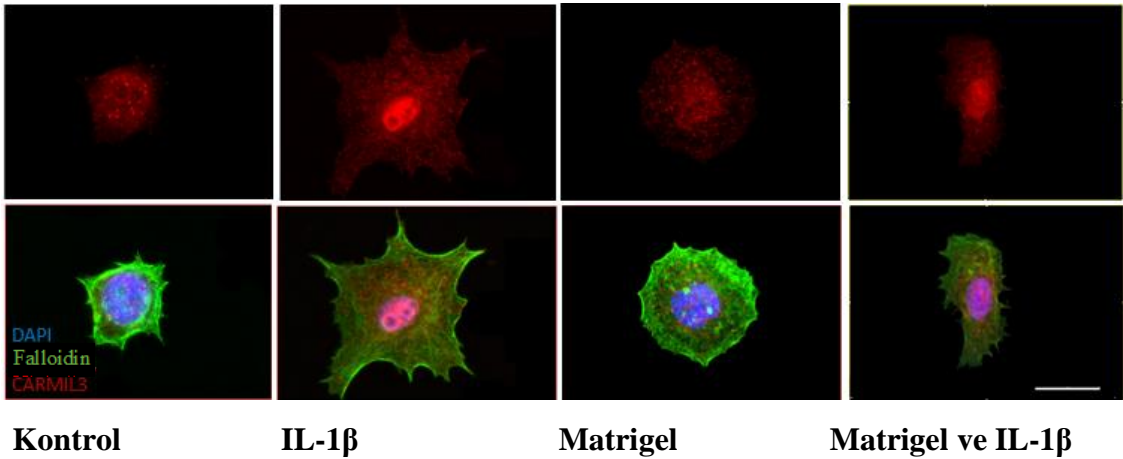
MCF-7 OFY CARMIL3	Kontrol	17,25 \pm 1,36
	IL-1 β	33,43 \pm 2,76
	Matrigel kaplı	22,35 \pm 2,53
	Matrigel kaplı ve IL-1 β	26,39 \pm 1,20
MDA-MB-231 OFY CARMIL3	Kontrol	18,98 \pm 0,75
	IL-1 β	20,48 \pm 1,07
	Matrigel kaplı	22,41 \pm 2,39
	Matrigel kaplı ve IL-1 β	17,88 \pm 0,79

MCF-7 Membran yığılma indeksi	Kontrol	1,46 ± 0,05
	IL-1β	1,59 ± 0,26
	Matrigel kaplı	1,83 ± 0,43
	Matrigel kaplı ve IL-1β	1,21 ± 0,04
MDA-MB-231 Membran yığılma indeksi	Kontrol	0,98 ± 0,03
	IL-1β	0,87 ± 0,03
	Matrigel kaplı	1,12 ± 0,04
	Matrigel kaplı ve IL-1β	0,77 ± 0,07

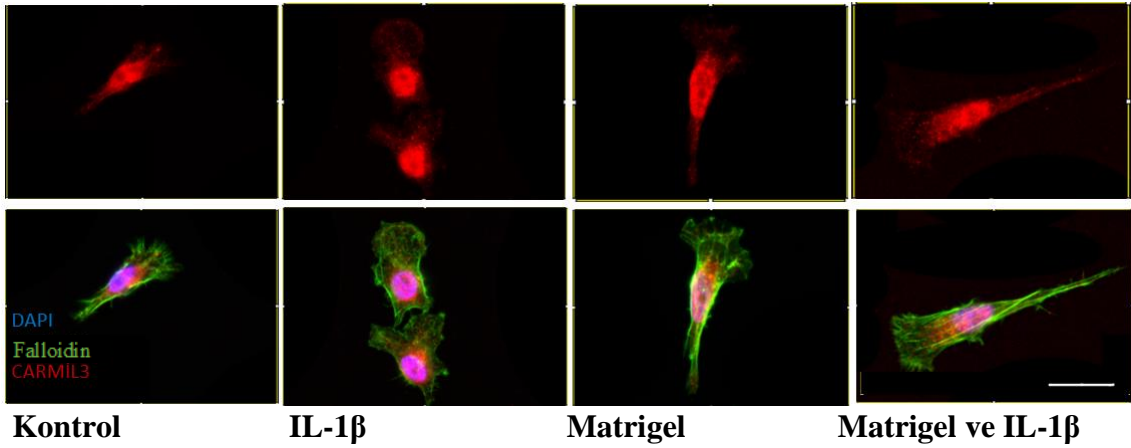
CARMIL3 OFY düzeyi MCF-7 hücrelerinde kaplanmamış yüzeyde yetişen hücrelerde istatistiksel anlamlılık düzeyinde artarken, Matrigel kaplı yüzeyde yetişen hücrelerde de artış trendi göstermiş ancak bu artış istatistiksel anlamlılık seviyesine erişememiştir. Aksine MDA- MB231 hücrelerindeyse kaplanmamış yüzeyde IL-1β belirgin bir CARMIL3 OFY değişimine sebep olmamış, Matrigel kaplı yüzeyde ise OFY düzeyini azaltmıştır. CARMIL3 proteininin membran bölgesine yığılma oranı ise kaplanmamış yüzeyde yetişen MCF-7 hücreleri dışındaki tüm koşullarda IL-1β ile azalmıştır (Şekil 4.11.).



E.



F.



Şekil 4.11. Kaplanmamış veya Matrigel kaplı yüzeylerde yetiştirilen ve IL-1 β ile uyarılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL düzey ve hücresel dağılımı. Sonuçlar immünfloresan yöntemle analiz edilmiştir. İmmünfloresan boyamasında hücre çekirdeği (DAPI, mavi), aktin iskelet (falloidin, yeşil) ve CARMIL (kırmızı) işaretlenmiştir. A grafiği MCF-7 hücrelerinin CARMIL3 OFY değerlerini, B grafiği hücrelerinin CARMIL3 membran yığılma indeks değerlerini, C grafiği MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL3 OFY değerlerini, D grafiği hücrelerinin CARMIL3 membran yığılma indeks değerlerini ve E grafiği temsili görüntüleri göstermektedir. Ölçek çubuğu 30 μm 'dir. (* $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)

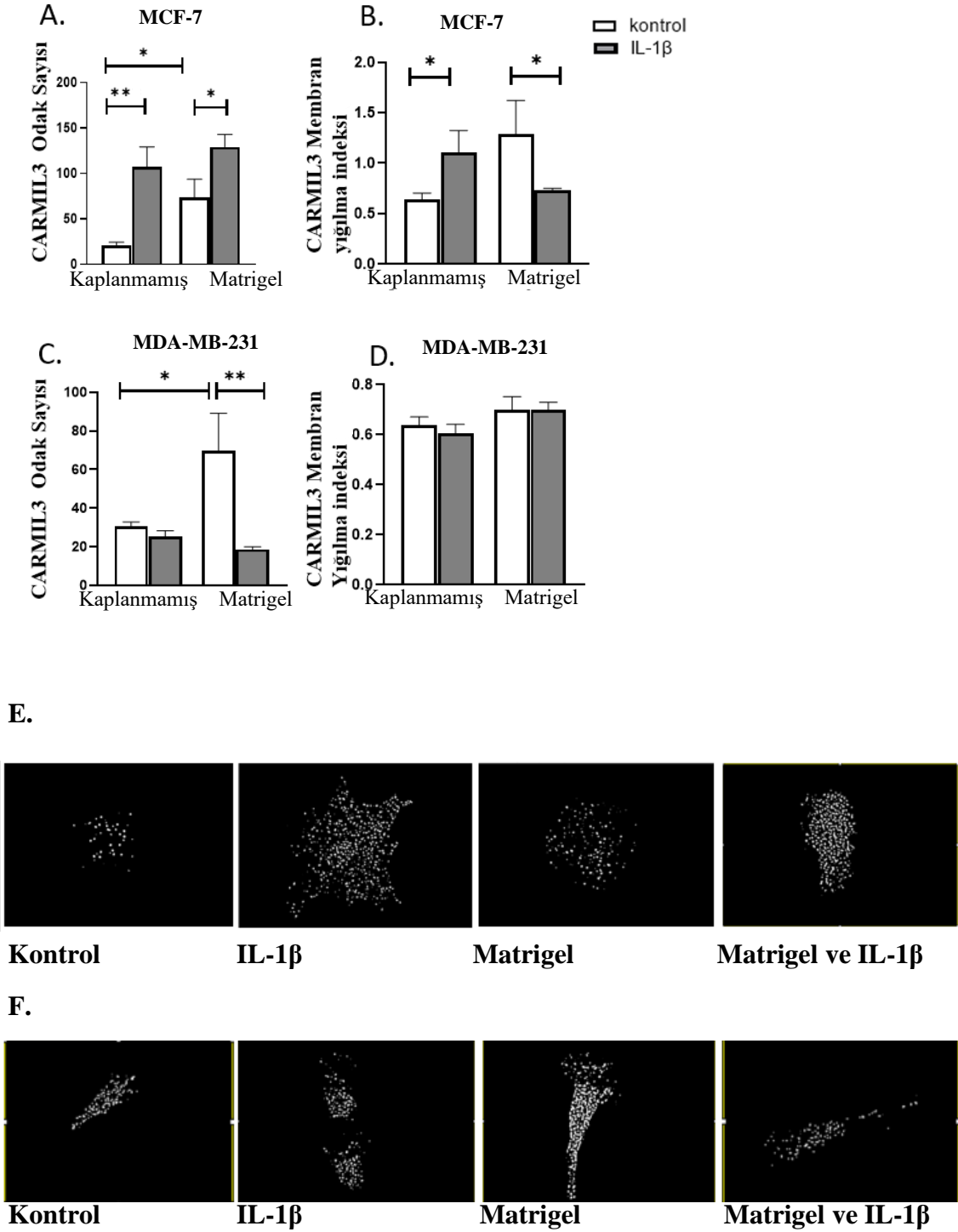
Vinkülin boyamaları ve partikül analizlerine ek olarak, iskelet dinamiklerinin incelenebilmesi adına bir de CARMIL3 proteini için partikül analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler sonucu elde edilen IL-1 β eklenmesiyle oluşan, odak sayısı ve odak sayısına bağlı membran yığılma oran ortalamaları ve hata oranları tabloda verilmiştir.

Tablo 4.4. Matrigel kaplı yüzeylerde yetişen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL3 protein Odak sayıları ve Membran yığılma indeksleri (Ortalama \pm SE)

MCF-7 Odak sayısı CARMIL3	Kontrol	21,10 \pm 3,19
	IL-1 β	107,23 \pm 20,33
	Matrigel kaplı	73,55 \pm 19,87
	Matrigel kaplı ve IL-1 β	129,17 \pm 13,99
MDA-MB-231 Odak sayısı CARMIL3	Kontrol	30,62 \pm 2,26
	IL-1 β	25,29 \pm 3,01
	Matrigel kaplı	69,97 \pm 18,90
	Matrigel kaplı ve IL-1 β	18,69 \pm 1,29
MCF-7 Membran yığılma indeksi	Kontrol	0,64 \pm 0,06
	IL-1 β	1,10 \pm 0,20
	Matrigel kaplı	1,29 \pm 0,33
	Matrigel kaplı ve IL-1 β	0,73 \pm 0,02
MDA-MB-231 Membran yığılma indeksi	Kontrol	0,64 \pm 0,03
	IL-1 β	0,61 \pm 0,04
	Matrigel kaplı	0,70 \pm 0,05
	Matrigel kaplı ve IL-1 β	0,70 \pm 0,03

CARMIL3 protein odak sayıları MCF-7 hücrelerinde kaplanmamış yüzeyde daha belirgin olmakla birlikte, Matrigel kaplı yüzeylerde de IL-1 β ile artmıştır. Kontrol koşulunda Matrigel kaplı yüzeyde bulunan hücrelerde CARMIL3 odak sayısı, kaplanmamış yüzeyde olana göre anlamlı düzeyde artmıştır. MCF-7 hücrelerinin aksine, MDA-MB-231 hücrelerinde CARMIL3 odak sayısı, kaplanmamış yüzeyde IL-1 β ile anlamlı bir değişik göstermemiştir. Matrigel yüzeyinde ise, IL-1 β ile odak sayısında belirgin bir azalma söz konusudur. İlginç bir şekilde, CARMIL3 odak sayısı Matrigel kaplı yüzeydeki uyarılmış koşulda kaplanmamış yüzeyde ve kaplanmış yüzeyde kaplanmış yüzeydeki IL-1 β uyarımı altında odak sayısından görece belirgin düzeyde artmıştır. Ancak, Matrigel kaplamasıyla artan CARMIL3 odak sayısı MDA-MB231 hücrelerinde IL-1 β 'nin etkisi ile azalmıştır.

MCF-7 hücrelerinde CARMIL3 proteininin membran yığılma indeks değerleri ise kaplı olmayan yüzeyde IL-1 β ile artmış, Matrigel kaplı yüzeyde ise IL-1 β ile azalmıştır. MDA-MB-231 hücrelerindeyse bu parametreler açısından anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Kaplanmamış veya Matrigel kaplı yüzeylerde yetiştirilen ve IL-1 β ile uyarılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL odak sayıları ve odakların hücreyel dağılımı. CARMIL odakları (beyaz renkli), immünflorasan yöntemle, partikül analizleri sonucu elde edilmiştir. A grafiği MCF-7 hücresinin CARMIL3 odak sayılarını, B grafiği CARMIL3 membran yığılma indeks değerlerini, C grafiği MDA-MB-231 CARMIL3 odak sayılarını, D grafiği CARMIL3 membran yığılma indeks değerlerini ve E grafiği MCF-7 hücrelerinin, F grafiği ise MDA-MB-231 hücrelerinin temsili görüntüleri göstermektedir. Ölçek çubuğu 30 μ m'dir. (* $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,01$)

4.3. IL-1 β ile uyarım sonrasında CARMIL3 ve Vinkülin protein düzey ve odak sayıları arasındaki korelasyon analizleri

MCF-7 ve MDA-MB231 hücrelerinde Vinkülin ve CARMIL3 protein düzeyleri ve odak sayılarının ilişki koşullardan bağımsız (total) ya da koşullara bağlı olarak korelasyon analizleri ile tespit edilmiştir.

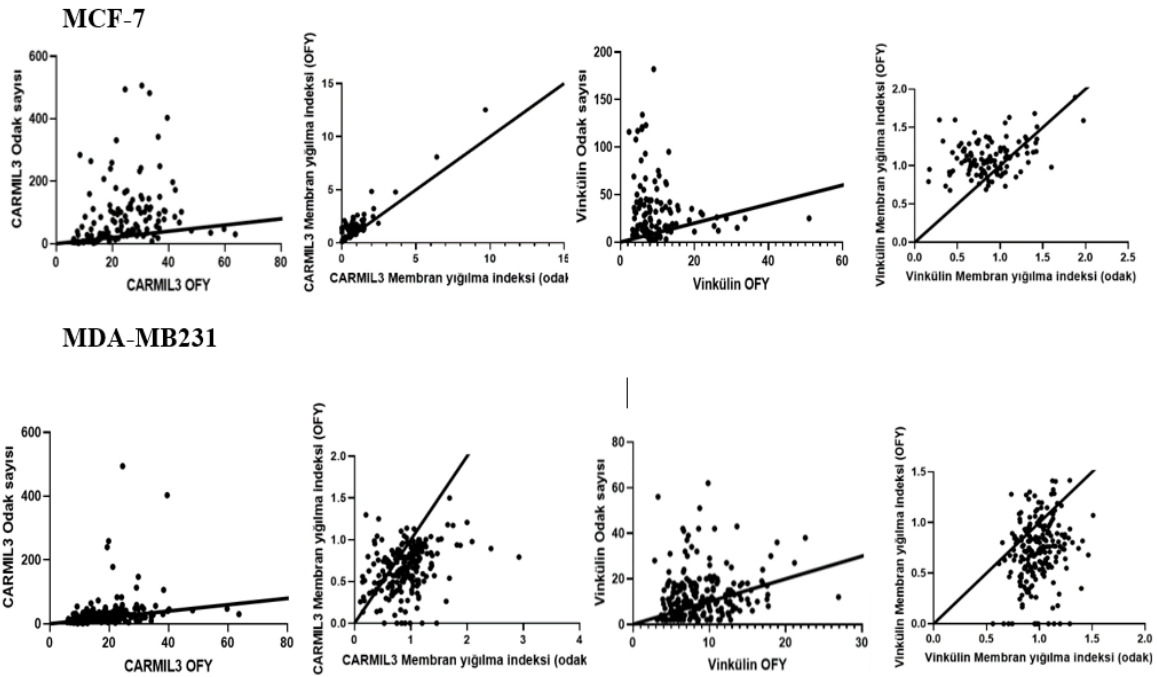
Tablo 4.5. Matrigel kaplı yüzeylerde yetişen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL protein düzeyleri ve odak sayıları korelasyon analizleri (p ve r değerleri)

		Total	Kontrol	IL-1 β	Matrigel	Matrigel +IL-1 β	
MCF-7	OFY ve Odak	p	0,004	0,031	0,219	<0,0001	0,336
		r	0,251	0,399	-0,365	0,6512	0,133
CARMIL3	Membran yığılma indeksi (OFY ve Odak)	p	<0,0001	0,758	<0,0001	<0,0001	0,017
		r	0,927	0,059	0,917	0,963	-0,323
MCF-7	OFY ve Odak	p	0,180	0,376	0,760	0,442	0,444
		r	-0,1287	0,215	-0,064	0,177	-0,116
Vinkülin	Membran yığılma indeksi (OFY ve Odak)	p	0,002	0,138	0,752	0,008	<0,0001
		r	0,352	0,352	0,066	0,562	0,555
MDA-MB231	OFY ve Odak	p	0,002	0,025	0,008	0,238	0,001
		r	0,250	0,301	0,352	0,204	0,406
CARMIL3	Membran yığılma indeksi (OFY ve Odak)	p	<0,0001	0,002	0,001	0,595	0,001
		r	0,313	0,398	0,503	0,092	0,424
MDA-MB231	OFY ve Odak	p	0,012	<0,0001	0,028	0,522	0,205
		r	0,169	0,549	0,304	0,090	0,167
Vinkülin	Membran yığılma indeksi (OFY ve Odak)	p	0,002	0,007	0,3417	0,050	0,027
		r	0,208	0,369	0,1345	0,272	0,286

MCF-7 hücrelerinin korelasyon analizlerinde koşullardan bağımsız olarak CARMIL3 protein düzey ve odak sayılarının pozitif yönde zayıf bir korelasyon gösterdiği görülmüştür. Koşul bazında protein düzeyi ve odak sayısı karşılaştırmaları MCF-7 hücrelerinde IL-1 β ile bu ilişkinin zayıf düzeyde negatif yönde olduğu,

Matrigel ile ise ilişkinin yüksek düzeye çıktığı tespit edilmiştir. Membran yığılma indekslerindeki protein düzey ve odak sayıları arasında ise koşuldan bağımsız durumda çok yüksek düzeyde pozitif bir ilişki görülmüştür. Bu yüksek düzey ilişki yalnızca IL-1 β veya yalnızca Matrigel içeren koşullarda da gözlenirken, Matrigel ve IL-1 β 'yı birlikte içeren koşulda zayıf olarak negatif yönde bir ilişkiye dönmemektedir. MCF-7 hücrelerinin Vinkülin protein düzey ve odak sayısı korelasyon analizlerinde ise anlamlı ilişki gözlenmemiş, ancak membran bölgesinde koşullardan bağımsız zayıf düzeyde bir ilişki görülmüştür. Membran bölgesi için koşullara tek tek bakıldığında ise Matrigel kaplı yüzeyde ve Matrigel kaplı ve IL-1 β uygulanmış yüzeyde protein düzeyi ile odak sayısının orta düzeyde pozitif yönlü ilişkisi gözlemlenmektedir.

MDA-MB231 hücrelerinde ise koşullardan bağımsız olarak CARMIL3 ve Vinkülin proteinlerinin hem sitoplazmik hem de membran yığılma indeksleri analizlerindeki düzey ve odak sayılarının zayıf ve orta düzeyde pozitif bir ilişki gösterdiği görülmüştür. Koşullar tek tek incelendiğinde Matrigel koşulunda CARMIL3 düzeyi ve odak sayısında anlamlı ilişki göstermezken, kontrol koşuluna göre IL-1 β ile Vinkülin protein düzeyi ve odak sayısı arasındaki ilişki membran bölgesinde kaybolmaktadır. Matrigel kaplı ve Matrigel kaplı ve IL-1 β uygulanmış yüzeyde kontrol koşula göre, sitoplazmik bölgede bu ilişki kaybolmaktadır

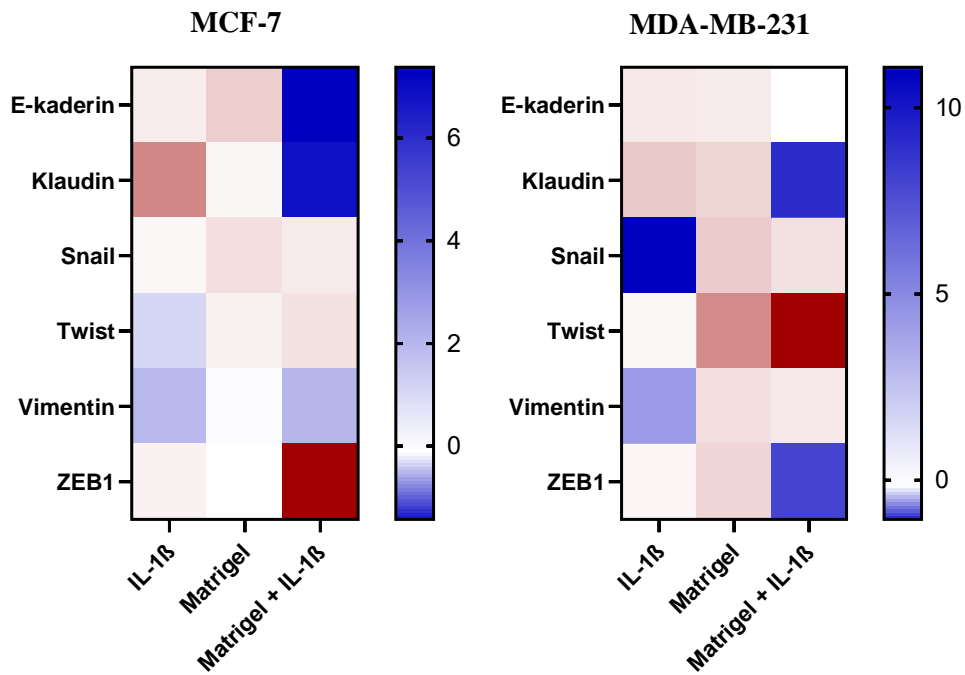


Şekil 4.13. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL3 ve Vinkülin protein düzeyleri ve odak sayıları korelasyon analizleri (total-bütün koşulları içerecek şekilde yapılan analizlerin grafikleri)

4.4. IL-1 β ile uyarım sonrasında EMT ile ilişkili gen ifadesi düzeyinde qRT-PCR ile analizi

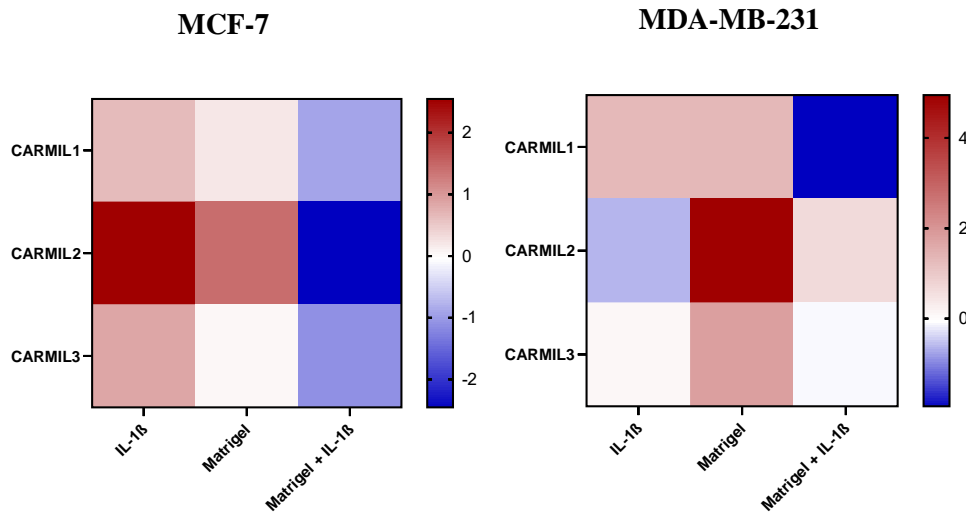
Matrigel ile kaplanmış ve kaplanmamış yüzeylerde büyütülen MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında yapılan gerçek zamanlı kantitatif PCR çalışmaları ile IL-1 β ile tetiklenen EMT durumunun daha iyi anlaşılması amacıyla E-kaderin ve klaudin, snail, ZEB1, twist1 ve vimentin, CARMIL1, CARMIL2 ve CARMIL3 gen ifade düzeylerine bakılmıştır.

MCF-7 hücrelerinde Matrigel kaplı yüzeylerde IL-1 β uyarımı sonrasında epitelyal belirteçler E-kaderin ve klaudin azalmış, mezenkimal belirteçler vimentin hariç snail, ZEB1, twist1 artmıştır. MDA-MB-231 için kaplanmış yüzeyde bulunan hücrelere IL-1 β eklenmiş hariç diğer koşullarda epitelyal ve mezenkimal belirteçler belirgin bir değişim yönü göstermemektedir. Kaplanmış yüzeydeki IL-1 β eklenmiş durumda ise, epitelyal belirteçlerden klaudin azalmış ancak E-kaderin ifadesi artmıştır. Mezenkimal belirteçler ise ZEB1 hariç artmıştır (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. Matrigel kaplı yüzeyde büyütülen ve IL-1 β ile EMT'ye tetiklenen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin epitelyal (E-kaderin, ve klaudin) ve mezenkimal belirteç (snail, twist, vimentin, ZEB) ifade düzeylerinin qRT-PCR analizleri değişimleri. Elde edilen sonuçlar $-\Delta\Delta CT$ hesaplanması yoluyla analiz edilmiştir.

Kaplanmamış yüzeylerde büyütülen MCF-7 hücrelerinde CARMIL mRNA düzeyleri IL-1 β uyarımı ile artarken, Matrigel kaplı yüzeylerde IL-1 β ile azalmaktadır. MDA-MB-231 hücrelerinde ise kaplanmamış yüzeylerde IL-1 β ile CARMIL1 artmış, CARMIL2 azalmış ve CARMIL3 ifadesi değişmemiştir. Matrigel kaplı yüzeylerde MDA-MB-231 hücrelerinde IL-1 β CARMIL1 azalmasına, CARMIL2 artışına neden olmuş ve CARMIL3 ifadesini ise değiştirmemiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Matrigel kaplı yüzeyde büyütülen ve IL-1 β ile EMT'ye tetiklenen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL ifade düzeylerinin qRT-PCR analizleri değişimleri. Elde edilen sonuçlar $-\Delta\Delta CT$ hesaplanması yoluyla analiz edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında proinflatuvar bir sitokin olan IL-1 β kullanılarak mezenkimal karakterli MDA-MB-231 ve epitelyal karakterli MCF-7 meme kanseri hücre hatları EMT'ye teşvik edilmiş ve IL-1 β ile tetiklenen EMT durumunda değişen hücre iskeleti dinamikleri farklı yüzey kaplamaları üzerinde yetiştirilen hücrelerde çalışılmıştır (49). CARMIL proteinlerine birer aktin iskelet uzama regülatörü olması nedeniyle önem verilmiştir (6).

Hücre hareketinde işlevi olduğu bilinen CARMIL proteinlerinin MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinin IL-1 β ile tetiklenen EMT durumunda bir rolü olup olmadığını test etmek amacıyla yapılan bütün deneylerde yetiştirilen bütün hücreler tümör mikroçevre çevresini taklit edebilmek amacıyla kaplanmış yüzeylerde yetiştirilmiştir. İmmünfloresan analizlerde EMT durumunu daha iyi modelleyebilmek adına daha çok hareket etme olasılığı bulunan diğer hücrelerle temas etmeyen, tek tek düşmüş hücreler analiz edilmiştir. Hangi yüzey kaplamasının daha olabileceğini belirleyebilmek için MDA-MB-231 hücreleri ECM elemanlarından biri olan ve fokal adezyondaki integrinlerin tutundukları; fibronektin veya ECM elemanlarından kolajen ve laminin gibi çeşitli içerikleri barındıran; Matrigel kaplı yüzeylerde yetiştirilmiştir. Bu hücreler morfoloji değişikliklerini tespit edilebilmesi adına aktin iskeleti boyayan falloidin ve hücre iskeleti dinamiklerini anlayabilmek için vimentin (mezenkimal bir belirteç), vinkülin (bir fokal adezyon aracısı) ve CARMIL1-3 immünfloresan yöntem ile işaretlenmiştir. Her iki kaplama koşulunun, kontrol yüzeye göre polarizasyon düzeylerinde belirgin bir etkisi olmadığı, ancak hücre alanlarını artırdıkları görülmüştür. Ortamda hücrelerin belli bir doğrultuya yönelmesine sebep olacak bir kemoatraktan bulunmadığı için polarizasyon düzeylerinin değişmemesi beklenmektedir (64, 65). Kaplama ile hücre alan artışları ise, mezenkimal hücrelerin tutunmak için bir yüzeye ihtiyaç duydukları bilindiği için kaplanmış yüzeylerde bu hücrelerin mezenkimal karaktere daha yakın bir morfolojiye sahip olduğuna işaret etmektedir (66). Ek, olarak bu sonuçlar fibronektin, laminin, kolajen gibi ECM bileşenlerinin integrinlere bağlanarak EMT ve metastazı desteklediği literatür bilgisi ile de örtüşmektedir (67).

Vimentin düzeyinin mezenkimal belirteç olarak analiz edilmesi ile farklı yüzeylerde yetişen hücrelerin bir farklılık göstermediği; ancak, vimentinin daha çok membran bölgesinde yığıldığı görülmüştür. Bu durum yüzeyde bulunan malzemenin özelliğinin vimentin protein miktarını arttırmaktan ziyade var olan vimentin proteinlerinin membran bölgesine daha çok yığılmasına ve gelişen yeni mezenkimalliği desteklenmesini sağlamakta olduğuna işaret edebilir (68).

Bir fokal adezyon proteini olan vinkülin proteini için ise hem floresan yoğunlukları hem de partikül analizleri yoluyla elde edilen odak sayıları kullanılarak analizler yapılmıştır. Matrigel kaplaması ile vinkülin düzeyi azalırken, odak sayısı artmıştır. Fibronektin kaplaması ise hem protein düzeyini hem de odak sayısı belirgin düzeyde artırmıştır. Protein miktarının genel olarak azalması vinkülinin odaklara yığılması nedeniyle gerçekleşebilir. Protein miktarı azalsa bile, odak sayısının artması vinkülin proteininin Matrigel'deki içeriklere tutunarak odaklar oluşturduğunu, fibronektin yüzeyinde ise hem protein düzeyi yüksekliği hem de odak sayısının yüksekliği fibronektine daha sıkı bir tutunma modelinin var olduğunu göstermektedir. Burada Matrigel ve fibronektin arasındaki fark, vinkülin düzeyi ve odaklarının fibronektinde daha çok olması da Matrigel'in birçok bileşenden oluşan kompleks bir yapı iken fibronektinin fokal adezyonların ucundaki integrinlere doğrudan bağlanan proteinlerden biri olmasından kaynaklanmaktadır. Bu hususu doğrular bir şekilde protein düzeyinin membrana yığılma oranları, Matrigel'e ve fibronektine doğru doğrusal bir artış göstermektedir. Her ne kadar burada analizler yapılırken hücre çekirdeği dahil edilmemiş olsa da hücreler en sıkı adezyonlarını en büyük ağırlık çekirdekte olduğu için çekirdek bölgesinde daha yoğun oranda oluştururlar, Lamelopodya bölgesinde bu adezyon noktaları daha küçük ve az miktarda oluşur. İlginç bir şekilde sonuçlar, kaplama ile birlikte vinkülinin membran bölgesinde yeni ve daha fazla odak oluşturmaksızın, var olan odaklardaki vinkülin protein yoğunluğunu artırdığı görülmektedir. Mezenkimal bir hücrenin adezyon kapasitesinin yüksek olduğu bilinmektedir (41). Bu sebeple, -bir fokal adezyon aracı proteini olan vinkülin proteininin odak sayısının artması ya da membran bölgesine vinkülin proteinlerinin yığılması da kaplama ile gelişen mezenkimal hücre özelliğinde vinkülin işlevini doğrulamaktadır.

Vimentin ve vinkülin proteinlerine ek olarak CARMIL proteinlerinin de hem protein düzeyleri hem de odak sayıları hücrelerin yetiştirildikleri yüzeylere bağlı olarak incelenmiştir. Öncelikle MDA-MB-231 hücrelerinde en az oranda ifade edildiğini gördüğümüz ve odak sayısı ya da membran yığılma oranlarında herhangi bir değişiklik göstermeyen CARMIL2 proteinin mezenkimal hücre karakteri ile doğrudan bağlantılı olmadığı düşünülebilir. CARMIL1 proteininin ise düzeylerine bakılarak MDA-MB-231 hücrelerinde CARMIL2 proteininden daha yüksek, CARMIL3 proteininden ise daha düşük ifadesi görülmüştür. Matrigel kaplama CARMIL1 düzeyini arttırmış, fibronektin ise değiştirmemiştir. CARMIL1 odak sayıları ise her iki yüzeyde de belirgin düzeyde artmıştır. Membran yığılma oranları ise, fibronektinde azalma dışında, değişmemiştir. Kaplama ile CARMIL1 odaklarının artışı bilinen CP düzenleyici işlevini ve CARMIL1-EMT ilişkisi düşündürürken, membran bölgesine yığılma düzeyinde değişiklik olmaması yönlendirilmiş bir hareket ve CP bağlantılı işlev ile örtüşmemektedir (57, 69). Çünkü aktin uzama bölgelerinde membrana yakın CP aktivitesi bilinmektedir (70). MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında en çok ifade edildiği görülen CARMIL proteini ise CARMIL3'tür. CARMIL3 proteini daha önce vinkülin proteininde de görülen şekilde Matrigel kaplaması ile düzey olarak azalmış ancak odak sayısını artmıştır. Aynı durum fibronektin kaplı yüzeyde de izlenmiştir ancak Matrigel yüzeydeki kadar belirgin düzeyde değildir. Membran yığılma oranları ise Matrigel'de artmakta, fibronektinde değişmemekte; odak sayısına bağlı ise bir artış şekli göstermektedir. Bu sonuçlar yani CARMIL3 odak sayısının artması ve membran bölgesine yoğunlaşması CARMIL3 proteininin *Capping protein* düzenleyici işlevine ve dolayısıyla hücre hareket kapasitesini artırıcı ve EMT ve metastazı destekleyebilme kapasite işaret etmektedir. Ek olarak, Matrigel tümör mikroçevresini daha iyi temsil etmektedir çünkü fibronektin ECM'de bulunan tek bir protein iken, Matrigel ECM bileşenlerinin konsantre edilmiş halidir. Buna ek deneylerde kullanılan Matrigel, büyüme faktörleri azaltılmış da olsa içeriğinde bulunan büyüme faktörleri, MMP vb. içerikler hücrelere EMT'yi destekleyici yönde sinyaller oluşturabilmektedir (32, 63).

Halihazırda mezenkimal karakterler barındıran MDA-MB-231 hücreleri ile yapılan deneylere, epitel karakterli MCF-7 hücreleri ve hücreleri epitel-mezenkimal dönüşüme teşvik etmek amacıyla IL-1 β uyarımı dahil edildi. MDA-MB-231 hücreleri

üçlü negatif mezenkimal karakterli meme kanseri hücreleridir ve bu çalışmadaki pozitif kontrol gibi kabul edilebilir. MCF-7 hücreleri luminal A tipinde epitelyal karakterli meme kanseri hücreleridir. MCF-7 hücreleri birçok çalışmada epitel hücre örneği olarak kullanılmaktadır. Öncelikle, EMT'nin modellenenebildiği, morfoloji değişimleri üzerinden aktin iskeleti şekil değişikliği ile görülmektedir. Ortamda bulunan belirli bir kemoatraktan olmadığı için polarizasyon gelişmemiştir. MCF-7 hücrelerinin hücre alanı yüzey kaplamasından bağımsız bir şekilde IL-1 β ile artmaktadır. Yine de Matrigel kaplı durumda daha fazla alan artışı olmasının sebebi Matrigel'in hücrelere tutunmak için yüzey sağlaması ve dolayısıyla mezenkimal duruma katkı sağlamasıdır. Bu durum, MCF-7 hücrelerinin Matrigel kaplı yüzeyde IL-1 β ile daha mezenkimal karakter göstermesi literatüre paralel bir şekilde, Matrigel içeriğinde bulunan ve birçok reseptöre bağlanan laminin, kolajen gibi ECM içeriklerinin EMT ve metastazını desteklediği bilgisini de doğrulamaktadır (71, 72).

MDA-MB-231 hücreleri, MCF-7 hücrelerinin aksine IL-1 β 'ya bağlı alanlarını genişletme yönünde bir yanıt oluşturmamışlardır. Hatta Matrigel kaplı yüzeylerde IL-1 β ile hücre alanında bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar literatürde var olan IL-1 β 'nın bazı durumlarda metastatik, bazı durumlarda anti-metastatik etkiler göstermesi ile de paraleldir (28, 73). Bu durumun sebebi bu hücrelerin halihazırda mezenkimal karakterde olması olabilir. Aynı zamanda Matrigel integrinlere bağlanıp fokal adezyon kinazlar (*Focal Adhesion Kinases*,FAK) üzerinden, IL-1 β ise MYD88 yolağı üzerinden NF κ B sinyal yolağının aktifleşmesine sebep olur. Bu iki taraflı NF κ B aktivasyonu, yüksek uyarıma (*over-stimulation*) sebep olarak mezenkimal karakteri negatif etkilemiş olabilir (19). Bu husus MDA-MB-231 hücrelerinde MCF-7 hücrelerine oranla daha yüksek oranda IL-1 reseptör tip 3 -sinyal başlatan tipte ifadesi görülmesi ile de örtüşmektedir (58). Çünkü daha çok miktarda IL-1 reseptör tip3 ifade eden MDA-MB-231 hücreleri, *over-stimulation* durumuna daha yatkın olabileceği için IL-1 β 'dan mezenkimal karakter açısından negatif yönde etkilenmiş olabilirler.

IL-1 β ile tetiklenen EMT durumunda vinkülin protein düzeyi her iki hücrede de kaplanmamış yüzeylerde IL-1 β ile azalmış, Matrigel yüzeylerde ise IL-1 β ile herhangi bir değişim göstermemiştir. Odak sayıları MCF-7 hücrelerinde kaplamadan

bağımsız olarak IL-1 β ile artmıştır. Bu durum vinkülin proteininin IL-1 β ile tetiklenen EMT durumu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Mezenkimal karakterli hücrelerin adezyon kapasiteleri yüksektir ancak adezyon kapasitelerinin yüksek olması onların hareket edebilme ya da invazyon kapasitelerini düşürmemektedir -ama hızlarının ameboid bir hücrenin hızından az olduğu bilinmektedir (31). Morfolojik analizlerine göre MCF-7 hücreleri IL-1 β ile alanlarını genişletmekte ama belli bir yöne yönelmemekteydi. IL-1 β ile vinkülin odak sayısının da artması, hücrelerin mezenkimal karaktere uygun bir şekilde adezyon kapasitelerinin de arttığına işaret eder (41). Bu sonuçlar da epitelyal bir hücrede IL-1 β 'nın EMT'yi tetikleyerek metastaza yardımcı olduğu gözlemini güçlendirmektedir. Ayrıca MDA-MB-231 hücrelerinde vinkülin odak sayıları kaplanmamış yüzeylerde IL-1 β ile artarken Matrigel kaplı yüzeylerde IL-1 β ile belirgin bir değişiklik göstermemiştir. Bu sonuç da MDA-MB-231 hücrelerindeki Matrigel ve IL-1 β 'nın birlikte olduğu durumda NF κ B aşırı uyarımı (*over-stimulation*) aracılığıyla mezenkimal karaktere negatif yönde etki edebileceği hususunu -mezenkimal karakterli hücrelerin adezyon kapasiteleri yüksektir literatür bilgisi sebebiyle desteklemektedir. Aynı zamanda bu iki hücrenin adezyon dinamiklerinin IL-1 β 'dan farklı yönde etkilenmesi IL-1 β 'nın EMT üzerindeki iki yönlü etkisine başka bir örnek oluşturmaktadır (2).

Vinküline ek olarak CARMIL3 proteini için de MCF-7 hücrelerinde kaplanmamış yüzeyde IL-1 β 'ya bağlı belirgin bir artış gözlemlendi ve Matrigel kaplı yüzeyde IL-1 β 'ya rağmen değişim yoktu. Odak sayıları kaplamadan bağımsız olarak IL-1 β ile artmaktadır. IL-1 β ile MCF-7 hücrelerinin mezenkimal duruma geçtiği bilindiği için bu sonuçlar IL-1 β ile tetiklenen EMT'nin CARMIL3 ile de desteklendiğini düşündürmektedir (74). Çünkü CARMIL proteinleri aktin iskelet uzama inhibitörü olan CP'ye bağlanarak aktin ucunu serbest bırakır ve hücre hareketine yardım ederler (69). Hücre hareketini destekleyici bu rol CARMIL proteinlerinin metastazı da desteklediğini düşündürmektedir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise CARMIL3 ifadesi ve odak sayısında azaltıcı etkiye sahiptir. Bu da hücrelerin mezenkimallik düzeyinin CARMIL3 odak sayısı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Bunu doğrular bir şekilde Matrigel kaplı ama IL-1 β eklenmemiş koşulda alanı en yüksek olan MDA-MB-231 hücrelerinin CARMIL3 odak sayıları da

en yüksek düzeydedir. CARMIL3 proteininin membrana yığılma oranları, MCF-7 hücrelerinde kaplı olmayan yüzeyde IL-1 β ile bir değişim göstermezken, kaplı yüzeyde azalmaktadır. MDA-MB-231 hücrelerinde ise kaplamadan bağımsız olarak azalmaktadır. Benzer bir şekilde, odak sayısına bağlı hesaplanan membran yığılma oranlarında ise MCF-7 hücrelerinde kaplanmamış yüzeylerde IL-1 β ile artarken, kaplı yüzeylerde IL-1 β ile azalmaktadır. Halihazırda mezenkimal karakterli MDA-MB-231 hücrelerinde ise hiçbir durumda bir değişiklik görülmemiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak, IL-1 β 'nin MCF-7 hücrelerinde CARMIL3 proteininin membrana yığılma ve orada işlev görme olasılığını artırdığı ancak Matrigel ile birlikte azalttığı söylenebilir. Mezenkimal karakterli MDA-MB-231 hücrelerinde ise IL-1 β 'nin CARMIL3 membran yığılmasını ya azalttığı ya da değiştirmedığı görülmüştür *-over-stimulation*. CARMIL3'ün odak artışları ve membran bölgesine dağılımı CP ilişkili rolünden ötürü IL-1 β ile tetiklenen EMT'de destekleyici rolü olabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda bu sonuçlara göre CARMIL3 metastatik belirteç olma potansiyeli de taşımaktadır. Buna ek olarak yapılan korelasyon analizlerinde de MCF-7 ve MDA-MB231 hücrelerinde Vinkülin ve CARMIL3 proteinlerin düzeyleri ile odak sayılarının pozitif yönlü ilişkisini göstermektedir. Bu durum bu proteinlerin koşullardan bağımsız olarak odaklanarak işlev gösterdiğini düşündürmektedir. Aynı zamanda epitelyal karakterli MCF-7 hücrelerinde çok yüksek düzeyde görülen membran bölgesindeki CARMIL3 protein düzeyi ve odak sayısı ilişkisi de membran bölgesine yoğunlaşan ve mezenkimal karakter artışı (EMT) ile artan CP aktivitesi düzenleme işlevini düşündürmektedir. Bu hücrelerde gözlemlenen kaplı yüzeyde IL-1 β ile membran bölgesinde protein düzeyi ve odak sayısı arasındaki negatif ilişki NF κ B yolağının aşırı uyarımı sebebiyle gerçekleşmiş olabilir. Bu duruma benzer bir negatif etki hali hazırda mezenkimal karakterli MDA-MB231 hücrelerinin en mezenkimal morfoloji gösterdiği Matrigel koşunda CARMIL3 düzey ve odak sayısı ilişkisi gözlenmemesi durumunda da kendini göstermektedir.

Matrigel kaplı yüzeylerde büyütülen ve IL-1 β ile uygulaması ile EMT'ye uyarılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde epitelyal belirteçlerin ifadesinin azalması, mezenkimal belirteçlerin ifadesinin artması beklenmektedir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, mRNA düzeyinde EMT'nin gözlemlenebilmesi için hem Matrigel hem IL-1 β gereklidir. Çünkü, sonuçlara göre MCF-7 hücrelerinde epitelyal belirteç

azalması yalnızca kaplı yüzeylerde yetişen ve IL-1 β uygulanmış hücrelerde görülmüştür. Benzer şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinde de kaplı yüzeylerde IL-1 β ile epitelyal belirteçlerde E-kaderin değişmemiş klaudin ise azalmıştır. Matrigel kaplı yüzeylerde uygulanan IL-1 β ile MCF-7 hücrelerinde vimentin, MDA-MB-231 hücrelerinde ZEB1 hariç bütün mezenkimal belirteçler EMT durumuna işaret etmektedir.

mRNA düzeyinde görülen sonuçlar ile protein düzeyinde görülen sonuçların örtüşmemesinin iki temel sebebi olabilir. Bunlardan birincisi post-transkripsiyonel ve post-translasyonel modifikasyon yoluyla gen ifade düzenlemeleri olabilir (75). Diğeri ise teknik bir husus olabilir. Gerçekleştirilen immünfloresan analizlerinde tümör kütesinden uzaklaşan ve EMT'ye daha yatkın bir hücre morfolojiyi modellemek amacıyla tek tek düşen hücreler tercih edilmiştir. Diğeri taraftan gen ifadesi analizlerinde uygulanan tüm koşullarda bulunan her hücre örneğe dahil edilerek RNA izole edilmiştir. Bu da immünfloresan ile elde edilen sonuçların daha seçici ve hücre özelinde de olsa daha belirleyici olmasını sağlamıştır. Bu durumda mRNA sonuçlarında sadece IL-1 β ya da sadece Matrigel kaplamaların kısmi EMT durumunu göstermesi hem EMT'ye uğramış hem de uğramamış hücrelerin örneklenmiş olması ile uyumludur. MCF-7 hücrelerinde CARMIL1, CARMIL2 ve CARMIL3 de benzer sonuçlar vermiştir. Bu hücrelerde CARMIL mRNA değerleri kaplanmamış yüzeylerde IL-1 β ile artarken, kaplı yüzeylerde IL-1 β ile azalma göstermiştir. IL-1 β 'nin MCF-7 hücrelerinde CARMIL-EMT ilişkisini desteklediği söylenebilir. Mezenkimal karakterli olduğu için daha çok pozitif kontrol benzeri MDA-MB-231 hücrelerinde ise IL-1 β 'nin CARMIL düzeylerine etkisi, beklenildiği üzere, değişkenlikler göstermekte ve bu hücrelerde IL-1 β 'ya bağlı belirgin bir modeli işaret etmemektedir.

CARMIL mRNA düzeyleri, hücre morfoloji değişimleri ile örtüşmektedir. Morfoloji ile yapılan analizlere göre IL-1 β , MCF-7 hücrelerinin daha mezenkimal görüntü sergilemesi için, Matrigel kaplama ise MDA-MB-231 hücrelerinin var olan mezenkimal karakterini gösterebilmesi için ön planda idi. Benzer şekilde MCF-7 hücrelerinde IL-1 β , MDA-MB-231 hücrelerinde ise Matrigel kaplama CARMIL düzeylerini belirgin düzeyde arttırmıştır. Bu sonuçlara bağlı olarak CARMIL

proteinlerinin IL-1 β ile tetiklenen EMT'de belki diğer epitelyal ve mezenkimal belirteçlerden de daha hassas bir belirteç olduğu düşünölebilir. mRNA düzeylerine göre CARMIL2 ile de belirgin fark elde edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen CARMIL3 ve vinkölin ifade düzeylerinin mezenkimal hücre karakterine bağlı olarak değişmesi ve odak sayılarının artması sonuçlarına bakılarak, CARMIL proteinlerinin (özellikle CARMIL3'ün), MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde, IL-1 β ile tetiklenen EMT ile ilişkilendirilebileceği söylenebilir. Ek olarak, elde edilen sonuçlara göre CARMIL proteinleri bir erken metastaz belirteci olma potansiyeli taşımaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Fibronektin veya Matrigel kaplı yüzeylerde yetişen MDA-MB-231 hücrelerinde hem Matrigel hem fibronektin kaplama hücre alanlarını artırmış, polarizasyon değerlerini değiştirmemiştir.
- MDA-MB-231 hücrelerinde iki kaplama yönteminde de vimentin proteininin düzeyi değişmezken, membran bölgesine yığılma oranı artmıştır.
- Matrigel kaplı yüzeyde vinkülin düzeyi azalmış, odak sayısı ise artmıştır. Fibronektin kaplaması ile vinkülin proteininin hem düzeyi hem odak sayısı artmıştır. Vinkülin proteininin membrana yığılma oranı doğrusal olarak artmış, membran bölgesindeki odak sayısı ise bir değişim göstermemiştir.
- Matrigel ya da fibronektin kaplı yüzeylerde yetiştirilen MDA-MB-231 hücrelerinde CARMIL3 ifadesi görece yüksek görülmüştür. CARMIL3 düzeyi kaplamamış yüzeylerde azalmış, odak sayısı ise kaplama ile artmış ve Matrigel’de, fibronektinden daha çok CARMIL3 odağı oluşmuştur. CARMIL1 proteininin düzeyi Matrigel’de artarken, fibronektin yüzeyde değişmemiştir. CARMIL1 odak sayıları ise her iki kaplama yüzeyinde de artış göstermiştir. En az ifade edilen CARMIL2 proteininin ise düzeyinde ve odak sayısında değişim tespit edilmemiştir.
- IL-1 β ile EMT’ye teşvik edilen MCF-7 hücrelerinin buldukları yüzeylerden bağımsız olarak alan değeri artmıştır.
- IL-1 β ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde vinkülin düzeyi kaplanmamış yüzeylerde IL-1 β ile azalma gösterirken, kaplı yüzeylerde IL-1 β ’ya rağmen sabit kalmaktadır. Odak sayıları ise IL-1 β ile artış yönünde değişmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise kaplanmamış yüzeyde IL-1 β ile sabitken, kaplı yüzeyde IL-1 β ile artmıştır. Vinkülin proteininin hem düzeyi hem odaklılığı açısından membrana yığılma oranları IL-1 β ile genel olarak artış yönündedir.

- IL-1 β ile EMT'ye yönlendirilen MCF-7 hücrelerinde kaplanmamış yüzeyde IL-1 β ile CARMIL3 artışı görülürken, Matrigel kaplı yüzeyde IL-1 β bir değişime sebep olmamıştır. CARMIL3 odak sayıları ise kaplamadan bağımsız olarak IL-1 β ile artmıştır. MDA-MB-231 hücrelerinde Matrigel kaplı yüzeyde yüksek düzeyde CARMIL3 odak sayısı artışı ise dikkat çekmektedir. CARMIL3 membran yığılma oranları ise kaplı olmayan yüzeylerde IL-1 β ile azalmakta, odak sayısı hesaplamalarına göre ise artmaktadır.
- Korelasyon analizleri MCF-7 ve MDA-MB231 hücrelerinde Vinkülin ve CARMIL3 proteinlerin düzeyleri ile odak sayılarının pozitif yönlü ilişkisini göstermektedir.
- IL-1 β ile EMT'ye yönlendirilen MCF-7 hücrelerinde Matrigel kaplı yüzlerde, EMT'yi destekler bir şekilde, epitelyal mRNA düzeyleri azalmış, mezenkimal belirteçlerin mRNA düzeyleri ise artmıştır.
- MCF-7 hücrelerinde CARMIL proteinlerinin mRNA düzeyleri kaplanmamış yüzeylerde IL-1 β ile artarken, Matrigel kaplı yüzeylerde IL-1 β ile azalmaktadır. MDA-MB-231 hücrelerinde ise CARMIL genlerinin ifadesi belirgin bir düzeyde değişim göstermemiştir.
- CARMIL ve EMT belirteçlerinin mRNA ifadeleri hücre morfoloji ile örtüşmektedir
- Kanser dokularından yapılacak analizler ile bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar hasta örneklerinde valide edilebilir.
- Metastatik dokularda bulunan CARMIL ifadeleri ile metastatik olmayan dokularda bulunan CARMIL ifadeleri karşılaştırılarak CARMIL proteinlerinin metastaz belirteci olup olmadığı daha iyi anlaşılabilir.
- Protein düzeyleri immünfloresan yanında Western Blot yöntemi ile de doğrulanabilir.
- Aynı deney düzeneği içerisinde hücre migrasyon ve invazyon kapasitelerinin tespitine yönelik deneyler yapılabilir.

- IL-1 β 'nin dışarıdan hazır verilmesi yerine fizyolojik koşullarda en temel kaynağı olan makrofaj hücresi kullanarak bir ko-kültür düzeneği kurulabilir ve kanser mikroçevresinin modellenmesi ile CARMIL düzeyleri ve diğer hücre iskelet dinamikleri incelenebilir.
- In vivo fare tümör modellerinde CARMIL proteinlerinin ve IL-1 β 'nin tümörogeneze etkisi incelenebilir.
- Benzer çalışmalar meme kanseri dışında diğer kanser türlerinde de çalışılabilir.

7. REFERANSLAR

1. Jin L, Yuan RQ, Fuchs A, Yao Y, Joseph A, Schwall R, et al. Expression of interleukin-1beta in human breast carcinoma. *Cancer*. 1997;80(3):421-34.
2. Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, et al. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2006;25(3):387-408.
3. Rebe C, Ghiringhelli F. Interleukin-1beta and Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7).
4. Mendoza-Rodríguez M, Arévalo Romero H, Fuentes-Pananá EM, Ayala-Sumuano J-T, Meza I. IL-1 β induces up-regulation of BIRC3, a gene involved in chemoresistance to doxorubicin in breast cancer cells. *Cancer Letters*. 2017;390:39-44.
5. Li R, Ong SL, Tran LM, Jing Z, Liu B, Park SJ, et al. Chronic IL-1 β -induced inflammation regulates epithelial-to-mesenchymal transition memory phenotypes via epigenetic modifications in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*. 2020;10(1).
6. Stark BC, Lanier MH, Cooper JA. CARMIL family proteins as multidomain regulators of actin-based motility. *Mol Biol Cell*. 2017;28(13):1713-23.
7. Mattiuzzi C, Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *J Epidemiol Glob Health*. 2019;9(4):217-22.
8. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46.
9. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*. 2019;51(1):27-41.
10. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*. 2014;27:16-25.
11. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019;16(3):151-67.
12. Murphy KM, Weaver C. *Janeway's Immunobiology: Tenth International Student Edition with Registration Card*. W. W. Norton, Incorporated; 2022.
13. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.
14. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1).
15. Xiao Z, Singh S, Singh M. Improving cancer immunotherapy by targeting IL-1. *OncoImmunology*. 2021;10(1).
16. Pierce BL, Ballard-Barbash R, Bernstein L, Baumgartner RN, Neuhaus ML, Wener MH, et al. Elevated Biomarkers of Inflammation Are Associated With Reduced Survival Among Breast Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(21):3437-44.
17. Khandia R, Munjal A. Interplay between inflammation and cancer. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2020;119:199-245.
18. Zavadil J, Böttinger EP. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*. 2005;24(37):5764-74.

19. Soria G, Ofri-Shahak M, Haas I, Yaal-Hahoshen N, Leider-Trejo L, Leibovich-Rivkin T, et al. Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF α & IL-1 β with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2011;11:130.
20. Biran H, Friedman N, Neumann L, Pras M, Shainkin-Kestenbaum R. Serum amyloid A (SAA) variations in patients with cancer: correlation with disease activity, stage, primary site, and prognosis. *Journal of Clinical Pathology*. 1986;39(7):794-7.
21. Chattopadhyay I, Ambati R, Gundamaraju R. Exploring the Crosstalk between Inflammation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. *Mediators of Inflammation*. 2021;2021:1-13.
22. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(4):232-41.
23. Zhang H, Sun S-C. NF- κ B in inflammation and renal diseases. *Cell & Bioscience*. 2015;5(1).
24. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2.
25. Kaneko N, Kurata M, Yamamoto T, Morikawa S, Masumoto J. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflammation and Regeneration*. 2019;39(1).
26. Franco-Barraza J, Valdivia-Silva JE, Zamudio-Meza H, Castillo A, Garcia-Zepeda EA, Benitez-Bribiesca L, et al. Actin cytoskeleton participation in the onset of IL-1 β induction of an invasive mesenchymal-like phenotype in epithelial MCF-7 cells. *Arch Med Res*. 2010;41(3):170-81.
27. Shi H, Zhang J, Han X, Li H, Xie M, Sun Y, et al. Recruited monocytic myeloid-derived suppressor cells promote the arrest of tumor cells in the premetastatic niche through an IL-1 β -mediated increase in E-selectin expression. *Int J Cancer*. 2017;140(6):1370-83.
28. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta—A Friend or Foe in Malignancies? *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(8):2155.
29. Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, Rustgi AK. EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis. *Trends in Cell Biology*. 2020;30(10):764-76.
30. Seetharaman S, Etienne-Manneville S. Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends in Cell Biology*. 2020;30(9):720-35.
31. Ortega-Carrion A, Feo-Lucas L, Vicente-Manzanares M. Cell Migration. In: Bradshaw RA, Stahl PD, editors. *Encyclopedia of Cell Biology*. Waltham: Academic Press; 2016. p. 720-30.
32. Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *J Cell Biochem*. 2019;120(3):2782-90.
33. L. S. The extracellular matrix? you don't say! . [Internet] Myopain Seminars 2022 [cited 2023Feb12] Available from: <https://www.myopainseminars.com/the-extracellular-matrix-you-dont-say/> 2022.
34. Svitkina T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2018;10(1):a018267.
35. Biber G, Ben-Shmuel A, Sabag B, Barda-Saad M. Chapter Three - Actin regulators in cancer progression and metastases: From structure and function to cytoskeletal dynamics. In: Thomas C, Galluzzi L, editors. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 356: Academic Press; 2020. p. 131-96.

36. Seong J, Wang N, Wang Y. Mechanotransduction at focal adhesions: from physiology to cancer development. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2013;17(5):597-604.
37. Hoffmann M, Schwarz US. A kinetic model for RNA-interference of focal adhesions. *BMC Systems Biology*. 2013;7(1):2.
38. Janiszewska M, Primi MC, Izard T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;295(8):2495-505.
39. Schnell U, Cirulli V, Giepmans BN. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(8):1989-2001.
40. Trepap X, Chen Z, Jacobson K. Cell Migration. *Comprehensive Physiology*. 2012.
41. De Pascalis C, Etienne-Manneville S. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Molecular Biology of the Cell*. 2017;28(14):1833-46.
42. What steps are involved in Lamellipodia assembly? mechanobiology institute: National University of Singapore.; [updated 2018 cited 2022 15.01.22]. Available from: <https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-are-lamellipodia-and-lamella/what-steps-are-involved-in-lamellipodia-assembly/>.
43. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular Oncology*. 2017;11(7):805-23.
44. M, Ruby, Rebecca, Jean. EMT: 2016. *Cell*. 2016;166(1):21-45.
45. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019;20(2):69-84.
46. Demirkan B. The Roles of Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) and Mesenchymal-to-Epithelial Transition (MET) in Breast Cancer Bone Metastasis: Potential Targets for Prevention and Treatment. *Journal of Clinical Medicine*. 2013;2(4):264-82.
47. Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garg VK, Goel N, Koundal D, et al. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *BioMed Research International*. 2022;2022:1-16.
48. Wawruszak A, Halasa M, Okon E, Kukula-Koch W, Stepulak A. Valproic Acid and Breast Cancer: State of the Art in 2021. *Cancers*. 2021;13(14):3409.
49. Wu Y, Sarkissyan M, Vadgama J. Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *Journal of Clinical Medicine*. 2016;5(2):13.
50. Bill R, Christofori G. The relevance of EMT in breast cancer metastasis: Correlation or causality? *FEBS Letters*. 2015;589(14):1577-87.
51. Fedele M, Cerchia L, Chiappetta G. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer: Focus on Basal-Like Carcinomas. *Cancers*. 2017;9(12):134.
52. Felipe Lima J, Nofech-Mozes S, Bayani J, Bartlett J. EMT in Breast Carcinoma—A Review. *Journal of Clinical Medicine*. 2016;5(7):65.
53. Ansieau S. EMT in breast cancer stem cell generation. *Cancer Letters*. 2013;338(1):63-8.
54. Lee CH, Chang JS, Syu SH, Wong TS, Chan JY, Tang YC, et al. IL-1beta promotes malignant transformation and tumor aggressiveness in oral cancer. *J Cell Physiol*. 2015;230(4):875-84.

55. Li Y, Wang L, Pappan L, Galliher-Beckley A, Shi J. IL-1 β promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation. *Molecular Cancer*. 2012;11(1):87.
56. Perez-Yepe EA, Ayala-Summano J-T, Lezama R, Meza I. A novel β -catenin signaling pathway activated by IL-1 β leads to the onset of epithelial–mesenchymal transition in breast cancer cells. *Cancer Letters*. 2014;354(1):164-71.
57. Yang C, Pring M, Wear MA, Huang M, Cooper JA, Svitkina TM, et al. Mammalian CARMIL inhibits actin filament capping by capping protein. *Dev Cell*. 2005;9(2):209-21.
58. Pontén F, Jirstrom K, Uhlen M. The Human Protein Atlas—a tool for pathology. *The Journal of Pathology*. 2008;216(4):387-93.
59. Wang Q, Notay K, Downey GP, McCulloch CA. The Leucine-Rich Repeat Region of CARMIL1 Regulates IL-1-Mediated ERK Activation, MMP Expression, and Collagen Degradation. *Cell Reports*. 2020;31(13):107781.
60. Fujiwara I, Remmert K, Piszczek G, Hammer JA. Capping protein regulatory cycle driven by CARMIL and V-1 may promote actin network assembly at protruding edges. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(19):E1970-E9.
61. Wang H, Wang C, Peng G, Yu D, Cui X-G, Sun Y-H, et al. Capping Protein Regulator and Myosin 1 Linker 3 Is Required for Tumor Metastasis. *Molecular Cancer Research*. 2020;18(2):240-52.
62. Horzum U, Ozdil B, Pesen-Okvur D. Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions. *MethodsX*. 2014;1:56-9.
63. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology*. 2005;15(5):378-86.
64. Zhao X, Jain S, Benjamin Larman H, Gonzalez S, Irvine DJ. Directed cell migration via chemoattractants released from degradable microspheres. *Biomaterials*. 2005;26(24):5048-63.
65. Wang F. The Signaling Mechanisms Underlying Cell Polarity and Chemotaxis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2009;1(4):a002980-a.
66. Mathieu PS, Lobo EG. Cytoskeletal and Focal Adhesion Influences on Mesenchymal Stem Cell Shape, Mechanical Properties, and Differentiation Down Osteogenic, Adipogenic, and Chondrogenic Pathways. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2012;18(6):436-44.
67. Aisenbrey EA, Murphy WL. Synthetic alternatives to Matrigel. *Nature Reviews Materials*. 2020;5(7):539-51.
68. Liu C-Y, Lin H-H, Tang M-J, Wang Y-K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*. 2015;6(18):15966-83.
69. Yang C, Pring M, Wear MA, Huang M, Cooper JA, Svitkina TM, et al. Mammalian CARMIL Inhibits Actin Filament Capping by Capping Protein. *Developmental Cell*. 2005;9(2):209-21.
70. Pollard TD. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(8).
71. Noël A, De Pauw-Gillet MC, Purnell G, Nusgens B, Lapiere CM, Foidart JM. Enhancement of tumorigenicity of human breast adenocarcinoma cells in nude mice by matrigel and fibroblasts. *British Journal of Cancer*. 1993;68(5):909-15.

72. Engbring JA, Kleinman HK. The basement membrane matrix in malignancy. *The Journal of Pathology*. 2003;200(4):465-70.
73. Baker KJ, Houston A, Brint E. IL-1 Family Members in Cancer; Two Sides to Every Story. *Front Immunol*. 2019;10:1197.
74. Jiménez-Garduño AM, Mendoza-Rodríguez MG, Urrutia-Cabrera D, Domínguez-Robles MC, Pérez-Yépez EA, Ayala-Sumuano JT, et al. IL-1 β induced methylation of the estrogen receptor ER α gene correlates with EMT and chemoresistance in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;490(3):780-5.
75. Mark, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell*. 2012;150(1):12-27.

8. Ekler

EK 1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu

MEME KANSERİNDE, IL-1β İLE TETİKLENEN EPİTELYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜMDE HÜCRE İSKELETİ DİNAMİKLERİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

%7	%6	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
İBİNCİ SAYFALAR			
1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%2	
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1	
3	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	%1	
4	www.turkimmunoloji.org.tr İnternet Kaynağı	<%1	
5	"Encyclopedia of Signaling Molecules", Springer Nature, 2018 Yayın	<%1	
6	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1	
7	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1	
8	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<%1	
9	stax.strath.ac.uk İnternet Kaynağı	<%1	
10	www.hasekidergisi.com İnternet Kaynağı	<%1	
11	zh.b-ok2.org İnternet Kaynağı	<%1	
12	turkiyeklinikleri.com İnternet Kaynağı	<%1	
13	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1	
14	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1	
15	jlb.onlinelibrary.wiley.com İnternet Kaynağı	<%1	
16	Rekha Khandia, Ashok Munjal. "Interplay between inflammation and cancer", Elsevier BV, 2020 Yayın	<%1	

EK 2. Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Hatice Toprak Doğramacı
Ödev başlığı: MEME KANSERİNDE, IL-1 β İLE TETİKLENEN EPİTELYAL MEZEN...
Gönderi Başlığı: MEME KANSERİNDE, IL-1 β İLE TETİKLENEN EPİTELYAL MEZEN...
Dosya adı: tez.pdf
Dosya boyutu: 2.94M
Sayfa sayısı: 96
Kelime sayısı: 18,663
Karakter sayısı: 121,730
Gönderim Tarihi: 06-Mar-2023 02:21 ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2030174402



EK 3. Tez Verilerini İçeren Bilimsel Toplantılar ve Projeler

Poster sunumu: “Cytoskeletal Dynamics in IL-1 β -induced Epithelial-Mesenchymal-Transition in Breast Cancer Cells”. 5. Uluslararası Moleküler İmmunoloji ve İmmunogenetik Kongresi (MIMIC-V), İzmir, P-80

9. ÖZGEÇMİŞ