T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

N-MYC DOWNSTREAM REGULATED GENE-2 EKSPRESYONUNUN TİROİD KANSERİNDE EPİTELYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜM ÜZERİNE ETKİSİ

Murat SİPAHİ
0000-0001-9616-6686

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

İZMİR
TEMMUZ 2021

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970004

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

N-MYC DOWNSTREAM REGULATED GENE-2 EKSPRESYONUNUN TİROİD KANSERİNDE EPİTELYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜM ÜZERİNE ETKİSİ

Murat SİPAHİ
0000-0001-9616-6686

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
Biyokimya Doktora Programı
DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Gülgün OKTAY
0000-0002-0481-6029

Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 2018.KB.SAG.069 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR
TEMMUZ 2021

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "N-MYC DOWNSTREAM REGULATED GENE-2 EKSPRESYONUNUN TİROİD KANSERİNDE EPİTELYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜM ÜZERİNE ETKİSİ" başlıklı doktora tezimde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri, akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Murat SİPAHİ

08/06/2021

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamım planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılması aşamalarında beni daima destekleyen, doktorayı bırakmaya karar verip geri döndüğüm zamanda dahi bana olan güvenini, inancını ve şefkatini hiç esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Gülgün OKTAY'a,

Tez izleme tarihleri dışında da toplanarak tezimin gelişimine bilimsel katkılarını hiç esirgemeyen doktora tez izleme komitesi üyeleri sayın hocalarım Prof. Dr. Pınar AKAN ve Doç. Dr. Zeynep YÜCE'ye,

Laboratuvara ilk adım attığım günden bu yana sadece bilgi birikimini değil aynı zamanda pratik zekâsını, azmini ve çalışkanlığını örnek aldığım yol arkadaşım ve can dostum Doktor Öğretim Üyesi Didem KELEŞ BARTIK'a,

Bu zor yolda her zaman bana destek olan ve dostluğunu esirgemeyen sevgili dostum Şeniz İnanç SÜRER'e,

Yol ve yolculuk arkadaşım Belgin SERT SERDAR'a,

Tezimin transformasyon aşamasındaki yardımlarından dolayı Hande EFE'ye,

Laboratuvardaki her türlü sorunumuzla ilgilenen sevgili Emin ÇAVUŞLU başta olmak üzere Teknik Hizmetler ekibine,

Tez ve diğer tüm evraklarımın takibinde büyük duyarlılık gösteren, güler yüzlü anabilim dalı sekreterimiz sevgili Eda Nesrin OLUM'a ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri'ne,

Bu süreçte her türlü laboratuvar imkanını sağlayan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'na ve İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü'ne,

Sırtımı her zaman yaslayabildiğim can dostum Önder KARADAŞ'a

Bana kitap okuma alışkanlığını aşılayan, santranç ile analitik düşünmenin önemini gösteren; zekâsına, bilgi birikimine, kültürüne hep saygı duyduğum ağabeyim Can SİPAHİ'ye,

Bu zorlu yolculukta bana her zaman destek olan, motivasyonumu artıran ve hayatımda olmalarından büyük şans duyduğum değerli kuzenlerim, Tuba SALCIOĞLU İNAY, Ünal İNAY, Zeki SALCIOĞLU ve Gönül ERSOY SALCIOĞLU'na,

Aşıladıkları şefkat ve güzel ahlakla hayatımın her döneminde yanımda olduklarını hissettiğim annem Nazife SİPAHİ ve babam Fadıl SİPAHİ başta olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Son olarak bu tezi yaşadığım büyük kayıpların ve kafa karışıklarının sırasında tanıştığım, gerçeklik yolculuğunda elimden tutan ve benimle yürüyen Doç. Dr. Gamze AKYÜZ'e ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... İ

TABLOLAR DİZİNİ ..... Vİ

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... Vİİ

KISALTMALAR ..... Xİ

ÖZET XV

ABSTRACT ..... XVİİ

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1 Tiroid Bezi 3

2.2 Tiroid Kanseri 4

2.2.1 Tiroid Kanserinde Sınıflandırma ve Evreleme 5

2.2.1.1 Papiller Tiroid Kanseri 7

2.2.1.2 Folliküler Tiroid Kanseri 9

2.2.1.3 Hürthle Hücreli Karsinom 9

2.2.1.4 Kötü Diferansiye Tiroid Kanseri 11

2.2.1.5 Anaplastik Tiroid Kanseri (indiferansiye tiroid kanser) 11

2.2.1.6 Nöroendokrin C hücresi kaynaklı tiroid kanseri 13

2.2.2 Etiyoloji 14

2.2.3 Epidemiyoloji 15

2.2.4 Tanı 15

2.2.5 Prognoz 16

2.3 Tiroid Kanserindeki Genetik Değişimlere Genel Bir Bakış 16

2.3.1 RET Proto-Onkogeni 17

2.3.2 RAS Mutasyonları 18

2.3.3 BRAF Mutasyonları 19

2.3.4 Paired Box Gene 8/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Yeniden Düzenlenmesi 21

2.4 N-Myc Donwstream Regulated Gene-2 21

2.4.1 NDRG2 ve Kanser 22

2.5 Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm 26

2.5.1 Epitelyal ve Mezenkimal Fenotipler 26

2.5.2 EMD'nin Transkripsiyonel Regülasyonu 29

2.5.2.1 Snail süper ailesi 29

2.5.2.2 Zing finger E-box binding (ZEB) proteinleri 30

2.5.2.3 Twist proteinleri 30

2.5.2.4 Kruppel-benzeri faktör (KLF) proteinleri 31

2.5.3 Hücresel Proteinler 31

2.5.3.1 Vimentin 31

2.5.3.2 Kaderin Ailesi 31

2.5.3.2.1 E-kaderin: Derinlemesine Bakış 32

2.5.3.4 Diğer hücresel proteinler 36

2.5.4 EMD'nin Sınıflandırılması 37

2.5.4.1 Birincil/ Tip 1 EMD: Implantasyon, embriyogenez ve organogenezde EMD 37

2.5.4.2 İkincil/ Tip 2 EMD: Yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu ve organ gelişiminde EMD 38

2.5.4.3 Üçüncül/ Tip 3 EMD 38

2.5.5 EMD'nin Metastatik Süreçteki Önemi 39

2.5.6 Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (DTH) ve EMD 42

2.5.7 Klinik Açıdan EMD 43

2.6 Tiroid Kanserinde EMD 44

3. GEREÇ VE YÖNTEM 46

3.1 Araştırmanın Tipi 46

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı 46

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları 46

3.4. Çalışma Materyali 46

3.5. Araştırmanın Değişkenleri 46

3.6. Veri Toplama Araçları 47

3.6.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler 47

3.6.2. Yöntemler 52

3.6.2.1. Hücre Kültürü 52

3.6.2.1.1 Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi 53

3.6.2.1.2 Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi 54

3.6.2.1.3 Hücrelerin Kültür Ortamlarının Değiştirilmesi 54

3.6.2.1.4 Hücrelerin Pasajlanması 54

3.6.2.1.5 Hücrelerin Dondurulması 55

3.6.2.1.6 Hücrelerin Sayılması 56

3.6.2.2 Plazmid DNA Transfeksiyonu ile NDRG2'nin Overekspresyonu 56

3.6.2.2.2 Plazmid Transformasyonu 56

3.6.2.2.2 Koloni PCR ile Uygun Kolonilerin Seçimi 58

3.6.2.2.3 Kolonilerin Küçük ve Büyük Hacimli Üretimi 59

3.6.2.2.4 Plazmid DNA'nın İzolasyonu 59

3.6.2.2.5 Plazmid DNA'nın Transfeksiyonu 60

3.6.2.2.4 Hücre Canlılık Tayini 62

3.6.2.3 siRNA Transfeksiyonu ile NDRG2'nin Susturumu 63

3.6.2.4 Real Time PCR 65

3.6.2.4.1 Total RNA İzolasyonu 65

3.6.2.4.2 Komplementer DNA Sentezi 67

3.6.2.4.3 Real Time PCR 68

3.6.2.4.4 pCMV6-AC-GFP Plazmidinin Bütünlüğünün Doğrulanması 72

3.6.2.5 Western Blot 73

3.6.2.5.1 Hücre Lizizi 73

3.6.2.5.2 Protein Tayini 74

3.6.2.5.3 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) 75

3.6.2.5.4 Proteinlerin PVDF Membrana Transferi 77

3.6.2.5.5 Bloklama, Antikor Muamelesi ve Kemilüminesan Görüntüleme 77

3.6.2.6 Matrijel İnvazyonu ve Hücre Migrasyonu 79

3.6.2.7 Yara İyilşemesi Lateral Migrasyon Denemesi 81

3.6.2.8 Hücre Adezyon Denemesi 81

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi 84

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi 86

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları 86

3.10 Etik Kurul Onayı 86

4. BULGULAR 87

4.1 Koloni PCR ile Transformasyonun, PCR Primerlerin ile Yalnızca Hedef Bölgelerin Çoğaltıldığının ve pCMV-AC-GFP Plazmidinin Bütünlüğünün Doğrulanması..... 87

4.2 Plazmid DNA Transfeksiyonu ile 8505C, BCPAP ve FTC-133 Hücrelerinde NDRG2'nin Overekspresyonu 89

4.2.1 8505C Hücrelerinde NDRG2 pDNA Transfeksiyonu Sonrası Hedef Gen ve Protein Ekspresyon Düzeyleri ile Metastatik Hücre Davranışının İncelenmesi 89

4.2.2 BCPAP Hücrelerinde NDRG2 pDNA Transfeksiyonu Sonrası Hedef Gen ve Protein Ekspresyon Düzeyleri ile Metastatik Hücre Davranışının İncelenmesi 96

4.2.3 FTC-133 Hücrelerinde NDRG2 pDNA Transfeksiyonu Sonrası Hedef Gen ve Protein Ekspresyon Düzeyleri ile Metastatik Hücre Davranışının İncelenmesi 103

4.3 siRNA Transfeksiyonu ile FTC-133 Hücrelerinde NDRG2 Ekspresyonunun Baskılanması Sonrası Hedef Gen ve Protein Ekspresyon Düzeyleri ile Metastatik Hücre Davranışının İncelenmesi 112

5. TARTIŞMA 118

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 126

KAYNAKLAR 128

KATKI 153

EKLER 154

EK-1: Etik Kurul Belgesi..... 154

EK-2: Özgeçmiş 157

EK-3: Tezden Türetilmiş Yayın ve Bildiriler 161

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Tiroid kanserinde TNM evrelendirme sistemi 6
Tablo 2. Papiller ve Folliküler Tiroid Kanseri ile Hürthle Hücreli Kanser için Evreleme 10
Tablo 3. Anaplastik Tiroid Kanseri için Evreleme 12
Tablo 4. Medüller tiroid kanseri için evreleme 14
Tablo 5. Farklı kanser tiplerindeki NDRG2 düzeyleri ile patolojik ve klinik önemler 23
Tablo 6. Araştırmada kullanılan malzeme ve kitlerin markaları ile kod numaraları. 47
Tablo 7. Araştırmada kullanılan cihazların markaları ve model/kod numaraları 51
Tablo 8. Araştırmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri 53
Tablo 9. RT-PCR için LC480 cihazında uygulanan ısı profili 59
Tablo 10. Hücre hatları ve deneylere ilişkin hücre sayıları, Lipofectamin 3000^{TM} ve p3000^{TM} ile plazmid DNA miktarları. 61
Tablo 11. RT-PCR'de kullanılan forward ve reverse primer sekansları ile çoğalttıkları bölgelerin baz çifti cinsinden boyutları 70
Tablo 12. PCR ve RT-PCR için reaksiyon karışımı 70
Tablo 13. PCR ve RT-PCR için Thermal cycler cihazında uygulanan ısı profili 71
Tablo 14. pCMV6-AC-GFP plazmidinin sekans primerleri ile çoğaltılmasına ilişkin PCR ısı profili 73
Tablo 15. RIPA tamponunda kullanılan çözeltiler ve özellikleri 74
Tablo 16. RIPA tamponunda kullanılan proteaz inhibitörleri ve özellikleri 74
Tablo 17. SDS-Poliakrilmaid jellerin hazırlanması 76
Tablo 18. Western Blot tekniğinde kullanılan çözeltiler 79
Tablo 19. Araştırma planı ve takvimi 85
Tablo 20. Seçili kolonilerden gerçekleştirilen RT-PCR sonrası C_T değerleri 87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Tiroid bezi (2) 3
Şekil 2. Tiroid bezinin histolojisi (5) 4
Şekil 3. Tiroid kanserinde sınıflandırma 5
Şekil 4. Yabanıl tip RET genine ait şematik temsil. Füzyon için meydana gelen kırılma noktaları oklarla gösterilmiştir. RET geni ile füzyonun meydana geldiği genlerin adları ile kromozomal lokasyonlar parantez içinde gösterilmiştir. ES, ekstrasellüler domain; TM, transmembran domaini; TK, RET'in tirozin kinaz domaini. CC: coiled-coil dimerizasyon domiani, C18 ve C39: dimerizasyon sırasında disülfid bağlarını oluşturan sistin kalıntıları. 18
Şekil 5. RAS-RAF-MEK-ERK yolu (106). 20
Şekil 6. Epitelyal (solda) ve mezenkimal (sağda) hücreler (171). 27
Şekil 7. ZEB protein ailesi (194) 30
Şekil 8. Tam boy E-kaderin ve kesim domainleri. ES: ekstrasellüler domain, TM: transmembran domaini, SD: sitoplazmik domain. 33
Şekil 9. Metastatik yayılımda EMD'nin rolü 40
Şekil 10. siRNA'nın genel yapısı (331) 63
Şekil 11. siRNA'nın çalışma mekanizması (332) 64
Şekil 12. SYBR green ve Taqman problarının çalışma prensibi 68
Şekil 13. FTC-133 hücrelerinde yola çıkılarak gerçekleştirilen konvansiyonel PCR sonrası agaroz jel görüntüsü. NDRG2 (94 bç), Slug (SNAI2) (62 bç), Snail (SNAI1) (120 bç), Twist1 (124 bç), Vimentin (204 bç) ve **α**-aktinin (ACTN1) (275 bç). 88
Şekil 14. VP1.5 ve XL6 sekans primerleri kullanılarak pCMV-AC-GFP plazmidinde çoğaltılan plazmid bölgesinin agaroz jel görüntüsü 88
Şekil 15. NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası 8505C hücrelerindeki NDRG2 mRNA ekspresyon düzeyi (n=3) *İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: $p \leq 0,05$ 89
Şekil 16. NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası 8505C hücrelerindeki NDRG2 protein ekspresyon düzeyine ait **a)** Western blot görüntüsü, **b)** Dansitometrik analizi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: ****$p<0,0001$ 90
Şekil 17. 8505C hücrelerinde NDRG2 pDNA transfeksiyonu sonrası, **a)** Snail (SNAI1), **b)** Slug (SNAI2), **c)** Twist1, **d)** Vimentin, **e)** E-kaderin (CDH-1) ve **f)** N-

kaderin (CDH-2) mRNA düzeyleri (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: *p≤0,05, **p<0,01 91
Şekil 18. NDRG2 overekspresyonunun 8505C hücrelerinde hedef protein ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. **a)** Snail, **b)** Slug ve **c)** Twist1 protein ekspresyon düzeylerine ilişkin western blot görüntüleri ile dansitometrik analizleri (n=3)..... 92
Şekil 19. 8505C hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonunun **a)** %invazyon, **b)** %migrasyon yetenekleri üzerine etkisi (n=3). 94
Şekil 20. 8505C hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonunun lateral hücre motilitesi üzerindeki etkisine ait a) mikroskobi görüntüleri ve b) % motilite indeksi (n=5). 95
Şekil 21. 8505C hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası adezyon yetenekleri üzerine etkisine ilişkin **a)** mikroskobi görüntüleri, **b)** bar grafikleri (n=3). 96
Şekil 22. NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası BCPAP hücrelerindeki NDRG2 mRNA ekspresyon düzeyi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: * p≤0,05 ... 96
Şekil 23. NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası BCPAP hücrelerindeki NDRG2 protein ekspresyon düzeyine ait **a)** Western blot görüntüsü, **b)** Dansitometrik analizi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: *p≤0,05 97
Şekil 24. BCPAP hücrelerinde NDRG2 pDNA transfeksiyonu sonrası, **a)** Snail (SNAI1), **b)** Slug (SNAI2), **c)** Twist1, **d)** Vimentin, **e)** E-kaderin (CDH-1) ve **f)** N-kaderin (CDH-2) mRNA düzeyleri (n=3). 98
Şekil 25. NDRG2 overekspresyonunun BCPAP hücrelerindeki hedef protein ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. **a)** Snail, **b)** Slug, **c)** Twist1 ve **d)** Vimentin protein ekspresyon düzeylerine ilişkin western blot görüntüleri ile dansitometrik analizleri (n=3). 99
Şekil 26. BCPAP hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonunun **a)** %invazyon, **b)** %migrasyon yetenekleri üzerine etkisi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: *p≤0,05, **p<0,001 101
Şekil 27. BCPAP hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonunun lateral hücre motilitesi üzerindeki etkisine ait **a)** mikroskobi görüntüleri ve **b)** % motilite indeksi (n=5). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: * p≤0,05 102

Şekil 28. BCPAP hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası adezyon yetenekleri üzerine etkisine ilişkin a) mikroskobi görüntüleri, b) bar grafikleri (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: * p≤0,05 103
Şekil 29. a) 24 ve **b)** 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda pDNA ile transfekte edilen FTC-133 hücrelerindeki canlılığın % kontrol cinsinden ifadesi. 104
Şekil 30. Farklı konsantrasyonlarda NDRG2 pDNA ile **a)** 24 saat ve **b)** 48 saat transfekte edilen FTC-133 hücrelerinde NDRG2+GFP protein ekspresyonuna ait western blot membran görüntüleri. 105
Şekil 31. NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücrelerindeki NDRG2 mRNA ekspresyon düzeyi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: ****p<0,0001 105
Şekil 32. NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücrelerindeki NDRG2 protein ekspresyon düzeyine ait **a)** Western blot görüntüsü, **b)** Dansitometrik analizi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: *p≤0,05 106
Şekil 33. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 pDNA transfeksiyonu sonrası, **a)** Snail (SNAI1), **b)** Slug (SNAI2), **c)** Twist1, **d)** Vimentin, **e)** E-kaderin (CDH-1) ve **f)** N-kaderin (CDH-2) mRNA düzeyleri (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: ** p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001 107
Şekil 34. NDRG2 overekspresyonunun FTC-133 hücrelerinde hedef protein ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. **a)** Snail, **b)** Slug, **c)** Twist1 ve **d)** Vimentin protein ekspresyon düzeylerine ilişkin western blot görüntüleri ile dansitometrik analizleri (n=3). 108
Şekil 35. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonunun **a)** % invazyon, **b)** % migrasyon yetenekleri üzerine etkisi (n=3). 110
Şekil 36. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonunun lateral hücre motilitesi üzerindeki etkisine ait a) mikroskobi görüntüleri ve b) % motilite indeksi (n=4). İstatistiksel olarak anlamlılık: *p≤0,05, **p<0,01 111
Şekil 37. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası adezyon yetenekleri üzerine etkisine ilişkin **a)** mikroskobi görüntüleri, **b)** bar grafikleri (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık: **p≤0,05* 112

Şekil 38. FTC-133 hücrelerinin 100 nM NDRG2 siRNA ile transfeksiyonu sonrası NDRG2 mRNA ekspresyon düzeyleri (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık: **p≤0,01 112
Şekil 39. NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücrelerindeki NDRG2 protein ekspresyon düzeylerine ait **a)** Western blot görüntüsü, **b)** Dansitometrik analizi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık: *p≤0,05 113
Şekil 40. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası, **a)** Snail (SNAI1), **b)** Slug (SNAI2), **c)** Twist1, **d)** Vimentin, **e)** E-kaderin (CDH-1) ve **f)** N-kaderin (CDH-2) mRNA düzeyleri (n=3). 114
Şekil 41. NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücrelerindeki **a)** Snail ve **b)** sE-kaderin (n=3) ile **c)** Vimentin (n=2) protein ekspresyon düzeylerine ait western blot görüntüsü ve dansitometrik analizi. 115
Şekil 42. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 siRNA transfeksiyonunun **a)** % invazyon, **b)** % migrasyon yetenekleri üzerine etkisi (n=3). 115
Şekil 43. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 siRNA transfeksiyonunun lateral hücre motilitesi üzerindeki etkisine ait **a)** mikroskobi görüntüleri ve **b)** % motilite indeksi (n=4). 116
Şekil 44. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası adezyon yetenekleri üzerine etkisine ilişkin a) mikroskobi görüntüleri, b) bar grafikleri (n=3). 117
Şekil 45. Western blot deneylerinde E-kaderin ekspresyonunun deteksiyonu kullanılan kullanılan primer antikorun epitopu. 120

KISALTMALAR

EMD: Epitelyal mezemkimal dönüşüm

NDRG2: N-myc Downstream Regulated Gene 2

RT-PCR: Real-Time Polymerase Chain Reaction

miRNA: Micro RNA

NDRG: N-myc Downstream Regulated Gene

siRNA: Small interfering RNA

E-kaderin: Epitelyal-kaderin

T4: Tiroksin

T3: Triiyodotironin

DTK: Diferansiye tiroid kanseri

TSH: Tiroid stimule edici hormon

SEER: Epidemiology and End Results

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AJCC: Amerikan Ortak Kanser Komitesi

UICC: Uluslararası Kanser Kontrol Birliği

T: Birincil tümör

N: Bölgesel lenf düğümleri

M: Uzak metastaz

FNA: İnce iğne aspirasyonu

PTK: Papiller tiroid kanseri

RAI: Radyoiyodine

FTK: Folliküler tiroid kanseri

HCC: Hürthle hücreli karsinomun

EBRT: Eksternal beam radyoterapisi

İDTK: İyi diferansiye tiroid kanserleri

ATK: Anaplastik tiroid kanseri

KDTK: Kötü diferansiye tiroid karsinomu

MTK: Medüller tiroid kanseri

MEN2: Çoklu endokrin neoplazi tip 2

RET: Rearranged during transfection

PC-MRI: Faz kontrastlı manyetik rezonans görüntülemesi (PC-MRI)

KEA: Karsinoembriyonik antijen

PET: Pozitron emisyon tomografisi

GDNF: Glial hücre kökenli nörotrofik faktör

GTP: Guanozin trifosfat

GDP: Guanizin difosfat

MAPK: Mitojen ile aktive edilen protein kinazlar

PI3K: Fosfoinositid-3 kinaz

GAP: GTPaz Aktive eden Proteinler

GEF: Guanin Nükleotid Değişim Faktörleri

ERK: Ekstrasellüler sinyalle düzenlenen kinaz

PAX8/PPARγ: Paired Box Gene 8/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma

NDRG: N-Myc Donwstream Regulated Gene (

AFP: Alfa fetal protein

ESM: Ekstrasellüler matriks

BM: Bazal membran

SNAI1: Snail

SNAI2: Slug

SNAI3: Smug

DBD: DNA'ya bağlanma domaini

NES: Nuclear export signal

CDH1: E-cadherin

PRC2: Polycomb Repressive Complex 2

TCF2: Transkripsiyon faktör 2

N-kaderin: Nöranal-kaderin

ZEB: Zinc finger E homeobox-binding

CtBP: C-terminal bağlayıcı protein

HD: Homeodomain

βHLH: beta helix-loop-helix

α-SMA: α-düz kas aktin

KLF: Kruppel-benzeri faktör

DCHS: FAT/dash sous

sE-kad: Solubl E-kaderin (

E-kad/CTF-1: E-kaderin C-terminal fragmanı-1

E-kad/CTF-2: E-kaderin C-terminal fragmanı-2

E-kad/CTF-3: E-kaderin C-terminal fragmanı-3

MMP-2: Matriks metalloproteinaz-2

MMP-9: Matriks metalloproteinaz-9

MT1-MMP: Membran tip 1 MMP

RTK: Reseptör tirozin kinaz

MED: Mezankimal epitelyal dönüşüm

TGF-β: Transforming growth faktör-β

IL-1: İnterlökin-1

TF: Transkripsiyon faktörü

TBH: Tümör başlatıcı hücrelerdir

KKH: Kanser kök hücreler

MKKH: Metastatik KKH'ler

FLIP: Flice inhibitör protein

TEM: Transendotelyal migrasyon

uPA: Ürokinaz tip plazminojenaktivatör

EGFR: Epidermal growth factor receptor

ICAM1: İntrasellüler adezyon molekülüne

ABC: ATP bağlayıcı kaset

Sox9: SRY-box 9

in vitro: Hücre kültürü

ECACC: European Collection of Authenticated Cell Cultures

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

FBS: FETAL DANA SERUM

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

DMSO: Dimetilsülfoksit

E.Coli: Escherichia coli

S.O.C: Super Optimal Broth with Catabolites Repression

LB: Lysogeny broth

BCA: Biçinkoninik Asit

BSA: Sığır serum albümin

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

MOPS: 3-(N-morpholino) propansülfonik asit

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

TEMED: Tetrametiletilendiamin

APS: Amonyumpersülfat

NaCl: Sodyum Klorür

$CaCl_2$: Kalsiyum Klorür

NP-40: Nonidet p40

NaF: Sodyum Florür

PVDF: Poliviniliden Florür

DAPI: 4′,6-diamidino-2-phenylindole

RPM: round per minute

WST-1: (4-[3-(4- iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat

RNAi: RNA interferans

Lnc RNA: Long non coding RNA

ds-RNA: Çift zincir RNA

RISC: RNA-uyarımlı susturum kompleksininin

rDNaz: Rekombinant DNaz

RT: Reverse transkriptaz (

dNTP: Deoksinükleosid trifosfat

MMLV: Moloney Murine Leukemia Virus

C_T: Cycle threshold

Bç: Baz çifti

SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi

TBS-T: Tris Buffer Saline-Tween 20

N-MYC DOWNSTREAM REGULATED GENE-2 EKSPRESYONUNUN TİROİD KANSERİNDE EPİTELYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜM ÜZERİNE ETKİSİ

Doktora Tezi

Murat SİPAHİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÖZET

Tiroid kanseri en sık görülen endokrin sistem kanseridir. Epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMD), epitelyal hücrelerdeki epitelyal özelliklerin kaybını/mezenkimal özelliklerin kazanımını içeren bir süreçtir. EMD diğer epitel kökenli kanserlerde olduğu gibi tiroid kanserinde başlangıç ve ilerleyiş için önemli ve gerekli aşamalardan biridir. N-myc Downstream Regulated Gene (NDRG) protein ailesinin üyelerinden olan N-myc Downstream Regulated Gene-2 (NDRG2) hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve gelişiminde rol oynar. Araştırmalar, NDRG2'nin tümör baskılayıcı fonksiyon ile diferansiyasyonu indükleyici rolünün olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın amacı NDRG2 ekspresyonunun, tiroid kanserinde EMD üzerindeki etkilerinin incelenmesidir.

Bu amaçla 8505C, BCPAP ve FTC-133 hücreleri NDRG2 plazmid DNA, FTC-133 hücreleri NDRG2 siRNA ile 48 saat transfekte edildi. Transfeksiyon verimi RT-PCR ve western blot ile değerlendirildi. Snail, Slug, Twist1, Vimentin ve E-kaderin ekspresyon düzeylerindeki değişimler RT-PCR ve western blot deneyleri ile incelendi. Transfeksiyonların metastatik hücre davranışı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla matrijel invazyon, transwell migrasyon, lateral migrasyon, yara iyileşmesi deneyi ile adezyon deneyleri uygulandı.

NDRG2 plazmid DNA transfeksiyonu sonrası 8505C hücrelerinde Vimentin protein ekspresyonu, BCPAP hücrelerinin invaziv yetenekleri ile lateral migrasyonda istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlendi. Ek olarak FTC-133 hücrelerinde NDRG2 overekspresyonunun lateral migrasyon ile hücre adezyonunu anlamlı olarak azalttığı saptandı. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası hücrelerdeki hedef gen ve protein düzeyleri ile hücrelerin metastatik hücre davranışlarında anlamlı bir değişim gözlenmedi.

Bulgularımızın tiroid kanserinde progresyonun engellemek amacıyla NDGR2 ekspresyonunu indükleyecek yaklaşımların geliştirilmesini hedefleyen araştırmalara öncülük edeceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: epitelyal mezenkimal dönüşüm, tiroid kanseri, N-myc downstream regulated gene-2, metastatik hücre davranışı

Tezin sayfa adeti: 162

Danışman: Prof. Dr. Gülgün OKTAY

THE EFFECT OF N-MYC DOWNSTREAM REGULATED GENE-2 EXPRESSION ON EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION IN THYROID CANCER

Doctoral Thesis

Murat SİPAHİ

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUE
Department of Medical Biochemistry

ABSTRACT

Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy. Epithelial- mesenchymal transition (EMT) is a process whereby epithelial cells lose epithelial characteristics and adopt mesenchymal characteristics. EMT is a necessary and an important step for beginning and progression in thyroid cancer like other epithelial-derived cancers. N-myc Downstream Regulated Gene-2 (NDRG2) which is a member of N-myc Downstream Regulated Gene (NDRG) family play roles in cell proliferation, differantiation and development. Studies showed that NDRG2 has tumor supressive functions and differentiation inducing roles.

The aim of this study is to investigate the effects of NDRG2 expression on EMT in thyroid cancers.

For this purpose, 8505C, BCPAP and FTC-133 cells were transfected with NDRG2 plasmid DNA while FTC-133 cells were transfected with NDRG2 siRNA for 48 hours. Transfection efficiency was evaluated with RT-PCR and western blot. Alterations in Snail, Slug, Twist1, Vimentin and E-cadherin expression levels were investigated with RT-PCR and western blot. Matrigel invasion, transwell migration, lateral migration, wound healing and adhesion assays were performed to evaluate metastatic cell behaviors after transfections.

After NDRG2 plasmid DNA transfection, statistically significant decrease was observed in Vimentin protein expression in 8505C cells, invasive abilities and lateral migration of BCPAP cells. Additionaly, it was determined that NDRG2 overexpression in FTC-133 cells significantly reduced lateral migration and cell adhesion. NDRG2 siRNA transfection had no significant effect in the target gene and protein levels and metastatic cell behavior of FTC-133 cells.

The data we obtained will contribute to the development of new approaches that will induce NDGR2 expression in order to prevent the progression of thyroid cancer.

Keywords: epithelial to mesenchymal transition, thyroid cancer, N-myc downstream regulated gene-2, metastatic cell behaviour

Page number: 162

Advisor: Prof. Dr. Gülgün OKTAY

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm kanserlerin %2'sini, tüm endokrin sistemi kanserlerinin %95'ini oluşturan tiroid kanseri en sık görülen endokrin sistem kanseri olup insidansı istikrarlı bir artış göstermektedir. Diğer kanser türlerine benzer şekilde, tiroid kanserinin başlangıcı ve ilerleyişi somatik mutasyonları, gen ekspresyon paternlerinde meydana gelen değişimleri, microRNA (miRNA) disregülasyonunu ve anormal gen metilasyonu gibi çeşitli genetik ve epigenetik değişimlerin aşamalı olarak birikimi sonucu meydana gelir.

Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMD), epitelyal hücrelerin farklı durum ve uyarılar sonucunda epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal özellikler kazanmaları durumudur. Birçok genetik, morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin meydana getirdiği bu süreç embriyonik gelişim, yara iyileşmesi ile kanser başlangıcı ve ilerleyişinde görülen bir mekanizmadır. Embriyonik gelişim süresinde epitel hücreleri organizmanın farklı kısımlarına göç ederek morfogenez sırasında farklı dokuları oluşturmak üzere farklılaşır iken, tümör hücresinde bu süreç kontrolsüzdür. Normal ve patolojik durumlarda benzer moleküler mekanizmaların yer almasından dolayı, kanser açısından yeni tedavi yaklaşımların geliştirilmesi için EMD'de rol alan kontrol mekanizmalarının aydınlatılması önemlidir.

EMD'nin geri dönüşümlü bir trans-diferansiyasyon süreci olması, NDRG2'nin ise diferansiyasyonu indükleyici rolü başta olmak üzere kanser hücrelerinde proliferasyon, motilite, ilaç direnci ve sağkalımı inhibe eden bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanması, NDRG2'nin tiroid kanserinde EMD açısından kritik bir rolünün olabileceğini gösterir. Bu temel bilgiler ışığından NDRG2 ekspresyonunun tiroid kanserinde EMD üzerindeki olası etkilerinin ekspresyonel ve fonksiyonel açıdan incelenmesi, tezimizin ana hedefini oluşturmuştur. Bu hedef doğrultusunda oluşturduğumuz hipotezlerimiz şu şekildedir:

H0: Tiroid kanserinde NDRG2 ekspresyonunun EMD üzerinde etkisi bulunmamaktadır.

H1: Tiroid kanserinde NDRG2 ekspresyonunun EMD üzerinde etkisi bulunmaktadır.

İleri sürdüğümüz hipotezlerimizin doğruluğunu incelemek amacıyla hedeflerimizi şu şekilde sıralayabiliriz:

1) İlk olarak insan anaplastik tiroid kanseri (8505C) ve insan papiller tiroid kanseri (BCPAP) ve insan follliküler tiroid kanseri (FTC-133) hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonu ile NDRG2 geninin overekspresyonu sağlandı.

2) İnsan folliküler tiroid kanseri (FTC-133) hücrelerinde small interfering RNA (siRNA) transfeksiyonu ile NDRG2 gen ekspresyonu susturuldu.

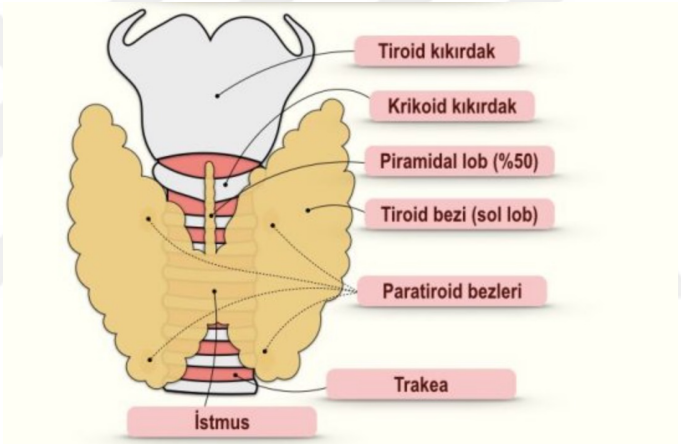
3) Transfeksiyonların Slug, Snail, Twist, Vimentin ve Epitelyal-kaderin (E-kaderin) gen ve protein ekspresyon düzeylerine olan etkileri incelendi.

4) Ayrıca transfeksiyonlar sonrası tiroid kanseri hücrelerinin metastatik hücre davranışlarındaki olası değişimler irdelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tiroid Bezi

Tiroid bez sternohyoid kas altında, C5 ve T1 vertebra seviyeleri arasında veya ikinci ve üçüncü trakeal halkalar arasında yerleşimli, ortalama ağırlığı 15-20 gram sağ ve sol olmak üzere iki lobdan oluşan endokrin bir organdır. Lobların her biri 4-5 cm boyunda, 2-3 cm eninde ve 2-4 cm kalınlığında olup lobları birleştiren istmus adlı dar bir geçiş kısmından oluşur. Sağ ve sol lobları tiroid kıkırdağın ortası ile altınca trakeal halka arasında uzanır. Genelde birinci ve dördüncü trakeal halkalar arasına yerleşim gösterir. Sağ ve sol lobları trakeayı önden kısmen çevreler, lateralinde karotis kılıfı ve sternokleidomastoid kası yer alır (1) (Şekil 1).



Şekil 1. Tiroid bezi (2)

İnsanda ilk gelişen endokrin bezdir; intrauterin hayatta dördüncü haftada, dil kökünden bir endodermal yapı olarak gelişmeye başlar. Zamanla tiroglossal kanal eşliğinde öne ve alta doğru hareket eder. İntrauterin hayatın yedinci haftasında erişkindeki gibi trakea önündeki konumuna ulaşır (3).

Tiroid bezi yüzeyden derine doğru; deri, süperfisyal fasya, derin boyun fasyasının yüzeyel tabakası ve bu tabakanın örttüğü sternokleidomastoid, omohyoid, sternohyoid ve sternotiroid kasları tarafından örtülür. Arka medialde özofagus ve trakea tarafından sınırlanmıştır (4).

Mikroskopik olarak tiroid, kolloid içeren birkaç follikül ve onu çevreleyen tek kat tiroid epitelinden meydana gelmiştir. Follikül hücreleri, kolloid olarak depolanan,

tiroglobulin sentezler. Foliküller arası bağ dokusu içerisinde nöroektoderm kökenli C hücreleri bulunur ve bu hücreler kalsiyum metabolizmasında etkili olan kalsitonin hormonunu salgılar (Şekil 2). Tiroksin (T4) ve triiyodotironin (T3) biyosentezi, tiroglobulin içinde tiroksin moleküllerinin iyodinasyonu ile oluşur (1).



Şekil 2. Tiroid bezinin histolojisi (5)

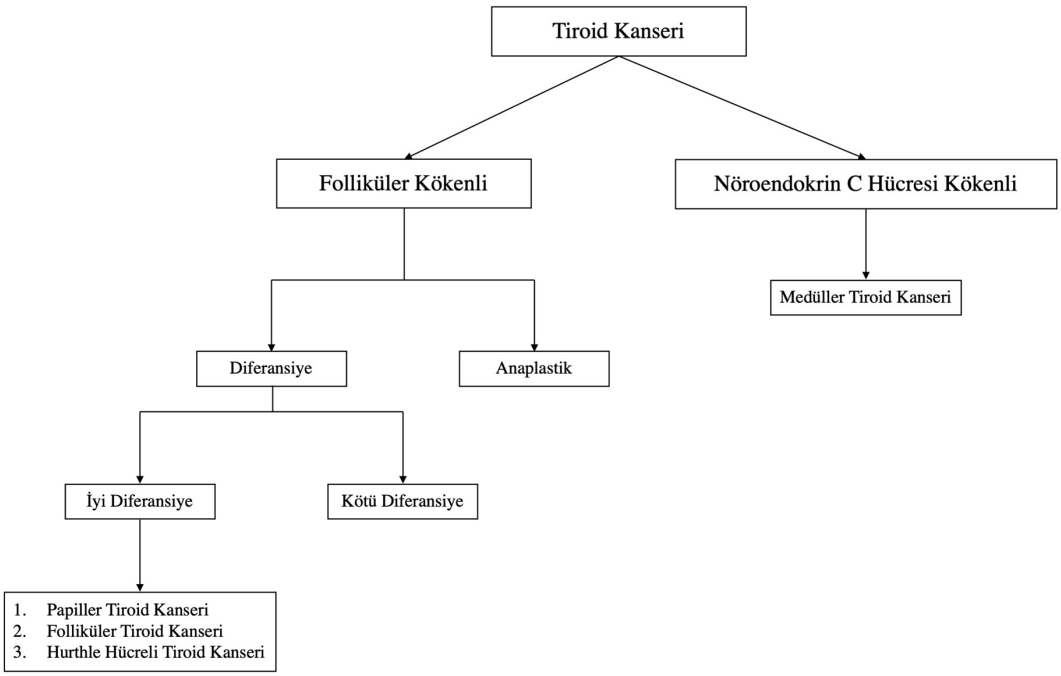
2.2 Tiroid Kanseri

Tiroid kanseri, endokrin organlar arasında en sık görülen malignitedir ve tüm insan kanserlerinin sadece %1'ini oluşturur. Medüller olmayan tiroid malignitelerinin yaklaşık %90'ı, histopatolojik kriterlere göre papiller veya folliküler olarak sınıflandırılan iyi diferansiye tiroid karsinomlarıdır. Diferansiye tiroid karsinomlarının

(DTK) seyri yavaştır ve genellikle cerrahi, radyoiyot ablasyonu ve tiroid stimule edici hormon (TSH) baskılayıcı tedavi kombinasyonu ile tedavi edilebilirler ancak hastaların %20-40'ında nüks meydana gelir (6, 7). Tümör progresyonu sırasında, hücre dediferansiyasyonu vakaların %5'inde görülür ve buna genellikle daha agresif büyüme, metastatik yayılma ve iyodür alım yeteneğinin kaybı eşlik eder. Bu nedenle tümör, konvansiyonel kemoterapi ve radyoterapi gibi terapötik yöntemlere dirençli hale gelir (8). Bu durum, tiroid kanserine bağlı ölümlerin büyük çoğunluğundan sorumludur. Bu nedenle tiroid kanserinin ileri evreleri terapötik açıdan kritik bir araştırma alanı olarak kabul edilmektedir.

2.2.1 Tiroid Kanserinde Sınıflandırma ve Evreleme

Daha önceleri, tiroid bezi malignitelerinin üç tipe ayrıldığı bir sınıflandırma yaygın olarak kullanılıyordu: farklılaşmış tiroid kanserleri (papiller ve folliküler tiroid kanserleri gibi), anaplastik karsinomlar ve nadir görülen tiroid kanseri türleri (medüller tiroid kanseri gibi). Daha güncel bir sınıflandırma, tiroid malignitelerini, folliküler türevi ve nöroendokrin C hücresinden kaynaklı tiroid kanseri olmak üzere katagorize eder (9) (Şekil 3).



Şekil 3. Tiroid kanserinde sınıflandırma

Kanser evreleme sistemleri tanı sırasında kanserin boyutunun tanımlanması, uygun tedavinin seçilimi ve başarılı olma olasılığını arttırmak için kullanılan temel bir faktördür.

Kanser evreleme sistemleri, bireysel hastalar için prognozu ölçmek ve klinik çalışmalar ile dünya genelinde standart bakım alan hasta gruplarını karşılaştırmak için araçlar sağlamak üzere kanserin kapsamını sistematikleştirirler. ABD'de kullanılan üç evreleme sistemi vardır. Nüfus insidansı ve sürveyansı için kullanılan bazı eyalet kanser kayıtları, nispeten basit Özet Evre Sistemini kullanır. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) programı Amerika Birleşik Devletleri (ABD) nüfusudaki kanser vakalarını azaltmak amacıyla kanser kendi "hastalık evreleme" sistemini geliştirmiştir. Klinisyenler arasında en yaygın kullanılan evreleme sistemi, Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) ve Uluslararası Kanser Kontrol Birliği (UICC) tarafından sürdürülen TNM sistemidir. Bu sistem, birincil tümörün (T), bölgesel lenf düğümlerinin (N) ve uzak metastazların (M) kapsamını kodlar ve T, N ve M'ye dayalı bir "evre gruplaması" sağlar.

Bu bağlamda tiroid kanserine ilişkin TNM evrelemesi tablo 1'de listelenmiştir.

Tablo 1. Tiroid kanserinde TNM evrelendirme sistemi

Primer Tümör	
T_X	Değerlendirilemeyen tümör
T0	Primer tümöre ait kanıt yok
T1	En büyük çapı 2 cm olan tiroid içinde sınırlı tümör
T2	2 cm'den büyük, 4 cm'den küçük, tiroid içinde sınırlı tümör
T3	4 cm'den büyük ancak tiroid içinde sınırlı tümör ya da herhangi bir boyutta ancak tiroid dışına minimal invazyonu olan tümör
$T4_a$	Herhangi bir boyutta tiroid dışı yayılımı olan tümör (subkutan yağlı doku, larinks, trakea, özefagus, rekürren sinir invazyonu)
$T4_b$	Prevertebral fasya, karotis arter veya mediastinal damarları invaze eden tümör

Bölgesel Lenf Nodları	
N_X	Değerlendirilemeyen lenf nodları
N0	Lenf nodu metastazı yok
N_1	Bölgesel lenf nodu metastazı mevcut
$N1_a$	Altıncı bölge lenf nodu metastazı mevcut
$N1_b$	Tek ya da çift taraflı, karşı tarafa geçen servikal ya da mediastinal lenf nodu metastazı
Uzak Metastaz	
M_X	Değerlendirilemeyen uzak metastaz
M_0	Uzak metastaz yok
M_1	Uzak metastaz var

2.2.1.1 Papiller Tiroid Kanseri

İyi diferansiye tiroid kanserlerinin %70-90'ını ve folliküler hücreden köken alan tiroid kanserlerinin %80-85'ini oluşturan papiller tiroid kanserleri (PTK) en yaygın tiroid kanseri türüdür (10). PTK, folliküler karsinomlara kıyasla ultrason ve ince iğne aspirasyonu (FNA) sitolojisi gibi tanı testleri ile daha kolay teşhis edilir (11). PTK'nın tanı konduğu yaş ortalaması 45'tir; insidans yaş arttıkça artar (12).

Radyasyona maruz kalma, nitrat, bilinmeyen çevresel kirleticiler gibi etiyolojik faktörler ile obezite, yüksek TSH düzeyleri ve Hashimoto tiroiditinin varlığı gibi endojen faktörler PTK için bilinen etiyolojik ve risk faktörleridir (13).

PTK, tiroid kanserleri arasındaki en iyi genel prognoza sahip kanser türüdür (9); ancak prognozu etkileyen bazı statik ve dinamik prognostik faktörler vardır (14). Statik prognostik faktörler terapötik stratejiler konusunda karar vermede yardımcı olur ve genellikle hastanın geçmişine veya preoperatif görüntüleme çalışmalarına, intraoperatif ve postoperatif patolojik bulgulara dayanır. Statik prognostik faktörler hastalığın değerlendirilme zamanına bağlı olarak üçe ayrılır; ameliyat öncesi, ameliyat sırası ve sonrası. Papiller tiroid kanserinde birincil tedavi, klinik, görüntüleme ve

histolojik değerlendirmeler gibi preoperatif değerlendirmelere bağlıdır. Tedavi seçenekleri hastalığın lokalizasyonu ile boyutuna bağlıdır. Ekstratroidal uzama veya lenf nodu metastazı bulgusu olmayan 4 cm'den küçük unifokal tümörlere lobektomi uygulanabilir. Önceki çalışmalar, bilateral veya unilateral rezeksiyonların benzer uzun dönemli sağ kalım ile ilişkili olduğunu göstermiştir (15-18). Servikal lenf nodu metastazı kanıtı olmayan papiller mikrokarsinomlu (1 cm'den az) hastalar için cerrahi dışı tedaviler bir seçenektir (19, 20). Tiroid hormon replasman tedavisi veya radyoiyodin (RAI) ablasyonu veya her ikisinin olası ihtiyacına karar vermek için ameliyattan kısa bir süre sonra cerrahi ve patolojik bulgulara başvurulur. Bu değerlendirme, nüks riskini değil mortaliteyi belirleyen TNM evrelemesine dayanmaktadır. PTK için evreleme tablo 2'de verilmiştir.

RAI ablasyonu: RAI ablasyonu, tiroid tiroidektomi sonrası gizli neoplastik hücreleri yok etmek için adjuvan tedavi olarak kabul edilir (21). Düşük riskli hastalarda tiroidektomiden sonra rutin olarak önerilmemektedir; daha çok orta ve yüksek riskli hastalara uygulanır. RAI'nin primer tümör çapının 2 cm'den büyük, lenf nodu ve uzak metastazların olduğu 45 yaş üstü hastalarda sağkalımı etkilediği bildirilmiştir (22). Çoğu ülkede, tümör çapının 1 cm'den büyük olduğu PTK hastaları için cerrahi sonrası RAI ablasyonu önerilir (23). Uzun vadeli randomize çalışmaların olmaması ve önceki çalışmaların tutarsızlığı nedeniyle, RAI'nin yararlı etkileri halen tartışmalıdır (24). Bunun üzerine Tang ve arkadaşlarının 2018 yılında gerçekleştirdikleri retrospektif çalışmada, primer tümör çapının 2 cm'den küçük olduğu ve uzak metastazın olmadığı PTK hastalarında RAI tedavisinin hastalığa spesifik sağkalım üzerinde bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

TSH supresyonu: TSH, normal tirositlerin ve bazı malign hücrelerin çoğalmasını uyarır; bu nedenle TSH supresyonu cerrahi sonrası bir tedavi olarak kullanılır (25). Bu yaklaşım DTK'de mortalite ve nüksü önemli ölçüde azaltır (26). Gerekli supresyonun kesin miktarı net değildir, ancak çalışmalar TSH seviyesini 0,1 mU/ L'nin altına düşürülmesinin klinik tabloyu iyileştirdiğini göstermektedir (27, 28). Bu tedavinin postmenopozal kadınlarda osteoporoz veya yaşlı hastalarda anjina ve atriyal fibrilasyon gibi bazı komplikasyonları olabilir; bu nedenle komplikasyon riski malign hücrelerin çoğalması riskine karşı tartılmalıdır (29).

2.2.1.2 Folliküler Tiroid Kanseri

İyi diferansiye tiroid karsinomlarının yaklaşık %10-15'ini kapsayan folliküler tiroid kanseri (FTK), "Folliküler hücre farklılaşmasını gösteren ancak PTK'nin tanısal nükleer özelliklerinden yoksun olan malign bir epitelyal tümör" olarak tanımlanır (30). Hastanın yaşı, tümörün evresi ve boyutu, RAI tedavisine yanıt verme ve cerrahi yaklaşım FTK'nin prognostik faktörleri arasındadır. Minimal invaziv karsinomlar yaygın invaziv karsinomlardan daha iyi prognoza sahiptir (31). FTK'nın evrelendirilmesi ve tedavisi PTK ile aynıdır ve tablo 2'de verilmiştir.

2.2.1.3 Hürthle Hücreli Karsinom

Hürthle hücreleri olarak bilinen tiroid onkositik folliküler hücreler, ilk olarak Karl Hürthle tarafından tanımlanmıştır ve Hürthle hücreli karsinomun (HHK) orjinidir (32). HHK, tüm tiroid kanserlerinin %3'ünü temsil eder (33). Tiroidin hem iyi huylu hem de kötü huylu lezyonlarda bulunabilirler. Hürthle hücre adenomu ve karsinomu arasındaki histolojik farklılaşma, rezeksiyon sonrası örnekte HHK için ayırt edici bir özellik olan vasküler veya kapsüler invazyon varlığı veya yokluğunun değerlendirilmesinin ardından yapılabilir (34).

İki tip Hürthle hücreli karsinom vardır: i) minimal invaziv karsinomlar, ii) geniş vasküler invazyona ve ekstratiroidal invazyona sahip yaygın invaziv tümörler. Minimal invaziv karsinomlu hastalar genellikle daha iyi prognoza sahiptir (33). Genel olarak, yaşlı bireyler ile büyük tümör çapı, ekstratiroidal ekstansiyonu olan ve cerrahi müdahalenin gerçekleştirilemediği hastalarda sağ kalım azalır (35). HHK'nin evrelendirilmesi PTK ve FTK ile aynı olup Tablo 2'de verilmiştir.

Diğer diferansiye tiroid kanserleri gibi, HHK için ana tedavi cerrahidir. HHK'nin preoperatif tanısı sitoloji ile mümkün olmadığından, cerrahinin başlangıç kapsamının belirlenmesi ve daha ileri cerrahi rezeksiyonun (tamamlayıcı tiroidektomi) postoperatif histolojik değerlendirmeyi içerip içermediğinin belirlenmesi gerekir (32). Bu nedenle, patolojik bulgular total tiroidektomiye yönlendirmediği sürece primer cerrahide ilk adım lobektomidir. Baskın kontralateral nodülün varlığı, 4 cm'den büyük nodül boyutu veya tiroid hormon tedavisi gerektiren önceden var olan azalmış tiroid hormon üretimi, total tiroidektomi için bir başka göstergedir (21).

TSH Supresyonu: TSH supresyonunun uygulanması nüks riskine bağlıdır. Tamamen rezeke edilen minimal invaziv HHK'ler düşük riskli olarak sınıflandırılır ve daha sonra TSH supresyon tedavisi gerekmez. Tedaviye tam yanıt vermeyen hastalarda, kontrendikasyon yoksa TSH seviyeleri 0,1 mU/l' den düşük olmalıdır. Tedaviye biyokimyasal açıdan eksik yanıt veren veya yüksek riskli HHK hastaları ile tedaviye tam yanıt veren veya yanıtın belirsiz olduğu hastalarda, TSH düzeyleri 0,1 ile 0,5 mU/l arasında olmalıdır.

RAI Ablasyonu: Az sayıda çalışma bulunması nedeniyle, HHK hastaları için RAI'nın yararı kesin değildir. Genel olarak düşük nüks riski olan hastalar için rutin olarak önerilmemektedir.

Eksternal beam radyoterapisi (EBRT): Ekstratiroidal yayılımın olduğu ve tümörün tamamen rezeke edilemediği hastalarda, EBRT bir tedavi seçeneği olarak düşünülebilir. Bununla birlikte, radyasyonun potansiyel yararı, diş çürüğü, trakeal stenoz, özofagus darlığı, osteonekroz, fibroz ve kserostomi gibi potansiyel komplikasyonlara karşı tartılmalıdır (36).

Tablo 2. Papiller ve Folliküler Tiroid Kanseri ile Hürthle Hücreli Kanser için Evreleme

	45 yaş altında	45 ve üstü yaşta
Evre I	Herhangi bir T, Herhangi bir N M0	T1 N0 M0
Evre II	Herhangi bir T Herhangi bir N M1	T2 N0 M0
Evre III		T3 N0 M0
		T1-T3 N1a M0
Evre IVA		T4a N0 M0
		T4a N1a M0
		T1-4a N1b M0
Evre IVB		T4b, Herhangi bir N, M0
Evre IVC		Herhangi bir T, Herhangi bir N, M1

2.2.1.4 Kötü Diferansiye Tiroid Kanseri

Bu tiroid kanseri grubu hem morfolojik hem de biyolojik açıdan iyi diferansiye tiroid kanserleri (İDTK) ve anaplastik tiroid kanseri (ATK) arasında yer almaktadır (37, 38). Tüm tiroid kanserlerinin %10'unu oluştururlar ve Avrupa'da, Amerika Birleşik Devletleri'nden daha yüksek insidansa sahiptirler (37, 39, 40). Kötü diferansiye tiroid karsinomu (KDTK), İDTK'nin ATK'ye ilerleyişinde ara basamağı temsil edebilir (38, 41-43). KDTK'ler, uygun tedaviye rağmen yüksek nüks oranına sahiptir. Bu kanser türleri tipik PTK'lerden daha agresif bir yapıya sahiptir.

Genellikle ekstratiroidal yayılım ve geniş lokal invazyon gösteren KDTK'ler tanı anında ileri evrededir (44). Bölgesel lenf nodlarına (%50-85) ve en yaygın olarak akciğere (%14-54) ve kemiklere (%18-33) uzak (%36-85) metastaz yapabilirler (45, 46). Hayatta kalma oranları, İDTC'li hastalara göre oldukça düşüktür (44, 46, 47). Kırk beş yaşın üzerindeki hastalar ile servikal lenf nodu invazyonu, tümör nekrozu, lokal nüks, 4 cm'den büyük tümör çapı ve tanı anında uzak metastazı olan hastalarda prognoz daha kötüdür (48).

KDTK'nın nadir görülmesi nedeniyle kesin bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır. Radyoiyot tedavisi (RAI), EBRT veya kemoterapi uygulaması tartışmalıdır (37).

2.2.1.5 Anaplastik Tiroid Kanseri (indiferansiye tiroid kanseri)

Anaplastik tiroid kanseri, tüm tiroid kanserlerinin %1,7-2'sinden sorumlu nadir ve ölümcül bir tiroid kanseri türüdür. Yaşamın altıncı veya yedinci dekatında görülür ve ortalama beş aylık bir sağ kalım süresine sahiptir ve tanı sonrası bir yıllık sağkalım %20'den düşüktür. ATK'nin coğrafi prevalansı %1,3-9,8 arasında geniş bir aralığa sahiptir (49-51).

ATK'nin, folliküler hücrelerin dediferansiyasyonu ile oluştuğu düşünülmektedir. ATK'nin yaklaşık %80'i, muhtemelen tanı konmamış iyi diferansiye tiroid kanseri olan guatr hastalarında ortaya çıkmaktadır (50). Çoğu durumda, ATK genellikle hızla genişleyen bir boyun kitlesi ve boyun ağrısı, disfaji, nefes darlığı ve ses kısıklığı gibi lokal semptomlarla kendini gösterir (52). Semptomlar, tümörün tekrarlayan laringeal sinir, parasempatik zincir (Horner sendromuna neden olur) veya hatta karotis arterler (inme nedeni) gibi komşu yapılara invazyonu ile ilişkili olabilir. Tanı konmuş

hastaların yaklaşık %40'ında genellikle lenfadenopati görülür ve %43'ünde kadar akciğer metastazı gözlenir, bunu kemik ve beyin takip eder (52).

Yapılan araştırmalar yaş, tümör çapı ve klinik evrenin ATK için prognostik faktörler olduğunu göstermiştir (53-56). Yaş (≥70), 10.000'den fazla beyaz kan hücresinin varlığı, tümör çapının 5 cm'den büyük olması, T4b ve uzak metastaz artmış mortalite ve kötü prognoz ile ilişkilidir (56).

ATK hem teşhis hem de tedavi açısından birtakım zorlukları gündeme getirir. Bunun nedeni hastalığın nadir görülmesi ve aynı zamanda anaplastik kanser hücrelerinde tiroid ve epitelyal hücre belirteçlerinin ekspresyonunun olmamasıdır (57). Ek olarak ATK hücrelerinde, tanıda ve tedavide gecikmeye neden olan çeşitli histolojik ve morfolojik anormallikler de bulunur.

Hastanın ATK açısından deneyimli bir merkeze yönlendirilmesi şiddetle tavsiye edilir. Uzman bir baş ve boyun cerrahı primer tümörün rezektabl olup olmadığını belirlemek için hastayı değerlendirmelidir. Rezeke edilemeyen primer tümörleri olan ancak uzak metastazı olmayan hastalarda palyatif kemoradyasyon önerilir.

İlerlemiş hastalığı (evre IVC) olan hastalar tedavi için en zor olanlardır. Primer tümörün lokal kontrolünü ve uzak metastazların tedavisi dengelenmelidir. Hava yolu risk altındaysa kemoradyoterapi başlatılmalıdır. Hava yolunun risk altında olmadığı veya trakeostomi ile stabilize olduğu hastalar tercihen klinik bir çalışmaya kaydolmalı veya sitotoksik ilaçlar ile sistemik kemoterapiye tabi tutulmalıdır (9).

BRAFV600E mutasyonunun bulunduğu ATK hastalarında BRAF inhibitörlerinin kullanılması gibi hedefe yönelik tedavi önerilmiştir (57). Seçici bir BRAF inhibitörü olan Dabrafenib, Trametinib, Lenvatinib, Rapamisin ve mikrotübül inhibitörleri ATK hastalarında değerlendirilen ilaçlar arasındadır. ATK için evreleme tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Anaplastik Tiroid Kanseri için Evreleme

	Anaplastik tiroid kanserlerinin tümü T4 olarak değerlendirilmektedir.
Evre IVA	T4a, Herhangi bir N, M0
Evre IVB	T4b, Herhangi bir N, M0
Evre IVC	T4c, Herhangi bir N, M1

2.2.1.6 Nöroendokrin C hücresi kaynaklı tiroid kanseri

Tüm tiroid kanserlerinin %5-10'unu oluşturan medüller tiroid kanseri nispeten daha nadirdir (58). Medüller tiroid kanseri (MTK), farklılaşmış tiroid kanserinin aksine parafolliküler nöroendokrin hücrelerden kaynaklanır. Rearranged during transfection (RET) proto-onkogenindeki germline mutasyonları nedeniyle sporadik (vakaların %75'inde) veya kalıtsal bir formda (çoklu endokrin neoplazi tip 2, MEN2) ortaya çıkar (59). Tiroid kanserlerinin çoğunda olduğu gibi, MTK genellikle yaşamın dördüncü veya altıncı dekatındaki hastalarda yalnız tiroid nodülü olarak görülür (60). Sıklıkla metastaz yaptığı için boyun lenfadenopatisi genellikle ilk belirtidir. Palpabl MTK'li hastaların çoğunda (%70) cerrahi müdahale sırasında servikal nodül tutulumu olduğuna dair kanıt vardır (61). Kızarma ve ishal ile ilişkili klasik bir tiroid nodülü, yaygın metastatik hastalığı düşündürür. MTK vakalarının yaklaşık %25'i kalıtsal çoklu endokrin neoplazi sendromu olan hastalarda görülür (60).

Diğer tiroid kanserleri gibi, MTK'de de cerrahi yaklaşım hastalığın yönetiminin temelidir; ancak en uygun cerrahi müdahaleyi belirlemek için cerrahi öncesi görüntüleme ve tanı gereklidir (9). MTK tanısı konduğunda hastaya boyun ultrasonografisi ve tümör belirteçlerinin (kalsitonin ve karsinoembriyonik antijen) değerlendirmesi yapılmalıdır. Ayrıca hastalığın sporadik veya MEN 2 sendromu ile ilişkili olup olmadığı belirlenmelidir, çünkü MEN 2 pozitif hastalarda feokromositoma ile primer hipertiroididen en az biri olabilir. Bu nedenle, germ hattı RET mutasyonu durumu bilinmeyen MTK hastalarında, feokromositomayı veya primer hiperparatiroidizmi ortadan kaldırmak için biyokimyasal test düşünülmelidir. Hastanın primer hiperparatiroidisi varsa, paratiroidektomi dahil total tiroidektomi yapılmalıdır. Feokromositoma hastalarında tiroidektomiye adrenalektomiye öncelik verilmelidir. Herediter MTK'li hastalar genetik danışmana yönlendirilmelidir (9). Germ hattı RET mutasyonu olan aile üyeleri profilaktik tiroidektomiden yararlanır (60).

Preoperatif kalsitonin düzeylerinin 146 pmol /L'den yüksek olduğu durumlarda, uzak metastaz olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır (60). Bu durumda boyun ve göğsün bilgisayarlı tomografisi (BT) ile karaciğerin faz kontrastlı manyetik rezonans görüntülemesi (PC-MRI) çekilmelidir. Kemik metastazı için aksiyel iskelet MRI önerilmektedir. Uzak metastazı olmayan hastalarda bilateral santral boyun diseksiyonu yapılan total tiroidektomi tercih edilir. Lateral boyun diseksiyonu sadece

boyun ultrasonu ile metastatik hastalıktan şüpheleniliyorsa ve FNA sitolojisi ile doğrulanıyorsa önerilir.

Ameliyattan sonra hastaların tiroid hormon replasman tedavisine ihtiyacı vardır, ancak yüksek riskli diferansiye tiroid kanserlerinde olduğu gibi TSH supresyonuna ihtiyaç duyulmaz. Hastalığın devam edip etmediği belirlemek için ameliyat sonrası en geç üç ay içinde kalsitonin ve karsinoembriyonik antijen (KEA) düzeyleri kontrol edilmelidir. Kalsitonin ve KEA'in altı ay içinde iki katına çıktığı hastalar genel sağkalım daha kısadır (62). EBRT, MTK hastalarında sınırlandırılmalıdır, çünkü olası bir fibrozis hem hastanın yaşam kalitesini azaltacak hem de diğer cerrahi girişimlerin sınırlanmasına neden olacaktır. MTK için evreleme tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Medüller tiroid kanseri için evreleme

Evre I	T1 N0 M0
Evre II	T2-3 N0 M0
Evre III	T1-T3 N1a M0
Evre IVA	T4a, Herhangi bir N, M0
	T1-3, N1b, M0
Evre IVB	T4b, Herhangi bir N, M0
Evre IVC	Herhangi bir T, Herhangi bir N, M1

2.2.2 Etiyoloji

Radyasyona maruz kalma ile tiroid kanseri arasındaki ilişki bilinmesine rağmen tiroid kanseri için kesin bir etiyolojik faktör yoktur. Tiroid kanseri insidansının artmasına neden olan radyasyona maruz kalma olgusu, II. Dünya Savaşı sırasında Hiroşima ve Nagazaki'de medana gelen atom bombası faciasının ardından belgelenmiştir (63). Bunu daha sonra Çernobil kazasından sonra ortaya çıkan radyasyon serpintisine maruz kalan çocuklar arasında tiroid kanserindeki logaritmik artış izlemiştir (64). Çocukluk döneminde düşük doz radyasyona maruz kalmanın (lösemi / lenfoma için terapötik radyasyon alan hastalarda olduğu gibi) tiroid kanseri insidansının artmasıyla ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır (65). Akne için düşük

voltajlı radyasyon ile tedavi edilen çocuklarda tiroid kanseri riskinin arttığını gösteren kanıtlar da bulunmaktadır. Radyasyona maruz kaldıktan sonra tiroid kanseri insidansı daha yüksek olmasına rağmen, hastalığın biyolojik davranışı hem radyasyona maruz kalan hem de radyasyona bağlı olmayan tiroid kanserine benzerdir. Bu nedenle, radyasyona maruziyet hastalığın tetiklenmesi için önemli olsa da malignitenin agresifliğinin belirlenmesinde rol oynamadığı görülmektedir.

2.2.3 Epidemiyoloji

Tiroid kanseri en sık genç yaş gruplarında görülür (66). Literatürde başlangıç yaşı, yaşamın ikinci, üçüncü ve dördüncü on yıllarında en yüksek insidansa sahip çan şeklinde bir eğri olarak görülür. Bununla birlikte, son yirmi yıl içinde, yaşamın dördüncü ve beşinci yıllarında tiroid kanseri insidansında bir artış olmuştur (67). Artan teşhisler, başka nedenlerle yapılan ultrason, BT, MRI ve pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi görüntüleme çalışmaları sonucu tümörlerin rastlantısal bulgularına atfedilebilir.

ABD'de başka nedenler yüzünden hayatını kaybeden insanlar arasında yapılan otopsilerde yaklaşık %10 oranında gizli tiroid kanserine rastlandığı bildirilmiştir (68). Bu insidans dünyanın çeşitli coğrafi bölgelerinde yükselir. Finlandiya'da, gizli papiller karsinomunun otopsi insidansı %35'tir (69). Bu durum tiroid kanserinin, muhtemelen yaşamın bir bölümünde klinik olarak anlamlı hale gelmeden mevcut olduğu gösterir. Bu bulgular tüm tiroid kanserlerinin teşhis ve tedavi edilip edilmeyeceği konusunda tartışmalı bir konu yaratır. ABD'deki otopsi çalışmalarından elde edilen veriler, bilmeden papiller karsinom ile yaşayan 38 milyondan fazla insan olduğunu göstermektedir. Bundan dolayı tüm tiroid karsinomlarının tedavi edilip edilmesinin gerekliliği tartışmalı bir konudur.

2.2.4 Tanı

Tipik olarak, rutin görüntülemede intratiroid nodüllerin saptanmasından sonra tiroid kanseri teşhisi konur. Tiroid kanseri olan bu tür hastaların çoğunda ilk tanı anında semptom görülmez. Semptomlar, genellikle primer tümörün komşu dokuya invazyonundan veya lateral boyun lenf noduna metastatik ilerleyişinden kaynaklanır. Hastaların az bir kısmında lokal olarak ilerlemiş tiroid kanseri (genellikle kötü

diferansiye veya anaplastik karsinom) görülür. Bu hastalar boyunda kitle belirtileri, basınç hissi veya boğulma hissi ile başvurabilirler. Bazen, laringeal sinirin invazyonundan kaynaklanan tekrarlayan ses tellerinin felci nedeniyle ses kısıklığı ile başvururlar. Bazı hastalar trakeaya büyüyen ve hava yolunu tehlikeye atan tümörlerden hemoptizi veya hava yolu tıkanıklığı yaşayabilir. Bazı hastalarda tek semptom, boyunda metastatik lenf nodundan kaynaklanan bir yumrudur (68).

Primer tümörü teşhis etmek ve değerlendirmek için bir dizi test yapılabilir. En uygun testler tiroid bezinin ultrasonu ve FNA'dır. Diğer tüm testler nispeten periferiktir ve kanser teşhisinin ardından yapılır (68).

Tanı konmasının ardından tümör büyüklüğüne ve yayılımına bağlı olarak bir takım radyolojik incelemeler gerekebilir. BT veya MRI gibi anatomik görüntüleme çalışmaları, genellikle bitişik yapıların invazyonu ile yayılım gösteren bir primer tümörü (T3 veya T4 primer tümör) veya yaygın nodal metastazları olan hastalarda gereklidir (68).

2.2.5 Prognoz

DTK'deki prognoz, hasta ve tümör ile ilişkili çeşitli faktörlere bağlıdır (Şekil 3) (70-74). Hasta yaşı önemli bir prognostik faktördür (75). Daha genç olan hastalar (genellikle <45 yaş) yaşlı hastalara kıyasla daha iyi bir prognoz gösterir. Kırk beş yaşından küçük hastalarda, 10 yıllık sağ kalım %99'dur. Buna karşılık mortalite, 70 yaşın üzerindeki hastalarda %25'e ulaşabilmektedir.

2.3 Tiroid Kanserindeki Genetik Değişimlere Genel Bir Bakış

Diğer kanserlerde olduğu gibi, tiroid karsinomları da invazyon yeteneğinin yanı sıra düzensiz hücre proliferasyonu ve ölümüyle sonuçlanan genetik değişiklikler ile karakterizedir. Tiroid kanserinin farklı morfolojik alt tipleri spesifik genetik değişimlerle ilişkilidir. Bununla birlikte farklı mutasyonlar, spesifik bir histopatolojik tümör alt tipinin meydana gelmesinde rol oynayabilir. Bu da bir tümörde mikroskopik fenotipin mutlaka tek bir genetik değişiklikten kaynaklanmadığı anlamına gelir.

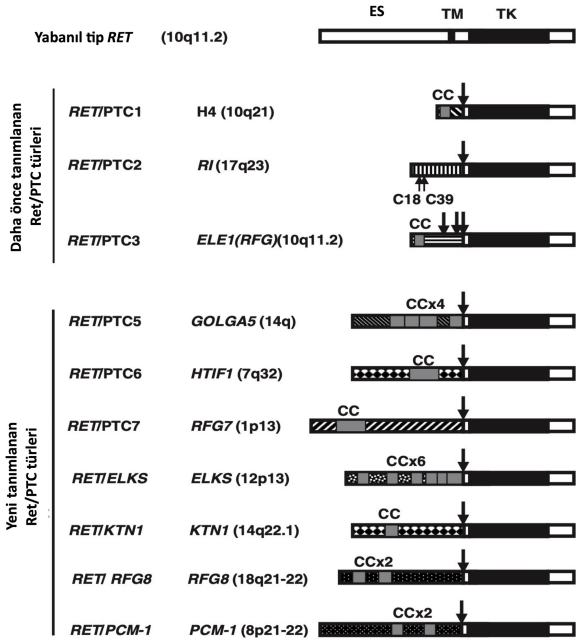
2.3.1 RET Proto-Onkogeni

İnsan RET geni, kromozomun 10q11.2 kolunda lokalize olmuştur ve hücre membranında lokalize bir reseptör tirozin kinazı kodlar (76, 77). Bu reseptör üç domainden oluşur; ligandın bağlandığı bir ekstrasellüler domaini, transmembran domaini ve tirozi kinaz aktivitesine sahip bir intrasellüler domain. RET reseptörünün ligandları, neurtulin, artemin ve persefin gibi glial hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF) ailesinin nörotrofik faktörleridir (78). Reseptöre ligandların bağlanması sonucu dimerizasyon meydana gelir; bunu reseptörde yer olan tirozin rezidülerinin otofosforilasyonu ve intrasellüler sinyal kaskadının başlaması izler.

Yabanıl tip RET, tiroid parafolliküler C-hücreleri dahil olmak üzere nöronal ve nöral-krest kökenli dokularda eksprese edilir, ancak tiroid folliküler hücrelerinde eksprese edilmez. C-hücrelerinde RET'in nokta mutasyonları, sporadik ve ailesel medüller tiroid medüller ile MEN2A ve MEN2B'den sorumluyken, RET'in fonksiyon kaybı "Hirschsprung" hastalığında rol oynar (79).

Tiroid folliküler hücrelerinde RET, farklı genlere füzyon yoluyla aktive edilebilir. Bu yeniden düzenlenmenin ürünü, *RET*/PTC (PTC, papiller tiroid kanserini tanımar) adlı kimerik bir onkojendir. Papiller tiroid karsinomlarında, üç major *RET*/PTC yeniden düzenlenmesi tanımlamıştır; *RET*/PTC1, *RET*/PTC2 ve *RET*/PTC3. Bu yeniden düzenlenmeler, RET geninin tirozin kinaz domainin, farklı genlerin 5' ucuna füzyonu ile gerçekleşir. RET genindeki kırılma noktaları her zaman 11 nolu intronda meydana geldiği için, RET geninin 3' ucunun aktive edici genlerle füzyona uğramış tarafı tirozin kinaz domaini içerirken, transmembran ve ekstrasellüler domainler içermez (80).

Son zamanlarda, yedi yeni *RET*/PTC yeniden düzenlenmesi tanımlanmıştır. Çoğu (*RET*/PTC5, *RET*/PTC6, *RET*/PTC7, *RET*/KTN1, *RET*/RFG8 ve *RET*/PCM-1) radyasyona maruz kalma öyküsü olan papiller karsinoma hastalarında bulunurken (81-85), sporadik papiller karsinomada tanımlamış tek bir yeniden düzenlenme bulunmaktadır (*RET*/ELKS) (86). Tüm yeni *RET*/PTC yeniden düzenlenmeleri, benzer şekilde RET geninde bulunan tirozin kinaz domainin farklı kromozomlar üzerinde bulunan heterolog genlere füzyonuyla meydana gelmiştir. Tüm RET füzyon genleri, kesime uğramış RET reseptörünün ligand bağımsız aktivasyonu için önemli olan bir veya daha fazla dimerizasyon domaini kodlar (Şekil 4).



Şekil 4. Yabanıl tip RET genine ait şematik temsil. Füzyon için meydana gelen kırılma noktaları oklarla gösterilmiştir. RET geni ile füzyonun meydana geldiği genlerin adları ile kromozomal lokasyonlar parantez içinde gösterilmiştir. ES, ekstrasellüler domain; TM, transmembran domaini; TK, RET'in tirozin kinaz domaini. CC: coiled-coil dimerizasyon domiani, C18 ve C39: dimerizasyon sırasında disülfid bağlarını oluşturan sistin kalıntıları.

Bu füzyonlar sonucu meydana gelen kimerik *RET*/PTC onkogeni, RET tirozin kinazın liganddan bağımsız aktivasyonu için gerekli bir dimerizasyon domaini sağlar (87, 88). RET tirozin kinazın liganddan bağımsız aktivasyonunun, tiroid hücrelerinin transformasyonu için gerekli olduğu düşünülmektedir. Farklı *RET*/PCT kimerik proteinleri, benzer RET tirozin kinaz domaini içerirken, N-terminal domaini açısından farklılıklar gösterirler. Bu durum onların farklı sitoplazmik dağılımlarını ve farklı substratlarla etkileşime girmelerini sağlayarak farklı onkojenik özellikler göstermelerini mümkün kılar.

2.3.2 RAS Mutasyonları

Ras ailesi birbirleriyle yüksek homoloji gösteren üç üyeden oluşur; NRAS, HRAS ve KRAS. Her biri 21 kDa ağırlığında olan bu ailenin üyeleri hücre membranının iç yüzeyinde yer alırlar. RAS ailesi proteinleri guanozin trifosfat (GTP)

ve guanizin difosfat (GDP) bağlı olmak üzere iki farklı formda bulunurlar. GTP bağlı aktif RAS proteinleri tirozin kinazlar ile G-protein eşlikli reseptörlerden gelen sinyalleri, proliferasyon, diferansiyasyon ve sağ kalım üzerinde rol alan mitojen ile aktive edilen protein kinazlar (MAPK) ve fosfoinositid-3 kinaz (PI3K)/AKT sinyal yollarına iletirler (89, 90).

RAS ailesi proteinlerinin fonksiyonları, GTPaz Aktive eden Proteinler (GAP) ve Guanin Nükleotid Değişim Faktörleri (Guanine Nuceotide Exchange Factors veya GEF) tarafından düzenlenir. GAP'lar, aktif RAS-GTP'leri inaktif RAS-GDP'lere dönüştürürken, GEF proteinleri RAS-GDP ile etkileşir ve GDP'nin proteinden uzaklaştırılarak, RAS'ın hücre içi derişimi yüksek olan GTP'yi bağlamasına ve yeniden işlev kazanmasına olanak sağlarlar (91). RAS geninde meydana gelen nokta mutasyonları sonucu GTP'ye olan affinite artarken, GTPaz'daki nokta mutasyonlar, enzimin otokatalitik aktivitesinin inhibisyonuna neden olur. Bu durum alt akımdaki MAPK ve PI3K-AKT sinyal yollarınının anormal aktivasyonuyla sonuçlanır (92-96).

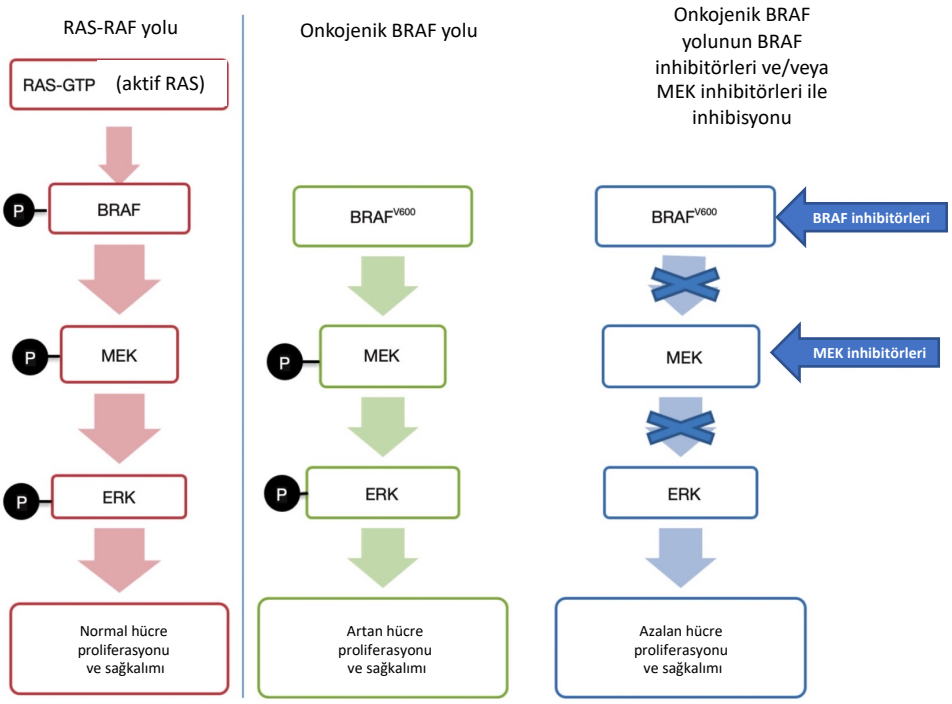
Tiroid kanserinde RAS geninin tüm izoformlarında mutasyonlar görülse de NRAS 61 nolu kodon ile HRAS 61 nolu kodon mutasyonları yaygındır. RAS mutasyonları papiller tiroid kanseri olgularının %10-20'sinde, folliküler tiroid kanseri olgularının %40-50'sinde, kötü diferansiye ve anaplastik karsinomaların %20-40'ında görülmektedir (97-103).

2.3.3 BRAF Mutasyonları

RAF enzim ailesi, evrimsel olarak korunan üç sitozolik serin/treonin kinaz içerir; ARAF, BRAF ve RAF1 olarak da bilinen CRAF. RAF ailesi, büyüme faktörleri gibi hücre dışı uyaranları bir fosforilasyon kaskadına dönüştüren ve hücrede proliferasyon, migrasyon, diferansiyasyon ve sağkalım gibi çeşitli biyolojik olayları meydana gelmesini sağlayan hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) sinyalinin aktivasyonunu sağlar (104).

BRAF mutasyonları özellikle PTK ve PTK-kaynaklı anaplastik tiroit kanserinde görülmektedir. BRAF mutasyonları 4 alt gruba ayrılmaktadır: klasik V600E mutasyonları, diğer RAF V600 dışı mutasyonlar, RAF füzyonları ve RAF delesyonları. BRAF'taki mutasyonlar, BRAF proteininin hiperaktivasyonuna neden olarak MAP kinaz yolundaki aktivitenin artmasına yol açar, bu durum tümörogenez

ile sonuçlanır. MEK proteini MAP kinaz yolunun alt akımında bulunduğu için mutasyonlar sonucunda bu proteinde de hiperaktivasyonlar görülür (105) (Şekil 5).



Şekil 5. RAS-RAF-MEK-ERK yolu (106).

BRAF geninde mutasyon saptanan vakaların yaklaşık %90'ında V600E mutasyonu görülmektedir (107, 108) . Bu nokta mutasyonda 1799 nolu nükleotitte bulunan timin, adenin ile yer değiştirir; bu durum 600 nolu rezidüde yer alan valin yerine glutamik asitin sentezlenmesi ile sonuçlanır. İyi diferansiye tiroid tümörlerinde erken ve yaygın bir mutasyon olan BRAF V600E mutasyonları daha ileriki aşamalarda diğer geç evre mutasyonların da meydana gelmesini sağlayarak tümörün ATK'ye dediferansiye olmasına neden olduğu için bir bakıma bir başlatıcı olarak rol alır.

V600 dışı BRAF mutasyonları, yabanıl tip BRAF ile karşılaştırıldığında, kinaz aktivitesinin arttığı ya da azaldığı mutasyonlardır. Onkogenez, V600E mutasyonlarına benzer şekilde düzensiz kinaz aktivitesiyle veya CRAF'ın hiperaktivasyona yol açan dimerizasyonu/ transaktivasyon yollarıyla meydana gelebilir.

BRAF K601E mutasyonu, 601 nolu rezidüdeki lizinin glutamik asitle yer değiştirmesi ile kinaz aktivitesinde artışa yol açan spesifik bir mutasyondur.

Melanoma vakalarının yaklaşık %5'inde görülür ve üçüncü en yaygın BRAF mutasyonudur (109).

2.3.4 Paired Box Gene 8/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Yeniden Düzenlenmesi

Paired Box Gene 8/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PAX8/PPARγ) yeniden düzenlenmesi, tiroit folliküler hücrelerinde PAX8 geninin (2q13) bir kısmının, PPARγ geni (3p25) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. PPARγ geni ile birleşen PAX8'in kısmı, tiroit folliküler hücrelerinde oldukça aktif olan PAX8 promotörünü içerdiğinden, yeniden düzenlenmenin ürünü olan füzyon transkripti ve proteininin (PPFP) düzeyi oldukça yüksektir (110).

PAX8/PPARγ yeniden düzenlenmesi folliküler tiroid kanserlerinin %30-35'inde görülür (111-113). Ayrıca birçok çalışmada, bu yeniden düzenlenme bazı folliküler adenomalar (%2-13) ile papiller kanserinin folliküler biçimlerinin ufak bir kesminde (%1-5) yer aldığı belirtilmiştir (114, 115).

2.4 N-Myc Donwstream Regulated Gene-2

N-Myc Donwstream Regulated Gene (NDRG) terimi ilk olarak Shimono ve arkadaşları tarafından N-Myc-knockout fare embriyolarında upregüle olan Ndr1 geni için kullanılmıştır (116). Dört üyeden oluşan bu protein ailesi (NDRG1, NDRG2, NDRG3 ve NDRG4), hidrolitik katalitik bölge içermemesi ve enzim fonksiyonundaki eksikliğe rağmen α / β hidrolaz grubuna dahil edilir (117) . Rezidü düzeyinde %57-65 homoloji göstermelerine rağmen her NDRG aile üyesi, spesifik ve işlevsel olarak farklı rollere sahip birden çok tür arasında ayrı bir homoloji kümesi oluşturur (118). Aile üyeleri arasındaki dizi farklılıkları ağırlıklı olarak N- ve C-terminal bölgelerinde bulunur.

İnsan NDRG1, NDRG2, NDRG3 ve NDRG4 genleri sırasıyla 8q24.3, 14q11.2, 20q11.21–11.23 ve 16q21– q22.1 kromozomlarında bulunur (119). Farklı aile üyelerine farklı isimler verilmiştir ve her bir gen, mRNA'lar ile çoklu izoformlara transkribe edilir. NDRG1'in ana izoformu, 394 aminoasitten oluşan 43kDa ağırlığında bir proteindir. NDRG2'nin tam uzunluktaki cDNA'sı, sırasıyla 371 aminoasit (41 kDa) (118) ve 357 aminoasit olan 2 farklı protein varyantını kodlar (120). NDRG4'ün 3

izoformu bulunmaktadır; NDRG4-B, NDRG4-B^{var} ve NDRG4-H (118, 120). NDRG4-B^{var}, NDRG4-B'nin alternatif splice varyantıdır. Bu izoformların dokuya özgü ekspresyonları türler arasında farklılık gösterir.

Tüm NDRG aile üyelerinin ekspresyonu, doğumdan yetişkinliğe doğru artan farklılaşmanın ilerleyen aşamalarıyla ilişkili görünmektedir. Nispeten erken embriyonik evrede düşük ekspresyon düzeyleri tespit edilebilmesine rağmen, ekspresyon postnatal dönemde artar (121). Araştırmalar NDRG1'in plasentasyonda rol oynadığını göstermiştir. İnsan trofoblast hücrelerinde, NDRG1 stres yanıtının proliferasyon ve farklılaşmada rol oynadığı saptanmıştır (122). Primer insan plasental trofoblastlarında NDRG1'in overekspresyonu ve susturulmasının sırasıyla artmış ve azalmış trofoblast farklılaşmasıyla sonuçlandığı bildirilmiştir (123).

2.4.1 NDRG2 ve Kanser

NDRG2 ve kanser arasındaki ilişki nörolojik (124) ve gastrointestinal (125) tümörler ile meme kanseri (126), akciğer (127, 128) ve tiroid kanseri (129, 130), fibrosarkom (131), oral skuamöz hücreli karsinom (132), miyeloid lösemi (133) ve servikal kanserde (Hela hücreleri) (134) bildirilmiştir. Bu nedenle NDRG2 ekspresyonu, tümörlerin klinik özellikleri ile ilişkilidir. NDRG2 düzeyi, tümör farklılaşması ile pozitif olarak ilişkiliyken lenf nodu metastazı ve TNM evresi arasında negatif bir ilişki vardır. Antikanser ilaçlara direnç gösterebilen birincil tümörlerin çoğunda, NDRG2 promotorunun epigenetik olarak susturulduğu bulunmuştur. Ancak, NDRG2 downregülasyonunun normal dokudan kanser başlangıcı ve ilerleyişinin bir nedeni mi yoksa bir sonucu mu olduğu belirsizliğini korumaktadır. NDRG2 downregülasyonu, malign klinik belirtiler ve artan patolojik derece gibi özellikler dahil olmak üzere kanser gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilidir. NDRG2, bağımsız olarak veya diğer faktörlerle kombinasyon halinde agresif davranış, tümör nüksü ve genel sağkalımı belirlemek için uygun bir biyobelirteçtir. Tablo 5'te farklı kanser türlerindeki NDRG2 düzeyi ile bunun klinik ve patolojik önemleri listelenmiştir.

Tablo 5. Farklı kanser tiplerindeki NDRG2 düzeyleri ile patolojik ve klinik önemler

Kanser Tipi	NDRG2 ekspresyon düzeyi	NDRG2 ekpresyon düzeyi ile ilişki	
		Klinik önem	Patolojik önem
Mide kanseri (135-138)	düşük mRNA ve protein düzeyleri	NDRG2 negatif hastalarda düşük sağkalım ve kötü prognoz	NDRG2 metilasyonu downregülasyonu ile tümör invazyonunun derinliği, Borrmann sınıflandırması ve TNM sınıflandırması arasında negatif ilişki
Kolorektal kanser (139-144)	düşük mRNA ve protein düzeyleri	Dukes evresi arttıkça NDRG2 seviyesinin düşme eğilimi var. Düşük NDRG2 mRNA seviyesine sahip hastalar, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha kısa hastalıksız sağkalıma ve genel sağkalım kalma süresine sahiptir.	--

Tablo 5. Farklı kanser tiplerindeki NDRG2 düzeyleri ile patolojik ve klinik önemler (devam)

Hepatosellüler karsinoma (145-149)		Hastalardaki NDRG2 down-regülasyonuna artmış alfa fetal protein (AFP) serum düzeyi, portal ven trombozu, nüks ve düşük sağkalım oranı eşlik eder.	Yüksek TNM evresi, infiltratif büyüme paterni, zayıf farklılaşma derecesi, nodal / uzak metastazı ve tümör invazyonu olan hastalarda NDRG2 downregülasyonu
Safrakesesi kanseri (150)	--	NDRG2 ekspresyonunun olmadığı hastalarda kötü prognoz ve düşük sağkalım	NDRG2 downregülasyonu ile invazyon derinliği ve yüksek TNM evresi arasında ilişki
Pankreas Kanseri (137, 151)	düşük mRNA düzeyi	Düşük NDRG2 düzeyi ile kötü prognoz arasında anlamlı ilişki	--
Glioblastom (150, 152-154)	düşük protein düzeyi	düşük sağkalım oranı	
Astrositom (154, 155)	düşük mRNA ve protein düzeyleri	NDRG2 ekspresyonu astrositom hastalarının yaşam süresi ile pozitif olarak ilişkili	NDRG2 ekspresyonu, patolojik derecelendirme ile negatif olarak ilişkili
Meningiom (156)	düşük mRNA ve protein düzeyleri	--	--

Tablo 5. Farklı kanser tiplerindeki NDRG2 düzeyleri ile patolojik ve klinik önemler (devam)

Nörablastom (157)		--	--
Renal hücreli karsinom (158-161)	düşük mRNA ve protein düzeyleri		
Prostat kanseri(162, 163)	düşük protein düzeyi	Düşük NDRG2 ekspresyonu, kısa rekürrenssiz sağkalım ve genel sağkalım ile önemli ölçüde ilişkili	Prostat kanseri dokularında NDRG2'nin downregülasyonu, ileri patolojik evre, pozitif metastatik durum ve yüksek Gleason skoru ile önemli ölçüde ilişkili
Mesane kanseri (164)	düşük protein düzeyi	--	NDRG2 düzeyi, tümör derecesi ve patolojik evre ile negatif olarak ilişkili
Meme kanseri (130, 165, 166)	düşük mRNA düzeyi	NDRG2 ekspresyonunun yüksek olduğu hastalarda daha iyi hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım	NDRG2 overekpresyonu sonucu hücre adhezyonu ve invazyonunda baskılanma
Akciğer kanseri (127, 128)	düşük protein düzeyi	NDRG2 düzeyleri, ile sağkalım süresi arasında pozitif ilişkili.	NDRG2 düzeyi, metastaz ve yüksek TNM evrelemesi ile negatif korelasyon gösterir.

Tablo 5. Farklı kanser tiplerindeki NDRG2 düzeyleri ile patolojik ve klinik önemler (devam)

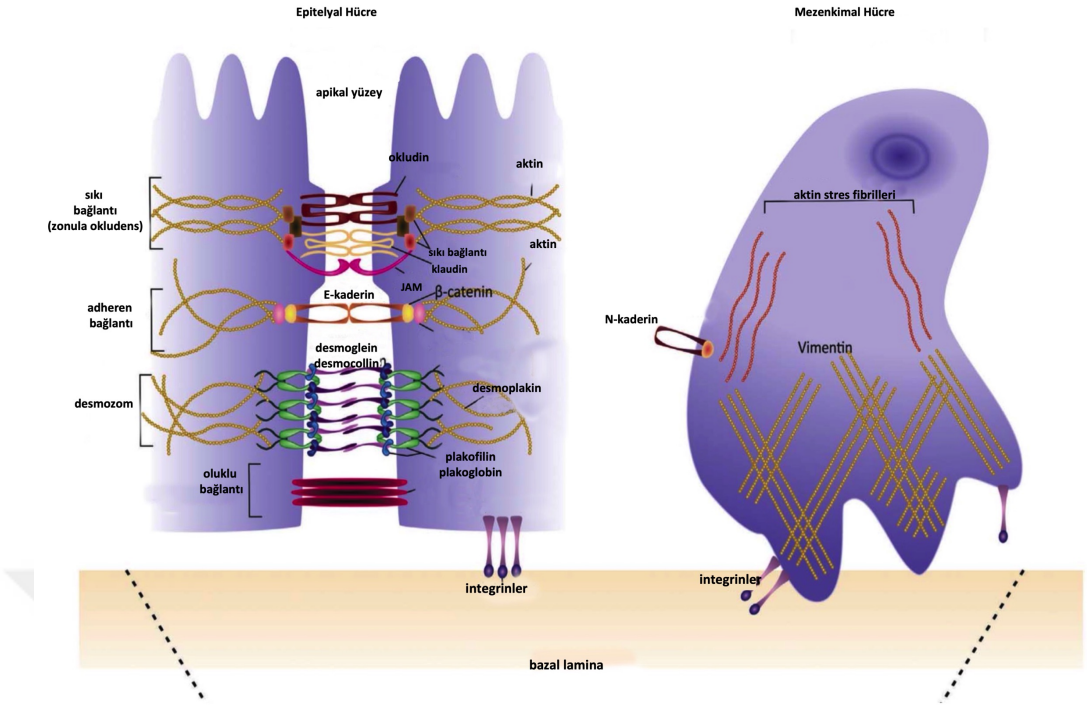
Tiroid kanseri (129, 130)	mRNA ve protein düzeyleri düşük	--	NDRG2 ekspresyonu ile uzak metastaz arasında anlamlı bir korelasyon yok.
Oral skuamöz hücreli karsinom (132)	düşük mRNA düzeyleri	--	NDRG2 ekspresyonunun indüksiyonu ile hücre proliferasyonunda inhibisyon.
Miyeloid lösemi (133)	düşük protein düzeyi		

2.5 Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm

Epitelyal mezenkimal dönüşüm, epitelyal hücrelerdeki epitelyal özelliklerin kaybını, mezenkimal özelliklerin kazanımını içeren bir süreçtir (167). Bu süreçte, epitelyal hücreler apikal polaritelerini ve diğer hücrelerle olan bağlantılarını kaybederler, sitoiskeletlerini yeniden organize ederler. E-kaderin gibi epitelyal belirteçlerin downregülasyonu ve vimentin, fibronektin gibi mezenkimal belirteçlerin upregülasyonu ile hücrede şekil ve motiliteden sorumlu sinyal yolları düzenlenir. Hücreler migratuvar ve invaziv karakter kazanırken, apoptoza ve/veya anoikise dirençli hale gelirler; degradasyon enzimlerindeki salınımları arttırarak ekstrasellüler matriks (ESM) yıkarlar ya da EMS bileşenlerini sentezlerler (168, 169).

2.5.1 Epitelyal ve Mezenkimal Fenotipler

Epitelyal dokular temelde epitel hücrelerin tek tek dizilmek suretiyle meydana getirdikleri tabakalardan/katmanlardan oluşur (170). Katmanları tanımlayan ortak özellikler şunlardır (Şekil 6):



Şekil 6. Epitelyal (solda) ve mezenkimal (sağda) hücreler (171).

i) Polatire: Epitel hücreleri konumları ve görevleri ile uyumlu olarak polarite gösterirler. Apikal (serbest) yüzey dış kısma veya lümene bakar. Lateral yüzey komşu hücrelerle temas halindedir ve özel bağlantı bölgeleri bulundurur. Bazal yüzey ise hücreyi alttaki bağ dokusuna tutturur (170). Moleküler ve biyokimyasal özellikler ile hücre dizilimleri farklı polariteleri meydana getirir.

ii) Hücre-hücre etkileşimleri: Özelleşmiş integral membran proteinleri epitel hücrelerini birleştirir; bu sayede oluşan tabakalar/katmanlar hücreler arası etkileşimlerin bütünleşmiş bir şekilde meydana gelmesini sağlar. Bu hücreler arası etkileşimler zonula okludens (sıkı bağlantı), zonula adherens (adheren bağlantı), makula adherens (desmozom) ve gap kavşaklardır (neksus).

Sıkı bağlantılar, epitel hücrelerinde lateral yüzeyin en üstünde yer alır. Hücreler arasında boşluk bulunmaktadır. Bu bağlantında zar proteinlerinin apikal yüzeyden bazolateral yüzeye hareketi ile parasellüler ve transsellüler difüzyonlar önlenir (170).

Adheren bağlantılar sıkı bağlantıların altında yer alırlar. Bu bağlantıdaki kemer benzeri yapılar hücreyi çepeçevre sarar. Bu bağlantı, sitoiskelette yer alan aktin ve miyozin filanetlerinin katenin ve kaderinlerin sitoplazmik domainine bağlanmasıyla meydana gelir. Bir transmembran glikoproteini olan E-kaderinin sitoplazmik doamini,

α- ve β-kateninler üzerinden sitoiskelete bağlanarak sitoiskeletin organizasyonunun ve bitişik hücrelerdeki bağlantıların güvenceye alınmasını sağlar (172). Bunun yanı sıra bu bağlantıdaki kemer benzeri düzenlemeler aynı zamanda hücre gerilimini ve şeklini kontrol etmek için bir tür gerilim kablosu olarak da işlev görebilir (173) .

Desmozomlar, plazma zarının sitozolik yüzeyinde kümelenmiş moleküler komplekslerdir ve iki hücreyi transmembranik bağlayıcı proteinler yoluyla birbirine bağlar. Mekanik desteğe yardımcı olur ve genellikle mekanik strese maruz kalan hücrelerde bulunurlar (174).

Hücreler arasındaki iletişim bitişik hücrelerin sitoplazmik alanları arasında köprü görevi gören konneksin proteinlerinin oluşturduğu bir por topluluğu olan oluklu bağlantı (gap juctions) kompleksleri (konneksinler) aracılığıyla sağlanır. Su dolu olan bu porlardan küçük metabolitlerin ve iyonların geçişi ile hücreler arası sinyal moleküllerinin geçişi sağlanır.

iii) Bazal membran (BM): Transmembran glikoproteinlerinden olan integrinler α ve β subunit bileşenlerine göre dört alt grubu ayrılır. Bazal membranda yer alırlar ve intrasellüler aktin filamentlerini, fibronektin, vitronektin, laminin ve tip 4 kollojen gibi ESM moleküllerine bağlarlar. Bu bağlantılar hücreyi çapalayarak bazal membranın oluşumunu ve epitelyumun alttaki hücrelerden ayrılmasını sağlayarak her iki tabakaya hücre invazyonunu önler. Bu bazal membran hücreye mekanik mukavemet kazandırır, gerilme kuvvetlerine karşı koyar; küçük moleküllerin ve kandan türetilen gazların geçişini desteklemek için bir difüzyon bariyeri görevi görür (170, 175).

Epitelyal bir hücrenin genel şekli düz ve poligonaldir. Hücresel yapı, bir mikrotübül ağı olan aktin hücre iskeleti ile yapıyı sağlamak ve hücreye şekil vermek için sinerjistik olarak çalışan ara filamentlerden oluşur (176). Epitel hücrelerin hareketi şekilleri ve bağlantılarıyla kısıtlanır; bu nedenle migrasyonları epitel katmanlar (bloklar) halinde olur (170, 172, 177). Mezenkimal hücreler, epitelyal hücrelerin aksine migratuvar ve invaziv özelliklere sahiptir. Morfolojik olarak düzensiz, uzamış ve iğne-benzeri bir yapıya sahiptirler (178, 179) (Şekil 6). Ayrıca bu hücrelerde Vimentin düzeyleri yüksektir; bu da migrasyon sürecinde onları daha dayanıklı hale getirir (180).

2.5.2 EMD'nin Transkripsiyonel Regülasyonu

EMD'yi başlatan mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte, EMD'nin çeşitli sinyal mekanizmalarının aktivitesi ile birtakım yollarının regülasyonu gibi birtakım şartlar altında meydana geldiği açıktır. Snail, Twist ve Zeb gibi transkripsiyon faktörleri EMD'nin ana düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır; hücredeki epitelyal özellikleri baskılayarak EMD sürecini başlatır ve sürdürürler.

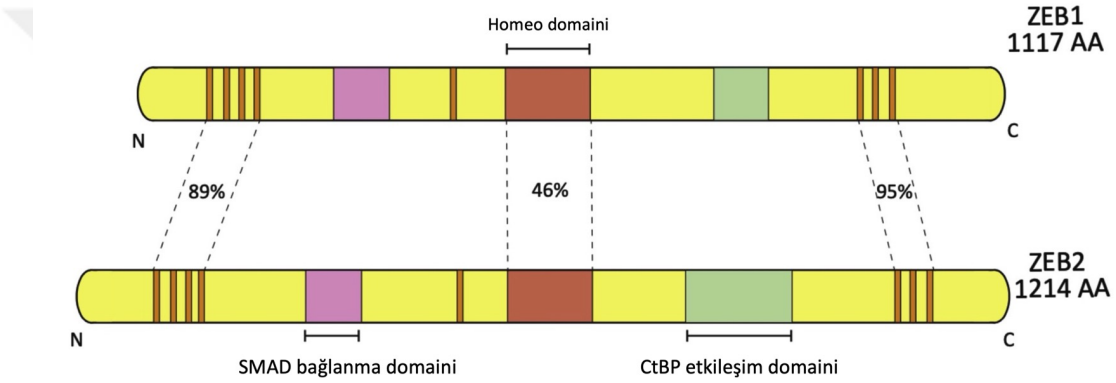
2.5.2.1 Snail süper ailesi

Snail süper ailesi Snail ve Scratch alt ailelerine ayrılmıştır ve günümüzde Snail alt ailesinin vertebrelerde tanımlanmış üç üyesi bulunmaktadır: SNAI1 (Snail), SNAI2 (Slug) ve SNAI3 (Smug) (181, 182). Bu ailenin üyeleri N-terminal domaini açısından farklılık gösterirken, ortak bir C-terminal domani içerirler (182); C-terminalde bulunan DNA'ya bağlanma domaini (DBD) konsensüs E2-box elementlerini (C/ACAGGTG) tanır (183) ve nükleer translokasyon sinyallerini indükler (184). Snail proteinlerinin merkezinde, üyeler arasında farklılık gösteren serin ve prolin aminoasitleri açısından zengin bir bölge bulunur; Snail2'de bu bölge Snail2-aracılı represyon için gerekli olan SLUG domainiyken (185), Snail1'de bu bölge nükleer export signal (NES) (186) ve destruction box domainlerini içerir (187).

Hücresel düzeyde, Snail faktörleri hücre hareketlerini düzenler ve statik epitel hücrelerini kök hücre özelliklerine sahip hareketli ve invaziv mezenkimal hücrelere dönüştürerek EMD sürecini tetikler. EMD'nin ayırt edici özelliklerinden biri E-kaderin fonksiyonunun kaybıdır; bu nedenle EMD'yi indükleyen faktörlerin E-kaderin ekspresyonunu veya fonksiyonunu bozarak epitelyal düzensizliği başlattığı genellikle kabul edilir (188). Snail1 ve Snail2, E-cadherin (CDH1) promotörünün proksimal E2 kutularına bağlanarak farklı ko-represörlerin bu bölgelye toplanmalarını sağlar (183, 185). Örneğin histon demetilasyonu ve deasetilasyonu için Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) gibi faktörleri bir araya getirerek birincil hedefleri olan E-kaderinin yan sıra okludinler, kaderin-16 ve transkripsiyon faktör 2 (TCF2) genlerini baskılayarak epitelyal karakterin baskılanmasını sağlarlar. Ayrıca Nöranal-kaderin (N-kaderin) ve ZEB1 gibi mezenkimal genleri ile matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) ve matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) gibi invaziv fenotipi teşvik eden proteazların ekpresyonunu arttırarak mezenkimal fenotipi indüklerler (189-191).

2.5.2.2 Zing finger E-box binding (ZEB) proteinleri

Zinc finger E homeobox-binding (ZEB) protein ailesi iki üyeden oluşur: ZEB1 ve ZEB2. Bu üyeler sırasıyla 1117 ve 1214 aminoasit içermektedir. N- ve C-terminallerinde, yüksek oranda homoloji gösteren ikişer çinko parmak kümeleriyle karakterizedirler. Bunun yanı sıra her iki protein de SMAD bağlanma ve C-terminal bağlayıcı protein (CtBP) etkileşim domainleri içerir. Ortada yer alan homeodomain (HD), protein-protein etkileşimlerinde rol alır (192). Çinko parmak domainlerinin DNA üzerinde yer z-box (CACCTG(G)) bağlanma dizilerine yüksek affinite ile bağlanarak transkripsiyonel represör olarak fonksiyon gösterirler (193) (Şekil 7).



Şekil 7. ZEB protein ailesi (194)

Transkripsiyonel represör olarak fonksiyon göstermelerinin yanı sıra, ZEB1 ve ZEB2'nin EMD'yi indükleyici transkripsiyonel aktivatör rolleri de bulunmaktadır. Bu proteinlerin overekspresyonları sonucu epitelyal belirteçlerin (örneğin E-kaderin), epitelyal polaritede rol alan proteinlerin (CRB2, HUGL2), konneksin ve desmosomların düzeyleri azalırken N-kaderin ve Vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyon düzeylerinde artış gözlenmiştir (195, 196).

2.5.2.3 Twist proteinleri

Yüzü aşkın üyesi bulunan beta helix-loop-helix (βHLH) protein ailesinde yer alan Twist1 ve Twist2 proteinleri, E12 ve E47 multifonksiyonel transkripsiyon faktörleri ile sırasıyla homo ve heterodimerler oluşturarak epitelyal karakterle ilişkili genlerin transkripsiyonunu inhibe ederken, mezenkimal genlerin ekspresyonlarını

indüklerler. Twist1, histon 4 proteininindeki 20 nolu lizin rezidüsünün metilasyonunu indükleyerek bir taraftan E-kaderinin ekspresyonunu baskılarken diğer taraftan N-kaderinin ekspresyonunu indükler; bunun sonucunda hücre invazyonunu destekleyen MMP-9 ve α-düz kas aktin (α-SMA) ekspresyonları dolaylı yoldan artar (191, 197, 198). E-kaderinin downregülasyonu ileri besleme mekanziması ile Twist ve Snail'i aktive ederek EMD'yi sürdürür (199).

2.5.2.4 Kruppel-benzeri faktör (KLF) proteinleri

KLF ailesi içinde EMD için transkripsiyonel aktivatör ya da represör olarak görev alan pek çok çinko parmak proteini bulunur. Örneğin KLF8, E-kaderini baskıladığı (200) öte yandan KLF4'ün epitelyal farklılaşmayı, bir takım adezyon ve sitoiskelet genlerinin inhibisyonu ile EMD'yi inhibe ederek sağladığını gösterilmiştir (201). Bir tümör baskılayıcı gen olan KLF6, doğrudan E-kaderin ekspresyonunu arttırarak, sitoplazmik β-katenin ve c-Myc düzeylerinde artışa neden olur (202).

2.5.3 Hücresel Proteinler

2.5.3.1 Vimentin

Vimentin yüksek plastik mezenkimal hücrelerde embriyonik gelişimin erken aşamalarından itibaren eksprese edilir. Daha sonra gelişim sırasında, keratin-eksprese eden epitelden dışlanır. Epitel hücrelerdeki Vimentin overekspresyonu ile migratuvar ve invaziv yeteneklerinin edinimi arasında ilişki olduğu için Vimetin, EMD için bir belirteç olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (203). Pek çok tümör tipinde, yüksek Vimentin ekspresyonu ile tümör agresifliği arasında pozitif bir ilişki gözlenmiştir (204). Bunun yanı sıra, Vimentin düzeylerindeki artışla paralel olarak Snail ve Slug ekspresyonlarının artması, Vimentinin, EMD düzenlenmesi üzerine de etkisi bulunduğunu da gösterir (205, 206).

2.5.3.2 Kaderin Ailesi

Hücreler arası bağlantılarda anahtar rol oynayan kaderin süperailesi Ca^{2+} bağımlı hücre adezyon moleküleridir (207, 208) ve birkaç alt tipte sınırlandırılabilir: E-kaderin, N-kaderin ve P-kaderin'in bulunuduğu tip I klasik kaderinler, VE-kaderin

ile OB-kaderin'in yer aldığı tip II kaderinler (209, 210), desmezomal kaderinler (211, 212), yedi adet transmembran geçişli kaderinler (213, 214), FAT/dash sous (DCHS) grubundaki kaderinler (215, 216) ve protokaderinler (217, 218). Hemem hemen tüm kaderinler transmembran proteinler olup üç domainden meydana gelirler: homotipik kaderin-kaderin etkileşimini sağlayan bir ekstrasellüler domain, tek yönlü transmembran domaini ve hücre yüzeyi ile sitoiskelet arasındaki iletişimi sağlayan sitoplazmik domain (218, 219).

E-kaderin ve N-kaderin, kaderin süperailesinin başlıca üyelerinden olup tümör gelişimi sürecinde önemli düzenleyiciler olarak hareket ederler. E-kaderin, epitelyal dokudaki bütünlüğün korunması ve epitel hücre katmanlarındaki polarizasyonunun sağlanmasında önemli bir rol oynarken (220) N-kaderin, mezenkimal hücreler ile nöral dokularda yüksek düzeylerde eksprese edilir (221); normal epitelyal hücrelerde N-kaderin eksprese edilmez ya da çok düşük düzeylerdedir.

Malignite sürecinde germline mutasyonları (222), promotor hipermetilasyonu (223) gibi birçok faktör E-kaderin düzeylerinde azalma meydana getirir. Bunun sonucunda E-kaderinin aracılı hücre-hücre adezyonu kaybolur (224). Bu nedenle E-kaderinin fonksiyonel kaybı en önemli EMD belirteçlerinden biri olarak tanımlanmıştır. E-kaderinin aksine, N-kaderin upregülasyonu sonucu tümör hücresinin migratuvar ve invaziv kapasitelerinde artış meydana gelir (225) bu nedenle yüksek N-kaderin düzeyleri ile tümör gelişimi arasında pozitif ilişki bulunmaktadır (226-229).

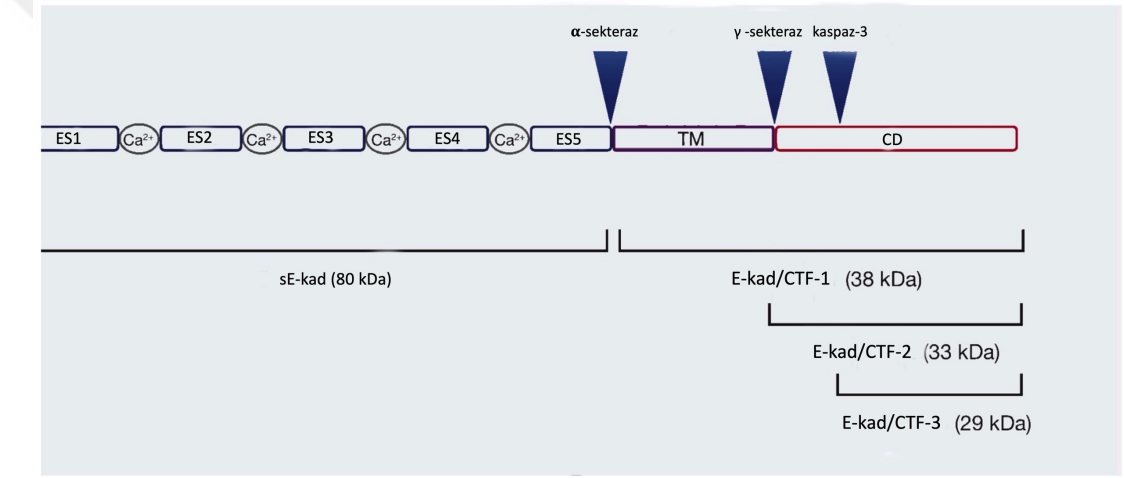
E- ve N-kaderinin yanı sıra diğer kaderinler de tömörogenezde rol alırlar. Çalışmalar P-kaderin disregülasyonu ile malign fenotipin kazanımı arasında güçlü bir olduğunu göstermiştir (230-232). Tip II kaderin alt ailesinde yer alan OB-kaderin'in yüksek düzeyleri ile kötü prognoz arasında bir ilişki bulunmaktadır (227, 233). Meme kanseri ve melanomada yüksek VE-kaderin ekspresyonunun kötü prognoza yol açtığı bildirilmiştir (234).

2.5.3.2.1 E-kaderin: Derinlemesine Bakış

Büyük bir ekstrasellüler domain, bir transmembran domamin ve korunmuş bir sitoplazmik domainden oluşan E-kaderin epitel hücrelerde adheren bağlantılarda yer alır. Ekstrasellüler domain, kalsiyum iyonlarını bağlayan 5 kaderin tekrarından

meydana gelir (Şekil 8). Sitoplazmik domaini, kaderin-katenin kompleksini aktin sitoiskeletine sabitlemek için kateninler ile çeşitli aktin bağlayıcı proteinlerle etkileşime girer (235). Böylece hücreler arası yaklaşık 25 nm'lik boşluk ile iki bitişik plazma membranı bir araya gelerek epitel hücrelerinin bireysel hareketi engellenir. Bu durum doku fizyolojisinin temelini oluşturur.

Epitel hücrelerinin immobilizasyonun yanı sıra E-kaderin büyüme faktörü aracılı proliferasyonu engelleyerek doku bütünlüğünün ve fonksiyonunun korunmasını sağlar (236). Bunun yanı sıra E-kaderin, embriyonik gelişim sırasındaki çeşitli süreçleri ve hatta embriyonik kök hücre pluripotensinin sürdürülmesini etkileyebilir (235, 237).



Şekil 8. Tam boy E-kaderin ve kesim domainleri. ES: ekstrasellüler domain, TM: transmembran domaini, SD: sitoplazmik domain.

Transkripsiyonel baskılama, epigenetik susturma, inaktive edici mutasyon, artmış degradasyon, endositoz ve proteolitik kesimler dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalardan kaynaklanan fonksiyonel E-kaderin kaybı, tümör progresyonu esnasında sıkça meydana gelen ve iyi karakterize edilmiş bir moleküler değişikliktir (238). E-kaderin downregülasyonu, EMD için standart bir özelliktir ve malign fenotipe geçişte nedensel bir rol oynar (235, 239).

EMD indüksiyonu ile E-kaderin kaybı her ne kadar metastaz için bir ön koşul kabul edilse de tümör yükünün heterojen olduğu ve bu nedenle hücre(ler)de E-kaderin kaybının her zaman invazyon ile ilişkili olmadığı göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca EMD çok aşamalı bir süreçtir ve kanser hücrelerinde E-kaderin ekspresyonu

ile epitel özelliklerini korunurken, hücrelerde invazyonu indükleyen/arttıran kısmi değişimler olabilir (240). Bu fikri desteklemek için yapılan *in vitro* çalışmalar, E-kaderinin overekspresyonu sonucu bazı kanser hücrelerinde motilite ile invazyonun engellenmediğini göstermiştir (241, 242). Ek olarak çevre dokulara invaze olmuş farklı kanser türlerine ait tümör dokularında yüksek E-kaderin düzeyleri tespit edilmiştir (240). Yüksek E-kaderin düzeyleri ile prostat kanserinde tümör büyümesi, glioblastomada ise tümör büyümesi ve invazyon, over kanserinde hücre proliferasyonunda artış ve düşük sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (243-245).

Bu bulgular bize E-kaderinin tümör gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir. E-kaderin'in proteolitik kesimi ile onkojenik fonksiyon gösteren protein fragmanları meydana gelir. α-sekteraz ile MMP-3, MMP-7, MMP-9, membran tip 1 MMP (MT1-MMP), plazmin ve kallikreinin de rol aldığı ve hücre membranının ekstrasellüler yüzünde gerçekleşen bu işlem sonucu 80 kDa'luk serbest bir ekstrasellüler N-terminal fragman ile 38 kDa'lık membrana gömülü bir C-terminal fragmanı meydana gelir (238, 246). N-terminal fragmanı ekstrasellüler alana, hatta kan dolaşımına difüze olur, parakrin/otokrin sinyal molekülü fonksiyon olarak fonksiyon gösterir; bu nedenle solubl E-kaderin (sE-kad) olarak adlandırılır. Membrana gömülü intrasellüler C-terminal fragmanı-1 (E-kad/CTF-1), γ-sekretaz (presenilin-1/2) tarafından kesilir. Bu proteolitik kesim sonucu oluşan 33 kDa ağırlığındaki E-kad/CFT-2, sitoloze salınarak burada intrasellüler sinyalizasyonda görev alır (247, 248). Bu fragman da kaspaz-3 tarafından kesilerek fonksiyonu henüz aydınlatılmamış 28 kDa'lık yeni bir fragman meydana gelir (E-kad/CFT-3) (249).

sE-kad ilk olarak MCF-7 hücrelerinin kültür ortamında keşfedilmiştir (250). Bunu takip eden çalışmalarda, farklı kanser türlerine ait hastalarının serumlarında, sE-kad düzeylerinde önemli ölçüde bir artış ve yüksek sE-kad düzeylerinin invaziv hastalık ve / veya kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (238). Hücrelerin sE-kad ile muamele edildiği *in vitro* çalışmalarda, migrasyon ile invazyonunun arttığı bildirilmiştir (251-253). Bu durum dört temel mekanizma ile meydana gelir: i) Tam uzunluktaki E-kaderinin proteolitik kesimi ile hücre membranındaki tam uzunluktaki E-kaderin oranı azalır. ii) Kesim sonucu oluşan sE-kad molekülleri halen homofilik bağlantılar yapabilmektedir; bu nedenle hücre membranında lokalize tam uzunluktaki E-kaderin proteinleri ile homofilik bağlantı yapan sE-kad molekülleri, iki E-kaderin

proteininceye meydana gelen adheren bağlantıyı bozar. iii) Ekstrasellüler matrikste tutuklanan sE-kad molekülleri migrasyon halindeki hücrelerin membranlarındaki E-kaderin proteinleri ile kuracakları homofilik bağlantılar sayesinde birer çapalanma bölgesi olarak fonksiyon gösteririler (238, 253). iv) sE-kad, MMP-2, MMP-9 ve MT1-MMP gibi bazal membranı degrede eden majör MMP'leri upregüle ederek invazyonu kolaylaştırır. MMP-9 ise, tam uzunluktaki E-kaderin proteinlerini keserek sE-kad düzeylerini arttırır; bu pozitif geri besleme mekanizmasının proteazların indüksiyonuna katkı sağladığı düşünülmektedir (254).

E-kaderinin ekstrasellüler domaini normal koşullarda EGFR ile etkileşirek EGFR'ın aktive eder. Bu açıdan bakıldığında, sE-kad bir büyüme faktörü olarak fonksiyon gösterir. Najy ve arkadaşları, MCF-7 hücrelerinde reseptör tirozin kinaz (RTK) üyelerinden HER2 ve HER3 ile sE-kad etkileşimi sonrası proliferasyon ve migrasyonda artış gözlediklerini bildirmişlerdir (255).

E-kaderin kesimi kanser başlayıcı ve ilerleyişi dolaylı yoldan da etkiler. Normal koşullarda E-kaderin ile Wnt sinyalinin ana mediyatörü β-katenin ile oluşan kompleks, hücre membranında tutulan β-katenin'nin transkripsiyonel aktivitesini engeller (256). E-kaderin kesimi sonucu β-katenin serbest kalır ve onkojenik Wnt yolu aktiflenir. Ayrıca Wnt yolu, E-kaderin kesim ürünü E-kad/CFT2 tarafından da indüklenir (247, 248, 257). Kesim sonucu serbest kalan bir diğer protein p120-katenindir. Bu protein, Wnt/β-katenin yolundaki hedef genlerin represyonunda rol olan Kasio proteinine bağlanarak dolaylı olarak onkojenik Wnt yoluna katkıda bulunur (258). Wnt/β-katenin yolunun aktiflenmesi ile kanser kök hücre benzeri fenotipin kazınımı ile bu yolun hedef genlerinden olan MMP-7'in ekspresyonu indüklenir. E-kaderinin proteolitik kesiminde MMP-7 de rol oynadığından, pozitif-geri besleme döngüsü ile E-kaderin kesilir ve onkojenik sinyalizasyonun devamlılığı sağlanır.

Sağlıklı bireylerin serumlarında sE-kad varlığı, onun normal fizyolojik süreçlerde de rol oynayabileceğini gösterir. Epitel hücrelerde motiliteyi arttırması ve eşzamanlı olarak motil haldeki epitel hücrelerdeki anoikisi engellemek amacıyla apoptozu bloke etmesi, sE-kad'in yara iyileşmesinde kilit bir rol oynadığını düşündürmektedir. Kalsiyumun yara iyileşmesi ile E-kaderin kesimindeki kritik rolü bu düşünceyi güçlendirmektedir. Ek olarak sE-kad, hücre-hücre adezyonunu

bozulmasını sağlayarak sürekli yenilenen dokulardaki yaşlı hücrelerin uzaklaştırılmasını teşvik edebilir (247, 248).

in vitro çalışmalara paralel olarak klinik araştırmalarda sE-kad düzeylerinin serumdaki yüksek düzeylerinin gösterilmesi, sE-kad'ın *in vivo*'da da patolojik bir rol oynadığını düşündürmektedir. Örneğin, dolaşımdaki sE-kad, tümör hücrelerinin invazyonu ile sekonder bölgelerde büyümelerini kolaylaştırmak için epitel bağlantılarını bozarak metastatik bölgelerin hazırlanmasına yardımcı olabilir.

Çeşitli kanser türlerinde serum sE-cad düzeylerindeki yükselme ile invazyon ve kötü prognoz arasındaki ilişki, sE-kad'i invaziv ve / veya metastatik hastalık için tanısal ve prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini gösterir. Örneğin, serum sE-kad'in ölçümü ile aktif olarak ilerleyen ve daha ivedi tedavi gerektiren tümörler ile daha yavaş büyüyen tümörlerin ayrımına yardımcı olabilir. Serum sE-kad düzeylerinin sürekli izlenmesi, tedavi etkinliğini izlemek için nispeten ucuz bir yöntem olabilir.

Tüm bu bilgiler, E-kaderinin kanser biyolojisinde tümör baskılayıcı bir hücre adezyon molekülünden çok daha karmaşık bir rol oynadığı gösterir. İnvaziv oldukları halde E-kaderin ekspresyonunun görüldüğü tümörler, bu durumun onkojenik sE-cad ve E-kad / CTF2 fragmanlarının meydana gelmesi için olup olmadığı sorusunu gündeme getirir. E-kaderin kesiminin patofizyolojik sonuçlarına ilişkin daha fazla araştırma yapılması gerekse de, mevcut bulgular E-kaderin fragmanlarının değerlendirilmesiyle birçok kanserin tanı ve tedavisinde önemli ilerlemeler sağlanabileceğini gösterir (259).

2.5.3.4 Diğer hücresel proteinler

Vimentin ve E-kaderinin yanı sıra EMD sürecinde rol alan pek çok protein bulunmaktadır. Hücre adezyonunda rol alan ve ESM organizasyonunu sağlayan periostinin pankreas, kolon, baş boyun, meme ve tiroid kanseri gibi pek çok kanser türünde ekspresyonunun arttığı (260-264) ve hücre invazyonunu indüklediği bildirilmiş (265), bu nedenle bir EMD belirteci olarak tanımlanmıştır (266).

Yirmiden fazla üyesi olan S100 kalsiyum bağlayıcı protein ailesi sitoiskelet elemanları ile doğrudan etkileşerek hücre migrasyonunu ve invazyonunu kontrol ederler (267). Araştırmalar aile üyelerinin upregülasyonu sonucu hücre-hücre adezyonunun bozulduğunu ve metastazın arttığını göstermiştir (268, 269). Ayrıca

meme, baş boyun ve pankreas kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinde EMD'yi indükleyici rolleri gösterilmiştir (270-274).

Hücre adezyonu ve sitoiskelet organizasyonunun düzenlenmesinde görev alan IQ-domain GTPase-activating protein (IQGAP) ailesinden IQGAP1'in mide, pankreas ve tiroid kanserlerinde EMD'yi indüklediği bildirilmiştir (275-277).

2.5.4 EMD'nin Sınıflandırılması

2.5.4.1 Birincil/ Tip 1 EMD: Implantasyon, embriyogenez ve organogenezde EMD

Embriyogenez ve organogenezin erken evrelerinde hücreler birden fazla EMD ve mezankimal epitelyal dönüşüm (MED) döngüsüne girerler. MED, metastatik hücrenin epitelyal özellikleri geri kazandığı ve yeni ikincil ortama uyum sağlayarak çoğaldığı, EMD sırasında meydana gelen değişikliklerin tersine dönmesi sürecidir. Blastosist gelişimin erken evrelerinde oluşan bir yapıdır ve bu yapının dış tabakası trofoblast denen hücreler tarafından şekillenir; dış tabakadaki bu hücrelerin içeriye doğru girinti yapması sonucu ise blastosöl (blastosit boşluğu) denilen içi sıvı dolu bir boşluk meydana gelir. Endometriumdaki hücrelerde invazyonu kolaylaştırmak ve plasenta oluşumu başlatmak için trofoblast tabakasında EMD aktiflenir (278). Blastosistin iç yüzeyini oluşturan hücreler ise aralarında primitif çizginin (ilkel yarık-bilateral simetriyi oluşturan ve gastrulasyonu başlatan bir yapı) da bulunduğu çeşitli yapılara farklılaşır. Burada EMD'nin indüksiyonu ektoderm, mezoderm ve endoderm doku tabakalarının oluşmasına neden olur (188, 279, 280). Primitif çizgide bulunan bir grup mezenkimal hücrede ise MED'in indüklenmesi ile notokord gibi mezodermal organlar oluşur (278, 281).

EMD ve MED embriyonik gelişimin geç evrelerinde de meydana gelerek kalp kapakçığı, iskelet kası ve damak (167) oluşumunu sağlar. Gelişim sonrası epitelyal hücreler dokuya özgü fonksiyonlar gösterirken, mezenkimal hücreler destek olarak varlıklarını sürdürürler (188, 279).

2.5.4.2 İkincil/ Tip 2 EMD: Yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu ve organ gelişiminde EMD

EMD'nin fizyolojik doku hasarı ile doku ve organların patolojik fibrozisinde aktif rolü bulunmaktadır. Birincil EMD'nin farklı olarak ikincil EMD inflamatuar bir yanıt ile ilişkilidir. Yara iyileşmesi sırasında, re-epitelizasyon üç aşamada gerçekleşir: i) fagositoz nedeniyle meydana gelebilecek doku hasarını sınırlamak için inflamasyon, ii) granülasyon dokusunu oluşturmak, anjiyogenezi tetiklemek ve yeni ekstrasellüler matriks bileşenlerinin yeniden meydana getirmek için proliferasyon ve iii) maturasyon. İnflamasyona, başta TGF-β (transforming growth faktör-β) ve interlökin-1 (IL-1) olmak üzere birtakım inflamatuar moleküllere ve sitokinlere maruz kalan inflamatuar ve fibroblastik hücreler aracılık eder. Bunun sonucunda çeşitli hücreler miyofibroblastlara farklılaşarak kollajen, laminin ve elastinin de aralarında bulunduğu ESM proteinleri ile etkileşirler (282). Yaranın meydana geldiği bölgede miyofibroblastlar hasarlı dokuyu MMP'ler ve diğer ESM degrede edici enzimlerin yardımıyla uzaklaştırdıktan sonra yaranın iyileşmesini sağlamak için ESM protein birikimi yoluyla bir iskele meydana getirirler (282, 283). Hasarlı dokunun onarımının ardından, ESM iskelesi degrede olurken miyofibroblastlar apoptoza uğrar (283). Bu süreçte regülasyonunda meydana gelen bir bozulma fibrotik ESM proteinlerin fazla üretimiyle sonuçlanır; böylece yara bölgesinde skarların ya da organlarda fonksiyon bozukluğuna yol açabilecek fibrosizle sonuçlanır (282, 283). Yara iyileşmesi sürecinde, Erk, Snail ve Slug gibi birtakım transkripsiyon faktörlerinin (TFlerin) düzeylerinin artması ile E-kaderin düzeyleri azalır; böylece re-epitalizasyon sırasında motilitenin artması ve hücre-hücre adezyonunun azalması sağlanır (284, 285).

2.5.4.3 Üçüncül/ Tip 3 EMD

Diğer EMD tiplerinde gözlenen kontrollü mekanizmanın aksine, tümörgenezde EMD agresif ve kontrolsüzdür. Kanserde hem EMD'nin hem de MED'nin edinimi, metastatik yayılım gösteren tümör hücrelerinin bir göstergesidir ve kanserde ilerlemenin merkezinde yer alır (170, 188).

Metastaz, tümör hücrelerinin birincil doku dışından doğrudan ya da kan-lenf damarlarıyla başka bölgelere sıçramasıdır (286). Kanser hücrelerinin ikincil bölgelere

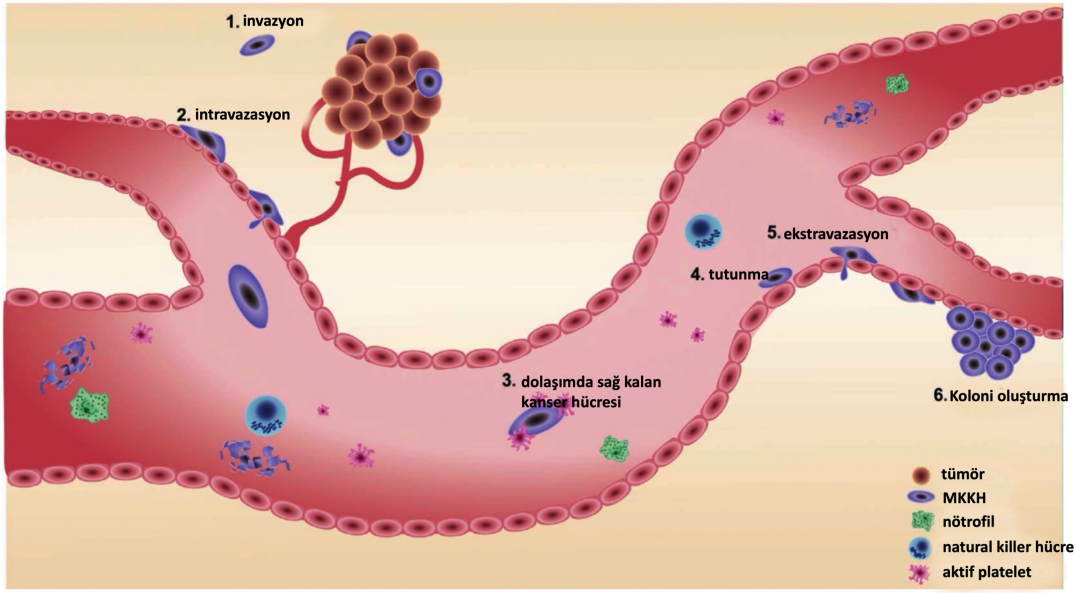
invazyonu ve migrasyonu için EMD metastatik sürecin erken evrelerinde gerçekleşir; ardından kanser hücrelerinde MED aktiflenerek ikincil bölgelerde bu hücrelerin epitelyal karakter kazanması sağlanır (178). Birincil tümörden ayrılan milyonlarca kanser hücresinin ancak %90'ı metastatazın erken aşamalarından bir ya da birkaçını tamamlayabilir ve bunlardan ancak %2'si mikro-metastatik büyüme yetisine sahiptir. Bununla birlikte, bu hücrelerin sadece %0,01'inin, tam makro-metastatik tümörler üretmek için tüm metastatik döngüden sağ çıkabildiği gösterilmiştir (287, 288). Bu nadir metastatik hücre popülasyonunun, kanser kök hücrelerinin (KKH'lerin) bir alt grubu olduğu önerilmiştir (289, 290).

Genel olarak KKH'ler, tümör yükünden belirgin şekilde farklı olan tümör başlatıcı hücrelerdir (TBH). Tümör büyümesinin başlatılmasını ve sürdürülmesini sağlayan rejeneratif ve proliferatif özellikler sergilerler, heterojen tümör içindeki diğer tüm hücre fenotiplerine yol açmak için asimetrik bölünme ve farklılaşma geçirirler (291). Birincil veya metastatik tümörlerin öncü ucunda artan EMD aktivitesi, durağan ve hareketli olmak üzere en az iki farklı KKH formunun olduğunu göstermektedir. Hareketli KKH'ler veya metastatik KKH'ler (MKKH'ler), uzak organın ortamını taklit eden stromadan sinyaller alarak yayılmak üzere seçilir ve hazırlanırlar.

EMD'nin indüksiyonu MKKH'lerin birincil bölgeden kaçma ve vücut boyunca yayılma aşamalarında hayatta kalabilmeleri için onlara sayısız yeti kazandırırken MED, hücrelerin ikincil bölge(ler)de kolonize olmalarını sağlar. Bu dönüşümler hücre morfolojisi, sitoiskeleti, adhezyonu ve mobilitesinde dinamik değişimleri tetikler.

2.5.5 EMD'nin Metastatik Süreçteki Önemi

EMD indüklenmesi ile MKKH'ler birincil bölgeden kaçmak ve vücudun her tarafına yayılmak için çok sayıda özellik kazanır. MED ile de hücreler yayılım gösterdikleri ikincil odaklarda koloni oluştururlar. Bu geçişler nihai istilacı bir fenotipi teşvik etmek amacıyla morfoloji, hücre iskeleti, adezyon ve hareketlilik gibi çeşitli dinamik değişiklikleri takip eder (Şekil 9).



Şekil 9. Metastatik yayılımda EMD'nin rolü

Hücre ayrılması: EMD süresince, belirli onkojenik mutasyonlar okludin ve klaudin ekspresyonlarını baskılayarak sıkı bağlantıların zayıflamasına neden olur (191, 292). Desmozom kompleksleri bozulur ve konneksin düzeylerinin azalmasıyla konneksinlerin bütünlüğü bozulur. E-kaderinin downregülasyonu ya da degredasyonu EMD ile karakterizedir; bu sayede adheren bağlantılar kararsızlaşır ve MKKH'ler komşu hücrelerden ayrılır. Bununla birlikte N-kaderinin upregülasyonu hücre migrasyonu ile invazyonunu kolaylaştırır. Anoikis, displastik hücre büyümesini önlemek için ESM'den ayrılan ankraj bağımlı hücrelerde meydana gelen programlı bir hücre ölümüdür (293). İntegrinlerin etkileşimi, birtakım kinazlar (FAK,Src, ILK gibi) ile yolakları (PI3K/Akt, Hippo, MAPK) etkileyerek hücrede sağ kalımı sağlarken, sinyal moleküllerindeki birtakım inaktivasyonlar ya da overekspresyonlar, hücrelerin bazal membrandan ayrılmasına neden olur (191). ESM'ye tutunan hücrelerde FAK yolu aktiftir ve bu sayede Bcl-2 ve FLICE inhibitör proteininin (FLIP) upregülasyonları ile hücrede sağ kalım sağlanır (294). Hücrenin ESM'den ayrılması ile bu sinyallerde kesilmeler meydana gelerek intrinsik ve ekstrinsik anoikis yolları aktiflenir. MKKH'ler anoikisten kaçınmak için birtakım yollar geliştirmişlerdir. "İntegrin anahtar" denilen, birtakım integrinlerin upregülasyonu ve diğer integrinlerin upregülasyonu içeren bir mekanizma ile bu hücrelerin anoikise girmeleri önlenir (295).

Örneğin E-kaderin downregülasyonu sonucu biriken sitoplazmik β-kateninin MAPK yolu ile etkileşime girmesi sonucu anoikise olan dirence katkı sağlanır (296).

İnvazyon: Lokal dokunun invazyonu, EMD sürecindeki hücrelerin metastatik potansiyelini şekillendirmede erken bir adımdır. ESM ve benzeri bitişik bariyerlerin üstesinden gelmek için tümör hücreleri tarafından farklı stratejiler kullanılır. Sitoiskeletin yeniden modellenmesi metastatik hücrelerin migratuvar ve invaziv yetenekleri için hayati önem taşımaktadır. EMD süresince intraselüler ve ekstrasellüler sinyallere yanıt olarak aktin sitoiskeleti dinamik bir yeniden düzenlenme içine girer. Hücre hareketi sırasındaki morfolojide değişimler, hücre hareket ettikçe kademeli olarak tanımlanabilir: polarizasyon, adezyon, hücredeki ön tarafın translokasyonu ile arka tarafın geri çekilmesi (297). Hücrenin ön tarafındaki kasılmalar, arka tarafın stromadan ayrılmasıyla hücreyi ileriye doğru itecektir (298). Hücre migrasyonunda iki tip morfoloji görülür; mezankimal ve ameboid migrasyon. Mezankimal migrasyona lamellipodia, filopodia, invadopodia, podozomlar gibi harekete yardım eden membran çıkıntıları yardımcı olur (299). Amoeboid migrasyonu ise, migrasyon için kabarcık şeklinde çıkıntılar üreten yuvarlak veya düzensiz şekilli hücrelerle karakterizedir (300). Bu çıkıntıların tümü, hücre ve ESM arasında bağlantı yerleri oluşturarak hücre motilitesini mümkün kılar.

İntravazasyon: MKKH'ler tümörün öncü ucunda yer alırlar, bu sayede çevre dokuya invazyonları ve kan ya da lenfatik dolaşıma girmeleri daha kolay olur (188, 290, 301). Çevre stromaya invaze olduklarında, MMKH'ler transendotelyal migrasyona (TEM) uğrayarak endotel bariyerini geçerler ve dolaşıma katılırlar. Bu süreçte var olan damarlarla bağlantı kurabilmek için neoanjiyogenez tetiklenir (188).

Endotel bariyerinden geçiş aktif ya da pasif migrasyonla olur. Aktif migrasyonda ürokinaz tip plazminojenaktivatör (uPA), katepsinler ve matriks metalloproteinazlar gibi ESM'in proteolizini sağlayan proteazlar rol alır. E-kaderinin, MMP'ler tarafından kesilmesi sonucu çözünür meydana gelen çözünür E-kaderin fragmanları epidermal growth factor receptor (EGFR) sinyali üzerinden parakrin yolla EMD'yi indükler (259). Pasif migrasyonda ise hücreler bariyerleri proteolitik bir aktivite olmaksızın aşarlar. Aktin ve miyozinin birbirleri üzerinde kaymaları suretiyle meydana gelen kasılma hareketi bu tip migrasyonda birincil öneme sahiptir (302).

Dolaşımda hayatta kalma: Dolaşıma katılan MKKH'ler, birçok ölümcül engelle karşılaşır ve bu engellere yenik düşen tümör hücrelerinin çoğundan farklı olarak, MKKH'lerde birtakım savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Örneğin trombin ekspresyonu ile plateletler üzerindeki koagülasyon faktörlerine bağlanarak bağışıklık sisteminden kaçarlar (303). Metastatik hücreler aynı zamanda kümeler halinde de dolaşabilirler. Kümelenme en başından olabildiği gibi dolaşımda tek başna hareket eden hücreleri agrege olmalarıyla da meydana gelebilir. Bu kümelenme platelet kalkanına benzer bir koruma sağlamanın yanı sıra anoikisin önlenmesinde rol oynar (304).

Tutuklanma ve Ekstravazasyon: Dolaşımda hayatta kalmayı başaran MKKH'ler uzak organların damar sisteminde lokalize olur (Şekil 9, dördüncü ve beşinci adımlar). Çalışmalar, dolaşımdaki metastatik hücrelerin, hücrenin kendisine benzer büyüklükteki kılcal damarlarda yavaşlayacağını ve genellikle tutuklamadan önce endotel boyunca yuvarlanacağını göstermiştir. E-selektin ile ona uygun ligandların MKKH'ler üzerinde ekspresyonu endotel boyunca göçe katkıda bulunur. MKKH'nin endotelyuma çapalanması, metastatik hücre üzerinde eksprese edilen CD44 ve MUC1 gibi integrinlerin, endotelyal hücreler üzerinde eksprese edilen selektinlere, intrasellüler adezyon molekülüne (ICAM1) ve galektin 3'e bağlanmasıyla gerçekleşir (305). Daha sonra MKKH'lerde, endotelyal hücre bağlantılarında açıklık oluşmasını indükleyici sinyal yollarını aktive eden birtakım faktörleri salgılanır; böylece TEM başlar.

Kolonizasyon: Bu aşamada hücrelerde MED, yani EMD sırasında meydana gelen değişiklikler tersine dönme sürecine başlar (Şekil 9, altıncı adım). Doku kolonizasyonunu destekleyen MED süreci hakkında nispeten az şey bilinmektedir, ancak ilgili mekanizmaların çoğunun EMD'ye bağlı olduğu açıktır. Bu süreçte Twist1 (306), Snail ve Slug (307) gibi birçok EMD indükleyici faktörün ekspresyonu, hücre-hücre bağlantıları gibi epitel özelliklerin yeniden aktiflenmesi ve hücre büyümesi ve kolonizasyonun indüklenmesi için azalır.

2.5.6 Dolaşımdaki Tümör Hücreleri (DTH) ve EMD

Dolaşımdaki tümör hücreleri (DTH), dolaşımda bulunan ancak henüz sekonder tümör büyümesi oluşturmayan ve metastatik gelişim öncüsünün "tohumları" olduğu

düşünülen metastatik hücrelerdir. Herhangi bir kanser tedavisi öncesi prognoz, nüks ve olası ilaç direnci gibi konularda bilgi vererek hastaları, DTH içermeyen olgulara göre daha farkı/kişiselleştirilmiş bir terapiye yönlendirdiği için DTH'lerin ölçümü ve karakterizasyonunun prognostik açıdan önemi yüksektir. Primer veya non-metastatik kanserlerde DTH'lerin tespiti kötü prognozla ilişkilidir ve yüzlerce klinik çalışma şu anda kanser ilerleyişi ve hayatta kalma gibi konularda DTH'leri kullanmaktadır (308, 309). Çeşitli kanser türlerinden izole edilen DTH'lerde EMD ve kök hücre karakteristikleri incelenmiş, bu karakteristiklerin DTH'lerde hematojen yayılımını ve metastatik potansiyelini arttırdığı gözlenmiştir (310-314). Mezenkimal bir fenotip sergileyen DTH'ler ile daha agresif ve metastaza eğimli bir hastalık ilerleyişi arasında bir ilişki olduğu gözlenmiştir (309). EMD'yi işaret eden pek çok gen bulunsa da, bunların çok azı klinik açıdan DTH'lerin tanımlanması için kullanılmaktadır (315).

2.5.7 Klinik Açıdan EMD

Tipik olarak epitelyal belirteçler, hastalığın ilerlemesi ve metastazın meydana gelmesi gibi konularda güvenilir belirteçler olarak kullanılsa da bu belirteçlerin kaybolduğu durumlarda mezenkimal fenotip gösteren DTH'lerin gözden kaçma olasılığı yüksektir (314). Epitelyal ve mezenkimal belirteç düzeyleri arasındaki değişimler, EMD'yi göstermek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kaderin anahtarı (E-kaderin/N-kaderin) EMD için önemli bir göstergedir. Pek çok kanser tipinde E-kaderin'in tümör oluşumu ve metastazın ilerlemesinde tümör baskılayıcı bir rolü olduğunu göstermektedir (185, 316, 317).

Snail ve Twist klinik açıdan kabul görmüş EMD-TF belirteçleridir. Snail düzeylerinin yüksek olduğu üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde daha güncel terapilerin uygulanması gerektiği belirtilmiştir (318). Pek çok kanser türünde overekspresyonlarının aksine, Twist1 ve Twist2 ekspresyonları normal yetişkin dokularında neredeyse saptanamayacak düzeydedir.

Kanser araştırmalarındaki ilerlemelere rağmen, kanser tedavisinde hala önemli zorluklar bulunmaktadır. Altın standart olan kemoterapi tek başına bir monoterapi olarak ya da cerrahi ve / veya radyoterapi ile kombinasyon halinde kullanılır, ancak genellikle EMD, kanser hücrelerinde bu terapötik yaklaşımlara direnç gelişmesine neden olur (319). Son yıllarda monoklonal antikorlar ve küçük moleküller ile

hedeflenmiş kanser tedavilerinde büyük yollar kat edilmiş ve yüzün üzerinde hedefe yönelik tedavi pek çok klinik araştırmada kullanım için onaylanmıştır. Ancak birçok hastada uzun süreli kullanım sonra ilaç direnci ortaya çıkmış ve bu durum ilaç direncini ilaç keşfinde önemli bir faktör haline getirmiştir (320). İlaç direnci, ilaç akışını düzenleyen ATP bağlayıcı kaset (ABC) transport proteinlerinin ekspresyonların artması gibi intrinsik olabileceği gibi apoptozu indükleyen ajanlara karşı direnç kazanılması gibi ekstrinsik de olabilir. Slug, Snail, Twist, Foxc2 gibi birtakım EMD düzenleyici TF'lerin metastatik hücrelerde bu mekanizmaları indüklediği gösterilmiştir (320, 321). Bu nedenle tek bir EMD reseptörünü yerine EMD-TF'lere odaklanmak daha kapsamlı bir etki yaratabilir.

Bununla birlikte, EMD inhibitörlerinin tümör büyümesinin (yani tümör hücresi çoğalması veya hayatta kalması) aksine EMD ile ilişkili sonuçlar üzerinde en etkili olduğu varsayıldığından EMD inhibitörlerinin anti-tümörojenik ilaçlar birlikte kullanılması daha etkili olacaktır (322).

2.6 Tiroid Kanserinde EMD

Zeb1 ve Zeb2 gibi transkripsyon faktörleri epitelyal polaritenin birkaç önemli düzenleyicisinin bastırılmasında rol oynayan anahtar modülatörlerdir ve bu nedenle EMD ve metastatik sürece dahil olurlar. Bcl-2 ile ilişkili athanojen 3'ün (BAG3) β-katenin'in nükleer birikimini uyardığı ve transkripsiyonel aktivitesini artırarak tiroid tümör hücrelerinde Zeb1'in overekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Zeb1 overkekspresyonu E-kaderin transkripsiyonunu baskılar ve böylece EMD'nin aktivasyonuna yol açar (323). Bir başka transkripsiyon faktörü olan Twist1'in ATK'deki yüksek düzeylerinin hücre migrasyonu ve invazyonu ile apoptoza olan direnci arttırdığı; siRNA aracılı Twist1 susturumu sonrası bu etkilerin tersine döndüğü bildirilmiştir (324-326). Ayrıca folliküler karsinomada Twist1 overekspresyonu ve E-kaderin kaybı ile agresif tümör davranışı arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte Slug ekspresyonunun normal insan tiroid hücrelerinde eksprese edilmediği, ancak tiroid kanseri hücreleri ile metastazlarında yüksek oranda eksprese edildiği belirtilmiştir. Buehler ve arkadaşları ATK dokuları ve hücre hatlarında Slug düzeylerinin PTK ve FTK'ye göre daha yüksek düzeyde olduğunu bildirmişlerdir (324). Bununla birlikte, Sun ve arkadaşları ATK hücrelerinde Slug susturumu sonra

hücre migrasyonu ve invazyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (327). Başka bir çalışmada, Wu ve arkadaşları FTK ve ATK dokularında Slug upregülasyonu ile kötü diferansiyasyon arasında pozitif bir ilişki saptamışlardır (328).

Aynı zamanda bir transkripsiyon faktörü olan Y kromozumu üzerinde cinsiyet belirleyen bölgede yer alan (SRY)-box 9 (Sox9) geninin, PTK'da overekspresyonun Wnt/β-katenin yolu üzerinden hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu ile EMD sürecini kontrol ettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada Sox9 susturumu sonrası N-kaderin ile Wnt/β-katenin yolunun downstreaminde yer alan β-katenin, c-Myc ve siklin D1 düzeylerinde azalma, E-kaderin düzeylerinde artma gözlenmiştir (329). Embriyonik gelişimde rol alan FOXD3'ün ATK dokularında downregüle olduğu saptanmış ve ATK hücrelerinde bu genin baskılanması sonrası E-kaderin düzeylerinde azalma gözlenmiştir (84).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel *(in vitro)* bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuarları, İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi ve Araştırma Laboratuarı'nda Ağustos 2018-Haziran 2021 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırma hücre kültürü (*in vitro)* çalışması olması nedeniyle araştırmanın bir evreni ve örneklemi bulunmamaktadır.

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmada insan anaplastik tiroid kanseri hücre hattı 8505C [European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) No: 94090184] ve insan folliküler tiroid kanseri hücre hattı FTC-133 (ECACC No: 94060901) ticari olarak sırasıyla 2013 ve 2019 yıllarında satın alınmıştır. BCPAP insan papiller tiroid kanseri hücre hattı [Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) No: ACC273] ise Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı (İzmir-Türkiye) öğretim üyesi Prof. Dr. Hilal KOÇDOR tarafından hediye edilmiştir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken: NDRG2 transfeksiyonu
Bağımsız değişken: mRNA ve gen ekspresyonları, metastatik hücre davranışındaki değişimler

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler ve kitler ile cihazlar sırasıla Tablo 6'da belirtilmiştir.

Tablo 6. Araştırmada kullanılan malzeme ve kitlerin markaları ile kod numaraları

Malzeme/Kit Adı	***Markası***	***Kod Numarası***
8505C Hücre Hattı	ECACC	94090184
BCPAP Hücre Hattı	DSMZ	ACC273
FTC-133 Hücre Hattı	ECACC	94060901
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	GIBCO	21870
Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)	GIBCO	21331
FETAL DANA SERUM (FBS)	GIBCO	10270106
L-glutamin	GIBCO	25030081
Penisilin/Streptomisin	GIBCO	15140122
Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) (10X)	LONZA	BE17-517Q

Tablo 6. Araştırmada kullanılan malzeme ve kitlerin markaları ile kod numaraları (devam)

Tripsin/EDTA	GIBCO	25200-056
Tripan Mavisi	BIOCHROM	L6323
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Fischer Scientific	EC-200-664-3
Cryo Tüp	Isolab	09111102
25 cm^2'lik Kültür Kabı	Sarstedt	83.3910002
75 cm^2'lik Kültür Kabı	Sarstedt	83.3911002
6 Kuyucuklu Plak	Greiner Bio-one	657160

24 Kuyucuklu Plak	Greiner Bio-one	662160
96 Kuyucuklu Plak	Greiner Bio-one	655101
Steril Tüp (15 mL)	Sarstedt	62.554.502
Steril Tüp (50 mL)	Sarstedt	62.547.254
NDRG2 siRNA	Dharmacon	L-013858-00-0010
Non-Target siRNA	Dharmacon	D-001810-10
siRNA Transfeksiyon Reaktifi	Dharmacon	T-2002
NDRG2 Ekspresyon Plazmidi	Origene	212237
Boş Plazmid	Origene	PS100010
Plazmid DNA Transfeksiyon Reaktifi	Thermo Scientific	L3000008
Escherichia coli (E.Coli) Kompetent Hücre	Thermo Scientific	C404010
Super Optimal Broth with Catabolites Repression (S.O.C) Ortamı	Thermo Scientific	15544034
Lysogeny broth (LB) Agar	Sigma	19344
Lysogeny broth (LB) Broth	Fluka	L3152
Ampicilin	Sigma	A9393
Öze	İsolab	S.082.03.001.001
Petri Kabı	İsolab	S.081.01.060

Tablo 6. Araştırmada kullanılan malzeme ve kitlerin markaları ile kod numaraları (devam)

Plazmid İzolasyon Kiti	Qiagen	#12362
Total RNA İzolasyon Kiti	Macherey-Nagel	740955.50
cDNA Sentez Kiti	New England Bioscience	6300S
Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Master Mix	Roche	06402712001

RT-PCR Plate	Roche	04729692001
NDRG2 PCR Primer	Invitrogen	C230G12-13
Snail (SNAI1) PCR Primer	Invitrogen	V6158C01-02
Slug (SNAI2) PCR Primer	Invitrogen	V6158B05-06
Twist1 PCR Primer	Invitrogen	V6158B11-12
Vimentin PCR Primer	Invitrogen	V6158B09-10
E-kaderin (CDH1) PCR Primer	Invitrogen	V6158B07-08
N-kaderin (CDH1) PCR Primer	Invitrogen	C0205H09-10
α-aktinin PCR Primer	Invitrogen	C0205H10-11
DNA Ladder	New England Bioscience	#N0469S
Biçinkoninik Asit (BCA) Total Protein Tayin Kiti	Thermo Scientific	23225
Matrigel	Corning	356237
Motilite/İnvazyon Kuyuları	Falcon	353097
Diff-Quik Stain Set	Siemens	B4132-1A
Agaroz	Biomax	HS8000
Etidyum bromür	Sigma	E8751
Gliserol	AppliChem	A1123
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Sigma	E02P

Tablo 6. Araştırmada kullanılan malzeme ve kitlerin markaları ile kod numaraları (devam)

3-(N-morpholino) propansülfonik asit (MOPS)	Sigma	M1254
N, N-dimetil formamid	Sigma	D8654
Sodyum Asetat	CODEY	366207
Akrilamid	Amresco	0172
N,N'metilen bisakrilmaid	AppliChem	A3636

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma	L9340
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma	T7024
Amonyumpersülfat (APS)	Sigma	A9164
İsopropanol	Riedel de Haen	24137
Tris-Baz	Applichem	A1086
Tis-HCl	Sigma	T5941
Sodyum Klorür (NaCl)	Riedel de Haen	13423
Kalsiyum Klorür ($CaCl_2$)	Riedel de Haen	12022
Nonidet p40 (NP-40)	AppliChem	A1694
Sodyum Florür (NaF)	Sigma	S-1504
Phenylmethylsulfonyl flüoride (PMSF)	Sigma	P7626
Leupeptin	Sigma	L2884
Pepstatin	Sigma	P5318
Isopropanol	Riedel de Haen	24137
Glisin	Sigma	G8898
Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific	26619
Tween-20	Merck	8.22184.500
Yağsız Süt Tozu	Sigma	70166
Metanol	Merck	1.060.18.2500

Tablo 6. Araştırmada kullanılan malzeme ve kitlerin markaları ile kod numaraları (devam)

Poliviniliden Florür (PVDF) Membran	Millipore	IPVH00010
Whatmann Kağıdı	Biorad	1703969
NDRG2 Primer Antikor	Cell Signaling Technology	5667S
Slug Primer Antikor	Cell Signaling Technology	9585S
Snail Primer Antikor	Cell Signaling Technology	3895S

Twist Primer Antikor	Cell Signaling Technology	46702S
Vimentin Primer Antikor	Cell Signaling Technology	5741S
E-kaderin Primer Antikor	Cell Signaling Technology	3195S
α-aktinin Primer Antikor	Cell Signaling Technology	3134S
Anti-rabbit IgG, HRP Sekonder Antikor	Cell Signaling Technology	7074S
594 sekonder antikor		
4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Cell Signaling Technology	4083
Mounting Medium	Abcam	Ab104135
Enhanced Chemiluminescence (ECL) Substrat	Millipore	WBLUF0500

Tablo 7. Araştırmada kullanılan cihazların markaları ve model/kod numaraları

Cihaz Adı	***Markası***	***Model/Kod Numarası***
Laminar Akımlı Kabinet	ESCO	EQR / GL-64
CO_2 İnkübatörü	Thermo	Model:311
Ters-faz Işık Mikroskobu	Nikon	ECLIPSE TS100
İmmünfloresans Mikroskop	Olympus	BX61
Nanodrop	Thermo	NanoDrop3300

Tablo 7. Araştırmada kullanılan cihazların markaları ve model/kod numaraları (devam)

Thermal Block Cycler	Applied Biosystems	SimpliAmp Thermal Cycler
RT-PCR Cihazı	Roche LightCycler 480	Versiyon 2.0
RT-PCR Yazılımı	Roche LightCycler 480 Software	Versiyon 1.5.0

Horizontal Elektroforez Sistemi	Embitec	RunOne Electrophoresis Cell
Vertikal Elektroforez Sistemi	Biorad	Mini Sub Gell GT
Güç Kaynağı	Biorad	PowerPac Basic
Wet Transfer Sistemi	Biorad	Mini Trans Blot
Semi-dry Transfer Sistemi	Biorad	Trans-blot Turbo
Membran Görüntüleme Cihazı	UVP	EC3 Chemi HR 410
Plak Okuyucu	Biotek	Synergy HT
Termal Isıtıcı Blok	Stuart	SBH130D
Lab Roller	Labnet	H5000
Hassas Terazi	Precisa	XB 220A
Manyetik Karıştıcı	VELP Scientificia	F20520162
pH Metre	J.P. Selecta	4120500
Soğutmalı Etüv	VELP Scientificia	FOC 225E
Sabit Açılı Santrifüj	Heraeus	Biofuge Stratos
Vorteks	Thermo Scientific	88880018
Salınımlı santrifüj	Hettich	320R
Otoklav	Hirayama	HICLAVE HV-50
Spinner	WISD	Wisespin CF-45
Derin Dondurucu -80^0 C	Thermo	Forma Model 705
Derin Dondurucu -20^0 C	Bosch	KDN56NW20N/12
Buzdolabı +4^0 C	Bosch	KDN56NW20N/12

3.6.2. Yöntemler

3.6.2.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada primer (8505C) ve metastatik (BCPAP ve lenf nodu metastazı FTC-133) tiroid kanseri hücre hatları kullanıldı. Bu hücre hatlarına ait genel bilgiler Tablo 8'de özetlenmiştir. Tüm çalışmalar Sınıf II Laminar Flow içerisinde aseptik koşullar altında gerçekleştirildi.

Tablo 8. Araştırmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri

Hücre Hattı	**Cinsiyet**	**Doku**	**Morfoloji**	**Tümör Evresi**	**Türü**
8505C	Kadın (78 yaş)	Tiroid	Epitel	Primer Tümör (indiferansiye karsinoma)	Anaplastik Tiroid Kanseri
BCPAP	Kadın (76 yaş)	Tiroid	Epitel	Metastatik	Papiller Tiroid Kanseri
FTC-133	Erkek (42 yaş)	Tiroid	Epitel	Metastatik, Lenf Nodu	Folliküler Tiroid Kanseri

8505C ve BCPAP hücreleri %10 inaktif FBS, 2 mM L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640, FTC-133 hücreleri ise %10 FBS, 2 mM L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12 bazal ortamları içeresinde 37 °C'de %5 CO_2 içeren inkübatöründe inkübe edildiler.

3.6.2.1.1 Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

Önceden hazırlanan ve 4 °C'de saklanan %10 serum içeren ortamlar 37 °C'e ısıtıldı.

1. Her bir hücre hattı için birer adet 25 cm^2'lik hücre kültür kabı hazırlandı.
2. Dondurma tüpleri içindeki hücreler azot tankından veya -80 °C'den çıkarılarak hızlıca çözüldü.
3. Çözünmüş olan hücreler pipet ile 2-3 kez süspanse edilerek 15 ml'lik steril tüplere aktarıldı ve üzerlerine 9 ml büyüme ortamı eklenerek pipet ile 1-2 kez alt üst edildi.
4. Tüpler oda sıcaklığında 1.300 round per minute (rpm) 5 dk santrifüjlendi.
5. Üst faz atılıp, dipte kalan çökelti 2-3 ml büyüme ortamı ile süspanse edilerek ve uygun kültür kaplarına aktarılarak üzeri ortam ile uygun hacime tamamlandı.
6. Bir gün sonra (16-20 saat) hücrelerin morfolojileri ve yüzeye tutunma oranları ters-faz ışık mikroskop ile değerlendirildi.

3.6.2.1.2 Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

1. Hücre süspansiyonunda bulunan hücrelerin %0,4'lük tripan mavisi ile canlılıkları kontrol edildi.
2. 1:1 oranında hücre süspansiyonu örneği ile tripan mavisi bir ependorf içinde karıştırıldı.
3. Santrifüj sonunda dipte kalan çökeltinin miktarına göre, gerek görüldüğü yerde steril 1x PBS ile seyreltmeler yapıldı.
4. Hücre süspansiyonundan 10 µL alınarak Neubauer Lamı ve lamel arasına yayıldı.
5. Neubauer lamının 16 küçük kare içeren 4 farklı alanındaki canlı ve ölü hücrelerin tümü ters faz ışık mikroskobu ile sayılarak, canlı ve ölü hücre sayısının ortalaması alındı.
6. Ölü ve canlı hücre sayısı formül 3.1'deki gibi hesaplandı:

   [**Hücre sayısı/ml:** Ortalama sayım değeri X seyreltme faktörü X 10^4]

3.6.2.1.3 Hücrelerin Kültür Ortamlarının Değiştirilmesi

1. Hücre kültürü kaplarında idame edilen hücrelerin bulunduğu kültür kaplarındaki doluluk, her gün ters faz ışık mikroskop ile değerlendirildi.
2. Pasajlama için yeterli doluluğa erişmeyen fakat ortamları sararan hücrelerin ortamları, hücre hattına uygun ilgili ortam ile değiştirildi.
3. Bu amaçla, hücre kültür kaplarındaki ortamlar atıldı.
4. Ölü hücreleri uzaklaştırmak için hücre kültür kapları 37 ºC'ye ısıtılmış steril 1 x PBS ile yıkandı.
5. Ardından hücre kültür kaplarına taze ortam eklendi.
6. Kültür kapları %90 doluluğa eriştiğinde hücreler pasajlandı.

3.6.2.1.4 Hücrelerin Pasajlanması

1. Hücre kültür kaplarının içindeki ortam atıldı.
2. Kapların yüzeyi ölü hücreleri ve kalan ortamı uzaklaştırmak için 37 ºC'de önceden ısıtılmış steril 1 x PBS ile yıkandı.

3. 25 cm^2'lik kültür kaplarına 1 ml, 75 cm^2'lik hücre kültür kaplarına 2 ml ve 175 cm^2'lik hücre kültür kaplarına 4 ml önceden 37°C'de önceden ısıtılmış tripsin/EDTA ilave edildi.
4. Hücre kültür kapları 1 dakika %5 CO_2 içeren 37 °C'deki inkübatörde bekletildi. Hücrelerin morfolojileri ters ışık mikroskobunda kontrol edildi.
5. Kalkmayan hücreler, hücre kültürü kabının tabanına hafifçe vurularak fiziksel kuvvet ile kaldırıldı.
6. Hücrelerin kültür kabının yüzeyinden ayrıldığı mikroskop altında doğrulandıktan sonra tripsin/EDTA'yı inhibe etmek amacıyla, hücre kültür kaplarına en az tripsin/EDTA miktarı kadar büyüme ortamı ilave edildi ve hücreler steril 15 ml'lik steril falkon tüplere aktarıldı.
7. Hücre kültürü kapları 37 ºC'de ısıtılmış steril 1 x PBS ile yıkandıktan sonra aynı falkon tüplere aktarıldı. Bu şekilde kalkan, ancak kültür kabı yüzeyinden ayrılmayan hücrelerden doğan kaybın önüne geçildi.
8. Tüpler oda sıcaklığında 1.300 rpm'de 5 dk santrifüjlendi.
9. Santrifüj sonunda üst kısım atıldı ve hücre pelleti uygun kültür ortamıyla süspanse edildi.
10. Hücre süspansiyonu, daha önce kültür ortamı konulan hücre kültür kaplarına eşit olarak dağıtıldı. Hücre kültür kapları dairesel hareketlerle, hafifçe birkaç defa çalkanarak hücrelerin hücre kültür kabı yüzeyine homojen bir şekilde dağılması sağlandı.
11. Hücrelerin durumu ters faz ışık mikroskobunda değerlendirildi.
12. Hücre kültür kaplarına hücre hattının adı, pasaj sayısı ve pasajlanma tarihi yazıldı.
13. Hücreler %5 CO_2 içeren 37 °C'deki inkübatöre kaldırıldı.

3.6.2.1.5 Hücrelerin Dondurulması

1. %50 FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin -100 µg/ml streptomisin ve %10 DMSO içeren RPMI 1640 veya DMEM/F12 dondurma ortamları hazırlandı.
2. Hücre sayılarak yaklaşık 1x 10^6 hücre/ml olacak şekilde dondurma tüplerine (cryo tüp) paylaştırıldı.

3. Dondurma tüpleri önce -20 °C'de 1 saat bekletildikten sonra hücrelerin ihtiyaç duyulan saklama zamanına göre -80 °C'ye veya -180 °C'ye (sıvı nitrojen) kaldırıldı.

3.6.2.1.6 Hücrelerin Sayılması

1. Pasajlanma işleminde ilk basamakların uygulanmasının ardından uygun kültür ortamı ile süspanse edilmek suretiyle homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 50 µl alındı.
2. Hücre süspansiyonu, tripan mavisi bir ependorf tüp içinde (1:1) karıştırıldı.
3. Sayımı kolaylaştırmak ve doğruluğunu arttırmak amacıyla gerek görüldüğü yerde steril 1x PBS ile seyreltmeler yapıldı.
4. Seyreltilmiş hücre süspansiyonunun 10 µL'si, Neubauer Lamı ve lamel arasına yayıldı.
5. Ters-faz ışık mikroskobunda 10X büyütmede sayım yapıldı.
6. Neubauer lamının 16 küçük kare içeren 4 farklı alanındaki canlı ve ölü hücrelerin tümü ters faz ışık mikroskobu ile sayılarak, canlı ve ölü hücre sayısının ortalaması alındı.
7. Hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını (hücre sayısı/ml) belirlemek için formül 3.2'den yararlanıldı:

[**Hücre sayısı/ml:** Ortalama sayım değeri x seyreltme faktörü x 10^4]

[**% Hücre canlılığı:** (canlı hücre sayısı) / (ölü+canlı hücre sayısı) x 100]

3.6.2.2 Plazmid DNA Transfeksiyonu ile NDRG2'nin Overekspresyonu

3.6.2.2.2 Plazmid Transformasyonu

Bir hücrenin içine dışarıdan bir DNA parçasının girmesi ve hücrenin genomuyla bütünleşmesi sonucu hücrede gerçekleşen genetik değişikliğe transformasyon denir. Hücre dışında bulunan serbest DNA fragmanları ancak kompetent haldeki bakteri, mantar, alg, maya ya da bitki hücrelerine girebilir. Doku kültüründeki ökaryotik hayvan hücrelerinde gerçekleşen transformasyon ise transfeksiyon olarak adlandırılır

(330). Bu tekniğin amacı, ticari olarak satın alınan ve klonlama vektörler ile tasarlanan bir plazmidi bakteri aracılığı çoğaltmak ve yüksek miktarlarda üretmektir.

Transformasyon ile hücre dışındaki serbest DNA'nın hücre içine alınabilmesi için bakterinin kompetent halde olması gerekir. Bir bakteri hücresi laboratuvar koşullarında kompetent hale getirebilindiği gibi, bu durum doğada hücrenin bulunduğu ortam koşullarının değişmesi sonucu da ortaya çıkabilir. Bakteri yaşamını tehdit eden ve bu nedenle de bakterileri kompetent hale sokan çevresel koşullara örnek olarak ortamda besinin azalması ya da antibiyotik olması verilebilir (331).

Bu çalışmada plazmid transformasyonu için konakçı olarak, One Shot kimyasal kompetent E. Coli hücreleri kullanıldı. E.coli hücreleri tam boy NDRG2 DNA'sını içeren NDRG2-pCMV6-AC-GFP plazmidi ile transforme edildi. Daha sonraki adımlarda hücrelerde transfeksiyon sonrası meydana gelecek olası değişimlerin etkisinin NDRG2-pCMV6-AC-GFP plazmidine ait olduğunu veya transfeksiyonun neden olduğu yanlış pozitif bir sonuç olup olmadığını doğrulamak için boş vektör pCMV6-AC-GFP plazmidi kullanıldı. Ancak daha önceki çalışmalarımızda bu plazmid, transformasyon ile bol miktarda elde edildiği için pCMV6-AC-GFP için transformasyon adımı tekrarlanmadı. Transforme olan bakterilerin seçilimi için, plazmidde yer alan, ampisiline karşı direnç gösteren β-laktamaz enzimini eksprese eden Amp^r geninden yararlanıldı.

1. Öncelikle 100 µg/ml ampisilin içeren, 50-55°C sıcaklıktaki %3,5 LB agar, laminar kabinde 15 ml olacak şekilde petri kaplarına dağıtıldı.
2. Oda sıcaklığında donana kadar bekletildikten sonra ters çevrilerek 37 ºC'de 30 dakika bekletildi.
3. NDRG2-pCMV6-AC-GFP plazmidi; son konsantrasyu 100µg/ml olacak şekilde kompetent E.Coli hücreleri ile karıştırıldı.
4. Tüp buz üzerinde 30 dakika, 42 ºC'de 30 saniye (sıcaklık şoku), buz üzerinde 2 dakika inkübe edildi.
5. Isı şoku sonrası strese giren transforme E.Coli hücrelerinde sağkalımı ve buna bağlı olarak transformasyon verimini arttırmak için peptid, aminoasid, vitamin ve glukoz açısından zengin olan S.O.C ortamı kullanıldı.
6. Bu bağlamda tüpe 250 µl oda sıcaklığına getirilmiş S.O.C ortamı eklendi ve orbital karıştırıcıda 37ºC ve 225 rpm'de 1 saat inkübe edildi.

7. İnkübasyon sonunda 10 µl ve 100 µl olacak şekilde agar petrilere pipetlendi ve steril özeyle yayılarak ekim yapıldı.
8. Bir adet agar petri havadan geçirilerek kontaminasyon kontrol petrisi olarak işaretlendi. Petri kapları ters çevrilerek 37 ºC'de gece boyu inkübe edildi.
9. Süre sonunda kontrol petrisinde üreme olmadığı onaylandı.
10. Ekim yapılan petri kaplarından koloniler, koloni PCR yöntemi ile transformasyonun doğrulanması için seçildi

3.6.2.2.2 Koloni PCR ile Uygun Kolonilerin Seçimi

1. Seçilen kolonilerde NDRG2'ye ait plazmidin bulunup bulunmadığı koloni PCR çalışması ile kontrol edildi.
2. Kolonilerin her biri 10 µl nükleaz içermeyen suda çözüldü.
3. Her bir süspansiyondan 4 µl alındı ve hücreler termal şok ile 95 ºC'de 10 dakika, -20 ºC'de 5 dakika ve 95 ºC'de 5 dakika inkübe edilerek lize edildi.
4. Liziz sonucunda elde edilen DNA'nın, NDRG2'ye spesifik primerlerle amplifikasyonu için RT-PCR deneyi kuruldu. RT-PCR için Roche Light Cycler 480 (LC480) cihazında uygulanan ısı profili Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. RT-PCR için LC480 cihazında uygulanan ısı profili

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	5 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	30
Bağlanma (Annealing)	62	30 saniye	
Uzama	72	30 saniye	
Son Uzama (Final Extension)	72	5 dakika	1

5. RT-PCR sonrası cycle threshold (C_T) değerleri incelenerek transformasyonun gerçekleştiği doğrulandı ve kolonilerden en uygunu seçilerek transformasyona devam edildi.

3.6.2.2.3 Kolonilerin Küçük ve Büyük Hacimli Üretimi

1. NDRG2 plazmidi taşıdığı doğrulanan kolonilerin 6 µl'si, 100 µg/ml ampisilin içeren %2'lik LB Broth tüplere inoküle edildi.
2. Tüpler orbital çalkalıyıcıda 37 °C ve 150 rpm'de çalkalanarak yaklaşık 6 saat inkübe edildi.
3. Küçük hacimli üretimin ardından büyük hacimli üretim yapılmak üzere 5 ml hücre süspansiyonu 100 µg/ml ampisilin içeren 300 ml %2 LB Broth içerisine aktarılarak orbital çalkalıyıcıda 37ºC ve 150 rpm'de gece boyu inkübe edildi.

3.6.2.2.4 Plazmid DNA'nın İzolasyonu

Plazmid izolasyonu endofree plasmid maxi kit (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirildi. Qiagen plazmid saflaştırma protokolünün prensibi ve prosedürü, plazmid DNA'nın uygun düşük tuz konsantrasyonu ve pH koşullarında reçineye bağlanmasını takip eden, modifiye edilmiş alkali lizisine dayanır.

1. Öncelikle bakteri hücreleri, 6.000 g'de 15 dakika +4 °C'de santrifüj ile çöktürüldü.
2. Ardından 10 ml RNaz A içeren P1 tamponu ile vortekslenerek resüspanse edildi.

3. Her tüpe 10 ml P2 tamponu konularak alt üst edildi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Elde edilen lizata 10 ml soğuk P3 tamponu konularak hızla karıştırıldı.
5. Daha sonra hücre lizatı QIA filtresine konuldu ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra piston yardımıyla 50 ml'lik bir tüpe filtre edildi.
6. Filtre edilen lizatın üzerine 2,5 ml ER tamponu konuldu ve buz içerisinde 30 dakika inkübe edildi. QIAGEN-tip 500'e 10 ml QBT tamponu uygulandıktan sonra yerçekimi ile kolonun boşalması sağlandı.
7. Ardından filtrelenmiş lizat QIAGEN-tip 500'e uygulandı ve yerçekimi etkisiyle lizatın reçineye girmesi sağlandı. QIAGEN-tip 2 kere 30 ml QC tamponu ile yıkandı.
8. Son olarak 15 ml QN tamponu ile DNA elue edildi ve 10,5 ml oda sıcaklığındaki izopropanol eklenerek DNA çöktürüldü.
9. Elde edilen DNA daha sonra 4 °C'de 30 dakika 15.000 g'de santrifüj edilerek çöktürüldü.
10. Süpernatant atıldıktan sonra DNA pelleti, 5 ml endotoksin içermeyen oda sıcaklığındaki %70 etanol ile yıkandı ve 10 dakika 15.000 g'de santrifüjlendi.
11. Süpernatant dikkatlice boşaltıldıktan sonra pellet havada 5-10 dakika kurutuldu.
12. Elde edilen plazmid 300µl DNaz, RNaz içermeyen suda çözüldü ve Nanodrop 2000 cihazında nükleik asit konsantrasyon ve saflık spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.6.2.2.5 Plazmid DNA'nın Transfeksiyonu

Plazmid transkfeksiyonu için lipid nanopartikül teknolojisine dayanan Lipofectamin 3000 transkfeksiyon kiti kullanıldı. 8505C, BCPAP ve FTC-133 hücrelerinde plazmid DNA transfeksiyonu için öncelikle aşağıdaki deney grupları oluşturuldu:

- NDRG2 + AC-GFP NDRG2-pCMV6-AC-GFP plazmidini içeren grup (NDRG2 + AC-GFP)
- pCMV6-AC-GFP plazmidini içeren grup [Boş vektör (AC-GFP)]
- Kontrol grubu

Her bir hücre hattına ilişkin yapılan deneyin türü, hücre sayısı, kültür kabı, transfeksiyonlar için kullanılan reaktifler ile plazmid DNA'ların miktarları Tablo 10'da gösterilmiştir. Lipofectamin 3000™ reaktifi belirli bir hücre sayısı aralığında sabit tutulurken, p3000™ reaktifi ile plazmid DNA konsantrasyonu arasında 0,005 katlık bir oran bulunmaktadır.

Tablo 10. Hücre hatları ve deneylere ilişkin hücre sayıları, Lipofectamin 3000™ ve p3000™ ile plazmid DNA miktarları.

Hücre Hattı	**Deney Adı**	**Kültür Kabı**	**Hücre Sayısı**	**Lipofectamin 3000™ Reaktifi (µl)**	**p3000™ Reaktifi (µl)**	**Plazmid DNA (ng/ml)**
8505C	• RT-PCR • Western Blot	25 cm^2 flask	$1x10^6$	2,25	3,0	600
	• Matrijel İnvazyon • Transwell Migrasyon • Adhezyon	6 kuyulu plak	$2x10^5$	1,5	1,5	300
	• Yara İyileşmesi	6 kuyulu plak	$4x10^5$	0,75	1,5	300
BCPAP	• RT-PCR • Western Blot	25 cm^2 flask	$1x10^6$	2,25	3,0	600
	• Matrijel İnvazyon • Transwell Migrasyon • Adhezyon	6 kuyulu plak	$2x10^5$	0,75	1,5	300
	• Yara İyileşmesi	6 kuyulu plak	$4x10^5$	0,75	1,5	300
FTC-133	• RT-PCR • Western Blot	25 cm^2 flask	$1x10^6$	2,25	1,0	200
	• Matrijel İnvazyon, • Transwell Migrasyon • Adhezyon	6 kuyulu plak	$2x10^5$	1,5	1,0	200
	• Yara İyileşmesi	6 kuyulu plak	$4x10^5$	1,5	1,0	200
	• WST-1	96 kuyulu plak	$5x10^3$	0,06	değişken	değişken

1. İlk olarak kültür kaplarına hücreler ekildi ve flask/plak yüzeyine tutunmaları için bir gece inkübatörde inkübe edildi.
2. Lipofectamin 3000™ reaktifi, 125 µl antibiyotiksiz ve serumsuz ortamla Tablo 14'te belirtilen miktarlarda karıştırıldıktan sonra 2-3 saniye vortekslendi.

3. Ayrı bir tüpte plazmid DNA'lar Tablo 14'te belirtilen miktarlarda 125 µl antibiyotiksiz ve serumsuz ortamla karıştırıldı
4. Transfeksiyon reaktifi ve plazmid DNA çözeltileri 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra DNA-lipid kompleksinin oluşumu için karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. Hazırlanan lipozom çözeltisi 8505C ve BCPAP hücrelerine %10 FBS, 2 mM L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI 1640, FTC-133 hücrelerine ise %10 FBS, 2 mM L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin DMEM/12 ortamlarında verildi. Hücreler DNA-lipid kompleksi içeren ortamlarla CO_2 inkübatöründe 37 ºC'de 24 saat inkübe edildi.
6. Süre sonunda ortamlar DNA-lipid kompleksini içeren ortamlar uzaklaştırılarak hücrelerin ortamları yenilendi. Western blot ve RT-PCR deneyleri için hücrelerde CO_2 inkübatöründe 37 ºC'de 24 saat daha inkübe edildikten sonra hücreler toplandı. Total protein ve RNA izolasyonları yapılarak lizatlar ve RNA'lar -80^0 C'de saklandı.
7. Matrijel invazyon, transwell migrasyon, adezyon ve yara iyileşmesi deneyleri için deneyden 12 saat önce hücrelerinde ortamları %1 FBS, 2 mM L-Glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren ortamlarla (RPMI1640 ve DMEM/F12) değiştirildi.

3.6.2.2.4 Hücre Canlılık Tayini

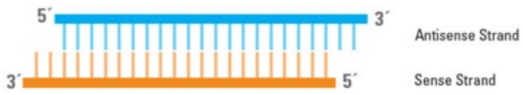
Plazmid DNA transfeksiyonu FTC-133 hücrelerinin canlılığını olumsuz yönde etkilediği için uygun plazmid konsantrasyonu WST-1 (4-[3-(4- iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonat) ile belirlendi. Bu amaçla 96 kuyulu plağın kuyularına 100 µl ortam içersinde $5x10^3$ FTC-133 hücresi ekildi ve hücreler bir gece CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Ertesi gün hücreler 100 µl ortam içeresinde 600-300-200-100-50 ng/µl NDGR2+ACF-GFP ve AC-GFP plazmidleri ile transfekte edildiler. FTC-133 hücre canlılığında görülen olumsuz etkinin transfeksiyon işleminden kaynaklanıp kaynaklanmadığını görmek için pDNA içermeyen, Lipofectamin3000™ ile p3000™ reaktiflerinden oluşan negatif kontrol grupları oluşturuldu. Hücreler 24 ve 48 saat CO_2 inkübatöründe inkübe edildikten sonra kuyulara 10 µl WST-1 reaktifi ışıksız ortamda eklendi. Karbondioksit inkübatöründe

iki ve üç saatlik inkübasyonlar sonunda 450 nm dalga boyunda (Referans dalga boyu: 632 nm) absorbans ölçümler alındı. Absorbans değerlerinden kör değeri çıkarıldıktan sonra Formül 3.3 ile % canlılık değerleri hesaplandı:

[**% Canlılık** = (Ortalama Örnek ABS / Ortalama Kontrol ABS) x 100]

3.6.2.3 siRNA Transfeksiyonu ile NDRG2'nin Susturumu

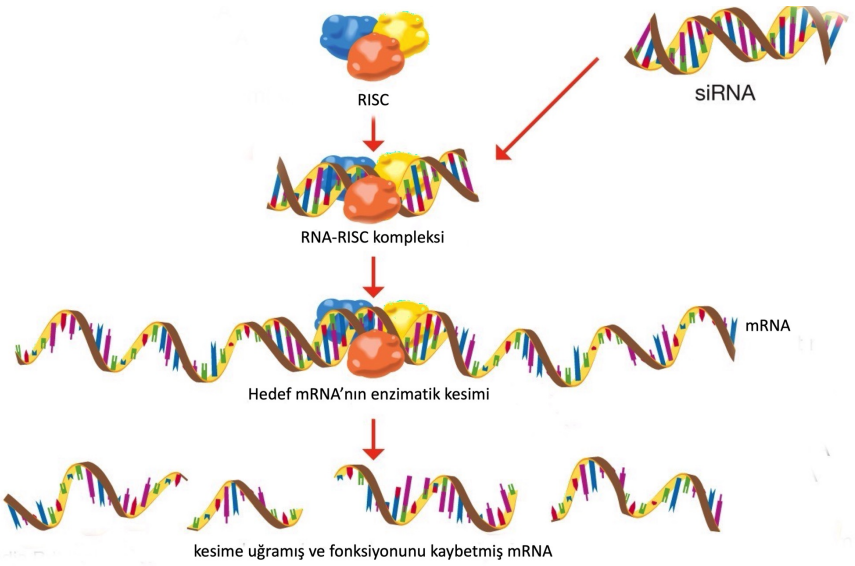
Small ya da short interfering RNA'lar (siRNA), protein kodlayan genlerinin kısa süreli susturumunu indüklemek için yaygın olarak kullanılan bir RNA interferans (RNAi) aracıdır. Hedeflenen mRNA'ya spesifik, sentetik olarak üretilen 20-25 nükleotitlik sense ve antisenseden oluşan oligozincirler ile hedef mRNA'nın yıkılımı ve hedef genlerin dolaylı olarak susturulması amaçlanır (Şekil 10).



Şekil 10. siRNA'nın genel yapısı (332)

siRNA'lar geçici susturma sağladığından, deneyler iki-dört günlük nispeten kısa zaman çerçeveleriyle sınırlıdır. siRNA'lar ayrıca uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) gibi protein kodlamayan genlerin susturulması edilmesi için de kullanılabilir.

siRNA'ların çift zincir olarak sentezlenmesindeki neden bir çok ökaryotta bulunan, viral enfeksiyonlar gibi çift zincir RNAları (ds-RNA) tanıyarak kesen, bir nevi savunma mekanizması sağlayan RNA-uyarımlı susturum kompleksininin (RISC) "dikkatini çekmektir". siRNA, hücreye girdikten sonra RISC, çift zincirli siRNA'ya bağlanır ve zincirlerden birini ayırır. Ayrılan zincir uzaklaştırılırken diğer zinciri taşıyan olgun RISC post translasyonel gen susturumu için hedef mRNA'nın degredasyonunu tetikler. Bu, siRNA-RISC kompleksinin komplementer mRNA sekansına bağlanması ve RISC proteinin bu sefer hedef mRNA'yı kesmesi ile gerçekleşir. Böylece mRNA işlevsiz hale gelir ve yani "susturulur" (333) (Şekil 11).



Şekil 11. siRNA'nın çalışma mekanizması (333)

FTC-133 hücrelerinde NDRG2 gen susturumu için 100 nM siRNA (Dharmacon) transfeksiyonu yapıldı. Bu amaçla öncelikle aşağıdaki deney grupları oluşturuldu:

- 100 nM NDRG2 siRNA grubu,
- 100 nM Non-target siRNA grubu,
- Kontrol grubu

1. Western blot ve RT-PCR çalışmaları için 25cm^2 flasklara 5x10^5 hücre, matrijel invazyon, hücre migrasyonu ve hücre adezyonu için 6 kuyu plaklara 2x10^5 hücre ve yara iyileşmesi için 24 kuyulu plaklara 1x10^5 hücre ekildi.
2. Hücrelerin flask/plak yüzeyine tutunmaları için bir gece %5 CO_2 ve 37 ºC'de inkübe edildi. Ertesi gün 2x10^4 FTC-133 hücresi başına 0,2 µl olacak şekilde transfeksiyon reaktifi hazırlandı. Bu bağlamda;
   - 25cm^2 flasklar ve 6 kuyulu plak için sırasıyla 2,5 µl ve 1 µl transfeksiyon reaktifi, 200 µl antibiyotiksiz ve serumsuz ortam içeren nuclease free tüplerde;
   - 24 kuyulu plak için 0,5 µl transkfesyion reaktifi 50µl antibiyotiksiz ve serumsuz ortam içeren nükleaz free tüplerde hazırlandı. Tüpler iki-üç saniye hafifçe vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
3. Benzer şekilde ayrı nuclease free tüplerde 100 nM SCN5A siRNA ve Non-target siRNA, 25cm^2 flasklar ve 6 kuyulu plak için 200 µl, 24 kuyulu plak

için 50µl antibiyotiksiz ve serumsuz ortamda hazırlandı. Tüpler 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. Transfeksiyon reaktifi ile siRNA çözeltileri 1:1 oranında iyice karıştırıldı ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. Flaskların/kuyuların ortamları taze ortamla değiştirildikten sonra deney gruplarına hazırlanan siRNA ve Non-target siRNA çözeltileri verildi. Ardından hücreler 37 ºC'de CO_2 inkübatöründe 24 saat inkübe edildi.
6. Süre sonunda siRNA içeren ortamlar uzaklaştırıldı ve flask/plaklara taze ortam konuldu.
7. Western blot ve Real Time PCR çalışmalarında kullanmak üzere siRNA transfeksiyonundan 48 saat sonra hücreler toplanarak total RNA ile total protein izolasyonları gerçekleştirildi.
8. Matrijel invazyon, transwell migrasyon, adezyon ve yara iyileşmesi deneyleri için deneyden 12 saat önce hücrelerinde ortamları %1 FBS, 2 mM L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren ortamla değiştirildi.

3.6.2.4 Real Time PCR

3.6.2.4.1 Total RNA İzolasyonu

Hücrelerden total RNA izolasyonu adımında, genomik DNA kontaminasyonun rekombinant DNaz (rDNaz) ile giderildiği kolon sistemine dayalı "M&N Nucleospin Total RNA İsolation" kiti kullanıldı.

1. $5x10^5$ hücreye karşılık gelen hücre süspansiyonu 1,5 ml'lik nükleaz içermeyen tüplere aktarıldı.
2. Tüp oda sıcaklığında 2.500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
3. Santrifüj sonrası üst faz atıldı.
4. Pelletlerin üzerine 350 µl lizis tamponu ve 3,5 µl β-merkaptoetanol eklenerek yaklaşık 30 saniye vortekslendi.
5. Kit ile gelen Nucleospin® filtre tüpleri, 2 ml'lik toplama tüplerinin içine yerleştirildikten sonra lizatlar filtre tüplerine aktarıldı.
6. Oda sıcaklığında 1 dakika 11.000 g'de santrifüj edilerek lizatların filtrasyonu sağlandı.

7. Toplama tüpündeki lizatlara, örnek başına 350 µl %70 etanol eklendi.
8. Aynı zamanda silika membran ile kaplı Nucleospin® kolon tüpleri 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi.
9. Yedinci adımdaki etanol eklenmiş lizatlar, kolon tüplerine aktarıldı.
10. Tüpler oda sıcaklığında 30 saniye 11.000 g'de santrifüj edilerek lizatların kolonda tutulması sağlandı.
11. Kolonların üzerine örnek başına 350 µl membranı tuzdan arındırıcı tampon (membrane desalting buffer) eklendi.
12. Oda sıcaklığında 1 dakika 11.000 g'de santrifüj gerçekleştirildi bu sayede membranların kuruması ve kolonların tuzlardan arındırılması sağlandı.
13. Steril bir tüpte örnek başına 10 µl DNaz ve 90 µl reaksiyon tamponundan oluşan DNaz reaksiyon karışımı hazırlandı.
14. Hazırlanan reaksiyon karışımı örnek başına 95 µl olacak şekilde kolon tüplerine kondu ve tüpler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
15. İnkübasyonun ardından kolon tüplerine örnek başına 200 µl olacak şekilde RAW2 yıkama tamponu uygulandı.
16. Tüpler oda sıcaklığında 30 saniye 11.000 g'de santrifüj edildi.
17. Santrifüj sonunda toplama tüplerindeki sıvılar atıldı ve kolon tüpleri tekrar kendi toplama tüplerine yerleştirildi.
18. Kolon tüplerine örnek başına 600 µl olacak şekilde RA3 yıkama tamponu uygulandı.
19. Tüpler oda sıcaklığında 30 saniye 11.000 g'de santrifüjlendi.
20. Santrifüj sonunda toplama tüplerindeki sıvılar atıldı ve kolon tüpleri tekrar kendi toplama tüplerine yerleştirildi.
21. Kolon tüplerine örnek başına 600 µl olacak şekilde RA3 yıkama tamponu uygulandı.
22. Tüpler oda sıcaklığında 2 dakika 11.000 x g'de santrifüjlendi.
23. Toplama tüpleri atıldı, kolon tüpleri 1,5 mL'lik nükleaz içermeyen tüplere yerleştirildi.
24. Kolon tüplerinin içersine 50 µL RNaz içermeyen su eklendi.
25. Tüpler oda sıcaklığında 11.000 g'de 1 dakika santrifüjlendi.

26. Kolon tüpleri atıldı ve elde edilen RNA örneklerinin 260nm ve 280nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

27. RNA konsantrasyonu ve saflığı formül 3.4'teki gibi hesaplandı:

$[C_{RNA}= A_{260nm}$ X Seyreltme faktörü X 40 µg/ml]

$[\text{RNA saflığı} = A_{260nm}/A_{280nm}]$

28. Konsantrasyonları belirlenen örnekler daha sonraki denemeler için -80 ^{o}C'ye kaldırıldı.

3.6.2.4.2 Komplementer DNA Sentezi

RNA moleküllerinin kalıp olarak kullanıldığı cDNA sentezi, reverse transkriptazlar (RT'ler) tarafından katalizlenir. İlk aşamada RNA molekülünün 3' ucuna komplementer random primerler ya da oligo-dT primerler RNA molekülüyle hibridize olur. Oligo-dT primerler, mRNA molekülleri gibi yalnızca poliadenillenmiş RNA moleküllerine bağlanırken, random primerler hem mRNA'lar hem de poliadenillenmemiş RNAlar ile hibridize olur.

Ardından deoksinükleosid trifosfat (dNTP'ler) kullanılarak RT ile zincirin uzaması sağlanır. Ticari olarak birçok RT bulunmaktadır. Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV, MMLV) reverse transkriptaz, moleküler biyoloji çalışmalarından en sık kullanılan RT'lerden biridir. Çift zincir cDNA sentezinin gerektiği durumlarda, RNA-DNA hibridinden RNA molekülünün uzaklaştırılması gerekir. Bu aşamada RNA-DNA hibridi RNaz H ile muamele edilerek RNA molekülü uzaklaştırılır.

1. İlk olarak RNA örneklerinden 1 µg RNA'ya karşılık gelen miktar alındı

2. Her tüpe 2 µL random primer konduktan sonra nükleaz içermeyen dH_2O ile son hacim 8 µL'ye tamamlandı.

3. RNA sekonder yapılarının denatürasyonu amacıyla tüpler 70^0C'de 5 dakika inkübe edildi.

4. Örnek başına 10 µl M-MuLV reaksiyon karışımı ve 2 µl M-MuLV enzim karışımı hazırlandı.

5. Hazırlanan karışım tüplere aktarıldı.

6. Daha sonra tüpler Thermal Block Cycler PCR cihazına yerleştirilerek;
5 dakika 25 °C'de

60 dakika 42 °C'de

5 dakika 80 °C'de

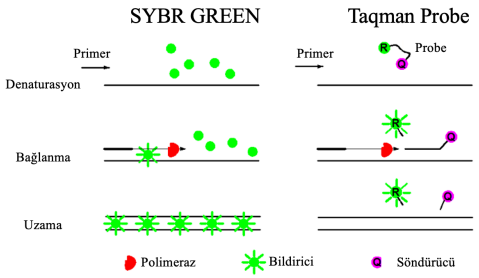
∞ zamanda +4 °C'de inkübe edildi.

7. Sentezlenen cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

3.6.2.4.3 Real Time PCR

Kantitatif PCR olarak da bilinen RT-PCR, PCR süresince amplifiye olan DNA'nın floresan özellikteki bir raportör sayesinde gerçek zamanlı dedekte edilmesidir. Floresan raportörden alınan sinyalin gücü, DNA'nın amplifikasyonu ile doğru orantılı olarak artar. Geleneksel PCR'da ise amplifiye edilmiş sekansın tespiti ve kantitasyonu ancak son döngüden sonra jel elektroforezi gibi görüntü analizleri ile mümkündür.

RT-PCR'de temel olarak iki farklı bir raportör kullanılır. Bunlardan ilki, sekansa özgü tasarlanmış oligonükleotitlerdir diğer bir anlatıyla bu "problar" çoğaltılması hedeflenen tek iplik DNA molekülüne hibridize olurlar. En sık kullanılan problar hidroliz probları, hibridizasyon probları ya da tek işaretli problardır. Taqman probları sıklıkla kullanılan bir hidroliz probudur; bu prob üzerinde birbirine yakın olan floresan bildirici ve floresan söndürücü bulunmaktadır. Prob bir bütünken söndürücü boya, bildirici boyayı baskılar böylece sinyal oluşumu engellenir. PCR süresince, polimerazın 5' nükleaz aktivitesi probu keser, bildiriciyle söndürücü birbirinden ayrılır ve böylece ışıma gerçekleşir (Şekil 12). Amplifikasyon artması daha fazla söndürücü boyanın ayrıldığı anlamına gelir; bu durumda bildirici boyanın vermiş olduğu sinyal artar.



Şekil 12. SYBR green ve Taqman problarının çalışma prensibi

RT-PCR'da kullanılan diğer raportörler SYBR green gibi sekans özgüllüğünden bağımsız, çift zincir DNA'ya bağlanan florofor boyalardır. PCR sırasında amplifiye olmuş ürün ile florofor boyanın vermiş olduğu sinyal arasında bir ilişki bulunmaktadır.

PCR tekniği tekrar eden üç termal döngü temeline dayanır:

1) Denatürasyon: Kalıp DNA 90-95 °C'de denatüre edilerek çift sarmal yapıdaki DNA zincirlerinin fiziksel olarak birbirinden ayrılması sağlanır. Elde edilen iki DNA zinciri, Taq polimeraz için kalıp görevi görür.

2) Primer bağlanması (annealing): Bu basamakta hedef bölgeye komplementer olan primerler DNA'ya bağlanır (hibridizasyon).

3) Zincir uzaması (extension): Taq polimerazın aktivitesinin en yüksek olduğu 70-75 °C arasında gerçekleştirilir ve aktifleşen Taq polimeraz seçici olarak hedef bölgeyi çoğaltır. Bu üç adım bir PCR döngüsünü oluşturur ve yaklaşık 25-40 döngü sonrası hedef bölgenin milyarlarca kopyası (amplikon) elde edilir

RT-PCR'da dört temel evre vardır. Amplifikasyonun yeni başladığı, sinyalin arka plan sinyalinin üzerine çıkamadığı doğrusal zemin fazı, floresan sinyalin arka planı aştığı erken eksponansiyel faz, PCR'nin optimuma ulaşarak her döngüde PCR ürünlerinin iki katlandığı doğrusal eksponansiyel faz ve son olarak substratların tükenmesi nedeniyle amplifikasyonun durduğu ve sinyalin artışının kesildiği plato fazı.

RT-PCR'da floresan sinyal miktarının, gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) geçtiği döngü sayısına eşik döngüsü denir ve C_T (cycle threshold) ile ifade edilir. Diğer bir anlatıyla, amplifiye edilen ürünün veride ilk görülebilir olduğu noktadır.

cDNA'nın sentezinde mRNA kalıp olarak kullanıldığı için ilgilenilen mRNA ekspresyonu düzeyi ve bu mRNA'dan sentezlenen cDNA düzeyi arasında doğru bir orantı vardır. Bu nedenle mRNA düzeyi ile C_T değeri arasında ters bir orantı bulunur; diğer bir anlatıyla mRNA düzeyi ne kadar yüksekse eşik döngüsü o kadar erken aşılır bu da sayısal olarak daha düşük C_T değeri anlamına gelmektedir.

Çalışmamızda kullanılan NDRG2, Slug, Snail, Twist1, Vimentin, E-kadherin ve α-aktinin için özgül primerler "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/" sitesi kullanılarak tasarlandı. Primlere ilişkin forward ve reverse sekanslar ile çoğalttıkları gen bölgelerinin baz çifti (bç) olarak değerleri Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. RT-PCR'de kullanılan forward ve reverse primer sekansları ile çoğalttıkları bölgelerin baz çifti cinsinden boyutları

Çoğaltılan gen bölgesi		**Amplikon boyutu (bç)**
NDRG2	Forward 5'->3': TGGTAGCTCAGTGTGCATCT Reverse 5'->3': GGGTAGCCCTTTCCACCCTA	94
Slug (SNAI1)	Forward 5'->3': TTCAAGGACACATTAGAACTCACAC Reverse 5' >3': TCTTTACATCAGAATGGGTCTGC	120
Snail (SNAI2)	Forward 5'->3': CCCCAATCGGAAGCCTAACT Reverse 5'->3': GCTGGAAGGTAAACTCTGGATTAGA	62
Twist1	Forward 5'->3': AGCTACGCCTTCTCGGTCT Reverse 5'->3': CCTTCTCTGGAAACAATGACATC	124
Vimentin	Forward 5'->3': GGAACAGCATGTCCAAATCG Reverse 5'->3': TCAGTGGACTCCTGCTTTGC	204
E-kaderin (CDH1)	Forward 5'->3': GGGAATGCAGTTGAGGATCC Reverse 5'->3': ACCACCAGGGTATACGTAGG	320
α-aktinin (ACTN1)	Forward 5'->3': CAGGCTGAGTACTGCATCGC Reverse 5'->3': AACTGTCTCACTTCGCGGGCA	275

Öncelikle PCR primerlerin, üreticinin belirttiği T_m değerinde kalıp DNA'ya bağlanarak bu sıcaklıkta primer dimerlerinin oluşmadığını ve amplikon boyutlarını doğrulamak için geleneksel PCR deneyi kuruldu. Geleneksel PCR için Thermal cycler cihazında uygulanan ısı profili Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. PCR ve RT-PCR için reaksiyon karışımı

Reaktifin Adı	***Miktarı (µl)***
PCR grade su	3,0
Forward Primer (10 µM)	0,5
Reverse Primer (10 µM)	0,5
SYBR Green Master Mix (2x)	5,0

1. Dokuz µl'lik reaksiyon karışımı Tablo 12'de gösterildiği şekilde PCR tüplerine pipetlendi
2. Daha sonra her tüpe ~50 ng cDNA olacak şekilde cDNA (1µl) konuldu.
3. Tüpler thermal cycler cihazına yerleştirildi ve Tablo 13'teki PCR profili uygulanarak PCR işlemi başlatıldı.
4. Elde edilen amplikonlar %0,00005 EtBr içeren %1'lik agaroz jel ile sabit 100 V'de yatay elektroforez sisteminde yürütüldü.
5. UVP altında jelin görüntüsü alındı.
6. DNA ladder baz alınarak ve dedekte edilen bantların görüntüleri karşılaştırılarak PCR primerlerin hedef bölgeyi çoğalttığı, aynı zamanda herhangi bir primer dimerinin oluşmadığı doğrulandı.

Tablo 13. PCR ve RT-PCR için Thermal cycler cihazında uygulanan ısı profili

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	5 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	35
Bağlanma	62	30 saniye	
Uzama	72	30 saniye	
Son Uzama (Final Extension)	72	5 dakika	1 döngü

1. Real Time PCR işlemi 9 µl'lik reaksiyon karşımı (Tablo 12) 96 kuyulu plaklardaki kuyucuklara pipetlendi.
2. Daha sonra her kuyuya ~50 ng cDNA olacak şekilde cDNA (1µl) konuldu. Negatif kontrol için PCR grade su kullanıldı. Tüm örnekler duplike çalışıldı.
3. Buharlaşmayı önlemek amacıyla plağın üzeri sealing foil ile kapatıldı.
4. Plak 2.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenerek tüm karışımın kuyunun dibinde toplanması sağlandı.
5. Plak, Light Cycler 480 II cihazına yerleştirildi ve RT-PCR işlemi başlatıldı.

6. Tablo 11'deki PCR profiline ek olarak primer dimerlerinin oluşmadığından tekrar emin olmak için Melting Curve adımı uygulandı.
7. Referans gen olarak α-aktinin kullanıldı.
8. Roche Lightcycler 480 (V 1.5.0) yazılımı kullanılarak her bir örneğe gen ekspresyonu, eşlenik α-aktinin ekspresyonu ekspresyonuna oranlanarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile "Rölatif Kantitasyon" yapıldı.
9. Hesaplama aşağıdaki formül 3.5 kullanılarak yapıldı:

[Δ_{Ct} kontrol= hedef genin C_t değeri- referans genin C_t değeri]

[Δ_{Ct} örnek= hedef genin C_t değeri- referans genin C_t değeri]

[Normalize edilmiş hedef gen ekspresyonu: $2^{-(\Delta Ct \text{ örnek} - \Delta Ct \text{ kontrol})} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$]

3.6.2.4.4 pCMV6-AC-GFP Plazmidinin Bütünlüğünün Doğrulanması

Plazmid transformasyonu bölümünde daha önceki deneylerimizden kalan ve bol miktarda bulunan pCMV6-AC-GFP plazmidinin varlığından söz edilmişti. Transfeksiyon deneylerine başlamadan önce bu plazmidin bütünlüğün değerlendirmek için üretici firmanın verdiği VP1.5 (forward primer) ve XL39 (reverse primer) sekans primleri ile PCR deneyi gerçekleştirildi. Ardıdan amplikon %0.00005 EtBr içeren %1'lik agaroz jel ile sabit 100 V'de yatay elektroforez sisteminde yürütüldü. Dedekte edilen bant, DNA ladder ile karşılaştırıldı. Bu amaçla kurulan PCR deneyine ait reaksiyon karışımı Tablo 13 ile aynı olup, PCR ısı profili Tablo 14'te gösterilmiştir.

Tablo 14. pCMV6-AC-GFP plazmidinin sekans primerleri ile çoğaltılmasına ilişkin PCR ısı profili

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	30
Bağlanma	55	30 saniye	
Uzama	72	2 dakika 30 saniye	
Son Uzama (Final Extension)	72	10 dakika	1 döngü

3.6.2.5 Western Blot

İmmünblotlama ya da protein blotlama olarak da bilinen western blot yöntemi, hücrelerden ekstrakte edilen kompleks bir protein karışımındaki spesifik bir proteinin varlığının tespiti için kullanılan bir tekniktir. Teknik üç ana temel unsura dayanır: protein karışımındaki proteinlerin indirgeyici koşullarda SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) elektroforezi ile molekül ağırlıklarına göre ayrımı, ayrım sonrası proteinlerin nitrosellüloz ya da PVDF membran gibi bir destek materyaline transferi, membranın hedef protein ile eşleşen antikorlar ile mumale edilmesiyle hedef proteinin spesifik tespiti. Bu adımların ardından hedef protein X-ray film üzerinde ya da görüntüleme sistemi ile bant şeklinde görüntülenir. Böylece bir protein karışımında ilgilenilen proteinin varlığının tayini ve ekspresyon düzeyi semi-kantitatif olarak belirlenir.

3.6.2.5.1 Hücre Lizizi

Hücrelerin membran ve intrasellüler proteinleri elde etmek amacıyla hücreler RIPA tamponu ile lize edildi. Bu tampona ilişkin bileşenler ile tampona eklenen proteaz inhibtörleri ve özellikleri sırasıyla Tablo 15 ve Tablo 16'te gösterilmiştir.

Tablo 15. RIPA tamponunda kullanılan çözeltiler ve özellikleri

RIPA Lizis Tamponu (pH 7,5)	***Özellikleri***
Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
SDS	%0,1
NP-40	%1

Tablo 16. RIPA tamponunda kullanılan proteaz inhibitörleri ve özellikleri

Proteaz İnhibitörleri	***Özellikleri***
NaF	10 mM
PMSF	1 mM
Aprotinin	2 µg/ml
Leupeptin	1µg/ml
Pepstatin	1µg/ml

1. Hücre süspansiyonu oda sıcaklığında 2.500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
2. Santrifüj sonunda üst faz atıldı, pelletler, pellet hacminin yaklaşık iki kadar liziz tamponu ile pipetaj yapılarak lize edildi.
3. Daha sonra tüpler vortekslendi ve 5 dakika buz içerisinde bekletildi. Toplam 30 dakika boyunca her 5 dakikada bir bu işlem tekrar edildi.
4. Liziz sonunda tüpler 10.000 g'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi.
5. Süpernatantlar yeni bir tüpe alındı ve analiz süresine kadar -80 °C'de saklandı.

3.6.2.5.2 Protein Tayini

Liziz sonucu elde edilen hücre lizatındaki total protein konsantrasyonu BCA yöntemi ile saptandı. Yöntemin prensibi, alkali koşullarda protein tarafından Cu^{+2} iyonunun Cu^{+1} iyonuna indirgenmesine ve BCA reaktifi tarafından renk değişimine dayanmaktadır (126).

1. Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA) ve kör olarak dH2O kullanıldı.

2. Öncelikle farklı konsantrasyonlarda (2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250, 125, 25 µg/ml) BSA standartları hazırlandı.
3. Biçinkoninik asit bulunan A Reaktifi ve %4 bakır sülfat içeren B Reaktifi 50:1 oranında karıştırılarak "Çalışma Reaktifi" hazırlandı.
4. 96 kuyucuklu bir mikroplağın kuyularına 25 µl standart ve örnekler konuldu.
5. Daha sonra her kuyucuğa 200 µl "çalışma reaktifi" eklendi ve pipetajla karıştırıldı.
6. Plağın kapağı kapatıldı ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
7. Süre sonunda mikroplak okuyucuda 562 nm'de örnek ve standartların absorbans değerleri okundu.
8. Elde edilen absorbans verilerine karşı standart konsantrasyonu grafiği çizildi ve bu standart grafiğinden yararlanılarak örneklerin total protein konsantrasyonu hesaplandı.

3.6.2.5.3 Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, yapı ve yükten bağımsız olarak proteinlerin elektrik akımı altında yalnızca moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasına dayanmaktadır. Poliakrilmaid jeller, akrilamid ve N,N-metilenbisakrilamidin polimerleşmesiyle meydana gelir. Polimerleşme reaksiyonunda akrilamid molekülleri yan yana bağlanarak düz zincirler oluştururlar. Bisakrilamid molekülleri ise iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar meydana getirir; böylece ağımsı bir yapı meydana gelir. Polimerleşme için serbest radikal oluşumuna sebep olan APS reaksiyon başlatıcı, TEMED ise katalizör olarak rol oynar.

Proteinlerin ayrılması, jel içindeki porların çapına bağlıdır; akrilamid miktarı arttıkça por çapı küçülür bu sayede daha küçük moleküler ağırlıktaki proteinlerin ayrılması mümkün olur. Akrilamid miktarının azalması daha büyük por çapı anlamına geldiği için, büyük molekül ağırlıklı molekülllerin ayrımında büyük por çapına sahip jeller kullanılır.

Proteinler amino asit içeriklerine bağlı olarak genellikle net bir artı veya eksi yüke sahiptir. Protein molekülünü içeren bir çözeltiye elektrik alan uygulandığında proteinlerin net yüke, büyüklüğe ve moleküler yapıya bağlı olarak belirli bir hızla

hareket etmesi beklenir. Bu nedenle SDS muamelesi ile çözeltide bulunan tüm proteinlerin negatif yükle yüklenmeleri sağlanır. Buna ek olarak proteindeki disülfit bağlarının 2-merkaptoetanol ile kırılması ve ısı ile denatürasyon işlemleri sayesinde proteinler primer yapıya indirgenir. Böylece yapı ve yükten bağımsız olarak proteinler elektrik akımı altında yalnızca moleküler ağırlıklarına göre ayrılır.

A. SDS-Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması

1. Öncelikle jel hazırlama düzeneği kullanılarak aralarında 1,00 mm boşluk bulunacak şekilde camlar sisteme yerleştirildi.
2. %10'luk ayırıcı jel çözeltisi hazırlanarak iki cam arasında döküldü (Tablo 16). Jellerin hava ile temasını engellemek ve jeli düzlemek amacıyla jel üzerine %70 izopropanol eklendi.
3. Jelin polimerleşmesi için beklendi.
4. Ayrıcı jel polimerleştikten sonra izopropanol uzaklaştırıldı ve jelin üzeri dH_2O ile yıkandı.
5. Ardından %5'lik paketleyici jel hazırlandı (Tablo 17) ve ayırıcı jelin üzerine döküldü.
6. Örneklerin uygulanacağı kuyucukların oluşturulması için paketleyici jel üzerine hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde 1,00 mm kalınlığında 10 kuyucuklu taraklar yerleştirildi.
7. Yaklaşık 15 dakika paketleyici jelin polimerleşmesi için beklendi.

Tablo 17. SDS-Poliakrilmaid jellerin hazırlanması

Kullanılan Reaktifler	***%10'luk Ayırıcı Jel***	***%5'lik Paketleyici Jel***
%30 Akrilamid/bisakrilmaid karışımı	3,3 ml	670 µl
dH_2O	4,0 ml	2,1 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	-
1,0 M Tris pH 6,8	-	380 µl
%10 SDS	100 µl	40 µl
%10 APS	100 µl	40 µl
TEMED	4 µl	4 µl

B. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

1. Jel dikey elektroforez sistemine yerleştirildi ve içerisine 1X Yürütme Tamponu (Tablo 18) konuldu.
2. 0,5 mL'lik tüplerde 100 µg total protein olacak şekilde hücre lizatı ve 1:1 oranında 2X Örnek Yükleme Tamponu (Tablo 18) karıştırıldı.
3. Tüpler daha sonra termal bloğa yerleştirildi ve proteinlerin denatürasyonu için 95°C'de 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tüpler hızla buz içerisinde yerleştirildi.
4. Tarak dikkatlice jelden çıkarıldı ve hazırlanan örnekler kuyucuklara yüklendi.
5. Proteinlerin düzgün paketlenmesini sağlamak amacıyla öncelikle sabit 70 V'de 30 dakika daha sonra 110 V'de yaklaşık 90 dakika +4 °C'de elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

3.6.2.5.4 Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

1. Elektroforez sonrası sistemden çıkarılan jel, eşitlenmesi için 1X Transfer Tamponu (Tablo 18) içeren bir kap içerisine alındı.
2. Daha sonra PVDF membran, jel boyutu ile aynı olacak şekilde kesildi ve aktive edilmesi için %100 metanol içerisinde 1-2 dakika inkübe edildi. Süre sonunda membran, eşitlenmesi için 1X Transfer Tamponu içerisine alındı.
3. Aynı şekilde 2 adet kalın Whatmann kağıdı eşitlenmesi için, 1X Transfer Tamponu içeren ayrı bir kaba alındı.
4. Turbo blot transfer sisteminde bulunan kaset içersine sırasıyla üst üste olacak şekilde 1 adet whatmann kağıdı, membran, jel ve tekrar 1 adet whatmann kağıdı yerleştirildi ve kaset sıkıca kapatıldı.
5. Sabit 20V'de yarım saat oda sıcaklığında transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.6.2.5.5 Bloklama, Antikor Muamelesi ve Kemilüminesan Görüntüleme

1. Spesifik olmayan antikor bağlanmasını engellemek için transfer sonrası falkon tüpe alınan membranlar %5 yağsız süt tozu içeren 1X Tris Buffer

Saline-Tween20 (TBS-T) (Tablo 18) ile roller cihazında 5 rpm'de oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

2. Bu süre içerisinde kullanılacak antikor hazırlandı. Primer antikorlar ve dilüsyon oranları şu şekildedir: E-kaderin primer antikor: 1:500; NDRG2, Snail, Slug ve Twist1 primer antikorlar 1:1000; Vimentin primer antikor 1:2000 ve α-aktinin 1:3000 oranında %5'lik yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T ile dilüe edilmek suretiyle hazırlandı.
3. Süre sonunda bloklama çözeltisi atıldı ve membranlar ilgili primer antikorlar ile roller cihazında 5 rpm ve +4 °C'de karıştırılarak 18 saat inkübasyona bırakıldı.
4. Primer antikor ile muamelenin ardından, ortamdaki bağlanmamış antikor uzaklaştırmak amacıyla membranlar, oda sıcaklığında sırasıyla 1 kere 15 dakika, 3 kere 5 dakika süreyle roller cihazında 1X TBS-T ile yıkandı.
5. Bu sırada sekonder antikorlar hazırlandı: NDRG2 (45kDa), NDRG2+GFP (72 kDa), Snail (29 kDa), Slug (30 kDa), Twist1 (26 kDa), E-kaderin (120 kDa) için 1:1000; Vimentin (55 kDa) için 1:3000 ve α-aktinin (100 kDa) için 1:5000 oranında sekonder antikorlar hazırlandı. Sekonder antikorların dilüsyonu %1 yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T ile gerçekleştirildi.
6. Yıkamaların ardından membranlar hazırlanan sekonder antikorlarla 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
7. Daha sonra ortamdaki bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak amacıyla membranlar, oda sıcaklığında sırasıyla 1 kere 15 dakika, 3 kere 5 dakika süreyle roller cihazında 1X TBS-T ile yıkandı.
8. Yıkamalar sonrası membranlar UVP jel ve membran dökümantasyon cihazına yerleştirildi ve üzerlerine ECL western blot substratı eklenerek görüntüleri alındı.
9. Semi-kantitatif analiz için elde edilen bantların dansitometrik analizleri UVP Bioimaging system with LabWorks 4.6 Image Acquistion yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.
10. Her örneğe ait elde edilen hedef protein ekspresyon düzeyi (area density) eşlenik referans proteinlerin ekspresyon düzeyine (area density) oranlanarak rölatif kantitasyon yapıldı.

Tablo 18. Western Blot tekniğinde kullanılan çözeltiler

Çözeltiler	Özellikleri
1X Yürütme Tamponu	20 mM Tris-baz 0,2 M Glisin %0,1 SDS 192 mM Glisin
2X Örnek Yükleme Tamponu	125 mM Tris baz (pH 6,8) %4 SDS %10 2-Merkaptoetanol %20 Gliserol %0,004 Bromfenol mavisi
1X Transfer Tamponu	25 mM Trisbaz %20 Metanol
1X TBS-T	10 mM Tris-HCl 140 mM NaCl %0,1 Tween-20

3.6.2.6 Matrijel İnvazyonu ve Hücre Migrasyonu

1. Tablo 10'da belirtildiği üzere 6 kuyulu plaklara $2x10^5$ 8505C, BCPAP ve FTC-133 hücresi ekildi ve plak yüzeyine tutunmaları için hücreler 37 ^oC ve %5 CO_2'de gece boyu inkübe edildi.
2. Daha sonra plazmid ve siRNA transfeksiyonu bölümlerinde açıklanan protokoller uygulandı.
3. Deneyden bir gece (~12 saat) önce hücrelerin ortamları %1 FBS içeren ortam ile yenilendi.

4. İnvazyon kuyularının oluşturulması için stok konsantrasyonu 9,8 mg/ml olan matrigel son konsantrasyon 0,25 mg/ml olacak şekilde ortam içinde hazırlandı.
5. İnvazyon/migrasyon kuyuları 24 kuyulu plaklara yerleştirildi.
6. İnvazyon kuyucuklarına 150 µl olacak matrijel içeren ortam eklendi ve kuyucuklar iki saat 37^{o}C'de inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon sonrasında kuyular 300 µl 0,1% BSA içeren 1X PBS eklenerek 5 dakika 37^{o}C'de inkübasyona bırakılmak suretiyle bloklandı.
8. Matrigel ile kaplanmamış kuyular "Hücre Migrasyonu" deneyleri için kullanıldı.
9. İnvazyon çalışması için, %1 FBS içeren ortamda 8505C ve BCPAP hücrelerinden $4x10^4$; FTC-133 hücrelerinden $2x10^4$, hücre/invazyon kuyusu olacak şekilde matrijel kaplı kuyulara ekildi.
10. Migrasyon çalışması için %1 FBS içeren ortamda 8505C ve BCPAP hücrelerinden $2x10^4$; FTC-133 hücrelerinden $1x10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde migrasyon kuyularına ekildi.
11. İnvazyon/migrasyon kuyucuklarının yerleştirildiği 24 kuyucuklu plakların kuyularına, hücreler için kemoatraktan işlevi görmesi açısıdan 750 µL %10 FBS içeren ortam konuldu; ardından 37 ^{o}C ve %5 CO_2'de gece boyu inkübe edildi.
12. İnkübasyon sonrası invazyon kuyuları Diff-Quik boyama kiti kullanılarak, hücreler öncelikle fikse edildi, daha eozin ve tiazin boyaları ile nükleus ve sitoplazma boyandı.
13. Kuyuların iç kısmında bulunan invaze/migrate olmayan hücreler pamuklu çubuk yardımıyla temizlendikten sonra, kuyuların alt tabanına göç eden hücreler ters faz ışık ed mikroskopta sayıldı.
14. Yapılan hücre sayımı sonucunda % invazyon ve % migrasyon formül 3.6 kullanılarak hesaplandı:

[**% İnvazyon =** (Örnek invaze olan hücre sayısı/ Kontrol invaze olan hücre sayısı) x 100]

[**% Migrasyon =** (Örnek migrate olan hücre sayısı/ Kontrol migrate olan hücre sayısı) x 100]

3.6.2.7 Yara İyileşmesi Lateral Migrasyon Denemesi

1. Tablo 10'da belirtildiği üzere 6 kuyulu plaklara $4x10^5$ 8505C, BCPAP ve FTC-133 hücresi ekildi ve plak yüzeyine tutunmaları için hücreler 37 ^oC ve %5 CO_2'de gece boyu inkübe edildi.
2. Daha sonra plazmid ve siRNA transfeksiyonu bölümlerinde açıklanan protokoller uygulandı.
3. Deneyden bir gece (~12 saat) önce hücrelerin ortamları %1 FBS içeren ortam ile yenilendi.
4. Süre sonunda 1000 µl'lik steril bir pipet ucu yardımıyla yaralar açıldı.
5. Kalkan hücreler 1X PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Hücrelerin ortamları %1 FBS ortamlar ile yenilendikten sonra 0.-6.- 9. ve 24. saatlerde yara genişlikleri ters faz ışık mikroskopta fotoğraflandı.
6. Yara genişliklerinin ölçümleri Image J programı MRI wound healing aracı kullanılarak gerçekleştirildi.
7. Hücresel motilitenin ifadesi olan "% motilite indeksi" formül 3.7'e göre hesaplandı:

[**%MoI** = 1- (Belirli bir zamandaki yara genişliği / başlangıçtaki yara genişliği)]

3.6.2.8 Hücre Adezyon Denemesi

1. Tablo 10'da belirtildiği üzere 6 kuyulu plaklara $2x10^5$ 8505C, BCPAP ve FTC-133 hücresi ekildi ve plak yüzeyine tutunmaları için hücreler 37 ^oC ve %5 CO_2'de gece boyu inkübe edildi.
2. Daha sonra plazmid ve siRNA transfeksiyonu bölümlerinde açıklanan protokoller uygulandı.
3. Deneyden bir gece önce hücrelerin ortamları %1 FBS içeren ortam ile yenilendi.

4. Ertesi gün 96 kuyucuklu plağın kuyuları, 1X PBS'te hazırlanmış 20 µg/ml matrijel ile kuyu başına 100 µl olacak şekilde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilerek kaplandı.
5. Bu esnada hücreler kaldırılarak ters faz ışık mikroskopta sayıldı. Kuyu başına 8505C hücreleri için $3x10^4$, BCPAP hücreleri için $4x10^4$ ve FTC-133 hücreleri için $1,5x10^4$ olacak şekilde hesaplamalar yapıldı.
6. Standart grafiği oluşturmak amacıyla, matrijel ile kaplanmamış ayrı bir 96 kuyucuklu plağa $3x10^4$ 8505C, $4x10^4$ BCPAP ve $1,5x10^4$ hücresinin %100, %50 ve %20'sine karşılık gelen hücre sayısı 100 µl ortam içinde ekildi ve 45 dakika 37 ºC'de CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Süre sonunda kuyular 1X PBS ile yıkanarak tutunmayan hücreler uzaklaştırıldı, tutunan hücreler taze %4 glutaraldehit solüsyonu ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilerek fikse edildi.
7. Kuyular matrigel ile kaplandıktan sonra non-spesifik adezyonun bloklanması için, kuyulara 200 µl/kuyu ısıyla denature edilmiş %1 BSA eklendi. Otuz dakika oda sıcaklığında inkübasyonun ardından kuyular üçer kez 1X PBS ile yıkanarak kalan BSA uzaklaştırıldı.
8. Ardından hücreler, beş nolu maddede belirtilen sayılarda matrijel kaplı kuyulara 100 µl ortam içeresinde ekildi. 45 dakika CO2 inkübatöründe inkübe edildi. Süre sonunda kuyular 1X PBS ile yıkanarak tutunmayan hücreler uzaklaştırıldı, tutunan hücreler taze %4 glutaraldehit solüsyonu ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilerek fikse edildi.
9. Fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler %0,1 kristal violet çözeltisi ile oda sıcaklığında 1 saat boyandı.
10. Kuyular 1X PBS ile yıkandıktan sonra ve 10 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. Kuyu başına 100µl %10 asetik asit konuldu ve oda sıcaklığında-orbital karıştırıcıda çalkalanarak 5 dakika inkübe edildi. Mikroplak okuyucu ile 570 nm'de absorbans ölçümü alındı.
11. Elde edilen veriler kör değerinden çıkarıldı.
12. Ardından %20, %50 ve %100 hücre sayılarına karşı ölçülen absorbans değerleri ile bir standart grafiği ve bir denklem oluşturuldu.

13. Tutuan hücreler ait absorbans değerleri denklem üzerinde yerine konarak adezyon yüzde cinsinden ifadesi edildi. (Humphries vd., 1998).

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırma planı ve takvimine ait akış Tablo 19'da gösterilmiştir.

Tablo 19. Araştırma planı ve takvimi

İş Paketi	2017	2018		2019										2020								2021			
	11. ve 12. aylar	1. ay - 6. ay	7. ay – 12 .ay	1. ay – 3. ay	4 .ay	5 .ay	6 .ay	7. ay	8. ay	9. ay	10. ay	11. ay	12. ay	1. ay	2. ay	3 .ay - 7. ay	8. ay	9. ay	10. ay	11. ay	12. ay	1. ay	2. ay	3 .ay	4 .ay- 6 .ay
Literatür taraması	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Malzemelerin temini			X	X									X	X						X	X				
Hücre kültürü çalışmaları					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	
Real Time PCR deneyleri					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X					
Western Blot deneyleri					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X					
Plazmid DNA transformasyonu					X	X	X	X																	
Plazmid DNA transfeksiyonu							X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X						
siRNA transfeksiyonu																			X	X					
İnvazyon, migrasyon, yara iyileşmesi ve adezyon deneyleri																	X	X	X		X	X	X	X	
Verilerin değerlendirilmesi					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Tez yazımı																X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen veriler Graph Pad 9.0.1 (San Diego, CA, ABD) programı kullanılarak istatiksel olarak değerlendirildi ve ortalama ± Standart Hata şeklinde verildi. Tüm çalışmalar en az 3 kere tekrar edildi. Gruplar arasındaki farklılıklar one way ANOVA testi ve unpaired t test ile değerlendirildi. Post hoc testler olarak Dunnett'in Post Hoc testinden yararlanıldı. p değerleri olarak * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızda western blot ve immunfloresan çalışmlarında kullanılması planlanan anti-E-kaderin primer antikorun çalışmaması nedeniyle başka bir üreticiden anti-E-kaderin primer antikoru temin edildi. Bu antikor deneme boyunda geldiğinden yalnızca western blot deneyleri gerçekleştirildi.

8505C ve BCPAP hücrelerinde E-kaderin mRNA düzeyleri saptanamadığı için N-kaderin PCR primerleri tasarlandu ve tüm hücre hatlarında E-kaderin mRNA düzeylerine ek olarak N-kaderin mRNA düzeyleri de incelendi.

Anti-Slug ve anti-Twist1 primer antikorlarının miyadlarının dolmasından dolayı siRNA transfeksiyonunun Snail, Vimentin ve E-kaderin protein düzeylerine olan etkisi incelenebildi.

3.10 Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu, 28.09.2017 tarih ve 2017/23-28 karar numarası ile 3348-GOA protokol numaralı çalışmamızın etik açıdan sakıncalı olmadığına karar vermiştir (EK-1).

4. BULGULAR

4.1 Koloni PCR ile Transformasyonun, PCR Primerlerin ile Yalnızca Hedef Bölgelerin Çoğaltıldığının ve pCMV-AC-GFP Plazmidinin Bütünlüğünün Doğrulanması

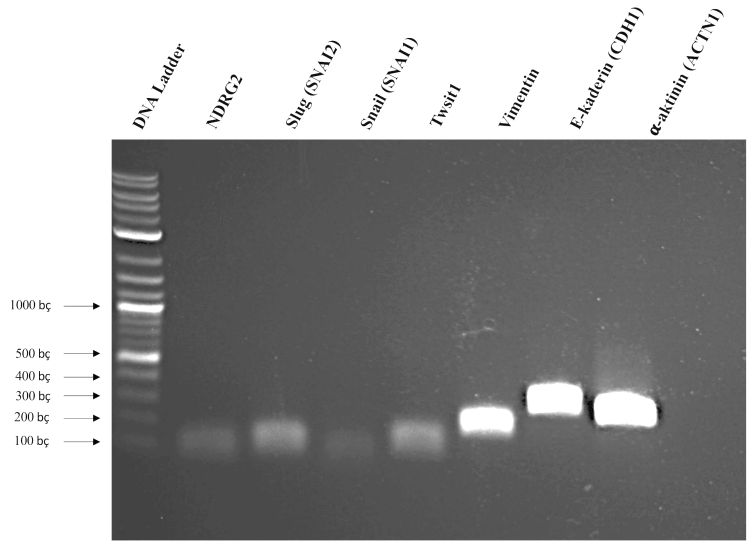
Transformasyon sonrası seçili kolonilerden yapılan RT-PCR sonrası C_T değerleri Tablo 20'de gösterilmiştir.

Tablo 20. Seçili kolonilerden gerçekleştirilen RT-PCR sonrası C_T değerleri

Koloni No	C_T Değerleri
1	7,71
2	9,37
3	9,93
4	10,07
5	9,74
Negatif kontrol	----

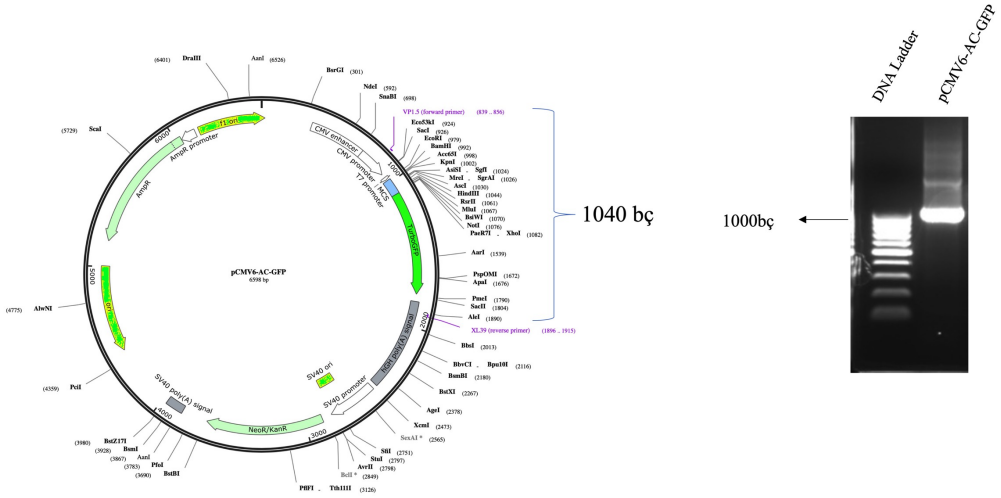
Bir nolu kolonin seçilerek transformasyon işlemlerine devam edilmesine karar verildi.

Tasarladığımız PCR primerlerinin ilgili gen bölgesine bağlandığının ve primer dimerlerinin oluşmadığının belirlenmesi için konvasiyonel PCR deneyi gerçekleştirildi. PCR sonucu amplikonların doğru bölgelerde dedekte edildiği ve herhangi bir primer dimeri ya da non-spesifik amplikasyon olmadığı görüldü (Şekil 13).



Şekil 13. FTC-133 hücrelerinde yola çıkılarak gerçekleştirilen konvansiyonel PCR sonrası agaroz jel görüntüsü. NDRG2 (94 bç), Slug (SNAI2) (62 bç), Snail (SNAI1) (120 bç), Twist1 (124 bç), Vimentin (204 bç) ve **α**-aktinin (ACTN1) (275 bç).

Son olarak pCMV-AC-GFP plazmidinin bütünlüğü kontrol edildi. PCR sonrası agaroz jelde görülen bantın pCMV6-AC-GFP plazmidinin 1040 bç'lik bölgesine ait olduğu, dolayısıyla pCMV-AC-GFP plazmidinin bütünlüğü doğrulandı (şekil 14).

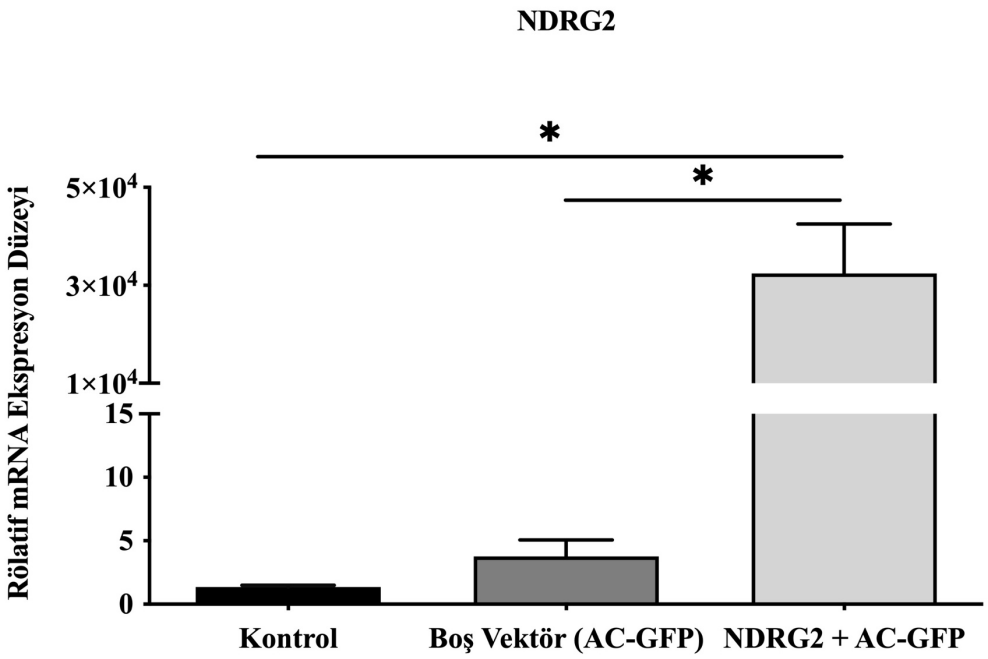


Şekil 14. VP1.5 ve XL6 sekans primerleri kullanılarak pCMV-AC-GFP plazmidinde çoğaltılan plazmid bölgesinin agaroz jel görüntüsü

4.2 Plazmid DNA Transfeksiyonu ile 8505C, BCPAP ve FTC-133 Hücrelerinde NDRG2'nin Overekspresyonu

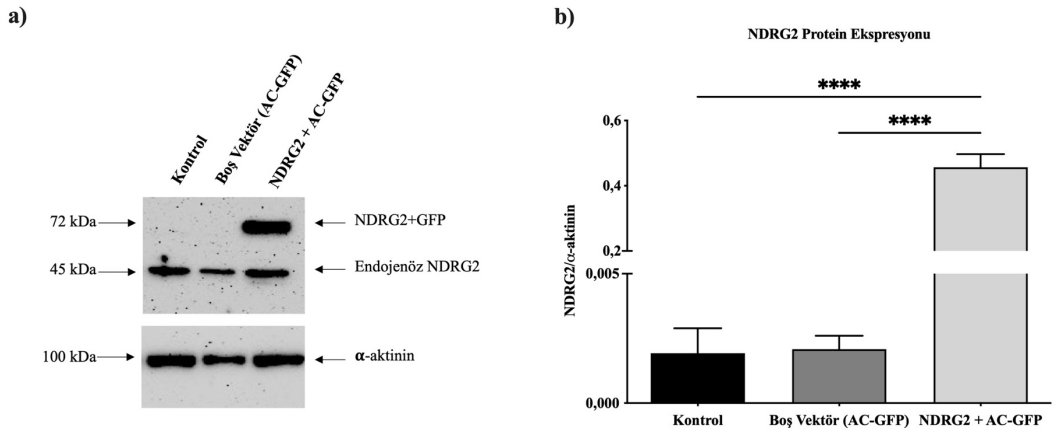
4.2.1 8505C Hücrelerinde NDRG2 pDNA Transfeksiyonu Sonrası Hedef Gen ve Protein Ekspresyon Düzeyleri ile Metastatik Hücre Davranışının İncelenmesi

NDGR2 plazmid DNA transfeksiyonu sonrası 8505C hücrelerinde NDRG2'nin overeksprese olduğu RT-PCR (Şekil 15) ve Western Blot deneyleri (Şekil 16) ile doğrulandı.



Şekil 15. NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası 8505C hücrelerindeki NDRG2 mRNA ekspresyon düzeyi (n=3) *İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: $p \leq 0,05$

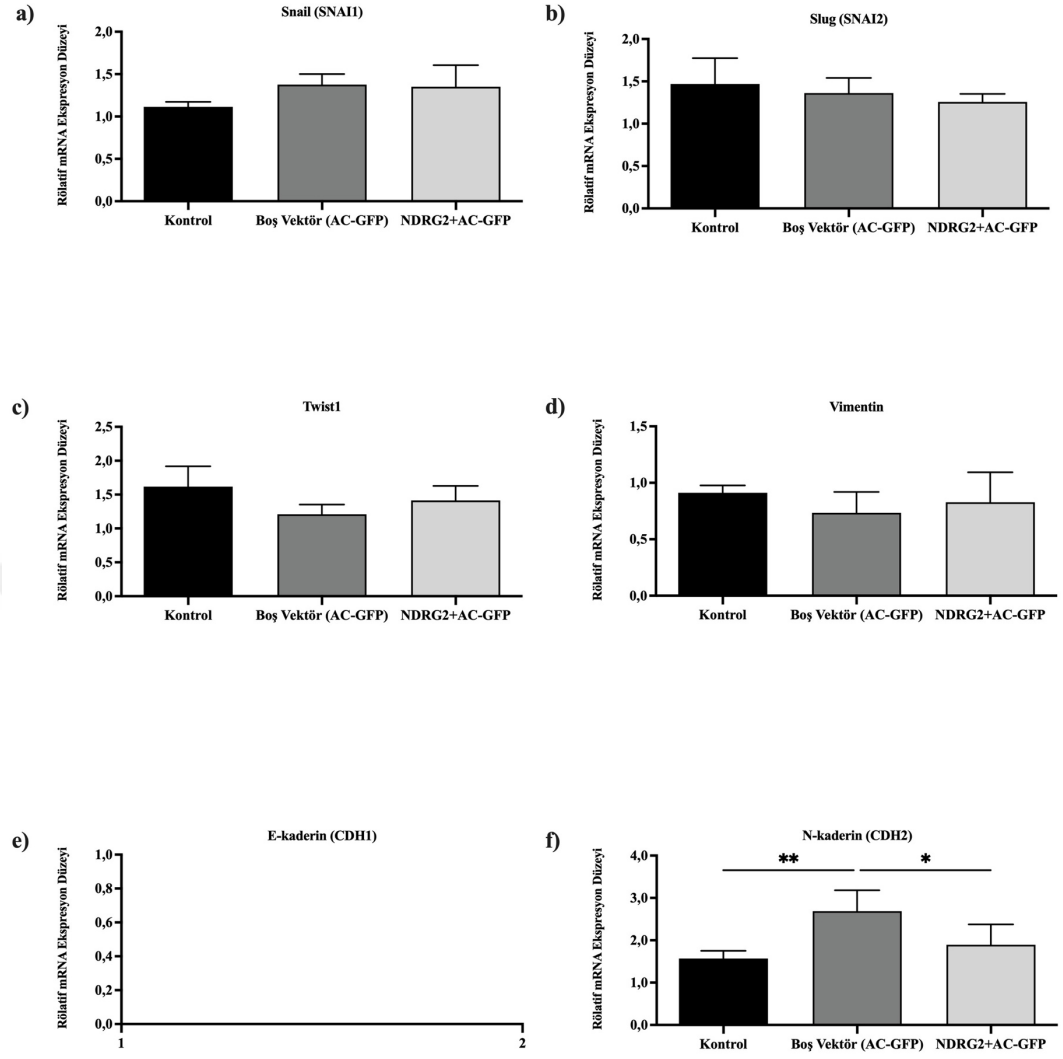
8505C hücrelerinde endojenöz olarak eksprese edilen NDRG2 45 kDa civarında bant verirken, NDRG2 plazmidinde NDRG2 proteinine GFP bağlı olması nedeniyle 70 kDa civarında bant görülmektedir (Şekil 15).



Şekil 16. NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası 8505C hücrelerindeki NDRG2 protein ekspresyon düzeyine ait **a)** Western blot görüntüsü, **b)** Dansitometrik analizi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: ****$p<0,0001$

NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası hedef genler olan Snail (SNAI1), Slug (SNAI2), Twist1, Vimentin, E-kaderin (CDH-1) ve N-kaderin (CDH-2) mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişim Real Time PCR tekniği ile incelendi (Şekil 17).

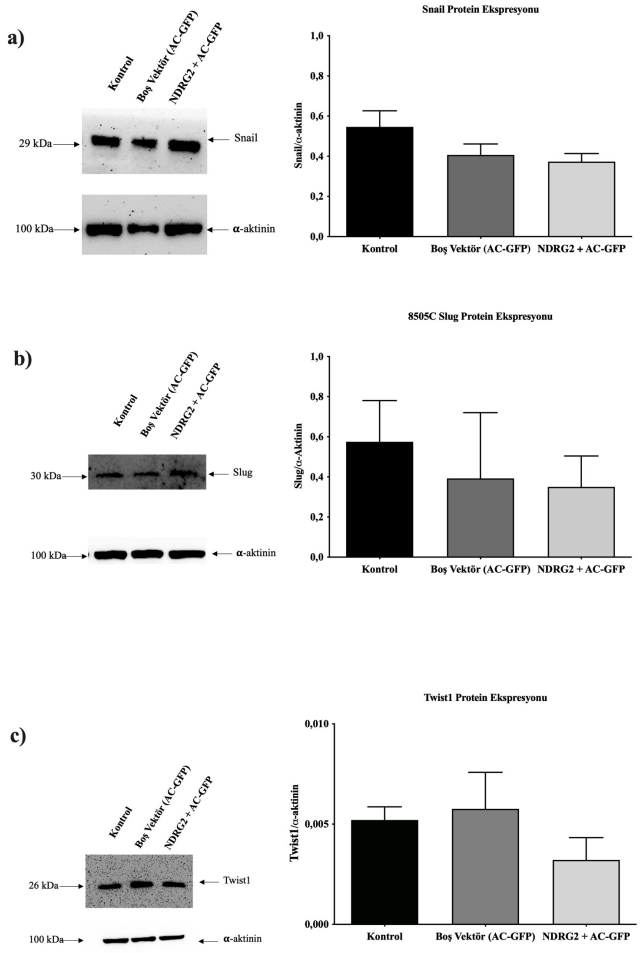
Elde edilen veriler analiz edildiğinde; NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası NDRG2 pDNA ile transfekte edilen grup ile kontrol grubundaki N-kaderin mRNA düzeylerinde, boş vektör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma saptandı. E-kaderin (CDH1) mRNA ekspresyonu gözlenmezken diğer hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark belirlenmedi.



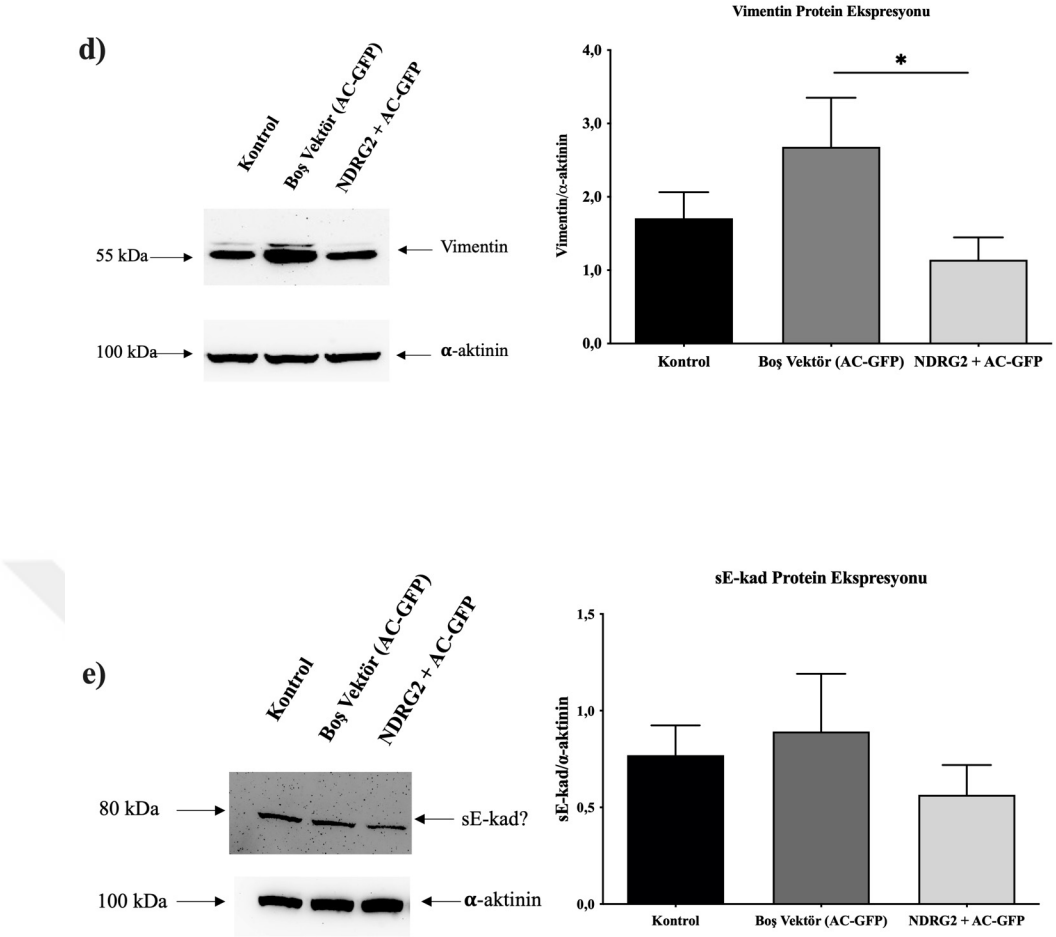
Şekil 17. 8505C hücrelerinde NDRG2 pDNA transfeksiyonu sonrası, **a)** Snail (SNAI1), **b)** Slug (SNAI2), **c)** Twist1, **d)** Vimentin, **e)** E-kaderin (CDH-1) ve **f)** N-kaderin (CDH-2) mRNA düzeyleri (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: *$p \leq 0,05$, **$p < 0,01$*

NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası Snail, Slug, Twist1, Vimentin ve E-kaderin protein ekspresyon düzeylerindeki değişim Western Blot tekniği ile incelendi (Şekil 18). Elde edilen veriler analiz edildiğinde; NDRG2 overekspresyonunun 8505C hücrelerinde Snail, Slug ve Twist1 protein ekspresyon düzeyleri üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlenirken, NDRG2 pDNA ile transfeksiyonu sonucu Vimentin protein ekspresyon düzeyinde boş vektör ile transfekte edilen gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalma meydana geldiği gözlendi. 8505C hücrelerinde bazal E-kaderin mRNA ve protein ekspresyonları gözlenmezken, western

blot sonucunda sE-kad olduğu düşünülen bantlar gözlendi. Ancak gruplar arasında sE-kad düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

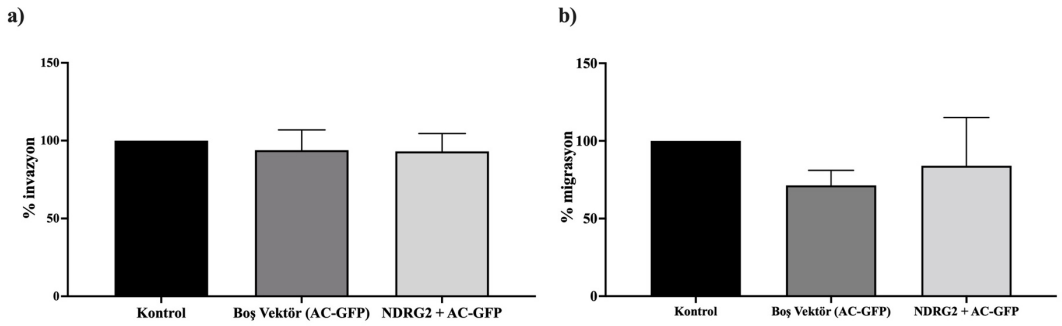


Şekil 18. NDRG2 overekspresyonunun 8505C hücrelerinde hedef protein ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. **a)** Snail, **b)** Slug ve **c)** Twist1 protein ekspresyon düzeylerine ilişkin western blot görüntüleri ile dansitometrik analizleri (n=3).



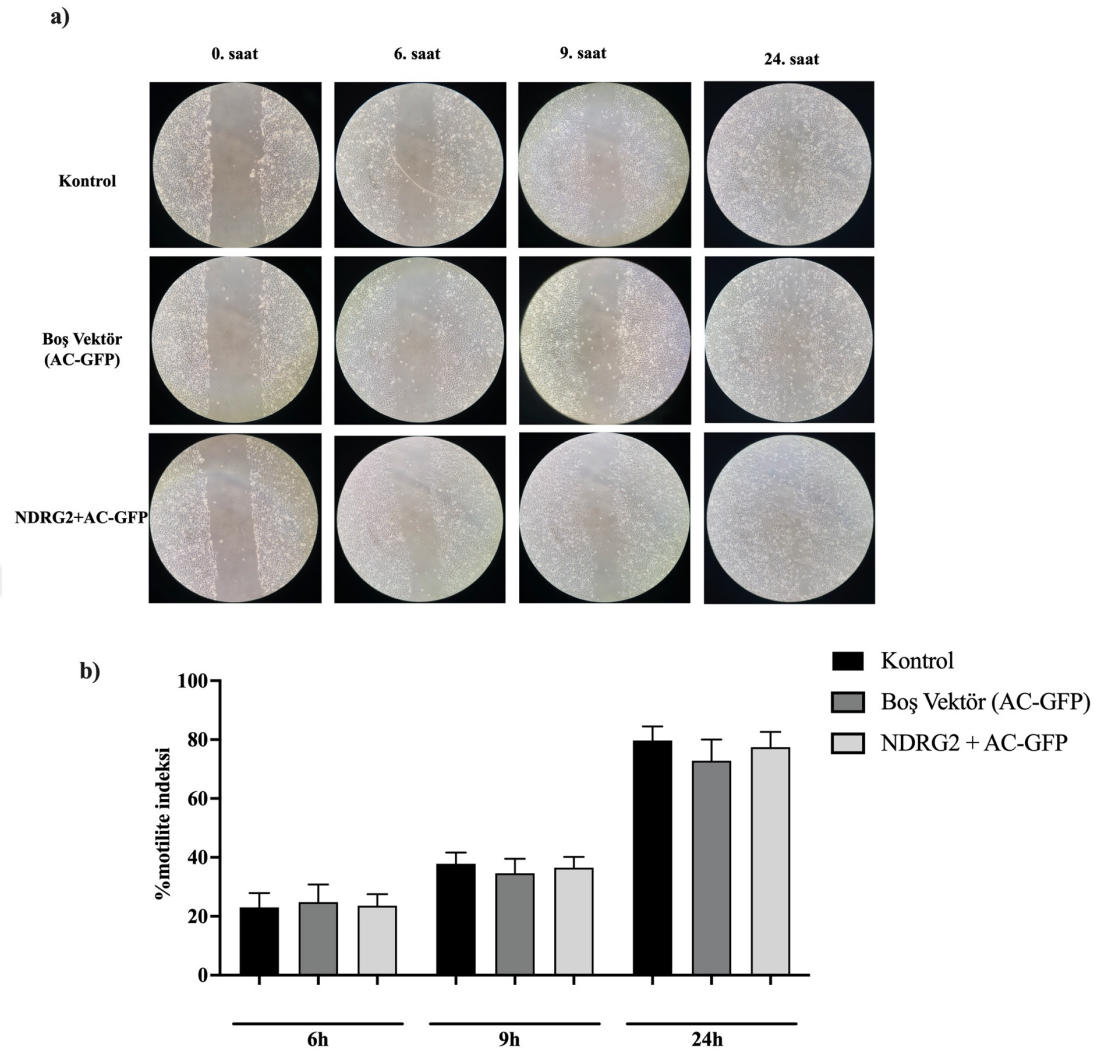
Şekil 18. NDRG2 overekspresyonunun 8505C hücrelerinde hedef protein ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi *(devam)*. **d)** Vimentin ve e) sE-kad protein ekspresyon düzeylerine ilişkin western blot görüntüleri ile dansitometrik analizleri (n=3). *(8505C hücrelerinde bazal E-kaderin mRNA ekspresyonu gözlenmediği için E-kaderin primer antikoru ile muamele sonrası saptanan bantlara soru işareti konmuştur.) İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: *p≤0,05*

NDRG2 pDNA transfeksiyonunun 8505C hücrelerinin metastatik hücre davranışları üzerindeki etkileri incelendiğinde; NDRG2 overekspresyonunun 8505C hücrelerinin invazyon ve migrasyon yetenekleri ile üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir etkisi olmadığı saptandı (Şekil 19).



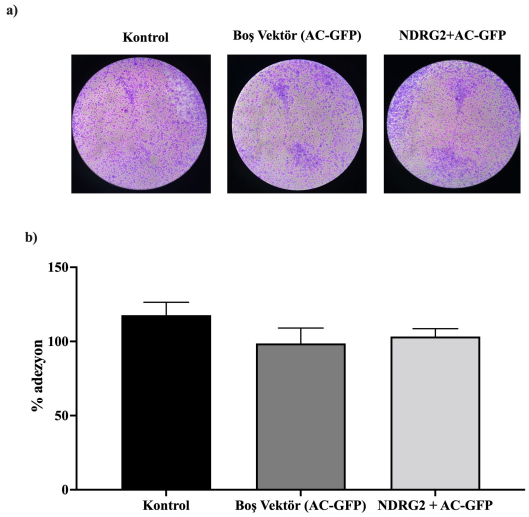
Şekil 19. 8505C hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonunun **a)** %invazyon, **b)** %migrasyon yetenekleri üzerine etkisi (n=3).

NDRG2 overekspresyonu sonrası 8505C hücrelerinin yara kapanma hızları incelendiğinde, NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası gruplar arasında hücrelerin lateral migrasyon yetenekleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark meydana getirmediği gözlendi (Şekil 20).



Şekil 20. 8505C hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonunun lateral hücre motilitesi üzerindeki etkisine ait a) mikroskobi görüntüleri ve b) % motilite indeksi (n=5).

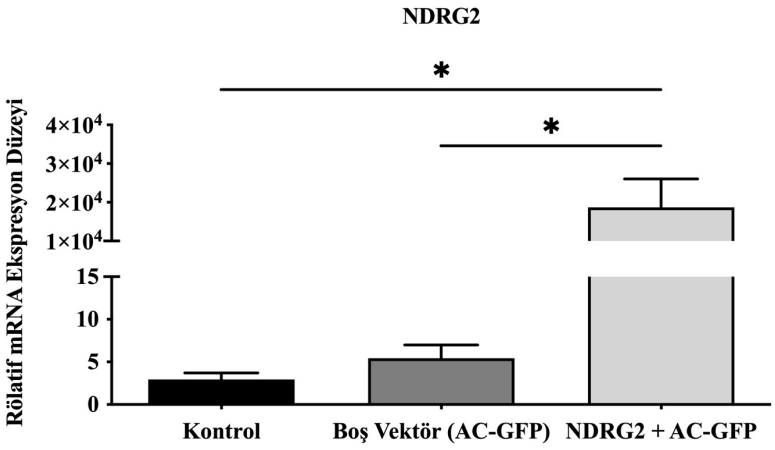
NDRG2 pDNA transfeksiyonu sonrası 8505C hücrelerinin adezyon yeteneklerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmedi (Şekil 21).



Şekil 21. 8505C hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası adezyon yetenekleri üzerine etkisine ilişkin **a)** mikroskobi görüntüleri, **b)** bar grafikleri (n=3).

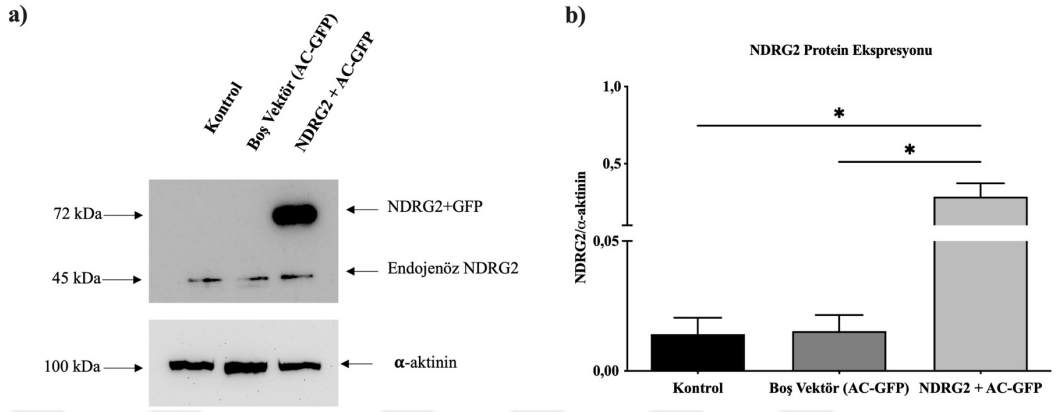
4.2.2 BCPAP Hücrelerinde NDRG2 pDNA Transfeksiyonu Sonrası Hedef Gen ve Protein Ekspresyon Düzeyleri ile Metastatik Hücre Davranışının İncelenmesi

NDGR2 plazmid DNA transfeksiyonu sonrası BCPAP hücrelerinde NDRG2'nin overekspresе olduğu RT-PCR (Şekil 22) ve Western Blot deneyleri (Şekil 23) ile gösterildi.



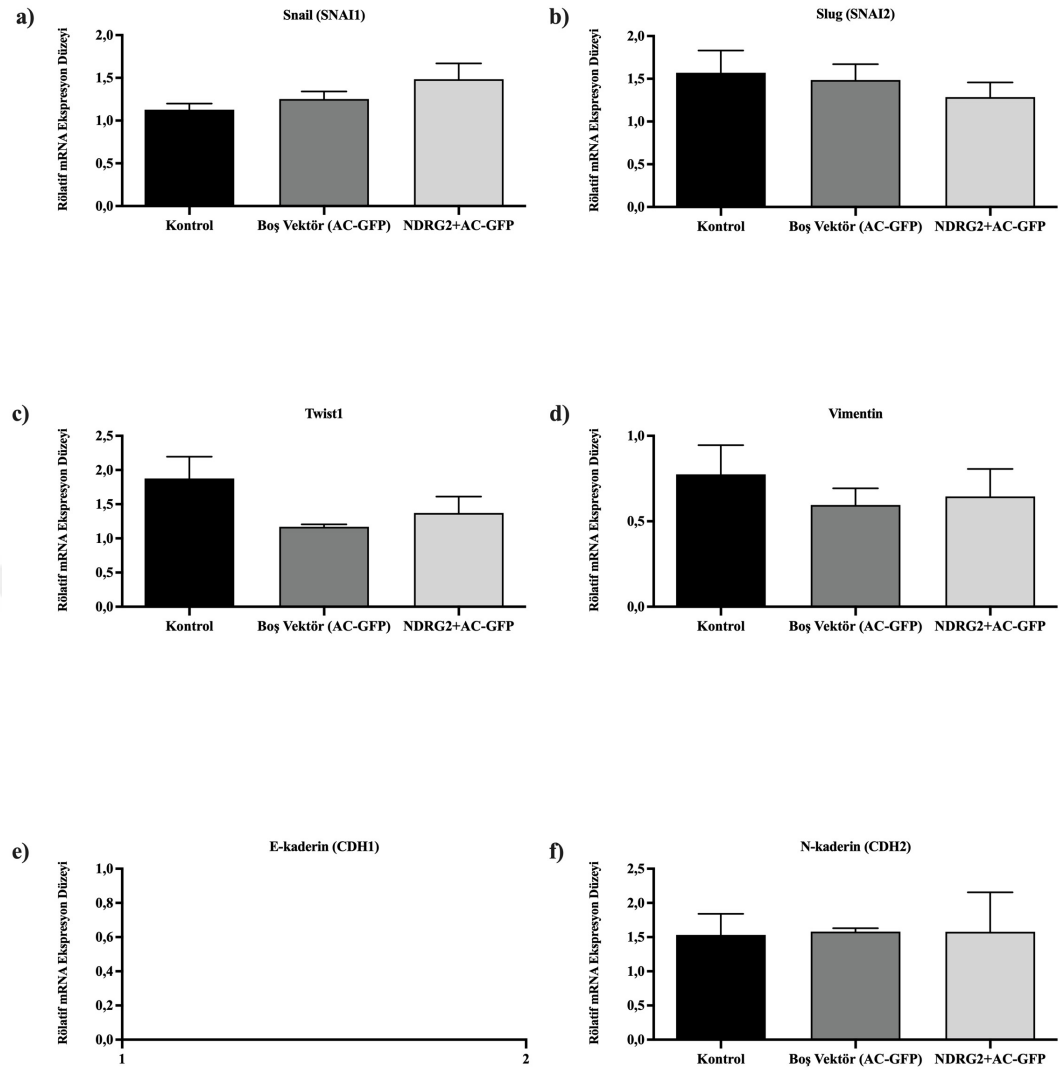
Şekil 22. NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası BCPAP hücrelerindeki NDRG2 mRNA ekspresyon düzeyi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: * $p \leq 0,05$

BCPAP hücrelerinde endojenöz olarak eksprese edilen NDRG2 45 kDa civarında bant verirken, NDRG2 plazmidinde NDRG2 proteinine GFP bağlı olması nedeniyle 70 kDa civarında bant görülmektedir (Şekil 23).



Şekil 23. NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası BCPAP hücrelerindeki NDRG2 protein ekspresyon düzeyine ait **a)** Western blot görüntüsü, **b)** Dansitometrik analizi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: *$p \leq 0,05$*

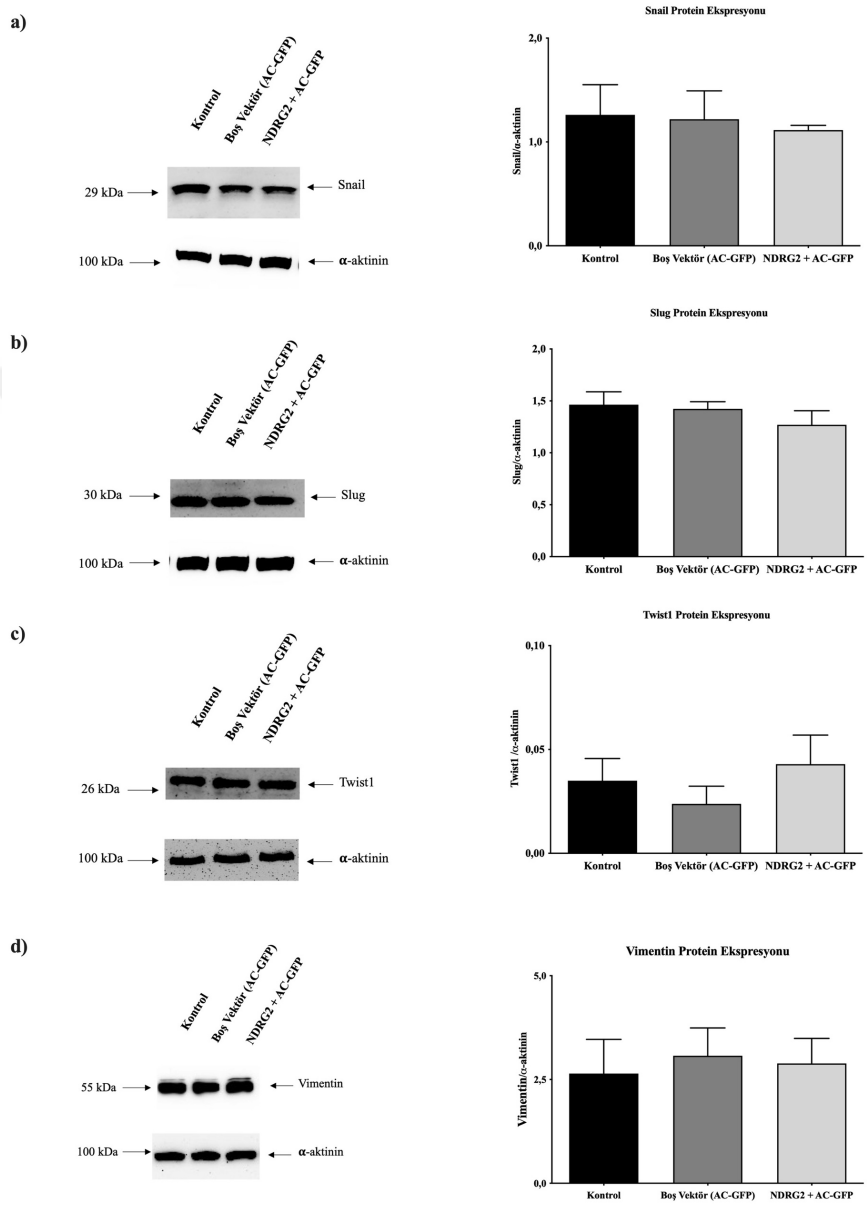
NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası hedef genler olan Snail (SNAI1), Slug (SNAI2), Twist1, Vimentin, E-kaderin (CDH-1) ve N-kaderin (CDH-2) mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişim Real Time PCR tekniği ile incelendi (Şekil 24). Elde edilen veriler analiz edildiğinde; BCPAP hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark belirlenmedi.



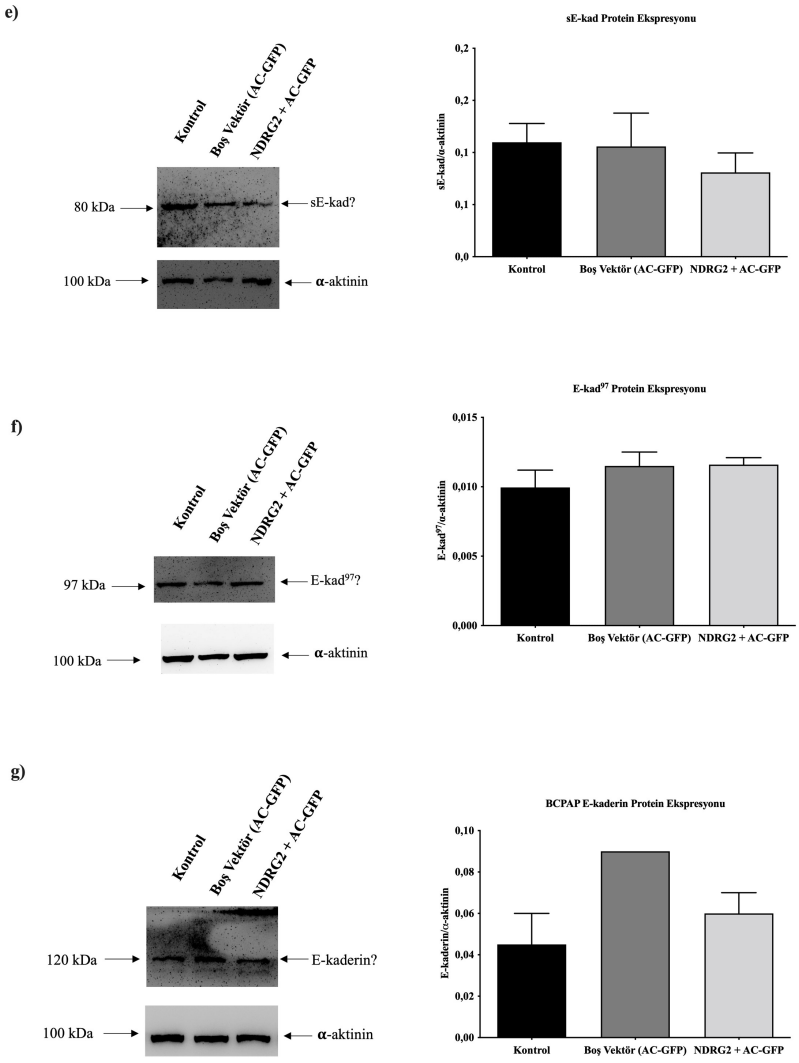
Şekil 24. BCPAP hücrelerinde NDRG2 pDNA transfeksiyonu sonrası, **a)** Snail (SNAI1), **b)** Slug (SNAI2), **c)** Twist1, **d)** Vimentin, **e)** E-kaderin (CDH-1) ve **f)** N-kaderin (CDH-2) mRNA düzeyleri (n=3).

NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası Snail, Slug, Twist1, Vimentin ve E-kaderin protein ekspresyon düzeylerindeki değişim Western Blot tekniği ile incelendi (Şekil 25). Elde edilen veriler analiz edildiğinde; NDRG2 overekspresyonunun BCPAP hücrelerinde Snail, Slug, Twist1 ve Vimentin protein ekspresyon düzeyleri üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlendi. 8505C hücrelerine benzer şekilde BCPAP hücrelerinde E-kaderin mRNA ekspresyonu gözlenmemesine rağmen western blot deneyi sonrası tam boy E-kaderin ile sE-kad ve 97 kDa'lık E-kaderin (E-kad^{97}) bantları saptandı. NDRG2 overekspresyonunun sE-

kad ve E-kaderin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlendi. Bununla birlikte NDRG2 pDNA ile transkfeksiyon sonucu sE-kad düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gözlendi.



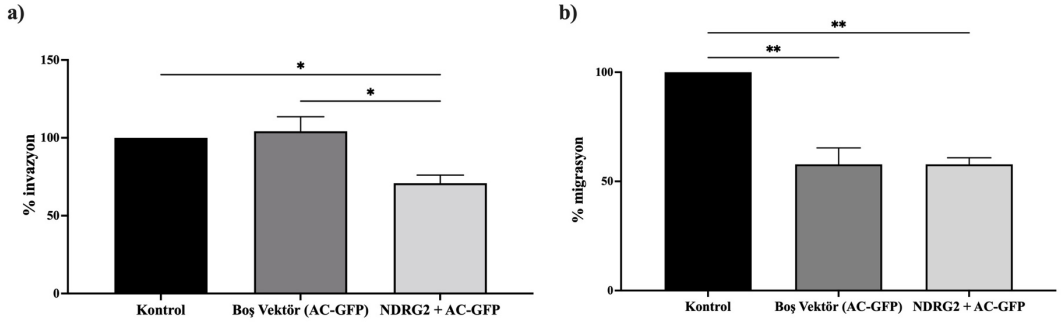
Şekil 25. NDRG2 overekspresyonunun BCPAP hücrelerindeki hedef protein ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. **a)** Snail, **b)** Slug, **c)** Twist1 ve **d)** Vimentin protein ekspresyon düzeylerine ilişkin western blot görüntüleri ile dansitometrik analizleri (n=3).



Şekil 25. NDRG2 overekspresyonunun BCPAP hücrelerindeki protein ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi (devam). **e)** sE-kaderin, **f)** 97 kDa E-kaderin ve **g)** tam boy E-kaderin protein ekspresyon düzeylerine ilişkin western blot görüntüleri ile dansitometrik analizleri (n=3). *(BCPAP hücrelerinde bazal E-kaderin mRNA ekspresyonu gözlenmediği için E-kaderin primer antikoru ile muamele sonrası saptanan bantlara soru işareti konmuştur.)*

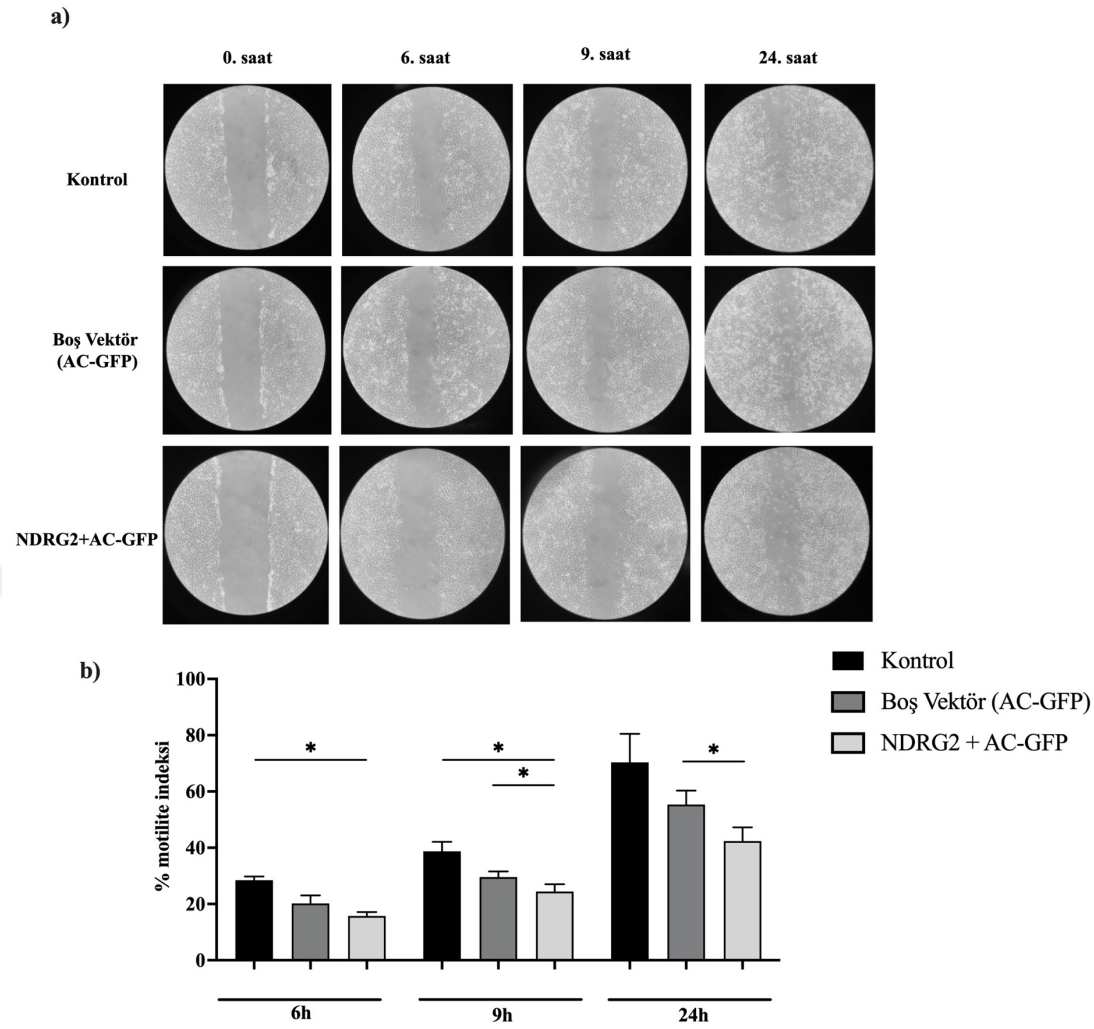
NDRG2 pDNA transfeksiyonunun BCPAP hücrelerinin metastatik hücre davranışları üzerindeki etkileri incelendiğinde; NDRG2'nin overeksprese edildiği BCPAP hücrelerinin invazyon yeteneklerinde, kontrol ve AC-GFP plazmidi ile transfekte edilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma gözlendi. Bunula birlikte, NDRG2 ve AC-GFP plazmidleri ile transfekte edilen BCPAP

hücrelerinin migrasyon yeteneklerinde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalma saptandı (Şekil 26).



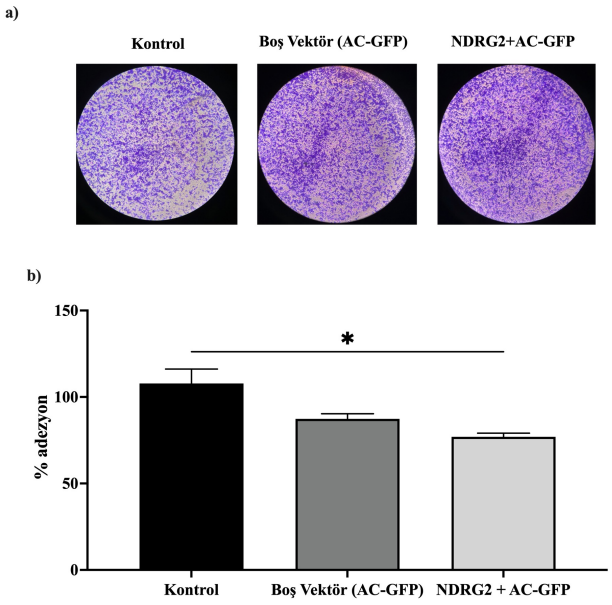
Şekil 26. BCPAP hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonunun **a)** %invazyon, **b)** %migrasyon yetenekleri üzerine etkisi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: *$p \leq 0,05$, **$p < 0,001$

NDRG2 overekspresyonu sonrası BCPAP hücrelerinin yara kapanma hızlarında altıncı saatte NDRG2 plazmidi ile transfekste edilen grupta kontrol grubuna göre, dokuzuncu saate NDRG2 plazmid plazmidi ile transfekste edilen grupta kontrol ve AC-GFP plazmidi ile transfekte edilen gruplara göre ve 24. saatte NDRG2 plazmidi ile transfekste edilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendi (Şekil 27).



Şekil 27. BCPAP hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonunun lateral hücre motilitesi üzerindeki etkisine ait **a)** mikroskobi görüntüleri ve **b)** % motilite indeksi (n=5). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: * *p≤0,05*

NDRG2 pDNA transfeksiyonu sonrası, BCPAP hücrelerinin adezyon yeteneklerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendi (Şekil 28).

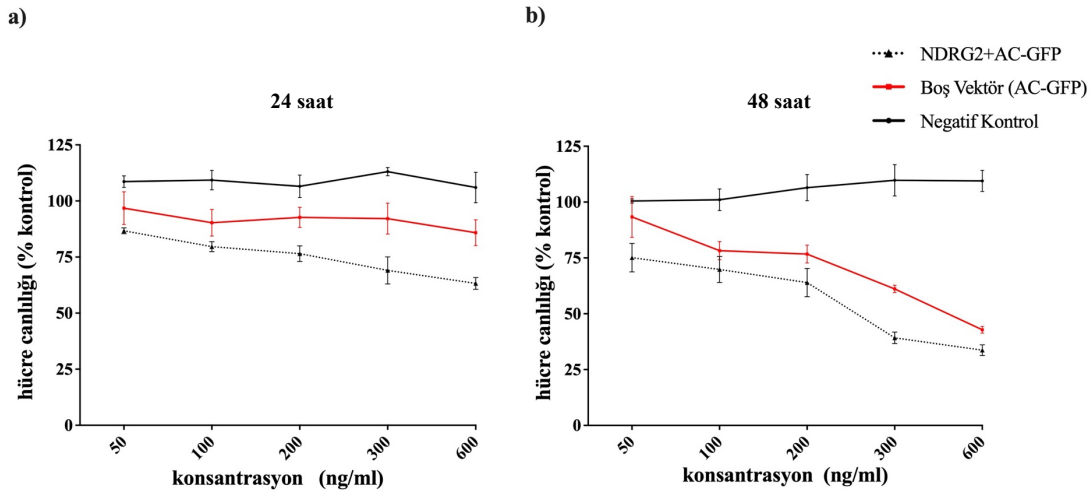


Şekil 28. BCPAP hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası adezyon yetenekleri üzerine etkisine ilişkin a) mikroskobi görüntüleri, b) bar grafikleri (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: * $p \leq 0,05$

4.2.3 FTC-133 Hücrelerinde NDRG2 pDNA Transfeksiyonu Sonrası Hedef Gen ve Protein Ekspresyon Düzeyleri ile Metastatik Hücre Davranışının İncelenmesi

Üretici firmanın talimatları doğrultusunda 600 ng/ml pDNA ile transfekte edilen FTC-133 hücrelerinin canlılığında göz görülür bir azalma saptandı. Canlılıktaki azalmanın nedenini/kaynağını bulmak için WST-1 canlılık testi uygulandı.

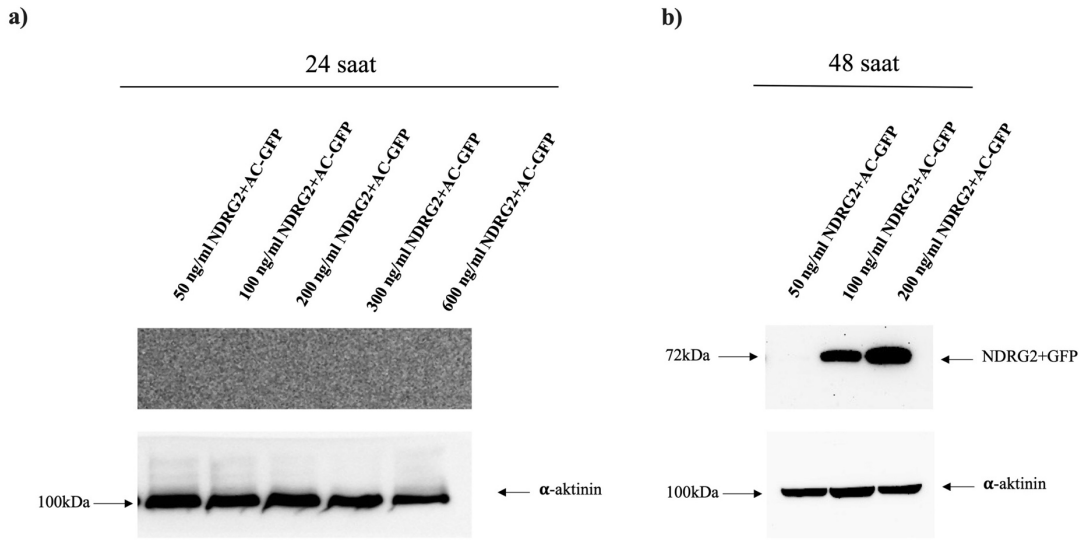
Sonuçlar incelendiğinde, 300 ve 600 ng/ml pDNA ile 48 saat transfekte edilen FTC-133 hücrelerinin canlılığında %50'den fazla bir azalma gözlendi. Bunun birlikte 24 saat pDNA transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücre canlılığında IC_{50} değerinin aşılmadığı saptandı. Ayrıca hücre canlılığındaki azalmaların negatif kontrol olarak belirtilen transfeksiyon reaktifinin kendisinden kaynaklanmadığı görüldü (Şekil 29).



Şekil 29. a) 24 ve **b)** 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda pDNA ile transfekte edilen FTC-133 hücrelerindeki canlılığın % kontrol cinsinden ifadesi.

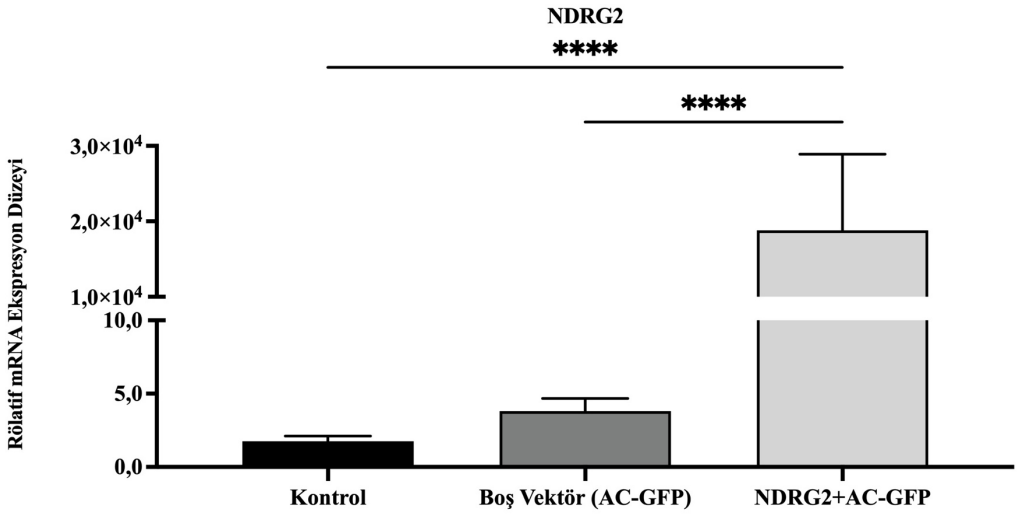
Bu verilen ardından 50, 100, 200, 300 ve 600 ng/ml NDRG2 pDNA ile 24 saat; 50, 100, 200 ng/ml NDRG2 pDNA ile 48 saat transfekte edilen FTC-133 hücrelerinde NDRG2+GFP proteinin düzeyi western blot ile incelendi. Şekil 30'da görüldüğü üzere 24 saat transfeksiyon sonrası hiçbir pDNA konsantrasyonunda NDRG2+GFP protein ekspresyonu görülmedi. Bununla birlikte 100 ve 200 ng/ml NDRG2 pDNA ile 48 saat transfekte edilen FTC-133 hücrelerinde NDRG2+GFP düzeyleri saptandı.

Hücre canlılığındaki azalmanın daha düşük olması nedeniyle, bundan sonraki deneylerde FTC-133 hücrelerinin 100 ng/ml NDRG2 pDNA ile 48 saat transfeksiyonuna karar verildi.



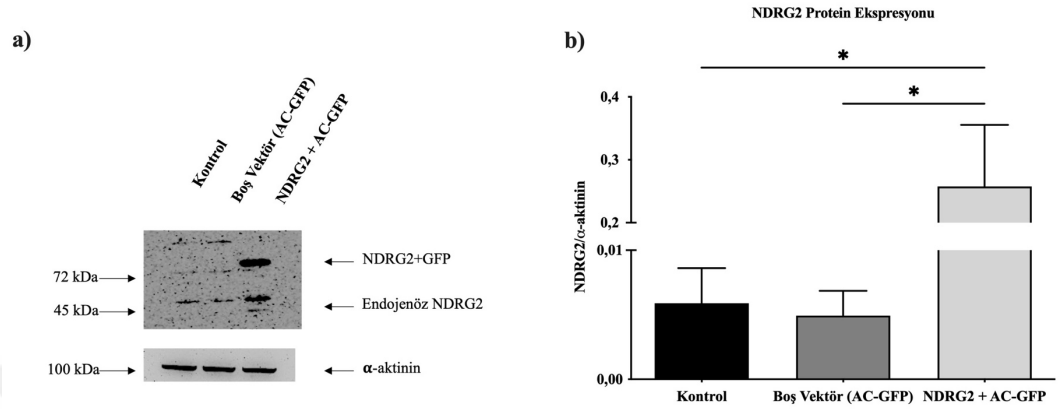
Şekil 30. Farklı konsantrasyonlarda NDRG2 pDNA ile **a)** 24 saat ve **b)** 48 saat transfekte edilen FTC-133 hücrelerinde NDRG2+GFP protein ekspresyonuna ait western blot membran görüntüleri.

NDGR2 plazmid DNA transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücrelerinde NDRG2'nin overeksprese olduğu RT-PCR (Şekil 31) ve Western Blot deneyleri (Şekil 32) ile gösterildi.



Şekil 31. NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücrelerindeki NDRG2 mRNA ekspresyon düzeyi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: ****$p<0,0001$

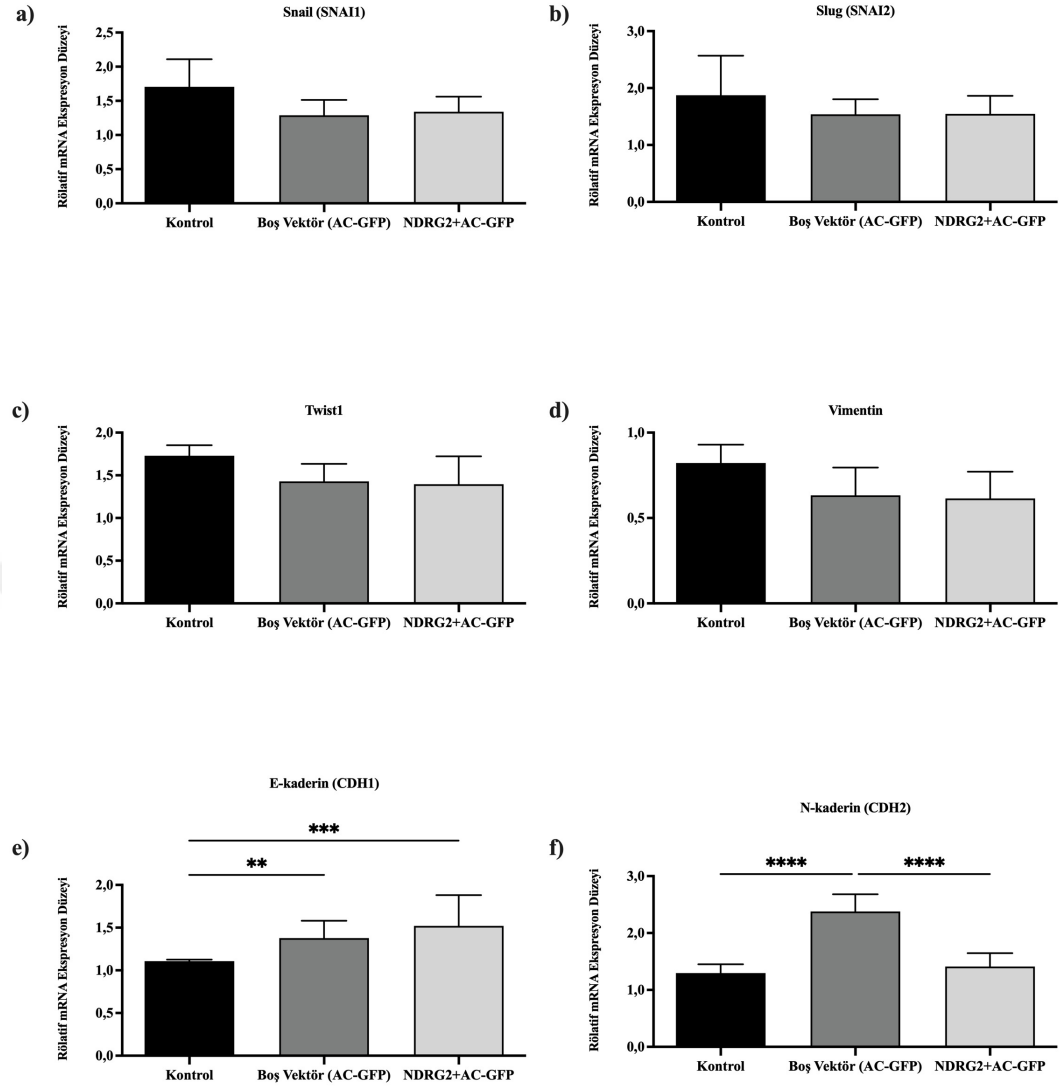
FTC-133 hücrelerinde endojenöz olarak eksprese edilen NDRG2 45 kDa civarında bant verirken, NDRG2 plazmidinde NDRG2 proteinine GFP bağlı olması nedeniyle 70 kDa civarında bant görülmektedir (Şekil 33).



Şekil 32. NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücrelerindeki NDRG2 protein ekspresyon düzeyine ait **a)** Western blot görüntüsü, **b)** Dansitometrik analizi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: *$p \leq 0,05$*

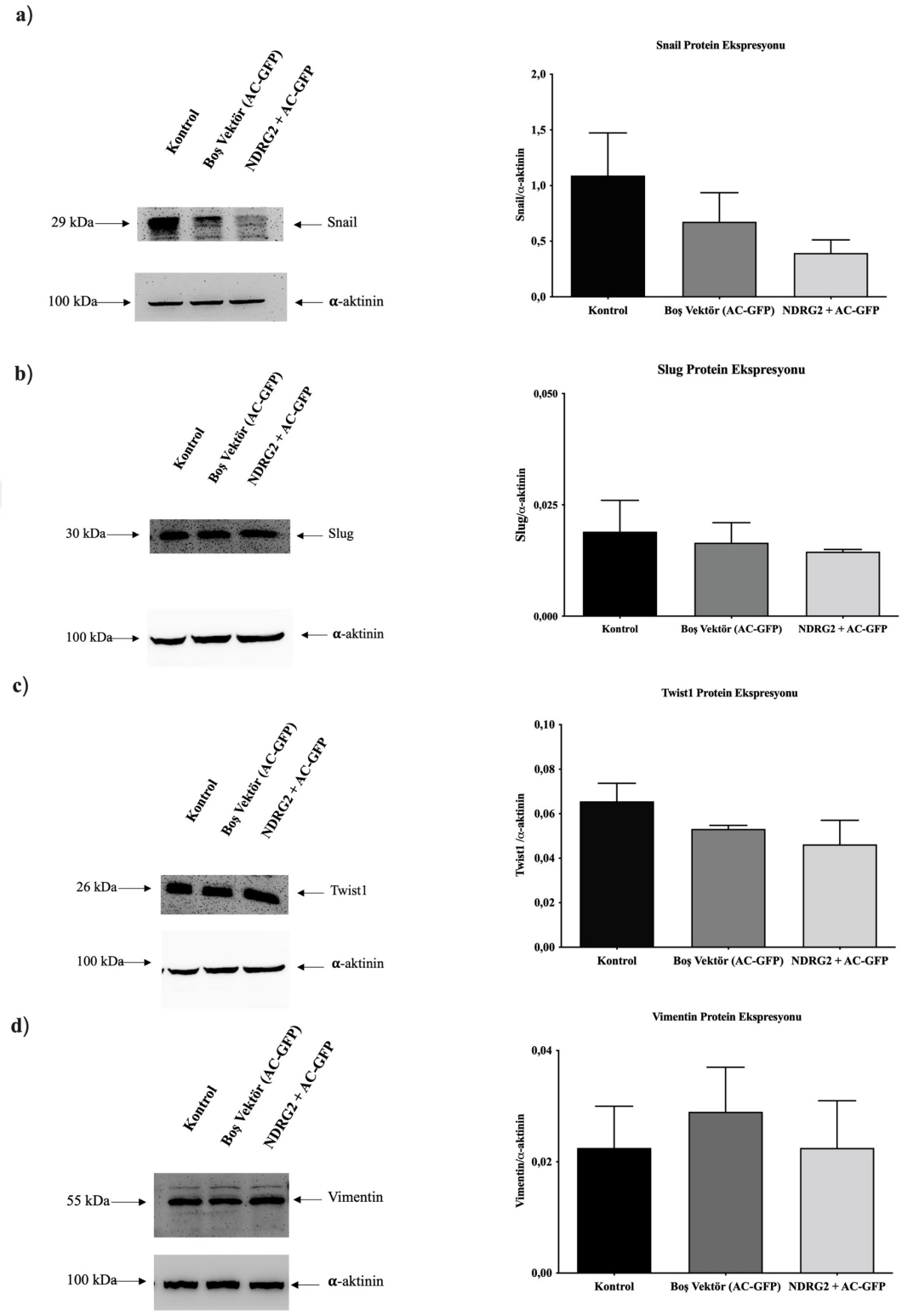
NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası hedef genler olan Snail (SNAI1), Slug (SNAI2), Twist1, Vimentin, E-kaderin (CDH-1) ve N-kaderin (CDH-2) mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişim Real Time PCR tekniği ile incelendi (Şekil 33).

Elde edilen veriler analiz edildiğinde; FTC-133 hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası olan Snail (SNAI1), Slug (SNAI2), Twist1 ve Vimentin mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark belirlenmedi. Bununla birlikte NDRG2+AC-GFP ve boş vektör gruplarındaki E-kaderin (CDH-1) mRNA düzeylerinin, kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttığı, kontrol ve NDRG2+AC-GFP gruplarındaki N-kaderin (CDH-2) düzeylerinin ise boş vektör grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldığı saptandı.

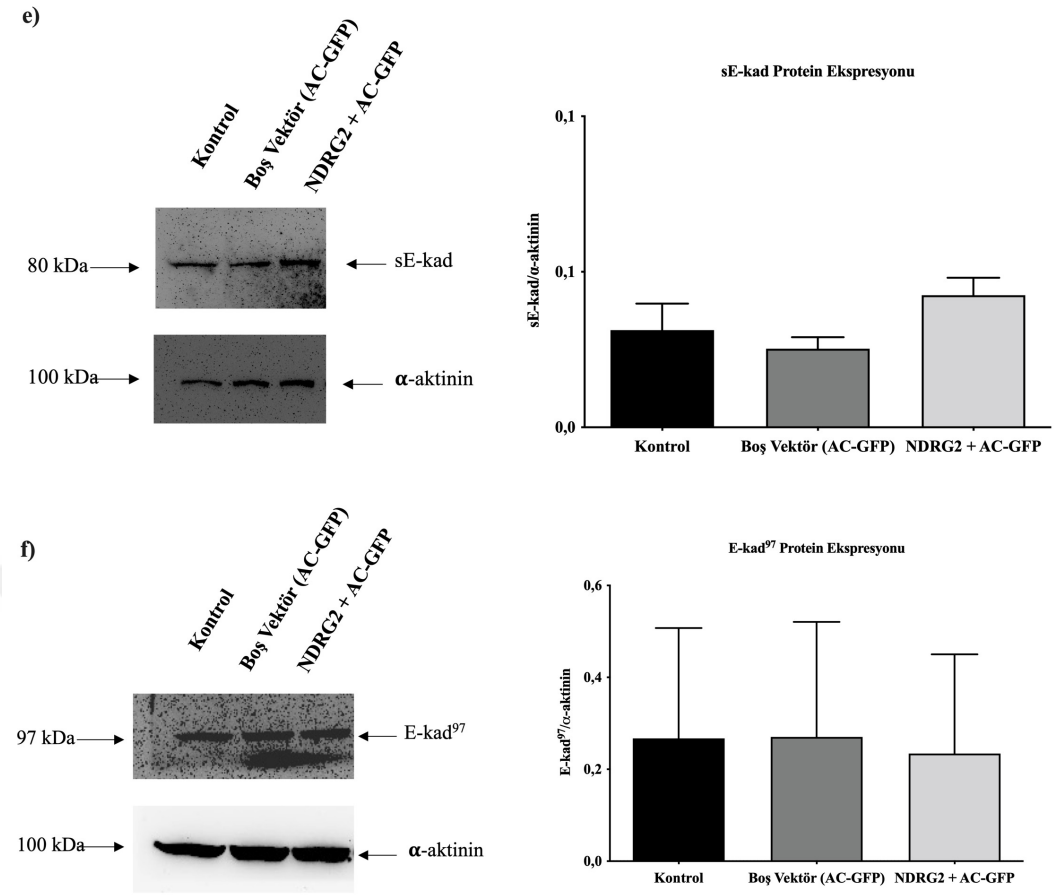


Şekil 33. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 pDNA transfeksiyonu sonrası, **a)** Snail (SNAI1), **b)** Slug (SNAI2), **c)** Twist1, **d)** Vimentin, **e)** E-kaderin (CDH-1) ve **f)** N-kaderin (CDH-2) mRNA düzeyleri (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi: ** *p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001*

NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücrelerinde Snail, Slug, Twist1, Vimentin ve E-kaderin protein ekspresyon düzeylerindeki değişim Western Blot tekniği ile incelendi. Elde edilen veriler analiz edildiğinde; NDRG2 overekspresyonunun FTC-133 hücrelerinde Slug, Twist1, Vimentin, sE-kad ve E-kad[97] protein ekspresyon düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlendi. Snail protein düzeyinde ise anlamlı olmayan bir azalma görül (Şekil 34).



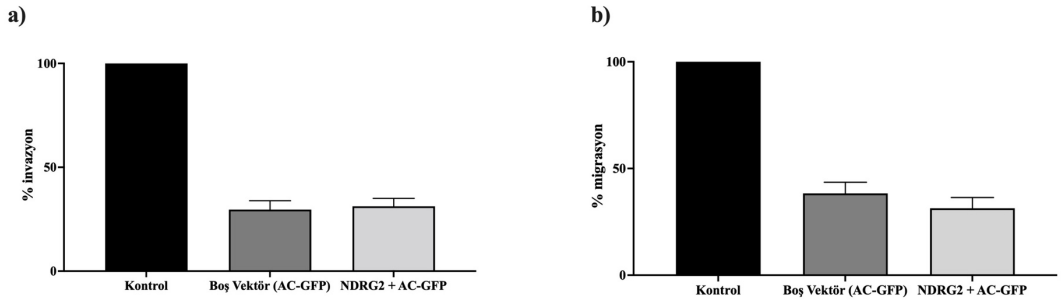
Şekil 34. NDRG2 overekspresyonunun FTC-133 hücrelerinde hedef protein ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi. **a)** Snail, **b)** Slug, **c)** Twist1 ve **d)** Vimentin protein ekspresyon düzeylerine ilişkin western blot görüntüleri ile dansitometrik analizleri (n=3).



Şekil 34. NDRG2 overekspresyonunun FTC-133 hücrelerinde hedef protein ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi (devam). **e)** sE-kad ve **e)** E-kaderin^{97} protein ekspresyon düzeylerine ilişkin western blot görüntüleri ile dansitometrik analizleri (n=3).

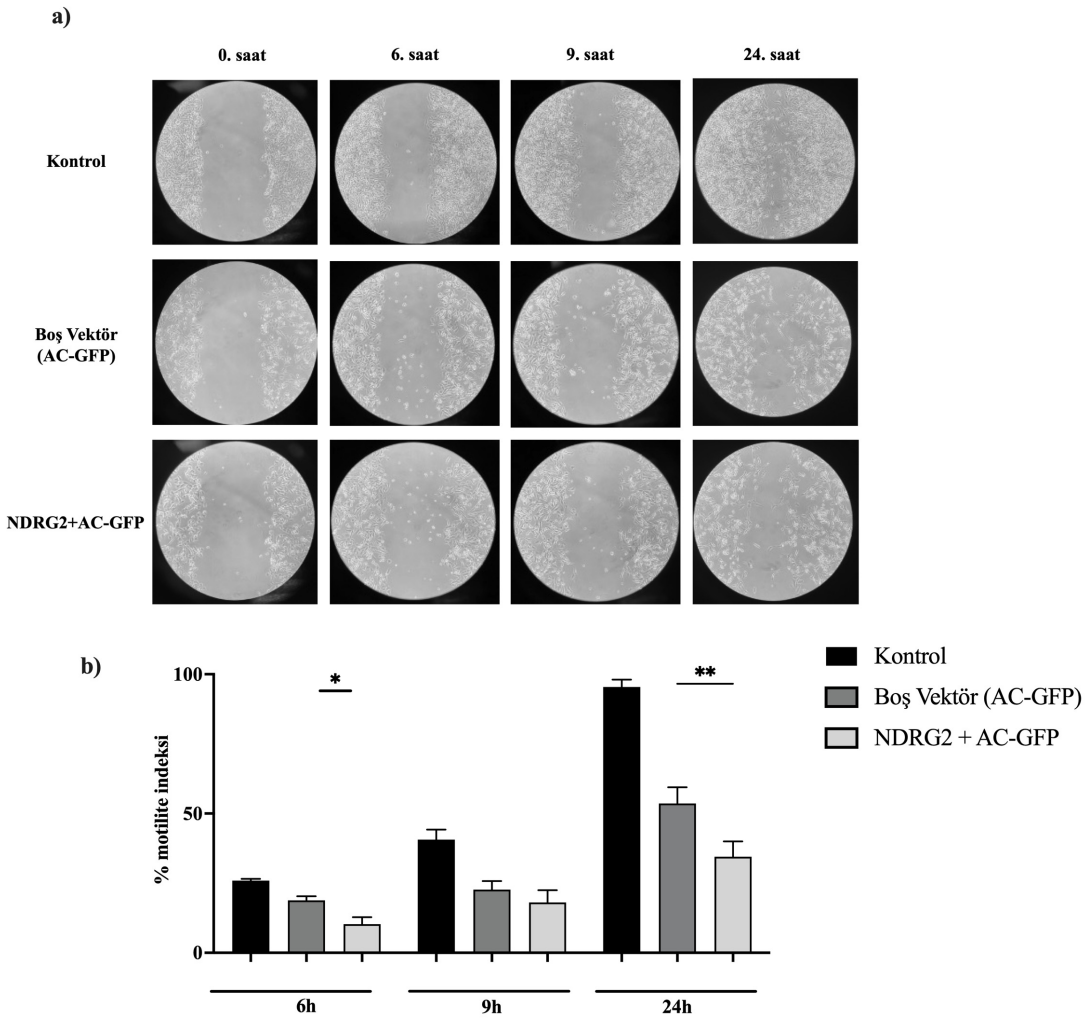
FTC-133 hücrelerinin 100 ng/ml pDNA ile 48 saat transfeksiyonu sonucu hücre canlılığında yaklaşık %25'lik bir kayıp meydana geldiği için (Şekil 29) FTC-133 hücrelerinin metastatik hücre davranışlarında meydana gelen olası değişimlerin istatistik olarak anlamlılığı NDRG2+AC-GFP ve boş vektör (AC-GFP) grupları arasında değerlendirildi.

NDRG2 overekspresyonunun FTC-133 hücrelerinin invazyon ve migrasyon yetenekleri ile üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir etkisi olmadığı saptandı (Şekil 35).



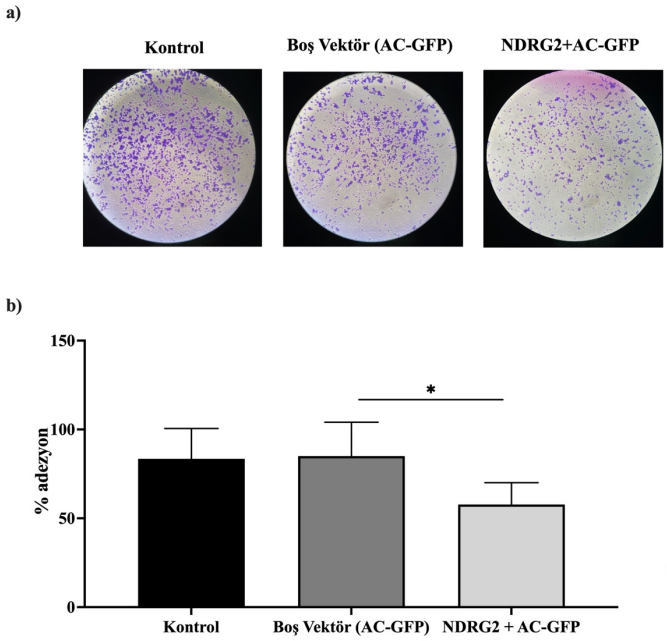
Şekil 35. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonunun **a)** % invazyon, **b)** % migrasyon yetenekleri üzerine etkisi (n=3).

NDRG2 overekspresyonu sonrası FTC-133 hücrelerinin yara kapanma hızları incelendiğinde, NDRG2 plazmid DNA'sı ile transfekte edilen FTC-133 hücrelerinde yara kapanma hızlarının 6. ve 24. saatlerde boş vektör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı gözlendi (Şekil 36).



Şekil 36. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonunun lateral hücre motilitesi üzerindeki etkisine ait a) mikroskobi görüntüleri ve b) % motilite indeksi (n=4). İstatistiksel olarak anlamlılık: *$p \leq 0,05$, **$p < 0,01$*

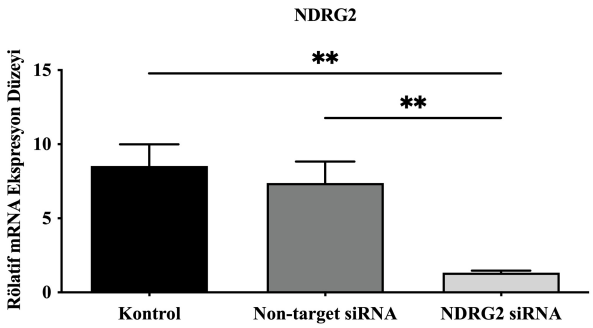
NDRG2 pDNA transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücrelerinin adezyon yetenekleri incelendiğinde, NDRG2 plazmid DNA'sı ile transfekte edilen FTC-133 hücrelerinin adezyon yetenelerinin boş vektör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı saptandı (Şekil 37).



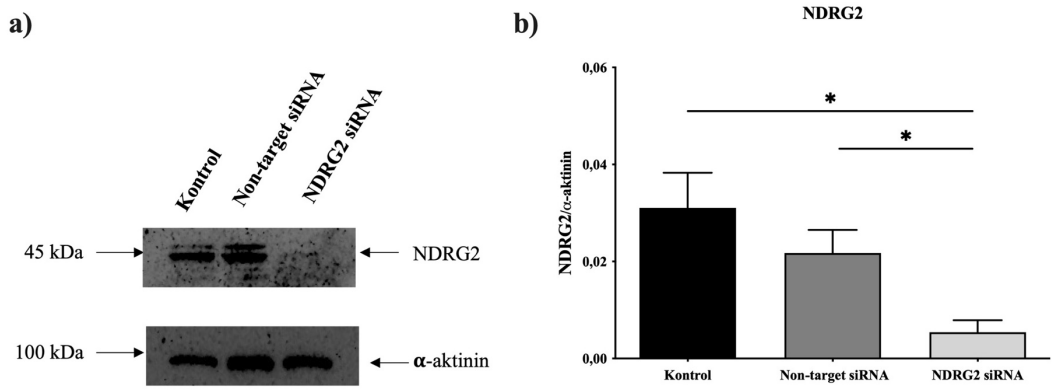
Şekil 37. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 plazmid transfeksiyonu sonrası adezyon yetenekleri üzerine etkisine ilişkin **a)** mikroskobi görüntüleri, **b)** bar grafikleri (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık: *$p \leq 0,05$*

4.3 siRNA Transfeksiyonu ile FTC-133 Hücrelerinde NDRG2 Ekspresyonunun Baskılanması Sonrası Hedef Gen ve Protein Ekspresyon Düzeyleri ile Metastatik Hücre Davranışının İncelenmesi

NDGR2 siRNA transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücrelerinde NDRG2 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerindeki azalma RT-PCR (Şekil 38) ve Western Blot deneyleri (Şekil 39) ile gösterildi.

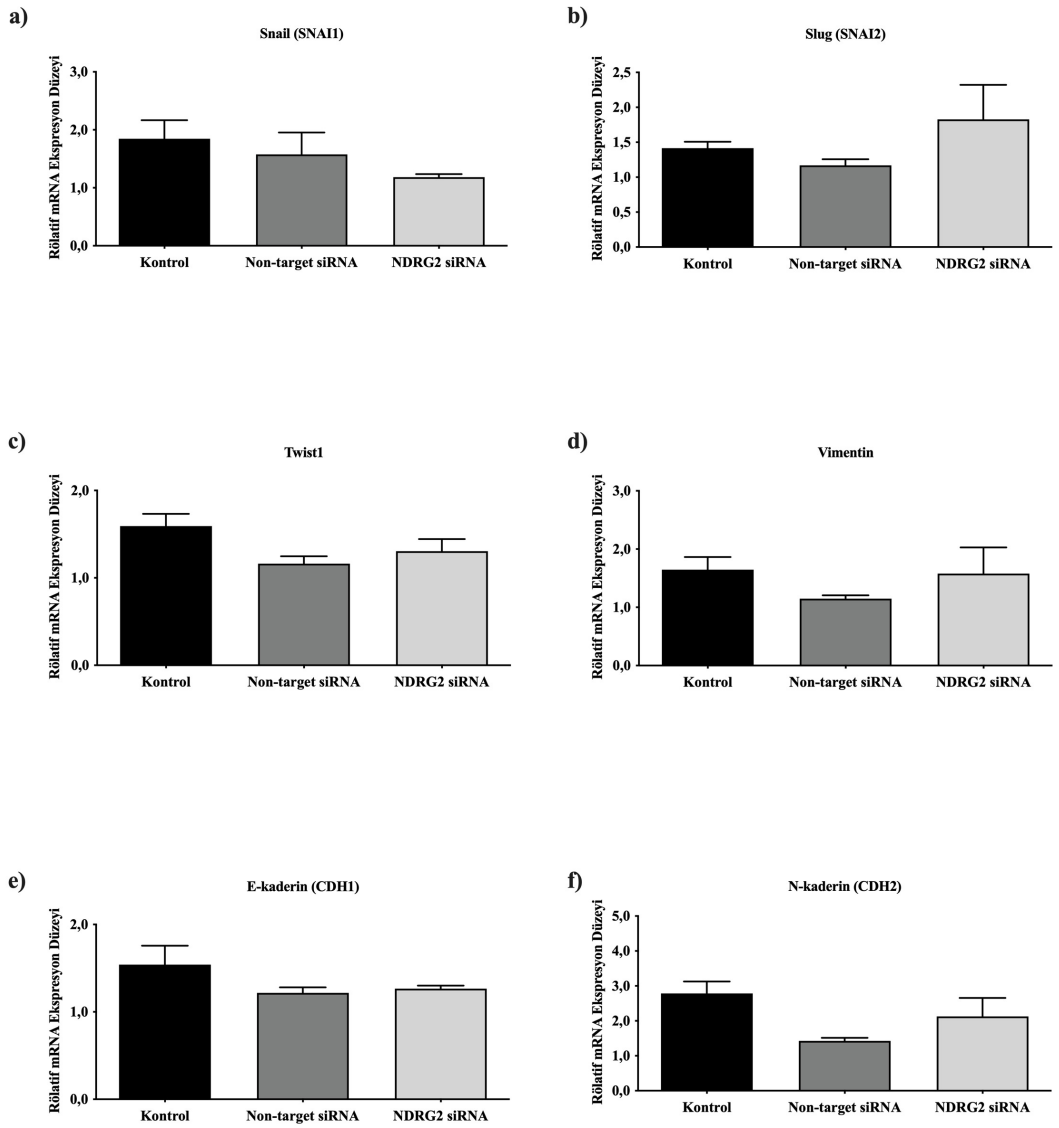


Şekil 38. FTC-133 hücrelerinin 100 nM NDRG2 siRNA ile transfeksiyonu sonrası NDRG2 mRNA ekspresyon düzeyleri (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık: *$p \leq 0,01$*



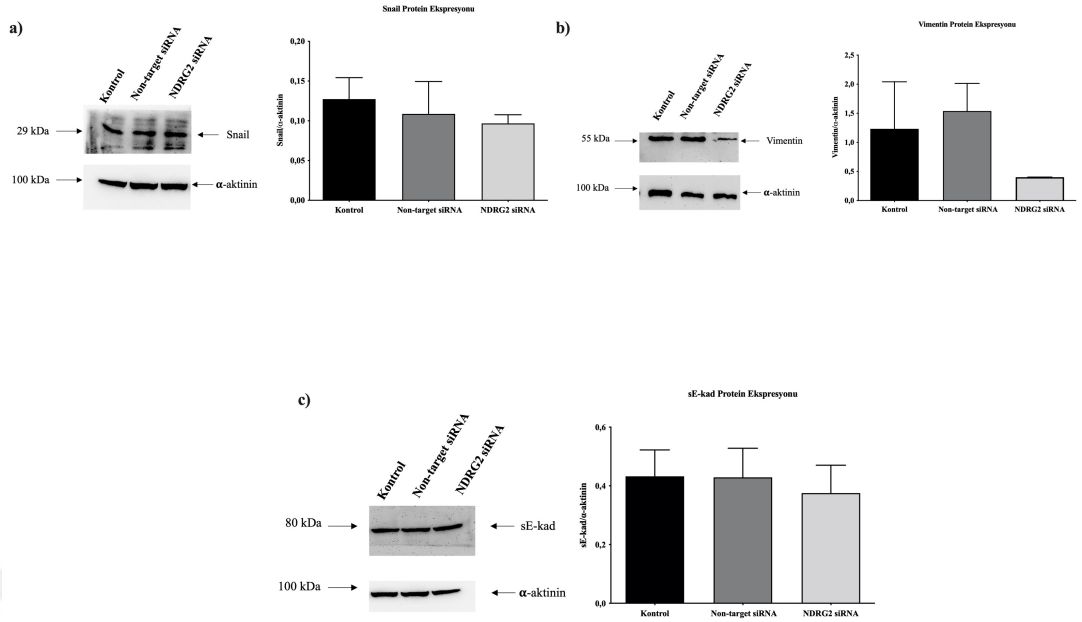
Şekil 39. NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücrelerindeki NDRG2 protein ekspresyon düzeylerine ait **a)** Western blot görüntüsü, **b)** Dansitometrik analizi (n=3). İstatistiksel olarak anlamlılık: *$p \leq 0,05$

NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası hedef genler olan Snail (SNAI1), Slug (SNAI2), Twist1, Vimentin, E-kaderin (CDH-1) ve N-kaderin (CDH-2) mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark belirlenmedi (Şekil 40).



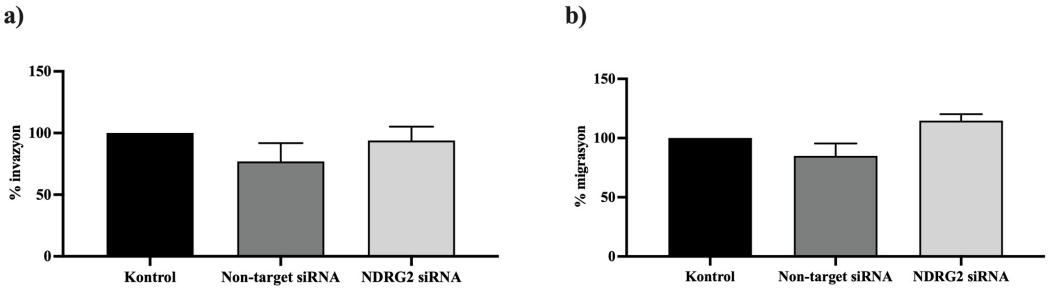
Şekil 40. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası, **a)** Snail (SNAI1), **b)** Slug (SNAI2), **c)** Twist1, **d)** Vimentin, **e)** E-kaderin (CDH-1) ve **f)** N-kaderin (CDH-2) mRNA düzeyleri (n=3).

NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası hedef proteinler olan Snail ve sE-kad protein ekspresyon düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark belirlenmedi. Primer antikor miyadlarının dolması nedeniyle Slug ve Twist protein düzeylerinde olası değişimler incelenemedi. Vimentin protein düzeyleri için iki biyolojik tekrar çalışıldığından söz konusu azalmanın istatistiksel açıdan anlamlılığı incelenmedi (Şekil 41).



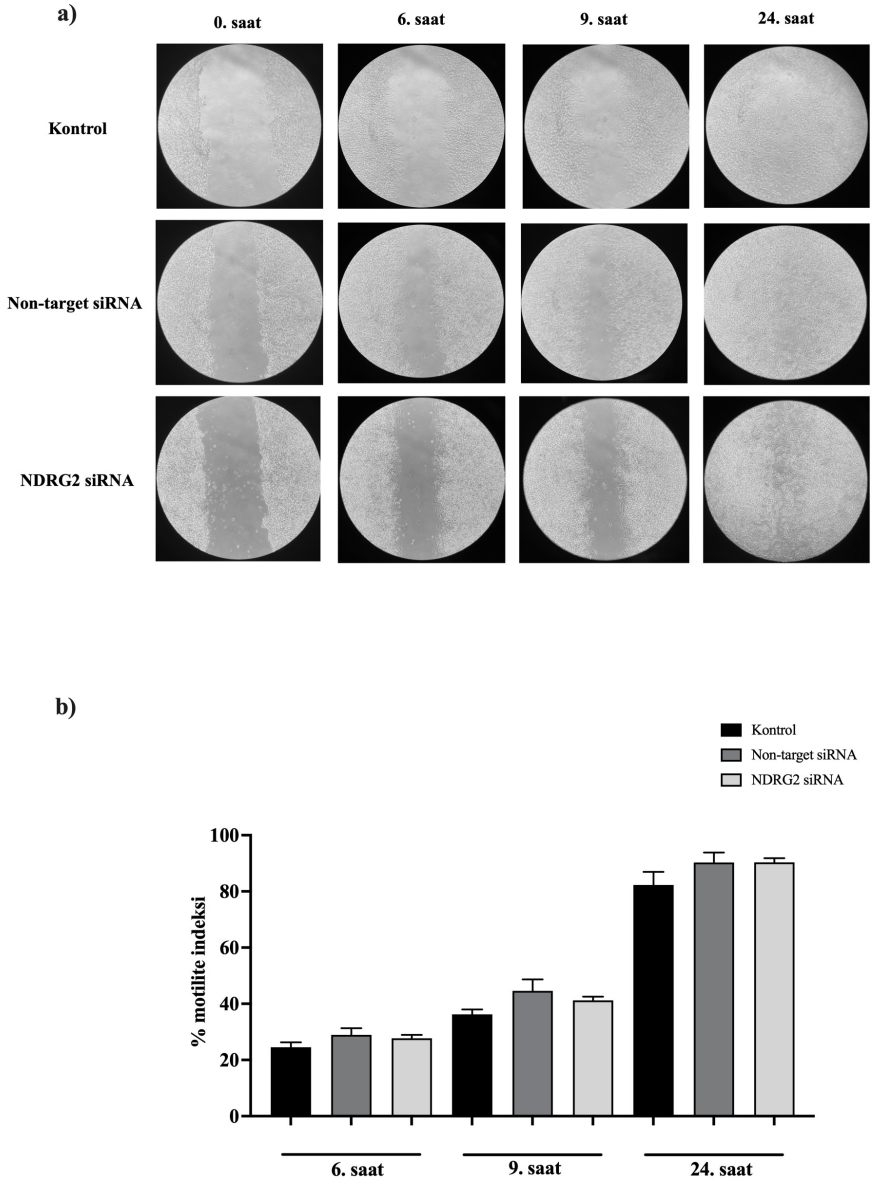
Şekil 41. NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücrelerindeki **a)** Snail ve **b)** sE-kaderin (n=3) ile **c)** Vimentin (n=2) protein ekspresyon düzeylerine ait western blot görüntüsü ve dansitometrik analizi.

NDRG2 siRNA transfeksiyonunun FTC-133 hücrelerinin metastatik hücre davranışları üzerindeki etkileri incelendiğinde; NDRG2 siRNA ile transfekte edilen FTC-133 hücrelerinin invazyon ve migrasyon yeteneklerinin non-target siRNA ile trasnfekte edilen gruba göre arttığı, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlendi (Şekil 42).



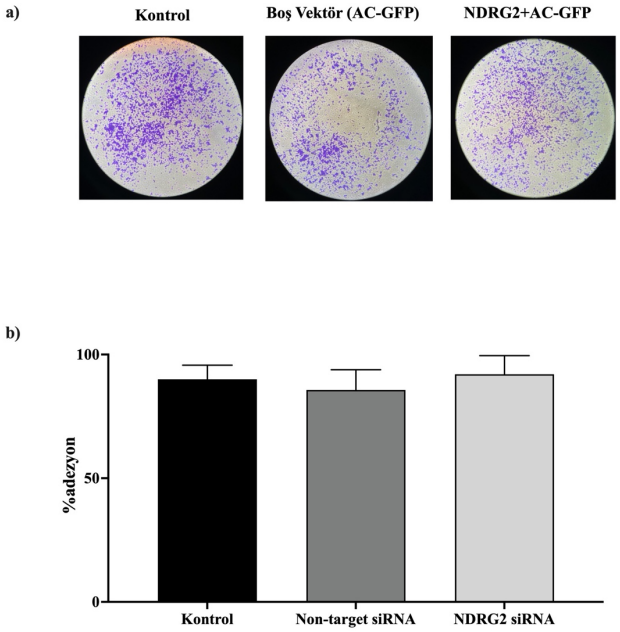
Şekil 42. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 siRNA transfeksiyonunun **a)** % invazyon, **b)** % migrasyon yetenekleri üzerine etkisi (n=3).

NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası FTC-133 hücrelerinin yara kapanma hızları incelendiğinde, NDRG2 siRNA ile transfekte edilen FTC-133 hücrelerinin yara kapanma hızlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmedi (Şekil 43).



Şekil 43. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 siRNA transfeksiyonunun lateral hücre motilitesi üzerindeki etkisine ait **a)** mikroskobi görüntüleri ve **b)** % motilite indeksi (n=4).

NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası, FTC-133 hücrelerinin adezyon yeteneklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmedi (Şekil 44).



Şekil 44. FTC-133 hücrelerinde NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası adezyon yetenekleri üzerine etkisine ilişkin a) mikroskobi görüntüleri, b) bar grafikleri (n=3).

5. TARTIŞMA

Tiroid kanseri endokrin organlar arasında en sık görülen malignite olup insidasındaki logaritmik artış bilim insanlarını bu hastalığın patogenezine yol açan genetik değişimleri aydınlatmaya yönlendirmiştir. Bununla birlikte epidemiyolojik verilerdeki artış ile tanıda yeni araçların geliştirilmesi sonucu hastalığın yönetimi son birkaç dekatta önemli ölçüde değişmiştir (334).

Epitelyal-mezenkimal dönüşüm, genetik değişiklikler sonucu epitel hücrelerinin epitel özelliklerini kaybederek mezenkimal özellikler kazanmalarını sağlayan, gelişim açısından önemli ve gerekli bir süreçtir. Bu sürecin sonucunda ortaya çıkan morfolojik ve biyokimyasal değişimler sayesinde bütün ve düzenli olan epitel hücreleri normal gelişim sürecinde organizmanın farklı kısımlarına göç ederek bu kısımlarda farklı dokuları oluştururlar (335). Ancak madalyonun diğer yüzünde EMD'nin ilerleyişi, kanser için istenmeyen tehlikeli bir süreçtir. Çünkü birincil tümördeki epitel hücreler EMD sürecinde ilerledikçe invaziv ve migratuvar özellikler kazanır, bunun sonucunda metastatik potansiyelleri artar (168).

EMD sürecine paralel bir başka süreç de farklılaşmanın kaybı anlamına gelen dediferansiyasyon sürecidir. Diferansiyasyon bir hücrenin morfolojik ve fonksiyonel olarak normal öncüsüne benzerliğinin derecesidir. Bir hücre ne kadar iyi diferansiye ise, normal akranlarının işlevsel yeteneklerini o kadar kendisinde barındırır. Dediferansiyasyon (anaplazi) sürecinden geçen hücreler, kendilerine özgü morfolojik, biyokimyasal ve moleküler özellikleri kaybederler. Hücrelerdeki farklılaşma ve oryantasyon kaybı ise büyük resme bakıldığında dokunun normal fonksiyonunun azalması ve nihayetinde kaybolması anlamına gelir. İyi diferansiye kanserlerde prognoz daha iyiyken, kötü diferansiye kanserlerde hastalık daha agresif seyredir, sağkalım azalır. Bazı kanserler ise kök hücrelerden meydana gelir, böyle tümörlerde hücreler diferansiye olmadıkları için dediferansiyasyon adımı geçirmezler. Bu nedenle bu tümörler indiferansiye tümörler olarak adlandırılır (336). Bu bilgiler ışığında EMD ve diferansiyasyon kavramları şu şekilde ilişkilendirilebilir; diferansiye hücreler epitel karakterdedirler. Dediferansiyasyon sürecine girdiklerine mezenkimal fenotipe yaklaşırlar; bu süreç devam ettikçe EMD-MED terazisinde EMD tarafı daha ağır basar. Diğer bir anlatıyla dediferansiyasyon sürecin EMD, diferansiyasyon ise sürecin MED yönüne kaydığını gösterir. İndiferansiye hücreler ise mezenkimal karaterde

oldukları için bir terazinin varlığından ve dolayısı ile EMD-MED süreçlerinden söz edilemez.

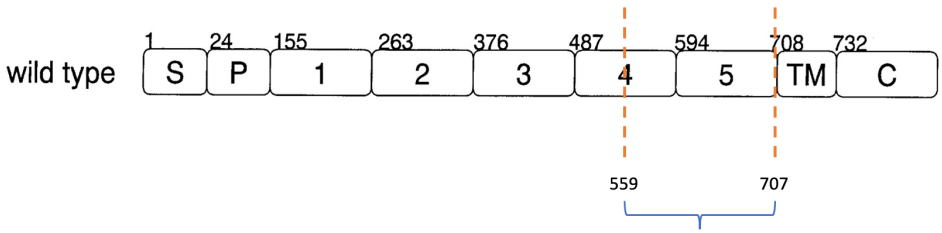
Bu çalışmada iki dediferansiye (papiller ve folliküler), bir indiferansiye (anaplastik) tiroid kanseri hücresinde diferansiyasyonla ilişkili ve tümör baskılayıcı gen olduğu bilinen NDRG2'nin EMD üzerine etkilerini inceledik. İki ana bölümden meydana gelen araştırmamızın birinci bölümü NDRG2'nin pDNA transfeksiyonu ile geçici overekspresyonuna, ikinci bölümü NDRG2 siRNA ile geçici olarak baskılanmasına ayrıldı. Transfeksiyonlar sonrasında epitelyal belirteç E-kaderin ve onu transkripsiyonel olarak baskılayan Snail, Slug ve Twist1 transkripsiyon faktörleri ile hücredeki invaziv ve migratuvar yetenekleri indükleyen Vimentin mRNA ve protein düzeylerindeki olası değişimleri inceledik. Daha sonra plazmid ve siRNA transfeksiyonlarının metastatik hücre davranışı üzerine olası etkileri gözledik. Bu bağlamda matrijel invazyon, transwell migrasyon, yara iyileşmesi (lateral migrasyon) ve adezyon deneylerini gerçekleştirdik.

Sonuçlar irdelendiğinde, NDRG2 plazmid transfeksiyonunun indiferansiye insan anaplastik hücre hattı 8505C hücrelerinde Vimentin protein düzeylerini azalttığı bunun dışındaki hedef gen ve protein düzeyleri ile metastatatik hücre davranışı üzerinde herhangi bir etki göstermediği gözlendi. Benzer şekilde NDRG2 overekspresyonunun insan papiller tiroid kanseri BCPAP hücrelerinde hedef gen ve protein düzeyleri üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı saptandı. Bununla birlikte NDRG2 overekspresyonu sonrası BCPAP hücrelerinin invaziv yetenekleri ile yara kapanma hızlarında anlamlı bir azalma saptandı. 8505C ve BCPAP hücrelerinde E-kaderin mRNA düzeyleri RT-PCR ile saptanamadığı için "Kaderin anahtarı" kavramı doğrultusunda N-kaderin mRNA düzeyleri üzerindeki değişimler incelendi. Bu bağlamda NDRG2 overekspresyonunun 8505C ve BCPAP hücrelerinde N-kaderin mRNA düzeyleri üzerinde bir etkisinin olmadığı belirlendi.

8505C ve BCPAP hücrelerinde E-kaderin gen ekspresyonu görülmemesine karşın western blot deneylerinde farklı molekül ağırlığında E-kaderin bantları saptandı. Erişilebilir literatür incelendiğinde sE-kad, E-kad/CTF-1, E-kad/CTF-2 ve E-kad/CTF-3 fragmanlarının yanısıra posttranslasyonel kesimler sonucu farklı kanser türlerinde farklı moleküler ağırlıklardaki E-kaderin fragmanlarının rol aldığı görülmektedir. Rashid ve arkadaşları 18 prostat kanseri ile eşlenik doku üzerinde

gerçekleştirdikleri araştırmalarında 120 kDa'lık tam uzunluktaki E-kaderinin (E-kad^{120}) yanısıra 97 kDa'lık başka bir fragman (E-kad^{97}) saptamışlar ve E-kad^{120}'den kesilen sitoplazmik kısmın β-katenin için bağlanma domaini olduğunu göstermişlerdir (337). Fontana ve arkadaşları prostat kanseri hücrelerinde sE-kad ile 50 ve 65 kDa'lık E-kaderin fragmanlarını göstermişlerdir (338).

Çalışmamızda western blot deneyleri sonucu 8505C hücrelerinde sE-kad (80 kDa), BCPAP hücrelerinde ise sE-kad ve 97 kDa'lık E-kaderin fragmanları ile 120 kDa'lık tam boy E-kaderin proteinine ait bant saptandı. Ancak her iki hücrede E-kaderin gen ekspresyonu görülmemesi nedeniyle bu bantlara kuşkuyla yaklaşıldı. Bununla birlikte sE-kad'ın invazyon ve migrasyonu indüklediğinin *in vitro* çalışmalar ile gösterilmesi, bizim çalışmamızda NDRG2 plazmid DNA transfeksiyonu sonucu BCPAP hücrelerinin invaziv ve migratuvar yeteneklerindeki azalmayla paralel sE-kad protein düzeylerindeki istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalmanın görülmesi, bu hücrelerde saptanan bantların E-kaderin proteini ile onun fragmanlarına ait olma ihtimalini arttırmaktadır. Tüm bunlara ek olarak western blot deneylerinde kullandığımız antikor, 882 aminoasitten oluşan E-kaderin proteininde ekstrasellüler domaininde yer alan 559-707 arasındaki aminoasit sekansına bağlanması saptanan bantların tam boy E-kaderin ile onun kesim ürünlerine ait olduğu savını daha da güçlendirmektedir (Şekil 45).



Şekil 45. Western blot deneylerinde E-kaderin ekspresyonunun deteksiyonu kullanılan kullanılan primer antikorun epitopu.

Çalışmamızda transfeksiyonlar sonrası E-kaderin gen ekspresyonundaki olası değişimlerin incelenmesi amacıyla RT-PCR deneylerinde kullandığımız PCR primerler, şu ana kadar tanımlamış dört farklı transkript varyantını çoğaltacak şekilde tasarlandı. Bu nedenle 8505C ve BCPAP hücrelerinde E-kaderin mRNA düzeylerinin saptanamaması E-kaderin düzeylerinin negatif geri besleme ile E-kaderin gen

ekspresyonunu baskılamış olmasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürdü. Bunu doğrulamak için E-kaderinin intrasellüler domainine bağlanan farklı anti-E-kaderin primer antikorları ile western blot deneylerinin tekrarlanması gerekmektedir. Böylece E-kad/CTF-1, E-kad/CTF-2 ya da E-kad/CTF-3 fragmanlarına benzer düşük molekül ağırlığında fragmanların dedekte edilmesi durumunda savımız kısmen doğrulanacaktır.

FTC-133 hücrelerinde, plazmid transfeksiyonunun hücre canlılığı üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı WST-1 deneyi gerçekleştirildi. Lipofectamin 3000™ ve p3000™'nin FTC-133 hücre canlılığı üzerinde bir etkisi olmaması bize FTC-133 hücre canlılığındaki kaybın transfeksiyon işleminin kendisinden kaynaklanmadığını gösterdi. Bunun üzerine farklı konsantrasyondaki NDRG2+AC-GFP ve AC-GFP plazmidleri ile 24 ve 48 saat inkübe edilen FTC-133 hücrelerinde % canlılık değerlerindeki azalmadan yola çıkılarak uygun plazmid konsantrasyonu ve transfeksiyon süresi belirlendi. Tüm plazmid konsantrasyonlarında hücre canlılığında azalma görülmesi FTC-133 hücrelerinde transfeksiyonun gerçekleştiğini gösterdi. Ancak santral dogma olarak bilinen "DNA'dan RNA'ya, RNA'dan proteine" süreci göz önüne alınarak transfeksiyon işleminin proteine yansıyıp yansımadığı western blot deneyi ile doğrulandı. Bu bağlamda FTC-133 hücrelerinin 100 ng/ml NDRG2 plazmidi ile 48 saat transfeksiyonu sonrası bu hücrelerde NDRG2+GFP proteininin eksprese edildiği western blot deneyi ile gösterildi. Bu veriler ışığında FTC-133 hücreleri için plazmid konsantrasyonu 100 ng/ml, transfeksiyon süresi ile 48 saat olarak belirlendi. Ayrıca WST-1 sonuçları tekrar irdelendiğinde NDRG2+AC-GFP plazmidinin, AC-GFP plazmidine göre hücre canlılığı üzerinde daha fazla olumsuz etkisi olduğu gözlendi. Lesueur ve arkadaşlarının plazmidlerin fiziksel boyutunun hücre canlılığı üzerine etkisin inceledikleri *in vitro* çalışmada plazmid boyutu ile transfeksiyon verimi ve hücre canlığı arasında ters bir orantı bulunduğunu göstermişlerdir (339). Bu çalışma, pDNA ile ile transfekte edilen FTC-133 hücrelerinde hücre canlılığın azalmasını ve NDGR+AC-GFP (7711 bç) plazmidi ile transfekte edilen gurupta canlılık kaybının AC-GFP plazmidi (6598 bç) ile transfekste edilen gruba daha fazla olmasını açıklamaktadır.

FTC-133 hücrelerinde NDRG2 pDNA transfeksiyonunun Snail, Slug, Twist1 ve Vimentin mRNA ve protein düzeyleri üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı görüldü.

NDRG2+AC-GFP ve boş vektör (AC-GFP) ile transfekte edilen FTC-133 hücrelerinde E-kaderin mRNA düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış saptandı. Boş vektör ile transfekte edilen FTC-133 hücrelerinin N-kaderin mRNA ekspresyonunda boş vektör ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlendi. 8505C ve BCPAP hücrelerindekine benzer şekilde FTC-133 hücrelerinde de E-kaderine ait 80 (sE-kad) ve 97 kDa'lık (E-kad97) fragmanlar gözlendi. Ancak NDRG2 overkespresyonu bu fragmanların düzeyinde bir fark meydana getirmedi.

WST-1 sonuçları doğrultusunda 100 ng/ml pDNA ile transfekte edilen FTC-133 hücrelerinde yaklaşık %25'lik bir canlılık kaybı gözlenmesi nedeniyle metastatik hücre davranışı deneylerinde karşılaştırmalar NDRG2 ve boş vektörle transfekte edilen gruplar arasında yapıldı. Bu bağlamda NDRG2'nin overeksprese edildiği FTC-133 hücrelerinin invaziv ve migratuvar yeteneklerinde anlamlı bir değişim gözlenmedi. Ancak NDRG2 plazmidi ile transfekte edilen FTC-133 hücrelerinin yara kapanma hızlarında 6. ve 24. saatlerde anlamlı bir azalma saptandı. Bununla birlikte hücre adezyon deneyi sonuçlarında NDRG2'nin overeksprese edildiği FTC-133 hücrelerinde adezyonunun azaldığı görüldü.

siRNA ile transfeksiyon bölümünde üç hücre hattından biri seçildi. Seçim kriterinde dediferansiyasyon (ya da indiferansiyon) – EMD süreci baz alındı. Bu bağlamda indiferasiye (en mezenkimal fenotip) 8505C hücre hattı elendi. Tiroid kanseri için diferansiyasyon belirteçleri olan sodyum iyodür simporter (NIS) ve tiroglobulin (Tg) antikorları ile bunlara ilişkin PCR primerleri bulunmadığı için BCPAP ve FTC-133 hücrelerinden birinin seçiminde EMD için epitel marker olan E-kaderin gen ve protein ekspresyonlarına bakıldı. FTC-133 hücrelerinde E-kaderin gen ve protein ($E\text{-}kad^{80}$ ve $E\text{-}kad^{97}$) ekspresyonlarının görülmesi sonucu NDRG2 siRNA transkfeksiyonunun FTC-133 hücreleri üzerinde gerçekleştirilmesine karar verildi.

FTC-133 hücrelerinde NDRG2 siRNA ile transfekte edilen FTC-133 hücrelerinde Snail (SNAI1), Slug (SNAI2), Twist1, Vimentin, E-kaderin (CDH1) ve N-kaderin (CDH2) mRNA düzeylerinde anlamlı bir değişim gözlenmedi. Slug ve Twist1 antikorlarının miyadlarının dolmasından ötürü, Snail, Vimentin ve E-kaderin protein düzeyleri incelenebildi. NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası Snail ve E-kaderin protein düzeylerinde anlamlı bir değişim gözlenmezken Vimentin

düzeylerinin azaldığı gözlendi. Ancak tekrar sayısının azlığından ötürü bu azalma istatistiksel olarak değerlendirilemedi. Biyolojik tekrar açısından elimizde yeterli sayıda grup olmasına rağmen yalnızca yakın tarihli biyolojik tekrarlardan elde eldilen lizatlarda Vimentin ekspresyonu görülmesinin nedeninin Vimentinin diğer proteinlere göre daha hızlı degrade olmasına bağlandı. NDRG2 susturumunun hücrelerdeki invaziv, migratuvar ve yara kapanma yetenekleri ile hücre adezyonu üzerinde bir etkisinin olmadığı saptandı.

Hücresel homeostaz, proteinlerin hücreler içinde düzgün dağılımına ve membran proteinlerinin doğru lokalizasyonuna kuvvetle bağlıdır (340). Tez projesinin öneri aşamasında NDRG2 plazmid DNA transfeksiyonları sonucu membran proteini olan E-kaderin protein düzeylerinde olası bir artışın ya da bazal E-kaderin düzeylerinin hücredeki lokalizasyondaki olası değişiminin immunfloresans deney ile desteklenmesi planlanmıştı. Ancak kullanılan primer antikor hem western blot hem de immunfloresans deneylerinde çalışmamasından dolayı, E-kaderin protein düzeylerinde olası değişimler bir başka üreticiden temin edilen anti-E-kaderin primer antikorunu ile gözlenebildi. Antikorun deneme boyunda olmasından olayı sadece western blot deneyleri gerçekleştirilebildi.

Erişilebilir literatürde, tiroid kanserinde EMD'nin incelendiği çalışmalar görülebilir. Hardy ve arkadaşlarının Snail, Slug ve E-kaderin gen ve protein düzeylerini tiroid kanseri hücreleri (BCPAP, Cal-62, 8305C, FTC-133 ve K1) ile insan normal tiroid kanseri hücre hattı (N-thy-ori-3-1) ile karşılaştırmışlar, tiroid kanseri hücrelerinde Snail ve Slug düzeylerinin yalnızca kanser hücrelerinde eksprese edildiğini saptamışlardır. Tiroid kanseri hücreleri arasında sadece BCPAP ve FTC-133 hücrelerinde E-kaderin protein ekspresyonu olduğunu, bununla birlikte bizim çalışmamıza benzer şekilde bu hücrelerde E-kaderin gen ekspresyonunun yok denecek kadar az olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada immünohistokimya çalışmaları sonucunda normal tiroid dokularında Snail ve Slug'ın ekprese edilmediği, hücre membranlarında E-kaderin ekspresyonunun gözlendiği belirtilmiştir. Otuz bir folliküler tiroid kanseri dokusundan 18'inde Snail, 22'sinde Slug ekspresyonu saptanırken, 15'inde E-kaderin ekspresyonunun düşük olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde 32 papiller tiroid kanseri dokusundan 28'inde Snail, tümünde Slug ekspresyonu gözlendiği, 15'inde E-kaderin ekspresyonunda düşük olduğunu

belirtmişlerdir (326). Salerno ve arkadaşlarının diğer bir EMD belirteci olan Twist1'in anaplastik tiroid kanserindeki rolünü inceledikleri bir çalışmada, 41 ATK dokusundan 20'sinde Twist1 ekspresyonu saptanmıştır. ATK hücrelerinde (8505C, OCUT-2 ve CAL62) Twist1 susturumu ile hücrelerin invazyon yetenekleri ile motilitelerinde anlamlı bir azalma saptamışlardır (325). Da ve arkadaşları N-kaderin ekspresyonundaki değişimi tiroid kanserinde incelemişler ve papiller tiroid kanseri dokularındaki N-kaderin gen ve protein ekspresyonunun normal tiroid dokularına göre anlamlı ölçüde arttığını belirtmişlerdir. PTK hücrelerinde (TPC-1 ve K1) hücrelerinde N-kaderin ekspresyonunun baskılanması ile hücrelerin migratuvar ve invaziv yeteneklerinde anlamlı ölçüde bir azalma saptamışlardır (341). Cazarin ve arkadaşları tarafından ise BCPAP ve TPC-1 papiller tiroid kanseri hücre hatlarındaki Vimentin protein ekspresyonunun N-thy-ori-3-1 hücrelerinde göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu belirtmişlerdir (342).

NDRG2-EMD ilişkisinin farklı kanser türleri üzerindeki etkilerinin incelendiği çeşitli çalışmalar NDRG2 kaybının EMD sürecinin ilerleyişi açısından olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Kim ve arkadaşları kolon kanseri hücreleri ile kolon kanseri dokularında NDRG2 ve E-kaderin ekspresyonları arasında pozitif korelasyon saptamışlar; KM12 hücrelerinde NDRG2'nin overekspresyonu ile E-kaderin ekspresyonunda artış, Snail ekspresyonunda azalma meydana geldiğini göstermişlerdir. NDRG2 upregülasyonu ile E-kaderin ekspresyonundaki artışın, NDRG2'nin bir transkripsiyon faktörü olarak davranarak E-kaderinin promotor bölgesine bağlanması ile açıklamışlardır. Ayrıca yüksek NDRG2 ekspresyonu ile genel sağkalım arasında anlamlı bir ilişki saptamışlardır (343). Kim ve arkadaşları ise MDA-MB-231 hücrelerinde NDRG2 overekspresyonu ile E-kaderin ekspresyonunda artma, Snail ekspresyonunda azalma; MCF-7 hücrelerinde NDRG2 susturumu ile E-kaderin ekspresyonunda azalma, Snail ekspresyonunda artış saptadıklarını belirtmişlerdir. Bu saptamalara paralel olarak NDRG2 overekspresyonunun hücrelerin migrasyon ve invazyon yeteneklerini anlamlı ölçüde azalttığını göstermişlerdir (344). Safra kesesi (345), mide (346), yemek borusu kanseri (347) ve renal hücreleri karsinom (348) alanında yapılan araştırmalarda da NDRG2 ekspresyon kaybı ile EMD ilerleyişi arasında pozitif bir ilişki gösterilmiştir.

Erişilebilir literatürde tiroid kanserinde NDRG2 ekspresyon değişimlerinin incelendiği çalışmalar sınırlıdır (129, 130, 349). Ancak folliküler hücre kaynaklı tiroid kanserleri hücrelerinde NDRG2-EMD ilişkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte Yin ve arkadaşları insan medüller tiroid kanseri hücrelerinde (TT hücre hattı) NDRG2 overekspresyonu ile hücrelerin koloni oluşturma ve invaziv yeteneklerinde anlamlı bir azalma gözlemlediklerini, NDRG2 overekspresyonunun hücrelerde apoptozu indüklediğini belirtmişlerdir. NDRG2 overeskpresyonunun nu/nu farede tümör yükünü anlamlı ölçüde azaltırken, NIS ekspresyonunda ve buna bağlı olarak iyodür alımında artma saptamışlardır (350).

Kanserde erken tanı hastalığın seyri ve sağkalım açısından büyük önem arz etmektedir. Bunun en önemli nedeni hastalığın başlaması ile tanı konması arasındaki artan sürecin kanser hücrelerinin dediferansiyasyon sürecinde daha çok yol alması anlamına gelmesindendir. Diğer bir anlatıyla tanıda ne kadar geç kalınırsa EMD-MED terazisinde EMD tarafı daha ağır basacak, bu durum kanserin ilerleyişi ve yayılımına fayda sağlayacaktır. Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi gibi konvansiyonel yöntemlere ek olarak aşılar, biyolojik, hormonal, hedeflenmiş terapiler ile gen terapileri sayesinde solid tümörlere karşı pek çok cephede verilen savaşın iki temel hedefi vardır: i) ilerleyişi ve yayılımı durdurmak, ii) birincil tümörü kontrol altına almak ve mümkünse yok etmek. Tüm bu tedavi yaklaşımlarından alınan fayda, heterojen tümör yükündeki epitelyal karakterdeki hücre oranı ile doğru orantılıdır. Bu bağlamda sonuçlarımızın, tiroid kanser başta olmak üzere pek çok kanser türünde NDRG2 upregülasyonunu hedefleyen farmakolojik ve moleküler yaklaşımların konvansiyonel tedavilerle kombine edilmesi ile daha etkin terapötik stratejilerin geliştirilmesine olanak vereceğini öngörmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1) Çalışmamızda tiroid kanseri (8505C, BCPAP ve FTC-133) hücrelerinde NDRG2'nin EMD üzerine etkileri incelendi.

2) NDRG2 plazmid ve siRNA transfeksiyonları RT-PCR ve western blot teknikleri ile doğrulandı.

3) NDRG2 overekspresyonu ile

a) 8505C hücrelerinde Vimentin protein düzeyleri ile,

b) BCPAP hücrelerinde invazyon ile yara iyileşme hızlarında azalma,

c) FTC-133 hücrelerinde E-kaderin mRNA düzeylerinde artış, yara kapanma hızı ve hücre adezyonunda azalma gözlendi.

4) NDRG2 overekspresyonu ile

a) BCPAP hücrelerindeki sE-kaderin düzeyleri ile,

b) FTC-133 hücrelerindeki Snail protein düzeylerindeki azalmanın anlamlı olup olmadığının belirlenmesi için deney sayısının arttırılması öngörüldü.

5) Farklı PCR primerleri ile 8505C ve BCPAP hücrelerinde E-kaderin mRNA ekspresyonlarının tekrar incelenmesine karar verildi.

6) 8505C ve BCPAP hücrelerinde western blot deneyleri ile E-kaderin fragmanları saptanırken, E-kaderin gen ekspresyonu gözlenmemesi sitoplazmik E-kaderin fragmanlarının negatif geri besleme ile E-kaderin genini baskıladığını düşündürdü. Bunu doğrulamak için

a) E-kaderinin sitoplazmik domainine bağlanan primer antikorlar ile western blot deneylerinin tekrar edilmesi,

b) Sitoplazmik E-kaderin fragmanlarının dedekte edilmesi durumunda kromatin immünopresipitasyon deneyleri ile baskılanmanın doğrulanması gerektiği sonucuna varıldı.

7) BCPAP hücrelerinin NDGR2 siRNA ile transfekte edilmesine ve bu sayede NDRG2 overekspresyonu ile BCPAP hücrelerinin invaziv yetenekleri ile yara iyileşme hızlarında azalmanın tersine bir etkinin görülüp görülmeyeceğinin incelenmesine kadar verildi.

8) FTC-133 hücrelerinde NDRG2 siRNA transfeksiyonu sonrası yeni Slug ve Twist1 primer antikorları ile Snail ve Twist1 protein düzeylerinin incelenmesinin yanısıra

Vimentin protein düzeylerinin incelenmesi için biyolojik tekrarın arttırılması gerektiğine karar verildi.

9) WST-1 deneyleri sonucu NDRG2 pDNA ile 24 saat transfekte edilen FTC-133 hücrelerinde canlılığının azalması transfeksiyonun gerçekleştiğini gösterse de transfeksiyonlar proteine yansımadığı saptandı. Covid-19 pandemisinin beraberinde getirdiği sokağa çıkma kısıtlamaları, metastatik hücre davranışı deneylerinin daha kısa sürede yapılmasını zorunlu kıldı. Bu nedenle pDNA konsantrasyonları daha yüksek tutuldu, FTC-133 hücre canlılığındaki azalma göz önünde bulundurularak transfeksiyonlar gerçekleştirildi. Bu bağlamda daha düşük konsantrasyonlarda pDNA kullanımıyla birlikte transfeksiyonun proteine yansıması için sürenin arttırılması sonucu FTC-133 hücre canlılığındaki azalmanın minimize edilebileceği, bu sayede MHD deneylerinin daha sağlıklı sonuçlar verebileceği öngörüldü.

10) NDRG2 overekspresyonun sonucu BCPAP ve FTC-133 hücrelerinin metastatik hücre davranışlarında görülen azalmaların altında yatan farklı mekanizmaların araştırılması gerektiğine karar verildi.

11) NDRG2'nin tiroid kanserinde EMD etkilerinin aydınlatılması ile özellikte kötü diferansiye tümörlere karşı daha farklı yaklaşımların geliştirilmesine ışık tutacaktır.

12) Bu bağlamda çalışmamızın tiroid kanserinde NDRG2 ekspresyonunu indükleyecek ajanların geliştirilmesini hedefleyen araştırmalara öncülük edeceğini öngörmekteyiz.

KAYNAKLAR

1) Nikiforov Y, Bittinger P. Normal Anatomy and Histology. In: B P Nikiforov YE, Thompson LDR, editors. Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009. p. 465-478.

2) https://www.turkcerrahi.com/makaleler/tiroid/tiroid-anatomisi-fizyolojisi-hormonlari/

3) Hansen J T. Embryology and surgical anatomy of the lower neck and superior mediastinum. In: S A Falk, editors. Thyroid Disease, endocrinology, surgery, nuclear medicine, and radiotherapy. 2. Raven Publishers; 1997. p. 15-27.

4) Skandalakis J E, , Skandalakis P.N., Skandalakis L.J. Anatomy of thyroid gland. In: editors. Surgical Anatomy and Technique. 5. Switzerland: Springer; 1995. p.

5) https://uta.pressbooks.pub/histology/chapter/endocrine-system/

6) Mazzaferri E L, Massoll N. Management of papillary and follicular (differentiated) thyroid cancer: new paradigms using recombinant human thyrotropin. Endocr Relat Cancer 2002;9(4): 227-247.

7) Schlumberger M J. Papillary and follicular thyroid carcinoma. N Engl J Med 1998;338(5): 297-306.

8) Haugen B R. Management of the patient with progressive radioiodine non-responsive disease. Semin Surg Oncol 1999;16(1): 34-41.

9) Cabanillas M E, McFadden D G, Durante C. Thyroid cancer. Lancet 2016;388(10061): 2783-2795.

10) Rosai J. T G. Special Techniques in Surgical Pathology. In: R J., editors. Ackerman's Surgical Pathology. 10. United States: Mosby; 2011. p. 43-65.

11) Kim W B. A closer look at papillary thyroid carcinoma. Endocrinol Metab (Seoul) 2015;30(1): 1-6.

12) Weetman J L J S J M A P. Harrison's Principles of Internal Medicine. New York. McGraw-Hill Publishers; 2012.

13) Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. J Cancer Epidemiol 2013;2013: 965212.

14) Ito Y, Miyauchi A, Kobayashi K, Kihara M, Miya A. Static and dynamic prognostic factors of papillary thyroid carcinoma. Endocr J 2014;61(12): 1145-1151.

15) Adam M A, Pura J, Gu L, Dinan M A, Tyler D S, ve ark. Extent of surgery for papillary thyroid cancer is not associated with survival: an analysis of 61,775 patients. Ann Surg 2014;260(4): 601-605; discussion 605-607.

16) Barney B M, Hitchcock Y J, Sharma P, Shrieve D C, Tward J D. Overall and cause-specific survival for patients undergoing lobectomy, near-total, or total thyroidectomy for differentiated thyroid cancer. Head Neck 2011;33(5): 645-649.

17) Haigh P I, Urbach D R, Rotstein L E. Extent of thyroidectomy is not a major determinant of survival in low- or high-risk papillary thyroid cancer. Ann Surg Oncol 2005;12(1): 81-89.

18) Mendelsohn A H, Elashoff D A, Abemayor E, St John M A. Surgery for papillary thyroid carcinoma: is lobectomy enough? Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2010;136(11): 1055-1061.

19) Ito Y, Miyauchi A, Inoue H, Fukushima M, Kihara M, ve ark. An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients. World J Surg 2010;34(1): 28-35.

20) Sugitani I, Toda K, Yamada K, Yamamoto N, Ikenaga M, ve ark. Three distinctly different kinds of papillary thyroid microcarcinoma should be recognized: our treatment strategies and outcomes. World J Surg 2010;34(6): 1222-1231.

21) Haugen B R, Alexander E K, Bible K C, Doherty G M, Mandel S J, ve ark. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Thyroid 2016;26(1): 1-133.

22) Luster M, Clarke S E, Dietlein M, Lassmann M, Lind P, ve ark. Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2008;35(10): 1941-1959.

23) Podnos Y D, Smith D D, Wagman L D, Ellenhorn J D. Survival in patients with papillary thyroid cancer is not affected by the use of radioactive isotope. J Surg Oncol 2007;96(1): 3-7.

24) Luster M, Reiners C. Radioiodine therapy in differentiated thyroid cancer. World J Endocr Surg 2009;1(1): 7-12.

25) Biondi B, Filetti S, Schlumberger M. Thyroid-hormone therapy and thyroid cancer: a reassessment. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2005;1(1): 32-40.

26) Mazzaferri E L, Kloos R T. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab 2001;86(4): 1447-1463.

27) Carhill A A, Litofsky D R, Ross D S, Jonklaas J, Cooper D S, ve ark. Long-Term Outcomes Following Therapy in Differentiated Thyroid Carcinoma: NTCTCS Registry Analysis 1987-2012. J Clin Endocrinol Metab 2015;100(9): 3270-3279.

28) Jonklaas J, Sarlis N J, Litofsky D, Ain K B, Bigos S T, ve ark. Outcomes of patients with differentiated thyroid carcinoma following initial therapy. Thyroid 2006;16(12): 1229-1242.

29) Cooper D S, Biondi B. Subclinical thyroid disease. Lancet 2012;379(9821): 1142-1154.

30) DeLellis R A. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon. IARC Press; 2004.

31) Livolsi V A. Surgical pathology of the thyroid. Philadelphia. WB Saunders Company; 1990.

32) Ahmadi S, Stang M, Jiang X S, Sosa J A. Hurthle cell carcinoma: current perspectives. Onco Targets Ther 2016;9: 6873-6884.

33) Hundahl S A, Fleming I D, Fremgen A M, Menck H R. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see commetns]. Cancer 1998;83(12): 2638-2648.

34) Montone K T, Baloch Z W, LiVolsi V A. The thyroid Hurthle (oncocytic) cell and its associated pathologic conditions: a surgical pathology and cytopathology review. Arch Pathol Lab Med 2008;132(8): 1241-1250.

35) Goffredo P, Roman S A, Sosa J A. Hurthle cell carcinoma: a population-level analysis of 3311 patients. Cancer 2013;119(3): 504-511.

36) Schlumberger M, Challeton C, De Vathaire F, Travagli J P, Gardet P, ve ark. Radioactive iodine treatment and external radiotherapy for lung and bone metastases from thyroid carcinoma. J Nucl Med 1996;37(4): 598-605.

37) Patel K N, Shaha A R. Poorly differentiated thyroid cancer. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2014;22(2): 121-126.

38) Sakamoto A, Kasai N, Sugano H. Poorly differentiated carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic entity for a high-risk group of papillary and follicular carcinomas. Cancer 1983;52(10): 1849-1855.

39) Burman K D, Ringel M D, Wartofsky L. Unusual types of thyroid neoplasms. Endocrinol Metab Clin North Am 1996;25(1): 49-68.

40) Sywak M, Pasieka J L, Ogilvie T. A review of thyroid cancer with intermediate differentiation. J Surg Oncol 2004;86(1): 44-54.

41) Carcangiu M L, Zampi G, Rosai J. Poorly differentiated ("insular") thyroid carcinoma. A reinterpretation of Langhans' "wuchernde Struma". Am J Surg Pathol 1984;8(9): 655-668.

42) Nishida T, Katayama S, Tsujimoto M, Nakamura J, Matsuda H. Clinicopathological significance of poorly differentiated thyroid carcinoma. Am J Surg Pathol 1999;23(2): 205-211.

43) Sobrinho-Simoes M, Sambade C, Fonseca E, Soares P. Poorly differentiated carcinomas of the thyroid gland: a review of the clinicopathologic features of a series of 28 cases of a heterogeneous, clinically aggressive group of thyroid tumors. Int J Surg Pathol 2002;10(2): 123-131.

44) Bongiovanni M, Sadow P M, Faquin W C. Poorly differentiated thyroid carcinoma: a cytologic-histologic review. Adv Anat Pathol 2009;16(5): 283-289.

45) Chao T C, Lin J D, Chen M F. Insular carcinoma: infrequent subtype of thyroid cancer with aggressive clinical course. World J Surg 2004;28(4): 393-396.

46) Sanders E M, Jr., LiVolsi V A, Brierley J, Shin J, Randolph G W. An evidence-based review of poorly differentiated thyroid cancer. World J Surg 2007;31(5): 934-945.

47) Patel K N, Shaha A R. Poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer. Cancer Control 2006;13(2): 119-128.

48) Jung T S, Kim T Y, Kim K W, Oh Y L, Park D J, ve ark. Clinical features and prognostic factors for survival in patients with poorly differentiated thyroid carcinoma and comparison to the patients with the aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. Endocr J 2007;54(2): 265-274.

49) Dijkstra B, Prichard R S, Lee A, Kelly L M, Smyth P P, ve ark. Changing patterns of thyroid carcinoma. Ir J Med Sci 2007;176(2): 87-90.

50) O'Neill J P, Shaha A R. Anaplastic thyroid cancer. Oral Oncol 2013;49(7): 702-706.

51) Smallridge R C, Copland J A. Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. Clin Oncol (R Coll Radiol) 2010;22(6): 486-497.

52) Keutgen X M, Sadowski S M, Kebebew E. Management of anaplastic thyroid cancer. Gland Surg 2015;4(1): 44-51.

53) Kihara M, Miyauchi A, Yamauchi A, Yokomise H. Prognostic factors of anaplastic thyroid carcinoma. Surg Today 2004;34(5): 394-398.

54) Kim T Y, Kim K W, Jung T S, Kim J M, Kim S W, ve ark. Prognostic factors for Korean patients with anaplastic thyroid carcinoma. Head Neck 2007;29(8): 765-772.

55) Sugitani I, Kasai N, Fujimoto Y, Yanagisawa A. Prognostic factors and therapeutic strategy for anaplastic carcinoma of the thyroid. World J Surg 2001;25(5): 617-622.

56) Sugitani I, Miyauchi A, Sugino K, Okamoto T, Yoshida A, ve ark. Prognostic factors and treatment outcomes for anaplastic thyroid carcinoma: ATC Research Consortium of Japan cohort study of 677 patients. World J Surg 2012;36(6): 1247-1254.

57) Hyman D M, Puzanov I, Subbiah V, Faris J E, Chau I, ve ark. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. N Engl J Med 2015;373(8): 726-736.

58) American Thyroid Association Guidelines Task F, Kloos R T, Eng C, Evans D B, Francis G L, ve ark. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. Thyroid 2009;19(6): 565-612.

59) Raue F, Frank-Raue K. Epidemiology and Clinical Presentation of Medullary Thyroid Carcinoma. Recent Results Cancer Res 2015;204: 61-90.

60) Wells S A, Jr., Asa S L, Dralle H, Elisei R, Evans D B, ve ark. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. Thyroid 2015;25(6): 567-610.

61) Moley J F. Medullary thyroid carcinoma: management of lymph node metastases. J Natl Compr Canc Netw 2010;8(5): 549-556.

62) Meijer J A, le Cessie S, van den Hout W B, Kievit J, Schoones J W, ve ark. Calcitonin and carcinoembryonic antigen doubling times as prognostic factors in medullary thyroid carcinoma: a structured meta-analysis. Clin Endocrinol (Oxf) 2010;72(4): 534-542.

63) Furukawa K, Preston D, Funamoto S, Yonehara S, Ito M, ve ark. Long-term trend of thyroid cancer risk among Japanese atomic-bomb survivors: 60 years after exposure. Int J Cancer 2013;132(5): 1222-1226.

64) Nikiforov Y E. Radiation-induced thyroid cancer: what we have learned from chernobyl. Endocr Pathol 2006;17(4): 307-317.

65) Bhatti P, Veiga L H, Ronckers C M, Sigurdson A J, Stovall M, ve ark. Risk of second primary thyroid cancer after radiotherapy for a childhood cancer in a large cohort study: an update from the childhood cancer survivor study. Radiat Res 2010;174(6): 741-752.

66) http://www.nccn.org/professionals/ physician_gls/pdf/thyroid.pdf.

67) Hughes D T, Haymart M R, Miller B S, Gauger P G, Doherty G M. The most commonly occurring papillary thyroid cancer in the United States is now a microcarcinoma in a patient older than 45 years. Thyroid 2011;21(3): 231-236.

68) Shah J P. Thyroid carcinoma: epidemiology, histology, and diagnosis. Clin Adv Hematol Oncol 2015;13(4 Suppl 4): 3-6.

69) Harach H R, Franssila K O, Wasenius V M. Occult papillary carcinoma of the thyroid. A "normal" finding in Finland. A systematic autopsy study. Cancer 1985;56(3): 531-538.

70) Hay I D, Grant C S, Taylor W F, McConahey W M. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. Surgery 1987;102(6): 1088-1095.

71) Cady B, Rossi R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. Surgery 1988;104(6): 947-953.

72) Hay I D, Bergstralh E J, Goellner J R, Ebersold J R, Grant C S. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. Surgery 1993;114(6): 1050-1057; discussion 1057-1058.

73) Lundgren C I, Hall P, Ekbom A, Frisell J, Zedenius J, ve ark. Incidence and survival of Swedish patients with differentiated thyroid cancer. Int J Cancer 2003;106(4): 569-573.

74) Shah J P, Loree T R, Dharker D, Strong E W, Begg C, ve ark. Prognostic factors in differentiated carcinoma of the thyroid gland. Am J Surg 1992;164(6): 658-661.

75) Gilliland F D, Hunt W C, Morris D M, Key C R. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991. Cancer 1997;79(3): 564-573.

76) Takahashi M, Ritz J, Cooper G M. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. Cell 1985;42(2): 581-588.

77) Takahashi M. Structure and expression of the ret transforming gene. IARC Sci Publ 1988 (92): 189-197.

78) Airaksinen M S, Titievsky A, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? Mol Cell Neurosci 1999;13(5): 313-325.

79) Smith D P, Eng C, Ponder B A. Mutations of the RET proto-oncogene in the multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes and Hirschsprung disease. J Cell Sci Suppl 1994;18: 43-49.

80) Grieco M, Santoro M, Berlingieri M T, Melillo R M, Donghi R, ve ark. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. Cell 1990;60(4): 557-563.

81) Klugbauer S, Demidchik E P, Lengfelder E, Rabes H M. Detection of a novel type of RET rearrangement (PTC5) in thyroid carcinomas after Chernobyl and analysis of the involved RET-fused gene RFG5. Cancer Res 1998;58(2): 198-203.

82) Klugbauer S, Rabes H M. The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. Oncogene 1999;18(30): 4388-4393.

83) Corvi R, Berger N, Balczon R, Romeo G. RET/PCM-1: a novel fusion gene in papillary thyroid carcinoma. Oncogene 2000;19(37): 4236-4242.

84) Klugbauer S, Jauch A, Lengfelder E, Demidchik E, Rabes H M. A novel type of RET rearrangement (PTC8) in childhood papillary thyroid carcinomas and characterization of the involved gene (RFG8). Cancer Res 2000;60(24): 7028-7032.

85) Salassidis K, Bruch J, Zitzelsberger H, Lengfelder E, Kellerer A M, ve ark. Translocation t(10;14)(q11.2:q22.1) fusing the kinetin to the RET gene creates a novel rearranged form (PTC8) of the RET proto-oncogene in radiation-induced childhood papillary thyroid carcinoma. Cancer Res 2000;60(11): 2786-2789.

86) Nakata T, Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, ve ark. Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary thyroid carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 1999;25(2): 97-103.

87) Tong Q, Xing S, Jhiang S M. Leucine zipper-mediated dimerization is essential for the PTC1 oncogenic activity. J Biol Chem 1997;272(14): 9043-9047.

88) Jhiang S M. The RET proto-oncogene in human cancers. Oncogene 2000;19(49): 5590-5597.

89) Davis R J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. J Biol Chem 1993;268(20): 14553-14556.

90) Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. Thyroid 2010;20(7): 697-706.

91) Telkoparan P, Tazebay U H. Ras Family of Proteins: Cellular Function, Molecular Control, and its Role in Oncogenesis. Turk J Biochem 2011;36(4): 367-373.

92) Nikiforov Y E, Nikiforova M N. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. Nat Rev Endocrinol 2011;7(10): 569-580.

93) Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. Endocr Rev 2007;28(7): 742-762.

94) Suarez H G, Du Villard J A, Caillou B, Schlumberger M, Tubiana M, ve ark. Detection of activated ras oncogenes in human thyroid carcinomas. Oncogene 1988;2(4): 403-406.

95) Bos J L. ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res 1989;49(17): 4682-4689.

96) Pai E F, Kabsch W, Krengel U, Holmes K C, John J, ve ark. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. Nature 1989;341(6239): 209-214.

97) Suarez H G, du Villard J A, Severino M, Caillou B, Schlumberger M, ve ark. Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors. Oncogene 1990;5(4): 565-570.

98) Esapa C T, Johnson S J, Kendall-Taylor P, Lennard T W, Harris P E. Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. Clin Endocrinol (Oxf) 1999;50(4): 529-535.

99) Motoi N, Sakamoto A, Yamochi T, Horiuchi H, Motoi T, ve ark. Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. Pathol Res Pract 2000;196(1): 1-7.

100) Manenti G, Pilotti S, Re F C, Della Porta G, Pierotti M A. Selective activation of ras oncogenes in follicular and undifferentiated thyroid carcinomas. Eur J Cancer 1994;30A(7): 987-993.

101) Namba H, Rubin S A, Fagin J A. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. Mol Endocrinol 1990;4(10): 1474-1479.

102) Karga H, Lee J K, Vickery A L, Jr., Thor A, Gaz R D, ve ark. Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. J Clin Endocrinol Metab 1991;73(4): 832-836.

103) Ezzat S, Zheng L, Kolenda J, Safarian A, Freeman J L, ve ark. Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules. Thyroid 1996;6(5): 409-416.

104) Desideri E, Cavallo A L, Baccarini M. Alike but Different: RAF Paralogs and Their Signaling Outputs. Cell 2015;161(5): 967-970.

105) Ballif B A, Blenis J. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. Cell Growth Differ 2001;12(8): 397-408.

106) Podolski A, Castellucci E, Halmos B. Precision medicine: BRAF mutations in thyroid cancer. Precision Cancer Medicine 2019;2.

107) Giordano T J, Kuick R, Thomas D G, Misek D E, Vinco M, ve ark. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. Oncogene 2005;24(44): 6646-6656.

108) Garnett M J, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. Cancer Cell 2004;6(4): 313-319.

109) Long G V, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, ve ark. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. N Engl J Med 2014;371(20): 1877-1888.

110) Mascia A, Nitsch L, Di Lauro R, Zannini M. Hormonal control of the transcription factor Pax8 and its role in the regulation of thyroglobulin gene expression in thyroid cells. J Endocrinol 2002;172(1): 163-176.

111) French C A, Alexander E K, Cibas E S, Nose V, Laguette J, ve ark. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. Am J Pathol 2003;162(4): 1053-1060.

112) Nikiforova M N, Lynch R A, Biddinger P W, Alexander E K, Dorn G W, 2nd, ve ark. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 2003;88(5): 2318-2326.

113) Dwight T, Thoppe S R, Foukakis T, Lui W O, Wallin G, ve ark. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. J Clin Endocrinol Metab 2003;88(9): 4440-4445.

114) Nikiforova M N, Biddinger P W, Caudill C M, Kroll T G, Nikiforov Y E. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. Am J Surg Pathol 2002;26(8): 1016-1023.

115) Marques A R, Espadinha C, Catarino A L, Moniz S, Pereira T, ve ark. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. J Clin Endocrinol Metab 2002;87(8): 3947-3952.

116) Shimono A, Okuda T, Kondoh H. N-myc-dependent repression of ndr1, a gene identified by direct subtraction of whole mouse embryo cDNAs between wild type and N-myc mutant. Mech Dev 1999;83(1-2): 39-52.

117) Shaw E, McCue L A, Lawrence C E, Dordick J S. Identification of a novel class in the alpha/beta hydrolase fold superfamily: the N-myc differentiation-related proteins. Proteins 2002;47(2): 163-168.

118) Qu X, Zhai Y, Wei H, Zhang C, Xing G, ve ark. Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family. Mol Cell Biochem 2002;229(1-2): 35-44.

119) Zhao W, Tang R, Huang Y, Wang W, Zhou Z, ve ark. Cloning and expression pattern of the human NDRG3 gene. Biochim Biophys Acta 2001;1519(1-2): 134-138.

120) Zhou R H, Kokame K, Tsukamoto Y, Yutani C, Kato H, ve ark. Characterization of the human NDRG gene family: a newly identified member, NDRG4, is specifically expressed in brain and heart. Genomics 2001;73(1): 86-97.

121) Hu X L, Liu X P, Deng Y C, Lin S X, Wu L, ve ark. Expression analysis of the NDRG2 gene in mouse embryonic and adult tissues. Cell Tissue Res 2006;325(1): 67-76.

122) Xu B, Lin L, Rote N S. Identification of a stress-induced protein during human trophoblast differentiation by differential display analysis. Biol Reprod 1999;61(3): 681-686.

123) Chen B, Nelson D M, Sadovsky Y. N-myc down-regulated gene 1 modulates the response of term human trophoblasts to hypoxic injury. J Biol Chem 2006;281(5): 2764-2772.

124) Choi S C, Kim K D, Kim J T, Kim J W, Yoon D Y, ve ark. Expression and regulation of NDRG2 (N-myc downstream regulated gene 2) during the differentiation of dendritic cells. FEBS Lett 2003;553(3): 413-418.

125) Assamaki R, Sarlomo-Rikala M, Lopez-Guerrero J A, Lasota J, Andersson L C, ve ark. Array comparative genomic hybridization analysis of chromosomal imbalances and their target genes in gastrointestinal stromal tumors. Genes Chromosomes Cancer 2007;46(6): 564-576.

126) Shon S K, Kim A, Kim J Y, Kim K I, Yang Y, ve ark. Bone morphogenetic protein-4 induced by NDRG2 expression inhibits MMP-9 activity in breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2009;385(2): 198-203.

127) Wang H, Wang W, Wang X, Cai K, Wu H, ve ark. Reduced N-Myc downstream-regulated gene 2 expression is associated with CD24 upregulation and poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. Med Oncol 2012;29(5): 3162-3168.

128) Li R, Yu C, Jiang F, Gao L, Li J, ve ark. Overexpression of N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) regulates the proliferation and invasion of bladder cancer cells in vitro and in vivo. PLoS One 2013;8(10): e76689.

129) Zhao H, Zhang J, Lu J, He X, Chen C, ve ark. Reduced expression of N-Myc downstream-regulated gene 2 in human thyroid cancer. BMC Cancer 2008;8: 303.

130) Lorentzen A, Lewinsky R H, Bornholdt J, Vogel L K, Mitchelmore C. Expression profile of the N-myc Downstream Regulated Gene 2 (NDRG2) in human cancers with focus on breast cancer. BMC Cancer 2011;11: 14.

131) Kim A, Kim M J, Yang Y, Kim J W, Yeom Y I, ve ark. Suppression of NF-kappaB activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells. Carcinogenesis 2009;30(6): 927-936.

132) Furuta H, Kondo Y, Nakahata S, Hamasaki M, Sakoda S, ve ark. NDRG2 is a candidate tumor-suppressor for oral squamous-cell carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 2010;391(4): 1785-1791.

133) Tschan M P, Shan D, Laedrach J, Eyholzer M, Leibundgut E O, ve ark. NDRG1/2 expression is inhibited in primary acute myeloid leukemia. Leuk Res 2010;34(3): 393-398.

134) Liu J, Zhang J, Wang X, Li Y, Chen Y, ve ark. HIF-1 and NDRG2 contribute to hypoxia-induced radioresistance of cervical cancer Hela cells. Exp Cell Res 2010;316(12): 1985-1993.

135) Chang X, Li Z, Ma J, Deng P, Zhang S, ve ark. DNA methylation of NDRG2 in gastric cancer and its clinical significance. Dig Dis Sci 2013;58(3): 715-723.

136) Choi S C, Yoon S R, Park Y P, Song E Y, Kim J W, ve ark. Expression of NDRG2 is related to tumor progression and survival of gastric cancer patients through Fas-mediated cell death. Exp Mol Med 2007;39(6): 705-714.

137) Tao Y, Guo Y, Liu W, Zhang J, Li X, ve ark. AKT inhibitor suppresses hyperthermia-induced Ndrg2 phosphorylation in gastric cancer cells. Braz J Med Biol Res 2013;46(4): 394-404.

138) Ling Z Q, Ge M H, Lu X X, Han J, Wu Y C, ve ark. Ndrg2 promoter hypermethylation triggered by helicobacter pylori infection correlates with poor patients survival in human gastric carcinoma. Oncotarget 2015;6(10): 8210-8225.

139) Shi H, Jin H, Chu D, Wang W, Zhang J, ve ark. Suppression of N-myc downstream-regulated gene 2 is associated with induction of Myc in colorectal cancer and correlates closely with differentiation. Biol Pharm Bull 2009;32(6): 968-975.

140) Shi H, Wang W Z, Yao L B, Zhang J, Yin Q, ve ark. [Expression and significance of new candidate tumor suppressor gene N-Myc downstream-regulated gene 2 in colorectal cancer]. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi 2009;12(3): 281-284.

141) Chu D, Zhang Z, Li Y, Wu L, Zhang J, ve ark. Prediction of colorectal cancer relapse and prognosis by tissue mRNA levels of NDRG2. Mol Cancer Ther 2011;10(1): 47-56.

142) Feng L, Xie Y, Zhang H, Wu Y. Down-regulation of NDRG2 gene expression in human colorectal cancer involves promoter methylation and microRNA-650. Biochem Biophys Res Commun 2011;406(4): 534-538.

143) Kim Y J, Yoon S Y, Kim J T, Song E Y, Lee H G, ve ark. NDRG2 expression decreases with tumor stages and regulates TCF/beta-catenin signaling in human colon carcinoma. Carcinogenesis 2009;30(4): 598-605.

144) Lorentzen A, Vogel L K, Lewinsky R H, Saebo M, Skjelbred C F, ve ark. Expression of NDRG2 is down-regulated in high-risk adenomas and colorectal carcinoma. BMC Cancer 2007;7: 192.

145) Deuschle U, Schuler J, Schulz A, Schluter T, Kinzel O, ve ark. FXR controls the tumor suppressor NDRG2 and FXR agonists reduce liver tumor growth and metastasis in an orthotopic mouse xenograft model. PLoS One 2012;7(10): e43044.

146) Lee D C, Kang Y K, Kim W H, Jang Y J, Kim D J, ve ark. Functional and clinical evidence for NDRG2 as a candidate suppressor of liver cancer metastasis. Cancer Res 2008;68(11): 4210-4220.

147) Cao W, Zhang J L, Feng D Y, Liu X W, Li Y, ve ark. The effect of adenovirus-conjugated NDRG2 on p53-mediated apoptosis of hepatocarcinoma cells through attenuation of nucleotide excision repair capacity. Biomaterials 2014;35(3): 993-1003.

148) Zheng J, Li Y, Yang J, Liu Q, Shi M, ve ark. NDRG2 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion, migration and invasion by regulating CD24 expression. BMC Cancer 2011;11: 251:251-259.

149) Wang J, Yin D, Xie C, Zheng T, Liang Y, ve ark. The iron chelator Dp44mT inhibits hepatocellular carcinoma metastasis via N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2)/gp130/STAT3 pathway. Oncotarget 2014;5(18): 8478-8491.

150) Song S P, Zhang S B, Liu R, Yao L, Hao Y Q, ve ark. NDRG2 down-regulation and CD24 up-regulation promote tumor aggravation and poor survival in patients with gallbladder carcinoma. Med Oncol 2012;29(3): 1879-1885.

151) Hu X L, Liu X P, Lin S X, Deng Y C, Liu N, ve ark. NDRG2 expression and mutation in human liver and pancreatic cancers. World J Gastroenterol 2004;10(23): 3518-3521.

152) Deng Y, Yao L, Chau L, Ng S S, Peng Y, ve ark. N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. Int J Cancer 2003;106(3): 342-347.

153) Skiriute D, Vaitkiene P, Asmoniene V, Steponaitis G, Deltuva V P, ve ark. Promoter methylation of AREG, HOXA11, hMLH1, NDRG2, NPTX2 and Tes genes in glioblastoma. J Neurooncol 2013;113(3): 441-449.

154) Tepel M, Roerig P, Wolter M, Gutmann D H, Perry A, ve ark. Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. Int J Cancer 2008;123(9): 2080-2086.

155) Li L, Wang J, Shen X, Wang L, Li X, ve ark. Expression and prognostic value of NDRG2 in human astrocytomas. J Neurol Sci 2011;308(1-2): 77-82.

156) Lusis E A, Watson M A, Chicoine M R, Lyman M, Roerig P, ve ark. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. Cancer Res 2005;65(16): 7121-7126.

157) Zhang Z G, Li G, Feng D Y, Zhang J, Zhang J, ve ark. Overexpression of NDRG2 can inhibit neuroblastoma cell proliferation through negative regulation by CYR61. Asian Pac J Cancer Prev 2014;15(1): 239-244.

158) Liang Z L, Kang K, Yoon S, Huang S M, Lim J S, ve ark. NDRG2 is involved in the oncogenic properties of renal cell carcinoma and its loss is a novel independent poor prognostic factor after nephrectomy. Ann Surg Oncol 2012;19(8): 2763-2772.

159) Ma J, Jin H, Wang H, Yuan J, Bao T, ve ark. Expression of NDRG2 in clear cell renal cell carcinoma. Biol Pharm Bull 2008;31(7): 1316-1320.

160) Ma J J, Kong L M, Liao C G, Jiang X, Wang Y, ve ark. Suppression of MMP-9 activity by NDRG2 expression inhibits clear cell renal cell carcinoma invasion. Med Oncol 2012;29(5): 3306-3313.

161) Ma J J, Liao C G, Jiang X, Zhao H D, Yao L B, ve ark. NDRG2 suppresses the proliferation of clear cell renal cell carcinoma cell A-498. J Exp Clin Cancer Res 2010;29: 103.

162) Yu C, Wu G, Dang N, Zhang W, Zhang R, ve ark. Inhibition of N-myc downstream-regulated gene 2 in prostatic carcinoma. Cancer Biol Ther 2011;12(4): 304-313.

163) Gao L, Wu G J, Liu X W, Zhang R, Yu L, ve ark. Suppression of invasion and metastasis of prostate cancer cells by overexpression of NDRG2 gene. Cancer Lett 2011;310(1): 94-100.

164) Li S J, Wang W Y, Li B, Chen B, Zhang B, ve ark. Expression of NDRG2 in human lung cancer and its correlation with prognosis. Med Oncol 2013;30(1): 421.

165) Ma J, Liu W, Guo H, Li S, Cao W, ve ark. N-myc downstream-regulated gene 2 expression is associated with glucose transport and correlated with prognosis in breast carcinoma. Breast Cancer Res 2014;16(2): R27.

166) Zheng J, Liu Q, Li Y, Yang J, Ma J, ve ark. NDRG2 expression regulates CD24 and metastatic potential of breast cancer cells. Asian Pac J Cancer Prev 2010;11(6): 1817-1821.

167) Fitchett J E, Hay E D. Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. Dev Biol 1989;131(2): 455-474.

168) Banyard J, Bielenberg D R. The role of EMT and MET in cancer dissemination. Connect Tissue Res 2015;56(5): 403-413.

169) Tsai J H, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. Genes Dev 2013;27(20): 2192-2206.

170) Lee J M, Dedhar S, Kalluri R, Thompson E W. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. J Cell Biol 2006;172(7): 973-981.

171) Singh M, Yelle N, Venugopal C, Singh S K. EMT: Mechanisms and therapeutic implications. Pharmacol Ther 2018;182: 80-94.

172) Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. Cancer Metastasis Rev 2009;28(1-2): 15-33.

173) Harvey L. Cell-cell adhesion and communication. In: S Tenney, K Ahr, U Steyn and L Ueno, editors. Molecular Cell Biology. New York: W.H. Freeman; 2001. p. 675-699.

174) Carraway C A, Carraway K L. Sequestration and segregation of receptor kinases in epithelial cells: implications for ErbB2 oncogenesis. Sci STKE 2007;2007(381): re3.

175) LeBleu V S, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. Exp Biol Med (Maywood) 2007;232(9): 1121-1129.

176) Axelrod J D. Cell shape in proliferating epithelia: a multifaceted problem. Cell 2006;126(4): 643-645.

177) Fletcher D A, Mullins R D. Cell mechanics and the cytoskeleton. Nature 2010;463(7280): 485-492.

178) Pasquier J, Abu-Kaoud N, Al Thani H, Rafii A. Epithelial to Mesenchymal Transition in a Clinical Perspective. J Oncol 2015;2015: 792182.

179) Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. Biochim Biophys Acta 2009;1796(2): 75-90.

180) Williams C M, Engler A J, Slone R D, Galante L L, Schwarzbauer J E. Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. Cancer Res 2008;68(9): 3185-3192.

181) Nieto M A. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3(3): 155-166.

182) Barrallo-Gimeno A, Nieto M A. Evolutionary history of the Snail/Scratch superfamily. Trends Genet 2009;25(6): 248-252.

183) Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, ve ark. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. Nat Cell Biol 2000;2(2): 84-89.

184) Yamasaki H, Sekimoto T, Ohkubo T, Douchi T, Nagata Y, ve ark. Zinc finger domain of Snail functions as a nuclear localization signal for importin beta-mediated nuclear import pathway. Genes Cells 2005;10(5): 455-464.

185) Molina-Ortiz P, Villarejo A, MacPherson M, Santos V, Montes A, ve ark. Characterization of the SNAG and SLUG domains of Snail2 in the repression of E-cadherin and EMT induction: modulation by serine 4 phosphorylation. PLoS One 2012;7(5): e36132.

186) Dominguez D, Montserrat-Sentis B, Virgos-Soler A, Guaita S, Grueso J, ve ark. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. Mol Cell Biol 2003;23(14): 5078-5089.

187) Zhou B P, Deng J, Xia W, Xu J, Li Y M, ve ark. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. Nat Cell Biol 2004;6(10): 931-940.

188) Kalluri R, Weinberg R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. J Clin Invest 2009;119(6): 1420-1428.

189) Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno M A, Fraga M F, Esteller M, ve ark. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. J Cell Sci 2003;116(Pt 3): 499-511.

190) Cano A, Perez-Moreno M A, Rodrigo I, Locascio A, Blanco M J, ve ark. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. Nat Cell Biol 2000;2(2): 76-83.

191) Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol 2014;15(3): 178-196.

192) Postigo A A, Dean D C. Differential expression and function of members of the zfh-1 family of zinc finger/homeodomain repressors. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(12): 6391-6396.

193) Verschueren K, Remacle J E, Collart C, Kraft H, Baker B S, ve ark. SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. J Biol Chem 1999;274(29): 20489-20498.

194) Scott C L, Omilusik K D. ZEBs: Novel Players in Immune Cell Development and Function. Trends Immunol 2019;40(5): 431-446.

195) Sanchez-Tillo E, Siles L, de Barrios O, Cuatrecasas M, Vaquero E C, ve ark. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. Am J Cancer Res 2011;1(7): 897-912.

196) Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, ve ark. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. Nucleic Acids Res 2005;33(20): 6566-6578.

197) Cubillo E, Diaz-Lopez A, Cuevas E P, Moreno-Bueno G, Peinado H, ve ark. E47 and Id1 interplay in epithelial-mesenchymal transition. PLoS One 2013;8(3): e59948.

198) Margetts P J. Twist: a new player in the epithelial-mesenchymal transition of the peritoneal mesothelial cells. Nephrol Dial Transplant 2012;27(11): 3978-3981.

199) Yang J, Mani S A, Donaher J L, Ramaswamy S, Itzykson R A, ve ark. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell 2004;117(7): 927-939.

200) Lahiri S K, Zhao J. Kruppel-like factor 8 emerges as an important regulator of cancer. Am J Transl Res 2012;4(3): 357-363.

201) Zhang W, Chen X, Kato Y, Evans P M, Yuan S, ve ark. Novel cross talk of Kruppel-like factor 4 and beta-catenin regulates normal intestinal homeostasis and tumor repression. Mol Cell Biol 2006;26(6): 2055-2064.

202) DiFeo A, Narla G, Camacho-Vanegas O, Nishio H, Rose S L, ve ark. E-cadherin is a novel transcriptional target of the KLF6 tumor suppressor. Oncogene 2006;25(44): 6026-6031.

203) Chung B M, Rotty J D, Coulombe P A. Networking galore: intermediate filaments and cell migration. Curr Opin Cell Biol 2013;25(5): 600-612.

204) Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. Cell Mol Life Sci 2011;68(18): 3033-3046.

205) 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): 15966-15983.

206) Virtakoivu R, Mai A, Mattila E, De Franceschi N, Imanishi S Y, ve ark. Vimentin-ERK Signaling Uncouples Slug Gene Regulatory Function. Cancer Res 2015;75(11): 2349-2362.

207) Angst B D, Marcozzi C, Magee A I. The cadherin superfamily: diversity in form and function. J Cell Sci 2001;114(Pt 4): 629-641.

208) Jao T M, Tsai M H, Lio H Y, Weng W T, Chen C C, ve ark. Protocadherin 10 suppresses tumorigenesis and metastasis in colorectal cancer and its genetic loss predicts adverse prognosis. Int J Cancer 2014;135(11): 2593-2603.

209) Goodwin M, Yap A S. Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton. J Mol Histol 2004;35(8-9): 839-844.

210) Kemler R. Classical cadherins. Semin Cell Biol 1992;3(3): 149-155.

211) Kottke M D, Delva E, Kowalczyk A P. The desmosome: cell science lessons from human diseases. J Cell Sci 2006;119(Pt 5): 797-806.

212) Yin T, Green K J. Regulation of desmosome assembly and adhesion. Semin Cell Dev Biol 2004;15(6): 665-677.

213) Takeichi M. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. Nat Rev Neurosci 2007;8(1): 11-20.

214) Goffinet A M, Tissir F. Seven pass Cadherins CELSR1-3. Semin Cell Dev Biol 2017;69: 102-110.

215) Tanoue T, Takeichi M. New insights into Fat cadherins. J Cell Sci 2005;118(Pt 11): 2347-2353.

216) Ahmed A F, de Bock C E, Sontag E, Hondermarck H, Lincz L F, ve ark. FAT1 cadherin controls neuritogenesis during NTera2 cell differentiation. Biochem Biophys Res Commun 2019;514(3): 625-631.

217) Frank M, Kemler R. Protocadherins. Curr Opin Cell Biol 2002;14(5): 557-562.

218) Sannigrahi M K, Srinivas S, Rakshit S. The Prospects of Cadherin-23 as a Mediator of Homophilic Cell-Cell Adhesion. Adv Exp Med Biol 2018;1112: 99-105.

219) Wheelock M J, Soler A P, Knudsen K A. Cadherin junctions in mammary tumors. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2001;6(3): 275-285.

220) Stemmler M P. Cadherins in development and cancer. Mol Biosyst 2008;4(8): 835-850.

221) Radice G L, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen K A, Takeichi M, ve ark. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. Dev Biol 1997;181(1): 64-78.

222) Pinheiro H, Bordeira-Carrico R, Seixas S, Carvalho J, Senz J, ve ark. Allele-specific CDH1 downregulation and hereditary diffuse gastric cancer. Hum Mol Genet 2010;19(5): 943-952.

223) Winter J M, Ting A H, Vilardell F, Gallmeier E, Baylin S B, ve ark. Absence of E-cadherin expression distinguishes noncohesive from cohesive pancreatic cancer. Clin Cancer Res 2008;14(2): 412-418.

224) Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. Biochim Biophys Acta 1994;1198(1): 11-26.

225) Hazan R B, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K. Cadherin switch in tumor progression. Ann N Y Acad Sci 2004;1014: 155-163.

226) Nakajima S, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, ve ark. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. Clin Cancer Res 2004;10(12 Pt 1): 4125-4133.

227) Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders G J, Ruijter E T, Jansen C F, ve ark. Cadherin switching in human prostate cancer progression. Cancer Res 2000;60(13): 3650-3654.

228) Choi Y, Lee H J, Jang M H, Gwak J M, Lee K S, ve ark. Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer. Hum Pathol 2013;44(11): 2581-2589.

229) Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, Bernardini S, Wallerand H, ve ark. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. Clin Cancer Res 2006;12(9): 2780-2787.

230) Hibi K, Goto T, Mizukami H, Kitamura Y H, Sakuraba K, ve ark. Demethylation of the CDH3 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. Anticancer Res 2009;29(6): 2215-2217.

231) Hibi K, Kitamura Y H, Mizukami H, Goto T, Sakuraba K, ve ark. Frequent CDH3 demethylation in advanced gastric carcinoma. Anticancer Res 2009;29(10): 3945-3947.

232) Paredes J, Albergaria A, Oliveira J T, Jeronimo C, Milanezi F, ve ark. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. Clin Cancer Res 2005;11(16): 5869-5877.

233) Pishvaian M J, Feltes C M, Thompson P, Bussemakers M J, Schalken J A, ve ark. Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. Cancer Res 1999;59(4): 947-952.

234) Bartolome R A, Torres S, Isern de Val S, Escudero-Paniagua B, Calvino E, ve ark. VE-cadherin RGD motifs promote metastasis and constitute a potential therapeutic target in melanoma and breast cancers. Oncotarget 2017;8(1): 215-227.

235) Gumbiner B M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 2005;6(8): 622-634.

236) Qian X, Karpova T, Sheppard A M, McNally J, Lowy D R. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. EMBO J 2004;23(8): 1739-1748.

237) Redmer T, Diecke S, Grigoryan T, Quiroga-Negreira A, Birchmeier W, ve ark. E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. EMBO Rep 2011;12(7): 720-726.

238) De Wever O, Derycke L, Hendrix A, De Meerleer G, Godeau F, ve ark. Soluble cadherins as cancer biomarkers. Clin Exp Metastasis 2007;24(8): 685-697.

239) Perl A K, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. Nature 1998;392(6672): 190-193.

240) Christiansen J J, Rajasekaran A K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. Cancer Res 2006;66(17): 8319-8326.

241) Nieman M T, Prudoff R S, Johnson K R, Wheelock M J. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. J Cell Biol 1999;147(3): 631-644.

242) Rajasekaran S A, Palmer L G, Quan K, Harper J F, Ball W J, Jr., ve ark. Na,K-ATPase beta-subunit is required for epithelial polarization, suppression of invasion, and cell motility. Mol Biol Cell 2001;12(2): 279-295.

243) Putzke A P, Ventura A P, Bailey A M, Akture C, Opoku-Ansah J, ve ark. Metastatic progression of prostate cancer and e-cadherin regulation by zeb1 and SRC family kinases. Am J Pathol 2011;179(1): 400-410.

244) Lewis-Tuffin L J, Rodriguez F, Giannini C, Scheithauer B, Necela B M, ve ark. Misregulated E-cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. PLoS One 2010;5(10): e13665.

245) Reddy P, Liu L, Ren C, Lindgren P, Boman K, ve ark. Formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion activates AKT and mitogen activated protein kinase via phosphatidylinositol 3 kinase and ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells. Mol Endocrinol 2005;19(10): 2564-2578.

246) Tomlinson J S, Alpaugh M L, Barsky S H. An intact overexpressed E-cadherin/alpha,beta-catenin axis characterizes the lymphovascular emboli of inflammatory breast carcinoma. Cancer Res 2001;61(13): 5231-5241.

247) Maretzky T, Reiss K, Ludwig A, Buchholz J, Scholz F, ve ark. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102(26): 9182-9187.

248) Ito K, Okamoto I, Araki N, Kawano Y, Nakao M, ve ark. Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts. Oncogene 1999;18(50): 7080-7090.

249) Steinhusen U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, ve ark. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. J Biol Chem 2001;276(7): 4972-4980.

250) Damsky C H, Richa J, Solter D, Knudsen K, Buck C A. Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. Cell 1983;34(2): 455-466.

251) Wheelock M J, Buck C A, Bechtol K B, Damsky C H. Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion. J Cell Biochem 1987;34(3): 187-202.

252) Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford H C, Vermeulen S, ve ark. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. J Cell Sci 2001;114(Pt 1): 111-118.

253) Chunthapong J, Seftor E A, Khalkhali-Ellis Z, Seftor R E, Amir S, ve ark. Dual roles of E-cadherin in prostate cancer invasion. J Cell Biochem 2004;91(4): 649-661.

254) Symowicz J, Adley B P, Gleason K J, Johnson J J, Ghosh S, ve ark. Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. Cancer Res 2007;67(5): 2030-2039.

255) Najy A J, Day K C, Day M L. The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. J Biol Chem 2008;283(26): 18393-18401.

256) Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. J Cell Sci 1999;112 (Pt 8): 1237-1245.

257) Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, ve ark. A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. EMBO J 2002;21(8): 1948-1956.

258) Spring C M, Kelly K F, O'Kelly I, Graham M, Crawford H C, ve ark. The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin. Exp Cell Res 2005;305(2): 253-265.

259) David J M, Rajasekaran A K. Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments. Cancer Res 2012;72(12): 2917-2923.

260) Liu Y, Li F, Gao F, Xing L, Qin P, ve ark. Role of microenvironmental periostin in pancreatic cancer progression. Oncotarget 2017;8(52): 89552-89565.

261) Xiao Z M, Wang X Y, Wang A M. Periostin induces chemoresistance in colon cancer cells through activation of the PI3K/Akt/survivin pathway. Biotechnol Appl Biochem 2015;62(3): 401-406.

262) Yu B, Wu K, Wang X, Zhang J, Wang L, ve ark. Periostin secreted by cancer-associated fibroblasts promotes cancer stemness in head and neck cancer by activating protein tyrosine kinase 7. Cell Death Dis 2018;9(11): 1082.

263) Vardaki I, Ceder S, Rutishauser D, Baltatzis G, Foukakis T, ve ark. Periostin is identified as a putative metastatic marker in breast cancer-derived exosomes. Oncotarget 2016;7(46): 74966-74978.

264) Puppin C, Passon N, Frasca F, Vigneri R, Tomay F, ve ark. In thyroid cancer cell lines expression of periostin gene is controlled by p73 and is not related to epigenetic marks of active transcription. Cell Oncol (Dordr) 2011;34(2): 131-140.

265) Kudo A, Kii I. Periostin function in communication with extracellular matrices. J Cell Commun Signal 2018;12(1): 301-308.

266) Morra L, Moch H. Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. Virchows Arch 2011;459(5): 465-475.

267) Gross S R, Sin C G, Barraclough R, Rudland P S. Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health. Cell Mol Life Sci 2014;71(9): 1551-1579.

268) Mack G S, Marshall A. Lost in migration. Nat Biotechnol 2010;28(3): 214-229.

269) Ji Y F, Huang H, Jiang F, Ni R Z, Xiao M B. S100 family signaling network and related proteins in pancreatic cancer (Review). Int J Mol Med 2014;33(4): 769-776.

270) Yin C, Li H, Zhang B, Liu Y, Lu G, ve ark. RAGE-binding S100A8/A9 promotes the migration and invasion of human breast cancer cells through actin polymerization and epithelial-mesenchymal transition. Breast Cancer Res Treat 2013;142(2): 297-309.

271) Xue C, Plieth D, Venkov C, Xu C, Neilson E G. The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis. Cancer Res 2003;63(12): 3386-3394.

272) Lo J F, Yu C C, Chiou S H, Huang C Y, Jan C I, ve ark. The epithelial-mesenchymal transition mediator S100A4 maintains cancer-initiating cells in head and neck cancers. Cancer Res 2011;71(5): 1912-1923.

273) Al-Ismaeel Q, Neal C P, Al-Mahmoodi H, Almutairi Z, Al-Shamarti I, ve ark. ZEB1 and IL-6/11-STAT3 signalling cooperate to define invasive potential of pancreatic cancer cells via differential regulation of the expression of S100 proteins. Br J Cancer 2019;121(1): 65-75.

274) Zhong J, Liu C, Chen Y J, Zhang Q H, Yang J, ve ark. The association between S100A13 and HMGA1 in the modulation of thyroid cancer proliferation and invasion. J Transl Med 2016;14: 80.

275) Liu J, Ni X, Li Y, Chen M, Chen W, ve ark. Downregulation of IQGAP1 inhibits epithelial-mesenchymal transition via the HIF1alpha/VEGF-A signaling pathway in gastric cancer. J Cell Biochem 2019;120(9): 15790-15799.

276) Hu W, Wang Z, Zhang S, Lu X, Wu J, ve ark. IQGAP1 promotes pancreatic cancer progression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) through Wnt/beta-catenin signaling. Sci Rep 2019;9(1): 7539.

277) Su D, Liu Y, Song T. Knockdown of IQGAP1 inhibits proliferation and epithelial-mesenchymal transition by Wnt/beta-catenin pathway in thyroid cancer. Onco Targets Ther 2017;10: 1549-1559.

278) Yang J, Weinberg R A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. Dev Cell 2008;14(6): 818-829.

279) Lim J, Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. Development 2012;139(19): 3471-3486.

280) Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, Nieto M A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell 2009;139(5): 871-890.

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

282) Kothari A N, Mi Z, Zapf M, Kuo P C. Novel clinical therapeutics targeting the epithelial to mesenchymal transition. Clin Transl Med 2014;3: 35.

283) Nistico P, Bissell M J, Radisky D C. Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. Cold Spring Harb Perspect Biol 2012;4(2).

284) Barriere G, Fici P, Gallerani G, Fabbri F, Rigaud M. Epithelial Mesenchymal Transition: a double-edged sword. Clin Transl Med 2015;4: 14.

285) Yan C, Grimm W A, Garner W L, Qin L, Travis T, ve ark. Epithelial to mesenchymal transition in human skin wound healing is induced by tumor necrosis factor-alpha through bone morphogenic protein-2. Am J Pathol 2010;176(5): 2247-2258.

286) Singh M, Manoranjan B, Mahendram S, McFarlane N, Venugopal C, ve ark. Brain metastasis-initiating cells: survival of the fittest. Int J Mol Sci 2014;15(5): 9117-9133.

287) Chambers A F, Groom A C, MacDonald I C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer 2002;2(8): 563-572.

288) Luzzi K J, MacDonald I C, Schmidt E E, Kerkvliet N, Morris V L, ve ark. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. Am J Pathol 1998;153(3): 865-873.

289) Hermann P C, Huber S L, Heeschen C. Metastatic cancer stem cells: a new target for anti-cancer therapy? Cell Cycle 2008;7(2): 188-193.

290) Liao W T, Ye Y P, Deng Y J, Bian X W, Ding Y Q. Metastatic cancer stem cells: from the concept to therapeutics. Am J Stem Cells 2014;3(2): 46-62.

291) Lobo N A, Shimono Y, Qian D, Clarke M F. The biology of cancer stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol 2007;23: 675-699.

292) Martin T A, Jiang W G. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. Biochim Biophys Acta 2009;1788(4): 872-891.

293) Giannoni E, Buricchi F, Grimaldi G, Parri M, Cialdai F, ve ark. Redox regulation of anoikis: reactive oxygen species as essential mediators of cell survival. Cell Death Differ 2008;15(5): 867-878.

294) Frisch S M, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. Curr Opin Cell Biol 1997;9(5): 701-706.

295) Bandyopadhyay A, Raghavan S. Defining the role of integrin alphavbeta6 in cancer. Curr Drug Targets 2009;10(7): 645-652.

296) Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. Biochim Biophys Acta 2013;1833(12): 3481-3498.

297) Ridley A J. Rho GTPase signalling in cell migration. Curr Opin Cell Biol 2015;36: 103-112.

298) Sun B O, Fang Y, Li Z, Chen Z, Xiang J. Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression. Biomed Rep 2015;3(5): 603-610.

299) El-Sibai M, Pertz O, Pang H, Yip S C, Lorenz M, ve ark. RhoA/ROCK-mediated switching between Cdc42- and Rac1-dependent protrusion in MTLn3 carcinoma cells. Exp Cell Res 2008;314(7): 1540-1552.

300) Rodriguez-Hernandez I, Cantelli G, Bruce F, Sanz-Moreno V. Rho, ROCK and actomyosin contractility in metastasis as drug targets. F1000Res 2016;5.

301) Oskarsson T, Batlle E, Massague J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. Cell Stem Cell 2014;14(3): 306-321.

302) Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nat Rev Cancer 2003;3(5): 362-374.

303) Palumbo J S, Talmage K E, Massari J V, La Jeunesse C M, Flick M J, ve ark. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. Blood 2007;110(1): 133-141.

304) Liotta L A, Saidel M G, Kleinerman J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. Cancer Res 1976;36(3): 889-894.

305) Stoletov K, Kato H, Zardouzian E, Kelber J, Yang J, ve ark. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. J Cell Sci 2010;123(Pt 13): 2332-2341.

306) Tsai J H, Donaher J L, Murphy D A, Chau S, Yang J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. Cancer Cell 2012;22(6): 725-736.

307) Olmeda D, Jorda M, Peinado H, Fabra A, Cano A. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. Oncogene 2007;26(13): 1862-1874.

308) Hay E D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. Dev Dyn 2005;233(3): 706-720.

309) Zhao R, Cai Z, Li S, Cheng Y, Gao H, ve ark. Expression and clinical relevance of epithelial and mesenchymal markers in circulating tumor cells from colorectal cancer. Oncotarget 2017;8(6): 9293-9302.

310) Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, ve ark. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. Breast Cancer Res 2009;11(4): R46.

311) Li Y M, Xu S C, Li J, Han K Q, Pi H F, ve ark. Epithelial–mesenchymal transition markers expressed in circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma patients with different stages of disease. Cell Death & Disease 2013;4(10): e831-e831.

312) Liu H, Zhang X, Li J, Sun B, Qian H, ve ark. The biological and clinical importance of epithelial-mesenchymal transition in circulating tumor cells. J Cancer Res Clin Oncol 2015;141(2): 189-201.

313) Papadaki M A, Kallergi G, Zafeiriou Z, Manouras L, Theodoropoulos P A, ve ark. Co-expression of putative stemness and epithelial-to-mesenchymal transition markers on single circulating tumour cells from patients with early and metastatic breast cancer. BMC Cancer 2014;14(1): 651.

314) Togo S, Katagiri N, Namba Y, Tulafu M, Nagahama K, ve ark. Sensitive detection of viable circulating tumor cells using a novel conditionally telomerase-selective replicating adenovirus in non-small cell lung cancer patients. Oncotarget 2017;8(21): 34884-34895.

315) Masuda T, Hayashi N, Iguchi T, Ito S, Eguchi H, ve ark. Clinical and biological significance of circulating tumor cells in cancer. Mol Oncol 2016;10(3): 408-417.

316) Adhikary A, Chakraborty S, Mazumdar M, Ghosh S, Mukherjee S, ve ark. Inhibition of epithelial to mesenchymal transition by E-cadherin up-regulation via repression of slug transcription and inhibition of E-cadherin degradation: dual role of scaffold/matrix attachment region-binding protein 1 (SMAR1) in breast cancer cells. J Biol Chem 2014;289(37): 25431-25444.

317) Li S, Qin X, Chai S, Qu C, Wang X, ve ark. Modulation of E-cadherin expression promotes migration ability of esophageal cancer cells. Sci Rep 2016;6: 21713.

318) Micalizzi D S, Farabaugh S M, Ford H L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2010;15(2): 117-134.

319) Wang J, Wei Q, Wang X, Tang S, Liu H, ve ark. Transition to resistance: An unexpected role of the EMT in cancer chemoresistance. Genes Dis 2016;3(1): 3-6.

320) Joosse S A, Pantel K. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. Cancer Res 2013;73(1): 8-11.

321) Abdullah L N, Chow E K-H. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. Clinical and Translational Medicine 2013;2(1): 3.

322) Elaskalani O, Razak N B, Falasca M, Metharom P. Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for overcoming chemoresistance in pancreatic cancer. World J Gastrointest Oncol 2017;9(1): 37-41.

323) Meng X, Kong D H, Li N, Zong Z H, Liu B Q, ve ark. Knockdown of BAG3 induces epithelial-mesenchymal transition in thyroid cancer cells through ZEB1 activation. Cell Death Dis 2014;5: e1092.

324) Buehler D, Hardin H, Shan W, Montemayor-Garcia C, Rush P S, ve ark. Expression of epithelial-mesenchymal transition regulators SNAI2 and TWIST1 in thyroid carcinomas. Mod Pathol 2013;26(1): 54-61.

325) Salerno P, Garcia-Rostan G, Piccinin S, Bencivenga T C, Di Maro G, ve ark. TWIST1 plays a pleiotropic role in determining the anaplastic thyroid cancer phenotype. J Clin Endocrinol Metab 2011;96(5): E772-781.

326) Hardy R G, Vicente-Duenas C, Gonzalez-Herrero I, Anderson C, Flores T, ve ark. Snail family transcription factors are implicated in thyroid carcinogenesis. Am J Pathol 2007;171(3): 1037-1046.

327) Pan W, Yang Y, Zhu H, Zhang Y, Zhou R, ve ark. KRAS mutation is a weak, but valid predictor for poor prognosis and treatment outcomes in NSCLC: A meta-analysis of 41 studies. Oncotarget 2016;7(7): 8373-8388.

328) Wu J, Zhang Y, Cheng R, Gong W, Ding T, ve ark. Expression of epithelial-mesenchymal transition regulators TWIST, SLUG and SNAIL in follicular thyroid tumours may relate to widely invasive, poorly differentiated and distant metastasis. Histopathology 2019;74(5): 780-791.

329) Huang J, Guo L. Knockdown of SOX9 Inhibits the Proliferation, Invasion, and EMT in Thyroid Cancer Cells. Oncol Res 2017;25(2): 167-176.

330) Chen I, Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation. Nat Rev Microbiol 2004;2(3): 241-249.

331) Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys J P. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. Nat Rev Microbiol 2014;12(3): 181-196.

332) https://horizondiscovery.com/en/applications/rnai/sirna-applications

333) https://www.britannica.com/science/RNA-induced-silencing-complex

334) Sipos J A, Mazzaferri E L. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. Clin Oncol (R Coll Radiol) 2010;22(6): 395-404.

335) Radisky D C. Epithelial-mesenchymal transition. J Cell Sci 2005;118(Pt 19): 4325-4326.

336) Bauman M E. Neoplazi. In: A A K Kumar V., Fausto N., Mitchell R., editors. Robbins Temel Patoloji. Philadephia: Saunders; 2007. p. 174-177.

337) Rashid M G, Sanda M G, Vallorosi C J, Rios-Doria J, Rubin M A, ve ark. Posttranslational truncation and inactivation of human E-cadherin distinguishes prostate cancer from matched normal prostate. Cancer Res 2001;61(2): 489-492.

338) Fontana F, Raimondi M, Marzagalli M, Sommariva M, Limonta P, ve ark. Epithelial-To-Mesenchymal Transition Markers and CD44 Isoforms Are Differently Expressed in 2D and 3D Cell Cultures of Prostate Cancer Cells. Cells 2019;8(2).

339) Lesueur L L, Mir L M, Andre F M. Overcoming the Specific Toxicity of Large Plasmids Electrotransfer in Primary Cells In Vitro. Mol Ther Nucleic Acids 2016;5: e291.

340) Paul P, Roth S, Schleiff E. Importance of organellar proteins, protein translocation and vesicle transport routes for pollen development and function. Plant Reprod 2016;29(1-2): 53-65.

341) Da C, Wu K, Yue C, Bai P, Wang R, ve ark. N-cadherin promotes thyroid tumorigenesis through modulating major signaling pathways. Oncotarget 2017;8(5): 8131-8142.

342) Cazarin J M, Coelho R G, Hecht F, Andrade B M, Carvalho D P. 5'-AMP-Activated Protein Kinase Regulates Papillary (TPC-1 and BCPAP) Thyroid Cancer Cell Survival, Migration, Invasion, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. Thyroid 2016;26(7): 933-942.

343) Kim Y J, Kang H B, Yim H S, Kim J H, Kim J W. NDRG2 positively regulates E-cadherin expression and prolongs overall survival in colon cancer patients. Oncol Rep 2013;30(4): 1890-1898.

344) Kim M J, Lim J, Yang Y, Lee M S, Lim J S. N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) suppresses the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells via STAT3/Snail signaling. Cancer Lett 2014;354(1): 33-42.

345) Lee D G, Lee S H, Kim J S, Park J, Cho Y L, ve ark. Loss of NDRG2 promotes epithelial-mesenchymal transition of gallbladder carcinoma cells through MMP-19-mediated Slug expression. J Hepatol 2015;63(6): 1429-1439.

346) Wang R X, Ou X W, Kang M F, Zhou Z P. Association of HIF-1alpha and NDRG2 Expression with EMT in Gastric Cancer Tissues. Open Life Sci 2019;14: 217-223.

347) Chen X L, Lei L, Hong L L, Ling Z Q. Potential role of NDRG2 in reprogramming cancer metabolism and epithelial-to-mesenchymal transition. Histol Histopathol 2018;33(7): 655-663.

348) Ding M, Bu X, Li Z, Xu H, Feng L, ve ark. NDRG2 ablation reprograms metastatic cancer cells towards glutamine dependence via the induction of ASCT2. Int J Biol Sci 2020;16(16): 3100-3115.

349) Mordalska A, Latek J, Ferenc T, Pomorski L, Galecka E, ve ark. Evaluation of NDRG2 gene expression in primary papillary thyroid carcinoma and in metastases of this neoplasm to regional lymph nodes. Thyroid Res 2010;3(1): 6.

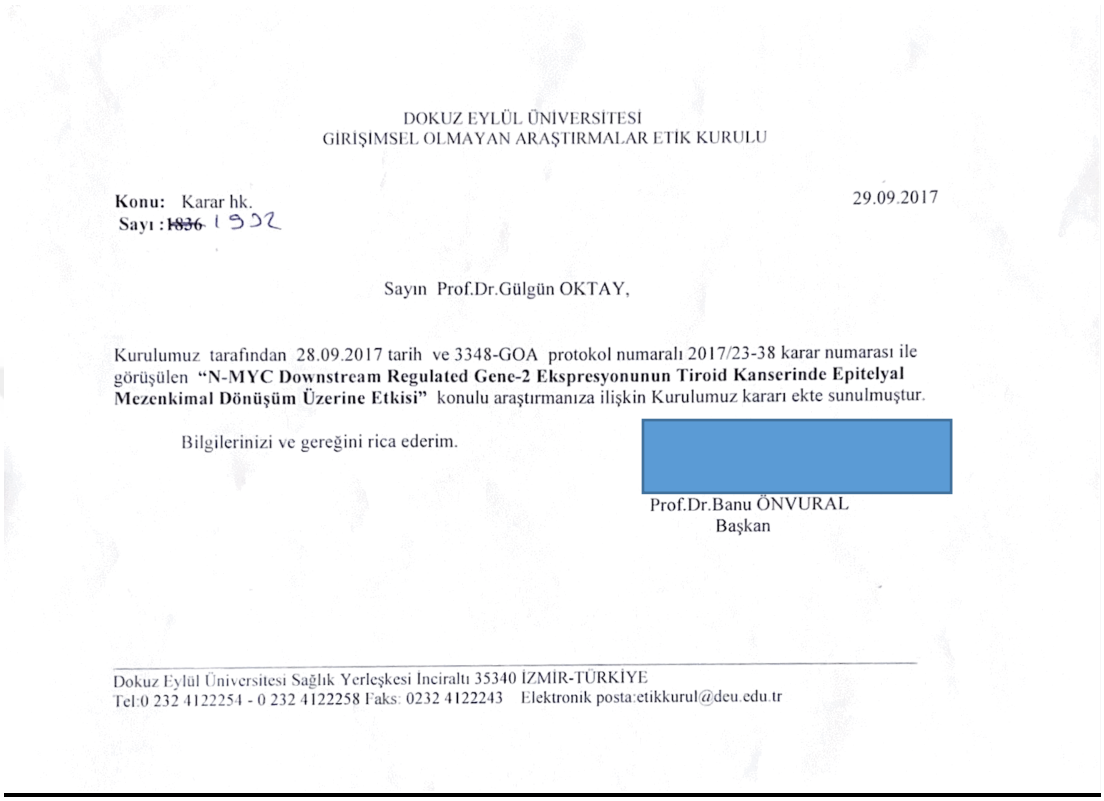
350) Yin A, Wang C, Sun J, Gao J, Tao L, ve ark. Overexpression of NDRG2 Increases Iodine Uptake and Inhibits Thyroid Carcinoma Cell Growth In Situ and In Vivo. Oncol Res 2016;23(1): 43-51.

KATKI

Bu araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (no. 2018.KB.SAG.069) desteklenmiştir.

EKLER

EK-1: Etik Kurul Belgesi



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.
Sayı : ~~1836~~ 1932

29.09.2017

Sayın Prof.Dr.Gülgün OKTAY,

Kurulumuz tarafından 28.09.2017 tarih ve 3348-GOA protokol numaralı 2017/23-38 karar numarası ile görüşülen **"N-MYC Downstream Regulated Gene-2 Ekspresyonunun Tiroid Kanserinde Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm Üzerine Etkisi"** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**etikkurul@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	3348-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☒
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**N-MYC Downstream Regulated Gene-2 Ekspresyonunun Tiroid Kanserinde Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm Üzerine Etkisi**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Gülgün OKTAY Tıbbi Biyokimya A.D.	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐

	Belge Adı	**Tarihi**	**Versiyon Numarası**	**Dili**
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Araştırıcı dilekçesi	26.09.2017		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2017/23-38**	**Tarih:28.09.2017**
	Prof.Dr.Gülgün OKTAY'ın sorumlusu olduğu "**N-MYC Downstream Regulated Gene-2 Ekspresyonunun Tiroid Kanserinde Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm Üzerine Etkisi"** isimli klinik araştırmaya ait 26.09.2017 tarihli araştırıcı dilekçesine ilişkin olarak; -Münferit araştırma olarak onay alınan çalışmanın Murat Sipahi'nin doktora tez çalışması olarak değiştirilmesi ile ilgili belge incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Müge KİRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

EK-2: Özgeçmiş



MURAT SİPAHİ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

01 Eylül 2013 - Şu Anda (7 yıl 10 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, BİYOKİMYA (DR)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.88 / 4.0

01 Eylül 2010 - 01 Ağustos 2013 (3 yıl)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (YL) (TEZLİ)
Tez Başlığı: İNDİFERANSİYE İNSAN ANAPLASTİK TİROİT KARSİNOMA HÜCRE HATTINDA KALSİTRİOLÜN NDRG2 (N-MYC DOWNSTREAM REGULATED GENE-2) VE NIS (SODYUM İYOT SİMPORTER) GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNDEKİ OLASI ETKİSİ
Tez Konusu: Tiroid kanserinde calcitriolün NRG2 gen ekspresyonu üzerin etkisi
Tarih: 2013
Tez Danışmanı: GÜLGÜN OKTAY
Diploma Numarası: 997
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.54 / 4.0

01 Eylül 2005 - 11 Haziran 2010 (4 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOKİMYA BÖLÜMÜ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Moleküler Biyoloji ve Genetik -- Kanser Moleküler Biyolojisi

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Biyokimya

Anahtar Kelimeler

Tiroid Kanseri

Western Blot Analizi

Oluşturma Zamanı: 08 Haziran 2021 10:51:44

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hücre Kültürü

Viral Olmayan Gen Transfeksiyonu

Epitelyal-Mezenkimal Geçiş

İnvazyon

Meme Kanseri

Kolon Kanseri

Zimografi

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

M. SİPAHİ, D. K. BARTİK, M. DORUK, F. BAYRAKTAR & G. OKTAY, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Induces N-Myc Downstream Regulated Gene-2 Expression In Papillary Thyroid Carcinoma Cells, JOURNAL OF BASIC AND CLINICAL HEALTH SCIENCES, 2020, 2458-8938, 4, 2, 128-132.

Bildiriler

M. SİPAHİ, D. KELEŞ BARTIK, H. EFE & G. OKTAY, NDRG2 OVEREXPRESSION ATTENUATES INVASION and LATERAL MIGRATION in BCPAP PAPILLARY THYROID CANCER CELLS, Sözlü Sunum, 6. Uluslararası Hipokrat Tıp ve Sağlık Bilimleri Kongresi, 30 Nisan 2021, 01 Mayıs 2021, 34 - 35.

Ş. İNANÇ SÜRER, D. KELEŞ BARTIK, M. SİPAHİ, Y. BASKIN & G. OKTAY, Effects Of Metformin And Dichloroacetate On Mitochondrial Energy Metabolism In Oral Cavity Cancer Cells, Poster Sunumu, The 43rd Febs Congress, 07 Temmuz 2019, 12 Temmuz 2019, 334 - 334.

M. SİPAHİ, D. KELEŞ BARTIK, M. B. DJAMGOZ & G. OKTAY, Sirna-directed Inhibition Of Scn5a Increases Matrix Metalloproteinase-9 Expression And Activity In Mda-mb-231 Metastatic Breast Cancer Cells, Poster Sunumu, The 43rd Febs Congress, 07 Temmuz 2018, 12 Temmuz 2018, 334 - 334.

D. KELEŞ BARTIK, M. SİPAHİ, M. B. DJAMGOZ & G. OKTAY, Tetracaine Suppress Metastatic Cell Behaviors Through Regulating Matrix Metalloproteinase- 2/-9 And Tmp-2 Levels In Metastatic Breast Cancer Cells, Poster Sunumu, The 43rd Febs Congress, 07 Temmuz 2018, 12 Temmuz 2018, 334 - 334.

D. KELEŞ BARTIK, G. OKTAY, M. SİPAHİ, Ş. İNANÇ SÜRER & M. B. DJAMGOZ, The Effect Of Voltage-gated Sodium Channel On Matrix Metalloproteinase Expression And Activity In Human Breast Cancer Cells, Poster Sunumu, 40th Febs Congress The Biochemical Basis Of Life, 04 Temmuz 2015, 09 Temmuz 2015, 282, Supp.1, 318 - 318.

D. KELEŞ BARTIK, G. OKTAY, M. SİPAHİ, Ş. İNANÇ SÜRER & M. B. DJAMGOZ, Matrix Metalloproteinase Expression And Activity In Human Breast Cancer Cells: Association With Voltage-gated Sodium Channel, Poster Sunumu, 3rd Eacr-sponsored Anticancer Agent Development Congress, 18 Mayıs 2015, 19 Mayıs 2015, 83 - 83.

D. KELEŞ BARTIK, M. SİPAHİ, Ş. İNANÇ SÜRER & G. OKTAY, Rhoc-gtpase Promotes Colon Cancer Cell Invasion In Matrixmetalloproteinase Dependent Manner, Poster Sunumu, Febs Embo Congress, 30 Ağustos 2014, 04 Eylül 2014, 281, 581 - 581.

M. SİPAHİ, D. KELEŞ BARTIK, M. ÇALAN, F. BAYRAKTAR & G. OKTAY, The Effects Of Calcitriol On N-myc Downstream Regulated Gene-2 And Sodium-iodide Symporter Gene Expressions In Undifferantiated Humananaplastic Thyroid Cancer Cell Line, Poster Sunumu, Febs Embo 2014, 30 Ağustos 2014, 04 Eylül 2014, 281, 508 - 508.

Ş. İNANÇ SÜRER, D. KELEŞ BARTIK, A. E. CANDA, T. ÜNEK, M. SİPAHİ, M. C. TERZİ, S. KARADERMİR, İ. ASTARCIOĞLU & G. OKTAY, Contribution Of Rhoc To Liver Metastasis Of Colorectal Cancer Through Mmp-2 Activation, Poster Sunumu, 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, 29 Kasım 2011, 02 Aralık 2011, 36, 100 - 100.

D. KELEŞ BARTIK, Ş. İNANÇ SÜRER, A. E. CANDA, M. C. TERZİ, M. SİPAHİ, H. ELLİDOKUZ, M. FÜZÜN & G. OKTAY, The Effects Of Rhoc, Rock And Mmp-2 On Colorectal Cancer Invasion, Poster Sunumu, 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, 29 Kasım 2011, 02 Aralık 2011, 36, 97 - 97.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), DİĞER, Baş Ve Boyun Kanser Hücrelerinin Hipoksik Mikroçevresinde Hıf-1alfa Ile Ilişkili Mitokondriyal Glukoz Metabolizmasının Rolünün Incelenmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: Dokuz Eylül Üniversitesi, BAP (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

BAP, DİĞER, N-myc Downstream Regulated Gene-2 Ekspresyonunun Tiroid Kanserinde Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm Üzerine Etkisi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: Dokuz Eylül Üniversitesi, BAP (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

TÜBİTAK 1001/3501/1003, BURSİYER, Oral Kavite Kanserinde Metformin Ve Dikloroasetat'ın Mitokondriyal Enerji Metabolizması Ve Setüksimab Kemoduyarlılığı Üzerine Sinerjistik Etkisinin Değerlendirilmesi: Ilaç Yeniden Konumlandırma, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BİLİM KURULU (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

TÜBİTAK 1001/3501/1003, BURSİYER, Metastatik Mda-mb-231 Insan Meme Kanser Hücrelerinde Matriks Metalloproteinaz-9?un Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı Nav1.5 Ve ß1 Regülasyonu Üzerindeki Fonksiyonel Etkilerinin Incelenme, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BİLİM KURULU (Yurt İçi) , 01 Ekim 2015, 01 Ekim 2018.

KURUMSAL (BAP V.B.), DİĞER, Kolon Kanser Hücrelerinde Rhoc-gtpaz Ile Ekstrasellüler Proteoliz Arasındaki Olası Ilişkinin Belirlenmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: Dokuz Eylül Üniversitesi, BAP (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) , 01 Haziran 2012, 01 Ağustos 2014.

KURUMSAL (BAP V.B.), DİĞER, Indiferansiye Insan Anaplastik Tiroid Karsinoma Hücre Hattında Kalsitriolün N-myc Downstream Regulated Gene-2 Ve Sodyum Iyot Simporter Gen Ekspresyonları Üzerindeki Olası Etkileri, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: Dokuz Eylül Üniversitesi,BAP (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) , 01 Mayıs 2012, 01 Mayıs 2013.

BAP, DİĞER, Primer Kolorektal Tümörlerde Ve Metastatik Karaciğer Tümörlerinde Migrasyon Ve Invazyon Ile Ilgili Moleküllerin Ekspresyonel Değişikliklerinin Kliniko-patolojik Bulgularla Ilişkisinin Araştırılması, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: Dokuz Eylül Üniversitesi BAP (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) , 01 Ocak 2008, 01 Aralık 2011.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

115S504, Metastatik MDA-MB-231 İnsan Meme Kanser Hücrelerinde Matriks Metalloproteinaz-9'un Voltaj Kapılı Sodyum Kanalı Nav1.5 ve ß1 Regülasyonu Üzerindeki Fonksiyonel Etkilerinin İncelenmesi, 1001 - Araştırma, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 15.10.2015 - 01.10.2018, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.10.2015 - 01.10.2018.
118S576, Oral Kavite Kanserinde Metformin ve Dikloroasetat'ın Mitokondriyal Enerji Metabolizması ve Setüksimab Kemoduyarlılığı Üzerine Sinerjistik Etkisinin Değerlendirilmesi: İlaç Yeniden Konumlandırma, 1001 - Araştırma, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 31.01.2019 - 31.01.2020, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.12.2018 - 01.12.2020.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

JBACHS
Journal of Basic and Clinical Health Sciences

J Basic Clin Health Sci 2020; 4:128-132
https://doi.org/10.30621/jbachs.2020.1012

Original investigation

1,25-Dihydroxyvitamin D3 Induces N-Myc Downstream Regulated Gene-2 Expression In Papillary Thyroid Carcinoma Cells

Murat Sipahi[1], Didem Keleş Bartık[2], Mehmet Doruk[3], Fırat Bayraktar[4], Gülgün Oktay[5]

[1]Dokuz Eylül University, Institue of Health Sciences, Department of Biochemistry, İzmir, Turkey
[2]Izmir University of Economics, Vocational School of Health Services, Department of Medical Laboratory Techniques, İzmir, Turkey
[3]Izmir Bozyaka Training and Research Hospital, Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, İzmir, Turkey
[4]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Internal Medicine, Department of Internal Medicine Endocrinology And Metabolic Diseases, İzmir, Turkey
[5]Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of Medical Biochemistry, İzmir, Turkey

Address for Correspondence: Gülgün Oktay, **E-mail:** gulgun.oktay@deu.edu.tr
Received: 05.02.2020; **Accepted:** 10.03.2020; **Available Online Date:** 15.05.2020
©Copyright 2020 by Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences - Available online at www.jbachs.org

Cite this article as: Sipahi M, Keleş Bartık D, Doruk M, Bayraktar F, Oktay G. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Induces N-Myc Downstream Regulated Gene-2 Expression In Papillary Thyroid Carcinoma Cells. J Basic Clin Health Sci 2020; 4:128-132.

ABSTRACT

Purpose: In addition to its role in serum calcium homeostasis, the anti-tumor function of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 (calcitriol) in cancer development is well established. N-myc Downstream Regulated Gene 2 which functions as a tumor suppressor gene has recently been shown to be downregulated in various cancer leading to increased tumor incidence, progression and metastasis. The goal of this study was to investigate the possible effects of calcitriol treatment on NDRG2 expression in BCPAP papillary thyroid carcinoma cells.

Methods: The experiments were carried on human primary thyroid follicular epithelial cells (Nthy-ori-3-1), and human papillary thyroid carcinoma cells (BCPAP). The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of calcitriol on BCPAP cells was determined by WST-1 assay. BCPAP cells were treated with 15 and 30μM calcitriol for 24, 48, and 72 hours, respectively. Basal NDGR2 expression in Nthy-ori-3–1 and BCPAP cells as well as the alterations on NDRG2 expression in calcitriol treated BCPAP cells were evaluated with western blot.

Results: A significant downregulation of NDRG2 was observed in BCPAP cells when compared to Nthy-ori-3–1 cells ($p<0.01$). IC_{50} dose of calcitriol was found to be 64, 54 and 43μM for 24, 48 and 72 hours, respectively. NDRG2 protein expression levels were significantly increased in 30μM calcitriol treated BCPAP cells after 48 hours ($p<0.05$).

Conclusions: Calcitriol induced NDRG2 protein expression in BCPAP cells. We predict that calcitriol increased NDRG2 protein levels in BCPAP cells via c-Myc repression, which is upregulated by aberrant Wnt/β-catenin signaling. Further investigation is required to enlighten the possible effect mechanisms of calcitriol in BCPAP cells.

Keywords: 1,25-Dihydroxyvitamin D_3, thyroid cancer, papillary thyroid cancer, N-myc downstream regulated gene 2

INTRODUCTION

Thyroid cancer is one of the most common endocrine neoplasia and the incidence is increasing worldwide. Most of the thyroid tumors arise from thyroid follicular epithelial cells which can be divided into four subclasses; 1) papillary thyroid cancer 2) follicular thyroid cancer, 3) Hurtle cell cancer and 4) anaplastic thyroid cancer. Medullary thyroid cancer, which is originated from non-follicular thyroid cells, accounts for 4% of thyroid cancer cases (1).

Papillary thyroid cancer (PTC), which accounts for 85–90% of all thyroid cancer cases, is the most common histological type of thyroid cancer. Due to its low progression rate and the positive role of radioactive iodine ablation, patients have a good prognosis with a high 10 year of survival rate (2).

Vitamin D is a fat-soluble vitamin and its major role is to increase the intestinal absorption of calcium and maintain proper serum calcium and phosphate concentrations which are essential for normal mineralization of bone (3). Calcitriol (1α, 25-Dihydroxyvitamin D_3) is the most active form of vitamin D and synthesis of endogenous calcitriol is a multistep process induced by ultraviolet rays from the sun in the skin. Molecular activity of calcitriol is dependent on binding to its receptor, Vitamin D Receptor (VDR), which is also a transcription factor present in both cytoplasm and nucleus (4). Binding of calcitriol to VDR induces the formation of calcitriol-VDR/Retinoid X Receptor (RXR) which is essential for translocation of calcitriol-RXR-VDR complex to nucleus. In nucleus, calcitriol-RXR-VDR complex interacts with vitamin D response elements (VDRE) and regulates several gene expression (5). The anti-cancer role of



BİLDİRİ ÖZETLERİ KİTABI

ABSTRACT BOOK

Editors - Editörler

Doç. Dr. Ahu Pakdemirli
Doç Dr. Meriç Eraslan

www.hippocratescongress.com

Presentation ID/Sunum No= 306

Oral Presentation / Sözlü Sunum

NDRG2 Overkespresyonu Bcpap Tiroid Kanseri Hücrelerinde İnvazyonu ve Yara İyileşmesini Azaltır

Ph.d. Cand. Murat Sipahi[1] , Asst. Prof. Dr. Didem Keleş Bartık[2] , Ph.d. Cand. Hande Efe[3] , Prof.Dr. Gülgün Oktay[4]

[1]Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı
[2]İzmir Ekonomi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri
[3]Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
[4]Dokuz Eylül Üniversitesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Özet

Giriş: Tiroid kanseri en yaygın endokrin kanserdir ve insidansındaki artış bu hastalığı küresel bir sağlık problemi haline getirmiştir. Papiller tiroid kanseri (PTK) en yaygın tiroid kanseri türüdür. İyi diferansiye karakteristiklerine rağmen, PTK invaziv olabilir; bu durum PTK tümörlerinin diğer organlara yayılmasına neden olabilir. NDRG ailesinin bir üyesi olan N-myc downstream regulated gene (NDRG)-2, çeşitli sinyal yollarını modüle ederek hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu, apoptoz ve metastazda rol oynar. Son bulgular, NDRG2 downregülasyonunun, birçok kanserde tümör ilerleyişi ve metastaz ile büyük ölçüde ilişkili olduğunu göstermektedir; ancak, NDRG-2'nin PTK hücre invazivliği üzerindeki olası etkisi ile ilgili güçlü bir kanıt bulunmamaktadır. Amaç: Bu çalışmada, BCPAP papiller tiroid kanser hücrelerinde NDRG2 upregülasyonunun metastatik hücre davranışı üzerindeki fonksiyonel etkilerini araştırmayı amaçladık. Metod: BCPAP hücreleri, LipofectamineTM 3000 kullanılarak tam uzunlukta NDRG2 geni içeren pCMV6-AC-GFP (BCPAP-NDRG2) veya pCMV6-AC-GFP (BCPAP-mock) ile geçici olarak transfekte edildi. Transfeksiyon verimliliği, real time PCR ve western blot ile doğrulandı. Transfeksiyonu takiben, BCPAP-NDRG2 hücrelerinin metastatik hücre davranışları üzerindeki olası değişiklikleri aydınlatmak için Matrigel invazyon, transwell migrasyon, yara iyileşmesi ve adezyon deneyleri gerçekleştirildi. Bulgular: NDRG2 overekspresyonu ile BCPAP-NDRG2 hücrelerinde Matrigelinvazyon ve lateral hücre migrasyonu, BCPAP-mock ve kontrol hücrelerine kıyasla anlamlı olarak inhibe edildi. Ancak, NDRG2 overekspresyonu, BCPAP-NDRG2 hücrelerinin transwell migrasyon ve adezyonu üzerinde anlamlı bir etki göstermedi. Sonuç: Sonuçlar ele alındığında, NDRG2 upregülasyonunu hedef alan yeni terapötik yaklaşımların PTK hücresel invazivliğini bastırmak için umut verici bir strateji olabileceği sonucuna vardık. Ek olarak, NDRG2 eksikliği olan PTK hastalarının metastaz açısından potansiyel risk altında olduğu düşünülebilir. Bununla birlikte, altta yatan mekanizmaları aydınlatmak için daha fazla deneysel araştırmanın yapılması gerekmektedir. Teşekkür: Bu araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (no. 2018.KB.SAG.069) desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler: N-Myc Dowstream Regulated Gene-2, Tiroid Kanseri, Papiller Tiroid Kanseri, Metastatik Hücre Davranışı

hippocratescongress.com

NDRG2 Overexpression Attenuates Invasion and Lateral Migratıon in Bcpap Papillary Thyroid Cancer Cells

Abstract

Introduction: Thyroid cancer is the most common endocrine cancer and its increasing incidence has turned this disease into a global health problem. Especially, papillary thyroid cancer (PTC) is the most prevalent type of thyroid cancer. Despite its well-differentiated characteristics, PTC may be invasive leading these tumors to spread the other organs. N-myc downstream regulated gene (NDRG)-2, a member of NDRG family, is involved in cell proliferation, differentiation, apoptosis, and metastasis via modulating several signaling pathways. Recent findings indicate that NDRG2 downregulation is highly associated with tumor progression and metastasis in many human cancers; however, there is no strong evidence about the possible function of NDRG-2 on PTC cell invasiveness. Objective: In this study, we aimed to investigate the functional effects of NDRG2 upregulation on metastatic cell behaviors in BCPAP papillary thyroid cancer cells. Method: BCPAP cells were transiently transfected with pCMV6-AC-GFP containing the full-length NDRG2 gene (BCPAP-NDRG2) or pCMV6-AC-GFP (BCPAP-mock) using LipofectamineTM 3000. The transfection efficiency was validated by real-time PCR and western blotting. Following transfection, Matrigel invasion, transwell migration, wound healing and adhesion assays were performed to elucidate possible alterations on metastatic cell behaviors in BCPAP-NDRG2 cells. Results: The Matrigel invasion and lateral cell migration of BCPAP-NDRG2 cells significantly inhibited with NDRG2 overexpression compared to BCPAP-mock and control cells. On the other hand, NDRG2 overexpression showed no significant effect in transwell migration and adhesion in BCPAP-NDRG2 cells. Conclusion: Taken together, we conclude that new therapeutic approaches promoting NDRG2 upregulation may be a promising strategy to suppress the cellular invasiveness of PTC. In addition, PTC patients with NDRG2 deficiency may be considered to have a potential risk for metastasis. However, further experimental investigations need to be performed to enlighten the underlying mechanisms. Acknowledgements: This research was supported by a grant (no.2018.KB.SAG.069) from Dokuz Eylul University Scientific Research Project Coordination Unit.

Keywords: N-Myc Dowstream Regulated Gene-2, Thyroid Cancer, Papillary Thyroid Cancer, Metastatic Cell Behaviour

hippocratescongress.com