

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRELERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN FİBRONEKTİNİN
MİYELOİD HÜCRE KARAKTERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Gürçan TUNALI

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2019

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRELERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN FİBRONEKTİNİN
MİYELOİD HÜCRE KARAKTERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Gürcan TUNALI

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI

ANKARA

2019

ONAY SAYFASI

MEME KANSERİ HÜCRELERİ TARAFINDAN ÜRETİLEN FİBRONEKTİNİN

MİYELOİD HÜCRE KARAKTERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Gürcan TUNALI

Danışman: Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI

Bu tez çalışması 25.03.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Ece KONAÇ

Gazi Üniversitesi

Üye:

Doç. Dr. Banu PEYNİRCİOĞLU

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Doç. Dr. Füsun ÖZMEN

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Dr. Öğr. Üyesi Arzu ATALAY

Ankara Üniversitesi

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

18 Nisan 2019



Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

15/03/2019



Gürcan TUNALI

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

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

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

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

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

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

ETİK BEYAN

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



Gürcan TUNALI

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi birikimi ile beni aydınlattığı ve yol gösterdiği için sonsuz teşekkürlerimi sunduğum danışmanım Prof. Dr. Güneş Esendağlı ile çalışmak benim için eşsiz bir hayat tecrübesi olmuştur.

Tez İzleme Komitesinin saygıdeğer üyeleri Doç. Dr. Füsun Özmen'e ve Dr. Öğr. Üyesi Arzu Atalay'a tezime yaptıkları değerli katkılardan dolayı şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam için olanaklarını bizimle paylaşan ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Ellen Van Obberghen-Schilling ve ekibine, Prof. Dr. Yasemin Aksoy'a, Dr. Deniz Ceylan'a ve Maurice Hattab'a teşekkür ederim.

Tez çalışmama verdiği destekten ötürü TÜBİTAK ve Hacettepe Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimine teşekkürü bir borç bilirim.

Yardımsaver ve güler yüzlü yaklaşımlarından ötürü H.Ü. Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı ve Kanser Enstitüsü çalışanlarına, yanımda olan, ilgi ve alakalarını eksik etmeyen arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında manevi olarak yanımda olan, bana güvenen ve koşulsuz destek veren sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Tunalı G. Meme kanseri hücreleri tarafından üretilen fibronektinin miyeloid hücre karakteri üzerine etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı Doktora Tezi, Ankara, 2019. Bazal-benzeri meme kanseri (BBMK) inflamasyonu düzenleyici karaktere sahiptir ve yüksek düzeyde miyeloid hücre infiltrasyonu gösterir. Tümör dokusunu oluşturan hücre-dışı matris bileşenleri, özellikle fibronektin (FN), miyeloid hücrelerin farklılaşmasına katkıda bulunur. Tümördeki makrofajlar STAT3 transkripsiyon faktörünün katkısı ile immün baskılayıcı karakter kazanır. Tümör-ilişkili makrofajlar (TAM), tümörde inflamatuvar mikroçevrenin oluşumuna katkı sağlar. Elastaz-2 FN'yi özgül bölgelerden keserek TLR4 reseptörünü uyarabilen EDA bölgesinin ortaya çıkmasını sağlar. Bu tez çalışması, BBMK hücrelerinden üretilen faktörlerin miyeloid hücrelerdeki STAT3 aktivitesini ve tümör mikroçevresindeki inflamatuvar karakterde önemli rol oynayan interleükin-1 β (İL-1 β) üretimini düzenlediği ve FN/FN-EDA, elastaz ve TLR4 ekseninin meme kanserinde inflamasyonun devamlılığını sağladığı hipotezine dayanmaktadır. Analizlerde periferik kan monositleri ve immatür miyeloid hücre modeli olarak miyeloid lösemi hücre hatları kullanıldı. Bu hücrelerde fenotipik (CD11b, CD11c, CD14, CD40) ve fonksiyonel (reaktif oksijen türlerinin üretimi, kemotaksis ve fagositoz kapasitesi, CD4⁺ T hücre çoğalmasının uyarılması) farklılaşma parametreleri değerlendirildi. BBMK hücre süpernatantları ile inkübe edilen miyeloid hücrelerde STAT3 aktivasyonu TLR4 düzeyleri, İL-1 β ve elastaz-2 üretimi araştırıldı. STAT3 aktivasyonu sonrasında miyeloid hücrelerin İL-1 β , TLR4, elastaz-2 ve NF- κ B aktivitesini uyarma düzeyi değerlendirildi. Pro-inflamatuvar sitokinler varlığında meme kanseri hücrelerinde total FN ve FN-EDA düzeyleri test edildi. FN-EDA'nın TLR4 ve NF- κ B aktivitesine etkisi incelendi. BBMK hücrelerinden salgılanan faktörler miyeloid hücrelerde fenotipik ve fonksiyonel olgunlaşmayı uyardı. Kemotaksis kapasitesi artan miyeloid hücrelerde BBMK hücrelerinden salgılanan faktörlerin STAT3 aktivitesini uyardığı belirlendi. Yüksek STAT3 aktivitesine sahip miyeloid hücrelerde İL-1 β salgı kapasitesi arttı. İL-1 β ile uyarılan BBMK hücrelerinde total FN ve FN-EDA izoformunun arttığı gözlemlendi. FN-EDA konsantrasyonu arttırılan BBMK hücre süpernatantlarının monositlerden İL-1 β üretimini etkili bir şekilde desteklediği görüldü. Yüksek düzeyde FN-EDA içeren ortamda BBMK hücrelerinden ve monositlerden salgılanan faktörlerin NF- κ B aktivitesini uyardığı tespit edildi. İL-1 β üretimi ve NF- κ B aktivitesi üzerindeki etkinin STAT3 aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleştiği belirlendi. BBMK hücrelerinden salgılanan FN-EDA'nın ve rekombinant FN-EDA varlığında yüksek düzeyde elastaz-2 içeren PMN lökosit süpernatantlarının TLR4 ve NF- κ B aktivitesini uyardığı görüldü. Sonuç olarak, BBMK ve monositler arasında tümör mikroçevresindeki kronik inflamasyonu destekleyen, STAT3/İL-1 β /FN molekülleri aracılığı ile pozitif bir geri-besleme mekanizmasının olabileceği yönünde bilgilere ulaşılmıştır. BBMK'de STAT3, İL-1 β ve FN'in hedeflenmesi inflamatuvar mikroçevreyi kanser tedavisine elverişli hale getirebilir. BBMK için tedavi stratejileri geliştirilirken bu pozitif geri-bildirim mekanizmasının varlığı dikkate alınmalıdır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, miyeloid hücre, fibronektin, STAT3, İL-1 β , FN-EDA

Bu çalışma, TÜBİTAK (Proje no: 113Z923 ve 116Z997) ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje no: TDK-2018-16203) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Tunali G. The effect of fibronectin produced by breast cancer cells on myeloid cell character. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Tumor Biology and Immunology Program Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2019. Basal-like breast cancer (BLBC) possess high capacity to regulate inflammation and identified with high-level myeloid cell infiltration. Extracellular matrix components produced by tumor cells, e.g. fibronectin (FN), can support myeloid cells' maturation. Macrophages in the tumor gain immunosuppressive characters with the contribution of the STAT3 transcription factor. Tumor-associated macrophages (TAM) contribute to the formation of inflammatory microenvironment. EDA fragment released by elastase-2-mediated cleavage of FN can stimulate TLR4 receptor. This study is based on the hypothesis that the factors produced by BLBC cells regulate STAT3 activity in myeloid cells and interleukin-1 β (IL-1 β) production, which plays an important role in the inflammatory character of the tumor microenvironment, and FN/FN-EDA, elastase and TLR4 axis provide the contribution of inflammation in breast cancer. Peripheral blood monocytes and myeloid leukemia cell lines, as immature myeloid cell model, were used. Phenotypic (CD11b, CD11c, CD14, CD40) and functional (production of reactive oxygen species, chemotaxis and phagocytosis capacity, stimulation of CD4⁺ T cell proliferation) differentiation parameters were evaluated. STAT3 activation, TLR4 levels, IL-1 β and elastase-2 production were investigated in myeloid cells incubated with BLBC cells' supernatants. IL-1 β , TLR4, elastase-2 and NF- κ B stimulation by myeloid cell were evaluated following STAT3 activation. In the presence of pro-inflammatory cytokines, total FN and FN-EDA levels were evaluated in breast cancer cells. The effect of FN-EDA on TLR4 and NF- κ B activity was investigated. Factors produced by BLBC cells induced phenotypic and functional maturation in myeloid cells. In myeloid cells with increasing chemotaxis capacity, STAT3 activation was stimulated by factors produced by BLBC. IL-1 β secretion increased in myeloid cells with high STAT3 activity. Total FN and FN-EDA isoform was highly produced by IL-1 β -induced BLBC cells. BLBC cell supernatants and FN-EDA were synergistically promoted IL-1 β production from monocytes and stimulated NF- κ B activity. The effect on IL-1 β production and NF- κ B activity were associated with STAT3 activation. Either secreted by BLBC cells or recombinant FN-EDA, when treated with neutrophil supernatants containing high levels of elastase-2, did not stimulate TLR4 and NF- κ B activity. In conclusion, a positive feedback mechanism between BLBC and monocytes through STAT3/IL-1 β /FN molecules supports chronic inflammation in the tumor microenvironment. Targeting STAT3, IL-1 β and FN in BLBC may modulate inflammatory microenvironment in favour of cancer therapy. The development of treatment strategies for BLBC should take into account the presence of this positive feedback mechanism.

Key words: Breast cancer, myeloid cell, fibronectin, STAT3, IL-1 β , FN-EDA

This study was supported by TUBITAK (Project no: 113Z923 and 116Z997) and Hacettepe University Scientific Research Unit (Project no: TDK-2018-16203).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xv
ŞEKİLLER	xviii
TABLolar	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Meme Kanseri	4
2.1.1. Meme Kanserinin Alt-tipleri	5
2.1.2. Meme Kanserinin İnflamatuvar Mikroçevresi	9
a. Meme Kanseri ve Makrofajlar	10
2.2. Monosit-Makrofaj Farklılaşması	14
2.2.1. TAM'lar ve STAT3 Transkripsiyon Faktörü	20
2.2.2. TAM'lar ve NF-κB Transkripsiyon Faktörü	23
2.2.3. TAM'lar ve İL-1β	27
2.2.4. Hücre-dışı Matrisin Makrofaj Farklılaşmasına Etkisi	29
2.3. Fibronektin Yapısı	30
2.4. Hücre-dışı Matris ve Kanseri Gelişimi	34
2.4.1. Fibronektinin Kanseri Gelişimindeki Rolü	35
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler	39
3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	40
3.3. Hücre Kültürü	44
3.3.1. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Çözülmesi	46

3.3.2. Hücrelerin Pasajlanması	46
3.3.3. Hücre Sayımı	47
3.3.4. Ko-kültür Deneyleri	48
3.3.5. Meme Kanseri Hücre Hatlarından Süpernatant Eldesi ve Miyeloid Hücrelerin Uyarılması	49
3.3.6. Meme Kanseri Hücre Hatlarının Pro-inflamatuar Sitokinler ile Uyarılması	49
3.3.7. Miyeloid Hücrelerde STAT3 Yolağının İnhibisyonu	50
3.4. Akım Sitometri	50
3.4.1. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Analizi	54
3.4.2. Fagositoz Analizi	54
3.4.3. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PKMH) İzolasyonu	55
3.4.4. Periferik Kandan Polimorfonükleer (PMN) Lökosit İzolasyonu	55
3.4.5. Floresan-aktif Hücre Ayrılama (<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , FACS) Yöntemi ile CD4 ⁺ T Hücre Eldesi	57
3.4.6. Manyetik-aktif Hücre Ayrılama (<i>magnetic activated cell sorting</i> , MACS) Yöntemi ile Monosit İzolasyonu	58
3.4.7. CD4 ⁺ T Hücre Çoğalmasının Ko-kültürlerde Analizi	60
3.5. Kemotaksis Deneyi	61
3.6. Western Blot Analizleri	62
3.6.1. Protein Lizatı Hazırlaması	62
3.6.2. Protein Ölçümü	62
3.6.3. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	64
3.6.4. Transfer ve Blotlama	66
3.6.5. Primer ve Sekonder Antikor ile İnkübasyon	67
3.6.6. Kemoluminesans Görüntüleme ve Yoğunluk Ölçümü (Dansitometri)	68
3.7. Gen İfade Analizleri	68
3.7.1. RNA İzolasyonu	68
3.7.2. RNA Örneklerinden DNA'nın Uzaklaştırılması	69
3.7.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	70

3.7.4. Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR)	71
3.8. Hücre Kültüründen Süpernatant Toplanması	74
3.9. ELISA Analizleri	75
3.9.1. İnsan Fibronektin ELISA	75
3.9.2. İnsan İL-1 β ELISA	76
3.9.3. İnsan PMN Elastaz ELISA	78
3.10. Rekombinant İnsan Fibronektin Ekstra Domain A ⁺ (FN-EDA ⁺) ve Ekstra Domain A ⁻ (FN-EDA ⁻) Protein İzofomlarının Saflaştırılması	80
3.11. Salgılanan Embriyonik Alkalın Fosfataz (<i>Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase</i> , SEAP) Bildirici (<i>Reporter</i>) Aktivite Analizi	81
3.12. İstatistiksel Analiz	82
4. BULGULAR	84
4.1. Bazal-benzeri ve Lüminal Meme Kanseri Hücrelerinin Miyeloid Hücre Farklılaşmasına Etkisi	84
4.1.1. Farklı Miyeloid Hücre Hatlarının Model Olarak Sınanması	84
4.1.2. Farklı Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücre Hatlarının THP-1 ve U937 Hücrelerinin Monositik Karakteri Üzerine Etkisi	91
a. Monosit Seri Belirteçlerinin Analizi	89
4.2. Bazal-benzeri ve Lüminal Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörlerin Miyeloid Hücre Hatlarının Fenotipine ve Fonksiyonlarına Etkisi	94
4.2.1. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantların Miyeloid Hücrelerde Oluşturduğu İmmünofenotipik Değişimler	94
4.2.2. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerin CD4 ⁺ T Hücrelere Kostimülasyon Sağlama Kapasiteleri	97
4.2.3. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerin Kemotaksis Yeteneğinin Analizi	101
4.2.4. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerde Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Üretim Düzeylerinin Değerlendirilmesi	102

4.2.5. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerin Fagositoz Yeteneğinin Değerlendirilmesi	104
4.2.6. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerde STAT3 Yolak Aktivasyonunun Araştırılması	106
4.2.7. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerde İntegrin Ailesi Adezyon Moleküllerine Ait Gen İfadesinin Analizi	106
4.3. Bazal-benzeri ve Lüminal Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörlerin Miyeloid Hücreler Üzerindeki Etkisinin Periferik Kan Monositleri ile Doğrulanması	111
4.3.1. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantların Monositlerde Oluşturduğu İmmünofenotipik Değişimler	111
4.3.2. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Monositlerin CD4 ⁺ T Hücrelere Kostimülasyon Sağlama Kapasiteleri	114
4.3.3. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Monositlerin Kemotaksis Yeteneğinin Analizi	117
4.3.4. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Monositlerde Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Üretim Düzeylerinin Değerlendirilmesi	120
4.3.5. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Monositlerin Fagositoz Yeteneğinin Değerlendirilmesi	121
4.4. Meme Kanseri Hücrelerinde Fibronektin Üretiminin Araştırılması	123
4.4.1. Bazal-benzeri, Lüminal ve HER2-pozitif Meme Kanseri Hücrelerinde Fibronektin Düzeyinin Belirlenmesi	123
4.4.2. Pro-inflamatuvar Sitokin Uyarımının Meme Kanseri Hücre Hatlarında Fibronektin Üretimine Etkisi	125
4.5. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörlerin Miyeloid Hücrelerde İL-1 β , TLR4, MD2 ve Elastaz-2 Moleküllerine Etkisi	130

4.5.1. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerde İL-1 β Üretiminin Değerlendirilmesi	131
4.5.2. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerde TLR4 ve MD2 Düzeylerinin Analizi	133
4.5.3. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerde Elastaz-2 Üretiminin Değerlendirilmesi	135
4.6. Meme Kanseri Hücrelerinden Üretilen FN-EDA Proteininin TLR4 Ligandı Olarak Aktivitesinin Değerlendirilmesi	136
4.7. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Üretilen Faktörlerin ve FN-EDA'nın Monositik Hücrelerin İnflamatuvar Kapasitesi Üzerine Etkisi	139
4.8. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinin Etkisi Altındaki Miyeloid Hücrelerde STAT3 Aktivitesinin İncelenmesi	145
4.8.1. STAT3 Aktivitesinin Küçük İnhibitör Molekül <i>Stattic</i> ile Engellenmesi	145
4.8.2. STAT3DN/THP-1 ve shSTAT3/THP-1 Hücreleri ile Analizler	148
4.9. STAT3 İnhibisyonunun Miyeloid Hücrelerin Pro-inflamatuvar Karakterine Etkisi	151
4.9.1. STAT3 İnhibisyonunun Miyeloid Hücrelerde İL-1 β Üretimine Etkisi	151
4.9.2. STAT3 İnhibisyonunun Miyeloid Hücrelerde TLR4 ve MD2 İfadesine Etkisi	155
4.9.3. STAT3 İnhibisyonunun Miyeloid Hücrelerde Elastaz-2 Üretimine Etkisi	159
4.10. STAT3 İnhibisyonunun Rekombinant Fibronektin Proteinleri Varlığında Monositlerde İL-1 β Üretimine Etkisi	162
4.11. Rekombinant Fibronektin Proteinleri Varlığında Monositlerde STAT3 İnhibisyonunun NF- κ B Aktivitesi Üzerine Etkisi	166

5. TARTIŞMA	168
5.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan <i>in vitro</i> Deney Modellerinin Değerlendirilmesi	169
5.2. Meme Kanseri Hücreleri Tarafından Miyeloid Hücrelerde STAT3 Aktivitesinin Uyarılması	180
5.3. Fibronektinin Meme Kanseri Mikroçevresindeki Miyeloid Hücreler Üzerine Etkisi	187
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	194
7. KAYNAKLAR	198
8. EKLER	
EK 1. Tez Çalışması ile ilgili etik kurul izni	
EK 2. Tez çalışması orijinallik raporu	
EK 3. Dijital Makbuz	
EK 4. Tez datasının içeren bilimsel toplantılar ve projeler	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

AP-1	Aktivatör Protein-1
Arg-1	Arginaz-1
BBMK	Bazal-benzeri Meme Kanseri
COX2	Siklooksijenaz 2
CTLA-4	Sitotoksik T Lenfosit ile İlişkili Antijen 4
DCIS	Duktal Karsinoma <i>In Situ</i>
EDA	Ekstra Domain A
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
ER	Östrojen Reseptörü
FAK	Fokal Adezyon Kinaz
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FN	Fibronektin
FN-EDA	EDA İçeren Fibronektin
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HIF	Hipoksi ile İndüklenebilen Faktör
IRF	İnterferon Düzenleyici Faktör
İFN	İnterferon
İL	İnterlökin
JAK	Janus Kinaz
JNK1/2	c-Jun N-terminal Kinaz 1/2
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
M-CSF	Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MD2	Miyeloid Farklılaşma Faktörü
MDSC	Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücre

MHC-II	Majör Doku Uygunluk Antijeni II
MMP	Matriks Metalloproteaz
MRC-1	Mannoz Reseptör C tip 1
MyD88	Miyeloid Farklılaşma Primer Yanıt Proteini 88
NF-κB	Nükleer Faktör- <i>Kappa</i> B
NK hücresi	Doğal Öldürücü Hücre
NLRP	NOD-like Reseptör Protein
NO	Nitrik Oksit
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PDL-1	Programlanmış Ölüm Ligandı 1
pFN	Plazma FN
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Fosfatidilinozitol 3 Kinaz
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4, 5-Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Birim α
PMA	Forbol Miristat Asetat
PMN	Polimorfonükleer Lökosit
PR	Progesteron Reseptörü
p-STAT3	Fosforile STAT3
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
RISC	RNA ile İndüklenen Susturma Kompleksi
ROT	Reaktif Oksijen Türü
SH2	Src Homoloji 2 Domaini
shSTAT3	<i>Short Hairpin</i> STAT3
STAT3	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
STAT3DN	Dominant Negatif STAT3
TAM	Tümör ile İlişkili Makrofaj
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü
Th1/2	Yardımcı T hücre 1/2
TLR4	<i>Toll</i> -benzeri reseptör 4
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör-alfa

TP53	Tümör Protein 53
Treg	Regülatuvar T Hücre
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
1.1.	Tez çalışması kapsamında ortaya çıkarılması hedeflenen mekanizmanın şematik gösterimi.	2
2.1.	Meme kanserlerinin moleküler alt-tipleri ve özellikleri.	6
2.2.	Meme kanseri gelişiminde rol oynayan TAM aracılı mekanizmalar.	12
2.3.	Doku makrofajları.	15
2.4.	Makrofajların farklılaşması ve alt-grupları.	18
2.5.	STAT ailesi üyeleri ve aktivasyonları.	21
2.6.	STAT3 aktivasyonu ve kanser gelişimi üzerine etkileri.	22
2.7.	İnsanda fonksiyonel olarak bulunan toll-benzeri reseptörlerin hücredeki lokalizasyonları, ligandları ve aktivasyon şekilleri.	26
2.8.	İnflamazom aktivasyonu ve İL-1 β üretimi.	28
2.9.	HücreSEL fibronektin protein yapısının, etkileşim ve integrin bağlanma bölgelerinin şematik olarak gösterimi	31
2.10.	HücreSEL fibronektinin sağlıklı hücre ve tümör hücresi üzerindeki etkileri.	36
3.1.	Hücre sayımı için kullanılan Fuchs-Rosental hemositometresinin şematik görünümü.	48
3.2.	Akım sitometri ile hücrelerin tek tek ayrılma ve miyeloid hücre belirteçlerinin analiz stratejisi	53
3.3.	Periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu	55
3.4.	Periferik kandan polimorfonükleer (PMN) hücre izolasyonu	56
3.5.	İzolasyon sonrası polimorfonükleer lökositlerin (PMN) akım sitometri ile canlılık ve saflık analizi	57
3.6.	FACS ile CD4 ⁺ T hücrelerinin izolasyon stratejisi	58
3.7.	MACS sonrası CD14 ⁺ monositlerin akım sitometri ile saflık analizi	60
3.8.	Spektrofotometrik protein ölçümlerinde, protein konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanılan örnek standart eğri grafiği.	64
3.9.	Protein belirteci	65
3.10.	100 bç DNA belirteci, 50 bç DNA belirteci	74
3.11.	Fibronektin ELISA analizine ait spektrofotometrik ölçümlerde, protein konsantrasyonlarının hesaplanması için "4-Parameter" algoritmasına göre oluşturulan standart eğri grafiği.	76

3.12.	İL-1 β ELISA analizine ait spektrofotometrik ölçümlerde, protein konsantrasyonlarının hesaplanması için “ <i>Linear</i> ” algoritmasına göre oluşturulan standart eğri grafiği.	78
3.13.	Elastaz-2 ELISA analizine ait spektrofotometrik ölçümlerde, protein konsantrasyonlarının hesaplanması için “ <i>4-Parameter</i> ” algoritmasına göre oluşturulan standart eğri grafiği.	80
3.14.	Tez çalışması kapsamında planlanan iş akış şeması	83
4.1.	Bazal-benzeri (MDA-MB-231) ve lüminal (MCF-7) meme kanseri hücre hatları ile 1:1 oranında 48 saat boyunca ko-kültürü yapılan miyeloid hücrelerin akım sitometri analizi sonrası yüzey belirteçlerinde meydana gelen değişim.	89
4.2.	Bazal-benzeri meme kanseri hücre hatları ile 1:1 oranında 48 saat boyunca ko-kültürü yapılan THP-1 ve U937 hücrelerinde monositik hücre belirteçlerinin akım sitometri ile analizi.	93
4.3.	Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca kültürü yapılan miyeloid hücre hatlarında monositik hücre belirteçlerinin akım sitometri ile analizi	96
4.4.	Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile muamele edilen miyeloid hücre hatlarının 96 saat sonunda CD4 ⁺ T hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesinin akım sitometri ile analizi	100
4.5.	Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının THP-1 hücrelerinin kemotaksis kapasitesine etkisi.	102
4.6.	Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının miyeloid hücrelerde ROT üretimine etkisi.	104
4.7.	Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının miyeloid hücrelerin fagositoz kapasitesine etkisi.	105
4.8.	Meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca kültürü yapılan miyeloid hücrelerde total STAT3 ve p-STAT3 protein düzeylerinin Western-Blot ile analizi.	107
4.9.	Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 1.5, 6 ve 24 saat (sa.) boyunca inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerinde STAT3 gen ifadesinin gerçek-zamanlı RT-PZR ile değerlendirilmesi.	108
4.10.	Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat (sa.) boyunca kültürü yapılan THP-1 ve U937 hücrelerindeki fibronektin reseptörlerinin mRNA düzeylerinde meydana gelen değişimler.	110
4.11.	Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca kültürü yapılan monositlerde hücre yüzey belirteçlerinin akım sitometri ile analizi.	114

- 4.12.** Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile muamele edilen monositlerin 96 saat sonunda CD4⁺ T hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesinin akım sitometri ile analizi 116
- 4.13.** Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının monositlerin kemotaksis kapasitesine etkisi. 119
- 4.14.** Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının monositlerde ROT üretimine etkisi. 121
- 4.15.** Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının monositlerin fagositoz kapasitesine etkisi. 122
- 4.16.** Bazal-benzeri, lüminal ve HER2-pozitif meme kanseri hücre hatlarında fibronektin (FN) gen ve protein ifadesinin analizi. Farklı meme kanseri alt-tiplerini temsil eden hücre hatlarında FN gen ifadesinin RT-PZR jel görüntüsü ve FN ve FN-EDA izoformunun protein ifadesini gösteren Western-Blot görüntüsü. Meme kanseri hücre hattı lizatlarında 100 µg total proteinde bulunan FN miktarını gösteren ELISA analizi 124
- 4.17.** Pro-inflamatuvar sitokinler ile 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca uyarılan bazal-benzeri, lüminal ve HER2-pozitif meme kanseri hücre hatlarında FN gen ifadesinin ve hücre-içi protein düzeylerinin analizi 127
- 4.18.** İL-1β, İL-6, TNF-α ve İFN-γ pro-inflamatuvar sitokinleri ile 2xED₅₀ konsantrasyonda 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca uyarılan bazal-benzeri, lüminal ve HER2-pozitif meme kanseri hücre hatlarından toplanan süpernatantlardaki FN düzeyleri ELISA ile değerlendirildi. 128
- 4.19.** İL-1β ile 40U (2xED₅₀) konsantrasyonda 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca uyarılan bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarında FN-EDA transkript varyantlarının (V1, V3 ve V4) RT-PZR jel görüntüsü ve bu hücrelerden salgılanan total FN ve FN-EDA izoformunun protein ifadesini gösteren Western-Blot görüntüsü. 130
- 4.20.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının miyeloid hücrelerde İL-1β gen ifadesine ve salgılanan protein düzeyine etkisi. 132
- 4.21.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının miyeloid hücrelerde TLR4 reseptör bileşenlerinin düzeyine etkisi. 134
- 4.22.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının miyeloid hücrelerde elastaz-2 gen ifadesine ve salgılanan protein düzeyine etkisi. 136
- 4.23.** THP-1, monosit ve PMN granüositlerden salgılanan elastaz-2 düzeyleri ve bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca yapılan inkübasyonların elastaz-2 salımına etkisi. 137

- 4.24.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarından salgılanan FN-EDA proteininin TLR4 ve NF- κ B aktivitesi üzerine etkisi. 139
- 4.25.** FN-EDA proteini ile uyarılan monositik hücrelerin NF- κ B aktivitesi üzerine etkisini gösteren bildirici deney analizi. 141
- 4.26.** İL-1 β 'nin NF- κ B aktivitesi üzerine etkisi. 142
- 4.27.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ve/veya rekombinant FN proteinleri ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca inkübe edilen monositlerden İL-1 β salımının ELISA ile analizi. 144
- 4.28.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile uyarılan miyeloid hücrelerde küçük inhibitör molekül *Stattic*'in STAT3 aktivasyonu ve gen ifadesine etkisi. 147
- 4.29.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile inkübe edilen genetik olarak modifiye edilmiş THP-1 hücrelerinde STAT3 protein ve gen ifadesindeki değişimler. 150
- 4.30.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile uyarılan miyeloid hücrelerde STAT3 inhibisyonunun İL-1 β gen ifadesine ve salgılanan protein düzeyine etkisi. 152
- 4.31.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile inkübe edilen genetik olarak modifiye edilmiş THP-1 hücrelerinde İL-1 β gen ifadesindeki ve serbestlenen protein düzeyindeki değişimler. 154
- 4.32.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile uyarılan miyeloid hücrelerde STAT3 inhibisyonunun TLR4 ve MD2 ifadesine etkisi. 157
- 4.33.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile inkübe edilen genetik olarak modifiye edilmiş THP-1 hücrelerinde TLR4 gen ifadesindeki değişimler. 158
- 4.34.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile uyarılan miyeloid hücrelerde STAT3 inhibisyonunun elastaz-2 gen ifadesine ve salgılanan protein düzeyine etkisi. 160
- 4.35.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile inkübe edilen genetik olarak modifiye edilmiş THP-1 hücrelerinde elastaz-2 gen ifadesindeki ve serbestlenen protein düzeyindeki değişimler. 162
- 4.36.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ve/veya rekombinant FN proteinleri ile inkübe edilen monositlerde STAT3 inhibisyonunun İL-1 β salımına etkisi. 164
- 4.37.** Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ve/veya rekombinant FN proteinleri ile inkübe edilen monositlerde STAT3 inhibisyonunun NF- κ B aktivitesi üzerine etkisi. 167

- 5.1.** Tez çalışması kapsamında, elde edilen veriler doğrultusunda ortaya çıkan pozitif geri-besleme mekanizmanın şematik gösterimi.

191



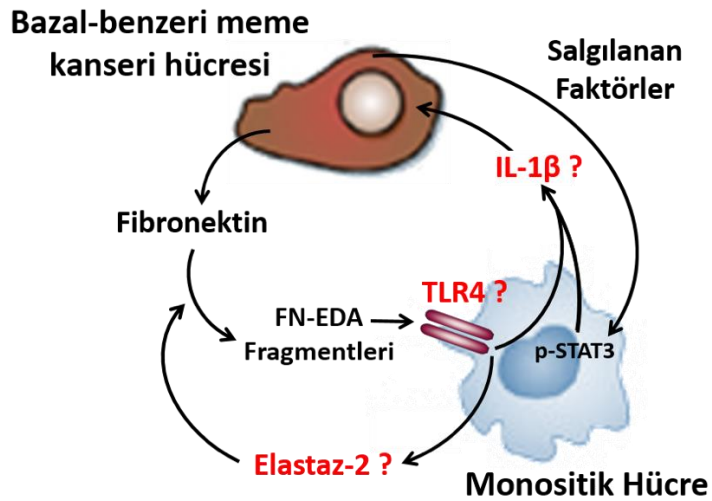
TABLolar

Tablo		Sayfa
3.1.	Tez çalışmasında kullanılan meme kanseri hücre hatları.	45
3.2.	Tez çalışmasında kullanılan miyeloid hücre hatları.	45
3.3.	Akım sitometri analizlerinde kullanılan antikorlar.	52
3.4.	Western Blot analizlerinde kullanılan primer antikorlar.	67
3.5.	Western Blot analizlerinde kullanılan sekonder antikorlar.	67
3.6.	PZR analizlerinde kullanılan primerler ve bağlanma ısıları.	71
3.7.	Standart PZR bileşen miktarları ve final konsantrasyonları.	72
3.8.	Gerçek-zamanlı PZR bileşen miktarları ve final konsantrasyonları.	72
3.9.	Standart PZR reaksiyon koşulları.	73
3.10.	Gerçek-zamanlı PZR reaksiyon koşulları.	73
4.1.	Ko-kültürü yapılan miyeloid hücrelere ait canlılık analizi sonuçları.	85
5.1.	Meme kanseri hücre hatlarında STAT3 aktivatörlerinin gen ifadesi.	181

1. GİRİŞ

Meme kanseri hem hücreSEL hem de moleküler düzeyde heterojenlik gösterir. Bu kanser türü tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan östrojen reseptörü (*estrogen receptor*, ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) ifadesine göre karakterize edilir (1, 2). Bazal-benzeri meme kanseri (BBMK) en agresif meme kanseri alt-tipidir ve bu reseptörlerin hiçbirini belirgin düzeyde ifade etmez (3). Bu kanser hücrelerinin ürettiği faktörler tümör mikroçevresinde bulunan, miyeloid hücreler dahil tüm hücreleri fenotipik ve fonksiyonel açıdan etkiler (4). Tümör dokusunu oluşturan hücre-dışı matriks bileşenleri, özellikle fibronektin, miyeloid hücrelerin dokuya yerleşimine ve farklılaşmasına katkıda bulunur (5). Tümör mikroçevresinde farklılaşan miyeloid hücreler genellikle immün baskılayıcı karakter kazanır. Tümör dokusunda baskın olarak bulunan tümör-ilişkili makrofajlarda (*tumor-associated macrophages*, TAM) immün baskılayıcı karakterin ortaya çıkması sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3) transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ile yakından ilişkilidir (6). STAT3 aktivitesi yüksek olan TAM'lar tarafından üretilen sitokinler kanserin ilerlemesine neden olan inflamatuvar mikroçevrenin oluşumunda rol oynar (7). Tümör dokusunda farklı özgülüklere sahip pek çok proteolitik enzimin varlığı tespit edilmiştir. Örneğin, elastaz gibi enzimler fibronektini (FN) özgül bölgelerinden keserek ekstra domain A (EDA) içeren fibronektin (FN-EDA) parçalarının oluşumuna katkı sağlar (8). FN-EDA parçalarının miyeloid hücrelerde yaygın olarak bulunan *toll*-benzeri reseptör 4'ü (*toll-like receptor 4*, TLR4) uyarabildiğine dair yayınlar mevcuttur (9). TLR4 uyarımı ise başlıca transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör- κ B (NF- κ B) aracılığı ile pro-inflamatuvar sitokin üretimini güçlendirir (10).

Bu tez çalışması, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden üretilen faktörlerin miyeloid hücrelerdeki STAT3 aktivitesini ve tümör mikroçevresindeki inflamatuvar karakterde önemli rol oynayan interlökin-1 β (İL-1 β) üretimini düzenlediği ve fibronektin/FN-EDA, elastaz ve TLR4 ekseninin meme kanserinde inflamasyonun devamlılığını sağladığı hipotezine dayanmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Tez çalışması kapsamında ortaya çıkarılması hedeflenen mekanizmanın şematik gösterimi. (FN-EDA Fragment, EDA içeren fibronektin fragmenti; p-STAT3, fosforile STAT3)

Gerçekleştirilen bu çalışmada, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin miyeloid hücrelerde fenotipik ve fonksiyonel olgunlaşmayı ve farklılaşmayı uyarabileceğini gösterdik. Kemotaksis kapasitesi artan miyeloid hücrelerde bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin STAT3 aktivitesini artırdığı belirlendi. Yüksek STAT3 aktivitesine sahip miyeloid hücrelerde İL-1β salım kapasitesinin arttığı tespit edildi. İL-1β ile uyarılan bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinde fibronektin ve FN-EDA izoformunun arttığı gözlemlendi. FN-EDA konsantrasyonu arttırılan bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının monositlerden İL-1β üretimini etkili bir şekilde artırdığı görüldü. Aynı zamanda FN-EDA konsantrasyonu yüksek olan bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresinde kanser hücrelerinden ve monositlerden salgılanan faktörlerin NF-κB aktivitesini etkili bir şekilde uyarabileceği gösterildi. İL-1β üretimi ve NF-κB aktivitesi üzerindeki etkinin STAT3 aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleştiği belirlendi. FN-EDA varlığında THP-1 hücre süpernatantlarının ve yüksek düzeyde elastaz-2 içeren PMN lökosit süpernatantlarının TLR4 ve NF-κB aktivitesini uyarmadığı görüldü.

Sonuç olarak, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörler monositlerde STAT3 aktivasyonunu artırarak inflamasyonu düzenleyici karakter kazanmasını sağlayabilir. Yüksek STAT3 aktivitesine sahip monositler İL-1 β düzeylerinin atmasına yol açarak bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden fibronektin, dolayısı ile FN-EDA, üretimini destekleyebilir. Böylece bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresinde FN-EDA konsantrasyonunun artışı monositlerden daha fazla İL-1 β üretilmesini sağlayabilecektir. Ayrıca, FN-EDA düzeyi artan mikroçevrede bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden ve monositlerden salgılanan faktörlerin otokrin ve parakrin şekilde NF- κ B aktivitesini uyararak İL-1 β artışının daha fazla desteklenmesine neden olabilir. Bu şekilde bazal-benzeri meme kanseri ve monositler arasında tümör mikroçevresindeki kronik inflamasyonu destekleyen, STAT3/İL-1 β /fibronektin molekülleri aracılığı ile pozitif bir geri-besleme mekanizmasının olabileceği yönünde bilgilere ulaşılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri kadınlarda yaygın olarak görülen sağlık problemlerinin başında gelmektedir. Ülkemizde ve diğer ülkelerdeki kadınlarda tanısı konan bütün kanserler içinde %23-30'lük oranla ilk sırada yer alır. Bu kanser türü kanser ile ilişkili ölümlerde akciğer kanserinden sonra kadınlarda (%14) ikinci sırada yer almaktadır (1, 11, 12). Meme kanseri, farklı morfoloji, biyolojik davranış ve klinik etkilerle karakterize edilmiştir; genetik ve moleküler olarak heterojenlik gösterir (3). Meme tümörlerindeki bu heterojenlik meme dokusunu oluşturan farklı hücre gruplarından meydana gelen neoplastik oluşumlardan kaynaklanmaktadır (1).

Meme dokusu süt üretmek ve salgılamak için özelleşmiş bir glandular yapıdır. Meme dokusunun embriyonik gelişimi tek tabakalı ektodermin genişleyip meme hattını oluşturmasıyla başlar. Bu yapı gelişimini doğumdan sonra tamamlar ve ergenlik dönemine kadar işlevsel değildir. Dışinin ergenliğe ulaşması ile beraber salgılanan hormonlar ve diğer faktörlerin kontrolü altında memenin duktal epiteli meme yağ dokusuna invaze olur. Çift katmanlı duktal yapı bazal tarafında kontraktil miyoepitelyal hücrelerin çevrelediği lüminal epitelyal hücrelerden oluşur. Meme epiteli her menstrual döngüde proliferer olur ve daha sonra apoptoza uğrar. Ancak, hamilelik sırasında, lüminal epitelde bulunan alveolar hücreler hormonların etkisiyle hızlı bir şekilde çoğalır ve süt üretebilen sekretuar alveoller meydana gelir. Laktasyon sırasında süt bu alveoller aracılığı ile duktal kanala salgılanır. Emzirme sürecinin sona ermesi ile, genişlemiş epitel hücreleri apoptoza uğrar. Meme bezi yeniden yapılandırılarak dinlenme fazına geri döner. Meme epiteli, menstrual döngü ile uyarılan hormonal değişimler ile ilişkili olarak meydana gelen periyodik genişlemeler, hamilelik sırasında meydana gelen değişimler, laktasyon ve involüsyon gibi aşamalar sırasında yapısal ve fonksiyonel olarak birçok kez değişime uğrar. Bu değişimler epitelyal hücrelerin transformasyonunu kolaylaştırabilmektedir. Bu nedenle, meme tümörleri genellikle epitelyal kökenlidir (13).

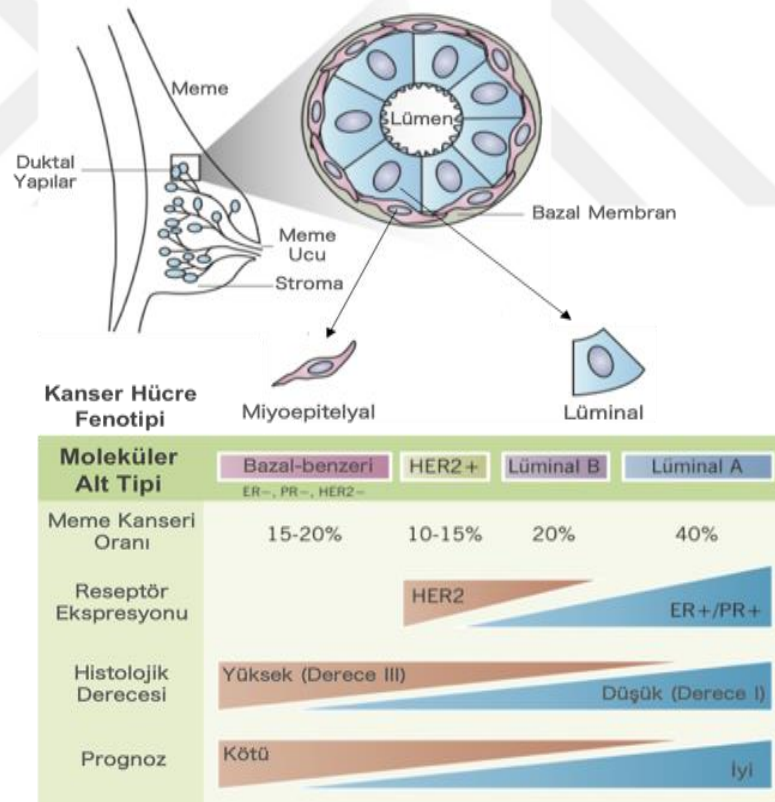
Kanser gelişimi uzun bir süreçtir ve çok sayıda moleküler değişim gerektirmektedir. Meme kanserinin klonal evrimi, normal epitel hücreden başlayıp metastatik kanserle sonlanır. Bu süreçte, genetik ve epigenetik birçok moleküler değişim ve fenotipik karakteri değişen birçok hücre popülasyonunun ortaya çıkması söz konusudur. Ortaya çıkan kanser hücrelerinin klonal büyümesi ve dokuda bulunan diğer hücreler ile moleküler ve hücresel düzeyde etkileşimleri karmaşık bir yapının oluşmasına neden olur. Meme kanseri gelişimi, atipik duktal hiperplaziden başlayarak duktal karsinoma *in situ* (*ductal carcinoma in situ*, DCIS) ve bu lezyonların evrimi ile invazif meme kanseri oluşumuna kadar aşamalı olarak ilerlemektedir (1).

İnvazif meme kanserleri histopatolojik olarak ve gen ifadesi analizlerine göre alt-tiplere ayrılmıştır (1, 2). Her alt-tip farklı biyolojik karakterlere ve davranışlara sahiptir (2). Meme kanseri alt-tiplerinin belirlenmesinde yüksek düzeyde ifade edilen hormon reseptörleri (ER ve PR) ve HER2 gibi özgül belirteçler kullanılmaktadır. Bu reseptörlerin varlığına göre meme kanserleri lüminal, HER2-pozitif ve bazal-benzeri olarak üç ana alt-grup altında sınıflandırılmaktadır (2).

2.1.1. Meme Kanserinin Alt-tipleri

Lüminal Meme Kanseri: Östrojen ve progesteron reseptörlerini yüksek düzeyde barındıran ve en yaygın görülen meme kanseri alt-tipidir (14). Bu reseptörlerden özellikle ER meme kanseri sınıflandırılmasında en önemli ve belirleyici bir biyobelirteçtir. Östrojen meme kanseri hücrelerine çoğalma sinyalleri sağlayarak bu hücrelerin büyümesini uyarmakta ve transformasyonunu kolaylaştırmaktadır (3). Progesteron ise potansiyel kanser hücrelerinin sayısında artışa neden olarak mutasyonlara yatkınlığı sağlamaktadır (15). Meme kanserlerinin yaklaşık %75'i ER pozitifdir (3). ER⁺ meme kanserlerinin çoğunluğunda PR pozitifliği görülmektedir. Bu kanser alt-tipi HER2 düzeyine göre iki gruba ayrılmaktadır. ER⁺/PR⁺/HER2⁻ fenotipe sahip meme kanserleri lüminal-A olarak sınıflandırılmaktadır (1, 3). Lüminal-A fenotipi invazif meme kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturur (Şekil 2.1). Sıklıkla, fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim α (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit α* , PIK3CA) ve

GATA bağlanma proteini 3 (GATA3) mutasyonlarını da taşırlar (2). Yüksek düzeyde farklılaşmış tümör hücreleri içermesinden dolayı en iyi prognoza sahip meme kanseri alt-tipidir. Hormonal tedavilere iyi yanıt verirler ve mortalite oranları düşüktür (3). ER⁺/PR⁺/HER2⁺ fenotipine sahip diğer grup lüminal-B olarak sınıflandırılmaktadır (1, 3). Lüminal B fenotipi invazif meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur (Şekil 2.1). Tümör protein (TP) 53, PIK3CA mutasyonları ve siklin D1 amplifikasyonlarını da taşıyabilirler. Lüminal-B tümörleri lüminal-A'ya göre daha az farklılaşmıştır (2). Bu tümörlerdeki HER2 pozitifliği hormonal tedavilerde dirence yol açabilmektedir (3). Bu nedenle, lüminal-B alt-tipi lüminal-A'ye göre daha kötü prognoza sahiptir (1). Lüminal meme kanserleri diğer meme kanseri alt-tipleri ile kıyaslandığında immün infiltrasyon düzeyi oldukça düşüktür (Solinas, 2017 14).



Şekil 2.1. Meme kanserlerinin moleküler alt-tipleri ve özellikleri. (Wong, 2012'den (16) uyarlanmıştır.)

HER2-pozitif Meme Kanseri: HER2 reseptörü PI3K/Akt/mTOR ve Ras/MAPK gibi farklı sinyal yolları aracılığı ile hücre proliferasyonunu ve sağ kalımı düzenleyen tirozin kinaz özelliğine sahip epidermal büyüme faktörü reseptörleri (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) ailesinin bir üyesidir (2). HER2, meme kanseri ve diğer kanser türlerinde bu genin amplifikasyonu ve proteinin yüksek düzeyde ifadesinden dolayı bir onkogen olarak davranmaktadır (1). HER2-pozitif kanserlerinden ER⁺/PR⁺/HER2⁺ fenotipine sahip lüminal-B alt tipi dışında hormon reseptörü bulunmayan ER⁻/PR⁻/HER2⁺ fenotipine sahip diğer bir alt-tip daha bulunmaktadır (1). Bu fenotipe sahip meme tümörleri invazif meme kanserlerinin yaklaşık %10-15'ini oluşturur (16) (Şekil 2.1). Lüminal-B'ye benzer şekilde TP53, PIK3CA mutasyonları ve siklin D1 amplifikasyonları da içermektedir (2). ER⁻/PR⁻/HER2⁺ tümörlerinin farklılaşma düzeyi düşüktür ve genellikle kötü prognoz gösterir (3). Bu alt-tipdeki tümörlerde immün infiltrasyon düzeyi lüminal meme kanserlerine göre yüksektir (14).

Bazal-benzeri Meme Kanseri (BBMK): BBMK meme dokusunda bulunan miyoepitelyal hücrelerden köken alır (15). Miyoepitelyal hücreler, lüminal epitelyal hücreler ile stroma arasında bulunur. Bu hücreler hemidesmozomlar aracılığıyla bazal membran ile, desmozomlar aracılığı ile de lüminal epitelyal hücrelerle etkileşir. Duktal yapıda bulunan miyoepitelyal hücreler iğsi yapıda olup duktal eksen boyunca paralel ve devamlı bir tabaka oluşturur. Miyoepitelyal hücreler çeşitli sitokeratinleri (sitokeratin-5, -14 ve -17) ifade ederek komşu hücreler ve bazal membran ile etkileşimi sağlar. Ek olarak, bu hücreler fibronektin, kollajen ve laminin gibi hücre-dışı matriks bileşenleri üreterek bazal membranın oluşumuna önemli katkı sağlar. DCIS lezyonlarından izole edilen miyoepitelyal hücrelerin belirgin düzeyde değişime uğradığı ve çok sayıda sitokin (İL-6, TNF- α) ve tümörü destekleyen molekül (kollajen, *tissue inhibitor of matriks metalloproteaz 3* (TIMP3), katepsin K, CXCL12, CXCL14, trombospondin 2) ürettiği belirlenmiştir. Bu faktörler bazal membranın normal bir şekilde üretimini ve fonksiyon göstermesini engeller (17; 18). Bu hücrelerden köken alan BBMK hücrelerinde ER, PR ve HER2 ifadesi görülmez. Bu nedenle üçlü negatif (*triple negative*) meme kanserleri olarak da

adlandırılmaktadırlar. BBMK invazif meme kanserlerinin yaklaşık %15-20'sini oluşturur (1, 16) (Şekil 2.1). TP53, PTEN, PIK3CA ve BRCA1 mutasyonları da yaygındır (15). BBMK hücreleri köken aldıkları miyoepitelyal hücreler gibi sitokeratin-5, -14 ve -17 üretirler. Bunlara ilaveten EGFR ifadesi de diğer alt-tiplere kıyasla yaygın olarak görülür (3). Bu kanser tipi farklılaşmış tümörler içermediğinden tüm meme kanserleri arasında en agresif olanı olarak nitelendirilmektedir. ER, PR ve HER2 taşımadıklarından hedefli tedavilere yanıt vermezler (3). Bu özelliğe sahip tümörler epitelyal-mezenkimal geçiş (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) belirteçlerinin (Slug, Snail-1 ve -2, Twist-1 ve fibronektin) yanı sıra, kök hücre ve tümör başlatıcı hücre belirteçlerini de yüksek düzeyde ifade ederler. Bu nedenle BBMK yüksek düzeyde mezenkimal özellik gösterir (1, 3). Bu durum primer tümörlerin metastatik özellik kazanmalarını hızlandırır ve agresifliği destekler. BBMK yüksek rekürrens ve düşük sağ kalım oranına sahiptir ve en kötü prognozlu meme kanseri olarak tanımlanır. (3, 18). Ayrıca, meme kanseri alt-tipleri içinde en yüksek lökosit infiltrasyonunu içerir (14). Aktif invazyon, metastaz ve immün sistemden kaçış özellikleri BBMK'nın gelişimini ve ilerleyişini desteklemektedir (3).

Bu alt-tipler dışında daha az sıklıkta görülen normal-benzeri ve düşük *claudin* düzeylerine sahip (*claudin-low*) meme kanseri alt-tipleri de bulunmaktadır.

Claudinler hücreler arasındaki sıkı bağlanma bölgelerinde bulunan protein ailesidir. Bu protein ailesinin en az 27 üyesi bulunmaktadır (19). *Claudinler* epitel hücreler arasında iyonların ve küçük moleküllerin geçişini kontrol eden bir bariyer görevi görürler. Kanserin EMT aşamasında hücre-hücre etkileşimlerini sağlayan bu yapıların düzeyi azalır ve kanser hücresi motil hale gelir. Bu nedenle *claudin* proteinlerinin ifade düzeyinin azalması özellikle metastaz aşamasında görülür (20). Meme kanserinde düşük düzeyde bulunan *claudin-3, -4 -7* proteinlerini taşıyan hücreler ayrı bir alt-tip olarak değerlendirilmiştir. Bu alt-tip ayrıca ER, PR ve HER2 reseptörlerini de içermeyip bazal-benzeri meme kanseri ile benzer özellikler gösterir (21, 22). Düşük *claudin* düzeylerine sahip bu alt-tip invazif meme kanserlerinin yaklaşık %10'unu oluşturur. Bazal-benzeri meme kanseri ile benzer şekilde bu alt-tip de kötü prognoz gösterir ve sağkalım oranları düşüktür (1).

Normal-benzeri meme kanseri, gen ifadesi analizlerinde normal meme epiteli özelliği gösterir (1). Ancak, ER⁺/PR⁺/HER2⁻ fenotipine sahip olmasından dolayı lüminal A meme kanseri alt-tipine benzer. Normal-benzeri meme kanseri alt-tipi invazif meme kanserlerinin yaklaşık %8'ini oluşturur. Bu alt-tip normalde iyi prognoz göstermesine rağmen lüminal A alt-tipi ile karşılaştırıldığında daha kötü prognoza sahiptir (23).

2.1.2. Meme Kanserinin İnflamatuvar Mikroçevresi

Kronik inflamasyon diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanserinde de neoplastik hücrelerin tümör oluşumunu destekleyecek uygun mikroçevrelerde gelişmesini sağlar. Meme kanseri mikroçevresinin hücre çeşitliliği yüksektir; epitelyal hücrelerin yanı sıra endotelyal hücreler, adipositler, fibroblastlar ve yüksek miktarda immün hücre içerir (24). İmmün sistem malign hücrelerin immün gözetimi ve yok edilmesinden sorumludur (25, 26). Tümöre infiltre olan lökositler ER⁻, ER⁺ ve HER2⁺ meme kanseri alt-tiplerine karşı uygulanan tedavilerin başarısına destek olurken, tümör gelişimini ve metastazı da kolaylaştırmaktadırlar (27, 28). Aktive olmuş sitotoksik T lenfositleri tarafından yürütülen anti-tümör hücre immün yanıtlar neoplastik hücreleri yok eder ve tümör oluşumunu engeller (29). Tümör hücrelerinin immün sistemden kaçtığı durumda ise, malin hücreler stromal doku ve hücre bileşenlerini hem oransal hem de fonksiyonel olarak değiştiren moleküller salgılar (30). Bu sinyaller, homeostatik koşullarda dokuya zarar veren inflamasyonu sınırlandıran ve immün baskılayıcı yanıtlar ile karakterize edilen "yara iyileşmesine benzer" bir durum oluşturur (31). Daha sonra, tümör hücreleri ve stromadaki lökositler arasındaki etkileşimler anti-inflamatuvar araçların dokuya birikimini sağlar (32). Miyeloid-kökenli baskılayıcı hücreler (*myeloid-derived suppressor cell*, MDSC) ve düzenleyici T hücreleri (*regulatory T cell*, Treg) gibi birçok immün baskılayıcı hücre tipi tanımlanmasına rağmen tümör-ilişkili makrofajlar (*tumor-associated macrophages*, TAM), meme tümörlerinde en yaygın bulunan hücre tipini oluşturur. TAM'lar kanser gelişimini destekleyici etkilere sahiptir (33, 34).

a. Meme Kanseri ve Makrofajlar

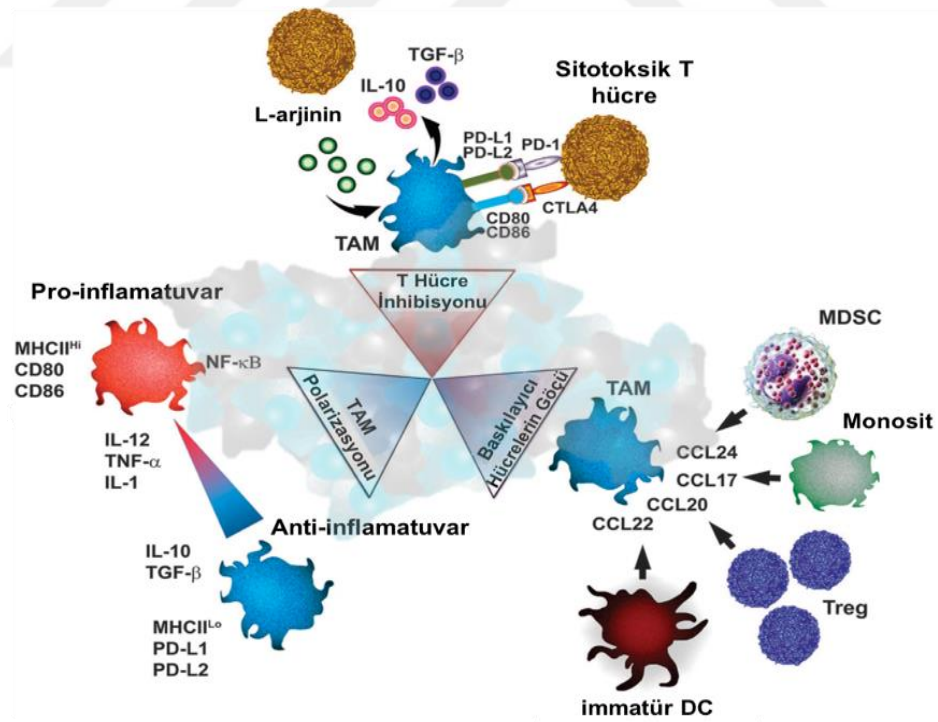
Makrofajlar vücutta fagositik kapasiteleri en yüksek hücreler olarak işlev görürler, organizma için tehlike oluşturma potansiyeline sahip hücreleri öldürüp ortamdaki uzaklaştırırlar. Bu hücreler vücuttaki ilk savunma hattını oluştururlar. Doğal ve edinsel immün sistem arasında köprü görevi görürler (24). Meme dokusunun gelişimi sırasında makrofajlar, doku modellenmesinde, bez yapısının dallanmasında ve morfogenezinde rol oynayan ve vasküler gelişimi düzenleyen duktal yapılarda toplanırlar. Makrofajlar, çeşitli proteazlar üreterek duktal yapıların dallanması sırasında hücre-dışı matriksin yeniden modellenmesini sağlar (35, 36). Doku makrofajları meme kök hücrelerinin canlılığının ve fonksiyonelliğinin devamını sağlar (37).

Meme tümörlerinin yok edilmesi için doğal ve edinsel immün sistem bileşenlerinin koordineli bir şekilde etkileşmesi gerekmektedir. Yüksek fagositoz kapasiteleri, güçlü sitokin ve kemokin üretimi ve edinsel immün yanıtları başlatmak için tümör antijenlerini sunma yeteneği ile donatılmış makrofajlar, anti-tümör immün yanıtları düzenlemek için son derece uygun hücrelerdir (24). Diğer taraftan, meme kanserinde de olduğu gibi immün uyarıcı sinyallerin sonlanmaması durumunda uzun süreli aktivasyon meydana gelir ve kronik inflamasyon gelişir. Kronik inflamasyon nedeniyle doku hasarını sınırlamak için sürekli olarak aktifleşen makrofajlar, pro-inflamatuvar yanıtları bastırma özellikleri ile karakterize edilen anti-inflamatuvar fenotipi benimserler (31). Bu nedenle, inflamasyonu sınırlayan doğal immün sistem mekanizmaları tümörde anjiyogenezi, büyümeyi ve metastatik yayılımı kolaylaştıran özellikleri TAM olarak bilinen makrofajlara kazandırmış olur.

İnsan meme tümörlerine infiltre olan monositler tümör hücrelerinden üretilen faktörler aracılığı ile TAM'lara farklılaşır. Meme kanseri mikroçevresindeki TAM'lar tümör hücrelerinin sağkalımını ve çoğalmasını destekler (38, 39). Makrofajlar, meme tümörlerinin periferinde yüksek sayıda bulunurken tümörün iç kısımlarına doğru sayılarında azalma görülür. Makrofajlar tümör kütlelerinde tek tek veya kümeler halinde bulunabilir; özellikle, kan damarlarına yakın bölgelerde bulunarak tümör hücrelerinin migrasyonunu etkilerler. (40). TAM'lar tarafından

üretilen proteolitik enzimler ve matriks metalloproteinazlar (MMP) bazal membranın degradasyonu ve hücre-dışı matriksin yeniden organizasyonunu sağlar (41). TAM'lar çeşitli faktörler (epidermal büyüme faktörü (*epidermal growth factor*, EGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), platelet-kökenli büyüme faktörü (*platelet-derived growth factor*, PDGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (*basic fibroblast growth factor*, bFGF), tümör nekroz faktörü (TNF)- α , transforme edici büyüme faktörü- β (*transforming growth factor* (TGF)- β), İL-8 ve İL-1 β , prostaglandin E2 (PGE2), timidin fosforilaz, CCL2 gibi) üreterek primer tümör mikroçevresine oksijen ve besin sağlamak amacıyla anjiyogenezi uyarır. Böylece kanser hücrelerinin yayılımı için gerekli vasküler yapının oluşması sağlanır (42, 43). Tümördeki bozuk damar yapısı nedeniyle yeterince oksijenlenemeyen tümör hücrelerinden üretilen hipoksi ile indüklenen transkripsiyon faktörleri de (*hypoxia-inducible factor* (HIF) 1 α ve HIF-2 α) makrofajların tümör dokusunda birikimine yol açar (44, 45). TAM'lardan salgılanan faktörler adezyon bölgelerindeki E-kaderin ve β -katenin düzeylerinin azalması ile EMT'yi tetikler (24). EMT meme kanseri hücrelerine mezankimal özellikler kazandıran bir dönüşüm sürecidir. Bu dönüşüm sonucunda hücreler kök hücre benzeri rejeneratif duruma geçerler. Kök hücre benzeri özelliklere sahip tümör hücreleri "kanser kök hücresi" olarak adlandırılır. Kanser kök hücreleri tümör oluşumunu ve ilerleyişini sağlayan hücrelerdir (24, 46). Makrofajlar temasa-bağımlı olarak meme kök hücrelerinin gelişimini destekleyen bir niş yaratır. Bu niş oluşumu EMT'yi artırır. TAM'lar ve kanser kök hücreleri arasındaki etkileşimler NF- κ B aktivasyonunu uyarır ve kanser kök hücresi fenotipinin devamlılığını sağlar (47). TAM'lar kanser kök hücresi ile ilişkili genlerin (Sox-2, Oct-4 ve Nanog) ifadesini artırarak kemoterapiye dirençte rol oynar (39). Tümör hücrelerinin dolaşıma geçişi ve meme kanserinin yaygın metastaz bölgeleri olan akciğere, beyine, karaciğere, kemiğe ve lenf düğümlerine yerleşmesine premetastatik niş hazırlayarak yardımcı olur (24, 48). Böylece dolaşımdaki tümör hücrelerinin metastaz yapılacak bölgelere toplanmasına ve yerleşmesine aracılık ederler. Metastaz odaklarının da burada gelişmesini sağlarlar.

Neoplastik oluşum sırasında TAM'lar reaktif oksijen türleri (*reactive oxygen species*, ROS) ve nitrojen türevleri üreterek DNA hasarına yol açarlar (30). Bu makrofajlar, transforme hücrelerin sağkalımında ve TNF- α , İL-6 ve İL-1 β gibi pro-inflamatuvar sitokinler salgılayarak inflamatuvar mikroçevrenin devamlılığını sağlamada belirleyici rol oynar (24, 43, 49). TAM'lar anti-inflamatuvar moleküller (İL-10, TGF- β , PGE2) üreterek efektör T hücrelerin ve doğal öldürücü (*natural killer*, NK) hücrelerin sitotoksik fonksiyonlarının baskılanmasını sağlar (50, 51). Bu nedenle, meme kanserindeki pro- ve anti-tümör immün yanıtlar arasındaki denge TAM'lardan önemli derecede etkilenmektedir. TAM'lar dışında tümör mikroçevresinde bulunan MDSC ve Treg hücreleri de İL-10, TGF- β ve PGE2 üreterek tümör hücrelerinin sağ kalımına ve immün baskılayıcı mikroçevrenin oluşumuna katkı sağlamaktadır. TAM'lar ayrıca çeşitli kemokinler (CCL17, CCL20, CCL22 ve CCL24) aracılığı ile sitotoksik T hücre yanıtlarını etkili bir şekilde baskılayan MDSC'lerin, Treg ve immatür dendritik hücrelerin tümör mikroçevresine göçünü de uyarır (24, 52) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Meme kanseri gelişiminde rol oynayan TAM aracılı mekanizmalar. (Williams, 2016'dan (24) uyarlanmıştır.)

Hipoksik tümör bölgelerindeki makrofajlar T hücre üzerindeki inhibitör reseptörlerin ifadesini düzenleyerek tümöre özgü T hücre yanıtlarını engeller (53). TAM'lar tarafından ifade edilen programlanmış ölüm ligandı 1 (*programmed death-ligand 1*, PDL-1) ve PDL-2 molekülleri ile aktif T hücreler üzerindeki PD-1 reseptörü etkileşir. Bu sayede, T hücreler apoptoza uğrar veya yanıt verme kapasitelerini azaltırlar (T hücre yorulması). Benzer şekilde, TAM'larda bulunan CD80 ve CD86 kostimülatör molekülerin aktif T hücreler üzerindeki sitotoksik T lenfosit ile ilişkili antijen 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4, CTLA-4) ile etkileşimi de sitotoksitenin inhibisyonu, hücre döngüsünün durması ve T hücre aktivasyonunun engellenmesi ile sonuçlanır. Tümör hücrelerine karşı aktifleşmiş T hücreler PD-1 ve CTLA-4 inhibitör reseptörleri taşıdığından dolayı TAM'lar edinsel immün yanıtları bu kontrol noktalarındaki düzenlenmeler ile baskılar (24) (Şekil 2.2). Diğer bir TAM aracılı T hücre inhibisyonu da L-arginin metabolizmasıdır. Tümör mikroçevresindeki İL-4, İL-10 ve İL-13, HIF-1 α ve laktik asit gibi hipoksik sinyallere yanıt olarak TAM'lar arginaz-1 (Arg-1) enzimi üretirler. Arg-1, L-arginini T hücrelerin etkileşemeyeceği bir forma dönüştür. L-arginin T hücrelerin proliferasyonu ve aktivasyonu için gerekli bir moleküldür. Böylece efektör T hücre yanıtları baskılanır ve tümör antijenlerine karşı yanıt oluşturamazlar (54, 55) (Şekil 2.2). Erken evre meme tümörlerindeki TAM'larda ve dolaşımdaki miyeloid hücrelerde Arg-1 artışı belirlenmiştir (56). Tümör mikroçevresinde bulunan lökositlerin yaklaşık %40'ını oluşturan TAM'lar İL-12'nin üretimini engeller (57, 58). Normal koşullarda makrofajlar tarafından üretilen İL-12 NK, yardımcı T hücre 1 (*T helper 1*, Th1) ve dendritik hücrelerde anti-tümör yanıtların uyarılmasını sağlar. Bunun yanı sıra, meme tümörlerinde çok sayıda bulunan makrofajlar majör doku uygunluk kompleksi II (*major histocompatibility complex II*, MHC-II) düzeyinin düşmesine ve böylece antijen sunumu ve edinsel immün uyarımların azalmasına neden olur (59). Bu mekanizmalar aracılığı ile yeterli immün gözetimin gerçekleşmemesi meme kanseri gelişimine yol açar (Şekil 2.2).

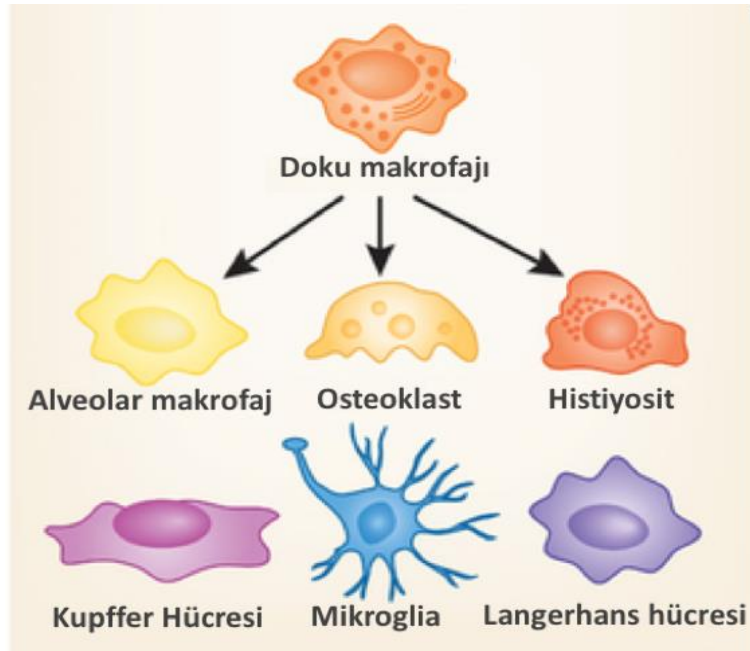
2.2. Monosit-Makrofaj Farklılaşması

Doğal immün sistem inflamasyonun başlangıcı, gelişimi, sonlanması ve doku bütünlüğünün yeniden sağlanmasına kadar farklı evreler boyunca görev alır. Zaman içinde gelişen koruyucu inflamatuvar yanıtları başlatarak içerden veya dışardan gelen tehlike sinyallerine karşı ilk savunmayı oluşturur. İnflamatuvar yanıtların ilk aşaması patojeni yok etmeyi amaçlamaktadır. Ardından ölü hücrelerin, zarar görmüş hücre-dışı matriks bileşenlerinin ve hücre debrisinin temizlenmesi süreci gelmektedir. Son olarak dokunun tamir edildiği ve işlevsel hale getirildiği evre ile bu süreç tamamlanır. İnflamasyon dokulardaki homeostazı yeniden oluşturmak için verilen bir yanıtıdır (60).

Mononükleer fagosit sistemi, hem yabancı maddelerin doğrudan ortadan kaldırılması hem de inflamatuvar sürecin her evresinin organize edilmesi ile gelişim, inflamasyon ve organizmanın savunmasında önemli rol oynar (60). Mononükleer fagositler arasında kemik iliğindeki miyeloid öncül hücreler, dolaşımdaki monositler, doku makrofajları ve dendritik hücreler yer alır (61). Bu hücrelerin fonksiyonları büyüme faktörleri, koloni uyarıcı faktör-1 (*colony stimulating factor 1*, CSF-1) ve İL-34 (diğer bir koloni uyarıcı faktör reseptör ligandı) tarafından düzenlenir (62, 63). Monositler mononükleer fagositlerin primer tipi olarak kanda bulunurlar. Doğumdan sonra, monositler kemik iliğindeki hematolojik öncül hücrelerden gelişerek kan dolaşımına geçerler (64). Bu hücreler insandaki toplam lökositlerin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Monositlerin tipik morfolojik özellikleri; düzensiz hücre şekli, oval veya böbrek şeklinde nükleus, sitoplazmik veziküller ve sitoplazma/çekirdek oranının yüksek olmasıdır. Monositler tehlikeli bir durumla karşılaşmış dokulara geçmediği sürece dolaşımda 1-2 gün kalırlar; daha sonra ise ölü olarak ortamdaki uzaklaştırılırlar (60). Kan aracılığı ile vücuttaki çeşitli dokulara yerleşen monositlerin ise olgunlaşarak makrofajlara dönüşme kapasiteleri vardır (64).

Dokuya yerleşik halde bulunan veya dokuya özgü makrofajlar embriyogenez sırasında gelişir (65). Bu makrofajlar, başlangıçta yolk kesesindeki öncül hücrelerden, daha sonra ise farklı organlara göç eden fetal karaciğerdeki

monositlerden gelişir (31). Doğumdan sonra hematopoez fetal karaciğerden kemik iliğine geçer (66). Doku makrofajları çeşitlilik gösteren ve yetişkin memelilerin bütün dokularında yaygın halde bulunan değişken yapıllı hücrelerdir. Fizyolojik koşullarda toplam hücre sayısının yaklaşık %10-15'ini oluşturmaktadır. Bu oran inflamasyon sırasında artış göstermektedir. Doku makrofajları, buldukları dokulara göre farklı isimler alırlar. Kemikte osteoklast, akciğerde alveolar makrofajlar, beyinde mikroglia hücreleri, bağ dokuda histiyosit, karaciğerde Kupffer hücreleri, deride ise Langerhans hücreleri adını alırlar (Şekil 2.3). Bu popülasyonlar son derece farklı transkriptom profillerine sahiptir (60, 67). Diğer yandan, makrofajların fonksiyonu genel olarak bütün dokularda aynıdır. Bu hücreler doku gelişiminde, patojenlere karşı immün yanıtta, immün gözetimde ve özellikle doku homeostazının sağlanmasında önemli rol oynarlar (60). Dokuya özgü makrofajlar homeostatik koşullarda kemik iliğindeki progenitörlerden veya kandaki monositlerin dokuya göç edip farklılaşmasından ziyade kendilerini yenileyerek popülasyonlarının devamlılığını sürdürürler (68, 69). Bu süreç CSF-1 ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) gibi büyüme faktörleri ve sitokinler ile düzenlenir (60).



Şekil 2.3. Doku makrofajları. (Galli, 2011'den (70) uyarlanmıştır.)

Dolaşımda bulunan monositler genellikle inaktif durumdadır. Doku hasarı, enfeksiyon, neoplazi gibi inflamasyonu tetikleyen durumlara yanıt olarak inflamatuvar dokuya göç ederler. Monositlerin dokuya geçişinde başta CCR2 kemokin reseptörünün ligandı olan kemokinler olmak üzere kompleman faktörleri, doku matriksinin yıkım ürünleri gibi pro-inflamatuvar moleküller rol oynar. İnflamatuvar alana geçen monositler bazal fenotiplerini değiştirip olgunlaşarak makrofajlara dönüşür ve aktif duruma geçerler. Bu makrofajlara “inflamatuvar makrofajlar” denir. İnflamasyon ile uyarılan olgunlaşma sırasında meydana gelen değişimler metabolizmanın değişmesine, hücre boyutlarının genişlemesine ve sitoplazmik değişimlere yol açar (64). Dolaşımda bulunan monositlerin boyutları yaklaşık olarak 7-8 µm iken bu monositlerden meydana gelen makrofajlar 15-20 µm boyuta ulaşmaktadır (64, 71).

Doğal immün sistemin en önemli elemanlarından olan makrofajlar çok sayıda patojeni tanıma, yutma ve yok etme özelliğine sahiptir (72). Fagositik hücreler omurgalı ve omurgasız canlılarda patojenleri yutma yeteneklerinden dolayı ilk kez Elie Metchnikoff tarafından tanımlanmıştır (73). İnflamatuvar reaksiyonların ilk aşamasında dokuda sayıları artan makrofajlar, doku hasarına yol açan patojenleri fagosite ettikten sonra ROS ve NO üretimi, miyeloperoksidaz aktivitesi ve inflamatuvar sitokinler İL-1 β , TNF- α ve İL-6 aracılığı ile yok ederler (74). Antijen sunma yeteneği makrofajların en önemli özelliklerindedir (75). Makrofajlar fagosite ettikleri patojenlerden kaynaklı antijenleri işleyerek doku mikroçevresinde bulunan T hücrelere majör doku uygunluk kompleksi (*major histocompatibility complex*, MHC) molekülleri aracılığı ile sunarlar (60, 76). Makrofajlar daha önce aktive edilmiş T hücrelere antijenleri sunarak aktivasyonlarının devamlılığını sağlar. Dokudaki makrofajlar naif T hücrelerin aktivasyonunu gerçekleştirmez. Çünkü naif T hücrelerin aktivasyonu lenf düğümlerinde meydana gelir. Diğer taraftan, T hücrelerin tamamen aktive olması ve etkin fonksiyon kazanması antijen sunan doku makrofajları ile karşılaşan aktive T hücreleri arasındaki immünolojik etkileşimler ile gerçekleşir (60, 75). Böylece, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerin polarizasyonuna, farklılaşmasına, çoğalmasına ve aktivasyonuna katkı sağlarlar. Bu sayede T hücreler

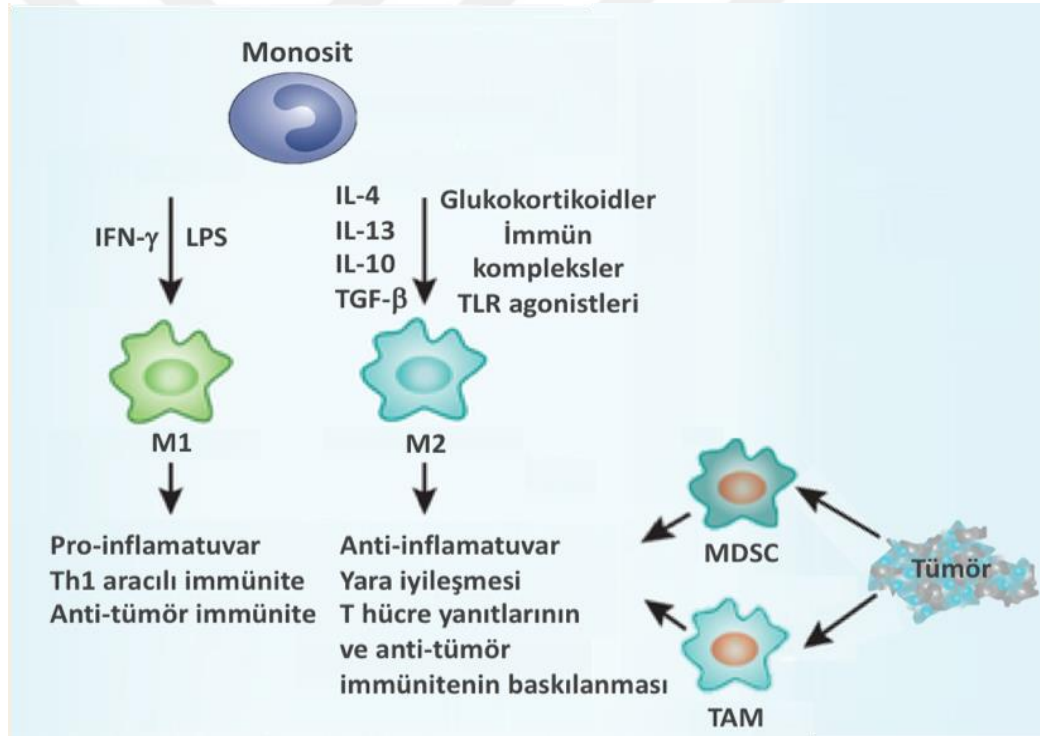
diğer immün sistem bileşenleri ile dokuyu istila eden patojenlere karşı etkili yanıtlar oluşturarak mikroorganizmaların ortamdan temizlenmesini sağlarlar (64).

Patojenin ortadan kaldırılmasından sonra dokuda bulunan makrofajlar inflamasyonun sonlandırılması, hasarlı dokudaki ölü hücrelerin temizlenmesi, yara iyileşmesi ve immün gözetim gibi fonksiyonlar göstererek homeostazın sağlanmasında ve sürdürülmesinde rol oynar (60). Bu makrofajlar yüksek düzeyde vasküler endotelial büyüme faktörü (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) üreterek hasarlı damar yapılarının yeniden oluşturulmasını ve hücre-dışı matriksin tekrar düzenlenmesini uyararak dokunun yeniden yapılandırılmasını sağlar (60).

Dokudaki inflamasyon sırasında burada bulunan monosit-kökenli makrofajlar mikroçevreden gelen pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sinyallere bağlı olarak M1 veya M2 fenotiplerine bürünebilirler. Dokuya ulaşan monositler inflamatuvar reaksiyonların farklı evrelerinde farklı mikroçevreler ile karşılaşabilirler. Dolayısı ile makrofajların bu fenotiplere adaptasyonu inflamatuvar reaksiyonlar sırasında dokuya ulaşan monositlerin zamanlamasına bağlıdır (60). Örneğin, inflamasyonunun erken aşamalarında dokuya göç eden monositler M1 fenotipine farklılaşır. Bu hücrelerin çoğu inflamasyon sırasında NO ve Fas gibi moleküllerin aktivitesi sonucu ölür (77). Bu hücreler için M1 fenotipi terminal farklılaşma fenotipidir. İnflamasyonunun geç aşamalarında dokuya ulaşan monositler veya sağkalan M1 makrofajlar, M2 fenotipine farklılaşabilecekleri mikroçevre ile karşılaşılırlar. Bu hücreler doku makrofajı haline gelirler (69, 78). Dokunun yeniden yapılandırılması ve yara iyileşmesi reaksiyonları sonrasında, bu hücrelerden bazıları hafıza özelliği kazanarak hafıza ve doku makrofajlarına dönüşür. Hafıza makrofajlar, dokularda bulunan daha önceki inflamatuvar reaksiyonlarda görev almış hücrelerdir. Yeni uyarım ile karşılaştıklarında daha hızlı yanıt oluşturma özelliklerine sahiptir. Bu durum makrofaj polarizasyonunun hem geçici hem de plastisitesi yüksek olduğunu göstermektedir (60).

İnflamatuvar yanıtların gelişimi sırasındaki M1/M2 dönüşümü makrofajların inflamatuvar reaksiyonun farklı fazlarında farklı aktiviteler gerçekleştirmesini sağlar (60). M1 makrofajlar inflamasyonun erken aşamalarında doku mikroçevresinde

yoğun miktarda bulunan interferon (IFN) γ ve bakteri hücre duvarı bileşeni olan lipopolisakkarit (LPS) gibi güçlü pro-inflamatuvar moleküller aracılığı ile meydana gelir. Bu fenotipe sahip hücreler pro-inflamatuvar sitokinler olan $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 ve IL-12 'nin yanında toksik efektör bileşenler olan ROS ve NO üretir ve MHC moleküllerini yüksek düzeyde ifade ederler. Böylece, patojenlere ve tümörlere karşı etkin yanıt oluştururlar (72, 79). İnflamasyonun geç aşamalarında dokuda bulunan makrofajlar çeşitli uyarılara yanıt olarak farklı M2 alt-tiplerine farklılaşabilir. IL-4 ve IL-13 aracılığı ile M2a, $\text{Fc}\gamma$ ve TLR reseptörleri ve immün kompleksler aracılığı ile M2b ve IL-10 , $\text{TGF-}\beta$ gibi anti-inflamatuvar sitokinler ve glukokortikoidler aracılığı ile M2c fenotipine farklılaşır (80, 81) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Makrofajların farklılaşması ve alt-grupları. (Galli, 2011'den (70) uyarlanmıştır.)

M2 makrofajlar yüksek düzeyde IL-10 , $\text{TGF-}\beta$ ve arginaz-1'in yanı sıra mannoz, galaktoz ve çöpçü (*scavenger*) reseptörlerini ifade ederler. Bu makrofajlar inflamasyonun sonlanması, dokunun yeniden yapılandırılması, anjiyogenez ve

immün düzenlenmede rol oynar. Ayrıca, alerjik reaksiyonlarda ve parazitlerin yok edilmesinde de etkindirler (82).

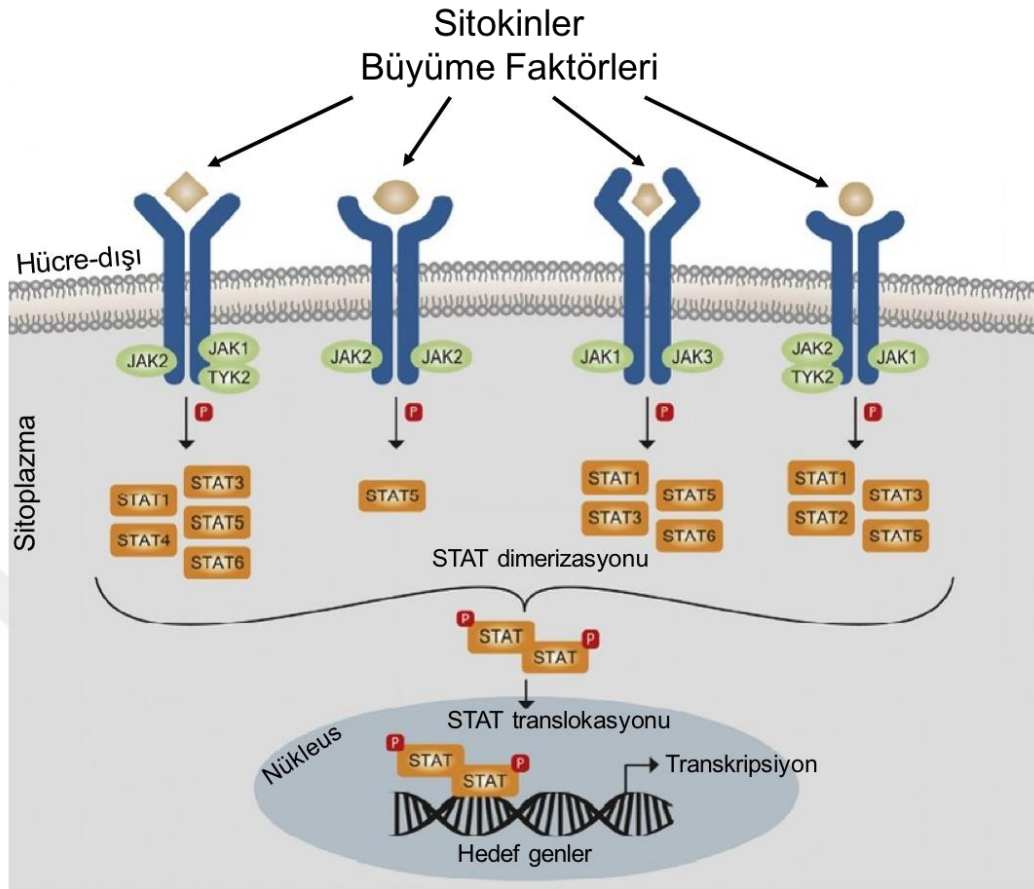
M1 ve M2 farklılaşması yardımcı T hücre (Th) 1/Th2 polarizasyonuna göre de tanımlanabilir. Farklı makrofaj popülasyonları CD4⁺ T hücre bağımlı tip-1 ve tip-2 immün inflamatuvar yanıtları kontrol eder ve destekler (83). M1 makrofajlar İL-12 ve İL-23 aracılığı ile sırasıyla Th1 ve Th17 hücrelerinin polarizasyonunu ve aktivasyonunu uyaran antijen sunma kapasitesine sahip hücrelerdir (60). Th1 hücreleri inflamatuvar mikroçevredeki İFN- γ 'nın esas kaynağıdır ve M1 polarizasyonunda rol oynar. Th2 hücreleri tarafından üretilen İL-4 ve İL-13 M2 polarizasyonunda rol oynarken, M2 makrofajlarda Th2 yanıtlarını desteklemektedir (73) (Şekil 2.4). M2 makrofajlar tarafından üretilen İL-10 ve TGF- β Treg gelişimini destekler (75).

Makrofajlar, tümör mikroçevresi gibi kronik inflamasyon sonucu oluşan immünolojik mikroçevrenin en önemli bileşenlerindedir (73). Bazı durumlarda, makrofajlar dahil, doğal immün sistem hücreleri tümör kütesinin neredeyse yarısını oluşturabilir (79). Pre-klinik ve klinik çalışmaların çoğunda makrofajların tümör oluşumu, gelişimi ve metastazı ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Tümör mikroçevresinde yüksek düzeyde bulunan tümör-ilişkili makrofajlar (*tumor-associated macrophages*, TAM) immün baskılama, lenfatik metastaz ve kötü prognoz ile de ilişkilidir (84). Tümör mikroçevresindeki kimyasal etkileşimler makrofajların fenotipini tümörün gelişimine katkı sağlayacak şekilde değiştirir (79). Tümör mikroçevresine infiltre olan makrofajlar kanserin erken evrelerinde anti-tümör M1, tümörün gelişimi ile beraber immün baskılayıcı ve regülatuvar M2 özellikleri gösterirler (73). TAM'lar hem M1- hem de M2-benzeri fenotipte olabilirler ancak fonksiyonel açıdan M2 özellikleri baskındır (85). Periferik kanda bulunan monositler CCL2, CCL5, CCL7, CXCL8 ve CXCL12 gibi çeşitli kemokinlerin etkisi altında kandan tümör dokusuna göç eder. Buradaki pro- ve anti-inflamatuvar sitokinler, hücre-dışı matriks molekülleri, büyüme faktörleri ve hipoksi gibi çeşitli uyarıların etkisi altında farklılaşarak TAM'ları meydana getirirler (73, 86). TAM'lar İL-10, TGF- β gibi anti-inflamatuvar sitokinleri, PGE2 ve arginaz-I moleküllerini yüksek düzeyde

üretir, İL-12 ve MHC-II moleküllerini ise düşük düzeyde ifade ederler. Böylece, anti-tümör T hücre yanıtlarını baskırlar. TAM'lar tarafından üretilen İL-1 β , TNF- α ve İL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinler ise tümör hücrelerinin sağkalımında ve inflamasyonun şiddetlenmesinde rol oynar. VEGF, PDGF, bFGF, PGE2, IL-8 gibi faktörler, çeşitli MMP'ler (MMP-1, 2, 7, 9, 12 ve 14) ve elastaz gibi proteazlar üreterek tümör mikroçevresinde immün düzenleyici süreçlerde, dokunun yeniden modellenmesinde, anjiyogenezde ve invazyonda rol oynarlar. TAM'lar tarafından üretilen EGF, hepatosit büyüme faktörü (*hepatocyte growth factor*, HGF) ve İL-6 tümör hücrelerinin çoğalmasını destekler. CCL13, CCL18 ve CCL22 gibi kemokinler üreterek immün baskılayıcı özelliğe sahip diğer hücrelerin (örneğin, Treg ve MDSC) tümör dokusunda migrasyonunu sağlar. Böylece TAM'lar tümör mikroçevresine daha fazla lökositin infiltre olmasına ve yara iyileşmesi-benzeri kronik inflamatuvar sürecin devamlılığına katkı sağlar (43, 49, 73).

2.2.1. TAM'lar ve STAT3 Transkripsiyon Faktörü

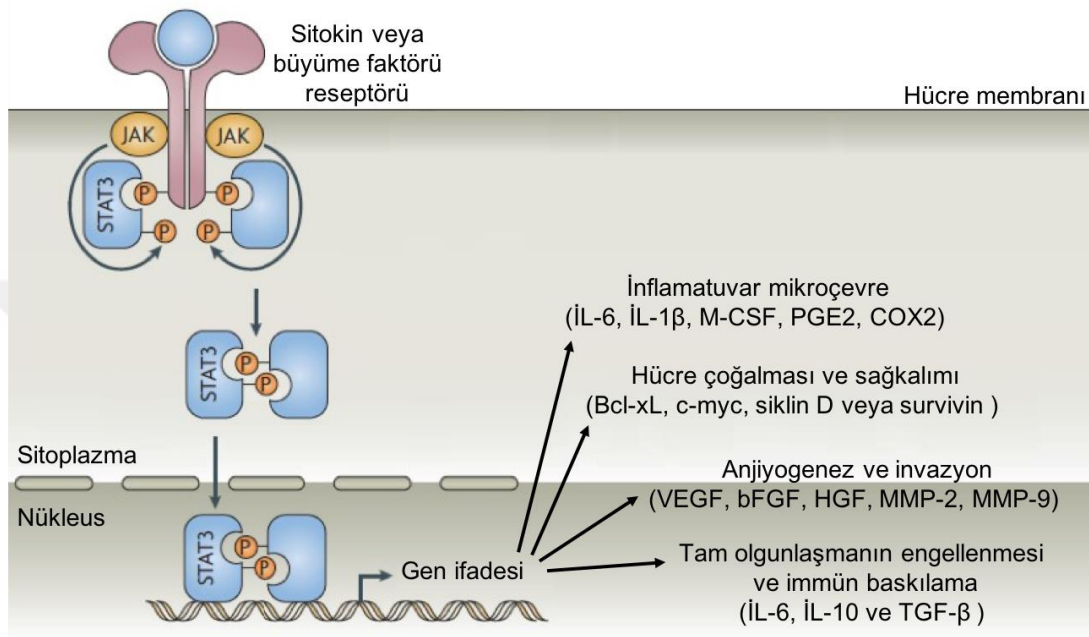
Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörleri (*signal transducer and activator of transcription*, STAT) bir transkripsiyon faktörü ailesi olup yedi üyeden (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6) oluşur. Bu faktörler, hücre büyümesinin düzenlenmesi, sağkalımı ve farklılaşmasında rol oynar. STAT transkripsiyon faktörleri sitoplazmik tirozin kinazlar olan Janus kinazları (JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2) tarafından aktive edilir. Bu kinazlar uyarılmamış hücrelerde inaktiftir. Reseptör-ligand etkileşimi sonrası JAK'lar sitoplazmada inaktif halde bulunan STAT proteinlerini Src homoloji 2 (SH2) bölümündeki spesifik tirozin rezidülerinden fosforilleyerek aktifleşmelerini sağlar. Aktive olan STAT transkripsiyon faktörleri homodimer veya heterodimer oluşturarak nükleusa göç eder ve ilgili genlerin transkripsiyonunu uyarır (87, 88) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. STAT ailesi üyeleri ve aktivasyonları. (Coskun, 2013'ten (89) uyarlanmıştır.)

Tümörde yaygın olarak bulunan TAM ve MDSC'lerin immün baskılayıcı özellik kazanması STAT3 transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu ile ilişkilidir. STAT3 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu bu hücrelere immün baskılayıcı özellik kazandırır ve tamamen olgunlaşmalarına engel olur (6, 10, 90). STAT3, başta İL-6 ailesi üyeleri (İL-6, Onkostatın M, İL-11, Lösemi inhibitör faktörü, Kardiyotrofin-1, Siliyer nörotrofik faktör) olmak üzere kanser hücreleri ve mikroçevrede bulunan immün hücreler tarafından üretilen çeşitli faktörler aracılığı ile aktive olur. STAT3 aktivasyonu; İL-6, İL-1 β , makrofaj-koloni uyarıcı faktör (*macrophage-colony stimulating factor*, M-CSF), PGE2 ve siklooksijenaz-2 (COX2) ifadesini sağlayarak tümör gelişimini destekleyen mikroçevrenin oluşumunda rol oynar (7). Bcl-xL, c-myc, siklin D veya survivin aracılığı ile sağkalımı ve hücre proliferasyonunu destekler (6, 91). VEGF, bFGF, HGF ve matris metalloproteazların (özellikle MMP-2

ve MMP-9) üretimi ile anjiyogenez ve invazyona aracılık eder. İL-6, İL-10 ve TGF- β üretimini uyararak ve İFN- γ , İL-12, MHC-II, CD80 ve CD86 ifadesini önleyerek tümör-ilişkili makrofajların tam olgunluğa ulaşmasını engeller ve immün baskılayıcı karakter kazanmasını sağlar (90) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. STAT3 aktivasyonu ve kanser gelişimi üzerine etkileri. (Yu, 2007'den (90) uyarlanmıştır.)

STAT3 transkripsiyon faktörünün inflamatuvar mikroçevre oluşumu, hücre çoğalması, sağkalım, anjiyogenez, invazyon ve miyeloid hücre karakteri üzerine etkileri kanser tedavisinde bu proteini hedefleyen stratejilerin geliştirilmesine yol açmıştır. STAT3 inhibisyonu için doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki yol belirlenmiştir. STAT3'ün doğrudan inhibisyonu; dimerizasyonun engellenmesi, STAT3 mRNA'sının seçici inhibisyonu, STAT3-DNA etkileşiminin ve transkripsiyonun engellenmesi ile meydana gelir. STAT3'ün dolaylı inhibisyonu ise; sitokin ve büyüme faktörlerinin ilişkili reseptörlerine bağlanmasının engellenmesi, JAK tirozin kinaz fosforilasyonunun engellenmesi, STAT3'ü negatif olarak düzenleyen proteinlerin aktivasyonu, STAT3'ün nükleositoloplazmik geçişinin engellenmesi ve protein tirozin

kinazların inhibisyonu ile meydana gelir (92, 93). STAT3 inhibisyonu için yapılan pre-klinik çalışmalarda bu transkripsiyon faktörünün genetik olarak susturulmasının anti-tümör yanıtların oluşumunu destekleyerek tümör gelişimini engellediği belirlenmiştir. Geçici olarak inhibe edilen STAT3'ün tümör gelişimini destekleyen inflamasyonu anti-tümör immünite yönüne çevirdiği gösterilmiştir (7). STAT3 üzerinde etkili küçük moleküllerin (STA-21, Stattic, S3I-201) dimerizasyonu ve DNA bağlanmasını inhibe ettiği belirlenmiş. Böylece tümör hücre çoğalmasını engellediği ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (7, 93). STAT3'ü doğrudan inhibe eden FDA onaylı bir ajan bulunmamaktadır (94). Ancak bu transkripsiyon faktörü için solid ve hematopoetik kanser türlerinde faz-I/II çalışmaları devam etmektedir (NCT03195699, NCT01066663, NCT02499328). STAT3'ün dolaylı inhibisyonunda ise FDA onaylı JAK inhibitörleri (Tofacitinib, Ruxolitinib) umut vaat etmektedir (95). FDA onaylı diğer tirozin kinaz inhibitörleri de (Sorafenib, Sunitinib) STAT3'ü dolaylı olarak inhibe eder. Böylece hücre döngüsünün durmasına ve apoptozu yol açarlar. Bu ajanlar aynı zamanda tümör-ilişkili immün hücrelerde STAT3 aktivitesini engelleyerek tümördeki immünolojik mikroçevreyi kanser tedavisine elverişli hale getirebilirler. Bu şekilde STAT3 aracılı kanser tedavilerinde rol oynarlar (7).

2.2.2. TAM'lar ve NF- κ B Transkripsiyon Faktörü

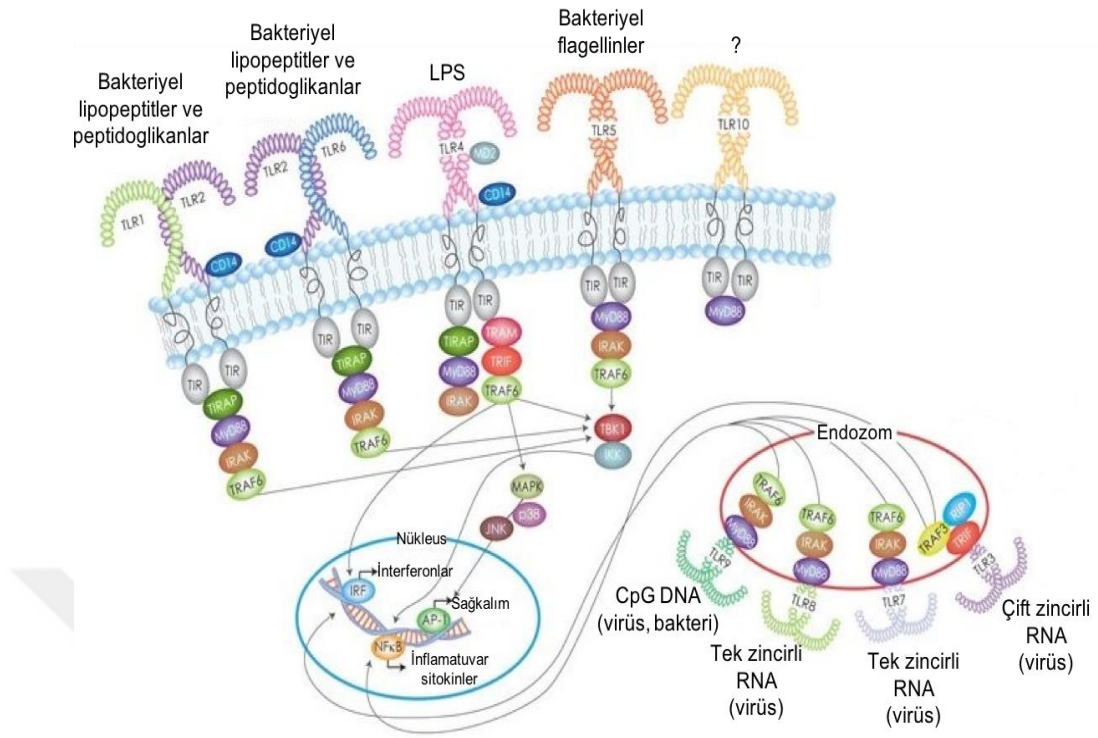
TAM'larda tümör gelişimi ve büyümesini destekleyen faktörlerin üretimine STAT3 ve NF- κ B transkripsiyon faktörlerinin sinerjik etkisi de katkı sağlamaktadır (7, 10). NF- κ B inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu, olgunlaşması ve etkin fonksiyon kazanması, hücre büyümesi ve sağkalımı, anjiyogenez, adezyon, invazyon ve metastaz gibi birçok hücreyel yanıtta düzenleyici olarak rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. NF- κ B transkripsiyon faktörü ailesi p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), RelA, RelB ve c-Rel olmak üzere beş proteinden oluşur. Klasik NF- κ B yolağında, sitokin reseptörleri, patojen-ilişkili moleküler yapıları tanıyan reseptörler ve diğer antijen reseptörlerinden gelen uyarılara yanıt olarak κ B inhibitör kinaz (IKK) kompleksi (IKK α -IKK β -IKK γ) uyarılır. Bu kompleks, sitoplazmada p50/RelA, p50/c-Rel heterodimerlerinin ve p50/p50 homodimerinin aktivasyonunu

engelleyen κB inhibitör (I κ B) proteinin fosforilleyerek proteozomal degradasyonunu tetikler. Böylece serbest kalan p50/RelA, p50/c-Rel ve p50/p50 nükleusa göç eder ve hedef genlerin transkripsiyonunu sağlamak üzere özgün DNA bölgesine (κB *enhancer*) bağlanır. Klasik olmayan yolak ise, TNF reseptör (TNFR) ailesini uyaran LT β R, BAFFR, CD40 ve RANK molekülleri aracılığı ile aktifleşir. Bu aktivasyon sonucu IKK α , p52/RelB heterodimerinin aktivasyonunu engelleyen p100 proteinini fosforilleyerek proteozomal degradasyonunu tetikler. Bu şekilde serberst kalan p52/RelB heterodimeri nükleusa göç eder ve hedef genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirir. Klasik yolak immün yanıtların tüm aşamalarında rol oynarken, klasik olmayan yolak özgün immün fonksiyonların düzenlenmesinde klasik yolağı destekleme görevi görmektedir (96, 97).

TAM'larda NF- κB 'nin tümörü destekleyici etkisi p50 ve IKK β bileşenleri aracılığı ile meydana gelir. Bu bileşenlerin aktivitesi sonucu TAM'lar M2 benzeri fenotip kazanırlar. Böylece TAM'larda tümör gelişimini destekleyen inflamatuvar yolların sürekliliği sağlanır (73, 79). Tümör hücrelerinin sağkalımında rol oynayan ve inflamatuvar mikroçevrenin oluşumuna katkı sağlayan sitokinler olan İL-1 β , TNF- α ve İL-6'nın üretimini sağlayan ana mekanizma NF- κB üzerinden gerçekleşmektedir (79). NF- κB aktivasyonu VEGF, MMP-9 ve COX2 gibi anjiyojenik faktörlerin üretimine de neden olur (98). Ek olarak, hipoksik ortam ve yüksek mobilite grup 1 proteini (*High mobility group box 1* protein, HMGB1), ısı-şok proteinleri (heat-shock protein, HSP) gibi tehlike sinyali ile ilişkili moleküler yapılar da (*danger-associated molecular pattern*, DAMP) TAM'larda NF- κB aktivasyonu ile immün baskılayıcı ve tümörü destekleyici özelliğe yol açar (99).

NF- κB transkripsiyon faktörünün en önemli aktivatörleri Toll-benzeri reseptörlerdir (*Toll-like receptor*, TLR). TLR'ler bir transmembran reseptör ailesidir. Normalde mikroorganizmalardaki patojen-ilişkili moleküler yapılar aracılığı ile patojenleri tanıyıp immün sistemin aktivasyonunu uyarırlar. Bu şekilde makrofajlar ve dendritik hücrelerin aktivasyonunu ve olgunlaşmasını sağlarlar (100). Memelilerde, TLR ailesinin 13 üyesi bulunmaktadır. Bunlardan TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10, TLR11 ve TLR12 hücre yüzeyinde bulunur. TLR3, TLR7, TLR8, TLR9

ve TLR13 hücre içinde endozomal membranlarda yer alır. Patojen-ilişkili moleküler yapılar olan bakteriyel lipopeptitler, TLR1, TLR2 ve TLR6 tarafından; bakteriyel peptidoglikanlar, TLR2 tarafından; LPS, TLR4 tarafından; bakteriyel flagellinler, TLR5 ve TLR11 tarafından; profilin, TLR11 ve TLR12 tarafından ve üropatojenik bakteriler (*E.coli*), TLR11 tarafından tanınır (100, 101). TLR10'un bilinen bir ligandı yoktur (102). Hücre içinde yer alan TLR'ler nükleik asitlerini tanırlar. Çift zincirli RNA, TLR3 tarafından; tek zincirli RNA, TLR7 ve TLR8 tarafından; CpG DNA, TLR9 tarafından; ribozomal RNA ise TLR13 tarafından tanınır (100, 103, 104). TLR11, TLR12 ve TLR13 farede ifade edilirken insanda bu reseptörlerin ifade edilmezler dolayısıyla fonksiyonel değildirler (105, 106). Ligand ile etkileşen TLR'ler aktive olur. TLR'ler sinyallerini Toll/IL1R reseptör (TIR) bölgesi içeren miyeloid farklılaşma primer yanıt proteini 88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*, MyD88) ve TIR bölgesi-içeren adaptör-indükleyici interferon- β (*TIR domain-containing adapter-inducing interferon- β* , TRIF) molekülleri aracılığı ile ileterek NF- κ B, interferon düzenleyici faktör (*interferon regulatory factor*, IRF) ve aktivatör protein (AP)-1 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu uyarır. TLR4 her iki molekülünü de uyarabilme kapasitesine sahip tek TLR ailesi üyesidir. NF- κ B, IRF ve AP-1 transkripsiyon faktörleri İL-1 β , TNF- α ve İL-6 pro-inflamatuvar sitokinlerini; CCL2, CXCL8 gibi kemokinleri; CD80 ve CD86 gibi kostimülatör moleküllerin ve İFN- α , İFN- β gibi tip-I interferonların ifadesini tetikleyerek akut inflamasyonu, anti-viral reaksiyonları ve edinsel immünitenin uyarılmasını sağlar (100) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. İnsanda fonksiyonel olarak bulunan toll-benzeri reseptörlerin hücredeki lokalizasyonları, ligandları ve aktivasyon şekilleri. (Hedayat, 2011'den (107) uyarlanmıştır.)

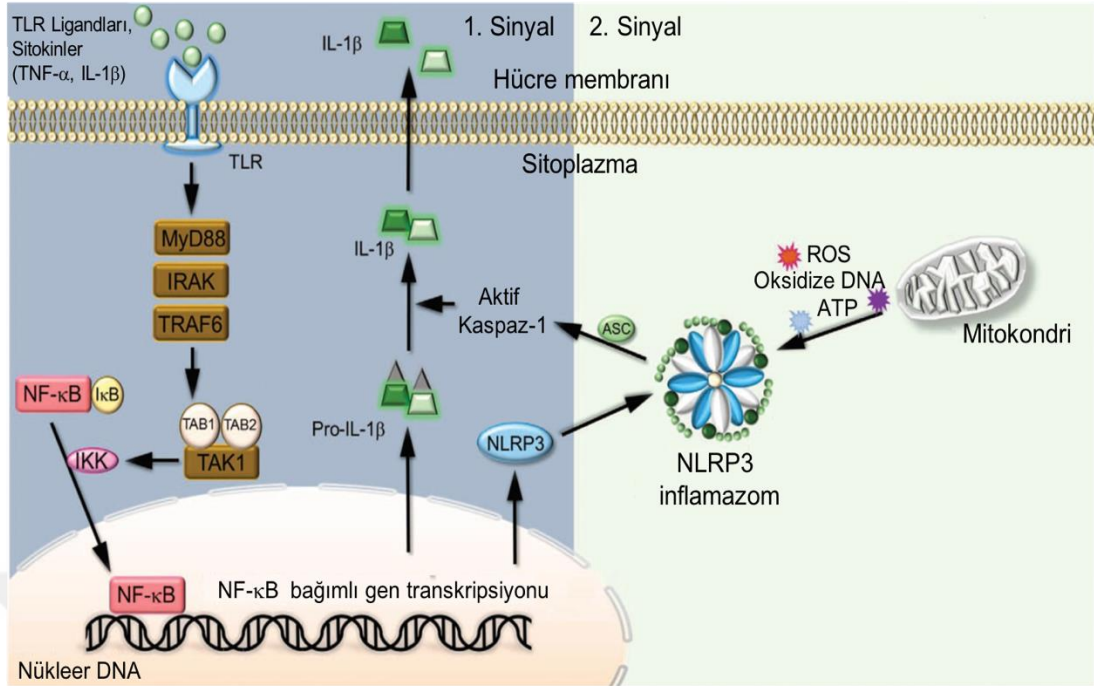
TLR sinyalleri çeşitli alternatif mekanizmalar aracılığı ile kronik inflamasyona da katkı sağlamaktadır. Tümör mikroçevresinde bulunan TLR4 ligandları (hücre-dışı matriks proteinleri ve HMGB1) tümör gelişimini destekleyen pro-inflamatuvar yolların aktivasyonuna yol açar (79). Tümör mikroçevresindeki TAM'lar yüksek düzeyde TLR4 taşır (98). TLR4, miyeloid farklılaşma faktörü (MD)-2 ve CD14 proteinleri ile kompleks oluşturarak fonksiyonel hale gelir (108). Böylece, TAM'lar NF- κ B transkripsiyon faktörü aracılığı ile pro-inflamatuvar sitokinlerin üretilmesini sağlayarak kronik inflamasyonun şiddetlenmesine neden olur. Bu da tümör gelişimini destekler. Ek olarak, TLR4 sinyali makrofaj öncüllerinin dolaşımdan tümör mikroçevresine göçünü de sağlar (98). Tümördeki miyeloid kökenli diğer bir baskılayıcı hücre grubu olan MDSC'lerde TLR4 aktivasyonu sonucu üretilen İL-1 β tümör mikroçevresindeki inflamasyona katkı sağlar (109). MDSC'lerin baskılayıcı aktivitesinde TGF- β , İL-13 ve İL-4'ün yanı sıra TLR4 agonistleri de rol oynar. Bu

agonistler tümörde MDSC birikimine yol açar ve bu şekilde T hücre yanıtlarının baskılanmasına neden olabilirler (98, 110). MDSC'lerde TLR4/CD14 aktivasyonu İL-10 üretiminde artışa İL-12 üretiminde ise azalmaya yol açarak anti-tümör immün yanıtların etkisini zayıflatır (98).

2.2.3. TAM'lar ve İL-1 β

Kronik inflamasyonun tetiklenmesinde ve sürdürülmesinde önemli görevi olan pro-inflamatuvar sitokinler esas olarak tümör mikroçevresindeki TAM'lar tarafından üretilmektedir. İL-1 β inflamatuvar kaskadın tepesinde bulunan prototipik bir sitokindir. Akut inflamasyonda mikrobiyal ajanların tanınmasını sağlayan, lenfoid hücre fonksiyonlarının aktivasyonu ve düzenlenmesinde rol oynayan çeşitli sinyal yollarının kavşak noktasında bulunur. Ancak, kanser ile ilişkili inflamasyonda bu sitokin tümöre infiltre olan miyeloid hücrelerin birikimi, anjiyogenez, anti-tümör immün yanıtların baskılanması gibi tümör mikroçevresinin farklı bileşenlerini modüle eder ve tümör gelişimini destekler (111).

İL-1 β üretimi inflamazom kompleksinin aktivasyonu sonucu meydana gelir (112). İnflamazom, NOD-benzeri reseptör protein (*NOD-like receptor protein*, NLRP), kaspaz aktivasyon ve toplanma bölgesi (*caspase activation and recruitment domain*, CARD) içeren apoptoz ile ilişkili nokta benzeri protein (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*, ASC) ve kaspaz-1'den meydana gelir (113). Olgun ve biyoaktif İL-1 β üretimi için iki sinyal gereklidir. İlk sinyal, pro-İL-1 β üretimini uyarmak için TLR ligandları (LPS, bakteriyel lipopeptitler, peptidoglikanlar) ve sitokinlerden (TNF- α , İL-1 β) sağlanırken; ikinci sinyal olarak patojen-ilişkili moleküler yapılar (*patogen-associated molecular pattern*, PAMP) (viral-RNA) ve DAMP'lar (ROS, oksidize DNA, ATP) kaspaz-1 bağımlı olarak pro-İL-1 β 'yı olgun İL-1 β 'ya dönüştürür (Şekil 2.8). Bu uyarımlar sonucunda NLRP proteinleri, ASC ve kaspaz-1 ile etkileşime girer ve oligomerize olarak multimoleküler sinyal kompleksi oluşturur. Pro-kaspaz-1, ASC ve NLRP ile etkileşim sonucu kaspaz-1'e dönüşür ve İL-1 β 'nın posttranslasyonel modifikasyonunu sağlar (112).



Şekil 2.8. İnflamazom aktivasyonu ve İL-1β üretimi. (Liu, 2017'den (96) uyarlanmıştır.)

Tümör mikroçevresindeki İL-1β'nin başlıca kaynağı TAM'lardır. Bu sitokin tümör gelişiminde önemli rol oynayan NF-κB, MAPK ve PI3K sinyal yollarının aktivasyonuna neden olur (114, 115). İnflamazom aktivasyonunun TAM ve MDSC gibi baskılayıcı özellikteki miyeloid hücrelerin tümör mikroçevresine daha fazla infiltre olmasını sağladığı belirtilmiştir. Bu miyeloid hücrelerdeki inflamazom aktivasyonu ve İL-1β, endotelial hücrelerde adezyon moleküllerinin üretilmesini (VCAM-1) destekleyerek tümör hücreleri ile etkileşiminde rol oynar ve VEGF üretimini uyararak anjiyogenezin devamlılığını sağlar. Ek olarak, İL-1β karsinogenezi destekleyecek şekilde aktivite gösterebilen Th17 lenfositlerin polarizasyonuna katkı da sağlayabilir. Tümör dokusundaki İL-1β artışının kötü prognozla ilişkili olduğu belirlenmiştir (111, 112). Meme kanserinde inflamazom aktivasyonu ve İL-1β üretimindeki artışın immün baskılama, tümör gelişimi ve metastazda önemli roller oynayabileceğine dair bulgular mevcuttur. Bu fonksiyonların inflamazom aktivasyonu ile immün baskılayıcı hücrelerin (TAM, MDSC) tümöre göçü sonucu ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu hücrelerin primer ve metastatik tümör bölgesine

göçünde, İL-1 reseptörü (İL-1R) ile aktive olan NF-κB ve MAPK yolları aracılığı ile üretilen kemokinlerin (CCL2, CCL5 ve CXCL12) rolü olabileceği belirtilmiştir (116).

2.2.4. Hücre-dışı Matrisin Makrofaj Farklılaşmasına Etkisi

Makrofajlar buldukları mikroçevreye göre fenotipik ve fonksiyonel farklılıklar gösteren yüksek plastisiteye sahip hücrelerdir. Maruz kaldıkları aracı moleküllerin yanı sıra, hücre-dışı matris bileşenleri ile etkileşimler de makrofajların farklılaşmasını etkiler (72, 117). Hücre-dışı matris dinamik bir yapılanma gösterir ve hücrelere sadece fiziksel destek sağlamakla kalmaz aynı zamanda doku gelişimini, homeostazı ve temel hücre fonksiyonları için gerekli sinyalleri sağlar (118). Hücre-dışı matrisin başlıca bileşenleri kollajen, fibronektin ve laminindir (119). Monositlerin kan dolaşımından dokuya göç etmesi sırasında temasa geçtiği hücre-dışı matrise adezyonu makrofajlara dönüşüm sürecini uyarır. (5, 120). Makrofajların yüzeyinde bulunan adezyon molekülleri (integrinler) hücre-dışı matris proteinleri ile etkileşime geçer. Bu şekilde yeni aktivasyon sinyalleri alan makrofajlar elastaz ve MMP gibi proteazları, süperoksit anyonlarını, PGE2 ve NF-κB gibi molekülleri ve İL-1β, TNF-α ve GM-CSF gibi sitokinleri üretme kapasitelerini güçlendirir. Monosit ve makrofajlar hücre-dışı matris ile etkileşim sonrası MCP-1, MIP-1α, İL-8 ve RANTES gibi kemokinler sentezleyerek bu bölgeye daha fazla immün hücrenin migrasyonunu uyarmaktadır (121).

Monosit-makrofaj farklılaşması fibronektin konsantrasyonunun fazla olduğu dokularda kolaylaşır (122, 123). Kandan dokuya göç eden monositlerin fibronektin (FN) ile yaptığı etkileşimler monosit-makrofaj farklılaşmasında rol oynayan PU.1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu sağlar. PU.1 transkripsiyon faktörü makrofaj farklılaşması için gerekli olan makrofaj koloni uyarıcı faktör (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) reseptörünün ifadesini sağlar. Bu transkripsiyon faktörü aynı zamanda monosit/makrofaj farklılaşma ve olgunlaşma belirteci olarak rol oynayan CD11b, CD18, CD14 ve Fc reseptörlerinin artışına neden olur. FN ile etkileşen α5β1 ve α4β1 integrinler monositlerde sürekli olarak bulunur. Diğer FN reseptörleri olan αvβ3 ve α4β7 integrinlerin varlığı ise monositlerin aktivasyonu ile

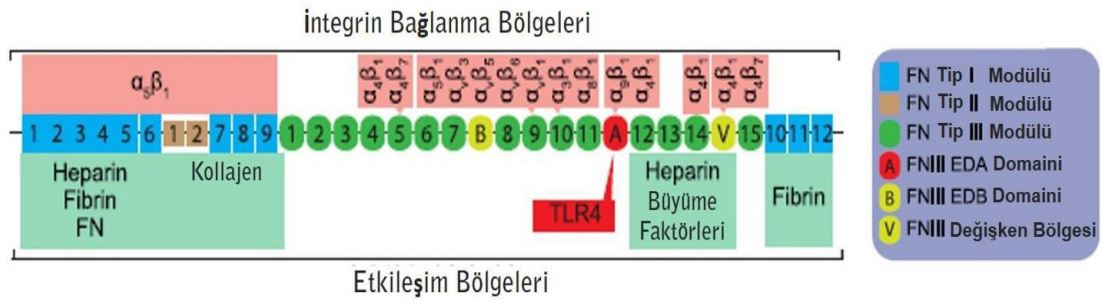
artar. İnflamasyon integrinlerin fibronektine olan yüksek afinitesini de güçlendirir. Bu etkileşim makrofajlarda inflamatuvar moleküllerin sentezini destekler. FN ile etkileşen makrofajlarda pro-inflamatuvar sitokinlerin (İL-1 β , TNF- α) salımı NF- κ B transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ile izlenir (121). FN ayrıca, miyeloid hücrelerin migrasyon ve fagositik kapasitesini artırır (124, 125). Tümör mikroçevresinde bulunan miyeloid hücreler tümör hücrelerinden salgılanan faktörler ve fibronektin gibi hücre-dışı matriks bileşenleri ile yaptığı etkileşimler sonucunda tümör gelişimini destekleyen MDSC ve TAM gibi hücrelere polarize olabilir. Bu şekilde tümör gelişimini ve ilerleyişini destekleyen ve anti-tümör yanıtları baskılayan fonksiyonları daha etkin şekilde gerçekleştirebilirler (126).

2.3. Fibronektinin Yapısı

Plazma ve hücre-dışı matriksin önemli bileşenlerinden olan FN glikoprotein yapısındadır. Sadece omurgalı canlılarda bulunan FN hücre-dışı matriks oluşumu, hücre adezyonu, hücre gelişimi, farklılaşma, migrasyon, kan koagülasyonu, yara iyileşmesi ve doku tamirinde rol oynar (118, 127, 128). Fibronektin iki şekilde bulunur. Plazma FN (pFN) dolaşımda bulunur, hepatositler tarafından üretilir ve kana salgılanır. Hücre FN (*cellular* FN, cFN) başta fibroblastlar olmak üzere stromal hücrelerden, epitelyal ve endotelyal hücrelerden lokal olarak üretilir (129, 130).

FN dimer halinde ve kompakt formda sentezlenir. Bu kompakt formun oluşmasında dimerleri meydana getiren C-terminal bölgesindeki kovalent bağlı disülfid bağları ve molekül içi iyonik etkileşimler rol oynar. Bu etkileşimler FN'nin spontan olarak fibril oluşturmasını engeller. FN'nin fonksiyon göstermesi için kompakt yapıdan fibriller matrikse dönüşmesi gerekmektedir. Bu nedenle FN fibrillerinin oluşumu için FN'nin hücreler ile doğrudan etkileşimi gereklidir (127). FN'nin primer reseptörleri integrinlerdir. Integrinler hücre yüzeyinde bulunan heterodimerik transmembran reseptörleridir. Alfa (α) ve beta (β) alt-ünitelerinden oluşur ve hücre iskeleti ile hücre-dışı matriks arasında bağlantı kurar. Adezyonla ilişkili sinyal yollarını düzenler (118). FN ile etkileşen 13 integrin heterodimeri

($\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 11\beta 3$, $\alpha M\beta 2$ ve $\alpha X\beta 2$) olmasına rağmen bunlardan sadece 4 tanesi ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$ ve $\alpha 11\beta 3$) fibril oluşumunu başlatabilmektedir (100, 127, 131) (Şekil 2.9). Ancak, FN fibrilogenezinden sorumlu primer reseptör $\alpha 5\beta 1$ 'dir. $\alpha 5\beta 1$, FN'deki arginin-glisin-aspartik asit (RGD) dizisine bağlanarak fibrolojenezi başlatır. Diğer integrinler sadece uygun uyarımlar sonucu FN fibrilleri oluşturabilirler (132). $\alpha 5\beta 1$ integrinlerin yoğun olduğu fokal adezyon bölgelerinde hücre yüzeyine sabitlenmiş FN'nin lokal konsantrasyonu artırılır. FN'e bağlı $\alpha 5\beta 1$ integrinlerin sitoplazmik kısmı fokal adezyon kinazların (FAK) uyarılmasını sağlar. Böylece hücre iskeletindeki aktin ve miyozinler ile etkileşime geçer (132). Bu etkileşim sonucu oluşan mekanik kuvvetler FN'e bağlı $\alpha 5\beta 1$ integrinlerin fokal adezyon bölgelerinden ayrılmasını sağlar. $\alpha 5\beta 1$ 'in bu hareketi sonucu FN dimerleri konformasyonel değişime uğrar ve kompakt yapıları kaybolur. Böylece FN'deki kriptik bölgeler ortaya çıkar. Kriptik bölgeleri açığa çıkan FN'ler, N-terminal bölgeleri aracılığıyla birbirleri ile etkileşime geçer. Bu şekilde kısa FN fibrilleri oluşur. Bu kısa FN fibrillerinin uzaması sonucu hücreler tarafından üretilen FN matrisi yapısı ortaya çıkar (133-135).



Şekil 2.9. Hücresel fibronektin protein yapısının, etkileşim ve integrin bağlanma bölgelerinin şematik olarak gösterimi (Julier, 2015'den (8) uyarlanmıştır.)

Fibronektin insan genomunda 90 kbp üzerinde olan 47 ekzondan oluşan tek bir genin (*FN1*) transkripsiyonundan meydana gelir. Fonksiyonel FN molekülü 220-250 kDa ağırlığa sahip benzer yapıdaki iki alt-üniteden oluşur. Her bir alt-ünite homolog tekrarlı bölgelere sahip tip-I, tip-II ve tip-III olmak üzere üç farklı tip

modülden meydana gelir (118). N-terminal bölgesindeki tip-I modülünde bulunan “tip-I 1-5” bölümleri diğer FN molekülleri için bağlanma bölgesi içerir ve fibrilogenezde önemlidir (Şekil 2.9). $\alpha 5\beta 1$ için primer bağlanma bölgesi olan RGD dizisi FN molekülünün tip-III modülünde bulunan “tip-III 10” bölümünde yer alır. “Tip-III 9” bölümü ise sinerji dizisi (PHSRN) içermektedir. Bu bölge RGD dizisinin $\alpha 5\beta 1$ heterodimerine yüksek afinite ile bağlanması için gereklidir (136).

Fibronektinin primer gen transkripti farklı FN alt-ünitelerini kodlayan mRNA’lar oluşturmak için alternatif kırılma (*alternative splicing*) mekanizmasını kullanır. Bu mekanizma tip-III bölümleri arasında üç farklı bölgenin oluşumunu sağlar. Bunlar “tip-III 7” ve “tip-III 8” bölümleri arasındaki ek bölüm B (*extra domain B*, EDB), “tip-III 11” ve “tip-III 12” bölümleri arasındaki ek bölüm A (EDA) ve “tip-III 14” ile “tip-III 15” bölümleri arasındaki değişken bölge (*variable region*, V) veya tip-III bağlanma dizisidir (*type-III connecting sequence*, IIICS) (132) (Şekil 2.9). EDA ve EDB bölümlerinin her biri tek bir ekzon tarafından kodlanır. IIICS bölgesi insanda 5 farklı FN mRNA kırılma mekanizması ile meydana gelmektedir Alternatif kırılma sonucu oluşan FN mRNA transkript varyantlarından (TV) 10 tanesi EDB veya EDA bölümlerinden birini (EDB: TV9, NM_001306130.1; TV12, NM_001365517.1; TV14, NM_001365519.1; TV16, NM_001365521.1; TV17, NM_001365522.1, EDA: TV3, NM_002026.3; TV4, NM_212478.2; TV13, NM_001365518.1; TV15, NM_001365520.1; TV19, NM_001365524.1) 5 tanesi hem EDB hem EDA bölümünü (TV1, NM_212482.2; TV8, NM_001306129.1; TV X4, XM_024452769.1; TV X6, XM_005246402.1; TV X16, XM_017003692.1) 4 tanesi sadece IIICS bölümlerini (TV5, NM_212476.2; TV10, NM_001306131.1; TV11, NM_001306132.1; TV18, NM_001365523.1) içerirken 1 tanesi de alternatif kırılma mekanizması ile oluşan hiçbir bölümü (TV6, NM_212474.2) içermemektedir (PubMed/Gene/*FN1 Homo sapiens (human)*). Bu şekilde, 20 monomerik FN izoformunun ifade edilmesi sağlanarak birbirinden farklı çok sayıda FN dimeri oluşturulmaktadır (118, 131). Alternatif kırılma mekanizmaları ile oluşan bölgeler FN’nin kriptik bölgelerinde yer alır. FN’nin fibrilogenezini sağlayan mekanik kuvvetler ve proteoliz sonucu bu bölgeler yapısal olarak modifikasyona uğrar ve ortaya çıkarak hücrelerin FN’e

bağlanma kapasitelerini ve afinitelerini artırır. Böylece FN fonksiyonlarının çeşitliliğinde artış meydana gelir (118, 137, 138). EDA bölümünde bulunan EDGIHEL amino asit dizisi $\alpha 4\beta 1$ ve $\alpha 9\beta 1$ integrinler tarafından tanınır. IIICS bölümünde LDV ve REDV dizileri bulunur ve $\alpha 4\beta 1$ ve $\alpha 4\beta 7$ integrin heterodimerleri tarafından tanınır. EDB bölümüne doğrudan bağlanan bir hücre reseptörü ise henüz tanımlanmamıştır (131, 139, 140).

FN-EDA hücre adezyonu, yara iyileşmesi, matriks oluşumu, protein sekresyonu, sitokin bağımlı MMP üretimi, hücre farklılaşması, doku hasarı, inflamasyon, hücre döngüsü ve mitotik sinyal iletimi gibi birçok fonksiyona sahiptir (118). EDA bölümüne bağlanan diğer bir reseptör de TLR4'tür (Şekil 2.9). EDA ile etkileşim sonucu aktive olan TLR4, NF- κ B'nin nükleer translokasyonunu tetikleyerek inflamasyona katkı sağlar (8, 9). EDA ve EDB bölümlerini içeren FN doku ve damarların yeniden modellenmesi sırasında yüksek düzeyde üretilir (118). Posttranslasyonel modifikasyonlar ile oluşan bölümleri taşıyan FN izoformları embriyonik gelişim sırasında artış gösterirken, doğum sonrasında ve yaşlanmayla giderek azalır. Yaralanmalarda, patolojik durumlarda ve doku tamirinde bu bölümleri içeren FN düzeylerinde artış görülür (118, 132).

Plazma FN (pFN) yapısında EDA ve EDB bölümleri bulunmaz. Bu durum, EDA ve EDB içeren FN izoformlarının polimerizasyonu ve fibrilogenezi daha fazla desteklediğini göstermektedir (141). pFN dimerik ve kompakt halde bulunur. Kandaki pFN konsantrasyonu yaklaşık 300-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'dir. pFN hasarlı damar yapılarının tamirinde trombosit ve fibrin ile beraber pıhtılaşma sırasında homeostaz oluşumunda görev alır. FN düzeyi yüksek olan pıhtı, yara kapanma süreci boyunca hücre göçünü desteklemek için geçici bir matriks oluşturur (118).

FN molekülü integrinler ve diğer FN molekülleri için bağlanma bölgeleri yanında, diğer hücre-dışı matriks bileşenleri (kollajen, fibrin ve heparin) ve büyüme faktörleri için de çoklu bağlanma bölgeleri içerir (Şekil 2.9). Bu sayede, hücre-dışı matriksin genişlemesine ve organize olmasına doğrudan katkı sağlayabilir (127). FN molekülünde bulunan heparin-bağlama bölümü VEGF, EGF, FGF, PDGF ve TGF- β gibi büyüme faktörlerinin aynı mikroçevrede hücreler ile etkileşimini sağlar. (142, 143).

Bu büyüme faktörlerinin reseptörleri ve integrinlerin birlikte etkileşimi hücre-dışı matriksin yeniden modellenmesini de düzenler (127).

2.4. Hücre-dışı Matriks ve Kanser Gelişimi

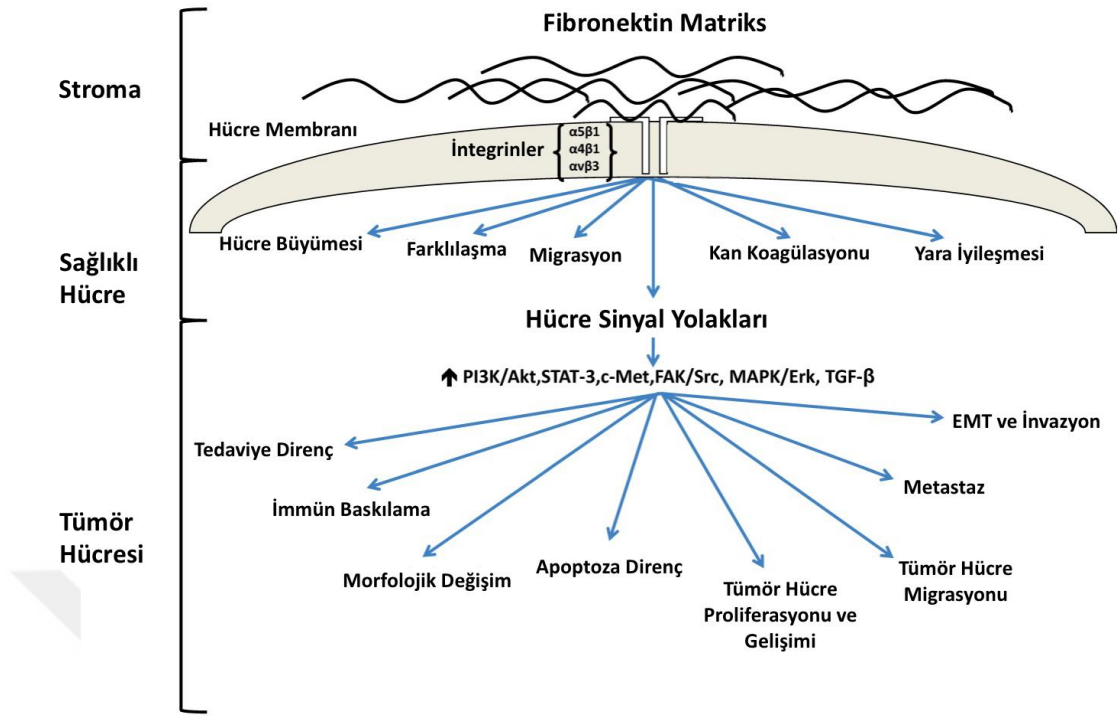
Hücre-dışı matriksin neoplastik gelişim sırasında yapısı ve organizasyonu bozulur ve kanser hücrelerinin transformasyonunu, gelişimini ve metastazını destekler. Kansereleşme sırasında hücre-dışı matriks proteinleri aşırı düzeyde üretilebilir. Anjiyogenez ve inflamasyonu kolaylaştırır ve tümörü destekleyen mikroçevrenin oluşumuna katkı sağlar (144). Hücre-dışı matriks proteinlerindeki artış bu matriks yapısının daha da yoğun hale gelmesini sağlayarak hücrelerin sağkalımı ve çoğalmasını destekler. İntegrinlerin aktivitesinde ve PI3K, ERK sinyal yollarının işlevinde artışa yol açarak onkojenik transformasyonu iletir (145-147). Hücre-dışı matriksi düzenleyen enzimler de kanserde artış gösterebilir. Bazal membranın yıkılmasına yol açarak epitelyal-mezenkimal geçişi (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) tetiklerler ve kanser hücrelerinin invazyonuna katkı sağlarlar (144). Tümör mikroçevresinde hücre-dışı matriks bileşenlerinin üretilmesi hem stromal hücreler hem de kanser hücreleri tarafından gerçekleştirilebilir (148).

Sağlıklı meme dokusunda, hücre-dışı matriks tümörleşmeyi engelleyen bir fonksiyon gösterirken; tümörde, anormal yapıda bulunur ve tümör gelişimini destekler. Meme dokusundaki miyoepitelyal hücreler memedeki hücre-dışı matriksin organizasyonundan sorumludur. Miyoepitelyal hücrelerden köken alan kanser hücrelerinin ürettiği proteinler hücre-dışı matriksin bileşimini değiştirerek hastalığın ilerlemesine katkı sağlayabilir. Bu değişimler duktal karsinoma in situ (*ductal carcinoma in situ*, DCIS) aşamasından itibaren görülmektedir. Örneğin, meme tümörü stromasında kollajen-I miktarındaki artış hücre-dışı matriks ile hücrelerin etkileşimlerini artırır ve normal hücre yapısı bozularak hücre çoğalması meydana gelir (141). Lamininler de meme kanseri hücrelerinin sağkalımına ve agresif yapı kazanmasına katkı sağlar (119).

2.4.1. Fibronektinin Kanser Gelişimindeki Rolü

Kanser gelişimi sırasında artan FN, tümör büyümesini, tümör hücrelerinin göçünü ve invazyonunu artırabilir. Ek olarak, kanser tedavisine verilen yanıtların etkisini sınırlayıcı rol oynayabilir (128) (Şekil 2.10). Kanser hastalarının doku ve serumunda artan FN'nin özellikle tümör gelişiminin birçok aşamasına katkıda bulunması bu glikoproteine olan ilgiyi artırmıştır (128, 149, 150). Tümör hücreleri üzerinde bulunan $\alpha 5\beta 1$ integrinin FN ile etkileşimi adezyon, çoğalma ve invazyon kapasitesini artırır. İntegrin $\alpha v\beta 3$ ile etkileşim de invazyona katkı sağlamaktadır (128). Bir EMT belirteci olarak kabul edilen FN, $\alpha v\beta 3$ integrini ile birlikte Slug transkripsiyon faktörünün ifadesini artırır (151). FN, Src kinazlar ve ERK/MAPK yolları aracılığı ile kanser hücrelerinde mortalite artışına neden olur (148). Primer tümörden salgılanan sitokinler sekonder organlarda FN üretimini uyarabilir ve böylece pre-metastatik niş oluşumunu ve metastazı destekler (119) (Şekil 2.10).

Meme kanserinde, (özellikle üçlü negatif ve HER2+ tümörlerde), total hücre FN, FN-EDA izoformu ve $\alpha 5\beta 1$ integrin düzeylerinin artış gösterebildiği ve invazyonu destekleyebileceği belirtilmiştir (152, 153). Meme kanseri hücrelerine etki eden FN'nin, FAK ve PYK2 yolları aracılığı ile STAT3 transkripsiyon faktörünü uyararak meme kanseri hücrelerine invazif ve metastatik özellikler kazandırabileceği gösterilmiştir (154). Duktal karsinoma in situ aşamasından invazif kanser histopatolojisine geçiş sürecinde FN ve izoformlarının (EDA ve EDB) düzeyinin artması ve bunların diğer hücre-dışı matriks bileşenleri (kollajen, tenasin C) ile yaptığı etkileşimler de tümör hücrelerinin sağkalımına ve kanserin ilerlemesine yol açabilir (141). Hücre FN ayrıca, PI3K yolağı aracılığı ile apoptoza dirençte de rol oynar; $\alpha 5\beta 1$ aracılığı ile bu yolağı veya PI3K/Akt sinyal bileşenleri üzerinden p21 ve p53 tümör-baskılayıcı proteinleri baskılar ve siklin D1'in aktivasyonunu sağlar (155). FN- $\alpha 5\beta 1$ integrin etkileşimi sonucu uyarılan c-Met/FAK/Src ve TGF- β /SMAD3 yolları da tümör hücrelerinin adezyonu, çoğalması ve invazyonuna yol açabilir (Şekil 2.10). FN, integrinler dışında, sindekanlara da bağlanarak tümör hücrelerinin hücre-dışı matriks ile etkileşimini ve gelişimini düzenler (128).



Şekil 2.10. Hüresel fibronektinin sağlıklı hücre ve tümör hücresi üzerindeki etkileri. (Wang ve Hierscher, 2017'den (128) uyarlanmıştır)

Tümör dokusunda bulunan termolizin, trombin, plazmin, MMP ve elastaz gibi enzimler FN'i substrat olarak kullanır (41, 156-158). Bu enzimler, çeşitli fonksiyonlara sahip FN parçalarının oluşumuna ve kriptik bölgelerin açığa çıkmasına neden olur. Hücre-dışı matrikste bulunan büyüme faktörleri ve sitokinlerin serbest kalmasına yol açarak biyolojik yanıtların ve fonksiyonların değişimine neden olabilir (119). Farklı büyüklüklere sahip FN parçaları makrofajlarda $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-8 , $\text{TGF-}\beta$ ve IL-10 üretimin artırabilir (159-161).

MMP ailesinin birçok üyesi olmasına rağmen meme kanserinde MMP-2, MMP-3, MMP-9 ve MMP-14 yüksek düzeyde bulunur. Bu enzimler, kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle bazal membranın yıkılması ve metastaz aşamalarında MMP-2 ve MMP-9 aktivitesi görülmektedir (119, 126). MMP-14 membran-bağımlı proteazdır. Kanser hücreleri ve immün hücreler üzerinde bulunur. Hücre göçü ve invazyonunda rol oynar (119). MMP-3, makrofajlar için kemoatraktan özelliğe sahip faktörlerin (osteopontin, fibronectin, kollajen, laminin) oluşumunu sağlayabilir (126, 162, 163). Meme kanserinde kanser hücreleri tarafından sentezlenmesinin

yanı sıra MMP'lerin esas kaynağı miyeloid hücrelerdir (126). Fibronektine bağlanan $\alpha 5\beta 1$ ve $\alpha v\beta 3$ integrinler miyeloid hücrelerde MMP üretimini artırabilir. Bunun yanında, FN'nin proteolizini sağlayan enzimlerden olan plazminin de MMP aktivasyonunu artırdığı bildirilmiştir (127).

Fibronektine etki eden bir serin proteaz olan elastaz başlıca nötrofiller olmak üzere monosit ve makrofajlar tarafında da üretilir (164, 165). Bu proteaz FN-EDA parçalarının oluşumunda rol oynar. EDA bölümü FN'deki "tip-III 11" ve "tip-III 12" bölümleri arasında bulunur. Elastaz, EDA ve "tip-III 12" bölümlerini birbirinden ayırarak EDA'nın açığa çıkmasını sağlar (8). Bu şekilde oluşan FN-EDA parçaları hücre yüzeyindeki reseptörleri (TLR4, $\alpha 4\beta 1$ ve $\alpha 9\beta 1$ integrinler) etkin bir şekilde uyararak tümörde inflamatuvar mikroçevrenin oluşumuna katkı sağlayabilir (166-168). FN-EDA ($\alpha 4\beta 1$ ve $\alpha 9\beta 1$ integrinler ve TLR4) reseptörlerinin düzeyi kanser gelişimi ile beraber artış gösterir. Meme kanserinde bu reseptörlerin aktivasyonu hücre proliferasyonu, immün sistemden kaçış, anjiyogenez, invazyon ve metastazla ilişkilidir. Üçlü negatif meme kanseri gibi invazyon kapasitesi yüksek meme kanserlerinde bu reseptörlerin ifadesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Meme kanserinde yüksek düzeydeki $\alpha 4\beta 1$ ve $\alpha 9\beta 1$ integrinlerin ve TLR4'ün artan fibronektin düzeyi ile korelasyon gösterdiği ve kötü prognoz ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (169-172).

Bu tez çalışmasının amacı, meme kanseri hücrelerinden üretilen fibronektinin miyeloid hücre karakterini nasıl etkilediğini belirlemektir. Bazal-benzeri meme kanserinde miyeloid hücre infiltrasyonu yüksektir ve kanser hücrelerinin ürettiği faktörler miyeloid hücreleri fenotipik ve fonksiyonel açıdan etkiler (4). Fibronektin miyeloid hücrelerin dokuya yerleşimine ve farklılaşmasına katkıda bulunur (5). Bazal-benzeri meme kanserinde fibronektin düzeyinin yüksek olduğu bilinmektedir (152, 154). Miyeloid hücrelerde immün düzenleyici karakterin ortaya çıkması STAT3 aktivasyonu ile ilişkilidir (6). STAT3 aktivitesi yüksek miyeloid hücreler tarafından üretilen pro-inflamatuvar sitokinler kanserin ilerlemesine neden olan inflamatuvar mikroçevrenin oluşumunda rol oynar (7). Diğer yandan, tümör dokusunda bulunan proteolitik enzimlerin, özellikle elastaz-2, fibronektini özgül

bölgelerinden keserek FN-EDA parçalarının oluşumunda rol oynadığı belirtilmiştir (8). FN-EDA'nın, TLR4 ve NF- κ B'yi uyarabilme kapasitesine sahip olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (8, 9). Bu bilgiler ışında, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden üretilen faktörlerin miyeloid hücrelerdeki STAT3 aktivitesini ve tümör mikroçevresindeki inflamatuvar karakterde önemli rol oynayan İL-1 β üretimini düzenlediği ve fibronektin/FN-EDA, elastaz ve TLR4 ekseninin meme kanserinde inflamasyonun devamlılığını sağladığı hipotezi oluşturuldu.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Eylül 2014 – Ekim 2018 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı ve Fransa Côte d’Azur Üniversitesi Valrose Biyoloji Enstitüsü Araştırma Laboratuvarları’nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki insan örnekleri kullanılarak yapılan deneyler için gerekli etik kurul kararı Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar no: GO 14/438-30).

3.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

Dulbecco’s modified eagle medium (DMEM), DMEM(1X)-GlutaMAX, RPMI 1640, McCoy’s 5A, penisilin/streptomisin çözeltisi, L-glutamin, fetal buzağı serumu (*fetal bovine serum*, FBS), 10X Tripsin–EDTA (Biological Industries, İsrail; Lonza, İsviçre; Biowest, Fransa); fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi tozu (*phosphate buffered saline*, PBS) (Advansta, ABD); tripan mavisini, sodyum florür, fenilmetilsülfonil florit (*phenylmethylsulfonyl flüoride*, PMSF), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), tris, β -merkaptöetanol, bromfenol mavisini, etanol, dietilpirokarbonat (*diethylpyrocarbonate*, DEPC), 3-sikloheksilamino-1-propansülfonik asit (*3-cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid*, CAPS), floresan-işaretli lateks boncuklar, ficoll 1.077 g/mL ve 1,119 g/mL (Sigma, ABD); dimetil sülfoksit (Origene, ABD); radyo-immün presipitasyon analizi (*radio-immunoprecipitation assay*, RIPA) tampon çözeltisi, proteaz inhibitör kokteyli, buzağı serum albümin, protein belirteci, polivinildiflorid (PVDF) membran, filtre kağıdı, bisikoninik asit (*bicinchoninic asit*, BCA) protein analiz kiti, DNaz enzimi (DNase I), *Dream Taq* tampon çözeltisi, *Taq* polimeraz enzimi, 25 mM dNTP çözeltisi, 50 baz çifti (bç) DNA belirteci, oligo(dT) primerler, 5X reaksiyon tampon çözeltisi, ribonükleaz inhibitörü (RiboLock), ters (*reverse*) transkriptaz (RT) enzimi (Thermo Scientific, ABD); 100 bç DNA belirteci (GeneDirex OneMark 100, ABD) *calyculin A*, p-STAT3 (Tyr705), total STAT3 ve β -aktin tavşan anti-insan monoklonal antikoları, anti-tavşan ve anti-fare IgG HRP bağlı sekonder antikolar (Cell Signaling, ABD); poliklonal keçi anti-fare immün globülin/HRP (Dako, ABD); forbol 12-miristat

13-asetat (*phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA), iyonomisin kalsiyum tuz çözeltisi (Cell Signaling, ABD; Sigma, ABD); sodyum dodesil sülfat (SDS) (JT Baker, ABD); gliserol (Gerbu, Almanya); amonyum persülfat (APS), tetrametiletilendiamin (TEMED), *SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix* çözeltisi (BioRad, ABD); glisin, metanol, Giemsa çözeltisi, entellan (Merck, Almanya); tween-20 (AppliChem, Almanya); yağsız süt tozu (Pinar, Türkiye); RNeasy Mini Kit (Qiagen, ABD); RNA temizleme ve konsantre etme kiti (Zymo Research, ABD); yükleme boyası (6X; Thermo Scientific, ABD; BioRad, ABD); Tris Borat EDTA (10X; Gibco, ABD); agaroz (Lonza, İsviçre); polimeraz zincir reaksiyonlarında (PZR) kullanılan oligonükleotitler (Sentegen, Türkiye); rekombinant insan İL-1 β , TNF- α , İL-6, İFN- γ (R&D, ABD); STAT3 inhibitörü V, (*Stattic*; Santa Cruz Biotechnology, ABD); fiksasyon ve permeabilizasyon çözeltisi (*Cytofix/Cytoperm*), permeabilizasyon yıkama tampon çözeltisi (1X; *PermWash Buffer*), *accudrop* boncukları, fare anti-insan fibronektin monoklonal antikoru (BD, ABD); boyden kemotaksis haznesi (Corning, ABD; BD, ABD); karboksi-diklorodihidrofloresan diasetat (H₂DCFDA) (Anaspec, ABD); karboksifloresin süksinimidil ester (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*, CFSE) (Invitrogen, ABD); fare anti-insan CD3 antikoru (HIT3a) (eBioscience, ABD); *MACS Human CD14 MicroBeads* (Miltenyi Biotec, Almanya); *EasySep Human CD14⁺ Selection* (Stem Cell Technologies, Kanada); DRAQ7 canlılık boyası, eritrosit liziz tampon çözeltisi, *Legend Max* İnsan İL-1 β ELISA kiti (Biolegend, ABD); HEK-Blue™ Detection tozu, zeosin, normosin, blastisidin ve HEK-Blue™ Selection antibiyotik, (Invivogen, ABD); pefabloc SC (Roche, Almanya); jelatin-sefaroze boncuklar (General Electric Healthcare, ABD); insan fibronektin ELISA kiti, insan PMN elastaz ELISA kiti, fare anti-insan fibronektin EDA monoklonal antikoru (Abcam, İngiltere).

3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Tam DMEM Besiyeri: Ticari olarak temin edilen düşük glikoz (1 g/L) veya yüksek glikoz (4.5 g/L) içeren DMEM kültür ortamına %10 oranında ısı ile inaktive edilmiş (56°C, 20 dk.) FBS, L-glutamin (2 mM) ve penisilin (100U)/streptomisin (100 µg/mL) antibiyotik çözeltisi eklendi. Hazırlanan besiyeri +4°C'de saklandı.

Tam RPMI 1640 Besiyeri: Ticari olarak temin edilen RPMI 1640 kültür ortamına %10 oranında ısı ile inaktive edilmiş (56°C, 20 dk.) FBS, L-glutamin (2 mM) ve penisilin (100U)/streptomisin (100 µg/mL) antibiyotik çözeltisi eklendi. Hazırlanan besiyeri +4°C'de saklandı.

Tam McCoy's 5A Besiyeri: Ticari olarak temin edilen McCoy 5A kültür ortamına %10 oranında ısı ile inaktive edilmiş (56°C, 20 dk.) FBS, L-glutamin (2 mM) ve penisilin (100U)/streptomisin (100 µg/mL) antibiyotik çözeltisi eklendi. Hazırlanan besiyeri +4°C'de saklandı.

Düşük Serumlu RPMI 1640 Besiyeri: Ticari olarak temin edilen RPMI 1640 kültür ortamına %1 oranında ısı ile inaktive edilmiş (56°C, 20 dk.) FBS, L-glutamin (2 mM) ve penisilin (100U)/streptomisin (100 µg/mL) antibiyotik çözeltisi eklendi. Hazırlanan RPMI 1640 besiyeri +4°C'de saklandı.

PBS Tampon Çözeltisi: Ticari olarak toz halinde temin edilen, 150 mM sodyum klorür ve 10 mM sodyum fosfat içeriğine sahip PBS, 500 mL distile suda (dH₂O) çözülerek 7.2 pH değerine sahip 1X PBS tampon çözeltisi hazırlandı. Hücre kültürü için otoklavlanarak sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

PBS-Tween-20 (PBS-T) Tampon Çözeltisi: Western-Blot deneylerinde kullanılmak üzere 1X PBS tampon çözeltisine final konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde *Tween-20* solüsyonu eklenerek PBS-T çözeltisi hazırlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Tripan Mavis: Toz halindeki tripan mavisinden hassas terazi ile 400 mg tartıldı ve 100 mL 1X PBS içinde çözüldü. Böylece %0.4 derişime sahip tripan mavis çözeltisi elde edildi. Bu çözelti 0.22 µm por büyüklüğüne sahip steril filtreden geçirildi ve alikotlanarak oda sıcaklığında saklandı.

Liziz Tampon Çözeltisi: Ticari olarak temin edilen RIPA tampon çözeltisine (25 mM Tris-HCl (pH: 7.6), 150 mM NaCl, %1 NP-40, %1 sodyum deoksikolat, %0.1 SDS) protein lizatı hazırlama aşamasından hemen önce, 1X proteaz inhibitör kokteyli (*protease inhibitor cocktail*, PIC), 200 mM sodyum florür (NaF), 50 nM *Calyculin A*, 5 mM EDTA ve 1 mM PMSF eklenerek +4°C soğuk odada hazırlandı ve taze şekilde kullanıldı.

Sodyum Florür (NaF) Çözeltisi: Stok çözelti olarak 10.5 g NaF 50 mL dH₂O içinde çözülerek 5 M NaF çözeltisi hazırlandı. Çözelti +4°C'de saklandı.

PMSF Çözeltisi: Toz halindeki 35 mg PMSF, 1 mL izopropil alkol içinde çözülerek 200 mM stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan çözelti -20°C'de saklandı.

EDTA Çözeltisi: Toz halindeki 7.3 g EDTA, 50 mL dH₂O içinde çözülerek 0.5 M konsantrasyona sahip stok çözelti hazırlandı. Çözelti +4°C'de saklandı.

Calyculin A Çözeltisi: Liyofilize halde bulunan *Calyculin A*, 200 µL DMSO içinde çözülerek 50 µM konsantrasyona sahip stok çözelti hazırlandı ve alikotlanarak -20°C'de saklandı.

SDS-jel Yükleme Tampon Çözeltisi: Bu çözelti 160 mM Tris-HCl (pH: 6.8), %20 gliserol, 0.6 mM bromfenol mavisi, %10 SDS ve 1.4 M β-merkaptotanol bileşenlerinden oluşmaktadır. β-merkaptotanol yüksek toksisiteye sahip olduğu için çözeltiliye çeker ocak içerisinde eklendi. Tris-HCl tampon görevi görür. Gliserol örneklerin kuyulara çökmesini, bromfenol mavisi reaksiyonun izlenmesini, SDS proteinin tamamen “-” yükle yüklenmesini, β-merkaptotanol ise proteinin primer yapıya dönmesini sağlar. Bu çözelti alikotlanarak +4°C'de saklandı.

Yürütme Tampon Çözeltisi: Final konsantrasyonu; 24.8 mM tris, 200 mM glisin ve 3.4 mM SDS olacak şekilde distile su içerisinde 10X konsantrasyonda hazırlandı. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi. Kullanılmadan önce distile su ile 1X konsantrasyona seyreltili.

Transfer Tampon Çözeltisi: Final konsantrasyonu; 24 mM tris ve 200 mM glisin olacak şekilde distile su içerisinde 5X konsantrasyonda hazırlandı. Çözelti +4°C'de saklandı. Kullanılmadan önce transfer tampon çözeltisi; absolut metanol ve distile su ile 1:1:3 oranında karıştırılarak 1X konsantrasyona seyreltili.

Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) Çözeltisi: Liyofilize haldeki 1 mg PMA, steril koşullarda 1 mL DMSO içinde çözülerek 1.6 mM stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözelti serum içermeyen RPMI 1640 besiyeri ile 80 µM (50 µg/mL) konsantrasyona seyreltili ve alikotlanarak -20°C'de saklandı.

İyonomisin Çözeltisi: Liyofilize haldeki iyonomisin steril koşullarda 1 mL DMSO içinde çözülerek 2.3 mg/mL stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözelti serum

içermeyen RPMI 1640 besiyeri ile 500 µg/mL konsantrasyona seyreltildi ve alikotlanarak -20°C'de saklandı.

Rekombinant İnsan Pro-inflamatuvar Sitokinleri: Liyofilize haldeki sitokinler steril koşullarda %0.1 buzağı serum albümini (BSA) içeren 1X PBS tampon çözeltisinde İL-1β ve TNF-α için 25 µg/mL, İL-6 için 50 µg/mL ve İFN-γ için dH₂O içerisinde 0.2 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde stoklar hazırlandı. Bu stoklardan, %0,1 buzağı serum albümini (BSA) içeren 1X PBS tampon çözeltisinde İL-1β ve TNF-α için 250 ng/mL, İL-6 için 500 ng/mL ve İFN-γ için FBS içermeyen RPMI 1640 içerisinde 20 µg/mL ara stok çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan stok ve ara stok çözeltiler alikotlandı ve -80°C'de saklandı.

STAT3 inhibitörü V, *Stattic*: Ticari olarak liyofilize halde temin edilen 25 mg *Stattic*, steril ortamda 2.4 mL DMSO içinde çözüldü (50 mM). Hazırlanan çözelti alikotlandı ve -80°C'de saklandı.

Karboksi-diklorodihidrofloresan Diasetat (H₂DCFDA): Liyofilize halde temin edilen 100 mg H₂DCFDA steril ortamda DMSO içinde çözülerek 100 mM çözelti hazırlandı ve alikotlanarak -80°C'de saklandı.

Karboksifloresin Süksinimidil Ester (CFSE): Liyofilize halde temin edilen 50 µg CFSE steril koşullarda 18 µL DMSO içinde çözülerek 5 mM çözelti hazırlandı ve alikotlanarak -80°C'de saklandı.

Anti-CD3 Monoklonal İnsan Antikor Çözeltisi: Fare anti-insan CD3 monoklonal antikorunu (1 mg/mL) serum içermeyen RPMI 1640 besiyeri ile 2 µg/mL konsantrasyona seyreltildi ve -20°C'de muhafaza edildi.

Primer ve Sekonder Antikorlar: Western-Blot analizlerinde kullanılan p-STAT3 (Tyr705), total STAT3 ve β-aktin tavşan anti-insan monoklonal antikorları ve fare anti-insan fibronektin ve fibronektin EDA monoklonal antikorları ile anti-tavşan ve anti-fare IgG HRP bağlı sekonder antikorlar PBS-T çözeltisi ile belirtilen konsantrasyonlara (primer antikorlar: p-STAT3 ve total STAT3, 1/1500; fibronektin ve fibronektin EDA, 1/1000; β-aktin, 1/2500, sekonder antikorlar: p-STAT3 için, 1/3000; total STAT3 ve β-aktin için, 1/5000; fibronektin ve fibronektin EDA için, 1/1500) seyreltildi.

Tris Borat EDTA (TBE) Tampon Çözeltisi: Tris (800 mM), borik asit (900 mM) ve EDTA (25 mM) bileşenlerinden 10X konsantrasyonda hazırlanan TBE tampon çözeltisi distile su ile 1X konsantrasyona seyreltili.

MACS Tampon Çözeltisi: Steril koşullarda 1X PBS içine %0.5 FBS ve 2 mM EDTA çözeltisi eklenerek hazırlandı. Hazırlanan çözelti alikotlandı ve +4°C'de saklandı.

CAPS Tampon Çözeltisi: Liyofilize halde temin edilen CAPS bileşeni distile suda çözülerek 0.2 M konsantrasyona ve 11 pH değerine sahip stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözelti kullanılarak 10 mM CAPS, 150 mM NaCl ve 1 mM CaCl₂ bileşenlerinden oluşan tampon çözelti hazırlandı. Hazırlanan çözelti +4°C'de saklandı.

HEK-Blue™ Detection Kültür Ortamı: Liyofilize halde temin edilen HEK-Blue™ Detection ajanı karanlık ortamda steril koşullarda paketinden dökülmek suretiyle 50 mL'lik tüpe aktarıldı ve 50 mL steril dH₂O ile çözüldü. Bu solüsyon 37°C su banyosunda 1 saat boyunca inkübe edildi. Bu süre sonunda HEK-Blue™ Detection kültür ortamı 0.2 µm por büyüklüğüne sahip filtreden süzüldü. Hazırlanan kültür ortamı +4°C'de saklandı.

Kristal Viyole Çözeltisi: Toz halindeki kristal viyole hassas terazi ile 200 mg tartıldı ve 100 mL 1X PBS içinde çözüldü. Böylece %0.2 derişime sahip kristal viyole çözeltisi elde edildi. Bu çözelti 0.22 µm por büyüklüğüne sahip steril filtreden geçirildi ve alikotlanarak oda sıcaklığında saklandı.

3.3. Hücre Kültürü

Bu tez çalışmasında kullanılan meme kanseri hücre hatlarından (Tablo 3.1) lüminal özelliğe sahip MCF-7, BT474 ve bazal-benzeri özelliğe sahip MDA-MB-468, MDA-MB-231 tam DMEM kültür ortamında; lüminal özelliğe sahip ZR75-1 ve bazal-benzeri özelliğe sahip HCC38 tam RPMI 1640 kültür ortamında; HER2-pozitif özelliğe sahip SKBR3 tam McCoy's 5A kültür ortamında; lüminal özelliğe sahip T47D 0.01 µg/mL insülin içeren tam RPMI kültür ortamında çoğaltıldı. İmmatür özellikteki akut miyeloid lösemi hücre hatları KG-1, HL-60, THP-1 ve U937 (Tablo 3.2) tam RPMI

kültür ortamında çoğaltıldı. Bölümümüzde daha önce gerçekleşen “STAT3 aracılı İFN- γ sinyali ile AML hücrelerinin CD11b⁺ alt popülasyonundaki PD1 ligandlarının modülasyonu” başlıklı çalışma için Dr. Tolga Sütü (Sabancı Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, SUNUM) tarafından hediye edilen *short hairpin* (sh) kontrol (pSIH1-puro-kontrol shRNA), shSTAT3 (pSIH1-puro-STAT3 shRNA) (173), dominant negatif STAT3 (STAT3DN) (EF.STAT3DN.Ubc.GFP) (174) ve GFP kontrol (LeGO-G2) (175) içeren plazmid vektörler ile modifiye edilmiş THP-1 hücreleri tam RPMI kültür ortamında çoğaltıldı. FN-EDA⁺ ve FN-EDA⁻ plazmid vektörler ile modifiye edilmiş HEK-293FT hücreleri 7.5 μ g/mL blastisidin içeren tam DMEM(1X)-GlutaMAX kültür ortamında çoğaltıldı. HEK-BlueTM hTLR4 ve Null2 hücreleri 100 μ g/mL normosin içeren yüksek glikozlu tam DMEM kültür ortamında çoğaltıldı ve 2. pasajdan sonra kültür ortamına HEK-BlueTM hTLR4 hücreleri için 1X HEK-BlueTM Selection, HEK-BlueTM Null2 hücreleri için ise 100 μ g/mL zeosin eklendi. Hücreler %5 CO₂ içeren 37°C’deki inkübatörde muhafaza edildi.

Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan meme kanseri hücre hatları

Hücre Hattı	Alt-tipi	ER	PR	HER2	Histolojisi
MCF-7	Lüminal A	+	+	-	İDK
BT474	Lüminal B	+	+	+	İDK
T47D	Lüminal A	+	+	-	İDK
ZR75-1	Lüminal A	+	+	-	İDK
SKBR-3	HER2-pozitif	-	-	+	AK
MDA-MB-468	Bazal-benzeri A	-	-	-	AK
MDA-MB-231	Bazal-benzeri B	-	-	-	AK
HCC38	Bazal-benzeri B	-	-	-	DK

ER: Östrojen reseptörü, PR: Progesteron reseptörü, HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2, İDK: İnvazif duktal karsinom, AK: Adenokarsinom, DK: Duktal karsinom

Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan miyeloid hücre hatları

Hücre Hattı	Matürasyon Derecesi	Hücre Tipi
KG-1	M1	Miyeloblastik
HL-60	M2-M3	Promiyelositik
THP-1	M5	Monositik
U937	M5	Histiyositik

3.3.1. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Çözülmesi

Dondurulması planlanan hücre hatları 5 mL tam besiyerinde süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonu üzerine 4 mL FBS ve 1 mL DMSO eklenerek dondurma çözeltisi hazırlandı. Bu karışım, her vialde 1 mL olacak şekilde, viallere aktararak alikotlandı. Vialler donma kabına koyuldu ve bir gece -80°C 'de saklandı. Bu süre sonunda vialler -196°C sıvı azot içeren tankın buhar fazında bulunan kaplara yerleştirildi.

Bu tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarını içeren vialler sıvı azottan buhar fazında bulunan kaplardan alınarak daha önce 37°C su banyosunda ısıtılmış distile su içeren beherlere aktarıldı. Bu vialler etil alkol ile sterilize edildikten sonra hücre kültürü ortamına alındı. Vialler içinde bulunan hücre süspansiyonu pastör pipeti kullanılarak 37°C tam besiyeri ile yıkandı ve 50 mL'lik tüplere aktarıldı. Hücre süspansiyonu santrifüj (2000 rpm , 5 dk. , oda sıcaklığı) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atıldı. Hücreler tam besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra T25 veya T75 flasklara alınarak 5% CO_2 içeren 37°C 'de nemli inkübatöre kaldırıldı.

3.3.2. Hücrelerin Pasajlanması

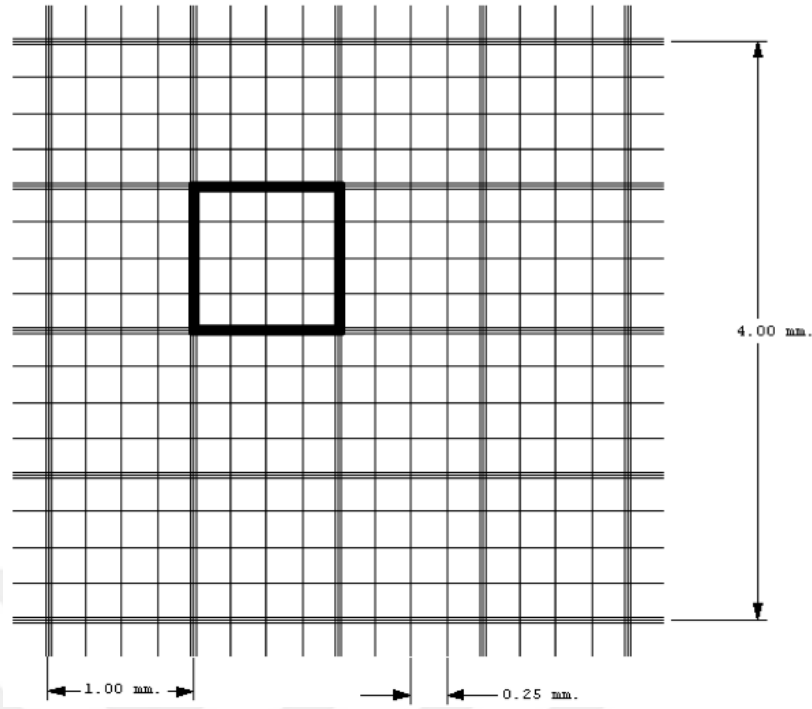
Hücrelerin yaklaşık 80% yoğunlukta olmalarına dikkat edildi. Bu yoğunluğa ulaşan aderan özellikteki hücreler tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak pasajlandı. Öncelikle hücrelerin bulunduğu flasklardan besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X PBS çözeltisi ile flaskın duvarında bulunan hücreler yıkandı. PBS ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra 10X konsantrasyonda tripsin-EDTA çözeltisi (T25 flasklar için $300\ \mu\text{L}$; T75 flasklar için $600\ \mu\text{L}$) eklendi ve inkübatörde $2-5\text{ dk.}$ inkübe edildi. Flaska tam besiyeri eklenerek hücreler toplandı ve 50 mL'lik tüplere aktarıldı. Analizlerde kullanılacak hücre sayısını belirlemek için hücre sayımı gerçekleştirildi (Bkz. Hücre sayımı). Hücre çoğalmasının devamlılığı sağlamak amacıyla, T75 flasklar için $2-3\text{ mL}$, T25 flasklar için $0.5-1\text{ mL}$ hücre süspansiyonu üzerine tam besiyeri eklendi (T75 flasklar için $15-18\text{ mL}$; T25 flasklar için $5-7\text{ mL}$) ve hücreler inkübatöre kaldırıldı.

HEK-Blue™ hTLR4 ve HEK-Blue™ Null2 hücreleri %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1X PBS tampon çözeltisi ile yıkandı. Hücrelerin bulunduğu T75 flasklara 5 mL 1X PBS tampon çözeltisi eklendi ve 37°C %5 içeren CO₂ inkübatörde 1-2 dakika bekletildi. Bu süre sonunda T75 flasklara hafifçe vurularak hücreler kaldırıldı ve 50 mL'lik falkonlara aktarıldı. Hücre çoğalmasının devamlılığı için, T75 flasklarda 1-2 mL hücre süspansiyonu üzerine 18-20 mL tam besiyeri eklendi ve hücreler inkübatöre kaldırıldı.

Süspense halde çoğalan hücre hatlarında ise flaskın tabanına çöken hücrelere pipetaj yapılarak besiyerinde homojen olarak dağılması sağlandı. Bu hücreler doğrudan 50 mL'lik tüplere aktarıldı ve analizlerde kullanılacak hücre sayısını belirlemek için hücre sayımı gerçekleştirildi (Bkz. Hücre sayımı). Hücre çoğalmasının devamlılığı sağlamak amacıyla, T75 flasklar için 4-5 mL, T25 flasklar için 1-2 mL hücre süspansiyonu üzerine tam RPMI 1640 besiyeri eklendi (T75 flasklar için 15-18 mL; T25 flasklar için 5-7 mL) ve hücreler inkübatöre kaldırıldı.

3.3.3. Hücre Sayımı

Hücre sayımı için hücre süspansiyonu (10 µL) ve tripan mavisini (10 µL) 1:1 oranında karıştırıldı. Ardından bu karışım Fuchs-Rosental hemositometresinde lam ile lamel arasında aktarıldı ve ışık mikroskopunda (10X) boyayı içine almamış canlı hücreler sayıldı. Sayım, lam üzerinde siyah kare ile çevrelenmiş büyüklüğe sahip alanlarda bulunan hücreler, her satır ve sütundan birer tane olacak şekilde dört tane, sayılarak yapıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Hücre sayımı için kullanılan Fuchs-Rosental hemositometresinin şematik görünümü.

Hücre sayımının yapıldığı Fuchs-Rosental hemositometresinde sayılan alanların ölçüleri 1 mm x 1 mm olup lam ile lamel arasındaki uzaklık 0.1 mm'dir (Celeromics, Fuchs-Rosental Hemositometresi, İngiltere). Hücre sayısı bu değerlerden yola çıkılarak aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Formül 3.1).

$$\text{Alan} = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2$$

$$\text{Hacim} = 1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4}$$

$$\text{Hücre sayısı / mL} = \frac{\text{Sayılan toplam hücre} \times \text{Seyreltme faktörü}}{\text{Sayılan alan}} \times 10.000 \quad (3.1)$$

3.3.4. Ko-kültür Deneyleri

Farklı moleküler tipteki meme kanseri hücrelerinin miyeloid farklılaşma modeli olarak kullandığımız immatür özellikteki AML hücreleri ile yapılacak ko-kültür

deneylerinin hücre canlılığı üzerine etkisi test edildi (Bkz, Hücre kültürü 3.3). Ko-kültür öncesi meme kanseri hücre hatlarının adheran özellik kazanmaları için bir gün önceden 24-kuyulu plaklara ekimi gerçekleştirildi. Ertesi gün süspansiyon haldeki miyeloid hücre hatları meme kanseri hücre hatlarının üzerine çeşitli oranlarda ($1 \cong 2.5 \times 10^5$; 1:1, 1:2, 2:1, 2:2) eklendi ve 48 saat boyunca ko-kültür yapıldı. İnkübasyon sonunda miyeloid hücreler pipetaj yapılarak toplandı ve canlılık analizi için 1:1 oranında tripan mavisi ile boyanarak ışık mikroskopunda Fuchs-Rosental hemositometresi ile sayıldı (Bkz. Hücre sayımı 3.3.3). Benzer ko-kültür yaklaşımı miyeloid hücre olgunlaşma analizleri için de kullanıldı.

3.3.5. Meme Kanseri Hücre Hatlarından Süpernatant Eldesi ve Miyeloid Hücrelerin Uyarılması

Meme kanseri hücre hatları 5×10^5 hücre/mL yoğunlukta tam RPMI 1640 besiyeri içerisinde T75 flaslara aktararak 48 saat boyunca inkübe edilmek üzere %5 CO₂ içeren 37°C'de nemli inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon sonunda toplanan besiyeri hücrelerden ve hücre atıklarından arındırılmak üzere santrifüj (2000 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi.

T75 flaslarda bulunan THP-1, U937, plazmid vektörler (shkontrol, shSTAT3, GFP kontrol, STAT3DN) ile modifiye edilmiş THP-1 hücreleri ve periferik kandan izole edilen monositler 50 mL'lik tüplere aktarıldı ve hücre sayımı gerçekleştirildi. Her hücre grubundan 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde hücreler ayrı 50 mL'lik tüplere alındı ve santrifüj edildi (2000 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı). Besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra miyeloid hücreler meme kanseri hücre hatlarından elde edilen süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde karıştırılarak süspansiyon haline getirildi. Bu hücreler deney koşullarına göre belirlenen sürelerde inkübe edildi.

3.3.6. Meme Kanseri Hücre Hatlarının Pro-inflamatuvar Sitokinler ile Uyarılması

Meme kanseri hücre hatları 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde T25 flaslara ekildi. Bu hücreler %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatöre kaldırıldı ve adheran özellik

kazanmaları için bir gece inkübe edildi. Hücreler aderan özellik kazandıktan sonra İL-1 β , TNF- α ve İL-6 sitokinleri için 20U (ED₅₀, İL-1 β 0.2 ng/mL; TNF- α 0.8 ng/mL; İL-6 10 ng/mL) ve 40U (2xED₅₀, İL-1 β 0.4 ng/mL; TNF- α 1.6 ng/mL; İL-6 20 ng/mL) İFN- γ sitokini için 200U (ED₅₀, 150 ng/mL) ve 400U (2xED₅₀, 300 ng/mL) olmak üzere iki farklı konsantrasyonda pro-inflamatuvar sitokinler hücrelerin besiyerine eklendi ve 48 saat inkübe edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı.

İnkübasyon sonunda T25 flasklardaki hücrelerin süpernatantları toplanarak santrifüj edildi (2000 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı). Santrifüj sonrası süpernatantlar ELISA analizi için 1.5 mL'lik tüplere aktarıldı ve -80°C'de saklandı. Flasklardaki hücreler ise RNA izolasyonu için kullanıldı (Bkz. Gen İfade Analizleri 3.7). Ayrıca İL-1 β ile inkübe edilen bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarından elde edilen süpernatantlar Western-Blot analizlerinde kullanıldı.

3.3.7. Miyeloid Hücrelerde STAT3 Yolağının İnhibisyonu

Miyeloid hücre hatlarında ve periferik kandan izole edilen monositlerde STAT3 yolağının inhibisyonu küçük inhibitör molekül *Stattic* aracılığı ile gerçekleştirildi. Miyeloid hücreler bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile uyarılmadan önce 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 50 mL'lik tüplere aktarıldı. Final konsantrasyonu THP-1 ve monositler için 5 μ M, U937 için ise 2.5 μ M olacak şekilde *Stattic* eklendi ve 45 dk. boyunca inkübe edilmek üzere %5 CO₂ içeren 37°C'de nemli inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon sonunda hücreler santrifüj edildi (2000 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) ve süpernatantlar uzaklaştırıldı. Miyeloid hücreler meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde süspansiyon edildi. Ayrıca kontrol grubu olarak *Stattic* inhibitörü ile inkübe edilmeyen miyeloid hücreler kullanıldı.

3.4. Akım Sitometri

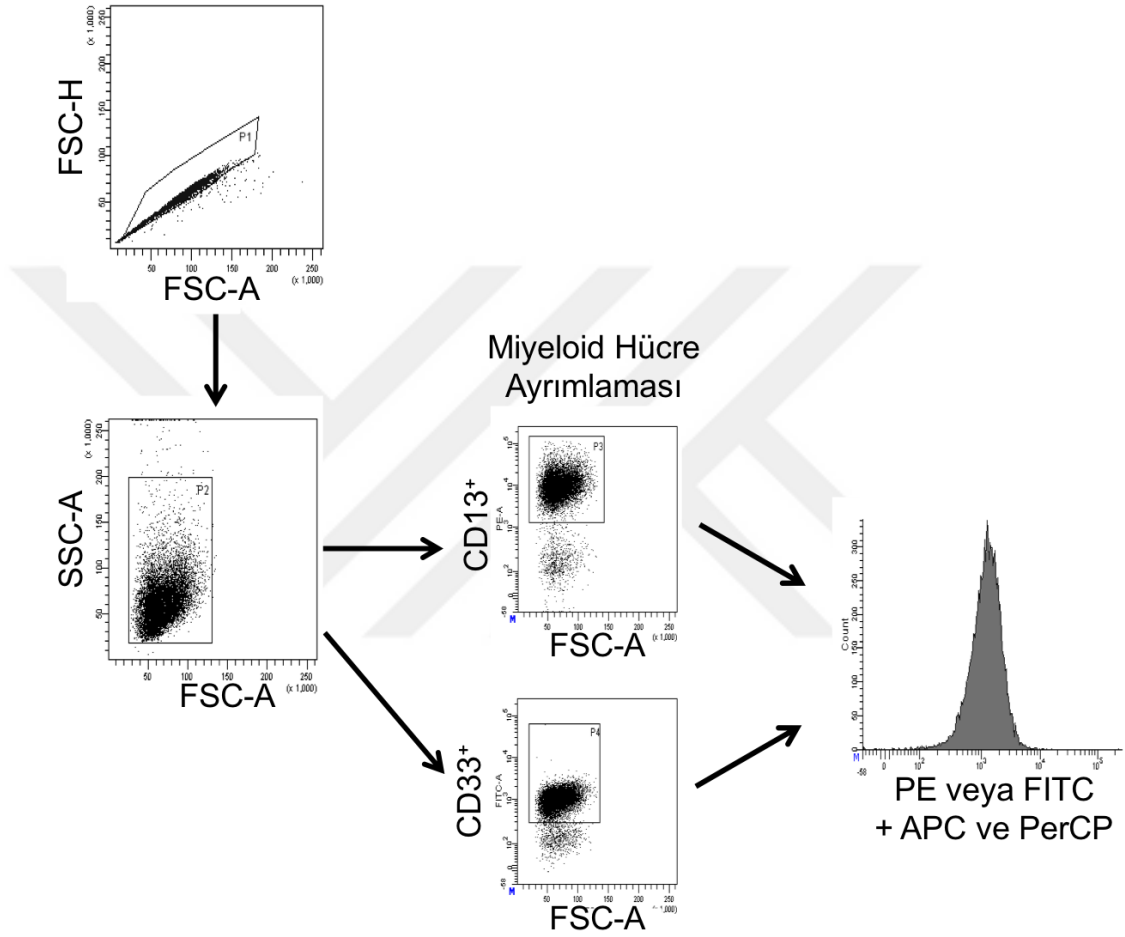
Meme kanseri hücrelerinin miyeloid hücreler ile yapılan ko-kültürlerinde pipetaj yapılarak toplanan aderan hücrelerden veya süspansiyon halindeki hücrelerden besiyerini uzaklaştırmak için santrifüj yapıldı (1800 rpm, 5 dk, oda

sıcaklığı). Santrifüj sonrası süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve hücreler 100 µL *Cell Wash* çözeltisi ile süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonuna özgül antikolar eklenerek +4°C'de 40 dk. inkübe edildi (Tablo 3.3). İnkübasyon sonunda hücreler ile etkileşmeyen antikoları uzaklaştırmak için hücreler yıkama solüsyonu ile santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 150 µL yıkama solüsyonu ile süspansiyon haline getirildi. Hücre belirteçlerinin düzeyi FACS Aria II akım sitometri cihazı (BD, ABD) ve FACS Diva yazılımı (BD, ABD) aracılığı ile floresan yoğunluğuna göre analiz edildi. Ko-kültürdeki miyeloid hücreleri meme kanseri hücrelerinden ayırmak amacıyla CD13 veya CD33 belirteçleri için işaretleme yapıldı. Hücrelerin tek tek analiz edilmesini sağlamak için *forward scatter height* (FSC-H) ve *forward scatter area* (FSC-A) dağılım grafiği kullanıldı. Bu hücrelerin granülaritesine ve boyutlarına göre dağılımını belirlemek için *side scatter area* (SSC-A) ve FSC-A dağılım grafiği oluşturuldu. CD13 ve CD33 pozitif hücreler içinden florokrom ile işaretli özgün antikolarla boyanan hücrelerdeki ortanca floresan yoğunluğu (OFY) değerleri uygun izotipik kontrol antikoruna ile işaretli hücrelerin OFY değerlerine oranlanarak normalize edildi (Formül 3.2, Şekil 3.2).

Tablo 3.3. Akım sitometri analizlerinde kullanılan antikorlar

<i>Antikor</i>	<i>Klon</i>	<i>Üretici</i>	<i>Florokrom</i>
<i>CD11b</i>	D12	BD, ABD	PE
	ICRF44	Biologend, ABD	APC/Cy7
<i>CD11c</i>	S-HCL3	BD, ABD	PE
<i>CD13</i>	L138	BD, ABD	PE
<i>CD14</i>	M5E2	BD, ABD	FITC
	63D3	Biologend, ABD	APC/Cy7
<i>CD15</i>	HI98	BD, ABD	FITC
<i>CD16</i>	3G8	BD, ABD	FITC
<i>CD33</i>	HIM3-4	BD, ABD	FITC
<i>CD34</i>	8G12	BD, ABD	PE
<i>CD40</i>	5C3	BD, ABD	FITC / PE
<i>CD45</i>	2D1	Biologend, ABD	PerCP
<i>CD62L</i>	DREG-56	BD, ABD	APC
<i>CD66b</i>	G10F5	BD, ABD	FITC
<i>CD83</i>	HB15e	BD, ABD	PE
<i>CD103</i>	Ber-ACT8	BD, ABD	FITC
<i>CCR7</i>	150503	R&D, ABD	PerCP
<i>HLA-DR</i>	G46-6	BD, ABD	FITC
<i>TLR4</i>	HTA125	Biologend, ABD	PE
<i>MD2</i>	18H10	Abcam, İngiltere	FITC
<i>CD4/CD8</i>	SK3/SK1	BD, ABD	FITC/PE
<i>Fibronektin</i>	P1H11	R&D, ABD	FITC
<i>İzotipik kontrol IgG1/IgG1</i>	X40/X40	BD, ABD	FITC/PE
<i>İzotipik kontrol IgG2b</i>	141945	R&D, ABD	APC
<i>İzotipik kontrol IgG2a</i>	20102	R&D, ABD	PerCP

$$\text{Normalize OFY değeri} = \frac{\text{Özgün antikor ile işaretli hücre OFY değeri}}{\text{İzotipik kontrol antikoru ile işaretli hücre OFY değeri}} \quad (3.2)$$



Şekil 3.2. Akım sitometri ile hücrelerin tek tek ayrılma ve miyeloid hücre belirteçlerinin analiz stratejisi

Hücre-içi protein düzeyini belirlemek için, 5×10^5 hücre/4 mL olacak şekilde T25 flasklara ekilen meme kanseri hücreleri pro-inflamatuvar sitokinler ile 48 saat uyarım sonrasında kazıyıcı ile zikzak şeklinde kazınarak flaskların tabanından kaldırıldı ve süspansiyon haline getirildi. Bu hücre süspansiyonu 47 μ m por

büyüklüğüne sahip filtreden süzülerek 15 mL'lik tüplere aktarıldı ve santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi. Pellet üzerine fiksasyon ve permeabilizasyon çözeltisinden (*Cytofix/Cytoperm*, BD, ABD) 400 µL eklendi ve nazik bir şekilde pipetaj yapılarak karıştırıldıktan sonra +4°C'de 30 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 2 kez 1 mL 1X permeabilizasyon yıkama tampon çözeltisi (*PermWash Buffer*, BD, ABD) eklenerek santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi. Son santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve 100 µL 1X permeabilizasyon yıkama tampon çözeltisi eklenerek hücreler süspansiyon haline getirildi. Hücreler izotipik kontrol antikoru ve anti-fibronektin antikoru ile +4°C'de 30 dk. inkübe edildi. İki kez yıkama yapıldıktan sonra, hücreler 150 µL 1X PBS tampon çözeltisinde süspansiyon haline getirildi. Yukarıda anlatıldığı şekilde akım sitometri ile analizler gerçekleştirildi. Özgün antikor ile işaretli hücrelerdeki pozitif hücre yüzdesi, izotipik kontrol antikoru ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.4.1. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Analizi

Analiz edilecek hücreler akım sitometri tüplerine aktarıldı ve santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi. Süpernatantlar uzaklaştırıldı ve hücreler 1X PBS ile süspansiyon haline getirildi. Hücreler karanlık ortamda 2 nM konsantrasyondaki H₂DCFDA ajanı ile inkübe edildi ve %5 CO₂ içeren 37°C'deki nemli inkübatörde 30 dk. tutuldu. İnkübasyon sonunda buz üzerine alınan tüplere 1 mL PBS çözeltisi eklendi ve santrifüj (2000 rpm, 5 dk., +4°C) edildi. Hücreler PBS tampon çözeltisi ile süspansiyon haline getirildi ve buz üzerine alındı

ROT düzeyi akım sitometri (495 nm eksitasyon, 529 nm emisyon) ile değerlendirildi (Bkz. Akım sitometri 3.4). Hücrelerin ROT üretim kapasitesi ortanca floresan yoğunluğu değerlerine göre analiz edildi.

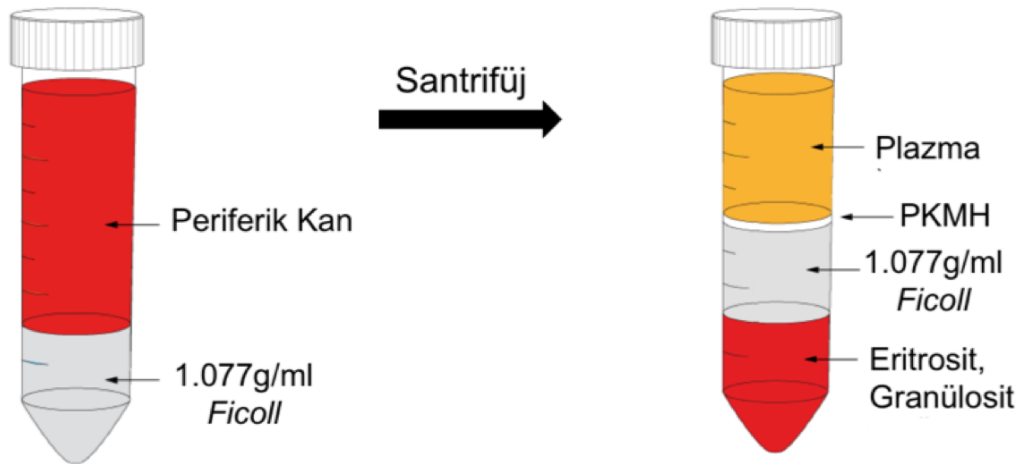
3.4.2. Fagositoz Analizi

Floresan-işaretli lateks boncuklar opsonizasyon için 1:1 oranında AB insan serumu ile karıştırıldı ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Miyeloid hücrelere 5 µL/mL lateks boncuk-serum karışımı eklendi. Karışımın hücre süspansiyonu içinde homojen

bir şekilde dağılması için kısaca vorteks yapıldı ve %5 CO₂ içeren 37°C'deki nemli inkübatörde 4 saat inkübe edildi. Analizler akım sitometri (575 nm eksitasyon, 610 nm emisyon) ile değerlendirildi.

3.4.3. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PKMH) İzolasyonu

Sağlıklı kişilerden EDTA içeren tüplere alınan kanlar 1:1 oranında FBS içermeyen RPMI 1640 besiyeri ile karıştırıldı. 15 mL'lik tüplere 3 mL *Ficoll* 1.077 g/mL eklendi. Üzerine kan örnekleri pastör pipeti yardımıyla yavaşça yayıldı ve santrifüj (400 g, 25 dk., oda sıcaklığı) edildi. Daha sonra, PKMH'lerin olduğu kısım pastör pipeti yardımıyla toplanarak ayrı bir tüpe aktarıldı (Şekil 3.3). Tüp tamamen PBS çözeltisi ile dolduruldu ve santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler PBS çözeltisi ile süspansiyon haline getirildi.

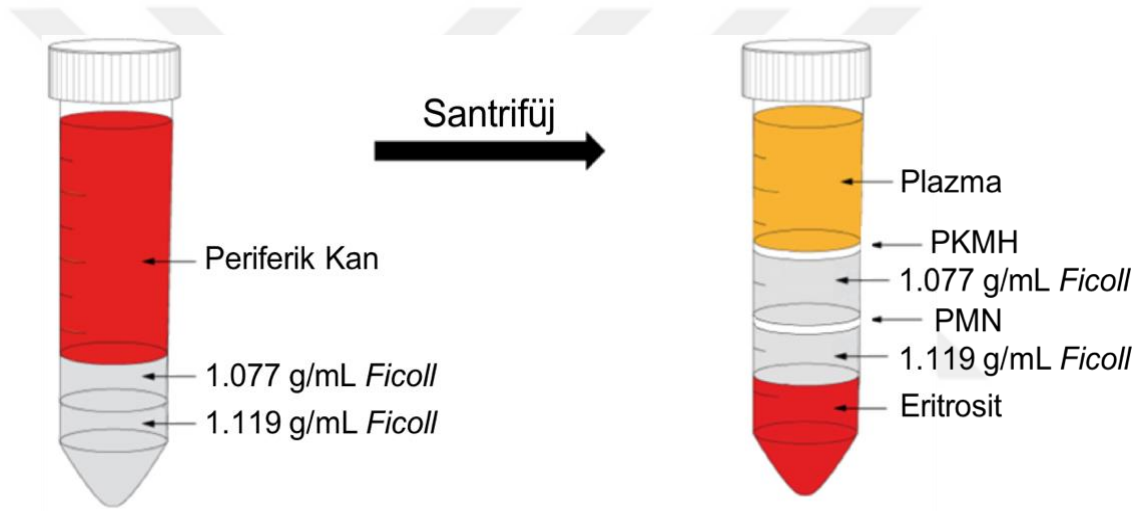


Şekil 3.3. Periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu

3.4.4. Periferik Kandan Polimorfonükleer (PMN) Lökosit İzolasyonu

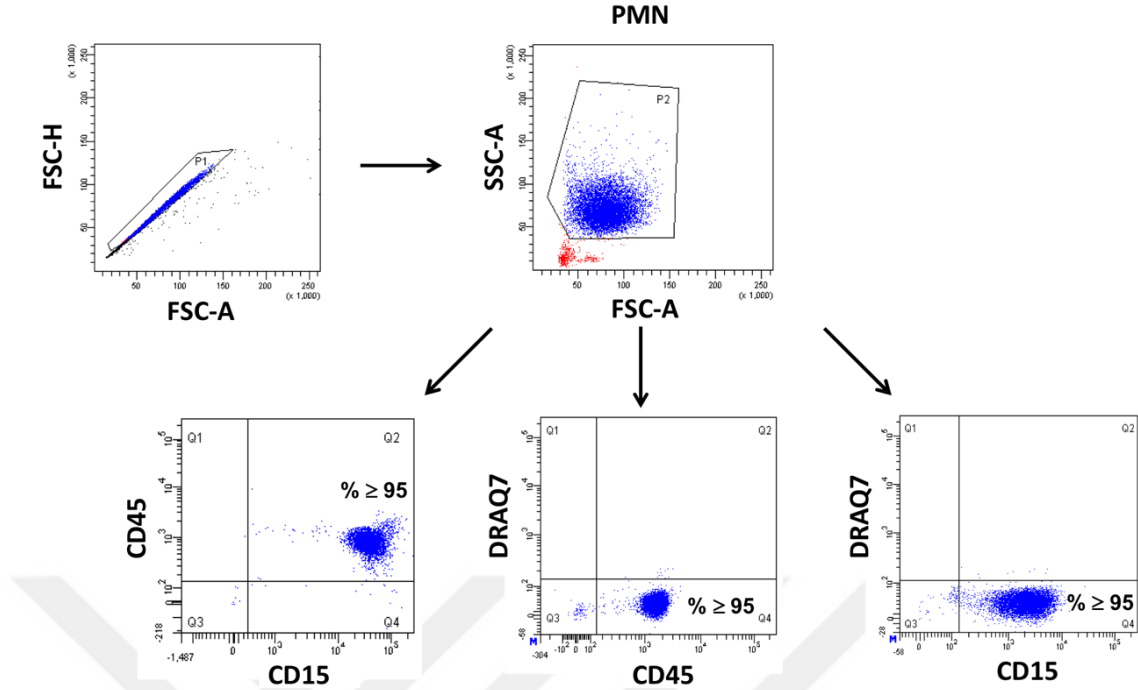
Sağlıklı kişilerden EDTA içeren tüplere alınan kanlar 1:1 oranında FBS içermeyen RPMI 1640 besiyeri ile karıştırıldı. 50 mL'lik tüplere 10'ar mL sırasıyla *Ficoll* 1.119 g/mL ve 1.077 g/mL eklendi. Üzerine kan örnekleri pastör pipeti

yardımıyla yavaşça yayıldı ve santrifüj (400 g, 25 dk., oda sıcaklığı) edildi. Daha sonra, PMN'lerin olduğu kısım pastör pipeti yardımıyla toplanarak ayrı bir tüpe aktarıldı (Şekil 3.4). Tüp tamamen PBS ile dolduruldu ve iki kez santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 200 µL tam RPMI 1640 besiyeri ile süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonundan eritrositleri uzaklaştırmak için tüpe 3 mL 1X eritrosit lizis tampon çözeltisi eklendi ve tüp 5 dk. boyunca oda sıcaklığında ters-düz edilerek karıştırıldı. Hücre solüsyonuna tam RPMI 1640 besiyeri eklenerek iki kez yıkandı. Pellette eritrosit olup olmadığı kontrol edildi. Eritrosit varsa eritrosit lizis işlemi tekrar edildi.



Şekil 3.4. Periferik kandan polimorfonükleer (PMN) hücre izolasyonu

Elde edilen PMN lökositlerin canlılık ve saflığını belirlemek için bir miktar PMN hücre süspansiyonu alınarak anti-insan CD45 ve CD15 antikorları ile işaretlendi (Tablo 3.3), canlılık için DRAQ7 (633 nm eksitasyon, 695 nm emisyon) boyaması yapıldı ve akım sitometri cihazında analiz edildi (Bkz. Akım sitometri 3.4). Hücre canlılığı ve saflığının yaklaşık olarak %95 veya daha fazla bulunması ile PMN hücreleri ileriki deneylerde kullanıldı (Şekil 3.5).

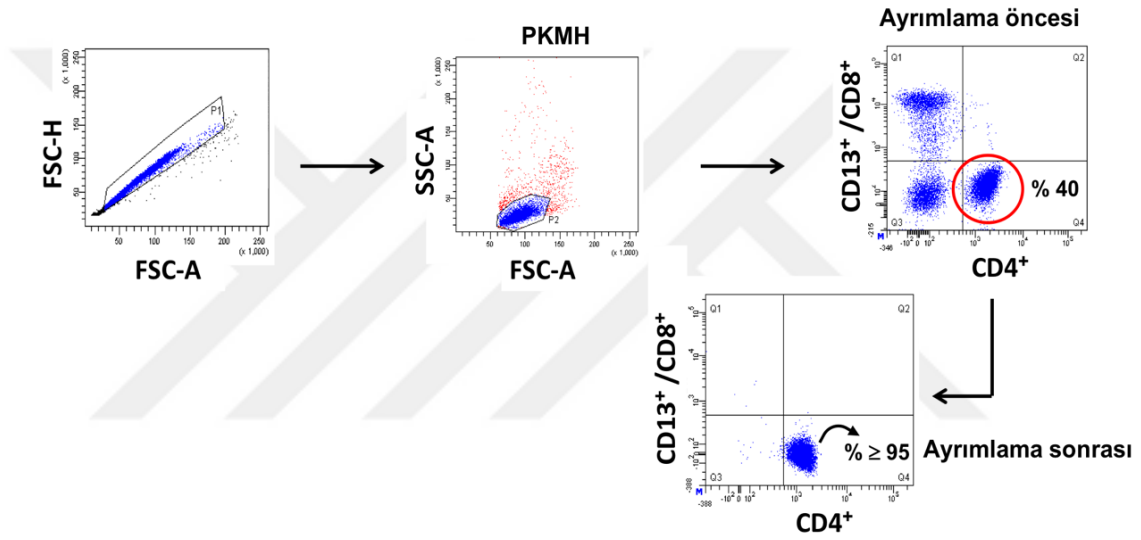


Şekil 3.5. İzolasyon sonrası polimorfonükleer lökositlerin (PMN) akım sitometri ile canlılık ve saflık analizi

3.4.5. Floresan-aktif Hücre Ayırma (*fluorescence-activated cell sorting, FACS*) Yöntemi ile CD4⁺ T Hücre Eldesi

Periferik kan mononükleer hücre popülasyonundan CD4⁺ T hücrelerin eldesi için PKMH'ler üzerine CD4, CD8 ve CD13 antikoru eklendi ve 20 dk. oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre süspansiyonunun hacmi 7-8 mL olacak şekilde tam RPMI 1640 besiyeri eklendi. CD4⁺ T hücrelerin eldesi FACSriaII akım sitometri cihazı ve FACS Diva yazılımı kullanılarak floresan-aktif hücre ayırma yöntemi ile gerçekleştirildi. Hücrelerin etkili bir şekilde ayrılması için gerekli ayarların yapılmasını sağlamak ve verimliliği test etmek amaçlı olarak *Accudrop* boncuklar kullanıldı. FACS Diva yazılımında, akış penceresinde gözükten damlaların pencerenin 1/3'ünden olacak şekilde kopmasına dikkat edildi. *Gap* değeri 6 olacak şekilde genlik (*amplitude, Ampl*) ve frekans (*Freq*) ayarları yapıldı. Alan ölçeklendirme

(*area scaling*) değeri 0.9 olarak ayarlandıktan sonra FSC-H/FSC-A dağılım grafiği ile hücrelerin tek tek analiz edilmesi sağlandı. SSC-A/FSC-A dağılım grafiğinde mononükleer hücrelerin seçilmesinden sonra florokrom ile işaretli spesifik antikolarla boyanan hücreler için ayrı bir grafik oluşturuldu. Bu grafik aracılığı ile CD4⁺ T hücreleri seçilerek hücre ayırılması işlemi gerçekleştirildi. Ayırılma sonrası elde edilen hücre süspansiyonu akım sitometri cihazında analiz edildi. Yaklaşık %95 veya daha fazla oranda saf CD4⁺ T hücre izolasyonu gerçekleştirildiği belirlendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. FACS ile CD4⁺ T hücrelerinin izolasyon stratejisi

3.4.6. Manyetik-aktif Hücre Ayırılma (*magnetic activated cell sorting, MACS*) Yöntemi ile Monosit İzolasyonu

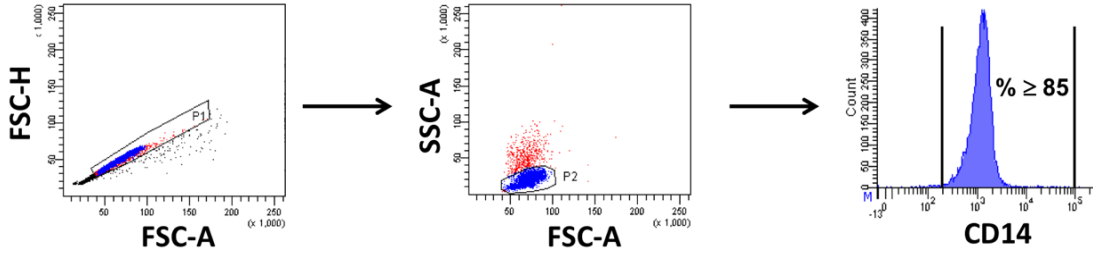
Periferik kandan monositlerin izolasyon işlemi için *EasySep Human CD14⁺ Selection* (Stem Cell Technologies, Kanada) kiti veya *MACS Human CD14 MicroBeads* (Miltenyi Biotec, Almanya) kiti kullanıldı.

Periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu (Bkz. PKMH izolasyonu) yapıldıktan sonra *EasySep Human CD14⁺ Selection* kit protokolüne göre; PKMH'ler sayıldı ve santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi. Santrifüj sonrası

1×10^7 hücre 100 μL *EasySep* tampon çözeltisi ile süspansiyon haline getirildi. Kit içeriğinde bulunan seleksiyon kokteyl solüsyonu (10 μL) eklendi ve yavaşça karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda manyetik boncukları içeren bileşenden 10 μL hücre süspansiyonuna eklendi ve 3 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu süre sonunda 2.5 mL *EasySep* tampon çözeltisi hücre süspansiyonu ile karıştırıldı ve hücrelerin bulunduğu tüp *EasySep Magnet*'e yerleştirilerek oda sıcaklığında 3 dk. inkübe edildi. Tüp magnetten çıkarılmadan içindeki sıvı kısım dökülerek manyetik boncuklar ile etkileşmeyen hücreler uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Daha sonra tüp magnetten çıkarıldı ve tüp içerisinde kalan hücreler (monositler) tam RPMI 1640 besiyeri ile süspansiyon haline getirildi.

MACS Human CD14 MicroBeads kiti protokolüne göre ise PKMH izolasyonu sonrası hücreler sayıldı (Bkz. Hücre Sayımı 3.3.3) ve santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi. Santrifüj sonrası 1×10^7 hücre 80 μL MACS tampon çözeltisi ile süspansiyon edildi. Kit içeriğinde bulunan *CD14 MicroBeads* solüsyonu (20 μL) eklendi ve yavaşça karıştırılarak $+4^\circ\text{C}$ 'de 15 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1×10^7 hücre 2 mL MACS tampon çözeltisi ile yıkandı ve hücreler 500 μL 'de süspansiyon haline getirildi. Kit içeriğinde bulunan kolon manyetik ayırıcıya yerleştirildi. Hücre süspansiyonu eklenmeden önce kolondan tampon çözelti geçirildi. Daha sonra hücre süspansiyonu kolona eklendi. Manyetik boncuklar ile etkileşmeyen hücreler uzaklaştırıldı ve kolon 3 kez MACS tampon çözeltisi ile yıkandı. Kolon manyetik ayırıcıdan alınarak toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona yaklaşık olarak 5 mL MACS tampon çözeltisi eklendi ve piston aracılığı ile kolondan geçirilerek hücreler toplama tüpüne aktarıldı.

Elde edilen monositlerin saflığını belirlemek için bir miktar monosit süspansiyonu alınarak anti-insan CD14 antikoru ile işaretlendi ve akım sitometri cihazında analiz edildi (Bkz. Akım sitometri 3.4). Hücre saflığının yaklaşık %85 veya daha fazla bulunması ile monositler ileriki deneylerde kullanıldı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. MACS sonrası CD14⁺ monositlerin akım sitometri ile saflık analizi

3.4.7. CD4⁺ T Hücre Çoğalmasının Ko-kültürlerde Analizi

Saflaştırılan CD4⁺ T hücreler santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde FBS içermeyen RPMI 1640 besiyeri ile süspansiyon edildi. T hücre süspansiyonu 37°C'de 5 dk. inkübe edildi. Final konsantrasyonu 5 μ M olacak şekilde karboksifloresan süksinimidil ester (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*, CFSE) ile karıştırıldı ve 37°C'de 15 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler tam besiyeri ile yıkandı ve 5 dk. buz üzerinde bekletildi. Bu süre sonunda hücreler santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücrelerin bulunduğu tüp tam besiyeri ile doldurularak tekrar santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 25×10^3 hücre/100 μ L olacak şekilde CFSE-işaretli T hücreler tam RPMI 1640 besiyeri ile süspansiyon haline getirildi. Hücrelerin üzerine 50 ng/mL saflaştırılmış anti-insan CD3 antikorunu (HIT3a) eklendi. CFSE-işaretli T hücreler çok kanallı pipet aracılığı ile U-tabanlı 96-kuyulu plaklara her kuyuda 100 μ L içerisinde 25×10^3 hücre olacak şekilde dağıtıldı.

Miyeloid hücreler 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde tam RPMI 1640 besiyeri ile süspansiyon haline getirildi. Miyeloid hücreler $1 \cong 25 \times 10^3$ hücre olacak şekilde 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1 oranlarında U-tabanlı 96-kuyulu plaklarda CFSE-işaretli T hücrelerin bulunduğu kuyulara eklenerek ko-kültür gerçekleştirildi. Hacmin iki katına çıkması nedeniyle saflaştırılmış anti-insan CD3 antikorunun konsantrasyonu da 25 ng/mL'ye düşmüş oldu. Kontrol olarak tam RPMI 1640 besiyeri ile 48 saat inkübe edilen miyeloid hücreler ve miyeloid hücreler ile ko-kültürü yapılmayan CD4⁺ T hücreler kullanıldı. Miyeloid hücre ve CD4⁺ T hücre ko-kültürleri 37°C, %5 CO₂

içeren nemli inkübatörde 96 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda CD4⁺ T hücrelerdeki CFSE yoğunluğuna göre proliferasyon düzeyi FACSArialII akım sitometri cihazı ve FACS Diva yazılımı kullanılarak belirlendi.

3.5. Kemotaksis Deneyi

THP-1 hücreleri (1×10^5 hücre) ayrı ayrı 1.5 mL'lik tüplere aktarıldı, santrifüj (2000 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi ve süpernatantlar uzaklaştırıldı. Bu hücreler 100 µL %1 FBS içeren RPMI 1640 besiyeri ile süspanse edildi. Kemotaksis deneyinin yapılacağı 24-kuyulu plaklara her koşul için 600 µL tam RPMI 1640 besiyeri eklendi. Tam RPMI 1640 besiyeri içeren kuyulara 5-8 µm por açıklığına sahip Boyden kemotaksis hazneleri tabanları kuyulardaki besiyerinin yüzeyine denk gelecek şekilde yerleştirildi. Daha önce hazırlanmış THP-1 hücre süspanسیونlarından her hazne üzerine 100 µL eklendi ve 37°C, %5 CO₂ içeren ortamda 8 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kemotaksis hazneleri 24-kuyulu plaktan çıkarıldı. Plaktaki kuyularda bulunan hücre süspanسیونları kristal viyole boyası ile 1:1 oranında muamele edilerek faz-kontrast mikroskopunda (IMT-2, Olympus, Japonya) 10X objektifte fotoğrafları çekildi ve her koşuldan hücre sayımı (Bkz. Hücre Sayımı 3.3.3) gerçekleştirildi.

Monositler ile yapılan kemotaksis deneyinde, kemotaksis haznesindeki membranın alt kısmına tutunan hücrelerin sayımı gerçekleştirildi. Bunun için, kemotaksis hazneleri 1X PBS içeren kuyulara alındı. Üzerine bir miktar PBS eklendi ve yumuşak bir çubuk yardımıyla membranın üst kısmındaki hücreler nazikçe kazınarak uzaklaştırıldı. Daha sonra membran 2 kez PBS ile yıkandı. Hazneler içi %100 metanol ile dolu kuyulara aktarıldı ve fiksasyon için oda sıcaklığında 2 dk. inkübe edildi. Hazneler PBS ile iki kez yıkandı, Giemsa çözeltisi (10X) içeren kuyulara aktarıldı ve oda sıcaklığında 5 dk. inkübe edildi. Hazneler içinde distile su bulunan kuyulara aktarıldı ve iyice yıkandı. Membranlar bistüri ile kesildi ve alt kısmı yukarıda olacak şekilde yaklaşık 2 saat boyunca oda sıcaklığında kuruması sağlandı. Kuruyan membranlar aynı pozisyonda lam-lamel arasına entellan aracılığı ile yapıştırıldı. Giemsa ile boyanan hücreler ışık mikroskobu (BX50, Olympus, Japonya) ile 10X

objektifte sayıldı. Hücrelerin *Image Focus 4* yazılımı aracılığı ile 40X objektifte fotoğrafları (BX51, Olympus, Japonya) çekildi.

3.6. Western Blot Analizleri

3.6.1. Protein Lizatı Hazırlaması

Aderan özellikteki hücreler (MCF-7, BT-474, T47-D, ZR-75-1, SK-BR-3, MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) ve süspansiyon hücreler (THP-1, U937 ve monositler) 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde T25 flasklara veya 15 mL'lik tüplere ekildi ve 48 saat veya 15 dk. boyunca inkübe edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı. İnkübasyon sonunda hücreler buz üstüne alınarak $+4^{\circ}\text{C}$ soğuk odada 5 dk. inkübe edildi. Aderan hücreler için flasklardan, süspansiyon hücreler için ise 15 mL'lik tüplerden besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 2 kez PBS tampon çözeltisi ile yıkandı. Flaska veya 15 mL'lik tüplere 400 μL lizis tampon çözeltisi eklendi ve çalkalayıcı üzerinde 100 rpm'de 10 dk. inkübe edildi. Aderan hücreler kazıyıcı (*scraper*) ile kazınarak flaskın tabanından kaldırıldı. Flasklar tekrar çalkalayıcı üzerinde 100 rpm'de 10 dk. inkübe edildi ve kazıma işlemi tekrarlandı. Flasklardaki veya 15 mL'lik tüplerdeki örnekler 20°C 'de soğutulmuş olan 1.5 mL'lik tüplere aktarıldı ve santrifüj edildi (13000 rpm, 15 dk., $+4^{\circ}\text{C}$). Proteinleri içeren süpernatant kısmı $+4^{\circ}\text{C}$ soğuk odada -20°C 'de soğutulmuş olan 1.5 mL'lik tüplere aktararak -80°C 'de muhafaza edildi.

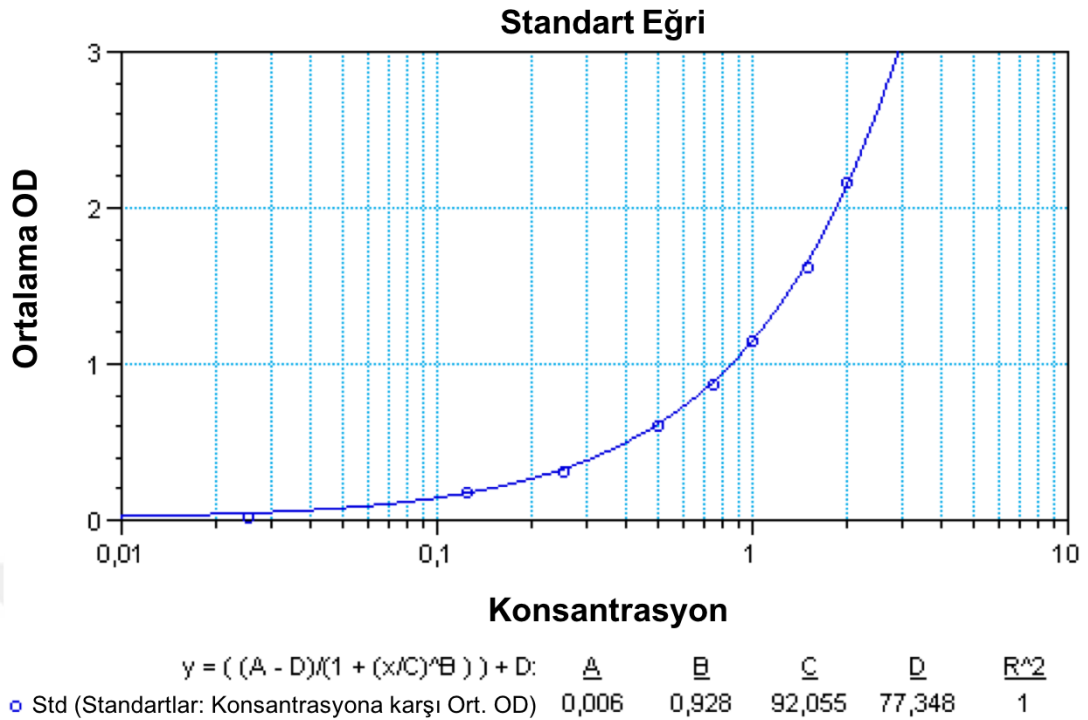
Hücre süpernatantlarından protein örneği hazırlamak için, hücrelerin bulunduğu 1.5 mL'lik tüpler santrifüj (2000 rpm, 5 dk., $+4^{\circ}\text{C}$) edildi. Süpernatant kısmı -20°C 'de soğutulmuş 1.5 mL'lik tüplere aktarıldı. Bu süpernatantlara $+4^{\circ}\text{C}$ soğuk odada 1X PIC ve 5 mM EDTA eklendi ve pipetaj yapılarak iyice karışması sağlandı. Tüpler çalkalayıcı üzerinde 150 rpm'de 15 dk. inkübe edildi. Süpernatantlara tekrar pipetaj yapıldı ve tüpler -80°C 'de muhafaza edildi.

3.6.2. Protein Ölçümü

Örneklerdeki protein miktarı bisikoninik asit (*bicinchoninic asit assay*, BCA) yöntemiyle hesaplandı. Örnekler çözümleri için buz üstüne alındı. BCA analizi için

düz tabanlı 96-kuyulu plaklar kullanıldı. Standartlar için 8 kuyu, her örnek için birer kuyu ve kontrol için de bir kuyu kullanıldı. BCA kitinde bulunan 2 mg/mL buzağı serum albumininden liziz tampon çözeltisi ile seri dilüsyonlar yapılarak standartlar (2 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL ve 0.025 mg/mL) hazırlandı, vortekslenildi veya nazikçe pipetaj yapıldı. Daha sonra her kuyuya 25 µL eklendi. Ölçülecek tüm örnekler de 25 µL hacimde kuyulara eklendi. Kontrol olarak kullanılan liziz tampon çözeltisinden veya süpernatanın hazırlandığı besiyerinden de 25 µL kuyulara eklendi. BCA kitinde bulunan çözeltilerden analiz için gereken miktar hesaplandı. Çözelti A ve Çözelti B 50:1 oranında karıştırıldı ve her kuyuya 175 µL eklendi. Örneklerin homojen olarak karışması için kuyular pipetaj yapılarak karıştırıldı. Plaklar alüminyum folyo ile kaplandı ve oda sıcaklığındaki çalkalayıcıda 30 sn. inkübe edildi. Bu işlem sonrasında 37°C inkübatöre kaldırılarak karanlık ortamda 30 dk. inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda plaklar inkübatörden çıkarıldı ve oda sıcaklığına gelmesi için beklendi. Spektrofotometrik ölçüm için *Softmax Pro* programında *Basic Endpoint Assay* protokolü kullanıldı ve 562 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapıldı. Lizatlardaki ve süpernatandaki protein konsantrasyonları, standartların optik yoğunluk (*optical density*, OD) değerlerine göre ortaya çıkan standart eğri grafikleri kullanılarak hesaplandı (Şekil 3.8). Kuyulara yüklenecek hacimlerin hesaplanmasında Formül 3.3 kullanıldı. Örnekler BCA çözeltisi ile 1:8 oranında seyreltildiğinden, elde edilen protein konsantrasyonları 8 ile çarpıldı. Örnekler SDS-jel yükleme tamponu ile 1:1 oranında karıştırıldığı için yüklenecek protein miktarları 2 ile çarpıldı.

$$\text{Protein hacim } (\mu\text{L}) = \frac{\text{Protein miktarı } (\mu\text{g}) \times 2}{\text{Protein konsantrasyonu } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) \times 8} \quad (3.3)$$



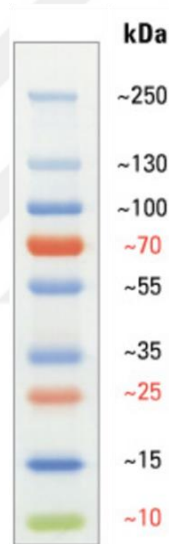
Şekil 3.8. Spektrofotometrik protein ölçümlerinde, protein konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanılan örnek standart eğri grafiği. Grafikler “4-Parameter” algoritmasına göre oluşturuldu.

Western Blot analizlerinde 50–120 µg arasında değişen ve her analizde kendi içinde eşit miktarda olacak şekilde protein lizatları ve süpernatantlar kullanıldı.

3.6.3. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS-jel yükleme çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılan örnekler 95°C ısı bloğu içerisinde 5 dk. ısıtılarak denatüre edildi. Western Blot için *TGX FastCast* Akrilamid Kiti (BioRad, ABD) kullanılarak %10'luk poliakrilamid jel hazırlandı. Yürütme jelinin (*Resolving Gel*) hazırlanması için kit içinde bulunan *Resolver* A ve B çözeltileri 1:1 oranında karıştırıldı. Jelin polimerizasyonunu sağlayan amonyum persülfat (APS) çözeltisinden ve polimerizasyonu hızlandıran tetrametiletildiamin (TEMED) çözeltisinden son konsantrasyonları %0.05 olacak şekilde jel dökülmeden hemen önce karışıma eklendi ve yürütme jeli, jel hazırlama aparatlarına döküldü. Yükleme jelinin (*Stacking Gel*) hazırlanması için kit içinde bulunan *Stacker* A ve B çözeltileri

1:1 oranında, yürütme jeline göre daha az hacimde karıştırıldı. Jelin polimerizasyonunu sağlayan APS çözeltisinden son konsantrasyonu %0.05 ve polimerizasyonu hızlandıran TEMED çözeltisinden ise son konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde karışıma eklendi. Yükleme jeli, yürütme jelinin üstüne doğrudan döküldü ve kuyuların oluşması için taraklar yerleştirildi. Yürütme ve yükleme jellerinin polimerizasyonu için oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildi. Yükleme ve yürütme jellerinin polimerize olmasını takiben jel yükleme aparatları Western Blot elektroforez tankına yerleştirildi. Bu aparatların arası tamamen 1X yürütme tamponu ile doldurulduktan sonra her kuyuda eşit miktarda olacak şekilde SDS-jel yükleme tamponu ile muamele edilen örnekler ve protein belirteci (Şekil 3.9) yüklendi.



Şekil 3.9. Protein belirteci (*Thermo Scientific*, ABD)

Fibronektin yüksek moleküler ağırlığa (220-250 kDa) sahip bir glikoprotein olduğundan fibronektin bantlarının belirgin bir şekilde gözlenmesi ve daha iyi analiz edilmesi amacıyla elektroforez işlemi (60 V, gece boyunca, +4°C) soğuk odada gerçekleştirildi. Fibronektin dışındaki proteinlerin analizi için ise elektroforez işlemi (50 V, 4 saat) oda sıcaklığı gerçekleştirildi. Elektroforez işlemi sonunda jel tanktan çıkarıldı. Jelin kurumaması için ıslak bir spatula yardımıyla jel, yükleme aparatlarından ayrıldı. Örnek içermeyen kısımlar spatula ile kesilerek uzaklaştırıldı

ve jel distile su içerisine alındı. Çalkalanarak (100 rpm, 15 dk., oda sıcaklığı) inkübe edildi.

3.6.4. Transfer ve Blotlama

Elektroforez işleminden sonra transfer işleminde kullanılan polivinildiflorid (PVDF) membran ve filtre kağıtları jele uygun olacak şekilde belirli ölçülerde kesildi. PVDF membranın polarize olması için absolut metanol içerisinde birkaç saniye tutuldu. PVDF membran ve filtre kağıtları 1X transfer tampon çözeltisi ile çalkalayıcıda (100 rpm, 15 dk., oda sıcaklığı) inkübe edildi. Çalkalayıcıda dH₂O ile inkübe edilen jel 1X transfer tampon çözeltisi içine alınarak tekrar çalkalayıcıda (100 rpm, 10 dk., oda sıcaklığı) inkübe edildi. Bu inkübasyonlardan sonra yarı-ıslak transfer için kullanılan cihazın (*Pierce Fast Semi-dry Blotter*, Thermo Scientific, ABD) alt kısmına bir kat filtre kağıdı, üzerine PVDF membran, membranın üzerine jel ve en üst kısma bir kat daha filtre kağıdı uygun bir şekilde yerleştirildi. Transfer cihazının alt kısmı anot, üst kısmı ise katot olacak şekilde güç kaynağına bağlandı ve transfer işlemi (25 V, 30 dk., oda sıcaklığı) gerçekleştirildi.

Islak transfer protokolünde ise transfer için kullanılan kasetlere 1X transfer tampon çözeltisinde 15 dk. inkübe edilen süngerler yerleştirildi. Anot kısımda bulunan süngerin üzerine bir kat filtre kağıdı, onun üzerine PVDF membran, membranın üzerine jel ve jelin üzerine bir kat daha filtre kağıdı, en üste ise diğer sünger uygun bir şekilde yerleştirildi ve kaset kapatılarak sıkışması sağlandı. Kasetler, transfer tankının içine yerleştirilen transfer aparatına dikey bir şekilde konuldu. Kasetler tamamen kaplanacak şekilde tank 1X transfer tampon çözeltisi ile dolduruldu. Bu çözeltinin homojen bir şekilde karışması için tankın içine manyetik balık konuldu ve tank manyetik karıştırıcının üzerine yerleştirildi. Tank güç kaynağına bağlandı ve transfer işlemi (340 mA, 1-1.5 sa., +4°C) gerçekleştirildi.

Transfer işleminden sonra PVDF membran PBS-T çözeltisi ile hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu karışımı içerisine alındı ve çalkalayıcıda (100 rpm, 1 sa., oda sıcaklığı) blokasyon yapıldı. Daha sonra, süt tozu karışımı uzaklaştırıldı ve membran

PBS-T çözeltisi ile 3 kez 10 dk. boyunca yıkandı. Yıkamalardan sonra antikor ile inkübasyon aşamalarına geçildi.

3.6.5. Primer ve Sekonder Antikor ile Inkübasyon

Primer antikor eklendikten sonra membran çalkalayıcıda (100 rpm, gece boyunca, +4°C) inkübe edildi (Tablo 3.4). Ertesi gün primer antikor uzaklaştırıldı ve membran PBS-T çözeltisi ile oda sıcaklığında 3 kez 10'ar dk. boyunca yıkandı. Yıkama işleminden sonra, kullanılan primer antikorun kaynağına göre membran sekonder antikor ile çalkalayıcıda (100 rpm, 1 sa., oda sıcaklığında) inkübe edildi (Tablo 3.5). Sekonder antikorla inkübasyon sonrası membran PBS-T ile 3 kez 10 dk. boyunca oda sıcaklığında yıkandı.

Tablo 3.4. Western Blot analizlerinde kullanılan primer antikorlar

<i>Antikor</i>	<i>Konakçı Tür</i>	<i>Klon</i>	<i>Dilüsyon</i>	<i>Firma</i>
<i>p-STAT3 (Tyr705)</i>	Tavşan	D3A7	1/1500	CST, ABD
<i>Total STAT3</i>	Tavşan	79D7	1/1500	CST, ABD
<i>β-aktin</i>	Tavşan	D6A8	1/5000	CST, ABD
<i>Fibronektin (FN)</i>	Fare	10/ <i>Fibronectin</i>	1/1000	BD, ABD
<i>FN-EDA</i>	Fare	IST-9	1/1000	Abcam, İngiltere

CST: *Cell Signaling Technologies*

Tablo 3.5. Western Blot analizlerinde kullanılan sekonder antikorlar

<i>Antikor</i>	<i>Konakçı Tür</i>	<i>Dilüsyon</i>	<i>Firma</i>
<i>Anti-tavşan IgG HRP</i>	Keçi	1/3000	CST, ABD
<i>Anti-fare IgG HRP</i>	At	1/1500	CST, ABD
<i>Anti-fare Immünglobülin/HRP</i>	Keçi	1/1000	Dako, ABD

CST: *Cell Signaling Technologies*, IgG: Immünglobülin G, HRP: *Horseradish* peroksidaz

PVDF membranda yükleme miktarlarını normalize etmek için β-aktin proteininin ifade düzeyleri kontrol edildi. Bu işlem için membran önce PBS-T ile çalkalayıcıda (100 rpm, 15 dk., oda sıcaklığı) yıkandı. Ardından PBS-T ile çözülen %5'lik yağsız süt tozu çözeltisi ile çalkalayıcıda (100 rpm, 1 sa., oda sıcaklığı)

bloklandı. Daha sonra, süt tozu çözeltisi uzaklaştırıldı ve membran PBS-T ile 3 kez 10'ar dk. boyunca yıkandı. β -aktin için antikor ile işaretleme aşamalarına geçildi.

3.6.6. Kemolüminesans Görüntüleme ve Yoğunluk Ölçümü (Dansitometri)

PBS-T ile yıkanan membran kurumadan, *Super Signal West-femto Maximum Sensitivity Substrate* kiti (*Thermo Scientific*, ABD) veya *SignalFire ECL* kiti (*Cell Signaling Technologies*, ABD) kullanılarak hazırlanan substrat çözeltisi membran yüzeyini kaplayacak şekilde eklendi ve karanlıkta 1 dk. inkübe edildi. Membran *Kodak Gel Logic 1500* (*Carestream Healty Inc.*, ABD) görüntüleme sistemi ile görüntülendi. *Kodak Gel Logic 1500* görüntüleme sistemindeki moleküler görüntüleme analiz yazılımı (*Kodak Molecular Imaging Software Standart Edition*, *Carestream Healty Inc.*, ABD) ile dansitometrik analizler yapıldı. Her bağımsız deney için protein bant yoğunluklarının β -aktin bant yoğunluklarına oranı hesaplandı.

3.7. Gen İfade Analizleri

3.7.1. RNA İzolasyonu

Gen ekspresyon analizi yapılmak üzere 37°C ve %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde bulunan hücrelerden *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen*, ABD) protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. RNA izolasyon aşamalarında filtreli pipet uçları veya RNA ve DNA'dan arındırmak için dietilpirokarbonat (DEPC) ile muamele edilen pipet uçları ve tüpler kullanıldı. Protokole göre, inkübatörde T25 flasklar içinde inkübasyonları tamamlanan süspansiyon ve aderan özellikteki hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS tampon çözeltisi ile iki kez yıkandı. Kit içeriğinde bulunan RLT çözeltisi ile %1 β -merkaptoetanol içerecek şekilde hazırlanan karışımdan 500 μ L eklenmesi sonrasında hücreler yaklaşık olarak 5 dk. vortekslendi ve bu şekilde parçalanmaları sağlandı. Bu çözeltinin üzerine 500 μ L %70 etanol eklendi. Bu karışım filtreli kolonlara aktarıldı ve santrifüj (10000 rpm, 20 sn., +4°C) edildi. Santrifüj sonunda toplama tüplerine geçen sıvı kısım uzaklaştırıldı. Her kolona kit içeriğinde bulunan RW1 çözeltisinden 700 μ L eklenerek santrifüj

(10000 rpm, 20 sn., +4°C) edildi. Toplama tüplerine geçen sıvı kısım uzaklaştırıldı. Kolonlara %100 etanol içeren RPE çözeltilisinden 500 µL eklendi ve santrifüj (10000 rpm, 20 sn., +4°C) sonrası toplama tüplerindeki sıvılar uzaklaştırıldı. Kolonlara tekrar RPE çözeltilisinden 500 µL eklendi ve santrifüj (13000 rpm, 4 dk., +4°C) edildi. Daha sonra, toplama tüpleri yenileri ile değiştirildi ve filtrelerdeki sıvıyı tamamen uzaklaştırmak için kolonlar yeniden santrifüj (13000 rpm, 1 dk., +4°C) edildi. Bu süre sonunda toplama tüpleri uzaklaştırılarak filtreli kolonlar her örnek için ayrı ayrı hazırlanan DEPC ile muamele edilmiş 1.5 mL hacimdeki tüplerin üzerine yerleştirildi. Filtreli kolonlara 30 µL RNaz-DNaz içermeyen ddH₂O eklendi ve santrifüj (10000 rpm, 1 dk., +4°C) edildi. Kolonlar uzaklaştırıldı ve tüpler buza gömüldü. *NanoDrop* (ND-1000 Spectrophotometer, *Thermo Scientific*, ABD) spektrofotometre aracılığı ile *NanoDrop* 1000 yazılımı kullanılarak örneklerdeki RNA içeriği belirlendi. Ölçülen örneklerdeki A_{260} / A_{280} ve A_{260} / A_{230} değerlerinin yaklaşık olarak 2 olmasına dikkat edildi. Örnekler ölçüm sonrası -80°C'de muhafaza edildi.

3.7.2. RNA Örneklerinden DNA'nın Uzaklaştırılması

Üç bağımsız deneyden elde edilen RNA örnekleri buz üzerinde çözüldü ve her örnekten eşit miktarda olacak şekilde birleştirildi. Bu RNA havuzlarındaki nükleik asit miktarı ve kalitesi spektrofotometrik olarak (*Nanodrop*, ND-1000 Spectrophotometer) değerlendirildi. DNA temizleme işlemi *RNA Clean and Concentrator* (*Zymo Research*, ABD) kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Kısaca, izole edilen RNA örneğinden 20 µL, 10X DNA tampon çözeltilisinden 5 µL, RNA içermeyen DNaz enziminden (DNase I, 1U/µL, *Thermo Scientific*, ABD) 4.5 µL ve 20 µL RNaz içermeyen ddH₂O'dan oluşan bir karışım hazırlandı. Bu oranlar temizlenecek örneğin miktarına ve hacmine göre ayarlandı. DNaz enziminin homojen olarak karışması için pipetaj işlemi yapıldı ve karışım 37°C su banyosunda 40 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda karışıma miktarının iki katı kadar kit içeriğinde bulunan RNA bağlama tamponu (*RNA Binding Buffer*) ilave edildi. Ardından oluşan yeni karışıma aynı miktarda %100 etanol eklenerek filtreli kolonlara aktarıldı. Kolonlar santrifüj (13000 rpm, 1 dk., oda sıcaklığı) edildi. Toplama tüpüne

geçen sıvı kısım uzaklaştırıldı. Her kolona 400 µL kit içeriğinde bulunan RNA hazırlama tamponu (*RNA Prep Buffer*) eklendi ve santrifüj (13000 rpm, 1 dk., oda sıcaklığı) edildi. Toplama tüplerindeki sıvılar uzaklaştırıldı ve her kolona 800 µL kit içeriğinde bulunan RNA yıkama tamponu (*RNA Wash Buffer*) ilave edildi. Kolonlar santrifüj (13000 rpm, 30 sn., oda sıcaklığı) edildi. Toplama tüplerindeki sıvılar uzaklaştırıldı ve kolonlara 400 µL daha RNA yıkama tamponu eklenerek yeniden santrifüj (13000 rpm, 30 sn., oda sıcaklığı) edildi. Filtreli kısmın tamamen kuru olmasını sağlamak için toplama tüpleri yenileri ile değiştirilerek kolonlar santrifüj (13000 rpm, 2 dk., oda sıcaklığı) edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpleri uzaklaştırılarak filtreli kolonlar her örnek için ayrı ayrı hazırlanmış RNaz–DNaz içermeyen 1.5 mL'lik tüplerin üzerine yerleştirildi. Kolonlara RNaz–DNaz içermeyen ddH₂O eklendi ve oda sıcaklığında bir dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası filtreli kolonların bulunduğu tüpler santrifüj (11000rpm, 30 sn., oda sıcaklığı) edildi. Santrifüj sonrası kolonlara 15 µL daha RNaz–DNaz içermeyen ddH₂O eklendi ve bir önceki ile aynı koşullarda santrifüj edildi. Temizlenen örnekler yeniden spektrofotometrik olarak değerlendirildi. RNA örneği içerisinde DNA bulaşının kalmadığını analiz etmek için, bu örneklerde β-aktin gen ifadesi PZR ile değerlendirildi (Bkz. Polimer Zincir Reaksiyonu 3.7.4). Bant görüntüsü içermeyen örneklerin DNA'dan tamamen arındırıldığı kabul edildi.

3.7.3. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA sentezi için, RNA örnekleri (1 µg veya 2 µg) mikrofüj tüplerine konuldu ve toplam hacmi 11 µL olacak şekilde ddH₂O eklendi. cDNA sentezinin başlaması için RNA'ya bağlanan oligo(dT) primerlerden final konsantrasyonu 0.5 µg/µL olacak şekilde her tüpe eklendi. Mikrofüj tüpler PZR cihazına yerleştirildi ve 65°C'de 5 dk. *Thermal cycler*'da (*Thermo Scientific*, ABD) tutuldu. Bu süre sonunda mikrofüj tüpler buz üzerine alındı. Her örneğe 4 µL 5X reaksiyon tampon çözeltisi, 2 µL 10 mM dNTP çözeltisi, 1 µL 40U ribonükleaz inhibitör çözeltisi ve 1 µL 200U ters (*reverse*) transkriptaz (RT) enzimden oluşan

karışım eklendi. Mikrofüj tüpler, 42°C'de 1 saat ve daha sonra 70°C'de 10 dk. olacak şekilde inkübe edildi. Sentezlenen cDNA örnekleri -20°C'de saklandı

3.7.4. Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR)

Gen ifade analizleri için, Tablo 3.6'da yer alan genler standart veya gerçek-zamanlı PZR ile değerlendirildi.

Tablo 3.6. PZR analizlerinde kullanılan primerler ve bağlanma ısıları

<i>Gen</i>	<i>Forward Primer (5'-3')</i>	<i>Reverse Primer (5'-3')</i>	<i>Ürün (bç)</i>	<i>Gen Bank No.</i>	<i>Bağlanma ısı (°C)</i>
<i>ITGA4</i>	tggcgtggtacaacttgactgc	tcacaggtagcatgcactgtg	141	NM_000885.4	60
<i>ITGA5</i>	tggcctcctactttggctatgc	tgtcgcaggtagacgtagacc	148	NM_002205.2	60
<i>ITGAV</i>	ttactggcgcagcagatggct	tgccccacctcttgaggttgc	142	NM_002210.4	60
<i>ITGAX</i>	tgtcatccccatggctgatg	tgctcctggagggtctcgat	123	NM_000887.4	60
<i>ITGAM</i>	acaagaacagcacacgcagac	agcagacaatggcgttccca	153	NM_000632.3	60
<i>ITGB1</i>	actgcaagaacgggtgaaatgg	acttctccgtaaagcccagagg	163	NM_033668.2	65
<i>ITGB3</i>	tagtgagctcatcccaggga	agagacaactctcaggagg	141	NM_000212.2	62
<i>ITGB7</i>	acagtaccctccaaactgcg	tcagaatggcatcgaagcc	180	NM_000889.2	62
<i>STAT3</i>	tcacgccttctacagactcgag	tccggacatcctgaagtgctg	121	NM_003150.3	64,6
<i>IL-1B</i>	aagtacctgagctgccagt	tggaaggagcactctcatctgt	103	NM_000576.2	58,2
<i>TLR4</i>	gcgtaggagtgtaaatacca	gaaaaggctcccagggttaa	116	NM_138557.2	61,2
<i>ELA2</i>	tgattctccagctcaacggg	ctcagcagagtgacaggtt	217	NM_001972.3	59,2
<i>FN1</i>	actgcgagagtaaacctgaagc	gcggtttgcgatgtacagct	164	NM_212482.1	62
<i>FN1-V1</i>	cgagccctgaggatggaatc	cttccctgggatgtgacca	1278	NM_212482.2	58
<i>FN1-V3</i>	ccatcatcccagctgttct	ttaccagttgggaagctcg	2211	NM_002026.3	58
<i>FN1-V4</i>	cgagccctgaggatggaatc	agggtcttttgaactgtct	989	NM_212478.2	58
<i>ACTB</i>	ctggaacggtgaaggtgaca	aaggactctctgtaacaatgca	139	NM_001101	60

İntergrinler; ITGA4: α 4, ITGA5: α 5, ITGAV: α v, ITGAX: α X, ITGAM: α M, ITGB1: β 1, ITGB3: β 3, ITGB7: β 7; IL-1B: IL-1 β ; ELA2: Elastaz-2; FN1: Fibronektin; FN-EDA varyantları: FN1-V1, FN1-V3, FN1-V4; ACTB: β -aktin; bç: baz çifti; V: varyant

Her mikrofüj tüpüne, standart PZR için Tablo 3.7’de, gerçek-zamanlı PZR için ise Tablo 3.8’de yer alan bileşenlerden oluşan karışım hazırlandı. Analizi yapılan genleri ifade ettiği bilinen bir cDNA  rneği pozitif kontrol olarak kullanılırken negatif kontrol olarak cDNA veya RNA  rneği içermeyen karışım hazırlandı.

Tablo 3.7. Standart PZR bileşen miktarları ve final konsantrasyonları

<i>Bile�en</i>	<i>Miktar</i>	<i>Final Konsantrasyonu</i>
<i>Dream Taq tampon �zeltisi (10X)</i>	5 �L	1X
<i>dNTP �zeltisi (2 mM)</i>	5 �L	0.2 mM
<i>Forward primer �zeltisi (5 �M)</i>	2 �L	0.2 �M
<i>Reverse primer �zeltisi (5 �M)</i>	2 �L	0.2 �M
<i>Dream Taq DNA polimeraz (5 U/�L)</i>	0.2 �L	0.02 U/�L
<i>cDNA veya RNA �rneği</i>	1 �L	
<i>ddH₂O</i>	34.8 �L	
<i>Toplam hacim</i>	50 �L	

Tablo 3.8. Gerçek-zamanlı PZR bile en miktarları ve final konsantrasyonları

<i>Bile�en</i>	<i>Miktar</i>	<i>Final Konsantrasyonu</i>
<i>SYBR Green Supermix �zeltisi (2X)</i>	5 �L	1X
<i>Forward primer �zeltisi (5 �M)</i>	1 �L	0.5 �M
<i>Reverse primer �zeltisi (5 �M)</i>	1 �L	0.5 �M
<i>cDNA �rneği</i>	1 �L	
<i>ddH₂O</i>	2 �L	
<i>Toplam hacim</i>	10 �L	

Mikrofüj tüpler reaksiyon için PZR cihazına (Standart PZR: *Arktik Thermal Cycler, Thermo Scientific, ABD*; Gerçek-zamanlı PZR: *CFX Connect Real Time System, Bio-Rad, ABD*) yerleştirildi. Standart PZR için Tablo 3.9’daki, gerçek-zamanlı PZR için ise Tablo 3.10’daki koşullara göre reaksiyon gerçekleştirildi. Gen ifade analizlerinin yanı sıra, genlere özgü primerlerin bağlanma sıcaklığını belirlemek için de standart PZR gradyanlı olarak değişen sıcaklıklarda gerçekleştirildi.

Tablo 3.9. Standart PZR reaksiyon koşulları

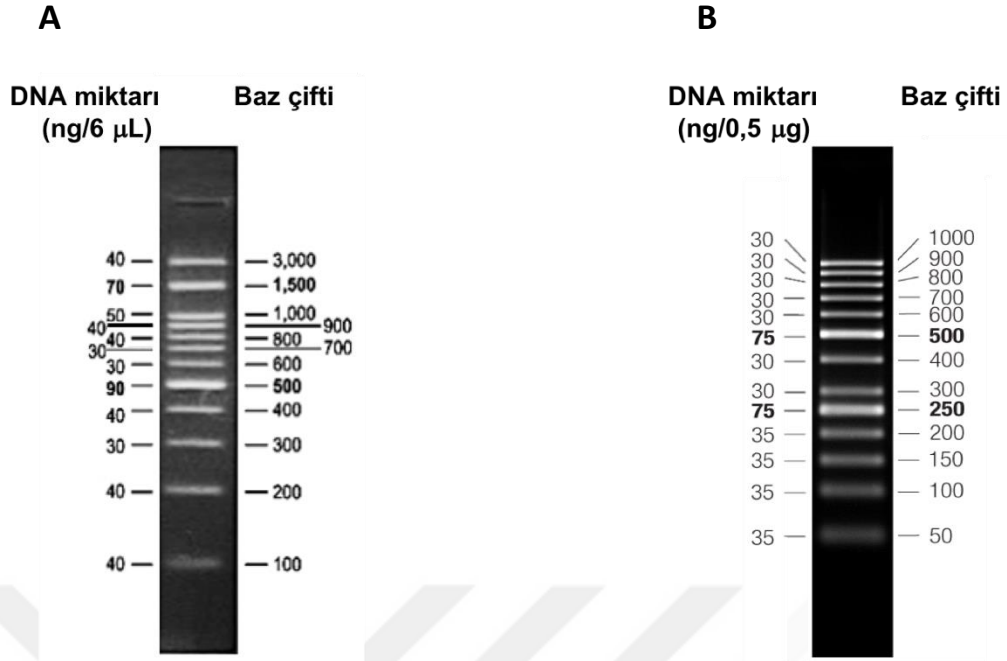
Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre
<i>İlk denatürasyon</i>	95	5 dk.
<i>Denatürasyon</i>	95	30 sn.
<i>Bağlanma</i>	Primere özgü	30 sn.
<i>Uzama</i>	72	30 sn.
<i>Son uzama</i>	72	5 dk.

} 35 - 40
döngü**Tablo 3.10.** Gerçek-zamanlı PZR reaksiyon koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre
<i>İlk denatürasyon</i>	95	3 dk.
<i>Denatürasyon</i>	95	30 sn.
<i>Bağlanma</i>	Primere özgü	30 sn.
<i>Uzama</i>	72	20 sn.
<i>Son uzama</i>	72	5 dk.

} 35 - 40
döngü

Reaksiyon sonunda PZR ürünleri jel elektorforezinde yürütüldü. Bu işlem için 1X TBE içinde %2'lik agaroz jel hazırlandı. Her 100 mL agaroz jel için final konsantrasyonu 500 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür çözeltisi eklendi. Agaroz jel kalıba döküldü ve kuyuların oluşması için taraklar yerleştirildi. Agaroz jelin polimerizasyonu için oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Jel kalıp ile beraber elektroforez tankına yerleştirildi. Tank 1X TBE çözeltisi ile jelin tamamını kaplayacak şekilde dolduruldu. Her PZR ürününden 15 µL alınarak parafilm üzerinde 3 µL 6X yükleme boyası ile karıştırıldı ve jeldeki kuyulara yüklendi. DNA belirteci olarak 100 veya 50 bç'lik belirteçler kullanıldı (Şekil 3.10). 50 bç'lik DNA belirteci, 6X yükleme boyası ve dH₂O ile 1:1:4 oranında karıştırılarak, 100 bç'lik DNA belirteci ise doğrudan jele yüklendi. Jel, elektroforez tankında (90 V, 1-3 sa., oda sıcaklığı) yürütüldü. Yürütme işlemi sonunda, jel *Kodak Gel Logic 1500* görüntüleme sisteminde UV ışık altında görüntülendi.



Şekil 3.10. A) 100 bç DNA belirteci (GeneDirex, ABD), B) 50 bç DNA belirteci (Thermo Scientific, ABD), bç: baz çifti

Gerçek-zamanlı PZR'de *CFX Manager* (Bio-Rad, ABD) yazılımı kullanılarak hedef genlerden elde edilen veriler, kontrol hücrelerin verilerine göre normalize edildi. Referans gen olarak β -aktin ifade verileri kullanıldı. Gen ifadesinde meydana gelen değişimler $\Delta\Delta Ct$ metodu ile rölatif olarak değerlendirildi (Formül 3.4).

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct \text{ hedef gen} - \Delta Ct \text{ kontrol gen})} \quad (3.4)$$

$$= 2^{-[(Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ referans gen}) - (Ct \text{ kontrol gen} - Ct \text{ referans gen})]}$$

3.8. Hücre Kültüründen Süpernatant Toplanması

ELISA, Western Blot ve hücre kültürü deneylerinde kullanılmak üzere farklı süre ve koşullarda kültürü veya ko-kültürü yapılan hücrelerin besiyeri steril tüplere toplandı ve santrifüj (2000 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi. Tüpler buz üzerine alındı ve süpernatant kısmı steril tüplere aktarıldı. Bazı durumlarda sitokin salınımını artırmak amacıyla süpernatant toplamadan 3 saat önce hücre kültürü ortamına 50 ng/mL PMA ve 0.5 μ g/mL iyonomisin eklendi. Daha sonra, süpernatantlar

yukarıda anlatıldığı şekilde toplandı. Fibronektin analizleri için %1 FBS içeren veya serumsuz ortamda kültür yapılmasına dikkat edildi. Western Blot analizleri için süpernatanlara 1X PIC ve 5 mM EDTA eklendi. Toplanan süpernatanlar analizlerde kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.9. ELISA Analizleri

3.9.1. İnsan Fibronektin ELISA

Meme kanseri hücre hattı süpernatanlarındaki fibronektin düzeyini belirlemek için insan fibronektin ELISA kiti (Abcam, İngiltere) kullanıldı.

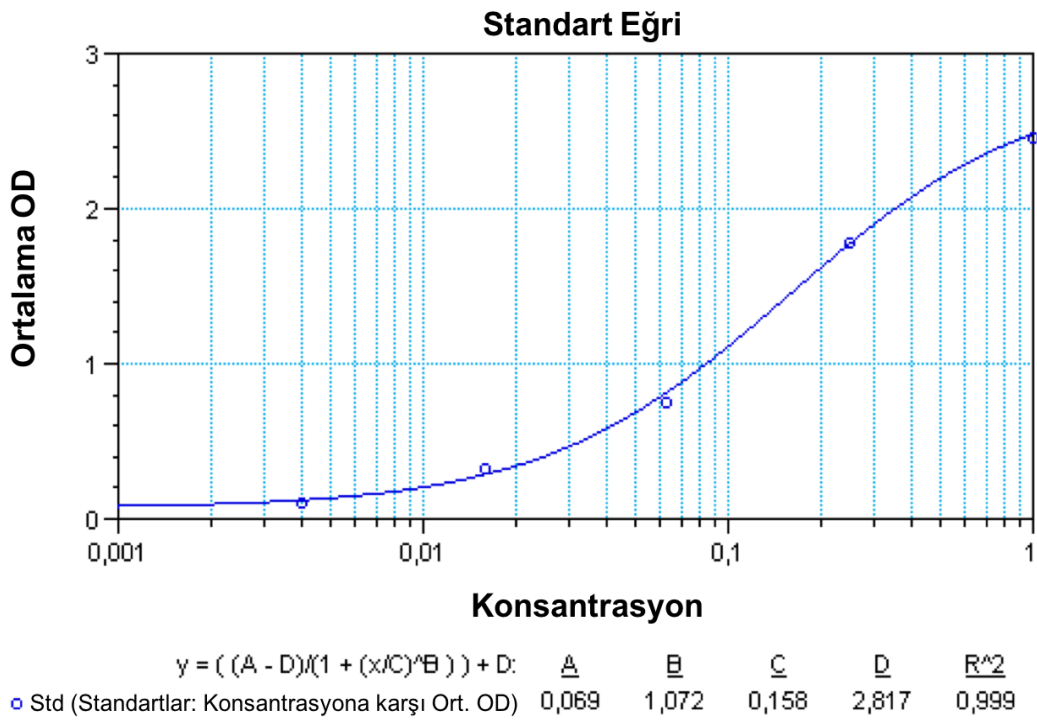
Çözeltilerin hazırlanması: ELISA için kullanılacak çözeltilerin ve malzemelerin oda sıcaklığında olmasına dikkat edildi. Kit içeriğinde bulunan 10X Diluent N ve 20X yıkama tampon çözeltisi, distile su ile 1X konsantrasyona seyreltildi. Liyofilize halde bulunan biyotinlenmiş fibronektine 4 mL 1X *Diluent N* çözeltisi eklenerek 1X biyotinlenmiş fibronektin çözeltisi hazırlandı. Kit içeriğinde bulunan 100X streptoavidin peroksidaz (SP) konjugatı, 1X Diluent N çözeltisi ile 1X konsantrasyona seyreltildi.

Standartlar deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı. Kit içeriğinde liyofilize halde bulunan fibronektin standartı 1X *Diluent N* çözeltisi ile 50 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Bu standart çözelti ile seri dilüsyonlar yapılarak 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3 µg/mL, 1.5 µg/mL ve 0.8 µg/mL olacak şekilde standartlar hazırlandı.

Örneklerin hazırlanması: Hücre süpernatanlarının bulunduğu tüpler -80°C'den çıkarıldı ve buza gömülerek çözülmeleri sağlandı. Süpernatanlar 1X *Diluent N* çözeltisi ile 1/1000 oranında seyreltildi.

Deney protokolü: Tüm örnekler ve standartlar duplike olarak çalışıldı. Kuyulara örnekler ve standartlardan 25 µL eklendi. Ardından her kuyuya 1X biyotinlenmiş fibronektin çözeltisinden 25 µL eklendi ve 96-kuyulu plağın üzeri kapatılarak oda sıcaklığında iki saat inkübe edildi. Plak 300 µL 1X yıkama tampon çözeltisi ile 5 kez yıkandı ve kurutuldu. Her kuyuya 50 µL 1X SP konjugatı eklendi ve 30 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Plak 300 µL 1X yıkama tampon çözeltisi ile

5 kez yıkandı ve kurutuldu. Kuyulara 50 µL kromojen substrat çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 25 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 50 µL reaksiyon durdurucu çözelti eklendi. Plak, optik okuyucuya (SprectraMax Plus, Molecular Devices – ABD) yerleştirildi. *Softmax Pro* programında *Basic Endpoint Assay* protokolü aracılığı ile 450 nm ve 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapıldı. İki dalga boyu arasındaki fark hesaplandı ve ortaya çıkan standart eğriye göre sonuçlar analiz edildi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Fibronektin ELISA analizine ait spektrofotometrik ölçümlerde, protein konsantrasyonlarının hesaplanması için “4-Parameter” algoritmasına göre oluşturulan standart eğri grafiği.

3.9.2. İnsan İL-1β ELISA

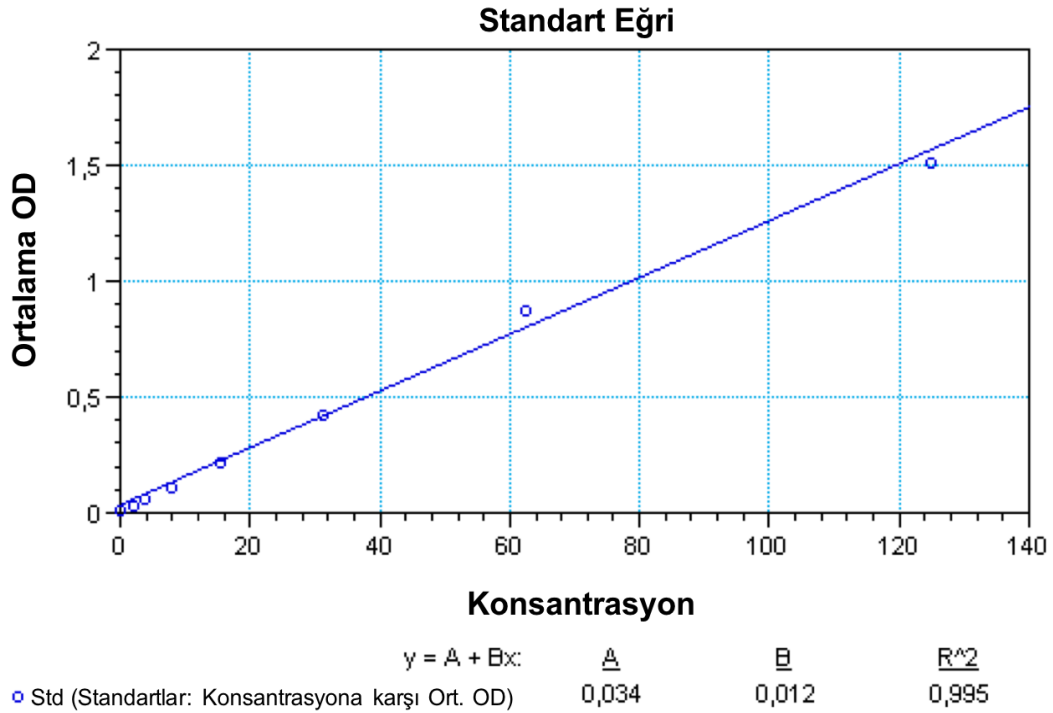
THP-1 hücrelerinden ve monositlerden elde edilen süpernatantlardaki İL-1β düzeyini belirlemek için *Legend Max* insan İL-1β ELISA kiti (Biolegend, ABD) kullanıldı.

Çözeltilerin hazırlanması: ELISA için kullanılacak çözeltilerin ve malzemelerin oda sıcaklığında olmasına dikkat edildi. Kit içeriğinde bulunan 20X yıkama tampon çözeltisi, distile su ile 1X konsantrasyona seyreltildi.

Standartlar deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı. Kit içeriğinde liyofilize halde bulunan İL-1 β standartı *Assay Buffer D* çözeltisi ile çözülerek 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden seri dilüsyonlar yapılarak 125 pg/mL , 62.5 pg/mL , 31.3 pg/mL , 15,6 pg/mL 7.8 pg/mL , 3.9 pg/mL ve 2 pg/mL olacak şekilde standartlar hazırlandı.

Örneklerin hazırlanması: Hücre süpernatanlarının bulunduğu tüpler -80°C'den çıkarıldı ve buza gömülerek çözümleri sağlandı. Süpernatanlar seyreltilmeden doğrudan kullanıldı.

Deney protokolü: Örnekler ve standartlar eklenmeden önce kit içeriğinde bulunan 96-kuyulu plak 300 μL 1X yıkama tampon çözeltisi ile 4 kez yıkandı. Tüm örnekler ve standartlar duplike olarak çalışıldı. Kuyulara örnekler ve standartlardan 50 μL eklendi. Ardından her kuyuya 50 μL *Assay Buffer D* solüsyonu eklendi ve plağın üzeri kapatılarak çalkalayıcıda (200 rpm, 2 sa., oda sıcaklığı) inkübe edildi. Plak 300 μL 1X yıkama tampon solüsyonu ile 4 kez yıkandı ve kurutuldu. Her kuyuya 100 μL *Detection* antikor çözeltisi eklendi ve çalkalayıcıda (200 rpm, 1 sa., oda sıcaklığı) inkübe edildi. Plak 300 μL 1X yıkama tampon solüsyonu ile 4 kez yıkandı ve kurutuldu. Her kuyuya 100 μL Avidin-HRP D çözeltisinden eklendi ve çalkalayıcıda (200 rpm, 30 dk., oda sıcaklığı) inkübe edildi. Plak 300 μL 1X yıkama tampon solüsyonu ile 5 kez yıkandı ve kurutuldu. Her kuyuya 100 μL substrat çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 50 μL reaksiyon durdurucu çözelti eklendi. Plak, optik okuyucuya (SpectraMax Plus, Molecular Devices – ABD) yerleştirildi. *Softmax Pro* programında *Basic Endpoint Assay* protokolü aracılığı ile 450 nm ve 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapıldı. İki dalga boyu arasındaki fark hesaplandı ve ortaya çıkan standart eğriye göre sonuçlar analiz edildi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. İL-1 β ELISA analizlerine ait spektrofotometrik ölçümlerde protein konsantrasyonlarının hesaplanması için “Linear” algoritmasına göre oluşturulan standart eğri grafiği.

3.9.3. İnsan PMN Elastaz ELISA

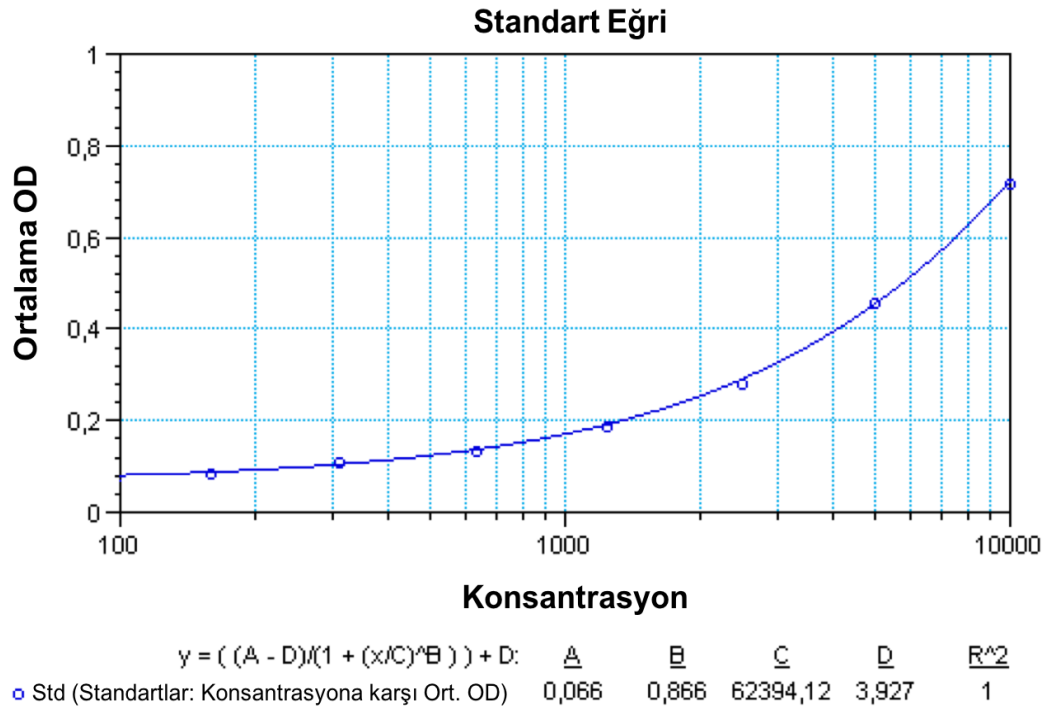
THP-1 hücrelerinden, monositlerden ve PMN lökositlerden elde edilen süpernatantlardaki elastaz-2 düzeyini belirlemek için insan PMN elastaz ELISA kiti (Abcam, İngiltere) kullanıldı.

Çözeltilerin hazırlanması: ELISA için kullanılacak çözeltilerin ve malzemelerin oda sıcaklığında olmasına dikkat edildi. Kit içeriğinde bulunan 10X yıkama tampon çözeltisi, distile su ile 1X konsantrasyona seyreltilti.

Standartlar deneyden hemen önce taze olarak hazırlandı. Kit içeriğinde liyofilize halde bulunan PMN elastaz standardı *Sample Diluent* çözeltisi ile 10 ng/mL konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Bu standart çözelti ile seri dilüsyonlar yapılarak 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL, 1.25 ng/mL, 0.6 ng/mL, 0.3 ng/mL ve 0.16 ng/mL olacak şekilde standartlar hazırlandı.

Örneklerin hazırlanması: Hücre süpernatantlarının bulunduğu tüpler -80°C 'den çıkarıldı ve buza gömülerek çözülmeleri sağlandı. Monosit süpernatantları 1/10 oranında, PMN lökositler ise 1/100 oranında *Sample Diluent* çözeltisi ile seyreltildi. THP-1 hücre süpernatantları seyreltilmeden doğrudan kullanıldı.

Deney protokolü: Örnekler ve standartlar eklenmeden önce kit içeriğinde bulunan 96-kuyulu plak 400 μL 1X yıkama tampon çözeltisi ile 2 kez yıkandı. Tüm örnekler ve standartlar duplike olarak çalışıldı. Kuyulara örnekler ve standartlardan 100 μL eklendi. Plağın üzeri kapatılarak çalkalayıcıda (400 rpm, 1 sa., oda sıcaklığı) inkübe edildi. Plak 400 μL 1X yıkama tampon solüsyonu ile 4 kez yıkandı ve kurutuldu. Her kuyuya 150 μL HRP ile konjuge antikor çözeltisi eklendi ve çalkalayıcıda (400 rpm, 1 sa., oda sıcaklığı) inkübe edildi. Plak 400 μL 1X yıkama tampon solüsyonu ile 4 kez yıkandı ve kurutuldu. Her kuyuya 200 μL TMB substrat çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dk. inkübe edildi. Inkübasyon sonunda 50 μL reaksiyon durdurucu çözelti eklendi. Plak, optik okuyucuya (SpectraMax Plus, Molecular Devices – ABD) yerleştirildi. *Softmax Pro* programında *Basic Endpoint Assay* protokolü aracılığı ile 450 nm ve 620 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapıldı. İki dalga boyu arasındaki fark hesaplandı ve ortaya çıkan standart eğriye göre sonuçlar analiz edildi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Elastaz-2 ELISA analizine ait spektrofotometrik ölçümlerde, protein konsantrasyonlarının hesaplanması için “4-Parameter” algoritmasına göre oluşturulan standart eğri grafiği.

3.10. Rekombinant İnsan Fibronektin Ekstra Domain A⁺ (FN-EDA⁺) ve Ekstra Domain A⁻ (FN-EDA⁻) Protein İzofomlarının Saflaştırılması

Rekombinant insan (rh) FN-EDA⁺ protein izofomlarının saflaştırılması işlemi Valrose Biyoloji Enstitüsü'nde (Nice, Fransa), Prof. Dr. Ellen Van Obberghen-Schilling'in sorumlu olduğu laboratuvarında gerçekleştirildi. rhFN-EDA⁺ protein izofomunun yanı sıra kontrol koşulu olarak rhFN-EDA⁻ protein izofomu da saflaştırıldı.

Saflaştırma için Prof. Dr. Ellen Van Obberghen-Schilling ve ekibi tarafından daha önce lentiviral gen aktarımı yöntemiyle hücresel fibronektine ait FN-EDA⁺ ve FN-EDA⁻ transkript varyantların aktarıldığı HEK-293FT hücreleri kullanıldı. Bu hücreler, hücre kültürü ortamında %10 FBS ve 7.5 µg/mL blastisidin antibiyotiği içeren DMEM(1X) GlutaMAX besiyerinde petri kapları içinde çoğaltıldı. Hücreler %80

yoğunluğa ulaştığında pasajlandı. T175 flasklara aktarılan hücreler %10 FBS içeren ancak antibiyotik içermeyen DMEM(1X) GlutaMAX besiyerinde çoğaltıldı. Hücre yoğunluğu %80'e ulaştığında T175 flasklardaki FBS içeren besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler 2 kez 1X PBS tampon çözeltisi ile yıkandı ve FBS içermeyen DMEM(1X) GlutaMAX besiyerinde 3 gün boyunca 37°C %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde tutuldu. Flasklardaki süpernatantlar 50 mL'lik tüplere aktarıldı ve her tüpe final konsantrasyonu 0.1 mg/mL olacak şekilde proteaz inhibitörü olan Perfabloc SC çözeltisi eklendi. Tüpler santrifüj (1000 rpm. 20 dk., oda sıcaklığı) edildi ve süpernatantlar 500 mL hacimli steril silindirik bir polipropilen şişeye aktarıldı. Fibronektin ile bağlanma kapasitesine sahip jelatin-sefaroz boncuklardan (General Electric Healthcare, ABD) 10 mL alınarak hücre süpernatantlarının bulunduğu şişeye aktarıldı. Süpernatant ve jelatin-sefaroz boncuklardan oluşan karışım yatay olarak çalkalayıcıya yerleştirildi ve +4°C soğuk odada 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda şişe 45° açıda olacak şekilde buz dolabında 2 saat inkübe edildi. Bu sayede fibronektin ile etkileşen jelatin-sefaroz boncukların dibine çökmesi sağlandı. Süpernatant şişeden uzaklaştırıldı ve elde edilen boncuklar 30 µm por büyüklüğüne sahip polietilen filtreli kolona (Biorad, ABD) aktarıldı. Jelatin-sefaroz boncuklar ile etkileşen fibronektin bu boncuklardan ayrıldı. Fibronektin, CAPS tampon çözeltisi içeren ortamda diyaliz yöntemiyle konsantre edildi. Bu işlem sonunda elde edilen rekombinant insan (rh) FN-EDA⁺ ve FN-EDA⁻ protein izoformlarının konsantrasyonları BCA protein analiz yöntemiyle (Bkz. Protein ölçümü) ölçülerek belirlendi.

3.11. Salgılanan Embriyonik Alkalın Fosfataz (*Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase, SEAP*) Bildirici (*Reporter*) Aktivite Analizi

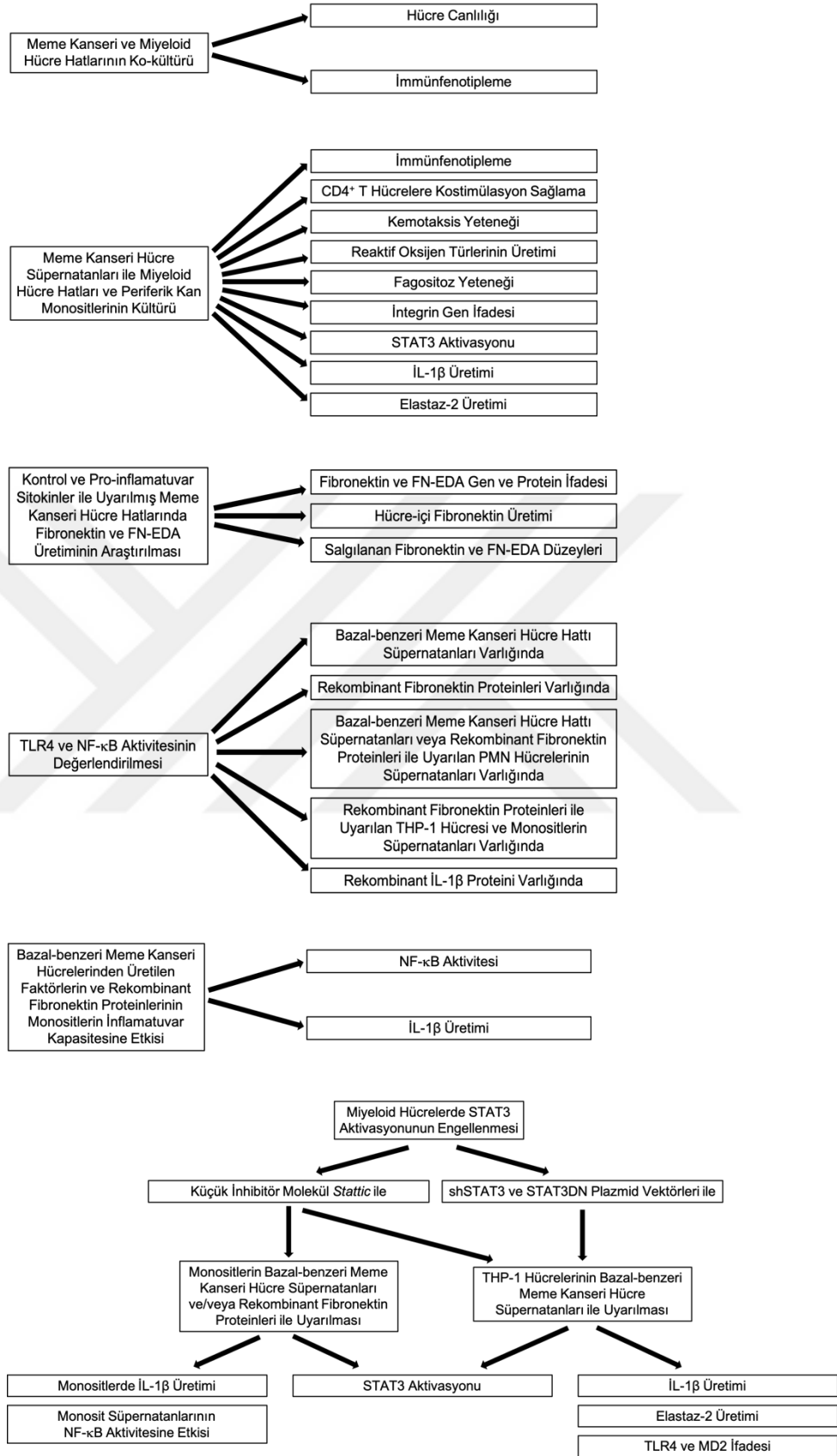
NF-κB bağlanma dizilerinin kontrolü altındaki SEAP *reporter* özelliğine sahip HEK-Blue™ hTLR4 ve HEK-Blue™ Null2 hücreleri sayıldı (Bkz. Hücre sayımı). Hücreler HEK-Blue™ Detection kültür ortamında (5x10⁴ hücre/180 µL) süspansiyon edildi ve 96-kuyulu plaklara her kuyuda 180 µL olacak şekilde eklendi. Farklı süre ve koşullarda kültürü yapılan hücrelerden elde edilen uyarım sağlayacak süpernatantlar

plaktaki her bir kuyuya 20 µL olacak şekilde duplike olarak eklendi. Pozitif kontrol olarak LPS (100 ng/mL) ve TNF- α (100 ng/mL), negatif kontrol olarak ise %1 FBS içeren RPMI 1640 kültür ortamı ve steril dH₂O kullanıldı. Plaklar 37°C %5 CO₂ içeren inkübatörde 16 saat boyunca inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda SEAP aktivitesi plakların spektrofotometrik ölçümü (650 nm) ile (SprectraMax Plus, Molecular Devices; *Softmax Pro, Basic Endpoint Assay*, ABD) değerlendirildi.

3.12. İstatistiksel Analiz

En az 3 bağımsız olarak gerçekleştirilen deneylerden elde edilen veriler arasındaki istatistiksel fark, varyans analizi (ANOVA) ile *Student t* testi kullanılarak değerlendirildi. Grafiklerde aritmetik ortalama, standart sapma veya standart hata ile beraber gösterildi. İstatistiksel analizler için Microsoft Excel 2016 (Microsoft, ABD) ve SPSS (IBM, ABD) yazılımları kullanıldı. Bu analizlerde $p < 0,05$ ve $p < 0,01$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 3.14. Tez çalışması kapsamında planlanan iş akış şeması

4. BULGULAR

4.1. Bazal-benzeri ve Lüminal Meme Kanseri Hücrelerinin Miyeloid Hücre Farklılaşmasına Etkisi

4.1.1. Farklı Miyeloid Hücre Hatlarının Model Olarak Sınanması

Meme kanseri mikroçevresine göç eden miyeloid hücrelerin tümör hücreleri ile karşılaşması bu hücrelerin sağkalımını, olgunlaşmasını ve farklılaşma düzeylerini etkiler (49, 176). Bu çalışmada, meme kanseri hücrelerinin miyeloid hücrelerin canlılığı ve bu hücrelerdeki fenotipik değişimler üzerine etkisini belirlemek için lüminal ve bazal-benzeri meme kanseri hücreleri ile ko-kültür deneyleri gerçekleştirildi. Bu analizler için miyeloid farklılaşma çalışmalarında sıklıkla kullanılan, iyi karakterize edilmiş ve farklı olgunluk düzeylerinde bulunan miyeloid lösemi hücre hatları (KG-1, HL-60, THP-1 ve U937) kullanıldı. Bu hücre hatları ile lüminal özelliğe sahip MCF-7 ve bazal-benzeri özelliğe sahip MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının ko-kültürü gerçekleştirildi. Meme kanseri hücrelerinin miyeloid hücrelerin canlılığı üzerine etkisini test etmek için meme kanseri ve miyeloid hücre hatlarının farklı oranlarda ko-kültürü yapıldı. Ko-kültürün miyeloid hücre canlılığını olumsuz yönde etkilemediği ve hücrelerin en az %80 oranında canlı olduğu görüldü. Biyolojik etkiyi daha iyi gözlemlemek adına eşit sayıda ekim yapılan oranlardan en çok hücre içeren 2:2 oranı bundan sonraki analizlerde kullanılmak üzere seçildi. Bu oran sonraki deneylerde standart olarak kabul edilerek 1:1 olacak şekilde (5×10^5 meme kanseri hücresi : 5×10^5 miyeloid lösemi hücresi) kullanıldı (Tablo 4.1).

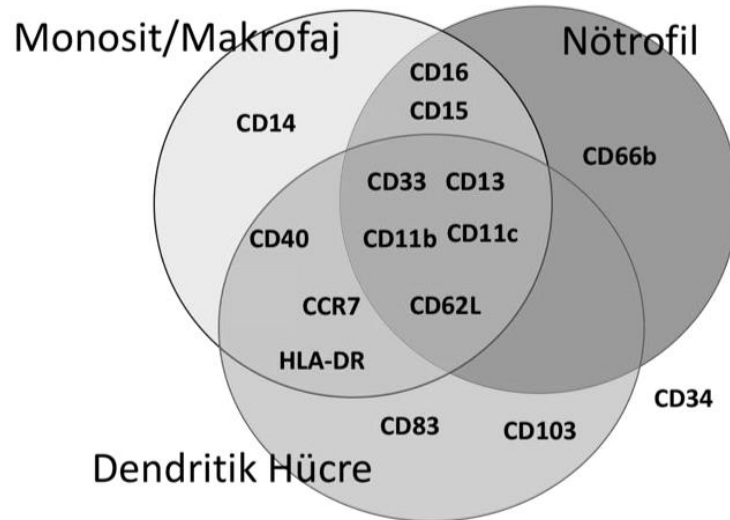
Tablo 4.1. Ko-kültürü yapılan miyeloid hücrelere ait canlılık analizi sonuçları. Miyeloid hücrelerin canlılığını test etmek için $1 \cong 2.5 \times 10^5$ olacak şekilde 1:1, 1:2, 2:1, 2:2 oranlarında meme kanseri hücre hatlarının miyeloid lösemi hücre hatları ile 48 saat boyunca ko-kültürü yapıldı. Miyeloid hücreler toplandı ve ışık mikroskopunda hücre sayımı gerçekleştirildi. Canlılık skorlaması ++ : %80-90, +++ : %90-100 olacak şekilde yapıldı.

Ko-kültür oranı (meme kanseri : miyeloid hücre)	1 : 1		1 : 2		2 : 1		2 : 2	
	MCF-7	MB-231	MCF-7	MB-231	MCF-7	MB-231	MCF-7	MB-231
KG-1	++	+++	++	+++	++	+++	++	+++
HL-60	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
THP-1	+++	++	+++	+++	++	++	+++	++
U937	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++

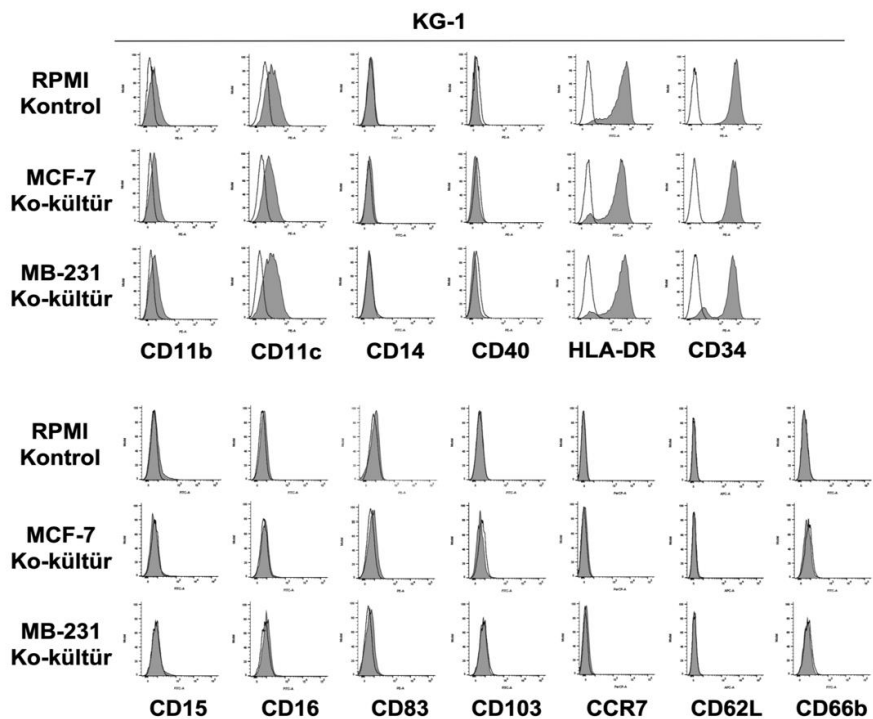
Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hatlarının miyeloid hücrelerin fenotipik farklılaşması üzerine etkisini test etmek için meme kanseri hücre hatları ile miyeloid hücre hatlarının 1:1 oranında 48 saat boyunca ko-kültürü yapıldı. Bu süre sonunda miyeloid hücre tiplerine özgü CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD34, CD40, CD62L, CD66b, CD83, CD103, CCR7 ve HLA-DR hücre yüzey belirteçlerinin düzeyi analiz edildi (Şekil 4.1 A). Bu analizler sonucunda, KG-1 hücrelerinde CD34 ve HLA-DR düzeylerinin yüksek olduğu saptandı. MDA-MB-231 hücre hattı ile yapılan ko-kültürlerde CD34 düzeylerinin, kontrole ve MCF-7 hücre hattı ile ko-kültürü yapılan hücrelere göre, azaldığı HLA-DR düzeylerinin ise arttığı gözlemlense de bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. MCF-7 hücre hattı ile yapılan ko-kültürlerde ise bu iki yüzey belirtecinin düzeylerinde kontrole göre belirgin bir değişim görülmedi. (CD34 OFY, RPMI kontrol 166.3 ± 18.4 , MCF-7 ko-kültür 133.7 ± 26.5 , MDA-MB-231 ko-kültür 119.25 ± 15.5 ; HLA-DR OFY, RPMI kontrol 70.5 ± 2.5 , MCF-7 ko-kültür 65 ± 19.7 , MDA-MB-231 ko-kültür 110 ± 25.9). Bu hücrelerde, MDA-MB-231 ko-kültürlerinde MCF-7 ko-kültürlerine kıyasla CD11c düzeylerinde artış ve MCF-7 ko-kültürlerinde kontrole göre CD103

düzeylerinde azalma gözlenmesine rağmen bu değişimler minimal düzeyde kalmıştır (Şekil 4.1 B, F). MDA-MB-231 hücre hattı ile ko-kültürü yapılan KG-1 hücrelerinde CD14 düzeylerinin MCF-7 ko-kültürlerine göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Ancak bu azalmanın düşük seviyede olduğu görüldü (CD14 OFY, RPMI kontrol 1.03 ± 0.04 , MCF-7 ko-kültür 1.14 ± 0.02 , MDA-MB-231 ko-kültür 0.98 ± 0.007). Diğer hücre belirteçlerinin düzeyinde ise anlamlı bir değişim gözlenmedi. HL-60 hücre hattı ile yapılan ko-kültürlerde MDA-MB-231 hücrelerinin, kontrole göre, CD34 düzeylerini artırdığı CD14 düzeylerini ise hem kontrole hem de MCF-7 hücre hattı ile yapılan ko-kültürlere göre azalttığı görüldü. Bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen düşük seviyelerde kaldığı belirlendi. Diğer belirteçlerin düzeylerinde ise belirgin bir değişim saptanmadı (Şekil 4.1 C, F).

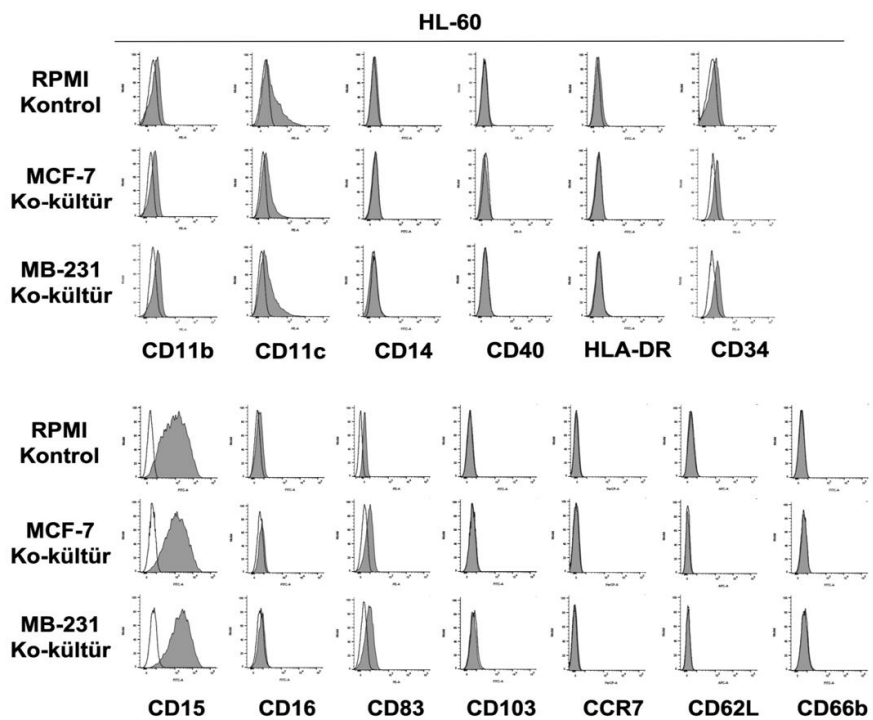
A



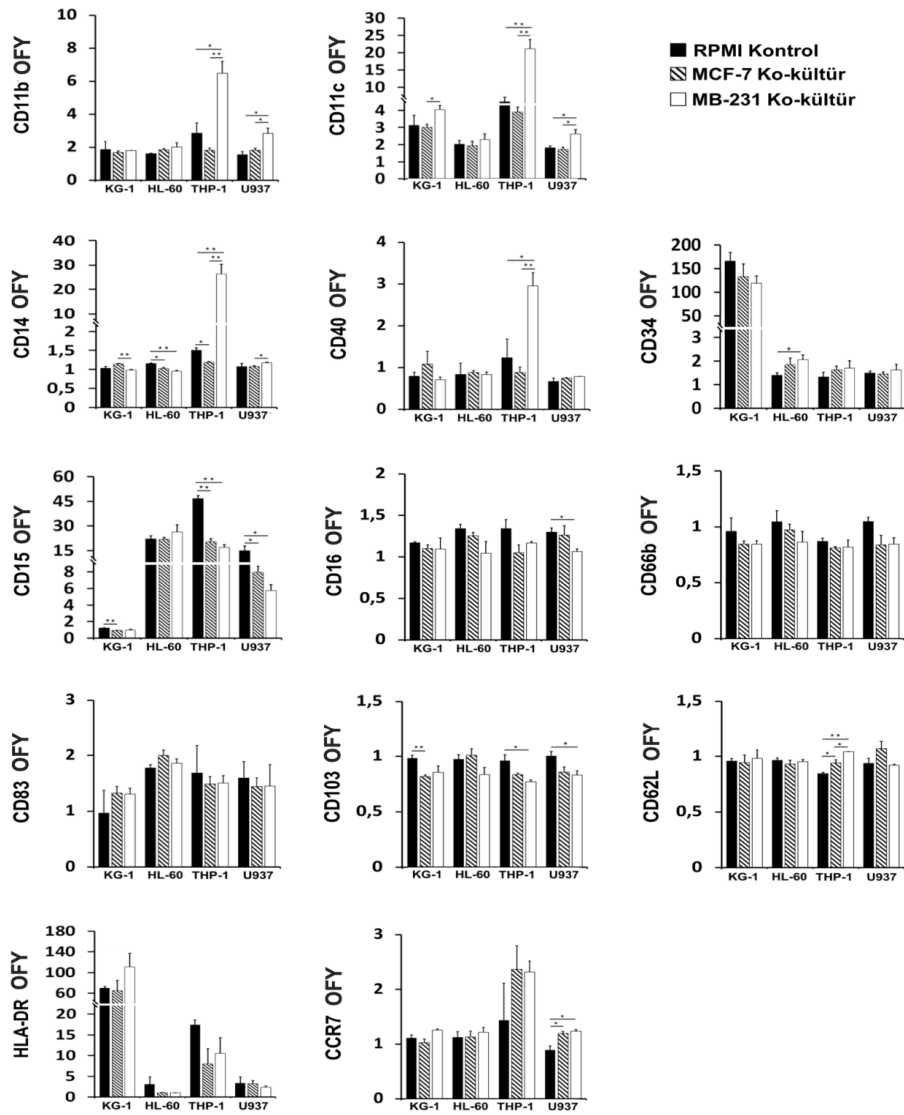
B



C



F



Şekil 4.1. Bazal-benzeri (MDA-MB-231) ve lüminal (MCF-7) meme kanseri hücre hatları ile 1:1 oranında ($1 \cong 5 \times 10^5$ hücre) 48 saat boyunca ko-kültürü yapılan miyeloid hücrelerin akım sitometri analizi sonrası yüzey belirteçlerinde meydana gelen değişim. A) Kullanılan miyeloid hücre belirteçlerinin hücre tiplerine göre dağılım şeması. B) KG-1, C) HL-60, D) THP-1, E) U937 hücreleri ile elde edilen sonuçları gösteren temsili akım sitometri histogramları ve F) izotipik kontrol boyamaları ile elde edilen ortanca floresan yoğunluğu (OFY) verisine göre normalize edilmiş OFY değişimleri. Boş histogramlar izotipik kontrolleri, dolu histogramlar ise özgül antikolar ile yapılan işaretlemeleri göstermektedir. (MB-231, MDA-MB-231; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n \geq 3$)

THP-1 hücrelerinde MDA-MB-231 hücre hattı ile yapılan ko-kültürlerde CD11b, CD11c, CD14 ve CD40 belirteçlerinin, kontrole ve MCF-7 hücre hattı ile yapılan ko-kültürlere kıyasla, belirgin şekilde anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (CD11b OFY, RPMI kontrol 2.86 ± 0.6 , MCF-7 ko-kültür 1.82 ± 0.14 , MDA-MB-231 ko-kültür 6.5 ± 0.73 ; CD11c OFY, RPMI kontrol 5.5 ± 1.3 , MCF-7 ko-kültür 3.9 ± 0.3 , MDA-MB-231 ko-kültür 21.9 ± 2.7 ; CD14 OFY, RPMI kontrol 1.5 ± 0.07 , MCF-7 ko-kültür 1.2 ± 0.03 , MDA-MB-231 ko-kültür 26.4 ± 4 ; CD40 OFY, RPMI kontrol 1.24 ± 0.44 , MCF-7 ko-kültür 0.9 ± 0.13 , MDA-MB-231 ko-kültür 2.95 ± 0.3). MCF-7 ile yapılan ko-kültürlerde bu belirteçlerin azalma eğiliminde olduğu görüldü. Bu belirteçler dışında, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları ile yapılan ko-kültürlerde THP-1 hücrelerinde CD15 düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi (CD15 OFY, RPMI kontrol 46.5 ± 1.9 , MCF-7 ko-kültür 20.3 ± 1.2 , MDA-MB-231 ko-kültür 6.5 ± 0.73). Aynı koşullarda CD103 düzeylerindeki azalmanın ve CD62L düzeylerindeki artışların çok düşük seviyede kaldığı tespit edildi (Şekil 4.1 D, F). Diğer hücre belirteçlerinin düzeyinde anlamlı bir değişim gözlenmedi.

U937 hücrelerinde MDA-MB-231 hücre hattı ile yapılan ko-kültürlerde CD11b ve CD11c düzeylerinin kontrol hücrelerine ve MCF-7 ile yapılan ko-kültürlere kıyasla, anlamlı bir şekilde arttığı görüldü (CD11b OFY, RPMI kontrol 1.5 ± 0.2 , MCF-7 ko-kültür 1.8 ± 0.1 , MDA-MB-231 ko-kültür 2.8 ± 0.3 ; CD11c OFY, RPMI kontrol 1.8 ± 0.1 , MCF-7 ko-kültür 1.7 ± 0.1 , MDA-MB-231 ko-kültür 2.6 ± 0.2). MDA-MB-231 ko-kültürlerinde U937 hücrelerindeki CD14 düzeyleri MCF-7 ile yapılan ko-kültürlere göre anlamlı olarak artış gösterse de bu artışın çok düşük seviyede kaldığı tespit edildi (CD14 OFY, RPMI kontrol 1.07 ± 0.09 , MCF-7 ko-kültür 1.07 ± 0.03 , MDA-MB-231 ko-kültür 1.17 ± 0.01). Bu miyeloid hücrelerin hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücre hatları ile yapılan ko-kültürlerinde CD15 düzeylerinin azaldığı CCR7 düzeylerinin ise arttığı belirlendi (CD15 OFY, RPMI kontrol 13.7 ± 4 , MCF-7 ko-kültür 8 ± 0.7 , MDA-MB-231 ko-kültür 5.7 ± 0.7 ; CCR7 OFY, RPMI kontrol 0.9 ± 0.07 , MCF-7 ko-kültür 1.2 ± 0.04 , MDA-MB-231 ko-kültür 1.23 ± 0.03). CD16 ve

CD103 düzeylerinin ise MDA-MB-231 ile yapılan ko-kültürlerde azaldığı saptandı (Şekil 4.1 E, F). Diğer hücre belirteçlerinin düzeyinde anlamlı bir değişim gözlenmedi.

Özetle, bu analizlerin sonucunda bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 hücrelerinin THP-1 hücrelerinde CD11b, CD11c, CD14 ve CD40 düzeylerini, U937 hücrelerinde ise CD11b ve CD11c düzeylerini hem kontrole hem de lüminal meme kanseri hücre hattı MCF-7 ile yapılan ko-kültürlere kıyasla artırmış olduğu belirlendi. İmmatür karakteri baskın olan miyeloid hücre hatlarının monositik karaktere doğru olgunlaşma eğilimi göstereceği ile ilgili bir öngörünün ortaya çıkmasına yol açtı. Diğer immatür miyeloid hücrelerde (KG-1 ve HL-60) belli bir miyeloid hücre tipine özgü belirteçlerin değişim göstermemesi nedeniyle ileri aşama deneylere THP-1 ve U937 hücreleri ile devam edilmesi kararlaştırıldı.

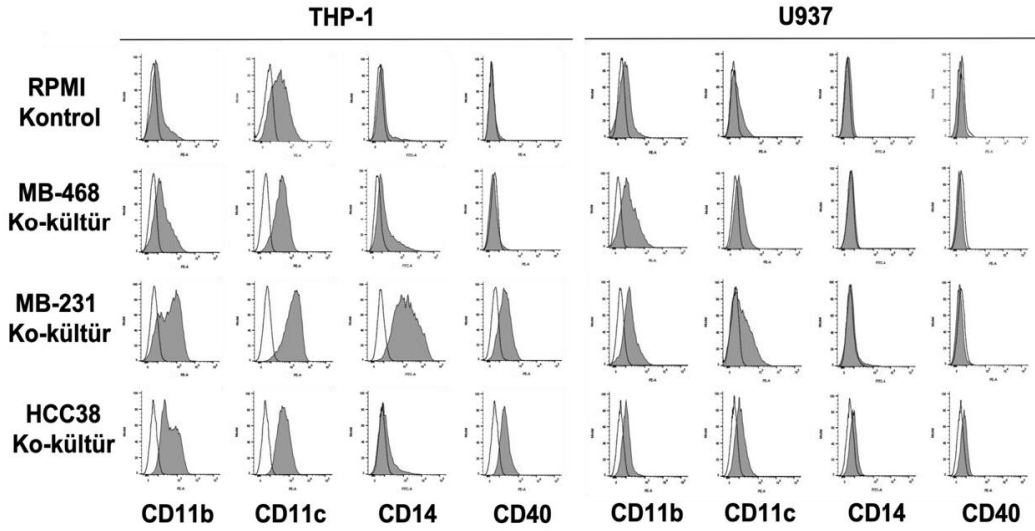
4.1.2. Farklı Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücre Hatlarının THP-1 ve U937 Hücrelerinin Monositik Karakteri Üzerine Etkisi

a. Monositik Seri Belirteçlerinin Analizi

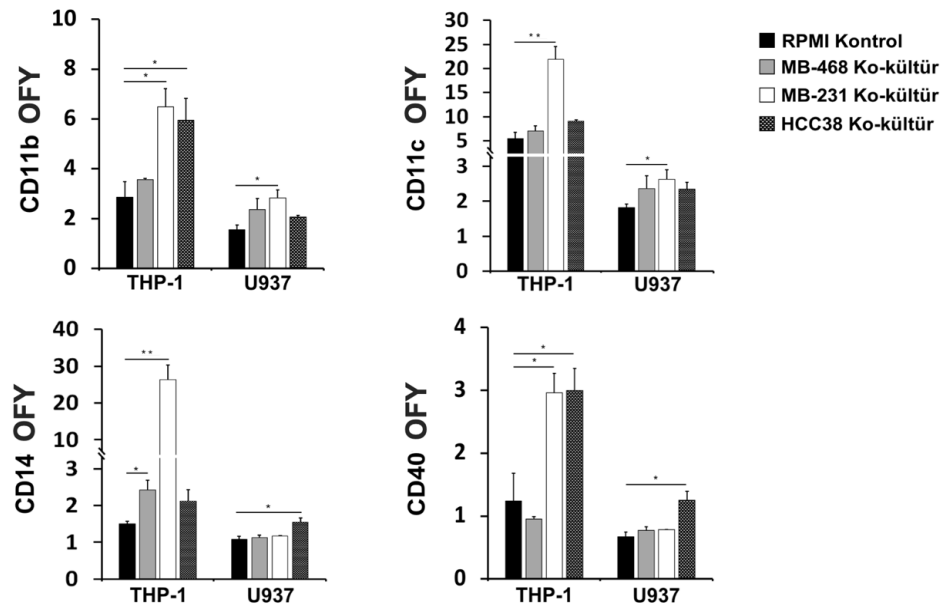
Bazal-benzeri özelliğe sahip meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 ile yapılan ko-kültürlerde özellikle THP-1 ve U937 hücrelerinde anlamlı sonuçlara ulaşılması nedeni ile diğer bazal-benzeri özelliğe sahip meme kanseri hücre hatlarında da benzer etkinin görülüp görülmeyeceği test edildi. Bu amaçla, THP-1 ve U937 hücreleri MDA-MB-231 hücre hattına ek olarak MDA-MB-468 ve HCC38 bazal-benzeri meme kanseri hücre hatları ile de 48 saat boyunca ko-kültür edildi ve monositik hücre belirteçlerindeki değişimler değerlendirildi. Bu analizler sonucunda, THP-1 hücrelerinde HCC38 ile yapılan ko-kültürlerde, MDA-MB-231 hücrelerindeki gibi, CD11b ve CD40 belirteçlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. CD11c ve CD14 düzeylerinde de artışlar gözlemlense de bu artışların anlamlı olmadığı belirlendi. (CD11b OFY, RPMI kontrol 2.86 ± 0.6 , HCC38 ko-kültür 5.95 ± 0.86 ; CD40 OFY, RPMI kontrol 1.24 ± 0.44 , HCC38 ko-kültür 3 ± 0.3 ; CD11c OFY, RPMI kontrol 5.5 ± 1.3 , HCC38 ko-kültür 9 ± 0.3 ; CD14 OFY, RPMI kontrol 1.5 ± 0.07 , HCC38 ko-kültür 2.1 ± 0.3) MDA-MB-468 ile yapılan ko-kültürlerde ise CD14 dışında anlamlı bir değişim saptanmadı (CD14 OFY, RPMI kontrol 1.5 ± 0.07 ,

MDA-MB-468 ko-kültür 2.4 ± 0.25). Bu bazal-benzeri meme kanseri hücre hattının THP-1 hücrelerinde CD11b ve CD11c belirteçlerinin düzeyini artırma eğiliminde olduğu gözlemlense de bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (Şekil 4.2).

A



B



Şekil 4.2. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hatları ile 1:1 oranında ($1 \approx 5 \times 10^5$ hücre) 48 saat boyunca ko-kültürü yapılan THP-1 ve U937 hücrelerinde monositik hücre belirteçlerinin akım sitometri ile analizi. A) THP-1 ve U937 hücreleri ile elde edilen sonuçları gösteren temsili akım sitometri histogramları ve B) izotipik kontrol boyamaları ile elde edilen ortalama floresan yoğunluğu (OFY) verisine göre normalize edilmiş OFY değişimleri. Boş histogramlar izotipik kontrolleri, dolu histogramlar ise özgül antikorlar ile yapılan işaretlemeleri göstermektedir. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n \geq 3$)

U937 hücreleri ile yapılan ko-kültürlerde MDA-MB-468 ve HCC38 hücrelerinin CD11b ve CD11c düzeylerini artırdığı ancak bu artışların MDA-MB-231 hücrelerinin etkisinden daha az olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. HCC38 ile yapılan ko-kültürlerde U937 hücrelerinde CD14 ve CD40 düzeylerinin kontrole ve göre arttığı gözlemlendi (CD14 OFY, RPMI kontrol 1.1 ± 0.08 , HCC38 ko-kültür 1.5 ± 0.1 ; CD40 OFY, RPMI kontrol 0.7 ± 0.07 , HCC38 ko-kültür 1.25 ± 0.1) (Şekil 4.2). Bu sonuçlar, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinin özellikle THP-1 hücrelerinin monositik karakterini destekleyebileceğini göstermiştir.

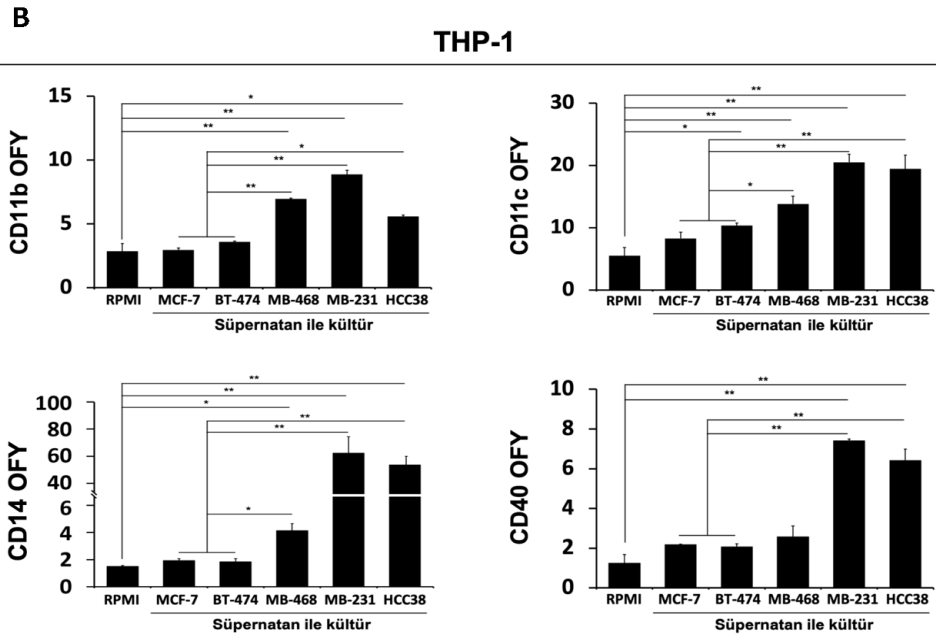
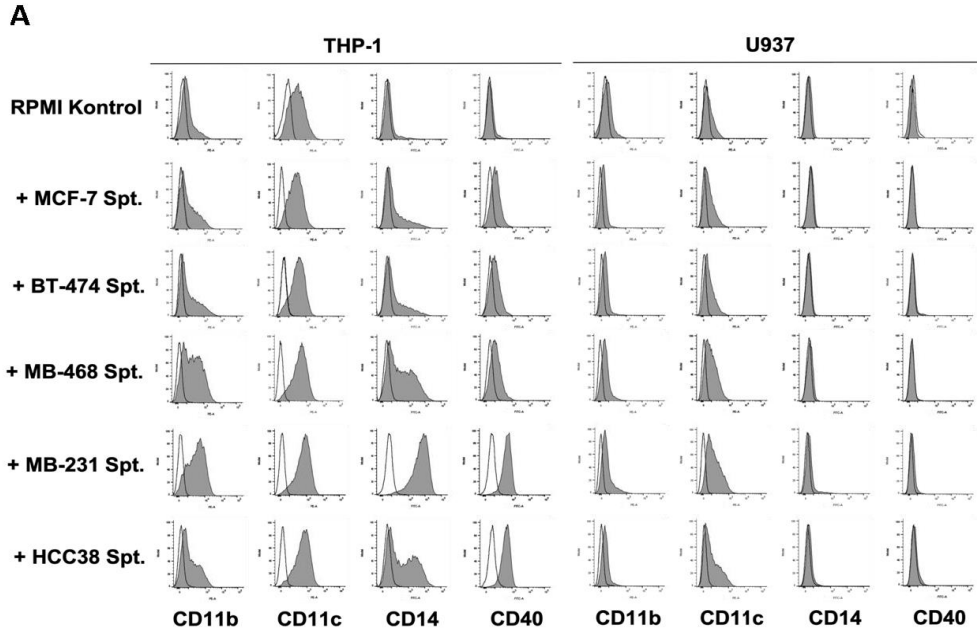
4.2. Bazal-benzeri ve Lüminal Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörlerin Miyeloid Hücre Hatlarının Fenotipine ve Fonksiyonlarına Etkisi

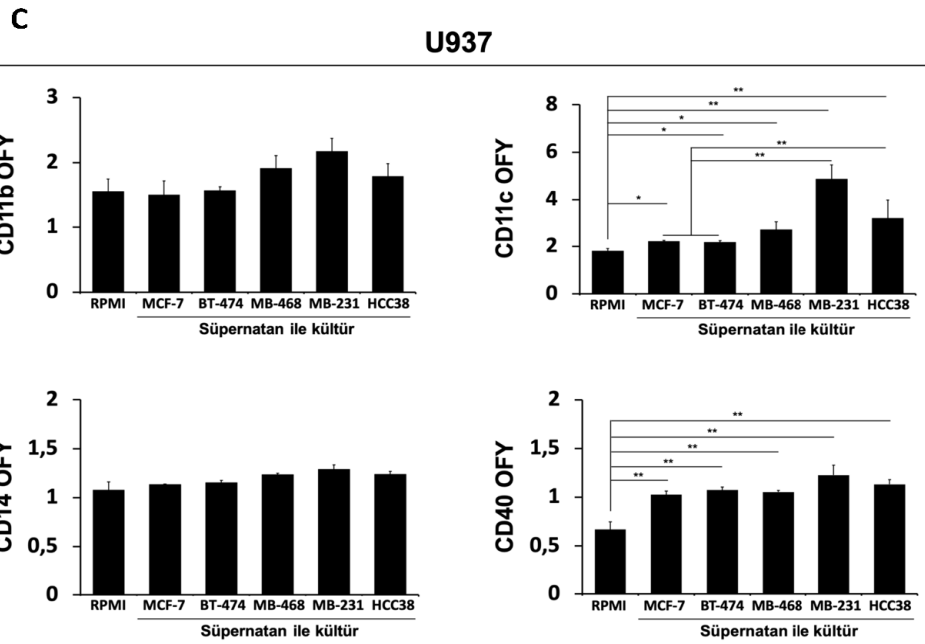
Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinin miyeloid hücrelerde monositik hücre fenotipini desteklemesinin meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerden olduğu hipotezi oluşturuldu ve meme kanseri hücre hatlarından salgılanan faktörlerin miyeloid hücrelerde yarattığı fenotipik ve fonksiyonel değişimler analiz edildi. Bunun için bazal-benzeri MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38 meme kanseri hücre hatlarının yanı sıra lüminal özellikteki MCF-7 ve BT-474 meme kanseri hücre hatlarından elde edilen süpernatantlar varlığında THP-1 ve U937 miyeloid hücre hatlarının 48 saat boyunca kültürü yapıldı. İnkübasyon süresi sonunda miyeloid hücrelerde immünofenotipik değişimler, CD4⁺ T lenfositlere kostimülasyon sağlama kapasitesi, kemotaksis yeteneği, reaktif oksijen türleri (ROT) üretim düzeyleri ve fagositoz yeteneği değerlendirildi. Ayrıca, STAT3 yolak aktivasyonu ve integrin gen ifadesi analizi de gerçekleştirildi.

4.2.1. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantların Miyeloid Hücrelerde Oluşturduğu İmmünofenotipik Değişimler

Meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlere 48 saat boyunca maruz bırakılan THP-1 ve U937 hücrelerinde CD11b, CD11c, CD14 ve CD40 düzeyleri incelendi. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları (spt.) ile, özellikle MDA-MB-231 ve HCC38 süpernatantları, kültürü yapılan THP-1 hücrelerinde tüm monositik hücre belirteçlerinin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının bu belirteçlerin ifadesini, sadece kontrol hücrelerine göre değil aynı zamanda lüminal meme kanseri hücre süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 hücrelerine göre de daha fazla desteklediği gözlemlendi (CD11b OFY, RPMI kontrol 2.86 ± 0.6 , MCF-7 spt. 2.95 ± 0.16 , BT-474 spt. 3.6 ± 0.04 , MDA-MB-468 spt. 6.95 ± 0.07 , MDA-MB-231 spt. 8.9 ± 0.3 , HCC38 spt. 5.6 ± 0.1 ; CD11c OFY, RPMI kontrol 5.5 ± 1.3 , MCF-7 spt. 8.2 ± 1 , BT-474 spt. 10.3 ± 0.4 , MDA-MB-468 spt. 13.8 ± 1.25 , MDA-MB-231 spt. 20.5 ± 1.3 , HCC38 spt. 19.4 ± 2.2 ;

CD14 OFY, RPMI kontrol 1.5 ± 0.07 , MCF-7 spt. 1.9 ± 0.1 , BT-474 spt. 1.8 ± 0.2 , MDA-MB-468 spt. 4.1 ± 1.2 , MDA-MB-231 spt. 62.4 ± 11.9 , HCC38 spt. 54.4 ± 5.2 ; CD40 OFY, RPMI kontrol 1.24 ± 0.44 , MCF-7 spt. 2.2 ± 0.02 , BT-474 spt. 2.1 ± 0.16 , MDA-MB-468 spt. 2.5 ± 0.5 , MDA-MB-231 spt. 7.4 ± 0.08 , HCC38 spt. 6.4 ± 0.6) (Şekil 4.3 A, B).





Şekil 4.3. Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca kültürü yapılan miyeloid hücre hatlarında monositik hücre belirteçlerinin akım sitometri ile analizi. A) THP-1 ve U937 hücreleri ile elde edilen sonuçları gösteren temsili akım sitometri histogramları. B) THP-1 ve C) U937 hücrelerinde izotipik kontrol boyamaları ile elde edilen ortanca floresan yoğunluğu (OFY) verisine göre normalize edilmiş OFY değişimleri. Boş histogramlar izotipik kontrolleri, dolu histogramlar ise özgül antikorlar ile yapılan işaretlemeleri göstermektedir. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n \geq 3$).

U937 hücrelerinde bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları, kontrole ve lüminal hücre süpernatantlarına göre CD11b ifadesini artırma eğiliminde olsa da bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. CD11c düzeylerinin ise kontrole göre tüm koşullarda anlamlı olarak arttığı belirlendi. Hem kontrole hem de lüminal hücre süpernatantları ile kültürü yapılan hücelere göre en belirgin artışların MDA-MB-231 ve HCC38 hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan U937 hücrelerinde olduğu belirlendi (CD11c OFY, RPMI kontrol 1.8 ± 0.1 , MCF-7 spt. 2.2 ± 0.04 , BT-474 spt. 2.2 ± 0.07 , MDA-MB-468 spt. 2.7 ± 0.3 , MDA-MB-231 spt. 4.9 ± 0.9 , HCC38 spt. 3.2 ± 0.8). CD14 düzeylerinde koşullar

arasında belirgin bir değişim gözlenmezken tüm meme kanseri hücre süpernatantlarının CD40 düzeylerini arttırabildiği tespit edildi (CD40 OFY, RPMI kontrol 0.7 ± 0.07 , MCF-7 spt. 1 ± 0.03 , BT-474 spt. 1.1 ± 0.03 , MDA-MB-468 spt. 1 ± 0.02 , MDA-MB-231 spt. 1.2 ± 0.2 , HCC38 spt. 1.1 ± 0.05) (Şekil 4.3 A, C).

Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin THP-1 ve U937 hücrelerinde monositik hücre belirteçlerinin düzeylerini kontrole ve lüminal hücre hattı süpernatantları ile yapılan költürlere göre artış yönünde etkilemesi bu hücrelerin fenotipik karakterinde doğrudan hücre-hücre kontakından ziyade salgılanan faktörlerin daha etkili olabileceği hipotezini desteklemiştir. Bu nedenle, ilerleyen deneylere meme kanseri hücre süpernatantları ile devam edilmesi kararlaştırıldı.

4.2.2. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerin CD4⁺ T Hücrelere Kostimülasyon Sağlama Kapasiteleri

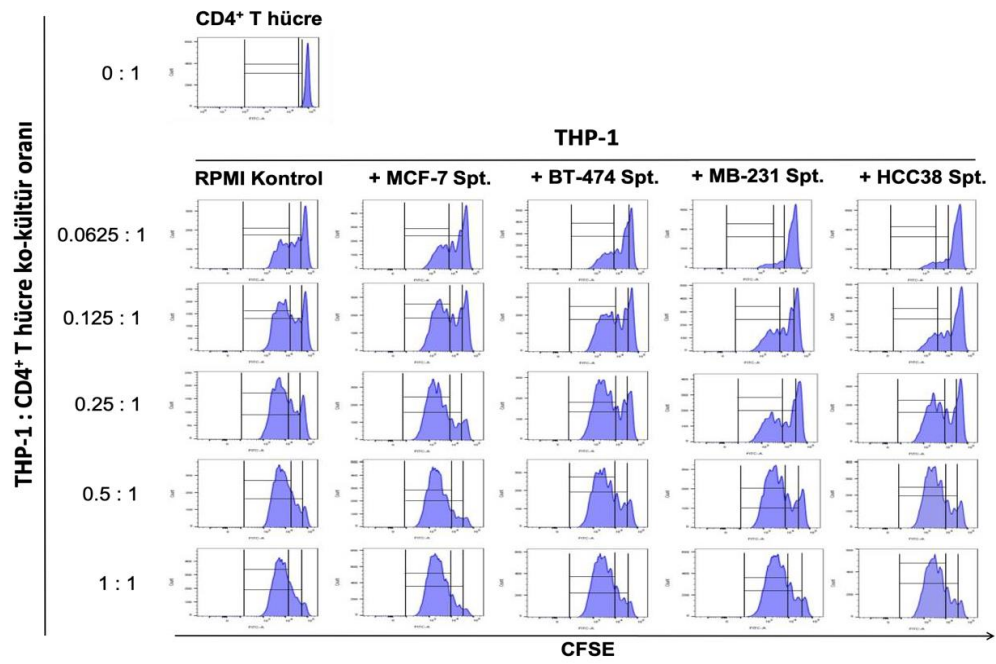
Meme kanseri hücre hatlarından (MCF-7, BT-474, MDA-MB-231 ve HCC38) elde edilen süpernatantlar ile 48 saat boyunca muamele edilen THP-1 ve U937 hücrelerinin CD4⁺ T hücre proliferasyonu üzerine etkisini belirlemek için T lenfosit ko-költürleri oluşturuldu. Miyeloid hücreler ile sağlıklı bireylerden izole edilen CD4⁺ T hücrelerin 0.0625:1, 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1 ve 1:1 oranlarında ko-költürü yapıldı. İlk sinyal olarak anti-CD3 antikoru varlığında deneyler gerçekleştirildi. Böylelikle, miyeloid hücrelerin T hücrelere verebildiği kostimülasyon hakkında bilgi elde edilmesi amaçlandı.

THP-1 hücreleri ile ko-költürü yapılan CD4⁺ T hücrelerin, U937'ye kıyasla, çoğalma kapasitelerinin daha yüksek olduğu görüldü. Lüminal meme kanseri hücre hattı (MCF-7 ve BT-474) süpernatantları ile muamele edilen THP-1 ve U937 hücrelerinin, kontrole göre, T hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesinde belirgin bir değişime neden olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.4). Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ile muamele edilen THP-1 hücrelerinin kontrole ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile

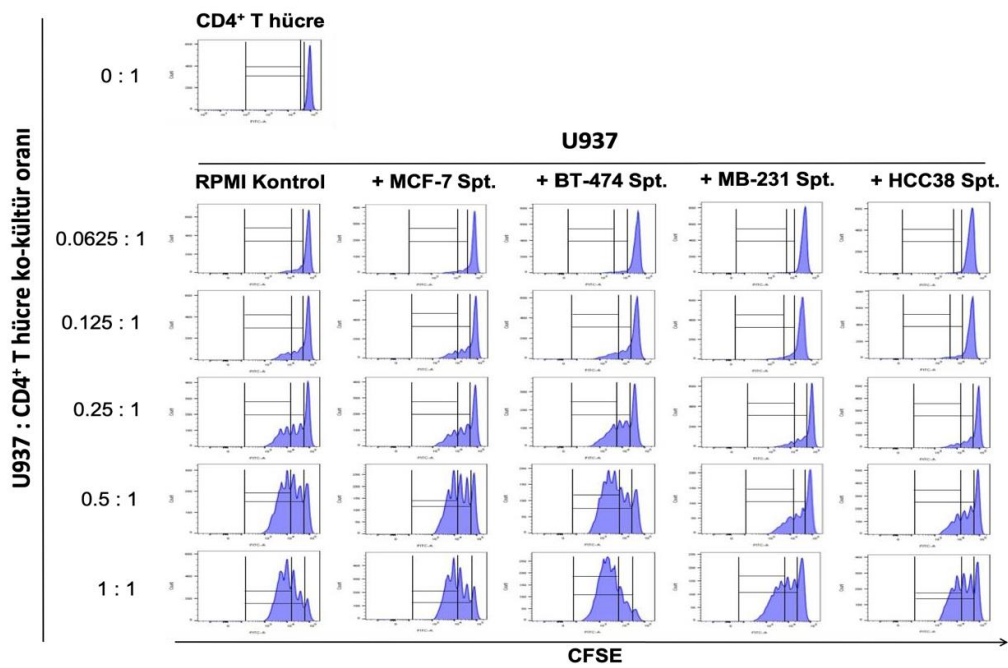
muamele edilen THP-1 hücrelerine göre CD4⁺ T hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesini 0.125:1 (miyeloid hücre : T hücre) oranında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı belirlendi. MDA-MB-231 hücre hattı süpernatanı ile muamele edilen THP-1 hücrelerinin T hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesini 0.25:1 oranında da anlamlı olarak azaltmaya devam ettiği belirlendi. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile muamele edilen THP-1 hücrelerinin CD4⁺ T hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesindeki azaltıcı etkisinin ilerleyen oranlarda ortadan kalktığı görüldü (Şekil 4.4 A, C).



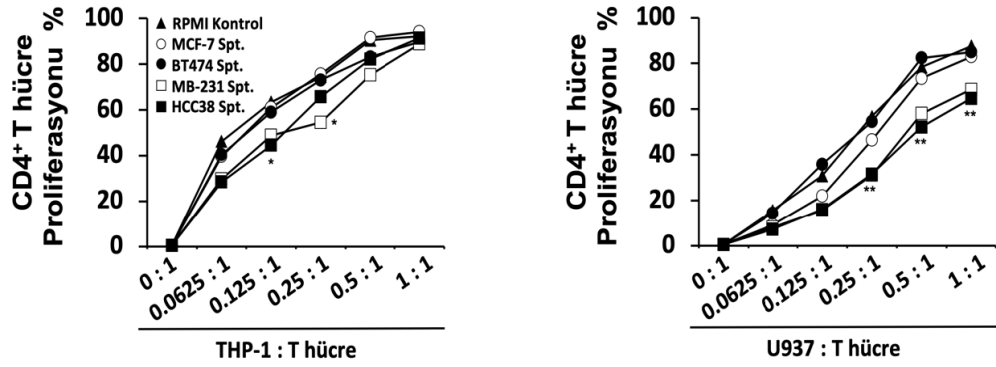
A



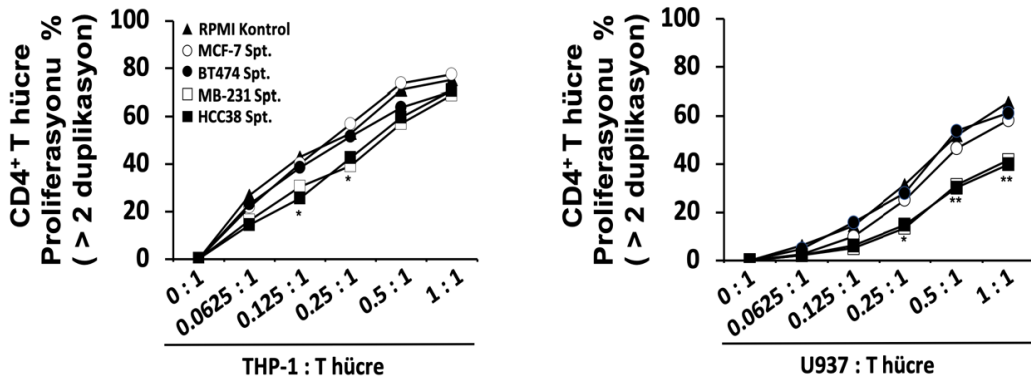
B



C



D



Şekil 4.4. Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile muamele edilen miyeloid hücre hatlarının 96 saat sonunda CD4⁺ T hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesinin akım sitometri ile analizi. A) THP-1 ve B) U937 hücreleri ile farklı oranlarda ko-kültürü yapılan anti-CD3 antikorunu ile uyarılmış CFSE işaretli CD4⁺ T hücrelerin proliferasyonundan elde edilen sonuçları gösteren temsili akım sitometri histogramları. C) Total proliferasyon ve D) ikiden fazla olan duplikasyon değerlerine ait yüzde grafikleri. (MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant; * p<0.05, ** p<0.01; n=3)

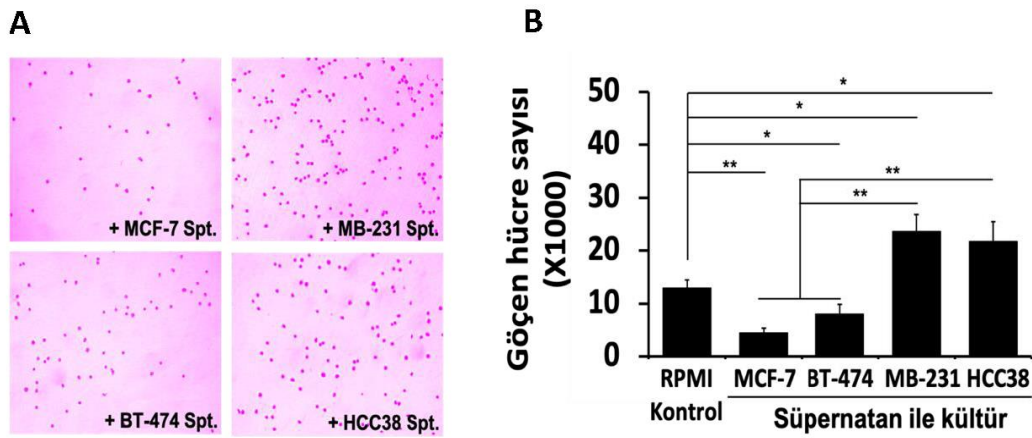
Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile muamele edilen U937 hücrelerinin kontrole ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile muamele edilen U937 hücrelerine göre CD4⁺ T hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesini 0.25:1 (miyeloid hücre : T hücre) oranından itibaren istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı belirlendi (Şekil 4.4 B, C).

Meme kanseri hücre süpernatantları ile muamele edilen THP-1 ve U937 hücrelerinin CD4⁺ T hücre proliferasyonu üzerindeki uyarıcı etkisini daha iyi gözlemek için ikiden fazla duplika olan, proliferasyon ivmesi daha yüksek hücre oranları da belirlendi. Bu hücrelerde de bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile muamele edilen miyeloid hücrelerin, kontrole ve lüminal meme kanseri hücre süpernatantları ile muamele edilen miyeloid hücrelere göre, CD4⁺ T hücrelerin proliferasyonunu uyarma kapasitesini düşürdüğü gözlemlendi. Bu fark en belirgin şekilde THP-1 için 0.125:1, U937 için 0.25:1 (miyeloid hücre : T hücre) oranında yapılan ko-kültürlerde tespit edildi (Şekil 4.4 A, B, D).

4.2.3. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerin Kemotaksis Yeteneğinin Analizi

Meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin miyeloid hücrelerin migrasyon kapasitesi üzerine etkisini gözlemek için lüminal ve bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 hücrelerinde kemotaksis analizi gerçekleştirildi. Kısaca; meme kanseri hücre hatlarından elde edilen süpernatantlar veya RPMI 1640 besiyeri ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca THP-1 hücrelerinin kültürü yapıldı. Daha sonra, meme kanseri hücre hattı süpernatantları uzaklaştırıldı ve THP-1 hücreleri tampon çözelti ile yıkandı. THP-1 hücreleri %1 FBS içeren besiyeri ile 1×10^5 hücre/100 μ L olacak şekilde süspansiyon edildi. Kemotaksis deneyinin yapılacağı plaktaki kuyulara her koşul için tam besiyeri eklendi ve kemotaksis hazneleri tabanları kuyulardaki besiyerinin yüzeyine denk gelecek şekilde kuyulara yerleştirildi. THP-1 hücre süspansiyonları haznelere eklendi ve 8 saat boyunca inkübe edildi. Serum gradyanına göre haznedeki plaktaki kuyulara göçen hücreler sayılarak analizler gerçekleştirildi.

Lüminal meme kanseri hücre süpernatantlarının THP-1 hücrelerinin göç kapasitesini RPMI besiyerindeki kontrol hücrelerine göre azalttığı gözlemlendi (Göçen hücre sayısı (x1000), RPMI kontrol 13 ± 1.5 , MCF-7 spt. 4.5 ± 0.85 , BT-474 spt. 8 ± 1.8). Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının, lüminal meme kanseri hücre süpernatantlarına ve kontrol hücrelerine kıyasla, THP-1 hücrelerinin kemotaksis yeteneğini belirgin düzeyde artırdığı tespit edildi (Göçen hücre sayısı (x1000), RPMI kontrol 13 ± 1.5 , MDA-MB-231 spt. 23.6 ± 3.2 , HCC38 spt. 21.75 ± 3.7) (Şekil 4.5).



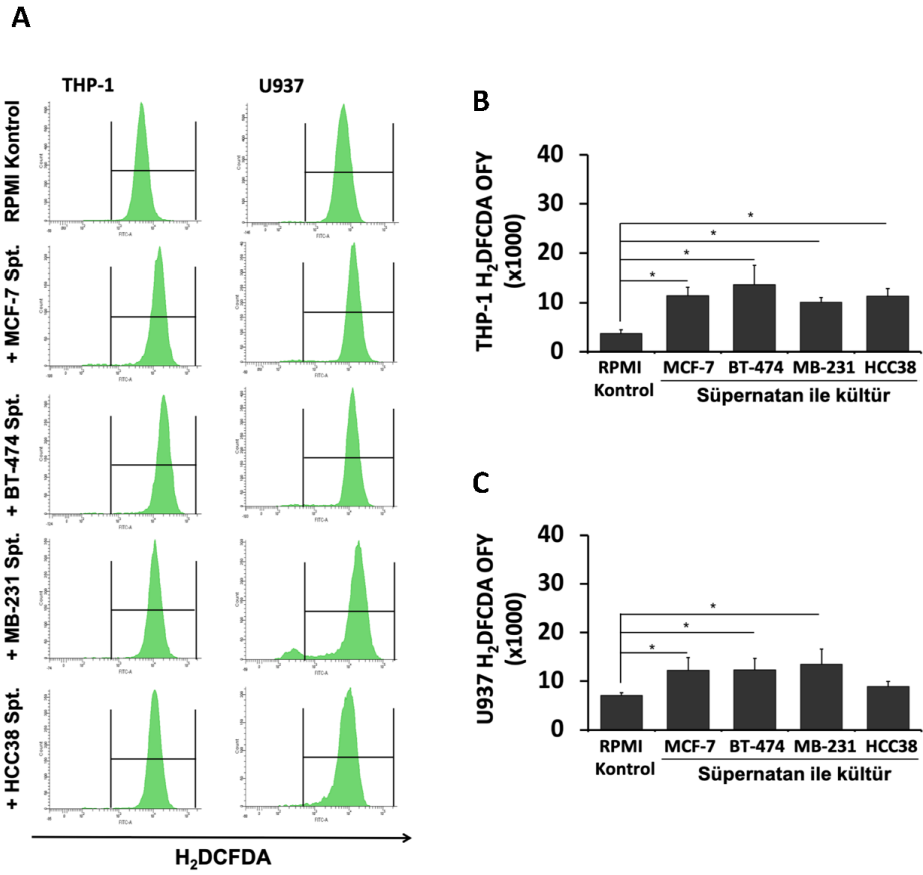
Şekil 4.5. Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının THP-1 hücrelerinin kemotaksis kapasitesine etkisi. A) Kemotaksis haznesinden plaktaki kuyulara göç eden hücrelerin kristal viyole ile boyandıktan sonraki mikroskop görüntüleri ve B) göçen hücre sayısını gösteren bar grafiği. (MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant; * p<0.05, ** p<0.01; n=3)

4.2.4. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerde Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Üretim Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Miyeloid hücrelerde ROT üretim düzeylerini analiz etmek için bu hücrelerin meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca kültürü yapıldı. Daha sonra, süpernatantlar uzaklaştırıldı ve miyeloid

hücreler tampon çözelti ile süspansiyon haline getirildi. Hücredeki reaktif oksijen türleri ile etkileştiğinde floresan ışımaya veren H₂DCFDA ajanı hücre süspansiyonuna eklendi ve 30 dk. boyunca inkübe edildi. Floresan ışımaya yoğunluğuna göre akım sitometri ile analizler gerçekleştirildi.

Bu analizler sonucunda, hem lüminal hem de bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin THP-1 ve U937 hücrelerinde ROT üretimini, kontrol hücrelerine göre, istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığı belirlendi (H₂DCFDA OFY, THP-1, RPMI kontrol 3.7 ± 0.8 , MCF-7 spt. 11.4 ± 1.75 , BT-474 spt. 13.7 ± 3.8 , MDA-MB-231 spt. 10.1 ± 0.9 , HCC38 spt. 11.4 ± 1.5 ; U937, RPMI kontrol 7.1 ± 0.6 , MCF-7 spt. 12.2 ± 2.6 , BT-474 spt. 12.3 ± 2.3 , MDA-MB-231 spt. 13.5 ± 3.1 , HCC38 spt. 8.9 ± 1). Ancak, bu artışların minimal düzeyde kaldığı gözlemlendi. Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücrelerden salgılanan faktörlerin THP-1 ve U937 hücrelerinin ROT üretimine etkisi arasında belirgin bir fark olmadığı görüldü (Şekil 4.6).

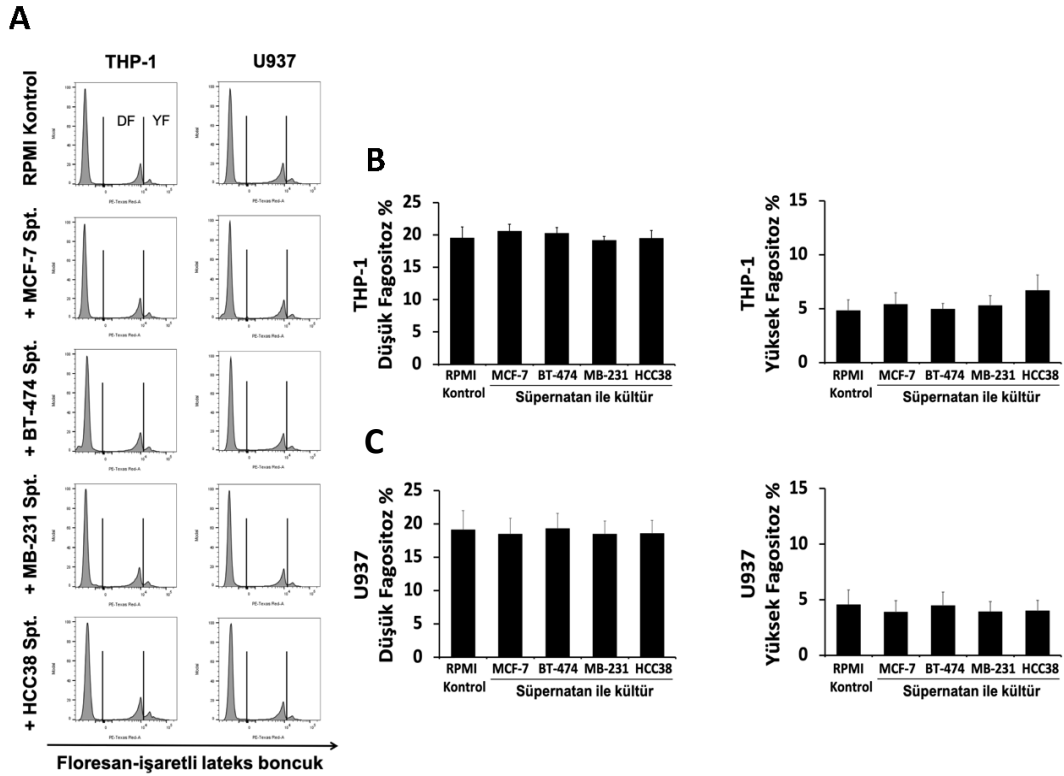


Şekil 4.6. Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatanlarının miyeloid hücrelerde ROT üretimine etkisi. A) Süpernatanlarla 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca uyarılan THP-1 ve U937 hücrelerinde ROT üretimini gösteren H₂DCFDA ajanı ile yapılan akım sitometri analiz histogramları. B) THP-1 ve C) U937 hücrelerinde ROT üretimine bağlı olarak ortanca floresan yoğunluğu (OFY) değerlerini gösteren bar grafikleri. (MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatan; * $p < 0.05$; $n = 3$)

4.2.5. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatanlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerin Fagositoz Yeteneğinin Değerlendirilmesi

Lüminal ve bazal-benzeri meme kanseri hücre hatları süpernatanları ile inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerinin serum ile opsonize edilmiş floresan-ışaretleli lateks boncuklar varlığında fagositoz kapasitesi değerlendirildi.

Lateks boncuklarla daha az düzeyde işaretlenmiş olan düşük fagositoz kapasitesine sahip miyeloid hücrelerde meme kanseri hücre süpernatantları ile muamele sonrası herhangi bir fark gözlenmedi (Şekil 4.7). Yüksek fagositoz kapasitesi değerlendirildiğinde ise, THP-1 hücrelerinde özellikle HCC38 hücrelerinden salgılanan faktörler varlığında fagositoz artışı tespit edilse de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil. 4.7 A, B). Meme kanseri hücre süpernatantları ile inkübe edilen U937 hücrelerinde de yüksek fagositoz kapasitesi değerleri arasında anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 4.7 A, C).

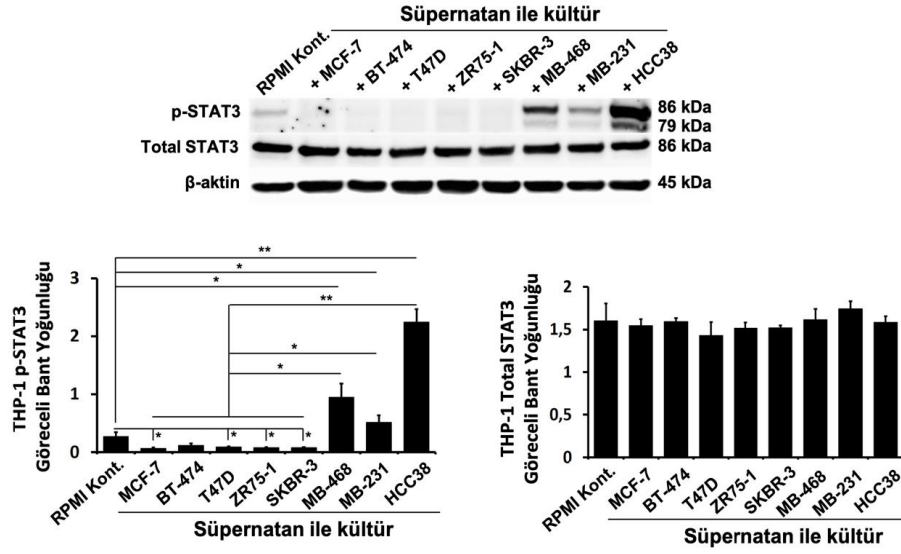


Şekil 4.7. Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının miyeloid hücrelerin fagositoz kapasitesine etkisi. A) Süpernatantlarla 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerinin floresan-ışaretli lateks boncuklarla işaretlenme bağlanma ve fagositoz kapasitesini gösteren temsili akım sitometri histogramları. Düşük fagositoz (DF) ve yüksek fagositoz (YF) kapasitesine sahip B) THP-1 ve C) U937 hücrelerindeki yüzde değişimlerini gösteren bar grafikleri. MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant; n=3)

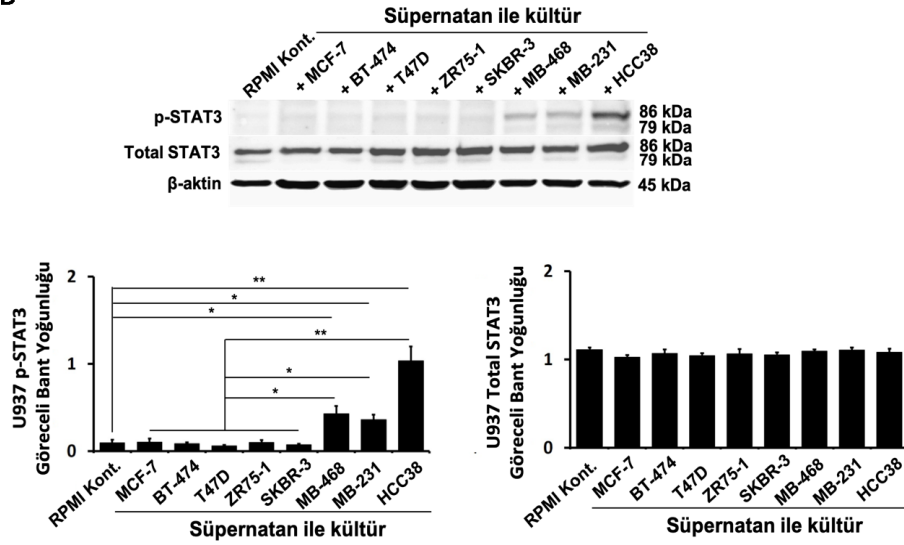
4.2.6. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerde STAT3 Yolak Aktivasyonunun Araştırılması

STAT3 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu sonucu tümör mikroçevresinde bulunan makrofajlar tümör gelişimini destekleyen immün baskılayıcı karakter kazanırlar (6). Çalışmamızda, lüminal (MCF-7, BT-474, T47D, ZR75-1), HER2-pozitif (SKBR-3) ve bazal-benzeri (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerinde total STAT3 ve p-STAT3 (Tyr705) proteinlerinin düzeyi araştırıldı. THP-1 hücrelerindeki total STAT3 düzeyleri U937 hücrelerinden yüksek idi (Şekil 4.8 A, B). Alt-tipine bakılmaksızın meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin miyeloid hücrelerde total STAT3 protein ifadesine etki etmediği belirlendi (Şekil 4.8). Lüminal ve HER2-pozitif meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin, BT-474 hariç, THP-1 hücrelerinde STAT3 fosforilasyonunu anlamlı olarak azalttığı görüldü. U937 hücrelerinde ise hem lüminal hem de HER2-pozitif meme kanseri hücre süpernatantlarının STAT3 fosforilasyonunu anlamlı düzeyde değiştirmedeği belirlendi. Bazal-benzeri meme kanseri süpernatantları varlığında hem THP-1 hem de U937 hücrelerinde, kontrole göre, p-STAT3 düzeylerinin arttığı gözlemlendi (p-STAT3/ β -aktin, THP-1, RPMI kontrol 0.27 ± 0.08 , MDA-MB-468 spt. 0.95 ± 0.2 , MDA-MB-231 spt. 0.52 ± 0.1 , HCC38 spt. 2.25 ± 0.2 ; U937, RPMI kontrol 0.1 ± 0.04 , MDA-MB-468 spt. 0.4 ± 0.09 , MDA-MB-231 spt. 0.36 ± 0.06 , HCC38 spt. 1 ± 0.1) (Şekil 4.8 A). Bu artışın THP-1 hücrelerinde, U937 hücrelerine kıyasla, daha fazla olduğu saptandı. Ek olarak, bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının lüminal ve HER2-pozitif meme kanseri hücre hattı süpernatantlarına göre miyeloid hücrelerde STAT3 aktivasyonunu anlamlı olarak artırdığı görüldü. STAT3 aktivasyonuna en belirgin şekilde etki eden faktörlerin HCC38 hücrelerinden üretildiği yönünde gözlemler yapıldı.

A

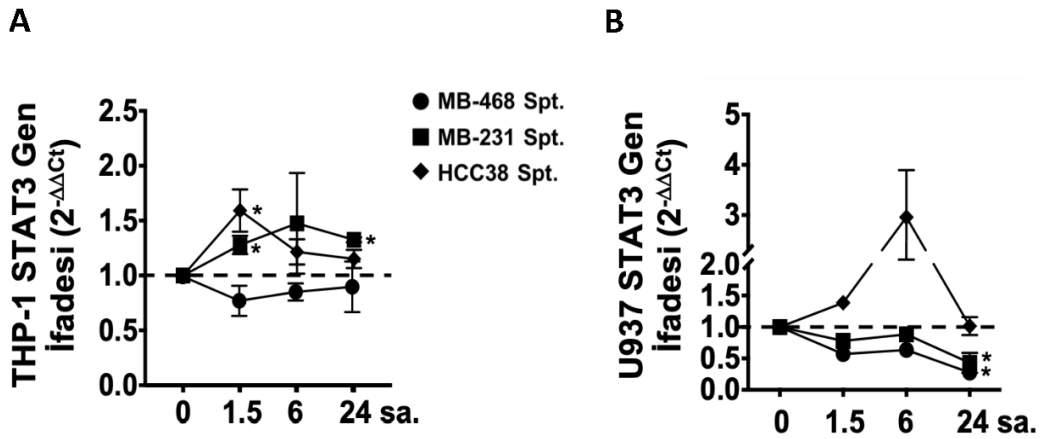


B



Şekil 4.8. Meme kanseri hücre hattı süpernatınları ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca kültürü yapılan miyeloid hücrelerde total STAT3 ve p-STAT3 protein düzeylerinin Western-Blot ile analizi. A) THP-1 ve B) U937 hücrelerindeki total STAT3 ve p-STAT3 protein analizine ait temsili Western Blot görüntüsü ve göreceli bant yoğunluğu. Total STAT3 ve p-STAT3 proteinlerinin bant yoğunlukları β -aktin bant yoğunluğuna göre normalize edildi. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; Kont., kontrol; kD, kilodalton; Spt, süpernatın; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n=3$)

Bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarının (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ile 1.5, 6 ve 24 saat boyunca inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerinde STAT3 mRNA düzeyleri analiz edildi. MDA-MB-231 ve HCC38 hücre hattı süpernatantları ile 1.5 saat boyunca kültürü yapılan THP-1 hücrelerinde STAT3 gen ifadesinin anlamlı olarak arttığı belirlendi. HCC38 hücre hattı süpernatantlarının bu etkiyi 24. saatte de gösterdiği saptandı. Ancak bu artışların çok düşük seviyelerde kaldığı görüldü (Şekil 4.9 A). MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 hücre hattı süpernatantları ile 24 saat boyunca kültürü yapılan U937 hücrelerinde STAT3 gen ifadesinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi. HCC38 hücre süpernatantları ile uyarılan U937 hücrelerinde ise 6. saatte bir artış görülse de bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Şekil 4.9 B).



Şekil 4.9. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 1.5, 6 ve 24 saat (sa.) boyunca inkübe edilen A) THP-1 ve B) U937 hücrelerinde STAT3 gen ifadesinin gerçek-zamanlı RT-PZR ile değerlendirilmesi. Analizlerden elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri RPMI kültür ortamındaki kontrol hücrelerin (THP-1 ve U937) verilerine göre normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant; * $p < 0.05$; $n = 3$)

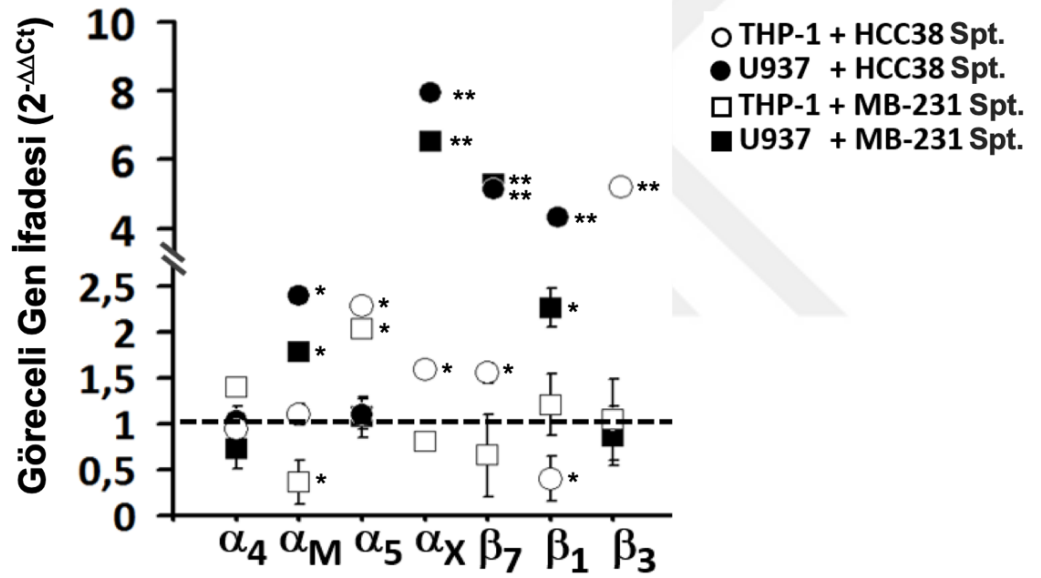
4.2.7. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerde İntegrin Ailesi Adezyon Moleküllerine Ait Gen İfadesinin Analizi

İntegrin ailesi adezyon molekülleri başta hücre-dışı matriks bileşenleri olmak üzere birçok molekül ile etkileşir. Bu adezyon molekülleri aynı zamanda farklılaşma belirteci olarak da kullanılabilir (177). Bu çalışmada meme kanseri hücreleri tarafından üretilen fibronektinin miyeloid hücre karakterine etkisi araştırıldığından, meme kanseri hücre süpernatantları varlığında fibronektin reseptör kompleksleri olarak görev alan integrinlerin ($\alpha 4$, $\alpha 5$, αM , αX , $\beta 1$, $\beta 3$ ve $\beta 7$) (100, 131) miyeloid hücrelerdeki mRNA düzeyleri incelendi.

Bazal-benzeri meme kanseri hücre (MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 ve U937 hücrelerinde $\alpha 4$ gen ifadesinde belirgin bir değişim gözlenmedi. Hem MDA-MB-231 hem de HCC38 hücre hattı süpernatantlarının U937 hücrelerinde αM (CD11b) mRNA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı görülürken MDA-MB-231 hücre süpernatantlarının THP-1 hücrelerinde bu integrinin gen ifadesini azalttığı saptandı (Şekil 4.10). Bu iki miyeloid hücre için de αM (CD11b) gen ifadesindeki değişimlerin protein düzeyini yansıtmadığı gözlemlendi (Şekil 4.3). Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının THP-1 hücrelerinde $\alpha 5$ gen ifadesini anlamlı olarak artırdığı görülürken U937 hücrelerinde değişmediği belirlendi. İntegrin αX (CD11c) gen ifadesinin bazal-benzeri hücre süpernatantları etkisiyle U937 hücrelerinde belirgin şekilde arttığı tespit edildi. THP-1 hücrelerinde HCC38 süpernatantı varlığında bu integrinin düzeyi anlamlı olarak artsa da minimal düzeyde kaldığı görüldü (Şekil 4.10). Hem U937 hem de THP-1 hücrelerinde αX (CD11c) düzeyindeki artışların protein düzeyi ile tutarlı olduğu belirlendi (Bkz. Bölüm 4.2.1, Şekil 4.3). Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin U937 hücrelerinde $\beta 7$ integrinlerin mRNA düzeyini belirgin şekilde arttığı tespit edildi. THP-1 hücrelerinde ise HCC38 hücre süpernatantlarının bu integrin düzeyini minimal olarak artırdığı görüldü. İntegrin $\beta 1$ mRNA düzeylerinin bazal-benzeri hücre süpernatantları etkisiyle U937 hücrelerinde belirgin şekilde arttığı ancak THP-1 hücrelerinde azaldığı

saptandı. Integrin $\beta 3$ düzeylerinin sadece HCC38 hücre süpernatanı varlığında THP-1 hücrelerinde anlamlı olarak arttığı, diğer koşullarda ise değişmediği belirlendi (Şekil 4.10).

Bu sonuçlar, bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatanlarının U937 hücrelerinde fibronektin ile etkileşebilen αM , αX , $\beta 1$ ve $\beta 7$ integrinlerin gen ifadesini THP-1 hücrelerine kıyasla daha fazla destekleme eğiliminde olduğunu gösterdi. THP-1 hücrelerinde ise bu süpernatanlar $\alpha 5$ ve $\beta 3$ integrinlerin gen ifadesini U937 hücrelerine kıyasla artırırken αM ve $\beta 1$ integrinlerin gen ifadesinde azalmaya yol açtı.



Şekil 4.10. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatanları ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat (sa.) boyunca kültürü yapılan THP-1 ve U937 hücrelerindeki fibronektin reseptörlerinin mRNA düzeylerinde meydana gelen değişimler. Analizler gerçek-zamanlı RT-PZR yöntemi ile gerçekleştirildi ve elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri RPMI kültür ortamında tutulan kontrol hücrelerinin (THP-1 ve U937) verilerine göre normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$ değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. (MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatan; $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 3$)

4.3. Bazal-benzeri ve Lüminal Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörlerin Miyeloid Hücreler Üzerindeki Etkisinin Periferik Kan Monositleri ile Doğrulanması

Çalışmamızın ilk aşamasında meme kanseri hücre hatlarının miyeloid hücrelerin fenotipik ve fonksiyonel olgunlaşması üzerine etkilerinin araştırması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda gerçekleştirdiğimiz analizlerde miyeloid hücre hatlarının model olarak uygunluğu sınıandı. Özellikle bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının miyeloid hücre hatlarında monositik hücre karakterini destekleyebileceğinin görülmesi üzerine bu etkiyi doğrulamak için sağlıklı bireylerden izole edilen periferik kan monositleri ile fenotipik ve fonksiyonel analizler gerçekleştirildi.

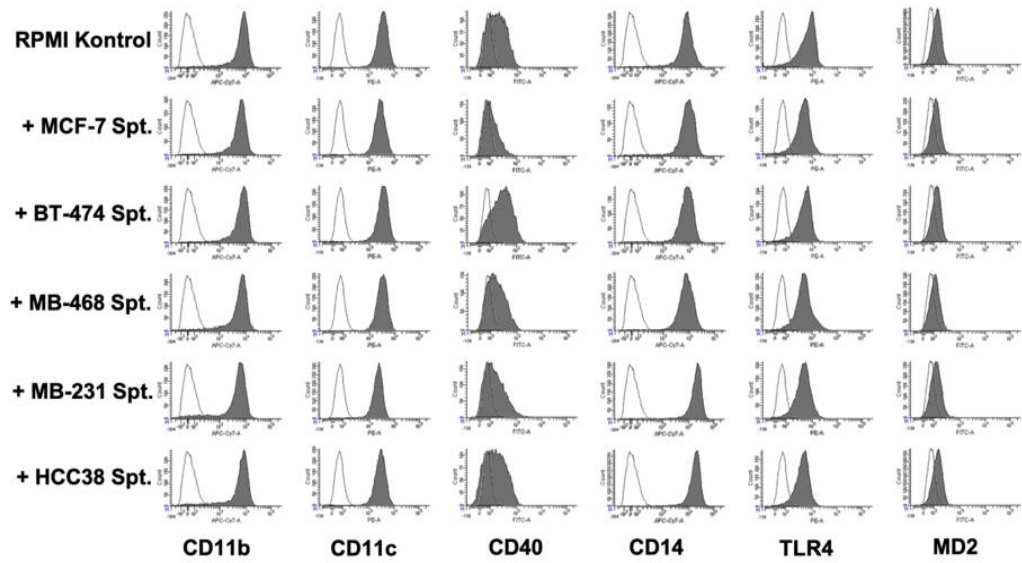
4.3.1. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantların Monositlerde Oluşturduğu İmmünofenotipik Değişimler

Meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin sağlıklı bireylerden izole edilen periferik kan monositlerinde neden olduğu fenotipik değişimleri gözlemlemek için lüminal (MCF-7, BT474) ve bazal-benzeri (MDA-MB-468, MDA-MB-231, HCC38) meme kanseri hücre hatlarından elde edilen süpernatantlar ile 48 saat boyunca inkübasyonlar yapıldı. CD11b, CD11c, CD14, CD40, TLR4 ve MD2 yüzey molekülleri immünofenotipleme ile incelendi.

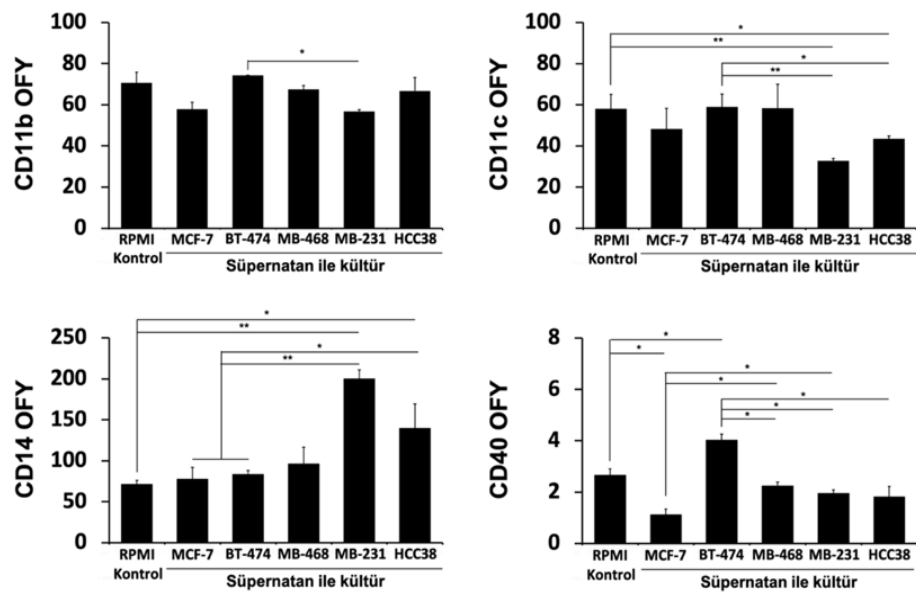
MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan monositlerde CD11b düzeyinin kontrole göre azaldığı gözlemlense de bu azalmaların istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı belirlendi. Ancak, bazal-benzeri MDA-MB-231 hücre hattı süpernatantları, lüminal BT-474 hücre hattı süpernatantlarına göre monositlerde CD11b düzeylerini anlamlı olarak azalttı. Diğer meme kanseri hücre hatlarından elde edilen süpernatantlar ise monositlerde CD11b düzeylerinde belirgin bir değişime neden olmadı. (Şekil 4.11 A, B). Özellikle bazal-benzeri MDA-MB-231 ve HCC38 süpernatantlarının monositlerde CD11c ifadesini azalttığı tespit edildi. Bu azalmaların kontrole ve lüminal BT-474 hücre hattı süpernatantı ile yapılan kültürlere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu

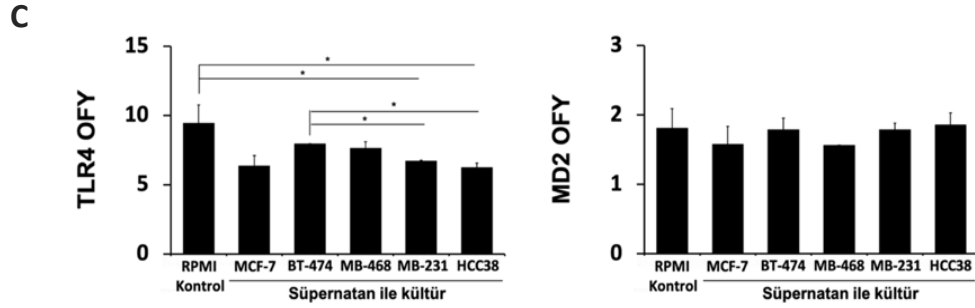
saptandı (CD11c OFY, RPMI kontrol 57.9 ± 7.3 , MCF-7 spt. 48.1 ± 10.2 , BT-474 spt. 58.8 ± 6.5 , MDA-MB-231 spt. 32.7 ± 1.2 , HCC38 spt. 43.3 ± 1.5) (Şekil 4.11 A, B). CD14 düzeyinin bazal-benzeri meme kanseri hücre hatları MDA-MB-231 ve HCC38 süpernatlarının etkisiyle, kontrole ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatlarına kıyasla, belirgin şekilde arttığı gözlemlendi (CD14 OFY, RPMI kontrol, 71 ± 5 , MCF-7 spt. 77.7 ± 14.2 , BT-474 spt. 83.4 ± 4.8 , MDA-MB-231 spt. 200 ± 10.8 , HCC38 spt. 139.4 ± 30). Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatları ile kültürü yapılan monositlerde CD40 düzeyi kontrole göre azalma eğilimi gösterse de bu azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Lüminal meme kanseri hücre hattı MCF-7 süpernatlarının, kontrole ve bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatlarına kıyasla, monositlerde CD40 düzeylerini anlamlı bir şekilde azalttığı BT-474 süpernatlarının ise artırdığı saptandı (CD40 OFY, RPMI kontrol 2.7 ± 0.25 , MCF-7 spt. 1.1 ± 0.2 , BT-474 spt. 4 ± 0.2 , MDA-MB-468 spt. 2.25 ± 0.15 , MDA-MB-231 spt. 1.95 ± 0.15 , HCC38 spt. 1.8 ± 0.4) (Şekil 4.11 A, B). Tüm koşullarda TLR4 düzeylerinin azalma yönünde olduğu belirlendi. MDA-MB-231 ve HCC38 hücre süpernatları ile yapılan kültürlerde bu azalma anlamlılık düzeyine ulaştı (TLR4 OFY, RPMI kontrol 9.45 ± 1.3 , MDA-MB-231 spt. 6.7 ± 0.06 ; HCC38 spt. 6.25 ± 0.3). Diğer yandan meme kanseri hücre hattı süpernatlarının monositlerdeki MD2 ifadesini etkilemediği gözlemlendi (Şekil 4.11 A, C).

A



B





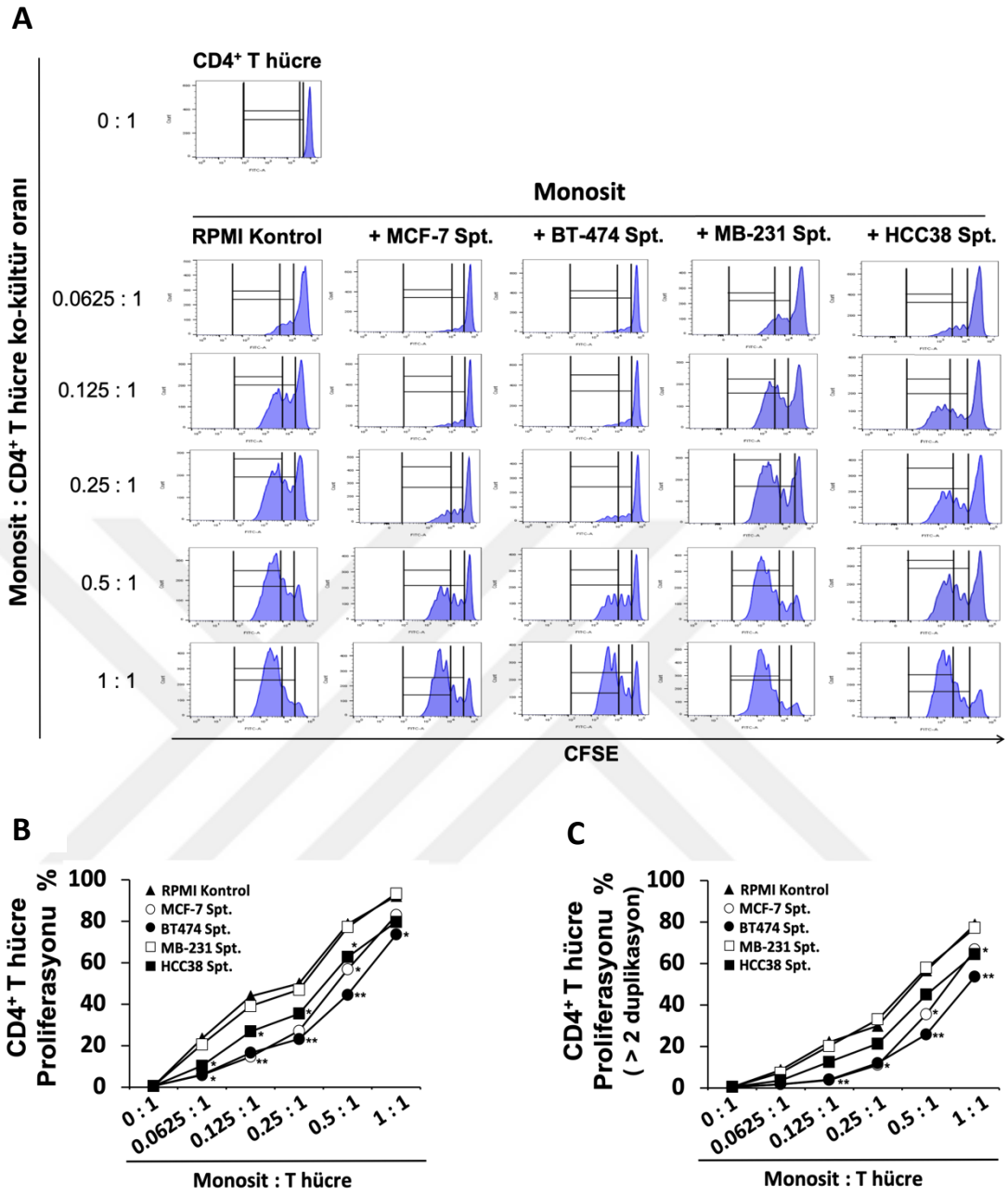
Şekil 4.11. Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca kültürü yapılan monositlerde hücre yüzey belirteçlerinin akım sitometri ile analizi. A) Monositler ile elde edilen sonuçları gösteren temsili akım sitometri histogramları. Boş histogramlar izotipik kontrolleri, dolu histogramlar ise özgül antikolar ile yapılan işaretlemeleri göstermektedir. B) Monositlerde izotipik kontrol boyamaları ile elde edilen ortanca floresan yoğunluğu (OFY) verisine göre normalize edilmiş OFY değerleri. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n=3$)

4.3.2. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Monositlerin $CD4^+$ T Hücrelere Kostimülasyon Sağlama Kapasiteleri

MCF-7, BT-474, MDA-MB-231 ve HCC38 hücrelerinden elde edilen süpernatantlar içerisinde 48 saat boyunca tutulan monositlerin $CD4^+$ T hücre proliferasyonu üzerine etkisi araştırıldı. Monositler ile $CD4^+$ T hücrelerin 0.0625:1, 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1 ve 1:1 oranlarında ko-kültürü yapıldı. Kontrol olarak RPMI kültür ortamında gerçekleştirilen ko-kültürlerde $CD4^+$ T hücrelerin proliferasyon kapasitesi yüksekti. Bazal-benzeri MDA-MB-231 hücre hattı süpernatantı ile muamele edilen monositlerin, kontrol ile kıyaslandığında, $CD4^+$ T hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesinde belirgin bir değişime neden olmadığı gözlemlendi. Aynı özellikteki HCC38 hücre hattı süpernatantı varlığında tutulan monositlerin, kontrole ve MDA-MB-231 hücre süpernatantı ile muamele edilen monositlere kıyasla, $CD4^+$ T hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesini anlamlı düzeyde azalttığı, ancak bu azalmanın lüminal meme kanseri hücre hattı (MCF-7 ve

BT474) süpernatantları ile muamele edilen monositlerin etki düzeyine ulaşamadığı görüldü. Lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının ise monositlerin CD4⁺ T hücre proliferasyonunu uyarma etkisini, kontrole ve bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında tutulan monositlere göre, azalttığı belirlendi. Bu etki en belirgin şekilde 0.125:1 (monosit : T hücre) oranında gözlemlenirken BT-474 hücre süpernatantları ile muamele edilen monositlerin CD4⁺ T hücrelerin proliferasyonunu uyarma kapasitesinin en az olduğu görüldü. MCF-7 hücre süpernatantları içinde tutulan monositlerin CD4⁺ T hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesinin 0.25:1 oranından itibaren HCC38 hücre süpernatantları ile muamele edilen monositlerin uyarma kapasitesine ulaştığı gözlemlendi (Şekil 4.12 A, B).

Meme kanseri hücre süpernatantları ile muamele edilen monositlerin CD4⁺ T hücre proliferasyonu üzerindeki uyarıcı etkisi ikiden fazla duplike olan hücre oranlarında da incelendiğinde, bu hücrelerde de lüminal meme kanseri hücre süpernatantları ile muamele edilen monositlerin, kontrole ve bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile muamele edilen monositlere göre, CD4⁺ T hücrelerin proliferasyonunu uyarma kapasitesini düşürdüğü gözlemlendi. Bu fark en belirgin şekilde 0.125:1 oranında yapılan ko-kültürlerde tespit edildi (Şekil 4.12 A, C).



Şekil 4.12. Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile muamele edilen monositlerin 96 saat sonunda CD4⁺ T hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesinin akım sitometri ile analizi. A) Monositler ile farklı oranlarda ko-kültürü yapılan anti-CD3 antikoruna uyarılmış CFSE işaretli CD4⁺ T hücrelerin proliferasyonundan elde edilen sonuçları gösteren temsili akım sitometri histogramları. B) Total proliferasyon ve C) ikiden fazla olan duplikasyon değerlerine ait yüzde grafikleri. (MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant; * p<0.05, ** p<0.01; n=3)

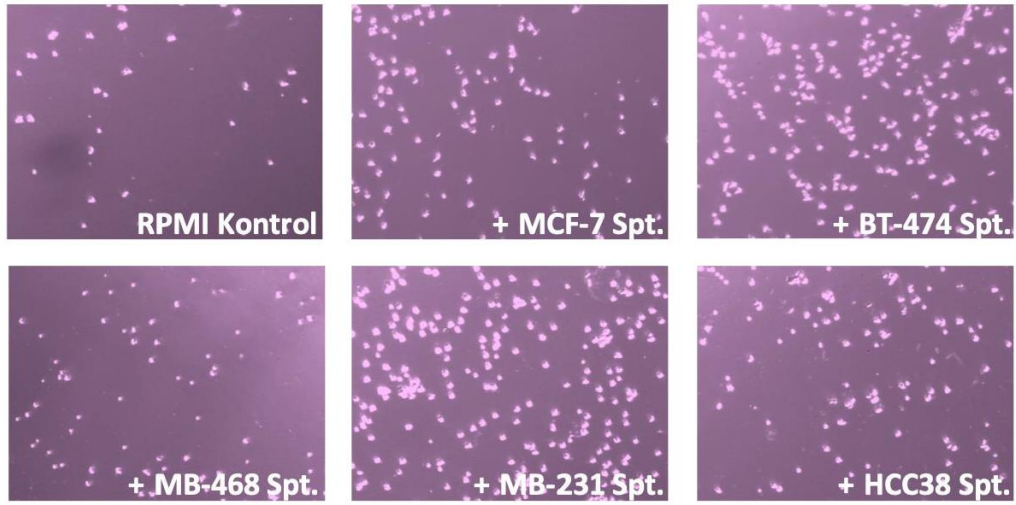
4.3.3. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Monositlerin Kemotaksis Yeteneğinin Analizi

Meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin monositlerin migrasyon kapasitesi üzerine etkisini gözlemlemek için lüminal ve bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında 48 saat inkübe edilen monositlerde kemotaksis analizi gerçekleştirildi. Kemotaksis haznesinden geçen hücreler analiz edildiğinde, tüm meme kanseri hücre süpernatantlarının monositlerin kemotaksis kapasitesini artırdığı gözlemlendi. MDA-MB-468 hücre hattı süpernatantı ile kültürü yapılan monositler dışında, diğer meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile inkübe edilen monositlerin kemotaksis kapasitesindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Göçen hücre sayısı (x1000), RPMI kontrol 7.75 ± 2.25 , MCF-7 spt. 15.75 ± 0.75 , BT-474 spt. 22.5 ± 5 , MDA-MB-231 spt. 21.25 ± 4 , HCC38 spt. 15 ± 1.2) (Şekil 4.13 A, B). Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin monositlerin kemotaksis haznesinden geçişine etkisi arasında belirgin bir fark görülmedi.

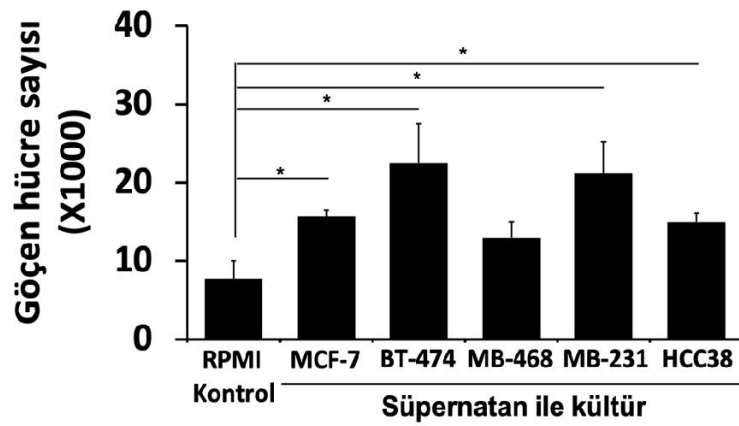
Matür hücreler olan monositler aderan yüzeylerde makrofajlara farklılaşma eğilimindedir. Dolayısıyla kemotaksis haznesindeki membrana güçlü bir şekilde tutunabilirler. THP-1 hücreleri ise immatür özelliklerinden dolayı membrana daha zayıf tutunma eğilimi gösterir (178). Bu nedenle monositler ile yapılan kemotaksis analizlerinde membrana tutunan hücrelerde analize dahil edildi. Bazal-benzeri MDA-MB-231 ve HCC38 ve lüminal BT-474 hücre süpernatantlarının, kontrole göre, monositlerin membrana kemotaksis kapasitesini anlamlı olarak artırdığı belirlendi. Ayrıca, bazal-benzeri MDA-MB-468 hücre süpernatantlarının, BT-474 hücre süpernatantlarına göre, monositlerin membrana kemotaksisini belirgin düzeyde azalttığı saptandı. Monositlerin membrana kemotaksisi açısından, BT-474 hücre süpernatantı ile diğer bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları arasında anlamlı bir fark görülmedi (Göçen hücre sayısı, RPMI kontrol 45 ± 6 , MCF-7 spt. 54.5 ± 10 , BT-474 spt. 100.5 ± 15 , MDA-MB-468 spt. 32.75 ± 1.75 , MDA-MB-231 spt. 76.5 ± 12 , HCC38 spt. 72.25 ± 10) (Şekil 4.13 C, D). Monositlerin kemotaksis kapasitesinde, kontrole kıyasla, MCF-7 hücre süpernatantları ile yapılan kültürlerde

artış, MDA-MB-468 hücre hattı süpernatantları ile yapılan kültürlerde ise azalma görülmesine rağmen bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. MCF-7 hücre süpernatantları ve bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının monositlerin membrana kemotaksis kapasitesine etkisi arasında belirgin bir fark görülmedi (Şekil 4.13)

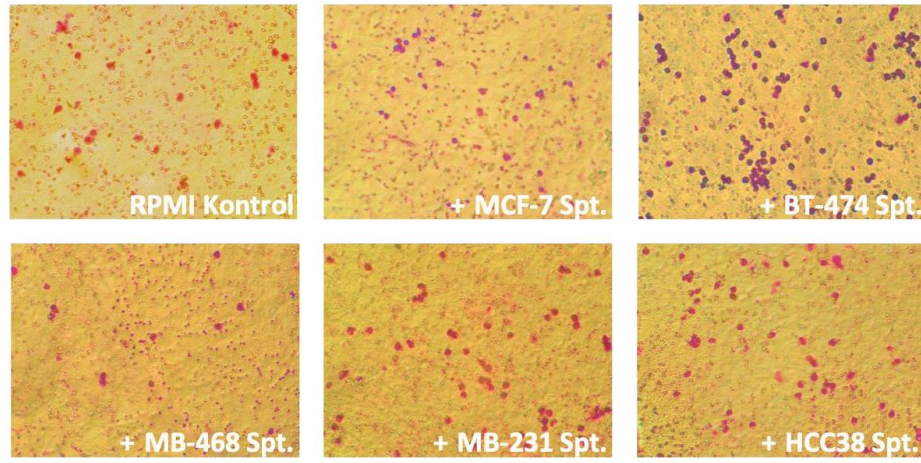
A



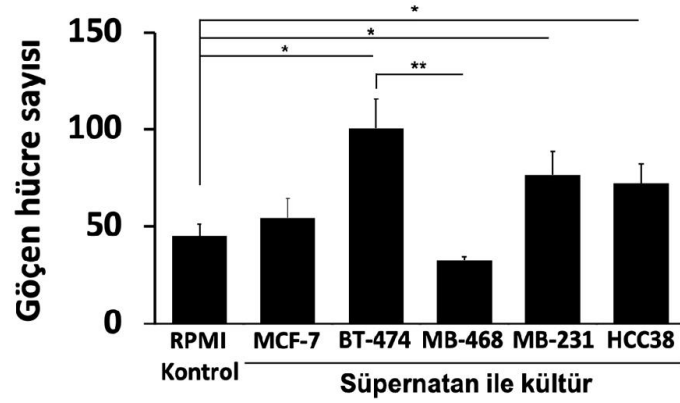
B



C



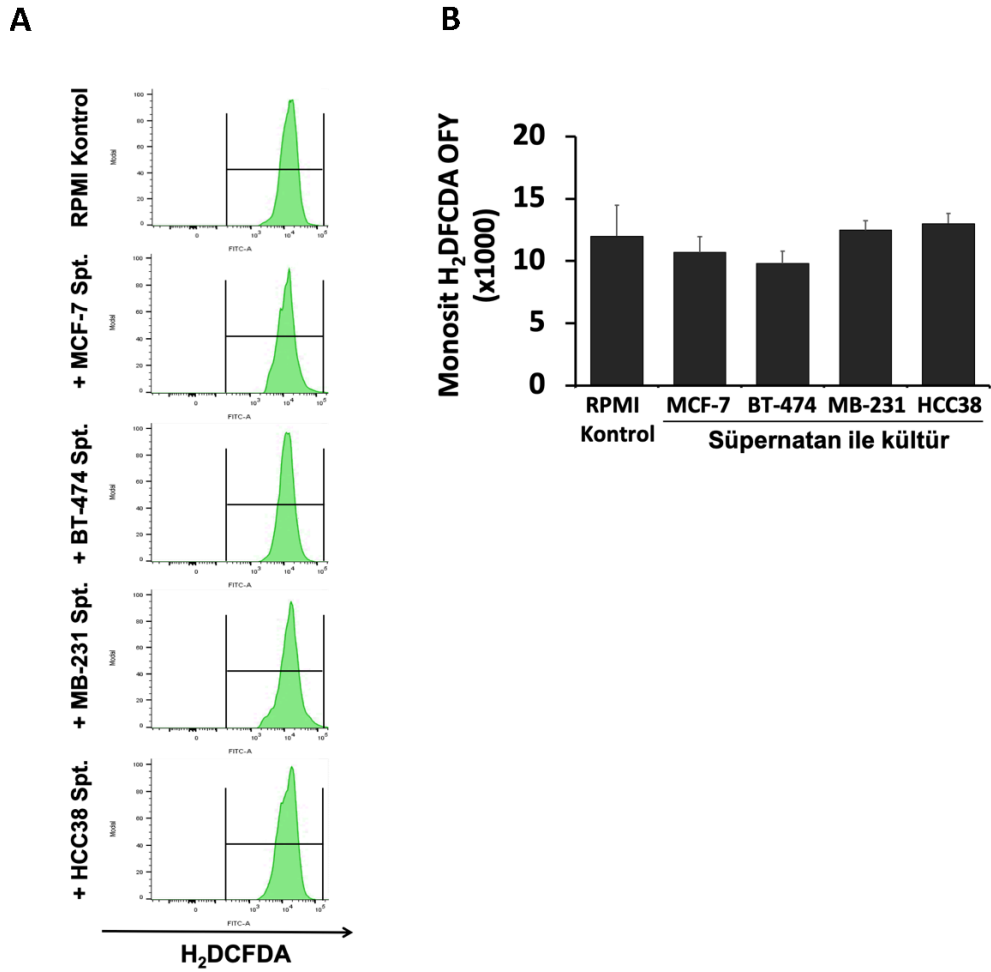
D



Şekil 4.13. Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının monositlerin kemotaksis kapasitesine etkisi. A) Kemotaksis haznesinden plaktaki kuyulara göç eden hücrelerin kristal viyole ile boyandıktan sonraki mikroskop görüntüleri ve B) göçen hücre sayısını gösteren bar grafiği. C) Kemotaksis haznesindeki membrana göç eden hücrelerin Giemsa ile boyandıktan sonraki mikroskop görüntüleri ve D) göçen hücre sayısındaki değişimi gösteren bar grafiği. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant; * $p<0.05$, ** $p<0.01$; $n=3$)

4.3.4. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Monositlerde Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Üretim Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 48 saat boyunca kültürü yapılan monositlerde ROT üretim düzeyleri analiz edildi. Lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan monositlerde, kontrole ve bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile muamele edilen monositlere kıyasla, ROT üretimi azalma eğiliminde olsa da bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadığı belirlendi. (H_2DCFDA OFY, RPMI kontrol, 11.98 ± 2.5 ; MCF-7 spt. 10.68 ± 1.25 , BT-474 spt. 9.8 ± 1 , MDA-MB-231 spt. 12.46 ± 0.8 , HCC38 spt. 12.98 ± 0.8). Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan monositlerde ise, kontrole göre, ROT üretiminde bir belirgin bir değişim gözlenmedi (Şekil 4.14).

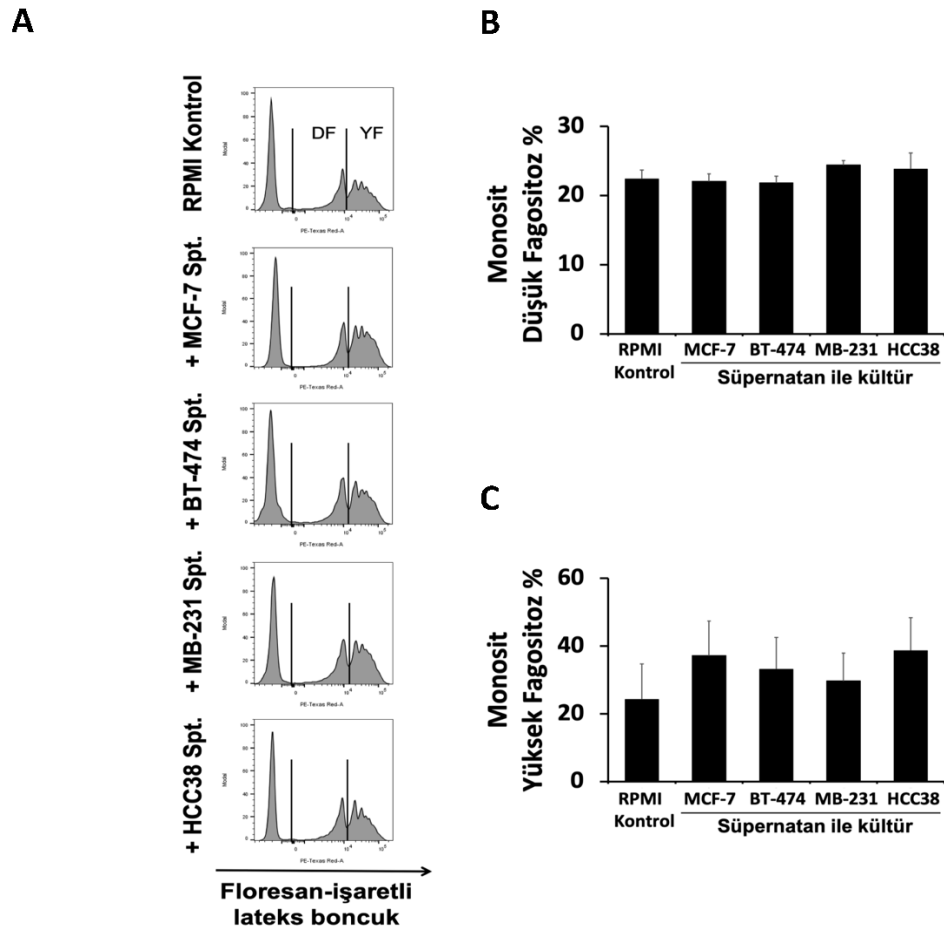


Şekil 4.14. Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatanlarının monositlerde ROT üretimine etkisi. A) Süpernatanlarla 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca uyarılan monositlerde ROT üretimini gösteren H₂DCFDA ajanı ile yapılan akım sitometri analiz histogramları. B) Monositlerde ROT üretimine bağlı olarak ortanca floresan yoğunluğu (OFY) değerlerini gösteren bar grafiği. (MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatan; n=3)

4.3.5. Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatanlar ile Muamele Edilen Monositlerin Fagositoz Yeteneğinin Değerlendirilmesi

Lüminal ve bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatanları ile 48 saat boyunca inkübe edilen monositlerin fagositoz kapasitesi incelendi. Düşük düzeyde fagositoz yapan monositlerin yüzdesinin meme kanseri süpernatanları ile

değişmediği, yüksek düzeyde fagositoz yapan monositlerin yüzdesindeki artışların ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücrelerden salgılanan faktörlerin monositlerde fagositoz kapasitesi açısından belirgin bir fark yaratmadığı görüldü (Şekil 4.15)



Şekil 4.15. Bazal-benzeri ve lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının monositlerin fagositoz kapasitesine etkisi. A) Süpernatantlarla 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca inkübe edilen monositlerin floresan-ışaretili lateks boncuklarla işaretlenme bağlanma ve fagositoz kapasitesini gösteren temsili akım sitometri histogramları. B) Düşük fagositoz (DF) ve C) yüksek fagositoz (YF) kapasitesine sahip monositlerdeki yüzde değişimlerini gösteren bar grafikleri. (MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant; n=3)

4.4. Meme Kanseri Hücrelerinde Fibronektin Üretimini Araştırılması

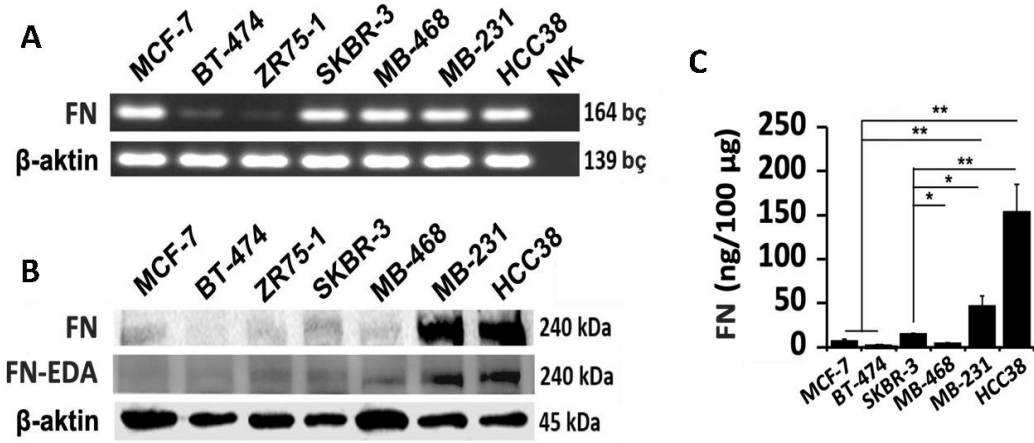
Tümör dokusunu oluşturan hücre-dışı matriks bileşenleri, stromal ve endotelial hücrelerin yanı sıra epitelyal kökenli kanser hücreleri tarafından da üretilebilir (129, 130). Bu bileşenler, özellikle fibronektin, miyeloid hücrelerin dokuya yerleşimine ve farklılaşmasına katkıda bulunur (5). Tümör dokusundaki miyeloid hücreler pro-inflamatuvar sitokinler üreterek inflamatuvar mikroçevrenin oluşumuna ve tümör gelişimine katkı sağlar (7). Çalışmamızda, meme kanseri hücreleri tarafından üretilen fibronektinin miyeloid hücre karakteri üzerine etkisini araştırmayı amaçladık. Bu amaç doğrultusunda, meme kanseri hücrelerinde total fibronektin ve TLR4 aracılı olarak pro-inflamatuvar yolakları uyarabilme özelliğine sahip FN-EDA izoformunun üretimi incelendi. Ayrıca, inflamatuvar mikroçevrenin oluşumunda rol oynayan pro-inflamatuvar sitokinlerin, meme kanseri hücrelerinde üretilen total fibronektin ve FN-EDA izoformu düzeylerine etkisi değerlendirildi.

4.4.1. Bazal-benzeri, Lüminal ve HER2-pozitif Meme Kanseri Hücrelerinde Fibronektin Düzeyinin Belirlenmesi

Meme kanseri hücrelerinde fibronektin üretimini belirlemek için lüminal (MCF-7, BT-474 ve ZR75-1), HER2-pozitif (SKBR-3) ve bazal-benzeri (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) alt-tiplerine ait hücre hatlarında fibronektin mRNA ve protein düzeyleri araştırıldı. Lüminal meme kanseri hücre hatlarında, MCF-7 dışında, fibronektin gen ifadesinin düşük düzeyde kaldığı görüldü. HER2-pozitif ve bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinde ise fibronektin mRNA düzeylerinin yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.16 A). Meme kanseri hücrelerinde fibronektin protein düzeyleri incelendiğinde, bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarından MDA-MB-231 ve HCC38'in fibronektini yüksek düzeyde ifade ettiği gözlemlendi. MCF-7, SKBR-3 ve MDA-MB-468 hücrelerinde fibronektin mRNA düzeyi yüksek olmasına rağmen bunun protein ifadesine yansımadağı görüldü.

Ekstra domain A (EDA) içeren fibronektin (FN-EDA) izoformlarının total fibronektin proteinine göre daha düşük düzeyde ifade edildiği gözlemlendi. FN-EDA izoformlarının meme kanseri hücrelerinde total fibronektin düzeyine benzer şekilde

MDA-MB-231 ve HCC38 hücre hatlarında, diğer alt-tiplere göre, daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.16 B). Meme kanseri hücre lizatlarından yapılan ELISA analizinde de total fibronektin protein düzeylerinin, bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarından özellikle MDA-MB-231 ve HCC38 hücrelerinde, lüminal ve HER2-pozitif meme kanseri hücre hatlarına göre yüksek olduğu tespit edildi (FN (ng/100 µg), MCF-7 7.5±2, BT-474 1.5±0.7, SKBR-3 15.5±0.7, MDA-MB-468 5±0.5, MDA-MB-231 47±16, HCC38 154±44) (Şekil 4.16 C). MDA-MB-468 hücre lizatlarında bulunan FN miktarının ise SKBR-3 hücre lizatlarına göre daha az düzeyde olduğu görüldü.

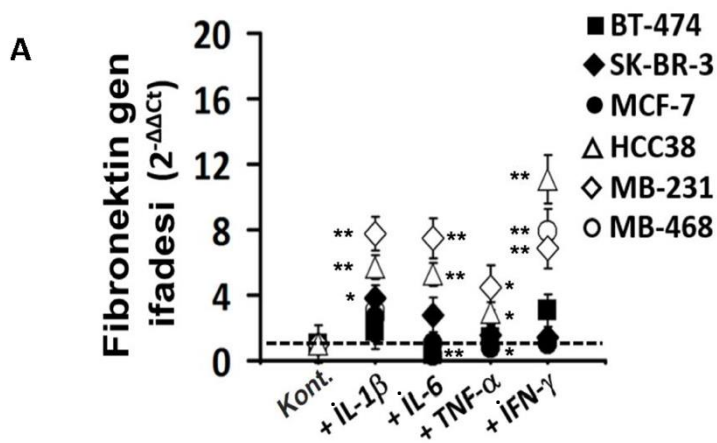


Şekil 4.16. Bazal-benzeri, lüminal ve HER2-pozitif meme kanseri hücre hatlarında fibronektin (FN) gen ve protein ifadesinin analizi. Farklı meme kanseri alt-tiplerini temsil eden hücre hatlarında A) FN gen ifadesinin RT-PZR jel görüntüsü ve B) FN ve FN-EDA izoformunun protein ifadesini gösteren Western Blot görüntüsü. C) Meme kanseri hücre hattı lizatlarında 100 µg total proteinde bulunan FN miktarını gösteren ELISA analizi (n=3). (FN-EDA, Ekstra domain A içeren FN izoformu; MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; NK, Negatif kontrol; bç, baz çifti; * p<0.05, ** p<0.01)

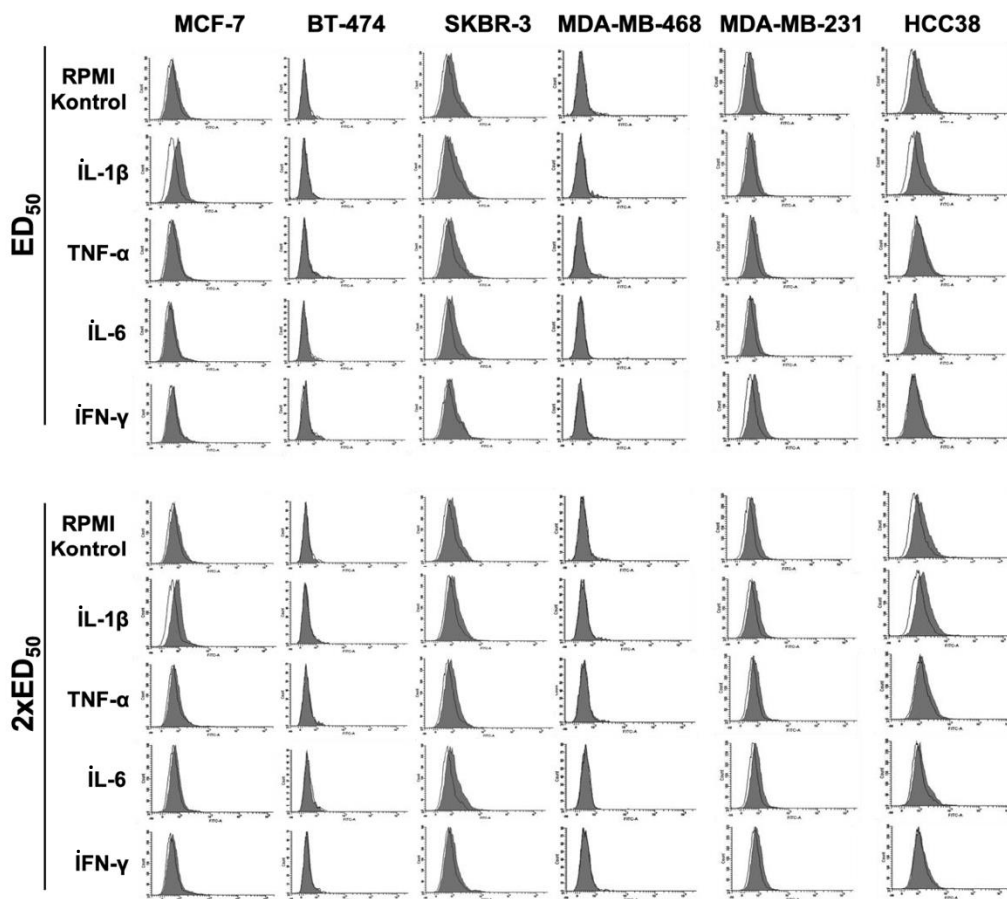
4.4.2. Pro-inflamatuvar Sitokin Uyarımının Meme Kanseri Hücre Hatlarında Fibronektin Üretimine Etkisi

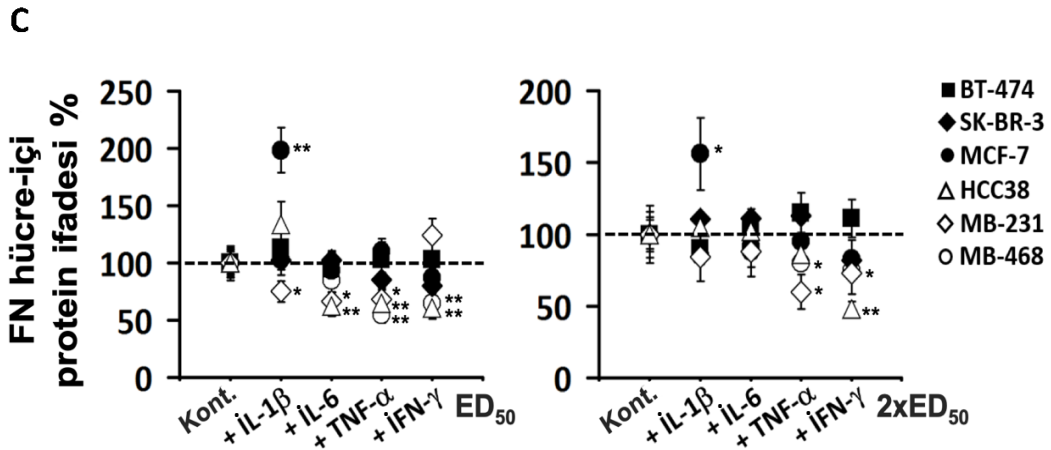
İnflamasyona aracılık eden en önemli faktörler arasında yer alan İL-1 β , İL-6, TNF- α ve İFN- γ sitokinlerinin meme kanseri hücrelerinde fibronektin üretimine etkisi araştırıldı. Bu pro-inflamatuvar sitokinler varlığında (48 saat), İL-1 β , İL-6 ve TNF- α için 40U (2xED₅₀) İFN- γ için ise 400U (2xED₅₀) konsantrasyonda, özellikle MDA-MB-231 ve HCC38 hücre hatlarında fibronektin mRNA düzeylerinin belirgin şekilde arttığı tespit edildi (Şekil 4.17 A). İL-1 β ile uyarılan SKBR-3 hücrelerinde de FN gen ifadesinin anlamlı düzeyde arttığı gözlemlense de MDA-MB-231 ve HCC38 hücrelerinin seviyesine ulaşmadığı görüldü. İL-6 ile uyarılan BT-474 hücrelerinde ve TNF- α ile uyarılan MCF-7 hücrelerinde FN mRNA düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi.

Hücre-içi fibronektin düzeylerinde inflamatuvar faktörlerin etkisi İL-1 β , İL-6 ve TNF- α için 20U (ED₅₀) ve 40U (2xED₅₀), İFN- γ için ise 200U (ED₅₀) ve 400U (2xED₅₀) olmak üzere iki farklı konsantrasyonda 48 saat uyarım sonrasında değerlendirildi. Pro-inflamatuvar sitokinler varlığında MDA-MB-231 ve HCC38 hücrelerinde görülen fibronektin mRNA artışının hücre-içi protein düzeyine yansımadağı gözlemlendi. İL-1 β varlığında her iki konsantrasyonda da MCF-7 hücrelerindeki hücre-içi fibronektin düzeyindeki artış dikkat çekmektedir (Şekil 4.17 B, C).



B

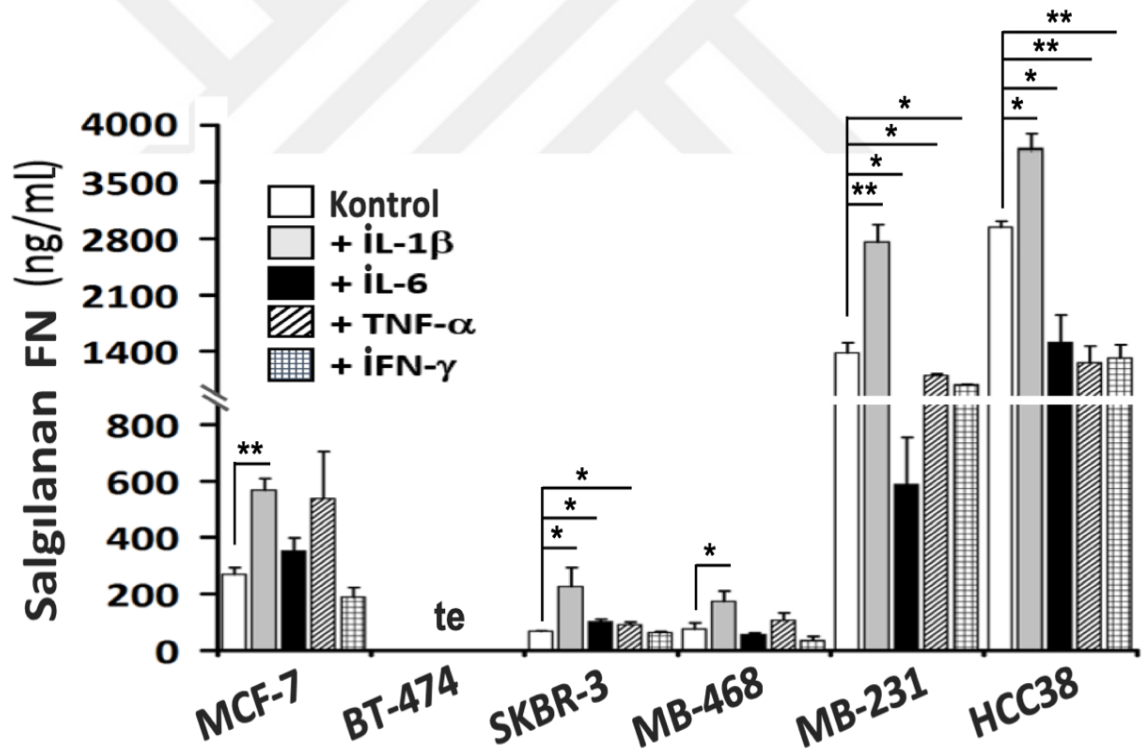




Şekil 4.17. Pro-inflamatuvar sitokinler ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca uyarılan bazal-benzeri, lüminal ve HER2-pozitif meme kanseri hücre hatlarında FN gen ifadesinin ve hücre-içi protein düzeylerinin analizi. A) Hücre hatlarındaki FN gen ifadesinde pro-inflamatuvar sitokinler ile $2 \times \text{ED}_{50}$ konsantrasyonda uyarım sonucu meydana gelen değişimler gerçek-zamanlı RT-PZR ile analiz edildi. Analizlerde elde edilen $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ değerleri kontrol hücrelerin (MCF-7, BT-474, SKBR-3, MB-468, MB-231 ve HCC38) verilerine göre normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 1$ değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. Pro-inflamatuvar sitokinler ile iki farklı konsantrasyonda (ED_{50} ve $2 \times \text{ED}_{50}$) uyarılan meme kanseri hücre hatlarına ait hücre-içi FN düzeylerindeki değişimi gösteren B) temsili akım sitometri histogramları ve C) yüzde değişim grafikleri. Boş histogramlar izotipik kontrolleri, dolu histogramlar ise özgül anti-FN antikoru ile yapılan işaretlemeleri göstermektedir. (ED_{50} , üretici firma tarafından bildirilen maksimum etkinin %50'sini oluşturan konsantrasyon; MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n \geq 3$)

Pro-inflamatuvar sitokinler ile $2 \times \text{ED}_{50}$ konsantrasyonda 48 saat boyunca uyarılan meme kanseri hücre hatlarında salgılanan protein düzeyi incelendiğinde, bazal-benzeri MDA-MB-231 ve HCC38 hücrelerinin serbestlediği total fibronektin düzeylerinin, diğer hücre gruplarına göre, belirgin şekilde yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.18). İL-1β'nın, BT-474 hariç, tüm meme kanseri hücrelerinde fibronektin düzeyini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı belirlendi (FN (ng/mL), MCF-7, kontrol 267 ± 25.4 , İL-1β 567.5 ± 41.7 ;

SKBR-3, kontrol 66.5 ± 3.5 , İL-1 β 225 ± 67.9 ; MDA-MB-468, kontrol 75 ± 22.6 , İL-1 β 173.5 ± 36 ; MDA-MB-231, kontrol 1374 ± 135 , İL-1 β 2757.5 ± 218.5 ; HCC38, kontrol 2935 ± 80 , İL-1 β 3765 ± 180) (Şekil 4.18). MCF-7 hücrelerinde hücre-içi total fibronektin düzeylerindeki artışın salgılanan protein düzeyine de yansıdığı görüldü. SKBR-3 hücrelerinde İL-6 ve TNF- α etkisiyle salgılanan total fibronektin düzeylerindeki azalmaların anlamlı olmasına rağmen düşük seviyede kaldığı gözlemlendi. MDA-MB-231 ve HCC38 hücrelerinde ise İL-6, TNF- α ve İFN- γ sitokinleri salgılanan total fibronektin miktarını anlamlı düzeyde azalttı. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarında fibronektin mRNA düzeylerini en belirgin şekilde arttıran sitokin olan İFN- γ 'nın hem hücre-içi hem de salgılanan fibronektin miktarını azaltması dikkate çekicidir (Şekil 4.18).

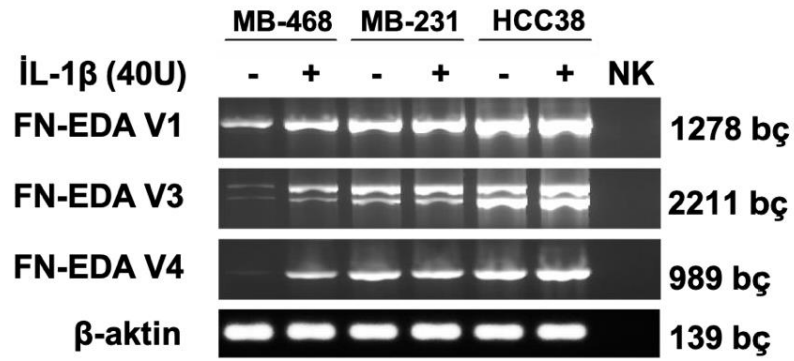


Şekil 4.18. İL-1 β , İL-6, TNF- α ve İFN- γ pro-inflamatuvar sitokinleri ile $2 \times ED_{50}$ konsantrasyonda 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca uyarılan bazal-benzeri, lüminal ve HER2-pozitif meme kanseri hücre hatlarından toplanan süpernatantlardaki FN düzeyleri ELISA ile değerlendirildi. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; te, tespit edilemedi; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 3$)

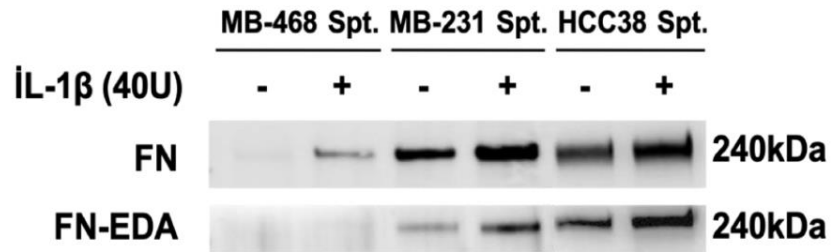
İL-1 β meme kanseri hücrelerinde, özellikle de bazal-benzeri MDA-MB-231 ve HCC38 hücrelerinde, total FN düzeyini en etkin şekilde artıran sitokin idi. Bu sitokinin, etkisini FN-EDA üzerinde de gösterdiğini belirlemek için ilk olarak İL-1 β 'nın bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarında FN-EDA transkript varyantları (V) üzerindeki etkisi test edildi. İL-1 β (40U) ile 48 saat boyunca inkübe edilen bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarında FN-EDA V1, V3 ve V4 varyantlarının düzeyi incelendi. Her üç varyantın da MDA-MB-468 hücrelerinde düşük düzeyde ifade edildiği görüldü. MDA-MB-231 ve HCC38 hücre hatlarında ise bu varyantlar yüksek düzeyde tespit edildi. İL-1 β uyarımı ile beraber MDA-MB-468 hücrelerinde FN-EDA transkript varyantlarının ifadesinin arttığı gözlemlenirken diğer bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarında ise gözle görülür bir fark saptanmadı (Şekil 4.19 A).

İL-1 β ile uyarılan bazal-benzeri meme kanser hücre hatlarından toplanan süpernatantlarda Western Blot yöntemiyle FN ve FN-EDA düzeyleri incelendi. İL-1 β 'nın, bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarında da total FN düzeylerini artırdığı doğrulandı. MDA-MB-468 hücrelerinde mRNA düzeyindeki FN-EDA artışının protein düzeyine yansımadağı görüldü. MDA-MB-231 ve HCC38 hücrelerinde ise İL-1 β uyarımı ile beraber FN-EDA protein izoformlarının belirgin şekilde arttığı gözlemlendi (FN-EDA/FN, MDA-MB-231, kontrol 0.1, İL-1 β 0.13; HCC38, kontrol 0.2, İL-1 β 0.3) (Şekil 4.19 B, C).

A



B



Şekil 4.19. İL-1 β ile 40U (2xED₅₀) konsantrasyonda 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 48 saat boyunca uyarılan bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarında A) FN-EDA transkript varyantlarının (V1, V3 ve V4) RT-PZR jel görüntüsü ve B) bu hücrelerden salgılanan total FN ve FN-EDA izoformunun protein ifadesini gösteren Western Blot görüntüsü. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; NK, negatif kontrol; V, varyant; bç, baz çifti; Spt, süpernatant; te, tespit edilemedi; * p<0.05, ** p<0.01; n=3)

4.5. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörlerin Miyeloid Hücrelerde İL-1 β , TLR4, MD2 ve Elastaz-2 Moleküllerine Etkisi

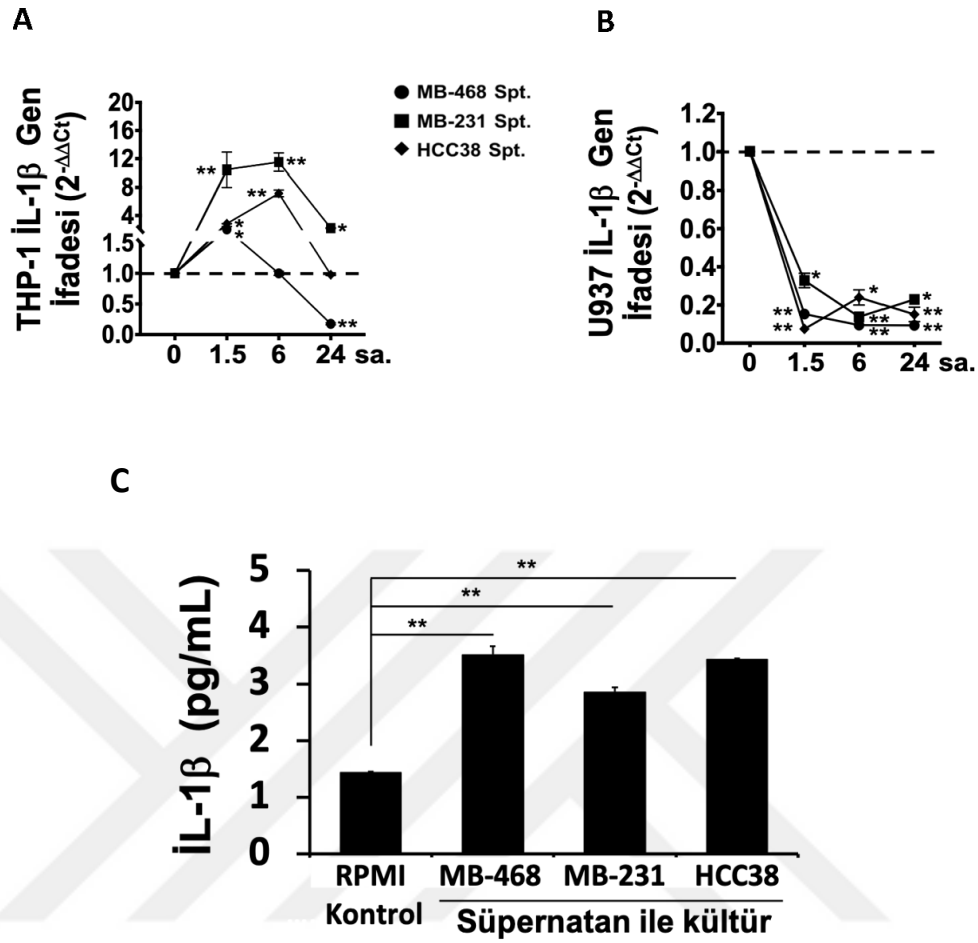
İL-1 β 'nin meme kanseri hücrelerinde total fibronektin ve FN-EDA izoformunun düzeylerini artırdığını gösterdik. İnflamatuvar mikroçevre oluşumunda rol oynayan başlıca sitokinlerden olan İL-1 β 'nin temel kaynağı miyeloid hücrelerdir (179). Miyeloid hücrelerde TLR4, MD2 ve CD14 bileşenlerinde oluşan TLR4

kompleksi İL-1 β üretiminden sorumlu olan yolakların aktivasyonunu sağlar (79, 108). Fibronektinin yapısındaki EDA kısmı TLR4 kompleksini aktive edebilmektedir (9). Bir serin proteaz olan elastaz-2 enzimi ise hücrel fibronektine etki ederek EDA parçalarının oluşumunda rol oynar (8). Bu bilgiler ışığında, miyeloid hücrelerde STAT3 aktivitesinin artışına yol açan bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin İL-1 β , TLR4 kompleksi bileşenleri ve elastaz-2'nin gen ve protein ifadesi üzerine etkileri değerlendirildi.

4.5.1 Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerde İL-1 β Üretiminin Değerlendirilmesi

Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ile 1.5, 6 ve 24 saat inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerinde İL-1 β mRNA düzeyleri analiz edildi. THP-1 hücrelerinde bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile yapılan 1.5 ve 6 saatlik kültürlerde, özellikle MDA-MB-231 ve HCC38 hücre süpernatantları ile, İL-1 β mRNA düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı ancak uzun süreli inkübasyonlarda (24 sa.) bu etkinin ortadan kalktığı belirlendi. MDA-MB-468 hücre süpernatantları ile 1.5 saatlik kültürlerde anlamlı artış görülse de 24 saat sonunda İL-1 β mRNA düzeylerini azaldığı saptandı (Şekil 4.20 A). U937 hücrelerinde, THP-1 hücrelerinin aksine, bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları İL-1 β gen ifadesinde belirgin şekilde azalmaya neden oldu (Şekil 4.20 B).

Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile 24 saat inkübe edilen THP-1 hücrelerinden süpernatantlar uzaklaştırıldı, tam besiyerinde süspanse hale getirildi. Maksimum salım kapasitesini ortaya çıkarmak amacıyla hücreler kısa süreli (3 saat) PMA/iyonomisin ile uyarıldı ve sonrasında toplanan süpernatantlardaki İL-1 β düzeyleri analiz edildi. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının THP-1 hücrelerinin İL-1 β üretim kapasitesini ve salımını anlamlı bir şekilde artırdığı tespit edildi. Ancak, İL-1 β düzeylerinin yine de düşük düzeyde olduğu (1-4 pg/mL) görüldü (Şekil 4.20 C).

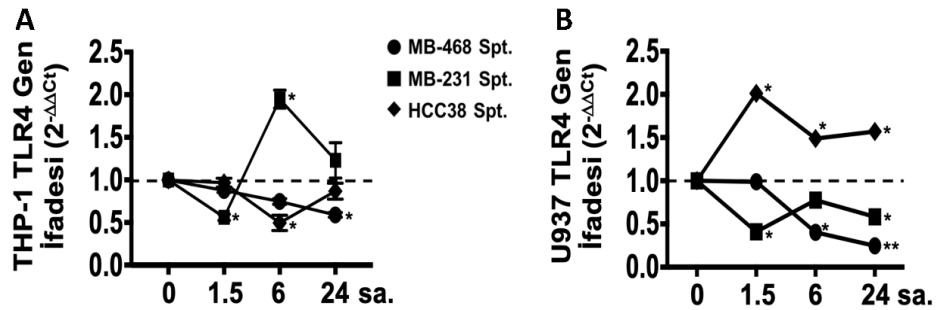


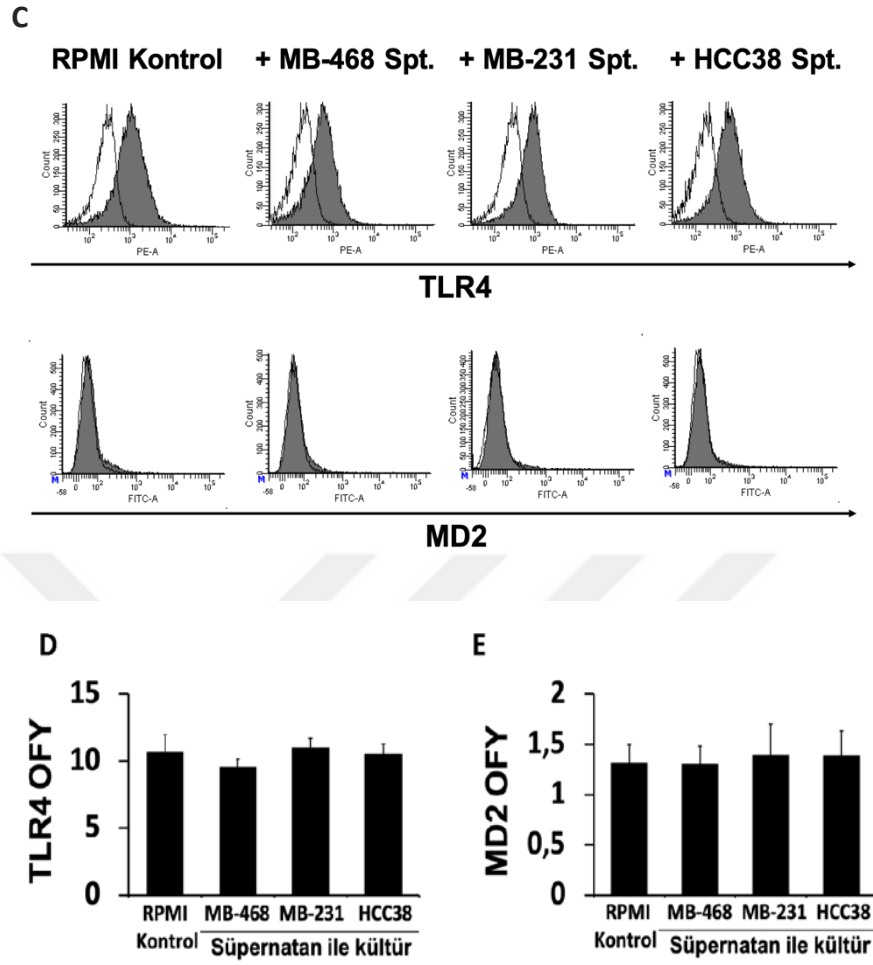
Şekil 4.20. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatanlarının miyeloid hücrelerde İL-1 β gen ifadesine ve salgılanan protein düzeyine etkisi. Süpernatanlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 1.5, 6 ve 24 saat (sa.) boyunca inkübe edilen A) THP-1 ve B) U937 hücrelerinde İL-1 β gen ifadesinde meydana gelen değişimler gerçek-zamanlı RT-PZR yöntemi ile analiz edildi. Analizlerde elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri RPMI kültür ortamında tutulan kontrol hücrelerinin (THP-1 ve U937) verilerine göre normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. C) Süpernatanlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 sa. boyunca inkübe edilen THP-1 hücrelerinin PMA (50 ng/mL)/iyonomisin (0.5 μ g/mL) uyarımı sonrası İL-1 β salgı kapasitesi ELISA yöntemi ile teyit edildi. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatan; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 3$)

4.5.2. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerde TLR4 ve MD2 Düzeylerinin Analizi

Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 1.5, 6 ve 24 saat inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerinde TLR4 mRNA düzeylerinde belirgin bir değişim gözlenmedi. THP-1 hücrelerinde MDA-MB-231 hücre süpernatantı ile yapılan 6 saatlik inkübasyonlar ve U937 hücrelerinde HCC38 hücre süpernatantı ile yapılan inkübasyonlarda TLR4 gen ifadesinde artış gözlemlenmesine rağmen bu artışlar göz ardı edilebilecek düzeyde kaldı (Şekil 4.21 A, B).

TLR4 kompleksi bileşenlerinden CD14'ün THP-1 hücrelerinde bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının etkisiyle istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını göstermiştik (Bkz. Bölüm 4.2.1, Şekil 4.3 A, B). Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 24 saat boyunca inkübe edilen THP-1 hücrelerinde TLR4 ve MD2 hücre yüzey reseptörlerinin düzeyi incelendiğinde THP-1 hücrelerinin büyük kısmının TLR4 ifade ettiği görüldü (TLR4 OFY, RPMI kontrol 10.65 ± 1.32). Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının TLR4 yüzey molekülünün ifadesinde belirgin bir değişime yol açmadığı gözlemlendi (Şekil 4.21 C, D). MD2 reseptörünün ise THP-1'de düşük düzeyde idi ve bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının varlığında MD2 düzeylerinde anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.21 C, E).



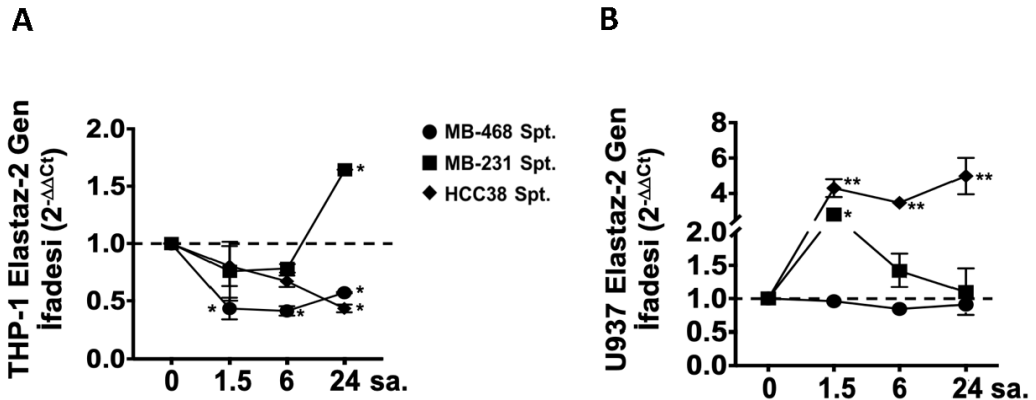


Şekil 4.21. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantlarının miyeloid hücrelerde TLR4 reseptör bileşenlerinin düzeyine etkisi. Süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 1.5, 6 ve 24 saat (sa.) boyunca inkübe edilen A) THP-1 ve B) U937 hücrelerinde TLR4 gen ifadesinde meydana gelen değişimler gerçek-zamanlı RT-PZR yöntemi ile analiz edildi. Analizlerde elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri RPMI kültür ortamında tutulan kontrol hücrelerin (THP-1 ve U937) verilerine göre normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. C) Süpernatantlar ile 24 saat boyunca inkübe edilen THP-1 hücrelerinde TLR4 ve MD2 belirteçlerinin temsili akım sitometri histogramları. Boş histogramlar izotipik kontrolleri, dolu histogramlar ise özgül anti-TLR4 veya anti-MD2 antikoru ile yapılan işaretlemeleri temsil etmektedir. THP-1 hücrelerinde D) TLR4 ve E) MD2 belirteçlerinin izotipik kontrol boyamaları ile elde edilen ortalama floresan yoğunluğu (OFY) verisine göre normalize edilmiş ortalama floresan yoğunlukları. (MB-468, MDA MB-468; MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 3$)

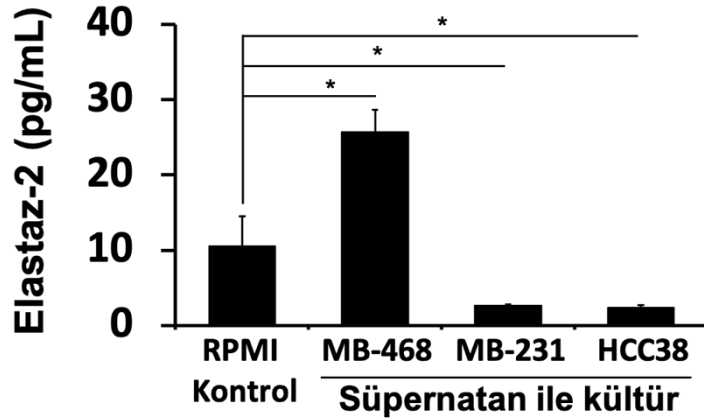
4.5.3. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Süpernatantlar ile Muamele Edilen Miyeloid Hücrelerde Elastaz-2 Üretimini Değerlendirilmesi

Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında 1.5, 6 ve 24 saat inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerinde elastaz-2 enziminin mRNA düzeyleri değerlendirildi. THP-1 hücrelerinde, MDA-MB-231 hücre süpernatantı ile 24 saat inkübe edilen koşul hariç, elastaz-2 gen ifadesinde hafif bir azalma oldu (Şekil 4.22 A). U937 hücrelerinde ise MDA-MB-231 ve HCC38 süpernatantlarının, kısa süreli uyarımlarda (1.5 sa.) elastaz-2 gen ifadesini desteklediği HCC38'in bu etkiyi uzun süre devam ettirdiği ancak MDA-MB-231'den salgılanan faktörlerin 24 saat sonunda elastaz-2'yi bazal seviyeye geri döndürdüğü görüldü (Şekil 4.22 B).

Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile 24 saat inkübe edilen THP-1 hücrelerinden süpernatantlar uzaklaştırıldı, tam besiyerinde süspanse hale getirildi. Maksimum salım kapasitesini ortaya çıkarmak amacıyla hücreler kısa süreli (3 saat) PMA/iyonomisin ile uyarıldı ve sonrasında toplanan süpernatantlardaki elastaz-2 düzeyleri analiz edildi. Kontrol olarak RPMI 1640 besiyeri ile inkübe edilen THP-1 hücrelerinde salgılanan elastaz-2 düzeyleri oldukça düşük idi. THP-1 hücrelerinde elastaz-2 düzeylerinin MDA-MB-468 süpernatantlarının etkisiyle belirgin şekilde arttığı ancak MDA-MB-231 ve HCC38 hücre hattı süpernatantları ile anlamlı olarak azaldığı belirlendi (Şekil 4.22 C).



C



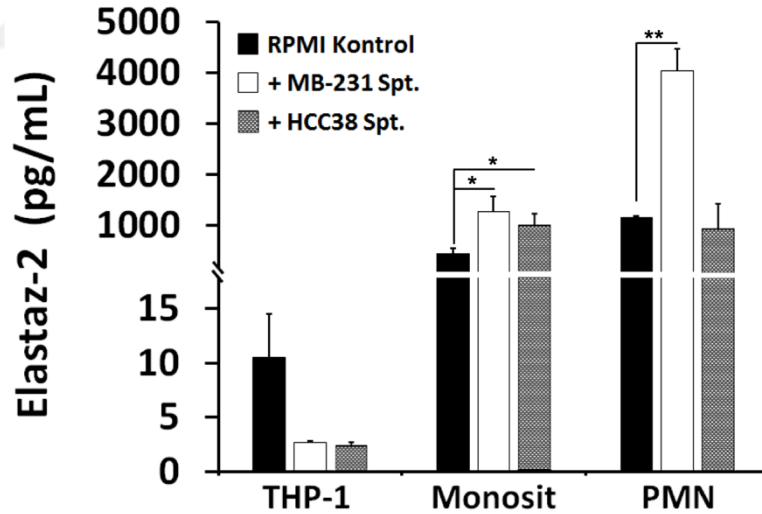
Şekil 4.22. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatınlarının miyeloid hücrelerde elastaz-2 gen ifadesine ve salgılanan protein düzeyine etkisi. Süpernatınlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 1.5, 6 ve 24 saat (sa.) boyunca inkübe edilen A) THP-1 ve B) U937 hücrelerinde elastaz-2 gen ifadesinde meydana gelen değişimler gerçek-zamanlı RT-PZR yöntemi ile analiz edildi. Analizlerde elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri RPMI kültür ortamında tutulan kontrol hücrelerinin (THP-1 ve U937) verilerine göre normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. C) Süpernatınlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 sa. boyunca inkübe edilen THP-1 hücrelerinin PMA (50 ng/mL)/iyonomisin (0,5 $\mu\text{g/mL}$) uyarımı sonrası elastaz-2 salım kapasitesi ELISA yöntemi ile teyit edildi. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatın; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n=3$)

4.6. Meme Kanseri Hücrelerinden Üretilen FN-EDA Proteininin TLR4 Ligandı Olarak Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Fibronektinin EDA kısmı TLR4'e bağlanarak bu reseptörün aktivasyonunu uyarabilmektedir (9). Elastaz-2 enziminin yaptığı kesim EDA ve "tip-III 12" kısımlarını birbirinden ayırır; bu sayede, EDA TLR4 reseptörü ile etkileşimini artırabilir. TLR4 uyarımı, NF- κ B transkripsiyon faktörünün aktivasyonuna neden olur (8). Bu tez çalışması kapsamında oluşturulan hipotezlerden birisi de monositik miyeloid hücrelerden serbestlenen elastaz-2 enziminin bazal-benzeri meme kanseri hücreleri tarafından üretilen FN-EDA proteinini keserek, yine miyeloid hücreler üzerinde

bulunan TLR4 reseptör kompleksi için ligand haline dönüştürdüğüdür. Bu doğrultuda ilk etapta, bazal-benzeri meme kanseri hücre (MDA-MB-231 ve HCCC38) süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1, monosit ve pozitif kontrol olarak polimorfonükleer granüositlerde (PMN) elastaz-2 düzeyleri incelendi.

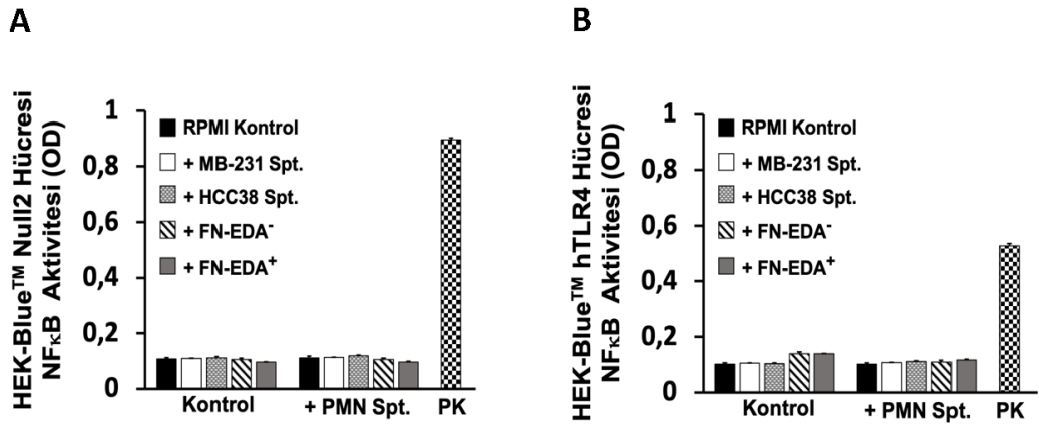
Bunun sonucunda THP-1 hücrelerinde elastaz-2 üretiminin çok düşük düzeylerde olduğu ve bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının (MDA-MB-231 ve HCC38) bu hücrelerde elastaz-2 üretimine etki etmediği saptandı. Diğer taraftan, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salınan faktörlerin monositlerde elastaz-2 düzeylerini artırdığı görüldü (Monosit elastaz-2 (pg/mL), RPMI kontrol 353 ± 200 ; MDA-MB-231 spt. 1271.3 ± 300 ; HCC38 spt. 1030 ± 191). THP-1, monosit ve PMN granüositler içinde elastaz-2 enzimini en fazla üreten hücrelerin PMN granüositler olduğu tespit edildi. Özellikle MDA-MB-231 hücre süpernatantları varlığında PMN granüositlerde elastaz-2 üretiminin belirgin şekilde arttığı tespit edildi (PMN granüosit elastaz-2 (pg/mL), RPMI kontrol 1161 ± 25.6 ; MDA-MB-231 spt. 3590 ± 874 pg/ml) (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. THP-1, monosit ve PMN granüositlerinden salgılanan elastaz-2 düzeyleri ve bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca yapılan inkübasyonların elastaz-2 salımına etkisi ELISA ile değerlendirildi. (MB-231, MDA-MB-231; Spt., süpernatant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n=3$)

TLR4 sinyalinin NF- κ B yolağını uyarması prensibine dayanan bildirici deneyleri (*reporter assay*) planlanmıştır. Bu deneylerde, HEK-Blue™ hTLR4 ve HEK-Blue™ Null2 hücreleri kullanıldı. HEK-Blue™ hTLR4 hücrelerinde TLR4 kompleksi aktivitesi sonucu NF- κ B aracılığı ile SEAP reporter geni aktifleşirken HEK-Blue™ Null2 hücreleri ise TLR4 kompleksi iğermez ve TLR4 aktivitesinden bağımsız olarak NF- κ B aracılığı ile SEAP reporter genini aktive eder. Bu amaçla, yüksek düzeyde FN-EDA üreten bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinin (MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ile TLR4 reseptörünü yüksek düzeyde ifade eden HEK-Blue™ hTLR4 ve kontrol olarak HEK-Blue™ Null2 hücrelerinin (Bkz. Gereç-yöntem 3.11) kültürü yapılarak bu süpernatantların TLR4 ve NF- κ B aktivitesi üzerine etkisi incelendi. Bu analiz sonucunda, FN-EDA proteinini yüksek düzeyde ifade eden bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının TLR4 ve NF- κ B yolaklarını uyarmadığı görüldü (şekil 4.24 A, B). Ortamda elastaz-2 varlığını sağlamak amacıyla MDA-MB-231 ve HCC38 süpernatantları içerisinde PMN hücrelerin kültürü yapıldı. Bu kültürlerden toplanan süpernatantların da TLR4 aracılığı ile NF- κ B aktivitesini uyarmadığı belirlendi (şekil 4.24 B).

Rekombinant FN-EDA⁺ ve FN-EDA⁻ proteinleri kontrol RPMI besiyerine eklenerek ayrı bir koşul oluşturuldu. Bu proteinleri iğereren besiyerleri ile doğrudan veya bu besiyerlerinin PMN hücreleri ile kültürü yapıldıktan sonra elde edilen süpernatantlar ile bildirici deneyleri yapıldı. Rekombinant FN-EDA proteinlerinin hem tek başına hem de PMN hücreleri varlığında NF- κ B aktivitesini uyarmadığı belirlendi (şekil 4.24 A, B). Bu sonuçlar, EDA iğereren fibronektinin veya elastaz-2 varlığı ile oluşabilecek FN-EDA parçalarının TLR4 reseptörünü doğrudan uyarmadığına işaret etmiştir.



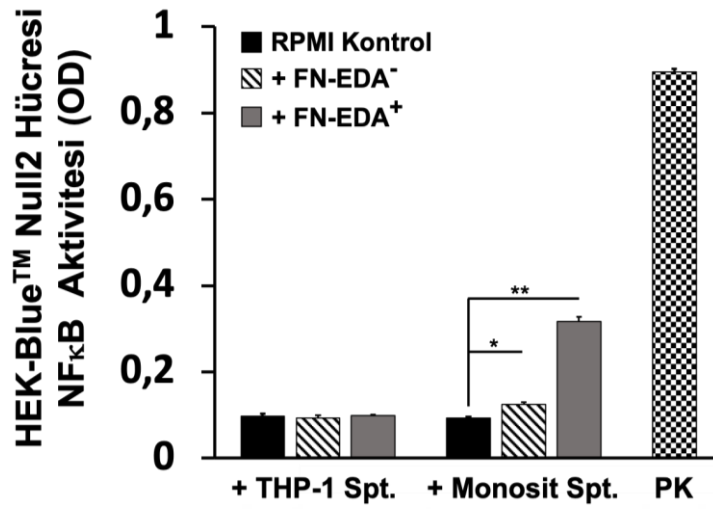
Şekil 4.24. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarından salgılanan FN-EDA proteininin TLR4 ve NF-κB aktivitesi üzerine etkisi. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ve rekombinant FN proteinlerinin (FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺, 15 µg/mL) tek başına ve PMN hücre süpernatantları varlığında A) TLR4'den bağımsız ve B) TLR4 aracılı NF-κB aktivitesine etkisi bildirci deneyler ile analiz edildi. (MB-231, MDA-MB-231; Spt., süpernatant; PK, pozitif kontrol; OD, optik yoğunluk; n=3)

4.7. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Üretilen Faktörlerin ve FN-EDA'nın Monositik Hücrelerin İnflamatuvar Kapasitesi Üzerine Etkisi

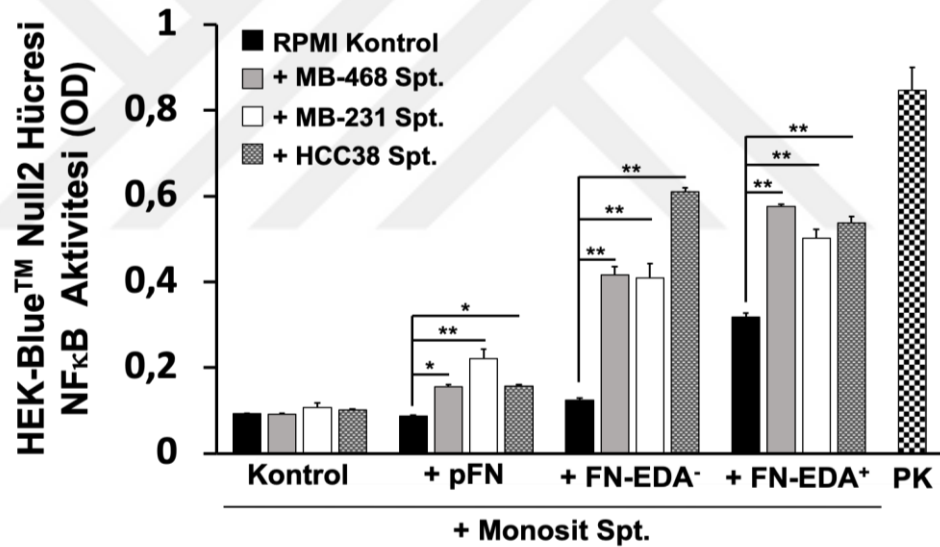
NF-κB yolağının TLR4 aracılığı ile FN-EDA içeren bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları veya elastaz-2 içeren PMN hücreleri ile oluşturulan koşullarda uyarılmaması nedeniyle, NF-κB yolağının TLR4'ten bağımsız olarak monositik hücreler aracılığı ile uyarılabileceği hipotezi oluşturuldu. FN-EDA⁺ ve FN-EDA⁻ rekombinant proteinleri ile kültürü yapılan THP-1 hücrelerinden ve periferik kan monositlerinden elde edilen süpernatantlar ile deneyler yapıldı. FN-EDA⁺ ve FN-EDA⁻ rekombinant proteinleri varlığında THP-1 hücrelerinden salgılanan faktörlerin NF-κB aktivitesini uyardı yeterli olmadığı görüldü. FN-EDA⁺ ve FN-EDA⁻ rekombinant proteinleri ile kültürü yapılan monositlerden salgılanan faktörlerin ise NF-κB aktivasyonunu anlamlı düzeyde uyardığı tespit edildi. Bu uyarım FN-EDA⁻ içeren

koşulda düşük seviyede kalsa da FN-EDA⁺ içeren koşulda oldukça yüksek düzeyde idi (Optik yoğunluk (OD), RPMI kontrol 0.093 ± 0.003 , FN-EDA⁻ 0.125 ± 0.004 , FN-EDA⁺ 0.32 ± 0.01) (Şekil 4.25 A). Plazma fibronektin (pFN), FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺ rekombinant proteinleri de eklenerek bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile 24 saat kültürü yapılan monositlerden süpernatantlar toplandı. Bu süpernatantlar ile HEK-Blue™ Null2 hücrelerinin kültürü yapılarak NF-κB aktivitesi üzerine etkisi değerlendirildi. Sadece bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile muamele edilen monositlerden salgılanan faktörlerin NF-κB aktivitesini uyarmada etkili olmadığı görüldü. Plazma fibronektin ile uyarılan monositlerin de NF-κB aktivitesini etkin bir şekilde uyarmadığı belirlendi. Plazma fibronektin içeren bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile inkübe edilen monositlerden salgılanan faktörlerin NF-κB yolağını düşük seviyede aktive ettiği gözlemlendi (OD, pFN, RPMI kontrol 0.08 ± 0.001 , MDA-MB-468 spt. 0.14 ± 0.004 , MDA-MB-231 spt. 0.22 ± 0.02 , HCC38 spt. 0.14 ± 0.002). FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺ rekombinant proteinleri varlığında bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile inkübe edilen monositlerden elde edilen süpernatantların NF-κB aktivitesini etkin bir şekilde uyardığı belirlendi. Özellikle MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 hücre süpernatantlarını içeren koşullarda monosit süpernatantlarının NF-κB aktivitesini uyarmada FN-EDA⁺ proteinin etkisinin FN-EDA⁻ proteinine göre daha fazla idi. HCC38 hücre süpernatantları varlığında, FN-EDA⁻ proteininin NF-κB aktivitesini uyaran monositik faktörlerin salımında FN-EDA⁺ rekombinant proteini içeren bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları kadar etkili olduğu gözlemlendi (OD, FN-EDA⁻, RPMI kontrol 0.125 ± 0.004 , MDA-MB-468 spt. 0.42 ± 0.02 , MDA-MB-231 spt. 0.41 ± 0.03 , HCC38 spt. 0.6 ± 0.01 ; FN-EDA⁺, RPMI kontrol 0.32 ± 0.01 , MDA-MB-468 spt. 0.58 ± 0.004 , MDA-MB-231 spt. 0.5 ± 0.02 , HCC38 spt. 0.54 ± 0.016). Bu analizler FN-EDA proteini içeren koşullarda PMN ve THP-1 hücrelerinden salgılanan faktörlerin NF-κB aktivitesini uyaramadığını gösterdi. Ancak, rekombinant fibronektin (pFN, FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺) içeren koşullarda bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında monositlerden üretilen faktörlerin NF-κB aktivasyonunu etkili bir şekilde uyardığını gösterdi (Şekil 4.25 B)

A

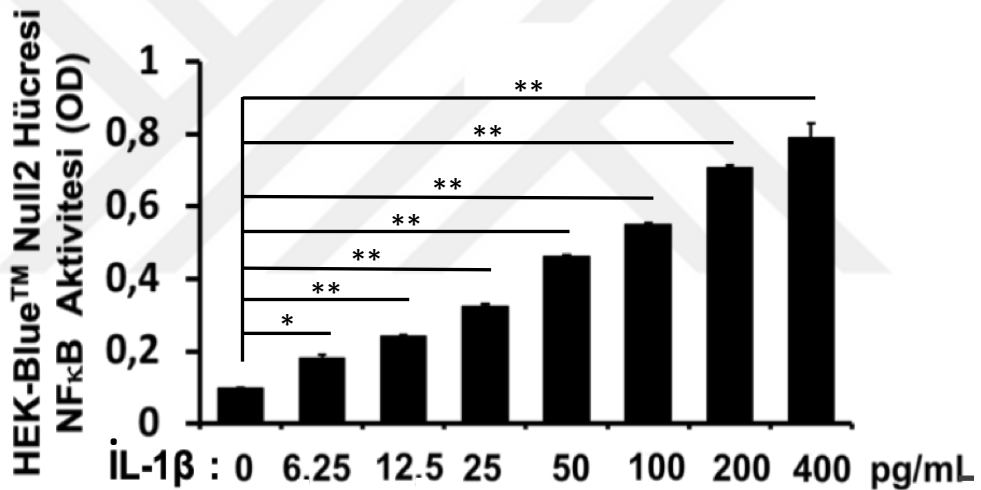


B



Şekil 4.25. FN-EDA proteini ile uyarılan monositik hücrelerin NF-κB aktivitesi üzerine etkisini gösteren bildirici deney analizi. A) Rekombinant FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺ proteinleri ile 15 µg/mL konsantrasyonda 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca inkübe edilen THP-1 ve monosit hücrelerinden elde edilen süpernatantların NF-κB aktivitesine etkisi. B) Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ve/veya rekombinant FN proteinleri (pFN, FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺, 15 µg/mL) ile 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca inkübe edilen monositlerden elde edilen süpernatantların NF-κB aktivitesine etkisi. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; PK, pozitif kontrol; Spt, süpernatant; OD, optik yoğunluk, * p<0.05, ** p<0.01; n=3)

Monositler ve makrofajlar tarafından yüksek miktarda üretilen İL-1 β , NF- κ B yolağını uyarır ve yine NF- κ B tarafından artış yönünde düzenlenir (79, 179). Rekombinant fibronektin proteinleri (pFN, FN-EDA ve FN-EDA⁺) varlığında bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile 24 saat boyunca kültürü yapılan monositlerden salgılanan faktörlerin NF- κ B bildirici aktivitesini artırmasının İL-1 β nedeniyle olabileceği hipotezi oluşturuldu. Rekombinant İL-1 β ile farklı konsantrasyonlarda (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 pg/mL) uyarılan HEK-Blue™ Null2 hücrelerinde NF- κ B aktivitesi analiz edildi. Bu analiz sonucunda, artan İL-1 β konsantrasyonu ile beraber NF- κ B aktivitesinin de arttığı gözlemlendi (Şekil 4.26).



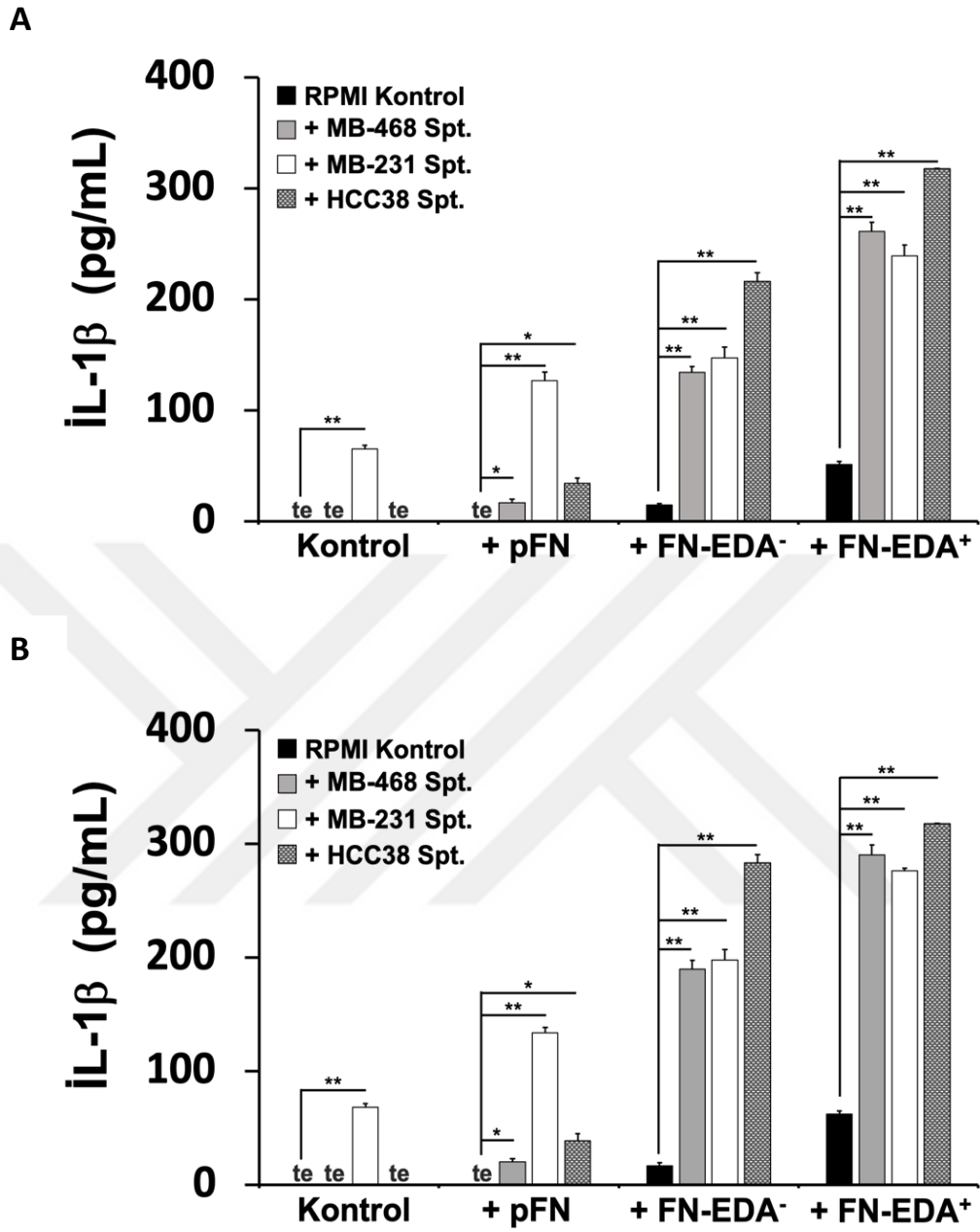
Şekil 4.26. İL-1 β 'nin NF- κ B aktivitesi üzerine etkisi. Farklı konsantrasyonlardaki (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 pg/mL) rekombinant İL-1 β 'nin NF- κ B aktivitesine etkisi bildirici deneyler ile analiz edildi. (OD, optik yoğunluk, * p<0.05, ** p<0.01; n=3)

Monositlerde İL-1 β üretimi değerlendirildiğinde, MDA-MB-231 hücre süpernatantının İL-1 β üretimini artırdığı diğer bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının ise monositlerde İL-1 β üretimini artırmasının ancak FN eklenmesi ile gerçekleştiği görüldü (Şekil 4.27 A). Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının pFN varlığında da İL-1 β üretimini artırdığı görüldü (İL-1 β (pg/mL),

pFN, RPMI kontrol 0 ± 0 , MDA-MB-468 spt. 16.7 ± 3 , MDA-MB-231 spt. 126.4 ± 7.8 , HCC38 spt. 34.3 ± 4.3). Bu artışın MDA-MB-231 hücre süpernatantları varlığında daha fazla olduğu gözlemlendi.

Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantı ile kültürü yapılan monositlerde FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺ rekombinant proteinleri varlığında İL-1 β üretiminin belirgin şekilde arttığı görüldü (İL-1 β (pg/mL), FN-EDA⁻, RPMI kontrol 14.4 ± 1.5 , MDA-MB-468 spt. 134.2 ± 5 , MDA-MB-231 spt. 147 ± 10 , HCC38 spt. 216 ± 8.2 ; FN-EDA⁺, RPMI kontrol 51.4 ± 2.7 , MDA-MB-468 spt. 261.2 ± 8.3 , MDA-MB-231 spt. 239.3 ± 9.6 , HCC38 spt. 317.5 ± 0.2). En fazla artışın HCC38 hücre süpernatantı varlığında olduğu tespit edildi. Monositlerde İL-1 β üretimini en fazla destekleyen koşulun FN-EDA⁺ rekombinant proteinlerini içeren bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları olduğu belirlendi (Şekil 4.27 A).

Rekombinant fibronektin proteinleri varlığında bazal-benzeri meme kanseri hücreler süpernatantları ile kültürü yapılan monositlerdeki maksimum İL-1 β üretimini uyarmak için bu hücreler PMA ve iyonominin ile kısa süreli (1.5) uyarıldı. Bu analiz sonucunda, özellikle FN-EDA⁻ rekombinant proteini varlığında bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının, PMA ve iyonominin içermeyen koşula göre, İL-1 β üretimini yaklaşık olarak 1.3 kat artırdığı belirlendi. FN-EDA⁺ rekombinant proteininde ise MDA-MB-468, MDA-MB-231 hücre süpernatantları ve kontrol olarak RPMI besiyeri ile kültürü yapılan monositlerde, PMA ve iyonominin içermeyen koşula göre, İL-1 β üretiminin yaklaşık olarak 1.15 kat arttığı tespit edildi. FN-EDA⁺ rekombinant protein varlığında HCC38 hücre süpernatantı ile kültürü yapılan monositlerde, PMA ve iyonominin içermeyen koşul ile kıyaslandığında, belirgin bir değişim gözlenmedi. PMA ve iyonominin ile uyarılan monositlerde kontrol ve pFN içeren koşulların, PMA ve iyonominin içermeyen koşula göre, İL-1 β üretiminde değişime yol açmadığı görüldü (Şekil 4.27 B). Bu sonuçlara göre, NF- κ B aktivitesinin uyarılmasında monositlerden salgılanan İL-1 β etkili olabilir. Diğer taraftan, FN-EDA⁻ proteininin monositlerde İL-1 β üretim kapasitesini artırdığı ancak bu sitokinin serbestlenmesini FN-EDA⁺ kadar uyarmadığı düşünüldü.



Şekil 4.27. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ve/veya rekombinant FN (pFN, FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺, 15 μ g/mL) proteinleri ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca inkübe edilen monositlerden İL-1 β salımının ELISA ile analizi. Süpernatantlar ve/veya rekombinant FN proteinleri ile inkübe edilen monositlerden süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra RPMI besiyerinde inkübasyon sonrası A) ortama serbestlenen İL-1 β ve B) PMA (50 ng/mL)/iyonomisin (0.5 μ g/mL) ile ortama serbestlenme kapasitesi artırılmış İL-1 β düzeyleri. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant; te, tespit edilemedi; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; n=3)

4.8. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinin Etkisi Altındaki Miyeloid Hücrelerde STAT3 Aktivitesinin İncelenmesi

Tümör mikroçevresindeki miyeloid hücrelerin baskılayıcı karakter kazanmasına katkı yapan STAT3 transkripsiyon faktörünün aktivasyonunun bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları varlığındaki artışı bu çalışmanın önemli bulguları arasındadır (Bkz. Bölüm 4.2.6, Şekil 4.8). Bu transkripsiyon faktörünün miyeloid hücrelerin pro-inflamatuvar karakteri üzerine etkilerini incelenmek için bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları varlığında özgül STAT3 inhibitörü ile aktivasyonu engellenerek analizler gerçekleştirildi. Ek olarak, bölümümüzde gerçekleştirilen “STAT3 aracılı İFN- γ sinyali ile AML hücrelerinin CD11b⁺ alt popülasyonundaki PD1 ligandlarının modülasyonu” başlıklı çalışma için Sabancı Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde (SUNUM) Dr. Tolga Sütü tarafından geliştirilen, viral transdüksiyon yöntemi ile *short hairpin* (sh)STAT3 (pSIH1-puro-STAT3 shRNA, shSTAT3/THP-1), shKontrol (pSIH1-puro-kontrol shRNA, shKontrol/THP-1) (173), dominant negatif STAT3 (EF.STAT3DN.Ubc.GFP, STAT3DN/THP-1) (174) ve GFP Kontrol (LeGO-G2, Kontrol GFP/THP-1) (175) plazmid vektörleri modifiye edilmiş THP-1 hücreleri de çalışmamızda STAT3 aktivasyonunun etkilerini incelemek için kullanıldı.

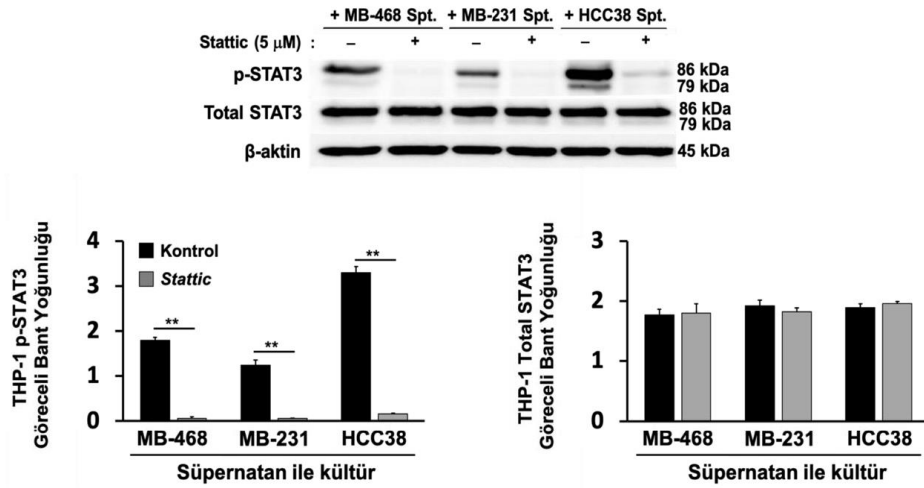
4.8.1. STAT3 Aktivitesinin Küçük İnhibitör Molekül *Stattic* ile Engellenmesi

THP-1 ve U937 hücre hatlarında STAT3 aktivasyonunu engellemek için bu hücreler önce *Stattic* ile inkübe edildi. Daha sonra *Stattic* içeren besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından, bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 ve U937 hücrelerinde p-STAT3 (Tyr705) ve total STAT3 protein düzeyindeki değişimler değerlendirildi. Bu analiz sonucunda, *Stattic*’in hem THP-1 hem de U937 hücrelerinde bazal-benzeri meme kanseri hücreleri tarafından uyarılan p-STAT3 düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı belirlendi (pSTAT3/ β -aktin, THP-1, MDA-MB-468 spt. kontrol 1.1 ± 0.07 , *Stattic* 0.06 ± 0.03 ; MDA-MB-231 spt. kontrol 0.65 ± 0.1 , *Stattic* 0.02 ± 0.01 ; HCC38 spt. kontrol 2.3 ± 0.1 , *Stattic* 0.16 ± 0.01 ; U937, MDA-MB-468 spt. kontrol 0.44 ± 0.01 , *Stattic* 0.06 ± 0.01 ;

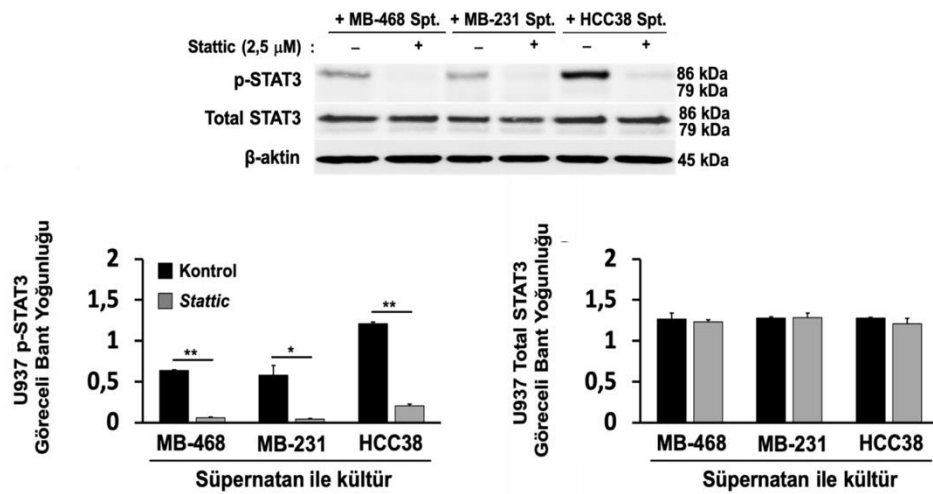
MDA-MB-231 spt. kontrol 0.4 ± 0.1 , *Stattic* 0.04 ± 0.01 ; HCC38 spt. kontrol 1.1 ± 0.02 , *Stattic* 0.2 ± 0.02). Total-STAT3 düzeylerinde ise herhangi bir değişim gözlenmedi (Şekil 4.28 A, B).

Aynı koşullarda bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan periferik kandan izole edilen monositlerde de küçük inhibitör molekül *Stattic*'in meme kanseri hücre süpernatantları ile uyarılan p-STAT3 protein ifadesini belirgin şekilde azalttığı doğrulandı (Şekil 4.28 C).

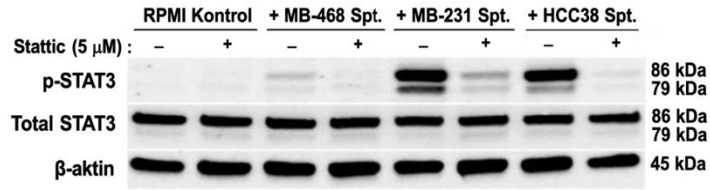
A



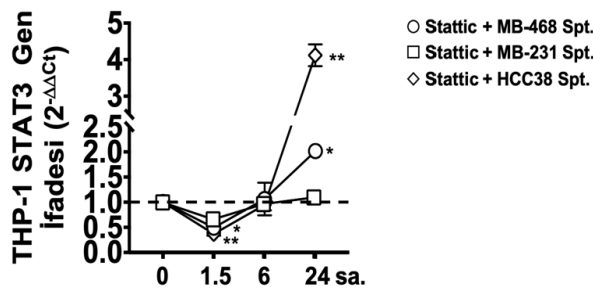
B



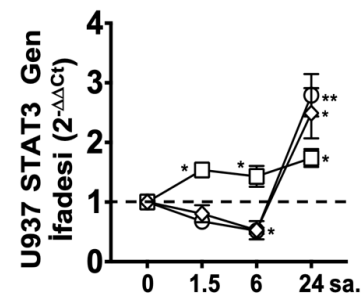
C



D



E



Şekil 4.28. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile uyarılan miyeloid hücrelerde küçük inhibitör molekül *Stattic*'in STAT3 aktivasyonu ve gen ifadesine etkisi. *Stattic* ile (THP-1 ve monositler için 5 µM, U937 için 2.5 µM) 45 dk. inkübasyon sonrasında süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 15 dk. boyunca inkübe edilen A) THP-1, B) U937 hücrelerinde ve C) monositlerde p-STAT3 ve total STAT3 protein ifadesindeki değişimleri gösteren Western Blot görüntüsü ve göreceli bant yoğunluğu değişim grafikleri. Total STAT3 ve p-STAT3 proteinlerinin bant yoğunlukları β-aktin bant yoğunluğuna göre normalize edildi. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 1.5, 6 ve 24 saat (sa.) uyarılan D) THP-1 ve E) U937 hücrelerinde *Stattic* etkisiyle meydana gelen STAT3 gen ifadesi değişimleri gerçek-zamanlı RT-PZR ile analiz edildi. Analizlerde, *Stattic* içeren koşullardan elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kontrol olarak meme kanseri hücre (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ile inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerden elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ verilere göre normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; n=3)

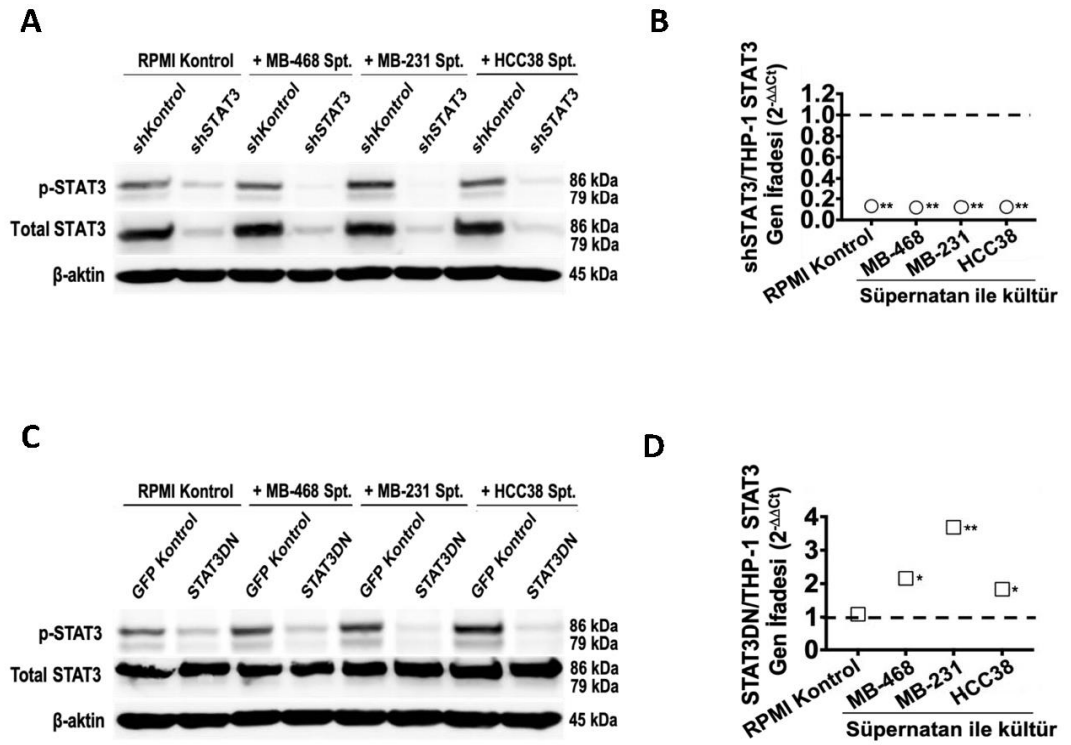
Stattic'in STAT3 gen ifadesine etkisini belirlemek amacı ile bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 1.5, 6 ve 24 saat inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerinde STAT3 mRNA düzeyleri ölçüldü. Bunun sonucunda, *Stattic* ile muamele edilen THP-1 hücrelerinde 1.5 saatlik inkübasyonlarda STAT3 mRNA düzeylerinin minimal olarak azaldığı 6. saatte ise başlangıç değerine ulaştığı gözlemlendi. MDA-MB-468 ve HCC38 hücre hattı süpernatantları varlığında 24. saatte belirgin bir STAT3 mRNA düzey artışı belirlendi (Şekil 4.28 D). *Stattic* varlığında U937 hücre hattı ile yapılan deneylerde MDA-MB-468 ve HCC38 hücre süpernatantları ile 6. saate kadar STAT3 gen ifadesinin minimal azaldığı 24. saatte ise yaklaşık olarak 3 kat arttığı gözlemlendi (Şekil 4.28 E). Hem U937 hem de THP-1 hücrelerinde *Stattic* muamelesinin MDA-MB-231 hücre süpernatantı içeren koşullarda STAT3 gen ifadesini belirgin düzeyde etkilemediği görüldü. (Şekil 4.28 D, E).

4.8.2. STAT3DN/THP-1 ve shSTAT3/THP-1 Hücreleri ile Analizler

STAT3DN/THP-1 ve shSTAT3/THP-1 hücreleri bölümümüzde yürütülen başka bir proje için Sabancı Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (SUNUM) Dr. Tolga Sütlü tarafından geliştirilmiştir. STAT3DN/THP-1 hücreleri için kontrol olarak GFP/THP-1 hücreleri, shSTAT3/THP-1 hücreleri için ise shKontrol/THP-1 hücreleri kullanılmıştır. STAT3DN proteininde STAT3'ün aktivasyonuna yol açan 705 numaralı tirozin amino asitinin (Tyr705) yerine fenilalanin amino asiti bulunmaktadır. Bu durum, STAT3DN plazmid vektörünü içeren hücrelerde STAT3'ün inaktif formunun üretilmesini sağlamaktadır. STAT3DN proteini, ilişkili reseptör uyarıldığında hücredeki endojen STAT3 ile yarışır. Böylece, bu proteinin fosforilasyonunu engeller. Fosforilasyonu engellenen STAT3 proteini dimer oluşturamaz ve nükleusa geçip hedef genlerin transkripsiyonunu gerçekleştiremez. Ayrıca, STAT3DN proteini ile heterodimer oluşturan fosforillenmiş endojen STAT3 proteini de fonksiyonel değildir ve DNA ile etkileşime geçemez (174, 180). STAT3 proteinin oluşumunu engellemek için shSTAT3 plazmid vektörü kullanılmıştır. Bu vektör aracılığı ile üretilen shSTAT3, STAT3 mRNA'sına bağlanır ve bu mRNA'nın proteine dönüşümünü engeller (173, 181).

Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ve kontrol olarak RPMI 1640 besiyeri ile inkübe edilen shSTAT3/THP-1 hücrelerinde STAT3 protein oluşumunun etkili bir şekilde baskılandığı tespit edildi (Şekil 4.29 A). Bu sonuçlar, STAT3 gen ifadesi ile de doğrulandı (Şekil 4.29 B). STAT3DN/THP-1 hücrelerinin bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ve kontrol olarak RPMI 1640 besiyeri ile yapılan kültürlerinde STAT3 aktivasyonunun belirgin bir şekilde azaldığı görüldü (Şekil. 4.29 C). Aynı koşullarda STAT3DN/THP-1 hücrelerindeki STAT3 gen ifadesinin bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile yapılan kültürlerde belirgin şekilde arttığı görüldü. Kontrol koşulunda STAT3 protein ifadesindeki azalmaya rağmen STAT3 gen ifadesinin değişmediği saptandı (Şekil. 4.29 D).





Şekil 4.29. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile inkübe edilen genetik olarak modifiye edilmiş THP-1 hücrelerinde STAT3 protein ve gen ifadesindeki değişimler. A) Süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde inkübe edilen shKontrol/THP-1 ve shSTAT3/THP-1 hücrelerinde p-STAT3 ve total STAT3 protein ifadesindeki (48 sa.) değişimleri gösteren Western Blot görüntüsü ve B) STAT3 gen ifadesinde (24 sa.) meydana gelen değişimlerin gerçek-zamanlı RT-PZR ile analiz ($n=3$). C) Süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde inkübe edilen kontrol GFP/THP-1 ve STAT3DN/THP-1 hücrelerinde p-STAT3 ve total STAT3 protein ifadesindeki (48 sa.) değişimleri gösteren Western Blot görüntüsü ve D) STAT3 gen ifadesinde (24 sa.) meydana gelen değişimlerin gerçek-zamanlı RT-PZR ile analiz ($n=3$). Total STAT3 ve p-STAT3 proteinlerinin bant yoğunlukları β -aktin bant yoğunluğuna göre normalize edildi. Analizlerde shSTAT3/THP-1 ve STAT3DN/THP-1 içeren koşullardan elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kontrol olarak meme kanseri hücre (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ve RPMI 1640 ile inkübe edilen shKontrol/THP-1 veya kontrol GFP/THP-1 hücrelerden elde edilen verilerine göre normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; sh, *short hairpin*; DN, *dominant negatif*; GFP, *green fluorescent protein*; Spt, süpernatant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

4.9. STAT3 İnhibisyonunun Miyeloid Hücrelerin Pro-inflamatuvar Karakterine Etkisi

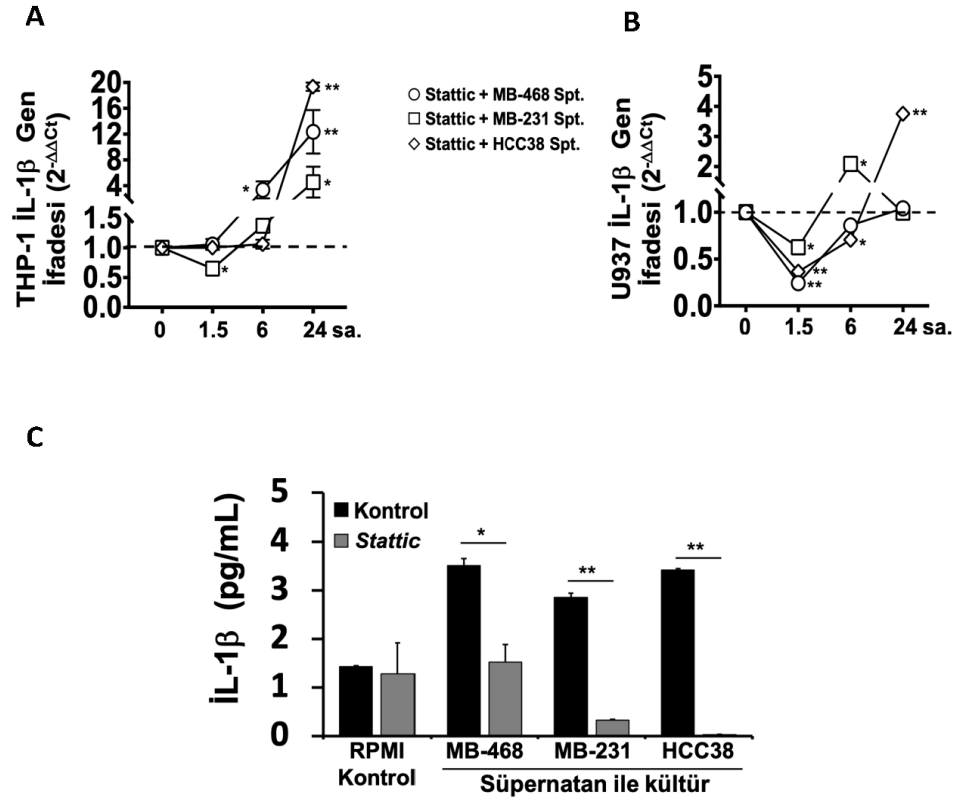
STAT3 aktivitesinin küçük inhibitör molekül *Stattic* veya genetik modifikasyon (shSTAT3 ve STAT3DN) ile inhibisyonunun, bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 ve/veya U937 hücrelerinde İL-1 β , TLR4 ve elastaz-2 ifadesine etkisi değerlendirildi.

4.9.1. STAT3 İnhibisyonunun Miyeloid Hücrelerde İL-1 β Üretimine Etkisi

THP-1 ve U937 hücre hatları önce *Stattic* ile inkübe edildi. Daha sonra *Stattic* içeren besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından, bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ile 1.5, 6 ve 24 saat kültürü yapılan THP-1 ve U937 hücrelerinde İL-1 β mRNA düzeyleri analiz edildi. THP-1 hücrelerinde meme kanseri hücre süpernatantları ile yapılan 1.5 saatlik uyarımlarda *Stattic*'in İL-1 β gen ifadesine belirgin şekilde etki etmediği ancak 6. saatten itibaren bir artışın olduğu belirlendi. Bu etki 24. saatte tüm bazal-benzeri meme kanseri hücreleri için en üst düzeye ulaştı (Şekil 4.30 A). *Stattic* ile muamele edilen U937 hücrelerinde bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında İL-1 β düzeylerinde ilk 1.5 saatte belirgin bir azalma olduğu 6. saatten itibaren ise bu etkinin ortadan kalktığı görüldü. HCC38 hücre süpernatantı varlığında 24. saatte en üst düzeyde idi (Şekil 4.30 B). En belirgin artışların THP-1 hücreleri ile yapılan 24 saatlik inkübasyonlarda görülmesi üzerine çalışmanın devamında gerçekleştirilen İL-1 β analizlerinde bu koşuldaki hücreler kullanıldı.

Stattic ile inkübasyon sonrası bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 hücrelerinden süpernatantlar uzaklaştırıldı, tam besiyerinde süspanse hale getirildi. Maksimum salım kapasitesini ortaya çıkarmak amacıyla hücreler PMA/iyonomisin ile kısa süreli (3 saat) uyarıldı ve sonrasında toplanan süpernatantlardaki İL-1 β düzeyleri analiz edildi. Bu hücrelerde, gen ifadesinin aksine, İL-1 β salımının azalmış olduğu gözlemlendi. THP-1 hücrelerinde normal şartlarda veya meme kanseri hücre süpernatantları varlığında İL-1 β üretimi

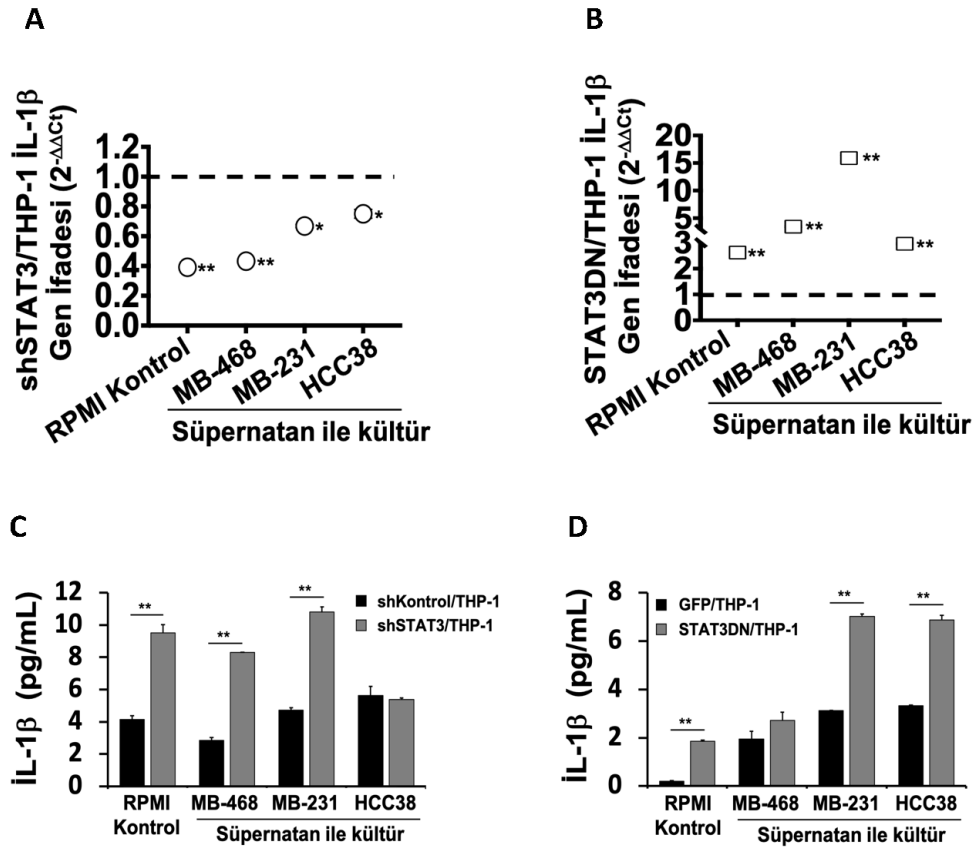
çok düşük (<5 pg/mL) olduğundan *Stattic* etkisiyle gerçekleşen azalma istatistiksel olarak anlamlı olsa bile gözlemlenebilecek biyolojik etkinin minimal düzeyde kalabileceği düşünülmüştür (Şekil 4.30 C).



Şekil 4.30. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile uyarılan miyeloid hücrelerde STAT3 inhibisyonunun İL-1β gen ifadesine ve salgılanan protein düzeyine etkisi. *Stattic* ile (THP-1 için 5 μM, U937 için 2.5 μM) 45 dk. inkübasyon sonrasında süpernatantlar ile 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 1.5, 6 ve 24 saat boyunca inkübe edilen A) THP-1 ve B) U937 hücrelerinde STAT3 inhibisyonunun İL-1β gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler gerçek-zamanlı RT-PZR ile değerlendirildi. Analizlerde, *Stattic* içeren koşullardan elde edilen 2^{-ΔΔCt} değerleri kontrol olarak meme kanseri hücre (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ile inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerden elde edilen 2^{-ΔΔCt} verilere göre normalize edildi. 2^{-ΔΔCt} =1 değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. C) *Stattic* ile inkübasyon sonrasında süpernatantlar ile 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca kültürü yapılan THP-1 hücreleri tam RPMI besiyerinde PMA (50 ng/mL)/iyonomisin (0.5 μg/mL) ile 3 saat boyunca uyarıldı ve İL-1β düzeyi ELISA yöntemi ile araştırıldı. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant; * p<0.05, ** p<0.01; n=3)

Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile inkübe edilen STAT3 düzeyi genetik olarak modifiye edilmiş THP-1 hücreleri ile yapılan analizlerde, İL-1 β gen ifadesinin shSTAT3/THP-1'de azaldığı STAT3DN/THP-1'de ise belirgin şekilde arttığı tespit edildi (Şekil 4.31 A, B).

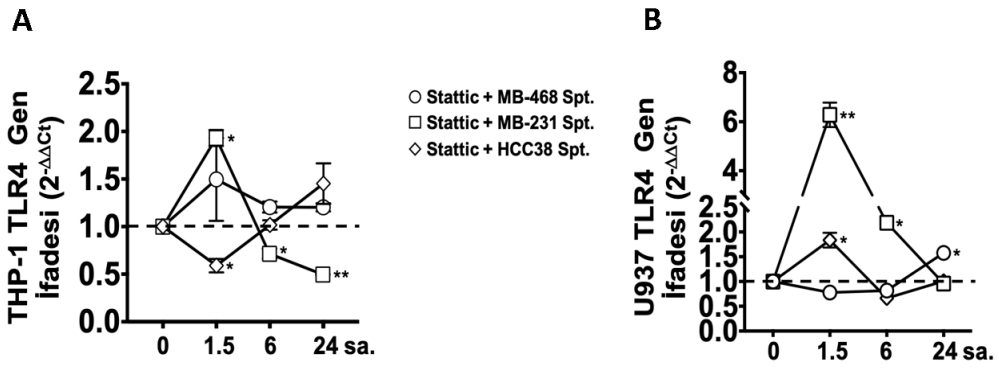
Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile inkübe edilen shKontrol/THP-1, shSTAT3/THP-1, kontrol GFP/THP-1 ve STAT3DN/THP-1 hücrelerinden süpernatantlar uzaklaştırıldı. Daha sonra bu hücrelerin tam besiyerinde kültürü yapıldı ve elde edilen süpernatantlarda İL-1 β düzeyleri analiz edildi. STAT3DN/THP-1 ve shSTAT3/THP-1 hücrelerinin meme kanseri süpernatantı içermeyen kontrol koşullarında İL-1 β salımını anlamlı düzeyde artırdığı gözlemlendi. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının shKontrol/THP-1 hücrelerinde İL-1 β salım düzeylerini etkilemediği kontrol GFP/THP-1 hücrelerinde ise artırdığı görüldü (Şekil 4.31 C, D). shSTAT3/THP-1 hücrelerinin bazal-benzeri meme kanseri süpernatantları ile gerçekleştirilen kültürlerinde, özellikle MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 süpernatantları varlığında İL-1 β düzeylerinin arttığı belirlendi (Şekil 4.31 C). Bu sonuçlar shSTAT3 plazmid vektörü varlığında İL-1 β mRNA düzeyinde gerçekleşen azalmanın protein ifadesine yansımadığını göstermektedir. STAT3DN/THP-1 hücrelerinde ise İL-1 β salımının MDA-MB-231 ve HCC38 hücre süpernatantları varlığında, gen ifadesi ile tutarlı olarak arttığı görüldü. Ancak, serbestlenen düzeyin THP-1'de çok düşük (<10 pg/mL) olduğu gözlemlendi (Şekil 4.31 D).



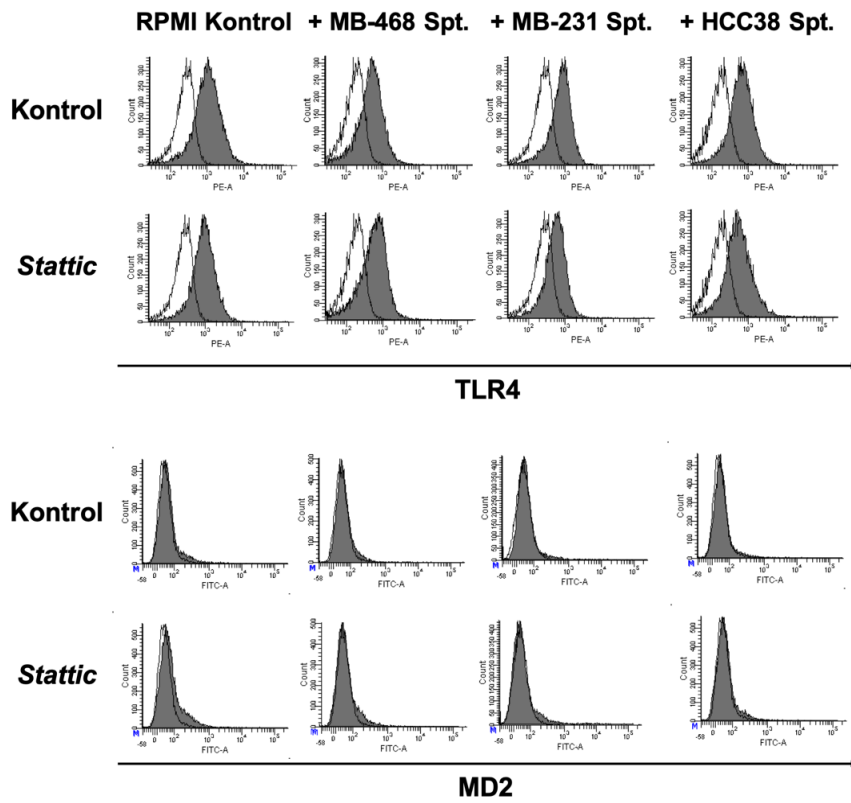
Şekil 4.31. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile inkübe edilen genetik olarak modifiye edilmiş THP-1 hücrelerinde İL-1β gen ifadesindeki ve serbestlenen protein düzeyindeki değişimler. Süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca inkübe edilen A) shSTAT3/THP-1 ve B) STAT3DN/THP-1 hücrelerinde İL-1β gen ifadesinde meydana gelen değişimler gerçek-zamanlı RT-PZR ile değerlendirildi. Analizlerde shSTAT3/THP-1 ve STAT3DN/THP-1 içeren koşullardan elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kontrol olarak meme kanseri hücre (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ve RPMI 1640 ile inkübe edilen shKontrol/THP-1 veya kontrol GFP/THP-1 hücrelerden elde edilen verilerine göre normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. Süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca inkübe edilen C) shKontrol/THP-1, shSTAT3/THP-1 ve D) kontrol GFP/THP-1 ve STAT3DN/THP-1 hücrelerinden süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra tam RPMI besiyerinde 24 saat inkübasyon sonrası serbestlenen İL-1β düzeyleri ELISA yöntemi ile analiz edildi. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; sh, *short hairpin*; DN, dominant negatif; GFP, *green fluorescent protein*; Spt, süpernatant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 3$)

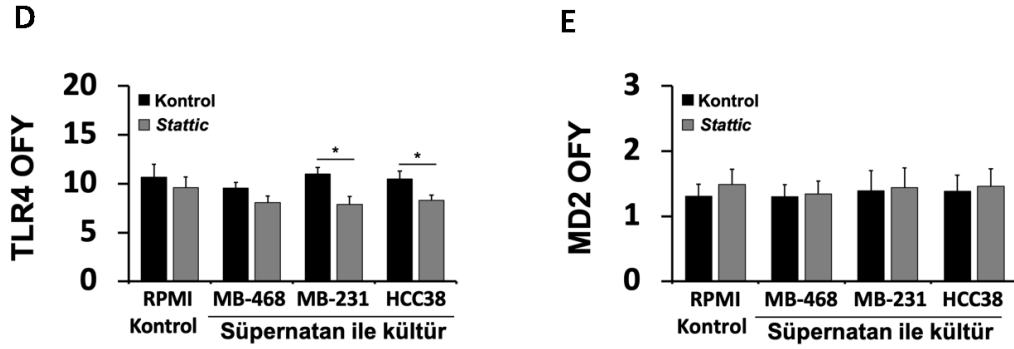
4.9.2. STAT3 İnhibisyonunun Miyeloid Hücrelerde TLR4 ve MD2 İfadesine Etkisi

Stattic ile inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerinin bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ile 1.5, 6 ve 24 saat kültürü yapıldı ve TLR4 mRNA düzeyleri analiz edildi. THP-1 hücrelerinde 1.5 saatlik uyarımlarda TLR4 gen ifadesinin HCC38 hücre süpernatantı varlığında anlamlı düzeyde azaldığı, MDA-MB-231 hücre süpernatantı varlığında ise arttığı görüldü. Bu hücre süpernatantlarının etkisinin 6. saatten itibaren ortadan kalktığı gözlemlendi. MDA-MB-231 hücre süpernatantı varlığında 6. ve 24. saatte THP-1 hücrelerindeki TLR4 gen ifadesinin anlamlı düzeyde azalması dikkat çekicidir. Diğer taraftan, *Stattic* ile muamele edilen U937 hücrelerinde MDA-MB-231 ve HCC38 hücre süpernatantları ile yapılan 1.5 saatlik uyarımlarda TLR4 ifadesinin anlamlı olarak arttığı belirlendi. Bu etkinin 6. saatten itibaren azaldığı gözlemlendi. Hem THP-1 hem de U937 hücrelerinde *Stattic* muamelesinin MDA-MB-468 hücre süpernatantı içeren koşullarda THP-1 hücrelerindeki TLR4 gen ifadesini belirgin düzeyde etkilemediği görüldü. U937 hücrelerinde *Stattic* muamelesi sonrası MDA-MB-231 hücre süpernatantı ile 1.5 saatlik uyarımdaki belirgin artış dışında THP-1 ve U937 hücrelerinde TLR4 gen ifadesindeki değişimlerin düşük seviyede kaldığı saptandı (Şekil 4.32 A, B).



C



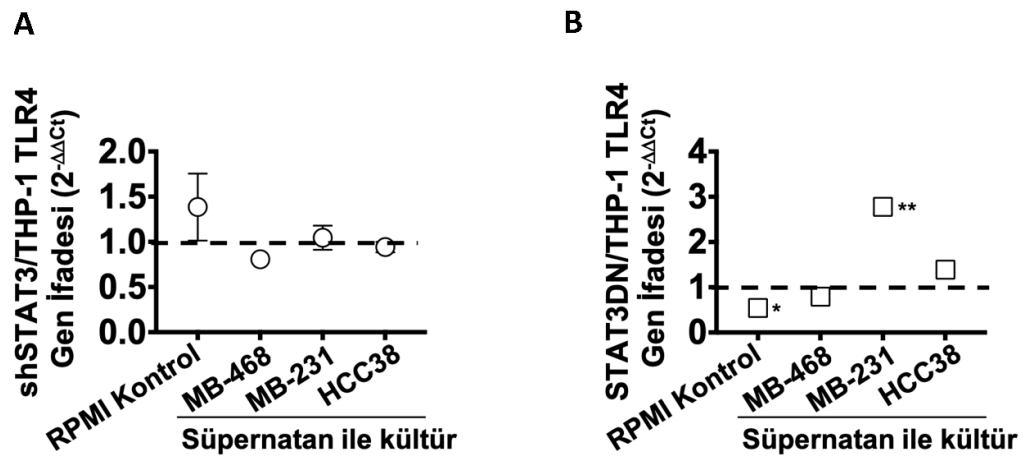


Şekil 4.32. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile uyarılan miyeloid hücrelerde STAT3 inhibisyonunun TLR4 ve MD2 ifadesine etkisi. *Stattic* ile (THP-1 için 5 µM, U937 için 2.5 µM) 45 dk. boyunca inkübasyon sonrasında süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 1.5, 6 ve 24 saat boyunca inkübe edilen A) THP-1 ve B) U937 hücrelerinde STAT3 inhibisyonunun TLR4 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler gerçek-zamanlı RT-PZR ile değerlendirildi (n=3). Analizlerde, *Stattic* içeren koşullardan elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kontrol olarak meme kanseri hücre (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ile inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerden elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ verilere göre normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. C) *Stattic* ile inkübasyon sonrasında süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca kültürü yapılan THP-1 hücrelerinde TLR4 ve MD2 hücre yüzey proteini düzeylerindeki değişimi gösteren temsili akım sitometri histogramları. Boş histogramlar izotipik kontrolleri, dolu histogramlar ise özgül anti-TLR4 veya anti-MD2 antikolar ile yapılan işaretlemeleri göstermektedir. THP-1 hücrelerinde D) TLR4 ve E) MD2 belirteçlerinin izotipik kontrol boyamaları ile elde edilen ortanca floresan yoğunluğu (OFY) verisine göre normalize edilmiş OFY değerleri (n=4-5). (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant; * p<0.05, ** p<0.01)

Stattic ile inkübasyon sonrasında bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 hücrelerinde TLR4 ve MD2 hücre yüzey reseptörlerinin düzeyi analiz edildi. *Stattic* varlığında, özellikle MDA-MB-231 ve HCC38 hücre hattı süpernatantları ile uyarılan THP-1 hücrelerinde, TLR4 düzeyinin anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi (TLR4 OFY, MDA-MB-231 spt., kontrol 11 ± 0.7 ,

Stattic 7.8 ± 0.8 ; HCC38 spt., kontrol 10.5 ± 0.8 , *Stattic* 8.3 ± 0.5) (Şekil 4.32 C, D). MD2 düzeyinde ise anlamlı bir değişimin olmadığı görüldü (Şekil 4.32 C, E).

shSTAT3/THP-1 ve STAT3DN/THP-1 hücrelerinin bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile 24 saat boyunca yapılan kültürler ile doğrulama deneyleri yapılması amaçlandı. shSTAT3/THP-1 hücrelerinde TLR4 gen ifadesi belirgin bir değişime uğramazken STAT3DN/THP-1 hücrelerinde ise kontrol RPMI 1640 ortamında TLR4 gen ifadesinin anlamlı düzeyde azaldığı MDA-MB-231 hücre hattı süpernatantı varlığında ise belirgin şekilde arttığı tespit edildi (Şekil 4.33).

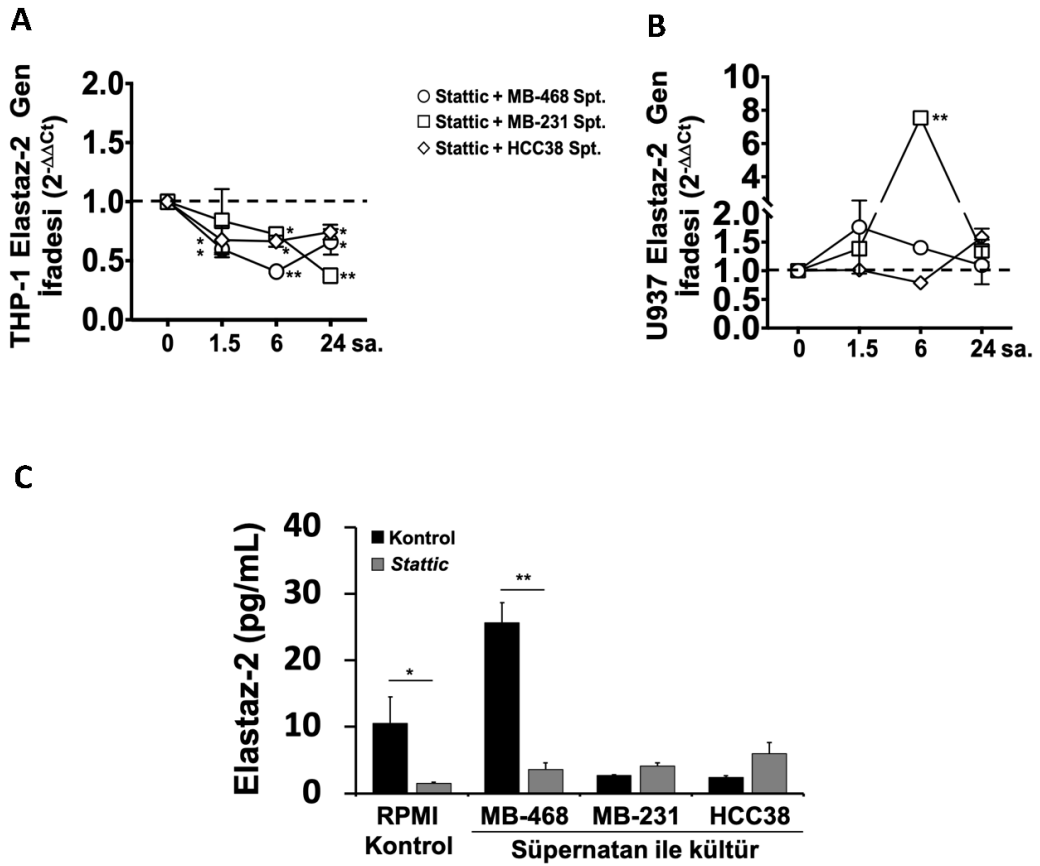


Şekil 4.33. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile inkübe edilen genetik olarak modifiye edilmiş THP-1 hücrelerinde TLR4 gen ifadesindeki değişimler. Süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca inkübe edilen A) shSTAT3/THP-1 ve B) STAT3DN/THP-1 hücrelerinde TLR4 gen ifadesinde meydana gelen değişimler gerçek-zamanlı RT-PZR ile değerlendirildi. Analizlerde shSTAT3/THP-1 ve STAT3DN/THP-1 içeren koşullardan elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kontrol olarak meme kanseri hücre (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ve RPMI 1640 ile inkübe edilen shKontrol/THP-1 veya kontrol GFP/THP-1 hücrelerden elde edilen verilerine göre normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; sh, *short hairpin*; DN, dominant negatif; GFP, *green fluorescent protein*; Spt, süpernatant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; n=3)

4.9.3. STAT3 İnhibisyonunun Miyeloid Hücrelerde Elastaz-2 Üretimine Etkisi

Bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarından salgılanan faktörlerin STAT3 inhibisyonu sırasında THP-1 hücrelerinde elastaz-2 üretimine etkisini test etmek için analizler gerçekleştirildi. *Stattic* ile inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerinin bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ile 1.5, 6 ve 24 saat kültürü yapıldı ve elastaz-2 mRNA düzeyleri analiz edildi. *Stattic* varlığında THP-1 hücrelerinde elastaz-2 mRNA ifadesinin belirlenen tüm zaman periyotlarında azaldığı görüldü (Şekil 4.34 A). U937 hücrelerinde ise belirgin bir değişim görülmemekle birlikte yalnızca MDA-MB-231 hücre süpernatantları varlığında 6. saatte elastaz-2 gen ifadesinde geçici bir artış izlendi (Şekil 4.34 B).

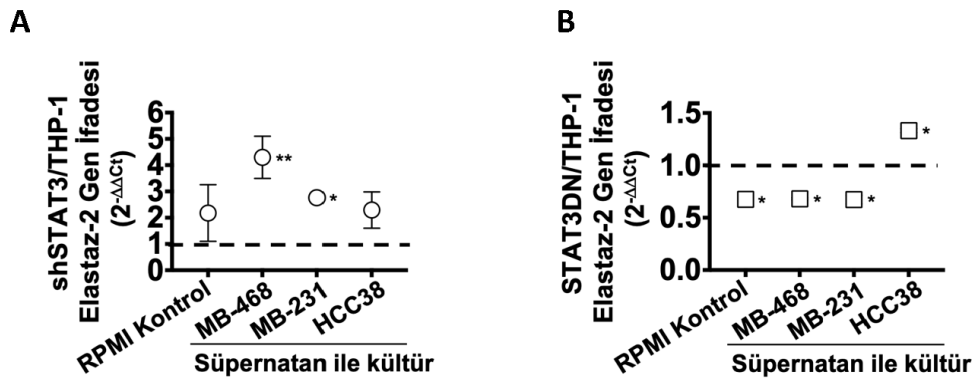
Stattic ile inkübasyon sonrası bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 hücrelerinden süpernatantlar uzaklaştırıldı, tam besiyerinde süspanse hale getirildi. Maksimum salım kapasitesini ortaya çıkarmak amacıyla hücreler PMA/iyonomisin ile kısa süreli (3 saat) uyarıldı ve sonrasında toplanan süpernatantlardaki elastaz-2 düzeyleri analiz edildi. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 hücrelerinden salgılanan elastaz-2 düzeyleri MDA-MB-468 hücre süpernatantı ve kontrol RPMI 1640 ortamında anlamlı düzeyde azaldı. Diğer koşullarda tespit edilen değişimler ise belirgin düzeyde değildi (Şekil 4.34 C).

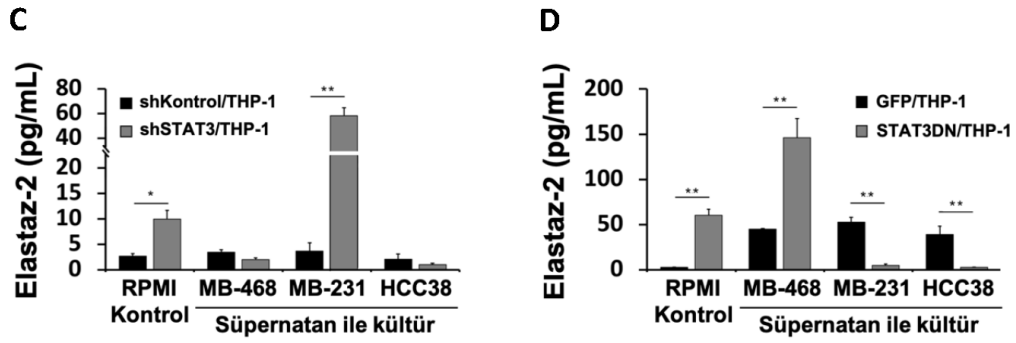


Şekil 4.34. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile uyarılan miyeloid hücrelerde STAT3 inhibisyonunun elastaz-2 gen ifadesine ve salgılanan protein düzeyine etkisi. *Stat3* ile (THP-1 için 5 μ M, U937 için 2.5 μ M) 45 dk. inkübasyon sonrasında süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 1.5, 6 ve 24 saat boyunca inkübe edilen A) THP-1 ve B) U937 hücrelerinde STAT3 inhibisyonunun elastaz-2 gen ifadesinde meydana getirdiği değişimler gerçek-zamanlı RT-PZR ile değerlendirildi. Analizlerde, *Stat3* içeren koşullardan elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kontrol olarak meme kanseri hücre (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ile inkübe edilen THP-1 ve U937 hücrelerden elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ verilere göre normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. C) *Stat3* ile inkübasyon sonrasında süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca kültürü yapılan THP-1 hücreleri tam RPMI besiyerinde PMA (50 ng/mL)/iyonomisin (0.5 μ g/mL) ile 3 saat boyunca uyarıldı ve elastaz-2 düzeyi ELISA yöntemi ile araştırıldı. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; n=3)

shSTAT3/THP-1 hücrelerinde MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 hücre hattı süpernatantlarının elastaz-2 mRNA düzeyini anlamlı olarak artırdığı belirlendi. HCC38 hücre süpernatantı ve kontrol olarak RPMI 1640 kültür ortamı ile inkübe edilen hücrelerde elastaz-2 gen ifadesi artış yönünde değişmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadı (Şekil 4.35 A). STAT3DN/THP-1 hücrelerinde MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 hücre süpernatantlarının ve kontrol RPMI 1640 kültür ortamının elastaz-2 mRNA düzeyini anlamlı olarak azalttığı HCC38 hücre süpernatantları varlığında ise artırdığı belirlendi. Ancak bu değişimlerin elastaz-2 üretimine belirgin düzeyde etki etmediği görüldü (Şekil 4.35 B).

Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile inkübe edilen shKontrol/THP-1, shSTAT3/THP-1, kontrol GFP/THP-1 ve STAT3DN/THP-1 hücrelerinden süpernatantlar uzaklaştırıldı. Daha sonra bu hücrelerin tam besiyerinde kültürü yapıldı ve elde edilen süpernatantlarda elastaz-2 düzeyleri analiz edildi. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının shKontrol/THP-1 hücrelerinde elastaz-2 salgı düzeylerini etkilemediği kontrol GFP/THP-1 hücrelerinde ise arttırdığı görüldü (Şekil 4.35 C, D). shSTAT3/THP-1 hücrelerinin MDA-MB-231 hücre süpernatantı ve kontrol RPMI 1640 ile yapılan kültürlerinde bu enzimin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (Şekil 4.35 C). STAT3DN/THP-1 hücrelerinde ise MDA-MB-468 hücre süpernatantlarının elastaz-2 protein düzeylerini belirgin şekilde artırdığı tespit edildi. Benzer bir artış kontrol RPMI 1640 kültürlerinde de gözlemlendi. Diğer taraftan, MDA-MB-231 ve HCC38 hücre süpernatantlarının STAT3DN/THP-1 hücrelerinde elastaz-2 enzimini minimal düzeye indirdiği belirlendi (Şekil 4.35 C).





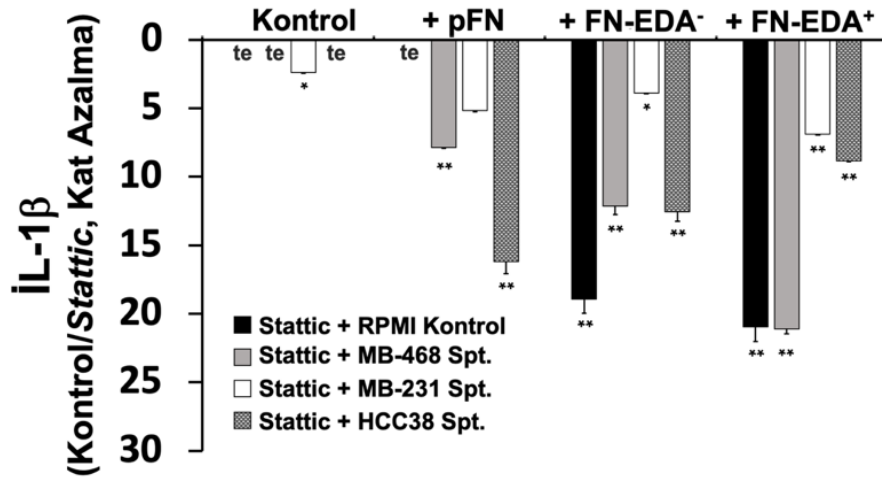
Şekil 4.35. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile inkübe edilen genetik olarak modifiye edilmiş THP-1 hücrelerinde elastaz-2 gen ifadesindeki ve serbestlenen protein düzeyindeki değişimler. Süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca inkübe edilen A) shSTAT3/THP-1 ve B) STAT3DN/THP-1 hücrelerinde elastaz-2 gen ifadesinde meydana gelen değişimler gerçek-zamanlı RT-PZR ile değerlendirildi. Analizlerde shSTAT3/THP-1 ve STAT3DN/THP-1 içeren koşullardan elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kontrol olarak meme kanseri hücre (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ve RPMI 1640 ile inkübe edilen shKontrol/THP-1 veya kontrol GFP/THP-1 hücrelerden elde edilen verilerine göre normalize edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ değerinden geçen kesikli çizgi kontrol hücreleri ile eşit düzeyde gen ifadesine işaret etmektedir. Süpernatantlar ile 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca inkübe edilen C) shKontrol/THP-1, shSTAT3/THP-1 ve D) kontrol GFP/THP-1, STAT3DN/THP-1 hücrelerinden süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra tam RPMI besiyerinde 24 saat inkübasyon sonrası serbestlenen elastaz-2 düzeyleri ELISA yöntemi ile analiz edildi. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; sh, *short hairpin*; DN, dominant negatif; GFP, *green fluorescent protein*; Spt, süpernatant; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 3$)

4.10. STAT3 İnhibisyonunun Rekombinant Fibronektin Proteinleri Varlığında Monositlerde İL-1 β Üretimine Etkisi

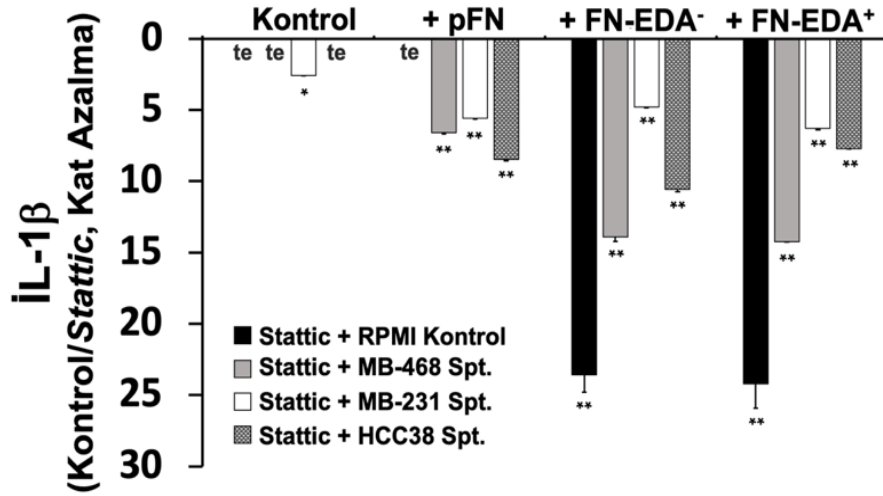
Stattic ile muamele edilen periferik kan monositleri rekombinant fibronektin proteinleri (pFN, FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺) varlığında bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ve RPMI 1640 kültür ortamı ile inkübe edildi. Kontrol olarak rekombinant fibronektin proteinlerini içermeyen koşullar kullanıldı. Bu monositlerde İL-1 β salgılanma düzeyindeki değişimler incelendi. Bazal-benzeri

meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile özellikle FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺ proteinleri varlığında, artış gösteren İL-1 β düzeyinin STAT3 inhibisyonu ile belirgin şekilde azaldığı tespit edildi. RPMI 1640 besiyeri ile kültürü yapılan monositlerde FN-EDA⁺ ve FN-EDA⁻ rekombinant fibronektin proteinleri sırasıyla 51.3 ± 2.7 ve 14.4 ± 1.5 pg/mL İL-1 β salgılanmasını sağlamaktaydı (Bkz. Bölüm 4.7, Şekil 4.27 A). STAT3 inhibisyonu ise İL-1 β üretiminin yaklaşık 20 kat azalmasına neden oldu (Şekil 4.36 A). HCC38 hücre süpernatantı ile FN-EDA⁺ rekombinant proteinini içeren koşul monositlerden İL-1 β salgılanmasının en fazla olduğu koşul idi (317.5 ± 0.2 pg/mL) (Bkz. Bölüm 4.7, Şekil 4.27 A). STAT3'ün inhibe edildiği koşullarda monositlerden salgılanan İL-1 β düzeyleri yaklaşık olarak 10 kat azaldı. Benzer şekilde, FN-EDA⁺ içeren diğer bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan monositlerde de STAT3 inhibisyonu İL-1 β düzeylerinde belirgin şekilde azalmaya neden oldu (FN-EDA⁺, MDA-MB-468 spt. ile ~ 20 kat azalma, MDA-MB-231 spt. ile ~ 7 kat azalma) (Şekil 4.36 A).

A



B



Şekil 4.36. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ve/veya rekombinant FN (pFN, FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺, 15 µg/mL) proteinleri ile inkübe edilen monositlerde STAT3 inhibisyonunun İL-1β salımına etkisi. *Stattic* (5 µM) ile 45 dk. inkübasyon sonrasında süpernatantlar ve/veya rekombinant FN proteinleri ile 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca kültürü yapılan monositlerden süpernatantlar uzaklaştırıldı. Daha sonra RPMI besiyerinde inkübe edildi ve toplanan süpernatantlarda İL-1β düzeyleri ELISA ile analiz edildi. A) Ortama serbestlenen İL-1β ve B) PMA (50 ng/mL)/iyonomisin (0.5 µg/mL) (1.5 sa.) ile ortama serbestlenme kapasitesi artırılmış İL-1β düzeyleri. Bar grafiklerindeki değerler *Stattic* içermeyen koşullara göre İL-1β salgılanma düzeylerindeki değişimleri göstermektedir. İstatistiksel analizlerde *Stattic* içeren koşulların verileri kontrol olarak *Stattic* içermeyen koşullarda meme kanseri hücre (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ve/veya rekombinant FN proteinleri ile inkübe edilen monositlerden elde edilen veriler ile karşılaştırıldı. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; te, tespit edilemedi; Spt, süpernatant; * p<0.05, ** p<0.01; n=3)

Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları varlığında FN-EDA⁻ ile kültürü yapılan monositlerde İL-1β salgılanmasını en fazla artıran koşul da HCC38 hücre hattı süpernatantı içeren koşul idi (215.9±8.2 pg/mL) (Bkz. Bölüm 4.7, Şekil 4.27 A). Bu koşulda monositlerde STAT3 inhibisyonu İL-1β üretimini yaklaşık olarak 12 kat azalttı. FN-EDA⁻ içeren koşullarda STAT3 inhibisyonu sonrası diğer

bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan monositlerde de belirgin şekilde azalma (FN-EDA⁻, MDA-MB-468 spt. ile ~ 12 kat azalma, MDA-MB-231 spt. ile ~ 4 kat azalma) gözlemlendi (Şekil 4.36 A).

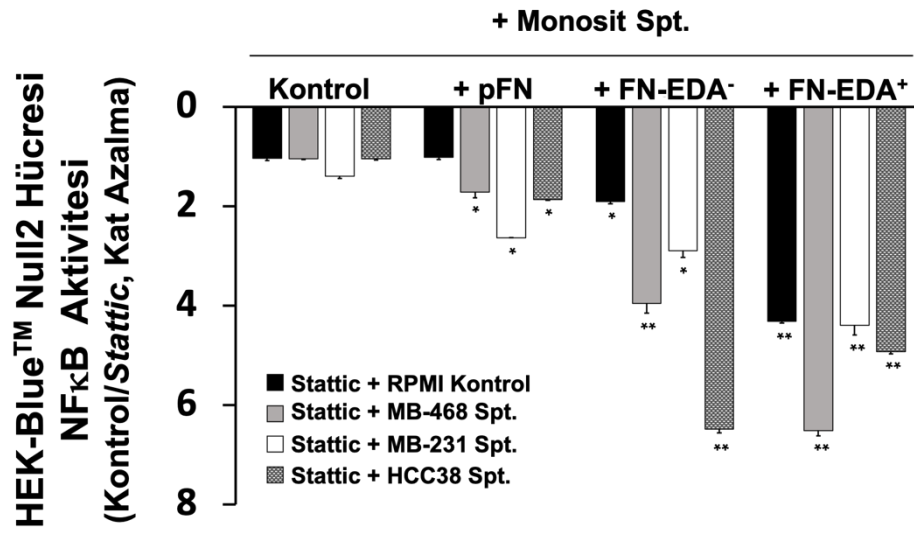
Plazma FN'nin, MDA-MB-231 hücre süpernatantı içeren koşulda monositlerde İL-1 β üretimini diğer bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantlarına göre daha fazla desteklemekte idi (126.4 ± 7.8 pg/mL) (Bkz. Bölüm 4.7, Şekil 4.27 A). Monositlerde STAT3 inhibisyonu sonrası pFN ve MDA-MB-231 hücre süpernatantı içeren koşulda İL-1 β salgılanma düzeyi yaklaşık olarak 5 kat azalmıştır (Şekil 4.36 A). İL-1 β salgılanma düzeyindeki azalmalar pFN ve diğer meme kanseri hücre süpernatantlarını içeren koşullarda daha fazla idi (pFN, MDA-MB-468 spt. ile ~ 8 kat azalma, HCC38 spt. ile ~ 16 kat azalma).

Rekombinant fibronektin proteini içermeyen koşullarda monositlerden İL-1 β üretimini en fazla MDA-MB-231 hücre süpernatantları desteklemekte idi (65 ± 3.2 pg/mL) (Bkz. Bölüm 4.7, Şekil 4.27 A). Bu koşulda STAT3 inhibisyonu ile İL-1 β salgılanmasının yaklaşık olarak 3 kat azaldığı belirlendi (Şekil 4.36 A). Diğer bazal-benzeri meme kanseri hücre hatları ve RPMI 1640 kültür ortamının rekombinant fibronektin proteinlerinin yokluğunda İL-1 β üretimine etki etmediğini belirlemiştik (Bkz. Bölüm 4.7, Şekil 4.27 A). STAT3 inhibisyonunun bu kontrol koşullarında İL-1 β üretimine etki etmediği görüldü (Şekil 4.36 A)

STAT3 inhibisyonunun, rekombinant fibronektin proteinleri varlığında bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile kültürü yapılan monositlerdeki maksimum İL-1 β salım kapasitesine etkisini gözlemlemek için bu hücreler PMA ve iyonomisin ile 1.5 saat boyunca uyarıldı. Bu koşullar altında da *Stattic* varlığında İL-1 β üretiminin monositlerde belirgin şekilde azaldığı doğrulandı (Şekil 4.36 B).

4.11. Rekombinant Fibronektin Proteinleri Varlığında Monositlerde STAT3 İnhibisyonunun NF-κB Aktivitesi Üzerine Etkisi

Stattic ile inkübe edilen monositlerin bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ve/veya rekombinant fibronektin proteinleri ile kültürü yapıldı. Bu kültür koşullarından elde edilen süpernatantların HEK-Blue™ Null2 hücrelerinde NF-κB yolağını uyarma kapasitesi değerlendirildi. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile özellikle FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺ varlığında kültürü yapılan monositlerden elde edilen süpernatantların NF-κB aktivitesini belirgin şekilde uyardığını göstermiştik (Bkz. Bölüm 4.7, Şekil 4.25 B). Aynı koşullarda, bu kez STAT3 yolağı inhibe edilen monositlerden elde edilen süpernatantların HEK-Blue™ Null2 hücrelerinde NF-κB aktivitesini etkili bir şekilde azalttığı belirlendi (FN-EDA⁻, RPMI kontrol ile ~ 2 kat azalma, MDA-MB-468 spt. ile ~ 4 kat azalma, MDA-MB-231 spt. ile ~ 3 kat azalma, HCC38 spt. ile ~ 6.5 kat azalma; FN-EDA⁺, RPMI kontrol ile ~ 4.5 kat azalma, MDA-MB-468 spt. ile ~ 6.5 kat azalma, MDA-MB-231 spt. ile ~ 4.5 kat azalma, HCC38 spt. ile ~ 5 kat azalma) (Şekil 4.37). *Stattic* varlığında, kontrol ve pFN içeren koşullardan elde edilen süpernatantlar da NF-κB aktivitesinde azalmaya yol açsa da bu azalma oranları FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺ rekombinant proteinleri içeren koşullardaki gibi etkin olmamıştır (Şekil 4.37). Bu durum bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ve rekombinant FN-EDA proteinleri varlığında monositler tarafından üretilen faktörlerin NF-κB aktivitesini uyarma kapasitesinin STAT3 inhibe edildiğinde azaldığını göstermektedir.



Şekil 4.37. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ve/veya rekombinant FN (pFN, FN-EDA⁻ ve FN-EDA⁺, 15 µg/mL) proteinleri ile inkübe edilen monositlerde STAT3 inhibisyonunun NF-κB aktivitesi üzerine etkisi. *Stattic* (5 µM) ile 45 dk. inkübasyon sonrasında süpernatantlar ve/veya rekombinant FN proteinleri ile 5x10⁵ hücre/mL olacak şekilde 24 saat boyunca kültürü yapılan monositlerden elde edilen süpernatantların NF-κB aktivitesi etkisi bildirici deneyler ile analiz edildi. Bar grafiklerindeki değerler *Stattic* içermeyen koşullara göre NF-κB aktivitesindeki değişimleri göstermektedir. İstatistiksel analizlerde *Stattic* içeren koşulların verileri kontrol olarak *Stattic* içermeyen koşullarda meme kanseri hücre (MDA-MB-468, MDA-MB-231 ve HCC38) süpernatantları ve/veya rekombinant FN proteinleri ile inkübe edilen monositlerden elde edilen veriler ile karşılaştırıldı. (MB-468, MDA-MB-468; MB-231, MDA-MB-231; Spt, süpernatant; * p<0.05, ** p<0.01; n=3)

5. TARTIŞMA

Bazal-benzeri meme kanseri, diğer meme kanseri alt-tiplerine kıyasla, immün uyarıcı ve/veya inflamasyonu destekleyici bir karaktere sahiptir (182). Bu durum hem miyeloid hücre hem de T lenfositler tarafından belirgin düzeyde infiltrasyon göstermeleri ile uyumludur (183). Tümör dokusunda bulunan hücre-dışı matriks bileşenleri, özellikle fibronektin, miyeloid hücrelerin dokuya yerleşimine ve farklılaşmasına katkıda bulunur (5). Tümördeki makrofajlar STAT3 transkripsiyon faktörünün katkısı ile immün baskılayıcı karakter kazanır (6). Yüksek STAT3 aktivitesine sahip tümör-ilişkili makrofajlar, inflamatuvar sitokinler üreterek mikroçevrenin oluşumuna ve tümör gelişimine katkı sağlar (7). Bunun yanı sıra, tümör mikroçevresinde proteolitik aktiviteye sahip elastaz-2 gibi enzimlerin varlığı bilinmektedir. Bu enzimler fibronektini özgül bölgelerden keserek EDA bölgesi gibi kriptik kısımların ortaya çıkmasını sağladığı ve bunların miyeloid hücreleri TLR4 reseptörleri üzerinden uyurabildiği savunulmaktadır (8).

Bu tez çalışmasında, meme kanseri hücrelerinden üretilen fibronektinin miyeloid hücre karakteri üzerine etkisi araştırılmıştır. Yüksek STAT3 aktivitesine sahip miyeloid hücrelerden üretilen İL-1 β 'nin bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinde fibronektin üretimine etkisinin ve miyeloid hücrelerden üretilen elastaz-2 aktivitesiyle oluşan FN-EDA parçalarının TLR4 aracılı olarak İL-1 β üretimine etkisinin araştırılması bu çalışmanın temel amaçları arasındadır. Elde ettiğimiz bulgulara göre;

- Bazal-benzeri meme kanseri hücreleri immatür miyeloid hücrelerde fenotipik olarak monositik karakteri destekledi.
- Bazal-benzeri meme kanseri hücreleri miyeloid hücre hatlarının CD4⁺ T hücre proliferasyonunu uyarma kapasitesini azaltırken, primer monositlerde tersi bir durum gözlemlendi.
- Bazal-benzeri meme kanseri hücreleri miyeloid hücrelerde kemotaksis kapasitesini artırır. Reaktif oksijen türlerinin üretim düzeyleri meme kanseri hücrelerinin etkisiyle miyeloid hücre hatlarında artarken monositlerde değişmedi.

- Bazal-benzeri meme kanseri hücreleri miyeloid hücrelerde STAT3 aktivitesini ve İL-1 β salımını artırdı.
- Bazal-benzeri meme kanseri hücreleri miyeloid hücre hatlarında elastaz-2 salımını azalttı monositlerde ise artırdı.
- Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinde fibronektin ve FN-EDA düzeyleri yüksek idi. İL-1 β , fibronektin ve FN-EDA düzeylerini artırdı.
- Rekombinant FN-EDA'nın TLR4 aracılığı ile NF- κ B aktivitesini uyardığı belirlendi.
- FN-EDA varlığında monositlerden ve bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörler TLR4'ten bağımsız olarak NF- κ B aktivitesini artırdı. STAT3 inhibisyonu ise NF- κ B aktivitesini azalttı.
- Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörler ve FN-EDA monositlerde İL-1 β salımını artırdı. STAT3 inhibisyonu ile İL-1 β salımı azaldı. Farklı aşamalarda (*Stattic*, shSTAT3, STAT3DN) inhibe edilen STAT3 aktivasyonunun İL-1 β , TLR4 ve elastaz-2 üzerine etkilerinin farklı olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, FN-EDA salımı yapan meme kanseri hücrelerinin inflamatuvar süreçleri daha ileri bir aşamaya taşıyabileceği ve bunun STAT3 – İL-1 β – fibronektin arasında gerçekleşen pozitif geri-bildirim mekanizması ile desteklenebileceğine dair özgün veriler elde edilmiştir.

5.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan *in vitro* Deney Modellerinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada akut miyeloid lösemi hücre hatları (KG-1, HL-60, THP-1 ve U937) immatür miyeloid hücre modeli olarak kullanılırken, sağlıklı bireylerden elde edilen periferik kan monositleri ise elde edilen verileri doğrulama amacıyla kullanıldı. Miyeloid hücre hatları ve primer monositler ile yapılan bazı analizlerde birtakım uyumsuzluklar olabileceği görülmüştür. Bu kısımda, literatürde sıklıkla monosit modeli olarak kullanılan miyeloid hücre hatları ve primer monositler arasındaki farkların çalışma sonuçlarına nasıl yansımış olabileceği tartışılmıştır.

Canlı organizmadan taze olarak izole edilmiş (*ex vivo*) hücreler kaynaklandıkları mikroçevreyi ve organizmanın *in vivo* durumunu daha iyi temsil etseler de donörler arasındaki çeşitlilik periferik kan monositleri ile yapılan analizlerin yorumlanmasını karmaşık hale getirir. Bu nedenle, kanser hücrelerinden köken alan miyeloid hücre hatları, hücresel fonksiyonların, mekanizmaların ve yanıtların çalışılmasında önemli *in vitro* sistemler olarak rol oynar. Hücre hatları çoğalma kapasitelerinin yüksek olması, homojen genetik ve epigenetik özellikler taşımaları ve sonuçların tekrarlanabilirliği açısından periferik kan monositlerine göre bazı avantajlara sahiptir. Diğer yandan, monositlerin eldesi sınırlı düzeydedir ve canlılığını sürdürmek için inflamatuvar moleküllere (LPS, TNF- α ve İL-1 β) ihtiyaç duyabilir (184). Bu avantajlara rağmen, hücre hatları malign yapısından dolayı kansere özgü genlerin ve proteinlerin aktivitesi sonucu doğal mikroçevredeki eşdeğerlerine göre farklı özellikler ve fonksiyonlar gösterebilir (185).

Akut miyeloid lösemi hücre hatları hastalıkların gelişiminde immün hücrelerin rolünü araştırmak için periferik kan monositlerinin ve makrofajların yerine model olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Farklı olgunlaşma düzeyinde bulunan bu hücre hatları tümör hücreleri tarafından üretilen moleküller ile veya bazı ajanlar (örneğin; LPS, PMA, DMSO, vitamin D3, retinoik asit ve kalsiyum iyonoforları) aracılığı ile daha olgun hale getirilebilir veya farklılaşabilirler (186-188).

Literatürde yer alan çalışmalarda CD11b, CD11c ve CD14 belirteçleri miyeloid hücre hatlarında düşük düzeyde bulunurken monositlerde yüksek düzeyde ifade edilir. Miyeloid hücre hatlarının olgunlaşması ile beraber bu belirteçlerin düzeyinde artış meydana gelir. Böylece monosit benzeri fenotip kazanabilir (189, 190). Ayrıca, kanser hücreleri miyeloid hücre hatlarının ve monositlerin olgunlaşmasına ve farklılaşmasına etki ederek makrofaj benzeri karakter kazanmasını sağlayabilir. Kolon kanseri hücre süpernatantlarının THP-1 hücrelerinde düşük düzeyde bulunan CD11b ve CD40 belirteçlerinin düzeylerini artırdığı bildirilmiştir (191). Pankreas kanseri ve küçük hücreli-dışı akciğer kanseri hücre süpernatantlarının monositlerde CD14 düzeylerini artırdığı belirtilmiştir (192, 193). Diğer yandan, meme kanseri hücre hatlarının miyeloid hücrelerin monosit/makrofaj benzeri fenotip kazanmasını

sağladığı gösterilmiş (194-196). Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinin lüminal hücrelere göre daha etkili bir şekilde bu fenotipi uyardığı belirtilmiştir (4). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, literatürle uyumlu şekilde CD11b, CD11c ve CD14'ün miyeloid hücre hatlarında düşük düzeyde monositlerde ise yüksek düzeyde olduğu görüldü. Miyeloid hücre hatlarının meme kanseri hücre hatları ile yapılan ko-kültürlerinde veya meme kanseri hücre süpernatantları ile yapılan kültürlerinde bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinin THP-1 hücrelerinde monositik hücre belirteçleri olan CD11b, CD11c, CD14 ve CD40 düzeylerini hem kontrole hem de lüminal meme kanseri hücre hattı ile yapılan kültürlerle göre belirgin şekilde artırdığını gözlemledik. Bu sonuçlar, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin THP-1 hücrelerinin olgunlaşmasında lüminal hücrelere göre daha etkili olduğunu ortaya koymuştur. THP-1 hücrelerinde monositik belirteçlerde meydana gelen artışların literatür ile tutarlı olduğu görüldü. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisiyle THP-1 hücrelerinde artan CD14 düzeylerinin monositlerdeki bazal CD14 düzeyleri ile eşdeğerde olduğu gözlemlendi. Bu durum, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin THP-1 hücrelerinin monosit benzeri fenotipe olgunlaşmasında etkili olabileceğini göstermektedir. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisiyle monositlerdeki CD14 düzeylerinin daha fazla artması da literatür ile uyumludur.

THP-1 hücrelerinde düşük düzeyde bulunan CD11b bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisiyle artmasına rağmen monositlerdeki bazal protein ifade düzeyine erişememiştir. Monositlerde CD11b düzeylerinin tüm meme kanseri hücre süpernatantları ile yapılan kültürlerde değişim göstermemesi monositlerde halihazırda yüksek düzeyde bulunan CD11b belirtecinin bu süpernatantların etkisiyle daha fazla artamayacağını düşündürmektedir. Bazal-benzeri meme kanseri süpernatantlarının etkisiyle olgunlaşan THP-1 hücrelerinde CD11c düzeyleri artmasına rağmen monositlerde bu belirtecin düzeyleri ilginç bir şekilde azalmıştır. Literatürde yer alan çalışmalarda farklılaşma ile beraber CD11c düzeylerinin artacağı veya yüksek düzeyde olduğu için değişime uğramayacağı belirtilmesine rağmen bu çalışmada monositlerdeki CD11c

düzeylerinin azalması tutarlılık göstermemektedir. Literatürle uyumlu olarak bu çalışmada da CD40 düzeylerinin hem miyeloid hücre hatlarında hem de monositlerde düşük düzeyde olduğunu gözlemledik. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında THP-1 hücrelerinde CD40 düzeyleri kontrole ve lüminal meme kanseri hücre süpernatantlarına göre artmasına rağmen monositlerde meme kanseri hücre hattına özgü olarak değişim gösterdiği belirlendi. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları monositlerde CD40 düzeylerini MCF-7 hücre süpernatantlarına göre artırırken BT-474 hücre süpernatantlarına göre azalttı. Bu sonuçlara göre, THP-1 hücreleri CD11c ve CD40 açısından meme kanseri çalışmalarında her zaman uygun bir monosit modeli olmayabilir.

U937 hücreleri ile yapılan analizlerde ise bazal-benzeri meme kanseri hücreleri varlığında CD11b ve CD11c düzeylerini kontrol ve lüminal meme kanseri hücre hatlarıyla yapılan kültürlerle göre artarken CD40 hem bazal-benzeri hem de lüminal meme kanseri hücre hattı süpernatantları varlığında arttı. CD14 düzeylerinde belirgin bir değişim gözlenmedi. U937 hücrelerinin bazal-benzeri meme kanseri hücre hattının etkisiyle daha olgun bir fenotipe farklılaşmasının uyarılabileceğini göstermiştir. Ancak, bu olgunlaşma düzeyinin THP-1 hücrelerindeki gibi etkili bir şekilde gerçekleşmediği gözlemlendi. Bu nedenle, U937 hücrelerinin bu çalışma için THP-1 hücreleri kadar uygun bir model olmadığı görüldü.

KG-1 gibi miyeloblastik hücre hatlarında yüksek düzeyde ifade edilen CD34 hücre yüzey belirtecinin ifadesi olgunlaşma ile beraber azalır (186, 197). CD34'ün yanı sıra bu hücrelerde T lenfositlere antijen sunumunda rol oynayan HLA-DR düzeyleri de yüksektir (197). Bu çalışmada, KG-1 hücresinde CD34 ve HLA-DR düzeylerinin yüksek olduğunu gördük. Lüminal (MCF-7) ve bazal-benzeri (MDA-MB-231) meme kanseri hücre hattı ile yapılan ko-kültürlerde CD34 düzeylerinde azalmalar gerçekleşse de bu azalmaların anlamlı olmadığı görüldü. HLA-DR belirtecinin ise bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı ile yapılan ko-kültürlerde arttığı gözlemlendi. Ancak bu artışın anlamlı düzeye ulaşmadığı belirlendi. Meme kanseri hücre hatları ile yapılan ko-kültürlerde KG-1 hücrelerinde dendritik hücre veya makrofaj belirteçlerinde belirgin bir değişim saptanmadı.

Bu sonuçlar, özellikle bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinin KG-1 hücrelerinin olgunlaşmasını uyarma potansiyeline sahip olabileceğini ancak, bu olgunlaşmanın ileri düzeyde gerçekleşemeyeceğini göstermektedir. HL-60 hücrelerinde ise yüzey belirteçlerinde belirgin bir değişim gözlenmedi. Bu durum, meme kanseri hücrelerinin HL-60 hücrelerinin herhangi bir miyeloid hücre fenotipine farklılaşmasında etkili olmadığını göstermiştir. KG-1 ve HL-60 hücrelerinin THP-1 ve U937 hücre hatlarına göre daha erken olgunlaşma düzeyinde bulunması ve olgun bir miyeloid hücreye farklılaşması için gen ve protein yapısında çok fazla değişiklik gerektirdiği şekilde açıklanabilir.

Kandan dokuya göç eden monositler makrofajlara farklılaşır. İnflamatuvar mikroçevreden gelen uyarılar makrofajların pro-inflamatuvar veya anti-inflamatuvar karakter kazanmasını sağlar. Pro-inflamatuvar makrofajlar mikroçevreden topladıkları antijenleri CD4⁺ T hücrelere sunarak onları aktive eder ve çoğalmalarını destekler; anti-inflamatuvar özellikteki makrofajlar ise CD4⁺ T hücrelerin çoğalmasını engeller veya baskılayıcı hücrelere dönüşmesine neden olurlar (83, 75). Bu tez çalışmasında, meme kanseri hücre süpernatantları ile inkübe edilen miyeloid hücrelerin CD4⁺ T hücre çoğalmasını uyarma kapasiteleri de fonksiyonel farklılaşmayı belirlemek amacıyla değerlendirildi. Bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 ve U937 hücrelerinin kontrole ve lüminal meme kanseri hücre süpernatantları ile uyarılan miyeloid hücre hatlarına göre CD4⁺ T hücrelerin çoğalmasını uyarma kapasitesini azalttığı belirlendi. Diğer taraftan, monositlerin ise lüminal meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisiyle CD4⁺ T hücre çoğalmasını azalttığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, monositler ve miyeloid hücre hatlarının CD4⁺ T hücre üzerindeki etkilerinin farklı olduğunu göstermektedir. Miyeloid hücre hatları meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörler aracılığı ile önce monosit sonrasında makrofaj-benzeri hücrelere farklılaşmaya çalışırken, monositler daha olgun hücreler olup bu faktörler aracılığı ile doğrudan makrofajlara farklılaşma sürecine girer. Farklı olgunlaşma aşamalarında olan bu hücreler meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin etkisiyle CD4⁺ T hücreler üzerinde farklı etkilere sahip olabilir. Ayrıca, miyeloid hücre hatlarının da

bir kanser hücresinden köken alması doğal mikroçevredeki eşdeğerlerine göre farklı davranışlar sergilemesine yol açabilir. Gerçekleştirdiğimiz fenotipik analizlerde ko-stimülator etkiye sahip CD40 belirtecinin bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında THP-1 ve U937 hücrelerinde arttığı monositlerde ise azaldığı gözlenmesine rağmen bu miyeloid hücre hatlarının ve monositlerin CD4⁺ T hücrelerin çoğalmasını uyarma kapasitelerine etkilerinin farklı olması CD40 belirtecinin bu süreçte etkin bir rol oynamadığını göstermektedir. Bu nedenle, meme kanseri hücre süpernatantları ile kültürü yapılan miyeloid hücre hatlarında ve monositlerde ko-stimülator ve ko-inhibitör moleküllerin ifade düzeylerinin incelenmesi ve miyeloid hücreler ile ko-kültürü yapılan CD4⁺ T hücrelerinin hangi T hücre alt-tipine (Th1, Th2, Treg) farklılaştığının belirlenmesi CD4⁺ T hücreler üzerindeki farklı etkilerin anlaşılmasına ışık tutacaktır.

Monositlerin en önemli özelliklerinden biri inflamatuvar moleküllere yanıt olarak inflamasyon bölgesine göç edebilmesidir. Kanser hücreleri tarafından üretilen kemoatraktan maddeler dolaşımdaki monositleri tümör mikroçevresine çekerek bu hücrelerin immün baskılayıcı fenotipe dönüştürmektedir (24). Literatürde yer alan çalışmalarda THP-1 hücre hattı ve monositlerin farklılaşmalarına yanıt olarak kemotaksis kapasitelerinin arttığı belirtilmiştir. U937 hücrelerinin ise kemotaksis kapasitelerinin zayıf olduğu gösterilmiştir. Monositler ve THP-1 hücreleri çok sayıda kemoatraktan madde içeren FBS'e daha iyi yanıt vermektedir (189). Bazal-benzeri meme kanseri, akciğer, prostat ve pankreas kanser hücrelerinden salgılanan faktörlerin monositlerin kemotaksis kapasitesini artırdığı belirtilmiştir (193). Ayrıca, bazal-benzeri meme kanseri hücre hatları ile ko-kültürü yapılan THP-1 ve U937 hücrelerinin lüminal meme kanseri hücre hatları ile yapılan ko-kültürlere göre kemotaksisi daha fazla artırdığı gösterilmiştir (4, 196). Bu tez çalışmasında, literatür ile uyumlu şekilde, THP-1 hücrelerinde bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisiyle kemotaksis kapasitesinin arttığı lüminal hücre süpernatantlarının etkisiyle ise azaldığı belirlendi. Monositlerde ise kemotaksis kapasitesinin hem lüminal hem de bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile arttığı belirlendi. Bu durum, bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları

varlığında THP-1 hücrelerinin, inflamatuvar hücre göçünde monositlere yakın bir hücre modeli olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) düzeyi monosit/makrofaj olgunlaşması ve farklılaşması sonucu artar. Özellikle M1 makrofajların yüksek düzeyde ROT ürettiği belirtilmiştir (195, 198). Diğer taraftan, ROT tümör mikroçevresinde immün baskılama ve makrofaj farklılaşması gibi fonksiyonları sayesinde tümör gelişimine katkı sağlar (199, 200). Kolon kanseri hücre süpernatantları ile inkübasyon sonrası THP-1 hücrelerinde ROT düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (191). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, lüminal ve bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının hem THP-1 hem de U937 hücrelerinde ROT üretimi artırdığı belirlendi. Bu artış monositlerin bazal ROT üretme düzeyine eş değerdir. Monositlerde ise meme kanseri hücre süpernatantları ile inkübasyon sonrası ROT üretiminde bir değişim olmadı. Bu sonuçlar, meme kanseri hücre süpernatantları ile kültürü yapılan miyeloid hücre hatlarının ROT üretimi açısından monositler ile aynı düzeye ulaşabildiğini ve tümör mikroçevresinde ROT üretimini artırarak oksidatif stresi indükleyebileceğini göstermektedir.

Fagositoz, makrofajların temel fonksiyonel özelliklerinden birisidir. Doku makrofajları, doku homeostazını sağlamak için fagositoz ile apoptotik hücreleri yok ederler. Bu olay sırasında pro-inflamatuvar sitokin üretimi baskılanıp anti-inflamatuvar efektörlerin üretimi desteklendiğinden fagositoz kapasitesi yüksek makrofajlar genellikle M2 fenotipi olarak değerlendirilir. MRC1 ve CD14 apoptotik hücrelerin fagositozuna aracılık eder (201). Primer monositlerin fagositoz kapasitesi THP-1 ve U937 hücrelerine göre yüksektir. Fagositoz kapasitesinin anti-inflamatuvar karaktere sahip primer monositlerde arttığı belirtilmiştir (202). Bu çalışmada da monositlerin fagositoz kapasitesinin THP-1 ve U937 hücrelerine göre daha fazla olduğunu gözlemlendi. Meme kanseri hücre süpernatantlarının THP-1 ve U937 hücre hatlarında ve periferik kan monositlerinde fagositoz aktivitesini etkilemediği görüldü. THP-1 hücresi ve monositlerde bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin etkisiyle CD14 düzeyleri artsa da bunun fagositoz aktivitesine etki etmediği görüldü. Bu durum, meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin

miyeloid hücre hatları ve monositlerin tam olarak makrofajlara farklılaşmasını sağlayamadığı için yeterli fagositoz aktivitesi sahip olmadığı şeklinde yorumlandı.

TLR4, miyeloid farklılaşma faktörü (MD)-2 ve CD14 proteinleri ile kompleks oluşturarak fonksiyonel hale gelir (108). NF- κ B, TLR4 kompleksi tarafından uyarılan başlıca transkripsiyon faktörüdür ve tümör mikroçevresinde tümör gelişimini destekleyen pro-inflamatuvar moleküllerin üretilmesini sağlar (79). Bu tez çalışmasında, bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 hücrelerinde TLR4 gen ifadesinde belirgin bir değişim gözlenmezken U937 hücrelerinde MDA-MB-231 hücre süpernatantı etkisiyle arttığı, diğer bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında ise azaldığı görüldü. TLR4 protein ifadesinin THP-1 hücrelerinde ve monositlerde benzer düzeyde olduğu görüldü. Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin etkisiyle THP-1 hücrelerinde TLR4 düzeyleri değişmezken monositlerde azaldığı belirlendi. Bu durumun hücrelerin olgunlaşma aşamaları ile ilgili olduğu düşünülmüştür. THP-1 hücreleri monosit-benzeri fenotipe olgunlaşması sırasında TLR4 düzeylerini korurken monositlerin makrofaj benzeri fenotipe farklılaşması sırasında bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin etkisiyle pro-inflamatuvar yolları uyarabilen TLR4 düzeylerini azaltması anti-inflamatuvar karakter kazanmasının bir işareti olabilir.

Pro-inflamatuvar sitokin olan İL-1 β monositlerden ve dokuda M1 polarizasyonuna sahip makrofajlardan üretilir (201, 202). TLR4 aracılığı ile aktive olan NF- κ B İL-1 β üretimini sağlayan başlıca mekanizmadır (100). Ancak, bu mekanizma dışında başka sinyal yolları da (MAPK, PI3K, STAT3, JNK1/2) İL-1 β üretiminde rol oynamaktadır (203-206). Tümör mikroçevresindeki İL-1 β 'nin asıl kaynağı TAM'lardır. İL-1 β , tümör gelişimini destekleyen inflamatuvar mikroçevrenin oluşmasının yanı sıra tümör hücrelerinin sağkalımı, anjiyogenez, metastaz ve immün baskılamada da rol oynar (116, 198). Literatürde yer alan çalışmalarda PMA ile olgunlaşmaları uyarılan THP-1 ve HL-60 hücre hatlarında İL-1 β üretiminin arttığı belirtilmiştir. Metastatik akciğer kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan makrofajlarda İL-1 β gen ifadesi artmıştır. Agresif yapıya sahip bazal-benzeri meme

kanseri hücre hattı ile ko-kültürü yapılan THP-1 hücrelerinde İL-1 β gen ve protein ifadesinin arttığı gösterilmiştir (4). Aynı çalışmada, İL-1 β artışının THP-1 hücrelerinin artan kemotaksis kapasitesi ile ilişkili olduğu lüminal hücreler ile ko-kültürü yapılan THP-1 hücrelerinde ise İL-1 β düzeyi ve kemotaksis kapasitesinin düşük olduğu belirtilmiştir (4). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin THP-1 hücrelerinde İL-1 β gen ifadesini erken evrede arttırabileceği gösterildi. U937 hücrelerinde ise İL-1 β gen ifadesinin belirgin şekilde azaldığı görüldü. THP-1 hücrelerinde bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisiyle İL-1 β salımının arttığı ancak bu artışın düşük düzeyde kaldığı belirlendi. Kolon kanseri hücre hattı süpernatantları ile yapılan bir çalışmada da THP-1 hücrelerinde İL-1 β düzeylerindeki artışın düşük seviyede kaldığı belirlenmiştir (191). Bu durum elde ettiğimiz sonuçların literatür ile uyumlu olduğu göstermektedir. Monositlerde ise sadece MDA-MB-231 hücre hattı süpernatantlarının İL-1 β salımını desteklediği belirlendi. Elde ettiğimiz bulgulara göre tümör hücrelerinden salgılanan faktörler İL-1 β üretimini destekleyebilir ve monositlerin/makrofajların tümör gelişimini destekleyen bir mikroçevreyi şekillendirmede kritik öneme sahip olduğunu gösterebilir. Diğer taraftan, THP-1 hücrelerinin MDA-MB-231 hücre hattı süpernatantları ile yapılan çalışmalarda monosit modeli olarak kullanılabilceğini gösterse de THP-1 hücrelerinde İL-1 β düzeylerindeki artışların düşük seviyede kalması modelin uygunluğu ile ilgili soru işaretleri doğurmaktadır. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında THP-1 hücrelerinde ve monositlerde CD14 düzeyleri artmasına rağmen TLR4 düzeylerinin değişmemesi veya azalması ve MD2 düzeylerinin düşük olmasının yanı sıra hem THP-1 hem de monositlerde NF- κ B aktivitesinin yeterince uyarılamaması bu hücrelerdeki TLR4 kompleksinin ve NF- κ B'nin verimli bir şekilde aktivasyon göstermemesine ve bu nedenle İL-1 β düzeylerindeki artışların düşük seviyede kalmasına yol açabilir. Diğer taraftan, bu durum İL-1 β artışında başka mekanizmaların da etkili olabileceğini gösterir. Elde ettiğimiz bulgularda literatür ile uyumlu olacak şekilde bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin hem THP-1 hücresinde hem de monositlerde İL-1 β üretimini artırması

kemotaksis kapasitesindeki artış ile tutarlı olmasına rağmen bu artışların düşük seviyede olmasının kemotaksis aktivitesi üzerinde belirgin bir etki yaratacağını düşündürmemektedir. Kemotaksis artışında meme kanseri hücrelerinden salgılanan diğer faktörlerin etkisi daha belirleyici olabilir. Lüminal meme kanseri hücre süpernatantları ile yapılan kültürlerde monositlerdeki kemotaksis artışı ise literatür ile uyumlu değildir.

Bir serin proteaz olan elastaz-2'nin başlıca kaynağı nötrofiller olmasına rağmen monosit ve makrofajlardan da üretilmektedir (164, 165). Gerçekleştirdiğimiz analizlerde, elastazın nötrofillerde, THP-1 ve monositlere kıyasla daha fazla üretildiği doğrulandı. Bu enzim nötrofillerdeki azürofilik granüllerde bulunur ve mikrobiyal organizmaların yok edilmesini sağlar (207) ve İL-8 üretimini artırarak daha fazla lökositin inflamasyon bölgesine göçünü uyarır (208). Bu şekilde, pro-inflamatuvar süreçlerde rol oynar. Diğer taraftan, elastaz-2 fibronektinde bulunan EDA ve "tip-III 12" kısımlarını birbirinden ayırarak FN-EDA parçalarının oluşumunu sağlar (8). Bu tez çalışmasında, bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 hücrelerinde elastaz-2 mRNA düzeylerinin azaldığı, U937 hücrelerinde ise arttığı görüldü. THP-1 hücrelerinde bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin etkisiyle, MDA-MB-468 dışında, elastaz-2 salımının azaldığı, monositlerde ise arttığı belirlendi. Bu sonuçlar, bazal-benzeri meme kanseri tümör mikroçevresindeki monositlerden veya makrofajlardan üretilen elastaz-2'nin bu mikroçevrede bulunan substratlarını etkili bir şekilde işleyebileceğini desteklemektedir. Diğer taraftan, meme kanseri çalışmalarında THP-1 hücrelerinin elastaz-2 üretimi açısından monosit modeli olarak kullanımının uygun olmadığını göstermiştir.

Hücre-dışı matriks proteini olan fibronektinin başlıca reseptörleri integrinlerdir (118). Fibronektin ile etkileşen $\alpha 4$, $\alpha 5$, αM , αX , $\beta 1$, $\beta 3$ ve $\beta 7$ integrinleri miyeloid hücrelerde yaygın şekilde ifade edilir (121). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 ve U937 hücrelerinde fibronektin ile etkileşen integrinlerin gen ifadesi değerlendirildi. THP-1 hücrelerinde $\alpha 5$ ve $\beta 3$ integrinlerin gen ifadesinin arttığı αM

ve $\beta 1$ integrinlerin gen ifadesinin ise azaldığı belirlendi. U937 hücrelerinde αM ve $\beta 1$ integrinlerin gen ifadesinin arttığı görüldü. Her iki hücre hattında da αX , ve $\beta 7$ integrinlerinin mRNA düzeyi artmasına rağmen bu artışların U937 hücrelerinde daha belirgin olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar, bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresinde bulunan fibronektinin, kullandığımız hücre hatlarına etki edebileceğini göstermektedir. Diğer yandan, THP-1 hücrelerinde MDA-MB-231 hücre süpernatanı etkisiyle αM (CD11b) gen ifadesi azalırken protein ifadesi belirgin şekilde arttı. Bu durum, olgunlaşmayla beraber hücrede bulunan CD11b mRNA'sının hızla proteine dönüştüğü ve bu nedenle mRNA düzeylerinde azalmanın meydana geldiği şeklinde açıklanabilir. HCC38 hücre süpernatanı CD11b gen ifadesine etki etmedi. CD11b protein düzeyi HCC38 süpernatanı etkisiyle artmasına rağmen anlamlı olmadığı görüldü. Bu da gen ve protein düzeylerinin birbirini yansıttığını göstermektedir. U937 hücrelerinde ise MDA-MB-231 hücre süpernatanlarının etkisiyle artan CD11b gen ve protein düzeylerinin birbiriyle tutarlı olduğu görüldü. HCC38 süpernatanı ile kültürü yapılan U937 hücrelerinde gen ifadesi artmasına rağmen bu artışın protein düzeyine yansımadağı görüldü. THP-1 hücrelerinde αX (CD11c) integrinlerin gen ifadesinin MDA-MB-231 hücre süpernatanı varlığında değişmediği ancak, protein düzeylerinin belirgin şekilde arttığı görüldü. HCC38 süpernatanı varlığında ise gen ifadesi minimal şekilde artmasına rağmen protein düzeyinin artış kadar belirgin olmadığı görüldü. U937 hücrelerinde ise tam tersi bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin CD11c gen ifadesini etkili bir şekilde arttırdığı ancak, protein düzeyindeki artışların düşük seviyede kaldığı görüldü. Artan gen ifadesinin protein düzeyine yansımadağı durumlar, artan mRNA düzeyine rağmen bu transkriplerin stabilitesinin olmaması ve translasyon işleminden önce yıkılması ile açıklanabilir (209).

Sonuç olarak, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin etkisiyle olgunlaşan miyeloid hücre hatlarının her parametre için monosit hücre modeli olarak kullanılamayacağı görüldü. CD14 düzeyi, kemotaksis kapasitesi ve İL-1 β üretimi açısından THP-1 hücreleri uygun monosit modeli olarak değerlendirilebilir. Ancak, CD4⁺ T hücre çoğalmasını uyarma kapasitesi, elastaz-2

üretimi, ROT üretme kapasitesi, CD11b, CD11c, CD40 ve TLR4 düzeyi açısından THP-1 hücreleri uygun monosit modeli olmayabilir. Özellikle CD14 ve ROT düzeyleri bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında ancak monositlerdeki bazal düzeye ulaşmaktadır. Diğer taraftan, THP-1 hücrelerinin monositik modeli U937 hücrelerine göre daha iyi yansıttığı gözlemlendi. U937 hücrelerindeki değişimlerin düşük seviyede kaldığı ve monositik hücre modelini tam olarak yansıtmadığı görüldü. Bu nedenle, U937 hücre hattı bazı analizlerde kullanılmadı.

5.2. Meme Kanseri Hücreleri Tarafından Miyeloid Hücrelerde STAT3 Aktivitesinin Uyarılması

STAT3 transkripsiyon faktörü tümör mikroçevresinde yaygın olarak bulunan TAM ve MDSC'lerin immün baskılayıcı karakter kazanmasını sağlar ve tamamen olgunlaşmasını engeller (6, 10, 90). TAM'lar meme kanseri mikroçevresinde yüksek miktarda bulunur ve kanser gelişimine katkı sağlar. Meme kanseri mikroçevresinde TAM'larda STAT3 aktivasyonunu sağlayan faktörler mevcuttur (33, 34). Bu tez çalışmasında, meme kanseri hücre modeli olarak kullanılan hücre hatlarında STAT3 transkripsiyon faktörünü uyaran aktivatörler farklı düzeylerde ifade edilebilmektedir (Gene-E Broad Institute, Tablo 5.1). Farklı meme kanseri alt-tiplerine ait meme kanseri hücre hattı süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 ve U937 hücrelerinde STAT3 aktivasyonu değerlendirildi. Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin STAT3 aktivasyonunu etkili bir şekilde artırdığı görüldü. Bu etki monositlerle de doğrulandı. Diğer alt-tiplerde belirgin bir değişim gözlenmedi. Bu durum, bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresinde miyeloid hücrelerde artan STAT3 düzeylerinin bu hücrelerin immün baskılayıcı karakter kazanması ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. STAT3 aktivasyonunda bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresindeki birçok faktörün etkili olması miyeloid hücreler üzerinde hangi faktörlerin tam olarak rol oynadığını net bir şekilde ortaya konulmasını zorlaştırmaktadır. Diğer taraftan, bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları THP-1 hücrelerindeki STAT3 gen ifadesinde belirgin bir değişime neden olmaz iken U937 hücrelerinde uzun süreli uyarımlarda STAT3 gen ifadesinin azaldığı belirlendi.

Azalan veya değişmeyen mRNA düzeylerinin artan protein ifadesi ile ilişkili olabileceği düşünölmektedir. Ayrıca, bu duruma etki eden diğer yollar da STAT3 gen ve protein ifadesine veya aktivasyonuna negatif geri-besleme yapabilir (210, 211).

Tablo 5.1. Meme kanseri hücre hatlarında STAT3 aktivatörlerinin gen ifadesi

	MCF-7	BT-474	T47D	ZR75-1	SKBR-3	MB-468	MB-231	HCC38	Kaynaklar
İL-6									87, 88
LİF									87
Onkostatın M									87, 88
İL-11									87, 88
CTF1									88
İL-10									88, 90
İL-21									88, 212
İL-23									213
VEGF-A									90
VEGF-B									90
VEGF-C									90
FGF-2									214
CXCL-12									215
İL-17A									216
İFN-γ									88, 217
G-CSF (CSF3)									88, 218
M-CSF (CSF1)									219
GM-CSF (CSF2)									88, 220
PDGF-B									88, 220, 221
İL-22									88, 222
İL-27									88, 223
İL-5									88, 224
İL-9									88
MCP-1 (CCL2)									88, 225
RANTES (CCL5)									88, 226
EGF									88, 220
TNF-α									88, 227
LIGHT									88, 228
SLF (SCF)									88, 229
İL-12A									88, 230, 231
İL-12B									88, 230, 231
TGF-α									88, 232
TGF-β1									233
FN1									154
İFN-β									220, 234
İFN-α									234
İL-2									235

Düşük

Yüksek



LİF, lösemi inhibitör faktörü; CTF1, kardiyotrofin-1; VEGF, vasküler endotelial büyüme faktörü; FGF, fibroblast büyüme faktörü; G-CSF, granüosit koloni uyarıcı faktör; M-CSF, makrofaj koloni uyarıcı faktör; GM-CSF, granüosit makrofaj koloni uyarıcı; PDGF, platelet kökenli büyüme faktörü; MCP-1, monosit kemoatraktan protein; RANTES, *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*; EGF, epidermal büyüme faktörü; TNF, tümör nekrozis faktör; LIGHT, *lymphotoxin homolog, inducible and competes with HSV glycoprotein D for HveA and is expressed on T-lymphocytes*; SLF (SCF), *steel factor (stem cell factor)*; TGF, transforme edici büyüme faktörü; FN, fibronektin; İFN, interferon

STAT3 transkripsiyon faktörü tümör mikroçevresinde miyeloid hücrelerin immün baskılayıcı karakter kazanmasının yanı sıra, sağkalımı (Bcl-xL, c-myc, siklin D veya survivin), anjiyogenezi ve invazyonu (VEGF, bFGF, HGF, MMP-2 ve MMP-9) destekleyerek bu hücrelerin düzenleyici özellik kazanmasını sağlar. Diğer taraftan, İL-1 β ve İL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinler üreterek tümör gelişimini destekleyen mikroçevrenin oluşumunda rol oynar. Bu sitokinleri salgılayan hücreler pro-inflamatuvar fenotip gösterir (6, 90, 91). Tümör mikroçevresindeki TAM'lar bu özelliklere sahip olup hem anti-inflamatuvar hem de pro-inflamatuvar karakterleri birlikte barındırabilirler (85). Bu tez çalışmasında, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin miyeloid hücre hatlarında ve monositlerde STAT3 aktivitesini artırması TAM benzeri hücrelere farklılaşabileceklerini desteklemektedir. Bu faktörlerin etkisiyle THP-1 hücrelerinde İL-1 β üretiminin arttığı gözlemlendi. Monositlerde ise en belirgin STAT3 aktivasyon artışının MDA-MB-231 hücre süpernatantları varlığında olduğu görüldü. Ayrıca, MDA-MB-231 hücre süpernatantlarının etkisiyle monositlerdeki İL-1 β üretiminin arttığı belirlendi. Bu sonuçlar, bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresinde yüksek STAT3 aktivitesine sahip miyeloid hücrelerin anti-inflamatuvar özellikler kazanmasının yanında pro-inflamatuvar süreçlerde de rol oynayabileceğini göstermektedir. Ancak, İL-1 β düzeyindeki artışların TAM benzeri miyeloid hücrelerin bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresinde pro-inflamatuvar yanıtların anti-tümör etkiye dönüşmesine sebep olmayacak şekilde sadece inflamatuvar ortamın devamlılığını sağlamak adına düşük seviyede tutulduğunu düşündürmektedir (236).

Sitokin ve büyüme faktörü reseptörlerinin uyarılması sonucu STAT3 transkripsiyon faktörünün SH2 bölümünde bulunan Tyr705 aminoasidi fosforile olur ve aktivasyon gerçekleşir. Primer tümörlerde ve tümör hücre hatlarında kontrolsüz şekilde aktivasyon gösteren ve tümör gelişimine katkı sağlayan STAT3 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu dominant negatif mutant STAT3, siRNA, shSTAT3, tuzak oligonükleotitler ve inhibitör moleküller ile engellenir ve tümör gelişimi baskılanabilir (237). STAT3 transkripsiyon faktörünün miyeloid hücrelerin inflamatuvar karakteri üzerine etkisini incelemek için bu transkripsiyon faktörünün

küçük inhibitör molekül *Stattic* ve genetik modifikasyon (STAT3 shRNA, shSTAT3; dominant negatif STAT3, STAT3DN) aracılığı ile farklı şekillerde inhibisyonu sağlanarak pro-inflamatuvar süreçlerde rol oynayan parametreler üzerindeki etkileri değerlendirildi.

Küçük inhibitör molekül *Stattic*, STAT3'ün SH2 bölümünü ile etkileşir. Böylece STAT3 aktivasyonu, dimerizasyonu ve DNA ile etkileşimi engellenir. Bu inhibitör, STAT1 ve STAT5b transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu da azaltmasına rağmen bu proteinlerin fosforilasyonu ve dimer oluşturma kapasitelerine etki etmemiştir (237). STAT3DN proteininde STAT3'ün aktivasyonuna yol açan 705 numaralı tirozin amino asitinin (Tyr705) yerine fenilalanin amino asiti bulunmaktadır. Bu durum, STAT3DN plazmid vektörünü içeren hücrelerde STAT3'ün inaktif formunun üretilmesini sağlamaktadır. STAT3DN proteini, ilişkili reseptör uyarıldığında hücredeki endojen STAT3 ile yarışır. Böylece, bu proteinin fosforilasyonunu engeller. Fosforilasyonu engellenen STAT3 proteini dimer oluşturamaz ve nükleusa geçip hedef genlerin transkripsiyonunu gerçekleştiremez. Ayrıca, STAT3DN proteini ile heterodimer oluşturan fosforillenmiş endojen STAT3 proteini de fonksiyonel değildir ve DNA ile etkileşime geçemez (174, 180). shSTAT3 ise STAT3 proteinin translasyonunu engeller. Hücrelere viral transdüksiyon yoluyla aktarılan shRNA'ların, RNA polimeraz II veya III tarafından transkripsiyonu gerçekleşir. Saç tokası şekilde ve çift zincirli yapıya sahip pre-shRNA oluşur. Pre-shRNA nükleusta Drosha/DCGR8 ve daha sonra sitozolde Dicer enzimleri aracılığı kesilir. Böylece çift zincirli siRNA kompleksleri oluşur. RNA ile indüklenen susturma kompleksi (RISC) çift zincirli siRNA'ları tek zincirli hale getirir ve hedeflenen mRNA ile etkileşimini kolaylaştırır. Bu etkileşim sonucu mRNA'lar degradasyona uğrar ve proteine dönüşümleri engellenir (181, 238). shSTAT3 de bu mekanizma ile, STAT3 mRNA'sının proteine dönüşümünü engeller (173). *Stattic* inhibitörü STAT3 üzerinde geçici inhibisyon sağlarken viral transdüksiyon yoluyla aktarılan STAT3DN ve shSTAT3 plazmid vektörleri STAT3'ün daha uzun süre inhibe olmasını sağlar (173, 174, 213).

Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin etkiyle miyeloid hücre hatlarında ve periferik kan monositlerinde artan STAT3 aktivasyonu *Stattic* varlığında etkili bir şekilde baskılandı. Aynı baskılayıcı etki shSTAT3/THP-1 ve STAT3DN/THP-1 hücrelerinde de gözlemlendi. THP-1 ve U937 hücrelerinde *Stattic* varlığında STAT3 gen ifadesindeki değişimler incelendiğinde bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile yapılan kısa süreli uyarımlarda da azalmalar görüldü. Uzun süreli uyarımlarda ise STAT3 gen ifadesinin belirgin bir şekilde arttığı gözlemlendi. STAT3DN/THP-1 hücrelerinde de uzun süreli uyarımlarda STAT3 gen ifadesinin arttığı shSTAT3/THP-1 hücrelerinde ise etkili bir şekilde baskılandığı görüldü. Bu sonuç, inhibitör molekül *Stattic*'in etkisinin geçici olduğunu ve bu etki sona erince STAT3'ün tekrar aktivasyon kazanacağını şeklinde algılansa da STAT3DN/THP-1 hücrelerindeki artışlar tam tersi şekilde *rebound* etkisinin varlığını ortaya çıkarabilir. Ancak bu durumun STAT3 protein düzeylerine yansımadağı belirlendi.

STAT3 aktivasyonunun miyeloid hücrelerde bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında artan İL-1 β salım düzeylerine etkisi incelendiğinde inhibitör molekül *Stattic* ile STAT3 inhibisyonunu özellikle THP-1 hücrelerinde erken evrede İL-1 β gen ifadesini baskıladığı ancak ileri aşamalarda bazal düzeyinin yaklaşık olarak 15-20 katına çıkması ile *rebound* etkisi yaptığı görüldü. *Stattic* varlığında bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile kültürü yapılan THP-1 hücrelerinde ve MDA-MB-231 hücre süpernatantları ile kültürü yapılan monositlerde İL-1 β düzeylerinin azalması gen ifadesindeki artışın salgılanan protein düzeyine yansımadağı gösterdi. Ayrıca, bazal-benzeri meme kanseri hücreleri ile uzun süreli uyarılan THP-1 hücrelerinde ve monositlerde İL-1 β salım düzeylerindeki artışların düşük seviyede kalması kanser mikroçevresinin pro-inflamatuvar mekanizmalardan ziyade anti-inflamatuvar mekanizmaları daha fazla desteklemesinden ötürü pro-inflamatuvar özellikteki moleküllerin ifadesini sınırlayabileceği şeklinde açıklanabilir. Diğer taraftan, shSTAT3/THP-1 hücrelerinde İL-1 β gen ifadesinin azaldığı salgılanan proteinleri düzeylerinin ise arttığı görüldü. Bu sonuca göre, İL-1 β mRNA'sının proteine dönüşmesi sonucu hücre içindeki miktarında azalmalar

meydana gelebilir. STAT3DN/THP-1 hücrelerinde ise bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile uzun süreli uyarımlarda İL-1 β gen ifadesinin arttığı gözlemlendi. Bu artışın salgılanan protein düzeyine yansıdığı görüldü. Elde edilen bulgulara göre, *Stattic* varlığında miyeloid hücrelerden salgılanan İL-1 β düzeyleri azalırken STAT3'ü özgün şekilde inhibe eden genetik modifikasyonlar sonucunda İL-1 β düzeylerinin arttığı belirlendi. Bu durum miyeloid hücrelerde anti-inflamatuvar karakterin kazanılmasında önemli rol oynayan STAT3 transkripsiyon faktörünün bu proteine özgü genetik modifikasyonlar ile inhibe edilmesi sonucu İL-1 β üretiminin artması bu hücrelerde pro-inflamatuvar fenotipi tetikleyebilir. Ancak, İL-1 β tümörde inflamatuvar mikroçevrenin devamlılığını sağlamada, anjiyogenezde, tümör hücrelerinin sağkalımında, immün baskılamada ve metastazda rol oynamaktadır (42, 43, 49, 116). Tümör dokusundaki İL-1 β artışı kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (111). Bu nedenle, STAT3 inhibisyonu sonucu İL-1 β düzeylerindeki artış tümör gelişimine katkı da sağlayabilir. Diğer taraftan, inhibitör molekül *Stattic*'in STAT3 dışında İL-1 β üretiminde rol oynayan diğer proteinlere de etki edebileceği düşünülmüştür. Literatürde yer alan bir çalışmada *Stattic*'in NF- κ B aktivasyonunu baskılamada etkili olabileceği belirtilmiştir (239). Bu çalışmada, *Stattic* varlığında hem miyeloid hücre hatlarında hem de monositlerde İL-1 β düzeylerindeki azalmada bu inhibitör molekülün STAT3'ün yanı sıra NF- κ B üzerindeki etkisinin de rolü olabileceği şeklinde açıklanabilir. Ayrıca, STAT3 İL-1 β üretimine doğrudan etki etmesinin yanında İL-1 β üretiminde rol oynayan sinyal yollarına ve proteinlere (NF- κ B, MAPK ve PI3K) pozitif veya negatif yönde etki ederek İL-1 β üretiminin düzenlenmesini sağlayabilir (7, 100, 203-205).

TLR4 sinyali ve bu sinyal ile ilişkili olan NF- κ B aktivasyonu her ne kadar kanser gelişimini destekleyici rol oynasa da asıl işlevi pro-inflamatuvar süreçlere katkı sağlamaktır (79, 98). Gerçekleştirdiğimiz analizlerde THP-1 hücrelerinde TLR4 düzeylerinin yüksek olduğu belirlendi. STAT3 inhibisyonu ile bu yüzey reseptörünün düzeyleri azalsa da bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin bu reseptöre belirgin düzeyde etki etmediği görüldü. Benzer durum *Stattic* ile inkübe edilen THP-1, shSTAT3/THP-1 ve STAT3DN/THP-1 hücrelerindeki TLR4 gen

ifadesi analizlerinde de izlendi. Bu sonuçlar, STAT3'ün TLR4 protein ifadesini destekleyebileceği şeklinde yorumlandı.

THP-1 hücrelerinde bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisiyle azalan elastaz-2 gen ifadesinin *Stattic* varlığında da bu eğilimini sürdürdüğü görüldü. MDA-MB-468 süpernatantı varlığında belirgin olan elastaz-2 salım düzeylerinin artışının *Stattic* ile etkili bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Diğer bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında düşük düzeydeki elastaz-2'nin inhibitör molekül *Stattic*'ten etkilenmediği gözlemlendi. STAT3DN/THP-1 hücrelerinde elastaz-2 gen ifadesinde belirgin değişimler görülmemesine rağmen MDA-MB-468 hücre süpernatantı etkisiyle elastaz-2 salım düzeylerinin etkin bir şekilde arttığı diğer bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisiyle de azaldığı görüldü. shSTAT3/THP-1 hücrelerinde elastaz-2 gen ifadesi artma eğiliminde olmasına rağmen sadece MDA-MB-231 hücre süpernatantlarının etkisiyle bu enzimin salımında belirgin bir artış gözlemlendi. Bu sonuçlar, THP-1 hücrelerinde STAT3 inhibisyonunun elastaz-2 düzeylerini meme kanseri hücre hatlarına göre heterojen şekilde etkilediğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin etkisiyle STAT3 artışına bağlı olarak pro-inflamatuvar yanıtlar etkilenmektedir. STAT3 tarafından düzenlenen İL-1 β tümör mikroçevresinde hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar etki gösterebilir. *Stattic* varlığında bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin TLR4 proteininde azalmaya yol açması bu reseptör aracılı NF- κ B aktivitesi sonucu üretilen İL-1 β düzeylerinin azalmasına neden olabilir. Elde edilen tüm veriler bir arada yorumlandığında, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin miyeloid hücre olgunlaşması, STAT3 ve İL-1 β eksenini etkileyerek immün düzenlenmeye sebep olabileceği yönünde bilgiler elde edilmiştir.

5.3. Fibronektinin Meme Kanseri Mikroçevresindeki Miyeloid Hücreler Üzerine Etkisi

Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinin köken aldığı miyoepitelyal hücreler fibronektin, kollajen ve laminin gibi hücre-dışı matriks bileşenlerini üreterek bazal membranın oluşumuna önemli katkı sağlar (18). Kanseri gelişimi sırasında, bazal-benzeri meme kanseri hücreleri epitelyal-mezenkimal geçiş sürecinde yüksek düzeyde fibronektin üretir. Bu durum, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinin mezenkimal özellik kazanmasına katkı sağlar (1, 154). Diğer taraftan, duktal karsinoma in situ aşamasından invazif kanser histopatolojisine geçiş sürecinde FN ve izoformlarının (EDA ve EDB) düzeyinin artması ve diğer hücre-dışı matriks bileşenleri (kollajen, tenasin C) ile yaptığı etkileşimler tümör hücrelerinin sağkalımına ve kanserin ilerlemesine yol açabilir (141). Meme kanseri mikroçevresinde fibronektin – integrin etkileşimleri tümör hücrelerinin adezyonu, sağkalımı ve çoğalmasına yol açabilir (128, 155). Ayrıca, fibronektin bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinin invazif ve metastatik özellikler kazanmasını sağlayarak bu hücrelerin agresif yapısını destekler (3, 154). Bu nedenle, bazal-benzeri meme kanserinde fibronektin artışı kötü prognoz ile ilişkilidir ve kanser tedavisine verilen yanıtların etkisini sınırlayıcı rol oynayabilir (128, 154). Meme kanserinde, total hücresele FN ve FN-EDA izoformu artış göstermektedir (152). Meme kanseri hücre hatları ile yapılan çalışmalarda ise lüminal özellikteki kanser hücrelerine kıyasla bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarında fibronektin mRNA düzeyinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (154). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada da total FN ve FN-EDA düzeylerinin bazal-benzeri meme kanseri hücre hatlarında, özellikle MDA-MB-231 ve HCC38, diğer hücre gruplarına göre yüksek olduğunu tespit ettik.

Monosit-makrofaj farklılaşması fibronektin konsantrasyonunun fazla olduğu dokularda kolaylaşır (122, 123). Kandan dokuya göç eden monositlerin fibronektin (FN) ile yaptığı etkileşimler monositlerde ve makrofajlarda olgunlaşma ve farklılaşma belirteçlerinin (M-CSFR, CD11b, CD14, CD18) ifadesini artırır (121). Fibronektin ile monosit-makrofajlarda bulunan integrinlerin etkileşimi bu hücrelerin fagositoz aktivitelerini ve pro-inflamatuvar sitokin üretme kapasitelerini artırır

(121, 125). Ayrıca, fibronektin monositlerin/makrofajların tümöre infiltre olmak için kemotaksis yeteneklerini destekler (124). Tümör mikroçevresindeki miyeloid hücreler, tümör hücrelerinden salınan faktörler ve fibronektin gibi hücre-dışı matriks bileşenleri ile yaptığı etkileşimler sonucunda MDSC ve TAM gibi hücrelere dönüşür. Bu şekilde tümör gelişimini destekleyen ve anti-tümör yanıtları baskılayan fonksiyonları daha etkin şekilde gerçekleştirebilirler (126). Bu tez çalışmasında, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörler miyeloid hücre hatlarında fibronektin reseptörü olan integrinlerin düzeyini artırabilmektedir. Bu durum, bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresinde artan fibronektinin miyeloid hücrelerdeki integrinler ile etkileşebileceğini göstermektedir. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisiyle STAT3 düzeyleri artan miyeloid hücre hatlarında ve periferik kan monositlerinde İL-1 β üretimi de arttı. Diğer taraftan, meme kanseri hücreleri pro-inflamatuvar sitokinler (İL-1 β , TNF- α , İL-6 ve İFN- γ) ile uyarıldığında İL-1 β 'nin hem gen hem de salgılanan protein düzeyinde fibronektin ve FN-EDA izoformunun ifadesini artırdığı belirlendi. Bu sonuçlar, bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresinde miyeloid hücreler tarafından artan İL-1 β 'nin bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinde fibronektin ve FN-EDA düzeylerini arttırabileceği, fibronektinin ve FN-EDA'nın ise miyeloid hücrelerle etkileşebileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, İFN- γ ile uyarılan bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinde fibronektin gen ifadesi belirgin şekilde artarken protein düzeylerinin azaldığı görüldü. Literatürde İFN- γ 'nın fibroblastlarda fibronektin mRNA'sını artırdığı ancak bu transkriptlerin stabil olmadığı ve hızla yıkıldığına dair bir çalışma mevcuttur. Bu nedenle, İFN- γ varlığında artan fibronektin gen ekspresyonunun mRNA stabilitesi sorunu nedeni ile proteine dönüşmediği düşünülmüştür (209).

Literatürde yer alan çalışmalarda fibronektindeki EDA bölgesinin TLR4 ile etkileştiği ve NF- κ B aktivitesini uyardığı gösterilmiştir (8, 9). Gerçekleştirdiğimiz analizlerde THP-1 ve monositlerde TLR4'ün yüksek düzeyde olduğunu gözlemlendi. Bu durum, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan fibronektin ve FN-EDA'nın miyeloid hücreleri TLR4 aracılığı ile uyurabileceğini düşündürmüştür. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının TLR4 ve NF- κ B aktivitesine

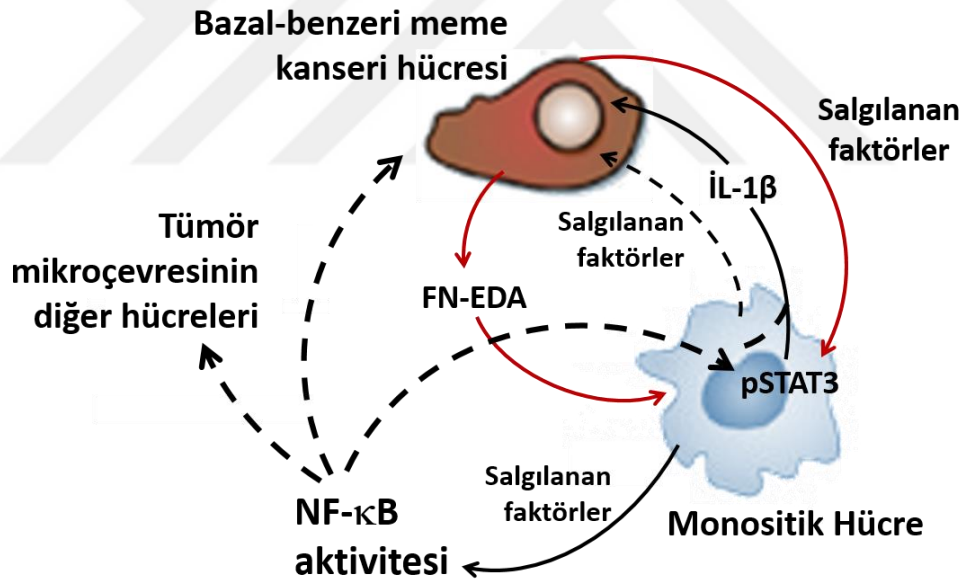
etkisi TLR4'ü yüksek düzeyde ifade eden HEK-Blue™ hücreleri aracılığı ile birdirici deneylerle (*reporter assay*) test edildi. Elde edilen bulgulara göre fibronektin ve FN-EDA içeren bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının TLR4 ve NF-κB aktivitesini uyarmadığı belirlendi. Elastaz-2'nin fibronektinde bulunan EDA ve "tip-III 12" kısımlarını birbirinden ayırarak FN-EDA parçalarının oluşumunu sağladığı ve TLR4 uyarımı ile NFκB transkripsiyon faktörünün aktivasyonuna neden olduğu belirtilmiştir (8). Elastaz-2'nin yüksek düzeyde salgılandığı PMN lökositlerden elde edilen süpernatantlar ve bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile yapılan kültürlerde de TLR4 ve NF-κB aktivitesinin uyarılmadığı görüldü. FN-EDA düzeyleri arttırıldığında da sonuç değişmedi. Bu sonuçlar göre, *reporter assay* deney kurulumunda fibronektinde bulunan EDA bölgesi, literatürün aksine, TLR4 ve NF-κB aktivitesini etkin bir şekilde uyarılmamaktadır.

Literatür yer alan sınırlı sayıdaki çalışmada fibronektinin EDA bölgesinin TLR4 ve NF-κB aktivitesini uyardığı belirtilmektedir. Bu çalışmalarda EDA proteinlerinin veya peptitlerinin klonlanması ve izolasyonu genellikle bakteri aracılı sistemler ile gerçekleştirilmiştir. Bakteri kökenli molekül olan LPS, TLR4 yolağını EDA peptitlerinden daha etkili bir şekilde uyarılmaktadır (8, 9). Bu peptitlerin klonlanması sırasında meydana gelebilecek LPS kontaminasyonu bu peptitlerle yapılan analizlerde yanlış sonuçların ortaya çıkmasına yol açabilir. Bu konuda az sayıda çalışmanın olması FN-EDA proteininin bilinen aksine TLR4 ve NF-κB aktivasyonunu uyarımda güçlü bir etkiye sahip olmadığını düşündürmektedir. Diğer taraftan, fibroblastlardan izole edilen FN-EDA proteinleri veya farelerde oluşturulan FN-EDA *knockout* modelleri ile de çalışmalar mevcuttur. Bu tez çalışmasında, lentiviral gen aktarımı ile HEK-293FT hücrelerinde ifade edilen ve saflaştırılan FN-EDA rekombinant proteini kullanılmıştır. TLR4 uyarımı üzerindeki etkisini test etmek için kullanılan sistem LPS ile çalışmasına rağmen bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ve rekombinant FN-EDA proteini ile sonuç vermedi. FN-EDA'nın TLR4 ve NF-κB aktivasyonu üzerinde etkisinin olup olmadığını görmek için yüksek düzeyde TLR4 ifade eden THP-1 hücrelerinde ve monositlerde TLR4 reseptörü inhibe edilip FN-EDA ile uyarılarak NF-κB veya İL-1β düzeyleri incelenebilir.

Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ve rekombinant FN-EDA proteinin tek başına TLR4 ve NF- κ B uyarımını sağlayamaması ek faktörlerin gerekli olduğunu düşündürmüştür. Rekombinant FN-EDA proteini ile kültürü yapılan THP-1 hücreleri ve monositlerden elde edilen süpernatantların NF- κ B aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde FN-EDA içeren monosit süpernatantlarının TLR4 reseptöründen bağımsız olarak NF- κ B aktivitesini uyardığı bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ile beraber bu etkinin daha da arttığı belirlendi. Bu durum, FN-EDA konsantrasyonu yüksek olan bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresinde kanser hücrelerinden ve monositlerden salgılanan faktörlerin otokrin ve parakrin şekilde NF- κ B aktivitesini etkili bir şekilde uyurabileceğini göstermiştir. Diğer taraftan, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin FN-EDA rekombinant proteinleri ile beraber monositlerde İL-1 β salımını belirgin şekilde artırdığı görüldü. Rekombinant İL-1 β varlığında NF- κ B aktivitesinin belirgin şekilde artması NF- κ B uyarımının monositler tarafından üretilen İL-1 β üzerinden olabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, NF- κ B aktivitesinin uyarılmasında monositlerden üretilen başka faktörlerin de etkili olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörler monositlerde STAT3 aktivasyonunu artırması anti-inflamatuvar fenotipi desteklediğini gösterir. Bu hücrelerde STAT3 artışına rağmen FN-EDA ile pro-inflamatuvar sitokin olan İL-1 β düzeylerinin artması STAT3 bağımlı bir mekanizmanın bu süreçte rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları ve rekombinant FN-EDA proteini ile uyarılan monositlerde STAT3 inhibisyonunun İL-1 β düzeylerini belirgin şekilde azalttığı gözlemlendi. Bu sonuç, monositlerde STAT3 – İL-1 β – fibronektin arasındaki etkileşimin bazal-benzeri meme kanserinde inflamatuvar mikroçevreyi destekleyen bir mekanizma olduğunu ortaya çıkarmıştır. FN-EDA konsantrasyonu yüksek olan bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresinde monositlerde STAT3 inhibisyonu sonrası salgılanan faktörlerin NF- κ B'yi etkili bir şekilde uyuramaması bu mekanizmayı destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörler monositlerde STAT3 aktivasyonunu artırdı ve bu hücrelerin inflamasyonu düzenleyici karakter kazanmasını sağladı. Yüksek STAT3 aktivitesine sahip monositler bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresinde İL-1 β düzeylerinin artmasına yol açtı. Artan İL-1 β düzeyleri bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden FN-EDA salımını destekledi. Bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresinde FN-EDA konsantrasyonunun artışı monositlerden daha fazla İL-1 β üretilmesini sağladı. Ayrıca, FN-EDA düzeyi artan mikroçevrede bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden ve monositlerden salgılanan faktörlerin NF- κ B aktivitesini uyarması söz konusu idi. Bu şekilde bazal-benzeri meme kanseri ve monositler arasında kanser mikroçevresindeki inflamasyonun devamlılığını destekleyen pozitif bir geri-besleme mekanizmasının olabileceği ortaya çıkarılmıştır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Tez çalışması kapsamında, elde edilen veriler doğrultusunda ortaya çıkan pozitif geri-besleme mekanizmanın şematik gösterimi. (FN-EDA Fragment, EDA içeren fibronektin fragmenti; p-STAT3, fosforile STAT3)

STAT3 – İL-1 β – fibronektin arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkan inflamasyonu destekleyen pozitif geri-besleme mekanizması periferik kan monositleri kullanılarak kültür ortamında gerçekleştirilen analizlerde gösterildi. Bu pozitif geri-besleme mekanizmasının *in vivo* olarak pre-klinik çalışmalarla ve bazal-benzeri meme kanseri hasta dokuları ile yapılan analizlerle doğrulanması halinde bu mekanizmayı besleyen moleküller hedeflenerek özgün bir tedavi yöntemi olmayan agresif yapılı bazal-benzeri meme kanserinin tedavisine önemli katkılar sağlanabilir.

Bu mekanizmanın önemli bileşenlerinden FN-EDA'nın bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresinde artışı anti-kanser tedavilere özgün şekilde kanser hücrelerini ortadan kaldırma ve tedavi etmede etkili bir hedef molekül olabileceğini göstermektedir. Bu molekülü hedefleyen antikolar veya bu antikolar ile kombine edilen sitokinler, kemoterapi ajanları ve aşılar bu geri-besleme mekanizmasının inflamasyonu destekleyici etkisini ortadan kaldırarak anti-tümör immün yanıtları uyurabilir böylece kanser gelişiminin önlenmesi sağlanabilir (240). Kanserde yüksek düzeyde bulunan fibronektin ve izoformlarını hedef alan tedavi ajanları, kötü huylu tümörleri erken teşhis etme ve kanser tedavilerinin etkinliğini artırma potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir (241).

Ortaya çıkarılan pozitif geri-besleme mekanizmasında İL-1 β aracılı olarak inflamasyonu destekleyen ve düzenleyen STAT3 transkripsiyon faktörünün hedeflenmesi tümör gelişimini sağlayan inflamatuvar ortamın zayıflamasına yol açabilir. STAT3'ü doğrudan inhibe eden FDA onaylı bir ajan bulunmamasına rağmen STAT3'e dolaylı olarak etki eden FDA onaylı JAK ve tirozin kinaz inhibitörleri (Tofacitinib, Ruxolitinib, Sorafenib, Sunitinib) umut vaat etmektedir (94, 95). Böylece, tümör-ilişkili immün hücrelerde STAT3 aktivitesini engelleyerek tümördeki immünolojik mikroçevreyi kanser tedavisine elverişli hale getirebilirler (7). Diğer yandan, kanserde inflamatuvar mikroçevrenin oluşumuna katkı sağlayan İL-1 β 'nın etkisini azaltan FDA onaylı inhibitör moleküller (Anakinra ve Kanakinumab) baskılayıcı özellikteki miyeloid hücrelerin artışını ve kanser gelişimini engelleyebilmektedir (242-244). Bu inhibitör moleküllerin kemoterapi ajanları ile

beraber kullanımı inflamasyonu destekleyen pozitif geri-besleme mekanizmasının kırılmasında rol oynayabilir (243).

Meme kanserinde henüz kanıtlanmış bir başarısı olmasa da NF- κ B'yi inhibe eden moleküller ve ajanlar (Kurkumin ve FDA onaylı Bortezomib) ile yapılan klinik denemeler umut verici sonuçlar ortaya koymuştur. Ancak, NF- κ B transkripsiyon faktörü 200'ün üzerinde gene etki etmektedir ve birçok hücrenel süreçte önemli rol oynar. Bu nedenle, kanser tedavilerinde NF- κ B'nin hedeflenmesi istenmeyen etkilere de yol açabilir (245).

Gerçekleştirdiğimiz analizlerde ortaya çıkan STAT3 – İL-1 β – fibronektin aracılı pozitif geri-besleme mekanizması bazal-benzeri meme kanseri mikroçevresindeki inflamasyonu destekleyebilir. Benzer mekanizma fibronektin veya FN-EDA düzeyi yüksek olan ve yüksek düzeyde miyeloid hücre infiltrasyonu gösteren kanserlerde de ortaya çıkabilir. Bazal-benzeri meme kanseri gibi özgün bir tedavi yöntemi bulunmayan kanser türleri için tedavi stratejileri geliştirilirken inflamasyonu destekleyen böyle bir pozitif geri-besleme mekanizmasının varlığı da dikkate alınmalıdır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında,

1. Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin miyeloid hücre hatlarının fenotipik olgunlaşmasında lüminal hücelere göre daha etkili olduğu gösterildi. THP-1 hücrelerinde CD11b, CD11c, CD14 ve CD40 belirteçlerinin, U937 hücrelerinde ise CD11b ve CD11c belirteçlerinin ifadesinin arttığı görüldü. U937 hücrelerindeki olgunlaşma düzeyinin THP-1 hücrelerine kıyasla daha düşük seviyede kaldığı görüldü.
2. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları monositlerin farklılaşmasını CD14 artışına yol açarak etkiledi. Miyeloid hücre hatları ile monositler arasında CD11b, CD11c ve CD40 belirteçleri açısından tam bir tutarlılık gözlenmedi.
3. Meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisi altında monositler ve miyeloid hücre hatlarının CD4⁺ T hücre üzerindeki etkilerinin birbirinden farklı olduğunu gösterildi. Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörler miyeloid hücre hatlarının CD4⁺ T hücrelerin çoğalmasını uyarma kapasitelerini azaltırken monositlerde bu azalmanın lüminal meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörler aracılığı ile gerçekleştiği belirlendi.
4. Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin hem THP-1 hücrelerinde hem de monositlerde kemotaksis kapasitesini artırdığı gözlemlendi.
5. Meme kanseri hücre süpernatantları ile kültürü yapılan miyeloid hücre hatlarının ROT üretimini açısından monositler ile aynı kapasiteye ulaşabileceği gösterildi.
6. Monositlerin fagositoz kapasitesinin miyeloid hücre hatlarına göre daha yüksek olduğunu gözlemlendi. Meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin miyeloid hücrelerin fagositoz kapasitesine etki etmediği görüldü.

7. Monositlerde ve THP-1 hücrelerinde TLR4 düzeylerinin yüksek olduğu belirlendi. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisiyle monositlerde TLR4 düzeylerinin azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi.
8. THP-1 hücrelerinde bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisiyle İL-1 β düzeylerinin arttığı görülürken monositlerde bu artış MDA-MB-231 hücre süpernatantlarının etkisiyle gerçekleşti.
9. Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin elastaz-2 düzeylerini THP-1 hücrelerinde artırdığı monositlerde ise azalttığı tespit edildi.
10. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının miyeloid hücre hatlarında ve monositlerde STAT3 aktivasyonunu artırdığı görüldü.
11. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisiyle THP-1 ve monositlerde artan İL-1 β düzeyleri küçük inhibitör molekül *Stat3ic* ile baskılarken genetik modifikasyonlar aracılığı ile inhibe edilen STAT3'ün İL-1 β düzeylerini artırdığı belirlendi.
12. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında, THP-1 hücrelerinde STAT3 inhibisyonu sonucu TLR4 düzeylerinin azalma eğilimi göstermesi STAT3'ün TLR4 protein ifadesini destekleyebileceğini gösterdi.
13. STAT3 inhibisyonunun THP-1 hücrelerinde elastaz-2 düzeylerini meme kanseri hücre hatlarına göre heterojen bir şekilde etkilediği görüldü.
14. Bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinde hücre-içi ve salgılanan total fibronektin ve FN-EDA düzeylerinin diğer meme kanseri alt-tiplerine göre yüksek olduğu belirlendi.
15. İL-1 β varlığında meme kanseri hücrelerinde total fibronektin ve FN-EDA düzeylerinin arttığı gözlemlendi.

16. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatlarının miyeloid hücre hatlarında fibronektine bağlanan integrinlerin mRNA düzeylerini artırabileceği görüldü. THP-1 hücrelerinde $\alpha 5$, αX , $\beta 3$ ve $\beta 7$ integrinlerin, U937 hücrelerinde ise αM , αX , $\beta 1$ ve $\beta 7$ integrinlerin arttığı gözlemlendi.
17. Fibronektin ve FN-EDA içeren bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatlarının TLR4 ve NF- κ B aktivitesini doğrudan uyarmadığı belirlendi.
18. Monosit süpernatları, FN-EDA rekombinant proteini varlığında, TLR4'ten bağımsız olarak NF- κ B aktivitesini uyardı. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatları ile bu uyarımın daha fazla arttığı belirlendi. Bu etkinin STAT3 aktivitesine bağlı olarak gerçekleştiği görüldü.
19. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatlarının, FN-EDA rekombinant proteini varlığında, monositlerde İL-1 β salımını daha fazla artırdığı ve bu etkinin STAT3 aktivitesi tarafından desteklendiği tespit edildi.
20. Rekombinant İL-1 β varlığında NF- κ B aktivitesinin belirgin şekilde artması NF- κ B uyarımının monositler tarafından üretilen İL-1 β üzerinden olabileceğini gösterdi.
21. Bazal-benzeri meme kanseri hücreleri ile yapılan çalışmalarda miyeloid hücre hatlarının, özellikle THP-1, fenotipik olgunlaşma ve farklılaşma açısından uygun monosit-makrofaj modeli olarak tanımlanması için CD68, CD163, CD206, CD274, CD80 ve CD86 belirteçlerinin düzeyleri araştırılabilir.
22. Meme kanseri hücre süpernatlarının etkisi altında monositler ve miyeloid hücre hatlarının CD4⁺ T hücrelerinin çoğalması üzerindeki farklı etkilerinin anlaşılması için miyeloid hücre hatlarında ve monositlerde ko-stimülatör ve ko-inhibitör moleküllerin ifade düzeyleri ve aktiviteleri incelenebilir. Ayrıca, miyeloid hücreler ile ko-kültürü yapılan CD4⁺ T hücrelerinin hangi T hücre alt-tipine (Th1, Th2, Treg) farklılaştığı belirlenebilir.

23. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisi altında THP-1 hücrelerinde ve monositlerde meydana gelen İL-1 β artışına, NF- κ B dışında, etki eden mekanizmaların olup olmadığı araştırılabilir.
24. PMN lökositlerden elde edilen süpernatantların FN-EDA aracılı olarak TLR4 ve NF- κ B aktivitesini uyarıp uyarıp olmadığı görüldü. Elastaz-2'nin FN-EDA üzerindeki etkisini gözlemlemek için saflaştırılmış elastaz-2 ile muamele edilen FN-EDA proteinin TLR4 ve NF- κ B aktivitesi üzerindeki etkileri incelenebilir.
25. Bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantlarının etkisiyle miyeloid hücre hatlarındaki integrinlerin mRNA'sındaki artışın protein düzeyine ve aktivitesine yansımaları test edilebilir.
26. Bazal-benzeri meme kanserinden salgılanan faktörlerin etkisiyle yüksek STAT3 aktivitesine sahip THP-1 hücrelerinde ve monositlerde *Stattic*, İL-1 β düzeylerini azalırken STAT3'e özgül genetik modifikasyonlar aracılığı ile gerçekleştirilen inhibisyonlar İL-1 β düzeylerini artırmaktadır. STAT3'ün, İL-1 β üretiminde önemli rol oynayan NF- κ B ve diğer faktörler üzerindeki etkisi araştırılabilir.
27. İL-1 β düzeylerinde meydana gelen değişimlerin pro-inflamatuvar veya anti-inflamatuvar süreçlere etkisi incelenebilir.
28. FN-EDA proteininin TLR4 ve NF- κ B aktivitesi üzerindeki etkisini net olarak ortaya koymak için TLR4 reseptörü ile FN-EDA proteininin etkileşimi engellenerek NF- κ B ve İL-1 β düzeyleri incelenebilir.
29. Meme kanseri hastalarından elde edilen dokularda fibronektin, FN-EDA, STAT3, İL-1 β , TLR4, elastaz ve NF- κ B gibi moleküllerin düzeylerindeki değişimler incelenerek ortaya konulan mekanizma ile tutarlı olup olmadığı değerlendirilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer challenges for personalized medicine. *Am J Pathol.* 2013;183(4):1113–24.
2. Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2018;27(1):95-120
3. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *J Cancer.* 2016;7(10):1281–94.
4. Stewart DA, Yang Y, Makowski L, Troester MA. Basal-like breast cancer cells induce phenotypic and genomic changes in macrophages. *Mol Cancer Res.* 2012;10(6):727-38.
5. Kamoshida G, Matsuda A, Sekine W, Mizuno H, Oku T, Itoh S, ve ark. Monocyte differentiation induced by co-culture with tumor cells involves RGD-dependent cell adhesion to extracellular matrix. *Cancer Lett.* 2012;315(2):145-52.
6. Rebe C, Végran F, Berger H, Ghiringhelli F. STAT3 activation: A key factor in tumor immunoescape. *JAKSTAT.* 2013;2(1):e23010.
7. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: A leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(11):798-809.
8. Julier Z, Martino MM, de Titta A, Jeanbart L, Hubbell JA. The TLR4 agonist fibronectin extra domain A is cryptic, exposed by elastase-2; use in a fibrin matrix cancer vaccine. *Sci Rep.* 2015;5:8569.
9. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, ve ark. The extra domain A of fibronectin activates toll-like Receptor 4. *J Biol Chem.* 2001;276(13):10229-33.
10. Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: The macrophage connection. *Cancer Lett.* 2008;267(2):204-15.
11. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30.
12. TC Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri [Internet]. 2017. Erişim Adresi: <https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2014>
13. Inman JL, Robertson C, Mott JD, Bissell MJ. Mammary gland development: Cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development.* 2015;142:1028-42
14. Solinas C, Carbognin L, De Silva P, Criscitiello C, Lambertini M. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer according to tumor subtype: Current state of the art. *Breast.* 2017;35:142-150.

15. Gross K, Wronski A, Skibinski A, Phillips S, Kupperwasser C. Cell fate decisions during breast cancer development. *J Dev Biol.* 2016;4(1):4.
16. Wong E, Chaudhry S, Rossi M. Breast Cancer [Internet]. 2012 [Erişim Tarihi 29 Aralık 2012]. Erişim Adresi: <http://www.pathophys.org/breast-cancer/>
17. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, ve ark. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell.* 2004;6(1):17-32.
18. Gudjonsson T, Adriance MC, Sternlicht MD, Petersen OW, Bissell MJ. Myoepithelial cells: Their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2005;10(3):261-72.
19. Tanaka H, Tamura A, Suzuki K, Tsukita S. Site-specific distribution of claudin-based paracellular channels with roles in biological fluid flow and metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1405(1):44-52.
20. Ding L, Lu Z, Lu Q, Chen Y. The claudin family of proteins in human malignancy: A clinical perspective. *Cancer Management and Research* 2013;5:367–75.
21. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, ve ark. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 2007;8(5):R76.
22. Dias K, Dvorkin-Gheva A, Hallett RM, Wu Y, Hassell J, Pond GR, ve ark. Claudin-low breast cancer; clinical & pathological characteristics. *PLoS ONE* 2017;12(1):e0168669.
23. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, Shi B. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res.* 2015;5(10):2929-43.
24. Williams CB, Yeh ES, Soloff AC. Tumor-associated macrophages: Unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *NPJ Breast Cancer.* 2016;2.pii:15025.
25. Kroemer G, Senovilla L, Galluzzi L, Andre F, Zitvogel L. Natural and therapy-induced immunosurveillance in breast cancer. *Nat. Med.* 2015;21:1128–38
26. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, ve ark. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 2007;450:903–7.
27. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, ve ark. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2010;28:105–13.
28. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, ve ark. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann. Oncol.* 2014;25:1536–43.

29. Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr. Opin. Immunol.* 2007;19:203–8.
30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
31. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2014;14:392–404.
32. Criscitiello C, Esposito A, Curigliano G. Tumor-stroma crosstalk: Targeting stroma in breast cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 2014;26:551–55.
33. O’Sullivan C, Lewis CE. Tumour-associated leucocytes: Friends or foes in breast carcinoma. *J. Pathol.* 1994;172:229–35.
34. Mantovani A, Marchesi F, Porta C, Sica A, Allavena P. Inflammation and cancer: Breast cancer as a prototype. *The Breast.* 2007;16 Suppl 2:27–33.
35. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2009;9:259–70.
36. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S, ve ark. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood.* 2010;116:829–40.
37. Gyorki DE, Asselin-Labat ML, van Rooijen N, Lindeman GJ, Visvader JE. Resident macrophages influence stem cell activity in the mammary gland. *Breast Cancer Res.* 2009;11:R62.
38. Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, ve ark. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res.* 2005;65:5278–84.
39. Yang J, Liao D, Chen C, Liu Y. Tumor-associated macrophages regulate murine breast cancer stem cells through a novel paracrine EGFR/Stat3/Sox-2 signaling pathway. *Stem Cells.* 2013;31:248–58.
40. Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li JF, Goswami S, Stanley ER ve ark. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* 2007;67:2649–56.
41. Kessenbrock K, Plaks V, Werb, Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010;141:52–67.
42. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2008;8:618–31.
43. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009;86(5):1065–73.

44. Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. Hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) induces angiogenesis in breast carcinomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2006;14:78–82.
45. Keibel A, Singh V, Sharma MC, Inflammation, microenvironment, and immune system in cancer progression. *Curr Pharm Des.*, 2009;15(17):1949-55.
46. Sarrió D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 2008;68:989–97.
47. Lu H, Clauser KR, Tam WL, Fröse J, Ye X, Eaton EN, ve ark. A breast cancer stem cell niche supported by juxtacrine signalling from monocytes and macrophages. *Nat. Cell Biol.* 2014;16:1105–17.
48. Rohan TE, Xue X, Lin HM, D'Alfonso TM, Ginter PS, Oktay MH, ve ark. Tumor microenvironment of metastasis and risk of distant metastasis of breast cancer. *J. Natl Cancer Inst.* 2014;106:1–11.
49. Kees T, Egeblad M. Innate immune cells in breast cancer--from villains to heroes? *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011;16(3):189-203.
50. Oh SA, Li MO. TGF- β : Guardian of T cell function. *J. Immunol.* 2013;191:3973–79.
51. Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front. Immunol.* 2013;4:129.
52. Watanabe M, Oda J, Amarante M, Cesar Voltarelli, J. Regulatory T cells and breast cancer: Implications for immunopathogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29:569–79.
53. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, ve ark. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J. Exp. Med.* 2014;211:781–90.
54. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:641–54.
55. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Piazuelo MB, ve ark. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res.* 2004;64:5839–49.
56. De Boniface J, Mao Y, Schmidt-Mende J, Kiessling R, Poschke I. Expression patterns of the immunomodulatory enzyme arginase 1 in blood, lymph nodes and tumor tissue of early-stage breast cancer patients. *Oncoimmunology* 2012;1:1305–12.
57. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim MV, Bivona MR, Liu K, ve ark. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science.* 2014;344:921–25.

58. Handel-Fernandez ME, Cheng X, Herbert LM, Lopez DM. Downregulation of IL-12, not a shift from a T helper-1 to a T helper-2 phenotype, is responsible for impaired IFN gamma production in mammary tumorbearing mice. *J. Immunol.* 1997;158:280–86.
59. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: Balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* 2010;22:231–37.
60. Italiani P, Boraschi D. From monocyte to M1/M2 macrophages: Phenotype vs. functional differentiation. *Front Immunol.* 2014;5:514.
61. Taylor PR, Gordon S. Monocytes heterogeneity and innate immunity. *Immunity.* 2003;19:2–4.
62. Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, ve ark. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science.* 2008;320:807–11.
63. Hume DA, MacDonald KP. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1receptor (CSF-1R) signaling. *Blood.* 2012;119:1810–20.
64. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(6):349–362.
65. Hopkinson-Woolley J, Hughes D, Gordon S, Martin P. Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *J. Cell Sci.* 1994;107:1159–67.
66. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010;327:656–61.
67. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, ve ark. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of Mouse tissue macrophages. *Nat Immunol.* 2012;13:1118–28.
68. Haldar M, Murphy KM. Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages. *Immunol. Rev.* 2014;262:25–35.
69. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, ve ark. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity.* 2013;38:792–804.
70. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* 2011;12(11):1035–44
71. Doerschuk CM, Downey GP, Doherty DE, English D, Gie RP, Ohgami M, ve ark. Leukocyte and platelet margination within microvasculature of rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 1990;68:1956–61.

72. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5:953–64.
73. Schmieder A, Michel J, Schönhaar K, Goerdts S, Schledzewski K. Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(4):289-97.
74. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 2008;26:421–52.
75. Ley K. The second touch hypothesis: T cell activation, homing and polarization. *F1000Res* 2014;3:37.
76. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol.* 2008;181:5829–35.
77. Janssen WJ, Barthe IL, Muldrow A, Oberley-Deegan RE, Kearns MT, Jakubzick C, et al. Fas determines differential fates of resident and recruited macrophages during resolution of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:547–60.
78. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity.* 2013;38:79–91.
79. Hallam S, Escorcio-Correia M, Soper R, Schultheiss A, Hagemann T. Activated macrophages in the tumour microenvironment – dancing to the tune of TLR and NF- κ B. *J Pathol.* 2009;219(2):143-52.
80. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:23–35.
81. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Bio sci.* 2008;13:453–61.
82. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122:787–95.
83. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000;164:6166–73.
84. Zhang B, Yao G, Zhang Y, Gao J, Yang B, Rao Z. M2-polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerated lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66:1879–86.
85. Schmid MC, Varner JA. Myeloid cells in tumor inflammation. *Vasc Cell.* 2012;4(1):14.
86. Mantovani A, Allavena P, Sozzani S, Vecchi A, Locati M, Sica A. Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin Cancer Biol.* 2004;14:155–60.

87. Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: New and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(11):736-46.
88. Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca, C, ve ark. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation and cancer: How intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1171:59-76.
89. Coskun M, Salem M, Pedersen J, Nielsen OH. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Res*. 2013;76:1-8.
90. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(1):41-51.
91. Coffey PJ, Koenderman L, de Groot RP. The role of STATs in myeloid differentiation and leukemia. *Oncogene*. 2000;19(21):2511-22.
92. Arora L, Kumar, AP, Arfuso F, Chng WJ, Sethi G. The role of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and its targeted inhibition in hematological malignancies. *Cancers (Basel)*, 2018;10(9).pii:E327.
93. Xiong A, Yang Z, Shen Y, Zhou J, Shen Q. Transcription factor STAT3 as a novel molecular target for cancer prevention. *Cancers (Basel)*. 2014;6(2):926-57.
94. Beebe JD, Liu JY, Zhang JT. Two decades of research in discovery of anticancer drugs targeting STAT3, how close are we? *Pharmacol Ther*. 2018;191:74-91
95. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(4):234-48.
96. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun SC., NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2017;2: e17023.
97. Sun SC. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(9):545-58.
98. Li J, Yang F, Wei F, Ren X. The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment. *Oncotarget*. 2017;8(39):66656-67.
99. Lawrence T, Fong C. The resolution of inflammation: Anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(4):519-23.
100. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 9th ed., Philadelphia: Elsevier; 2017.
101. Hatai H, Lepelley A, Zeng W, Hayden MS, Ghosh S. Toll-like receptor 11 (TLR11) interacts with flagellin and profilin through disparate mechanisms. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148987.

102. Hess NJ, Felicelli C, Grage J, Tapping RI. TLR10 suppresses the activation and differentiation of monocytes with effects on DC-mediated adaptive immune responses. *J Leukoc Biol.* 2017;101(5):1245–52.
103. Oldenburg M, Krüger A, Ferstl R, Kaufmann A, Nees G, Sigmund A, et al. TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science.* 2012;337(6098):1111-5.
104. Fukui R, Murakami Y, Miyake K. New application of anti-TLR monoclonal antibodies: Detection, inhibition and protection. *Inflamm Regen.* 2018;38:11.
105. Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Dinarello CA, O'Neill L, Netea MG. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(6):344-57.
106. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005;17(1):1-14.
107. Hedayat M, Netea MG, Rezaei N. Targeting of Toll-like receptors: A decade of progress in combating infectious diseases. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(9):702-12.
108. Kelsh R, You R, Horzempa C, Zheng M, McKeown-Longo PJ. Regulation of the innate immune response by fibronectin: synergism between the III-1 and EDA domains. *PLoS One.* 2014;9(7):e102974
109. Bunt SK, Clements VK, Hanson EM, Sinha P, Ostrand- Rosenberg S. Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol.* 2009;85:996–1004.
110. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:162–74.
111. Mantovani A, Barajon I, Garlanda C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunol Rev.* 2018;281(1):57-61.
112. Kantono M, Guo B. Inflammasomes and Cancer: The Dynamic role of the inflammasome in tumor development. *Front Immunol.* 2017;8:1132.
113. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* 2014;157:1013–22.
114. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal.* 2010;3:cm1
115. Mora J, Weigert A. IL-1 family cytokines in cancer immunity – a matter of life and death. *Biol Chem.* 2016;397:1125–34.
116. Guo B, Fu S, Zhang J, Liu B, Li Z. Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. *Sci Rep* 2016;6:36107.
117. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 2013;14(10): 986-95.

118. White ES, Baralle FE, Muro AF. New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J Pathol.* 2008;216(1):1-14.
119. Insua-Rodríguez J, Oskarsson T. The extracellular matrix in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97, 41-55.
120. Souza ST, Agra LC, Santos CEA, Barreto E, Hickmann JM, Fonseca EJS. Macrophage adhesion on fibronectin evokes an increase in the elastic property of the cell membrane and cytoskeleton: an atomic force microscopy study. *Eur Biophys J.* 2014;43:573–79.
121. De Fougerolles AR, Kotliansky VE. Regulation of monocyte gene expression by the extracellular matrix and its functional implications. *Immunol Rev.* 2002;186:208-20.
122. Sudhakaran PR, Radhika A, Jacob SS. Monocyte-macrophage differentiation in vitro: Fibronectin-dependent upregulation of certain macrophage-specific activities. *Glycoconj J.* 2007;24(1):49-55.
123. Jacob SS, Shastry P, Sudhakaran PR. Monocyte-macrophage differentiation in vitro: modulation by extracellular matrix protein substratum. *Mol Cell Biochem.* 2002;233(1-2):9-17.
124. Hemler ME. VLA proteins in the integrin family: Structures, functions, and their role leukocytes. *Annu Rev Immunol.* 1990;8:365–400.
125. Newman SL, Tucci MA. Regulation of human monocyte/macrophage function by extracellular matrix. Adherence of monocytes to collagen matrices enhances phagocytosis of opsonized bacteria by activation of complement receptors and enhancement of Fc receptor function. *J Clin Invest* 1990;86:703–714.
126. Jiang D, Lim SY. Influence of immune myeloid cells on the extracellular matrix during cancer metastasis. *Cancer Microenviron.* 2016;9(1):45-61.
127. Wolanska KI, Morgan MR. Fibronectin remodelling: Cell-mediated regulation of the microenvironment. *Biochem Soc Trans.* 2015;43(1):122-8.
128. Wang JP, Hielscher A. Fibronectin: How its aberrant expression in tumors may improve therapeutic targeting. *J Cancer.* 2017;25;8(4):674-82.
129. To WS, Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: Distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2011;4:21.
130. Stoffels JMJ, Zhao C, Baron W. Fibronectin in tissue regeneration: Timely disassembly of the scaffold is necessary to complete the build. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013;70:4243–53.
131. Leiss M, Beckmann K, Giros A, Costell M, Fässler R. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20(5):502-7.

132. Schwarzbauer JE, De Simone DW. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(7).pii:a005041.
133. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada, KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2:793–805
134. Pankov R, Cukierman E, Katz BZ, Matsumoto, K, Lin DC, Lin S, ve ark. Integrin dynamics and matrix assembly: Tensin-dependent translocation of $\alpha 5\beta 1$ integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 2000;148:1075–90.
135. Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 2001;114:3583–90.
136. Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:397-419.
137. Baneyx G, Baugh L, Vogel V. Fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5139–43.
138. Krammer A, Lu H, Isralewitz B, Schulten K, Vogel V. Forced unfolding of the fibronectin type III module reveals a tensile molecular recognition switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:1351–56.
139. White ES, Muro AF. Fibronectin splice variants: Understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models. *IUBMB Life* 2011;63(7):538–46
140. Sens C, Huck K, Pettera S, Uebel S, Wabnitz G, Moser M, Nakchbandi IA. Fibronectins containing extradomain A or B enhance osteoblast differentiation via distinct integrins. *J Biol Chem.* 2017;292(19):7745-60.
141. Robertson C. The extracellular matrix in breast cancer predicts prognosis through composition, splicing, and crosslinking. *Exp Cell Res.* 2016;343(1):73-81.
142. Hynes RO. The extracellular matrix: Not just pretty fibrils. *Science.* 2009;326: 1216–19.
143. Wijelath ES, Rahman S, Namekata M, Murray J, Nishimura T, Mostafavi-Pour Z, ve ark. Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain: enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism. *Circ. Res.* 2006;99:853–60
144. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* 2012;196(4):395-406.
145. Wozniak MA, Desai R, Solski PA, Der CJ, Keely PJ. ROCK generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in re sponse to the physical properties of a threedimensional collagen matrix. *J. Cell Biol.* 2003;163:583–95.

146. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, ve ark. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*. 2005;8:241–54.
147. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Ertler JT, ve ark. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009;139:891– 906.
148. Xiong GF, Xu R. Function of cancer cell-derived extracellular matrix in tumor progression. *J Cancer Metasta Treat* 2016;2:357-64.
149. Ylä-tupa S, Haglund C, Mertaniemi P, Vahtera E, Partanen P. Cellular fibronectin in serum and plasma: A potential new tumour marker? *Br J Cancer*. 1995;71(3):578-82.
150. Malik G, Knowles LM, Dhir R, Xu S, Yang S, Ruoslahti E, Pilch J. Plasma fibronectin promotes lung metastasis by contributions to fibrin clots and tumor cell invasion. *Cancer Res*. 2010;70(11):4327-34.
151. Knowles LM, Gurski LA, Engel C, Gnarr JR, Maranchie JK, Pilch J. Integrin α v β 3 and fibronectin upregulate Slug in cancer cells to promote clot invasion and metastasis. *Cancer research*. 2013;73:6175-84.
152. Nam JM, Onodera Y, Bissell MJ, Park CC. Breast cancer cells in three-dimensional culture display an enhanced radioresponse after coordinate targeting of integrin α 5 β 1 and fibronectin. *Cancer research*. 2010;70:5238-48.
153. Mierke CT, Frey B, Fellner M, Herrmann M, Fabry B. Integrin α 5 β 1 facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *Journal of Cell Science*. 2011;124:369-83.
154. Balanis N, Wendt MK, Schiemann BJ, Wang Z, Schiemann WP, Carlin CR. Epithelial to mesenchymal transition promotes breast cancer progression via a fibronectin-dependent STAT3 signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013;288:17954-67.
155. Han SW, Roman J. Fibronectin induces cell proliferation and inhibits apoptosis in human bronchial epithelial cells: Pro-oncogenic effects mediated by PI3-kinase and NF- κ B. *Oncogene*. 2006;25:4341-9.
156. Marom B, Rahat MA, Lahat N, Weiss-Cerem L, Kinarty A, Bitterman H. Native and fragmented fibronectin oppositely modulate monocyte secretion of MMP-9. *J Leukoc Biol*. 2007;81(6):1466-76.
157. McDonald JA, Kelley DG. Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. Release of biologically active fragments. *J Biol Chem.*, 1980;255(18):8848-58.
158. Mantovani A. Macrophages, neutrophils, and cancer: A double edged sword. *New Journal of Science*. 2014;Article ID 271940.

159. Feghali K, Grenier D. Priming effect of fibronectin fragments on the macrophage inflammatory response: Potential contribution to periodontitis. *Inflammation*. 2012;35(5):1696-705.
160. Beezhold DH, Personius C, Fibronectin fragments stimulate tumor necrosis factor secretion by human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 1992;51(1):59–64.
161. Birdsall HH, Porter WJ, Trial J, Rossen RD. Monocytes stimulated by 110-kDa fibronectin fragments suppress proliferation of anti-CD3-activated T cells. *J Immunol*. 2005;175(5):3347-53.
162. Haro H, Crawford HC, Fingleton B, MacDougall JR, Shinomiya K, Spengler DM, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase-3-dependent generation of a macrophage chemoattractant in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest*. 2000;105(2):133-41.
163. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(12).pii:a005058.
164. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Ito Y, Hada Y, et al. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology*. 2005;146(2):790–96.
165. Horwitz M, Benson KF, Person RE, Aprikyan AG, Dale DC. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat Genet*. 1999;23(4):433-6.
166. Abe Y, Bui-Thanh NA, Ballantyne CM, Burns AR. Extra domain A and type III connecting segment of fibronectin in assembly and cleavage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(3):1640-7.
167. Khan MM, Gandhi C, Chauhan N, Stevens JW, Motto DG, Lentz SR, et al. Alternatively-spliced extra domain A of fibronectin promotes acute inflammation and brain injury after cerebral ischemia in mice. *Stroke*. 2012;43(5):1376-82.
168. Lasarte JJ, Casares N, Gorraiz M, Hervás-Stubbs S, Arribillaga L, Mansilla C, et al. The extra domain A from fibronectin targets antigens to TLR4-expressing cells and induces cytotoxic T cell responses in vivo. *J Immunol*. 2007;178(2):748-56.
169. Nieberler M, Reuning U, Reichart F, Notni J, Wester HJ, Schwaiger M, et al. Exploring the role of RGD-recognizing integrins in cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9(9).pii:E116.
170. Ma FJ, Liu ZB, Hu X, Ling H, Li S, Wu J, Shao ZM. Prognostic value of myeloid differentiation primary response 88 and toll-like receptor 4 in breast cancer patients. *PLoS One*. 2014;9(10):e111639.

171. Allen MD, Vaziri R, Green M, Chelala C, Brentnall AR, Dreger S, ve ark. Clinical and functional significance of $\alpha 9\beta 1$ integrin expression in breast cancer: A novel cell-surface marker of the basal phenotype that promotes tumour cell invasion. *J Pathol.* 2011;223(5):646-58.
172. Yao ES, Zhang H, Chen YY, Lee B, Chew K, Moore D, Park C. Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. *Cancer Res.* 2007;67(2):659-64.
173. Huang S, Sinicrope FA. Sorafenib inhibits STAT3 activation to enhance TRAIL-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(3):742-50.
174. Hillion J, Dhara S, Sumter TF, Mukherjee M, Di Cello F, Belton A, ve ark. The high-mobility group A1a/signal transducer and activator of transcription-3 axis: An achilles heel for hematopoietic malignancies? *Cancer Res.* 2008;68(24):10121-7
175. Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther.* 2008;16(4):698-706.
176. Elliott LA, Doherty GA, Sheahan K, Ryan EJ., Human tumor-Infiltrating myeloid cells: Phenotypic and functional diversity. *Front Immunol.* 2017;8:86.
177. Zhang Y, Wang H. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology.* 2012;135(4):268-75.
178. Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, ve ark. Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *J Immunol Methods.* 2004;288(1-2):123-34.
179. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(4):189-95.
180. Mohr A, Fahrenkamp D, Rinis N, Müller-Newen G. Dominant-negative activity of the STAT3-Y705F mutant depends on the N-terminal domain. *Cell Commun Signal.* 2013;11:83.
181. Lambeth LS, Smith CA. Short hairpin RNA-mediated gene silencing. *Methods Mol Biol.* 2013;942:205-32.
182. Matsumoto H, Koo SL, Dent R, Tan PH, Iqbal J. Role of Inflammatory Infiltrates in triple negative breast cancer. *J Clin Pathol.* 2015;68(7):506-10.
183. Lin EY, Pollard JW. Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer.* 2004;90:2053–8.
184. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol.* 2014 Nov;23(1):37-45

185. Schildberger A, Rossmannith E, Eichhorn T, Strassl K, Weber V. Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:697972
186. Nonnemacher MR, Quiterio S, Allen AG, Mele AR, Pirrone V, Wigdahl B. *Biology of Myelomonocytic Cells.* London: IntechOpen; 2017
187. Guo Q, Zhang L, Li F, Jiang G. The plasticity and potential of leukemia cell lines to differentiate into dendritic cells. *Oncol Lett.* 2012 Oct;4(4):595-600.
188. Santegoets SJ, van den Eertwegh AJ, van de Loosdrecht AA, Scheper RJ, de Gruijl TD. Human dendritic cell line models for DC differentiation and clinical DC vaccination studies. *J Leukoc Biol.* 2008;84(6):1364-73.
189. Riddy DM, Goy E, Delerive P, Summers RJ, Sexton PM, Langmead CJ. Comparative genotypic and phenotypic analysis of human peripheral blood monocytes and surrogate monocyte-like cell lines commonly used in metabolic disease research. *PLoS One.* 2018 May 10;13(5):e0197177
190. Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis.* 2012;221(1):2-11.
191. Sawa-Wejksza K, Dudek A, Lemieszek M, Kaławaj K, Kandefer-Szerszeń M. Colon cancer-derived conditioned medium induces differentiation of THP-1 monocytes into a mixed population of M1/M2 cells. *Tumour Biol.* 2018;40(9):1010428318797880.
192. Solinas G, Schiarea S, Liguori M, Fabbri M, Pesce S, Zammataro L, et al. Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: A new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility. *J Immunol.* 2010;185(1):642-52.
193. Estko M, Baumgartner S, Urech K, Kunz M, Regueiro U, Heusser P, Weissenstein U. Tumour cell derived effects on monocyte/macrophage polarization and function and modulatory potential of *Viscum album* lipophilic extract in vitro. *BMC Complement Altern Med.* 2015;15:130.
194. Hollmén M, Roudnicky F, Karaman S, Detmar M. Characterization of macrophage--cancer cell crosstalk in estrogen receptor positive and triple-negative breast cancer. *Sci Rep.* 2015;5:9188
195. Sousa S, Brion R, Lintunen M, Kronqvist P, Sandholm J, Mönkkönen J, et al. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res.* 2015;17:101.
196. Ding J, Guo C, Hu P, Chen J, Liu Q, Wu X, et al. CSF1 is involved in breast cancer progression through inducing monocyte differentiation and homing. *Int J Oncol.* 2016 Nov;49(5):2064-2074.

197. Plesa A, Ciuperca G, Louvet V, Pujo-Menjouet L, Génieys S, Dumontet C, ve ark. Diagnostics of the AML with immunophenotypical data. *Math. Model. Nat. Phenom.* 2006;1(2):104-123
198. Caras I, Tucureanu C, Lerescu L, Pitica R, Melinceanu L, Neagu S, Salageanu A. Influence of tumor cell culture supernatants on macrophage functional polarization: In vitro models of macrophage-tumor environment interaction. *Tumori.* 2011;97(5):647-54.
199. Chen X, Song M, Zhang B, Zhang Y. Reactive oxygen species regulate T cell immune response in the tumor microenvironment. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1580967.
200. Zhang Y, Choksi S, Chen K, Pobezinskaya Y, Linnoila I, Liu ZG. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. *Cell Res.* 2013;23(7):898-914.
201. Shiratori H, Feinweber C, Luckhardt S, Linke B, Resch E, Geisslinger G, ve ark. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Mol Immunol.* 2017;88:58-68.
202. Chimal-Ramirez GK, Espinoza-Sanchez NA, Chavez-Sanchez L, Arriaga-Pizano L, Fuentes-Panama EM. Monocyte differentiation towards protumor activity does not correlate with M1 or M2 phenotypes. *J Immunol Res.* 2016;2016:6031486.
203. Bachstetter AD, Van Eldik LJ. The p38 MAP kinase family as regulators of proinflammatory cytokine production in degenerative diseases of the CNS. *Aging Dis.* 2010;1(3):199-211.
204. Samavati L, Rastogi R, Du W, Hüttemann M, Fite A, Franchi L. STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria. *Mol Immunol.* 2009 May;46(8-9):1867-77.
205. Xie S, Chen M, Yan B, He X, Chen X, Li D. Identification of a role for the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in innate immune cells. *PLoS One.* 2014;9(4):e94496.
206. Gupta P, Barthwal MK. IL-1 β genesis: The art of regulating the regulator. *Cell Mol Immunol.* 2018;15(11):998-1000.
207. Halabi CM, Mecham RP. Elastin purification and solubilization. *Methods Cell Biol.* 2018;143:207-22.
208. Vincent JL, Buchele G, Ospina-Tascon GA. Mechanical Ventilation Clinical Applications and Pathophysiology. Philedelphia: Saunders/Elsevier; 2008.

209. Diaz A, Jimenez S.A. Interferon-gamma regulates collagen and fibronectin gene expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997;29(1):251-260.
210. Casanova EA, Kurt Bürki K, Cinelli P. *Molecular Mechanisms of Pluripotency in Murine Embryonic Stem Cells*. London: IntechOpen; 2011
211. Siavash H, Nikitakis NG, Sauk JJ. Signal transducers and activators of transcription: Insight into the molecular basis of oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(5):298-307.
212. Wan CK, Andraski AB, Spolski R, Li P, Kazemian M, Oh J ve ark. Opposing roles of STAT1 and STAT3 in IL-21 function in CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(30):9394-9.
213. Fransen K, van Sommeren S, Westra HJ, Veenstra M, Lamberts LE, Modderman R ve ark. Correlation of genetic risk and messenger RNA expression in a Th17/IL23 pathway analysis in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20(5):777-82.
214. Feng D, Guo B, Liu G, Wang B, Wang W, Gao G ve ark. FGF2 alleviates PTSD symptoms in rats by restoring GLAST function in astrocytes via the JAK/STAT pathway. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015;25(8):1287-99.
215. Liu X, Xiao Q, Bai X, Yu Z, Sun M, Zhao H ve ark. Activation of STAT3 is involved in malignancy mediated by CXCL12-CXCR4 signaling in human breast cancer. *Oncol Rep.* 2014;32(6):2760-8.
216. Xu M, Song ZG, Xu CX, Rong GH, Fan KX, Chen JY ve ark. IL-17A stimulates the progression of giant cell tumors of bone. *Clin Cancer Res.* 2013;19(17):4697-705.
217. Roth S, Spalinger MR, Müller I, Lang S, Rogler G, Scharl M. Bilberry-derived anthocyanins prevent IFN- γ -induced pro-inflammatory signalling and cytokine secretion in human THP-1 monocytic cells. *Digestion.* 2014;90(3):179-89.
218. Agarwal S, Lakoma A, Chen Z, Hicks J, Metelitsa LS, Kim ES, Shohet JM. G-CSF Promotes Neuroblastoma Tumorigenicity and Metastasis via STAT3-Dependent Cancer Stem Cell Activation. *Cancer Res.* 2015;75(12):2566-79.
219. Dominguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Perez-Maceda B, Gomez-Aguado F, Corcuera MT ve ark. Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin expression on M2-polarized and tumor-associated macrophages is macrophage-CSF dependent and enhanced by tumor-derived IL-6 and IL-10. *J Immunol.* 2011;186(4):2192-200.
220. Zhang X, Blaskovich MA, Forinash KD, Sebti SM. Withacnistin inhibits recruitment of STAT3 and STAT5 to growth factor and cytokine receptors and induces regression of breast tumours. *Br J Cancer.* 2014;111(5):894-902.

221. Wang YZ, Wharton W, Garcia R, Kraker A, Jove R, Pledger WJ. Activation of Stat3 preassembled with platelet-derived growth factor beta receptors requires Src kinase activity. *Oncogene*. 2000;19(17):2075-85.
222. Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijjer W, Schuringa JJ, Renauld JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem*. 2002;277(37):33676-82.
223. Ma MC, Wang BW, Yeh TP, Wu JL, Chung TH, Tsui K ve ark. Interleukin-27, a novel cytokine induced by ischemia-reperfusion injury in rat hearts, mediates cardioprotective effects via the gp130/STAT3 pathway. *Basic Res Cardiol*. 2015;110(3):22.
224. Burnham ME, Esnault S, Roti Roti EC, Bates ME, Bertics PJ, Denlinger LC. Cholesterol selectively regulates IL-5 induced mitogen activated protein kinase signaling in human eosinophils. *PLoS One*. 2014;9(8):e103122.
225. Chun E, Lavoie S, Michaud M, Gallini CA, Kim J, Soucy G ve ark. CCL2 promotes colorectal carcinogenesis by enhancing polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cell population and function. *Cell Rep*. 2015 Jul 14;12(2):244-57.
226. Yi EH, Lee CS, Lee JK, Lee YJ, Shin MK, Cho CH ve ark. STAT3-RANTES autocrine signaling is essential for tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2013;11(1):31-42.
227. Miscia S, Marchisio M, Grilli A, Di Valerio V, Centurione L, Sabatino G ve ark. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signaling through TNFR-1 in human B cells. *Cell Growth Differ*. 2002;13(1):13-8.
228. Nadiminty N, Chun JY, Hu Y, Dutt S, Lin X, Gao AC. LIGHT, a member of the TNF superfamily, activates Stat3 mediated by NIK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359(2):379-84.
229. Gotoh A, Takahira H, Mantel C, Litz-Jackson S, Boswell HS, Broxmeyer HE. Steel factor induces serine phosphorylation of Stat3 in human growth factor-dependent myeloid cell lines. *Blood*. 1996;88(1):138-45.
230. Ysebrant de Lendonck L, Eddahri F, Delmarcelle Y, Nguyen M, Leo O, Goriely S, Marchant A. STAT3 signaling induces the differentiation of human ICOS(+) CD4 T cells helping B lymphocytes. *PLoS One*. 2013;8(7):e71029.
231. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med*. 2012;209(7):1241-53.
232. Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor- mediated cell growth in vitro. *J Clin Invest*. 1998;102(7):1385-92.

233. Thomas PE, Peters-Golden M, White ES, Thannickal VJ, Moore BB. PGE(2) inhibition of TGF-beta1-induced myofibroblast differentiation is Smad-independent but involves cell shape and adhesion-dependent signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(2):L417-28.
234. Ho HH, Ivashkiv LB. Role of STAT3 in type I interferon responses. Negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation. *J Biol Chem*. 2006 May 19;281(20):14111-8.
235. Fung MM, Rohwer F, McGuire KL. IL-2 activation of a PI3K-dependent STAT3 serine phosphorylation pathway in primary human T cells. *Cell Signal*. 2003;15(6):625-36.
236. Sica A. Role of tumour-associated macrophages in cancer-related inflammation. *Exp Oncol* 2010;32(3):153–8
237. Schust J, Sperl B, Hollis A, Mayer TU, Berg T. Stattic: A small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem Biol*. 2006;13(11):1235-42.
238. Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ. Short hairpin RNA (shRNA): Design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol*. 2010;629:141-58.
239. Li CH, Xu LL, Jian LL, Yu RH, Zhao JX, Sun L ve ark. Stattic inhibits RANKL-mediated osteoclastogenesis by suppressing activation of STAT3 and NF- κ B pathways. *Mol Carcinog*. 2018;57(4):522-535.
240. Kumra H, Reinhardt DP. Fibronectin-targeted drug delivery in cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;97:101-10.
241. Han Z, Lu ZR. Targeting Fibronectin for cancer imaging and therapy. *J Mater Chem B*. 2017;5(4):639-654.
242. Wu TC, Xu K, Martinek J, Young RR, Banchereau R, George J ve ark. IL1 receptor antagonist controls transcriptional signature of inflammation in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 2018;78(18):5243-5258.
243. Dinarello CA. An interleukin-1 signature in breast cancer treated with interleukin-1 receptor blockade: Implications for treating cytokine release syndrome of checkpoint inhibitors. *Cancer Res*. 2018;78(18):5200-5202.
244. Litmanovich A, Khazim K, Cohen I. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of cancer and its potential as a therapeutic target in clinical practice. *Oncol Ther* 2018;6:109–127.
245. Godwin P, Baird AM, Heavey S, Barr MP, O'Byrne KJ, Gately K. Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy. *Front Oncol*. 2013;3:120.

8. EKLER

EK 1. Tez Çalışması ile ilgili etik kurul izni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -923

04 Eylül 2014

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 03.09.2014 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2014/13
Proje No : GO 14/438 (Değerlendirme Tarihi 03.09.2014)
Karar No : GO 14/438 - 30

Üniversitemiz Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Güneş ESENDAĞLI'nın sorumlu araştırmacısı olduğu Uzm.Bio.Gürcan TUNALI'nın tezi olan GO 14/438 kayıt numaralı ve "**Meme Kanseri Hücreleri Tarafından Üretilen Fibronektinin Miyeloid Hücre Karakteri Üzerine Etkisi**" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | | |
|---|---------|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | İZİNLİ | 9 Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) | GÖREVLİ | 10. Prof. Dr. Cansın Saçkesen (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye) | İZİNLİ | 11. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye) | İZİNLİ | 12. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye) | İZİNLİ | 13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | İZİNLİ | 14. Prof. Dr Leyla Dinç (Üye) |
| İZİNLİ | | |
| 7. Prof. Dr. Songül Vaizoğlu (Üye) | İZİNLİ | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | İZİNLİ | 16. Av. Meltem Onurlu (Üye) |

EK 3. Dijital Makbuz

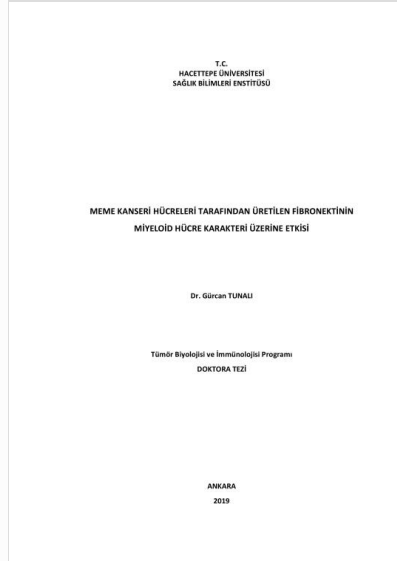


Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Gürcan Tunalı
Ödev başlığı: Meme Kanseri Hücreleri Tarafından..
Gönderi Başlığı: Meme Kanseri Hücreleri Tarafından..
Dosya adı: Gurcan_TUNALI_-_Doktora_Tezi.p...
Dosya boyutu: 28.46M
Sayfa sayısı: 239
Kelime sayısı: 52,999
Karakter sayısı: 343,422
Gönderim Tarihi: 24-Nis-2019 02:43PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1118257423



EK 4. Tez datasının içeren bilimsel toplantılar ve projeler

Projeler:

“Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücreleri ve Miyeloid Hücreler Arasındaki IL-1 β , Elastaz-2 ve Fibronektin Aracılı Pozitif Geri-besleme Mekanizmasının Kronik İnflamasyona Katkısı” 116Z997 Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) – Kimya Biyoloji Araştırma Grubu (**Proje Yürütücüsü**), Temmuz 2017 – Aralık 2018

“Meme Kanseri Hücreleri Tarafından Üretilen Fibronektinin Miyeloid Hücre Karakteri Üzerine Etkisi” 113Z923 Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Kimya Biyoloji Araştırma Grubu (**Bursiyer**), Nisan 2014 – Nisan 2015

Sözel Sunumlar:

Tunali G. and Esendagli G. (2014) The Effect of Breast Cancer Cell Lines on Myeloid Maturation and Differentiation. *2nd Uluslararası Moleküler İmmünoloji ve İmmünojenetik Kongresi (MIMIC-II)*, Antalya, Ref. : 13, P.49

Tunali G. and Esendagli G. (2013) Meme Kanseri Hücrelerinin Miyeloid Hücre Farklılaşması Üzerine Etkisi *22. Ulusal İmmünoloji Kongresi*, İzmir, S-012, Ref. No: 37, P.85

Poster Sunumları:

Tunali G. and Esendagli G. (2017) Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücreleri Tarafından Uyarılan Miyeloid Hücrelerde STAT3 Aktivasyonunun IL-1 β Üretimi Üzerine Etkisi. *24. Ulusal İmmünoloji Kongresi*, İstanbul, P-50, P.52

Tunali G. and Esendagli G. (2016) Myeloid Cells Under The Influence of Basal-like Breast Cancer: A Possible Link Between, IL-1 β , fibronectin and STAT3. *3rd Uluslararası Moleküler İmmünoloji ve İmmünojenetik Kongresi (MIMIC-III)*, Antalya, P-0160, P.68

Tunali G. and Esendagli G. (2015) Fibronectin Production in Basal-like Breast Cancer Cells is Regulated by Pro-inflammatory Cytokines and May Influence Myeloid Cell Maturation. 4. *Avrupa İmmünoloji Kongresi*, Viyana, Avusturya, PB-13.01, P.131

Tunali G. and Esendagli G. (2015) Pro-inflamatuar Sitokinlerin Varlığında Meme Kanseri Hücrelerinde Fibronektin Üretimi ve Miyeloid Hücre Olgunlaşması Üzerine Etkisi. 23. *Ulusal İmmünoloji Kongresi*, Antalya, PS-053, P.87

Tunali G. and Esendagli G. (2014) Fibronectin production in breast cancer cells may influence myeloid cell maturation. *Moleküler Biyoloji Derneği 3. Uluslararası Kongresi*, İzmir, P-122, P.153



9. ÖZGEÇMİŞ

Gürcan Tunali (Araştırma Görevlisi, 2014-2018)

Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı, Sıhhiye/Ankara, Türkiye

E-mail: gurcantunali@gmail.com

Eğitim

- 2012 - 2019 Doktora, Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı, Ankara
- 2010 - 2012 Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı, Ankara
- 2006 - 2010 Lisans, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

Uluslararası Deneyimler

Côte d'Azur Üniversitesi, Valrose Biyoloji Enstitüsü (iBV), Prof. Dr. Ellen Van Obberghen-Schilling (EVO) Araştırma Ekibi, Nice, Fransa (Ekim 2017 – Ocak 2018)
(Misafir Araştırmacı)

Charité-Universitätsmedizin, Campus Virchow-Klinikum, Over Kanseri Tümör Bankası, Berlin, Almanya (Temmuz 2009 – Eylül 2009) **(Stajyer)**

Yayınlar

Tunali G., Esendağlı G. Kanser İmmünoterapisinde Sitokinler, Erten Yurdagül G, editör. Kanser İmmünolojisi. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2018. p.37-44. (Kitap Bölümü)

Sarmadi P., **Tunali G.** Esendagli G., Atypical chemokine receptors in cancer, Acta Medica, 5, 79-86, 2016. (Derleme)

Tunali G., Dogan A.L. The effect of inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway on receptor tyrosine kinase expression in breast cancer cells, FEBS J., 283 (Suppl. 1), 226, 2016. DOI: 10.1111/febs.13808 (Bildiri Özeti)

Sarmadi P., **Tunali G.** Esendagli-Yilmaz G., Yilmaz K.B., Esendagli G., CRAM-A indicates IFN-gamma-associated inflammatory response in breast cancer, Mol Immunol., 68 (2 Pt C), 692-8, 2015. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.10.019

Turhan N., Esendagli G., Ozkayar O., **Tunali G.**, Sokmensuer C., Abbasoglu O. Co-existence of Echinococcus granulosus infection and cancer metastasis in the liver correlates with reduced Th1 immune responses, Parasite Immunol., 37, 16-22, 2015. DOI: 10.1111/pim.12152