Araştırma

# EMG, MAPK ve inflamasyona yakından bakış: Fare embriyonik kök hücre, somatik ve kanser hücrelerinde ne farklıdır?

## CLOSE LOOK IN EMT, MAPK AND INFLAMMATION: WHAT DIFFERS BETWEEN MOUSE EMBRYONIC STEM, SOMATIC AND CANCER CELLS?

**Fatih OLTULU[1], Berrin ÖZDIL[2], Çevik GÜREL[3], Eda AÇIKGÖZ[4], Duygu ÇALIK KOCATÜRK[1], Yasemin ADALI[1], Ayşegül UYSAL[1], Altuğ YAVAŞOĞLU[1], Gülperi ÖKTEM[1], Hüseyin AKTUĞ[1]**

[1] Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir
[2] Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Isparta
[3] Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa
[4] Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Van

**ÖZ**

**Amaç:** Yaşam; başlangıç, hayatta kalma ve ölümü içeren hücrelerin devamlı olan döngüsünden oluşmaktadır. Hücreler devamlı olarak bölünür, farklılaşır ve somatik hücreleri oluştururlar. Somatik hücreler de belli bir noktada kanser hücrelerini oluşturup kök hücreler ile benzer karakteristikleri paylaşabilmektedirler. Bu dönemlerdeki süreçler, somatik hücrelerde anormalliğe eğilimi ve kanser hücrelerine dönüşümü tanımlamak için önemlidir. Kanserin ortaya çıkışını ve ilerleyişini kontrol etmek için, hayatta kalma mekanizmaları özellikle de epitelyal-mezenkimal geçiş (EMG) ve iltihaplanma önemlidir. EMG, hem embriyonik gelişim aşamalarında, hem de kanser ilerlemesinde ortaya çıkar ve bu süreç özellikle moleküler temelli tedavi için terapötik hedef olabilir.

**Gereç ve Yöntem:** EMG, MAP-Kinaz ve inflamasyon yolaklarının gen ekspresyon seviyesinde karşılaştırılmasında kanser hücreleri temsili için fare skuamöz akciğer kanseri hücreleri (SqLCCs), somatik kökenli hücre örneği olarak fare derisi fibroblastları (MSF'ler) ve embriyonik kök hücre olarak da fare embriyonik kök hücreleri (mEKH'ler) kullanılmıştır. ERK 1/2, Vimentin ve Twist'in immünofloresan boyama protein düzeyleri aynı hücrelerde karşılaştırılarak incelenmiştir.

**Bulgular:** MSF'lerde ve SqLCC'lerde ERK1/2 protein ekspresyonu benzer iken mEKH'lerde ekspresyonu en düşük bulunmuştur. Ayrıca, Twist ve Vimentin ifadesi istatistiksel olarak üç hücre hattında farklı çıkmıştır. EMG'nin gen ekspresyon profiline ve MAPK sinyal yolağının desteklediği inflamasyona göre, özellikle Sparc, Vimentin, Mapksp1 ve Il24 gibi belirgin genlerde ekspresyon profilleri birbirinden çok farklı bulunmuştur.

**Sonuç:** Üç farklı hücre hattı hem gen hem de protein ekspresyonunda farklı özellikler göstermiştir. Bu nedenle, bu moleküller terapötik hedef belirlenmesinde potansiyel itici güç olabilir.

**Anahtar Sözcükler:** Kanser, Epitelyal mezenkimal geçiş, inflamasyon, MAPK, Embriyonik kök hücre

**Fatih OLTULU**
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Bornova-İZMİR
https://orcid.org/0000-0001-6475-642X

DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2018;32(3): 201-212
doi: 10.5505/deutfd.2018.16768

**Gönderim tarihi:** 07.06.2018
**Kabul tarihi:** 26.07.2018

**ABSTRACT**

**Objective**: Life is a continuous cycle of the cells, composed of beginning, surviving and death. Cells keep dividing, differentiate and turn into somatic cells. The somatic cells at some point can give way to cancer cells and share characteristics of stem cells. The processes during these periods are important for identifying the tendency to abnormality and transformation to the cancer cells in somatic cells. To control emergence and progress of the cancer, mechanisms which take part in the survival become significant, especially EMT and inflammation. EMT occurs in both embryonic developmental stages and cancer progression and molecular basis of this process can be the therapeutic target for cure.

**Material and Method:** For cancer representation mouse squamous lung cancer cells (SqLCCs), for somatic origin mouse skin fibroblasts (MSFs) and for embryonic stem cell mouse embryonic stem cells (mESCs) were used for comparison of three signaling pathways (EMT, MAPK and inflammation) at the gene expression level. Immunofluorescence staining protein levels of ERK 1/2, Vimentin and Twist were compared.

**Results:** ERK1/2 protein expression similar in MSFs and SqLCCs while mESCs expression wasthe lowest. Besides, Twist and Vimentin expression statistically different in three. According to gene expression profiling of the EMT and inflammation supported by the MAPK signaling pathway are a far cry from each other at prominent genes especially Sparc, Vimentin, Mapksp1 and Il24.

**Conclusion:** Three different cell linages showed different pattern both in gene and protein expression. Therefore, these molecules can be the potential driving force for therapeutic target.

**Keywords:** Cancer, epithelial- mesenchymal transition, inflammation, MAPK, embryonic stem cell

Embriyonik kök hücreler (EKH), embriyonik gelişim sırasında memeli blastosistinin iç hücre kitlesinden (İHK) elde edilmektedirler. Somatik hücrelerden farklı hücre döngüsü mekanizmaları içeren bir kompleks gen ifadelerinin programı tarafından yönetilen bu hücreler, kendi kendini yenileme kapasiteleri ve pluripotensi özellikleri ile karakterize edilir (1). Bu karakteristik özelliklerin yanı sıra, üç germ yaprağındaki (endoderm, mezoderm ve ektoderm) hücrelere dönüşebilen ve çoklu bölünebilen EKH'ler, birçok bilimsel araştırma için önemli kaynağı oluşturmaktadırlar (2). Hızlı proliferasyon oranı gibi kanser hücreleri ve EKH'lerin benzer özellikleri nedeniyle kök hücre çalışmaları, kanser biyolojisinin analizi için vazgeçilmez bir yer tutmaktadırlar (3). İnsan hayatı için büyük bir tehdit oluşturduğundan ve bu yüzyılda insan ölümlerinin başta gelen sebeplerinden biri olduğundan dolayı kanser, toplum sağlığı açısından dünya çapında sağlık problemlerinden birini oluşturmaktadır (4). Somatik hücreler, EKH'ler ve kanser hücreleri farklı amaçlar için aynı biyolojik süreçleri kullanabilirler. Bunun bir örneği, somatik hücreler için yara iyileşmesinde, farklı hücre tiplerini oluşturma ve organogenezis için EKH'lerde ve kanser hücreleri tarafından metastaz yapabilmek için kanser hücrelerinde kullanılan epitelyal mezenkimal geçiştir (EMG) (5). EMG, normal olarak bazal membranı ile bazal yüzeyine bağlanan polarize epitel hücresinin, birçok biyokimyasal ve moleküler değişime uğraması sonucunda hücre polaritesi ve hücreler arası bağlantılarda meydana gelen değişimler ile bir mezenkimal hücre fenotipini edindiği biyolojik bir süreçtir (6,7). EMG geleneksel olarak göç kapasitesi, invazivite, artmış apoptotik direnç ve ekstrasellüler madde (ESM) bileşenlerinin artan üretimi gibi özelliklere sahiptir (8). Kadherinlerin epitelyal-kaderin (E-kaderin) ve nöral-kaderin (N-kaderin) olarak değişimi, EMG sürecinin tipik bir göstergesidir (9). Ancak, embriyonik ve tümörijenik EMG'ler arasındaki ana fark, tümörijenik EMG kullanan anormal hücrelerin bu süreçte normal büyüme düzenleyici sinyallere karşı duyarlılığını yitirmesidir (10). Örnek olarak, transforming growth factor-β (TGF-β), kanser metastazında gözlenen güçlü bir EMG uyarıcısıdır (11). EMG'deki TGF-β sinyal yolu, hem Smad-bağımlı hem de Smad-bağımsız yollarla düzenlenir (12). Smad yolu TGF-β sinyaline özgü olsa da, Smad bağımsız yolu, EMG'yi uyarmak için TGF ile işbirliği yapan

Ras ve Wnt dahil olmak üzere başka yollarla da aktive edilebilir (13). TGF-β sinyalinin EMG cevabı, E-kaderin gibi epitelyal proteinleri kodlayan genlerin (Snail 1 (Snai1), Slug (Snai2), Zeb1 ve Zeb2 gibi bağlayıcı proteinler) inaktivasyonu ve diğer bağ proteinleri ve N-kaderin ve vimentin dahil olmak üzere mezenkimal proteinleri kodlayan genlerin aktivasyonunu başlatan transkripsiyonel yeniden programlama ile oluşmaktadır (14). Metastatik dokular bir epitel fenotipi sergilediklerinden, EMG hücrelerinin apikobazal polarizasyon ve birleşme komplekslerinin yeniden ifadeleri ile mezenkimal epitelyal geçişi (MEG) göstermesi gerekir. MEG, metastatik hücrelerde tekrarlayan E-kaderin sekresyon ve epitelyal fenotip edinimi ile karakterize, EMG karşıtı olarak düşünülebilmektedir. MEG süreci, primer tümör dokusundan sekonder tümör dokusuna göç eden bu hücrelerin kolonizasyonu ve sağkalımı ile ilgili bir olgudur (15). Bu açıdan bakıldığında, EMG ve MEG, birbirlerinin tersi olarak çalışıyor gibi görünseler de, tümör oluşumunda, metastaz ve invazyon süreçlerinde birlikte çalıştıkları kabul edilmektedir.

Son yirmi yıldaki çalışmalar, inflamasyon aracılı organ fibrozis ve kanser arasındaki ilişkiyi düzenleyen moleküler yolakları anlamamıza önemli bir katkı sağlamıştır ve bu dejeneratif hastalıkların ortak bağlantısı olan EMG bu çalışmaların temel unsurlarından birini oluşturmaktadır (16). İnflamasyon aracılı organ fibrozisi ve kanser üzerine yapılan bu çalışmalar, patolojik EMG'lere giden yolların ve bu yoldaki oyuncuların aynı olduğunu göstermiştir. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) ve hipoksi birlikte, Snail aktivitesinin farklı mekanizmaların indüksiyonu ile nükleer faktör kappa beta (NF-κβ) aktivasyonunun oluşumunun merkezinde rol oynamasına benzer şekilde hem kanser hem de fibroziste EMG'yi tetiklemektedirler (17). Buna ek olarak, makrofajlar ve düzenleyici T hücreleri gibi immün hücrelerin tümör mikroçevresindeki TGF-β1'in hücresel kaynaklarını temsil ettiği düşünülürse, TGF-β'nin ile indüklenen EMG'nin kanser ve iltihaplanma arasında bir bağlantı olduğu sonucuna varılabilmektedir (18). Ayrıca, tümör mikroçevresindeki diğer inflamatuar sitokinler ve büyüme faktörleri EMG oluşumunu desteklemektedir (19). Ayrıca, Snail, Slug ve Twist gibi EMG mediatörleri aynı zamanda kanser kök hücrelerinin köklülük özelliğinde de etkili olmaktadırlar (20). Bu nedenlerle EMG, tümör ilerlemesine neden olan mikroçevresel değişikliklerle inflamasyon ve kanserden sorumludur (21). Moleküler kanıtlara ek olarak, epidemiyolojik ve klinik araştırmalar, inflamatuar yanıtların, tümör başlangıcı ve metastaz gibi, tümör gelişiminin farklı aşamalarıyla ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Primer tümör alanındaki lokal inflamatuar faktörler ve makrofajlar, EMG'den bağımsız olarak dolaşıma katılan tümör hücrelerinin kapasitesini artırdığı görülmektedir (22). Böylelikle inflamasyon kanser göstergesi olarak listelenmeye başlamıştır (23).

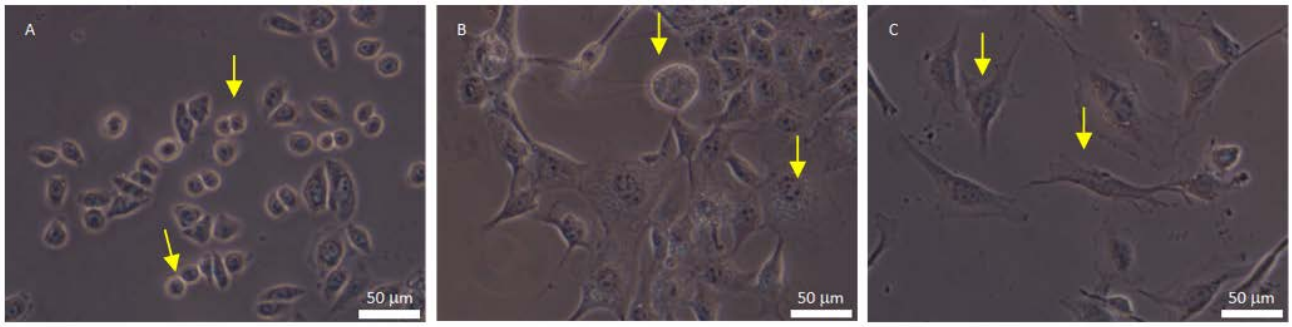
Kanser, EMG ve inflamasyon ile ilgili başka bir yolak da, mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK) sinyal yolağıdır. Doğal ve adaptif immünolojik yanıtlar gibi birçok fizyolojik süre ile ilişkili olan MAPK sinyal yolağı, proliferasyon, farklılaşma, metabolizma, hayatta kalma, apoptoz gibi hücresel süreçlerin geniş bir yelpazesini koordine etmektedir (24). Bu hücresel süreçlere ek olarak, normal MAPK / ERK fonksiyonu, ubikuitinasyon aracılı hücre döngüsü aktivitesi için gerekli olan proteinlerin degradasyonu ile tümör baskılanmasında önemlidir (25). Buna rağmen, MAPK'ların anormal aktivasyonu, prostat benign tümörleri modelindeki normal fibroblastlarda gösterildiği gibi, hücre döngüsü sırasında progresyon için gerekli olan proteinlerin parçalanmasıyla sonuçlanır. MAPK'lerin bu ikili etkilerinden hangisinin, sinyalin yoğunluğuna ve sinyalin anormal olarak aktive edildiği bağlam veya dokuya bağlı olduğu bilinmemektedir (26). MAPK / ERK'in kanserin başlangıcında ve ilerlemesinde ilişkili olduğu birçok farklı yolak vardır. Bunların en bilinenleri Raf / Ras / MAPK yolağıdır. Ras'ın insan kanserinde en yaygın mutasyon olması nedeniyle bu yolun disregülasyonu kanserde en sık rastlanan olaylardan biridir (27). MAPK'ların ilişkili olduğu başka bir süreç de EMG'dir (28). MAPK sinyal yolağı üyeleri (özellikle p38), Smad'dan bağımsız olarak TGF β ile indüklenen EMG için temel düzenleyicilerdendirler. MAPK / ERK sinyal yolağı, E-kaderin ve vimentin gibi proteinler üzerinden hareket ederek, hücre-hücre bağlantılarının yok edilmesinde ve hücre hareketliliğinin arttırılmasında önemli rol oynamaktadır (11, 28).

Olgun vücut hücreleri, embriyonik kök hücrelerin sahip olduğu özelliklerin çoğunu kaybeder, mikroçevreleriyle uyum içinde yaşar ve zaman geldiğinde ölürler. Ancak kanser hücreleri ve kanser kök hücreleri, Peter Pan ile yaramaz ve büyümeyi reddeden kayıp çocuklara benzetilebilir. Kanser hücrelerinde up-regüle edilmiş moleküllerden, özellikle vücut hücrelerinde down-regüle edilenlerin hedeflenmesi, planlanan tedavi protokolünden maksimum yanıt alınırken, yan etkilerin en aza indirgenmesi anlamına gelir. Sinyal yolakları arasından, EMG, MAPK ve inflamatuar yolaklar embriyogenez ve tümör oluşumunda ortak olarak kritik rol oynamaktadırlar. EMG, MAPK ve inflamatuar yolakları iyi tanımlanmış olmalarına rağmen, normal hücreler, embriyonik kök hücreler ve kanser hücrelerinde bu yolakları ifade eden genlerin nasıl değiştiği konusundaki bilgimiz büyük ölçüde sınırlıdır. Normal hücrelerde, embriyonik kök hücrelerde ve kanser hücrelerinde genlerin ifadelerindeki değişimler hakkında daha iyi bilgi, embriyonik gelişimi ve kanser oluşum süreçlerini anlamak için çok önemlidir. Bu çalışmada, normal hücrelerde, embriyonik kök hücrelerde ve kanser hücrelerinde farklı olarak ifade edilen genleri tanımlamak için RT-PCR ve immünofloresan boyama uygulanmıştır. Bu çalışmada embriyogenez süreci ve tümör arasındaki ortak sinyal yolakları ve ilişkili gen gruplarının belirlenerek, embriyogenez ve tümör oluşumları arasındaki ortak sinyal yolaklarını hedef alan yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine katkıda bulunması beklenmektedir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hücre Kültürü

Çalışmamızda EMG, MAPK ve inflamasyon mekanizmalarını embriyonik kök hücre, kanser hücresi ve somatik hücre açısından incelemek için hücre kültürü yapılmıştır. Kontrol grubu olarak MSF'leri (ATCC: CRL-2017), deney grupları olarak SqLCC'leri (ATCC: CRL-1453 KLN-205) ve mEKH'leri (Celprogen Torrance, CA, ABD) kullanılmıştır (Şekil 1).




*Şekil 1: A) mEKH B) SqLCC ve C) MSF 'lerin faz kontrast mikroskop görüntüleri.EKH'ler nükleolusu belirgin büyük nükleusa sahip hücrelerdir. SqLCC'ler şekilleri oldukça düzensiz, büyük nükleuslu hücrelerdir. MSF'ler merkezi yerleşimli oval veya yuvarlak nükleusa sahip iğ şeklinde hücrelerdir.MSF'ler ile karşılaştırıldığında mEKH ve SqLCC'lerde nükleus stoplazma oranı artmıştır.*

MSF hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS) içeren McCoy's 5A besi yeri içerisinde büyütülürken, SqLCC' ler %10 FBS, %5 L-glutamin ve %5 Penisilin streptomisin içeren DMEM besi yerinde büyütülmüştür. mEKH kültürü için, serum ve antibiyotik içeren fare embriyonik kök hücre büyüme besi yeri kullanılmıştır. Deneylerdeki tüm gruplar için, pasaj 3-6 arasındaki hücreler kullanılmış olup, 6. pasajdan sonra, mEKH'nin farklılaştığı varsayılıp deneylerde kullanılmamıştır.

### RT-PCR

Gen profilleme için üç hücre hattından RT-PCR için RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için, büyüme ortamına ekilen hücreler bir gün sonra yüzeyden kaldırıldı ve 1X Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) ile yıkandı. Gruplar

arasında gen ifadesindeki farklılıklar "Çoklu Plaka Analizi" programı kullanılarak belirlenmiştir. Bu programda, gen kopya sayısını belirlemek için "mutlak nicelik", daha sonra üç farklı kontrol geni (β-aktin, GAPDH, G6PDX) ifadelerine göre normalize edilmiş ve "göreceli nicelik" ifadeleri üzerinden gruplar arası istatistiksel analiz için t-test yapılmıştır.

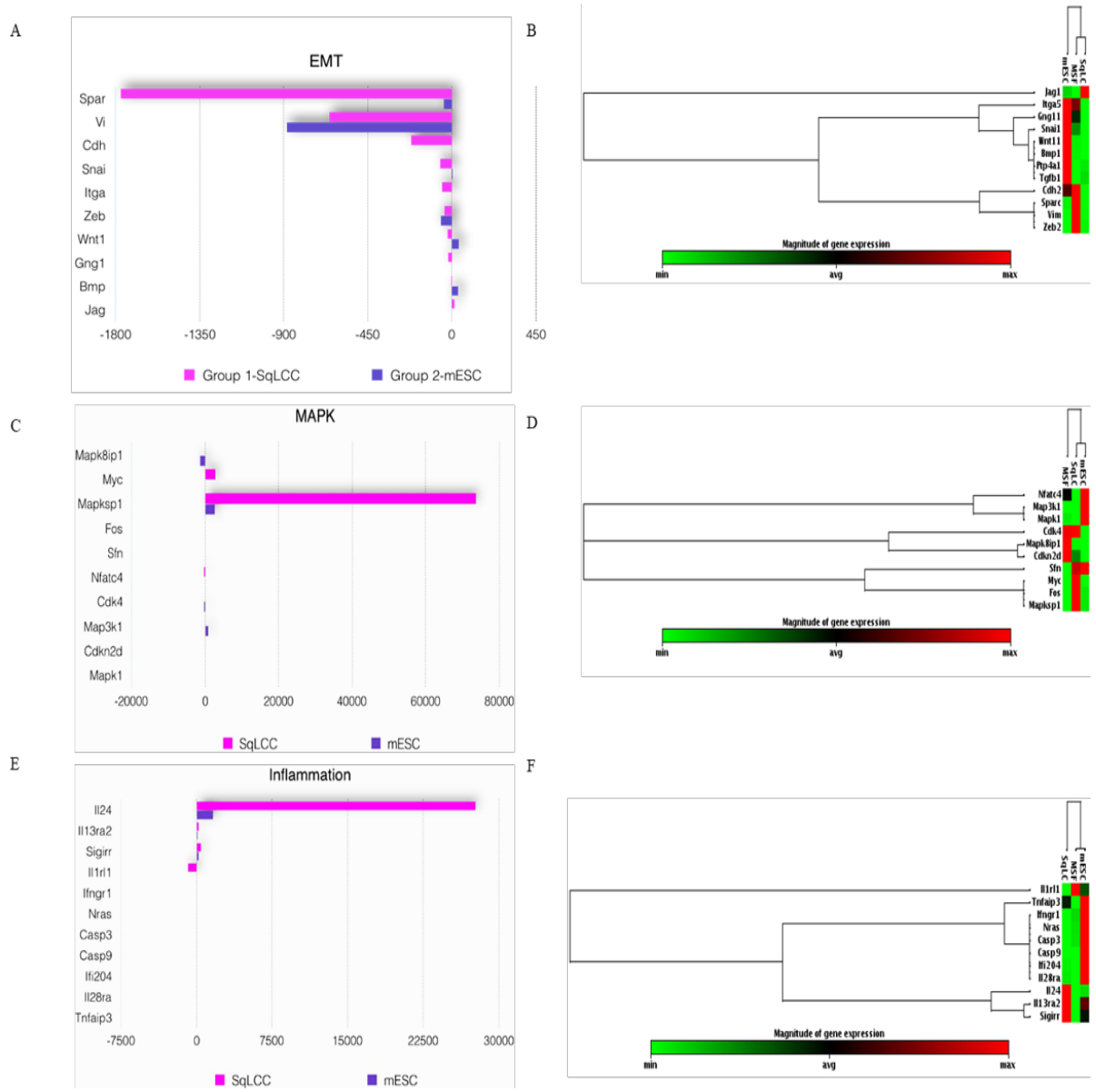
**İmmünofloresan Boyama**

ERK 1/2, Vimentin ve Twist proteinlerinin karşılaştırılması için immünofloresan boyama yapılmıştır. 16 saatlik inkübasyondan sonra, 15 mm çaplı yuvarlak lameller üzerinde büyütülen hücreler %4 paraformaldehid ile sabitlenmiştir. Hücreler boyamadan önce 15 dakika %0.1 Triton-X100 çözeltisi ile geçirgen hale getirilmiş ve üç kez 1X PBS ile durulanmıştır. Daha sonra, hücreler bir saat süreyle spesifik olmayan bağlantıları önlemek için %1 Sığır Serum Albumin (bovin serum albümin-BSA) solüsyonu ile oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hücreler, PBS içinde %1 BSA ile 1/100 seyreltilen birincil antikor ile +4°C' de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bunu takiben hücreler, oda sıcaklığında bir saat boyunca %1 BSA içerisinde 1/200 oranında seyreltilmiş FITC sekonder antikor (anti-tavşan Bios) ile inkübe edilmiştir. Kapama işlemi için DAPI içeren kapama ortamı (Santa Cruz) kullanılmıştır.

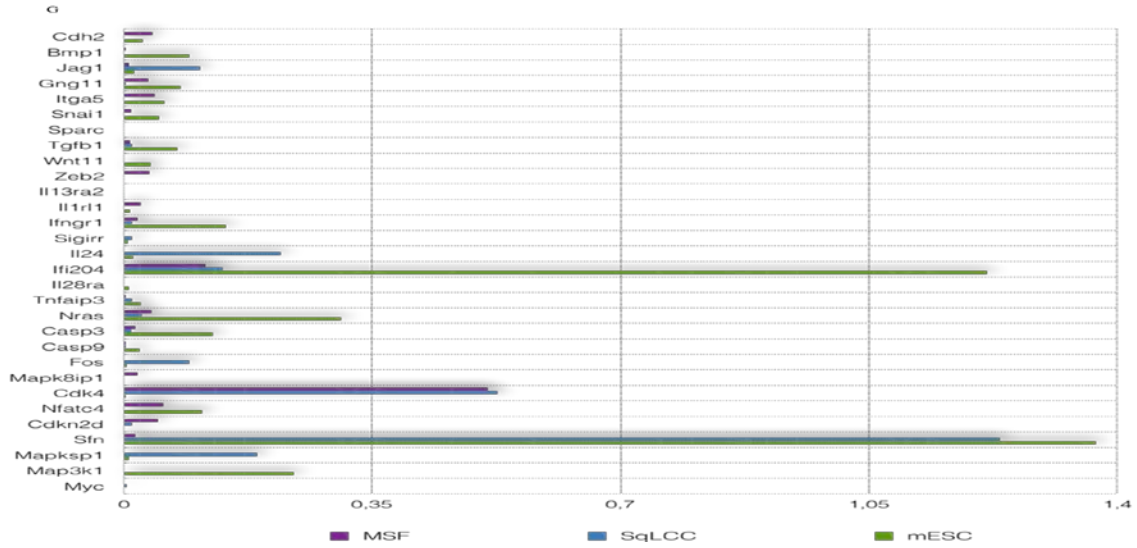
**BULGULAR**

Genlerin ve proteinlerin farklı ifadesi, hücre kaderini belirler ve çeşitli hücreler karakterlerini korur. Bu şemada, MSF'ler, SqLCC'ler ve mEKH'lerde EMG, MAPK ve inflamasyonla ilişkili genler arasındaki ekspresyonel benzerlikleri ve farklılıkları karşılaştırılmıştır. Sparc ve kaderin genleri SqLCC'lerde belirgin olarak farklı ve düşük bulunuştur. (Şekil 2-A, B ve Şekil 3). Vimentin geni her iki grupta da anlamlı olarak düşüktür. Snail, Itga, Wnt1 ve Gng1 genleri SqLCC'lerde düşüktür. Zeb geni her iki hücre hattında da düşük olsa da bu durum mEKH'lerde daha belirgin görülmektedir (Şekil 2-A, B ve Şekil 3 ). SqLCC'lerin tam tersi olarak Snai1, Itga5, Wnt11, Gng11 genlerinin mEKH'lerde artmış olduğu görülmüştür. Bmp1, Jag1, Tgfb1 genleri her iki hücre hattında da artmış olmakla olmakla beraber Bmp1 geni artışı mEKH'ler için özellikle belirgindir (Şekil 2-A, B ve Şekil 3). Myc ve Mapksp1 genlerinin SqLCC'lerde daha baskın ve belirgin olarak artmış olduğu açıktır (Şekil 2-C, D ve Şekil 3). Maapk8ip1, Cdk4, Cdkn2d genleri mEKH'lerde belirgin düşük bulunmuştur (Şekil 2-C, D ve Şekil 3). Fos ve Sfn genleri SqLCC'lerde pozitif olmakla beraber, Sfn geninin SqLCC'ler ve mEKH'lerde benzer değerlerde olduğu görülmüştür. Nfatc4 geni SqLCC'lerde azalmıştır (Şekil 2-C, D ve Şekil 3). Il24, Il13ra2, Sigirr genleri her iki hücre hattında da belirgin olarak artmıştır, fakat Il24 geninin artışı SqLCC'ler için daha belirgindir (Şekil 2-E, F ve Şekil 3). Ifngr1, Nras, Casp3, Casp9, Ifi204, Il28ra ve Tnfaip3 genleri mEKH'lerde artmıştır. Ifi204, Il28ra ve Tnfaip3 genleri SqLCC'lerde de artmış olmasına rağmen, bu hücrelerdeki artış mEKH'lerdekinden daha düşük düzeydedir. Ifngr1, Nras, Casp3 ve Casp9 genleri SqLCC'lerde belirgin olarak daha düşük düzeylerdedir (Şekil 2-E, F ve Şekil 3).

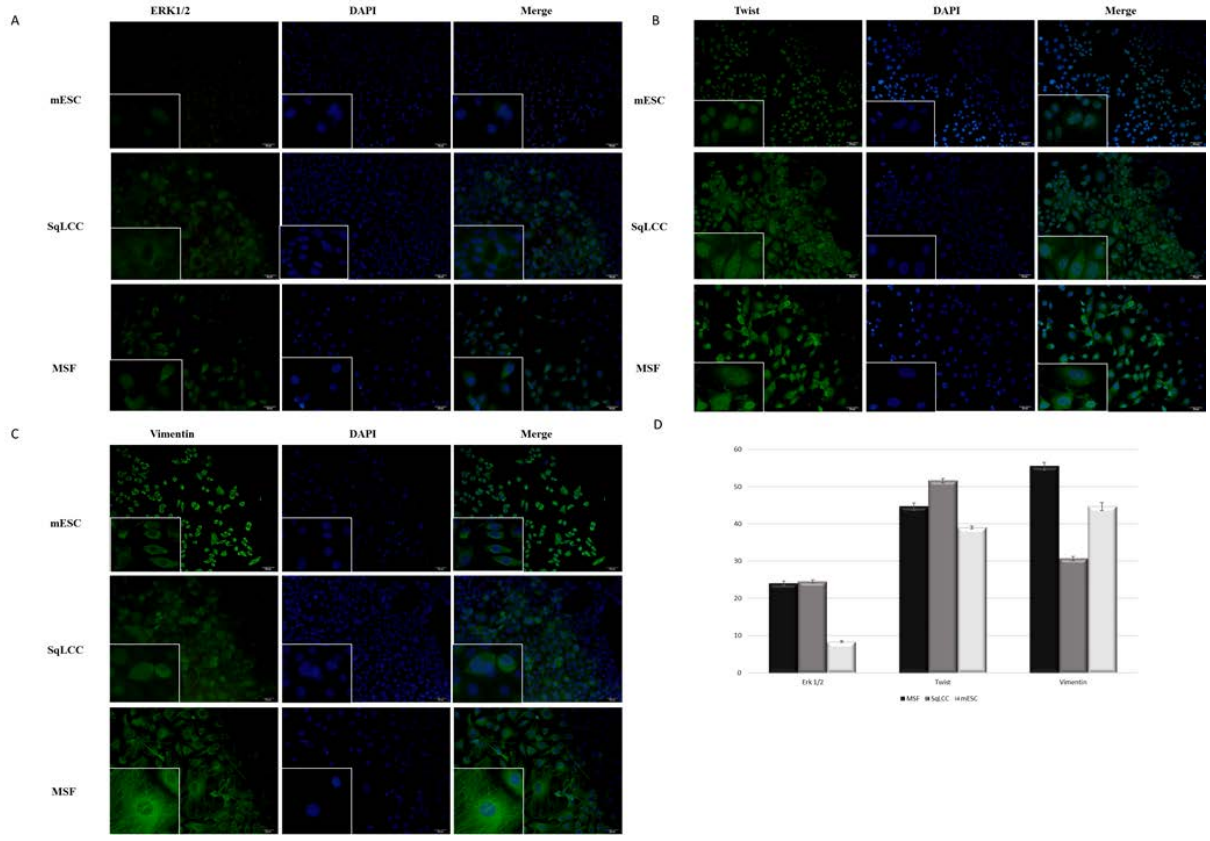
ERK 1/2 protein ifadesi diğer hücre hatları ile karşılaştırıldığında mEKH'lerde belirgin olarak daha düşük bulunmuştur (Şekil 4-A, D). MSF'lerve SqLCC'ler benzer düzeylerde ERK 1/2 ifadesi göstermişlerdir (Şekil 4-A, D). Twist protein yoğunluğu SqLCC'lerde en yüksek, MSF'lerde orta ve mEKH'lerde en düşük düzeyde bulunmuştur (Şekil 4-B, D). Vimentin yoğunluğu MSF'lerde en yoğun gözlenirken bu hücreleri sırasıyla mEKH'ler ve en düşük düzeyde olarak SqLCC'ler takip etmektedir (Şekil 4-C, D). Şekil S1 ve S2'de belirtilen modifiye-derecelendirme sonuçları.




Şekil 2: MSF'lere oranlanarak mEKH'ler ve SqLCC'lerde EMG ile ilişkili genlerin fold change değerleri, ortalama delta Ct değerleri grafikleri ve *cluster gram*'ları. A-B) EMG ile ilgili gen profilleri. C-D) MAPK ile ilgili gen profilleri. E-F) İnflamasyonla ilgili gen profilleri.




Şekil 3: EMG, MAPK ve inflamasyonla ilişkili genlerin ortalama delta Ct değerleri




Şekil 4: mEKH, SqLCC ve MSF'lerde ERK 1/2 protein ekspresyonunun immünofloresan boyama görüntüleri. A) ERK 1/2 protein ifadesi, B) Twist protein ifadesi, C) Vimentin protein ifadesi, D) Protein ifadesinin ortalama yoğunluğunun grafiği.

## TARTIŞMA

Gelişimsel ve patolojik süreçler arasındaki mekânsal-zamansal düzenlemenin başlıca farkı, patolojik bozuklukların tersine gelişim sırasında hücresel ve moleküler seviyenin sıkı kontroldür. Bunu en iyi temsil eden örneklerden biri, fare embriyo araştırmalarının ve kanser oluşumu çalışmalarının karşılaştırılması, EMG'nin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasıdır (29). Akciğer kanseri ele alındığında, araştırma çalışmaları yüksek EMG mekanizmasının Oct4 ve Nanog gibi embriyonik kök hücre belirteçleri ile tümör metastazını desteklediğini göstermiştir (30). Ek olarak, TGF-β ve bu gibi inflamatuar sitokinler etkileşimli yolaklarla, EMG ve inflamasyon ve inflamasyonla indüklenen fibrozis mekanizmasının da birbiriyle bağlantılı olduğu gösterilmiştir (31). Bu çalışmada, yeni hücresel ve moleküler tedavi ajanlarını belirlemek için bir rehber olmak amacıyla, EMG, MAPK ve inflamasyonla ilişkili genlerin kanser, somatik ve fare embriyonik kök hücre hatlarında RNA ve protein ifadeleri karşılaştırılmıştır.

İlk olarak, mEKH'ler, MSF'ler ve SqLCC'lerde EMG ile ilişkili genlerin RNA ifadelerinin yanı sıra Twist ve Vimentin proteinlerinin ifade seviyelerini göstermiştir. Gelişimsel bir transkripsiyon faktörü olarak Twist' in, EMG ile kanser oluşumunu teşvik ettiği bulunmuştur. On yıldan fazla bir süredir, embriyonik transkripsiyon faktörlerini yeniden aktive ederek yapılan çalışmalarda, Twist'in, kanserde hastalığın ilerlemesine ve kötü prognoza yol açtığı gösterilmiştir (32). Twist protein ifadesi SqLCC'lerde diğerlerine göre daha yüksekti.

Tip III ara filaman olarak Vimentin, mezenşimal hücre kaynaklı hücreler tarafından ifade edilir. Ek olarak, Vimentin fizyolojik veya patolojik süreçlerde epitel hücre göçünde rol oynar (33). Çalışmamızda kullanılan üç hücre hattı arasında MSF'lerde Vimentin protein ekpresyonu diğer hücrelere oranla en yüksek seviyede görülmüştür ve bunun Vimentin'in normal olgun hücrelerde fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir aracı olduğunu gösterdiği söylenebilir.

EMG ile ilişkili genlerden biri olan Jagged1 (Jag1), özellikle vaskülarizasyonda ve gelişen embriyoda önemli bir yere sahip iken, kan damarları çevresinde yoğun olarak bulunur (34). Bizim çalışmamızda SqLCC'lerde Jag1 gen ifadesi, mEKH'lerdekinden ve MSF'lerdekinden nispeten yüksek bulunmuştur.

Embriyonik ve post-natal dönemde doku-organ gelişimi sırasında, kemik morfojenetik proteinleri (BMP'ler) hücre farklılaşmasını, proliferasyonu ve sağkalımı düzenler. Tümör oluşumu ve kanser ilerlemesi ile ilgili olması nedeniyle, BMP'ler kanser biyolojisinde önemli bir protein ailesidir (35). Bu protein ailesinin üyeleri ile tümöral EMG düzenlemesinde paradoksal bir ilişki vardır. Örneğin, E-kaderini inhibe ederek ve N-kaderini artırarak, BMP-4 EMG aktivatörlerini tetikler. Snail ve Slug meme ve yumurtalık kanseri hücrelerinde tümöral EMG aktivasyonuna katılır (36). Bunun aksine, BMP-7'nin TGF-β aracılı Twist ifadesi üzerindeki baskılayıcı etki gösterir. BMP-7, kolanjiokarsinoma hücrelerinin göçünü inhibe eder (37). Araştırmalar, BMP'lerin EMG inhibe edici etkilerini EMG aktivatörü Zeb1 genini baskılayarak gerçekleştirdiğini göstermiştir (38). Bizim çalışmamızda bu paradoksal durumun bir kısmını ele aldığımızda, SqLCC'lerinde BMP1 aktivasyonunun düşüklüğü BMP1 in EMG' yi inhibe eden bir BMP olduğunu düşündürmüştür.

İnterlökin 24 (IL-24), çeşitli dokulardan salgılanan IL-10 ailesinin inflamasyonla ilgili gen üyesidir (39). Melanom, prostat ve miyeloid lösemi gibi insan kanserlerinin hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, IL-24'e maruz kaldığında apoptosise giren hücreler gözlemlenmiştir (40). Son çalışmalar, TGF-β gibi büyüme faktörlerinin, IL-24, E-kaderin ve β-katenin ifadesini aktive ederek ekspresyonu inhibe ettiğini göstermiştir (41). Bunlar, IL-24'ün EMG'yi inhibe ettiği göstergelerdir (42). Ayrıca, Goerlich ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada IL-24, akciğer kanseri hücre dizilerinde Snail, Slug ve Twist gibi EMG ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin mRNA seviyelerini azalttığını bildirmiştir ve böylece IL24, EMG'yi bloke ederek kanser metastazını ve invazyonu engellemiştir (41). Elde ettiğimiz sonuçlar, IL-24 RNA düzeylerinin SqLCC'lerinde ve mEKH'lerinde anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermiştir. SqLCC'lerinde RNA ifadesi seviyesi, mEKH'lerinin yaklaşık iki katı çıkmıştır.

Nras hücre bölünmesinin düzenlenmesinde bir GTPaz olarak çalışmaktadır (43). Agresif cilt kanserinde melanom ve kolorektal kanserde Nras mutasyonları tespit edilmiştir (44). Melanogenezde Nras mutasyonu bulunması halinde Nras sinyalinin aktivasyonu embriyonik transkripsiyon faktörlerinin yeniden dağılımına yol açar ve Snai2 ve Zeb2'yi Zeb1 ve Twist1 genlerini aktif hale geçirir (45), böylece hücre davranışı tersine değişir (46). Bu çalışmamızda, Nras gen ifadesi, MSF'llere oranla mEKH'lerde daha yüksek, SqLCC'lerinde daha olarak belirlenmiştir. Ayrıca, mEKH'lerde Zeb2 ifadesi üç hücre hattı içerisinde en düşük çıkmıştır. Snai2 ve Zeb2'nin Twist ve Zeb1'e tüm bu değişiminin Nras aktivitesine dayalı transkripsiyon faktörlerinin yeniden dağılımı olabileceği düşünülmüştür.

Sigirr (Tek Ig ve TIr Domain İçeren), Toll benzeri reseptör interlökin 1 reseptörlerinden biridir (47). İnflamasyonda negatif bir regülatördür ve daha iyi bağışıklık yanıtı için ifadesinin düşürülmesi gerekir (48). Sigirr de dahil olmak üzere çeşitli sitokin düzenleyiciler EMG sürecinde dalgalı bir ifadelenme gösterirler (49). Bulgularımız, Sigirr ifadesinin SqLCC'lerinde ve mEKH'lerinde MSF'lere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir.

MAPK aktivasyonları proliferasyon, sağkalım ve ölüm gibi birçok hücresel olayları etkileyen serin-treonin kinazlardır (50) ve Erk 1/2, MAPK ailesinin alt grubundan biridir (51). Erk 1/2 ifadesi normalde hücre takibini artırır, bu nedenle karsinogenez, metastaz ve fibrozisin indüksiyonuna neden olabilir (51). EMG sürecinde Erk, MMP üretimini indükler ve mezenkimal karaktere benzeyen E-kaderin ifadesini bastırır (52). TGF-β bağımlı EMG için ortak Erk 1/2 sinyal yolunun gerekli olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir (53). Burada, MSF'lerin Erk 1/2 protein yoğunluğu SqLCC'lerine benzer iken, mEKH'lerinde bu üç gruptaki hücreler arasında en düşük olduğu gösterilmiştir.

MAPK1 sinyal yolu aktivitesinin, servikal kanser hücresi metastazının indüksiyonunda rol oynayan önemli bir molekül olduğu gösterilmiştir (54) ve MAPK1' in engellenmesi Snai1 ifadesini azaltır (55). Bir çalışmada, MAPK sinyal yolağının bir alt popülasyonu olan MAPK1 aktivasyonunun, servikal kanser hücrelerinde EMG'yi önemli ölçüde uyarabildiği belirtilmiştir. Bu araştırmanın sonucu, MAPK1 ifadesinin MSF'lere göre mEKH'lerinde yüksek SqLCC'lerinde düşük olduğu gösterilmiştir.

Onkogen Myc proteini, gelişim süreçlerinde B ve T lenfositlerinin oluşumundan sorumludur, diğer yandan normal hücrelerde, hücre bölünmesinde ve farklılaşmasında önemli rol oynar. Ayrıca Myc miktarı malignitelerde translokasyon ve amplifikasyon mekanizmalarıyla sayıca artar. Genel olarak, EMG ile ilişkili gen ifadeleri, MSF'lere kıyasla SqLCC'lerinde ve mEKH'lerinde daha yüksek bulunmuştur.

Verilerimiz, EMG, MAPK ve inflamasyonla ilişkili gen ifadelerinin büyük bir oranının embriyonik kök hücre ve kanser hücrelerinde benzer olduğunu göstermiştir. Hücre sinyal yollarının birbiriyle ilişkili olarak incelenmesi, terapötik hedeflerin oluşturulmasında kritik ve aydınlatıcı bir çekiciliğe sahiptir. Tümör hücresi davranışı ve metastatik potansiyel durum incelemesinde, MAPK ve EMG'yi yönlendiren genlerin davranışları terapötik hedef olarak potansiyeldir ve son derece önemlidir. Bizim çalışmamızda, bu konuyla ilgili göze çarpan çeşitli veriler bulunmaktadır. Embriyonik kök hücre, somatik hücre ve tümör hücre davranış modelleri ile bu hücre gruplarının karşılaştırmalı analizi, bu zor bulmacanın deşifre edilmesi için geliştirilmelidir.

## TEŞEKKÜR

Projemizi 16-TIP-045 sayı ile destekleyen Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi BAP komisyonu'na teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Chen CY, Cheng YY, Yen CYT, Hsieh PCH. Mechanisms of pluripotency maintenance in mouse embryonic stem cells. Cell Mol Life Sci. 2017; 74: 1805–17.

2. Tucak A, Vrabac D, Smajić A, Sažić A. Future trends and possibilities of using induced pluripotent stem cells (iPSC) in regenerative medicine. In Springer, Singapore; 2017; 459–64.

3. He N, Feng G, Li Y, Xu Y, Xie X, Wang H, et al. Embryonic stem cell preconditioned microenvironment suppresses tumorigenic properties in breast cancer. Stem Cell Res Ther. 2016;7:95.

4. Kan X-X, Li Q, Chen X, Wang Y-J, LiY-J, Yang Q, et al. A novel cell cycle blocker extracted from Stellera chamaejasme L. inhibits the proliferation of hepatocarcinoma cells. Oncol Rep. 2016; 35: 3480–8.

5. Kim Y-S, Yi B-R, Kim N-H, Choi K-C. Role of the epithelial–mesenchymal transition and its effects on embryonic stem cells. Exp Mol Med. 2014;46: e108.

6. Chen C-L, Chen Y-H, Tai M-C, Liang C-M, Lu D-W, Chen J-T. Resveratrol inhibits transforming growth factor-β2-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human retinal pigment epithelial cells by suppressing the Smad pathway. Drug Des Devel Ther. 2017;11:163–73.

7. Iskender B, Izgi K, Hizar E, Jauch J, Arslanhan A, Yuksek EH, et al. Inhibition of epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer cells via modulation of mTOR signalling. Tumor Biol. 2016;37: 8281–91.

8. Shagieva G, Domnina L, Makarevich O, Chernyak B, Skulachev V, Dugina V. Depletion of mitochondrial reactive oxygen species downregulates epithelial-to-mesenchymal transition in cervical cancer cells. Oncotarget. 2017; 8: 4901-4913

9. Bryan RT. Cell adhesion and urothelial bladder cancer: the role of cadherin switching and related phenomena. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015; 370: 20140042.

10. Zhou P, Li B, Liu F, Zhang M, Wang Q, Liu Y, et al. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer. Mol Cancer. 2017;16: 52.

11. Pang M-F, Georgoudaki A-M, Lambut L, Johansson J, Tabor V, Hagikura K, et al. TGF-β1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis. Oncogene. 2016; 35: 748–60.

12. Fuxe J, Vincent T, De Herreros AG. Transcriptional crosstalk between TGFβ and stem cell pathways in tumor cell invasion: Role of EMT promoting Smad complexes. Cell Cycle. 2010; 9: 2363–74.

13. Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS, Asaduzzaman SM. TGF-β/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. Bone Res. 2015; 3: 15005.

14. Morry J, Ngamcherdtrakul W, Yantasee W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. Redox Biology. 2017; 11: 240–53.

15. Tseng JH, Bisogna M, Hoang LN, Olvera N, Rodriguez-Aguayo C, Lopez-Berestein G, et al. miR-200c-driven Mesenchymal-To-Epithelial Transition is a Therapeutic Target in Uterine Carcinosarcomas. Sci Rep. 2017; 7: 3614.

16. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. Mol Oncol. 2017; 11: 805–23.

17. López-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. EMBO Mol Med. 2009; 1:303–14.

18. Khalafalla FG, Khan MW. Inflammation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Fighting Against Multiple Opponents. Cancer Growth Metastasis. 2017;10: 1179064417709287.

19. Ye X, Tam WL, Shibue T, Kaygusuz Y, Reinhardt F, Ng Eaton E, et al. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. Nature. 2015;525: 256–60.

20. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Tumour progression and metastasis. Ecancermedicalscience. 2016; 10: 617.

21. Franco AT, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. Blood. 2015; 126: 582–8.

22. Klameth L, Rath B, Hochmaier M, Moser D, Redl M, Mungenast F, et al. Small cell lung cancer: model of circulating tumor cell tumorospheres in chemoresistance. Sci Rep. 2017;7:5337.

23. Crusz SM, Balkwill FR. Inflammation and cancer: advances and new agents. Nat Rev Clin Oncol. 2015;12:584–96.

24. Low HB, Zhang Y. Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer. Immune Netw. 2016;16:85–98.

25. Burotto M, Chiou VL, Lee JM, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. Cancer. 2014;120:3446–56.

26. Derynck R, Muthusamy BP, Saeteurn KY. Signaling pathway cooperation in TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition. Curr Opin Cell Biol. 2014;31:56–66.

27. Molina JR, Adjei AA. The Ras/Raf/MAPK Pathway. J Thorac Oncol. 2006;1:7–9.

28. Moyano J V, Greciano PG, Buschmann MM, Koch M, Matlin KS. Autocrine transforming growth factor-β1 activation mediated by integrin αVβ3 regulates transcriptional expression of laminin-332 in madin-darby canine kidney epithelial cells. Mol Biol Cell. 2010;21:3654–68.

29. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 15: 2010; 117–34.

30. Chu P-Y, Hu F-W, Yu C-C, Tsai L-L, Yu C-H, Wu B-C, et al. Epithelial–mesenchymal transition transcription factor ZEB1/ZEB2 co-expression predicts poor prognosis and maintains tumor-initiating properties in head and neck cancer. Oral Oncol. 2013;49:34–41.

31. Yang L. TGFβ and cancer metastasis: an inflammation link. Cancer Metastasis Rev. 2010;29:263–71.

32. Zeng J, Zhan P, Wu G, Yang W, Liang W, Lv T, et al. Prognostic value of Twist in lung cancer: systematic review and meta-analysis. Transl Lung Cancer Res. 2015;4:236–41.

33. Dauphin M, Barbe C, Lemaire S, Nawrocki-Raby B, Lagonotte E, Delepine G, et al. Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas. Lung Cancer. 2013;81:117–22.

34. Jones EA, Clement-Jones M, Wilson DI. JAGGED1 expression in human embryos: correlation with the Alagille syndrome phenotype. J Med Genet. 2000;37:658–62.

35. Zhang L, Ye Y, Long X, Xiao P, Ren X, Yu J. BMP signaling and its paradoxical effects in tumorigenesis and dissemination. Oncotarget. 2016;7:78206–18.

36. Tan X, Zheng F, Zhou Q, Duan L, Li Y. [Effect of bone morphogenetic protein-7 on monocyte chemoattractant protein-1 induced epithelial-myofibroblast transition and TGF-beta1-Smad 3 signaling pathway of HKC cells]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2005; 85:2607–12.

37. Duangkumpha K, Techasen A, Loilome W, Namwat N, Thanan R, Khuntikeo N, et al. BMP-7 blocks the effects of TGF-??-induced EMT in cholangiocarcinoma. Tumour Biol. 2014;35):9667–76.

38. Mock K, Preca B-T, Brummer T, Brabletz S, Stemmler MP, Brabletz T. The EMT-activator ZEB1 induces bone metastasis associated genes including BMP-inhibitors. Oncotarget. 2015;6: 14399-412.

39. Sahoo A, Im S-H. Molecular Mechanisms Governing IL-24 Gene Expression. Immune Netw. 2012;12:1–7.

40. Manesh ME, Esmaeilzadeh A, Mirzaei MH. IL-24: A novel gene therapy candidate for immune system upregulation in Hodgkin's lymphoma. J Med Hypotheses Ideas. 2015;9:61–6.

41. Goerlich G, Shanker M, Jiankang J, Mani S, Ramesh R. Interleukin-(IL)-24 Regulates Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) Transcription Factors. Mol Ther. 2010;18:S93.

42. Wang M, Liang P. Interleukin-24 and its receptors. Immunology. 2005; 114:166–70.

43. Wang Y, Velho S, Vakiani E, Peng S, Bass AJ, Chu GC, et al. Mutant N-RAS protects colorectal cancer cells

from stress-induced apoptosis and contributes to cancer development and progression. Cancer Discov. 2013;3:294–307.

44. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: From mutations to medicine. Genes Dev. 2012; 26:1131–55.

45. Ansieau S, Collin G, Hill L. EMT or EMT-Promoting Transcription Factors, Where to Focus the Light? Front Oncol. 2014;4:353.

46. Tulchinsky E, Pringle JH, Caramel J, Ansieau S. Plasticity of melanoma and EMT-TF reprogramming. Oncotarget. 2014; 5:1–2.

47. Thomassen E, Renshaw BR, Sims JE. Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily. Cytokine. 1999;11:389–99.

48. Garlanda C, Riva F, Veliz T, Polentarutti N, Pasqualini F, Radaelli E, et al. Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8, an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family. Cancer Res. 2007;67:6017–21.

49. Thomson S, Petti F, Sujka-Kwok I, Mercado P, Bean J, Monaghan M, et al. A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states. Clin Exp Metastasis. 2011;28:137–55.

50. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. Oncogene. 2007;26:3279–90.

51. Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. IUBMB Life. 2006;58:621–31.

52. Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL. Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. Neoplasia. 2004;6:603–10.

53. Buonato JM, Lazzara MJ. ERK1/2 blockade prevents epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells and promotes their sensitivity to EGFR inhibition. Cancer Res. 2014;74:309–19.

54. Du L, Rao G, Wang H, Li B, Tian W, Cui J, et al. CD44-positive cancer stem cells expressing cellular prion protein contribute to metastatic capacity in colorectal cancer. Cancer Res. 2013;73:2682–94.

55. Li XW, Tuergan M, Abulizi G. Expression of MAPK1 in cervical cancer and effect of MAPK1 gene silencing on epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis. Asian Pac J Trop Med. 2015;8:937–43.