



**Connexin 32'nin Farklı Metastatik Özellikleri Olan
Meme Kanseri Hücrelerinde Oynadığı Rollerin
Araştırılması**

Program Kodu: 1001

Proje No: 114Z874

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Gülistan MEŞE ÖZÇİVİCİ

Danışman(lar):
Doç. Dr. Özden YALÇIN ÖZUYSAL

Bursiyer(ler):
Deniz UĞUR
Aslı ADAK
Yağmur Ceren ÜNAL

HAZİRAN 2018
İZMİR



Bu projede sağlıklı meme dokusunda ve meme kanserlerinde ifadesi ve rolü hakkında limitli bilgi bulunan connexin32'nin normal meme hücresi MCF10A ve farklı metastatik özellikleri olan meme kanseri hücreleri MCF7, MDA-MB-231 ve Hs578T'de gap junction ve yarım kanalların fonksiyonlarına, hücrelerin çoğalmasına, hücre döngüsüne, migrasyonuna ve invazyonuna etkisi araştırılmıştır. Bunun sonucunda Cx32'nin hücrenin tipine ve kanser tip özelliklerine bağlı olarak farklı şekillerde fizyolojik etkiler oluşturmaları gözlenmiştir.

Proje çalışmaları esnasında kullanılan teknikler, analizler ve karşılaşılan problemler konusunda bizlere yardımcı olan İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Doç. Dr. Özden Yalçın Özuysal ve Biyomühendislik Bölümü'nden Doç. Dr. Engin Özçivici'ye teşekkürlerimizi sunarız. Ayrıca, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Araştırma ve Uygulama Merkezi (BIYOMER) personeline bazı deneylerde verdikleri teknik destekten dolayı teşekkür ederiz.

Bu proje TÜBİTAK Kimya ve Biyoloji Araştırma Destek Grubu tarafından desteklenmiş ve Doç. Dr. Gülistan Meşe Özçivici yürütücülüğünde tamamlanmıştır.

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1 Hücreler arası iletişim ve connexinler	2
2.2 Connexinlerin fizyolojik görevleri	4
2.3 Connexinler ve meme kanseri	4
3. GEREÇ VE YÖNTEM	8
3.1 Connexin 32'nin farklı ekspresyon vektörlerine klonlanması	8
3.2 Hücre kültürü	8
3.3 Virüs üretimi	10
3.4 Virüs titrasyonu	10
3.5 Virüs enfeksiyonu	11
3.6 Tekli immunohistokimyasal analizler	11
3.7 Western blot analizleri	12
3.7.1 Protein izolasyonu	12
3.7.2 Western blot protokolü.....	12
3.8 mRNA ifade analizleri	13
3.9 Hücre içine floresan boya alım (dye uptake) analizleri	15
3.10 Yarıklı floresan boya yükleme (scrape loading) analizleri.....	15
3.11 MTT analizleri	16



3.12 BrdU boyaması	16
3.13 PI boyaması ve akış sitometrisi ile hücre döngüsü analizleri.....	16
3.14 Yara kapama deneyleriyle migrasyon analizleri	17
3.15 Boyden chamber ile invazyon analizleri.....	17
4. BULGULAR	18
4.1 Connexin 32'nin farklı ekspresyon vektörlerine klonlanması.....	18
4.2 Cx32 ile transfekte edilen hücrelerdeki Cx32'nin lokalizasyonunun tespiti.....	19
4.3 Ekzojen olarak ifade ettirilen Cx32 proteini ve mRNA ifadesinin teyidi.....	20
4.4 Cx32'nin hücrelerdeki gap junction kanallarının ve yarım kanallarının fonksiyonlarına etkisi.....	21
4.5 Cx32'nin hücrelerin büyüme ve çoğalmalarına etkisi.....	24
4.6 Cx32'nin hücre döngüsüne etkisi.....	26
4.7 Cx32'nin hücrelerinin migrasyonuna etkisi	27
4.8 Cx32'nin hücrelerinin invazyonuna etkisi	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
6. KAYNAKLAR.....	38



TÜBİTAK

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Connexin ve oluklu bağlantıların organizasyonu.....	3
Şekil 2. İnsan ve fare meme dokusunda connexin ifadesinin karşılaştırılması	6
Şekil 3. Connexin ifadesindeki değişimlerin meme kanserinin farklı evrelerinde oynadığı roller	7
Şekil 4. PZR reaksiyonundan sonra jelden izole edilen hCx32 cDNA'sının kontrolü	18
Şekil 5. Sekanslamaya gönderilen örneğin normal Cx32 cDNA'sı ile Multalin programıyla karşılaştırılması	19
Şekil 6. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7, Hs578T hücrelerinde ifade edilen Cx32'nin hücrelerdeki lokalizasyonu	20
Şekil 7. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7, Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin protein miktarının Western blot ile karşılaştırılması.....	21
Şekil 8. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7, Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin mRNA miktarının gerçek zamanlı yarı kantitatif PCR ile karşılaştırılması.....	21
Şekil 9. MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin oluşturduğu gap junction kanallarının aktivitelerinin yarıkla floresan boyama yükleme ile karşılaştırılması	22
Şekil 10. MCF7 ve Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin oluşturduğu gap junction kanallarının aktivitelerinin yarıkla floresan boyama yükleme ile karşılaştırılması	23
Şekil 11. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin oluşturduğu yarım kanalların aktivitelerinin hücre içine neurobiotin alım deneyi ile karşılaştırılması	24
Şekil 12. MCF10A (a), MDA-MB-231 (b), MCF7 (c) ve Hs578T (d) hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin hücrelerin canlılıklarına (viability) etkileri	25
Şekil 13. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin hücrelerin çoğalmalarına etkisi.....	26
Şekil 14. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin hücre döngüsüne etkisi.	27
Şekil 15. MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin migrasyona etkisi	28
Şekil 16. MCF7 ve Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin migrasyona etkisi..	30



Şekil 17. a) MCF10A ve b) MDA-MB-231 hücrelerinde Cx32 ifadesini epitel-mezenkimal geçiş	31
Şekil 18. MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinde Cx32 ifadesini epitel-mezenkimal geçiş belirteçlerinden E-cadherin, Slug ve vimentinin protein seviyesinde ifadesine etkileri.....	32
Şekil 19. a) MCF7 ve b) Hs578T hücrelerinde Cx32 ifadesinin epitel-mezenkimal geçiş belirteçlerinin mRNA seviyesindeki ifadelerine etkisi	33
Şekil 20. MCF7 ve Hs578T hücrelerinde Cx32 ifadesinin epitel-mezenkimal geçiş belirteçlerinden E-cadherin, Zeb2 ve snailin protein seviyesinde ifadesine etkileri.....	34
Şekil 21. Transwell geçirgen kap ile invazyon deneyleri.	35



TÜBİTAK

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Cx32'nin çoğaltılması için kullanılan primerler	8
Tablo 2. Western blot için kullanılan birincil ve ikincil antikorlar	13
Tablo 3. RT-PCR'da kullanılan primer listesi.....	14
Tablo 4. qRT-PCR protokolü	14

Meme kanseri kadınlarda kansere bağlı ölümlerde ilk sıradadır ve bunların büyük bir kısmı metastazdan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle metastazın moleküler mekanizmalarının araştırılması önemlidir. Meme kanserinde connexin (Cx)'ler de rol oynamaktadır. Bunlar, komşu hücreler arasında oluklu bağlantılarla küçük moleküllerin geçişini sağlayarak ve/veya yarım kanallarla hücre dışına moleküller salgılayarak dokuların homeostazisini sağlarlar.

İnsan meme dokusunda Cx26 ve Cx43 genleri hücrelerin çoğalma ve farklılaşma mekanizmalarında ve memede tümör oluşumunda rol oynamaktadır. Meme primer tümörlerinde, connexinlerin miktarları azalarak veya proteinlerin lokalizasyonları değişerek hücreler arasındaki iletişimin ortadan kalkması nedeniyle bunların tümör baskılayıcı olduklarını göstermektedir. Buna karşılık, invaziv meme kanserinde Cx26 ve Cx43'nin ifadesinin olduğu ve hücre sitoplazmasında biriktikleri gözlenmiştir. Bu, connexinlerin kanserin farklı evrelerinde görevlerinin değişebildiğine işaret etmektedir.

İnsan meme kanseri dokularında, normal meme dokusunda ifade edilmeyen Cx32'nin lenf tutunumlu meme kanseri hastalarında sentezlendiği ve hücre zarı yerine sitoplazmada biriktiği gösterilmiştir. Fakat, Cx32'nin meme kanserde hangi rolleri oynadığı bilinmemektedir. Projede meme kanserlerinin ileri safhalarında sentezlenen ve hücre sitoplazmasında bulunan Cx32'nin farklı metastatik özellikler gösteren meme kanseri hücrelerinin yaşam ve çoğalmalarına yaptığı etkiler ile Cx32'nin hücrelerin migrasyon/invazyonuna etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada Cx32'nin normal meme hücresi MCF10A'de ve farklı metastatik özellikteki meme kanseri hücreleri MCF7, MDA-MB-231 ve Hs578T'de sadece MCF10A'lerde gap junction plakaları oluşturdukları ve diğerlerinde sitoplazmada oldukları gözlenmiştir. Cx32'nin MCF10A ve Hs578T'nin canlılıklarını azaltmış ama MCF7 ve MDA-MB-231'nin canlılıklarını etkilememiştir. Cx32 MCF10A ve MCF7'nin hücre döngüsünü değiştirmemiş, MDA-MB-231'de G1'deki hücre oranını azaltmış ve G2'deki hücre oranını artırmıştır. Hs578T hücrelerinde G1'deki hücre oranını azaltmış ve S'teki hücre oranını artırmıştır. Cx32 MCF10A'nın migrasyonunu artırma eğilimi göstermiş fakat MCF7 ve Hs578T'nin migrasyonunu azaltmıştır. Son olarak Cx32 MDA-MB-231'in migrasyonunu etkilememesine rağmen epitel belirteçlerden E-cadherinin protein ve mRNA seviyesini azaltmış ve mezenkimal belirteçlerden vimentin, slug ve Zeb2'nin mRNA miktarını artırmıştır.

Sonuç olarak Cx32'nin hücrenin tipine, durumuna ve karakteristiğine bağlı olarak hücrelerin fizyolojisini ve özelliklerini farklı şekillerde etkilediği gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Connexin32, oluklu bağlantılar, meme kanseri, invazyon/migrasyon, metastaz



ABSTRACT

Breast cancer is the leading cause of cancer-related mortality in females due to metastasis. Therefore, it is important to understand molecular mechanisms of metastasis. Connexins (Cx), associated with breast cancers, regulate tissue homeostasis via both gap junction channels that exchange molecules between neighboring cells and hemichannels that release molecules into the extracellular environment.

Cx26 and Cx43 play role in proliferation and differentiation of mammary cells. Furthermore, they were down-regulated leading to loss of gap junctional communication in primary breast tumors, indicating their tumor suppressor role. In invasive tumors, they were mainly in cytoplasm rather than cell membranes, suggesting differential Cx roles in different stages. Moreover, Cx32, which is not normally expressed in normal breast, was observed in cytoplasm of primary breast cancers with lymph node metastasis. Roles of Cx32 in breast cancer is unknown so, we investigated effects of Cx32 on viability, proliferation and migration/invasion of breast cancer cells with different metastatic potentials.

Exogenous Cx32 expression caused formation of gap junction plaques between adjacent MCF10A cells while Cx32 was cytoplasmic in MDA-MB-231, MCF7 and Hs578T cancer cells. Further, Cx32 decreased viability of MCF10A and Hs578T with no effect on MCF7 and MDA-MB-231. Cx32 did not alter cell cycle phases in MCF10A and MCF7, but it decreased percentage of MDA-MB-231 in G1 and increased that in G2 phases. Hs578T cells in G1 phase decreased with an increase in S phase. For migration, Cx32 showed an increasing trend in movement of MCF10A; whereas it decreased migration of MCF7 and Hs578T. Finally, although Cx32 did not influence MDA-MB-231 migration, it decreased expression of epithelial marker E-cadherin and increased expression of mesenchymal markers, vimentin, slug and Zeb2.

As a result, it was observed that Cx32 affects properties of cells in different ways depending on the type and characteristics of the cell.

Key words: Connexin32, gap junctions, breast cancer, invasion/migration, metastasis



1. GİRİŞ

Hücreler arası iletişimi sağlayan connexin (Cx) molekülleri: 1) Sağlıklı dokulardaki hücrelerin koordineli çalışmaları, 2) dokuların dış uyaranlara karşı hızlı ve uyumlu cevap vermeleri ve 3) doku homeostazisinin devamlılığını sağlamaları, sebebiyle organizma için önem taşırlar (Delmar vd., 2017). Cx moleküllerinde oluşabilen mutasyon ve değişimler sonucunda, ilgili dokuların fonksiyon ve organizasyonlarında bozulmalar gözlenir. Bu bağlamda, bir önemli özelliği de doku fonksiyon ve organizasyonlarındaki bozulma olan tümör dokularını oluşturan hücrelerdeki Cx seviyelerinde, lokalizasyonlarında ve fonksiyonlarında, sağlıklı dokulara göre önemli farklılıklar bulunması şaşırtıcı değildir. Kanser hücrelerinde Cx moleküllerinde gözlenen bu tür değişimler hücreler arası oluklu bağlantılarla yapılan iletişimin (gap junctional intercellular communication (GJIC)) miktarı ve paylaşılan moleküllerin çeşitliliğinin yanı sıra GJIC'den bağımsız mekanizmaları tetikleyerek de kanser fizyolojisini etkilemektedir (Graham vd., 2018). Tümör dokusunda Cx'lerin protein miktarlarında ve dolayısıyla oluşturdukları oluklu bağlantılarda önemli ölçüde azalma olduğu gözlenmekte, bu nedenle de bu moleküllerin kanser biyolojisinde tümör baskılayıcı potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir (Delmar vd., 2017; Graham vd., 2018). Buna karşılık, Cx'lerin hücreler arası iletişimi sağlama dışındaki görevlerinin kanserin oluşmasında ve/veya ilerlemesinde nasıl görevler yüklendiğine dair bilgi birikimi oldukça sınırlıdır.

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, kanserli dokularda bazı connexinlerin, miktarlarındaki azalmalardan ziyade proteinlerin hücre içindeki lokalizasyonlarında değişimler olduğu da gözlenmektedir (Stoletov vd., 2013). Değişik kanser tiplerinde (karaciğer, meme), connexinlerin hücre sitoplazmasında ve/veya Golgi aygıtı gibi bazı organellerde birikerek, oluklu bağlantı kanalları kurulmasından bağımsız olarak hücre metabolizmasında değişikliklere neden olabildiği gözlenmektedir (Kanczuga-Koda vd., 2010.; Stoletov vd., 2013). Bu özelliğin kanser oluşumu sırasında değil de kanserin daha ileri evrelerinde özellikle metastatik özellik kazanmış hücrelerde gözlenmiş olması, connexinlerin tümörün gelişim evresine bağlı olarak farklı fonksiyonlar üstlenebileceğine işaret etmektedir (Naus ve Laird, 2010). Son dönemdeki insan meme kanseri dokularında yapılan çalışmalarda özellikle normal insan meme dokusunda ifade edilmeyen connexin 32 (Cx32)'nin lenf tutulumu görülen hastalarda ifade edilmeye başlandığı ve bu moleküllerin hücre sitoplazmasında biriktiği gözlenmiştir (Kanczuga-Koda vd., 2007). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, normal insan meme dokusunda sadece Cx26 ve Cx43 genlerinin ifade edildiği ve bunların meme kanserinde özellikle tümör baskılayıcı olarak çalıştığı gösterilmiştir (Phillips vd., 2017). Fakat, Cx32'nin meme kanseri hücrelerinde ifade edilmeye başlamasının ve oluklu bağlantı kanalları kurmak yerine hücre sitoplazmasında birikmesinin meme kanseri hücrelerinin fonksiyonunu ve meme

kanserinin gelişim evrelerini nasıl etkilediği bilinmemektedir. Bu bağlamda meme kanseri hücrelerinde, normal meme dokusunda bulunmayan, fakat kanserli dokularda ifade edilmeye başlanan Cx32 geninin farklı metastatik potansiyellere sahip meme kanseri hücrelerinde biyosentez ve fonksiyonun araştırılması, metastatik evrelerde özellikle migrasyon ve invazyonda nasıl çalıştığıının tanımlanması Cx32'nin metastatik meme kanserlerindeki rolünün ortaya konulması önem arz etmektedir.

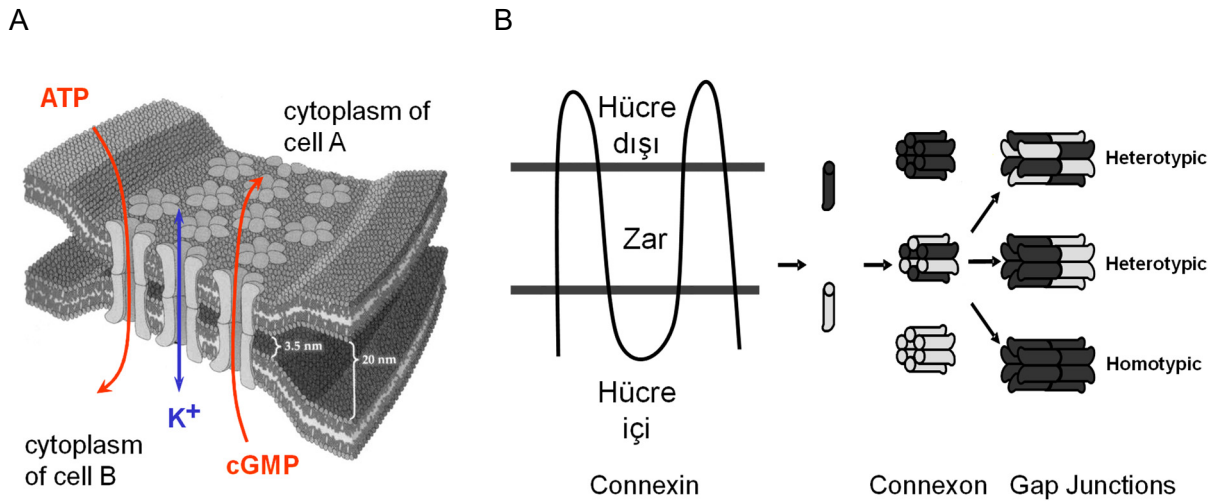
2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Hücreler arası iletişim ve connexinler

Hücreler arası iletişim çok hücreli canlılarda doku içi dengesinin sağlanmasında ve devam ettirilmesinde önemli roller oynamaktadır. Hücrelerin kullandığı çeşitli iletişim mekanizmaları içerisinde gap junction (oluklu bağlantı) kanalları önemli bir yer tutar (Robertson, 1963; Revel ve Karnovsky, 1967; Wei vd., 2004). Bu kanallar birbirlerine komşu olan hücrelerin sitoplazmaları arasında doğrudan bağlantı kurarak iyonların, aminoasitlerin, ikincil ulakların, küçük metabolitlerin ve siRNA'lerin değişimini gerçekleştirirler (Şekil 1A) (Valiunas vd., 2005; Mese vd., 2007). Gap junctionlar hücreler arasında molekül geçişini sağlayarak hücrelerin senkronizasyonu, farklılaşması, büyümesi ve damarsız dokuların atık ve metabolit koordinasyonunun yapılması gibi bir çok fizyolojik olayın düzenlenmesini sağlayan vazgeçilmez unsurlardır (Kanno ve Loewenstein, 1964; Lawrence vd., 1978; White ve Paul, 1999; Valiunas vd., 2005).

Oluklu bağlantılar omurgasız ve omurgalı bütün canlılarda faaliyet gösterirler (Şekil 1A) (Bruzzone vd., 1996; White ve Paul, 1999; Vinken vd., 2006). Omurgasızlarda gap junctionlar innexin adı verilen bir gen ailesi tarafından oluşturulmaktadır. Buna karşılık, Chordate filumunda gap junctionlar connexin (Cx) adı verilen bir gen ailesi tarafından kodlanır (Şekil 1B) (Goodenough, 1974; Zoidl ve Dermietzel, 2010). Connexin ailesinin üyeleri, gap junction kanallarının duvarlarını oluşturan 4 tane transmembran bölge, bu bölgeleri hücre dışında birbirine bağlayan ve kanalların/hücrelerin birbirlerini tanımasında ve connexonların (yarım kanalların) birbirlerine yapışmasında görev alan 2 tane dış döngü (extracellular loops, EL1 and EL2) ile hücre içinde bulunan amino-terminal uç, karboksil-terminal uç ve ikinci ve üçüncü transmembranları birbirine bağlayan bir iç döngü (intercellular loop, IL) içermektedir. Bu bölgeler arasında transmembran, amino uç ve dış döngülerin sekansları oldukça korunmuşken, C-terminal uç ve hücre içindeki döngü hem dizilim hem de uzunluk bakımından izoformlar arasında farklılıkların en çok olduğu ve posttranslasyonel değişikliklerin (örneğin fosforlama) en çok görüldüğü bölgelerdir (Harris, 2001; Lampe ve Lau, 2004; King ve Lampe, 2005).

İnsan genomunda vücudun hemen hemen bütün hücrelerinde ifade edilen en az 21 farklı connexin izoformu bulunmaktadır. Mesela, Cx43 vücudumuzdaki bir çok hücrede bulunurken, Cx32 başlıca karaciğer ve Schwann hücrelerinde üretilmektedir (Harris, 2001). Bazı hücreler birden çok connexin izoformu sentezlemekte bu da bu hücrelerde oluşturulan connexonların ve oluklu bağlantıların yapısını etkilemektedir. Yarım kanallar ya da oluklu bağlantılar yapılırken eğer bir çeşit connexin kullanılırsa homomerik/homotipik kanallar, kanal oluşumu sırasında birden fazla connexin kullanıldıysa heteromerik/heterotipik kanallar oluşur (Şekil 1B) (Beyer vd., 1995; Bukauskas vd., 2006). Bu türden farklı organizasyonlar yapısal ve fonksiyonel çeşitliliği arttırdığı gibi hücreler arasında değiştirilen moleküllerin çeşitliliğini de etkiler.



Şekil 1. Connexin ve oluklu bağlantıların organizasyonu. a) Gap junctionlar komşu hücrelerin sitoplazmaları arasında doğrudan bağlantı kurarak iyonların ve küçük moleküllerin değişimini sağlarlar (Evans ve Martin, 2002). b) 4 transmembran bölgesine sahip 6 connexin bir araya gelerek önce connexon adı verilen yarım kanalları daha sonra da hücre zarında gap junction kanalları oluştururlar (Mese vd., 2007).

Hücrelerde gap junction'ların yapımı, connexinlerin sentez sırasında endoplazmik retikulumla entegrasyonu ile başlayıp, trans-Golgi aygıtında altı tanesinin bir araya gelip connexon adı verilen yarım kanalları oluşturmasıyla tamamlanır (Musil ve Goodenough, 1993; Das vd., 2002; Laird, 2006). Yarım kanallar daha sonra hücre zarına keseciklerle taşınarak ya kendi başlarına görev yaparlar (non-junctional kanallar) ya da hücre zarında serbest bir şekilde dağılarak hücrenin komşu hücrelerle birbirlerine çok yaklaştığı kısımlardaki komşu connexonlarla kenetlenerek oluklu bağlantıların yapımını tamamlarlar (Harris, 2001; Goodenough ve Paul, 2003). Connexinlerin yarılanma ömürleri 2-6 saat arasındadır. Bu da hücrelerin çevrelerinde

olan olaylara çabuk bir şekilde değişikliklere uyararak gerekli yanıtları vermelerini sağlamaktadır (Musil vd., 2000).

Son senelerde, connexinlerin gap junction kanalları oluşturarak hücreler arasında madde geçişini sağlamalarının yanı sıra, hücre zarına gönderilen connexonların (non-junctional) yarım kanallar vasıtasıyla hücrelerin yaşamlarını ve faaliyetlerini sürdürmeleri için önemli roller üstlendikleri gösterilmiştir. Normal şartlarda ya da hastalık durumlarında bu kanallar açılarak farklı faktörlerin (ATP, kalsiyum, glutamate, NAD gibi) hücre dışına salınımını sağlayarak otokrin ve parakrin sinyallerle çevrelerini etkilemelerinin yanı sıra bu moleküllerin hücre içine alımını sağlayarak hücre homeostazisinde görev almaktadırlar (Goodenough ve Paul, 2003; Saez vd., 2005; Evans vd., 2006).

2.2 Connexinlerin fizyolojik görevleri

Connexinlerin insan fizyolojisi için önemi bu genlerde oluşan mutasyonların farklı genetik hastalıklara neden olduğunun gösterilmesiyle ortaya konmuştur (Srinivas vd., 2018). Günümüze kadar en az 10 connexin izoformundaki mutasyonların 28 farklı genetik hastalığa neden olduğu gösterilmiştir (Srinivas vd., 2018). Mesela, Cx32 mutasyonlarının Charcot-Marie-Tooth disease adı verilen kalıtsal periferik neuron hastalığı, Cx46 ve Cx50 mutasyonlarının katarakt ve Cx26, Cx30 ve Cx31'in sağırılık ve deri hastalıklarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bergoffen vd., 1993.; Gong vd., 1997; Shiels vd., 1998; Scott ve Kessel, 2011).

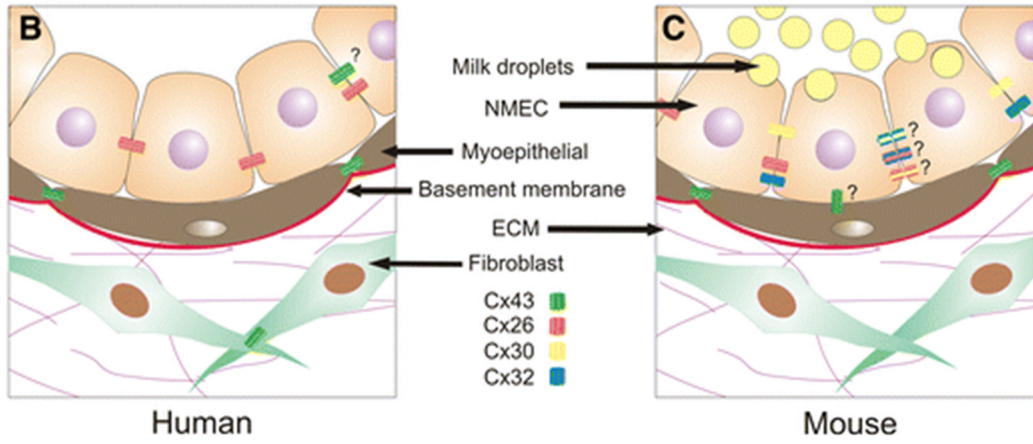
Connexinlerin kalıtsal genetik hastalıklarla bağlantısının yanı sıra meme kanseri gibi farklı kanserlerin başlangıcında ve ilerlemesinde de rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan öncül çalışmalarda tümör hücrelerinin arasında gap junctional intercellular communication (GJIC) olmadığı ve bu durumun connexin ifadesinin azalmasından kaynaklı olduğu gösterilmiştir (Mesnil vd., 2005; Aasen vd., 2017). Bu nedenle GJIC ve connexinlerin tümör baskılayıcı olarak görev aldıkları düşünülmüştür (Mesnil vd., 2005). Fakat daha sonra gerçekleştirilen çalışmalar connexinlerin kanser indükleyici olarak da çalışabildiklerine işaret etmektedir. Bu bağlamda connexinlerin tümör oluşumunda hücre, evre ve zamana bağlı olarak farklı roller üstlenebileceği vurgulanmıştır.

2.3 Connexinler ve meme kanseri

Gelişmiş ülkelerdeki kadınlarda en sık rastlanan kanser türü olan meme kanseri, düzenli mamografi taramalarının erken teşhise yaptığı önemli katkılara rağmen, halen kadınlarda kansere bağlı ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Lokalize ya da bölgesel lenf tutulumu aşamasında tespit edilen meme kanseri etkili bir şekilde tedavi edilebilirken, uzak metastaz durumlarında kullanılan rutin uygulamalar yetersiz kalmakta ve bu durum 5 yıllık

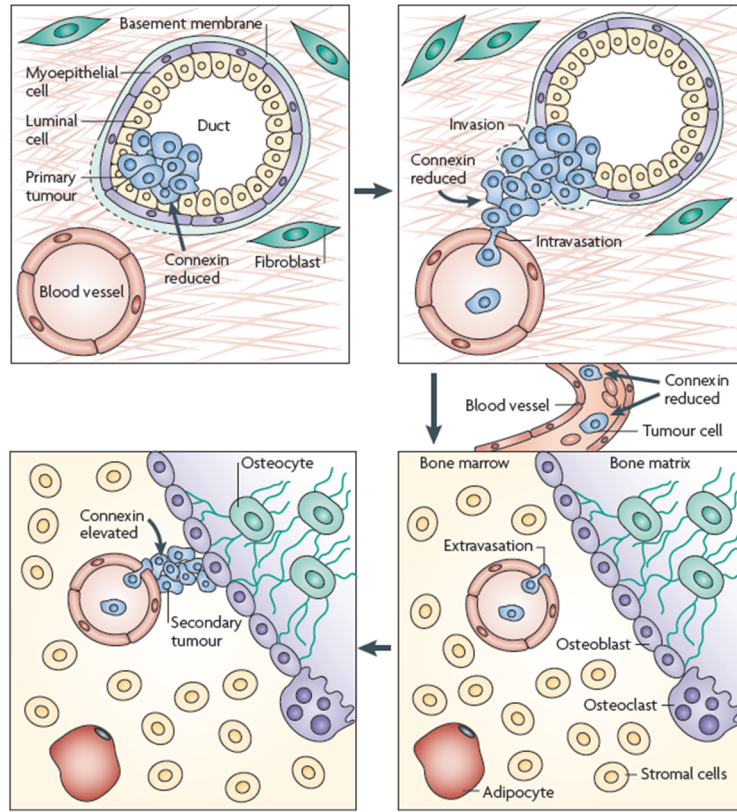
hayatta kalma oranını oldukça düşürmektedir. Meme kanserinde başlıca ölüm sebebi olan metastazın öngörülebilmesi ya da etkin olarak tedavi edilebilmesi mevcut tıbbi yöntemlerle mümkün değildir. Bu nedenle, hastaya uygun tedavi yöntemlerinin doğru bir şekilde uygulanabilmesi için metastaz riskinin kesin bir şekilde belirlenebilmesi gerekmektedir. Bu amaca ulaşabilmek için metastazı yöneten tüm faktörlerin moleküler düzeyde belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Weigelt vd., 2005; Dünya Sağlık Örgütü, 2018).

Normal ve patolojik meme fizyolojisinde görev alan moleküllerden biri olan connexinler (Cx) hem hücreler arasında oluklu bağlantılar (gap junction) kurarak hem de etkileşim içinde oldukları diğer moleküller vasıtasıyla meme homeostazında önemli roller üstlenmektedir (El-Saghir vd., 2011). İnsan meme dokusunda, meme küçültme operasyonlarından elde edilen örneklerde connexin ailesi üyelerinden sadece Cx26 ve Cx43 genlerinin ifade edildikleri gözlenmiştir (Monaghan vd., 1996) . Bu dokularda Cx26'nın özellikle lüminal hücrelerde, Cx43'ün de miyoepitel hücrelerde bulunduğu ve buldukları hücrelerin çoğalma ve farklılaşma mekanizmalarında rol oynadıkları ön görülmüştür (Şekil 2) (El-Sabban vd., 2003; McLachlan vd., 2007). İnsanlardan memenin her gelişim evresinden istenilen doku örnekleri elde edilmesi zor olduğu için, kemirgenlerde (fare ve sıçan) yapılan çalışmalar connexinlerin meme fizyolojisinde oynadığı rollere ışık tutmuştur. Bu çalışmalarda memenin farklı gelişim evrelerinde Cx26 ve Cx43'ün yanı sıra Cx32 ve Cx30'un da ifade edildiği gözlenmiştir (El-Sabban vd., 2003; Sohl ve Willecke, 2004; Talhouk vd., 2005; McLachlan vd., 2007). Kemirgenlerde, bakirelik, hamilelik, emzirme ve süttten kesme dönemlerinde connexinlerin çeşitlerinde, ifade düzeylerinde ve miktarlarında değişimler olduğu gösterilmiştir (Talhouk vd., 2005). Mesela, Cx26 ve Cx32'nin süt üretimi döneminde hem mRNA hem de protein seviyelerinde önemli ölçülerde artmalar olduğu, süttten kesme evresinde ise bu moleküllerin seviyelerinin bakire farelerinkine benzer düzeylere dönmeye başladığı gözlenmiştir. Bu da Cx26 ve Cx32'nin en azından kemirgenlerde süt üretiminde ya da salgılanmasında görev aldığına işaret etmektedir (Monaghan vd., 1996; Talhouk vd., 2005).



Şekil 2. İnsan ve fare meme dokusunda connexin ifadesinin karşılaştırılması. İnsan meme dokusunda Cx26 ve Cx43 bulunurken, fare meme dokusunda Cx26, Cx30, Cx32 ve Cx43'ün ifade edildiği gözlenmiştir (McLachlan vd., 2007).

Meme kanserinde connexinlerin ya da gap junctionların görev aldığı bilgisine normal meme dokusu ve meme kanseri dokusundan elde edilen mRNA'ların subtractive hibridizasyon yöntemiyle karşılaştırılması sonucunda ulaşılmıştır. Bu çalışmalara göre, tümör dokusundan elde edilen hücrelerde Cx26 ve Cx43 miktarlarının normal dokulara göre önemli ölçüde azaldığı ve hücreler arasındaki gap junction plakalarının oluşmadığı gözlenmiştir (Lee vd., 1992). Daha sonra yapılan araştırmalarda memede ifade edilen connexinlerin primer tümör dokularında genel olarak ya miktarlarında azalma olduğu ya da proteinlerin lokalizasyonlarının değiştiği, böylece hücreler arasındaki GJIC (gap junctional intercellular communication)'ın tamamen ortadan kalktığı gözlenmiştir (Laird vd., 1999; Kanczuga-Koda vd., 2003; Kanczuga-Koda vd., 2005; Conklin vd., 2007). Ek olarak, GJIC bulunmayan kanser hücrelerinde connexinlerin yeniden ifade ettirilmelerinin hücre bölünmesini ve tümör büyümesini engellemesi, bu genlerin meme kanserinde tümör baskılayıcı görevler üstlendiklerine işaret etmektedir (Zhu vd., 1991; McLachlan vd., 2006; Naus ve Laird, 2010). Bunun yanı sıra, hastalardan elde edilen bazı invaziv meme kanseri türlerinde Cx26 ve Cx43'nin ifade edilmeye devam ettikleri, bu proteinlerin büyük çoğunlukla hücre sitoplazmasında biriktikleri gözlenmiştir (Jamieson vd., 1998; Kanczuga-Koda vd., 2006; McLachlan vd., 2007). Bu gözlemler connexinlerin kanserin farklı evrelerinde farklı görevler üstlenebildiğine işaret etmektedir: Bu da connexinlerin kanserin ilk evrelerinde ve/veya primer kanserlerde tümör baskılayıcı olarak çalışırken, kanserin ileri safhalarında ise metastazı teşvik edici faaliyetlerde bulunabileceğini göstermektedir (Şekil 3). Buna göre, kanserin ileri safhalarında connexinlerin hücre zarında gap junction kanallar yapmak yerine hücre sitoplazmasında birikerek bilinmeyen mekanizmalarla metastazda görev alabilecekleri düşünülmektedir (McLachlan vd., 2007; Naus ve Laird 2010).



Şekil 3. Connexin ifadesindeki değişimlerin meme kanserinin farklı evrelerinde oynadığı roller. Connexinlerin tümör oluşumunun ilk dönemlerinde azaldığı fakat ileri aşamalarında seviyelerinin arttığı gözlenmiştir (Naus ve Laird, 2010)

Yukarıda da işaret edildiği üzere, normal insan meme dokusunda ve meme kanseri araştırmalarında kullanılan hücre hatlarında sadece Cx26 ve/veya Cx43 genlerinin ifade edildikleri gösterilmiştir. Bununla beraber son dönemlerde, meme kanseri hastalarından elde edilen doku örneklerinde yapılan immunokimyasal çalışmalar, kanser dokularında Cx26 ve Cx43'e ek olarak Cx32'nin de ifade edilmeye başladığını göstermiştir (Conklin vd., 2007; Kanczuga-Koda vd., 2007). Normal meme dokusundaki bu Cx moleküllerine ek olarak miyoepitel ve bazı lüminal hücrelerde Cx30 varlığı ve Cx32'nin lüminal epitel hücreler arasında bulunduğu gösterilmiştir (Teleki vd., 2014). Fakat, Cx30 ve Cx32'nin insan meme fizyolojisindeki fonksiyonu bilinmemektedir. Cx32'nin insan meme dokusunda kanser gelişimi sırasında ifade edilmeye başlamasının meme kanserine etkisi ve bu bağlamda Cx32'nin meme fizyolojisinde oynadığı roller bilinmemektedir.

Cx32 geni ilk olarak karaciğer hücrelerinden klonlanmış, daha sonra da Schwann hücreleri ve böbrekteki podocyte gibi bir çok farklı hücrede bulunduğu gösterilmiştir (Kumar ve Gilula, 1986; Kumar ve Gilula, 1996). Cx32 mutasyonlarının insanlarda X kromozomuna bağlı kalıtsal Charcot-Marie-Tooth (CMTX1, OMIM# 302800) hastalığına neden olduğu gösterilmiştir (Bergoffen vd., 1993). Bu da Cx32'nin insan fizyolojisi için olan önemini ortaya koymaktadır.

Ek olarak, Cx32'nin farklı kanser türlerinde de etkin rol üstlendiği bilinmektedir. Özellikle deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, Cx32 geni çıkarılan farelerin kimyasal ya da radyasyonla indüklenen karaciğer ve akciğer kanserlerine normal farelerden daha yatkın oldukları gösterilmiştir (Temme vd., 1997; King ve Lampe, 2004). Bu da Cx32'nin bu dokularda tümör baskılayıcı görevler üstlendiğine işaret etmektedir. Bazı hepatocellular carcinoma (HCC) türlerinde Cx32'nin ifade edilmeye devam ettiği ve Cx32'nin hücreler arasında oluklu bağlantı kurmak yerine, hücre sitoplazmasında biriktiği gözlenmiştir (Li vd., 2007). Bu çalışmada Cx32'nin oluşturduğu oluklu bağlantıların HCC'nin gelişmesini engellediği fakat sitoplazmada biriken Cx32'nin HCC hücrelerinin invazyon ve metastazını artırdığı gösterilmiştir. Cx32'nin hücre sitoplazmasında biriktiği durumlar mide, prostat, kolon kanseri gibi farklı kanser türlerinde de kaydedilmiştir (Mehta vd., 1999; Kanczuga-Koda vd., 2010; Jee vd., 2011). Fakat, Cx32'nin hücre sitoplazmasında birikmesinin kanser hücrelerinin hareket ve metastaz kabiliyetlerini nasıl etkilediği tam olarak bilinmemektedir.

Bu projede, lenf tutulumlu meme kanserlerinde ifade edilmeye başlandığı gözlenen Cx32'nin farklı metastatik özellikler gösteren meme kanseri hücrelerinde oynadığı rollerin araştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Connexin 32'nin farklı ekspresyon vektörlerine klonlanması

İnsan connexin 32 (hCx32) cDNA'sı ABD'deki University of Pennsylvania'da bulunan Professor Steven S. Scherer'dan tedarik edilmiştir. Ek olarak, hCx32'nin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çoğaltılması için gerekli olan Tablo 1'deki primerler klonlama için gerekli restriksiyon enzim kesim bölgeleri (sırasıyla XhoI ve EcoRI) eklenerek tedarik edilmiştir.

Tablo 1. Cx32'nin çoğaltılması için kullanılan primerler

hCx32-XhoI-F	TGT TGT CTC GAG atg aac tgg aca ggt t
hCx32-EcoRI-R	TGT TGT GAA TTC tca gca ggc cga gca gc

hCx32 cDNA'sı farklı vektörlere klonlanmak amacıyla PZR ile çoğaltılmıştır. cDNA XhoI ve EcoRI enzimleriyle kesilerek öncelikle sekansının doğrulanması amacıyla pBSBK bakteriyel vektörüne klonlanmıştır. Sekansı teyit edilen hCx32 cDNA'sını içeren klonlar daha sonra tekrar XhoI ve EcoRI enzimleriyle kesilerek aynı enzimlerle kesilmiş pIRES2-EGFP memeli ve pMSCV PIG viral ekspresyon vektörlerine klonlanmıştır.

3.2 Hücre kültürü

hCx32'nin fonksiyonunun araştırılması için normal meme hücresi MCF10A ve farklı metastatik özellikleri olan meme kanseri hücreleri, MCF7 (invaziv olmayan), Hs578T (orta derece invaziv),

MDA-MB-231(invaziv)) kullanılmıştır (Guo vd., 2002; Hughes vd., 2008). Hücreler aşağıda listelenen besi yeri ortamlarında 37°C ve %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatörde çoğaltılarak kültürleri devam ettirilmiştir.

MCF10A: DMEM/F-12 (GIBCO)/%5 Donor Horse Serum (Biological Industries)/%1 Penicillin/Streptomycin (GIBCO)/ 20ng/mL EGF (Sigma)/ 0.5 µg/mL Hydrocortisone (Sigma)/ 100ng/mL Cholera Toxin (Sigma)/10 µg/mL insülin (Sigma)

MCF7, MDA-MB-231 ve 293T: DMEM (GIBCO)/%10 Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO)/%1 Penicillin-Streptomycin (GIBCO)

Hs578T: DMEM (GIBCO)/%10 Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO)/%1 Penicillin-Streptomycin (GIBCO)/10µg/ml insülin(Sigma)

NIH3T3: DMEM, %10 Newborn Calf Serum (NBCS) (Life Technologies, Cat# 16010159) /%1 Penicillin-Streptomycin (GIBCO)

Hücreler haftada iki kere, %0.05 Trypsin-EDTA (Biological Industries) ile 2-15 dakika 37°C'de bekleterek kaldırılmış ve yeni kaplara uygun sayıda ekilerek pasajlanmıştır.

Hücrelerin pIRES2-EGFP2-Cx32 ile transfeksiyonları aşağıda belirtildiği şekilde üreticinin protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir:

MCF10A- Transfeksiyondan 24 saat önce 6-kuyucuklu kaplara kuyucuk başına 500,000 hücre ekilerek transfeksiyon günü Fugene HD transfeksiyon ajanıyla hücrelere pIRES2-EGFP2 ve pIRES2-EGFP2-Cx32 plazmidleri 2µg DNA:4µl Fugene HD (Promega) oranıyla verilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra EGFP sinyali floresan mikroskopuyla kontrol edilerek deneylerde kullanılmıştır.

MCF7- Transfeksiyondan 24 saat önce 6-kuyucuklu kaplara kuyucuk başına 300,000 hücre ekilerek transfeksiyon günü Fugene HD transfeksiyon ajanıyla hücrelere pIRES2-EGFP2 ve pIRES2-EGFP2-Cx32 plazmidleri 1µg DNA:6µl Fugene HD (Promega) oranıyla verilmiştir. Transfeksiyondan 48 saat sonra EGFP sinyali floresan mikroskopuyla kontrol edilerek deneylerde kullanılmıştır.

Hs578T- Transfeksiyondan 24 saat önce 6-kuyucuklu kaplara kuyucuk başına 200,000 hücre ekilerek ertesi gün Lipofectamine 3000 transfeksiyon ajanıyla hücrelere pIRES2-EGFP2 ve pIRES2-EGFP2-Cx32 plazmidleri 3µg DNA:4µl Lipofectamine 3000 oranıyla verilmiştir. Transfeksiyondan 72 saat sonra EGFP sinyali floresan mikroskopuyla kontrol edilerek deneylerde kullanılmıştır.

MDA-MB-231- Transfeksiyondan 48 saat önce 6-kuyucuklu kaplara kuyucuk başına 400,000 hücre ekilerek Fugene HD transfeksiyon ajanıyla hücelere pIRES2-EGFP2 ve pIRES2-EGFP2-Cx32 plazmidleri 2µg DNA:6µl Fugene HD (Promega) oranıyla verilmiştir. Transfeksiyondan 48 saat sonra EGFP sinyali floresan mikroskopuyla kontrol edilerek deneylerde kullanılmıştır.

Fugene HD transfeksiyonu için belirlenen DNA ve Fugene miktarları serumsuz DMEM'de karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika beklenmiştir. Karışım hücelere damla damla verilerek hücreler 24 ile 48 saat arasında deneylerde kullanılmıştır.

Lipofectamine 3000 transfeksiyonu için öncelikle Lipofectamine 3000 serum olmayan DMEM'e eklenip vortex'le karıştırılmıştır. DNA serum olmayan DMEM ve kitle gelen P3000 miyarıyla karıştırılarak hazırlanmıştır. DNA solüsyonu, Lipofectamine 3000 solüsyonuna eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Karışım hücelere damla damla verilerek hücreler 24 ile 48 saat arasında deneylerde kullanılmıştır.

3.3 Virüs üretimi

3.5-4.5x10⁶ 293T hücrelerinin 10 cm lik kültür kabına ekiminden 24 saat sonra, hücreler lentiviral vektörler: 2µg pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro (pLenti-GFP, ABMGOOD) veya 2µg pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro-Cx32 (pLenti-Cx32-GFP, ABMGOOD), 1.3µg paketleme vektörü (pCMVdR8.74) ve 0.7µg sarmalama vektörü (pMD2.VSVG) ile 12 µl Fugene HD kullanılarak transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra, hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmış ve yeni 8.5 mL besiyeri eklenmiştir. Transfeksiyondan 48 saat sonra, virüsleri içeren besiyeri falcon tüplerine toplanmış ve yerine 8.5 mL yeni besiyeri eklenmiştir. Toplanmış virüsler, bir sonraki toplamaya kadar 4°C'de saklanmıştır. Transfeksiyondan 72 saat sonra, virüs içeren besiyeri tekrar toplanmıştır. Titrasyon için 200 µl virüs ayrılmış ve geriye kalan virüsler – 80°C'de saklanmıştır.

3.4 Virüs titrasyonu

Virüs üretiminin verimliliğini belirlemek amacıyla, virüslerin titresine karar verilmiştir. Virüs titrasyonu fare fibroblast hücreleri olan NIH3T3+ hücre hattı kullanılarak yapılmıştır. 2x10⁵ NIH3T3+ hücrelerinin 6-kuyucuklu kaplara ekilmesinden 24 saat sonra, 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ oranlarında seyreltilmiş virüsler ve 8 µg/mL polybrene içeren 4mL son hacimli besiyeri hücrelerin üzerine eklenmiştir. Hücreler 2 saat, 2,500 rpm ve 32°C'de santrifüj edilmiştir. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuk başına 2mL yeni besiyeri eklenmiştir. Virüs enfeksiyonundan 48 saat sonra, hücreler trypsin ile kaldırılmış ve 10 cm'lik kültür kabına, 2

$\mu\text{g/mL}$ puromycin içeren seçilim besiyerine ekilmiştir. Virüs içermeyen negatif kontrol (mock) koşulundaki hücreler ölene kadar seçilim devam ettirilmiştir.

Seçilim tamamlandığında, kültür kapları 1X PBS ile iki kere kabin içerisinde yıkanmıştır. 4 mL 1X PBS eklendikten sonra, kültür kapları kabin dışına alınmış ve PBS uzaklaştırılmıştır. Sonra kültür kapları 5mL % 5'lik Crystal Violet boya solüsyonu ile çalkalama kabında, oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Crystal Violet boya solüsyonu uzaklaştırılmış ve kültür kabı 1X PBS ile yıkanmıştır. 1X PBS ile yapılan 10 dk'lık yıkamalar mock koşulundaki hücrelerin kültür kabı transparan oluncaya kadar devam ettirilmiştir. 1X PBS uzaklaştırıldıktan sonra, kültür kapları ters çevrilmiş ve kurumaya bırakılmıştır. Kültür kapları kuruduktan sonra koloniler sayılmıştır.

3.5 Virüs enfeksiyonu

6-kuyucuklu kaplara, kuyucuk başına $2.5-3.5 \times 10^5$ MCF10A, MCF7, MDA-MB-231 ve Hs578T hücresi ekilmiştir. Hücre ekiminden 24 saat sonra hücrelerin besi yeri uzaklaştırılmış, her kuyucuğa 8 $\mu\text{g/mL}$ polybrene ile birlikte 4mL virüs eklenmiştir. 6-kuyucuklu kaplar 2 saat boyunca 2,500 rpm ile 32°C de santrifüj edilmiştir. Kuyucuk başına 2 mL yeni besiyeri eklenmiştir. Enfeksiyondan 48 saat sonra, hücreler trypsin ile kaldırılıp 10 cm'lik hücre kültürü kaplarına transfer edilmiştir. Hücreler 2 $\mu\text{g/mL}$ puromycin içeren seçilim besiyerine ekilmiştir. Mock koşulundaki hücreler ölene kadar seçilim devam ettirilmiş ve böylece Cx32'yi kalıcı olarak ifade eden hücreler elde edilmiştir.

3.6 Tekli immunohistokimyasal analizler

Lamel'de büyütülen ve pIRES2-EGFP ve pIRES2-EGFP2-hCx32 ile transfekte edilen hücreler iki defa 1X PBS'le yıkandıktan sonra 1X PBS'te hazırlanmış %4 paraformaldehyde ile 20 dakika boyunca sabitlenmiştir. %0.1 TritonX-100'lü 1XPBS'le hücre zarının geçirgenliği 15 dakika boyunca artırılmış ve hücreler %3-%5 BSA bulunan %0.1 TritonX-100'lü 1XPBS'le 30-60 dakika boyunca bloklanmıştır. Daha sonra hücrelere 1:200 oranında seyreltilen tavşan anti-Cx32 birincil antikoru (rabbit anti-Cx32 antibody - Invitrogen) bütün gece 4°C'de ya da oda sıcaklığında 1 saat boyunca uygulanmıştır. Sonrasında birincil antikor üç kere 1X PBS'le yıkandıktan sonra tavşana karşı üretilen floresan molekül bağlı ikincil antikor (Alexa Fluor 555-anti-rabbit antikor (Invitrogen)) 1:200 ve DAPI 1:500 oranlarında seyreltilerek 30 dakika boyunca uygulanmıştır. Üç kere 1X PBS'le yıkanan lameller cam lamlara yükleme solüsyonuyla (mounting medium) yüklenmiştir. Hazırlanan cam lamlar floresan mikroskopta 40X-100X objektifiyle kontrol edilip resimleri çekilmiş, ImageJ programıyla da (NIH) birleştirilmiştir.

3.7 Western blot analizleri

3.7.1 Protein izolasyonu

Transfekte veya enfekte edilen hücreler sıvı nitrojende dondurulmuş ve -80°C'de saklanmıştır. Protein izolasyonu sırasında dondurulmuş hücreler buzun üzerinde 5 dakika boyunca eritildikten sonra üzerlerine Lysis buffer (10 mmol/l Tris pH 7.5, 1 mmol/l EDTA, %0.1 Triton X-100, 1X protease inhibitor and 1 mM DTT) eklenerek, hücreler kazınarak toplanmıştır. Eppendorf tüplere toplanan hücreler 26G'lik insülin şırıngalarıyla homojenize edildikten sonra buzun üzerinde 20 dakika boyunca bekletilmişlerdir. Kısa bir vortex'ten sonra hücreler 4°C'de ve 14000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilip sıvı kısmı yeni Eppendorf tüplere aktarılmış, protein miktarı Bradford testiyle belirlendikten sonra -80°C'de saklanmışlardır.

Bradford için proteinler 1:200 oranında (1 µl protein, 159 µl dH₂O and 40 µl 5X Bradford miyar olacak şekilde) 96-kuyucuklu kaplarda ikili örnekler olarak hazırlanmıştır. Protein konsantrasyonlarının tayini için 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8 mg/ml BSA konsantrasyonları hazırlanarak, spektrofotometre ile 595 nm'de ölçümler yapıp standart eğri hazırlanmıştır. Deneysel örnekler spektrofotometrede ölçülmüş, standart eğri kullanılarak örneklerdeki protein miktarları tayin edilmiştir.

3.7.2 Western blot protokolü

Hücrelerden izole edilmiş proteinler yükleme boyası eklenerek eşit konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Örnekler protein belirteciyle beraber (NEB) SDS-PAGE jelinde yürütülmüştür. Nitrocellulose membranına geçirilen proteinler 1X TBS-Tween-20 (0.05 %) (TBS-T) ile yıkandıktan sonra, 1X TBS-T'te çözünen %5 süt tozu ile membran 2-3 saat boyunca bloklanmıştır. Membran daha sonra 1:1000 olarak seyreltilen birincil antikolarla (Tablo 2) bütün gece 4°C'de döndürülmüştür. Bir sonraki gün membran 1X TBS-T ile 15'er dakika süreyle 3 kere yıkandıktan sonra 1:2500 olarak seyreltilen peroxidase'e bağlı ikincil antikolarla (Pierce) muamele edilmiştir. Membran 1X TBS-T ile 15'er dakika süreyle 3 kere yıkandıktan sonra üzerine SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo) uygulanarak Versadoc görüntüleme sistemiyle (Bio-Rad) görüntülenmiştir. Bu deneylerde, γ -tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmış, aynı membran aynı protokol takip edilerek 1:10000 seyreltilen γ -tubulin miktarının tayini için kullanılmıştır. Birincil antikor olarak fare anti- γ -tubulin antikorunu (Sigma) ve ikincil antikor olarak peroxidase'e bağlı keçi anti-fare (Dako) kullanılarak görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2. Western blot için kullanılan birincil ve ikincil antikorlar

Antikorlar	Üretildiği canlı	Katalog numarası
Cx32 birincil antikor	Rabbit	Abcam, Cat# ab66613
Cx32 birincil antikor	Rabbit	Sigma, Cat# C3595
Cx32 birincil antikor	Rabbit	Invitrogen, Cat# 34-5700
Cx26 birincil antikor	Goat	Abcam, Cat# ab59020
Cx43 birincil antikor	Rabbit	Invitrogen, Cat# 71-0700
γ -tubulin birincil antikor	Mouse	Sigma, Cat# T6557
Slug birincil antikor	Rabbit	Cell signaling, Cat# 9585P
Snail birincil antikor	Rabbit	Cell signaling, Cat# 3879P
Twist birincil antikor	Rabbit	Calbiochem, Cat# DR1088
E-Cadherin birincil antikor	Rabbit	Cell signaling, Cat# 3195P
N-Cadherin birincil antikor	Rabbit	Cell signaling, Cat# 13116P
Zo-1 birincil antikor	Rabbit	Cell signaling, Cat# 8193P
Zeb-1 birincil antikor	Rabbit	Cell signaling, Cat# 3396P
Zeb-2 birincil antikor	Rabbit	Merck, Cat# ABT332
Vimentin birincil antikor	Rabbit	Cell signaling, Cat# 5741P
İkincil antikor	anti-rabbit	Thermo, Cat# 31460
İkincil antikor	anti-goat	Pierce, Cat# 31460
İkincil antikor	anti-mouse	Dako, Cat# 00071312

3.8 mRNA ifade analizleri

Moleküler ifade analizlerinde kullanılmak üzere dizayn edilen primerler (Tablo 3) nükleaz içermeyen suda çözülmüş, kullanım solüsyonu 500X'lik stok solüsyonunu 10X'e seyrelterek elde edilmiştir. Toplam mRNA izolasyonu için, 6 kuyulu platelerde bulunan hücreler iki kere

1XPBS ile yıkandıktan sonra sıvı azotla dondurulmuştur. Sıvı azottan alınan platelerin kuyularına 200µl lysis buffer eklenip hücreler buzun üzerinde 2-3 dk boyunca bekletilmiştir. Kuyulardaki parçalanmış hücreler 1.5 ml'lik eppendorf tüplerde toplanmış ve insülin iğnesi yardımıyla homojenize hale getirilmiştir. Tüpteki sıvılar, üzerlerine kendi hacimleri kadar etanol eklendikten sonra, toplam mRNA izolasyonu PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen) protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Elde edilen örneklerin mRNA konsantrasyonları Nanodrop kullanılarak ölçülmüştür. Eşit miktarlarda mRNA'dan First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) ile elde edilen cDNA'lar RT-PCR analizi için kullanılmıştır. Çevrimler sonucu (Tablo 4) elde edilen ifade eğrileri kontrollü olarak analiz edilmiştir. Üç tekrarlı (triplicate) olarak yürütülen RT-PCR deneylerinde numune sayısı da üç olarak kullanılmıştır.

Tablo 3. RT-PCR'da kullanılan primer listesi

Gen adı	İleri (forward) primer (5'-3')	Geri (reverse) primer (5'-3')
Connexin 32	ggcacaaggtccacatct	gcatagccagggttagagc
GAPDH	gaaggtgaaggtcggagtc	aatgaaggggtcattgatgg
E-cadherin	cagcacgtacacagccctaa	gggatggggcggtgtcatt
ZO-1	atggaggaaacagctatatggga	ccaaatccaaatccaggagc
ZEB1	cccaggtgtaagcgcagaaa	gtctggtctgtggcaggtc
ZEB2	ataaggagggtggagtggaa	gttaattgcggtctggatcgtg
Vimentin	gctaaccaacgacaaagccc	cgttcaaggtcaagacgtgc
Snail	ctaggccctggctgctacaa	tgtggagcaggacattcg
Slug	ctcctcatcttggggcgag	ttcaatggcatgggggtctg
Twist1	ctgtccattttctccttctctgg	ttctcggcttgaggatgga
N-cadherin	gacggttcgccatccagac	tcgattggt ttgaccacgg

Tablo 4. qRT-PCR protokolü

Preincubation	95 °C	600 s	1 cycle
3 step amplification	95 °C	30 s	45 cycle
	60 °C		
	72 °C		
Melting	95 °C	10 s	1 cycle
	65 °C	60 s	
	72 °C	1 s	

Bütün mRNA ifade analizi deneylerinde insan GAPDH geni içsel kontrol (housekeeping gene) olarak kullanılmıştır. RT-PCR Roche LightCycler® 96 sisteminde gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Delta-Delta Ct yöntemiyle analiz edilmiştir.

3.9 Hücre içine floresan boya alım (dye uptake) analizleri

Kalıcı olarak enfekte edilmiş hücreler 6-kuyucuklu kaplara ekildikten 48 saat sonra, 1X PBS ile yıkanmış ve Opti-MEM® ile 20 dk. 37°C'de inkübe edilmiştir. Sonra, 0,5 mg/mL Neurobiotin (NB) içeren Opti-MEM® hücrelerin üzerine eklenmiş ve hücreler 20 dk. 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücreler sonrasında DMEM besiyeri ile 3 kere 10'ar dk.'lık aralıklarla yıkanmıştır. Bunu takiben hücreler 1X PBS'de hazırlanan 0,5mg/ml neurobiotin boyasına 20 dakika boyunca karanlıkta ve 37°C'de maruz bırakılmışlardır. Belirtilen sürenin sonunda hücreler 1X PBS'le yıkanmış ve 1X PBS'te hazırlanmış %4 paraformaldehide ile 20 dakika boyunca sabitlenmiştir. %0.1 TritonX-100'lü 1X PBS'le hücre zarının geçirgenliği 10 dakika boyunca artırılmış ve hücreler %3 BSA bulunan %0.1 TritonX-100'lü 1X PBS'le 15 dakika boyunca bloklanmıştır. Daha sonra hücreler 1:1000 oranında tetra methyl rhodamine isothiocyanate (TRIT-C)'e bağlı streptavidin'le (Pierce) muamele edilmişlerdir. 1X PBS'le yıkanan hücreler floresan mikroskopta 20X objektifiyle kontrol edilip resimleri çekilmiş, ImageJ programıyla da analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.10 Yarıkla floresan boya yükleme (scrape loading) analizleri

Hücreler 6-kuyucuklu kaplara ekildikten 48 saat sonra, 1X PBS ile yıkanmıştır. Sonra, 0.5 mg/mL Neurobiotin (NB) içeren Opti-MEM® hücrelerin üzerine eklenmiştir. Bistüri ile hücreler üzerinde kesik yapıldıktan sonra hücreler 10 dk. 37°C'de inkübe edilmiştir. Neurobiotin (NB) içeren Opti-MEM® çekildikten sonra hücreler DMEM besiyeriyle 20 dk. 37°C'de inkübe edilmiştir. Opti-MEM® ile 3 kere 10'ar dk.'lık yıkamalardan sonra hücreler %4 Paraformaldehide (PFA) ile 15 dk. oda sıcaklığında inkübe edilerek sabitlenmiştir. Hücreler sonrasında 3 kez 1X PBS ile yıkandıktan sonra with %0.1 TritonX-100/PBS ile oda sıcaklığında 15 dk. bekletilmiştir. Sonra, hücreler 3 % BSA kullanılarak 4°C'de gece boyunca inkübe edilerek bloke edilmiştir. Hücreler, 1:500 seyreltme oranında Rhodamine-conjugated streptavidin ve 1:1000 seyreltme oranında DAPI ile blok solüsyonunda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve sonrasında 1X PBS ile 10'ar dk.'lık ara ile 2 kere yıkanmıştır. 1X PBS'le yıkanan hücreler floresan mikroskopta 10X objektifiyle kontrol edilip resimleri çekilmiş, ImageJ programıyla da analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.11 MTT analizleri

2×10^3 MCF10A ve MDA-MB-231 hücreleri 48-kuyucuklu kaplara ekilmiştir. 1, 4, 7 ve 10. günlerde hücreler %10 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) içeren solüsyon ile 4 saat 37°C de inkübe edilmiştir. MTT içeren solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra, kristaller DMSO ile çözülerek 96-kuyucuklu kaplara transfer edilmiştir. Örneklerin absorpsiyon değerleri 570 nm and 650 nm de spectrophotometer ile ölçülmüştür.

Hücreler Hs578T hücreleri için 2500 hücre/kuyu ve MCF7 hücreleri için 5000 hücre/kuyu olarak 24 kuyulu ortama ekilip 10 gün boyunca büyütülerek aynı protokolle 3,5,7 ve 10. günlerde MTT analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.12 BrdU boyaması

2×10^5 MDA-MB-231 ve 1×10^5 MCF10A hücresi 6-kuyucuklu kaplara konulmuş lamellere ekilmiş ve 48 saat sonra hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmıştır. Her kuyu için 1:500 seyreltme oranında BrdU (20 μM) içeren 500 μl besiyeri eklenmiş ve 2 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. Hücreler 3'er dk. aralıklarla iki kere yıkanmış ve sonrasında %4 Paraformaldehyde (PFA) kullanılarak, 20 dk. oda sıcaklığında inkübe edilerek sabitlenmiştir. Hücreler 1X PBS ile 5'er dk. aralıklarla üç kere yıkanmış ve sonrasında 1.5 M HCl ile 30 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hücreler 1X PBS ile 5'er dk. aralıklarla iki kere yıkanmıştır. Hücreler %5 Normal Horse Serum (NHS), %0,2 Triton X içeren 1X PBS ile hazırlanmış bloke solüsyonuyla 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hücreler bir kere 1X PBS ile yıkandıktan sonra 1:50 seyreltilmiş BrdU antikoruna ile antikor solüsyonunda (%2 Normal Horse Serum (NHS), %1 Triton X içeren 1X PBS ile hazırlanmış solüsyon) 4°C de gece boyunca bekletilmiştir. Sonra hücreler 5'er dk aralıklarla 3 kere yıkanmış ve 1:1000 seyreltme oranında DAPI içeren antikor solüsyonunda 45 dk. bekletilmiştir. Hücreler 3 kere 1X PBS ile yıkandıktan sonra, lameller otoklavlanmış suya batırılmış, kurutulmuş ve lama mount edilmiştir. Örneklerin görüntülemeleri, Olympus floresan mikroskobu kullanılarak alınmış ve görüntüler ImageJ programı ile analiz edilmiştir.

3.13 PI boyaması ve akış sitometrisi ile hücre döngüsü analizleri

Hücreler 6-kuyucuklu kaplara ekilmiş ve 48 saat sonra 1X PBS ile yıkanmıştır. Hücreler tripsinize edildikten sonra falcon tüplerine toplanmış ve 10 dk. 1200 rpm ile santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvı kısmı çekilmiş ve pelet içeren tüpler buza konmuştur. 1 mL 1X PBS eklendikten sonra, hücreler nazikçe pipetlenmiştir. 4mL soğuk %100 EtOH eklenmesinden sonra, hücreler nazikçe karıştırılmıştır. Falcon tüpler -20°C 'de gece boyunca bekletilmiştir. 1500 rpm ile 10 dk.'lık santrifüjü takiben, 1 dk.'lık 2000 rpm ile santrifüj yapılmıştır. Üstte kalan

sıvı kısmı çekilmiş ve 1mL PBS eklenmiştir. Solüsyonlar Eppendorf tüplere transfer edildikten sonra, +4°C'de 1500 rpm ile 10 dk. santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvı kısmı çekilmiş ve 200 µl 0.1 % TritonX-100/PBS ve 20 µl RNase A (200 µg/mL) eklenip iyice karıştırılmış, 37°C'de 30 dk. inkübe edilmiştir. Solüsyon flow cytometer tüplerine transfer edildikten sonra 20 µl PI (1mg/mL) eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dk. bekletilmiştir. Hücre döngüsü analizleri FACS Canto (BD Biosciences, CA, USA) ile yapılmıştır.

3.14 Yara kapama deneyleriyle migrasyon analizleri

2×10^5 MCF10A, 9×10^5 MCF7, $2,5 \times 10^5$ MDA-MB-231 ve 4.5×10^5 Hs578T hücresi 12-kuyucuklu kaplara ekilmiş ve 48 saat sonra hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1X PBS ile yıkanmış ve 10 µg/mL mitomycin C içeren serumsuz besiyeri ile 2 saat boyunca 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ ile inkübe edilmiştir. 10 µl'lik tip ile kuyucuklara çizik atıldıktan sonra hücreler 1X PBS ile yıkanmıştır. %1 FBS içeren (MCF7, MDA-MB-231 ve Hs578T hücreleri için) ve %1.3 DHS içeren (MCF10A hücreleri için) besiyerleri eklenmiştir. Leica konfokal mikroskopta, hücrelerin saat başı görüntüleri alınmış ve görüntüler ImageJ programında analiz edilmiştir.

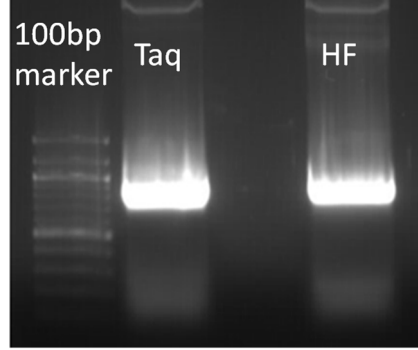
3.15 Boyden chamber ile invazyon analizleri

Matrigel buzun üzerinde çözdürüldükten sonra 1:6 oranında serumsuz besi yerinde seyreltilmiştir. Daha sonra 8µm'lik delikler içeren transwell kaplarına hazırlanan 40µl matrigel eklenerek 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına yerleştirilerek 37°C'de polimerizasyonu sağlanmıştır. Bu sırada hücreler tripsinle kaldırılmış ve 2ml %10 FBS içeren besi yeri ile toplanarak falcon tüplere aktarılmıştır. Hücreler 2 dk boyunca 1400 rpm'de döndürülerek çökertilmiş ve 5ml serumsuz besi yeri ile karıştırılarak sayılmıştır. 200 µl serumsuz besiyerinde 50000 hücre olacak şekilde hazırlanan hücreler transell kaplarındaki matrigel'in üzerine ekilmiştir. Kuyucuklara da 700µl normal besi yeri eklenerek hücreler 24 saat 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ ile inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda transwell kapları dikkatlice alınarak matrigelin üstü kulak çöpüyle temizlenmiştir. Kaplar daha sonra 1X PBS ile iki defa yıkanmış ve hücreler %4 PFA ile 20 dk süreyle sabitlenmiştir. Daha sonra hücreler iki kere 1X PBS ile yıkanmış ve 1:100 dilüe edilmiş DAPI ile 30 dk boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Kaplar tekrar 1X PBS ile iki defa yıkandıktan sonra lamın üstüne konularak 4X objektifle resimleri çekilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Connexin 32'nin farklı ekspresyon vektörlerine klonlanması

ABD'deki University of Pennsylvania'da çalışmalarını sürdüren Professor Steven S. Scherer'dan tedarik edilen insan connexin 32 (hCx32) cDNA'sı Tablo 1'de listelenen primerler ve iki farklı enzim (Taq ve High Fidelity (HF) polimeraz) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonuyla (PZR) çoğaltılmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. PZR reaksiyonundan sonra jelden izole edilen hCx32 cDNA'sının kontrolü

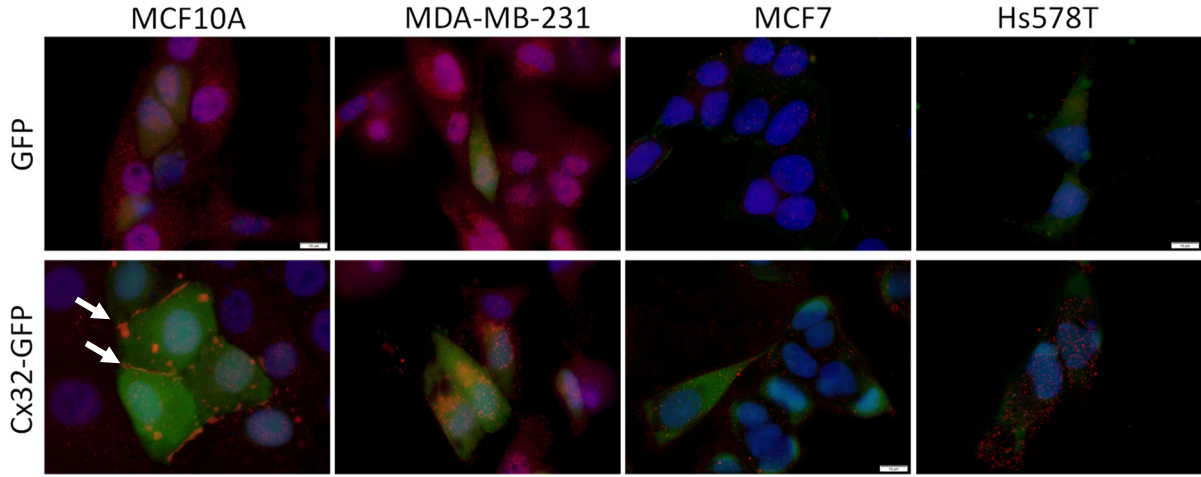
cDNA'lar ve pBSBK bakteriyel vektör ayrı ayrı EcoRI ve XhoI enzimleriyle kesilerek ligasyon yapılmış ve elde edilen klonlardan izole edilen plazmid DNA'lar sekanslamaya gönderilmiştir. Sekanslamaya gönderilen klonlar normal insan Cx26 gen dizilimine karşı Multialin programı kullanılarak hizalanmıştır (Şekil 5). Sekansları doğrulanan pBSBK-Cx32 plazmidi XhoI ve EcoRI enzimleriyle kesilerek, yine aynı enzimlerle kesilmiş pIRES2-EGFP2 memeli ve pMSCV PIG viral vektörlerine klonlanmıştır.

hCx32 Cx32-1-T3 Consensus	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
	GGACGAGAAAGGACCGGGCCCTTAGGGCCCTTCCAAAGTTAAGCGGTACCCGTTGGCGGGTAAACCCACCACCCCGGGCCGGCTTARTGCGCCGTTACAGGCGGGTTCACCTTCCGATTCAGGGTG													
hCx32 Cx32-1-T3 Consensus	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
	CGCACTGTGGAGGGCGATCGGTGCGGGCCCTTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAGGGGGATGTGCTGCAGGCGATTAGTTGGGTACGCCAGGGTTTCCCGTACAGCGTTGTAAACGA													
hCx32 Cx32-1-T3 Consensus	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
	CGGCGGTGAGCGCGTAAACAGACTACTATAGGGCAATTGGGTACTCCATGCAGGATGATGATGCGGTACCGGGCCCGCCCTCGAGATGAACTGGACAGGTTTGTACACCTTCTCAGTGGCGTGA ATGAACTGGACAGGTTTGTACACCTTCTCAGTGGCGTGA ATGAACTGGACAGGTTTGTACACCTTCTCAGTGGCGTGA													
hCx32 Cx32-1-T3 Consensus	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
	ACCGGATCTACTGCCATTGGCCAGATGGCTCTGGTCATCTTCAATCTCAGAACTATGGTGGTGGTGGCTGCAGAGAGTGTGGGGTGTGAGAACTTCCCTTCTGCACACACTCCA ACCGGATCTACTGCCATTGGCCAGATGGCTCTGGTCATCTTCAATCTCAGAACTATGGTGGTGGTGGCTGCAGAGAGTGTGGGGTGTGAGAACTTCCCTTCTGCACACACTCCA ACCGGATCTACTGCCATTGGCCAGATGGCTCTGGTCATCTTCAATCTCAGAACTATGGTGGTGGTGGCTGCAGAGAGTGTGGGGTGTGAGAACTTCCCTTCTGCACACACTCCA													
hCx32 Cx32-1-T3 Consensus	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
	GCCTGGCTGCACACGCGTTGGCTATGACCAATCTTCCCATCTCCCATGTGGCGCTGGTCCCTGCAGCTCATCTAGTTCCACCCAGCTCTCTCTGGCCATGCAGCTGGCTCACCAGACAC GCCTGGCTGCACACGCGTTGGCTATGACCAATCTTCCCATCTCCCATGTGGCGCTGGTCCCTGCAGCTCATCTAGTTCCACCCAGCTCTCTCTGGCCATGCAGCTGGCTCACCAGACAC GCCTGGCTGCACACGCGTTGGCTATGACCAATCTTCCCATCTCCCATGTGGCGCTGGTCCCTGCAGCTCATCTAGTTCCACCCAGCTCTCTCTGGCCATGCAGCTGGCTCACCAGACAC													
hCx32 Cx32-1-T3 Consensus	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
	ATAGAGAGAAATGCTACGGCTTAGGGCCATGGGACCCCTACACCTGGAGGAGTGAAGAGGCACAGGTCACATCTCAGGACACATGGTGGACATGATCATACAGCTGGTGTCCGGCTGT ATAGAGAGAAATGCTACGGCTTAGGGCCATGGGACCCCTACACCTGGAGGAGTGAAGAGGCACAGGTCACATCTCAGGACACATGGTGGACATGATCATACAGCTGGTGTCCGGCTGT ATAGAGAGAAATGCTACGGCTTAGGGCCATGGGACCCCTACACCTGGAGGAGTGAAGAGGCACAGGTCACATCTCAGGACACATGGTGGACATGATCATACAGCTGGTGTCCGGCTGT													
hCx32 Cx32-1-T3 Consensus	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
	TGTTGAGGCGCTTTCATGTATGTCTTTATCTGCTACCCCTGGCTATGCGCATGGTGGCGCTGGTCAAGTGCAGCTTACCCCTGCCCAACACAGTGAACCTGCTCGTGTCCCGCCACAGAA TGTTGAGGCGCTTTCATGTATGTCTTTATCTGCTACCCCTGGCTATGCGCATGGTGGCGCTGGTCAAGTGCAGCTTACCCCTGCCCAACACAGTGAACCTGCTCGTGTCCCGCCACAGAA TGTTGAGGCGCTTTCATGTATGTCTTTATCTGCTACCCCTGGCTATGCGCATGGTGGCGCTGGTCAAGTGCAGCTTACCCCTGCCCAACACAGTGAACCTGCTCGTGTCCCGCCACAGAA													
hCx32 Cx32-1-T3 Consensus	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
	AACCGTCTTCCAGCTTTCATGCTAGCTGCTTGGCATCTGCATCATCTCARTGTGGCCAGGTTGGTACCTCATCATCCGGGCTGTGCCCGGAGCCAGCCGCTCCATCCACCTTCCCGC AACCGTCTTCCAGCTTTCATGCTAGCTGCTTGGCATCTGCATCATCTCARTGTGGCCAGGTTGGTACCTCATCATCCGGGCTGTGCCCGGAGCCAGCCGCTCCATCCACCTTCCCGC AACCGTCTTCCAGCTTTCATGCTAGCTGCTTGGCATCTGCATCATCTCARTGTGGCCAGGTTGGTACCTCATCATCCGGGCTGTGCCCGGAGCCAGCCGCTCCATCCACCTTCCCGC													
hCx32 Cx32-1-T3 Consensus	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
	AAGGGCTCGGGCTTCCGCCACCCGCTTCACTGAAACAGCAGAGTGAATCAACAGCTGCTGAGTGAAGCAGATGGCTCCCTGAAAGACATCTGCGCCAGCCCTGGACCGGGCTGGGCTGG AAGGGCTCGGGCTTCCGCCACCCGCTTCACTGAAACAGCAGAGTGAATCAACAGCTGCTGAGTGAAGCAGATGGCTCCCTGAAAGACATCTGCGCCAGCCCTGGACCGGGCTGGGCTGG AAGGGCTCGGGCTTCCGCCACCCGCTTCACTGAAACAGCAGAGTGAATCAACAGCTGCTGAGTGAAGCAGATGGCTCCCTGAAAGACATCTGCGCCAGCCCTGGACCGGGCTGGGCTGG													
hCx32 Cx32-1-T3 Consensus	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1291	
	CTGAAAGAGCAGCCGCTGCTGGCTGCTGA CTGAAAGAGCAGCCGCTGCTGGCTGCTGA CTGAAAGAGCAGCCGCTGCTGGCTGCTGA													

Şekil 5. Sekanslamaya gönderilen örneğin normal Cx32 cDNA'sı ile Multalin programıyla karşılaştırılması

4.2 Cx32 ile transfekte edilen hücrelerdeki Cx32'nin lokalizasyonunun tespiti

Projede kullanılan hücreler bir doktora öğrencisi ve bir yüksek lisans öğrencisi arasında paylaştırılmıştır. Normal meme hücresi MCF10A ve invaziv meme kanseri hücresi MDA-MB-231 ile yapılan çalışmalar yüksek lisans öğrencisi tarafından ve invaziv olmayan MCF7 ve orta derece invaziv olan Hs578T ile yapılan çalışmalar doktora öğrencisi tarafından yürütülmüştür. Projenin ilk amacı Cx32 verilen hücrelerdeki Cx32'nin hücre lokalizasyonunun tespitidir (Şekil 6).

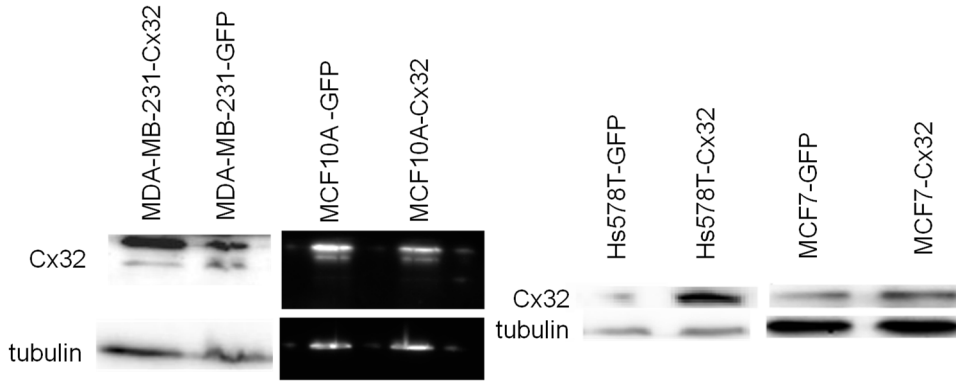


Şekil 6. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7, Hs578T hücrelerinde ifade edilen Cx32'nin hücrelerdeki lokalizasyonu. Yeşil GFP'yi, kırmızı Cx32'yi ve mavi DAPI hücre çekirdeğini göstermektedir. Oklar gap junction plakaları işaret etmektedir. Ölçek 10µm.

Şekil 6'da kırmızı sinyaller Cx32, mavi sinyaller hücre çekirdeğini ve yeşil sinyaller GFP'yi göstermektedir. Bu ve diğer deneylerde GFP ile enfekte edilen hücreler kontrol hücresi olarak kullanılmış ve karşılaştırmalar GFP ifade eden hücrelere karşı yapılmıştır. Buna göre tüm hücre gruplarında bir miktar Cx32 ifadesinin olduğu gözlenmiştir. Cx32 overekpresyonu hücrelerde Cx32 protein ifadesinde bir artışa neden olmuştur ve MCF10 hücrelerinde gap junction plakalarının oluştuğu gözlenmiştir (beyaz oklar). Diğer hücelerde gap junction plakalarından ziyade proteinlerin hücre içinde bulunduğu gözlenmiştir. Cx32 proteinlerinin hücre içindeki lokalizasyonlarının tespiti için hücrelerin GFP içermeyen pLenti-GIII-CMV-C term-HA-Cx32 ile enfekte edilerek ikili hücre boyamalarının gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Fakat HA lenti viral vektörlerle 3-4 kez denenerek gerçekleştirilen kalıcı enfeksiyonlar sonucunda istenilen ölçüde Cx32 mRNA ve protein ifadesi elde edilemediği için ikili immuno boyama deneyleri (hücre zarı-Cx32 ve hücre zarı-Golgin 97 (Golgi aygıtı belirteci)) gerçekleştirilememiştir. Cx32 immuno boyamaları sonucunda Cx32 ifadesi tespit edilmiş ve sadece MCF10A hücrelerinde gap junction plakaları gözlenmiştir.

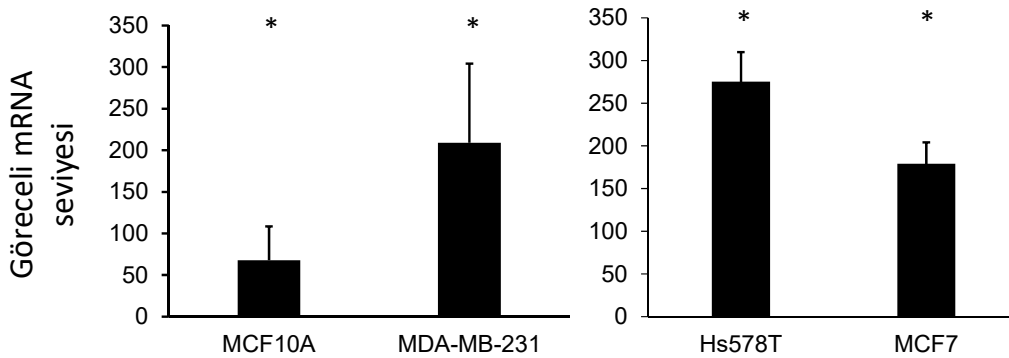
4.3 Ekzojen olarak ifade ettirilen Cx32 proteini ve mRNA ifadesinin teyidi

MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerinde immuno boyama ile Cx32 lokalizasyonunun tespitinden sonra hücrelere dışarıdan verilen Cx32'nin protein ve mRNA ifadesini nasıl etkilediği sırasıyla Western blot ve gerçek zamanlı yarı kantitatif PCR ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 7 ve Şekil 8).



Şekil 7. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7, Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin protein miktarının Western blot ile karşılaştırılması. Tubulin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Western blot sonuçlarına göre Cx32 ifade eden MCF10A, MDA-MB-231 ve MCF7 hücrelerinde kontrol GFP hücrelerine göre protein seviyesinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Buna karşılık Hs578T hücrelerinde protein ifadesinde artışın olduğu gözlenmiştir (Şekil 7 sağ panel). Bunun yanı sıra bütün Cx32 ifade eden hücrelerde mRNA seviyesinde anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 8). GFP ve Cx32 ifade eden hücrelerdeki mRNA miktarları önce içsel gen (housekeeping gen) olan GAPDH'e ve daha sonra da Cx32'deki mRNA oranı GFP ifade eden hücrelerdeki mRNA'ya oranlanmıştır. Buna göre Cx32 enfekte edilen MCF10 hücrelerinde 68 kat, MDA-MB-231 hücrelerinde 209 kat, Hs578T hücrelerinde 270 kat ve MCF7 hücrelerinde 170 kat artış olmuştur (şekil 8, $p < 0.05$).

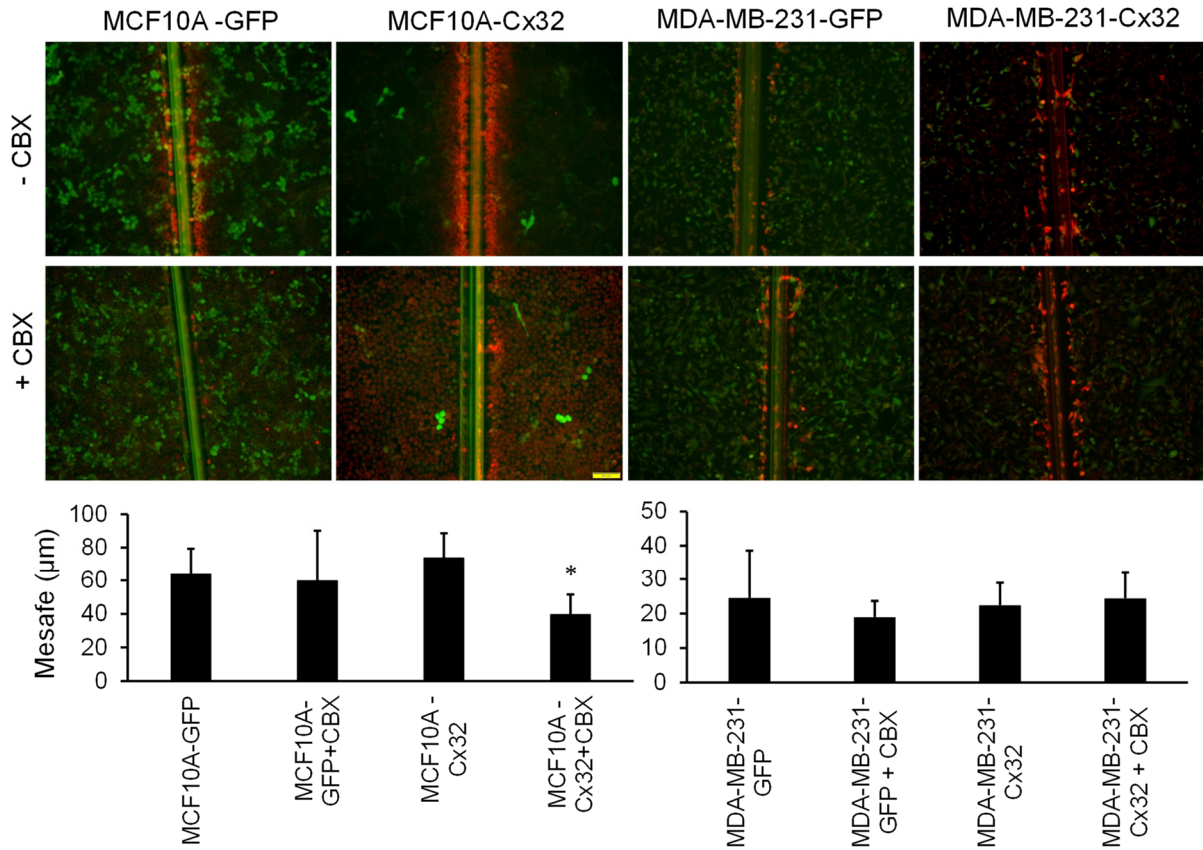


Şekil 8. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7, Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin mRNA miktarının gerçek zamanlı yarı kantitatif PCR ile karşılaştırılması (n=3 *, $p < 0.05$, Student's ttest)

4.4 Cx32'nin hücrelerdeki gap junction kanallarının ve yarım kanallarının fonksiyonlarına etkisi

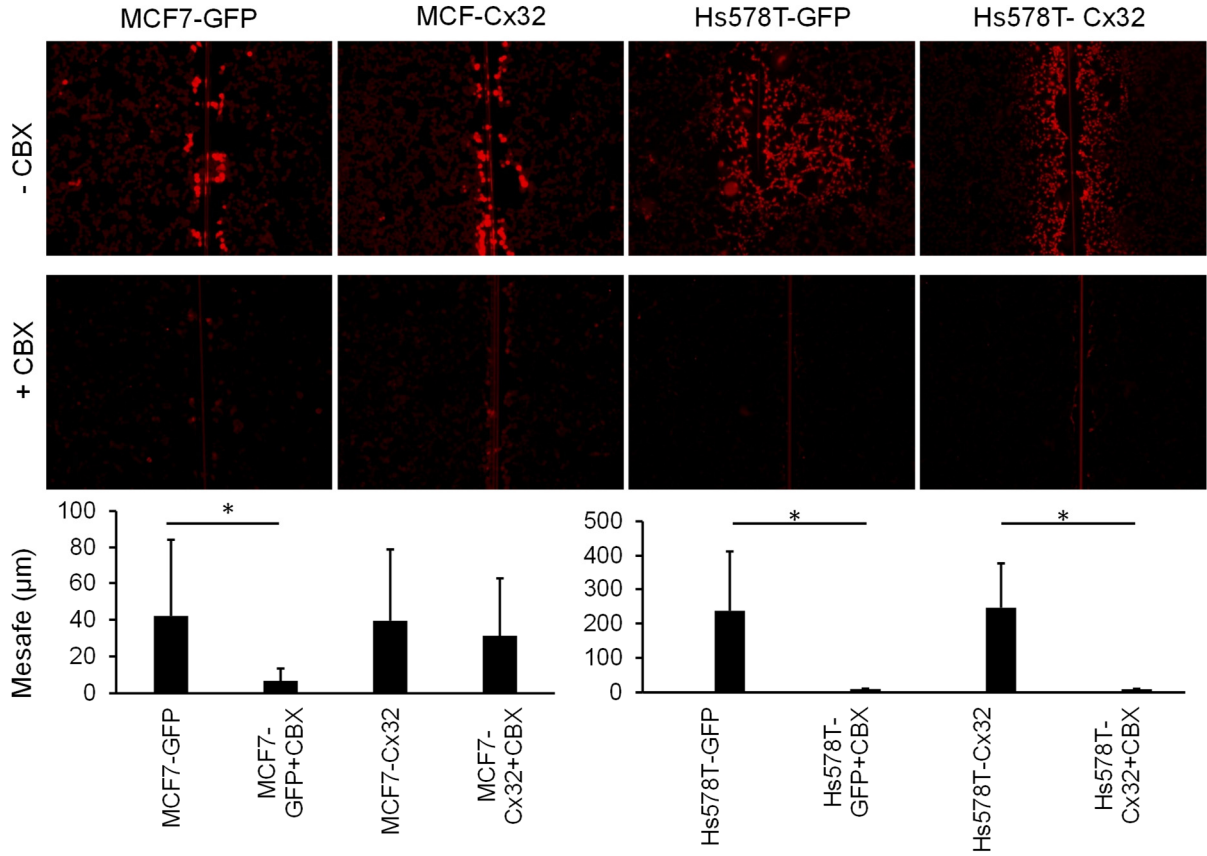
Dışarıdan verilen Cx32 ifadesinin özellikle mRNA seviyesinde 60-200 kat arasında değişimlere neden olduğu için Cx32'nin bu hücrelerdeki gap junction kanallarının ve yarım kanallarının

fonksiyonlarına etkisi araştırılmıştır. Yarıklı floresan boyama yükleme deneylerinde hücre kaplarındaki kuyucukları tamamen dolduran hücreler neurobiotin ile bekletilirken bistirü ucu kullanılarak yarıklar oluşturulmuştur. Bu deneylerde aynı zamanda gap junction kanal inhibitörü carbenoxolone (CBX) deneyin çalıştığına gösterilmesi amacıyla kontrol olarak kullanılmış ve boyanın oluşturulan yarıktan ilerleme mesafesi belirlenmiştir (Şekil 9 ve 10). Gösterilen örnek resimlerde kırmızı neurobiotin ve yeşil GFP'yi göstermektedir. Cx32 ifade eden hücrelerle GFP ifade eden hücreler karşılaştırıldığında MCF10 ve MDA-MB-231 hücrelerinde boya geçiş mesafeleri arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Örnek resimlerde CBX uygulamasının MCF10 kontrol ve Cx32 hücrelerinde belirgin bir azalmaya neden olduğu fakat MDA-MB-231 hücrelerindeki geçişe etkisi olmadığı gözlenmiştir. Fakat farklı deneylerden en az 20 resimle gerçekleştirilen analizlerde CBX'in sadece Cx32 içeren MCF10A hücresindeki boya geçişini azalttığı gözlenmiş ($p < 0.01$), buna karşılık MCF10A kontrol hücrelerindeki gap junctional iletişime etki etmediği gözlenmiştir.



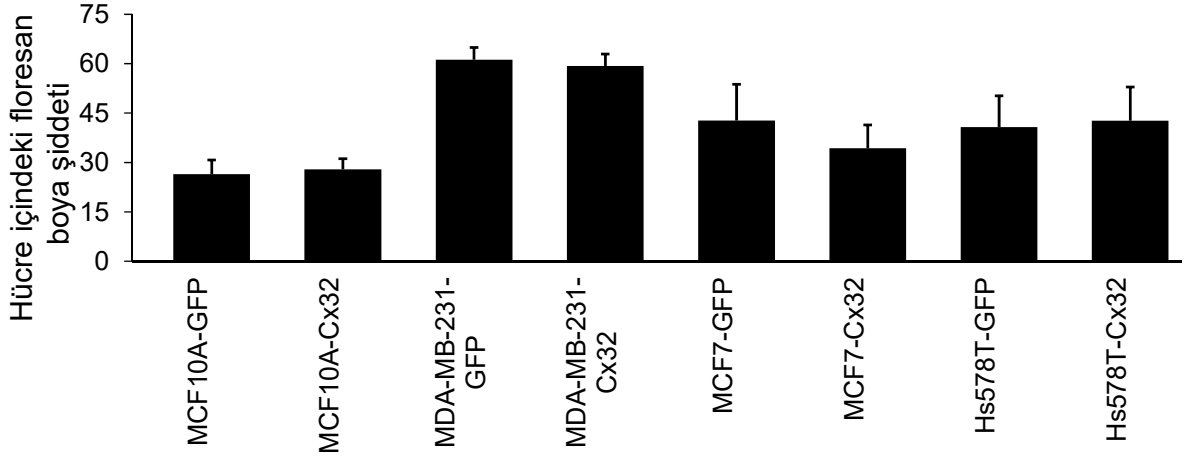
Şekil 9. MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin oluşturduğu gap junction kanallarının aktivitelerinin yarıklı floresan boyama yükleme ile karşılaştırılması. Örnek resimlerde yeşil GFP sinyali ve kırmızı neurobiotini göstermektedir. Grafikler boyanın yarıktan ilerleme mesafesini karşılaştırmaktadır. Ölçek 100µm, (n= 3 ve toplam 20-30 farklı resim, *, $p < 0.01$).

MCF7 ve Hs578T hücrelerinde gerçekleştirilen deneylerde GFP ifade eden hücrelerle Cx32 ifade eden hücreler arasında hücreler arasında gerçekleştirilen iletişimde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 10). Buna karşılık hücrelere CBX verilmesi durumunda MCF7-Cx32 hücreleri hariç diğer hücre gruplarında gap junctional iletişimde istatistiksel olarak anlamlı (MCF-GFP için 6, Hs578T-GFP için 24 ve Hs578T-Cx32 için 26 kat) azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 10, $p < 0.001$)



Şekil 10. MCF7 ve Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin oluşturduğu gap junction kanallarının aktivitelerinin yarıklı floresan boyama yükleme ile karşılaştırılması. kırmızı neurobiotini göstermektedir. Grafikler boyanın yarıktan ilerleme mesafesini karşılaştırmaktadır. Ölçek 100µm, (n= 3 ve 30 farklı resim, *, $p < 0.01$).

Bu sonuçlar doğrultusunda MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerine dışarıdan verilen Cx32'nin hücrelerdeki gap junctional iletişimi etkilemediği gözlenmiştir. Buna karşılık hücrelere verilen Cx32'nin hücre zarında fonksiyonel yarı kanal yapabileceği düşünülmüş ve bunu test etmek amacıyla neurobiotin ile hücre içine boya alım deneyleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 11). Gerçekleştirilen deneylerde hiç bir hücre grubunda Cx32 ifadesinin fonksiyonel yarı kanal oluşturmadığı gözlenmiştir.

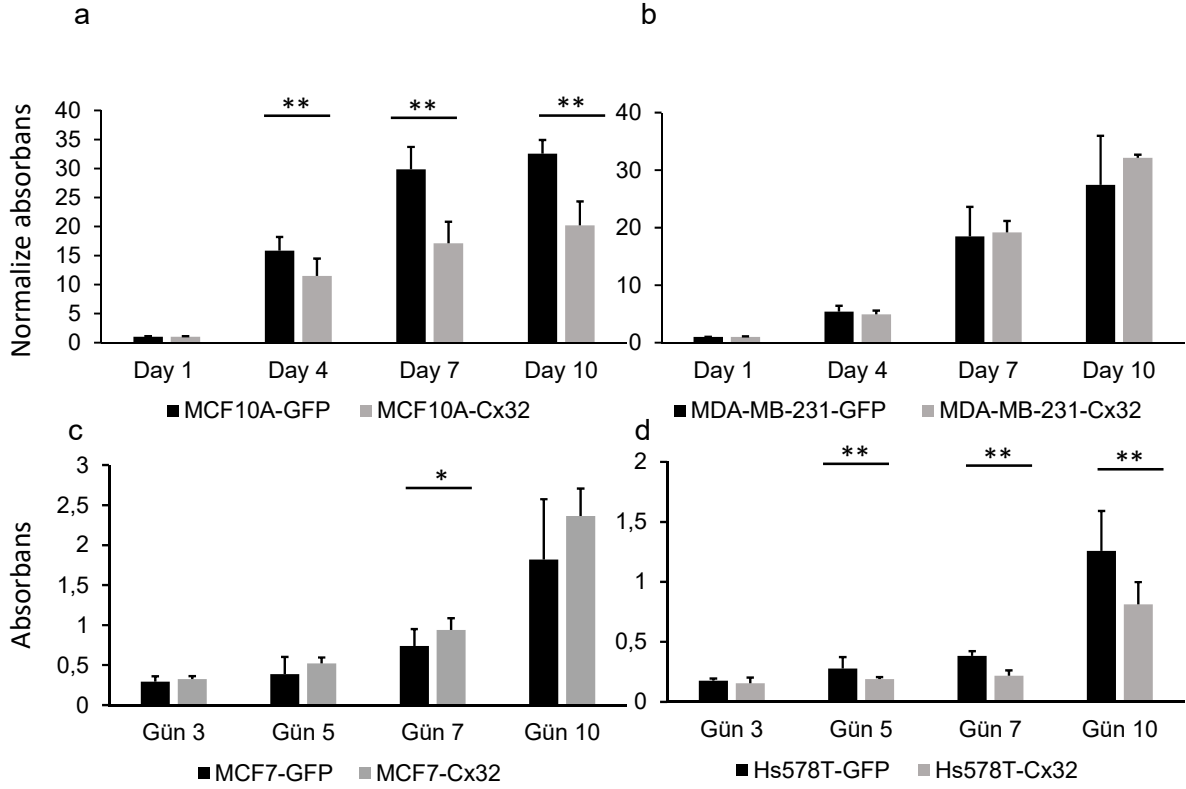


Şekil 11. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin oluşturduğu yarım kanalların aktivitelerinin hücre içine neurobiyotin alım deneyi ile karşılaştırılması (n=2, toplam 15-20 resim).

MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerine dışarıdan verilen Cx32'nin fonksiyonel gap junction ve yarım kanallarına etkilerinin olmadığı gözlenmiştir.

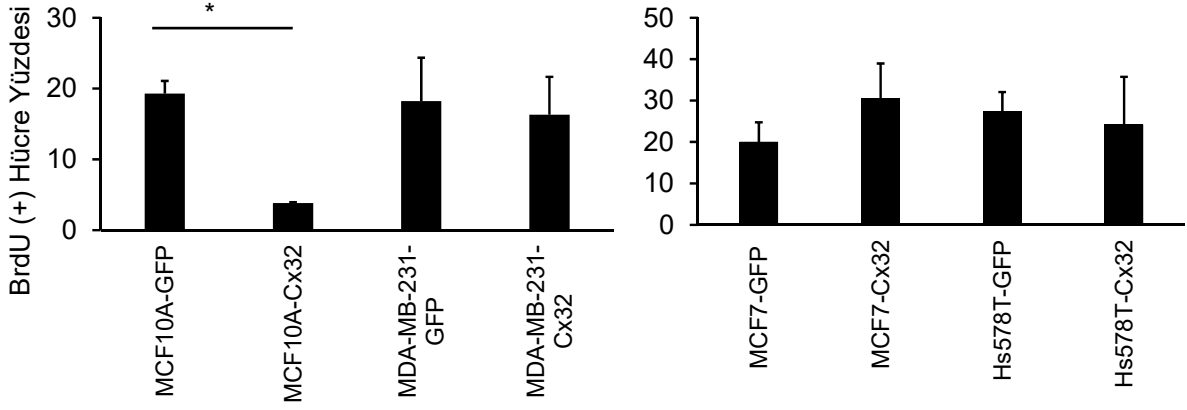
4.5 Cx32'nin hücrelerin büyüme ve çoğalmalarına etkisi

MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerine ekzojen olarak verilen Cx32'nin hücrelerin canlılıklarına (viability) etkisi hücrelerin 10 gün boyunca büyütülerek farklı günlerde gerçekleştirilen MTT testiyle ortaya konmuştur (Şekil 12). MTT analizlerinde MDA-MB-231-GFP ve Cx32 içeren hücrelerinin 10 gün boyunca canlılıkları arasında farklılık gözlenmemiştir. Hücreler ilk günden itibaren aynı oranlarda çoğalmış ve canlılık göstermişlerdir (Şekil 12b). Buna karşılık MCF10A-Cx32 hücreleri 10 gün boyunca büyüme göstermiş fakat bu büyüme 4, 7 ve 10. günlerde MCF10A-GFP hücrelerine göre daha yavaş olmuştur (Şekil 12a, **, $p < 0.01$). Benzer bir durum Hs578T hücrelerinde de gözlenmiştir. Hs578T-Cx32 hücrelerinin çoğalmaları Hs578T-GFP'ye göre daha az olmuştur (Şekil 12d, **, $p < 0.01$). Son olarak MCF7 hücrelerinde genel olarak Cx32 içeren hücrelerin GFP içeren hücrelere göre 5. günden itibaren daha hızlı artış gösterdiği, fakat bu artışın sadece 7. günde istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir (Şekil 12c, $p < 0.05$).



Şekil 12. MCF10A (a), MDA-MB-231 (b), MCF7 (c) ve Hs578T (d) hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin hücrelerin canlılıklarına (viability) etkileri. (MCF10A için n=4; MDA-MB-231 için n=6; MCF7 ve Hs578T için n=3; p<0.05 **, p<0.01)

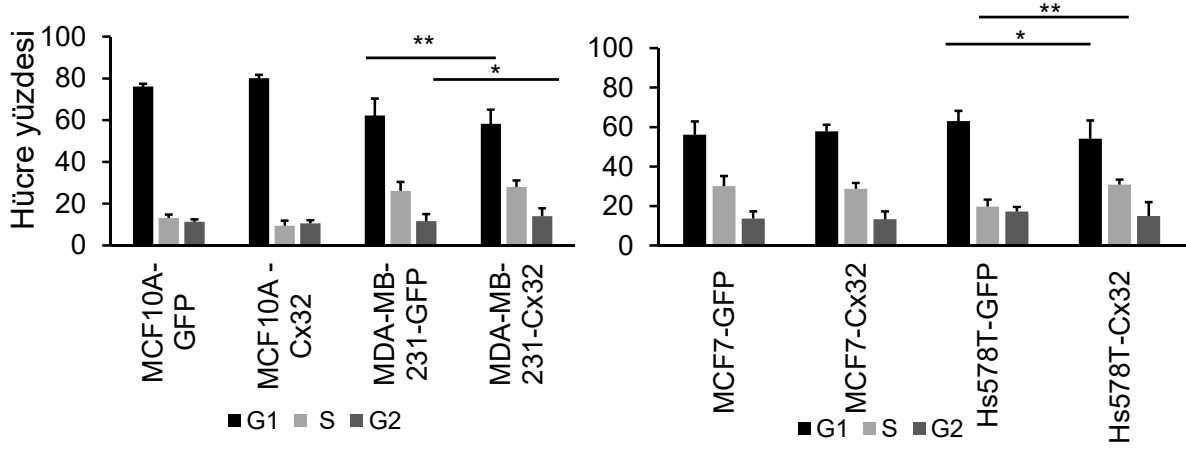
Cx32'nin hücrelerin çoğalmasına etkisinin test edilmesi amacıyla Cx32 ve GFP ifade eden hücreler BrdU ile bekletildikten sonra anti-BrdU antikoru kullanılarak çoğalan hücrelerin oranları belirlenmiştir. Farklı alanlardan resimler çekilerek 1000 tane hücre sayılmış ve bu resimlerdeki BrdU pozitif hücre sayıları belirlenerek bölünen hücrelerin yüzdeleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır (Şekil 13). Yapılan öncül deneylerde MCF10A hücrelerinde Cx32 ifade eden hücrelerde GFP'ye oranla bölünen hücre sayısında bir azalma olduğu gözlenmiştir. Buna karşılık diğer hücre grupları arasında BrdU pozitif hücre yüzdesinde bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 13). Bu deneylerin uygun bir şekilde değerlendirilebilmeleri için deneylerin en az 2 defa daha tekrarlanması gerekmektedir.



Şekil 13. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin hücrelerin çoğalmalarına etkisi. (n=2, toplam 1000 hücre sayımı için 10-20 resim analizi*, p<0.01)

4.6 Cx32'nin hücre döngüsüne etkisi

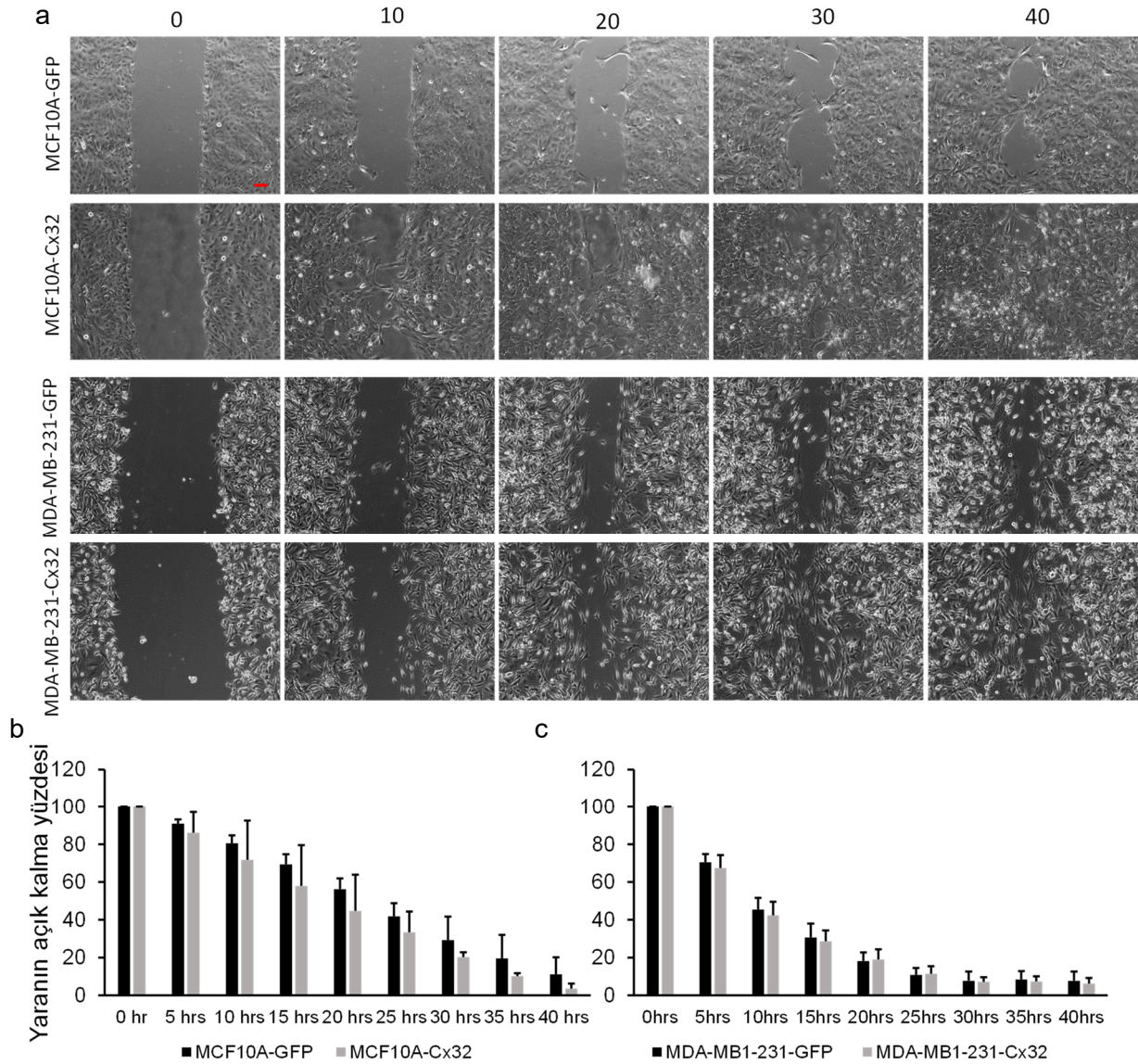
MTT analizleriyle Cx32'nin MCF10A ve Hs578T hücrelerinin 10 gün boyunca çoğalmalarını kontrol hücrelere göre yavaşlattığı buna karşılık MCF7 hücrelerinde ise sadece 7. günde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmesine rağmen 10 gün boyunca bir artış eğilimi olduğu gözlenmiştir. Bu farklılıkların hücre döngüsüne etkisinin test edilmesi amacıyla PI boyaması ve arkasından akış sitometresi gerçekleştirilmiştir (Şekil 14). Hücre döngüsü analizlerinde MCF10A ve MCF7 hücrelerinde GFP kontrol ve Cx32 deneysel gruplar arasında G1, S ve G2 fazlarında bulunan hücre yüzdeleri bakımından farklılık gözlenmemiştir. Buna karşılık MDA-MB-231-GFP ve Cx32 ifade eden gruplar arasında G1 fazındaki hücrelerde %7 oranında azalma (p<0.01) ve G2 fazındaki hücre oranında %19 artma (p<0.05) olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra Hs578T hücrelerinde GFP ve Cx32 bulunan gruplar arasında G1 fazındaki hücre yüzdesinde %15 azalma (p<0.05) ve S fazındaki hücrelerde %55 oranında artış (p<0.01) not edilmiştir.



Şekil 14. MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin hücre döngüsüne etkisi. (n=3, her bir deneyde 3 farklı örnek; *, p<0.05; **, p<0.01).

4.7 Cx32'nin hücrelerinin migrasyonuna etkisi

Ekzojen Cx32 ifadesinin normal meme hücresi MCF10A, invaziv meme kanseri hücresi MDA-MB-231, invaziv olmayan meme kanseri hücresi MCF7 ve orta derece invaziv olan meme kanseri hücresi Hs578T'lerin migrasyonunu nasıl etkilediği yara kapama deneyleriyle tespit edilmiştir. Mitomycin C ile bekletilen hücrelerde hücre bölünmesi durdurularak gerçekleştirilen yara kapama deneylerinde hücrelerin migrasyon kapasiteleri ölçülmüştür (Şekil 15 ve Şekil 16).

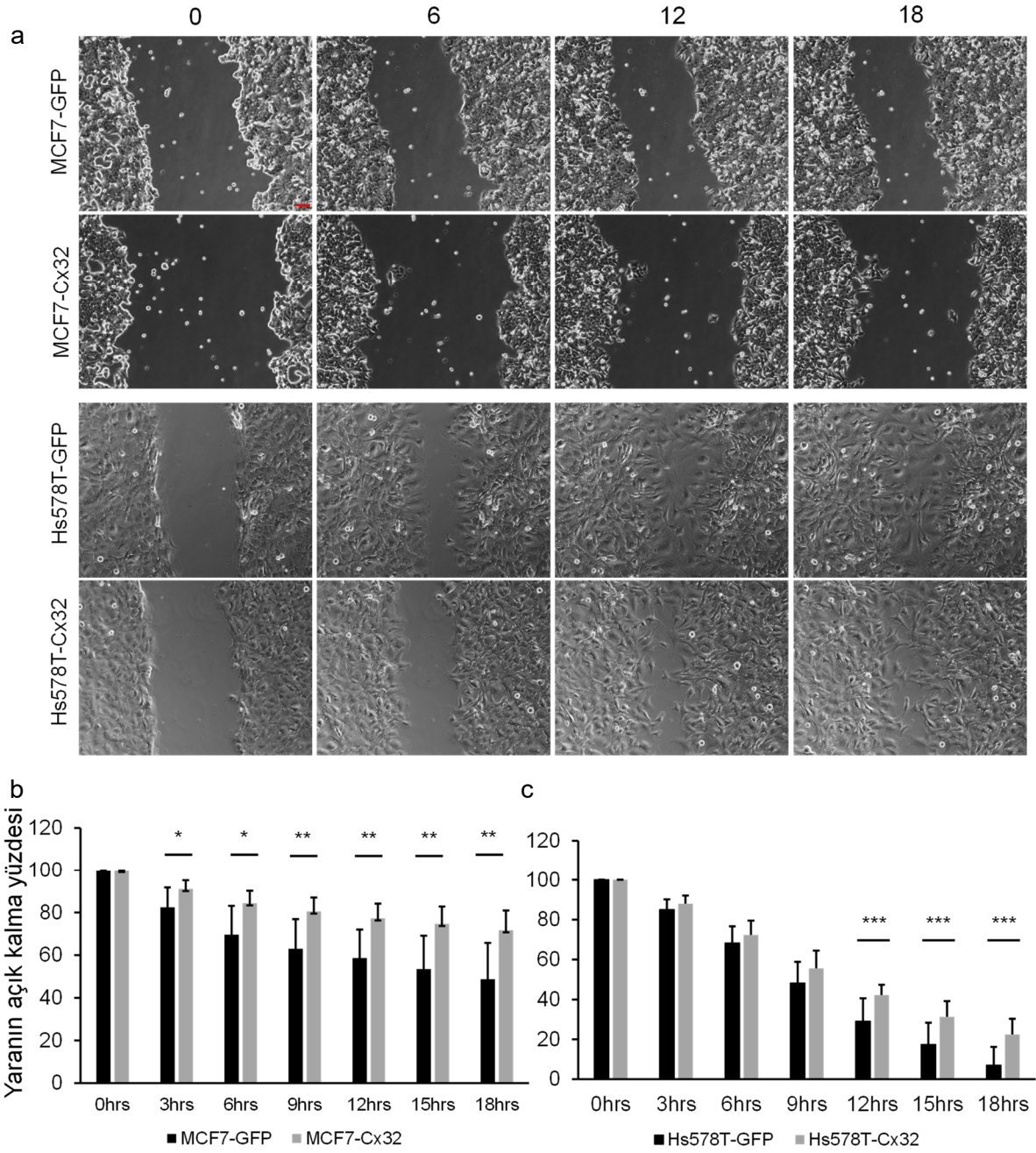


Şekil 15. MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin migrasyona etkisi. a) 0, 10, 20, 30 ve 40. saatlerde çekilmiş örnek resimler gösterilmektedir. Ölçek 50µm. b) MCF10A ve c) MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonu sırasında açık kalan yarığın alanlarının karşılaştırılması (n=3 deneyin 3 farklı örneğinde en az 3 farklı bölgenin resmi).

Şekil 15a'da MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinde yara kapama deneyinin 40 saatlik takibi sonucunda elde edilen örnek resimler gösterilmektedir. Bu resimlerde MCF10-Cx32 hücrelerindeki yaranın MCF10A-GFP'ye oranla daha hızlı kapandığı gözlenmiştir (Şekil 15a, üst panel). 3 defa tekrarlanan deneylerden elde edilen resimler ImageJ programında hücreler arasındaki yarığın alanı hesaplanarak analiz edilmiştir. Bu doğrultuda elde edilen sonuçlarda MCF10-Cx32 hücrelerinin GFP hücrelerine göre yarıyı daha hızlı kapattığı yönünde bir eğilim (trend) olmasına rağmen, bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 15b). Buna karşılık MDA-MB-231-Cx32 ve GFP hücrelerinin hem resimlerinde (Şekil 15a, alt panel) hem de ImageJ analizlerinde (Şekil 15c) yara kapama kapasitelerinde bir farklılık gözlenmemiştir.

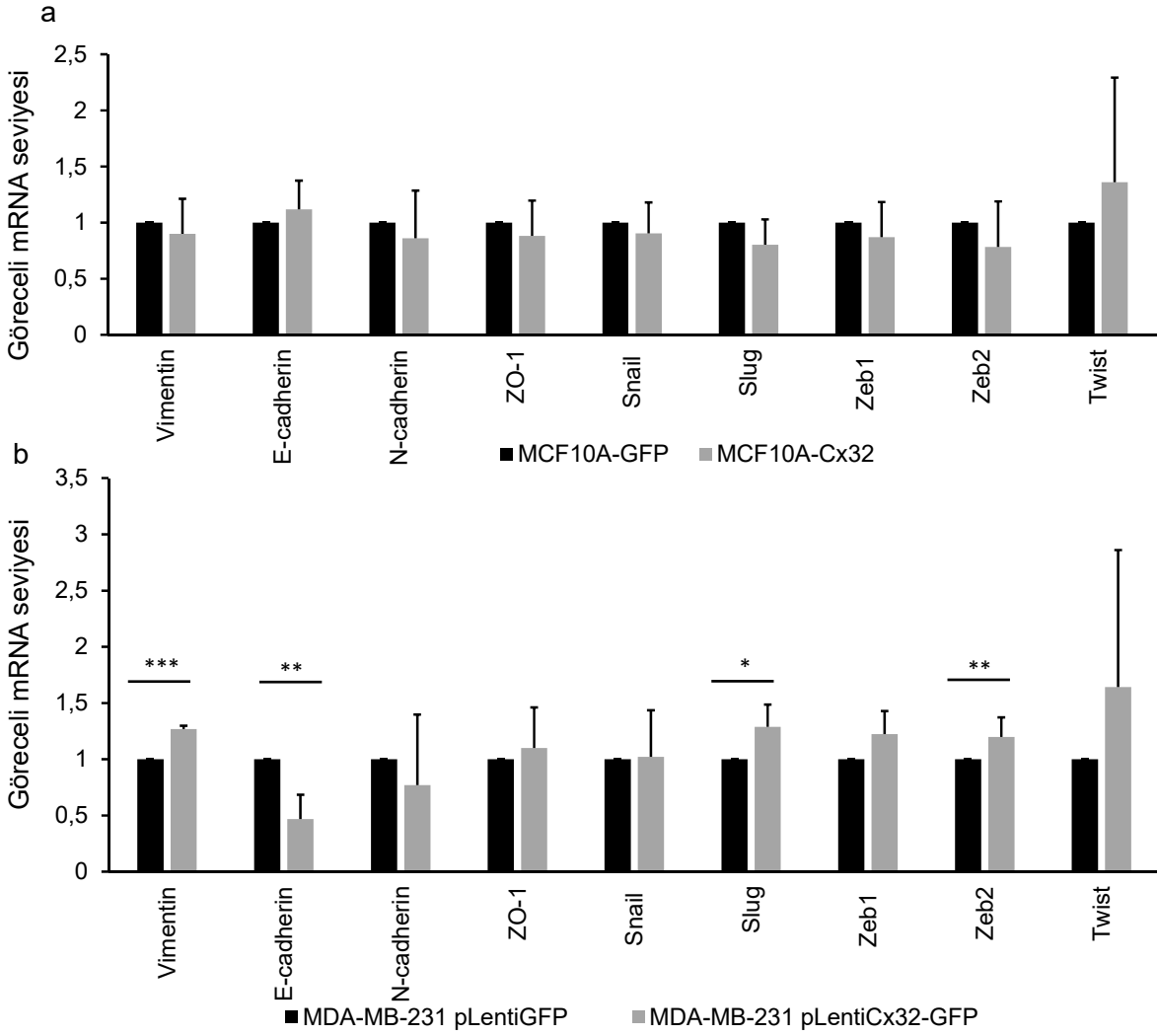


Yara kapama deneyleri MCF7 ve Hs578T hücreleri için de gerçekleştirilmiştir (Şekil 16). Örnek resimlerde gözleneceği üzere MCF7-Cx32 hücreleri GFP hücrelerine göre yarayı daha yavaş kapatmıştır (Şekil 16a, üst panel). ImageJ'de gerçekleştirilen analizlerde hücrelerin yara kapama kapasitesi 3. saatten itibaren istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermiştir (Şekil 16b, *, $p<0.05$ ve **, $p<0.01$). Hs578T hücreleri de benzer şekilde davranmıştır, GFP içeren hücreler Hs578T-Cx32'ye göre yarayı daha hızlı kapatmış (Şekil 16a, alt panel) ve gruplar arasındaki fark 12.saatten itibaren istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir (Şekil 16c, ***, $p<0.002$).



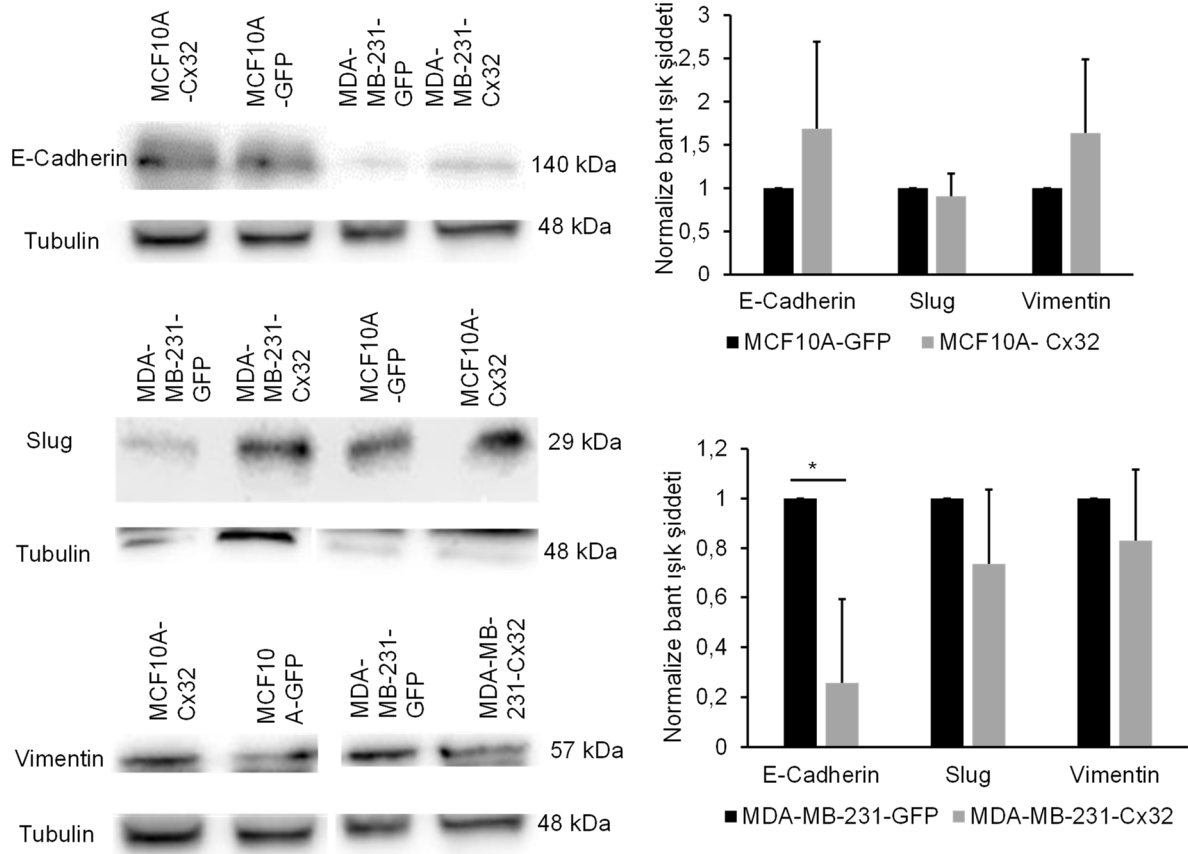
Şekil 16. MCF7 ve Hs578T hücrelerinde ifade edilen ekzojen Cx32'nin migrasyona etkisi. a) 0, 6, 12 ve 18. saatlerde çekilmiş örnek resimler gösterilmektedir. Ölçek 50µm. b) MCF7 ve c) Hs578T hücrelerinin migrasyonu sırasında açık kalan yarığın alanlarının karşılaştırılması. (n=2 deneyin 3 farklı örneğinde en az 3 farklı bölgenin resmi *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.002).

Hücrelerde gözlenen migrasyondaki farklılıkların moleküler temellerinin araştırılması için epitel-mezenkimal geçiş belirteçlerinin seviyelerindeki değişimler mRNA ve protein seviyesinde sırasıyla gerçek zamanlı yarı kantitatif PCR ve Western blot ile tespit edilmiştir (Şekil 17, 18, 19 ve 20).



Şekil 17. a) MCF10A ve b) MDA-MB-231 hücrelerinde Cx32 ifadesini epitel-mezenkimal geçiş belirteçlerinin mRNA seviyesinde ifade analizleri (n=3; *, p=0.059; **, p<0.03; ***, p<0.001).

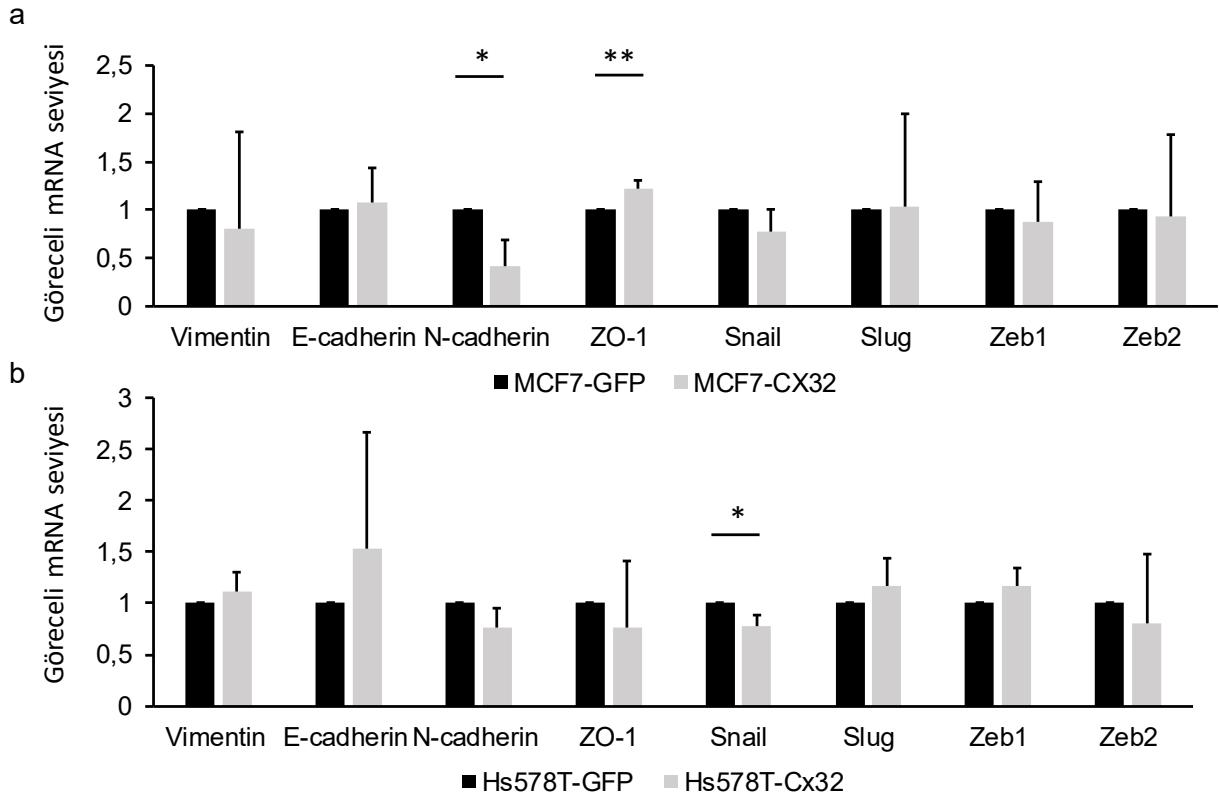
MCF10A-GFP ve Cx32 hücrelerinde gerçekleştirilen mRNA ifade analizlerinde gruplar arasında anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir (Şekil 17a). Buna karşılık MDA-MB-231-Cx32 hücrelerinde GFP hücrelerine göre epitel belirteç E-cadherinde %50 azalma (p<0.03) ve mezenkimal belirteçler vimentinde %20 (p<0.001) ve Zeb2'de %20 (p<0.03) artış ve mezenkimal belirteç slugda artış eğilimi (p=0.059) gözlenmiştir.



Şekil 18. MCF10A ve MDA-MB-231 hücrelerinde Cx32 ifadesini epitel-mezenkimal geçiş belirteçlerinden E-cadherin, Slug ve vimentinin protein seviyesinde ifadesine etkileri (n=3; *, p=0.034).

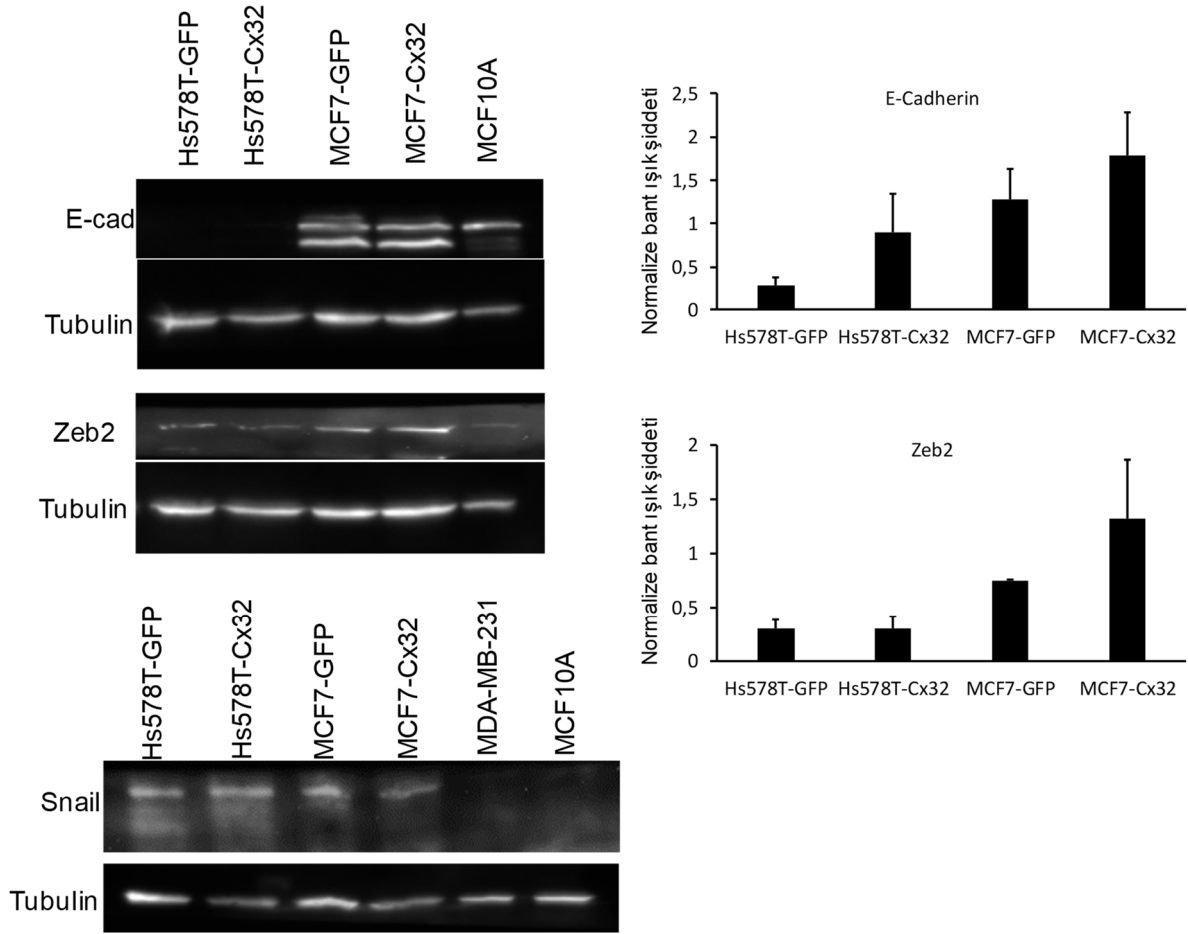
MDA-MB-231 hücrelerinde mRNA seviyesinde değişim gözlenen E-cadherin, Slug ve Vimentin için Western blot analizleri gerçekleştirilmiştir. MCF10A-GFP ve Cx32 hücrelerinde belirtilen proteinlerin seviyelerinde değişim gözlenmemiştir (Şekil 18 sağ üst panel). Bunun yanı sıra MDA-MB-231 hücrelerinde epitel belirteç E-cadherin protein miktarında %75 azalma olduğu tespit edilmiş (p=0.034) fakat mezenkimal belirteç slug ve vimentinde bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 18 sağ alt panel).

Epitel-mezenkimal geçiş belirteçlerindeki değişimler MCF7 ve Hs578T hücrelerinde de hem mRNA (Şekil 19) hem de protein (Şekil 20) seviyesinde analiz edilmiştir. Bu çalışmalarda MCF7-GFP ve Cx32 hücrelerinde mRNA ifade analizlerinde mezenkimal belirteç N-cadherin ifadesinde %58 oranında azalma (p<0.02) ve epitel belirteç ZO-1 ifadesinde ise %20 oranında artış (p<0.01) gözlenmiştir (Şekil 19a). Bunun yanı sıra, Hs578T-Cx32 hücrelerinde GFP hücrelerine göre mezenkimal belirteç snail'de %23 azalma (p<0.02) olduğu gözlenmiştir (Şekil 19b).



Şekil 19. a) MCF7 ve b) Hs578T hücrelerinde Cx32 ifadesinin epitel-mezenkimal geçiş belirteçlerinin mRNA seviyesindeki ifadelerine etkisi (n=3; *, p<0.02; **, p<0,01).

Epitel-mezenkimal belirteçlerin protein ifadelerinin tespitinde (Şekil 20) MCF7 ve Hs578T hücrelerinde çalıştığı gösterilen epitel belirteç E-cadherin (n=3) ve mezenkimal belirteçler Zeb2 (n=2) ve snail ifadelerinde Cx32 ve GFP ifade eden gruplar arasında istatistiksel (E-cadherin için) ya da görsel olarak (Zeb2 ve snail için) anlamlı değişimler gözlenmemiştir.

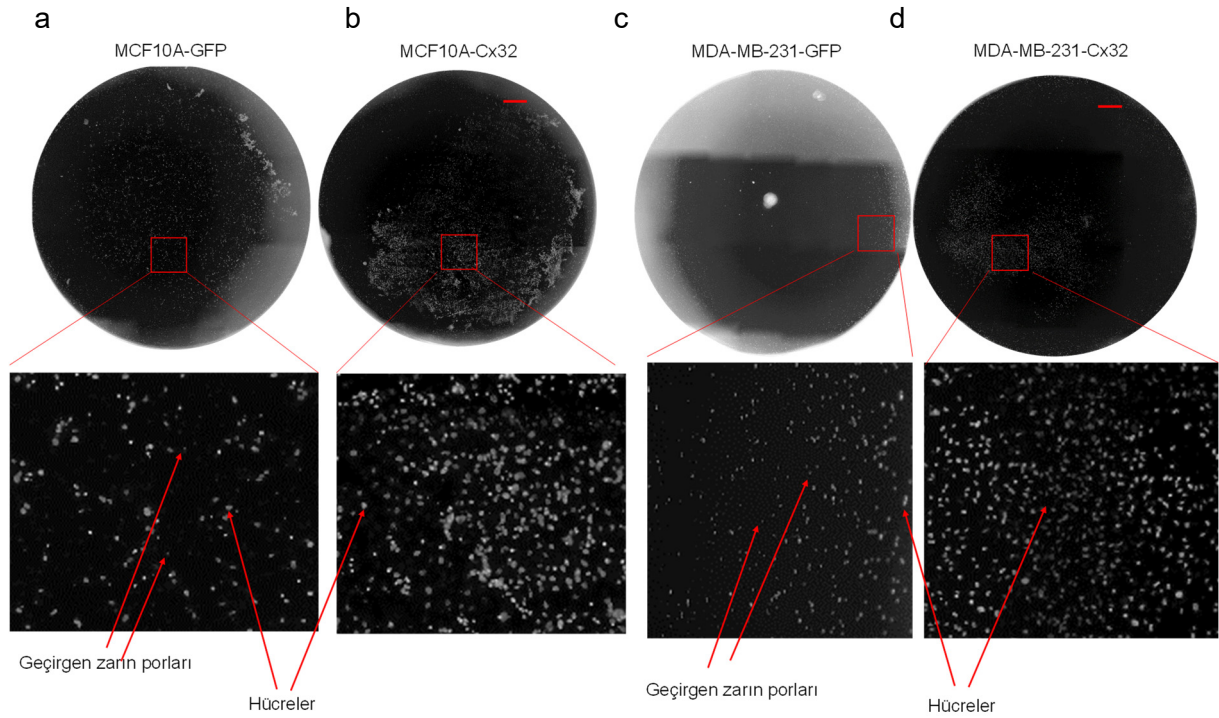


Şekil 20. MCF7 ve Hs578T hücrelerinde Cx32 ifadesinin epitel-mezenkimal geçiş belirteçlerinden E-cadherin, Zeb2 ve snailin protein seviyesinde ifadesine etkileri (E-cadherin için n=3; Zeb2 için n=2 ve snail için n=1).

4.8 Cx32'nin hücrelerinin invazyonuna etkisi

MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerinin invazyon kapasitelerine etkisi transwell geçirgen kap yöntemi (Boyden chamber) ile tespit edilmeye başlanmıştır. Transwell geçirgen kaplarda matrigel üzerine ekilen hücrelerin matrigelden transwell kabın zarına geçişiyle hücrelerin invaziv kapasiteleri belirlenmesi amaçlanmıştır. Öncelikle deneylerin optimizasyon çalışmaları ilk olarak invaziv olmayan MCF10A ve invaziv olan MDA-MB-231 hücrelerinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 21). Şekil 21'de yuvarlak resimler DAPI ile boyanmış hücreleri içeren transwell geçirgen kabın zarının tüm yüzeyini, kare resimler ise kırmızı ile belirlenmiş alanın büyütülmüş halini göstermektedir. Gerçekleştirilen ilk çalışmalarda hücrelerin matrigelden geçişlerinin daha çok zarın kenarlarında gerçekleştiği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra MCF10A-GFP ile MCF10A-Cx32 karşılaştırıldığında MCF10A-Cx32 hücrelerinin daha çok geçtiği gözlenmesine rağmen (Şekil 21a ve b) kantitatif analiz yapılabilmesi için deneyin en az 3 kere tekrarlanması gerekmektedir. MCF10A hücrelerine benzer şekilde MDA-MB-231 hücrelerinde Cx32 içeren hücrelerin matrigelden geçişinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. MCF10A'ye

benzer şekilde kantitatif analiz yapılabilmesi için deneyin en az 3 kere tekrarlanması gerekmektedir. MDA-MB-231 hücreleri invaziv olan meme kanseri hücreleridir buna karşılık MCF10A hücreleri normal meme hücresidir, bu yüzden MDA-MB-231 hücrelerinin MCF10A'ye göre matrigelden daha çok geçmesi beklenmektedir. Fakat gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında MCF10A-GFP kontrol hücrelerinin MDA-MB-231-GFP hücrelerinden daha fazla geçtiği tespit edilmiştir (Şekil 21a ve c). Bu nedenle deneyin optimizasyonları devam etmektedir ve uygun koşullar sağlandıktan sonra deneyler en az 3'er kere tekrarlanacaktır.



Şekil 21. Transwell geçirgen kap ile invazyon deneyleri. Matrigelle yüklenen a) MCF10A-GFP, b) MCF10A-Cx32, c) MDA-MB-231-GFP ve d) MDA-MB-231-Cx32 hücrelerinin transwell geçirgen kabın zarına geçişleri (n=2).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, normal insan meme dokusunda sadece Cx26 ve Cx43 genlerinin ifade edildiği ve bunların meme kanserinde özellikle erken evrelerde tümör baskılayıcı olarak çalıştığı gösterilmiştir (Zhu vd., 1991; McLachlan vd., 2006; Naus ve Laird, 2010). Fakat, Cx32'nin meme kanseri hücrelerinde ifade edilmesinin ve oluklu bağlantı kanalları kurmak yerine hücre sitoplazmasında birikmesinin meme kanseri hücrelerinin fonksiyonunu ve meme kanserinin farklı evrelerini nasıl etkilediği bilinmemektedir. Yapılan çalışmada farklı metastatik özellikleri olan meme kanseri hücrelerinde, normal meme

dokusunda bulunmayan, fakat kanserli dokularda ifade edilen Cx32 geninin hücre içindeki lokalizasyonları, gap junction ve yarım kanal fonksiyonları, çoğalma, hücre döngüsü, migrasyon ve invazyonda oynadığı roller araştırılmıştır.

MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerinde Cx32'nin ifade edilmesi durumunda sadece MCF10A hücrelerinin gap junction plakaları oluşturduğu buna karşılık diğer hücrelerde Cx32'nin çoğunlukla hücre içinde olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra Cx32'nin hücre zarında oluşturulan gap junction kanallarının ve yarım kanalların (connexon) fonksiyonlarını etkilemediği gözlenmiştir. Gerçekleştirilen Western blot analizlerinde MCF10A ve MCF7 hücrelerinin endojen olarak Cx32 ifade ettiği tespit edilmiştir. Dışarıdan Cx32 verilmesi MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerindeki Cx32 ifadesinde ve/veya lokalizasyonunda değişime neden olmuştur. MCF10A-GFP kontrol hücrelerinde proteinler daha çok hücre içinde yayılmış bir halde bulunurken MCF10A-Cx32'de büyük Cx32 kümelerinin (cluster) ve gap junction plakalarının oluştuğu gözlenmiştir. Fakat bu plakalar MCF10A hücrelerindeki gap junction kanallarının aktivitelerini değiştirmemiştir. Buna karşılık MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerinde Cx32 gap junction kanalları kurmadan hücre içinde etkili olarak hücrelerin fizyolojisini etkileyebileceği düşünülmüştür (Dang vd., 2003; Li vd., 2007). Benzer durum yarım kanalların fonksiyonları için de geçerlidir: MCF10A, MDA-MB-231, MCF7 ve Hs578T hücrelerinde yarım kanalların fonksiyonlarında bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Normal fizyolojik durumlarda memeli dokularında connexon yarım kanallarının fonksiyonel olmadığı bilinmektedir (Thimm vd., 2005). Yarım kanalların fonksiyonel olması dışarıdan bir etki ile tetiklenerek (Tran Van Nhieu vd., 2003; Guttman vd., 2010) ya da connexin genlerindeki mutasyonların sürekli açık kanallar yapmasıyla mümkün olmaktadır (Gerido vd., 2007; Mese vd., 2011). Deneyler hücrelerdeki yarım kanalları açacak bir hasar verilerek tekrarlanabilir ve bu şekilde fonksiyonel yarım kanallardaki farklılıklar ortaya konabilir (Johnson vd., 2016).

MTT analizlerinde MCF10A ve Hs578T hücrelerinde Cx32'nin hücrelerin 10 gün boyunca çoğalmasını/canlılığını kontrol hücrelerine göre yavaşlattığı gözlenmiştir. Bununla ilintili olarak, BrdU ile yapılan deneylerde de Cx32 içeren MCF10A hücrelerinin sayılarında MCF10A-GFP'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ve Hs578T hücrelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalış yönünde bir trend olduğu tespit edilmiştir. BrdU deneyleri 1-2 defa tekrarlanarak deneyin istatistiksel gücü artırılarak gözlemler teyit edilmeye çalışılacaktır. Fakat bu iki gözlem Cx32'nin MCF10A ve Hs578T hücrelerinin çoğalmasını azalttığına işaret etmektedir. Benzer durumlar hepatocellular karsinomda, glioma ve melanoma hücrelerinde de gözlenmiştir; Cx32 ifadesi hepatocellular karsinomda hücre çoğalmasını azalttığı (Zhao vd.,

2015) ve Cx43 ifadesinin de glioma ve melanoma hücrelerin çoğalmalarını negatif yönde etkilediği gözlenmiştir (Zhu vd., 1991; Tittarelli vd., 2015).

MTT ve BrdU deneylerinde invaziv olan MDA-MB-231 hücrelerinde GFP kontrol ve Cx32 hücrelerinin 10 gün boyunca çoğalmalarında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Buna karşılık MCF7-Cx32 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre hem MTT hem de BrdU deneylerinde bir artış eğilimi (trendi) gözlenmiştir. Connexinlerin, mesela Cx43'ün, hücre çoğalmasını arttırdığı hepatocellular karsinoma gibi farklı kanserlerde de gözlenmiştir (Zhang vd., 2007). Bu gözlemler Cx32'nin hücre tipine bağlı olarak farklı etkiler gösterdiğine işaret etmektedir.

Hücre döngüsü analizlerinde Hs578T hücrelerinde Cx32 ifadesinin G1 fazındaki hücre oranında azalmaya ve S fazındaki hücre oranında artmaya neden olduğu gözlenmiştir. MTT ve BrdU analizlerinde Cx32 ifadesinin hücre canlılığı ve çoğalmasını azalttığı gözlenmiştir. Hücre döngüsü ve MTT analizlerindeki bu farkın Cx32'nin mitokondriyel fonksiyonundan kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Cx32'nin mitokondrinin iç zarında lokalize olduğu gösterilmiş ve Cx32 overekpresyonunun mitokondriyel aktiviteyi negatif şekilde etkileyerek MTT ile test edilen hücre canlılığını azaltabileceği düşünülmektedir (Fowler vd., 2013).

Cx32'nin MCF10A hücrelerinin migrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artırdığı gözlenmiştir. Buna karşılık gerçek zamanlı yarı kantitatif PCR deneylerinde incelenen epitel-mezenkimal geçiş belirteçlerin mRNA seviyesinde bir değişim gözlenmemiştir. Bu da Cx32'nin migrasyona etkisinin epitel-mezenkimal geçişten ziyade aktin hücre iskeletindeki organizasyonel değişimlerden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Connexinlerin aktin iskelet ağı ve yardımcı molekülleriyle bağlantılı olduğu ve bu vesileyle aktin ağının organizasyonunu etkilediği bilinmektedir (Kotini ve Mayor, 2015). Aktinin MCF10A'lerdeki organizasyonel değişimleri phalloidin immunoboyamasıyla teyit edilebilir.

MDA-MB-231 hücreleri invaziv hücrelerdir ve mezenkimal özelliklere sahiptir. Migrasyon deneylerinde Cx32'nin hücrelerin hareketlerini değiştirmedeği gözlenmiştir. Buna karşılık gerçek zamanlı yarı kantitatif PCR ve Western blot deneylerinde incelenen epitel-mezenkimal geçiş belirteçlerinden epitel belirteç E-cadherinin ifadesinde sırasıyla mRNA ve protein seviyelerinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra mRNA seviyesinde mezenkimal belirteçlerden vimentin, Slug ve Zeb2'de artış olmuştur. Bu durum hücrelerin mezenkimal özelliklerinin arttığına işaret etmektedir. MDA-MB-231 hücreleri zaten mezenkimal özellikli hücreler olduğu için epitel-mezenkimal geçiş belirteçlerindeki değişimlerin hücrelerin migrasyon kapasitelerini değiştirmeyeceği düşünülmektedir.

Cx32'i MCF7 ve Hs578T hücrelerinin migrasyonunu azaltmıştır. MCF7 hücrelerinin migrasyonunda gözlenen değişimin GFP ve Cx32'de deneyler sırasında oluşturulan yarıkların

boyutlarındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Hücreler arasındaki mesafe arttıkça hücreler arasındaki etkileşim de farklılaşarak hücrelerin migrasyonunu değiştirebilir. Bunun yanı sıra, mRNA seviyesinde epitel belirteci ZO-1'de artma ve mezenkimal belirteci N-cadherinde ise azalma gözlenmesi, MCF7-Cx32 hücrelerinin kontrol hücrelerine göre migrasyonunda gözlenen yavaşlamanın kaynağı da olabileceği düşünülmüştür. Hs578T hücrelerinde ise GFP ve Cx32 arasında migrasyonda gözlenen farkın teyit edilmesi amacıyla epitel-mezenkimal geçiş belirteçler mRNA seviyesinde karşılaştırılınca sadece snailde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu, fakat Western blot örneğinde snail proteinin seviyesinde bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Bu doğrultuda, mezenkimal özellikli Hs578T hücrelerinde Cx32'nin hücrelerin migrasyonunu azaltmasının mezenkimal-epitel dönüşümden (mesenchymal-epithelial transition-MET) kaynaklı olmayabileceği, farklı mekanizmaların rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Özetle, bu çalışmada Cx32'nin normal meme hücresi MCF10A ve farklı metastatik özellikleri olan invaziv MDA-MB-231, invaziv olmayan MCF7 ve orta derece invaziv olan Hs578T hücrelerindeki rolü ortaya konmaya çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki Cx32, diğer connexinlerde olduğu gibi, hücre tipine ve durumuna bağlı olarak hücrelerin fizyolojilerini farklı şekillerde etkilemektedir.

6. KAYNAKLAR

- Aasen T., Mesnil M., Naus C. C., Lampe P. D., Laird D. W. 2017. "Gap junctions and cancer: Communicating for 50 years", *Nature Reviews Cancer*, 17(1): 74.
- Bergoffen J., Scherer S. S., Wang S., Scott M. O., Bone L. J., Paul D. L., , 1993. "Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-tooth disease", *Science*, 262(5142): 2039-42.
- Beyer E. C., Davis L. M., Saffitz J. E., Veenstra R. D. 1995. "Cardiac intercellular communication: Consequences of connexin distribution and diversity", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28(4): 415-25.
- Bruzzone R., White T. W., Goodenough D. A. 1996. "The cellular internet: On-line with connexins", *Bioessays*, 18(9): 709-18.
- Bukauskas F. F., Kreuzberg M. M., Rackauskas M., Bukauskiene A., Bennett M. V., Verselis V. K., vd. 2006. "Properties of mouse connexin 30.2 and human connexin 31.9 hemichannels: Implications for atrioventricular conduction in the heart", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25): 9726-31.
- Conklin C., Huntsman D., Yorida E., Makretsov N., Turbin D., Bechberger J. F., vd. 2007. "Tissue microarray analysis of connexin expression and its prognostic significance in human breast cancer", *Cancer Letters*, 255(2): 284-94.
- Dang X., Doble B. W., Kardami E. 2003. "The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 242(1-2): 35-8.

- Das S. J., Wang F., Koval M. 2002. "Targeted gap junction protein constructs reveal connexin-specific differences in oligomerization", *Journal of Biological Chemistry*, 277(23): 20911-8.
- Delmar M., Laird D. W., Naus C. C., Nielsen M. S., Verselis V. K., White T. W. 2017. "Connexins and disease", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Sep 4;10(9).
- El-Sabban M. E., Abi-Mosleh L. F., Talhouk R. S. 2003. "Developmental regulation of gap junctions and their role in mammary epithelial cell differentiation", *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 8(4): 463-73.
- El-Saghir J. A., El-Habre E. T., El-Sabban M. E., Talhouk R. S. 2011. "Connexins: A junctional crossroad to breast cancer", *The International Journal of Developmental Biology*, 55(7-9): 773-80.
- Evans W. H., De V. E., Leybaert L. 2006. "The gap junction cellular internet: Connexin hemichannels enter the signalling limelight", *Biochemical Journal*, 397(1): 1-14.
- Evans W. H., Martin P. E. 2002. "Gap junctions: Structure and function (review)", *Molecular Membrane Biology*, 19(2): 121-36.
- Fowler S. L., Akins M., Zhou H., Figeys D., Bennett S. A. 2013. "The liver connexin32 interactome is a novel plasma membrane-mitochondrial signaling nexus", *Journal of Proteome Research*, 12(6): 2597-610.
- Gerido D. A., Derosa A. M., Richard G., White T. W. 2007. "Aberrant hemichannel properties of cx26 mutations causing skin disease and deafness", *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 293(1): C337-C45.
- Gong X., Li E., Klier G., Huang Q., Wu Y., Lei H., vd. 1997. "Disruption of Alpha3 connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice", *Cell*, 91(6): 833-43.
- Goodenough D. A. 1974. "Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Characterization of the principal protein, connexin", *Journal of Cell Biology*, 61(2): 557-63.
- Goodenough D. A., Paul D. L. 2003. "Beyond the gap: Functions of unpaired connexon channels", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(4): 285-94.
- Graham S. V., Jiang J. X., Mesnil M. 2018. "Connexins and pannexins: Important players in tumorigenesis, metastasis and potential therapeutics", *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6).
- Guo Y., Pakneshan P., Gladu J., Slack A., Szyf M., Rabbani S. A. 2002. "Regulation of DNA methylation in human breast cancer. Effect on the urokinase-type plasminogen activator gene production and tumor invasion", *The Journal of Biological Chemistry*, 277(44): 41571-9.
- Guttman J. A., Lin A. E., Li Y., Bechberger J., Naus C. C., Vogl A. W., vd. 2010. "Gap junction hemichannels contribute to the generation of diarrhoea during infectious enteric disease", *Gut*, 59(2): 218-26.
- Harris A. L. 2001. "Emerging issues of connexin channels: Biophysics fills the gap", *Quarterly Reviews of Biophysics*, 34(3): 325-472.
- Hughes L., Malone C., Chumsri S., Burger A. M., McDonnell S. 2008. "Characterisation of breast cancer cell lines and establishment of a novel isogenic subclone to study migration, invasion and tumourigenicity", *Clinical & Experimental Metastasis*, 25(5): 549-57.
- Jamieson S., Going J. J., D'Arcy R., George W. D. 1998. "Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumours", *The Journal of Pathology*, 184(1): 37-43.

- Jee H., Nam K. T., Kwon H. J., Han S. U., Kim D. Y. 2011. "Altered expression and localization of connexin32 in human and murine gastric carcinogenesis", *Digestive Diseases and Sciences*, 56(5): 1323-32.
- Johnson R. G., Le H. C., Evenson K., Loberg S. W., Myslajek T. M., Prabhu A., vd. 2016. "Connexin hemichannels: Methods for dye uptake and leakage", *The Journal of Membrane Biology*, 249(6): 713-41.
- Kanczuga-Koda L., Koda M., Sulkowski S., Wincewicz A., Zalewski B., Sulkowska M. 2010. "Gradual loss of functional gap junction within progression of colorectal cancer -- a shift from membranous Cx32 and Cx43 expression to cytoplasmic pattern during colorectal carcinogenesis", *In Vivo*, 24(1): 101-7.
- Kanczuga-Koda L., Sulkowska M., Koda M., Reszec J., Famulski W., Baltaziak M., vd. 2003. "Expression of connexin 43 in breast cancer in comparison with mammary dysplasia and the normal mammary gland", *Folia Morphologica*, 62(4): 439-42.
- Kanczuga-Koda L., Sulkowska M., Koda M., Rutkowski R., Sulkowski S. 2007. "Increased expression of gap junction protein--connexin 32 in lymph node metastases of human ductal breast cancer", *Folia Histochemica et Hystobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 45 Suppl 1: S175-80.
- Kanczuga-Koda L., Sulkowski S., Koda M., Sulkowska M. 2005. "Alterations in connexin26 expression during colorectal carcinogenesis", *Oncology*, 68(2-3): 217-22.
- Kanczuga-Koda L., Sulkowski S., Lenczewski A., Koda M., Wincewicz A., Baltaziak M., vd. 2006. "Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer", *Journal of Clinical Pathology*, 59(4): 429-33.
- Kanno Y., Loewenstein W. R. 1964. "Low-resistance coupling between gland cells. Some observations on intercellular contact membranes and intercellular space", *Nature*, 201: 194-5.
- King T. J., Lampe P. D. 2004. "Mice deficient for the gap junction protein connexin32 exhibit increased radiation-induced tumorigenesis associated with elevated mitogen-activated protein kinase (p44/ERK1, p42/ERK2) activation", *Carcinogenesis*, 25(5): 669-80.
- King T. J., Lampe P. D. 2005. "Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1719(1-2): 24-35.
- Kotini M., Mayor R. 2015. "Connexins in migration during development and cancer", *Developmental Biology*, 401(1): 143-51.
- Kumar N. M., Gilula N. B. 1986. "Cloning and characterization of human and rat liver cdnas coding for a gap junction protein", *The Journal of Cell Biology*, 103(3): 767-76.
- Kumar N. M., Gilula N. B. 1996. "The gap junction communication channel", *Cell*, 84(3): 381-8.
- Laird D. W. 2006. "Life cycle of connexins in health and disease", *Biochemical Journal*, 394(Pt 3): 527-43.
- Laird D. W., Fistouris P., Batist G., Alpert L., Huynh H. T., Carystinos G. D., vd. 1999. "Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors", *Cancer Research*, 59(16): 4104-10.
- Lampe P. D., Lau A. F. 2004. "The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(7): 1171-86.
- Lawrence T. S., Beers W. H., Gilula N. B. 1978. "Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication", *Nature*, 272(5653): 501-6.

- Lee S. W., Tomasetto C., Paul D., Keyomarsi K., Sager R. 1992. "Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines", *The Journal of Cell Biology*, 118(5): 1213-21.
- Li Q., Omori Y., Nishikawa Y., Yoshioka T., Yamamoto Y., Enomoto K. 2007. "Cytoplasmic accumulation of connexin32 protein enhances motility and metastatic ability of human hepatoma cells in vitro and in vivo", *International Journal of Cancer*, 121(3): 536-46.
- McLachlan E., Shao Q., Laird D. W. 2007. "Connexins and gap junctions in mammary gland development and breast cancer progression", *The Journal of Membrane Biology*, 218(1-3): 107-21.
- McLachlan E., Shao Q., Wang H. L., Langlois S., Laird D. W. 2006. "Connexins act as tumor suppressors in three-dimensional mammary cell organoids by regulating differentiation and angiogenesis", *Cancer Research*, 66(20): 9886-94.
- Mehta P. P., Perez-Stable C., Nadji M., Mian M., Asotra K., Roos B. A. 1999. "Suppression of human prostate cancer cell growth by forced expression of connexin genes", *Developmental Genetics*, 24(1-2): 91-110.
- Mese G., Richard G., White T. W. 2007. "Gap junctions: Basic structure and function", *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11): 2516-24.
- Mese G., Sellitto C., Li L., Wang H. Z., Valiunas V., Richard G., vd. 2011. "The Cx26-G45E mutation displays increased hemichannel activity in a mouse model of the lethal form of keratitis-ichthyosis-deafness syndrome", *Molecular Biology of the Cell*, 22(24): 4776-86.
- Mesnil M., Crespin S., Avanzo J. L., Zaidan-Dagli M. L. 2005. "Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1719(1-2): 125-45.
- Monaghan P., Clarke C., Perusinghe N. P., Moss D. W., Chen X. Y., Evans W. H. 1996. "Gap junction distribution and connexin expression in human breast", *Experimental Cell Research*, 223(1): 29-38.
- Musil L. S., Goodenough D. A. 1993. "Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER", *Cell*, 74(6): 1065-77.
- Musil L. S., Le A. C., VanSlyke J. K., Roberts L. M. 2000. "Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function", *Journal of Biological Chemistry*, 275(33): 25207-15.
- Naus C. C., Laird D. W. 2010. "Implications and challenges of connexin connections to cancer", *Nature Reviews Cancer*, 10(6): 435-41.
- Phillips S. L., Williams C. B., Zambrano J. N., Williams C. J., Yeh E. S. 2017. "Connexin 43 in the development and progression of breast cancer: What's the connection? (review)", *International Journal of Oncology*, 51(4): 1005-13.
- Revel J. P., Karnovsky M. J. 1967. "Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver", *Journal of Cell Biology*, 33(3): C7-C12.
- Robertson J. D. 1963. "The occurrence of a subunit pattern in the unit membranes of club endings in mauthner cell synapses in goldfish brains", *Journal of Cell Biology*, 19: 201-21.
- Saez J. C., Retamal M. A., Basilio D., Bukauskas F. F., Bennett M. V. 2005. "Connexin-based gap junction hemichannels: Gating mechanisms", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1711(2): 215-24.

- Scott C. A., Kelsell D. P. 2011. "Key functions for gap junctions in skin and hearing", *Biochemical Journal*, 438(2): 245-54.
- Shiels A., Mackay D., Ionides A., Berry V., Moore A., Bhattacharya S. 1998. "A missense mutation in the human connexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 1q", *American Journal of Human Genetics*, 62(3): 526-32.
- Sohl G., Willecke K. 2004. "Gap junctions and the connexin protein family", *Cardiovascular Research*, 62(2): 228-32.
- Srinivas M., Verselis V. K., White T. W. 2018. "Human diseases associated with connexin mutations", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1860(1): 192-201.
- Stoletov K., Strnad J., Zardouzian E., Momiyama M., Park F. D., Kelber J. A., vd. 2013. "Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization", *Journal of Cell Science*, 126(Pt 4): 904-13.
- Talhouk R. S., Elble R. C., Bassam R., Daher M., Sfeir A., Mosleh L. A., vd. 2005. "Developmental expression patterns and regulation of connexins in the mouse mammary gland: Expression of connexin30 in lactogenesis", *Cell and Tissue Research*, 319(1): 49-59.
- Teleki I., Szasz A. M., Maros M. E., Gyorffy B., Kulka J., Meggyeshazi N., vd. 2014. "Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis", *PLoS One*, 9(11): e112541.
- Temme A., Buchmann A., Gabriel H. D., Nelles E., Schwarz M., Willecke K. 1997. "High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32", *Current Biology*, 7(9): 713-6.
- Thimm J., Mechler A., Lin H., Rhee S., Lal R. 2005. "Calcium-dependent open/closed conformations and interfacial energy maps of reconstituted hemichannels", *The Journal of Biological Chemistry*, 280(11): 10646-54.
- Tittarelli A., Guerrero I., Tempio F., Gleisner M. A., Avalos I., Sabanegh S., vd. 2015. "Overexpression of connexin 43 reduces melanoma proliferative and metastatic capacity", *British Journal of Cancer*, 113(2): 259-67.
- Tran Van Nhieu G., Clair C., Bruzzone R., Mesnil M., Sansonetti P., Combettes L. 2003. "Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of shigella in epithelial cells", *Nature Cell Biology*, 5(8): 720-6.
- Valiunas V., Polosina Y. Y., Miller H., Potapova I. A., Valiuniene L., Doronin S., vd. 2005. "Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions", *The Journal of Physiology*, 568(Pt 2): 459-68.
- Vinken M., Vanhaecke T., Papeleu P., Snykers S., Henkens T., Rogiers V. 2006. "Connexins and their channels in cell growth and cell death", *Cellular Signalling*, 18(5): 592-600.
- Wei C. J., Xu X., Lo C. W. 2004. "Connexins and cell signaling in development and disease", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20: 811-38.
- Weigelt B., Peterse J. L., van 't Veer L. J. 2005. "Breast cancer metastasis: Markers and models", *Nature Reviews Cancer*, 5(8): 591-602.
- White T. W., Paul D. L. 1999. "Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions", *The Annual Review of Physiology*, 61: 283-310.
- World Health Organization. "Breast cancer: prevention and control". <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en>,



Son erişim tarihi: 12 Ekim 2018.

Zhang D., Kaneda M., Nakahama K., Aii S., Morita I. 2007. "Connexin 43 expression promotes malignancy of HuH7 hepatocellular carcinoma cells via the inhibition of cell-cell communication", *Cancer Letters*, 252(2): 208-15.

Zhao B., Zhao W., Wang Y., Xu Y., Xu J., Tang K., vd. 2015. "Connexin32 regulates hepatoma cell metastasis and proliferation via the p53 and AKT pathways", *Oncotarget*, 6(12): 10116-33.

Zhu D., Caveney S., Kidder G. M., Naus C. C. 1991. "Transfection of C6 glioma cells with connexin 43 cDNA: Analysis of expression, intercellular coupling, and cell proliferation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(5): 1883-7.

Zoidl G., Dermietzel R. 2010. "Gap junctions in inherited human disease", *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 460(2): 451-66.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. GÜLİSTAN MEŞE ÖZÇİVİCİ
Proje No:	114Z874
Proje Başlığı:	Connexin 32'nin Farklı Metastatik Özellikleri Olan Meme Kanseri Hücrelerinde Oynadığı Rollerin Araştırılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	ÖZDEN YALÇIN ÖZUYSAL
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ FEN FAKÜLTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2015 - 15/04/2018
Onaylanan Bütçe:	508198.0
Harcanan Bütçe:	338562.51
Öz:	<p>Meme kanseri kadınlarda kansere bağlı ölümlerde ilk sıradadır ve bunların büyük bir kısmı metastazdan kaynaklanmaktadır. Bu nedenle metastazın moleküler mekanizmalarının araştırılması önemlidir. Meme kanserinde connexin (Cx)'ler de rol oynamaktadır. Bunlar, komşu hücreler arasında oluklu bağlantılarla küçük moleküllerin geçişini sağlayarak ve/veya yarım kanallarla hücre dışına moleküller salgılayarak dokuların homeostazisini sağlarlar. İnsan meme dokusunda Cx26 ve Cx43 genleri hücrelerin çoğalma ve farklılaşma mekanizmalarında ve memede tümör oluşumunda rol oynamaktadır. Meme primer tümörlerinde, connexinlerin miktarları azalarak veya proteinlerin lokalizasyonları değişerek hücreler arasındaki iletişimin ortadan kalkması nedeniyle bunların tümör baskılayıcı olduklarını göstermektedir. Buna karşılık, invaziv meme kanserinde Cx26 ve Cx43'nin ifadesinin olduğu ve hücre sitoplazmasında biriktikleri gözlenmiştir. Bu, connexinlerin kanserin farklı evrelerinde görevlerinin değişebildiğine işaret etmektedir.</p> <p>İnsan meme kanseri dokularında, normal meme dokusunda ifade edilmeyen Cx32'nin lenf tutunumlu meme kanseri hastalarında sentezlendiği ve hücre zarı yerine sitoplazmada biriktiği gösterilmiştir. Fakat, Cx32'nin meme kanserde hangi rolleri oynadığı bilinmemektedir. Projede meme kanserlerinin ileri safhalarında sentezlenen ve hücre sitoplazmasında bulunan Cx32'nin farklı metastatik özellikler gösteren meme kanseri hücrelerinin yaşam ve çoğalmalarına yaptığı etkiler ile Cx32'nin hücrelerin migrasyon/invazyonuna etkileri araştırılmıştır.</p> <p>Çalışmada Cx32'nin normal meme hücresi MCF10A'de ve farklı metastatik özellikteki meme kanseri hücreleri MCF7, MDA-MB-231 ve Hs578T'de sadece MCF10A'lerde gap junction plakaları oluşturdukları ve diğerlerinde sitoplazmada oldukları gözlenmiştir. Cx32'nin MCF10A ve Hs578T'nin canlılıklarını azaltmış ama MCF7 ve MDA-MB-231'nin canlılıklarını etkilememiştir. Cx32 MCF10A ve MCF7'nin hücre döngüsünü değiştirmemiş, MDA-MB-231'de G1'deki hücre oranını azaltmış ve G2'deki hücre oranını artırmıştır. Hs578T hücrelerinde G1'deki hücre oranını azaltmış ve S'teki hücre oranını artırmıştır. Cx32 MCF10A'nın migrasyonunu artırma eğilimi göstermiş fakat MCF7 ve Hs578T'nin migrasyonunu azaltmıştır. Son olarak Cx32 MDA-MB-231'in migrasyonunu etkilememesine rağmen epitel belirteçlerden E-cadherinin protein ve mRNA seviyesini azaltmış ve mezankimal belirteçlerden vimentin, slug ve Zeb2'nin mRNA miktarını artırmıştır.</p> <p>Sonuç olarak Cx32'nin hücrenin tipine, durumuna ve karakteristiğine bağlı olarak hücrelerin fizyolojisini ve özelliklerini farklı şekillerde etkilediği gözlenmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Connexin32, oluklu bağlantılar, meme kanseri, invazyon/migrasyon, metastaz?
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Investigating the Role of Connexin 32 on Gap Junctions in Breast Cancer Cells (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),