

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANSER KÖK HÜCRELERİNDE BIO-BELİRTEÇ
OLARAK DEAMİNO NÖROMİNİK ASİT
(KDN)'in İNCELENMESİ

Kök Hücre Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM

DANIŞMAN
Doç. Dr. Remziye DEVECİ

İZMİR
2014

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANSER KÖK HÜCRELERİNDE BİO-BELİRTEÇ
OLARAK DEAMİNO NÖROMİNİK ASİT
(KDN)'in İNCELENMESİ

Kök Hücre Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM

DANIŞMAN
Doç. Dr. Remziye DEVECİ

İZMİR
2014

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(ADI SOYADI)

(İMZA)

Başkan: Doç. Dr. Remziye DEVECİ (Danışman)

Üye: Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN

Üye: Prof. Dr. Şükran DARCAN

Üye: Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ

Üye: Doç. Dr. Zeynep SERCAN

Doktora tezinin kabul edildiği tarih

.....

ÖNSÖZ

Hep birlikte daha güzel işlerde başarıya ulaşabilmek dileği ile başta asistanlarım olmak üzere, üzerimde emeği olan herkese aileme, hocalarıma ve dostlarıma çok teşekkür ederim.

Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM

Selinime
ve
sevdiklerime...

ÖZET

KANSER KÖK HÜCRELERİNDE BİO-BELİRTEÇ OLARAK DEAMİNO NÖROMİNİK ASİT (KDN)'in İNCELENMESİ

Kanser dokusu heterojen hücre gruplarından oluşmuştur. Bu heterojenite, genetik ve mikro-çevresel farklılıklarla açıklanabildiği gibi hücrelerin farklılaşabilme dereceleriyle de ilişkilidir. Son 10 yılda hızla değer kazanan Kanser Kök Hücresi (KKH) hipotezi, bütün dünyada yapılmakta olan onkolojik çalışmalar içindeki önceliğini sürdürmektedir. Tümör dokusu içindeki bu kök hücre özelliklerini içeren tümör başlangıç hücreleri tümörün çoğalmasından, invazyonundan ve hatta metastazından sorumlu olan hücrelerdir. Bu hücreler kök hücre biyolojisine benzer şekilde bölünerek kendine eş KKH oluştururlar. Kanser teşhis ve tedavisinde KKH çalışmaları ve yeni hedef molekül arayışları hastalıkta kür elde edilmesi veya yaşam süresinin arttırılabilmesi için büyük önem taşımaktadır. KDN (deaminoneuraminic acid, 2-keto-3-deoxy-D-glycero- D-galacto-nononic acid), insanda klasik sialik asit analiz yöntemleri ile belirlenemeyecek kadar az miktarda bulunan minör bir sialik asittir. Tümör dokusunda bir “oncodevelopmental” antijen olarak yüksek oranda bulunması ile dikkat çeken bir moleküldür. Çeşitli tümörlerde, hücre hatlarında veya kısıtlı sayıda hasta örneğinde yapılan çalışmalarda serbest KDN düzeyinin, serbest sialik asitlere ve normal dokuya göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber oranın kanserin progresyonu ile birlikte arttığı düşünülmektedir. Bu molekülün kanser dokusunda biyolojik belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Kanser hücrelerinde gözlenen KDN'ye ait bu ifade artışı dikkat çekicidir ancak literatürde çok kısıtlı sayıda veri olmakla beraber kanser kök hücrelerinde bu molekülün davranışı ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın hipotezi kanser dokusunda gözlenen bu artışın heterojen hücre gruplarında farklı miktarlarda ifade bulacağı ve kanser kök hücresi ile ilişkili olabileceğidir. Bu amaçla insan prostat ve meme kanseri hücre hattında ve bu hücre hatlarından izole edilen kanser kök hücrelerinde KDN molekülüne ait değişiklikler incelenmiştir. Ayrıca aynı kanserlerde hasta biopsi örneklerinde immunohistokimyasal analizler yapılmış ve klinik korelasyon yönüyle değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda özellikle hasta

örneklerinde belirlenen immunoreaktivite artışları umut vericidir. Çalışma verileri elde edildikten sonra Uluslar Arası Patent Başvurusu (The Patent Cooperation Treaty (PCT) Patent No: 2014-G-78576) yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kanser Kök Hücresi, KDN, Meme kanseri, Prostat kanseri

ABSTRACT

INVESTIGATION OF KDN (DEAMINONEURAMINIC ACID) AS A BIOMARKER IN CANCER STEM CELLS.

A cancer tissue arise from heterogenic cell subsets. This heterogeneity correlated with genetic, microenvironment and cells' differentiation grade. In last decade, cancer stem cell (CSC) hypothesis is very popular and most of the oncological studies based on this hypothesis all around the world. Cancer stem cells responsible for tumor progression, invasion and metastase. CSCs divide like normal stem cells and produce two similar cancer stem cells. Targeting CSC is very important for cancer diagnosis and drug development. New target molecules are searched to target cancer stem cells, thus cure chance and time of life decrease. KDN (deaminoneuraminic acid, 2-keto-3-deoxy-D-glycero- D-galacto-nononic acid) is a minor sialic acid that very rarely to determined with classical sialic acid detection protocols in humans. KDN is an oncodevelopmental antigen that it's presence of higher levels in tumor tissue is very spectacular molecule But it is thought that KDN levels decrease correlated with tumor. Studies with several tumors, cancer cell lines or limited patient samples indicated that free KDN levels in cancer are higher than free sialic acid levels or free KDN levels in normal tissues. However it is thought that the KDN levels increase correlated with cancer progression. It is thought that this molecule could be used as a biomarker in cancer tissue. Increasing KDN levels in cancer tissue is very spectacular. There is unsufficient data in literature about KDN-cancer reliation. Besides that there are no studies on KDN molecule's behaviour in cancer stem cells. The hypothesis of this study that increase KDN different amount in cancer tissue and heterogenic cell populations and this difference associated with cancer stem cells. Fort that purpose, we analyzed KDN levels in prostate and breast cell cancer cell lines and cancer stem cells in this cell lines. Also we analyzed KDN immunoreactivity in patient samples and evaluated with clinical correlation aspect. As a result of this study, determinated increasing of immunoreactivity in patient samples are very important and hope-inspring for cure. After this results, we applied for international patent (The Patent Cooperation Treaty (PCT) Patent No: 2014-G-78576).

Key words: breast cancer, cancer stem cell, KDN, prostate cancer

İÇİNDEKİLER

1. Giriş.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1. Kanser Kök hücreleri.....	3
2.2. Kanser Kök Hücrelerinde Sinyal yolları.....	4
2.2.1. WNT/ β -catenin Sinyal Yolağı.....	4
2.2.2. Notch Sinyal Yolağı.....	5
2.2.3. Sonic Hedgehog Sinyal Yolağı.....	7
2.3. Kök Hücre Nişleri ve KKH'deki Rolü.....	8
2.4. Kanser Kök Hücresi ve Kanser Tedavi Direnci.....	9
2.5. Sialik Asitler.....	11
2.5.1. Sialik Asitlerin Moleküler Yapısı.....	11
2.5.2. Sialik Asitlerin Bağ Özellikleri.....	12
2.5.3. Sialik Asitlerin Görevleri.....	13
2.6. KDN (Deaminoneuraminic acid, 2-keto-3-deoxy-D-glycero- D-galactono- nononic acid).....	15
2.7. KDN İçeren Glikanların Özellikleri.....	21
3. Gereç ve Yöntem.....	25
3.1. KDN Poliklonal Antikor Yanıtı Geliştirilmesi.....	25
3.2. Hücre Kültürü.....	27
3.2.1. Hücre Kültür hattı için mediumum hazırlanması.....	27
3.2.2. Hücre Hatlarının Üretilmesi.....	28
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	28
3.2.4. Hücre Hattının Dondurulması.....	29
3.3. Flow Sitometri Cihazında CD133 ⁺ /CD44 ^{+/low} Kanser Kök Hücrelerinin Toplanması.....	30
3.4. Western Blot Analizi.....	31
3.5. İmmünohistokimyasal Analizler.....	33
3.5.1. Hücreler İçin İmmünohistokimyasal Analiz.....	33
3.6. Biyopsi Örneklerinin Toplanması, Takibi ve İmmünohistokimyasal Analiz.....	33
3.6.1. Hasta Örneklerinin Toplanması.....	33
3.6.2. Işık Mikroskop Takibi.....	33

3.6.3. Kesit Alma.....	34
3.6.4. İmmunohistokimyasal Analiz.....	34
3.7. Sialik Asit Analizi.....	35
3.7.1. Standartların Hazırlanması.....	35
3.7.2. Sialik Asit Analizi İçin Asit Hidrolizi.....	35
3.7.3. Sialik Asitlerin Türevlendirilmesi.....	35
3.8. Sialik Asit Analizinde LC-MS/MS.....	36
3.8.1. HPLC Koşulları.....	36
3.8.2. Kütle Spektrometrisi.....	36
3.8.3. Reaktifler.....	37
3.8.4. Türevlendirme.....	37
3.9. İstatistiksel analizler.....	40
4. Bulgular.....	41
4.1. Tavşan İmmunizasyon Sonuçları.....	41
4.2. Protein Analizi Bulguları.....	44
4.2.1. Prostat ve Meme Kanseri Hücre Hatlarından Elde Edilen Kanser Kök Hücrelerinde “Western Blot” Analizi Bulguları.....	44
4.2.2. Prostat ve meme kanseri hücre hatlarından elde edilen Kanser Kök Hücrelerinde İmmunohistokimyasal Analiz Bulguları.....	45
4.3. Prostat Kanseri Biyopsi Örneklerinin Değerlendirilmesi.....	50
4.3.1. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları.....	54
4.4. Meme kanseri Biyopsi Örneklerinin Değerlendirilmesi.....	57
4.4.1. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları.....	62
4.5. KDN Molekülünün LC-MS Analizi Bulguları.....	66
4.5.1. Kanser Kök Hücrelerinde ve Kanser Kök Hücresi Olmayan Grupta Analizi Bulguları.....	66
4.5.2. Hücre hatlarında analiz sonuçları.....	67
5. Tartışma	69
6. Sonuç ve Öneriler	74
7. Kaynaklar.....	76
8. Özgeçmiş.....	88

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal kök hücreler ve kanser kök hücreleriyle ilişkili sinyal yolakları.....	6
Şekil 2.2. Sialik asidin genel formülü ve olası tipleri.....	11
Şekil 2.3. KDN'nin Metabolik Haritası.....	20
Şekil 2.4. Memeli Hücrelerinde KDN Oluşum Mekanizması.....	24
Şekil 3.1. DU145 Prostat kanseri hücre hattından izole edilen CD133 ⁺ /CD44 ^{+/low} Kanser Kök Hücreleri.....	31
Şekil 3.2. DMB ile sialik asitlerin işaretlenmesi.....	38
Şekil 3.3. Standart sialik asit tiplerine ait capLC-ESI-MS/MS analizleri.....	39
Şekil 4.1. KDN antijeni ile bağışıklanan tavşanın 3. immünizasyon sonrası immün yanıtları.....	41
Şekil 4.2. KDN antijeni ile bağışıklanan tavşanın 4. ve 5. immünizasyonları sonrası immün yanıtları.....	43
Şekil 4.3. Monolayer (2D) ve üç boyutlu (3D) Du145 Prostat kanser kök hücrelerinde KDN analizi (b).....	45
Şekil 4.4. KDN immunoreaktivitesi.....	47
Şekil 4. 5. Sferoidlerde KDN immunoreaktivitesi.....	48
Şekil 4.6. Mannoz 6P immünoreaktivitesi.....	49
Şekil 4.7. Benign ve PIN grupları arasında PSA ve KDN değerlendirilmesi.....	51
Şekil 4. 8. Benign ve malign gruplar arasında PSA ve KDN değerlendirilmesi.....	51

Şekil 4. 9. PSA ve KDN'nin PIN ve malign gruplar arasında	
değerlendirilmesi.....	52
Şekil 4.10. Benign, PIN ve Malign guruplar arasında PSA değerlerinin	
karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.11. Benign, PIN ve Malign guruplar arasında KDN değerlerinin	
karşılaştırılması.....	53
Şekil 4. 12. Prostatik dokularda KDN immünoreaktivitesi.....	55
Şekil 4. 13. Prostatik dokularda KDN immünoreaktivitesi.....	56
Şekil 4.14. Hastalarda KDN analizi grafikleri.....	58
Şekil 4.15. Tüm guruplarda meme kanseri hastalarına ait KDN	
immunoreaktivitelerinin tümör tipleri ile karşılaştırılması.....	59
Şekil 4.16. Tanı gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	60
Şekil 4.17. Hastalarda “grade” ve KDN immunoreaktivitesinin istatistiksel	
olarak karşılaştırılması.....	61
Şekil 4.18. KDN immunoreaktivitesi ile hastalarda görülen metastazın	
istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	62
Şekil 4.19 Malign ve Benign meme duktuslarında KDN İmmünoreaktivitesi.	64
Şekil 4.20. Malign ve benign meme duktuslarında KDN İmmünoreaktivitesi.	65
Şekil 4.21: KDN standart ile belirlenen oran.....	66
Şekil 4.22. Du145 insan prostat kanseri kanser kök hücresi olmayan grupta	
KDN LC-MS verileri.....	67
Şekil 4.23. MCF-7 insan meme kanseri kanser kök hücresi olmayan grupta	
KDN LC-MS verileri.....	67
Şekil 4. 24: Prostat ve meme kanserinde LC-MS analiz sonuçları.....	68

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. KDN molekülü ile tavşana yapılan immünizasyon içerikleri ve tarihleri.....	26
Tablo 3.2. Hücre kültür medium içeriği.....	27
Tablo 3.3. Hücre hattı dondurma medium içeriği.....	29
Tablo 3.4. Sialik asitlerin parçalanma iyonları (m/z).....	36
Tablo 3.5. HPLC koşulları.....	36

KISALTMALAR LİSTESİ

ALDH-1: Aldehit Dehidrogenaz-1

AML: Akut Myeloid Lösemi

BCL-2: B-cell lenfoma protein

BMP: Kemik morfogenetik proteinleri

B16: Fare melonoma hücre hattı

CAD: Aktif kaspaz deoksiribonükleaz

CD44: Hücre yüzey adezyon molekülü

CD133: Prominin-1

Cdk: Siklin bağımlı kinaz

Ci: Cubitus interruptus

CK1: Kazein kinaz 1

CSS: CMP-sia Sentaz

CXCR4: Kemokin Reseptör Tip 4

DMEM/F12: Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

Dsh: disheveled

DU145: İnsan prostat kanseri hücre hattı

EGF: Epidermal çoğalma faktörü

EKH: Embriyonik kök hücre

ER: Endoplazmik retikulum

ESA: Epitel-Spesifik Antijen

(Fu): Serin/Treonin kinaz Fused

Fzd: Frizzled

Glu-6-P: Glukoz-6-fosfat

GLT-1: Glukoz transporter-1

GPI: Glikozil fosfotidilinositol

GSK3: Glikojen Sentaz Kinaz-3

Hh: Hedgehog

HKH: Hematopoetik kök hücre

HMLEs: İmmortalize edilmiş insan meme epitelyum hücreleri

IAP: Apoptosis inhibitör protein

ICAD: Kaspaz deoksiribonükleaz inhibitörü

KDN: Deamino nörominik asit
KKH: Kanser kök hücresi
KH: Normal Kök Hücre
KPS: KDN-9-Fosfat Sentetaz
LDL: Düşük-yoğunluklu Lipoprotein
LRP5/6: Lipoprotein Reseptör bağlantılı Protein
Man: Mannoz
Man-6-P: Mannoz-6-fosfat
MDR1: Çoklu ilaç direnci proteini 1
Mcl-1: Antiapoptotik Bcl-2 ailesi protein
MMP-7: Matriks metalloproteinaz-7
NIH: Uluslararası Sağlık Enstitüsü
NICD: Notch intraselüler domaini
NPS: Neu5Ac-9-P sentetaz
PEP: Fosfoenolpiruvat
PI: Propidium
PKA: Protein Kinaz-A
PMI: Fosfomanoz İzomeraz
PPAR-δ: Peroxisome proliferator-active edici reseptör delta
PS: Fosfotidilserin
p53: Tümör protein 53
ROS: Reaktif oksijen türevleri
SAS: Sialik asit sentetaz
SCID: İmmün Yetersiz
SDF-1: Stromal Kökenli Faktör-1
Sia: N-asetilnörominik asit
Shh: Sonik hedgehog
Smo: Smoothened
TCF-1: Transkripsiyon Faktörü-1
TCF/LEF: T hücresi faktörü/ lenfoid arttırıcı faktör
TGF-α: Transforme edici çoğalma faktörü alfa
TGF-β1: Transforme edici çoğalma faktörü beta 1
TNF-1: Tümör nekroz faktörü-1

1. GİRİŞ

Bütün dünyada bilimsel araştırmalara ayrılan bütçenin büyük payını kanser araştırmaları almaktadır. NIH tarafından 2014 yılında yayınlanan verilere göre en sık görülen kanser türleri sırasıyla meme, prostat ve akciğer kanseridir. Kanser hücrelerinin moleküler biyolojik davranışındaki çeşitlilik, kanser teşhisini ve tedavisini zorlaştırmakta ve hastalarda kür şansını azaltmaktadır. Kanser Kök Hücre (KKH) teorisinin ortaya atılmasından sonra bütün dünyada çok sayıda bilim insanı bu konuya yönelmiş ve bu hastalığın aydınlatılabilmesi için çalışmaya başlamıştır.

Tümörler farklı morfolojik özelliklere sahip kanser hücrelerinden oluşmuştur. Her bir tümör tipi için değişen yüzey belirteçlerini içeren bu hücreler farklı proliferasyon kapasitelerine sahip heterojen populasyonlar oluştururlar. Bu heterojenite, genetik ve mikro-çevresel farklılıklarla açıklanabildiği gibi hücrelerin farklılaşabilme dereceleriyle de açıklanabilir. Son 10 yılda hızla değer kazanan Kanser Kök Hücre (KKH) hipotezi, bütün dünyada yapılmakta olan onkolojik çalışmalar içindeki önceliğini sürdürmektedir (1). Daha önce çalışılmış olan kanserleşme modellerinde hücrelerin önlenemeyen büyümesinin bir seri genetik kazanım sonunda olduğu öngörülmüştür. Bu genetik aktivasyonların hücrelerin proliferasyon potansiyellerinin artması, proliferasyonu inhibe eden genlerin sessizleşmesi ve programlı hücre ölümüne ait genlerin bypass edilmesi şeklinde ortaya çıktığı düşünülmüştür. KKH kavramı, tümör biyolojisindeki normal kök hücre/projenitör hücre yakınlığı ve buna bağlı olarak organlarda görülen “kendini yenileyebilme potansiyeli” ile kanser hücrelerinde görülen “süregelen proliferasyonlar” arasındaki benzerliklerin gözlenmesiyle ortaya çıkmıştır (2). Tümör dokusu içindeki bu kök hücre özelliklerini içeren tümör başlangıç hücreleri tümörün çoğalmasından, invazyonundan ve hatta metastazından sorumlu olan hücrelerdir. Bu hücreler kök hücre biyolojisine benzer şekilde bölünür, bir hücre kendi kendini yenileyerek kendine eş KKH oluştururken diğer hücre tümör dokusundaki “bulk population” denilen hücre yığını oluşturur (non-KKH). Çoklu ilaç direncini taşıyan hücreler KKH’leridir ancak diğer hücre grubu kemoterapi ve radyoterapiye duyarlıdır (3).

Kanser hücrelerinin ve/veya KKH'lerinin spesifik olarak işaretlenmesi kanser teşhis ve tedavisinde önemli bir adım olarak değerlendirilebilir. Ancak bugüne kadar yapılmış çalışmalarda umut veren moleküller bulunmakla beraber hedef tedaviyi gerçekleştirebilecek bir yöntem geliştirilememiştir. Hedefe giden her molekül bir tedavi veya teşhis seçeneği olarak “Faz” çalışmalarında kullanılmaktadır ancak daha çok çalışmaya ve daha çok yeni bilgiye ihtiyaç bulunduğu açıktır. Bu tezde hedefe yönelik tedavinin yapılabilmesi için yeni başlangıç yapılmıştır. Bu hedef molekül **KDN (Deaminoneuraminic acid, 2-keto-3-deoxy-D-glycero- D-galacto-nononic acid)**'dir. Tezde bu konuyla ilgili uzun zamandır sürdürülmekte olan çalışmaları bulacaksınız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Kök Hücreleri

Kanser kitlesinin küçük bir popülasyonunu oluşturan kanser kök hücrelerinin (KKH) varlığı ile ilgili ilk modern kanıtlar 1994 yılında insan akut miyeloid lösemi (AML) çalışmalarından elde edilmiştir. Araştırmacılar, AML hastalarından elde ettikleri AML-başlatıcı hücre popülasyonunu çeşitli immün yetersiz farelere (SCID) transplante ederek bu hücrelerin varlığını açıklamaya çalışmışlardır (4). 2003 yılında insan KKH'leri meme (5) ve beyin kanseri (6) gibi solid tümörlerde tanımlanmıştır. Bunu takip eden çalışmalarda kolon, pankreas, akciğer ve prostat kanseri, melanoma ve glioblastoma gibi çeşitli tümörlerde kanser kök hücreleri tespit edilmiştir.

CD44, CD24, CD29, CD90, CD133, epitel-spesifik antijen (ESA) ve Aldehid dehidrogenaz-1 (ALDH1) gibi hücre yüzey belirteçlerinin ifadesi değişik tümörlerdeki kanser kök hücrelerinin izolasyonu için kullanılmaktadır. Örneğin, $CD44^+CD24^{low}$ ve $ALDH^+$ meme kanserinde; $CD133^+$ kolon, beyin ve akciğer kanserinde; $CD34^+/CD38^-$ lösemide; $CD44^+$ baş ve boyun kanserinde; CD90 karaciğer kanserinde; $CD44^+/CD24^+/ESA^+$ pankreas kanserinde kanser kök hücrelerinin izolasyonu için kullanılmaktadır (7). Kanser kök hücreleri daha çok kök hücre (self-renewal) oluşturabilme yeteneğinde ve farklılaşacak olan hücreleri üretebilme yeteneğindeki hücreler olarak ifade edilmektedir. Asimetrik hücre bölünmesinde, kök hücre özelliğini devam ettiren bir hücre ve post-mitotik farklılaşma özelliğine sahip bir hücre olmak üzere iki hücre oluşmaktadır. Bu nedenle bir tümördeki KKH alt popülasyonu oranının kesin olarak belirlenebilmesi mümkün değildir.

Kanser kök hücrelerinin kökeni ile ilgili birkaç farklı teori vardır. Teorilerden biri, kanser kök hücrelerinin spesifik genetik mutasyona ya da çevresel değişikliklere maruz kalan normal kök/progenitör hücrelerden kaynaklandığı şeklindedir. Bazı kanser kök hücreleri hücreSEL özellik, fenotip ve hatta hücre yüzey belirteçleri yönünden incelendiğinde normal kök/progenitör hücreler ile benzer özellikler sergilemektedir. Kanser kök hücrelerinin kökeni ile ilgili diğer bir teori de kanser kök hücrelerinin genetik ve/veya heterotipik değişimler ile kök hücre karakteri kazanan normal somatik hücrelerden kaynaklandığı şeklindedir. Örneğin,

kanser hücreleri epitelyal-mezenşimal geçiş (EMT) vasıtasıyla kök hücre karakteri kazanabilmektedir. İmmortalize edilmiş insan meme epitelyum hücrelerinde (HMLEs) EMT'nin indüksiyonu sonucunda bu hücrelerin mezenşimal özellikler kazanarak HMLE'den izole edilen kök hücre benzeri hücrelerdeki bazı yüzey belirteçlerini ifade edebildiği gösterilmiştir. Ayrıca, bu hücreler mammosfer (mammoküre) oluşturabilme yeteneğine sahiptirler (8).

EMT, epitel hücrelerin invazyonunu indükleyen SNAI1/2, ZEB1/2 ya da TWIST1/1 gibi transkripsiyon faktörleri tarafından tetiklenmektedir. Çeşitli çalışmalarda EMT indüklenmesinin kendini yenileme özelliği ve KKH karakteri kazandırdığı gösterilmiştir. (Ansieu et al., 2008; Yang et al., 2004). Buna karşın, bazı çalışmalar epitelyal fenotipe sahip tümörlerin periferik dolaşımda hayatta kaldığını ve uzak dokulara metastaz yapabildiğini göstermektedir (9).

2.2. Kanser Kök Hücrelerinde Sinyal Yolakları

Kanser kök hücrelerinin kendi kendisini yenilemesi ve farklılaşması sitokinler ve kanser hücre mikroçevresini de kontrol eden birden çok düzenleyici yolak tarafından kontrol edilmektedir. Hedgehog, Notch ve Wnt/ β -catenin gibi çeşitli yolaklar kanserin ilerlemesini kontrol etmektedirler (10). Bu yolaklar hücre bölünmesi, proliferasyonu ve polaritesi gibi önemli biyolojik proseslerin düzenlenmesinde büyük rol oynamaktadırlar.

2.2.1. WNT/ β -catenin Sinyal Yolağı

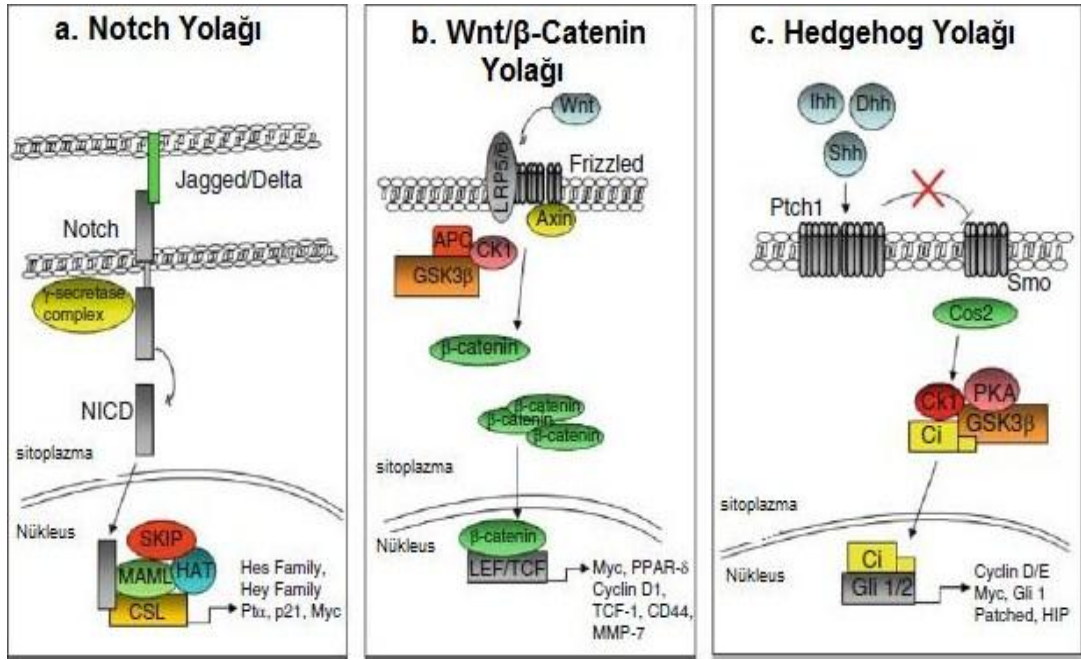
Wnt sinyali gelişimsel programların ve kök hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde role sahiptir (11). Artan Wnt sinyali farelerde hipofiz tümörlerine yol açmakta ve kök hücrelerde simetrik bölünmenin indüklenmesini sağlamaktadır (12) Wnt gen ailesi, Frizzled (Fzd) reseptörlerine bağlanan sisteince zengin glikoproteinleri kodlamaktadırlar (13). Kanonik Wnt sinyalizasyonunda Wnt'nin Fzd'a bağlanması disheveled (Dsh)'in aktivasyonunu, Glikojen Sentaz Kinaz-3'ün (GSK3) inaktivasyonunu ve β -catenin'in stabilizasyonunu sağlamaktadır. Bu kaskadın ilerlemesi siklin D1 gibi hedef genlerin aktive olmasına neden olmaktadır (Şekil 2.1b). Bu yolaktaki ikinci reseptör düşük-yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörü olarak bilinen Lipoprotein Reseptör bağlantılı Protein (LRP5/6) aynı

zamanda Wnt'ye bağlanmaktadır. Bunlar birlikte kanonik Wnt- β -catenin sinyal yolağını aktive etmektedirler. Kanonik-olmayan WNT/ β -catenin sinyalizasyonunda, Dsh'yi aktive etmek için Wnt Fzd'ye bağlanır. Kanonik-olmayan WNT/ β -catenin sinyalizasyonu kök hücrelerin planar polarizasyonunu artırarak simetrik bölünmenin gerçekleşmesini sağlamaktadır.

2.2.2. Notch Sinyal Yolağı

Notch sinyal yolağı hem tümör oluşumu hem de hücre yenilenmesinde önemli rol oynamaktadır ve farklılaşmamış kök hücre havuzunun korunması için gereklidir. Memelilerde Notch, 4 reseptör (Notch 1-4) ve 5 ligand (Jagged 1, Jagged 2, Delta-benzeri 1, -3 ve -4) yoluyla sinyal oluşturmaktadır. Bir ligandın Notch reseptörüne bağlanması, hücrenin nükleusuna göç eden Notch intraselüler domaini (NICD)'nin γ -sekretaz aracılı proteolitik parçalanmasına yol açar. NICD nükleusta Hes ve Hey ailelerinden bazı hedeflerin transkripsiyonunu uyaran bir transkripsiyonel faktör kompleksiyle etkileşime girer (Şekil 2.1a.).

Notch sinyalini hedef alan ve KKH'leri üzerinde yoğunlaşmış pre-klinik ve klinik çalışmalar bulunmaktadır. Glioblastoma multiforme kanser hücrelerinde Notch1 geni siRNA ile susturulduğunda bu hücrelerin tümör oluşturma kabiliyetlerinin azaldığı gösterilmiştir (14). Notch yolağının inhibe edilmesi ilaç direnci ve metastazın aşılması için potansiyel olarak etkili bir stratejidir.



Şekil 2.1. Normal kök hücreler ve kanser kök hücreleriyle ilişkili sinyal yolakları. (a). Notch Yolağı; Hücre-hücre temasını takiben Delta veya Jagged ligandı Notch reseptörüne bağlanır, böylece reseptörün proteolitik yıkımı uyarılır. Notch Intraselüler Domain'i (NICD) sitoplazmaya bırakılarak HES ve HEY ailelerine mensup olan Notch-ilişkili hedef genlerin transkripsiyonlarını aktive etmek üzere nükleusa geçer. **(b).** Wnt/ β-catenin Yolağı: Wnt ligandı varlığında Axin, APC, GSK3-β ve CK1'den oluşan yıkım kompleksi parçalanır ve β-catenin sitozolde birikir. Bu birikme sonucunda da nükleusa geçer ve burada Lef/Tcf transkripsiyon faktörlerine bağlanarak hedef genler olan Myc, PPAR-δ, Siklin D1, TCF-1, CD44 ve MMP-7'yi aktive eder. **(c).** Hedgehog Yolağı: aktif durumdayken Shh, Ihh ve Dhh ligandları bitişik hücredeki Pitch1 reseptörüne bağlanır ve bu da Smo'nun aktivasyonuna yol açar. Ci'nin CK1, PKA ve GSK3-β kompleksinden ayrılmasını önleyen Cos2 bu kompleksten ayrılınca Ci nükleusa geçerek transkripsiyon faktörleri Gli1/2 ve hedef genler Siklin d/E, Myc, Gli1, Patched ve HIP'i aktive eder. (Pasto A, Amadori A, Indraccolo S. *Signaling Pathways in Cancer Stem Cells: Therapeutic Implications*. In: Hayat MA (editor), *Stem Cells and Cancer Stem Cells*, Volume 5. Springer Science and Business Media. 'dan Türkçeleştirilmiştir.)

2.2.3. Sonic Hedgehog Sinyal Yolağı

Fizyolojik koşullar altında Hedgehog (Hh) sinyalizasyonu erişkinlerde doku rejenerasyonunu, embriyoda ise gelişimi regüle etmektedir. Memelilerde üç homolog proteini tanımlanmıştır: Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) ve Desert Hedgehog (Dhh). Ancak lösemi, bazal hücre karsinoması, pankreas ve meme kanseri de dahil olmak üzere kanserlerde up-regüle olduğu anlaşılmıştır (15). Hh yolağı polikomb gen BMI-1'in regülasyonu yoluyla hem normal hem de malign memeli kök hücrelerinde kendi kendini yenilemenin sürdürülmesinde çok önemli bir yere sahiptir (16). Notch'a benzer olarak Hh yolağı da çoklu ligandlardan oluşmuştur. Bu ligandlar (Sonic (Shh), Indian ve Desert) "dodecatransmembran Patched receptor (Ptch1)" ile etkileşimdedirler. Patch1 7 transmembran proteindir, Smoothened (Smo) inhibitörü olarak çalışır ve Frizzled ailesiyle de ilişkilidir.

Bunların yanında Patch1, transkripsiyon faktörü Cubitus interruptus (Ci), Serin/Treonin kinaz Fused (Fu), kinezin-like molekül costal2 (cos2) ve Suppressor of Fused (Sufu)'dan oluşan Hh sinyalizasyon kompleksinin komponentlerinden birisidir. Cos2 ayrıca Hh sinyal yolağının içerdiği diğer kinazlar olan protein kinaz A (PKA), protein kinaz CK1 (Kazein kinaz 1) ve glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3)'e de bağlanır. Ligandların yokluğunda, Patch 1 Smo'yu baskılar, böylece Ci'un proteolitik parçalanmasını aktive etmiş olur. Ci böylece nükleusa girebilen bir reseptöre dönüşür ve Hedgehog hedef gen ifadelerini inhibe eder. Ligandların varlığında ise Patch1'in Smo üzerindeki inhibe edici etkileri azalır. Smo, PKA ve CK1 tarafından fosforillenir. PKA, CK1 ve GSK3, Ci'un ayrılmasını engelleyen Cos2'den ayrılırlar. Ci bütünüyle nükleusa girer ve Hh hedef genlerinin transkripsiyonunu tetikler (17) (Şekil 2.1c.). Bu yolağın glioma projenitörleri ve kök hücrelerde de önemli bir rol oynadığı onaylanmıştır. Glioma KKH'leri Nanog/Oct4/Sox2/Bmi1 ifadesiyle ve bir Smo inhibitörü olan Siklopamin ile tedavi edilen spesifik kültür koşullarında gliomasferleri oluşturabilme yeteneğiyle tanımlanmıştır. Bu tedavi, KKH sayısında bir düşüşü tetikler ve doza bağımlı olarak apoptotik oranlarını artırır; 20 günlük tedavi gliomasferleri geri dönülmez şekilde parçalamak için yeterlidir. Tersine, proliferasyon ve apoptozu tetikleyen siklospamin gibi bir ilaç olan temozolomide'le tedavi gliomasferlerin parçalanmasını sağlamada başarılı değildir (18). İnsan glioblastoma örneklerinden elde edilen CD133⁺ hücrelerdeki Gli1, Patch1, Nanog, Sox2 ve Oct4 ifadeleri

CD133⁻ hücrelerle 4 saatlik siklospamin tedavisi sonucunda karşılaştırıldığında CD133⁺ hücrelerde bu genlerin ifadelerinin sırasıyla %50, %40, %10, %57 ve %20 düşüş gösterdiği görülmüştür. Bu sonuçlar Hh yolağının KKH'lerinin tümörijenik potansiyelindeki önemini altını çizmektedir.

Yeni bir çalışma Pitch1 ve transkripsiyon faktörleri Gli1 ve Gli2'nin insan normal meme dokusundaki kök/projenitör hücrelerin kültüre edilmesiyle oluşturulan mammokürelerde yüksek seviyelerde ifade edildiğini göstermiştir (19). Hh sinyalizasyonunun Shh yoluyla aktivasyonu mammoküre sayı ve büyüklüğünü %57 oranında arttırmış, Bmi1 ifadesinde de 6 katlık bir artışı tetiklemiştir. Ayrıca bu çalışmada mammoküre oluşumunu azaltan ve Gli1 ve Gli2 ifadesini inhibe eden siklospamin tedavisi uygulanarak artan mammoküre sayısı azaltılmış ve Bmi1 ifadesi bloke edilmiştir.

2.3. Kök Hücre Nişleri ve KKH'deki Rolü

Normal kök hücreler (KH) ve kanser kök hücreleri (KKH) arasındaki önemli farklardan birinin kök hücrelerin özel mikroçevresi olan ve içerisinde sessiz bir şekilde yaşabildikleri “kök hücre nişleri”ne olan bağımlılıklarıdır. Yetişkinlerde kök hücreleri destekleyen, fizyolojik olarak sınırlanmış, doku ve hücre tipine göre farklılık gösteren bu mikroçevreler kök hücrelerin suskun yataklarıdır (20) Bu hücrelerel mikroçevredeki büyüme faktörleri, sitokinler ve MikroRNA'lar gibi bileşenler hücrelerin büyüme, çoğalma, iletişim gibi temel fonksiyonları için gerekli şartları sağlar. Tüm kök hücre nişlerinde ortak görülen özellikler ise;

- KH nişleri özel olarak konumlanmış ve görevleri KH'lerin devamlılığını sağlamak olan özel hücreler içerir
- Nişler KH'ler için fizyolojik olarak bağlanma noktalarıdır. Bu hücre-hücre ve hücre –ekstraselüler ortam bağlantılarında adezyon molekülleri iş görür.
- Nişler kök hücre sayısını, çoğalmasını ve kaderini tayin eden dışsal faktörler oluştururlar. Bunlara Hedgehog (HH), Wnt, Kemik morfogenetik proteinleri (BMP) , fibroblast büyüme faktörü, Notch gibi birçok gelişimsel düzenleyici sinyal molekülleri dahildir ve hücreler bu sayede kendi kendini yenileme ve soy devamlılığının korunmasını sağlarlar.
- Nişler KH'lerin asimetric bölünmesini kontrol ederler (21-22).

Hematopoetik, intestinal ve kıl folikülü gibi sistemlerin kök hücrelerinde bromodeoksiüridin işaretleme yöntemi ile gösterilen nişler hücre büyüme ve çoğalma sinyallerini inhibe ederek kök hücreleri uzun bir süre sessiz halde korur. Yalnızca özel uyarıcı sinyal geldiğinde kök hücreler aktif hale geçer ve bölünürler. Bu nedenle hücre çoğalması dinamik niş sinyallerine bağlıdır. Çoğalmayı uyarıcı ve çoğalmayı dengeleyici sinyaller arasındaki dengenin sağlanması KH'lerin hemostatik devamlılığının sağlanmasının anahtarıdır (23).

KH'leri büyüme sinyallerinden bağımsız hale getiren veya büyüme inhibe edici sinyallerden kaçışa neden olan mutasyonlar, KH'lerin durdurulamaz büyümesine ve tümörijeniteye neden olur (24). Normal KH'lerin sessizliği ve mobilize hale gelmesi ile KKH'lerinin invazyonu ve metastazı arasında büyük bir benzerlik ve belirli temel ortak adımlar bulunmaktadır. Örneğin Hematopoetik kök hücrelerde (HKH) proteolizis için gerekli olan ekstraselüler matriks bileşenlerini aktive eden matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) , kök hücre faktörünü de membrana bağımlı halden serbest hale dönüştürür ve bu sayede c-kit üzerinden HKH'lerin nişlerde çoğalmasını ve hareketli hale geçmesini sağlar (25). MMP ailesi molekülleri kanser hücrelerinin metastazında rol alan anahtar moleküllerden biridir (26). Benzer şekilde hem hematopoetik hem de nöral sistem kök hücrelerinde integrin, kök hücre göçünde yer alan moleküllerden biri iken, tümör hücrelerinin göçü ve metastazında da yer almaktadır. Kanser hücresi metastazının normal kök hücrelerle ortak olan bir diğer özelliği ise SDF1 (Stromal Kökenli Faktör-1) ve CXCR4 (Kemokin Reseptör Tip 4)'ün önemli rol oynadığı homing ve dolaşıma katılım mekanizmasıdır. Son yapılan çalışmalar SDF1'in meme kanseri kök hücrelerinin göçünde de yer alan bir molekül olduğunu göstermiştir. Bu veriler kanser kök hücrelerinin işleyişinde kök hücre nişlerinin önemini ortaya çıkarmaktadır. KKH'ler kök hücre nişleri içerisinde sessiz halde kalıp normal KH'ler gibi davranarak radyoterapi ve kemoterapiden kaçış sağlamaktadır (26, 27).

2.4. Kanser Kök Hücresi ve Kanser Tedavi Direnci

Bilim insanları tedavi stratejileri geliştirebilmek için yıllardır kanser gelişimini anlamaya çalışmaktadır. 90'lı yılların başında normal somatik hücrelerin KKH'lerine dönüşümüne somatik hücrelerde meydana gelen 6 genetik mutasyonun neden olduğu hipotezi ortaya atılmıştır. Bu mutasyonlar büyüme sinyalleri yönünden

kendi kendine yetebilme, büyüme durdurucu uyarılara duyarsızlık, apoptozisten kaçma yeteneği, limitsiz büyüme, süregelen angiogenesis, doku invazyonu ve metastaz yeteneği olarak sıralanabilmektedir. Yapılan çalışmalar bu kazanılan mutasyonların tumor dokusunun %1 ve daha azını oluşturan kanser kök hücreleri vasıtası ile sürdürüldüğünü göstermiştir (28-29).

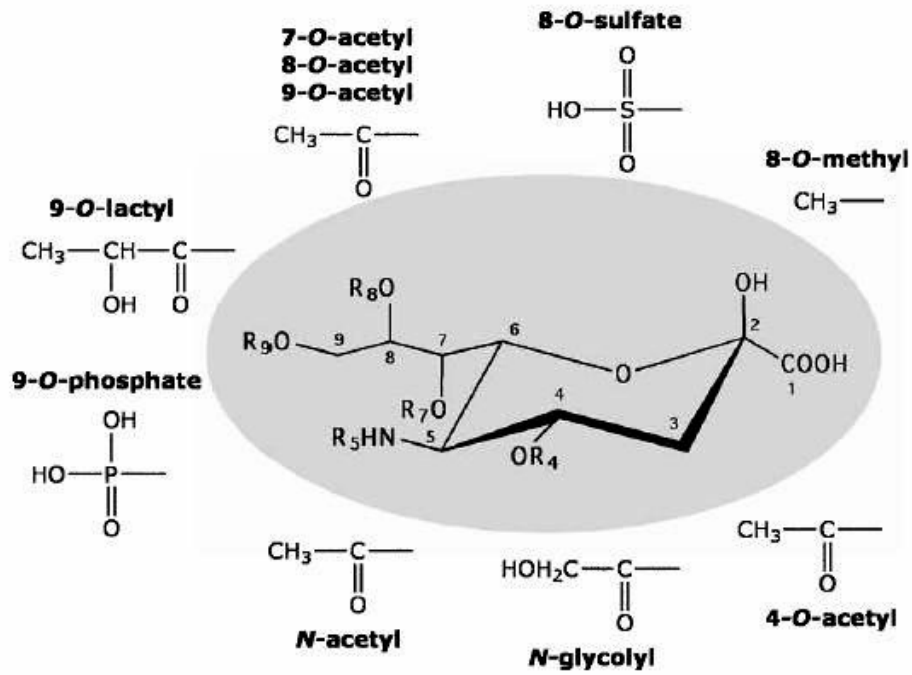
KKH'leri immün-yetersiz farelere transplante edildiğinde tümör oluşturabilmektedir. Kanser nüksü ve metastazında önemli rolleri olduğu bilinen KKH'lerinin kemoterapi ve radyoterapiye oldukça dirençli olduğu da bilinmektedir. Yüksek düzeyde CD44 ve düşük veya tespit edilemeyen düzeylerde CD24 yüzey belirteçlerinin ifadesine sahip olan tümörjenik meme kanseri hücreleri kemoterapiye dirençli oldukları için kanserin nüksünden sorumlu olabilirler. Li ve arkadaşları standart kemoterapi öncesi ve sonrasında meme kanseri örneklerindeki hücre alt popülasyonlarının oranlarındaki değişimi incelemişlerdir (28). 12 haftalık kemoterapiden sonra epitelial kanser hücrelerinin oranlarında önemli bir değişiklik gözlenmezken, CD44⁺/CD24^{-low} hücrelerin % 4.7'den % 13.6'ya kadar artış gösterdiğini belirlemişlerdir. Meirelles ve arkadaşları yakın zamanda insan over KKH'lerinin doksuribisin gibi kemoterapötik ajanlara karşı dirençli olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmalar, tümörün küçük bir kısmını oluşturan KKH'lerinin kemoterapiye oldukça dirençli olduğunu gösteren önemli klinik çalışmalardır (29).

Kanser hücrelerinde küçük bir grubu temsil eden KKH veya tümörü başlatan hücrelerin sahip olduğu ilaç direnci, metastaz, apoptoz direnci gibi özellikler tümör terapisini önemli ölçüde etkilemektedirler. Tümör ilaç direnci spesifik morfoloji, DNA tamir yeteneği, antiapoptotik proteinlerin aşırı ifadesi, ilaç akış taşıyıcıları ve detoksifikasyon enzimleri gibi birçok içsel özelliklerle ilişkilidir. Spesifik mikro çevre ve hipoksi stabilitesi KKH'lerini anti-kanser tedavilerine karşı korumaktadır. KKH-odaklı terapi etkili anti-kanser stratejisini çekirdeğini oluşturmaktadır. Güncel radyo ve kemoterapiler kanser hücre bulk popülasyonunu öldürmektedir, ama spesifik direnç mekanizmaları tarafından korunan KKH'lerini ortadan kaldırmamaktadır. Hayatta kalan KKH'ler hastalığın nüksetmesine neden olarak, yeni tümör ve metastazların oluşmasına neden olurlar. Tekrarlayan tümörler hızla yayılır ve önceden kullanılan ilaçlara dirençli hale gelerek prognoza yol açarlar. KKH'lerinin spesifik sağkalımı birçok tedavinin başarısız olmasının nedenidir ve bu durum kanser tedavilerinin geliştirilmesi için yeni yöntemlerin gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

2.5. Sialik Asitler

2.5.1. Sialik Asitlerin Moleküler Yapısı

Hücrel tanıma olaylarında rol oynayan en önemli moleküllerin başında, bir uç şeker olan dokuz karbonlu modifiye şeker sialik asit (Sia)'lar gelmektedir (Şekil 2.2). 5. pozisyonundaki karbon atomuna bağlanan gruplara göre 4 tipi ayırt edilir. Sadece hidrojen bağlı olduğunda, nöraminik asit (Neu); N-asetil grubu bağlı ise nöraminik asit 5-N-asetil (Neu5Ac); N-asetil grubu hidroksillenmiş ise nöraminik asit 5-N-glikolil (Neu5Gc) ve son olarak 5. karbondaki sadece bir OH grubu bulunuyorsa 2-keto-3-deoxy-nonulosonik asit (KDN) olarak adlandırılır. Bu dört molekülün 4., 7., 8., ve 9. pozisyonlardaki karbonlarının OH gruplarına O-asetil, O-metil, O-sülfat ve O-fosfat gibi ek grupların eklenmesiyle karmaşık yapıları sialik asitler oluşur (30-35).



Şekil 2.2. Sialik asidin genel formülü ve olası tipleri .

Sialik asitlerin dokuz karbonlu yapısının şekillenmesi, hücrelerin sitozolünde fosfoenolpiruvat ile N-asetil mannozamin-6-P birleşmesiyle başlar. Fosfat grubu uzaklaştırılınca Neu5Ac nukleusa girer. Nukleusta aktif şeker vericisi (CMP-Neu5Ac) haline gelir ve tekrar sitozole ve Golgi zarlarına taşınır. Sialik asitlerin glikokonjugatların oligosakkaritlerine eklenmesi Golgi keseleri içinde olur. Sialik

asit bağlanmasından sorumlu olan enzimler hem farklı sınıflardaki (N-glikan, gangliositler) sialik asitler için ve hem de glikosidik bağ için özeldir. Farklı sialik asitler belli dönemlerde ana moleküle ek grupların eklenmesiyle meydana gelir. Örneğin aktifleşmiş sialik asit vericisinden, CMP-Neu5Ac'den, CMP-Neu5Ac hidroksilaz enzimiyle CMP-Neu5Gc sitozolde şekillenir. CMP-Sia özel taşıyıcı ile Golgi sahasına taşınır. O-asetil esterlerin eklenmesi Golgi zarları lümenlerinde meydana gelir. Sialik asitlerin Golgi lümeninde glikokonjugatlara eklenmesinden sonra O-asetil esterazlar özel pozisyonların O-asetilasyonunda iş görürler (4., 9. pozisyonlar gibi). Glikokonjugatlardan sialik asitlerin uzaklaştırılması ise lizozomlarda olur. Sialidazlarla koparılan sialik asitler sitozole taşınır ve yeniden aktif sialik asit vericisi oluşturmak için kullanılır.

Sialik asitlerin farklı gruplarının eklenmesi ve farklı pozisyonlardaki glikozidik bağ şekillenmesi ile meydana gelen değişiklikleri hem moleküle özeldir, örneğin glikokonjugatların yalnız özel bir grubunda meydana gelir. Hem de dokuya özel ve gelişmeyle ilgili düzenlenir. Oluşmaları ve düzenlenmeleri için özel enzimatik mekanizmalar vardır. Moleküle eklenen gruplar molekülün iriliğini, şeklini, hidrofiliğini, net yükünü değiştirir ve dolayısıyla biyolojik özelliklerine etki eder.

2.5.2. Sialik Asitlerin Bağ Özellikleri

Glikokonjugatların oligosakkarit dizisinin en son ucunda yer alan Sia'lar 2. pozisyonundaki C atomu ile alttaki şekere $\alpha 2,3$, $\alpha 2,6$ ve $\alpha 2,8$ glikosidik bağlarla bağlanır (32,33). Örneğin; alttaki galaktoza onun 3. ve 6. pozisyonlarındaki karbon atomuyla bağlanır. $\alpha 2,3$ ve $\alpha 2,6$ glikosidik bağlar şekillenir. Altteki N-asetilgalaktozamin şekere ise onun 6. pozisyonundaki karbon atomuyla bağlanır ve $\alpha 2,6$ glikozidik bağ şekillenir. Polisialik asitler şeklinde bulundukları zaman alttaki şekere $\alpha 2,3$ olan bir başlangıç glikozidik bağdan sonra birbirlerine $\alpha 2,8$ glikosidik bağla bağlanırlar. Çeşitli gruplarla farklı glikosidik bağların birleşmesiyle glikokonjugatlarda bulunan sialik asitlerde çok sayıda farklılık oluşturulur. Bu yapısal farklılıklar hücre içi ve hücreler arası moleküler ilişkilerde sialik asitlerin antibadiler ve lektinlerle tanınmasını belirler.

α 2,3 bağı; omurgalı glikoprotein ve glikolipitlerindeki galaktoza (Gal) bağlanır. Dokuya özel bulunurlar ve beş farklı α 2,3 sialiltransferazla (ST3Gal-I, ST3Gal-II, ST3Gal-III, ST3Gal-IV ve ST3Gal-V) sentezlenirler. α 2,3 bağı Sia'larla sonlanan glikanlar T-limfositlerin yaşaması için gereklidir. Patojenlerin lektinleri için ve selektinlerin bağlanması için ligant olurlar. Alttaki galaktozu kap şeklinde örterek, asialoglikoprotein reseptörlerin galaktozu taşıyan glikokonjugatı tanınmasını ve dolaşımdan uzaklaştırılmasını engeller (37).

α 2,6 bağı; omurgalıların glikolipidleri ve N-bağı glikoproteinlerinde yaygın şekilde bulunur. α 2,3 bağıyla karşılaştırılınca daha az görülür. α 2,6 sialiltransferazlar hiç değilse dokuya özel altı farklı enzim familyası (ST6Gal-I, ST6GalNAc-I, ST6GalNAc-II, ST6GalNAc-III ve ST6GalNAc-IV) olarak bulunur. Zararlıların tanıdığı ligantlardır. İmmun sistemde sinyal aktarımında rol oynarlar. Alttaki şekeri maskeleyen görevi de vardır (37).

α 2,8 bağı; gelişmeye bağı düzenlenirler. Sinir sisteminde gelişmenin düzenlenmesinde, sinyal aktarımında rol oynar. Beş farklı α 2,8 sialiltransferaz vardır. ST8Sia-I, ST8Sia-III ve ST8Sia-V glikolipit ve N-bağı oligosakkaritlere tek veya oligo-Sia bağlarının sentezinden sorumludurlar. Golgi apereyiyle ilişkili ST8Sia-II ve ST8Sia-IV enzimleri α 2,8 bağı düz polimerleri sentezlerler. Başlangıçlarında Sia'lar α 2,3, α 2,6 veya α 2,8 bağlarla bağlanırlar. Polimer içinde KDN, Neu5Ac, Neu5Gc tip Sia'lar yer alır (38,34,39). Uç Sia dizileri ile bağları lektinlerin monosakkaritlerle birlikte glikosidik bağı da tanıyarak tutunmasından faydalanarak belirlenir.

2.5.3. Sialik Asitlerin Görevleri

Şekerlerin sorumlu tutulduğu görevler az sayıdaki glukoz, galaktoz, mannoz, fukoz, N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin, glukoronik asit, idoronik asit, ksiloz ve sialik asit gibi şekerlerle gerçekleştirilir (4, 10). Oligosakkaritlerdeki özel pozisyonları nedeniyle monomerik birimlerin en önemlilerinden biri dokuz karbonlu sialik asit, nöraminikasit (Neu5Ac)'dir. Sialik asitler genellikle omurgalıların ve omurgasızların tüm oligosakkarit dizilerinde bulunurlar (41-42,37,33-44). Biyolojik görevlerini; hidrofilik özelliğiyle, elektronegatiflik özelliğiyle, oldukça büyük fiziksel iriliğiyle, moleküler yapılarıyla ve oligosakkarit

zincirinin son ucundaki pozisyonuyla gerçekleştirirler. Kısaca konformasyona, dayanıklılığa, yük ve viskoziteye etki ederler (özellikle çözünen proteinlerde). Molekülleri ve hücreleri parçalanmaya karşı ataklardan korurlar. Hücre tutunması, yığılması ve aglütinasyonunu idare ederler. Diğer hücre tipleri üzerinde reseptörler için ligantları oluştururlar (45,35,46-48).

Sialik asitler glikokonjugatların glikolipitler ve glikoproteinlerin kısa (32-33 birimlik) veya uzun (20'ye yakın birimlik) dizilerinin en son ucunda başlık gibi yer alarak, alttaki şekerlerin ilişkilerinin engellenmesine (maske rolü) veya kurulmasına (uzaklaştırıldığı zaman) neden olurlar (49,32). Örneğin glikokonjugatların uç sialik asitleri virüs, bakteri ve protozoa enfeksiyonları için tanıma yerleridir. *Trypanosoma cruzi* paraziti ev sahibi Sia'yı koparıp kendisine bağlayarak ev sahibi antikorlardan korunur. Uç sialik asitlerin uzaklaştırılması ile açıkta kalan alttaki şeker karaciğer reseptörleri tarafından tanınarak, hem sialik asidi uzaklaştırılmış glikoproteinler ve hem de böyle glikokonjugatları taşıyan hücreler dolaşımdan uzaklaştırılır. Sialik asitlerin tanıma olayları 9-O-asetilasyonla da engellenir (46,50-51). Sinir sisteminde bulunan polisialik asitlerde O-asetilasyon gelişme safhasına ve bölgeye özel olarak değişmektedir. Ayrıca kışlayan-kışlamayan, soğuk-sıcak kanlı türlerde beyin gangliositlerin O-asetilasyonunda farklar bulunmuştur. Bunlara ek olarak çeşitli kanserlerde T-hücrelerinde artmış O-asetilasyon bulunması sialik asitlerin O-asetillasyonu ile kanser arasında ilişki kurulmasına neden olmuştur. Kansere değişen hücrelerde çarpıcı sialik asit değişiklikleri meydana gelir (52,37). Örneğin; sialik asit miktarının arttığı, farklı bağların ortaya çıktığı (α 2,6 bağlar belirginleşir), sialik asit tiplerinin değiştiği ve O-asetilasyonun bazı kanserlerde gözden kaybolurken (kolon karsinoma) bazılarında görünür (melaomalarda) hale geldiği bildirilmektedir. Kısaca; doğal embriyonik gelişme, farklılaşma, yaşlanma ile patolojik farklılaşmalarda Sia içeriğinde kalitatif ve kantitatif farklılaşmalar görülür.

Uçlarında Sia taşıyan oligosakkarit dizileri, moleküller ve hücreler arasında gerçekleşen çok çeşitli tanıma olaylarında reseptör olarak rol oynarlar. Bu tanıma olayları hücresel farklılaşmada (53-54), tutunmada (55-56,46,57), virüs bağlanmasında (58) ve bakteri bağlanmasında (59-60) iş görmektedir. Diğer taraftan Sia'lar, hemen altında yer alan reseptörleri kapatarak onları hem parçalanma-bozulma olaylarından korurlar ve hem de reseptörün iş görmesini

engelleyen maske rolü oynarlar (45,49,35,61-64). Bundan başka pozitif yüklü iyon ve bileşiklerin bağlanması ve taşınmasında iş görürler (61,49,65-38).

Sialik asitleri belirlemede farklı amaçlar için farklı yöntemler tercih edilir. Şekerler dokularda iz miktarda bulunmaktadır. Kimyasal yöntemlerle belirlemelerde izole edilmeleri, saflaştırılmaları aşamalarında kayıplar olmaktadır. Bir kalıba göre sentezlenmediklerinden miktarı artırmak için polimeraz zincir reaksiyonuna benzer bir yöntem de yoktur (69-71). Araştırılan bir şeker molekülünün çalışılan hücrelerin hangi kısımlarında (hücre yüzeyi, sitoplazma, organeller veya nukleus gibi) ve hangi yoğunlukta yerleştiğini anlamak için mikroskobik yöntemler kullanılır. Hücre yüzeylerinde yer alan glikokonjugatların belirlenmesi için elektron mikroskobunda katyonik boyalar (Ruthenium red, Alcian blue ve diğerleri) enzimatik sindirim uygulamalarıyla birlikte kullanılmaktadır (72). Oligosakkaritlerin uç şeker birimleri de lektinlerle belirlenmektedir (73-75).

2.6. KDN (Deaminoneuraminic acid, 2-keto-3-deoxy-D-glycero- D-galactononic acid)

KDN ortak bir Sia (N-asetilnöraminik asit -Neu5Ac) içinde yer alan C5 pozisyonunda asetoamid grubu yerine hidroksil grubu içeren bir sialik asit türüdür. Varlığı ilk olarak 1986 yılında ortaya konmuştur (76). Bu döneme kadar N-asetilnöraminik asit türevi olduğu düşünülmüş ancak N-açıl grubu eksikliği sebebi ile sialik asit ailesine ait olup olmadığı da uzun süre tartışılmıştır. Bu molekül bilimsel araştırmaların genişlemesi ile sialik asit ailesinin bir üyesi olarak literatüre geçmiş ve deaminonöraminik asit olarak adlandırılmıştır (77). İlk olarak “gökkuşağı alabalığı” yumurtasından elde edilmiştir ve glikobiyoloji uzmanları tarafından KDN olarak adlandırılmıştır. Yapılan araştırmalar KDN’nin az sayıda hücrede, düşük sınıf vertebralılarda mukus sekresyonunda ve bazı bakteri tiplerinde yoğun olarak bulunduğunu göstermiştir (76). KDN’ce zengin kaynaklardan elde edilen KDN içeren glikanlarla yapılan çalışmalar KDN nin glikolipid, glikoprotein ve bakteriyal polisakkaritleri de içeren tüm sialo-glikokonjugatların yapısında bulunduğunu göstermiştir (84, 85). Monoklonal antikorları da içeren biyolojik bağlantıların KDN yapısını spesifik olarak tanıdığı ve KDNase’ın tam olarak bu bağlantı bölgesinde kırılmaya neden olduğu yüksek duyarlılığa sahip kimyasal

yöntemlerle kanıtlanmıştır ve KDN nin insan dokularını da içeren tüm memelilerde bulunduğunu ortaya koymuştur (78). Son yıllarda KDN'nin ve KDN içeren glikanların biyosentezinin ve metabolizmasının aydınlatılması ile ilgili yapılan moleküler biyolojik çalışmalarda, KDN nin çok basit prekürsörlerden *de novo* olarak da sentezlendiğini gösterilmiştir (85). Bu çalışmalar ayrıca bazı enzimlerin KDN'ye ve KDN bağlı glikanlara spesifik olduğunu, diğerlerinin Neu5Ac ile ortak olduğunu işaret etmektedir. KDN daha önce de bahsettiğimiz gibi ortak bir Neu5Ac (N-asetilnöraminik asit) içinde yer alan C5 pozisyonunda aseto-amid grubu yerine hidroksil grubu eklenmesi ile oluşur (76). Biyosentezi ve fonksiyonu açısından sialik asit ailesinin önemli bir üyesidir. Sialik asit'in ana yapısını oluşturan Neu5Ac ile KDN'nin ortak olarak gösterdiği özellik KDN'nin insan dahil pek çok canlı türünde bulunmasıdır (77). KDN glikoproteinler, glikolipitler, kapsüler polisakkaritler de dahil olmak üzere neredeyse tüm tip glikokonjugatlarda bulunur (78). KDN molekülünden ayrılan molekül grupları Neu5Gc gibi neredeyse tüm glikan yapıları ile bağlantılıdır (79). KDN'nin mannoz kullanılarak *de novo* sentezi Neu5Ac de olduğu gibi mümkündür. Bu sentez esnasında N-asetilmannozamin prekürsör şeker olarak kullanılır.

Bununla beraber KDN ve Neu5Ac'nin birbirlerinden ayrıldıkları en önemli özellik KDN'nin insan da dahil olmak üzere memelilerdeki oranının klasik metodlarla saptanamayacak kadar az olmasıdır (80). KDN memeli hücrelerinde çok az oranda da olsa her zaman bulunmaktadır. Memeli doku ve hücrelerinde KDN'nin büyük bir bölümü serbest şeker olarak oluşurken çok az bir kısmı da glikolipit veya glikoproteinlerle konjuge haldedir (76).

KDN nin türe spesifik ifadesi glikokonjugatlarda aşağı sınıf vertebralılar ve salgılarında, patojenik bakterilerin polisakkarit hücre duvarında bulunur. Bu ifadenin biyolojik veya gelişimsel açıdan önemli olduğu düşünülmekte ve açıklanmaya çalışılmaktadır (82). Serbest KDN insanda umbilikal kortdan elde edilen fetal kan hücrelerinde ve bazı malign tümörlerde yüksek olarak bulunmuştur. Bu seviye yüksekliğinin sebebinin KDN yolağındaki bir metabolik eksikliğe ya da bir hastalığa sekonder gelişebileceği düşünülmekle beraber, malign hastalıklardaki artışın nedeni (bu tez konusunda olduğu gibi) ilerleyen çalışmalarla belirlenebilecektir. Bununla beraber insan teratokarsinoma PA-1 hücreleri ile yapılan bir çalışmada sadece serbest KDN oranının değil aynı zamanda

glikoproteine bağı KDN'nin de çözünmüş halde ve membrana bağı olarak bulunduğı gösterilmiştir (80).

Hayvan hücrelerinde Neu5Ac'nin çoğunlukla konjuge halde bulunması, serbest KDN'nin nasıl oluştuğı ve serbest KDN'nin interselüler regülasyonunu neyin sağladığı sorusunu akla getirmiştir. Daha önce de bahsedildiğı gibi sialik asitlerin 50'den fazla moleküler formu mevcuttur ve tüm bu Sia'lar Neu5Ac'den türevlenmektedirler. Aynı şekilde serbest KDN'nin de Neu5Ac'nin doğrudan deasetilasyonu ve deaminasyonu yoluyla oluştuğı düşünülmektedir.

Kısaca KDN sentezinde iki yolak mümkündür (90) ;

1. Doğrudan deaminasyon ve deasilasyon ile Neu5Acly'den oluşmaktadır. Bununla birlikte, doku homojenat çalışmalarında bugüne kadar Neu5Ac'nin KDN'ye doğrudan dönüşüne ilişkin bir bilgi bulunmamaktadır (86,87).
2. Neu5Ac sentezi için gerekli olan enzimler dışındaki bir takım enzimlerle *de novo* sentezi ile oluşmaktadır. Bu sentez türü diğer ulasonik asitlerin sentezi ile benzer şekilde olmaktadır. Örneğin 3-deoxy-D-manno- octulosonic acid (KDO) ve Neu5Ac, fosfoenolpiruvat (PEP) ve ilgili şekerler, fosfat yoğunlaşması içeren bir takım benzer reaksiyonlar ile (3-deoksi-D-manooctulosonikasit 8-fosfat için arabinoz 5-fosfat veya Neu5Ac 9-fosfat için N-asetilmannozamin 6-fosfat) sentezlenir. Bu duruma göre, KDN *de novo* biyosentezinin, PEP ve mannoz 6-fosfat (Man-6-P)'ın yoğunlaşarak KDN 9-fosfat (KDN-9-P) oluşturması ile meydana geldiğı ileri sürdürölmektedir (86-88).

KDN'nin alternatif olarak mannoz (Man) varlığında *de novo* sentezi diğer ulasonik asitlerden elde edilen Manno-6-fosfat ve fosfoenolpiruvatın (PEP) kondenzasyonu yolu ile:

Reaksiyon 1: $\text{Man} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Man-6-P} + \text{ADP}$ (fosforilasyon)

Reaksiyon 2: $\text{Man-6-P} + \text{PEP} \rightleftharpoons \text{KDN-9-P} + \text{Pi}$

Reaksiyon 3: $\text{KDN-9-P} \rightleftharpoons \text{KDN} + \text{Pi}$ (defosforilasyon) şeklindedir.

Reaksiyon 2'yi katalizleyen enzim KDN-9-fosfat sentetaz (KPS)' dir, $\text{ManNAc-6-P} + \text{PEP} \rightarrow \text{Neu5Ac-9-P} + \text{Pi}$ reaksiyonunu katalizleyen

Neu5Ac-9-P sentetaz (NPS)' dan saflaştırılmıştır. Gökküşağı alabalıklarının testisinde her iki enzimin varlığı da gösterilmiştir (56). Enzim aktivitesi hem mannozun fosforilasyonu (reaksiyon 1) hem de KDN-9-fosfatın defosforilasyonu

(reaksiyon 3) gereklidir. Testiste KDN-9-P sentaz, Neu5Ac-9-P sentaz ile birlikte bulunmaktadır. Ancak her ikisinin aktivite oranı saflaştırılması sırasında önemli ölçüde değişmektedir. Bu durum, KDN-9-P ve Neu5Ac-9-P sentezinin iki farklı sentaz aktivitesi tarafından yapıldığı fikrini ortaya çıkarmaktadır (56-57). KDN sentaz aktivitesi alabalık karaciğerinde de belirlenmiştir. Bununla beraber, KDN-9-P spesifik aktivite oranı Neu5Ac-9-P sentaza göre karaciğer dokusunda testis dokusuna göre belirgin olarak daha düşüktür. Testis ve karaciğerde iki sentaz aktivitesinin ekspresyon seviyesindeki bu farklılık, değişik özelliklere sahip çoklu enzim proteinin varlığını göstermektedir. Ancak KDN-9-P sentaz ve Neu5Ac-9-P sentaz enzim aktivitelerinin ayrı enzim proteinleri üzerinde olduğu bilgisi literatürde hala açık değildir. KDN-9-P sentaz aktivitesi inhibisyonu KDN ile (1 mM'a kadar), Neu5Ac ile (1 mM'a kadar), CMP-KDN ile (0.5 mM'kadar), veya CMPNeu5Ac ile (0.5 mM'kadar) gözlenmemiştir (89).

Memeli NPS enziminin klonlanması ilk olarak farelerde gerçekleşmiştir (88). Aynı yıl insan sialik asit sentez (SAS) geni de bildirilmiştir. Bu genin orijinal olarak sialik asit sentezi yapamayan insekt hücrelerinde ifade edilebildiğinin keşfedilmesinden itibaren hem KDN hem de Neu5Ac'nin *in vivo* üretimi gözlenmiştir. *In vitro* denemelerde enzim hem ManNAc-6-P'i hem de Man-6-P'i substrat olarak kullanmaktadır. Bu nedenle SAS Sia-9-fosfat sentetaz olarak dizayn edilmiştir ve kısaltması SPS olarak adlandırılmıştır. 2. reaksiyonu katalizleyen enzim KDN-9-P sentaz (KPS)'dir ve Neu5Ac'den saflaştırılmıştır (78,89).

Memelilerde mannoz glikoz üzerinden türetilir ve fruktoz-6-fosfat'ın mannoz-6-fosfat'a dönüşümünde anahtar rolü PMI (fosfo-mannoz izomeraz) enzimi oynar. Memelilerde mannozun kandaki seviyesi 50-100 µM civarındadır ve KDN sentezinin serum mannoz konsantrasyonu üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir (90). Man-6-P, ökaryotik hücrelerde en az iki muhtemel biyosentetik yol ile sentezlenebilir. İlk olarak Man-6-P fosfoizomeraz ile fruktoz 6-fosfat'tan sitozol içinde oluşturulur. Alternatif olarak, mannoz hücre içine taşınması sonrasında 6-fosfokinaz ile fosforile edilebilir. Mannoz yüksek hayvanların kanında normal bir bileşen olarak bulunmaktadır (90).

Serbest KDN oranında yükselme olmasına rağmen glikanlara bağlı KDN oranının neden düşük kaldığını anlayabilmek için hem gökküşağı alabalıklarında hem de farelerde bir dizi deneyler yapılmıştır. Neu5Ac'nin aktivasyonunda CMP-Sia sentaz (CSS) tarafından aktive edilen CMP-Neu5Ac rol oynamaktadır. Aynı

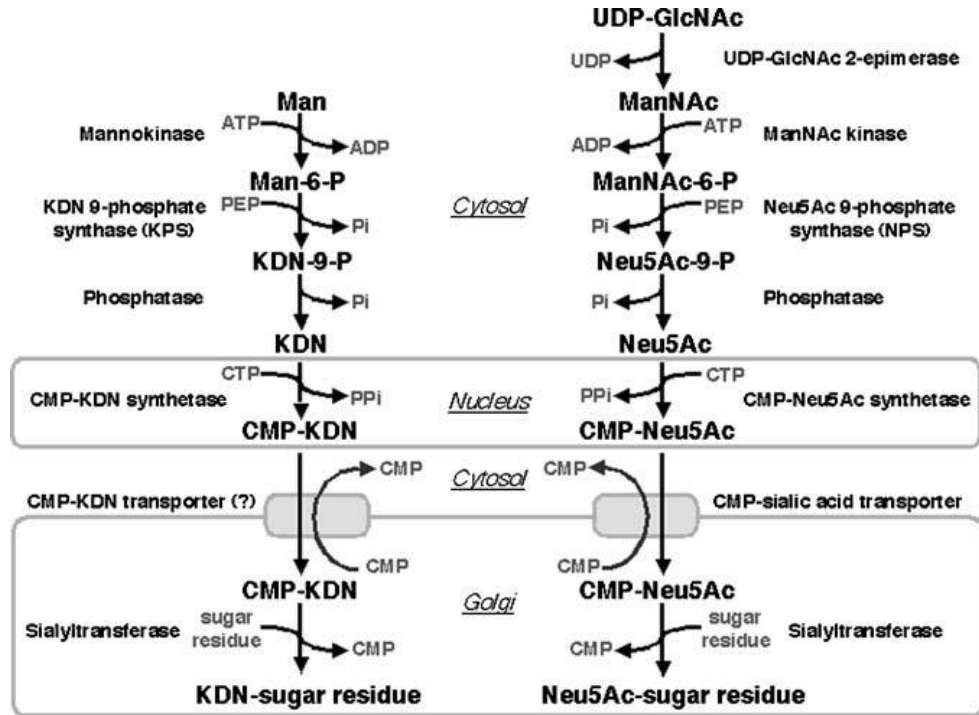
reaksiyonun varlığı KDN'nin hücre yüzey gangliositlerinin majör sialik asit komponenti olduğu gökkuşağı alabalığı testislerinde de incelenmiştir (57) ve CSS enziminin hem KDN hem de Neu5Ac'yi aktive ettiği, KDN aktivasyonunun Neu5Ac'ye göre 2 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Buna rağmen KDN ekspresyonunun gerçekleşmesinin organ spesifik olarak gerçekleştiği ve bu nedenle az miktarda glikan bağlı KDN ortaya çıktığı düşünülmüştür (88).

KDN serbest ve bağlı formlarının hücresel düzeylerinde artış, fare melanoma B16 ve Afrika yeşil maymunu böbrek COS-7 hücrelerinde mannozdan zengin ortamda kültürlendiğinde ortaya çıkmaktadır. Serbest KDN yükseltilmiş ifadesi serbest Man hücre içi konsantrasyonu ile orantılıdır. KDN-9-P sentaz aktivitesi her iki hücre hattında da tespit edilmiştir. Bu çalışmada ilginç bir şekilde, her bir hücre hattının, dış mannoz için farklı bir tepki gösterdiği belirlenmiştir (78,79) İnsan teratokarsinom PA-1 hücreleri, serbest ve bağlı KDN sentezinde harici olarak ilave edilmiş mannoz için yanıt vermiştir. Yüksek doz mannoz uygulaması yanıtına serbest KDN ifade artışı, çeşitli kültüre edilmiş memeli hücrelerde ve fare organlarında izlenmiştir ancak mekanizmanın tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bununla ilişkili olarak, fare testisinde Fru-6-P ve Man-6-P'ı dönüştüren bir enzim olan Fosfoaminoz izomeraz'ın (PMI), dönem-spesifik ifadesinde KDN düzeyinin artmasına neden olduğu muhtemeldir. Bu enzimin ifadesi ve proteine bağlı KDN miktarının, testiste akciğerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir (76,78, 89).

Yakın zamanda yapılmış olan bir çalışmada Neu5Ac sentaz (neuB)'ın *Escherichia coli*'ye fare homologu cDNA'si klonlanmıştır. 50-kDa protein olarak HeLa hücrelerinde ifade olmuş recombinant fare homologu, Neu5Ac-9-P sentaz faaliyetine sahip olurken Neu5Ac sentaz aktivitesine sahip değildir. Bu enzimin sitozolde lokalize olduğu ve çeşitli fare dokularında dağılmış olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Özellikle Neu5Ac- 9-P sentaz'ın *in vitro* olarak KDN ve KDN-9-P sentezini katalize edememesi, bu enzimin KDN-9-P sentezinde bir rolü olmayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, *in vivo* KDN sentezinde Neu5Ac-9-P sentaz ilişkisi en son RNA interferans deneylerinin sonuçlarına göre gösterilmiştir. (90)

2000 yılında, insan sialik asit fosfat sentaz geni (SAS) *E. coli* sialik asit sentaz geninin (*neuB*) homologisine dayanarak klonlanmıştır. İnsana ait bu gen, insan dokularında ifade edilmiş ve 40-kDa 'luk bir protein olarak kodlanmıştır. Sf-9

böcek hücrelerinin Neu5Ac düzeyi serumsuz ortamda son derece düşük bulunmuştur (80,81,90). Recombinant baculovirus (AcSAS) ile transfekte olmuş Sf-9 hücreleri ve hücre lizatlarında KDN bulunmuştur ancak Neu5Ac'nin düşük düzeyinde herhangi bir artış izlenmemiştir. Besi yerine büyüme faktörleri ile 10 mM ManNAc eklenerek yeni bir deney grubu oluşturulmuş ve veriler ManNAc yokluğunda transfekte olmayan hücrelerin büyümesi ile karşılaştırılmıştır. Araştırma sonucunda Neu5Ac düzeyinde 900 kat artışa ulaşılmıştır (82). Başka bir deyişle AcSAS transfekte Sf-9 hücreleri KDN düzeyinde bir miktar yükselmeye neden olmuştur ancak ortama Man veya ManNAc ilave edildiğinde KDN oranındaki artışın daha yüksek olduğu izlenmiştir. Bununla beraber AcSAS transfeksiyonu ve ManNAc eklenmesi Neu5Ac seviyeleri elde etmek için gereklidir. *In vitro*'da, insan enzimi Neu5Ac-9-P ve KDN-9-P oluşturmak için ManNAc-6-P ve Man-6-P kullanılmış, ancak Neu5Ac-9-P ürüne doğru çok daha yüksek bir aktivite göstermiştir (81,82,90).



Şekil 2.3. KDN'nin metabolik haritası

2.7. KDN İçeren Glikanların Özellikleri

Canlı organizmaların glikokonjugatlarda KDN tercihli ifadesinin potansiyel biyolojik önemini anlamak için, KDN içeren glikanların diğer moleküller ile etkileşiminin araştırması kritik öneme sahiptir. Bu konjugasyon esnasında oligo/poliKDN'nin kalsiyum iyonuna bağlama özelliğinin önem kazandığı bilinmektedir. O-bağlı glikanlar üzerine $\alpha 2 \rightarrow 8$ -bağlı oligo/poliKDN içeren glikoprotein (KDN-gp), kalsiyum iyonuna $2.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ K_a ile bağlanma göstermiştir, ki bu PSGP (O-bağlı bir glikan üzerine $\alpha 2 \rightarrow 8$ -bağlı oligo/poliNeu5Gc içeren glikoprotein) ile aynı değerdedir (85,86). Gökkuşığı alabalığı sperminin yumurtaya bağlanması, KDNGM3 ve Gg3-like epitoplarının güçlü karbonhidrat-karbonhidrat etkileşimi aracılığı ile Gg3Cer-kaplı plastik plaklara bağlanan KDNGM3-içeren lipozomlarla ilişkili deney modeli kullanarak gösterilmiştir (76,88,82). KDNGM3 ve Gg3Cer arasında bağlanma Neu5AcGM3 ve Gg3Cer arasındaki bağlanmadan daha güçlüdür. Bununla beraber taze alabalık sperminde fizyolojik koşullar altında da Gg3Cer-kaplı plağa bağlanma belirlenmiştir (86).

Glikokonjugatlarda sialik asit kalıntılarının ifadenmesi normal büyüme ve gelişme için önemlidir. Normal gelişme esnasında ve farklı hücre türlerinde, farklı evrelerde sialik asit seviyelerinde değişiklik son derece önemli ve dinamik bir süreçtir. Sialo-glikokonjugatların çoğu evreye özgü olup kanser hücrelerinde onkofetal ve onkodevelopmental antijenler olarak yeniden eksprese edilebilirler. Bunlardan, neural hücre adezyon molekülleri üzerinde eksprese olan $\alpha 2,8$ -bağlı polyNeu5Ac epitopu en geniş kapsamda araştırılan yapıdır. Normal insan hücrelerinde ifadele olmayan *N*-Glycolylneuraminic asit (Neu5Gc)'in kolon kanseri dokusunun gangliozidlerinde ve insan tümör musininde ifadesi bildirilmiştir (85,86).

Olağan dışı sialil yapıları aynı zamanda bazı tümör hücre hatlarında da bulunmaktadır. Örneğin Neu5Ac'in $\alpha 2,9$ -bağlı dimeri, PA-1 insan yumurtalık hücre teratokarsinomunda, $\alpha 2,8$ -bağlı polyNeu5Ac insan MCF7 meme kanserinde ve RBL rat bazofilik lösemi hücrelerinde, $\alpha 2,9$ -bağlı polyNeu5Ac murin nöroblastoması (klon NB41A3) hücrelerinde belirlenmiştir. Fakat bu gliko-epitopların fonksiyonel önemi halen açıklığa kavuşmamıştır (76,82,90). KDN sialik asit ailesinin alışılmadık bir türü olarak sadece normal gelişimde değil bazı

metabolik bozukluklar ve malign transformasyonlarda da oluşan bir aday şekerdir. KDN'nin, fetus umbilikal kord kırmızı kan hücrelerinde anneye ait kırmızı kan hücreleri ile karşılaştırıldığında artmış olduğu belirlenmiştir. Normal yumurtalık dokusu ile karşılaştırıldığında yumurtalık tümörlerinde serbest KDN yüksek ekspresyon göstermektedir (76-78).

İnsan hücrelerinde KDN'nin anormal ekspresyonunun mekanizması kısmen aydınlatılmıştır ve bu mannozun yüksek hücre içi düzeyi ile ilgili gibi görünmektedir. Neu5Ac biyosentetik yolağı KDN ile karşılaştırıldığında, KDN'nin anahtar prekürsörlerinden biri olan Man-6-P, Neu5Ac için ManNAc-6-P ile değiştirilir. Hayvan hücrelerinde ManNAc-6-P'nin oluşumu için bilinen bu yol "UDP-GlcNAc 2-epimeraz/ManNAc kinaz" ile katalize edilmektedir. Bu enzim CMP-Neu5Ac düzeyinde bir artış olması durumunda (-) geri bildirim mekanizması ile engellenir. Bununla birlikte, eğer ManNAc, UDP-GlcNAc 2-epimerase içermeyen maddeler tarafından sağlanmazsa, geri bildirim engellenmeye çalışılmaz ve sonucunda Neu5Ac aşırı eksprese olur (83,84). UDP-Glc'tan Man-6-P'a analog bir yol bildirilmemiştir. Tümör hücrelerinde KDN ekspresyonunu araştırmak, bazı kanserlerde Neu5Ac'nin artmış ekspresyonunun çalışması ile ilişkilidir. Normal ve tümörlü hücrelerde ve dokularda bol miktarda oluşan Neu5Ac'nin aksine, KDN'nin insan olgun normal dokularında oluşumu nadir ve neredeyse imkansızdır (80).

Bu nedenle, bazı insan tümörlerinin varlığı için KDN'nin hassas ve güvenilir bir gösterge olarak görev yapması mümkündür. İnsan kanser türlerinde görünen spesifik KDN-içeren glikoprotein(ler)'in araştırılması bazı hücre türlerinde tümör oluşum mekanizmasını çözmek için bir anahtar olabilir.

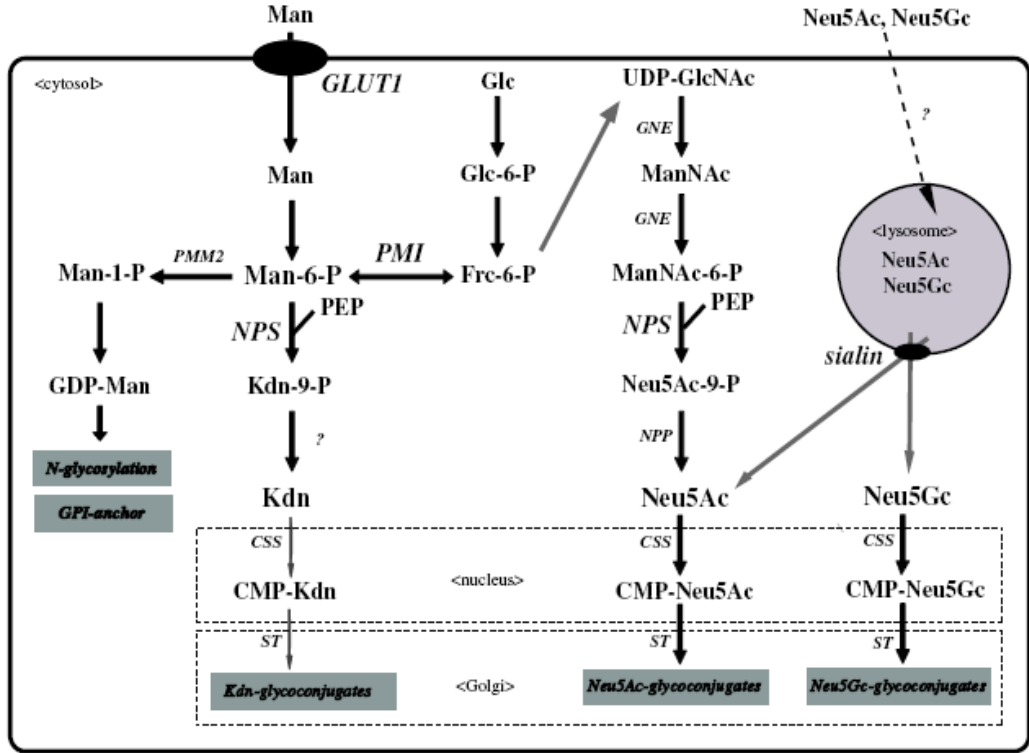
KDN en fazla miktarda over salgıları ve alt omurgalıların cilt mukozasında oluşur. KDN patojenik bakterilerin kapsül şeklindeki polisakkaridlerinde de bulunmaktadır. Ancak dikkat edilmelidir ki, KDN hücre dışında oluşan glikokonjugatlarda bulunmaktadır (82,85). KDN biyosentetik yolağı Neu5Ac ile karşılaştırıldığında, monosakkarid Man'un prekürsör olarak sağlanması (KDN için) ManNAc (Neu5Ac için)'den daha kolay gibi görünmektedir. Yukarıda anlatıldığı gibi, bir geri bildirim mekanizması KDN sentezine giden biyosentetik yolağı etkileyebilmektedir. Bu KDN sentezini düzenlemek için bilinen bir metabolik mekanizmanın olmadığı anlamına gelmektedir (82,83).

Ekstraselüler olarak biriken KDN-glikoproteinlerinin biyosentezi, yumurtalık ve cilt salgılarının mukusu gibi, ön-maddesi şekerce zengin kaynağı tercih edilebilir

ve Man yerine ManNAc kullanan KDN-glikoproteinlerinin biyosentezi evrimle baskın yol haline gelmiş olabilir. Diğer taraftan, Neu5Ac-glikoproteinleri hücre-hücre iletişimde önemli rol oynamaktadır ve biyosentezlerinde aşırı ekspresyonu önlemek Neu5Ac'nin hücreler ve dokular tarafından tercih edilen bir sialik asit bileşeni olmasını sağlayabilir (84-86).

Minör bir sialik asit olan KDN'nin insan örneklerinde saptanmasında en dikkat çekici özellik insan tümörlerinde bir “oncodevelopmental” antijen olarak yüksek oranda bulunmasıdır. Memelilerde KDN ilk olarak domuz *gl. submaksillaris* dokusundan izole edilmiştir (80). İzolasyon için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz-sıvı kromatografisi, kütle spektrometresi ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi kullanılmıştır (87). Yapılan çalışmalar insan dokusunda az miktarda KDN bulunduğunu (0.1–1% of Neu5Ac) göstermiştir. Daha büyük miktarda KDN'nin insan eritrositlerinde bulunduğu ve bu miktarın fetal eritrositlerde erişkin eritrositlerine göre 2.4 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Normal over dokusu ile kıyaslandığında over kanserlerinde serbest KDN düzeyi, serbest Neu5Ac ye göre daha yüksektir. Bununla beraber oranın kanserin progresyonu ile birlikte arttığı düşünülmektedir (88,89). KDN biyosentezinde mannozun önemli bir yeri bulunmaktadır ve B16 fare melanoma ve COS-7 Afrika yeşil maymunu böbrek fibroblast hücreleri mannozca zengin hücre ortamlarında çoğaltılarak ekstraselüler mannoz konsantrasyonları arttırıldığında intraselüler KDN oranlarının arttığı belirlenmiştir. Bu hücrelerde glikokonjugatlara bağlı KDN ve serbest KDN oranlarının da arttığı izlenmiştir (90). Lokal ilerlemiş tümörlerde hipoksinin kanser hücrelerinin malign transformasyonu üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Hücreler düşük oksijen konsantrasyonlarına adapte olabilmek için pek çok gende transkripsiyonel değişiklikler yaparlar ve bu yolla tümör dokusundaki anjiogenezisi arttırırlar (88). Hipoksik tümör dokusunda glikolitik enzimlerin ve glikoz transporterlarının artması ile Warburg etkisi adı verilen anaerobik glikolizisin arttığı bir süreç başlar. Hipoksiye dirençli kanser hücreleri radyoterapi ve kemoterapiye de daha az duyarlıdırlar (91,92). NPS (N-asetilnöraminik asit 9-fosfat sentetaz) memeli hücrelerinde Neu5Ac'nin *de novo* sentezi için anahtar bir enzimdir ve $\text{ManNAc-6-P} + \text{PEP} \rightarrow \text{Neu5Ac-9-P} + \text{Pi}$ reaksiyonunu katalizler. İnsan NPS'ı bir substrat olarak ManNAc-6-P yerine Man-6-P kullanarak düşük verimlilik ile KDN sentezleyebilme yeteneğindedir. NPS aktivitesi memeli hücrelerinde KDN ve Neu5Ac'nin sentezi ile direkt olarak

ilişkilidir. NPS sırasıyla Man-6-P ve ManNAc-6-p ile PEP'in kondenzasyonu ile Kdn ve Neu5Ac sentezini katalizlemektedir. PMI (phosphomannoisomerase) fruktoz-6-fosfatın Man-6-P'ye dönüşümünü katalizlemektedir. İntraselüler Glc düzeyi GLUT1 artan ekspresyonuna bağlı olarak artış göstermektedir. Yüksek Glc düzeyi Glc'nin downstream metaboliti olan Frc-6-P ile PMI ekspresyonuna bağlı olarak Man-6-P'nin artışıını indüklemektedir.



Şekil 2.4. Memeli Hücrelerinde KDN'nin Oluşum Mekanizmaları

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. KDN Poliklonal Antikor Yanıtı Geliştirilmesi

Poliklonal antikor geliştirmek amacı ile aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir ;

1. Tavşanın antijen (KDN) ile bağışıklanması,
2. Tavşanın antikor yanıtının kontrol edilmesi, Dolaylı ELISA Testi

Ticari olarak temin edilen KDN molekülü (Sigma Ketodexynonulosonic acid, 60714, standart) poliklonal antikor geliştirilmesi amacı ile tavşan immünizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

KDN;

Synonyms	: 3-Deoxy-D-glycero-D-galactonulopyranosonic acid
Formula	: $C_9H_{16}O_9$
Molecular Weight	: 268,22 g/mol

3 aylık 1 adet tavşana deri altı (sc) ve intraperitoneal (IP) olarak 2 hafta aralıklarla KDN antijeni immünize edilmiştir. İlk enjeksiyonda 200 µg KDN molekülü (Ketodexynonulosonic acid), 500 µl PBS içinde hazırlanmış ve eşit hacimde Freund's complete adjuvant (500 µl) ile karıştırılarak hem deri altı hem intraperitoneal yolla uygulanmıştır. Sonraki 3 enjeksiyonda ise antijen aynı miktarlarda Freund's incomplete adjuvant kullanılarak hazırlanmış ve benzer şekilde tavşana uygulanmıştır. Daha etkin bir antikor yanıtı geliştirmek amacıyla, immünizasyonlar aynı anda tavşanların birkaç bölgesine birden yapılmıştır.

Tavşana yapılan bağışıklama tarihleri ve koşulları Tablo 1'de verilmektedir. Tabloda ayrıca bağışıklamalar sonrası, tavşanın antikor düzeyini belirlemek üzere gerçekleştirilen indirekt ELISA çalışmalarının tarihleri yer almaktadır.

Tavşana uygulanan son enjeksiyonlardan 10 gün sonra kan serumu örnekleri alınarak serumlarındaki antikor düzeyi indirekt ELISA yöntemi ile belirlenmiştir.

İmmünizasyonlar KDN molekülü	İmmünizasyon Tarihleri	Uygulanan Doz
1. İmmünizasyon (FCA)	23 / 01 / 2013	200 µg Ag / tavşan
2. İmmünizasyon (FIA)	06 / 02/ 2013	200 µg Ag / tavşan
3. İmmünizasyon (FIA)	20 / 02/ 2013	200 µg Ag / tavşan
Tavşan 1. ELISA çalışması (1.03.2013)		
4. İmmünizasyon (FIA)	17/ 03/ 2013	500 µg Ag / tavşan
5. İmmünizasyon (FIA)	08 / 04/ 2013	500 µg Ag / tavşan
Tavşan 2. ELISA çalışması ELISA (18.04.2013)		

Tablo 3.1: KDN molekülü ile tavşana yapılan immünizasyon içerikleri ve tarihleri

KDN antijenlerine karşı antikor geliştirme amacıyla tavşanlara yapılan 3 immünizasyon sonrası tavşanın kulağından kan alınmış ve antikor aktivitesini test etmek amacı ile santrifügasyon işlemi uygulanarak serum ayırıştırılmış ve KDN antijenine karşı oluşan poliklonal antikor yanıtına dolaylı ELISA testi ile bakılmıştır.

İmmünizasyonlar sonrası KDN antijenine karşı, tavşan serumundaki antikor düzeyini belirlemek için enzime bağlı immünolojik deneyler (ELISA) kullanılmıştır. Antikor saptanması amacıyla yapılan dolaylı ELISA deneylerinde; ELISA plaklarındaki kuyucuklar ilgili antijen (KDN) ile kaplanarak antikora

duyarlı hale getirilmiştir. Antikor düzeyi saptanacak olan örnek (tavşan serumu) kuyucuklara ilave edilmiştir. Böylece antikor, tabana bağlı antijen ile reaksiyona girmiştir. Kuyucuklar yıkandıktan sonra ortamda sadece antijen antikor kompleksleri kalmıştır. Bir sonraki aşamada kuyucuklara konan enzimle işaretli anti-immünglobulin antikorları ortamdaki antikor moleküllerine bağlanmıştır. Kuyucukların tekrar yıkanmasından sonra ortama konan özgül substrat, enzim ile reaksiyona girmiş ve renk değişimi ile saptanan substratın parçalanma oranı örnekteki antikorum miktarını belirlemiştir. Tavşan serumlarındaki antikor aktivitelerinin belirlenmesi için genellikle tavşanın kulağından kan alınmakta, serum ayrılmakta ve ELISA’da kullanılmaktadır. İmmünizasyonlara başlamadan önce tavşandan 23.01.2013 tarihinde kan alınmış ve çalışmanın sonunda negatif kontrol kanı olarak kullanılmıştır.

3.2. Hücre Kültürü

3.2.1. Hücre kültür hattı için mediumun hazırlanması

Solüsyonlar	%	Hacim (ml)
DMEM/ RPMI1640 (Lonza, BE12-167F)		500 ml
Fötal Bovin Serum (Biowest, S1810)	% 10	50 ml
L-Glutamin (Thermo Scientific, SH3003401)	% 1	5 ml
Penisilin/Streptomisin (Thermo Scientific, SV30010)	% 1	5 ml
Amfoterisin B (Lonza, 17-836E)	% 1	5 ml

Tablo 3.2 Hücre Kültürü Medium İçeriği

Yöntem

1. RPMI 1640 solüsyonu içerisine çizelgede gösterilen miktarda FBS, L-Glutamin, Amfoterisin B ve Penisilin/Streptomisin eklenir.
2. Pipetle birkaç kez çekilip bırakılarak ortamın homojen olması sağlanır.
3. Şişe +4⁰ C’de saklanır.

3.2.2. Hücre Hatlarının Üretilmesi

Hücre hatları %10 FBS (Biowest, S1810), %1 Penisilin/Streptomisin (Thermo Scientific, SV30010) ve %1 L-Glutamin (Thermo Scientific, SH3003401) ve %1 Amfoterisin B (Lonza, 17-836E) içeren RPMI 1640 (Lonza, BE12-167F) mediumla 75 cm²'lik steril polisitren hücre kültürü flasklarında (Corning) % 5 CO₂'li ortamda, 37⁰C'deki inkübatörde kültüre edilmiştir.

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Pasajlama işlemi için hücrelerin hücre kültürü flasklarının yüzeyini tamamen kaplamış (%90-100) olmaları gerekmektedir. Böyle flasklara 'konfluent flasklar' denir. Konfluent flaskların üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreleri temizlemek için PBS ile yıkanır ve daha sonra PBS aspire edilerek ortamdaki uzaklaştırılır. Hücre pasajlama işlemi, flasklarda tek tabaka halinde bulunan hücrelere zarar verilmekten yüzeyden tripsin yardımıyla kaldırılıp sıvı içinde süspansiyon edilerek başka ortamlara aktarma prensibine dayanır. Aktarılan ortam %5 CO₂'li etüvde 37⁰ C'de hücre tabakası olana kadar inkübe edilir. Standardizasyon açısından her pasajlama işleminde hücre sayımı ve hücre canlılığı kontrol edilir. Hücreler tripan mavisi ile muamele edilerek, bir hemositometrede mikroskop altında incelenir.

Deney sırasında kullanılacak Tripsin-EDTA (Lonza) 30 dakika öncesinden 37 °C'ye ayarlanmış olan su banyosunda bekletilmiştir. Hücreler 4 ml % 0.05 Tripsin-EDTA (Lonza) ile muamele edilerek 3 dakika inkübatörde (37⁰C, %5 CO₂) inkübe edilmiş ve hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Süre bitiminde hücrelerin tutundukları kültür kabının yüzeyinden ayrılması mikroskop altında gözlenmiştir. Tripsin-EDTA ile hidroliz edilen hücre ortamına 8 ml FBS içeren RPMI 1640 medium eklenerek tripsin inaktivasyonu sağlanmış ve 15 ml'lik santrifüj tüpüne (non pirojenik ve steril, AFS) transfer edilerek 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir (Nüve NF 200, TR). Santrifüj sonrası süpernatant dökülüp tüp içerisine 2 ml besiyeri eklenerek hücreler tekrar süspansiyon edilmiş ve mikroskopta sayılmışlardır. Hücrelerin sayılması için 10 µl hücre süspansiyonu 90 µl Tripan boyasıyla karıştırılarak mikroskop altında sayım yapılmıştır. Hemositometredeki dört karedeki hücreler sayılıp ortalaması alındıktan sonra çıkan

sayı Dilüsyon katsayısı $\times 10^4$ ile çarpılıp 1 ml'deki hücre sayısı (hücre/ml) 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu işlemin sonucunda çoğaltma işlemi için hücreler yeni kültür flasklarına alınmıştır. Hücreler % 5 CO₂'li ortamda, 37°C'deki inkübatörde kültüre edilmiştir.

3.2.4. Hücre Hattının Dondurulması

Kullanılan hücreler, yapılan çalışmada duyulan ihtiyaçtan daha fazla sayıda çoğalıyor veya yapılan çalışma bitmiş ya da ara verilecek ise uygun koşullarda dondurularak saklanabilir. Hücrelerin dondurulması, hücrelerin yeniden çözündürüldüğünde canlılık oranının yüksek olması için çok dikkat edilmesi gereken bir işlemdir.

Malzemeler	Final Konsantrasyon	1 ml dondurma mediumu
Medium (RPMI1640)	% 70	0.7 ml
Fetal bovin serum (FBS)	% 20	0.2 ml
DMSO	% 10	0.1 ml

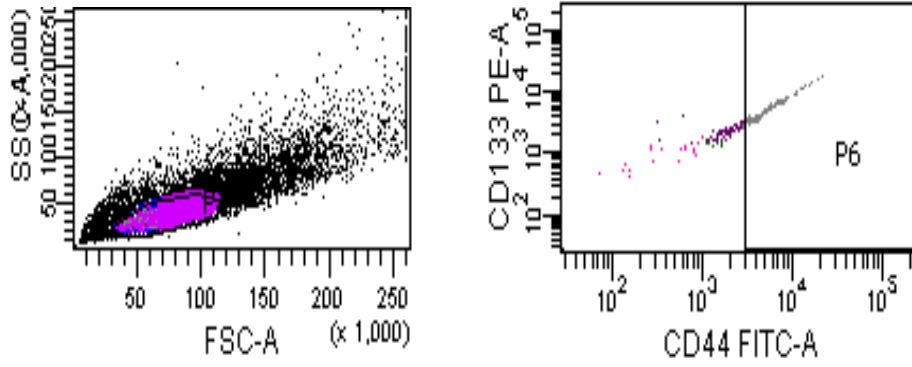
Tablo 3.3 Hücre Dondurma Mediumu İçeriği

Uygulama Basamakları

1. Su banyosu 37°C'ye ısıtılır.
2. Hücre besi ortamı ve serum su banyosunda 37°C'ye ısıtılır.
3. 'Hücre Pasajlanması' protokolünde belirtildiği şekilde hücre pelleti elde edilir.
4. Hücre pelleti, 1 mL dondurma ortamı içinde süspande edilir ve 'cryovial' adı verilen tüplere konulur (Hücre süspansiyonunda $2-4 \times 10^6$ hücre/ml olması, yeniden çözöldüğünde hücre canlılığının iyi olması açısından önemlidir).
5. Hücrelerin bulunduğu tüpler dondurma kabına konulur ve -80°C'de bir gece bekletilir.
6. Ertesi gün sıvı azot tankına transfer edilir.

3.3. Flow Sitometri Cihazında CD133⁺/CD44^{+/low} Kanser Kök Hücrelerinin Toplanması

DU145 prostat kanseri hücrelerinin %1 L-Glutamin (Thermo Scientific, SH3003401), %10 FBS (Biowest, S1810), %1 Amfoterisin B (Lonza, 17-836E) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Thermo Scientific, SV30010) içeren RPMI 1640 (Lonza, BE12-167F) mediumla 75 cm²'lik steril polisitren hücre kültürü flasklarında (Corning)  o altılmalarından sonra hücreler 4 ml % 0.05 Tripsin-EDTA (Lonza) ile muamele edilerek 5 dakika inkübatörde (37⁰C, %5 CO₂) tutuldu ve flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. % 0.05 Tripsin-EDTA + hücre karışımına FBS içeren 8 ml RPMI 1640 medium eklenerek tripsin inaktivasyonu sağlandı ve 15 ml'lik santrifüj tüpüne (non pirojenik ve steril, AFS) alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi (Nüve NF 200, TR). Süpernatant atıldıktan sonra tüpe 5 ml PBS eklendi, vortekslendi ve bu süspansiyondan 10  l örnek alınarak tripan blue (Sigma Biyoteknoloji, ABD) ile sayım yapıldı. Yaklaşık 3.000.000 hücre olduğu tespit edildi. Sonrasında bu süspansiyon 300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Daha sonra hücreler 5ml'lik polisitren Falcon tüpe alınarak (steril ve non pirojenik, Becton Dickinson Labware, USA) 1x PBS ile 300 rpm'de 5 dakika tekrar santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Sonra tüpe 10  l CD44-FITC (Clone B-F24, GenProbe USA) ve 10  l CD133-PE (Miltenyi Biotech, UK) eklendi. 20 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1ml PBS eklenerek CD133⁺/CD44⁺ yüzey belirteçlerini barındıran DU145 prostat kanseri hücre hattı hücrelerinin floresanla aktive hücre ayırma (FACS) yöntemiyle akım sitometri analizi Ege Üniversitesi AREL'de bulunan FACS Aria II (Beckton Dickinson) cihazında yapıldı ( ekil 1). Hücreler CD133⁺/CD44⁺ (sorting) ve bunların dışında kalan hücreler (non-sorting) olarak i lerinde 2' er ml RPMI 1640 medium bulunan 5 ml'lik polisitren Falcon tüplere toplandı. Sonra bu hücreler  o altılmak üzere 25 cm²'lik steril polisitren hücre kültürü flasklarına (Corning) alındı.



Şekil 3.1. DU145 Prostat kanseri hücre hattından izole edilen $CD133^+/CD44^{+low}$ Kanser Kök Hücreleri

3.4. Western Blot Analizi

DU145 prostat kanseri hücre hattı hücrelerinden hücre lizati hazırlanmıştır. Proteaz ve fosfataz inhibitörleri lizis solüsyonuna eklenmiştir. Protein konsantrasyonları ölçülmüş ve SDS page elektroforezleri yapılmıştır. Yarı kuru yöntem ile SDS page jelinden PVDF membrana transfer yapıp, Wet Electroforetic Transfer Cell sistemi kullanılarak ıslak yöntem ile SDS page jelinden PVDF membrana transfer yapılmıştır.

Spesifik antikorlar ile blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Western Blot Stripping Tampon ile membrana bağlanan antikorların uzaklaştırılması işlemi yapıp eşit yükleme yapıldığının kontrol edilmesi amacıyla β -actin antikoruna ile blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir. “SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate” kiti ile deteksiyon yapılmış ve “SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate” kiti ile de deteksiyon yapılmıştır.

BIO-RAD Protein assay, kolorimetrik olarak total protein konsantrasyonu ölçülmesi için formüle edilmiş bir testtir. Konsantrasyonu bilinen standartların 595 nm.’de verdiği absorbanslardan yararlanılarak standart grafiği çizilir. Böylece konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin verdiği absorbansların standart grafikten karşılığı okunarak, protein konsantrasyonları belirlenir.

Western blotta ilk aşama protein makromoleküllerinin SDS PAGE jel elektroforezi ile molekül büyüklüklerine göre ayrılmasıdır. Elektroforezde iki farklı jel kullanılır. Bunlar ayrıştırıcı jel ve yükleme jelidir. İlk dökülen jel proteinlerin molekül büyüklüklerine göre ayrıştırıldığı ayrıştırıcı jeldir. Yükleme jeli, ayrıştırıcı

jel üzerine dökülür. Tarak bu jel üzerine yerleştirilir. Hücre lizati denatüran yükleme tamponu ile karıştırılıp, ısıtılarak denatüre edildikten sonra jele yüklenir.

Membrana “Yarı Kuru” Yöntem İle Transfer :

Jel büyüklüğünde PVDF membran kesilir. Transfer tamponu ile membran, blot kâğıtları ve jel ıslatılır.

“Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell” cihazına kâğıt, membran ve jel yerleştirilir ve 15 V’ da 40 – 50 dakika transfer işlemi yapılır.

Western Blot:

% 5 süt tozu içeren TBST içerisinde 4 °C’ de 1 saat membran blotlanmıştır. 4 °C’ de % 5 Süt tozu, primer antikor içeren TBST içerisinde bir gece boyunca membranın blotlanmasına devam edilmiştir. Membran dört kez TBST ile yıkanmış ve 4 °C’ de %5 oranında süt tozu ve sekonder antikor içeren TBST içerisinde bir saat inkübe edilmiştir. Membran dört kez TBST ile yıkanmıştır.

“SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate” veya “SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate” kitinin peroksit ve enhancer solüsyonları 1:1 oranında karıştırılmış ve membran 5 dakika boyunca bu karışım içerisinde inkübe edilmiştir. Sonra bir poşet dosya içerisine alınıp kaset içerisine yerleştirilmiştir. Kaset içerisine karanlık odada film yerleştirilmiş ve 1 saniye’den 5 dakika’ya kadar olan farklı zaman aralıklarında film kaset içerisinde tutularak görüntü elde edilmiştir.

Membranın “Strip” Edilmesi:

Western blot yapılan membranın ikinci kez başka bir antikorla blotlanması amacıyla “strip” edilerek bağlı durumdaki antikorların uzaklaştırılması gerekmektedir. Proteinlerin eşit miktarda yüklendiğini kanıtlamak amacıyla membran “strip” edilerek membran üzerindeki proteinlere bağlanan antikorlar uzaklaştırılmış ve tekrar β -actin primer antikorla ile western blot yapılmıştır.

3.5. İmmünohistokimyasal Analizler

3.5.1. Hücreler İçin İmmünohistokimyasal Analiz

Hücreler 2 kez 5'er dk. Fosfat Buffer Salin (PBS) ile muamele edilmiştir. PBS ile hazırlanan %4'lük paraformaldehitte 30 dk. fikse edildikten sonra 3 kez 5'er dk. PBS ile yıkanmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için distile suyla hazırlanan %3'lük hidrojen peroksitle (Sigma, USA) 10 dk. muamele edilmiştir. 3 kez 5'er dk. PBS ile yıkandıktan sonra 15 dk. Tritonix ile muamele edilmiştir. Sonra 3 kez 5'er dk. daha PBS ile yıkanmış ve blok solüsyonu (non-immün serum) (Invitrogen, USA) eklenerek 1 saat bekletilmiştir. Serumun fazlası atıldıktan sonra örnekler uygun şekilde dilüe edilmiş primer antikolarla muamele edilip kapalı ve nemli kutuda 1 gece +4⁰C'de bekletilmiştir. 3 kez 5'er dk. PBS ile yıkandıktan sonra biotinle işaretlenmiş sekonder antikorla (Invitrogen, USA) 30 dk. muamele edilmiştir. 3 kez 5'er dk. PBS ile yıkanıp 30 dk. streptavidinle işaretli sekonder antikorla (Invitrogen, USA) muamele edilmiştir. 3 kez 5'er dk. PBS ile yıkandıktan sonra DAB (Invitrogen, USA) ile muamele edilmişlerdir. Mikroskopta renk değişimi kontrol edilerek 5 dakikaya kadar inkübe edilmiştir. Yeterli boyanma görüldüğünde 5 dk. PBS ile sonrasında da 15 dk. distile su ile muamele edilmiştir. Karşıt boyama için 1 dk. Mayer's hematoksilen uygulanmıştır. Mounting medium ile kapatılıp incelenmiştir.

3.6. Biyopsi Örneklerinin Toplanması, Takibi ve İmmünohistokimyasal Analiz

3.6.1. Hasta Örneklerinin Toplanması

Bu araştırmada ; immünohistokimyasal boyamalar KDN antikorlu ile normal prostat dokusu (n=14), prostatik intraepitelyal neoplazi (n=15) , prostat adenokarsinomu (n=45), normal meme dokusu (n=30) ve meme karsinomu (n=52) içeren dokular üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.6.2. Işık Mikroskop Takibi

Doku örnekleri fiksatiflerde +4°C’ de Fosfat Tamponlu %2 Formalin Solüsyonu içinde 48 saat fiksasyonu takiben tampona alınmış ve 48 saat tamponda +4°C’ de yıkanmışlardır. Oda ısısına alınan örnekler 2 saat akan suda bırakılmıştır. Ardından örnekler 2 saat %80 etanolde, 3 saat %95 etanol I’de, 15 saat %95 etanol II’de, 2 saat %100 etanol I’de, 2 saat % 100 etanol II’de ve 2 saat %100 etanol III ‘de olmak üzere alkol serilerinden geçirilmiştir. Alkolden çıkarılan örnekler oda ısısında açık havada iyice kurutulmuştur. Parça boyutları küçük olduğu için 1-3 dakika Xylol I’de, 1-3 dakika Xylol II’de, 1-3 dakika Xylol III’de bekletilerek şeffaflaştırılmışlardır. 37°C etüvde erimiş beyaz boncuk parafin içerisine alınan parçalar 1 gece bekletilmiştir. Etüvden çıkarılan parçalar, özel bloklama kalıplarının içinde erimiş mavi boncuk parafine gömülerek oda ısısında bloklanmıştır.

3.6.3. Kesit Alma

Mikrotomda elde edilen 5µm kesitler kullanıma hazır rodajlı ve poli-lizin kaplı lamlara alınmıştır. Kesitler 58°C’ye ısıtılmış etüvde bir saat kalacak şekilde kurutulmuşlardır.

3.6.4. İmmunohistokimyasal Analiz

Tüm boyamalar poli-lizinli lamlara alınan 5 mikron kalınlıktaki parafin kesitlerde tam otomatik immünohistokimyasal boyama cihazında (Dako Autostainer Link 48, Denmark), cihaza uyumlu Dako Flex kitler kullanılarak yapıldı. Antijen açığa çıkarma otomatik PT Link cihazında düşük pH'ya sahip sitrat solüsyonunda gerçekleştirildi. KDN poliklonal antikoru 1/1200 oranında dilüe edildi ve antikor ile 15 dakika inkübasyon gerçekleştirildi.

3.7. Sialik Asit Analizi

3.7.1. Standartların Hazırlanması

Silaik asit analizi için standart olarak kullanılan N-asetil nöraminik asit, Neu5Ac (Sigma), N-glikolil Nöraminik asit, Neu5Gc (Sigma) ve deamino nöraminik asit, KDN (Sigma) ultra saf su içinde hazırlanmıştır .

3.7.2. Sialik Asit Analizi İçin Asit Hidrolizi

Örnek 2M Asetik asit ile hidroliz amacıyla kilitli kapaklı santrifüj tüpünde içinde çözünmüştür. Elde edilen çözelti 80 °C’de 3 saat inkübe edilmiştir.

3.7.3. Sialik Asitlerin Türevlendirilmesi

Sialik asitin LC-MS sisteminde daha duyarlı analiz edilebilmesi amacıyla DMB (1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene.2HCl, Sigma Aldrich) flouresan reaktifi ile türevlendirilmiştir. Hidroliz edilen örneğe 7mM olacak biçimde DMB çözeltisi ilave edilerek kilitli kapaklı tüp (Axigen) içinde 60°C’de 2,5 saat inkübe edilmiştir.

Oda sıcaklığına soğutulan ve türevlendirilmiş sialik asitlerin de bulunduğu tüp 16000g’de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant CapLC-ESI-MS/MS analizi için viallere aktarılmış ve analiz edilmiştir.

3.8. Sialik Asit Analizinde LC-MS/MS

Agilent 1200 Capillary HPLC (Polo alto, USA) sisteminde (ACE 5 C18 150 x 0,5 mm 5 µm) ters faz kolon kullanılarak kromatografik ayrımlar gerçekleştirilmiştir. Mobil faz Asetonitril-Metanol (Sigma Aldrich) karışımı ve ultra saf su ikilisinden oluşur. Mobil faz akış hızı 20 µL/dak. ve enjeksiyon hacmi 0,5 µL olarak belirlenmiştir. Analiz edilecek numuneler soğutmalı otoörnekleyicide 5°C’de bekletilerek analiz edilmiştir. Toplam analiz süresi 55 dakikadır.

Sialik asitler	[M+H] ⁺	Parçalanma iyonları (m/z)	
		[M+H-H ₂ O] ⁺	
Neu5Gc	442	424	313-295-268-283-229
Neu5Ac	426	408	313-295-283-229
KDN	385	367	313

Tablo 3.4 Sialik Asitlerin Parçalanma İyonları

3.8.1. HPLC Koşulları

DS kolon C18 Kapiller kolon kullanılmıştır. Agilent ZORBAX SB-C18 150 x 0.5 mm, 5 µm, USA)

Mobil faz: A → su, B → (ACN : MeOH 10:15)

	A (su)	B (MeOH: ACN, 15:10)
0 dakika	% 87.5	% 12.5
35 dakika	% 87.5	% 12.5
45 dakika	% 50	% 50
50 dakika	% 87.5	% 12.5

Tablo 3.5 HPLC Koşulları

Bu gradient 12 bileşik analizinde kullanıldığından bunun yerine 15 dakika izokratik akış kullanılabilir. Üç bileşik ilk 10 dakikada gözlenebilmektedir.

Enjeksiyon hacmi: 0.5uL (sisteme bağlı artırılabilir)

Akış: 20 uL/min (sisteme gore karar verilebilir)

Kolon sıcaklığı: 30 °C

Soğutmalı otoörnekleyici

3.8.2. Kütle Spektrometresi

50 – 650 m/z aralığında MS/MS nicel analiz yapabilecek sistem olmalıdır.

Çalışılacak örnek asidik nitelikte şeker molekülü olup floresan ajanla türevlendirilerek analiz edilmiştir.

Aşağıdaki tabloda bu moleküllerin türevlendirildikten sonra oluşan ana kütle değerleri ve parçalanma iyonları görülmektedir.

Sisteme bu molekülü tanıtmak için de standart molekül türevlendirilmiş ve infüzyonu MS sistemine doğrudan yapılmıştır.

Hedef molekül KDN'dir. Bunun yanında sadece Neu5Ac ve Neu5Gc'nin standart materyali vardır.

3.8.3. Reaktifler

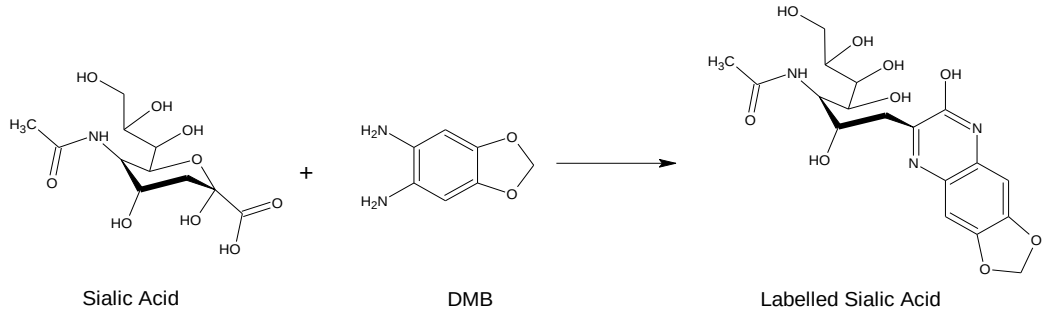
DMB (1,2-diamino-4,5-methylenedioxy-benzene dihydrochloride),
sialik asit standartları (KDN, Neu5Ac, Neu5Gc)
asetik asit

3.8.4. Türevlendirme

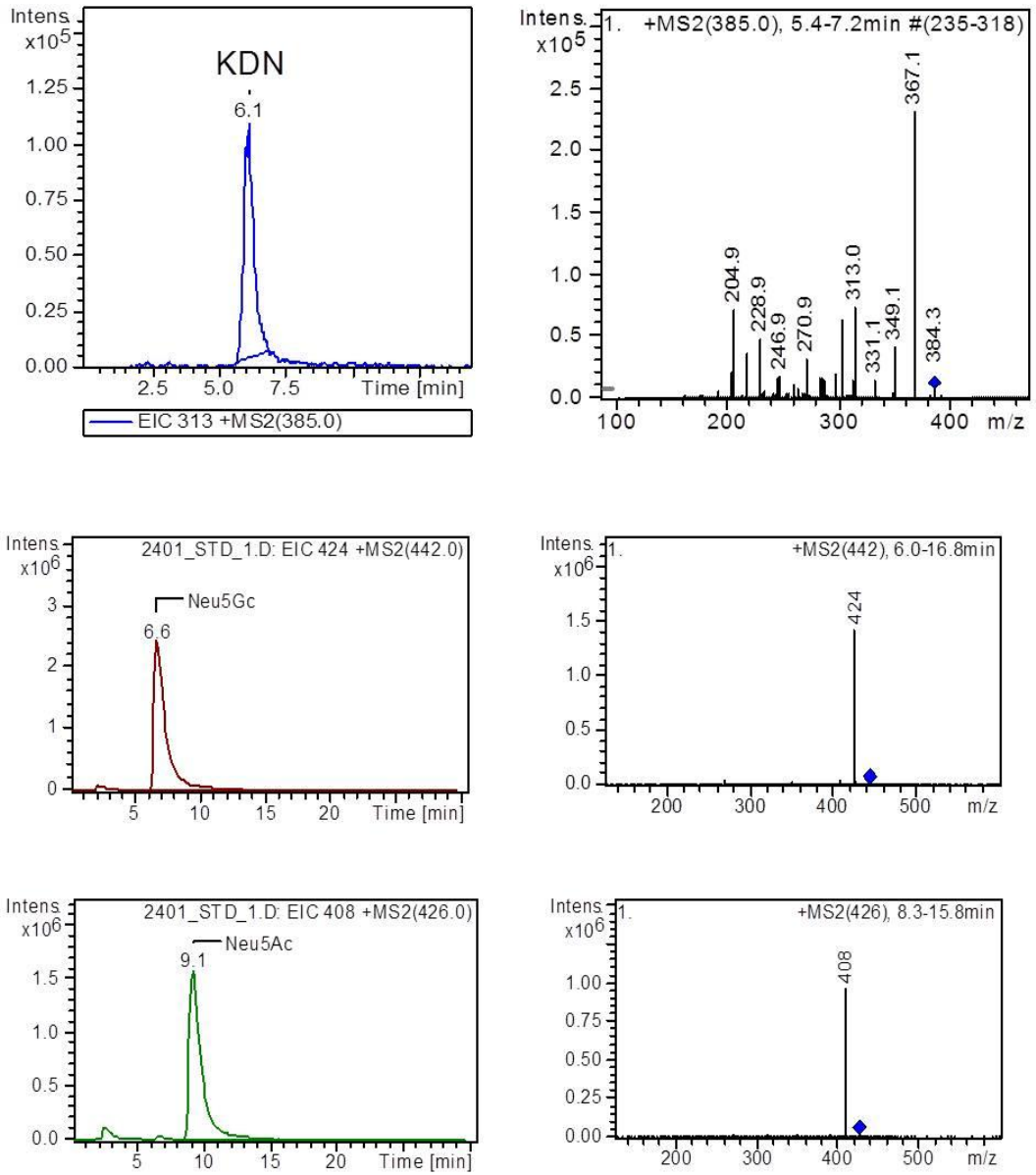
Standart sialik asit çözeltisi (1 µg/mL) hidroliz yapılmadan türevlendirilmiştir. 40 µL standarda 40 µL DMB çözeltisi (7 mM DMB in 1 mL 1.4 M aqueous acetic acid containing 18 mM sodium hydrosulfite and 0.75 M β-mercaptoethanol) eklenerek türevlendirme işlemi yapılmıştır.

Hücre homojenatından elde edilen üst faza (40 µL) türevlendirme amacıyla 40 µL DMB çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım 60 °C karanlıkta 150 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 16800 g ivme ile santrifüj yapılmış ve üst kısım 250 µL vial insertine aktarılmıştır.

Sialic acids	Rt	[M+H] ⁺	CID Fragments	
			[M+H-H ₂ O] ⁺	Fragments (m/z)
Neu5Gc	6.8	442	424	313-295-268-283-229
Neu5Ac	9.4	426	408	313-295-283-229
KDN	6.1	387	367	313-205-229



Şekil 3.2. DMB ile sialik asitlerin işaretlenmesi.



Şekil 3.3. Standart sialik asit tiplerine ait capLC-ESI-MS/MS analizleri. Protonlanmış ($[M+H]^+$) sialik asit türlerine ilişkin MRM sistemi ile oluşturulan kromatogram ve spektrumlar.

3.9. İstatistiksel Analizler

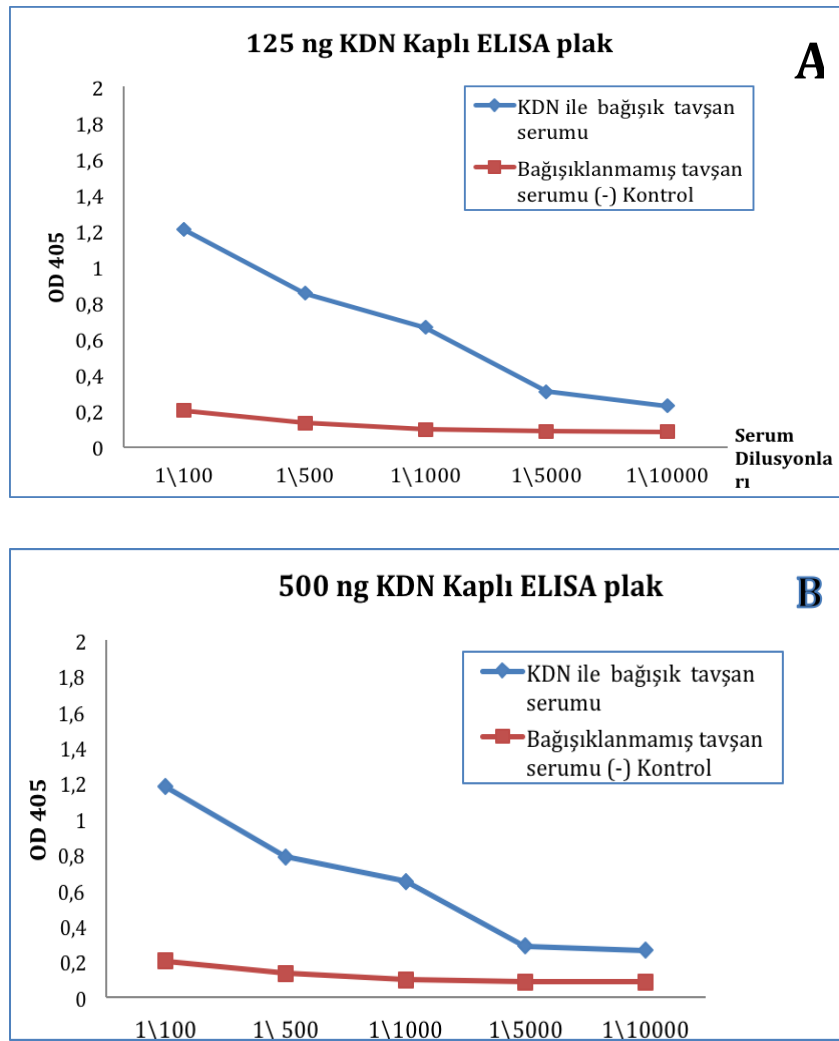
İstatistiksel analizler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim A.D. yardımı alınarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde IBM-SPSS (version20.0) kullanılmıştır. KDN değişkeninin gruplar arasında karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis sıralamalı tek-yönlü varyans analizi (grup sayısı ≥ 3) veya Mann-Whitney U testi (grup sayısı=2) kullanılmıştır.

Nümerik ve /veya ordinal değişkenler arasında doğrusal ilişki Spearman rho korelasyon analizi ile incelenmiştir. Tüm hipotez kontrolleri $\alpha = 0.05$ önem seviyesinde gerçekleştirilmiştir ($p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir).

4. BULGULAR

4.1. Tavşan İmmünizasyon Bulguları

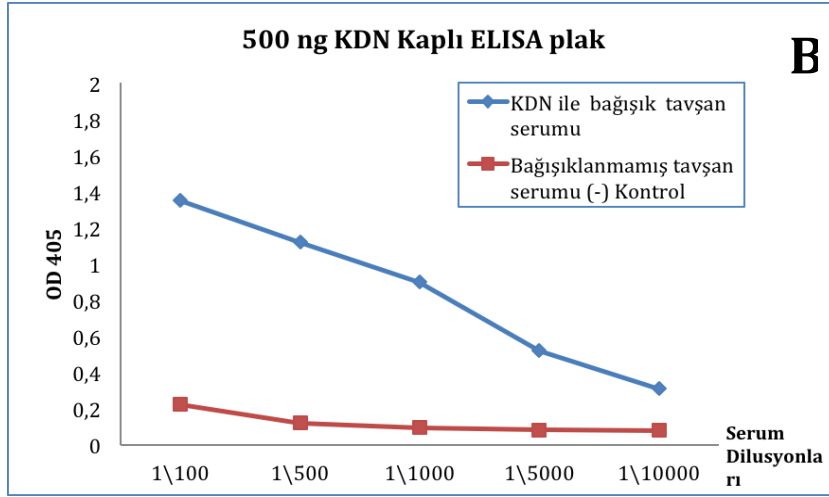
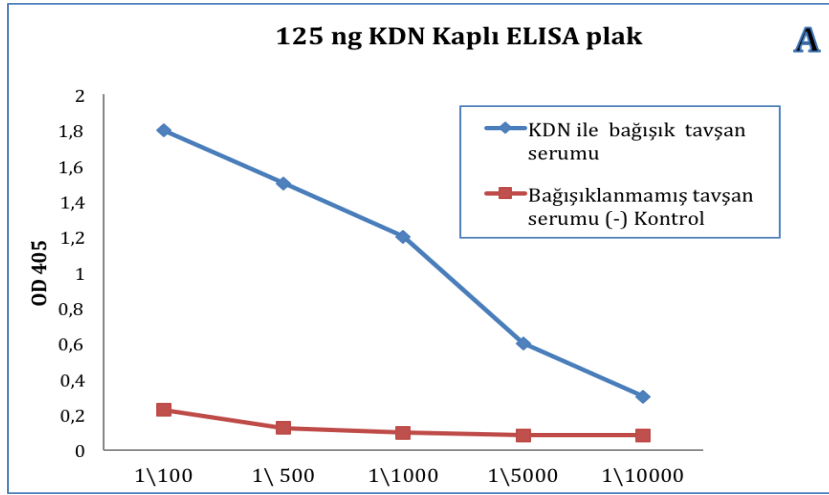
Tavşana ait immünize olmamış negatif kontrol serumu ve KDN antijeni ile immünize tavşan serumuna ait antikor yanıtlarını gösteren ELISA sonuçları Şekil 1’de görülmektedir. Şekil 1 A’da 125ng KDN antijeni, Şekil 1 B’de 500 ng KDN antijeni ile kaplı ELISA plaklarda test edilen farklı dilusyonlarda tavşan serumlarına ait sonuçlar yer almaktadır.



Şekil 4.1. KDN antijeni ile bağışıklanan tavşanın 3. immünizasyon sonrası immün yanıtları. Farklı konsantrasyonlarda kaplanmış ELISA plaklar ile farklı dilusyonlardaki (1/100, 1/500, 1/1000,1/5000,1/10000,1/25000,1/50000) poliklonal tavşan serumlarının dolaylı ELISA sonuçları; **A**-125 ng KDN kaplı plak ; **B**-500 ng KDN kaplı plak .

Western ve diğ er antijen-antikor ilişkisine dayalı testlerde kullanılması planlanan poliklonal antikordaki, antikor titresini yükseltmek amacı ile aynı tavşanda immünizasyon çalışmaları sürdürülmüştür. 17.03.2013 ile 08.04.2013 tarihlerinde KDN antijen miktarını artırılarak (500 g /500  l PBS) Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) ile eşit miktarda (500  l) karıştırılarak 4. ve 5. imm nizasyonlar yapılmıştır. Bağışıklanmış tavşanlardaki antikor titresini test etmek için 5. imm nizasyondan 10 gün sonra tekrar kan alınarak serumu ayırıtırlmış ve ELISA ile bakılmıştır.

ELISA çalışmasında tavşana ait negatif kontrol serumu ve KDN antijeni ile tekrar immünizasyonları sonrası elde edilmiş bağışık tavşan serumuna ait antikor aktivite sonuçları şekil 2'de görülmektedir. şekil 2 A'da 125ng KDN antijeni, şekil 2 B'de 500 ng KDN antijeni ile kaplı ELISA plaklarda test edilen farklı dilusyonlardaki tavşan serumlarına ait sonuçlar yer almaktadır.



Şekil 4.2. KDN antijeni ile bağışıklanan tavşanın 4. ve 5. immünizasyonları sonrası immün yanıtları. Farklı konsantrasyonlarda kaplanmış ELISA plaklar ile farklı dilusyonlardaki (1/100, 1/500, 1/1000, 1/5000, 1/10000, 1/25000, 1/50000) poliklonal tavşan serumlarının dolaylı ELISA sonuçları; **A**-125 ng KDN kaplı plak ; **B**-500 ng KDN kaplı plak. Şekilde görüldüğü gibi KDN antijeni ile bağışıklanmış tavşan serumu ile bağışıklanmamış tavşan serumu karşılaştırıldığında, bağışıklanmış tavşanda KDN antijenine karşı oldukça yüksek antikor yanıtı elde edildiği görülmektedir.

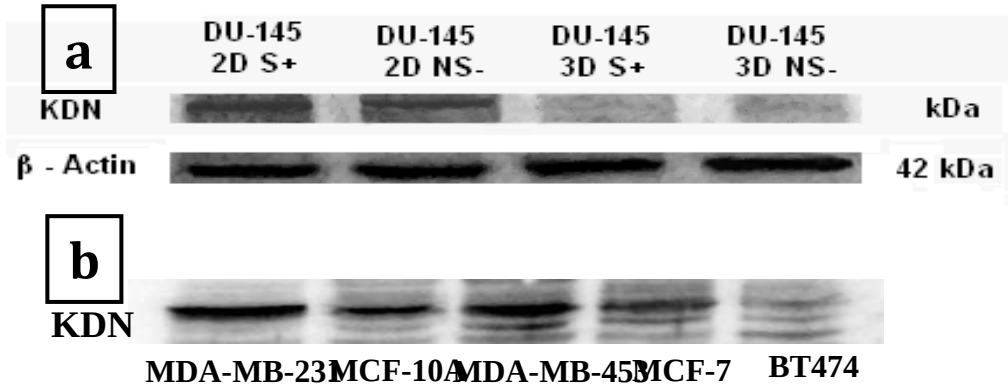
4.2. Protein Analizi Bulguları

4.2.1. Prostat ve Meme Kanseri Hücre Hatlarından Elde Edilen Kanser Kök Hücrelerinde “Western Blot” Analizi Bulguları

DU145 insan prostat kanseri hücre hattından CD133⁺/CD44⁺ yüzey belirteç özelliği gösteren hücreler (Sorting+) izole edilmiştir (FACS Aria). Bu hücreler dışında kalan grup hücreler (NonSorting-) grup olarak ayrılmıştır (Şekil 4.3a). Wester Blot analizi için prostat kanserinde DU145 hücre hattından elde edilen KKH'leri ve meme kanserinde MDA-MB-231, MCF-10A, MDA-MB-453, MCF-7, BT474 hücre hatları kullanılmıştır (Şekil 4.3b).

Prostat kanserinde KKH'leri kullanılarak elde edilen sferoidlerde yapılan KDN analizinde monolayer (tek tabakalı kültür) hücrelere göre sferoidlerde protein ifadesinde belirgin derecede azalma olduğu gözlenmiştir. Sferoidlerde KKH (S) ve KKH dışında kalan hücrelerle (NS) yapılan western blot analizlerinde gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında NS grupta KDN proteininin bir miktar artmış olduğu gözlenmiştir.

KKH izolasyonu yapılmadan, hücre hattındaki protein düzeyini görebilmek amacı ile meme kanseri hücre hatları kullanıldı. Bu deneyde sırası ile MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7, MCF-10A, BT474 hücrelerinde azalan protein oranları göze çarptı. Normal meme epiteli hücre hattı olan MCF-10A'da KDN düzeyinin BT474 (invaziv ductal carcinoma) hücrelerinden fazla olması dikkat çekmiştir.



Şekil 4.3. Monolayer (2D), Du145 Prostat kanser kök hücresi (KKH) monolayer sorting (s) ve nonsorting (NS) ve üç boyutlu (3D) hücrelerinde KDN analizi (a) ve meme kanseri hücre hatlarında KDN analizi (b)

4.2.2. Prostat ve Meme Kanseri Hücre Hatlarından Elde Edilen Kanser Kök Hücrelerinde İmmünohistokimyasal Analiz Bulguları

DU145 insan prostat kanseri hücre hattından CD133⁺/CD44⁺ ve MCF-7 insan meme kanseri hücre hattından CD44⁺/CD24⁻ yüzey belirteç özelliği gösteren hücreler (S) izole edilmiştir (FACS Aria). Bu hücreler dışında kalan hücreler (NS) grup olarak ayrılmıştır.

Bu çalışmada her iki grupta da bütün hücrelerde pozitif immünoreaktivite olduğu gözlenmiştir. Prostat kanseri NS (Şekil 4.4.b) hücrelerinde KDN immünoreaktivitesi S (Şekil 4.4.a) hücrelerle karşılaştırıldığında hücrelerde immünoreaktif intensitenin artmış olduğu gözlenmiştir.

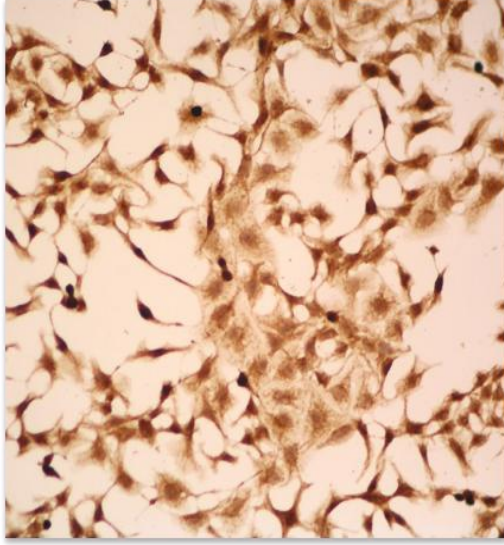
Meme kanseri kök hücreleri için inceleme yapıldığında benzer şekilde NS (d) hücrelerinde KDN immünoreaktivitesi S (Şekil 4.4.c) hücrelerine göre artmış olarak belirlenmiştir. NS hücrelerinde immünoreaktif intensitenin artmış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4.d).

Kanser kök hücresi ve kanser kök hücresi olmayan hücreler 3 boyutlu kültür ortamında geliştirilerek sferoidler elde edilmiştir. Sferoidler parafin bloklara gömülerek histolojik kesitler alınmış ve KDN immünoreaktivitesi değerlendirilmiştir. Yapılan analiz sonucu prostat kanseri S gurubunda (Şekil 4.5.a) NS guruba göre (Şekil 4.5.b) KDN immünoreaktivitesinin azalmış olduğu

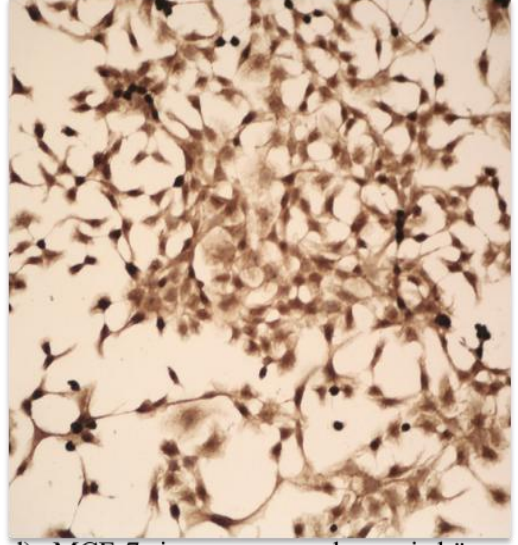
belirlenmiştir. Benzer bulgular meme kanseri deneylerinde de gözlenmiştir. NS gurupta (Şekil 4.5.d) S hücrelerine göre (Şekil4.5.c) immunoreaktivite artmıştır (Şekil 4.5).

Monolayer hücrelere ait immunoreaktiviteden farklı olarak sferoid gurubunda nuklear ve sitoplazmik boyanmanın daha az olduğu gözlemlenmiştir. KDN *de novo* biyosentezinin, PEP ve manoz 6-fosfat (Man-6-P)'ın yoğunlaşarak KDN 9-fosfat (KDN-9-P) oluşturması ile meydana geldiği düşünülmektedir. Bu çalışmada bir prekürsör olan Man-6-P'in varlığının immünohistokimyasal olarak gösterilmesi önem kazanmıştır. Yapılan analiz sonucunda KDN immünoreaktivitesinden daha belirgin olmak üzere, KKH (S) gruplarında azalmış Man-6-P immunoreaktivitesi gözlenmiştir. Bu azalmış immunoreaktivite prostat kanseri KKH (S) grubunda (Şekil 4.6.a) NS gurubuna göre (Şekil 4.6.b) ve meme kanserinde KKH (S) grubunda (Şekil 4.6.c) NS grubuna göre (Şekil 4.6.d) belirlenmiştir (Şekil 4.6).

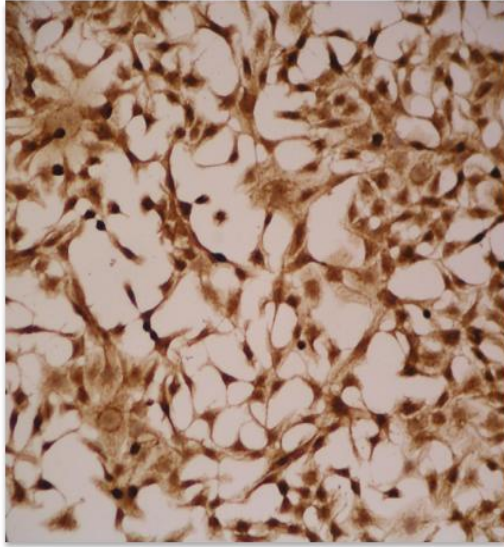
a)Du145 insan prostat kanseri hücre hattı kanser kök hücrelerinde (S) KDN immunoreaktivitesi



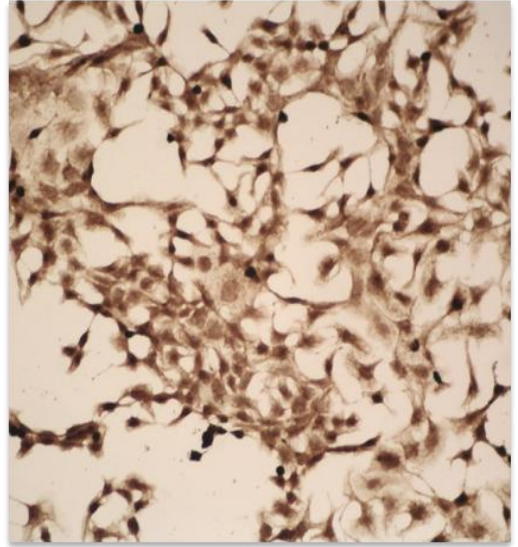
b)Du145 insan prostat kanseri hücre hattı kanser kök hücresi dışında kalan hücrelerde (NS) KDN immunoreaktivitesi



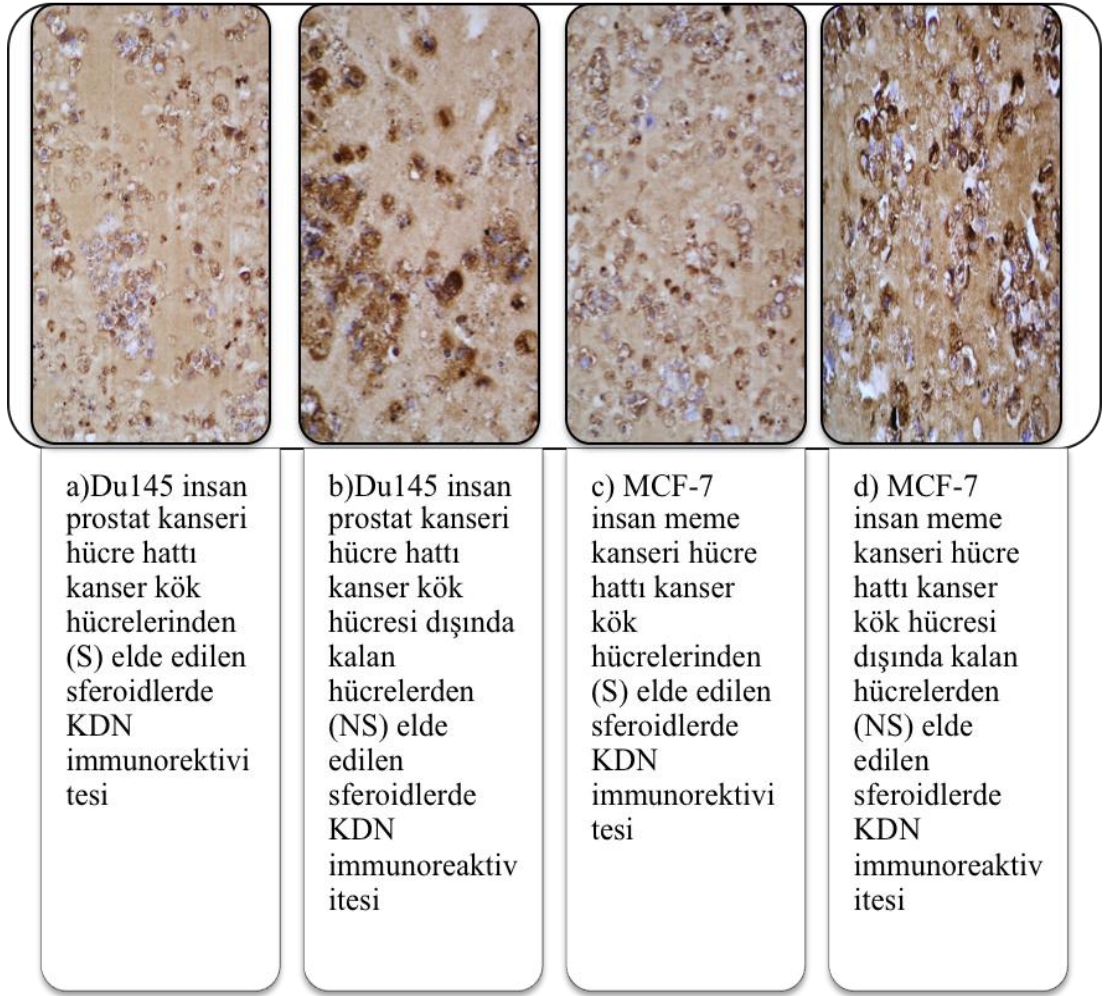
c) MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı kanser kök hücrelerinde (S) KDN immunoreaktivitesi



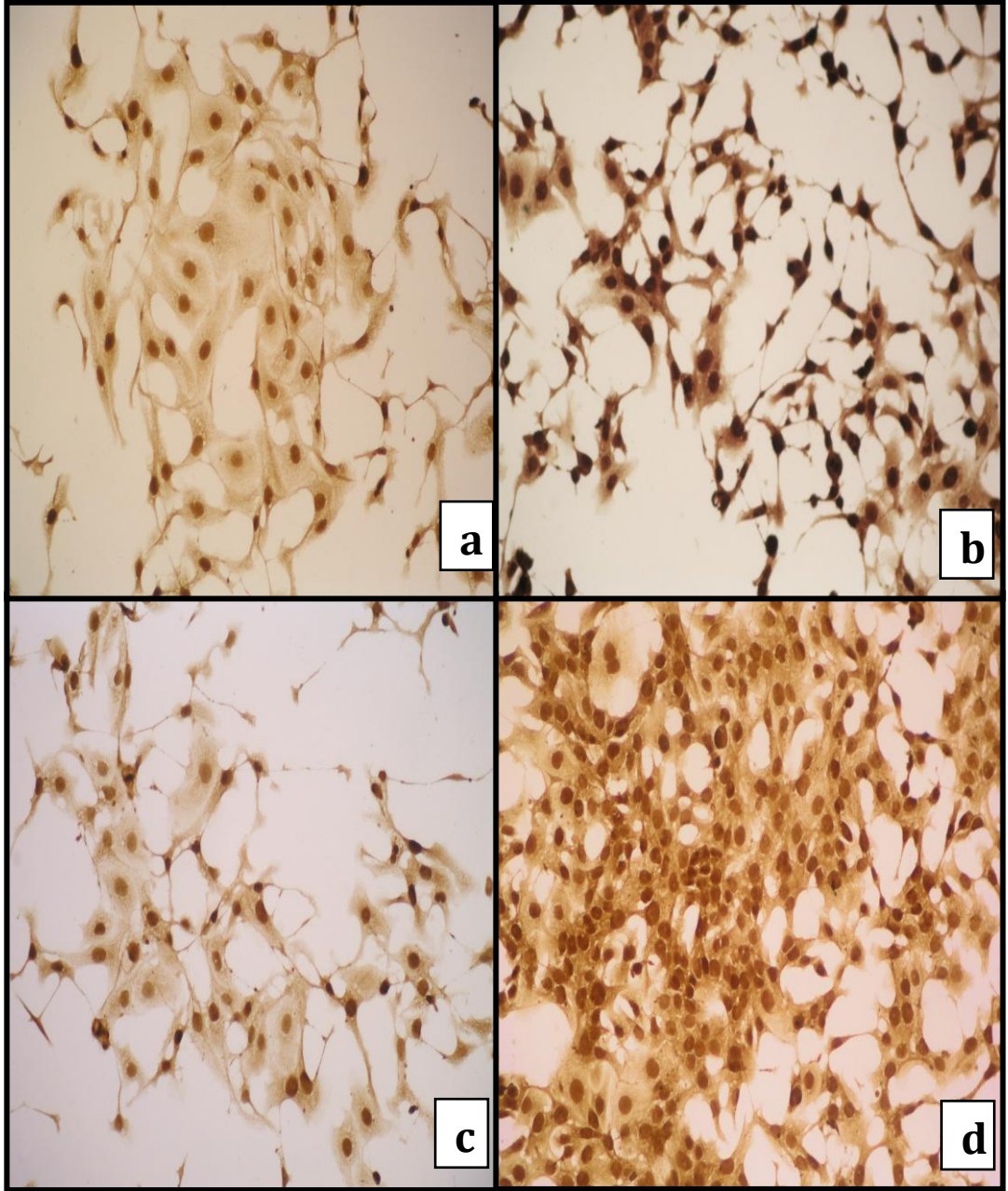
d) MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı kanser kök hücresi dışında kalan hücrelerde (NS) KDN immunoreaktivitesi



Şekil 4.4. Monolayer DU145 KKH ve KKH-olmayan hücrelerde, MCF-7 KKH ve KKH-olmayan hücrelerde KDN immunoreaktivitesi.



Şekil 4. 5. Sferoidlerde KDN immünoreaktivitesi.



Şekil 4.6. Azalmış Mannoza 6P immünoaktivitesi

Prostat kanseri kök hücrelerinde KKH (S) gurubunda (a) NS gurubuna göre (b) ve meme kanserinde KKH (S) gurubunda (c) NS gurubuna göre (d) belirlenmiştir.

4.3. Prostat Kanseri Biyopsi Örneklerinden Elde Edilen Bulgular

Prostat kanseri hastalarından seçilen 74 biyopsi örneği değerlendirmeye alınmıştır. Hasta grupları benign (14), PIN (15), Malign (45) olarak belirlenmiştir. Çalışma “İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu” onayı ile yapılmıştır. Biyopsi örnekleri hazırlanan parafin bloklardan kesitler alınarak lam üzerine yerleştirilmiş ve KDN poliklonal antikorunu kullanılarak otomatik immunohistokimya boyama cihazı (Dako link 48 IHC autostainer) ile immunohistokimyasal olarak işleme yapılmıştır. KDN immünoreaktivitesi H-skor ile semi-kantitatif olarak değerlendirilmiş ve elde edilen veriler hasta klinik verileri ile karşılaştırılmıştır. Hasta klinikleri; yaş, histolojik tip, G skoru, PSA değeri, TNM (klinik evre) ve TNM (cerrahi evre) olarak incelemeye alınmıştır.

Hastaların ortalama yaşı 69.45 ± 0.98 ortalama PSA değerleri 34.18 ± 8.81 olarak belirlenmiştir. Hasta yaşları histolojik gruplar ile değerlendirildiğinde; benign ve malign gruplar arasında yaş farkı anlamlı olarak belirlenmiştir ($p=0.048$). Benign grupta; ortalama PSA 2.40, KDN 78.3, PIN grubunda; PSA 5.58 , KDN 145, Malign grupta ; PSA 16.7, PSA 175 olarak belirlenmiştir. Yapılan Kruskal Wallis Testi sonucuna göre her üç histolojik tip arasında PSA ve KDN'nin istatistiksel olarak farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$).

PSA ve KDN arasındaki oranlar benign, PIN ve malign gruplar arasında sırayla ikili analizlerde değerlendirilmiştir. Öncelikle; PSA ve KDN oranları benign ve PIN grupları arasında değerlendirildiğinde her iki grupta da fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bununla beraber benign ve PIN grupları arasında KDN'nin belirleyiciliğinin ($p<0.001$) PSA'ya göre ($p=0.02$) daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.7). Bu veri klinik kullanım için oldukça önemli görünmektedir. Intraepitelial neoplazilerde erken teşhiste PSA değerlerinden daha kıymetli bir analiz olma olasılığı bulunmaktadır.

Ranks				
Histo.Type		N	Mean Rank	Sum of Ranks
PSA	Benign	8	6,50	52,00
	PIN	11	12,55	138,00
	Total	19		
KDN	Benign	14	7,68	107,50
	PIN	15	21,83	327,50
	Total	29		

Test Statistics ^b		
	PSA	KDN
Mann-Whitney U	16,000	2,500
Wilcoxon W	52,000	107,500
Z	-2,323	-4,497
Asymp. Sig. (2-tailed)	,020	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,020 ^a	,000 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Histo.Type

Şekil 4.7. PSA ve KDN benign ve PIN grupları arasında değerlendirilmiştir.

Benign ve malign gruplar arasında PSA ve KDN oranları belirgin şekilde farklıdır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$). Bu analizler sonunda benign ve malign tümörleri ayırmak için her iki değerin de belirleyiciliğinin fazla olduğunu söylemek mümkündür (Şekil 4.8).

Ranks				
Histo.Type		N	Mean Rank	Sum of Ranks
PSA	Benign	8	7,13	57,00
	Malign	44	30,02	1321,00
	Total	52		
KDN	Benign	14	7,86	110,00
	Malign	45	36,89	1660,00
	Total	59		

Test Statistics ^b		
	PSA	KDN
Mann-Whitney U	21,000	5,000
Wilcoxon W	57,000	110,000
Z	-3,932	-5,537
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a	

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Histo.Type

Şekil 4. 8. PSA ve KDN benign ve malign gruplar arasında değerlendirilmiştir.

PIN ve malign gruplar arasında PSA ve KDN karşılaştırıldığında, PSA değerinde PIN ve malign gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ($p=0.005$) ancak KDN değerinin PIN ve malign grupların ayırd edilmesinde anlamlı olmadığı ($p=0.084$) görülmüştür

Ranks

Histo.Type	N	Mean Rank	Sum of Ranks
PSA PIN	11	15,77	173,50
Malign	44	31,06	1366,50
Total	55		
KDN PIN	15	23,77	356,50
Malign	45	32,74	1473,50
Total	60		

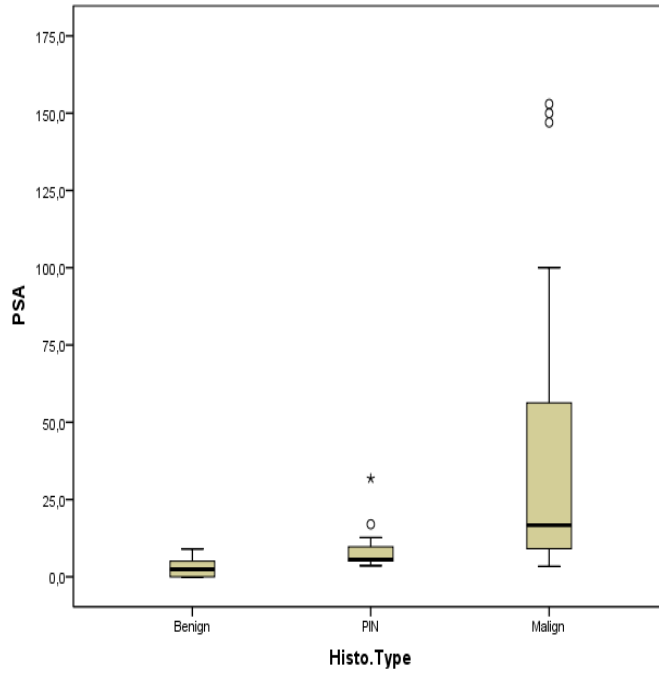
Test Statistics^a

	PSA	KDN
Mann-Whitney U	107,500	236,500
Wilcoxon W	173,500	356,500
Z	-2,830	-1,728
Asymp. Sig. (2-tailed)	,005	,084

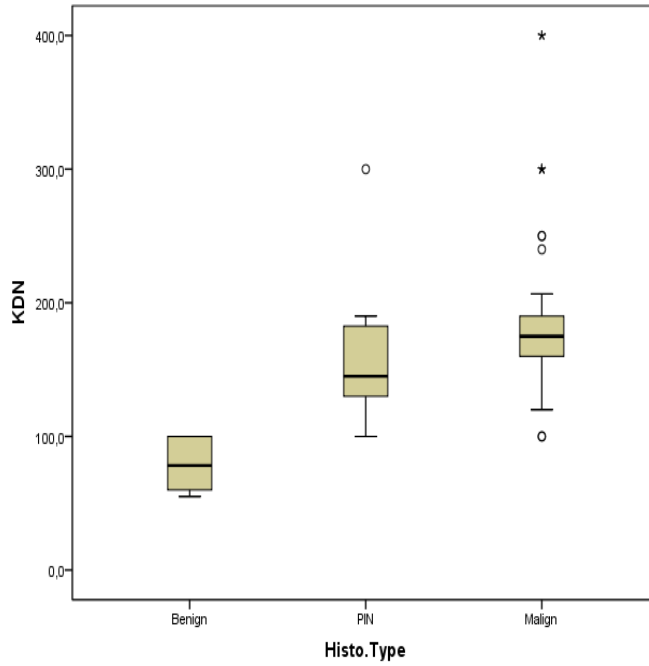
a. Grouping Variable: Histo.Type

Şekil 4. 9. PSA ve KDN PIN ve malign gruplar arasında değerlendirilmiştir.

PSA değerleri her üç grup arasında incelendiğinde malign grupta benign gruba göre belirgin artış bulunmaktadır. Malign gruptaki bu artış PIN grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmakla beraber çok belirgin değildir. Bu oran PSA'nın tümörün ilerlemesi ile yakın ilişkide olduğunu bir kez daha ortaya koymaktadır (Şekil 4.10). Bununla beraber bu çalışmada ön plana çıkan KDN immünoreaktivitesinin PSA değerlerinde görünmeyen şekilde PIN grubunda benign gruba göre belirgin olarak artmış olmasıdır (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. Benign, PIN ve Malign guruplar arasında PSA değerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 4. 11. Benign, PIN ve Malign guruplar arasında KDN değerlerinin karşılaştırılması.

Deney grupları arasındaki ilişki non-parametrik olarak Spearman's rho ile değerlendirilmiştir. KDN immünoaktivitesi ile PSA (p=0.511), Glisson skoru (p=0.387) ve Histolojik tip (p=0.623) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmaktadır. Bu çalışma PSA'nın hastanın yaşı (p=0.409), Glisson skoru (p=0.414), T (klinik evre) (p=0.635), histolojik tip (p=0.577) ve M (klinik evre) (p=0.498) ile korelasyon gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Hastalara ait Glisson skorları KDN (p=0.387) ve PSA (p=0.414) ile pozitif korelasyon göstermekle beraber T (klinik evre) (p=0.408) ve T (cerrahi evre) (p=0.508) ile de istatistiksel olarak ilişkili görülmektedir.

4.3.1. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları

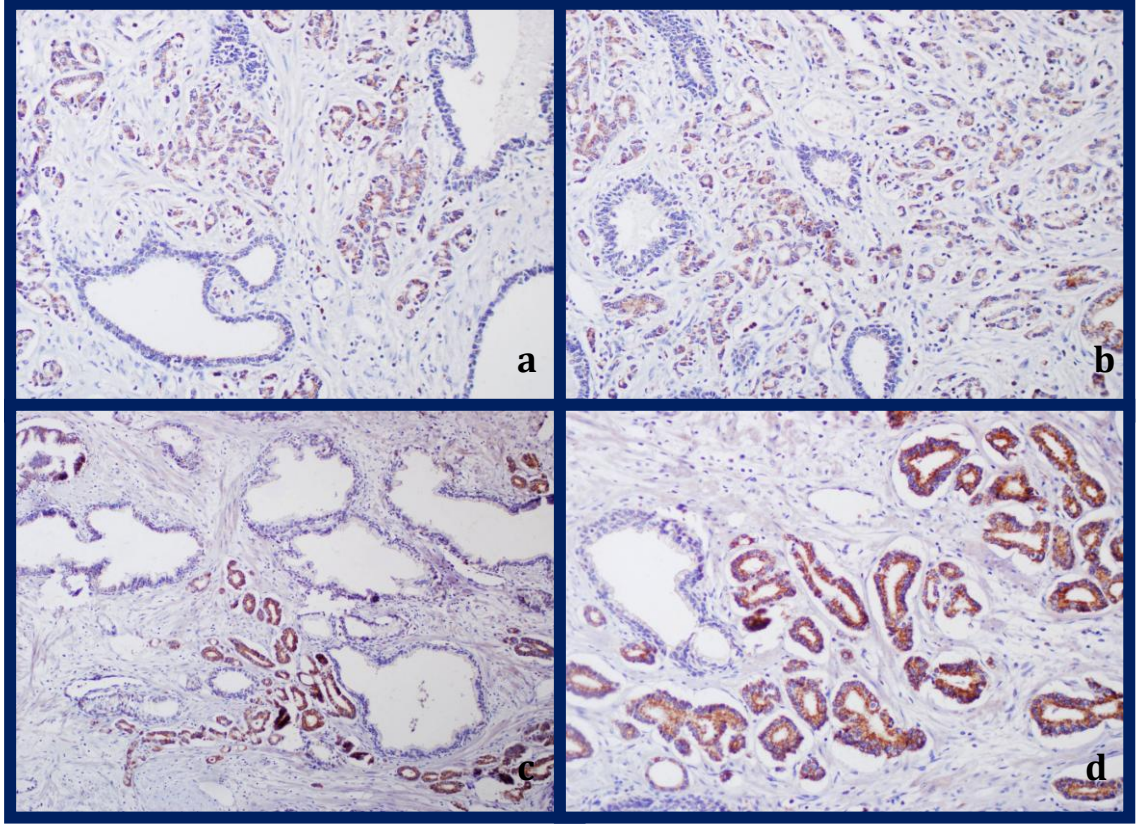
Bu çalışmada prostat kanseri biyopsi örneklerinde yapılmış olan immunohistokimyasal analizlerde KDN antikoru ile sitoplazmik granüler boyanmalar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Boyanan hücre yüzdesi yanı sıra boyanma şiddetine göre olgular 3 gruba (+/++/+++) ayrılmıştır. Tüm örnekler H skor ile değerlendirilmiştir.

$$H \text{ SCORE} = \sum P_i (i+1)$$

P_i: Her bir boyanma yoğunluğundaki hücre gurubunun yüzdesinin değerlendirilmesi

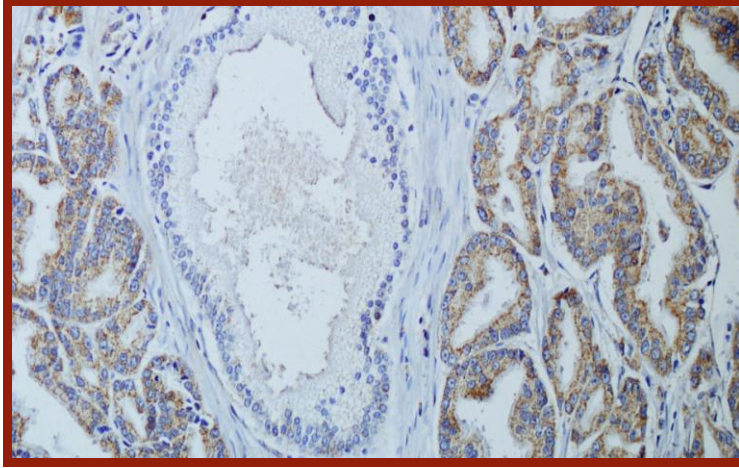
i: Hücrelerin boyanma yoğunluklarına göre 1, 2, 3 olarak değerlendirilmesi (sırasıyla zayıf, orta ve kuvvetli)

Prostat kanserinde farklı dilüsyonlarda immünohistokimyasal analizler yapılmıştır. Uygun dilüsyon bulunduğunda normal dokuda ne parankimde ne de stromal dokuda immünolojik tutunma gözlenmemiştir (Şekil 4.12). Bununla beraber kanser hücrelerinde farklı intensitelerde immünoaktivite tüm hasta örneklerinde dikkat çekmektedir. Damar duvarlarında, normal duktus yapısında ve ayrıca bağ dokusunda yer yer çok zayıf immünoaktivite artışı görülmekle beraber çoğunlukla tutunma izlenmemiştir (Şekil 4.13).

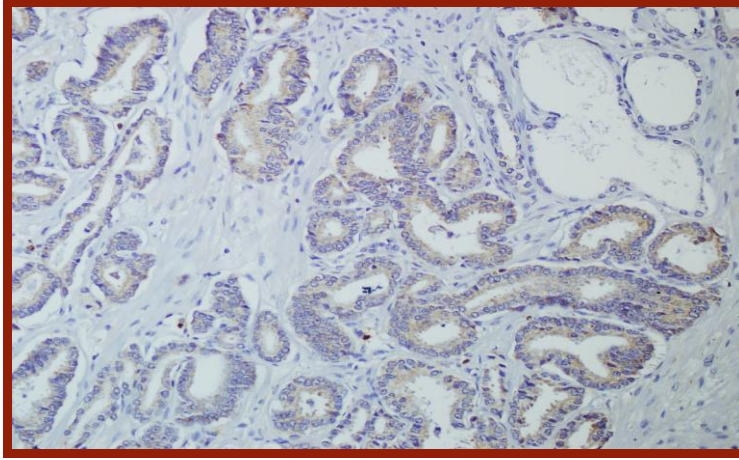


Şekil 4. 12. a-b:KDN ile malign prostatik asinuslarda (++) sitoplazmik granüler boyanma izlenirken, benign prostatik duktuslarda boyanma izlenmemiştir.

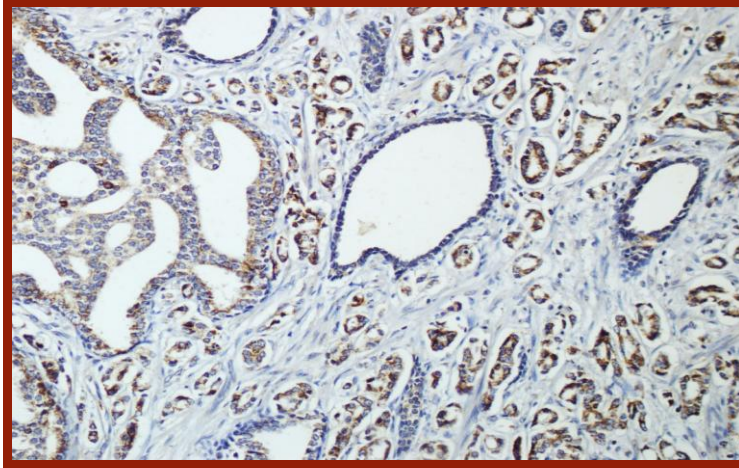
c-d: KDN ile malign prostatik asinuslarda (+++) sitoplazmik granüler boyanma izlenirken, benign prostatik duktuslarda boyanma izlenmemiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.13. a: KDN ile malign prostatik asinuslarda (++) sitoplazmik granüler boyanma izlenirken, benign prostatik duktuslarda boyanma izlenmemiştir.

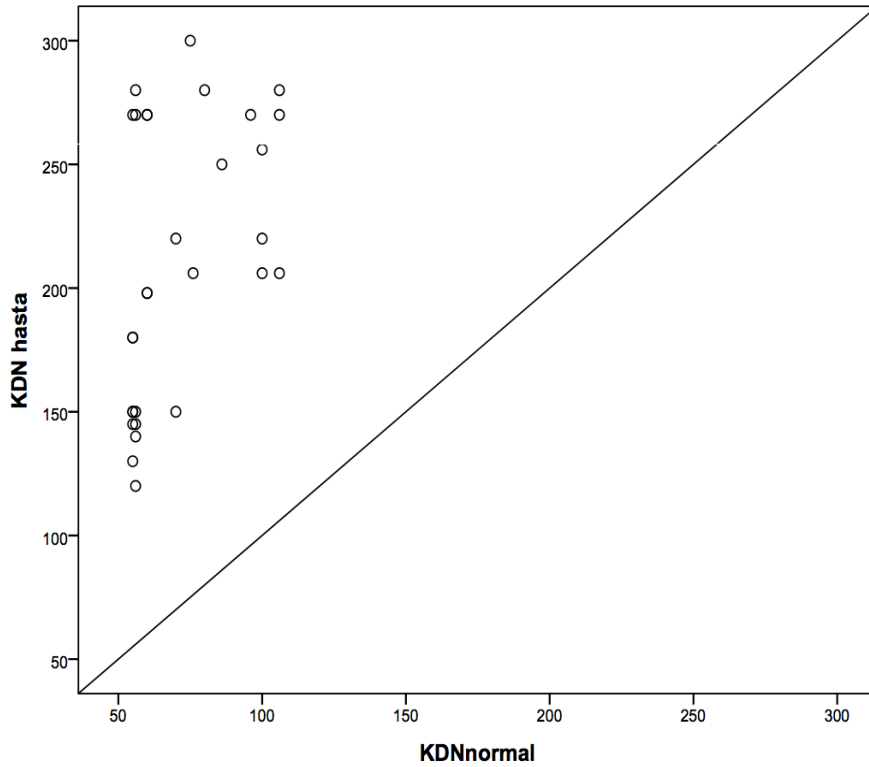
b: KDN ile malign prostatik asinuslarda (+) sitoplazmik granüler boyanma izlenirken, benign prostatik duktuslarda boyanma izlenmemiştir.

c: KDN ile malign prostatik asinuslarda (+++) sitoplazmik granüler boyanma izlenirken, benign prostatik duktuslarda boyanma izlenmemiştir.

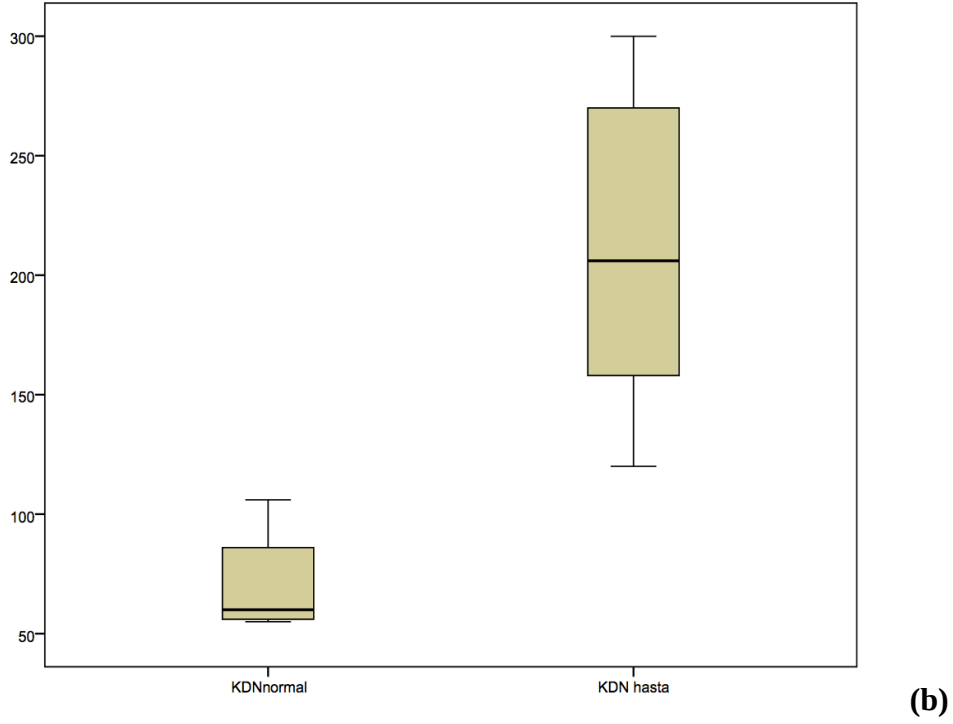
4.4. Meme Kanseri Biyopsi Örneklerinden Elde Edilen Bulgular

52 meme kanseri hastasından (invaziv duktal karsinom, in situ komponenti baskın invaziv duktal karsinom, invaziv lobüler karsinom) alınan biyopsi örnekleri klinik izlemleri ile birlikte değerlendirilmeye alınmıştır. Hastalara ait biyopsilerde 52 tümör dokusu örneğinin yanında 30 hastada normal meme dokusu belirlenmiş ve “KDN normal” grubu olarak incelemeye alınmıştır. Biyopsi örnekleri hazırlanan parafin bloklardan kesitler alınarak lam üzerine yerleştirilmiş ve KDN poliklonal antikor kullanılarak immünohistokimyasal olarak boyanmıştır.

Öncelikle KDN immünoaktivitesi normal doku ve tümör dokusu arasında karşılaştırılmıştır. KDN immünoaktivitesi tümör dokularında belirgin olarak artmıştır. Fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.011$) (Şekil 4. 14 a ve b).



(a)



Şekil 4.14. KDN analizleri hastalarda ve hasta olmayan grupta iki ayrı grafikte sunulmuştur. **a:** KDN immünoreaktivitesi hastalara ait tümör dokusu örneklerde normal dokulara göre belirgin olarak artmıştır. **b:** İki grup arasında fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

KDN'nin normal dokulara göre tümör dokusunda artmış ifadesi belirlendikten sonra tümör dokusu örneklerinde KDN immunoreaktivitelerine ait H-score sonuçları hasta klinik verileri ile karşılaştırılmıştır. Hasta klinikleri; tanı, hasta yaşı, tümör çapı, östrojen reseptör pozitifliği (er), progesteron reseptör pozitifliği (pr), her2 pozitifliği (her2) ve TNM klasifikasyonu yönüyle ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Hastalara ait tümör biyopsi örnekleri aldıkları tanılara göre;

- (1)-İnvaziv duktal karsinom
- (2)-İn situ komponenti baskın invaziv duktal karsinom
- (3)-İnvaziv lobuler karsinom olarak gruplara ayrılmışlardır.

KDN hasta tümör değerleri tanı grupları ile karşılaştırıldığında gruplar arasında fark anlamlıdır ($p=0.025$) (Şekil 4.15).

Ranks		
	tanı	N
KDN hasta	1	38
	2	7
	3	3
	Total	48
		Mean Rank
		23,88
		34,50
		9,00

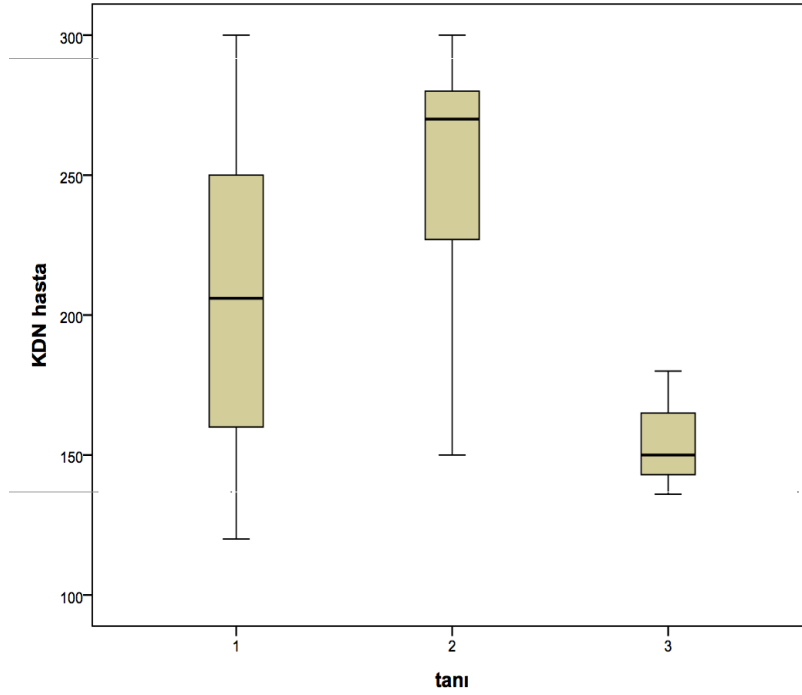
Test Statistics ^{a,b}	
	KDN hasta
Chi-square	7,378
df	2
Asymp. Sig.	,025

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: tanı

Şekil 4.15. Tüm gruplarda meme kanseri hastalarına ait KDN immünoreaktivitelerinin tümör tipleri ile karşılaştırılmasında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır.

İkili analizlere geçildiğine 1. ve 2. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p=0.055$). Benzer şekilde 1. ve 3. gruplar arasında da istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ($p=0.059$). 2. ve 3. guruplar karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p=0.031$) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Tanı grupları aralarında (1)-İnvaziv duktal karsinom (2)-İn situ komponenti baskın invaziv duktal karsinom (3)-İnvaziv lobuler karsinom olarak numaralandırılmıştır ve 2. ve 3. gruplar karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($p=0.031$).

KDN immünoaktiviteleri hastaların “grade”leri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı gözlenmiştir ($p=0.331$) (Şekil 4.17).

Ranks			
	grade	N	Mean Rank
KDN hasta	1	3	12,67
	2	28	24,91
	3	16	24,53
	Total	47	

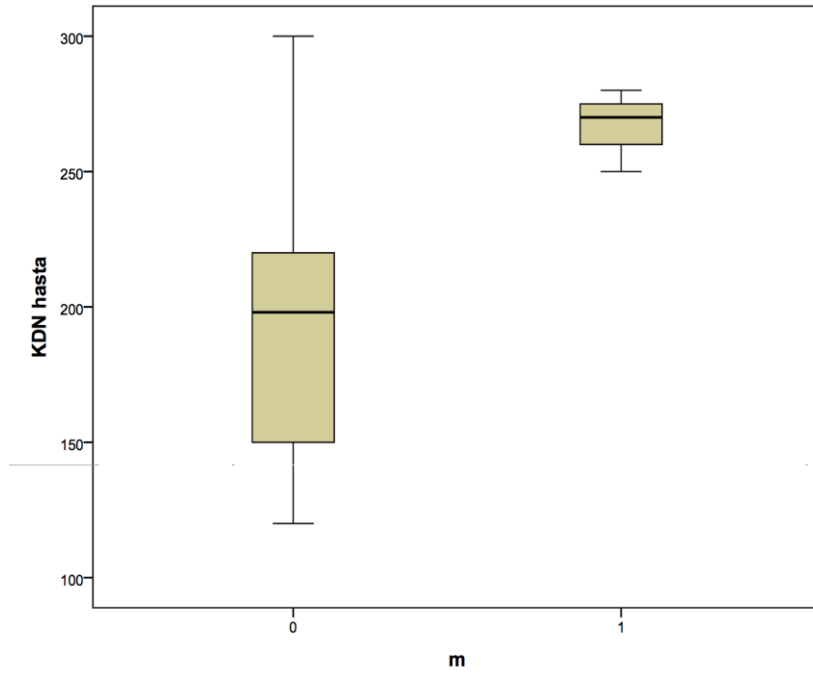
Test Statistics ^{a,b}	
	KDN hasta
Chi-square	2,214
df	2
Asymp. Sig.	,331

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: grade

Şekil 4.17. Hastalarda “grade” ve KDN immünoreaktivitesi arasında istatistiksel bir anlamlılık yoktur.

Hastalar TNM klasifikasyonu yönünden ayrı ayrı değerlendirilmiştir. KDN immünoreaktivitesi ile T ve N skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.071$ ve $p=0.693$, sırasıyla). Bununla beraber “Metastaz” ile anlamlı bir bağlantı vardır ($p=0.018$) (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. KDN immunoreaktivitesi ile hastalarda görülen metastaz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (p=0.018).

4.4.1. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları

Meme kanseri biyopsi örneklerinde yapılmış olan immünohistokimyasal analizlerde KDN antikoru ile sitoplazmik granüler boyanmalar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Boyanan hücre yüzdesi yanı sıra boyanma şiddetine göre olgular 3 gruba (+/++/+++) ayrılmıştır. Tüm örnekler H skor ile değerlendirilmiştir.

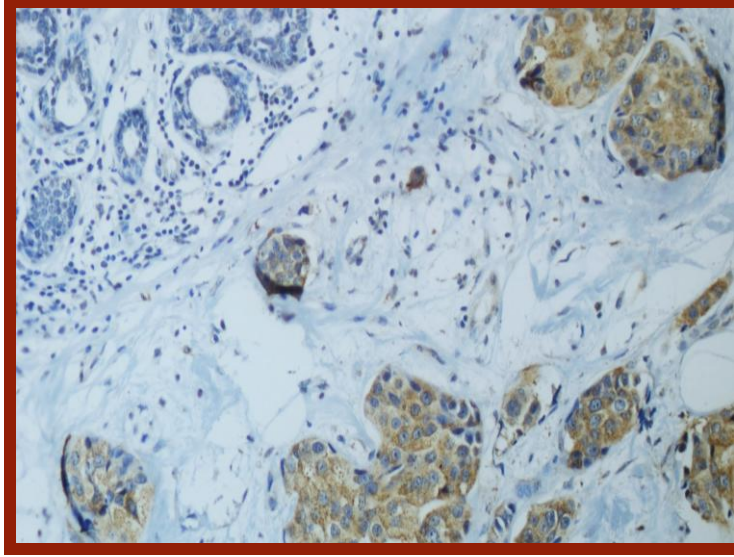
$$H \text{ SCORE} = \sum P_i (i+1)$$

P_i: Her bir boyanma yoğunluğundaki hücre grubunun yüzdesinin değerlendirilmesi

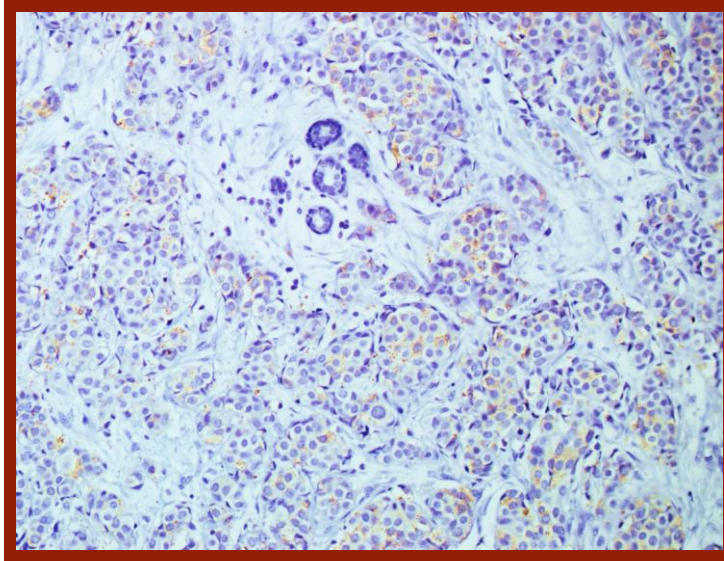
i: Hücrelerin boyanma yoğunluklarına göre 1, 2, 3 olarak değerlendirilmesi (sırasıyla zayıf, orta ve kuvvetli)

Prostat kanseri örneklerinde olduğu gibi meme kanserinde de histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler yapılmıştır. Uygun dilüsyonda (1/1200) normal dokuda parankimde ve stromal dokuda immünolojik tutunma gözlenmezken tümör dokusunda belirgin bir immünoreaktivite artışı izlenmiştir. Bununla beraber kanser hücrelerinde farklı yoğunluklarda immünoreaktivite tüm hasta örneklerinde dikkat

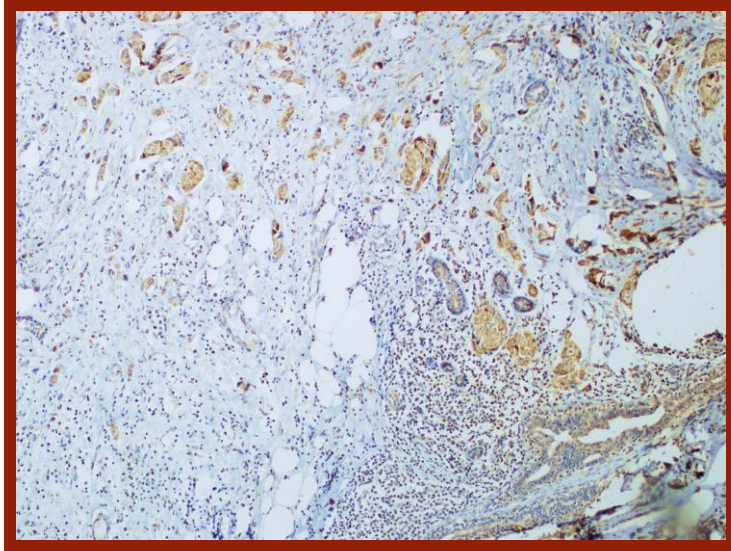
çekmektedir. Prostat kanseri örneklerine benzer şekilde damar duvarlarında ve normal meme duktuslarında, ayrıca bağ dokusunda yer yer çok zayıf immunoreaktivite artışı görülmekle beraber çoğunlukla tutunma izlenmemiştir (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).



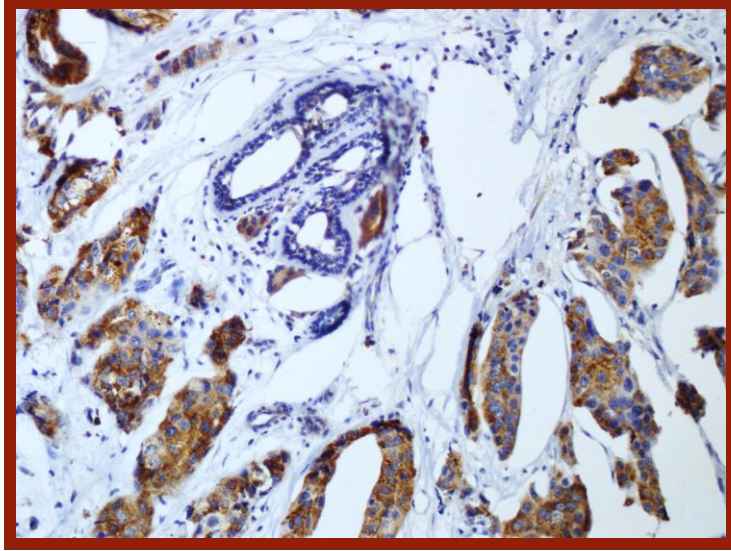
(a)



(b)

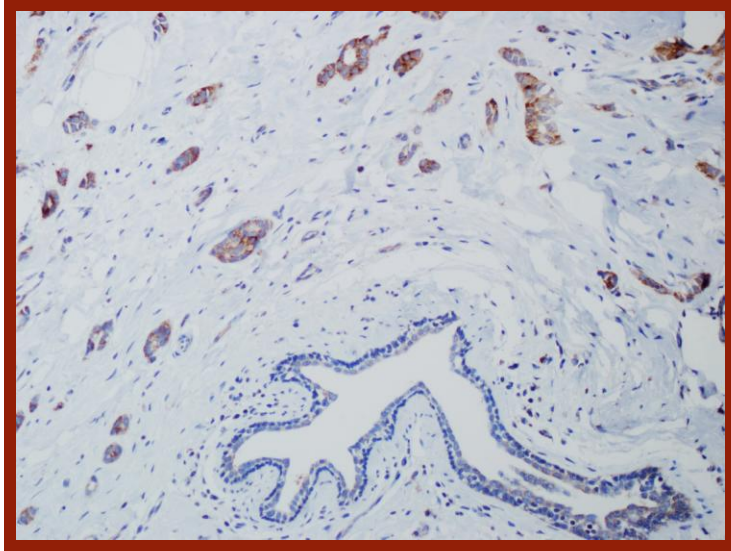


(c)

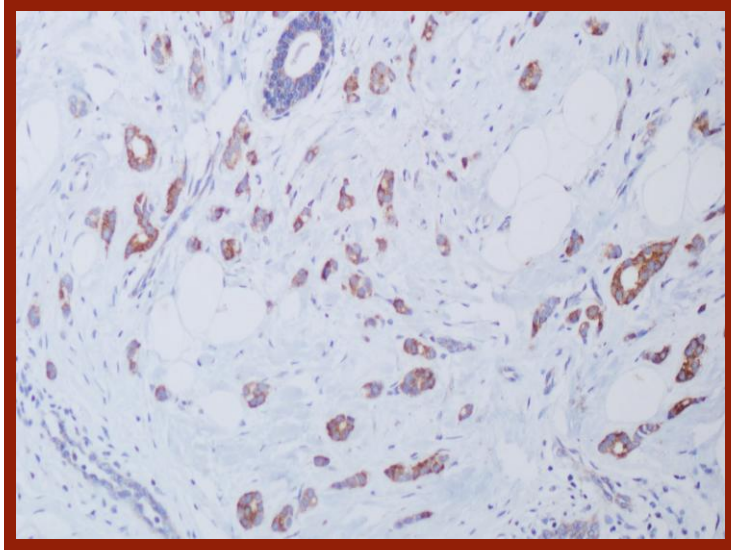


(d)

Şekil 4.19. a: KDN ile malign meme duktuslarında (++) sitoplazmik granüler boyanma izlenirken, benign duktuslarda boyanma izlenmemiştir. **b:** KDN ile malign meme duktuslarında (++) sitoplazmik granüler boyanma izlenirken, benign duktuslarda boyanma izlenmemiştir. **c:** KDN ile malign meme duktuslarında (+) sitoplazmik granüler boyanma izlenirken, benign duktuslarda boyanma izlenmemiştir. **d:** KDN ile malign meme duktuslarında (+++) sitoplazmik granüler boyanma izlenirken, benign duktuslarda boyanma izlenmemiştir.



(a)



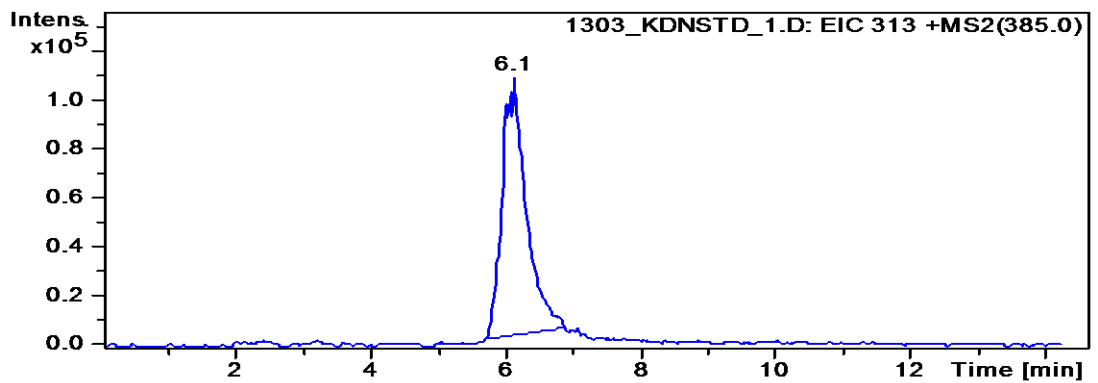
(b)

Şekil 4.20. KDN ile malign meme duktuslarında (+++) sitoplazmik granüler boyanma izlenirken, benign duktuslarda boyanma izlenmemiştir.

4.5. KDN Molekülünün LC-MS Analizi Bulguları

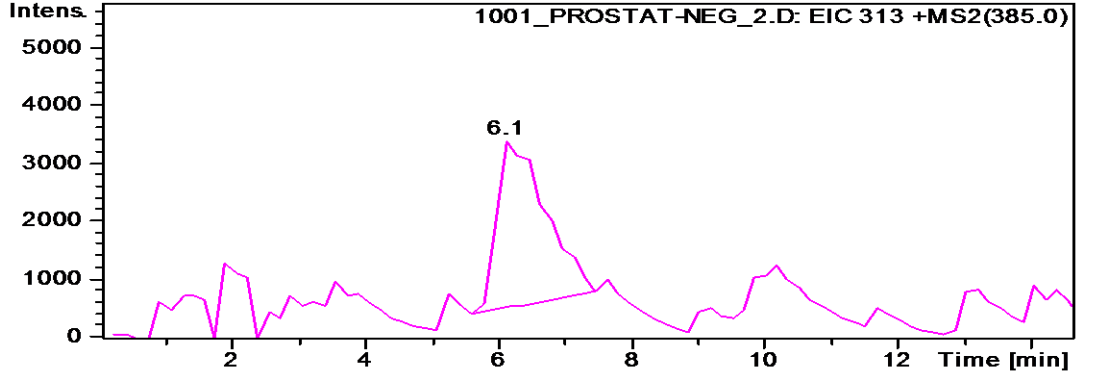
4.5.1. Kanser Kök Hücrelerinin ve Kanser Kök Hücresi Olmayan Grubun Analiz Bulguları

Bu analize ait birinci deney KDN standardına ait pikin yerini göstermek için planlanmıştır (Şekil 4.21). Hücre hatlarında aranan pikin lokalizasyonu belirlendikten sonra hücreler hazırlanmıştır.

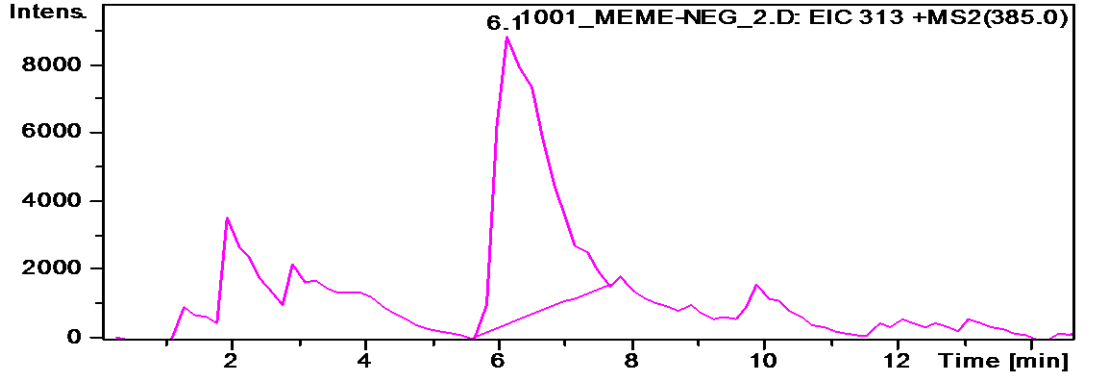


Şekil 4.21: KDN standart ile belirlenen oran şekilde sunulmuştur.

DU145 insan prostat kanseri hücre hattından elde edilen kanser kök hücreleri ve kanser kök hücresi olmayan gruba ait hücreler toplanarak LC-MS analizi yapılmıştır. Kanser kök hücreleri ile ilgili her iki kanser tipinde de (prostat ve meme) analiz sonucunda belirgin bir KDN pikine rastlanamamıştır. Bununla beraber kanser kök hücresi olmayan grupta ise hem prostat kanserinde (Şekil 4.22) hemde meme kanserinde (Şekil 4.23) KDN piki izlenmiştir.



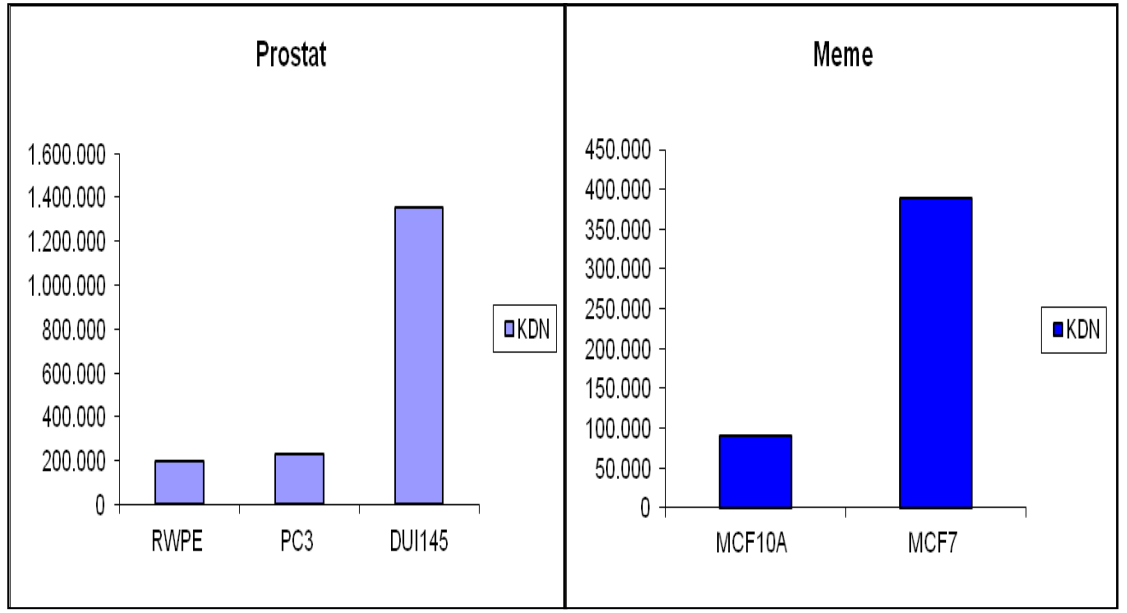
Şekil 4.22. Du145 insan prostat kanseri kanser kök hücresi olmayan grupta KDN ye ait yoğunluk gösterilmektedir.



Şekil 4.23. MCF-7 insan meme kanseri kanser kök hücresi olmayan grupta KDN ye ait yoğunluk gösterilmektedir.

4.5.2. Hücre Hatlarında Analiz Bulguları

Prostat kanser analizi için normal prostat epitel hücre hattı (RWPE-1) ve insan prostat kanser hücre hatları (PC3 ve DU145), meme kanseri için non invaziv meme kanseri hücreleri (MCF-10A) ve invaziv meme kanserine ait (MCF-7) hücrelerden izole edilen hücreler toplanmış ve LC-MS analizi için hazırlanmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4. 24: Prostat ve meme kanserinde LC-MS analiz sonuçları

Yapılan analiz sonucunda prostat kanserinde PC3 hücrelerinde KDN miktarının normal epitel hücrelerine göre değişmediği ancak DU145 hücrelerinde belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. Meme kanserinde MCF-7 hücrelerinde KDN miktarının non-invaziv kanser hücrelerine göre belirgin oranda arttığı gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu araştırmanın sonunda kanser hücrelerine spesifik olarak bağlandığı belirlenen bir antikör bulunmuştur. Tez konusu prostat ve meme kanserlerini hedeflemektedir ve bu sebeple öncelikle bu iki kanser tipinde araştırmalar başlatılmıştır. Ancak araştırma laboratuvarımızda diğer solid tümörlerle ilgili çalışmalar devam etmektedir. Pek çok organ tümöründe özellikle immünohistokimyasal olarak benzer sonuçlar alınmaktadır.

KDN molekülü ilk defa Inoue Y. tarafından 1986 yılında yayınlanan bir makale ile bilim dünyasına giriş yapmıştır. Bu makalede KDN'nin gökkuşağı alabalığı yumurtalarında oligosakkarit zincirinin son kısmının indirgenmediği bir polisialoglikoprotein olması nedeni ile doğada tek olduğundan bahsedilmiştir. KDN içeren oligosakkaritler pH=7.4'de katalizlenen bir hidrolizle polisialoglikoproteinlerden elde edilmişlerdir (93). Aynı ekip 2 yıl sonra KDN molekülünü gökkuşağı alabalığı (*Salmo gairdneri*) fertilize olmamış yumurtasında perivitellin alanda izole etmişlerdir. Bu makalede KDN glikoproteinlerinden bahsedilmiş ve glikoproteinlerin KDN içerdiği ancak asidik karbonhidratlar şeklinde sialik asit içermedikleri anlatılmıştır. Ayrıca KDN'nin major karbonhidrat komponentinin Gal. ve GalNAc olduğu söylenmiştir. Thr ve Ala'nin %71 (mol/mol) oranında bulunan aminoasit içeriği olduğu dikkat çekmektedir. KDN-KDN'nin olası bağlantısının (örneğin oligo-KDN gruplarının) kor proteinine O-glikolizasyonla bağlandığı bildirilmiştir (94). KDN *Klebsiella*'nın (museum strain 2211 of *Klebsiella ozaenae* serotype K4) kapsuler polisakkarit yapısında da bulunmaktadır (95). Nakamura M. ve ark. KDN'yi *Oncorhynchus keta* adındaki bir tür somon balığının fertilize yumurtasından HPLC yöntemi ile elde ettiklerini yazmışlardır (96).

Bu çalışmadan 1 yıl sonra ise yine Inoue Y. ve ark. gökkuşağı alabalığı yumurtasında ovaryum sıvısında KDN izole etmişlerdir (97). 1993 yılında ise ilk defa monoklonal antikörünü üretmişlerdir (98). Hibridomalar için fare myeloma hücreleri ve immunizasyonlar için gökkuşağı alabalığı sperminden izole ettikleri KDN-gangliozid (KDN-GM3) kullanılmıştır. Inoue Y. ve arkadaşları 1994 yılında yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri antikörü ilk defa immünolojik işaretlemede kullanmışlardır (99). Bizim çalışmamız ise bundan tamamen farklıdır. Bu çalışmada sentetik bir kimyasal olarak 3-Deoksi-D-glysero-D-

galaktononulopyranosonic asit ($C_9H_{16}O_9$) kullanılmıştır. Molekül ağırlığı 268,22 g/mol 'dür. Bu sebeple elde edilen antikör literatürde ilktir.

KDN sıklıkla GM3 (monosialodihexosylganglioside) veya GM4 (Monosialoganglioside)'e bağlı olarak bulunmaktadır. Gangliozidlerin özellikle de GM3 ve GM4'ün immünsüpresif aktivitesi olduğu ve gangliozidlerle oluşan bileşiklerin immünsüpresyonda farklı etkiler yapabildiği ancak KDN ile bağlı GM3 ve GM4 'ün immünsüpresif olduğu belirlenmiştir (100). Sialik asitler ve KDN pek çok bakterinin ve virüsün polisakkarit kapsüllerinde bulunan moleküllerdir. İmmün yanıtta kaçışları da kapsülde bulunan gangliozidlerin yardımıyla gerçekleşiyor olabilir. Burada artık kanser hücrelerinin immün yanıtta nasıl kaçabildikleri ile ilgili bir giriş yapmakta fayda olabilir. Bu tezde kanser hücre yüzeyinde bulunan KDN molekülünün kanser hücrelerine spesifik olduğunu göstermiştik. Dolayısı ile kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan KDN sayesinde hücreler bakteri ya da virüsleri taklit ederek immün yanıtta kaçıyor olabilirler. Bu da tabi ki olası tedavi modellerini akla getirmektedir.

KDN ile ilgili çalışmalar çeşitli canlılarda (*Xenopus laevis* yumurtası ve spermi (101), *Sphingobacterium multivorum* (102) ve deniz kestanesi (103) devam etmiş, ardından içinde Inoue Y. ve ekibinin de bulunduğu bir araştırma grubu tarafından ilk defa memelilerde incelenmiştir. Bu çalışmada KDN'nin memelilerde her üç germ yaprağından köken alan farklı dokularda, organlarda, ekstraselüler matrikste ve bazal membranda bulunduğu belirtilmiştir. Bununla beraber KDN kasta, böbrekte, akciğerde ve beyinde gelişimsel olarak regüle edilmektedir. Geniş doku yayılımına rağmen, sadece 150 kDa ağırlığındaki bu glikoprotein, böbrekte 350 kDa'dan fazla büyüklükte bir glikoprotein olarak farklı şekilde bulunmaktadır (104). Bu tezde kullanılan standart kimyasal olarak KDN'nin molekül ağırlığı 268,22 g/mol'dür. Dolayısı ile standart bir antikör büyüklüğüne ulaşılmıştır. Bu antikör kullanılarak yapılan immünohistokimyasal analizlerde dilüsyonla tamamen ortadan kaldırılabilen bir normal doku boyanması elde edilmiştir. Bununla beraber meme kanseri çalışmalarında hastalara ait biyopsi örneklerinde deride ekstraselüler matrikse göre hafif artmış bir immünoreaktivite gözlenmiş, bunun üzerine farklı örneklerde analiz tekrarlanmıştır. Bu çalışma sonucunda KDN immünoreaktivitesinin çok az da olsa epidermiste artmış olduğu gözlenmiştir. İlerleyen çalışmalarda bunun tedavi için bir yan etki oluşturabilme olasılığı incelenecektir.

Deaminoneuraminosyl-glycohydrolase (KDNase) enzimi doğada bulunmakta olan KDN'nin glikokonjugatlarla yapmış olduğu bağlantının hidrolizini katalizlemektedir. Bu enzim KDN ile ilgili fonksiyonel ve gelişimsel çalışmalar için gereklidir, çünkü KDN residüleri sialidaz aktivitesine rezistandır (105). Ayrıca bu enzim KDN'ye spesifiktir ve ayrı bir çalışma konusu oluşturmaktadır. Araştırma gurubumuzun da KDN ile ilişkili enzimlerin KDN-onkogenezis ilişkisinde değerlendirilmesi ile ilgili ayrı bir çalışması bulunmaktadır.

KDN-Kanser ilişkisi ilk defa 1996 yılında önceleri aynı ekipte olan ancak sonra ayrılan 2 grup tarafından aynı yıl içinde gösterilmiştir. KDN molekülünün 150 kDa ağırlığında bir "onkocodevelopmental" antijen olduğu ilk defa Qu B. ve arkadaşları tarafından 1996 yılında akciğer dokusunda gösterilmiştir. Çalışma PNAS'da yayınlanmıştır ve 2,8-bağlı N-acetylneuraminic acid [poly(alpha 2,8-Neu5Ac) ile beraber 2,8-linked deaminoneuraminic acid [poly (alpha 2,8-KDN)] residülerinin de akciğer gelişimi sırasında önemli rol oynadığı ve bu molekülün akciğer kanseri için spesifik bir belirteç olabileceği belirtilmiştir. Antikor gökkuşağı alabalığında perivitellin alandan elde edilmiştir (106). Onkoloji ile ilgili ilk yayını yapmalarına rağmen bu ekibin ilerleyen çalışmaları KDN'nin gelişimsel olarak önemini açıklamaya yönelmiştir. İlerleyen çalışmalarında poly alpha2,8 KDN taşıyan glikoproteinin böbrekte bulunduğunu ve bu molekülün proteolitik segmentlerinin aminoasit sekanslarının LDL reseptör ailesinin bir üyesi olan "Megalin" ile homolog olduğunu göstermişlerdir (107). Megalin o-glikolizasyonla Alfa 2,8 deaminoneuraminic acid (KDN)'i taşımaktadır ve pek çok normal dokuda ve karsinoma hücre hattında gösterilmiştir (108). Bu araştırma grubu KDN'nin seruloplazminde varlığını gösterdikten sonra bu konu ile ilgili çalışmaları son bulmuştur (109). Megalin aynı zamanda bir D vitamini transport proteindir ve onkolojik bağlantısına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (110-112). Ancak KDN ile ilişkisini aydınlatmak için ilerleyen çalışmalar yapılmamıştır.

Aynı yıl KDN molekülünün kanserle ilişkisini gösteren başka bir çalışma Inoue Y. ve ekibi tarafından yayınlanmıştır. KDN domuz submaksiller tükürük bezinden izole edildikten sonra akciğer kanseri hücre hattında ve memeli dokularında gösterilmiştir. Sıçanlarda yapılan çalışmada yağ dokusunda, serebellumda, neokorteksde, olfaktor bulbusta, kalpte, böbrekte, akciğerde, kasta, submaksiller bezde, dalakta ve timusta çok az miktarda KDN varlığı saptanmıştır. KDN miktarı tayininde kütle spektrometrisi, HPLC, gaz-sıvı kromatografisi ve

NMR spektroskopisi kullanılmıştır. Akciğer kanseri KDN düzeyi A125, A549, Calu ve Hotz karsinoma hücre hatlarında araştırılmıştır (113).

KDN'nin tümör dokularında varlığı ile ilgili araştırmalar bu çalışmalarla hız kazanmıştır. KDN insan periferik kanında eritrositlerde, kordon kanındaki eritrositlerde ve over kanserinde izole edilmiştir. (114). Bu çalışmada sialik asit analizleri HPLC kullanılarak belirlenmiştir. Tümör biopsi örnekleri normal over dokusu ile karşılaştırılmıştır. Ancak ilginç bir şekilde kaç hastadan hangi tip tümör dokusu alındığı, etik kurul varlığı gibi veriler hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Tümör dokularında artmış olarak belirlenen KDN miktarı tümörlerde KDN'nin erken tanı amacıyla kullanılabileceğini ilk defa gündeme getirmiştir.

Bu çalışmadan 8 yıl sonra yapılan çalışmada KDN miktarının dokularda çok az olmasının klasik sialik asit tarama yöntemleriyle tespiti güçleştirdiği üzerinde durulmuştur. Serbest KDN/serbest Neu5Ac oranının over adenokarsinomlarının tanısında ve evresinin belirlenmesinde yardımcı olabileceği düşünülmüştür. 30 kDa ağırlığındaki KDN-glikoprotein kompleksinin, membran fraksiyonundan izole edildiği, immünohistokimyasal boyanmaya uygun olduğu (mAb.kdn3G KDN α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ epitopuna spesifik) ve KDNase'a duyarlı olduğu bildirilmiştir. 49kDa ağırlığındaki KDN-glikoprotein kompleksinin mAb.kdn3G ile reaktivitede bulunmadığı, çözünmüş şekilde elde edildiği ve ancak KDNase'a duyarlı olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada PA-1 over teratokarsinoma hücreleri üzerine mannozdan zengin ortamda çoğaltıldığında bağlı ve serbest KDN miktarının arttığı belirlenmiştir (115). Farelere diyetle mannoz verildiğinde organlarda KDN oranının arttığı gözlenmiştir (116). Hipoksik ortamın da kanser hücre hatlarında sialik asit ve KDN oranını arttığı belirlenmiştir (117). Bu tez yazıldığı döneme kadar KDN'nin kanser hücrelerinde artışı ile ilgili yapılmış en son çalışma 2012 yılında Myomato Y. ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Ekip önceki çalışmalarında Neu5Ac-içeren kompleks tip-N-glikanların pankreas kanserinde artmış olduğunu göstermişlerdir (118). Konuyla ilgili yaptıkları en son çalışmada prostat kanserinde glikomik analizi yaparak inceledikleri 5 hastanın 4'ünde artmış KDN oranı belirlemişlerdir (119). Bu çalışma bizim araştırmamızı destekler niteliktedir.

KDN molekülü ile ilgili bugüne kadar yapılmış olan araştırmalar etki mekanizmasını aydınlatabilmek adına yol göstericidir. Ancak KDN, bu çalışma ile

ilk defa kanser kök hücresi ve kanser kök hücresi olmayan hücrelerde, hücre hatlarında ve ayrıca iki farklı kanser tipindeki hasta serilerinde, klinik korelasyonları ile birlikte incelenmiştir. Bu tez konusunun dışında da tamamlanan ve devam etmekte olan çalışmalar bulunmaktadır. Farklı tedavi protokolleri 1003 TÜBİTAK projesi ile devam etmektedir. Monoklonal antikor üretme çalışmaları sürmektedir. Mide, mesane kanserleri ve malign melanomada biopsi örneklerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu örneklerde malign melanomada spesifik immünoreaktivite belirlenirken, normal deri örneklerinde tutunma izlenmemiştir. Diğer solid tümörlerde de çalışmalar sürmektedir. Araştırma grubumuz kanser tanısı ve tedavisinde, hasta refahı ve yaşam kalitesi adına bir adım daha atabilmek için çalışmalarını sürdürmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Farklı disiplinlerden bilim insanlarının dönem dönem ilgisini çeken KDN molekülü, enzimatik reaksiyonları ve metabolizması ile pek çok çalışmada yer almıştır ancak kanser ile ilişkisi, özellikle insan materyalindeki durumu hakkında literatür verileri oldukça sınırlıdır. Detaylı kimyasal çalışmalar KDN sentezi ve metabolizmasının aydınlatılmasında önemli bir yol kat edilmesini sağlamış görünmektedir ancak tümörlerle ilgili daha çok bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tezin *in vivo* analizler aşamasında KDN poliklonal antikorları kullanılarak normal prostat dokusu (n=14), prostatik intraepitelyal neoplazi (n=15), prostat adenokarsinomu (n=45), normal meme dokusu (n=30) ve meme karsinomu (n=52) içeren dokular üzerinde immünohistokimyasal inceleme yapılmış ve bu analizler hasta klinikleri ile karşılaştırılmıştır. Çalışma literatürde ilk olmakla beraber sonuçlar yönüyle incelendiğinde teşhis ve tedavide klinik kullanıma uygun veriler ortaya çıkmıştır.

Bu tezde ilk defa kimyasal bir standart antijen verilerek poliklonal antikor elde edilmiştir. Önceki çalışmalarda kullanılan antikorlar başta gökkuşağı alabalığı yumurtası olmak üzere farklı organizmalardan alınmış dokulardan ekstrakte edilen KDN antijeni kullanılarak elde edilmiştir. Bu yönüyle çalışma orjinaldir ve uluslararası patent başvurusunda bulunulmuştur.

Prostat ve meme kanser hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalarla elde edilen *in vitro* veriler literatürde ilktir. KDN oranının kanser hücrelerinde artması yönüyle değerlendirildiğinde bundan önceki çalışmaları desteklemektedir. Kanser kök hücresi son yıllarda bütün dünyanın ilgisini çeken bir konu olmakla beraber kanser kök hücresinde KDN miktarı daha önce araştırılmamıştır. Bu yönüyle de elde edilen veriler literatürde bir ilk olacaktır. Bununla beraber kanser kök hücresi ile ilgili yapılmış olan çalışmalar bu hücrenin kanserin tedaviye direncinden, rekürrensinden ve relapsından sorumlu olan hücreler olduğunu, dolaşımdaki tümör hücrelerinin kanser kök hücrelerinin diferansiye olması ile oluştuğunu ve metastaz yaptığını ortaya koymuştur. Bu tezde kanser kök hücrelerinde KDN miktarı çok az miktarda ölçülürken, tümör yığını oluştururan kanser kök hücresi olmayan hücreler (non-KKH) daha yüksek oranda KDN ifade etmişlerdir. Man-6-P düzeyi de benzer şekilde KKH olmayan grupta yüksektir. Diğer taraftan *in vivo* çalışmalara bakıldığında KDN immünoaktivitesi prostat kanserinde PIN grubunda belirgin

şekilde artarak, prostat kanseri teşhisinde sıklıkla kullanılan PSA'dan daha belirleyici hale geçmektedir. Benign dokuda malign dokuya göre belirgin şekilde yüksektir.

Prostat kanserinde KDN immünoaktivitesi Glisson skoru ve hastanın tüm klinik bulguları ile uyum göstermektedir. Progresif gidiş ve ileri dönem hastalıkla KDN immunohistokimyası korelasyon göstermektedir. Meme kanserinde sonuçlar prostat kanseri kadar çarpıcı olmamakla beraber benign dokuya göre KDN immünoaktivitesinde belirgin bir artış vardır. Diğer önemli bulgu ise metastatik hastalıkta immünoaktivitenin artıyor olmasıdır.

Bu sonuçlar *in vitro* kanser kök hücresi analiz sonuçları ile çelişmektedir. Tümör hücre yığını içerisinde zararsız görünen ve tedaviye duyarlı olan hücrelerde KDN yüksekken, malign hücrelerde düşüktür. Oysa ki *in vivo* sonuçlarda progresif tümörde immünoaktivite fazladır. Bu en az iki düşüncüyü akla getirmektedir. Bunlardan birincisi çalışma gurubumuzun da uzun zamandır araştırma konusu olan “Kanser kök hücresi” nin yıllardır tartışıldığı üzere bir teorem olabileceği, ikincisi ise, ki daha gerçekçi olan gibi görünmektedir, tümörün progresyon için birden fazla yol kullanabileceği gerçeğidir.

Bu tezde kullanılan antikor prostat kanseri ve meme kanseri erken tanısında kullanılabilir. İnce iğne biyopsisi ile alınan örneklerde bile tanı koydurabilecek spesifik immünoaktiviteyi göstermektedir. Bu da çeşitli tedavi modellerini düşünebilme olasılığını arttırmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003 Sep 15;63(18):5821-8
2. Blagosklonny MV. Cancer stem cell and cancer stemoids: from biology to therapy. *Cancer Biol Ther.* 2007 Nov;6(11):1684-90. Epub 2007 Oct 10
3. Salcido CD, Larochelle A, Taylor BJ, Dunbar CE, Varticovski L. Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in small-cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2010 May 25;102(11):1636-44.
4. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367:645–8.
5. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:3983–8.
6. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research* 2003;63:5821–8.
7. Yu Z, Pestell RG. microRNAs and Cancer Stem Cells. In: Cho WCS, editor. *MicroRNAs in Cancer Translational Research.* Springer; 2011. p. P373–88.
8. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial– mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704–15.
9. Floor S, van Staveren WC, Larsimont D, Dumont JE, Maenhaut C. Cancer cells in epithelial-to-mesenchymal transition and tumor-propagating-cancer stem cells: distinct, overlapping or same populations. *Oncogene* 2011; 30: 4609–21.
10. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843–50.
11. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; 127:469–80.

12. Le Grand F, Jones AE, Seale V, Scime A, Rudnicki MA. Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell* 2009;4:535–47.
13. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science* 2003;116:2627–34.
14. Wang E, Wang J, Meng Q, Li S, Sun X, Bo Y, et al. siRNA targeting Notch-1 decrease glioma stem cell proliferation and tumor growth. *Mol Biol Rep* 2012. 39: 2497-2503.
15. Curtin JC, Lorenzi M. Drug discovery approaches to target Wnt signaling in cancer stem cells. *Oncotarget* 2010. 1:563–577.
16. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol* 2008. 26:2813–2820.
17. Cohen MM Jr. The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A* 2003. 123A:5–28.
18. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. Hedgehog-Gli1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell selfrenewal, and tumorigenicity. *Curr Biol* 2007. 17:165–172.
19. Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 2006. 66:6063–6071.
20. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004;116: 769–78.
21. Song X, Xie T. DE-cadherin-mediated cell adhesion is essential for maintaining somatic stem cells in the Drosophila ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:14813–8.
22. He TC, Sparks AB, Rago C, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281: 1509–12.
23. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;51:1–28.
24. Tubiana M, Malaise EP. [Cell proliferation kinetics of tumors and cancer treatment]. *Pathol Biol (Paris)* 1973;21:647–64.
25. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002;109:625–37.

26. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999;189:300–8.
27. Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Prada LF. Nuerofibromas in NF1. Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science* 2002;296:920–2.
28. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute* 2008;100:672–9.
29. Meirelles K, Benedict LA, Dombkowski D, Pepin D, Preffer FI, Teixeira J, et al. Human ovarian cancer stem/progenitor cells are stimulated by doxorubicin but inhibited by Mullerian inhibiting substance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012;109:2358–63.
30. Minoru F, Hindsgaul O. *Molecular Glycobiology*. Oxford: IRL Press at Oxford University Press, 1994.
31. Schauer R, Kelm S, Reuter G. *Biology of Sialic Acids* ed. Rosenberg A. pp. 7±67. Plenum Press, New York 1995.
32. Kelm S, Schauer R. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol*. 1997;175:137-240.
33. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR et al. editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. New York: Cold Spring Laboratory Press; 2009.
34. Schauer, R. Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj. J.* 2000; 17, 485–499.
35. Kamerling JP, Gerwig GJ. Structural analysis of naturally occurring sialic acids. In : Clifton NJ editor. *Methods in molecular biology* 2006;347():69-91.
36. Brooks SA, Schumacher U, Dweck M, editors. *Functional and Molecular Glycobiology - Advanced Texts*. Bios Scientific Publishers Ltd. 2002 .
37. Rutishauser U, Landmesser L. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell–cell interactions. *Trends Neurosci.* 1996; 19, 422–427

38. Brusés JL, Rutishauser U. Polysialic acid in neural development: roles, regulation and mechanism. In: Fukuda M, Hindsgaul O, editors. *Molecular and Cellular Glycobiology*. Oxford, UK and New York, USA: Oxford University Press; 2000. pp. 116–132.
39. Karacali S. Glikobiyoloji Güncel Moleküler Biyoloji. *Turk J Vet Anim Sci*. 2003;27, 489-495.
40. Varki A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J*. 1997;11(4):248-55.
41. Ueda T, Kajita K, Fujimori O. Histochemical studies on sialic acids in the epididymis during post-natal development of the rat. *Histochem J*. 1998;30(9):667-76.
42. Cerná A, Janega P, Martanovic P, Lisý M, Babál P. Changes in sialic acid expression in the lung during intrauterine development of the human fetus. *Acta Histochem*. 2002;104(4):339-42.
43. Sasaki T, Akimoto Y, Sato Y, Kawakami H, Hirano H, Endo T. Distribution of sialoglycoconjugates in the rat cerebellum and its change with aging. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(9):1179-86.
44. Schauer R. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 1982;40:131–234.
45. Varki A. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology*. 1992; 2:25–40.
46. Schauer R, Kamerling JP. Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. In: Montreuil J, Vliegthart JFG and Schachter H, editors. *Glycoproteins II*. Elsevier; Amsterdam: 1997.; pp. 243–402.
47. Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* 2002; 102,439–469.
48. Schauer R. Sialic acids and their roles as biological masks. *Trends Biochem Sci*. 1985;10:357–360.
49. Klein A, Roussel P. O-acetylation of sialic acids. *Biochimie*. 1998;80(1):49-57.

50. Martin LT, Marth JD, Varki A, Varki NM. Genetically altered mice with different sialyltransferase deficiencies show tissue-specific alterations in sialylation and sialic acid 9-O-acetylation. 2002; 277,32930-32938.
51. Brockhausen I, Yang J, Ogata S, Itzkowitz SH. Enzymatic basis for sialyl-Tn expression in human colon cancer cells. Glycoconjugate Journal. 1998;15,595-603.
52. Taatjes DJ, Roth J, Peumans W, Goldstein IJ. Elderberry bark lectin--gold techniques for the detection of Neu5Ac (alpha 2,6) Gal/GalNAc sequences: applications and limitations. Histochem J. 1988; 20(9):478-90.
53. Jass JR, Smith M. Sialic acid and epithelial differentiation in colorectal polyps and cancer--a morphological, mucin and lectin histochemical study. Pathology. 1992; 24(4):233-42.
54. Lackie PM, Zuber C, Roth J. Polysialic acid and N-CAM expression in embryonic rat kidney: mesenchymal and epithelial elements show different patterns of regulation. Development. 1990; 110:933-947.
55. Boisseau S, Nedelec J, Poirier V, Rougon G, Simonneau M. Analysis of high PSA N-CAM expression during mammalian spinal cord and peripheral nervous system development. 1991;112:69-82.
56. Zuber C, Lackie PM, Caterall WA, Roth J. Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in adult brain. J Biol Chem 1992; 267:9965-9971.
57. Hanson JE, Sauter NK, Skehel JJ, Wiley DC. Proton nuclear magnetic resonance studies of the binding of sialosides to bodies to intact influenza virus. Virology. 1992; 189, 525 - 533.
58. Ramphal R, Pyle M. Evidence for mucins and sialic acid as receptors for *Pseudomonas aeruginosa* in the lower respiratory tract. Infect Immun. 1983; 41(1):339-344.
59. Mater Y, Karaçalı S. Anionic sites on Streptococcal and Staphylococcal Envelopes. Turkish J. of Med. Sci. 2001;31(4):291-295.

60. Schauer R, Schröder C, Shukla AK. New techniques for the investigation of structure and metabolism of sialic acids. *Adv Exp Med Biol.* 1984;174:75-86.
61. Karacali S, Deveci R, Pehlivan S. Adhesion of hemocytes to desialylated prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) in the larval stage. *Invertebr Reprod Dev.* 2000; 37(2):167-170.
62. Bayro İ. “*Galleria mellonella*’nın Gelişen Testislerinde Sialik Asidin Rolü” Ege Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi 2006.
63. Deveci R, Eratak B, Bayro İ, Özkan M, Karaçalı S. Enkapsülasyondaki hücrel ilişkilerde yüzey şekerlerinin rolü. XVIII. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi 2007, Eskişehir,
64. Reuter G, Stoll S, Kamerling JP, Vliegthart JFG, Schauer R. Sialic acids on erythrocytes and in blood plasma of mammals. In: Schauer R, Yamakawa T. editors, *Sialic Acids. Proceedings of the Japanese–German Symposium on Sialic Acids*, Kiel, Germany. 1988;88–89.
65. Recio-Pinto E, Thornhill WB, Duch DS, Levinson SR, Urban BW. Neuraminidase treatment modifies the function of electroplax sodium channels in planar lipid bilayers. *Neuron.* 1990; 5, 675–684
66. Ivey S, Thornhill WB, Levinson SR. Monoclonal antibodies raised against posttranslational domains of the electroplax sodium channel. *J Membr Biol.* 1991;121:215–222.
67. Werner G, Addicks K, Fncke U, Klaus W, Sarram M, Gielen W. Sialic acid removal modules the miocardial and vascular activity of calcium channel ligands. *Biochem. Pharmacol.* 1991; 42, 577- 587.
68. Townsend RR, Hotchkiss AT. *Techniques in Glycobiology.* New York: CRC Press, 1997 .
69. Karaçalı S., Deveci R. Glikobiyolojinin Tarihçesi ve Çalışma Yöntemleri. *Biyolojik Bilimlerde Araştırma Yöntemleri Yaz Okulu.* 2002;225-229. İzmir.

70. Karaçalı S, Kırmızıgül S, Deveci R, Deveci Ö. Presence of Sialic Acid in Hemolymph of *Dociostaurus maroccanus* Thun. (Orthoptera: Acrididae). *Inverteb Reprod Dev.* 2003;43(2): 91-94.
71. Karaçalı S, Kırmızıgül S, Deveci R, Deveci Ö, Onat T, Gürcü B. Presence of sialic acid in prothoracic glands of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Tissue and Cell.* 1997; 29:315-321.
72. Gabius, HJ, Gabius S. editors, *Lectins and glycobiology.* Heidelberg: Springer Publ. Co. 1993.
73. Rhodes JM, Milton JD. *Lectin methods and protocols.* In: *Methods in Molecular Biology.* London : Humana Press, 1998.
74. Karaçalı S, Deveci R. Protorasik Bezlerdeki Hemosit Reseptörünün Belirlenmesi. Tübitak Projesi, TBAG-AY/214, 2001; pp 16.
75. Inoue S, Inoue Y. New findings in KDN glycobiology: from lower vertebrates to human. In: Lee YC, Inoue Y, Troy FA, editors. *Sialobiology and other novel forms of glycosylation.* Osaka: Gakushin Publishing Company 1999; 57–67.
76. Inoue S, Lin SL, Chang T, Wu SH, Yao CW, Chu TY et al. Identification of free deaminated sialic acid (2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid) in human red blood cells and its elevated expression in fetal cord red blood cells and ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 1998;273:27199–27204.
77. Angata T, Nakata D, Matsuda T, Kitajima K, Troy FA. 2nd Biosynthesis of KDN (2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid). Identification and characterization of a KDN-9-phosphate synthetase activity from trout testis. *J Biol Chem* 1999;274:22949–22956.
78. Inoue S, Kitajima K, Sato C, Go S. Human KDN (deaminated neuraminic acid) and its elevated expression in cancer cells: mechanism and significance. *Adv Exp Med Biol* 2011;705:669-78.
79. Ajit Varki Schauer R. Sialic acids in human health and disease Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J* 2000;17, 485–499.

80. Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* 2002;102,439–469
81. Ilver D, Johansson P, Miller-Podraza H, Nyholm PG, Teneberg S, Karlsson KA. Bacterium–host protein–carbohydrate interactions. *Methods Enzymol* 2003;363, 134–157.
82. Lehmann F, Tiralongo E, Tiralongo J. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell Mol Life Sci* 2006;63, 1331–1354.
83. Vimr ER, Kalivoda KA, Deszo EL, Steenbergen SE. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68, 132–153.
84. Nadano D, Iwasaki M, Endo S, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galactononulosonic acid (KDN). Its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. *J Biol Chem* 1986;261:11550–11557
85. Inoue S, Kitajima K, Inoue S. Identification of 2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactonononic acid (KDN, Deaminoneuraminic Acid) Residues in Mammalian Tissues and Human Lung Carcinoma Cells. Chemical Evidence of the Occurrence of KDN Glycoconjugates in mammals. *The Journal Of Biological Chemistry* 1996;271:24341-24344.
86. Nakata D, Close BE, Colley KJ, Matsuda T, Kitajima K. Molecular cloning and expression of the mouse N-acetylneuraminic acid 9-phosphate synthase which does not have deaminoneuraminic acid (KDN) 9-phosphate synthase activity. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;273:642–648).
87. Kundig W, Ghosh S, Roseman S. The sialic acids VII. N-acylmannosamine kinase from rat liver. *J Biol Chem* 1966;241:5619–5626.
88. Panneerselvam K, Etchison JR, Freeze HH. Human fibroblasts prefer mannose over glucose as a source of mannose for N-glycosylation. Evidence for the functional importance of transported mannose. *J Biol Chem* 1997;272:23123–23129.
89. Terada T, Kitajima K, Inoue S, Ito F, Troy FA, Inoue Y. Synthesis of CMPdeaminoneuraminic acid (CMP-KDN) using the CTP: CMP-3-deoxynonulosonate cytidyltransferase from rainbow trout testis.

- Identification and characterization of a CMP-KDN synthetase. *J Biol Chem* 1993;268:2640–2648.
90. Nakata D, Munster A, Gerardy-Schahn R, Aoki N, Matsuda T, Kitajima K. Molecular cloning of a unique CMP-sialic acid synthetase that effectively utilizes both deaminoneuraminic acid (KDN) and N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) as substrates. *Glycobiology* 2001; 11:685–692.
 91. Hinderlich S, Stäsche R, Zeitler R, Reutter W. A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver: purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* 1997;272:24313–24318.
 92. Inoue S, Poongodi GL, Suresh N, Chang T, Inoue Y. Identification and partial characterization of soluble and membrane-bound KDN (deaminoneuraminic acid)-glycoproteins in human ovarian teratocarcinoma PA-1, and enhanced expression of free and bound KDN in cells cultured in mannose-rich media. *Glycoconjugate Journal* 2006;(23):5-6:401 – 410.
 93. Nadano D, Iwasaki M, Endo S, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galactononulosonic acid (KDN). Its unique occurrence at the non-reducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. *J Biol Chem*. 1986 Sep 5;261(25):11550-7
 94. Inoue S, Kanamori A, Kitajima K, Inoue Y. KDN-glycoprotein: a novel deaminated neuraminic acid-rich glycoprotein isolated from vitelline envelope of rainbow trout eggs. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 May 31;153(1):172-6.
 95. Structure of the capsular polysaccharide of *Klebsiella ozaenae* serotype K4 containing 3-deoxy-D-glycero-D-galactononulosonic acid. Knirel YA, Kocharova NA, Shashkov AS, Kochetkov NK, Mamontova VA, Solovéva TF. *Carbohydr Res*. 1989 Jun 1;188:145-55.
 96. Studies on sialic acids. XIII. Isolation of 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonic acid (KDN) from chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Nakamura M, Furuhashi K, Yamazaki K, Ogura H, Kamiya H, Ida H. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1989 Aug

97. Isolation and characterization of deaminated neuraminic acid-rich glycoprotein (KDN-gp-OF) in the ovarian fluid of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Kanamori A, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Oct 31;164(2):744-9.
98. Song Y, Kitajima K, Inoue Y. Monoclonal antibody specific to α -2 $\rightarrow$ 3-linked deaminated neuraminyl beta-galactosyl sequence. *Glycobiology*. 1993 Feb;3(1):31-6.
99. Kanamori A, Inoue S, Xulei Z, Zuber C, Roth J, Kitajima K, Ye J, Troy FA 2nd, Inoue Y. Monoclonal antibody specific for α 2 $\rightarrow$ 8-linked oligo deaminated neuraminic acid (KDN) sequences in glycoproteins. Preparation and characterization of a monoclonal antibody and its application in immunohistochemistry. *Histochemistry*. 1994 Jun;101(5):333-40.
100. Ladisch S, Hasegawa A, Li R, Kiso M. Immunosuppressive activity of chemically synthesized gangliosides. *Biochemistry*. 1995 Jan 31;34(4):1197-202.
101. Plancke Y, Wieruszeski JM, Alonso C, Boilly B, Strecker G. Structure of four acidic oligosaccharides from the jelly coat surrounding the eggs of *Xenopus laevis*. *Eur J Biochem*. 1995 Jul 15;231(2):434-9.
102. Nishino S, Kuroyanagi H, Terada T, Inoue S, Inoue Y, Troy FA, Kitajima K. Induction, localization, and purification of a novel sialidase, deaminoneuraminidase (KDNase), from *Sphingobacterium multivorum*. *J Biol Chem*. 1996 Feb 9;271(6):2909-13.
103. Kitazume S, Kitajima K, Inoue S, Haslam SM, Morris HR, Dell A, Lennarz WJ, Inoue Y. The occurrence of novel 9-O-sulfated N-glycolylneuraminic acid-capped α 2 $\rightarrow$ 5-Oglycolyl-linked oligo/polyNeu5Gc chains in sea urchin egg cell surface glycoprotein. Identification of a new chain termination signal for polysialyltransferase. *J Biol Chem*. 1996 Mar 22;271(12):6694-701.
104. Ziak M, Qu B, Zuo X, Zuber C, Kanamori A, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y, Roth J. Occurrence of poly(α 2,8-deaminoneuraminic acid) in mammalian tissues: widespread and developmentally regulated but highly selective expression on glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 2;93(7):2759-63.

105. Angata T, Kitajima K, Inoue S, Chang J, Warner TG, Troy FA 2nd, Inoue Y. Identification, developmental expression and tissue distribution of deaminoneuraminate hydrolase (KDNase) activity in rainbow trout. *Glycobiology*. 1994 Aug;4(4):517-23.
106. Qu B, Ziak M, Zuber C, Roth J. Poly (alpha 2,8-deaminoneuraminic acid) is expressed in lung on a single 150-kDa glycoprotein and is an oncodevelopmental antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 20;93(17):8995-8.
107. Ziak M, Roth J. Expression of oligo/polyalpha2,8-linked deaminoneuraminic acid and megalin during kidney development and maturation: mutually exclusive distribution with polyalpha2,8-linked N-acetylneuraminic acid of N-CAM. *Histochem Cell Biol*. 1999 Aug;112(2):169-78.
108. Ziak M, Meier M, Roth J. Megalin in normal tissues and carcinoma cells carries oligo/poly alpha2,8 deaminoneuraminic acid as a unique posttranslational modification. *Glycoconj J*. 1999 Mar;16(3):185-8.
109. Ziak M, Meier M, Novak-Hofer I, Roth J. Ceruloplasmin carries the anionic glycan oligo/poly alpha2,8 deaminoneuraminic acid. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jul 19;295(3):597-602.
110. Anderson LN, Cotterchio M, Knight JA, Borgida A, Gallinger S, Cleary SP. Genetic variants in vitamin d pathway genes and risk of pancreas cancer; results from a population-based case-control study in ontario, Canada. *PLoS One*. 2013 Jun 24;8(6):e66768.
111. Xue HY, Wong HL. Targeting megalin to enhance delivery of anti-clusterin small-interfering RNA nanomedicine to chemo-treated breast cancer. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012 May;81(1):24-32.
112. Choeprasert W, Sawangpanich R, Lertsukprasert K, Udomsubpayakul U, Songdej D, Unurathapan U, Pakakasama S, Hongeng S. Cisplatin-induced ototoxicity in pediatric solid tumors: the role of glutathione S-transferases and megalin genetic polymorphisms. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013 May;35(4):e138-43.
113. Inoue S, Kitajima K, Inoue Y. Identification of 2-keto-3-deoxy-D-glycero-galactononic acid (KDN, deaminoneuraminic acid) residues in mammalian tissues and human lung carcinoma cells. Chemical evidence of

- the occurrence of KDN glycoconjugates in mammals. *J Biol Chem.* 1996 Oct 4;271(40):24341-4.
114. Inoue S, Lin SL, Chang T, Wu SH, Yao CW, Chu TY, Troy FA 2nd, Inoue Y. Identification of free deaminated sialic acid (2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nononic acid) in human red blood cells and its elevated expression in fetal cord red blood cells and ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* 1998 Oct 16;273(42):27199-204.
 115. Inoue S, Poongodi GL, Suresh N, Chang T, Inoue Y. Identification and partial characterization of soluble and membrane-bound KDN (deaminoneuraminic acid)-glycoproteins in human ovarian teratocarcinoma PA-1, and enhanced expression of free and bound KDN in cells cultured in mannose-rich media. *Glycoconj J.* 2006 Jul;23(5-6):401-10.
 116. Go S, Sato C, Furuhashi K, Kitajima K. Oral ingestion of mannose alters the expression level of deaminoneuraminic acid (KDN) in mouse organs. *Glycoconj J.* 2006 Jul;23(5-6):411-21.
 117. Go S, Sato C, Yin J, Kannagi R, Kitajima K. Hypoxia-enhanced expression of free deaminoneuraminic acid in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jun 1;357(2):537-42
 118. Yabu M, Korekane H, Takahashi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Miyamoto Y. Accumulation of free Neu5Ac-containing complex-type N-glycans in human pancreatic cancers. *Glycoconj J.* 2013 Apr;30(3):247-56.
 119. Yabu M, Korekane H, Hatano K, Kaneda Y, Nonomura N, Sato C, Kitajima K, Miyamoto Y. Occurrence of free deaminoneuraminic acid (KDN)-containing complex-type N-glycans in human prostate cancers. *Glycobiology.* 2013 Jun;23(6):634-42. doi: 10.1093/glycob/cws132. Epub 2012 Sep 12.

8. ÖZGEÇMİŞ



10. 04. 1971 yılında Ankara’da doğmuştur. 1989-1995 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde eğitim görmüştür. 1999-2002 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Tıpta Uzmanlık yapmıştır. 2000 yılında University of Helsinki Haartman Institute’ da çalışmıştır. 2004 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Yardımcı Doçent, 2007 yılında Doçent ve 2013 yılında Profesör ünvanı almaya hak kazanmıştır. 2008 ve 2014 yıllarında Harvard University Beth Israel Deaconess Medical Center ‘da Kanseri Kök Hücre ve siRNA teknolojisi kullanılarak kanser tedavi modeli oluşturulması konusunda çalışmıştır. Halen Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Kök Hücre Anabilim Dalında Doktora eğitimi almaktadır. Kök Hücre, Kanseri Kök Hücre, Gelişim Biyolojisi, Rejeneratif Tıp ile ilgili konularda çalışmalar yapmaktadır. Bu konuları kapsayan çok sayıda makalesi ve kitap bölümleri yayınlanmıştır. Bilimsel kuruluşlara üyelikleri yanı sıra bilimsel dergilerde kurul üyelikleri ve hakemlik görevleri de yürütmektedir. Evlidir ve bir kız çocuğu bulunmaktadır.