

ZNF304 gen ifadesinde artış ve CXCR4'de azalma ile prostat kanserinde anoikis değişebilir

Significant increase in ZNF304 and decrease in CXCR4 gene expressions may alter anoikis in prostate cancer

Şule Ayla¹ Gülperi Öktem² Cüneyd Parlayan³

¹İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER), İstanbul, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³İstanbul Medipol Üniversitesi Doğa Bilimleri ve Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendislik Anabilim Dalı, Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER), İstanbul, Türkiye

Öz

Amaç: Prostat kanser hücre hattı (DU145) ve prostat normal epitel hücre hatları (RWPE) arasında anoikis mekanizmasını arttıracak veya inhibe edebilecek genlerin analizini yapmak ve kanser gelişiminde olası rolünü incelemek.

Gereç ve Yöntem: İnsan prostat epitel hücre hattı (RWPE) ve prostat kanseri hücre hatları (DU-145) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den temin edildi. Hücre hatlarının çoğaltılmasında ve sürdürülmesinde RPMI 1640 (*Biological Industries*) besi ortamı kullanıldı. Transkriptom analizi için RNA izolasyonu yapılarak, kütüphane oluşturuldu, kütüphanenin kantasyonunun ardından NextSeq500 (illumina) ile sekanslama yapıldı. Dizileme, haritalandırma, bağıl gen ifadeleri ölçümleri gibi biyoinformatik analizler *Genomics Workbench v 8* (*Qiagen*) yazılımı kullanılarak GRCh38 referans sekansı ile yapılmıştır.

Bulgular: RWPE Normal prostat epitel hücre kültürleri ile DU145 prostat kanser hücreleri karşılaştırıldığı zaman DU-145 prostat kanser hücre kültürlerinde, ZNF304, PYCARD ve Notch3 gen ekspresyonlarında anlamlı bir artış ($p<0,05$) görülürken, CXCR4, Pak3, SerpinB1 gen ekspresyonlarında anlamlı bir azalma ($p<0,05$) görülmüştür.

Sonuç: DU145 prostat kanseri hücre hattında anoikis ile ilişkili önemli gen ekspresyonlarında artış ve azalma gözlemledik. Değişime bağlı olarak hücrelerin anoikisden kaçarak metastatik özellik kazanabileceğini düşündük.

Anahtar Sözcükler: Apoptozis, anoikis, kanser, mezenkimal geçiş.

Abstract

Aim: To analyze genes that may increase or inhibit the anoikis mechanism between prostate cancer cell line and prostate normal epithelial cell line and examine the possible role of cancer in cancer development.

Materials and Methods: Human prostate epithelial cell line (RWPE) and prostate cancer cell line (DU145) were acquired from ATCC. Both cell lines were maintained in RPMI 1640 (*Biological Industries*) medium. Total RNA were isolated and fragmented. Adapters were ligated to prepare RNA library for whole transcriptome experiments. Statistics and bioinformatics analysis including mapping, clustering, sequencing were done by using *Genomics Workbench v 8*. (*Qiagen*) software.

Results: As we compared the normal prostate epithelial cells (RWPE) and prostate cancer cells (DU 145); ZNF304, PYCARD ve NOTCH3 were significantly ($p<0.05$) up-regulated in DU145 cells, on the other hand, CXCR4, PAK3, SERPINB1 genes were significantly down-regulated.

Conclusion: We found that there are significant differential gene expressions in DU-145 cells which may lead to metastatic state via evasion of anoikis process.

Keywords: Apoptosis, anoikis, cancer, mesenchymal transition.

Yazışma Adresi: Şule Ayla

İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER), İstanbul, Türkiye

Makalenin Geliş Tarihi: 16.07.2017 Kabul Tarihi: 24.07.2017

Giriş

Malign kanserlerin en önemli özelliklerinden birisi metastaz yetenekleridir. Kanser hücreleri lenf veya venöz dolaşım yolu ile uzak organlara taşınmaktadır (1). İdealize modellerde 1 gr tümör için dolaşıma her gün 10^6 tümör hücresinin döküldüğü/girdiği gözlenmiştir (2). Bir çoğu başta apoptoza olan yatkınlıkları ve aniokise direnç göstermemeleri nedeniyle daha damar içindeyken elimine olurlar (3,4). Hayatta kalan az sayıda hücre grubu ise hedef bölgeye ulaşır, ancak bu hücrelerin de büyük kısmı gerekli çoğalma başarısını gösteremez. Ancak kan, kanser hücrelerine kısa süreli ev sahipliği yapmayı hastalık boyunca sürdürür.

Kanser araştırmalarında son yıllarda kaydedilen gelişmeler, hastalara sunulan tanı ve tedavi yöntemlerinin değişmesine ve sağ kalım sürelerinin artmasına neden olmaktadır. Moleküler biyolojik çalışmaların artması ve teknolojik gelişmelerin çok hızlı ve kolay paylaşılabılır olması da bu gelişmede önemli rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinin sağ kalımı, metastaz yeteneği, çevre matriksi ile olan ilişkileri ve farklılaşabilme yeteneği dışında hücre ölüm mekanizmaları da yoğun olarak çalışılmaktadır. Yakın zamana kadar morfolojik tanımlamalarla sınıflandırılan iki hücre ölüm çeşidi *nekrosis* ve *apoptosis* olarak bilinmekteydi. Ölçülebilen biyokimyasal özelliklerinin yanında oldukça karmaşık mekanizmaları ile hücre ölümü günümüzde, apoptosis, otofajik hücre ölümü, mitotik katastrofi, nekroptosis, parthanatos, ferroptosis, pyroptosis, pyronekrosis, anoikis, kornifikasyon, entosis ve netosis olarak sınıflandırılmaktadır. Apoptotik hücre ölümünün bir modeli olarak da kabul edilen anoikis; yetersiz hücre- hücre matriksi ilişkisi ile oluşmaya başlayan ve metastaz biyolojisinde rol alan çok önemli bir mekanizma olarak bilinmektedir. Anoikis ilk olarak 1994 yılında Frish ve Francis (5) tarafından tanımlanmış ve o dönemden sonra da kanser ve anoikis inhibisyonu ilişkisi çalışılmaya başlanmıştır. Yeni bir terminoloji olan *anoikis* eski Yunancada *evsiz* anlamında kullanılmaktadır ve matrikse yapışamayan (yetersiz hücre-hücre matriks ilişkisi) hücrelerde meydana gelen apoptozisi tanımlamaktadır. Anoikisin varlığı, apoptozis mekanizmasının önemli bölümlerini kontrol eden integrin düzenlemelerini ifade eder, çünkü integrinler *in vivo* önemli matriks reseptörleridir (5). Anoikis normal deri dokusunda (6) ve kolon epitel hücrelerinde (7) oluşmaktadır. İlginç olarak, embriyogenezin ilk kavitasyon mekanizmasında önemli bir fizyolojik gelişim rolü oynar (8). Anoikis, hücrelerin displastik büyümeleri ve yanlış lokalizasyonlarda yeni matrikse yapışmasının önlenmesinde organizmanın önemli bir defans

mekanizması olarak rol oynar, bu düzenlenme kanser hücrelerinde ve hücrelerin uzak organ metastazlarında dikkat çekicidir (9). Çok sayıda heterojen hücreden oluşan tümör dokusuna ait hücreler, metastaz sürecinde dolaşıma geçme yönünde değişikliklere uğrayarak çoğalmaktadırlar. Bu dönemde sayısız malign hücre dolaşıma geçerken, çok az sayıda hücre, yerleşmek için belirlediği organa göç ederek o bölgede çoğalma şansına sahip olmaktadır. Hücre dışı matrikse bağlanamamak hücre ölümü için bir sebeptir ve dolaşıma geçen ancak tutunamayan hücrelerin pek çoğu anoikis nedeni ile ölmektedir. (10,11). Anoikis direnci tümör invazyon ve metastazında önemli rol oynarken, anoikis duyarlılığı da doku ile bağlantı yapamayan kanser hücrelerinin yok olması ile sonuçlanmaktadır. Bu olay, ekstrasellüler matris bileşenleri (ECM) üzerinde bulunan bağlantı kompleksleri ile ilişkide olan integrinler tarafından düzenlenmektedir ve hücre iskeletinde aktinin kontrol ettiği hücre çıkıntısı sayesinde ekstrasellüler matrise yapışması ve hücre göçü sağlanabilmektedir. Epitelial mezankimal geçiş (EMT) kök hücre özelliklerini belirlenmesinde, hücre göçü özelliğinin ortaya çıkmasında ve adezyon yapan bağlantının bozularak invaziv özellik kazanılmasında rol oynamaktadır. Böylelikle anoikis ile tümör mikro çevresinden kaçış ortaya çıkmaktadır (12). Anoikis direnci tümör metastazı için bir zorunluluktur. EMT tümör hücrelerinin anoikisden kaçınmasına izin verir (13). Tümör hücrelerinin anoikis için direnci ana apoptotik oluşumun inaktivasyonu ve büyüme faktörü/integrin sinyal yolağının aktivasyonunun neden olduğu tümör mikro çevresindeki eşsiz oluşumlar ya da epigenetik değişimler ile sürdürülür (14-16). Prostat kanseri erkeklerde en sık tanı konulan kanserler arasında ikinci sıradayken, kansere bağlı ölümlerde ise beşinci sırada yer almaktadır (17,18).

Bu çalışmada, prostat kanser hücre hattı ve prostat normal epitel hücre hatları arasında anoikis mekanizmasını arttıracak veya baskılayacak genlerin analizi yapılarak kanser gelişiminde olası rolü incelendi.

Gereç ve Yöntem

Gen analizi

İnsan prostat epitel hücre hattı (RWPE) ve prostat kanseri hücre hatlarında (DU-145), anoikis ile ilişkisi olduğu düşünülen, ZNF304, PYCARD, Notch3, CXCR4, Pak3, SerpinB1 gen ekspresyonları araştırıldı.

Hücre kültürü

İnsan prostat epitel hücre hattı (RWPE) ve prostat kanseri hücre hatları (DU-145) Amerikan Tıp Kültür

Koleksiyonu (ATCC)'den temin edildi. DU-145 insan prostat kanseri hücre hattının çoğaltılmasında ve sürdürülmesinde RPMI 1640 besi ortamı (Biological Industries) kullanıldı, 500 ml'lik steril besi ortamının içerisine %1 oranında penisilin/streptomisin, %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu, %1 oranında amfoterisin B ve %1 oranında L-glutamin eklenerek çoğaltıldı. RWPE-1 insan normal prostat epiteli hücre hattının çoğaltılmasında ve sürdürülmesinde ise keratinsit SFM besi ortamı (Invitrogen, 17005-075) kullanıldı. İçerisinde L-glutamin, epiteliyal büyüme faktörü (EGF) ve bovin pitüiter ekstraktı (BPE) bulunan bir kit ile birlikte satılan bu besi ortamına kitte bulunan bu maddeler eklenerek, 37 °C sıcaklıkta, %5 CO2 ve nem içeren inkübatörde çoğaltıldı. Hücre hatları canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta günlük olarak izlendi, flasklarda %80'in üzerinde hücre yoğunluğu gözlemlendiğinde hücreler pasajlanarak çoğaltıldı.

Transkriptom Analizi

RNA izolasyonu

RNA izolasyonu RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Lot No:148050825) protokolüne göre yapıldı. Kısaca lizis ve homojenize olmuş hücreler genomik DNA'dan arındırılıp 75 ng/uL toplam RNA izole edildi. RNA kalitesi UV absorbans birimi spectra Max i3 (Molecular Devices) ile ölçüldü.

Kütüphane oluşturulması

Kütüphane hazırlığı ve sekanslama *TruSeq Stranded RNA LT* kit (Illumina, Ref: 15032612, Lot:10037008) ile yapıldı. Kısaca 750 ng toplam RNA önce Ribo-Zero (Illumina Lot:10035196) ile fragmanlara ayrıldı, iki basamakta cDNA sentezi yapıldı (Illumina, Lot: 10035192), 3' terminler adenilasyon edildikten sonra RNA fragmanları özel dizayn edilmiş adaptörler ile bağlandı. Adaptörlere bağlanan diziler kitte tavsiye edildiği üzere PCR ile çoğaltıldı. 10nM Tris-HCl ve Tween 20 ile karıştırılarak örnekler havuz haline getirilip normalize edildi.

Kütüphane kantasyonu

Oluşturulan kütüphane *Kappa library quantification* (Illumina, Lot: KK4824) ile *real time* PCR (CFX Connect, BioRad) cihazında kantite edildi. 10 uL reaksiyon hacminde 20 pM olarak *real time* PCR cihazına yüklendi. Ergime eğrileri (*melting curves*) ve ortalama Cq skoru=7.20 kalite değerleri olarak belirlendi. Kalite kriterine aykırı değerler elendi.

Sekanslama

Grupların üçlü replikeleri Nextseq500 (Illumina) cihazı ile 18 saat süre ile sekanslandı. Kümelenme kalitesi

Illumina tarafından önerilen minimum 300 bazlık fragmentlar CTE1, CTE2, CTA ve CTL kontrolleri kontrol edildi.

Biyoinformatik analiz

NextSeq 500 cihazının oluşturmuş olduğu ham veri BioSpace (Illumina) veri tabanı ile "fastq" formatına çevrildi; genetik haritalandırma, kümelenmeler, dizilemeler ve istatistik analizler Genomics WorkBench (GWB) version 8 (CLC bio, Qiagen) ile GRCh38 referans sekansı ile yapıldı.

İstatistik analiz

Biyoinformatik analizden sonra çıkan parametrik sonuçlarda *reads per kilobase of transcript per million mapped reads* (RPKM) değerleri gen ifadeleri hesaplanmasında kullanıldı. RPKM değerleri GWB donanımındaki *quantile* metoduna göre normalize edildi. T test ile normalize edilmiş gen ifade değerleri gruplar arasında karşılaştırıldı ve p <0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Transkriptom analizi sonuçlarına göre, RWPE normal prostat epitel hücreleri ile DU145 prostat kanser hücreleri arasında yapılan karşılaştırma ile 7506 adet belirgin gen analiz edilerek, bunların içinden 1802 gen apoptozis ile ilişkili olarak bulundu, yine bunların içinden 113 gen anoikis ile ilişkilendirildi. Bu 113 gen ekspresyonu arasında belirgin anlamlılık (p<0.05) ifade eden genler Tablo-1'de gösterilmiştir. RWPE normal prostat epitel hücre kültürleri ile DU145 prostat kanser hücreleri karşılaştırıldığı zaman DU-145 prostat kanser hücre kültürlerinde, ZNF304, PYCARD ve Notch3 gen ekspresyonlarında anlamlı bir artış (p<0.05) görülürken, CXCR4, Pak3, SerpinB1 gen ekspresyonlarında anlamlı bir azalma (p<0.05) görüldü.

Tablo-1. DU-145 Prostat Kanseri Hücre Kültüründe Gen İfadesindeki Değişimler (p<0.05).

Gen ifadesinde artış	Kat değişimi (Fold change)	p değeri	Gen ifadesinde azalış	Kat değişimi (Fold change)	p değeri
ZNF304	916.3	p<0.01	CXCR4	-44.9	p<0.01
PYCARD	843.4	p<0.05	PAK3	-17.9	p<0.05
NOTCH3	233.9	p<0.05	SERPINB1	-13.1	p<0.01

Tartışma

Daha önceki çalışmalar, *Notch* sinyal yolağının prostat kanserinin progresyonunda önemli bir rol oynayabileceğine dair önemli bilgiler vermiştir. Bazı hücre biyolojisine dair çalışmalar aksini iddia etse bile prostat kanserinde *Notch* aktivitesi özellikle, ileri

metastatik hastalıklarda artmaktadır (19). Daha ilginç olarak, *Notch* aktivitesi metastatik tümör örneklerinde, primer tümör örneklerinden daha yüksek gözlenmiştir (20). Yine çalışmalarda, prostat kanseri kök hücre benzeri hücrelerde NF- κ B sinyal aktivasyonunu artırarak anoikis direnci oluşturmaktadır (21). Bizim çalışmamızda da DU-145 prostat kanseri hücre hatlarında normal epiteliyal hücre (RWPE) hatlarına kıyasla *Notch3* ekspresyonunda önemli bir artış gözlenmiştir. Anoikis direnci ile ilişkili olduğu düşünülen bu artış, özellikle metastatik kanser hücreleri için önemlidir.

Aslan ve ark. (22) tarafından yapılan bir çalışmada *zinc finger transcription factor* (ZNF304) over kanser metastazlarında önemli bir anahtar rol oynadığı söylenmiştir. Aynı çalışmada ZNF304 gen ekspresyonunun birçok proto-onkogenik yolağı destekleyerek tümör hücresinin yaşamasını, migrasyonunu ve invazyonunu kolaylaştırdığı ve ZNF304'ün, β 1 integrin ile birlikte Src/fokal adhezyon kinaz ve paxillin regülasyonunu sağlayarak anoikisi engellediği gösterilmiştir (13). Bir başka çalışmada ZNF304'ün normal over ve meme epiteline kıyasla invaziv meme ve over tümör epiteline artmış olduğu gözlenmiştir (23,24) Çalışmamızda da yaptığımız gen tanımlamaları arasında ZNF304'ün DU-145 prostat kanser hücre serilerinde normal prostat epitel hücre serilerine oranla çok daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır.

Anoikis, integrin aktivitesinin yoksunluğuna bağlı olarak görülen adheren malign olmayan hücrelerde apoptozisin bir formudur (5,25). Ancak malign hücreler anoikise direnç geliştirir ve bu da metastatik potansiyelin artmasına neden olur (26). İntegrinler, anoikisde ekstrasellüler matriks proteinleri ve hücreler arasında adezyonu sağlayan önemli mediyatörlerdir (14,27). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda integrinlerin aktivasyonu, doku dışına çıkışı sırasında ekstrasellüler matriks elemanları ile etkileşimi artırarak ve tümör yayılması sırasında anoikis duyarlılığını azaltarak prostat kanser hücrelerinin metastatik potansiyelini artırmaktadır (28). Eğer adezyonun olmadığı durumlarda kanser hücrelerinin anoikisden kaçışının moleküler mekanizması anlaşıldığı takdirde, kanser hücrelerinin primer tümörden daha uzak metastaz yaparak yayılma prosedürünün anlaşılması için önemli bir adım olduğu düşünülmektedir (12).

Davalieva ve ark. (29) yaptığı bir çalışmada, SerpinB1 protein bozukluğunun prostat kanserinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda SerpinB1 gen ekspresyonlarının DU145 prostat kanser

hücre serilerinde anlamlı derecede azaldığını gözlemledik. Serpin B1'in spontan hücre ölümlerini hızlandırdığı, böylece yeni karakterize edilen apoptozis yollarının önemli bir parçasını oluşturduğu düşünülmektedir (30).

Rosenbaum ve ark. (31) yaptığı bir çalışmada, prostat kanser hastalarının oluşturduğu homojen bir grupta 6 epigenetik biyoişaretleyicinin (AIM1, CDH1, KIF1A, MT1G, PAK3, ve RBM) önemli bir prognostik değer olduğu gösterilmiştir, çalışmamızda da DU-145 prostat kanser hücre hattında PAK3 gen ifadesinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir.

CXCR4 tümör hücrelerinden eksprese edilen oldukça yaygın kemokin reseptörleridir ve 23 farklı kanser türünde belirlenmiştir yine tümörün metastazı ve agresif özelliği ile ilişkilendirilmiştir (32,33). İnsan prostat kanserlerinde, CXCL12 ve CXCR4 ekspresyon seviyelerindeki artış normal ya da benign prostat hiperplazilerindeki dokulardan daha yüksektir (34). Hastalar, tümörlerde CXCR4'ün yüksek ekspresyonuna sahiplerse yaşam süreleri CXCR4'ün düşük seviyelerine sahip hastalara göre daha kısadır (35). CXCL12 ve CXCR4 arasındaki etkileşim, prostat kanserinin kemik ve nöral dokuya metastazında önemli bir rol oynar (36). Kanser gelişimi esnasında, hipoksinin CXCR4 ekspresyonunu artırdığı ve metastazı desteklediği bilinir (37,38). Abblet ve ark. (39) bir çalışmasında anoikis dirençli kanser hücrelerinde CXCR4 ekspresyon oranları anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Kochetkova ve ark. (40) yaptıkları bir çalışmada CXCR4 ve CCR7 kemokin reseptörleri için, anoikisi inhibe ederek malign tümörler ve metastatik kanser mekanizmaları için dikkat çekici bir açıklama yaptıklarını ifade etmişlerdir. Çalışmamızda yapılan çalışmaların aksine DU145 prostat kanseri hücre hatlarında CXCR4 gen ifadesinde bir azalma olduğunu gördük ve bu durumun anoikis direnci ile ilişkili olduğunu düşündük ama bu konuya dair çalışması gereken birçok farklı sinyal yollarının da olduğunu fark ettik ve bu yolların açıklanması halinde kemokin bazlı antikanser aşılarnın uygulanmasında çok önemli adımlar atılabileceğini fark ettik.

Sonuç

Çalışmamızda, DU145 prostat kanseri hücre hattında anoikis ile ilişkili önemli gen ekspresyonlarında artış ve azalma gözlemledik. Değişime bağlı olarak hücrelerin anoikisden kaçarak metastatik özellik kazandığını düşündük.

Kaynaklar

1. Sethi N, Kang Y. Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies. *Nat Rev Cancer* 2011;11(10):735-48.
2. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: Frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(26):14608-13.
3. Glinsky VV, Glinsky GV, Glinskii OV, et al. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res* 2003;63(13):3805-11.
4. Berezovskaya O, Schimmer AD, Glinskii AB, et al. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Res* 2005;65(6):2378-86.
5. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124(4):619-26.
6. Polakowska RR, Piacentini M, Bartlett R, Goldsmith LA, Haake AR. Apoptosis in human skin development: Morphogenesis, periderm, and stem cells. *Dev Dyn* 1994;199(3):176-88.
7. Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: The importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994;107(Pt 12):3569-77.
8. Coucouvanis E, Martin GR. Signals for death and survival: A two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* 1995;83(2):279-87.
9. Chiarugi P, Giannoni E. Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol* 2008;76(11):1352-64.
10. Rosenblatt J, Raff MC, Cramer LP. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr Biol* 2001;11(23):1847-57.
11. Buchheit CL, Weigel KJ, Schafer ZT. Cancer cell survival during detachment from the ECM: Multiple barriers to tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2014;14(9):632-41.
12. Cao Z, Livas T, Kyrianiou N. Anoikis and EMT: Lethal "liaisons" during cancer progression. *Crit Rev Oncog* 2016;21(3-4):155-68.
13. Farris JC, Pifer PM, Zheng L, Gottlieb E, Denvir J, Frisch SM. Grainyhead-like 2 reverses the metabolic changes induced by the oncogenic epithelial-mesenchymal transition: Effects on anoikis. *Mol Cancer Res* 2016;14(6):528-38.
14. Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13(5):555-62.
15. Reddig PJ, Juliano RL. Clinging to life: Cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24(3):425-39.
16. Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett* 2008;272(2):177-85.
17. Deng G, Ma L, Meng Q, Ju X, et al. Notch signaling in the prostate: Critical roles during development and in the hallmarks of prostate cancer biology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016;142(3):531-47.
18. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359-86.
19. Shou J, Ross S, Koeppen H, de Sauvage FJ, Gao WQ. Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis. *Cancer Res* 2001;61(19):7291-7.
20. Danza G, Di Serio C, Ambrosio MR, Sturli N, Lonetto G, Rosati F *et al.* Notch3 is activated by chronic hypoxia and contributes to the progression of human prostate cancer. *Int J Cancer* 2013;133(11):2577-86.
21. Rajasekhar VK, Studer L, Gerald W, Socci ND, Scher HI. Tumour-initiating stem-like cells in human prostate cancer exhibit increased NF-kappaB signalling. *Nat Commun* 2011;18(2):162.
22. Aslan B, Monroig P, Hsu MC, et al. The ZNF304-integrin axis protects against anoikis in cancer. *Nat Commun* 2015;17(6):7351.
23. Bowen NJ, Walker LD, Matyunina LV, et al. Gene expression profiling supports the hypothesis that human ovarian surface epithelia are multipotent and capable of serving as ovarian cancer initiating cells. *BMC Med Genomics* 2009;2(1):71.
24. Casey T, Patel O, Dykema K, Dover H, Furge K, Plaut K. Molecular signatures reveal circadian clocks may orchestrate the homeorhetic response to lactation. *PLoS One* 2009;4(10):e7395.
25. Kim YN, Koo KH, Sung JY, Yun UJ, Kim H. Anoikis resistance: An essential prerequisite for tumor metastasis. *Int J Cell Biol* 2012;2012:306879.
26. Jennings S, Pham T, Ireland SK, Ruoslahti E, Biliran H. Bit1 in anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett* 2013;333(2):147-51.
27. Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(5):701-6.
28. Lee YC, Jin JK, Cheng CJ, et al. Targeting constitutively activated beta1 integrins inhibits prostate cancer metastasis. *Mol Cancer Res* 2013;11(4):405-17.
29. Davalieva K, Kostovska IM, Kiprijanovska S, et al. Proteomics analysis of malignant and benign prostate tissue by 2D DIGE/MS reveals new insights into proteins involved in prostate cancer. *Prostate* 2015;75(14):1586-600.
30. Loison F, Xu Y, Luo HR. Proteinase 3 and Serpin B1: A novel pathway in the regulation of caspase-3 activation, neutrophil spontaneous apoptosis, and inflammation. *Inflamm Cell Signal* 2014;1(6):e462.
31. Rosenbaum E, Begum S, Brait M, et al. AIM1 promoter hypermethylation as a predictor of decreased risk of recurrence following radical prostatectomy. *Prostate* 2012;72(10):1133-9.
32. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol* 2004;14(3):171-9.
33. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004;4(7):540-50.

34. Zhang S, Qi L, Li M, et al. Chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 expression are associated with perineural invasion of prostate cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;4(27):62.
35. Akashi T, Koizumi K, Tsuneyama K, Saiki I, Takano Y, Fuse H. Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Cancer Sci* 2008;99(3):539-42.
36. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 2002;62(6):1832-7.
37. Schioppa T, Uranchimeg B, Saccani A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med* 2003;198(9):1391-402.
38. Helbig G, Christopherson KW 2nd, Bhat-Nakshatri P, et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* 2003;278(24):21631-8.
39. Ablett MP, O'Brien CS, Sims AH, Farnie G, Clarke RB. A differential role for CXCR4 in the regulation of normal versus malignant breast stem cell activity. *Oncotarget* 2014;5(3):599-612.
40. Kochetkova M, Kumar S, McColl SR. Chemokine receptors CXCR4 and CCR7 promote metastasis by preventing anoikis in cancer cells. *Cell Death Differ* 2009;16(5):664-73.