



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**miRNA KULLANILARAK NOTCH1 İNHİBİSYONU
İLE KANSER KÖK HÜCRELERİ VE TÜMÖR
MİKROÇEVRESİNİN HEDEFLENMESİ**

Doktora Tezi

Kök Hücre Anabilim Dalı

Ümmü GÜVEN

İzmir

2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**miRNA KULLANILARAK NOTCH1 İNHİBİSYONU
İLE KANSER KÖK HÜCREleri VE TÜMÖR
MİKROÇEVRESİNİN HEDEFLENMESİ**

Doktora Tezi

Ümmü GÜVEN

Danışmanlar

Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM

Doç. Dr. Bülent ÖZPOLAT

Kök Hücre Anabilim Dalı

İzmir
2019

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan

: Prof.Dr. Gülperi

Selen Gülper

(Danışman)

Üye

: Prof.Dr. Hüseyin

AKER

Üye

: Prof.Dr. Yiğit

Yonkal

Üye

: Prof.Dr. V. Sevinç

İNAN

Üye

: Prof.Dr. Brakem Ser

İsmail

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 21.08.2019

ÖNSÖZ

Kanser tedavisinin geçmişı bin yıl öncesine dayanmaktadır. Tarihsel bulgular, eski Mısır ve Yunan uygarlıklarında bu hastalığın ağırlıklı olarak radikal cerrahi ve genellikle ölümcül olmayan koter ile tedavi edildiğini ama ölümlerin engellenemediğini göstermektedir. Yüzyıllar boyunca, önemli keşifler, tümörlerin biyolojik ve patolojik özelliklerini tanımlamayı olanaklı kılsa da, 1800'lerin sonunda X-ışınlarının keşfedilmesi ve tümörlerin tedavisinde kullanılmalarına kadar etkili terapötik yaklaşımlar geliştirilememiştir. Ardından gelen sitotoksik anti-tümör ilaçların keşfi ve çeşitli hematolojik ve katı tümörlerin tedavisi için kemoterapinin doğması ile gerçek bir atılım gerçekleşmiştir. Teknolojik atılımların verdiği imkanlarla vücut bulan İnsan Genom Projesi ile insan vücudundaki tüm genlerin haritasının çıkarılması, bilim insanlarına genlerimizin bedeni nasıl kontrol ettikleri hakkında bir taslak vererek kansere yaklaşım şeklimiz üzerinde büyük bir etkisi olmuştur.

Kanser karşılaştığımız en büyük küresel sağlık sorunlarından birisi olsa da kanser araştırmaları, bilimin son yıllarda mümkün kıldığı tüm teknolojik gelişmelerden yararlanarak tam hızda ilerlemektedir. Peki bu durum kanser tedavilerinin geleceği için ne anlama gelmektedir?

Kanserin kolayca ortadan kaldırılabilceğini iddia edebileceğimiz bir aşamada olmasak da, bilgi ve teknoloji düzeyimiz bizi oyunda önde tutarak bu hastalığa karşı mücadelede şansımızı arttırmaktadır.

Bazı yenilgilere rağmen, onkolojik çalışmaların hala çok fazla vaadi var ve aceleyle terk edilmemesi gerekiyor. Tümör heterojenitesiyle savaşmanın zorluğu, kanseri yenmek için gösterilen çabaları korkutmamalı aksine cesaretlendirmelidir.

Ümmü Güven

İzmir
31.07.2019

ÖZET

miRNA Kullanılarak Notch1 İnhibisyonu ile Kanseri Kök Hücreleri ve Tümör Mikroçevresinin Hedeflenmesi

Pankreas kanseri, 6 ay ortalama hasta sağkalımı ile son derece zayıf sağkalım oranlarına sahip en agresif kanserlerden biridir ve karşılanamayan bir terapötik zorluğu temsil etmektedir. Pankreas kanseri ilerleyişini ve mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır. Yalnızca tümör hücrelerini hedef alan stratejilerin pankreas kanseri hücrelerini ortadan kaldırmada başarısız olduğu ve metastazı, ilaca direnci ve hasta ölümlerini önlediği kanıtlanmıştır. Kanseri kök hücreleri hücre göçü / istilası, ilaç direnç ve metastaz özellikleri sebebiyle önemli klinik etkilere sahiptir. NOTCH ve ilişkili sinyal yollarının kanseri kök hücrelerinde düzensiz aktivite gösterdikleri bilinmektedir. NOTCH1'in pankreas kanseri kök hücrelerinin regülasyonundaki fonksiyonel rolü tamamen açıklığa kavuşmamıştır. Bu verilerden yola çıkarak planlanan çalışmayla nanolipozom teknolojisi ile miRNA temelli tedavi modeli uygulanmıştır. NOTCH1 hedef alınarak pankreas kanserinde kanseri kök hücre özelliklerinin baskılandığının durduğu görülmüştür. Tedavi yaklaşımı olarak etkin bir şekilde kullanılabileceği öngörülmektedir .

Anahtar Kelimeler; miRNA, nanolipozom, kanseri kök hücresi, Notch1, pankreas kanseri

ABSTRACT

Inhibition Of Notch1 Signaling By MicroRNA For Targeting Cancer Stem Cell And Tumor Microenvironment

Pancreatic cancer is one of the most aggressive cancers with extremely poor survival rates with an average patient survival of 6 months and represents an unmet therapeutic challenge. The progress and mechanisms of pancreatic cancer are still not fully understood. Strategies targeting tumor cells alone have been shown to fail to eliminate pancreatic cancer cells and prevent metastasis, drug resistance, and patient deaths. Cancer stem cells have important clinical effects due to cell migration / invasion, drug resistance and metastasis. NOTCH and related signaling pathways exhibit high / increased activity in cancer stem cells; it is known to be important for the maintenance and survival of these cells. The functional role of NOTCH1 in the regulation of pancreatic cancer stem cells remains unclear. In the planned study, a miRNA based treatment model targeting NOTCH1 was applied with non-toxic nanoliposome technology used in the clinic. By targeting NOTCH1, it was observed that cancer stem cell properties were suppressed and tumor growth and spread stopped. It can be used effectively as a treatment approach.

Keywords; miRNA, nanoliposomes, cancer stem cells, Notch1, pancreatic cancer

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Pankreas Yapısı ve Biyolojisi.....	2
2.2. Pankreas Kanseri.....	2
2.3. Kanser Kök Hücreleri ve Pankreas Kanseri Kök Hücreleri.....	3
2.4. Notch Sinyal Yolağı.....	5
2.4.1. Pankreas Kanseri ve Kanser Kök Hücrelerinde Notch Yolağının Rolü.....	6
2.5. MikroRNA'ların (miRNA) Biyogenezi (Oluşumu) ve İşlevleri.....	8
2.5.1. Pankreas Kanseri ve MikroRNA'ların (miRNA) Rolü.....	9
2.5.2. MikroRNA'ların (miRNA) Kanser Tedavisinde Kullanımı.....	10
2.5.3. hsa-miR-193 Ailesi.....	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	13
3.1. Hücre Kültürü.....	13
3.2. Floresanla Aktive Hücre Ayırma (FACS) Yöntemi ile PANC-1 ve MiaPaCa2 Hücre Hatlarından Kanser Kök Hücrelerinin İzole Edilmeleri.....	13
3.3. Tümör (Sferoid) Oluşturma Kabiliyeti Deneyi.....	14
3.4. Yumuşak Agarda Koloni Oluşturma Deneyi.....	15
3.5. siRNA ve miRNA Transfeksiyonları.....	16
3.6. Migrasyon Deneyi.....	17
3.7. İnvazyon Deneyi.....	17
3.8. hsa-miR-193b-3p için Lusiferaz Raportör Deneyi.....	18
3.9. Annexin V ile Apoptoz Tayini ve Hücre Döngüsü Analizi.....	18
3.10. Protein İzolasyonu ve Western Blot.....	18
3.11. RNA İzolasyonu ve RT-qPCR Analizi.....	20
3.12. İmmünopresipitasyon (IP) Deneyi.....	21

3.13. miR-193b-3p-mimik ve kontrol miRNA-mimik Taşıyan Nanolipozomların Hazırlanması.....	22
3.14. Pankreas Kanseri Tümör Ksenograft Modelinin Oluşturulması.....	22
3.15. Tümör Boyutlarının ölçülmesi.....	23
3.16. İmmünohistokimyasal Boyamalar.....	23
3.17. İstatistiksel Analizler.....	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. CD133 ⁺ /CD44 ⁺ /EpCAM ⁺ Pankreas Kanseri Kök Hücrelerinin İzolasyonu.....	25
4.2 Tümör (Sferoid) Oluşturma Kabiliyeti.....	27
4.3. Yumuşak Agarda Koloni Oluşturma Kabiliyeti.....	29
4.4. Panc1 ve MiaPaca2 Kanseri Kök Hücrelerinde Kök Hücre Belirteçlerinin İfade Düzeyleri.....	31
4.5. Kanseri Kök Hücrelerindeki Notch1 ve Notch2 mRNA ve protein seviyeleri Kanseri Kök Hücreleri-olmayan gruptan belirgin derecede yüksektir.....	32
4.6. Pankreas kanseri kök hücrelerinde miR-193b-3p ifadesindeki artış NOTCH1 ve NOTCH2 ifadesini önemli ölçüde düşürmektedir.....	34
4.7. hsa-miR-193b-3p, Notch2 mRNA'sına doğrudan bağlanmaktadır.....	38
4.8. miR-193b-3p, Panc1 and MiaPaCa2 Kanseri kök hücrelerinde çoğalmayı ve koloni oluşumunu baskılar.....	40
4.9. miR-193b-3p ifadesi apoptozu tetikleyer ve hücre döngüsünü inhibe eder.....	41
4.10. Panc1 ve MiaPaCa2 kanseri kök hücrelerinde miR-193b-3p ifadesi migrasyon ve invazyonu baskılar.....	46
4.11. Notch1 ve Notch2 genlerinin susturulması Panc1 ve MiaPaCa2 kanseri kök hücrelerine çoğalmayı, migrasyonu ve invazyonu inhibe eder.....	49
4.12. Notch1 and Notch2 genlerinin susturulması apoptozisi tetikler ve hücre döngüsü inhibisyonunu indükler.....	57
4.13. Notch1 ve Notch2 İmmünopresipitasyonu.....	62
4.14. miR-193b-3p'nin DOPC nanolipozomlar ile birlikte <i>in-vivo</i> tedavi uygulaması Panc1 kanseri kök hücreleri tümör modelinde tümör büyümesini inhibe eder.....	63
5. TARTIŞMA.....	66
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	75
7. KAYNAKLAR.....	76
EKLER	
TEŞEKKÜR	

ÖZGEÇMİŞ



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Pankreas Kanserinin Progresyonu.....	3
Şekil 2. In-vivo tümör modeli ve tedavi şekli.....	23
Şekil 3. PANC1 hücre hattından izole edilen CD133+/CD44+/EpCAM+ Kanser Kök Hücrelerinin dağılımı.....	25
Şekil 4. MiaPaCa2 hücre hattından izole edilen CD133+/CD44+/EpCAM+ Kanser Kök Hücrelerinin dağılımı.....	26
Şekil 5. Panc1 kanser kök hücreleri (KKH) ve kanser kök hücresi-olmayan hücrelerin (non-KK) tümör oluşturma kapasiteleri.....	27
Şekil 6. MiaPaCa-2 kanser kök hücreleri (KKH) ve kanser kök hücresi-olmayan hücrelerin (non-KK) tümör oluşturma kapasiteleri.....	28
Şekil 7. PANC-1 and MIAPaCa-2 kanser kök hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri.....	29-30
Şekil 8. Panc1 (A) and MiaPaca2 (B) kanser kök hücreleri OCT4, SOX2 ve Nanog kök hücre belirteçlerini belirgin derecede ifade etmektedirler.....	31
Şekil 9. Notch1 ve Notch2'nin Panc1 (A) ve Panc1 KKH (A), MiaPaca2 (B) ve MiaPaCa2 KKH (B) gruplarındaki mRNA ve protein seviyeleri.....	32-33
Şekil 10. Kontrol miRNA mimik ve miR-193b-3p mimik ile transfekte edilen Panc1 ve MiaPaCa-2 KKH'lerinde Notch1 mRNA seviyeleri.....	35
Şekil 11. Kontrol miRNA mimik ve miR-193b-3p mimik ile transfekte edilen Panc1 ve MiaPaCa-2 KKH'lerinde Notch2 mRNA seviyeleri.....	36
Şekil 12. Kontrol miRNA mimik ve miR-193b-3p mimik ile transfekte edilen Panc1 ve MiaPaCa-2 KKH'lerinde Notch1 ve Notch2 protein seviyeleri.....	37
Şekil 13. miR-193b-3p, Notch2 mRNA'sının 3'UTR ucuna direkt olarak bağlanmakta (A) ve ifadenmesini baskılamaktadır (B).....	39
Şekil 14. miR-193b-3p, Panc1(A) ve MiaPaCa2 (B) Kanser kök hücrelerinde koloni oluşumunu baskılar.....	40-41
Şekil 15. Kontrol miRNA mimik ve miR-193b-3p mimik ile transfekte edilen Panc1 (A) ve MiaPaCa-2 (B) KKH'lerinde miR-193b-3p ifadesi apoptozu tetikler.....	42-43
Şekil 16. Kontrol miRNA mimik ve miR-193b-3p mimik ile transfekte edilen Panc1 (A) ve MiaPaCa-2 (B) KKH'lerinde miR-193b-3p ifadesi hücre döngüsünü inhibe eder.....	44-45

Şekil 17. miR193b-3p ifadesi, Panc1 kanser kök hücrelerinde migrasyonu inhibe eder.....	47
Şekil 18. miR193b-3p ifadesi, Panc1 ve MiaPaCa2 kanser kök hücrelerinde invazyonu inhibe eder.....	48
Şekil 19. Notch1 ve Notch2 genlerinin susturulması Panc1 (A) ve MiaPaCa2 (B) kanser kök hücrelerinde çoğalmayı inhibe eder.....	50
Şekil 20. Notch1 ve Notch2 genlerinin susturulması Panc1 kanser kök hücrelerinde migrasyonu inhibe eder.....	51
Şekil 21. Notch1 ve Notch2 genlerinin susturulması Panc1(A) ve MiaPaCa2 (B) kanser kök hücrelerinin invazyon kapasitesini önemli derecede düşürür.....	52-53
Şekil 22. Panc1 (A) ve MiaPaCa2 (B) kanser kök hücrelerinde Notch1 geninin susturulması Notch2 protein inhibisyonuna; Notch2 geninin susturulması Notch1 protein inhibisyonuna sebep olur.....	54
Şekil 23. Panc1 (A) ve MiaPaCa2 (B) kanser kök hücrelerinde Notch1 geninin susturulması Notch2 mRNA düzeyinin azalmasına; Notch2 geninin susturulması Notch1 mRNA düzeyinin azalmasına sebep olur.....	55-56
Şekil 24. Notch1 ve Notch2 genlerinin susturulması Panc1 (A) ve MiaPaCa2 (B) kanser kök hücrelerinde apoptozu tetikler.....	59
Şekil 25. Notch1 ve Notch2 genlerinin susturulması Panc1 (A) ve MiaPaCa2 (B) kanser kök hücrelerinde hücre döngüsü inhibisyonunu indükler.....	60-61
Şekil 26. Panc1 hücrelerinde Notch1 proteini Notch2 proteini ile ve Notch2 proteini Notch1proteini ile birlikte çökelir.....	62
Şekil 27. Nanolipozomal miR-193b-3p'nin <i>in Vivo</i> sistemik enjeksiyonu tümör büyümesini inhibe ederek Notch1 ve Notch2'nin tümörlerdeki ifadesini azaltır...	64-65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1. Transfeksiyon için kullanılan ürünler.....	16
Tablo 2. Western Blot için kullanılan antikorlar.....	19



SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

KKH : Kanser kök hücresi

Non-KKH: Kanser kök hücresi olmayan hücreler

CD: Başkalaşım kümesi

qRT-PCR: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

EpCAM: Epitelyal hücre adezyon molekülü

PDAC: Pankreatik duktal adenokarsinom

PanIN: pankreatik intraepitelyal neoplazma

MCN: müsinöz kistik neoplazma

IPMN: intraduktal papiller müsin neoplazma

Ki67: Kiel 67

miRNA: mikro RNA

HES: Hairy-Enhancer of Split

NOD-SCID: Obez olmayan diyabetik- şiddetli kombine immün yetmezlikli

FOXO3: Forkhead Box O3

LGR5: Lösence zengin tekrarlı-G-proteini içeren çiftli reseptör 5

CXCR4: C-X-C Motif Kemokin Reseptör 4

BM: Bazal Membran

KRAS: Kirsten rat sarkoma

UTR: Okunmayan bölge

TGFB: Tümör büyüme faktörü beta

FBS: Fötal bovin serumu

EDTA: Etilen diamino tetraasetik asit

HBSS: Hank'in Denge Solüsyonu

APC: Allofikosiyanin

PE: Fikoertirtin

IHC: immünohistokimya

IP: immünopresipitasyon

DOPC: 1,2-Dioleoil-sn-gliserol-3-fosfolipin

PVDF: polivinil

TBS-T: Tritonixli tris- tuz solüsyonu

RPM: Dakikadaki devir sayısı

SD: Standart sapma

1. GİRİŞ

Pankreas kanseri invaziv bir hastalıktır ve agresif seyretmesi geç belirlenmesine neden olmaktadır. En iyi tedavi şansını küratif rezeksiyon (Nalls, Tang, Rodova, Srivastava, & Shankar, 2011; Schultz et al., 2014). sunsa da erken metastaz eğilimi yüzünden hastaların %20'sinden daha azı ameliyat için uygundur Bunun nedeni vakaların büyük bir kısmında kanserin lokal bölgeye veya uzak organlara yayılmış durumda olmasıdır. Erken teşhis ihtimalinin çok düşük olması doğru biyolojik belirteçlerinin hala tanımlanamamış olmasına bağlanmaktadır. Bu nedenle erken teşhis ve tedavi için yeni tanı yöntemleri ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi acilen gerekmektedir. Uluslararası Dünya Kanser Araştırmaları Fonu İstatistikleri'ne göre küratif rezeksiyon uygulansa dahi pankreas kanseri tanısı konmuş hastaların 5 yıl yaşama oranları 100.000'de 4.1'dir.

Normal embriyonik gelişimde ve yetişkin kök hücrelerin sürdürülmesinde görev alan Notch ve ilişkili sinyal yolları (Wnt/B-Catenin sinyal yolağı), kanser kök hücrelerinde düzensizlik gösterirler. Buna ek olarak Notch sinyal yolağı kök hücrelerin sürdürülmesi dahil karsinogenezle ilişkili birçok süreçte de rol oynamaktadır. Özellikle NOTCH1'in, kötü diferansiye over kanseri örneklerinde aşırı ifadelendiği ve tümör evresinin yüksekliğiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (M. Wang, Wang, Wang, Wu, & Xin, 2010). Ardından, özellikle pankreas kanserinde NOTCH1 aşırı ifadesinin kötü prognoz ve düşük sağkalım ile ilişkili olduğu da bulunmuştur (H. Hu, Zhou, Awadallah, & Xin, 2013; Z. Wang et al., 2006). Bununla birlikte, NOTCH1'in pankreas kanserinde kök hücre regülasyonundaki fonksiyonel rolü tamamen açığa kavuşmamıştır. Ortaya çıkan kanıtlar miRNA'ların (mikro RNA) Notch sinyal yolağını negatif yönde regüle ederek kök hücrelerin kendi kendini yenilemesinde ve farklılaşmasında temel bir rol oynadığını desteklemektedir (Brabletz et al., 2011; Ji et al., 2009). Daha önce kanser kök hücreleriyle yapılan hiçbir çalışmada miR-193b-3p'nin işlevi gösterilmemiştir. Pankreas kanserinde miR-193b-3p'nin NOTCH1 regülasyonundaki rolü daha önce araştırılmamıştır.

Bu sebeple bu çalışmada pankreas kanser kök hücrelerinde miR-193b-3p'nin, NOTCH1 ve downstream molekülleri üzerindeki regülatif etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Pankreas Yapısı ve Biyolojisi

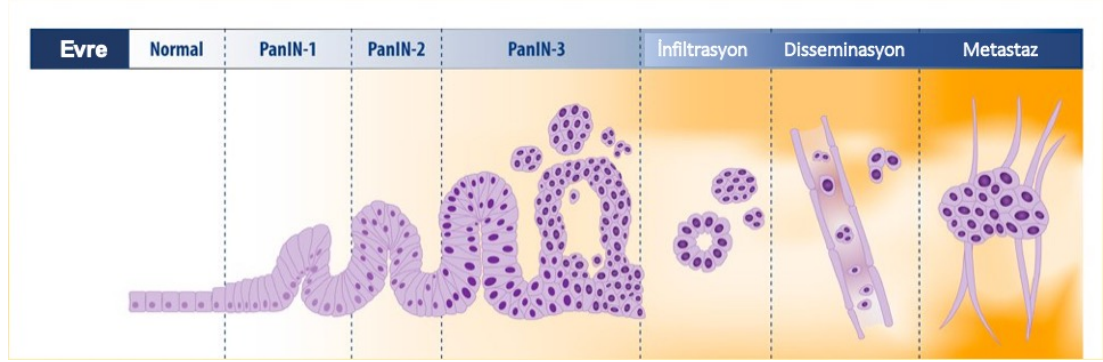
Pankreas, karın boşluğunun üst orta bölgesinde, midenin alt yüzeyinin hemen arkasında bulunan yumuşak bir organdır. Bu üç kısımdan genişlemiş orta bölüm; caput (baş), merkezi kısım; corpus (vücut) ve daralan yan kısım ise cauda (kuyruk) olarak isimlendirilir. Pankreas hem ekzokrin bezi hem de endokrin bezidir. Pankreasın ekzokrin kısmı, (pankreastaki tüm salgı hücrelerinin yaklaşık %99'unu oluşturur) asiner hücrelerden oluşur ve bunlar akini adı verilen çok sayıda küçük küme halinde düzenlenmiştir. Pankreas salgısı genellikle duodenuma iki kanal, ana pankreas kanalı ve aksesuar pankreas kanalı yoluyla verilir. (Bazı insanlarda, gelişim sırasında aksesuar kanalı kaybolur.)

2.2 Pankreas Kanseri

Pankreatik adenokarsinom, 2012 yılında dünyada 330.000'den fazla ölüme sebep olan, kanser sebepli ölümlerde yedinci sırada gelen en ölümcül ve agresif kanser türlerinden birisidir (Ilic & Ilic, 2016). 2017 yılında Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü, pankreas kanserinin tüm kanserlerin %3,2'sini ve tüm kanser ölümlerinin %7,2'sini temsil ettiğini açıklamıştır. Son birkaç yıl içerisinde pankreas kanseri insidansı sürekli olarak artmakta olup, 2030 yılına kadar öngörülen insidans ve ölüm, pankreas kanserinin 2030 yılına kadar ikinci ölüm nedeni olacağını öngörmektedir (Rahib et al., 2014). Bu tümör, uzak organlara lokal difüzyon ve metastazla erken yayılma ile karakterizedir ve hastaların yaklaşık %80'i, cerrahi olarak temizlenemeyecek lokal olarak ileri ya da metastatik hastalık tanısı alır. Tanıda lokalize hastalığı olan ve radikal cerrahi operasyon geçiren hastalarda bile, medyan sağkalım 18 ay civarında sınırlı kalmaktadır (Kleeff et al., 2016; Rebelo, Molpeceres, Rijo, & Pinto Reis, 2017).

Pankreasın neoplazmaları geniş bir yelpazede ve genellikle histolojik farklılaşmalarına göre epitelyal veya epitel olmayan olarak ve benign, malign öncesi veya malign neoplazmalardaki biyolojik davranışlarına göre sınıflandırılırlar. Epitelyal neoplazmalar, ekzokrin veya endokrin olabilirken, ekzokrin neoplazmaları grubu ayrıca duktal ve asiner neoplazmlarda da sınıflandırılır (Haeberle & Esposito, 2019). Adı duktal hücrelere histolojik benzerliğinden türetilen pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC), pankreas neoplazmalarının yaklaşık %90'ını oluşturan en yaygın pankreas malignitesidir (Seufferlein, Bachet, Van cutsem, & Rougier, 2012).

Bu nedenle “pankreas kanseri” ve “pankreas duktal adenokarsinomu” terimleri sıklıkla eşanlamlı olarak kullanılır.



Şekil 1. Pankreas Kanserinin Progresyonu. (Batey, M. *Challenges and Opportunities in Pancreatic Cancer Research*, 2019. Crown BioSciences Inc. 'ten Türkçeleştirilerek alınmıştır.) (PanIN: pankreatik intraepitelyal neoplazma (ekzokrin))

PDAC'lerin çoğu, pankreasın baş bölgesinde ortaya çıkar ve değişken derecelerde farklılaşma gösteren duktal epitel hücrelerine benzeyen bir glandüler yapı sergilerler. Klinik ve histolojik çalışmalar, PDAC'a yol açan üç farklı prekürsör lezyon tipini belirlemiştir; pankreatik intraepitelyal neoplazma (PanIN), müsinöz kistik neoplazma (MCN) ve intraduktal papiller müsin neoplazmaları (IPMN). PanIN, 1'den 3'e kadar olan aşamalara göre derecelendirilir (Şekil 1).

2.3 Kanser Kök Hücreleri ve Pankreas Kanseri Kök Hücreleri

Kanser kök hücreleri (KKH), benzersiz plastisite ve metabolizma ile birleştiğinde kendi kendini yenileme yetenekleri ile karakterize olan farklılaşmamış sessiz hücrelerdir. Pankreas kanserinde KKH'nin, tümör oluşumunu ve hastalığın ilerlemesini tetiklemekten sorumlu olan tümör içindeki küçük bir alt popülasyon olduğu düşünülmektedir (Abel & Simeone, 2013).

Yetişkin yaşamının gelişmesi sırasında, “fenotipik plastisite” olarak adlandırılan, çok sayıda soyun farklılaşma / geçiş kapasitesine sahip hücresel alt popülasyonları vardır. Bu özellik embriyogenez sırasında elzem olmakla birlikte, yetişkin kök hücreleriyle sınırlıdır, ancak organı sürdürmenin veya onarmanın bir yolu olarak karaciğer, pankreas ve kolon gibi spesifik dokularda yeniden etkinleştirilebilir. Benzer şekilde,

kanserde tümör hücreleri, plastisiteyi, tümör ilerlemesini artırmak için bir araç olarak yeniden etkinleştirir. Kanser bağlamında, kanser kök hücrelerinin bir tümör içindeki fenotipik plastisitenin ana kaynağı olduğuna ve KKH fenotipik plastisitesinin, tümör içinde bulunan her bir hücresel fenotip ve alt tipin yenilenmesine izin verdiğine inanılmaktadır. Örneğin, aynı genetik klonlar içerisinde fenotipik ve epigenetik seviyelerde farklılık gösteren ve tek bir tümör içinde birden fazla farklı alt popülasyona yol açabilen farklı KKH'leri bulabilmekteyiz.

Pankreas kanserinde kanser kök hücreleri; ampirik olarak genetik soy belirteçlerinin izlenmesi (Driessens, Beck, Caauwe, Simons, & Blanpain, 2012) veya immün yetmezliğe sahip farelere seri transplantasyon sonrası tümörigenezin değerlendirilmesi şeklinde iki ana teknikle tanımlanmıştır (Facompre, Nakagawa, Herlyn, & Basu, 2012; García-Silva, Frias-Aldeguer, & Heeschen, 2013). Kanser kök hücrelerinin tanımlanması ve incelenmesi için en yaygın kullanılan strateji, CD44, CD90, CD24, CD133, LGR5, EpCam ve/veya CXCR4 gibi bazı hücre yüzey antijenlerine karşı yönlendirilen antikorların kullanımına dayanmaktadır (Hermann et al., 2007; C. Li et al., 2007; Nguyen et al., 2017; Rasheed et al., 2010). Bao ve ark. izole edilen CD44⁺/CD133⁺/EpCAM⁺ hücrelerin kendi kendini yenilemenin yanı sıra, migrasyon ve büyümeye ilişkin performanslarının farklılığını ve agresiflik artışını göstermişlerdir (Bao et al., 2014). Bu çalışmada, MiaPaCa2 ve L3.6pl hücre hatlarından izole edilen CD44⁺/CD133⁺/EpCAM⁺ KKH'lerinde şiddetli agresif davranışın FoxQ1 ifadesine bağlı olduğunu göstermek için siRNA kullanmışlardır. Ek olarak, hayvanlara enjekte edilen FoxQ1 geni susturulmuş MiaPaCa2 hücrelerinin tümör oluşturma yeteneklerinin gözle görülür derecede yavaşladığı; tümör oluşumu ve büyümesinin bozulduğu rapor edilmiştir (Bao et al., 2014).

Li ve ark. CD44⁺/CD24⁺/ESA⁺ yüzey belirteçlerine sahip pankreas kanseri kök hücre popülasyonunu tanımlamak için insan primer pankreas tümörleri ve düşük pasaj numarasına sahip hücre hatlarından farelerde primer tümörler ksenograftlarıyla çalışmalar yapmıştır. Pankreas kanseri kök hücreleri, bu belirteçler için negatif olan tümör hücrelerinden 100 kat daha fazla tümör başlatıcı potansiyel göstermiştir. On tümörden elde edilen veriler, bu üç yüzey belirtecini ifade eden hücrelerin tüm pankreas kanseri hücrelerinin sadece % 0,2'sini oluşturduğunu göstermiştir. Bu nadir popülasyon, NOD-SCID farelere enjekte edildiğinde şimdiye kadar görülen en yüksek tümörijenik potansiyeli göstermiştir. Sadece 100 tane CD44⁺/CD24⁺/ESA⁺ hücre 12 farenin 6'sında tümör oluşturmak için yeterli olmuştur. Kanser kök hücreleri

belirteçleri için negatif olan hücreler ise çok daha az tümörijenik kapasite göstermiştir. Bunlardan 12 farenin 1'inde dahi tümör oluşturabilmek için en az 10.000 hücre gerekmiştir (C. Li et al., 2007).

Özellikle, iki çalışma FOXO3 transkripsiyon faktörünün pankreas kanseri hücrelerinde CD44 ekspresyonu için gerekli olduğuna dair kanıt sağlamıştır. FOXO3/c-AMP/PCG-1/piruvat dehidrojenaz-A1 içeren metabolik yolun pankreas kanseri hücrelerinde CD44 ekspresyonu ve kanser kök hücresi özellikleri için esas olduğu bulunmuştur (Kumazoe et al., 2017).

Hermann ve ark. kök hücre belirteci CD133 kullanarak insan pankreas tümörü örneklerinde bir kanser kök hücresi popülasyonu tanımlamışlardır. Akış sitometrisi analizi, tümör kitlesinin %1 ila %3,2'sinin CD133⁺ hücreleri içerdiğini göstermiştir. 500 adet CD133⁺ hücrenin ortotopik implantasyonu atimik farelerde tümör üretebilmiş, oysa 1x10⁶ CD133⁻ hücrelerinin tümörojenik kapasitesinin olmadığı gözlemlenmiştir. Bu KKH nüfusunun epitelyal farklılaşma belirteci olan sitokeratini ifade etmedikleri de görülmüştür. Bu durum bu hücrelerin tümör kitlesi hücrelerinden farklı bir progenitör popülasyonu olduğunu düşündürmektedir. CD133⁺ KKH'lerinin %0,1'inde CD44 ve CD24' ün birlikte ekspresyonu da gözlenmiştir; bu durum ise çoklu ve farklı olmak üzere birçok popülasyonun mevcut olabileceği ihtimalini ortaya koymaktadır.

2.4 Notch Sinyal Yolağı

Doku gelişimi sırasında belirli hücresel toplulukların oluşturulması, hücre çoğalması, farklılaşma, iletişim, göç ve ölüm arasındaki karmaşık bir etkileşime dayanır. Bu hücresel programları koordine eden sinyal işaretleri arasında, Notch yolağı, tüm metazoanlar boyunca hücre kaderinin ana bir belirleyicisi olarak yaygın şekilde kabul edilen yüksek oranda korunmuş bir hücre sinyal sistemidir. Memeliler NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 ve NOTCH4 olmak üzere dört farklı Notch reseptörüne sahiptir (Kumar, Juillerat-Jeanneret, & Golshayan, 2016). Notch, tek geçişli bir transmembran reseptör proteindir. Kalsiyuma bağımlı, kovalent olmayan bir etkileşimle, kısa bir hücre dışı bölgeden, tek bir transmembran geçişi ve küçük bir hücre içi çentikten ve büyük bir hücre dışı bölümden oluşan bir hetero-oligomerdur. Embriyonik gelişimin düzenlenmesinde büyük rol oynar (Brou et al., 2000).

Notch sinyalizasyonu, Notch reseptörleri ve bitişik hücrelerdeki ligandları arasındaki etkileşimler tarafından tetiklenir. Reseptör aktivasyonu, soylara özgü belirleyicilerin baskılayıcıları olarak işlev gören HES (Hairy-Enhancer of Split) ailesi genleri dahil olmak üzere, Notch hedef gen indüksiyonu ile sonuçlanır. Buna karşılık, bu jukstakrin (doğrudan bitişik hücreye) sinyal mekanizması, bir hücrenin konumuna ve komşularının bileşimine göre soy özelliklerini dinamik olarak düzenler. Yolağın düzeni ve işleyişinde sıradışı bir sadelik – zardan ikinci haberci amplifikasyonu ve düzenlemesi olmayan çekirdeğe giden doğrudan bir yol – göze çarpmaktadır. Bir yandan da bu sadelik, Notch aktivasyonun hücreleri gelişimsel yollara doku ve zamana bağlı bir şekilde yönlendirebiliyor olmasıyla çelişmektedir. Bu nedenle Notch yolağı, hücrelerin komşu hücrelerden ve fiziksel hücre dışı ortamdan gelen çok sayıda girdiyi, doku morfogenezini ile hücre kaderi belirlenimini koordine etmek için nasıl birleştirdiğini incelemek için ideal bir paradigma sağlar. Notch, bazı dokularda (örn.; deri keratinositlerinde (Blanpain & Fuchs, 2006) ve akciğerde (Lafkas et al., 2015)) hücrelerel farklılaşmayı teşvik ederken, genellikle kas, bağırsak, hematopoetik ve sinir kök hücrelerinde sinyal aktivasyonu kök hücre sağkalımı ve çoğalması ile ilişkilidir (Bjornson et al., 2012; Fre et al., 2005; Pellegrinet et al., 2011; Philippos et al., 2012; Shen et al., 2004; Varnum-Finney et al., 2000).

Notch sinyal yolağı kök hücrelerde aktif olan en önemli sinyal yollarından birisidir. Özellikle kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında kilit konumdadır. Notch yolağı, interselüler iletişimde görevli olmasının yanında hücrelerel kendini yenileme, apoptozis, farklılaşma ve çoğalmayı kontrol ederek intestinal, nöronal, meme ve over gibi birçok dokunun homeostazını regüle eder. NOTCH1, pankreatik embriyogenezde pankreatik progenitör hücrenin kendi kendine yenilenmesini ve ekzokrin hücre serilerinin gelişimini destekleyerek önemli bir rol oynamaktadır (Miyamoto et al., 2003a).

2.4.1 Pankreas Kanseri ve Kanser Kök Hücrelerinde Notch Yolağının Rolü

Normal gelişen bir pankreasta, Notch sinyal yolağının, kendini yenileme ve farklılaşma arasındaki dengenin önemli bir düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (Apelqvist et al., 1999; Jensen et al., 2000). Notch sinyal yolunun inhibisyonu, pankreas progenitör hücrelerinin tükenmesine yol açar (Apelqvist et al., 1999; Hald et al., 2003; Jensen et al., 2000). Tersine, uyarılmış Notch aktivasyonu ise pankreas

epitelyal farklılaşmasını önler ve farklılaşmamış pankreas progenitör hücrelerinin sirkülasyonunun artmasına neden olur (Hald et al., 2003).

Notch sinyal yolağının aktivasyonu pankreatik karsinogenezin erken evrelerinde meydana gelir. Hem insan çalışmaları hem de fare modelinde Notch yolağı bileşenleri ve NOTCH1 hedeflerinin pankreas kanseri ve öncüllerinde up-regüle olduğu gösterilmiştir. Bu yolağın kök hücrelerde aktif ve önemli olan WNT/B-catenin sinyal yolağıyla da yoğun bir etkileşim halinde olması sebebiyle sinyal yolakları arasındaki bu etkileşimlerin tümörlerin agresifliğinde büyük etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. (Bao et al., 2011; Miyamoto et al., 2003a; Vorvis, Koutsoumpa, & Iliopoulos, 2016). KRAS proto-onkogenindeki aktive edici mutasyonlar, pankreas kanserinde ve varsayılan öncül lezyonlarında, pankreas intraepitelyal neoplazisinde (PanIN) hemen hemen her yerde görülür (Jones et al., 2008). Notch-1, Kras'ın önemli bir downstream aracısıdır ve aralıksız Notch1 sinyalinin, Ras mutant hücrelerinin transforme fenotipinin korunmasında gerekli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Notch sinyalizasyonunun Kras ile sinerjize olduğu, PanIN'in başlatılmasını ve ilerlemesini teşvik ettiği bildirilmiştir (J.-P. De La O et al., 2008). Yapılan son çalışmalar, Kras'ın hücreleri dönüştürme yeteneğinin, Notch sinyal yolu ile işbirliğine de bağlı olduğunu göstermiştir (Weijzen et al., 2002). Bugüne kadar, Kras hedefli ajanları özellikle kanser hücrelerini öldürmek için geliştirme girişimleri hayal kırıklığı yaratmıştır (Van Cutsem et al., 2004). Pankreas kanseri tedavisinin belirlenmesinde Notch sinyal inhibisyonu özellikle cazip olacaktır, çünkü bu yol normal yetişkin pankreas homeostazında önemli bir rol oynamıyor gibi görünmektedir.

Pankreas kanserinin Notch sinyal yoluna bağlı molekülleri aşırı ifade ettiği gösterilmiştir. Pankreas kanserinde yüksek miktarda Notch reseptörleri, Notch ligandları ve Notch hedef genleri ekspresyonu gözlenmiştir (Büchler et al., 2005; J.-P. De La O et al., 2008; J. P. De La O & Murtaugh, 2009; Kimura et al., 2007; Miyamoto et al., 2003b; Mullendore et al., 2009; Sawey, Johnson, & Crawford, 2007). Dahası, TGF- α -indüklemeli asiner-duktal geçiş için Notch aktivitesi gereklidir. Notch aktivasyonunun γ -sekretaz inhibitörleri (GSI) ile önlenmesi, TGF- α ile tedavi edilmiş hücrelerde asiner-duktal metaplaziyi önler (Miyamoto et al., 2003a). Spesifik siRNA kullanılarak Notch-1'in down-regülasyonu veya GSI ile tedavi, azalmış proliferatif oranlar, artmış apoptoz, azalmış hücre göçü ve pankreas kanseri hücrelerinin invaziv özelliklerinin azalması ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Pankreas kanseri fare modellerinde Notch sinyal yolağının, γ -sekretaz inhibitörü (GSI) tarafından inhibe edilmesinin tümör oluşumunu tamamen bloke ettiği gösterilmiştir (Plentz et al., 2009). Notch sinyalizasyonunun düzensiz aktivasyonunun, pankreas kanserlerinde farklılaşmamış öncül hücrelerin birikmesine yol açan ve kanser kök hücrelerinin hayatta kalmasını teşvik eden tetikleyici bir olay olabileceğini gösteren kanıtlar da vardır (Lomberg & Urrutia, 2008). Abel ve ark. primer insan pankreas kanseri hücreleri kullanılarak oluşturulan ksenogreftlerde, kanser kök hücrelerinde (CD44⁺/CD24⁺/ESA⁺) Notch 1-3, Hes1, Jag2 ve DDL1 de dahil olmak üzere Notch yolağı bileşenlerinin ifadelerinin arttığını göstermiştir. Notch yolağının bir gama sekretaz inhibitörü olan R0492907 veya Hes1 shRNA ile inhibe edilmesi, kanser kök hücresi sayısını ve tümör sferoidleri oluşumunun yüzdesini azaltmıştır. Ayrıca, NOD/SCID farelerdeki ortotopik pankreas tümörlerinin *in-vivo* olarak gama-sekretaz inhibitörü MK-0752 ile tedavisi, tümör büyümesini bloke etmiş ve tümörlerde KKH popülasyonunun azalmasını sağlamıştır (Abel et al., 2014). Benzer şekilde, Wang ve ark. pankreas kanser kök hücrelerinde KKH-olmayan popülasyona kıyasla daha yüksek Notch1 ekspresyonu bulmuşlardır (Y. H. Wang et al., 2009). Ji ve ark., CD44⁺/CD133⁺ pankreas KKH'lerinin yüksek seviyede Notch1 ve Notch2 ifade ettiklerini ve miR-34 tedavisinin her iki reseptörün ifadesinin de düşürdüğünü bildirmişlerdir (Ji et al., 2009).

2.5. MikroRNA'ların (miRNA) Biyogenezi (Oluşumu) ve İşlevleri

İlk mikroRNA'nın (miRNA), lin-4, 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'ta (R. C. Lee & Ambros, 2001; Wightman, Ha, & Ruvkun, 1993) Ambros ve Ruvkun'un grupları tarafından keşfedilmesi moleküler biyoloji alanında devrim yaratmıştır. O zamandan beri miRNA'lar tüm hayvan modeli sistemlerinde tespit edilmiş ve bazılarının türler arasında yüksek oranda korunduğu gösterilmiştir (Davis-Dusenbery & Hata, 2010; Friedländer et al., 2014; S. C. Li et al., 2010; Pasquinelli et al., 2000).

miRNA'lar güçlü sekonder yapı motifleri ile en çok ~ 22 nükleotitten oluşan tek iplikli RNA transkriptleridir. Çoğu durumda, miRNA'lar ekspresyonu baskılamak için hedef mRNA'ların 3'UTR'si ile etkileşime girerler (Ha & Kim, 2014). Bununla birlikte, miRNA'ların 5'UTR, kodlama dizisi ve gen promotörleri dahil diğer bölgelerle etkileşimi de rapor edilmiştir (Broughton, Lovci, Huang, Yeo, & Pasquinelli, 2016). Ayrıca, miRNA'ların belirli koşullar altında gen ekspresyonunu aktive ettiği

gösterilmiştir (Vasudevan, 2012). Son dönemlerde yapılan çalışmalar, miRNA'ların, translasyon oranını ve hatta transkripsiyonu kontrol etmek için farklı alt hücre kompartmanları arasında gidip-geldiğini göstermiştir (Makarova, Zhang, & Koonin, 2017).

miRNA biyogenezi, RNA polimeraz II/III transkriptlerinin post- ya da ko-transkripsiyonel olarak işlenmesiyle başlamaktadır (Ha & Kim, 2014). Hali hazırda tanımlanmış tüm miRNA'ların yaklaşık yarısı intrageniktir (aynı gen üzerinde) ve çoğunlukla intronlardan ve nispeten az sayıda protein kodlayan gen ekzonundan işlenirken, diğerleri intergeniktir (kromozom üzerinde başka gende), bir host geninden bağımsız olarak kopyalanır ve kendi promotörleri tarafından düzenlenirler (De Rie et al., 2017; Kim & Kim, 2007).

Hücre proliferasyonu, hücre ölümü, yağ metabolizması, nöronal modelleme, hematopoetik farklılaşma, bağışıklık, yaprak ve çiçek gelişiminin kontrolü gibi çeşitli işlemlerde işlevleri olan bir dizi miRNA bilinmektedir (He & Hannon, 2004). miRNA'lar tarafından düzenlenen genleri bulmak için hesaplama teknikleri ve biyoinformatik algoritmalar, bu örneklerin toplam miRNA sisteminin çok azını temsil ettiğini göstermiştir. miRNA'ların, memelilerdeki belirli süreçlerin düzenlenmesinde kilit rolleri bulunmaktadır. Gen regülasyonunda önemli ve güçlü bir araç olmaları onları potansiyel terapötik hedefler yapmaktadır.

2.5.1. Pankreas Kanserinde MikroRNA'ların (miRNA) Rolü

Pankreas kanseri hücrelerinde çeşitli miRNA'lar tümör baskılayıcıların ifadesini inhibe eden onkogenik mediatörler olarak görev yapmakta ve pankreas kanserinin gelişmesine ve ilerlemesine neden olmaktadır. Öte yandan, bazı miRNA'lar onkogenlerin ifadesini downregüle eden ve böylece kanser büyümesini ve saldırganlığını inhibe eden tümör baskılayıcılar olarak işlev görmektedirler. Pankreas pre-kanserli ve kanserli hücrelerde, belirgin şekilde artmış onkogenik miRNA seviyeleri ve azalmış tümör baskılayıcı miRNA seviyeleri bulunmuştur (Munding et al., 2012; Zhang et al., 2015).

Pankreas kanserinde genelde down-regüle durumda olan miR-217, KRAS'ı düzenleyebilme ve bir tümör baskılayıcı olarak işlev görebilme özelliklerine sahiptir (L. S. Lee et al., 2014). miRNA mikroarray yöntemi ile tümör dokuları kullanılarak yapılan çalışmalarda miR-34a ve miR30d ekspresyonları azalırken miR-21

ekspresyonunun arttığını gösterilmiştir; bu, kanserli dokunun temizlenerek çıkarılabileceği (rezektabl) pankreatik duktal adenokarsinomali hastalarda kötü sağkalım oranları ile ilişkilidir (Jamieson et al., 2012). Hamada ve ark. (S. Hamada et al., 2012; Shin Hamada et al., 2013) pankreatik duktal adenokarsinomada miR-126 ve miR-197 ekspresyonunu tanımlayarak miR-126'nın bir tümör baskılayıcı olarak etki ettiğini, miR-197'nin ise p120-katenin'i hedefleyerek pankreas kanseri hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçişi indüklediğini göstererek miR-197/p120-katenin ilişkisinin yeni bir terapötik hedef olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Diğer fonksiyonel çalışmalar, miR-367'nin *in-vitro* pankreas kanseri yayılımını ve *in-vitro* olarak metastazı teşvik ettiğini ve Smad7'yi düşürdüğünü göstermiştir (Zhu et al., 2015).

miR-196a'nın ekspresyonu, cerrahi olarak temizlenmesi mümkün olmayan pankreas tümörü olan hastalarda up-regüle olarak bulunmuş ve kanser progresyonu ve kötü prognoz ile korele olduğu görülmüştür (Kong et al., 2011). Çok sayıda çalışma, seçilmiş mikroRNA'ların (plazma miR-221) yüksek ekspresyonunun pankreas kanserinin distal metastazlarıyla korele olduğunu veya tümör rezeksiyonundan sonra önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (plazma miR-221 ve miR-18a) (Bettegowda et al., 2014; Morimura et al., 2011). 197 pankreas kanseri hastasından alınan serum örneklerinde miRNA ekspresyon profili, miR-25'in aşırı ekspresyonunu ortaya çıkarmış ve daha büyük bir hasta grubunu içeren sonraki çalışmalar, serum miR-25'in pankreas kanserinin erken tespiti için yeni bir biyobelirteç olarak güçlü bir potansiyele sahip olduğunu doğrulamıştır (Deng et al., 2016).

2.5.2. MikroRNA'ların (miRNA) Kanser Tedavisinde Kullanımı

miRNA'lar insan genomundaki protein kodlayan genlerin yaklaşık %30'unu kontrol eden kodlanmayan-RNA'lara (non-coding RNAs) dahil bir ailedir ve çoğalma, farklılaşma, apoptoz, strese yanıt gibi birçok biyolojik süreçte hedef genleri post transkripsiyonel seviyede regüle ederek kritik rol oynamaktadırlar.

Günümüzde, kanserde miRNA temelli hedefe yönelik terapötik stratejiler;

- 1 - Tümör baskılayıcı miRNA mimic (miRNA taklitçileri) ve
- 2 - Anti-miR'ler/antagomiR'ler olarak bilinen ve onko-miR'lerin etkisini engelleyen miRNA inhibitörlerinin terapötik olarak uygulanmasını içerir (Cheng et al., 2015; Garzon, Marcucci, & Croce, 2010; Ling, Fabbri, & Calin, 2013).

Çift sarmal miRNA-mimik'ler, miRNA ekspresyon kaybını geri kazanmayı amaçlarken, anti-miR'ler, tek sarmallı (anti-sense) oligonükleotitler (miRNA moleküllerini hedeflemek için tamamlayıcı yapılar), onkojenik özellikleri taşıyan mRNA'ları hedeflemek, ilaç direncini ve kanser kök hücresi sağkalımını ve sürdürülmesini etkilemek üzere tasarlanmıştır (Cheng et al., 2015; Garzon et al., 2010; Ling et al., 2013). miR mimiklerinin ve antimiRs/antagomiR'lerin kanser klinik çalışmalarında terapötik kullanımları için, hedef mRNA'lar için bağlanma afinitelerinin, kan dolaşımındaki stabilitelerinin, farmakokinetiklerinin yanı sıra kanser hücrelerine/dokusuna taşınma verimlerinin geliştirilmesini gerekmektedir.

Pankreas kanserinde hedef mRNA ifadesini düzenlemek için terapötik miRNA'ların sistemik kan ortamı, tümör dokusu ve tümör hücresi mikroçevresi de dahil olmak üzere bir dizi biyolojik engeli degrade olmadan geçmesi ve son olarak kanser hücrelerinin sitozolüne sağlam olarak ulaşmaları gerekmektedir. Yüksek moleküler ağırlık ve negatif yük nedeniyle, miRNA'lar zayıf membran penetrasyonunu göstermekte ve dolayısıyla *in-vivo* kararsızlık, biçimsiz biyo-dağılım ve hedef dışı etkiler göstermektedirler. miRNA'nın sistemik dağıtımındaki ilk zorluk, miRNA'yı kan dolaşımında sağlam ve stabil tutmaktır. Bu noktada devreye nanolipozomlar girmektedir. Nanolipozomların spesifik olarak tümör hücrelerini hedef almamakla birlikte, tümör ile ilişkili endotelin geçirgenliği ve retansiyon etkisinin artması nedeniyle, tümör dokularında pasif olarak birikmeleri sayesinde miRNA iletimi gerçekleşir.

miRNA bazlı terapötiklerin pre-klinik hayvan çalışmalarında (Arora et al., 2014; Q. L. Hu et al., 2013; Janssen et al., 2013; Jopling, Yi, Lancaster, Lemon, & Sarnow, 2005; Y. Li & Sarkar, 2016; Ohno et al., 2013; Pai, Rachagani, Are, & Batra, 2013; Pramanik et al., 2011; Y. Wu et al., 2013) başarılı olduğu, bazılarının ise kanser ve diğer hastalıklar için insan klinik çalışmalarına gittiği gösterilmiştir (Bader, 2012; Janssen et al., 2013; Seto et al., 2018). İlk miRNA bazlı klinik çalışma, Hepatit C virüsü ile enfekte olan karaciğer hücrelerinde miR-122'yi hedef alan LNA bazlı bir miRNA inhibitörü kullanılarak Faz II'ye geçen MIRAVIRSEN olmuştur (Janssen et al., 2013). Bir başka miRNA-mimik ilacı olan MRX34, Faz I klinik deneyinde lipid bazlı bir nanoparçacık olarak, karaciğer gibi katı tümörleri tedavi etmek için, aynı zamanda hematolojik malignitelerin tedavisi için kullanılmıştır (Bader, 2012). Ne yazık ki, bu çalışma yakın zamanda ilacın yan etkileri nedeniyle sonlandırılmıştır. Bir anti-miR-155 (inhibitör) tedavisi olan COBOMARSEN, yetişkin T hücreli

lösemi/lenfoma hastaları için devam etmektedir ve objektif hastalık ölçümlerinde iyileşme ile beş aydan uzun süren klinik yanıt göstermiştir (Seto et al., 2018).

2.5.3. hsa-miR-193 Ailesi

miRBase mikroRNA dizi veritabanındaki bilgiler temel alındığında, miR-193 ailesi bunlardan yedisinin güvenilirliği yüksek olan 56 miRNA dizisi içermektedir. Bunlar arasında, sırasıyla 17 (chr17: 31559996-151560083) ve 16 (chr16: 14303967-14304049) sayılı kromozomlarda bulunan miR-193a ve miR-193b vardır. Bu mikroRNA'lar olgun formda, evrim sürecinde oldukça iyi korunmuş, uzunlukları 22 nükleotitten oluşan kısa-kodlamayan RNA'lardır .

Yakın zamanda, miR-193'ün normal hücrelerde çoğalma ve hücre döngüsü regülasyonunu kısıtlayabileceği belirtilmiştir. Buna karşılık, miR-193'ün hem sıvı hem de katı tümörlerde tümör baskılayıcı işlevi gördüğü de bulunmuştur (Grossi, Salvi, Abeni, Marchina ve De Petro, 2017). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada miR-193b ifadesi insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinden (hADSC'ler) kondrosit gelişiminde belirlenmiştir. Ayrıca, erken kondrogenezde özellikle büyüme büyüme faktörü $\beta 2$ (TGF - $\beta 2$) ve TGF $\beta R3$ 'ü 3'UTR bölgelerinden hedefleyen miR-193b-3p'nin inhibe edici aktivitesi de araştırılmıştır (Hou ve diğ., 2015).

Son çalışmaları takiben miR-193b'nin DNA metilasyonu, ilaç duyarlılığı ve tümör metastazında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Gao ve ark. 2011). Ayrıca, epidermis karsinogenezi sırasında miR-193b-3p/365a kümesinin, RAS ve Myc yollarında MAX ve KRAS dahil olmak üzere spesifik hedeflerin baskılanmasıyla anti-tümoral etkisi teyit edilmiştir (Gastaldi et al., 2014).

miR-193b-3p'nin pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) örneklerinde ve hücre hatlarında down-regüle olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. Ek olarak, miR-193b'nin G1 fazı durmasının (arrest) uyarılmasıyla pankreas kanseri hücrelerinde bir hücre döngüsü inhibitörü olarak etki ettiği ve bununla birlikte hücre çoğalmasını düzenlediği bulunmuştur. miR-193b ayrıca KRAS'ın AKT ve ERK yolları üzerinden doğrudan hedeflenerek pankreas kanseri hücrelerindeki malign transformasyon fenotipini de baskılamaktadır (Jin ve diğerleri, 2015). Bunun yanı sıra, miR-193b, pankreas kanserinde mitojenle-aktive protein kinaz (MAPK) ile de bağlantılıdır (Ikeda, Tanji, Makino, Kawata ve Furukawa, 2011).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan PANC-1 ve MiaPaCa-2 insan pankreas kanseri hücre hatları Texas Üniversitesi MD Anderson Kanser Merkezi Hücre Hattı Merkezi'nden temin edilmiştir. PANC-1 hücre hattı pankreatik duktal adenokarsinoma kaynaklı ve kötü diferansiye hücrelerdir. MiaPaCa-2 hücre hattı ise pankreatik adenokarsinoma kaynaklı kötü diferansiye hücrelerdir. Bu hücre hatlarının seçilme sebebi pankreas kanseri modelinde genellikle kullanılan, morfolojik ve genetik karakteristikleri iyi çalışılmış hücreler olmalarıdır.

PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri, %10 oranında Fetal Bovin Serum (FBS) (35016CV, Corning, USA) ve Penisilin/Streptomisin (100 unit/ml) (30002CL, Corning, USA) eklenmiş DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (10090CV, Corning, USA) besiyerinde, 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ / %95 atmosferik hava barındıran inkübatör (3010, Thermo Scientific, ABD) koşullarında çoğaltılmışlardır.

3.2. Floresanla Aktive Hücre Ayırma (FACS) Yöntemi ile PANC-1 ve MiaPaCa2 Hücre Hatlarından Kanser Kök Hücrelerinin İzole Edilmeleri

PANC-1 ve MiaPaCa-2 hücreleri 10x10⁶ hücre elde edilebilecek miktarda çoğaltıldıktan sonra floresanla aktive hücre ayırma (FACS) yöntemiyle /EpCAMkanser kök hücrelerinin izolasyonu akım sitometri cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Bunun için hücreler flaskları %90 kapladıktan sonra, % 0,25 Tyripsin-EDTA (TD-4049-100, Sigma, ABD) kullanılarak flask yüzeyinden kalkmaları sağlanmıştır. Ardından 1000 rpm x 5 dakika süreyle santrifüj edilmişlerdir. Hücre sayımı, Countess II otomatik hücre sayım cihazında (AMQAX100, Thermo Scientific, ABD) Tripan mavisi kullanılarak yapılmıştır. Hücre sayısının belirlenmesinden sonra, hücreler uygun boyama tamponu (RUO-554656, Beckton Dickinson, ABD) içerisine alınarak hücre konsantrasyonu 5x10⁶/ml hücre olacak şekilde tekrar süspansiyon haline getirilmişlerdir. Daha sonra, hücreler CD133-PE (12-1338-42, ThermoScientific,

ABD) (10ul/10⁶ hücre), CD44-APC (17-0441-82, ThermoScientific, ABD) (10ul/10⁶ hücre) ve EpCAM-AlexaFluor488 (53-8326-42, ThermoScientific, ABD) (10ul /10⁶ hücre) ile floresan bağlı antikorlar ile 20 dakika boyunca karanlıkta 4°C'de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sona erdikten sonra, hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve %1 BSA ile takviye edilmiş fosfat tamponlu (PBS) ile yeniden süspanse edilmişlerdir. Daha sonra, hücreler, MD Anderson Kanseri Merkezi Akış Sitometrisi ve Hücresel Görüntüleme Analizi Merkezi'nde bulunan FACS Aria II (Beckton Dickinson, ABD) floresanla aktive edilmiş hücre analiz cihazı kullanılarak /EpCAMpopülasyonu (kanseri kök hücreleri) (CSC) ve -/EpCAM- kanseri kök hücresi- olmayan (non-CSC) hücre popülasyonu olarak izole edilmişlerdir.

3.3. Tümör (Sferoid) Oluşturma Kabiliyeti Deneyi

Kanseri kök hücre izolasyonundan sonra, tümör oluşurma kabiliyetini ölçmek için hücreler, Mammocult proliferasyon takviyesi (05622, StemCell Technologies, ABD) eklenmiş Mammocult İnsan Tümör Oluşturma Besiyeri (37°C) (05620, StemCell Technologies, ABD) ile süspansiyon haline getirilmiştir. 0,48 ug / ml Hidrokortizon (07925, StemCell Technologies, ABD) ve 4ug/ml Heparin (07980, StemCell Technologies, ABD) ve hücrelerin zeminine yapışmasını engelleyen özel 6 kuyucuklu plakalara (ultra-low adherent) (27145, StemCell Technologies, ABD) kuyucuk başına 1x10³ hücre olacak şekilde ekilmişlerdir. Devamında tümör oluşumu takip edilmiş ve tümör oluşumları kristal viyole ile boyanarak en az 50 hücresinden oluşan tümör küreleri Image J yazılımı kullanılarak sayılmıştır. Birbirinden bağımsız en az 3 sayım yapılmıştır.

3.4. Yumuşak Agarda Koloni Oluşturma Deneyi

Alt agaroz tabakasının hazırlanması; HBSS (Hank's Balance Salt Solution) (14025092, Gibco, ABD) kullanılarak %5 agaroz (05077, Sigma, ABD) çözeltisi hazırlanmış ve 15 dakika 121°C'de otoklavlanmıştır. Daha sonra bu karışımın küçük bir miktarına son agar konsantrasyonu %0,5 olana kadar besiyeri (37°C) ilave edilmiştir. 12 kuyucuklu steril hücre kültürü plakasının her kuyucuğuna bu karışımdan 0,8 ml eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca katılaşması sağlanmıştır. Agaroz-hücre karışımı üst tabakanın hazırlanması; /EpCAM kanser kök hücreleri santrifüj edilip PBS ile yıkandıktan sonra, Mammocult proliferasyon takviyesi (05622, StemCell Technologies, ABD), 0,48 ug / ml Hidrokortizon (07925, StemCell Technologies, ABD) ve 4ug/ml Heparin (05622, StemCell Technologies, ABD) ile tamamlanan besiyeri ile yeniden süspanse edilmişlerdir. Daha sonra %5 agaroz çözeltisi ve hücre süspansiyonu, son agaroz konsantrasyonu % 0,3 (1×10^3 hücre /0,8 ml) olacak şekilde homojen olarak karıştırılmıştır. 12 kuyucuklu bir plaka kullanılarak her bir kuyucuğa 0,8 ml hücre-agaroz karışımı, katılaştırılmış alt agaroz tabakası üzerine ilave edilmiş ve inkübatörde 30 dakika boyunca katılaşması sağlanmıştır. 30 dakika sonra, agarozun kurumasını önlemek için üstüne 800 ul besiyeri eklenerek %95 hava ve %5 CO₂ karışımı ile 37 ° C 'deki inkübatöre alınmıştır. Koloni oluşumu 3 hafta izlenmiş, sonra koloniler %0,1 kristal viyole ile boyanmış ve Image J yazılımı kullanılarak sayılmıştır.

3.5. siRNA ve miRNA Transfeksiyonları

Hücreler, 6 kuyucuklu steril hücre kültürü plakalarına (1×10^5 hücre/kuyucuk) ekildikten 24 saat sonra, 100 uM siRNA ve 100 uM negatif kontrol siRNA, 50 uM miR-193b-3p-mimik ve 50 uM negatif kontrol miRNA mimik, HiPerfect transfeksiyon ajanı ile karıştırılarak hücreler transfekte edilmiştir. siRNA-HiPerfect ve miRNA-HiPerfect karışımları, FBS ve penisilin/streptomisin içermeyen DMEM/F12 besiyeri ile süspanse edilmiştir. 5 saatlik inkübasyon süresinden sonra, transfeksiyon besiyeri alınarak her kuyucuğa %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin ile takviye edilmiş 2'şer ml DMEM/F12 besiyeri ilave edilmiştir. Hücreler 72 saat inkübe edilmiş ve western blot analizi için toplanmışlardır. Aynı işlem, PCR analizi için kullanılacak hücrelere de yapılmıştır.

Tablo 1. Transfeksiyon için kullanılan ürünler

İsim	Katalog No	Firma
Notch1 siRNA -1	SASI_Hs02_00350287	Sigma-Aldrich, ABD
Notch1 siRNA -2	SASI_Hs01_00052328	Sigma-Aldrich, ABD
Notch2 siRNA -1	SASI_Hs01_00068799	Sigma-Aldrich, ABD
Notch2 siRNA -2	SASI_Hs01_00068800	Sigma-Aldrich, ABD
Negatif Kontrol siRNA	SIC001	Sigma-Aldrich, ABD
hsa-miR-193b-3p-3p Mimik (miRBase Accession: MIMAT0002819)	4464067	Ambion, Thermo Fisher Scientific, ABD
Negatif Kontrol miRNA mimik	4464059	Ambion, Thermo Fisher Scientific, ABD
HiPerfect Transfeksiyon Ajanı	301705	Qiagen, ABD

3.6. Migrasyon Deneyi

Migrasyon kapasitesindeki değişimi ölçebilmek için *in-vitro* yara iyileşmesi deneyi kurgulanmıştır. Bunun için 6-kuyucuklu steril hücre kültürü plaklarına ekilen siRNA ve miRNA'lar ile transfekte edilmiş hücrelerin yapıştığı flask tabanı 200 ul'lik steril pipet ucu ile boydan boya çizilmiştir (0. saat). Ardından yüzen hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için besiyeri değişimi yapılmıştır. Sonra 0., 24., ve 48. saatlerde faz-kontrast mikroskobu (Nikon Eclipse TE-200-U, Japonya) kullanılarak çilen alanların fotoğrafı çekilmiştir. Migrasyon, belirlenen her bir zaman anında (0., 24. ve 48. saatler) hücre tabakası çizilerek oluşturulan kenarlardan hücrelerin göç ettikleri mesafeler ölçülerek hesaplanmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Migrasyon 0. ile 24. saatler arasında çekilen fotoğraflarla 24. ve 48. saatlerde çekilen fotoğraflar karşılaştırılarak gösterilmiştir. Her deney için en az 5 rastgele örtüşmeyen fotoğraf, ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, ABD) kullanılarak test edilmiş ve ölçülmüştür.

3.7. İnvazyon Deneyi

İnvazyon testi matrijel (0,7 mg/mL; 356234, BD Biosciences, ABD) ile kaplanmış geçirgen membranlı transwell sistemi (8 µm por boyutlu; 353097, Fisher Scientific, ABD) kullanılarak yapılmıştır. siRNA ve miRNA'lar ile transfekte edilmiş hücreler bu transfeksiyonlar yapıldıktan 72 saat sonra transwell sistemindeki üst kuyucuklara serumsuz besiyerinde (4×10^4 hücre/100ul) alınmışlardır. 24 saat bu şekilde inkübe edilerek %10 FBS içeren besiyeri bulunan alttaki kuyucuklara invazyonları izlenmiştir. Sürenin sonunda invaze olan hücreler fikse edilerek Hema3 Boyama Kiti (22-122911, Fisher Scientific, ABD) ile boyanmışlardır. Altta kalıp invaze olmayan hücreler pamuklu çubuk yardımıyla silinerek uzaklaştırılmışlardır. İnvaze olan hücreler ışık mikroskobu kullanılarak sayılmış ve sayım en az 5 farklı alanda yapılarak ve 3 tekrarlı olacak şekilde kurgulanmıştır. Görüntüler ImageJ yazılımı (NIH, Bethesda, ABD) kullanılarak test edilmiş ve ölçülmüştür.

3.8. hsa-miR-193b-3p-3p için Lusiferaz Raportör Deneyi

96-kuyucuklu hücre kültürü plaklarına 1×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Sonra Notch2'nin 3'UTR'sinde miR-193b-3p için bağlanma yerlerini içeren pEZX-MT06 miRNA raportör vektörleri ve lusiferaz geni ile (GeneCopoeia, ABD) transfekte edilmişlerdir. Hücreler transfeksiyondan 24 saat önce 24 kuyucuklu steril hücre kültürü plakasına (5×10^4 hücre/kuyucuk) ekilmişlerdir. Hücreler, pEZX-MT06 vektörü (200 ng) ve 50 nM miR-193b-3p-mimik veya kontrol-miRNA ile transfekte edilmişlerdir. Lusiferaz aktivitesi, Luc-Pair miR Lusiferaz Assay (GeneCopoeia, ABD) kullanılarak transfeksiyondan 48 saat sonra ölçülmüştür. Her numune için firefly lusiferaz aktivitesi, *Renilla* lusiferaz aktivitesi referans alınarak normalleştirilmiştir. Deney her grup için 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.9. Annexin V ile Apoptoz Tayini ve Hücre Döngüsü Analizi

siRNA ve miRNA'lar ile transfekte edilen hücreler üreticinin protokolüne göre, bir FITC apoptoz saptama kiti (BDB556547, BD Biosciences, ABD) kullanılarak Annexin V/PI boyama ile analiz edilmişlerdir. Kit içerisindeki solüsyonlar ile muamele edilen hücreler, MD Anderson Kanseri Merkezi Akış Sitometrisi ve Hücresel Görüntüleme Analizi Merkezi'nde bulunan FACS Calibur akış sitometresi (BD Biosciences, ABD) cihazı ile analiz edilmişlerdir. Apoptotik hücrelerin sayısını saptamak için CellQuest Pro yazılımı (BD Biosciences, ABD) kullanılmıştır. Hücre siklus testi Propidium Iodide boyama ile değerlendirilmiştir.

3.10. Protein İzolasyonu ve Western Blot

Proteinler %1 proteaz inhibitör kokteyli (P8340, Sigma Aldrich Biotechnology, ABD), %1 fosfataz inhibitör kokteyli (P2850, Sigma Aldrich Biotechnology, ABD) ve % 0,4 sodyum florür eklenen ripa tamponu (89900, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak özütlenebilirler. Örnekler, buz üzerinde 30 dakika boyunca ripa tamponu içerisinde inkübe edilmiş ve bu süre içerisinde her 5 dakikada bir vorteksenerek homojenite sağlanmıştır. 30 dakika dolunca, örnekler 13500 rpm'de 15 dakika, 4°C sıcaklıkta

santrifüj edilmişlerdir. Daha sonra protein içeren süpernatantlar yeni tüplere alınmıştır. Protein ölçümü, Pierce BCA protein ölçüm kiti (23225, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak 570nm dalga boyunda yapılmıştır. Daha sonra numuneler, Laemmli-SDS tamponu (BP-111NR, BioPlus, ABD) ile karıştırılmış ve 95°C’de 5 dakika kaynatılmıştır. Örnekler 40ug/30 ul protein miktarı olacak şekilde %10’luk hazır poliakrilamid jele (4561033, Bio-Rad, ABD) yüklenerek 60V’ta 30 dk ve 100V’ta 60 dk. yürütülmüşlerdir. Ardından PVDF (polivinilden florit) (IPVH00010, Merck-Millipore, Almanya) membranlar metanol ile aktive edilmiş ve proteinler 16 saat süresince 23V’luk güç kaynağı kullanılarak jellerden membranlara transfer edilmişlerdir. Membranlar sonra 10 dakika boyunca TBS-T (% 2 Triton X-100 içeren Tris tampon salin) ile yıkanmış ve %5’lik süt tozu (1706404, Bio-Rad Laboratories, ABD) ile hazırlanan bloklama çözeltisi ile 1 saat inkübe edilerek ardından gece boyunca primer antikor ile muamele edilmişlerdir. Daha sonra membranlar HRP (horseradish peroksidaz enzimi) bağlı ikincil antikorla inkübe edilmiş ve protein seviyelerini oluşturan bantlar kemilüminesan belirleme kiti kullanılarak Alpha Innotech Imager HP System’de (ProteinSimple, ABD) görüntülenmişlerdir.

Tablo 2. Western Blot için kullanılan antikorlar

Antikor	Katalog No. / Firma	Kullanılan Konsantrasyon
NOTCH1	3608S, Cell Signal, ABD	1:500
NOTCH2	4530S, Cell Signal, ABD	1:500
NIICD	AF3647, R&D Systems, ABD	1:500
N2ICD	07-1233, Merck Millipore, ABD	1:1000
OCT4	2750S, Cell Signal, ABD	1:200
SOX2	14962S, Cell Signal, ABD	1:200
NANOG	8822S, Cell Signal, ABD	1:500
B-ACTIN	58169S, Cell Signal, ABD	1:10000
IgG-HRP	7074S, Cell Signal, ABD	1:1000
IgG-HRP	7076S, Cell Signal, ABD	1:1000

3.11. RNA İzolasyonu ve RT-qPCR Analizi

Örneklere (1000 ul/kuyucuk) TRIzol RNA izolasyon reaktifi (15596026, Thermo Scientific, ABD) eklenmiş, vortekslenmiş ve buz üzerinde 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra her örneğe 200 ul kloroform eklenmiş ve 3'er dakika beklenmiştir. Örnekler, 6500 rpm'de, 15 dakika boyunca santrifüj edilmişlerdir. Karışım kırmızı renkli fenol-kloroform, interfaz ve renksiz üst faza ayrılmıştır. Renksiz faz, tüpleri 45° açı ile eğerek ve pipetle alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Her tüpe 500 ul 2-izopropanol ilave edilmiş ve 10'ar dakika inkübe edildikten sonra 6500 rpm 10 dakika santrifüjlenmişlerdir. Total RNA, tüpün dibinde beyaz bir topak olarak çökelmiştir. Süpernatalar atılmış ve örnekleri yıkamak için her tüpe 1 ml %75 etanol ilave edilerek vortekslenmiştir. Örnekler 10'ar dakika 6500 rpm'de santrifüjlenmiş ve süpernatalar atılmıştır. Sonra 15 dakika hava ile kurutularak 40'ar ul nükleaz içermeyen su ile yeniden süspanse edilmişlerdir. Ardından 55°C'de 15 dak. tutulup Nanodrop cihazı (ThermoScientific, ABD) kullanılarak kalite ve miktar ölçümleri yapılmıştır. Sonra RT-PCR analizinde kullanılmak üzere -20°C'de saklanmışlardır.

miR-193b-3p ekspresyon seviyelerini ölçebilmek için ilk önce cDNA, qScript mikroRNA cDNA Sentez Kiti (Quanta Biosciences, ABD) kullanılarak sentezlenmiştir. Gerçek zamanlı qPCR yöntemi ile miR-193b-3p-3p primeri (Sigma Aldrich, ABD) ve PerfeCTa Sybr Green SuperMix kullanılarak BX-384 RT-PCR tespit cihazında (Bio-Rad, ABD) ölçülmüş ve endojen kontrol olarak da U6 küçük nükleer RNA (RNU6) (Qiagen, ABD) kullanılmıştır.

Notch1 ve Notch2 mRNA seviyeleri kiti üretici firmanın protokolüne göre ölçülmüştür. İzole edilmiş RNA'dan ilk önce cDNA, cDNA Sentez Kiti (Quanta Biosciences, ABD) kullanılarak sentezlenmiştir. qRT-PCR, Sso Advanced Universal SYBR-Green SuperMix (Bio-Rad, ABD) kullanılarak BX-384 RT-PCR tespit cihazında (Bio-Rad, ABD) yapılmıştır. Reaksiyonlar üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Notch1 ve Notch2 mRNA ekspresyon seviyeleri gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) internal kontrol kullanılarak normalleştirilmiştir. Sens (Forward) ve anti-sens (Reverse) Notch1 primerlerinin sekansları 5'-

CCTGACACCCCTGGACAATG-3' ve 5'-GGCACGATTTCCCTGACCA-3', Notch2 primerleri idi.

Sırasıyla 5'-ATGAGTGCCAGAATCAGCCC-3', 5'-CTTCACAGAGTAGGCCCCGA-3' Sens (Forward) ve anti-sens (Reverse) GAPDH primerlerinin sekansları sırasıyla 5'-CAAGGTCATCCATGACAACTTTG-3' ve 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3' idi. mRNA ve miRNA ifadelerinin nispi nicelemesi, karşılaştırmalı threshold cycle ($2 - \Delta\Delta Ct$) yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.12. İmmünopresipitasyon (IP) Deneyi

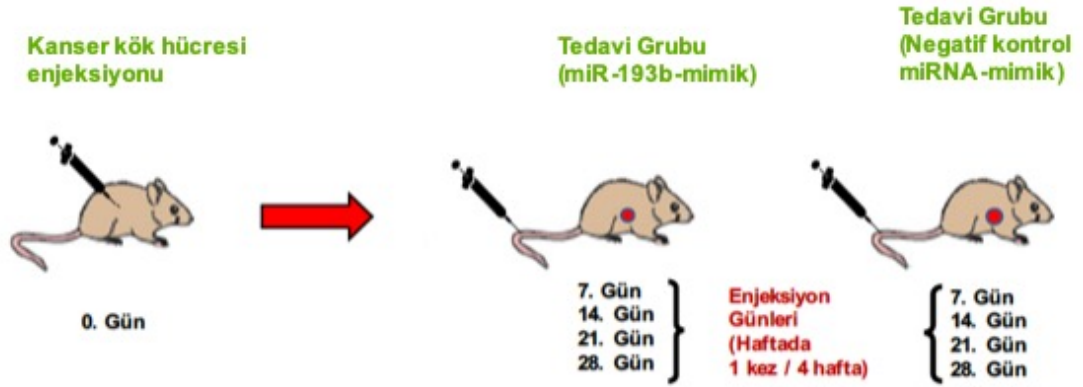
İmmünopresipitasyon (İmmünçökeltme-IP) testi, kiti üretici firmanın yönergelerine göre (Abcam, ABD) yapılmıştır. Hücreler, buz üzerinde soğuk PBS ile yıkanmış ve lizis tamponu ilave edilmiştir. Süspansiyon bir tüp içinde toplanmış ve döner bir karıştırıcıda 30 dakika boyunca karıştırılmış, daha sonra 4°C'de 10000g /10 dk. santrifüjlenmiştir. Daha sonra, gece boyunca anti-Notch1 (Cell Signaling, ABD) ve anti-Notch2 (Cell Signaling, ABD) ve anti-IgG (Abcam, ABD) antikoları ile inkübe edilmiştir. Ertesi gün, proteinler A/G Sepharose Beads ile 2'er saat inkübe edilmişler ve 3'er kez yıkama tamponu ile yıkanmışlardır. Daha sonra proteinler bir SDS-poliakrilamid jeli üzerinde yürütülmüş ve PVDF membrana aktarılacak ve western blot metodu ile analiz edilmiştir.

3.13. miR-193b-3p-mimik ve kontrol miRNA-mimik Taşıyan Nanolipozomların Hazırlanması

miR-193b-3p-mimik'i ve negatif kontrol miRNA-mimik'i *in-vivo* olarak tümörlü farelere vermek için yüksüz olan ve toksisite oluşturmeyen DOPC (diooil fosfatidilkolin) temelli pegile nanolipozomlar kullanılmıştır. miR-193b-3p-mimik ve negatif kontrol miRNA-mimik, nanolipozomlar ile 1:10 oranında karıştırılarak yüksek miktarda tersiyer bütanol varlığında reaksiyona sokulmuş ve daha sonra bu karışıma 1:19 oranında Tween-20 eklenmiştir. Karışımlar vortekslendikten sonra aseton ve kuru buzdan oluşan buz banyosunda donmaya bırakıldıktan sonra liyofilize hale getirilmişlerdir. *In-vivo* uygulamadan önce oda ısıda bulunan PBS ile 200 µg miRNA/enjeksiyon olacak şekilde sulandırılmışlardır.

3.14. Pankreas Kanseri Tümör Ksenograft Modelinin Oluşturulması

Hayvan deneyleri, MD Anderson Kanseri Merkezi Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Kurulu tarafından onaylanan deneysel protokole göre yürütülmüştür. Heterotopik pankreas tümörleri oluşturmak için MD Anderson Kanseri Merkezi Hayvan Deneyleri Birimi'nden (4-5 haftalık) temin edilen atimik nude fareler kullanılmıştır. Hazırlanan kanser kök hücrelerine (%20 matrigel içinde 3×10^4) farelere heterotopik olarak alt kadrana enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan sonraki 8. günde, her farenin tümörün büyüklüğü yaklaşık 3-5 mm'ye ulaştığında, lipozomal-miRNA tedavisine başlanmıştır. Her fareye, kuyruktan 4 hafta boyunca 100 ul bir hacimde miR-193b-3p mimik veya kontrol miRNA mimik (haftada bir kez 8 mg / kg'lık 0,3 mg / kg eşdeğeri) enjekte edilmiştir (toplam beş intravenöz enjeksiyon [iv]). Tümör boyutları düzenli olarak bir elektronik kumpas ile ölçülmüştür. Tedavi tamamlandığında, fareler izofluran inhalasyonu sağlanarak ötenazi edilmiş ve tümör büyümesini ölçmek için tartılmışlardır. Ardından tümör dokuları yapılacak analizler için alınmıştır.



Şekil 2. *In-vivo* tümör modeli ve tedavi şekli

3.15. Tümör Boyutlarının Ölçülmesi

Tümör oluşumundan sonra belirginleşmeye başlayan her gruptaki tümörlerin boyutları 3 günde 1 ölçülmüş ve zamana bağlı olarak gruplar arası tümör büyüme farklılıklarına bakılmıştır.

3.16. İmmünohistokimyasal Boyamalar

Formalinle fiks edilmiş ve parafine gömülmüş tümör dokularından alınan 5 µm'lik kesitler kit üreticinin protokolüne göre Ki-67, CD31, Notch1 ve Notch2 için immün boyamaya tabi tutulmuşlardır. Kesitler, 55°C'de 30 dakika ısıtılarak deparafinize edilmiş, daha sonra ksilene maruz bırakılarak parafinin çözülmesi sağlanmıştır. Sonra sırasıyla %100x2, %95x2 ve %80'lik etil alkol serisinden geçirilerek rehidrasyon sağlanmıştır. Bundan sonra, kesitler 95 dakika süreyle 95°C'de antijen retrieval çözeltisinde (Dako, ABD) inkübe edilmişlerdir. Endojen peroksidaz aktivitesi, 15 dakika boyunca % 3 hidrojen peroksit içeren metanol içinde kesitleri bekleterek bloke edilmiştir. Slaytlar, bir gece boyunca 4°C'de Ki-67 (Abcam, ABD), CD31 (Abcam, ABD), Notch1 (Hücre Sinyali, ABD) ve Notch2 (Hücre Sinyali, ABD) primer antikorları ile inkübe edilmişlerdir. Daha sonra, oda sıcaklığında kesitlere 1 saat sekonder antikorlar uygulanmıştır. Ardından, kesitler 30 saniye boyunca

hematoksilende tutulmuş ve çeşme suyu kullanılarak yıkanmışlardır. Görsel analiz ışık mikroskobu (Nikon Eclipse TE-200-U) kullanılarak yapılmıştır.

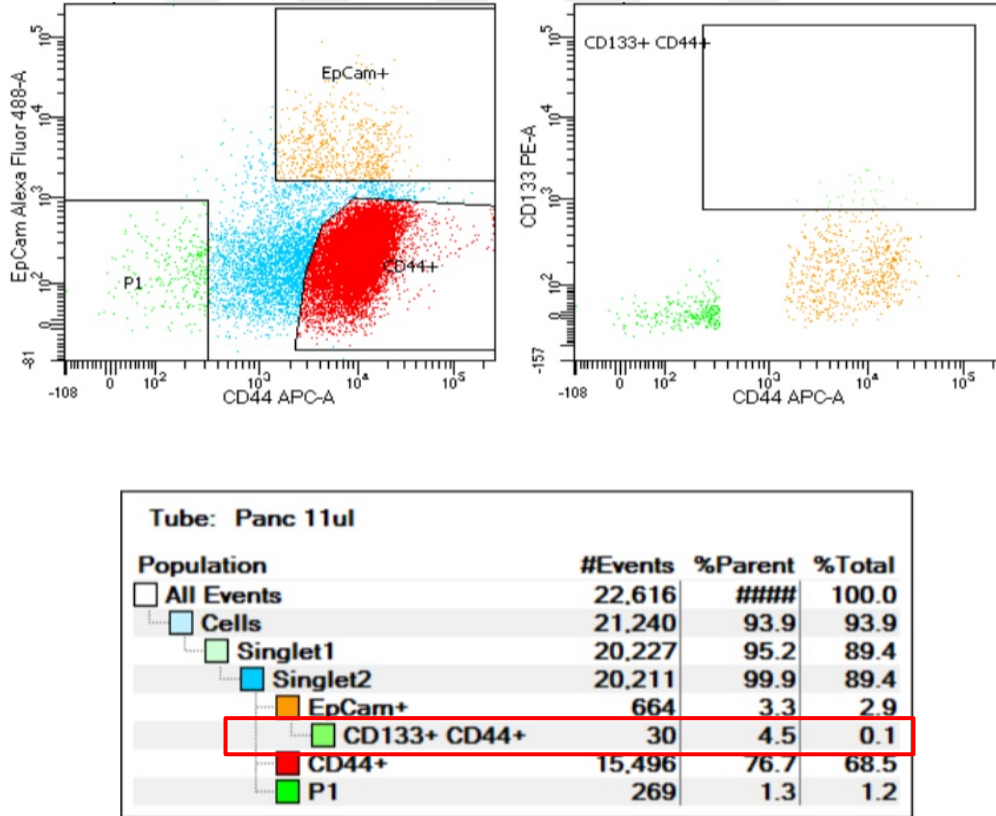
3.17. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel açıdan anlamlı olması için birbirinden bağımsız 3'er tekrarlı (örnekli) yapılan deneylerin verileri $\pm$ SD (Standard Deviation – Standart Sapma) olarak analiz edilmiştir. Farklı gruplar için nicel veriler Student t-testi ile karşılaştırılmış ve p değerleri <0.05 bulunanlar anlamlı kabul edilmiştir. Dağılımın normalliği Shapiro-Wilk testi kullanılarak test edilmiştir. Tanımlanmış moleküler ve hücresel fonksiyonlarda farklılıkların önemini tanımlamak için Fisher Kesin Testi kullanılmıştır. Kontrol ve tedavi gruplarının karşılaştırılması için varyans analizi kullanılmıştır. Analizler, GraphPad Prism (sürüm 6.02) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

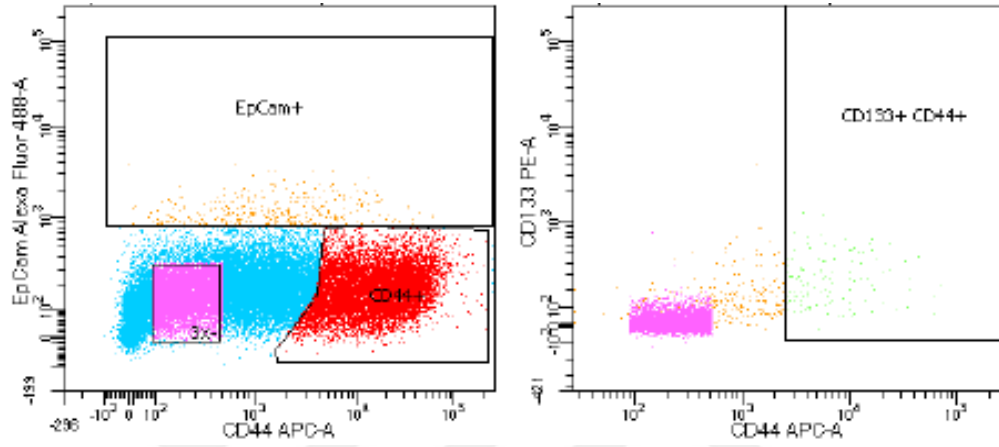
4. BULGULAR

4.1. CD133⁺/CD44⁺/EpCAM⁺ Pankreas Kanser Kök Hücrelerinin İzolasyonu

Sort (hücre ayırma) için her işlemde 10x10⁶'ar Panc1 ve MiaPaCa2 hücrelerinden sırasıyla 0,1% ve 0,3% CD133⁺/CD44⁺/EpCAM⁺ kanser kök hücresi izole edilebilmiştir. Üç farklı dalgaboyunda ışıma veren üç farklı floresan bağlı antikörle aynı anda üçlü seçim yapılması mümkün olmadığı için ilk önce Epcam⁺ popülasyonlar belirlenmiş; ardından CD133⁺/CD44⁺ popülasyonlar belirlenerek bu popülasyonlar üçlü pozitif ve üçlü negatif olarak iki ayrı grup şeklinde steril tüplere toplanmıştır (Şekil 3 ve Şekil 4).



Şekil 3. PANC1 hücre hattından izole edilen CD133⁺/CD44⁺/EpCAM⁺Kanser Kök Hücrelerinin dağılımı



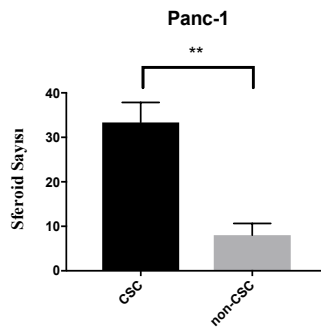
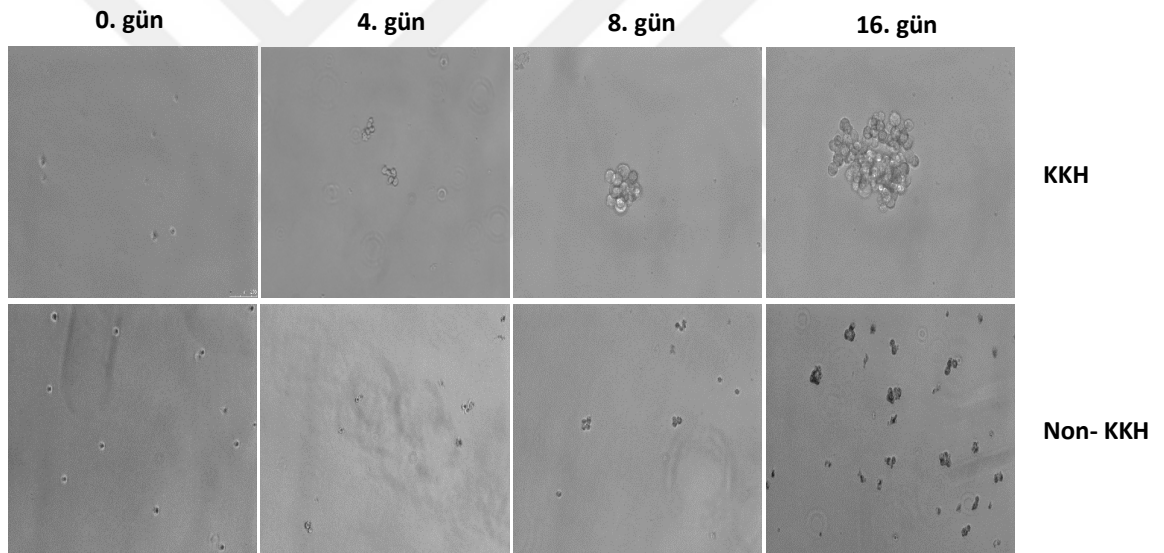
Tube: 1ul MIAPACA 2

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	44,760	####	100.0
Cells	42,082	94.0	94.0
Singlet1	34,575	82.2	77.2
Singlet2	34,381	99.4	76.8
EpCam+	361	1.0	0.8
CD133+ CD44+	121	33.5	0.3
CD44+	11,018	32.0	24.6
3x-	7,171	20.9	16.0

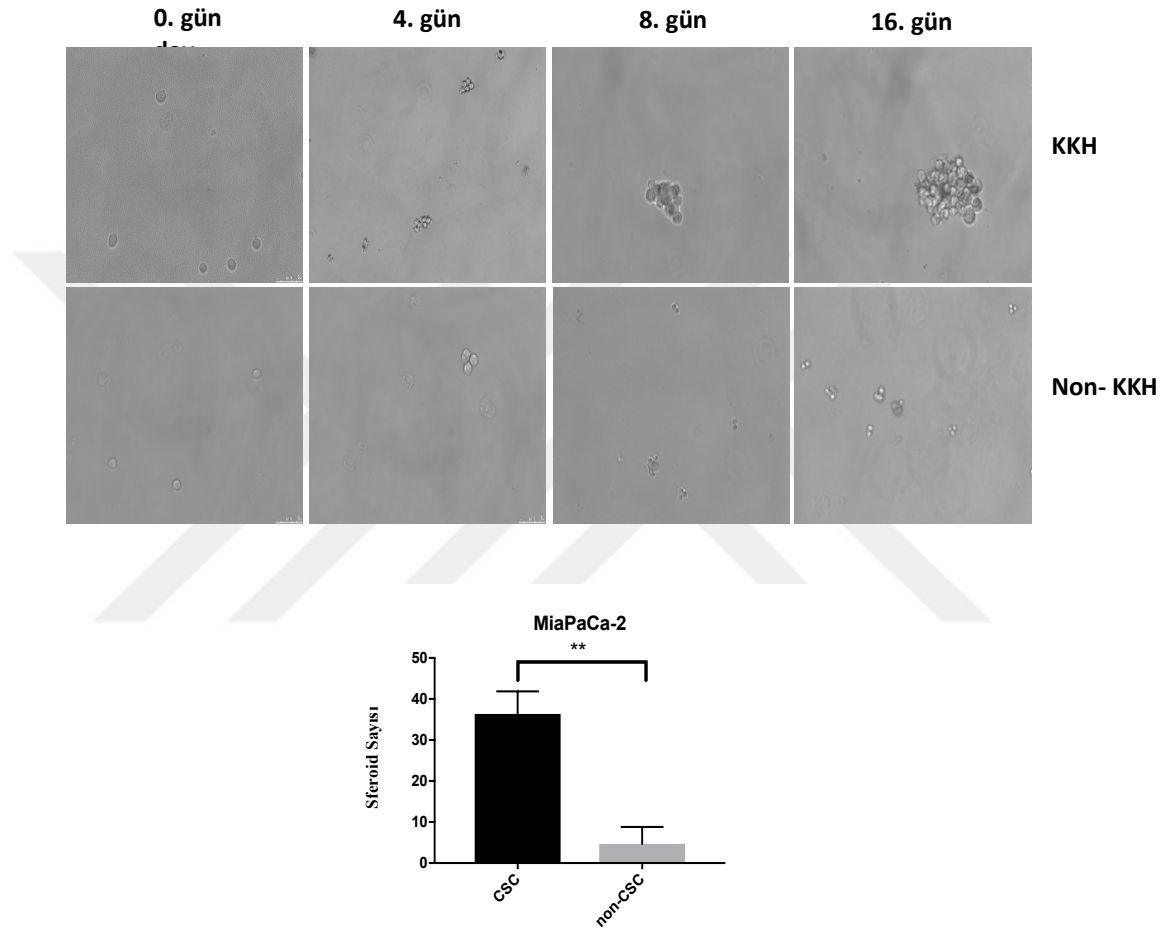
Şekil 4. MiaPaCa2 hücre hattından izole edilen CD133⁺/CD44⁺/EpCAM⁺ Kanseri Kök Hücrelerinin dağılımı

4.2 Tumor (Sferoid) Oluşturma Kapiliyeti

Panc1 ve MiaPaCa1 hücre hatlarından izole edilen CD133⁺/CD44⁺/EpCAM⁺ (KKH) hücrelerin kök hücre özelliklerinin karakterizasyonu için tumor oluşturma kapasitelerini analiz ettik. CD133⁺/CD44⁺/EpCAM⁺ hücreler adheziv olmayan koşullarda tumor küreleri oluşturmuş 4.günden itibaren giderek bu kürelerin büyüdüğü gözlemlenmiştir. Bunun yanında bu üç belirteci barındırmayan CD133⁻/CD44⁻/EpCAM⁻ hücreler (non-KKH) ise dağınık kalarak tumor küreleri oluşturamamışlar ve canlılıklarını da devam ettirememişlerdir (Şekil 5 ve Şekil 7).



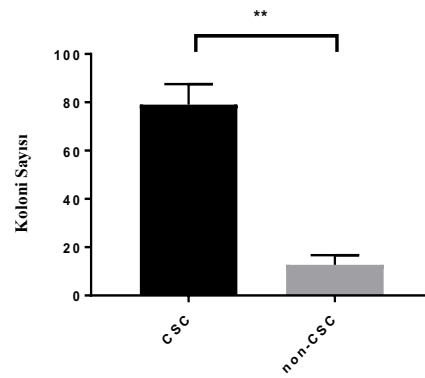
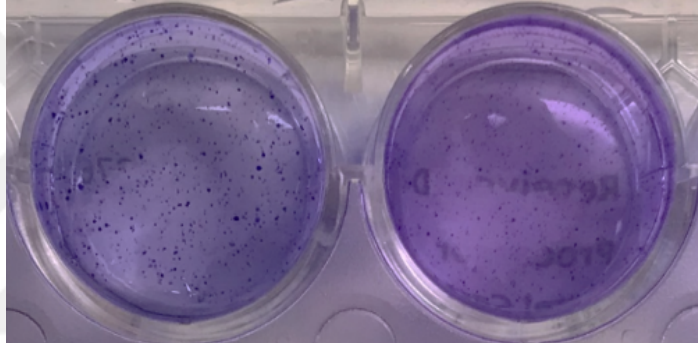
Şekil 5. PANC-1 kanser kök hücreleri (CSC) ve kanser kök hücresi-olmayan hücrelerin (non-CSC) tumor oluşturma kapasiteleri (** $p < 0,001$)

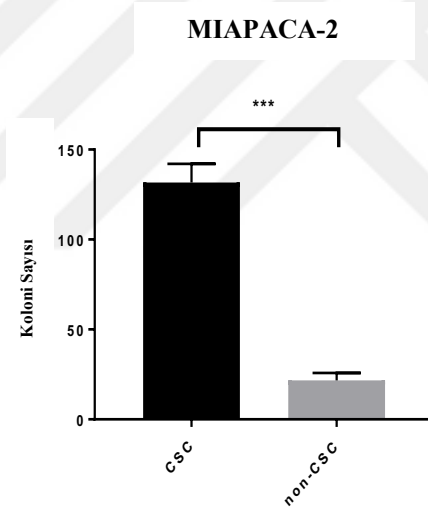
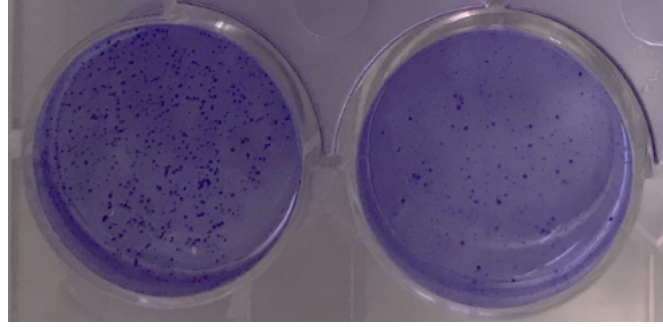


Şekil 6. MiaPaCa-2 kanser kök hücreleri (KKH) ve kanser kök hücresi-olmayan hücrelerin (non-KK) tümör oluşturma kapasiteleri (** $p < 0,001$)

4.3. Yumuşak Agarda Koloni Oluşturma Kabiliyeti

Bir yere tutunma gereksinimi duymadan büyüme; transforme hücrelerin katı bir yüzeyden bağımsız olarak büyüme kabiliyetidir ve karsinogenez için ayırıcı bir özelliktir. Panc-1 ve MiaPaca-2 kanser kök hücreleri, kanser kök hücresi olmayan grup ile karşılaştıklarında belirgin derecede yüksek koloni oluşturma kapasitesine sahip oldukları görülmüştür (Şekil 7).

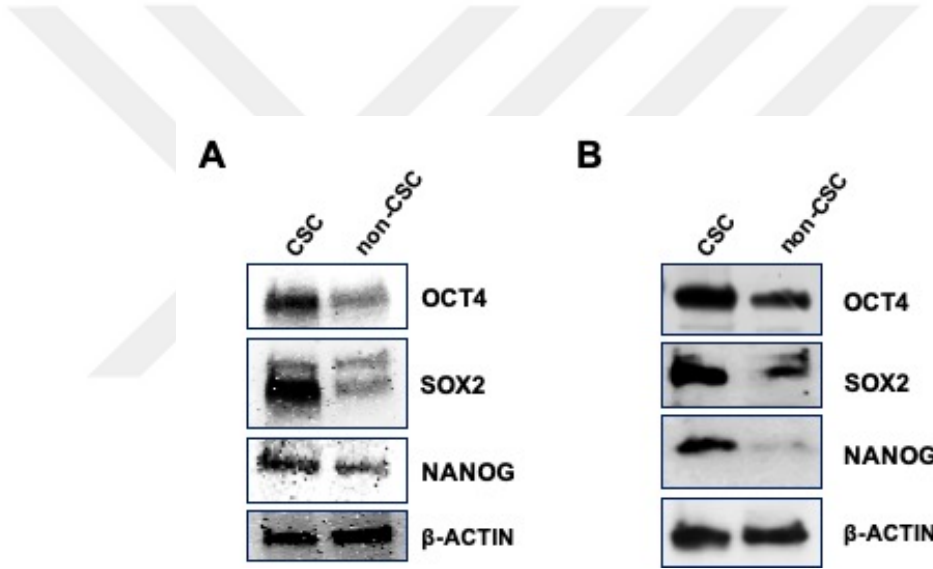




Şekil 7. MiaPaCa-2 ve PANC-1 kanser kök hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri (sırasıyla *** $p < 0,0009$ ve ** $p < 0,001$)

4.4. Panc1 ve MiaPaca2 Kanser Kök Hücrelerinde Kök Hücre Belirteçlerinin İfade Düzeyleri

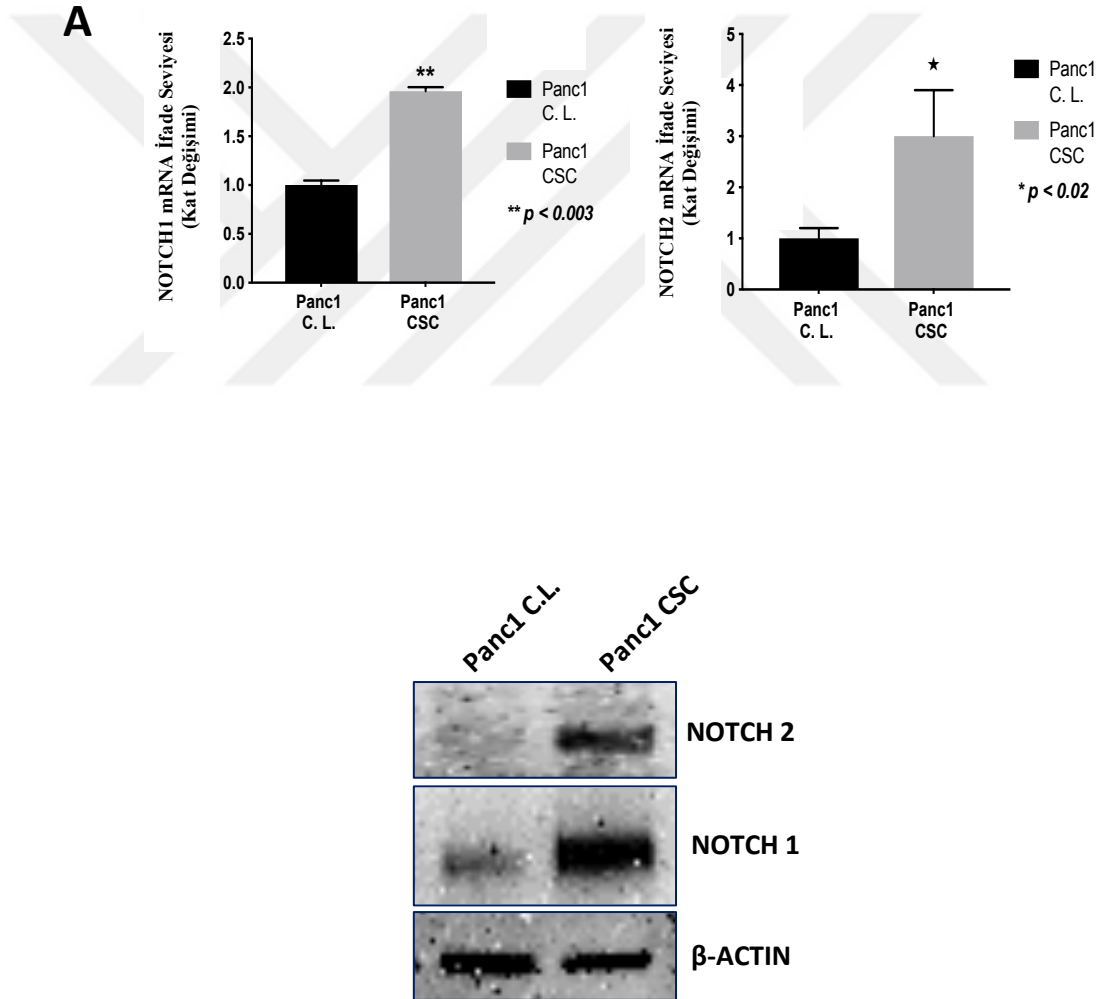
Yumuşak agarda koloni oluşturma ve tümör küresi oluşturma deneylerine ek olarak, Panc-1 ve MiaPaCa-2 hücre hatlarından izole edilen CD133⁺/CD44⁺/EpCAM⁺ kanser kök hücreleri ve CD133⁻/CD44⁻/EpCAM⁻ hücrelerden (kanser kök hücresi olmayan grup) protein izolasyonu yapılarak kök hücre belirteçlerinin protein düzeyinde ifade olup olmadığına da bakılmıştır. Kanser kök hücrelerinde belirgin derecede yüksek Oct4, Sox2 ve Nanog proteini ifadeleri tespit edilmiştir (Şekil 8).

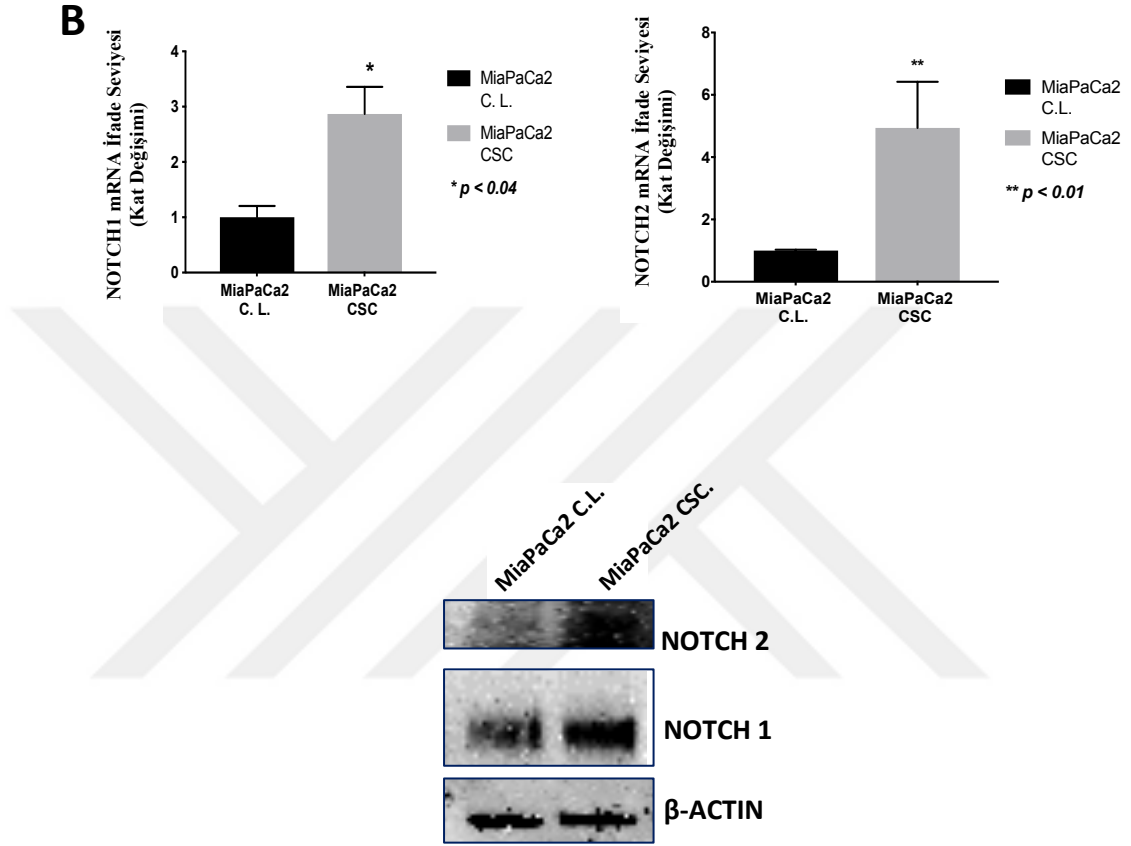


Şekil 8. Panc1 (A) and MiaPaca2 (B) kanser kök hücreleri Oct4, Sox2 ve Nanog kök hücre belirteçlerini belirgin derecede ifade etmektedirler.

4.5. Kanser Kök Hücrelerindeki Notch1 ve Notch2 mRNA ve protein seviyeleri hücre hatlarından belirgin derecede yüksektir.

qRT-PCR ve western blot analizleri hücre hatları ile karşılaştırıldığında Notch1 ve Notch2 mRNA ve protein ifadelerinin hem Panc1 hem de MiaPaCa2 kanser kök hücrelerinde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Şekil 9).



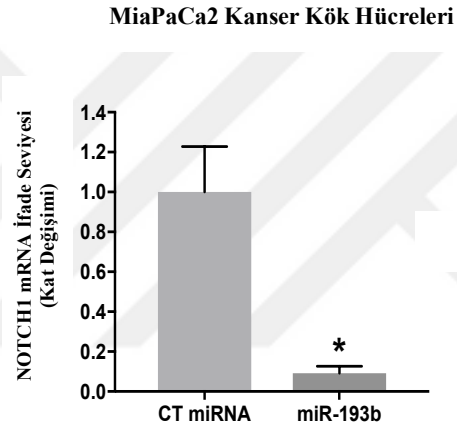
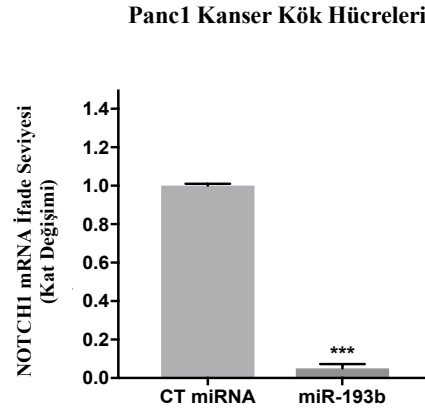


Şekil 9. Notch1 ve Notch2'nin Panc1 (A) (** $p < 0.003$, * $p < 0.02$) ve Panc1 KKH (A), MiaPaca2 (B) ve MiaPaCa2 KKH (B) (* $p < 0.04$, ** $p < 0.01$) gruplarındaki mRNA ve protein seviyeleri.

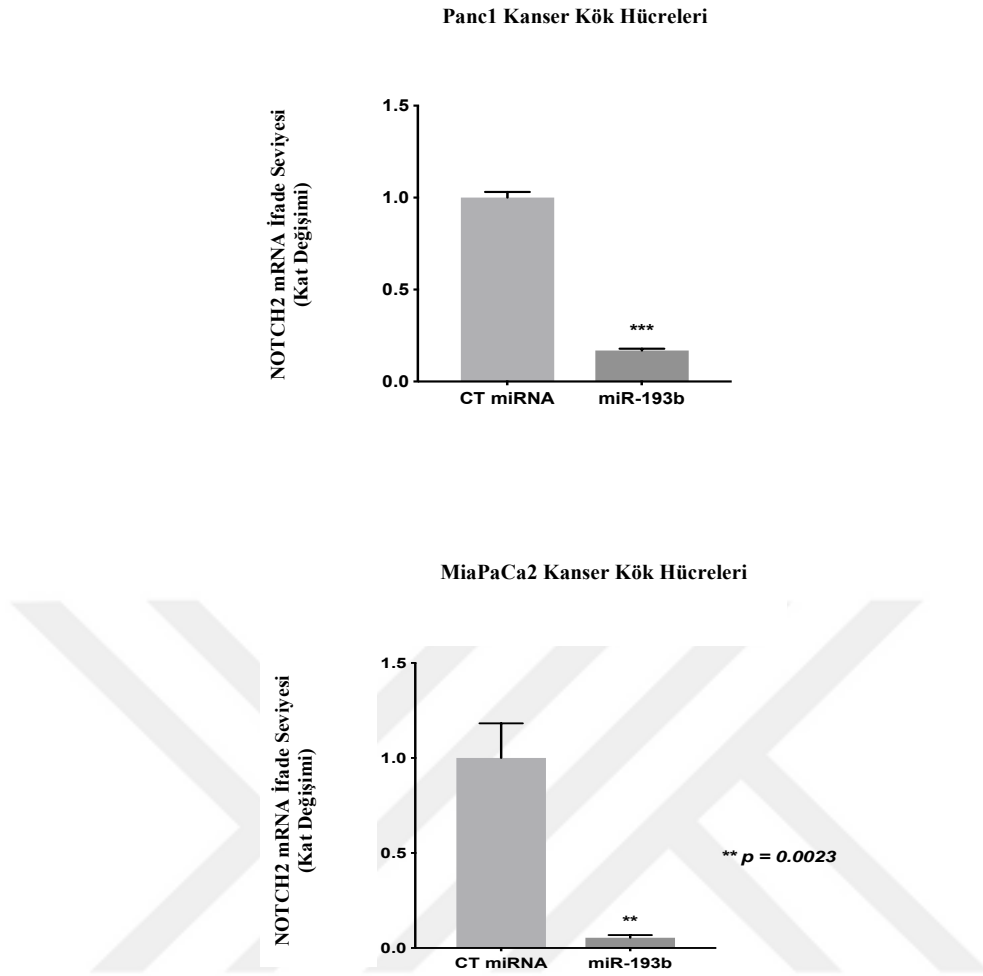
4.6. Pankreas kanser kök hücrelerinde miR-193b-3p ifadesindeki artış NOTCH1 ve NOTCH2 ifadesini önemli ölçüde düşürmektedir.

MiR-193b-3p'nin Notch1 ifadesini inhibe ettiğini gösterdikten sonra, Notch2'nin de miR-193b-3p tarafından inhibe edilip edilmediğini kontrol edilmiştir. Notch1, miR-193b-3p tarafından inhibe edilmesine rağmen, Notch1 geni, miR-193b-3p için bağlayıcı bir bölgeye sahip değildir. Fakat Notch2 sahiptir. Dolayısıyla çalışmaya Notch2 geni de dahil edilerek Notch1-Notch2 ilişkisini de araştırmaya karar verilmiştir. Hem Panc1 hem de MiaPaca2 kanser kök hücrelerinde Notch1 ve Notch2 protein ve mRNA düzeyleri analiz edilmiştir.

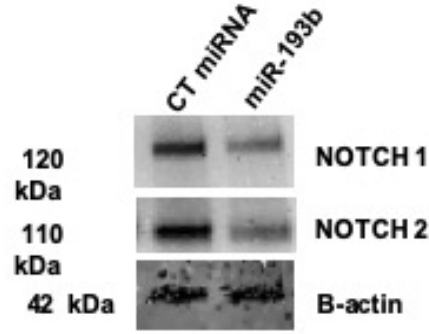
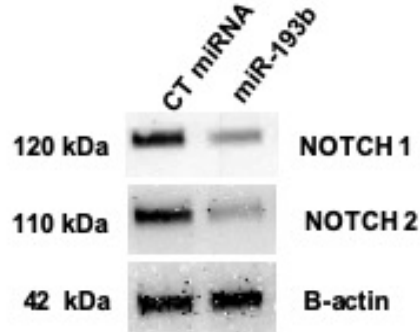
Kontrol miRNA mimik ve miR-193b-3p mimik ile transfekte edilen Panc1 ve MiaPaCa-2 KKH'lerinde Notch1 ve Notch2 mRNA seviyeleri ve protein seviyeleri büyük bir düşüş göstermektedir (Şekil 10-12).



Şekil 10. Kontrol miRNA mimik ve miR-193b-3p mimik ile transfekte edilen Panc1 ve MiaPaCa-2 KKH'lerinde Notch1 mRNA seviyeleri (** $p=0.0003$, * $p<0.05$).



Şekil 11. Kontrol miRNA mimik ve miR-193b-3p mimik ile transfekte edilen Panc1 ve MiaPaCa-2 KKH'lerinde Notch2 mRNA seviyeleri ($***p=0.0008$, $*p=0.0023$).

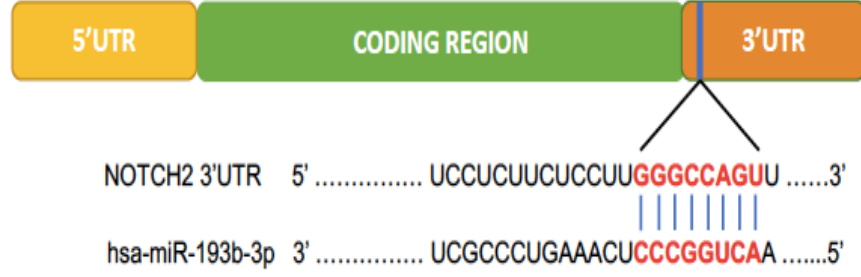
A**Panc1 Kanser Kök Hücreleri****B****MiaPaCa2 Kanser Kök Hücreleri**

Şekil 12. Kontrol miRNA mimik ve miR-193b-3p mimik ile transfekte edilen Panc1 ve MiaPaCa-2 KKH'lerinde Notch1 ve Notch2 protein seviyeleri.

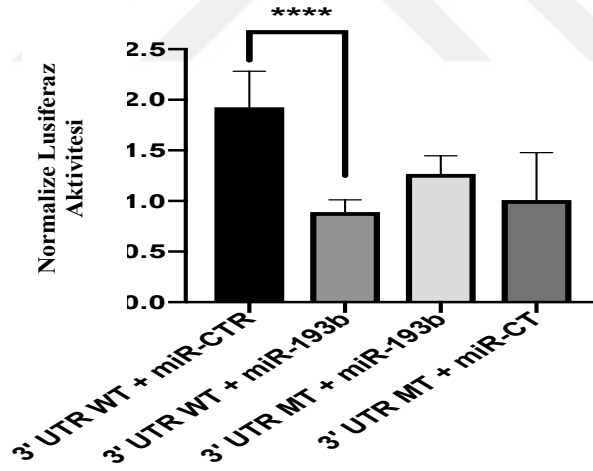
4.7. hsa-miR-193b-3p-3p, Notch2 mRNA'sına doğrudan bağlanmaktadır

Notch2 mRNA'sının miR-193b-3p'nin 3'UTR ucuna doğrudan bağlandığını göstermek için lusiferaz raportör analizi yapılmıştır. Notch2'nin 3'UTR ucunda bulunan miR-193b-3p bağlanma bölgesi, lusiferaz geni de (pEZX-MT06 - 3'UTR) içeren bir pEZX-MT06 miRNA raportör vektörüne klonlanmıştır. Elde edilen plazmitler, miR-193b-3p veya kontrol-miRNA ile birlikte PANC1 hücrelerine co-transfekte edilmiştir. Lusiferaz aktivitesi transfeksiyondan 48 saat sonra ölçülmüştür. Lusiferaz ifadesinin, miR-193b-3p ve Notch2 3'UTR ucu ile birlikte transfekte edilen hücrelerde kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur. Ancak, miR-193b-3p ve mutant Notch2 3'UTR ile birlikte transfekte edilen hücrelerde kontrollere kıyasla herhangi bir azalma gözlenmemiştir.

A



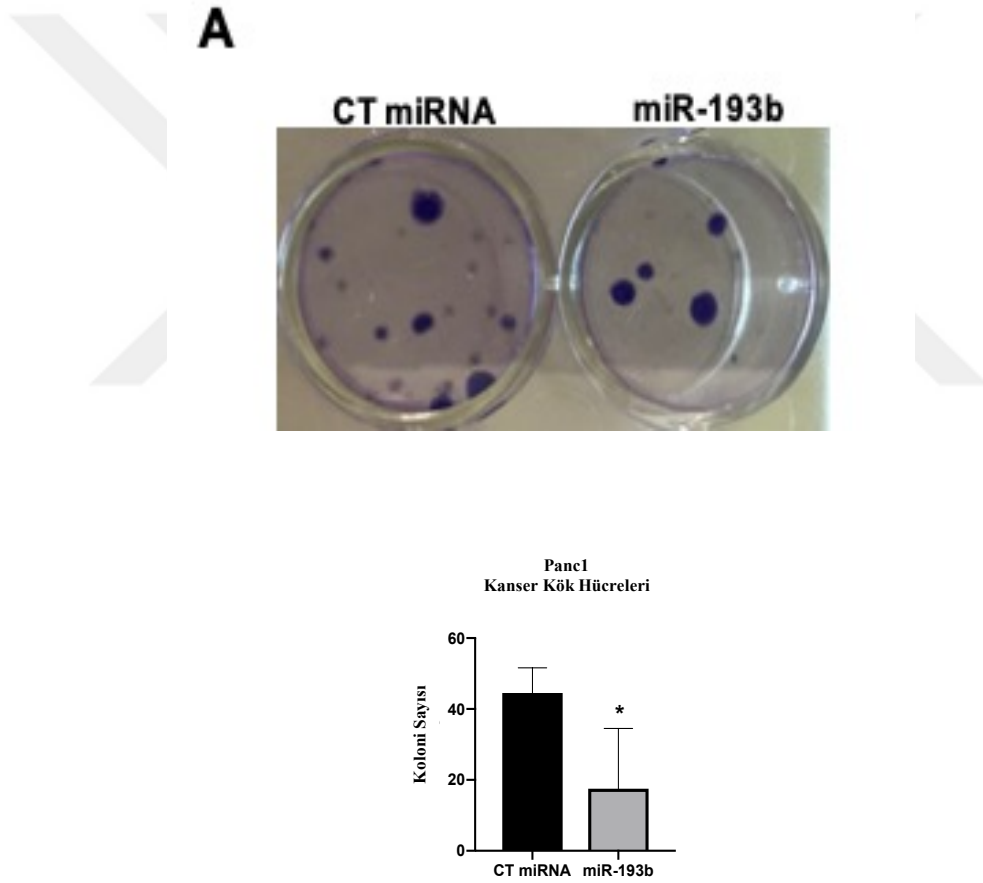
B

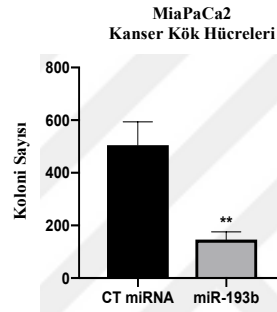
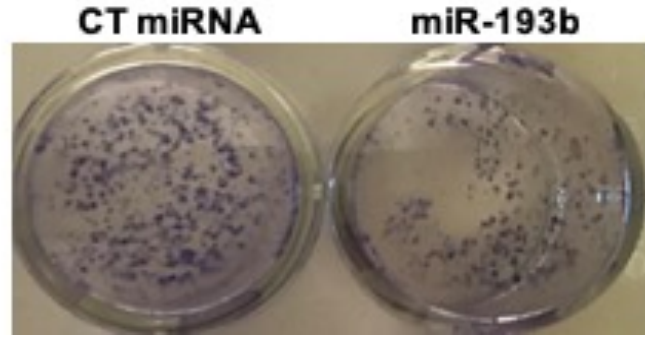


Şekil 13. miR-193b-3p, Notch2 mRNA'sının 3'UTR ucuna direkt olarak bağlanmakta (A) ve ifadenmesini baskılamaktadır (B) (**** $p < 0.0001$)

4.8. miR-193b-3p, Panc1 ve MiaPaCa2 Kanser kök hücrelerinde çoğalmayı ve koloni oluşumunu baskılar

miR-193b-3p'nin Panc1 ve MiaPaca2 kanser kök hücrelerinin çoğalma ve sağkalımı üzerindeki etkilerini koloni oluşumu deneyi ile de incelenmiştir. miR-193b-3p ifadesi artan hücrelerin, kontrol miRNA ile transfekte edilmiş hücrelere kıyasla koloni oluşum yeteneği($p < 0.05$) önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 14).



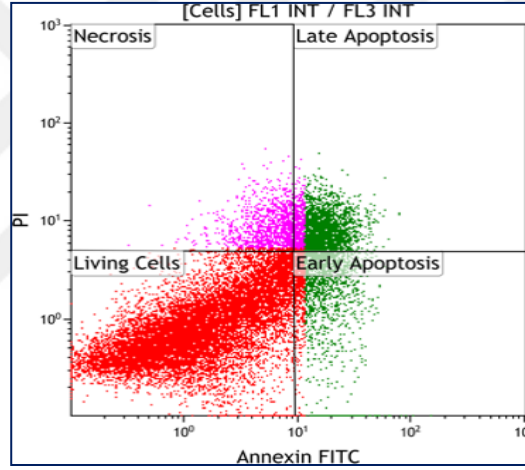
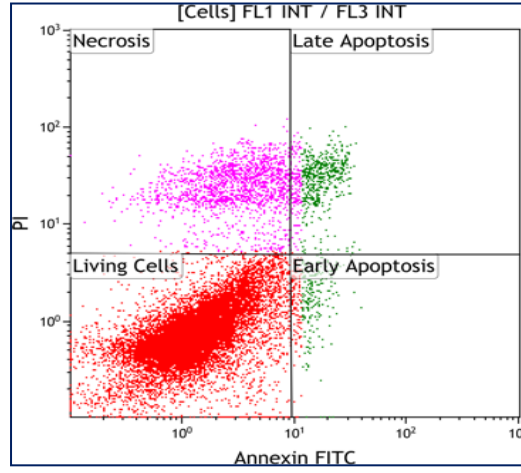
B

Şekil 14. miR-193b-3p, Panc1(A) ve MiaPaCa2 (B) Kanser kök hücrelerinde koloni oluşumunu baskılar (* $p < 0.05$, ** $p = 0.0027$)

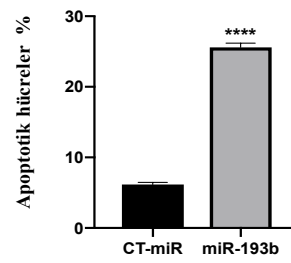
4.9. miR-193b-3p ifadesi apoptozu tetikleyerek hücre döngüsünü inhibe eder

miR-193b-3p'nin ifade artışının apoptozu tetikleyip tetiklemediğini görmek için Annexin V ve propidium iyodür (PI) boyama kullanılarak apoptoz oranı flow sitometri yöntemi ile değerlendirilmiştir. miR-193b-3p'nin transfeksiyonundan 72 saat sonra hem erken hem de geç apoptotik Panc1 ve MiaPaCa-2 kanser kök hücrelerinin sayısı, kontrol miRNA ile transfekte edilmiş hücrelerin sayısından ~4 kat daha fazla bulunmuştur (Şekil 15).

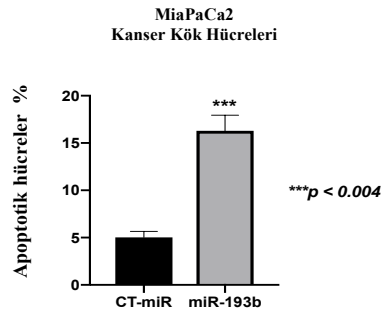
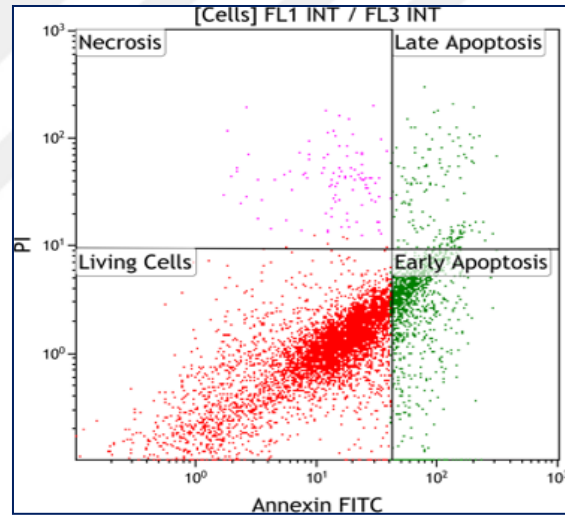
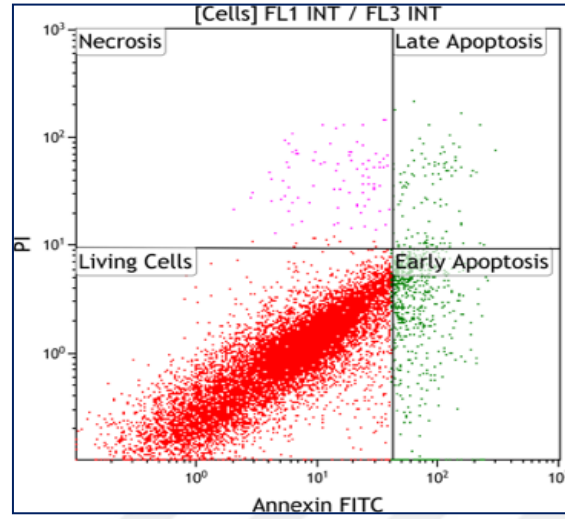
A



Panc1
Kanser Kök Hücreleri

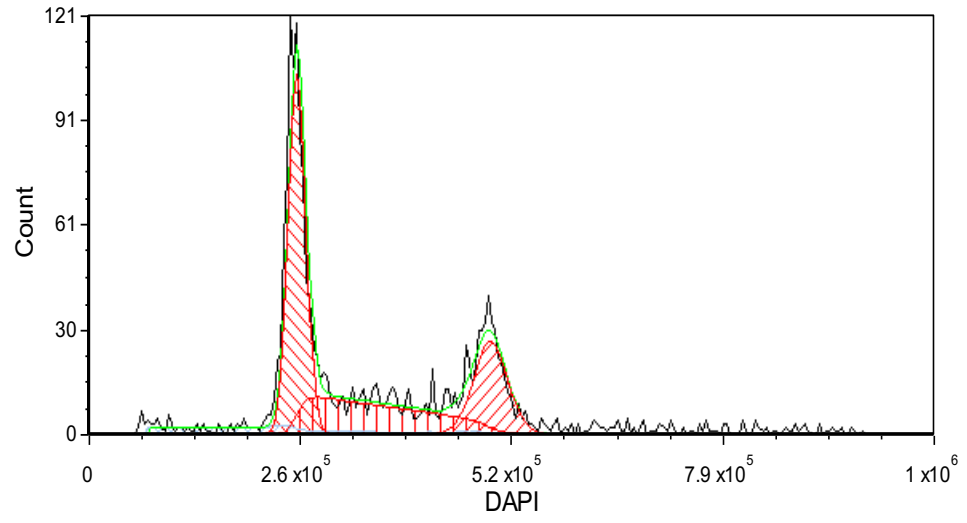


B

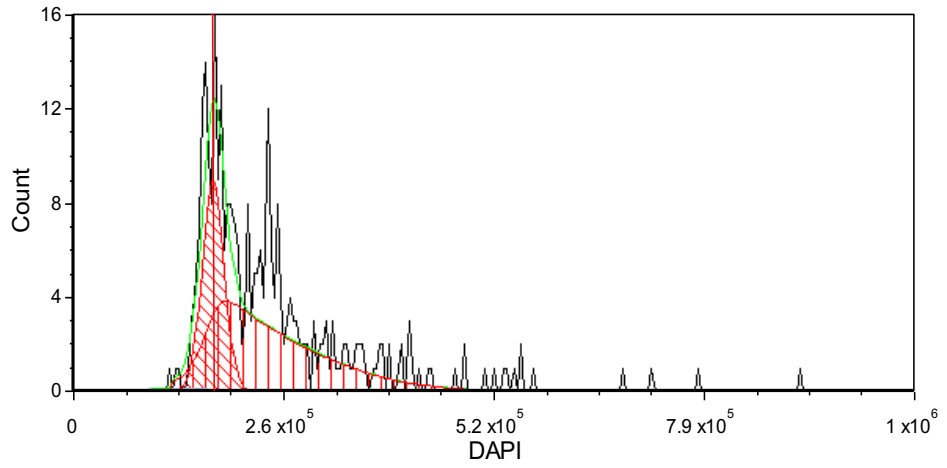


Şekil 15. Kontrol miRNA mimik ve miR-193b-3p mimik ile transfekte edilen Panc1 (A) ve MiaPaCa-2 (B) KKH'lerinde miR-193b-3p ifadesi apoptozu tetikler (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.004$)

A

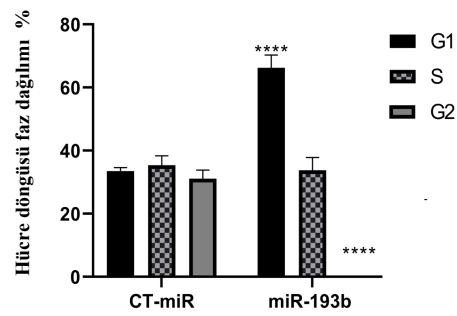


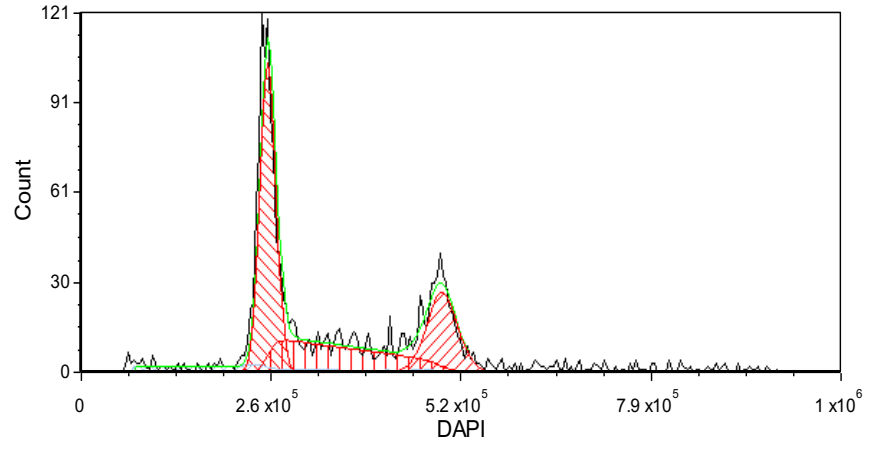
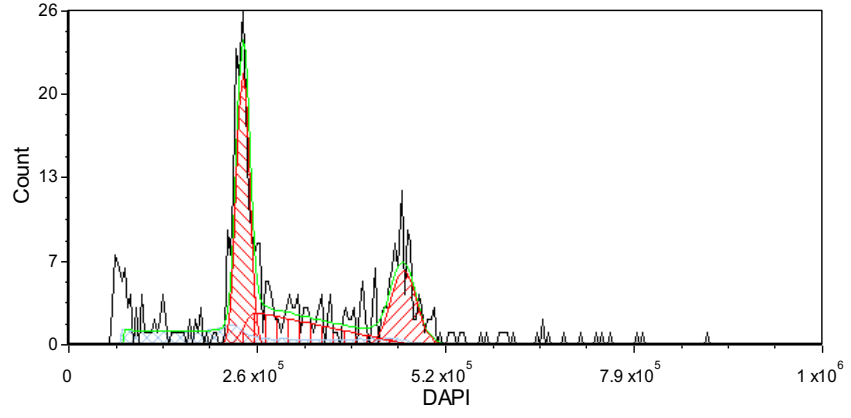
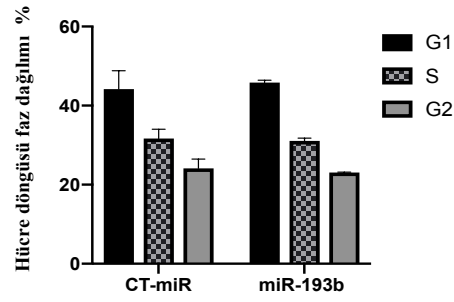
CT-miR



miR-193b-3p

**Panc1
Kanser Kök Hücreleri**

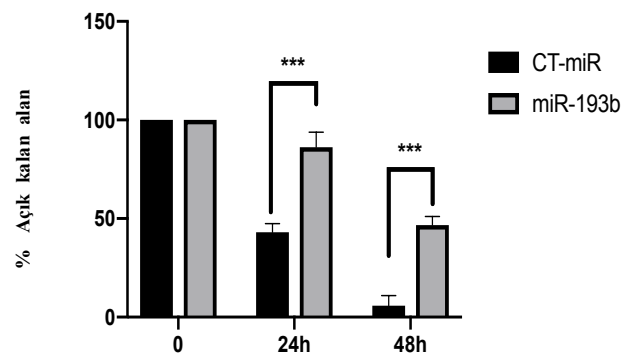
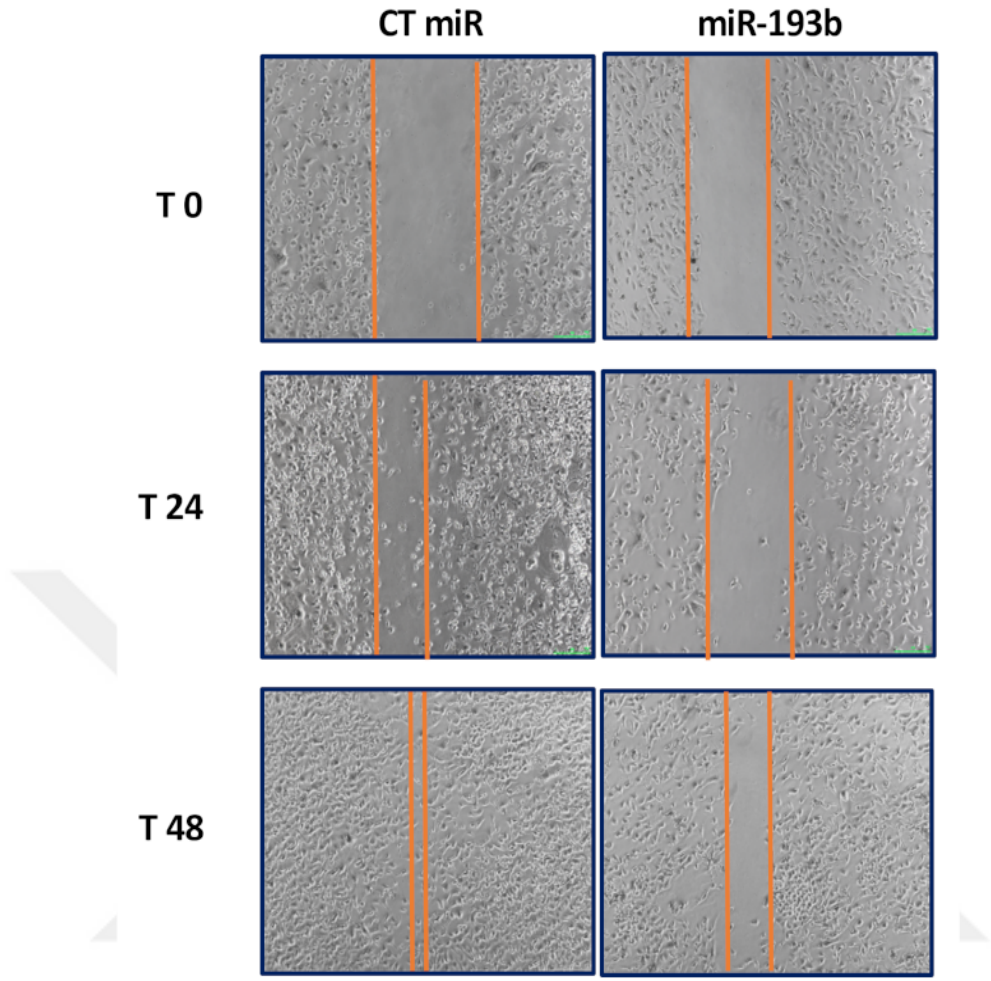


B**CT-miR****miR-193b-3p****MiaPaCa2
Kanser Kök Hücreleri**

Şekil 16. Kontrol miRNA mimik ve miR-193b-3p mimik ile transfekte edilen Panc1 (A) ve MiaPaCa-2 (B) KKH'lerinde miR-193b-3p ifadesi hücre döngüsünü inhibe eder (**** $p<0.0001$).

4.10. Panc1 ve MiaPaCa2 kanser kök hücrelerinde miR-193b-3p ifadesi migrasyon ve invazyonu baskılar

miR-193b-3p'nin migrasyon üzerindeki etkisini incelemek için yara iyileşme deneyi yapılmıştır. miR-193b-3p transfeksiyonundan sonra hücrelerin yayıldığı alanda oluşturan çizginin iki ucu arasındaki mesafe farklı zaman noktalarında, kontrol grubundan belirgin şekilde daha fazlaydı; bu sonuç, miR-193b-3p ifadesinin, Panc1 kanseri kök hücrelerinin migrasyonunda azalmaya sebep olduğunu göstermektedir (Şekil 17).

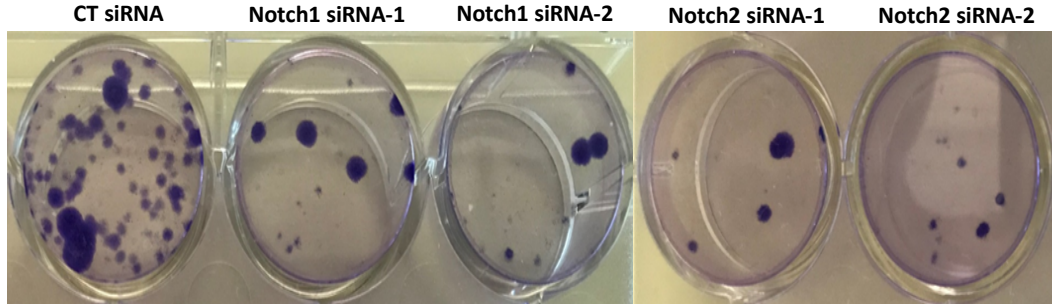
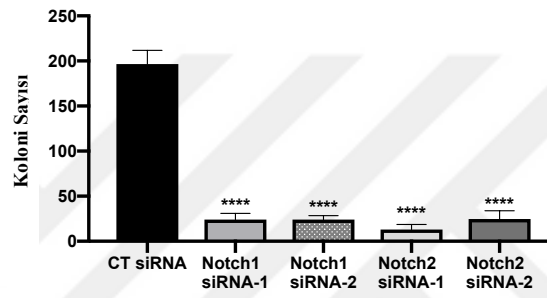
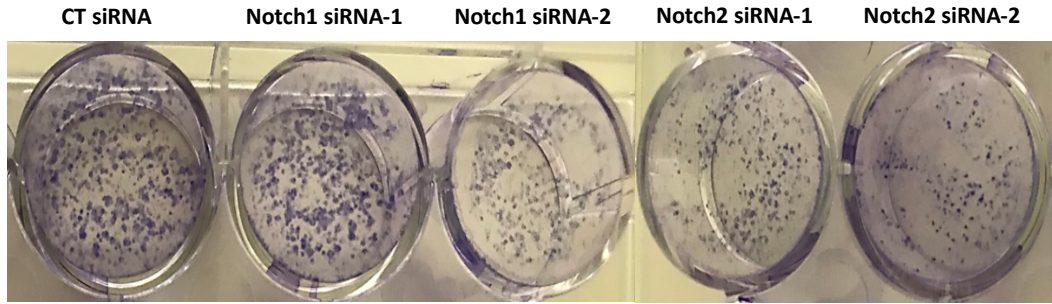
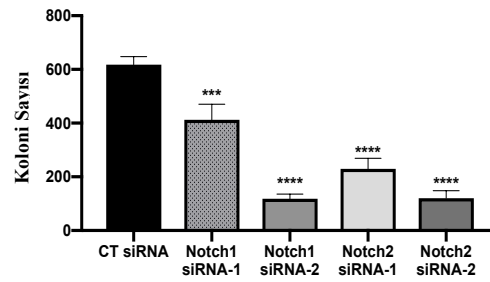


Şekil 17. miR193b ifadesi, Panc1 kanser kök hücrelerinde migrasyonu inhibe eder (***) $p < 0.001$

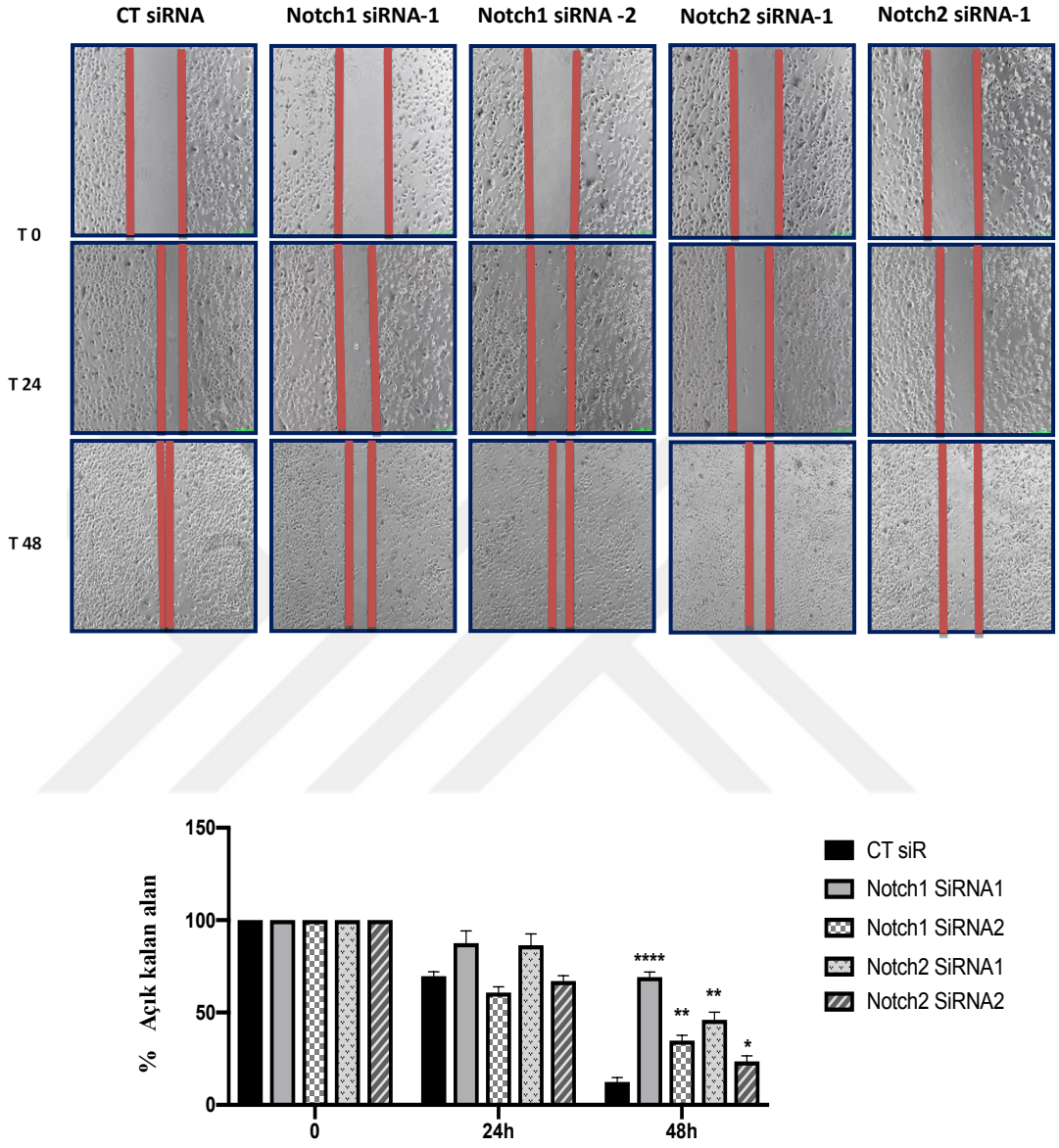
miR-193b-3p ifadesinin pankreas kanser kök hücre invazyonunun regülasyonundaki rolünü açıklamak için, miR-193b-3p mimik ve kontrol miRNA ile transfekte edildikten sonra *in-vitro* matrigel invazyon deneyi yapılmıştır. miR-193b-3p'nin ektopik ifadesi, invaziv Panc1 ve MiaPaCa-2 kanser kök hücrelerinin sayısını, miR-kontrolüne kıyasla önemli ölçüde azaltmıştır. Bu sonuçlar, miR-193b-3p ifadesinin, hem Panc1 hem de MiaPaCa-2 kanser kök hücrelerinde invaziv karakteri baskıladığını göstermektedir (Şekil 18).

4.11. Notch1 ve Notch2 genlerinin susturulması Panc1 ve MiaPaCa2 kanser kök hücrelerine çoğalmayı, migrasyonu ve invazyonu inhibe eder

miR-193b-3p'nin Panc1 ve MiaPaCa2 kanser kök hücrelerinde proliferasyon, invazyon ve migrasyon üzerindeki düzenleyici etkilerinin Notch1 ve Notch2 üzerinden olup olmadığını göstermek için, siRNA aracılı Notch1 ve Notch2 inhibisyonu oluşturarak miR-193b-3p'nin tümör baskılayıcı etkilerini yeniden oluşturduk. Notch1 ve Notch2 genlerinin susturulması, hem Panc1 hem de MiaPaCa2 kanser kök hücrelerinde koloni oluşumu kabiliyetini, hücre migrasyonunu ve invazyonunu baskılamıştır. Bu sonuçlar aynı zamanda western blot analizleri ile de doğrulanmıştır. Elde edilen bu sonuçların, miR-193b-3p'nin ifade artışının hücrelerde oluşturduğu etkiler ile son derece benzer olduğu görülmüştür (Şekil 19-22).

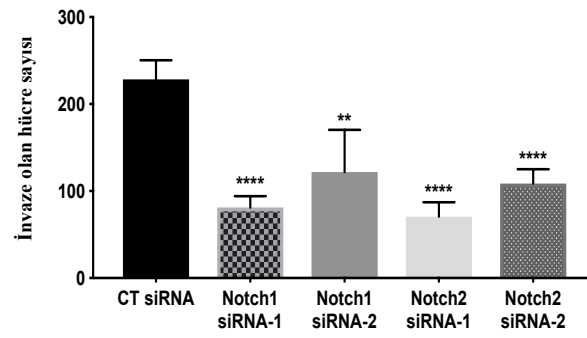
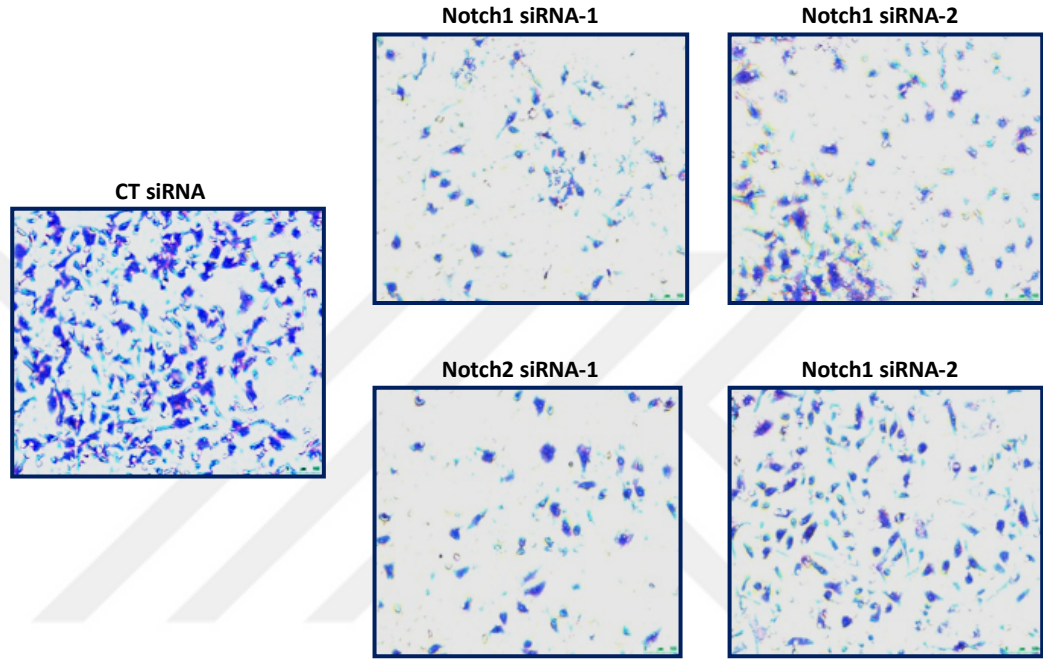
A**Panc1****B****MiaPaCa2**

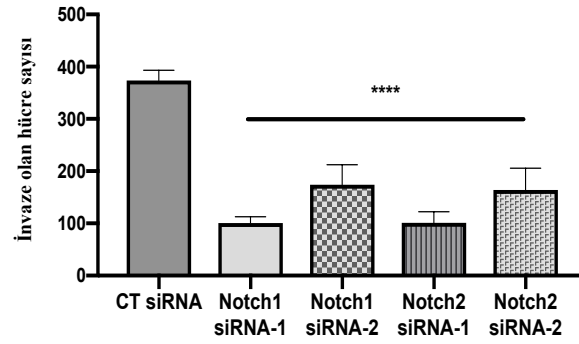
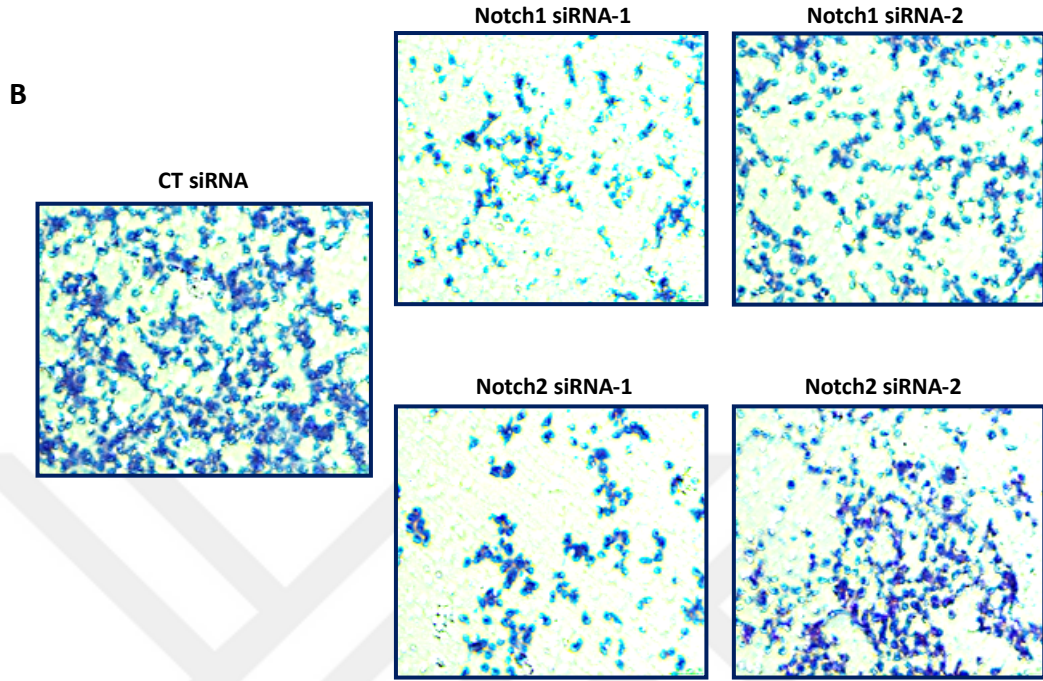
Şekil 19. Notch1 ve Notch2 genlerinin susturulması Panc1 (A) ve MiaPaCa2 (B) kanser kök hücrelerinde çoğalmayı inhibe eder (**** $p < 0.0001$, *** $p = 0.0002$)



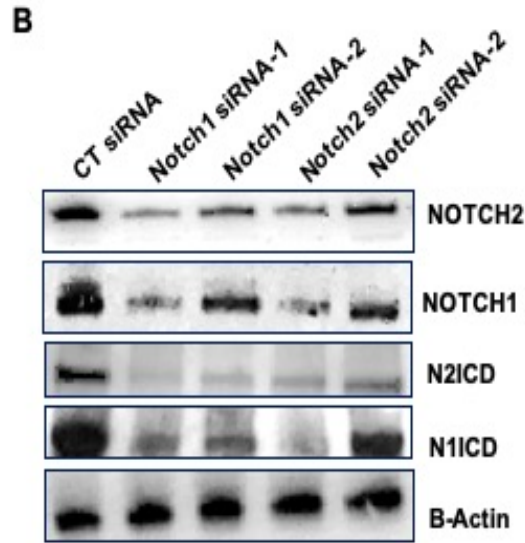
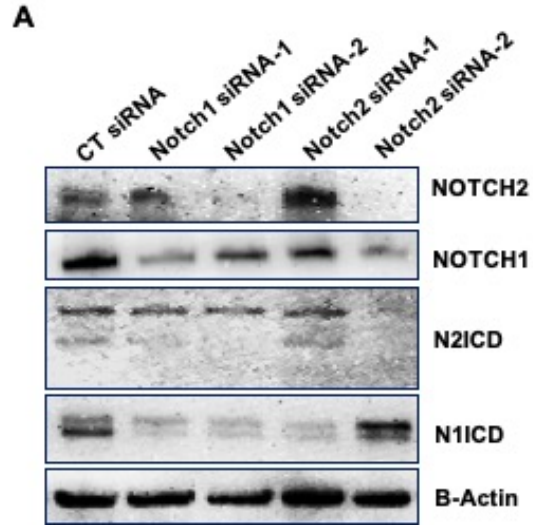
Şekil 20. Notch1 ve Notch2 genlerinin susturulması Panc1 kanser kök hücrelerinde migrasyonu inhibe eder (**** $p < 0.0001$, ** $p < 0.05$, * $p < 0.04$)

A





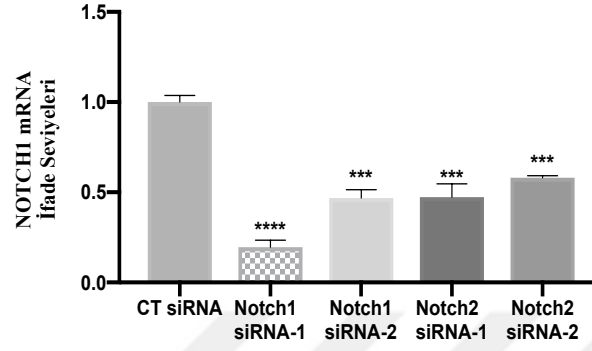
Şekil 21. Notch1 ve Notch2 genlerinin susturulması Panc1(A) ve MiaPaCa2 (B) kanser kök hücrelerinin invazyon kapasitesini önemli derecede düşürür (**** $p < 0.0001$, ** $p < 0.021$)



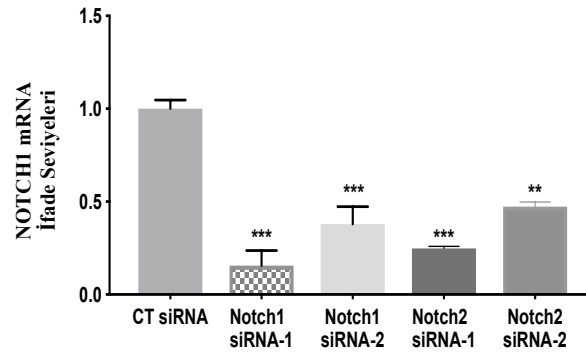
Şekil 22. Panc1 (A) ve MiaPaCa2 (B) kanser kök hücrelerinde Notch1 geninin susturulması Notch2 protein inhibisyonuna; Notch2 geninin susturulması Notch1 protein inhibisyonuna sebep olur.

A

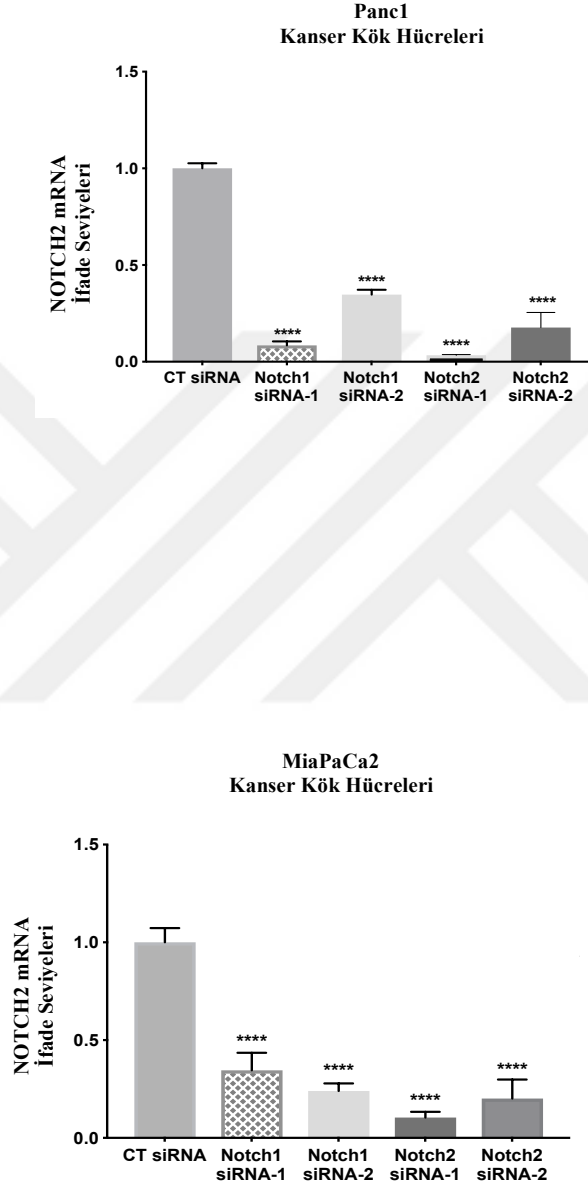
**Panc1
Kanser Kök Hücreleri**



**MiaPaCa2
Kanser Kök Hücreleri**



B

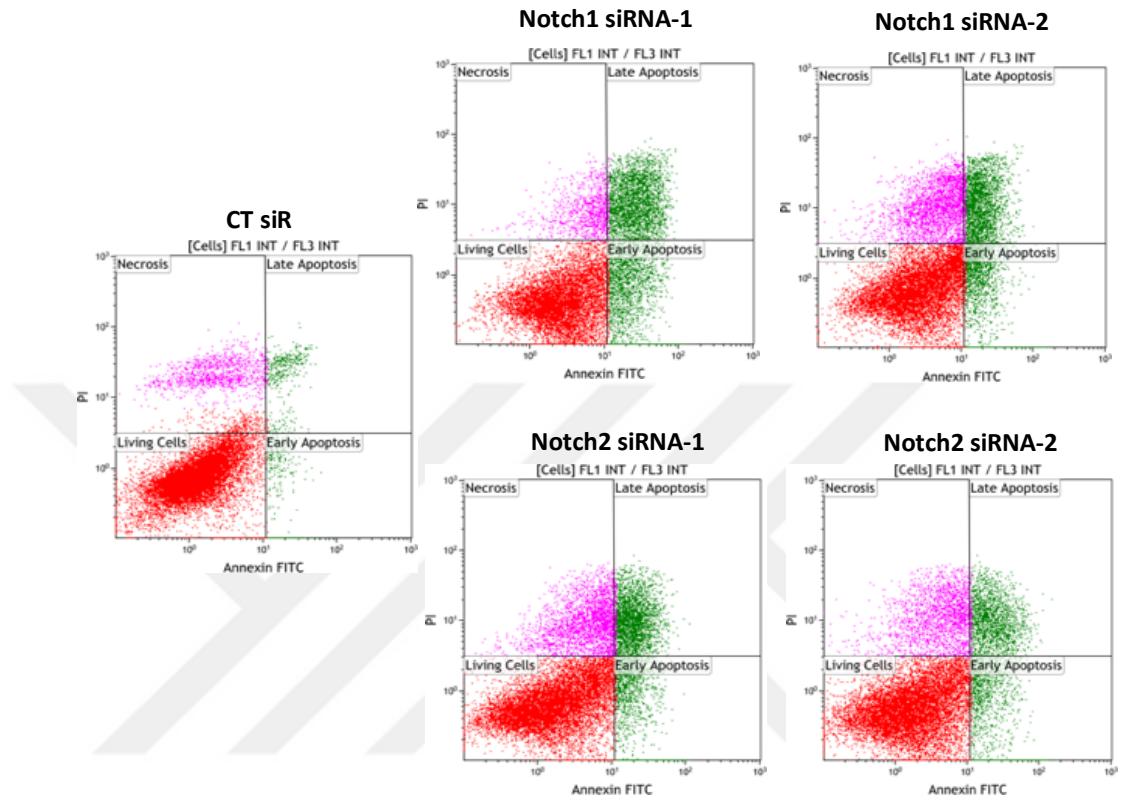


Şekil 23. A. Panc1 (**** $p<0.0001$, *** $p<0.0009$) ve MiaPaCa2 (*** $p<0.0005$, ** $p=0.001$) kanser kök hücrelerinde Notch1 geninin susturulması Notch2 mRNA düzeyinin azalmasına neden olur. **B.** Panc1 ve MiaPaCa2 kanser kök hücrelerinde Notch2 geninin susturulması Notch1 mRNA düzeyinin azalmasına neden olur (**** $p<0.0001$)

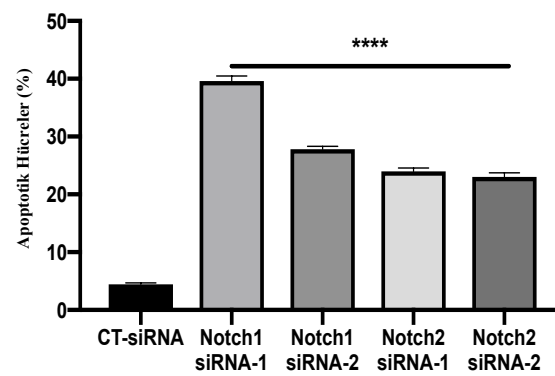
4.12. Notch1 and Notch2 genlerinin susturulması apoptozisi tetikler ve hücre döngüsü inhibisyonunu indükler

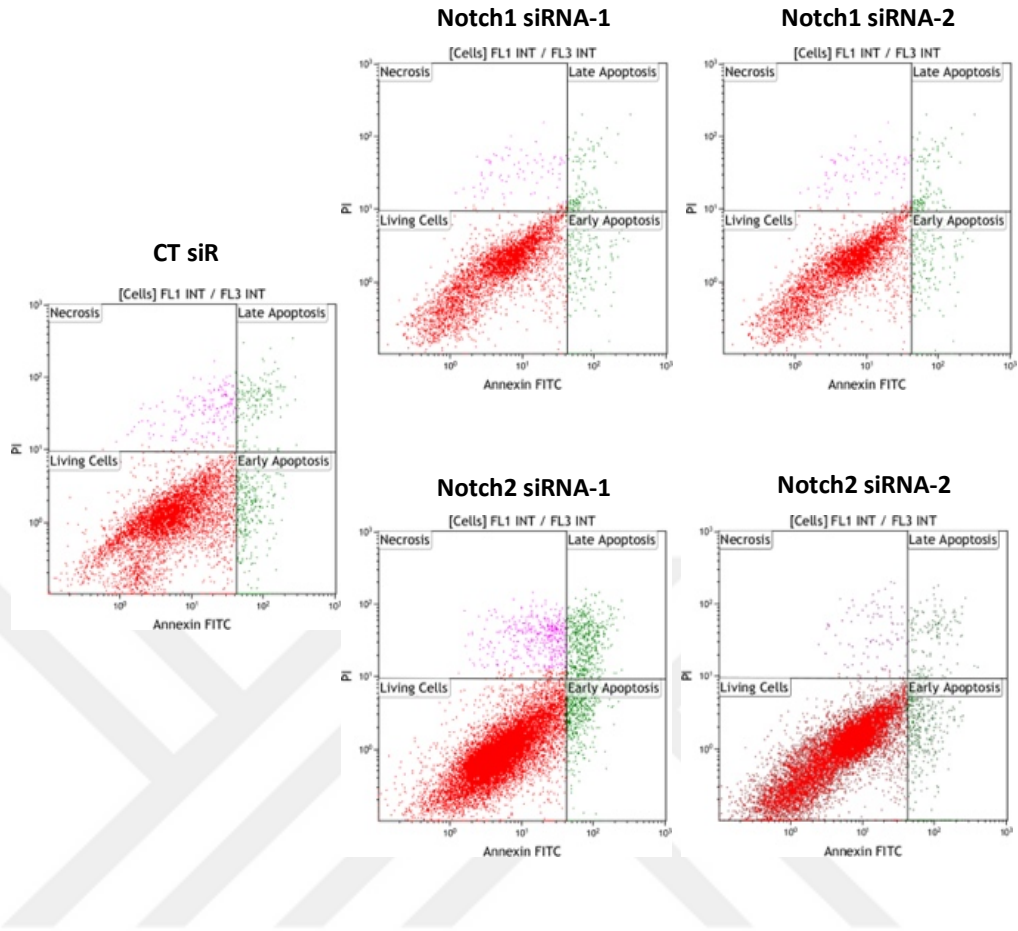
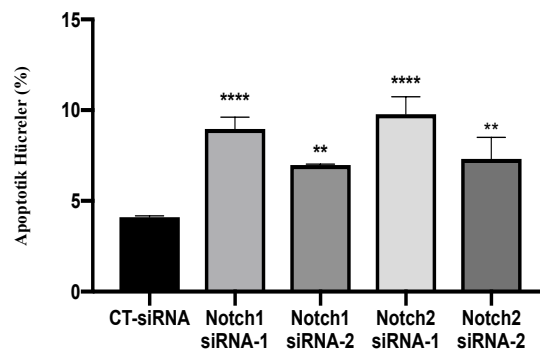
Apoptozun Notch1 ve Notch2 generinin susturulması aracılığıyla büyüme inhibisyonuna olan etkisi incelenmiştir. Annexin V ve propidium iyodür (PI) boyama kullanılarak akış sitometrisi yöntemi ile hücresel apoptoz oranı değerlendirilmiştir. Hem erken hem de geç apoptotik PANC1 ve MIAPaCa-2 kanserinin kök hücreleri sayısının, Notch1 ve Notch2 siRNA'larının transfeksiyonundan 72 saat sonra, kontrol siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerin sayısından -25 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 24 ve 25).

A



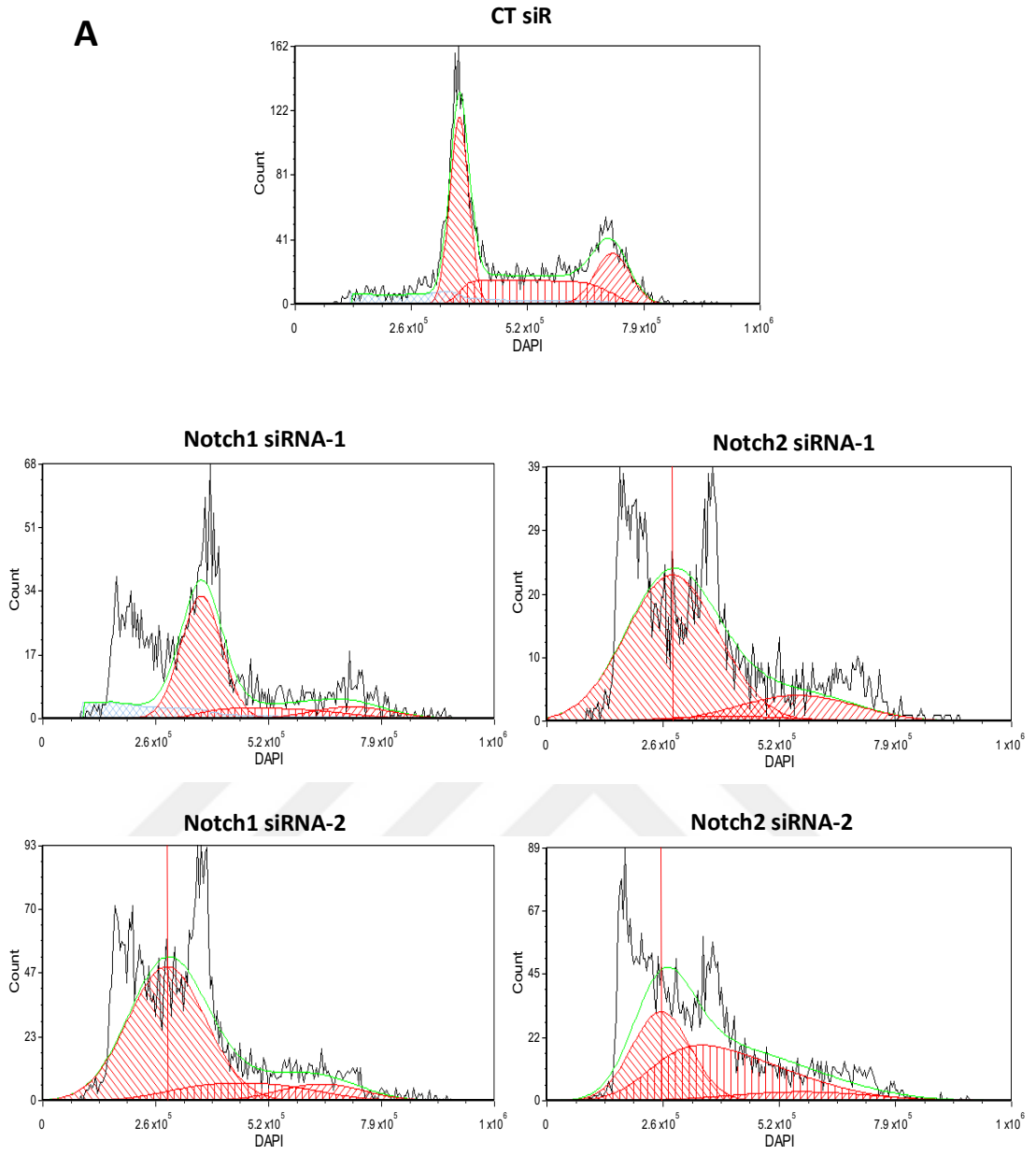
Panc1 Kanser Kök Hücreleri



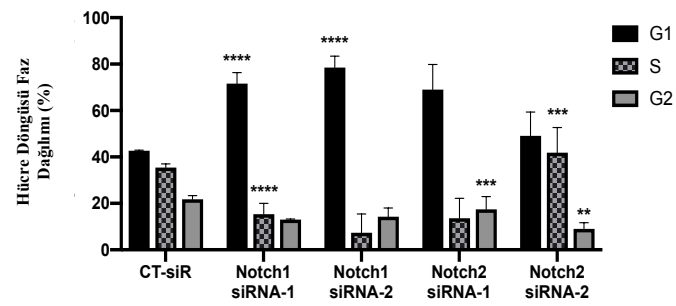
B**MiaPaCa2 Kanser Kök Hücreleri**

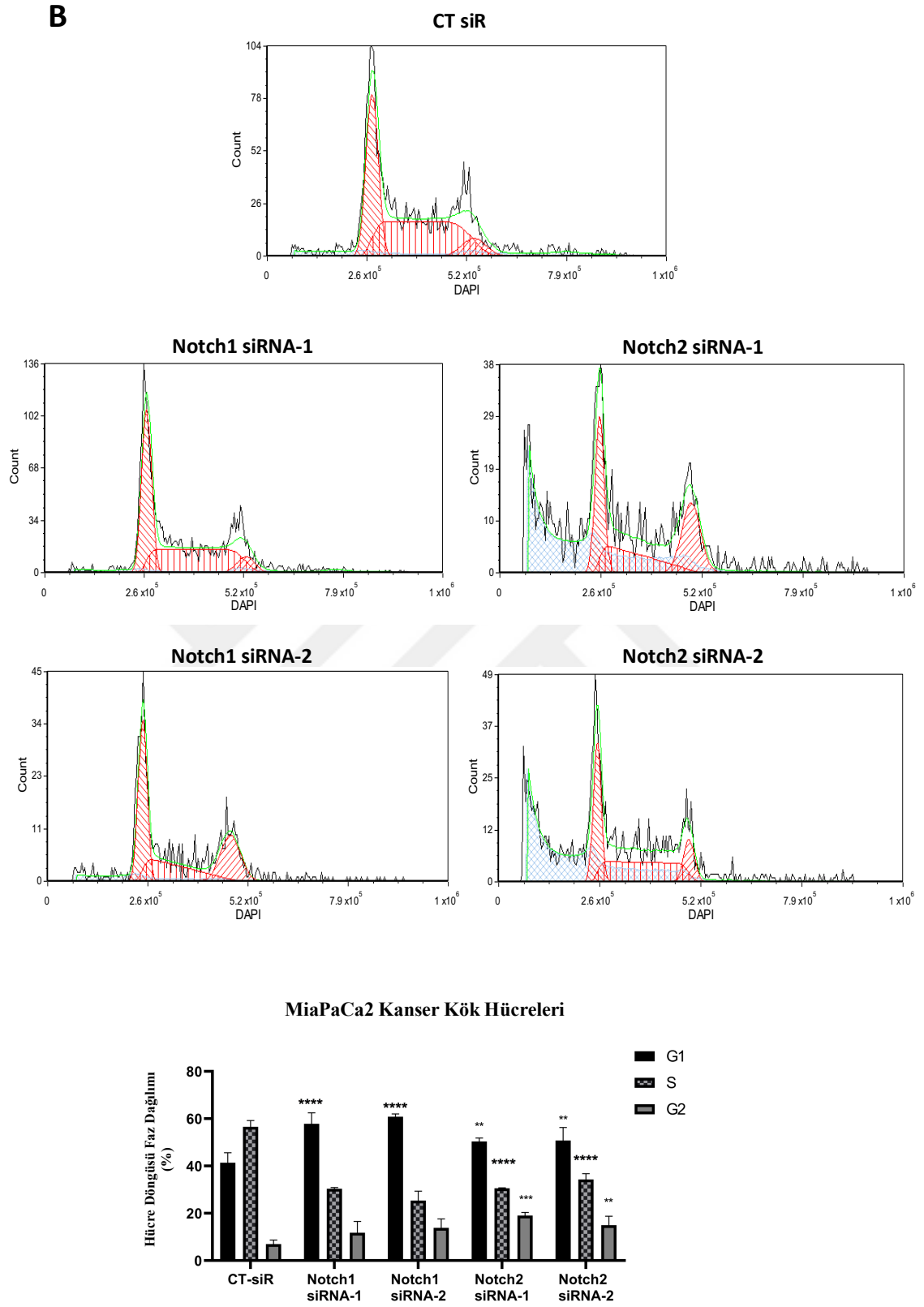
Şekil 24. Notch1 ve Notch2 genlerinin susturulması Panc1 (A) ve MiaPaCa2 (B) kanser kök hücrelerinde apoptozu tetikler (**** $p<0.0001$, ** $p<0.003$)

A



Panc1 Kanser Kök Hücreleri

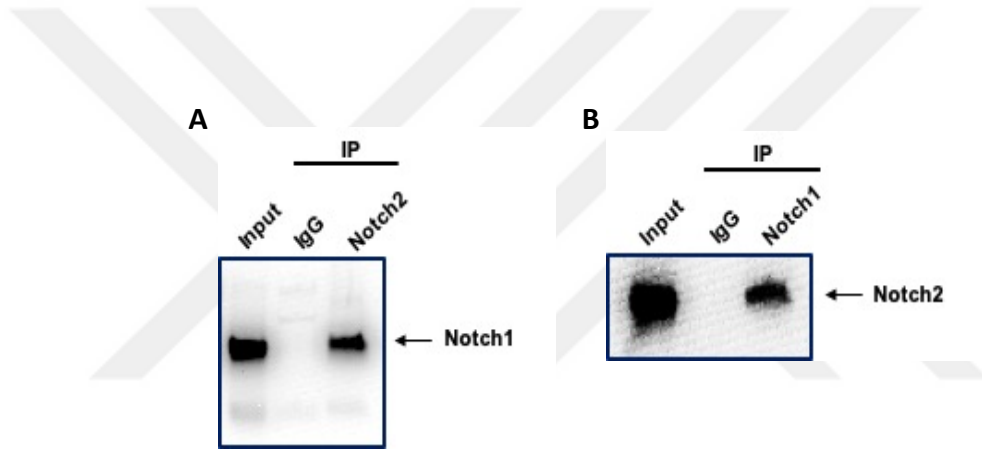




Şekil 25. Notch1 ve Notch2 genlerinin susturulması Panc1 (A) ve MiaPaCa2 (B) kanser kök hücrelerinde hücre döngüsü inhibisyonunu indükler

4.13. Notch1 ve Notch2 İmmünopresipitasyonu

Notch1 – Notch2 arasındaki bağlantıyı doğrulamak için ayrıca hücreleri üzerinde immünopresipitasyon deneyi yapılmıştır. Western blot sonuçları Notch1 ve Notch2 arasındaki ilişkiyi doğrulamıştır (Şekil 26).

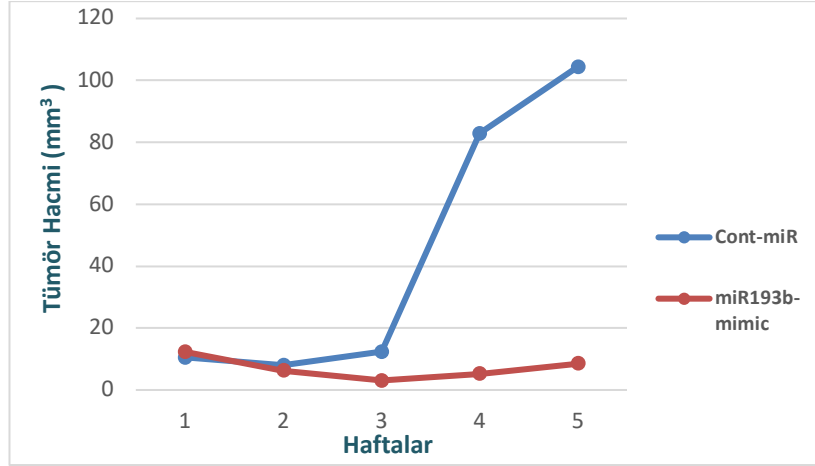
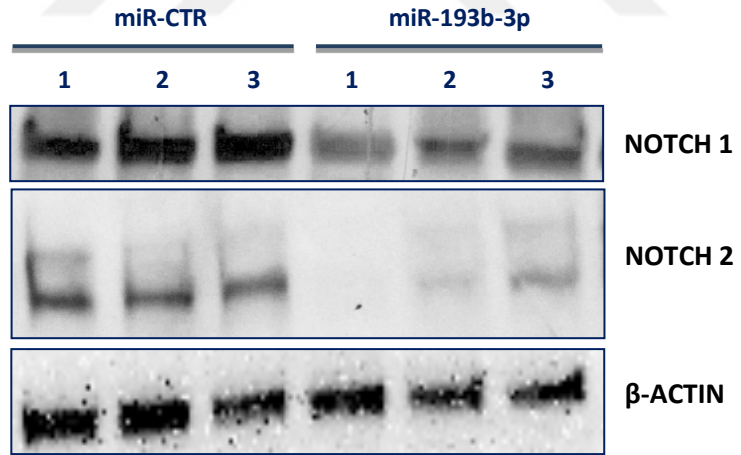


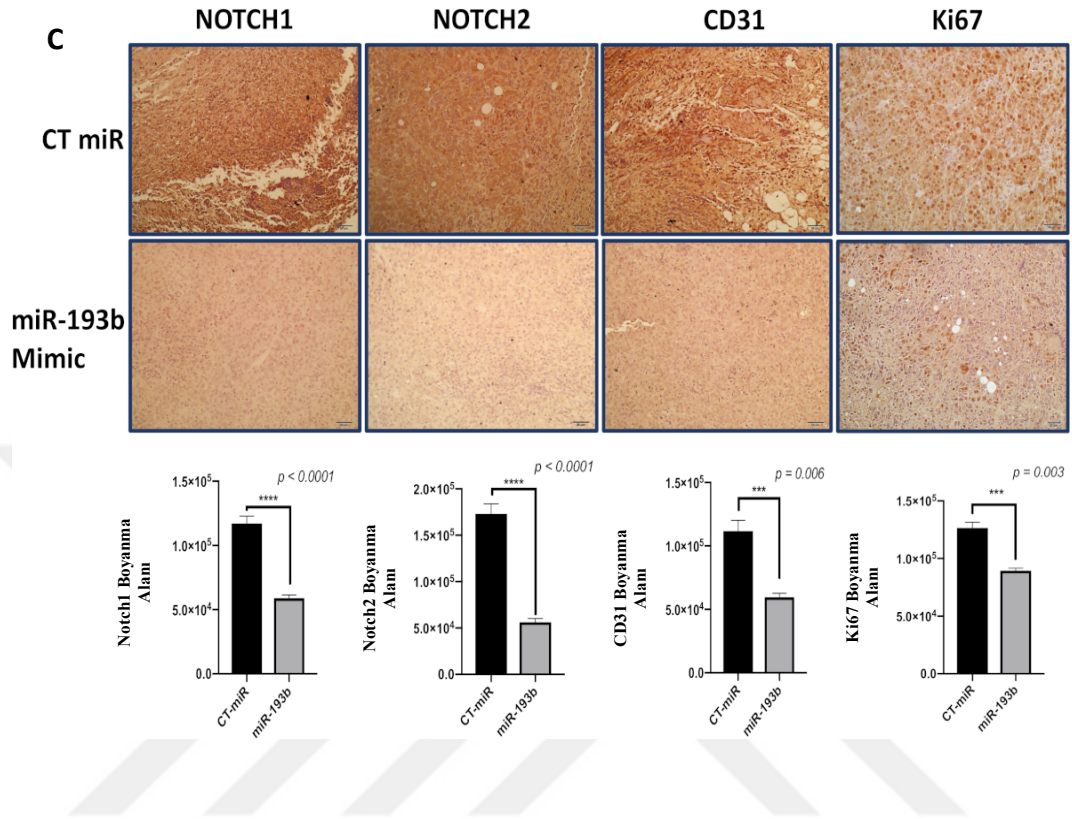
Şekil 26. Panc1 hücrelerinde Notch1 proteini Notch2 proteini ile ve Notch2 proteini Notch1 proteini ile birlikte çökelir

4.14. miR-193b-3p'nin DOPC nanolipozomlar ile birlikte *in-vivo* tedavi uygulaması Panc1 kanser kök hücresi tümör modelinde tümör büyümesini inhibe eder

miR-193b-3p ifadesinin pankreas tümörigenezi üzerindeki *in-vivo* etkilerinin yanı sıra bu miRNA'nın terapötik potansiyelini belirlemek için, Panc1 kanseri kök hücre ortotopik ksenograft fare modellerinde intravenöz olarak miR-193b-3p enjeksiyonu uygulanmıştır. miR-193b-3p ile tedavi edilen fareler, kontrol miRNA ile tedavi edilen farelere göre anlamlı şekilde daha az tümör büyümesi göstermişlerdir.

Tümörlü fareler, 5 hafta boyunca haftada 1 kez (5 fare / grup) intravenöz kontrol miRNA (miR-CTR) veya miR-193b-3p mimik (0.3 mg / kg [8 ug / fare]) içeren DOPC nanolipozomları ile tedavi edilmişlerdir. Tümör hacimleri haftada 1 kez ölçülmüş ve ortalamalar $\pm$ SE olarak gösterilmiştir. miR-193b-3p'nin nanolipozomlar ile iletimi, tümörlü farelerde Notch1 ve Notch2 ifadelerini ve intratumoral proliferasyonu inhibe etmiştir. Proliferasyon belirteci Ki-67, anjiyogenez belirteci CD31 ve ayrıca Notch ve Notch2 ifadelerini değerlendirmek için immünohistokimyasal boyama yapılmıştır (Şekil 27).

A**B**



Şekil 27. Nanolipozomal miR-193b-3p'nin *in vivo* sistemik enjeksiyonu tümör büyümesini inhibe ederek Notch1 ve Notch2'nin tümörlerdeki ifadesini azaltır .

5. TARTIŞMA

Pankreas kanseri, inatçı bir malignite olmakla birlikte endüstrileşmiş ülkelerde en sık görülen üçüncü, dünya kanser ölümlerinde ise yedinci sıradadır (Ferlay et al., 2018). GLOBOCAN 2018 tahminlerine dayanarak, dünyada her yıl 458.918 kişi pankreas kanseri tanısı almakta, 432.224 kişi hayatını kaybetmektedir ve 2030 yılına gelindiğinde dünyada kanser sebepli ölümlerde ikinci sırada olacağı öngörülmektedir (F. Bray et al., 2018). Ülkemizde ise Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun 2017 yılında yayınlanan verilerinde pankreas kanseri kadınlar arasında en sık görülen yedinci, erkekler arasında ise beşinci kanserdir (Hacıkamiloğlu et al., 2017). Pankreas kanseri insidansı ve mortalitesi artan yaşla ilişkili olmakla birlikte, erkeklerde biraz daha yaygın görülmektedir (F. Bray et al., 2018). Genellikle pankreasın baş kısmından başlayıp çevresindeki doku boyunca uzanarak karaciğer, dalak ve peritona metastaz yapmaktadır (Ying et al., 2016). Potansiyel risk faktörleri ve erken tanı için yeni kullanılan araçlardaki ilerlemeye rağmen, görülme sıklığının her yıl artacağı tahmin edilmektedir. Tipik olarak tanı sonrası, insanların sadece % 24'ü 1 yıl; %9'u ise 5 yıl yaşamaktadır (Stewart & Wild, 2014). Tanının geç konması ve tedavi başarısının düşük olmasının ana nedenleri; erken evrelerde ayırt edici bir belirti vermemesi, belirtiler olsa bile birçok farklı hastalıkla karıştırılabilecek yaygın belirtiler olması ve pankreasın anatomik olarak birçok organın arkasında yer almasının tanı yöntemlerinin verimli kullanılamamasına sebep olmasıdır.

Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi geleneksel olarak hayatta kalma süresini uzatmak ve/veya hastaların semptomlarını azaltmak için kullanılmaktadır. Her ne kadar birinci nesil ajanlardan gemsitabin ağrıyı hafifletme ve kilo artışı gibi klinik yanıtlar sağlasa da (Matano et al., 2000) prognoz 5 yıllık sağkalım % 1-4; ve 4-6 aylık bir medyan sağkalım süresiyle kısıtlı kalmıştır (Hermann et al., 2007). Gemsitabin bazlı kemoterapötik kombinasyonlar ya da Folfirinox rejimi uygulanması evre IV hastalarda ortalama sağkalımın ancak 6,8-11,1 aya çıkmasını sağlayabilmiştir (Conroy et al., 2011). Bu özellikler, pankreas kanserinin standart kemoterapötik tedavilere nispeten düşük duyarlılığı ile açıklanabilir (Renz, D'Haese, Werner, Westphalen, & Ilmer, 2017). Mevcut tanı testleri spesifik değildir ve erken evredeki hastaları tespit edememe riski yüksektir (De La Cruz, Young, & Ruffin IV, 2014).

Notch sinyal yolağının hücre çoğalması, farklılaşması, gelişimi ve homeostazi için kritik ve gerekli olduğu bilinmektedir (Zlobin et al., 2018). Tümör kitlesini oluşturan hücreler kemoterapiye duyarlı olmalarına rağmen, kanser kök hücreleri kemoterapiye dirençlidirler ve bu durum sitotoksik kemoterapinin başarısızlığına sebep olmaktadır (Hermann et al., 2007). Gemsitabin dirençli pankreas kanseri kök hücrelerinin epitelya-mezenşimal-geçiş (EMT) fenotipi edinmelerinin Notch sinyal yolunun aktivasyonu ile bağlantılı olduğu; yeni stratejiler ile Notch sinyalinin blokajının, kemoterapi direncinin üstesinden gelmek için potansiyel bir hedefli-terapötik yaklaşım olabileceği gösterilmiştir (Z. Wang et al., 2009). Ayrıca, ortotopik ve genetiği değiştirilmiş modeller dahil olmak üzere birçok tümör modelinde, Notch inhibisyonu standart sitotoksik ajanlarla tümleşik etkinlik göstermektedir (Cook et al., 2012; Plentz et al., 2009; Z. Wang et al., 2010). Rezektabl tümürlü hastalara Notch inhibisyonu yoluyla KKH'lerini hedef alan terapi sağlayarak, hastalığın tekrarlamaı engellenebilir ve tedavi ilerlemesi sağlanabilir.

Pankreas kanserli hastaların %95'inde Kras mutasyonu görölmesine rağmen, bugüne dek kanser hücrelerini öldürmek için Kras hedefli ajanlar geliştirme girişimleri hayal kırıklığı yaratmıştır (Van Cutsem et al., 2004). Çünkü Notch1, Kras'ın önemli bir down-stream düzenleyicisi olmakla birlikte, sürekli aktif durumdaki Notch1 sinyalinin, Ras mutant hücrelerinin transforme fenotipinin korunmasında kilit rol oynadığı ve Kras'ın hücreleri dönüştürme yeteneğinin, Notch sinyal yolu ile işbirliğine bağı olduğu gösterilmiştir (Weijzen et al., 2002). Dahası, Notch sinyallerinin Kras ile sinerjize edildiğı, PanIN'in başlamasını ve ilerlemesini teşvik ettiğı bildirilmiştir (J.-P. De La O et al., 2008). Notch sinyal yolağı normal yetişkin pankreas homeostazında önemli bir role sahip olmadığı için Pankreas kanseri tedavisinde moleküler stratejilerin belirlenmesinde bu yolağın inhibisyonu özellikle önem kazanmaktadır (García-Silva et al., 2013).

Bu nedenle bu çalışmada Notch yolağı moleküllerinin pankreas kanser kök hücreleri üzerindeki işlevsel rolünün *in-vitro* ve *in-vivo* olarak belirlenmesi; miR-193b-3p'nin Notch1 ve Notch1 üzerindeki etkisinin gösterilerek tedavi yaklaşımı olarak kullanılma potansiyelinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Bunun için ilk olarak Panc1 ve MiaPaCa2 hücre hatlarından CD133, CD44 ve EpCAM yüzey belirteçlerinin varlığı temel alınarak KKH ve non-KKH hücre popülasyonları izole edilmiştir (Şekil 5-6). İzole edilen CD133⁺/CD44⁺/EpCAM⁺ KKH ve CD133⁻/CD44⁻/EpCAM⁻ non-KKH'lerinin kök hücre belirteçlerini ifadeleri, yumuşak agarda tümörosfer oluşturma kapasiteleri, koloni oluşturma kapasiteleri ölçülerek karakterizasyonları yapılmıştır.

Adherent olmayan özel hücre kültürü flasklarında kültüre edilen KKH'leri çok sayıda tümör küresi oluşturabilirken; non-KKH'leri oluşturamamış ve bir süre sonra ölmeye başlamışlardır (Şekil 7-8). Daha önce Sai ve ark. Panc1 ve Pk45 pankreas kanseri hücre hatlarında izole ettikleri CD44⁺/EpCAM⁺ ve CD44⁻/EpCAM⁻ hücrelerle aynı sonuçlara ulaşmışlardır (Sai et al., 2015). Bunun aksine retinablastoma KKH'lerini karakterize etmek için yapılan bir çalışmada ise CD133^{lo} ve CD133^{hi} olarak izole edilen KKH'lerinden CD133^{lo} tümör küreleri oluştururken CD133^{hi} olan hücreler çok az miktarda oluşturmuşlardır (Nair et al., 2017). Bu ilginç ve zıt veri, KKH'lerinin bazı özelliklerinin kademeli bir şekilde artıp azaldığını ve muhtemelen dokuya özgü olduğunu yansıtmaktadır.

Ardından koloni oluşturma kapasiteleri 3 boyutlu olarak yumuşak agarda test edilen hücrelerden KKH çok sayıda koloniyi kısa sürede oluşturabilirken; non-KKH'leri oluşturamamıştır (Şekil 9). Wu ve ark.'nın nazofarenks kanseri hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda yumuşak agarda nazofarenks KKH'leri koloni oluşturabilirken non-KKH'lerinin bir süre sonra öldükleri saptanmıştır (S. L. Wu et al., 2017). Ek olarak western blot analizi sonuçlarında KKH'lerinde yüksek seviyede Oct4, Sox2 ve Nanog aktivitesi görülürken non-KKH'lerinde görülmemesi izole edilen CD133⁺/CD44⁺/EpCAM⁺ hücrelerin karakterizasyonunun tamamlar niteliktedir (Şekil 10).

Farklı kanser tiplerinde izole edilen kanser kök hücreleri üzerinde daha önce yapılan çalışmalarda bu hücrelerde Notch1 ve Notch2 reseptörlerinin anormal artışı ve bağlantılı olarak artış Notch sinyal yolağı aktivasyonu bildirilmiştir (Demitrack et al., 2019; Vorvis et al., 2016; Jialiang Wang et al., 2010). Bununla bağlantılı olarak Panc1 ve MiaPaCa2 hücreleri ve KKH'lerinde Notch1 ve Notch2'nin mRNA ve protein seviyeleri karşılaştırıldığında KKH'lerinde Notch1 ve Notch2'nin ekspresyonlarının daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 11).

Hücrelerde miR-193b-3p ifadesinin artışının Notch1 ve Notch2'nin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisini incelemek için yapılan qRT-PCR ve western blot analizlerinde; hem Panc1 hem de MiaPaCa2 KKH'lerinde artan miR-193b-3p ifadesine bağlı olarak Notch1 ve Notch2 ifadelerinde keskin bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 12-14). Bu düşüşün direkt bağlanma ile mi yoksa başka moleküller üzerinden mi olduğunu incelemek üzere Notch2'nin miR-193b-3p için bağlanma bölgeleri bulunmuştur. Yapılan lusiferaz raportör gen analizi ile miR-193b-3p'nin Notch2 mRNA'sına doğrudan bağlandığı ve Notch2 gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde bu direkt bağlanma yolu ile görev aldığı gösterilmiştir (Şekil 15).

Son yıllarda yapılan birçok çalışma farklılaşmayı inhibe etmesi, hücre çoğalmasını arttırması ve sağkalımı desteklemesi ile bilinen Notch reseptörlerinin inhibe edilmesiyle tümörögenезin durdurulabileceğini göstermiştir (Pang et al., 2010; Jing Wang, Fu, Gu, & Ma, 2011; Xiao, Gao, Duan, Yuan, & Ke, 2017). Notch2'nin siklin D1 ve siklin D3 ifadelerini bloke ederek G1/S kontrol noktasını etkisizleştirip hücrelerin kontrolsüz ve sürekli olarak bölünmeye devam etmelerine sebep olduğunu bildirilmiştir (Dobranowski, Ban, Contreras-Sanz, Cherkasov, & Black, 2018; Pierce, Pantazis, Caldwell, & Wells, 1982; Tchorz et al., 2012). miR-193b-3p'nin kanser kök hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerinde de düşüşe neden olması (Şekil 16) bu miRNA'nın tümörögenезde önemli bir regülatör olabileceğini doğrulamaktadır.

miR-193b'nin ektopik ekspresyonu sağlanan pankreas kanseri hücrelerinin apoptoza uğradıkları daha önce gösterilmiştir (Jin et al., 2015). miR-193b'nin apoptozu birkaç farklı sinyal yolağı üzerinden tetiklediği düşünülse de, pankreas kanseri hücrelerinde yapılan protein analizlerinde c-PARP ve kaspaz proteinleri yüksek oranda tespit

edilmiştir (Jin et al., 2015). Meme kanseri hücrelerinde miR-193b ekspresyonunun artırılmasının kemosenesiviteyi arttırdığı ve daha az miktarda doksurubisin kullanımıyla yüksek etki görüldüğü bildirilmiştir (Long, Ji, Jiang, Wang, & Meng, 2015). miR-193b'nin bir apoptotik mekanizma üzerinden etki edip etmediğini belirlemek için çalışmamızda Panc1 ve MiaPaCa2 kanser kök hücreleri üzerinde yaptığımız flow sitometrik analizlerde miR-193b-3p'nin Panc1 kanser kök hücrelerinde geç apoptozu tetiklediği; MiaPaCa2 kanser kök hücrelerinde ise daha çok erken apoptozu tetiklediği görülmüştür (Şekil 17). Bu durum iki farklı hücre hattında farklı apoptotik mekanizmaların aktif olduğunu işaret etmektedir.

Kanser kök hücrelerinin canlılıklarının azalması ve çoğalmalarının durmasının altındaki mekanizmayı aydınlatmak için yaptığımız hücre döngüsü analizlerinde miR-193b ifadesindeki artışın Panc1 KKH'lerinde G1 fazında birikmeye, G2 fazında ise anormal bir azalmaya sebep olduğu görülmüştür (Şekil 18). Bu sonuçlar, pankreas kanseri hücrelerinde miR-193b'nin yüksek ekspresyonunun hücre büyümesini ve hücre döngüsü ilerlemesini bir fren görevi görerek keskin bir biçimde inhibe ettiğini göstermektedir. Araştırmalar, onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin rolünün, kontrolsüz büyüme ve bölünmenin kansere evrilmesine neden olan hücre döngüsü mekanizması ile doğrudan veya dolaylı yollardan ilişkili olduğunu göstermektedir (Slattery et al., 2017). Xu ve ark., miR-193b ekspresyonundaki artışın siklin D1 ve ETS1'i hedef alarak karaciğer kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü bloke ettiğini; migrasyon ve invazyonu baskıladığını göstermiştir (Xu et al., 2010). Chen ve ark. ise malign melanom hücrelerindeki miR-193b artışının proliferasyonunu inhibe ettiğini ve siklin D1 ekspresyonunu baskıladığını öne sürmüşlerdir (Chen et al., 2010). Başka bir çalışmada, siklin D1'in yüksek ekspresyonunun G1 fazını kısaltarak hücrelerin S fazına girmesini teşvik edebileceğini ve böylece kontrolsüz hücre proliferasyonuna, hiperplastik lezyonlara veya kansere neden olabileceğini gösterilmiştir (Malumbres & Barbacid, 2009).

Pankreas kanseri kök hücrelerinin migrasyon ve invazyonun davranışlarını incelemek için yaptığımız deneylerde miR-193b-3p'nin ekspresyonundaki artışın hem migrasyonu hem de invazyonu anlamlı bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 19-20). Bu bulgular miR-193b-3p'nin pankreas kanserinde tümör baskılayıcı işlevi gördüğünü desteklemektedir.

miR-193b-3p'nin pankreas kanseri hücrelerinin sağkalımı, proliferasyonu, invazyonu ve migrasyonu üzerindeki düzenleyici etkilerine Notch'un aracılık edip etmediğini belirlemek için siRNA kullanılarak gen inhibisyonu yapılmıştır. Hem Notch1 hem de Notch2 gen ekspresyonları 2'şer farklı siRNA kullanılarak baskılanmıştır. siRNA kullanılan deneylerden elde edilen verilere olan güveni arttırmanın en iyi yollarından biri, tek bir hedef gene iki ya da daha fazla bağımsız siRNA kullanmaktır. Aynı gene farklı siRNA'ların uygulanması gen ekspresyon profillerinde veya fenotiplerinde benzer değişiklikleri indüklemelidir.

Panc1 ve MiaPaCa2 kanser kök hücrelerinde Notch1 ve Notch2 gen ekspresyonları siRNA teknolojisi kullanılarak transfeksiyon yolu ile baskılandıktan sonra qRT-PCR ve western blot deneyleri ile kullanılan siRNA'ların etkinlikleri ölçülmüştür (Şekil 24-25). Yapılan koloni oluşumu, migrasyon ve invazyon deneylerinde hem Notch1 hem de Notch2 geninin susturulmasının proliferasyon, invazyon ve migrasyonu önemli ölçüde inhibe ederek onkojenik kapasiteyi düşürdüğü bulunmuştur (Şekil 21-23). Bu verilerin miR-193b-3p ifadesinin arttırılması ile elde ettiğimiz verilerle benzer olması; miR-193b-3p'nin regülatif etkinliğini Notch yolağı üzerinden gösterdiği düşüncemizi doğrular niteliktedir.

Apoptoz analizinde Notch1 ve Notch2 genleri susturulan Panc1 kanser kök hücrelerinin büyük bir kısmının geç apoptotik süreçte oldukları görülürken; MiaPaCa2 kanser kök hücrelerinin çoğunlukla erken apoptotik süreçte oldukları görülmüştür (Şekil 26). Notch1 ve Notch2 molekülleri, pankreas kanseri tümorigenezinde, özellikle hücre döngüsü düzenlemesi yoluyla majör efektör konumundadır. Kanserli hücrelerde Notch1 ifadesindeki artış Siklin D3'ü uyarır, bu da hücreleri G1 arrestinden kurtarır. Notch1 molekülünün inhibe edilmesi, siklin D3 üzerinden hücre döngüsünü G0/G1 fazında inhibe etmektedir. Notch2 ifadesinin inhibe edilmesi ise p21'in up-regülasyonunun tetikleyerek siklin D1'in down-regüle olmasını sağlar ve hücrelerin

G0/G1 arrestine girmesini tetikler. Panc1 ve MiaPaCa2 kanser kök hücrelerinde Notch1 ve Notch2 gen ifadelerinin susturulması hücrelerin G1 fazında birikmelerine, S fazında ise düşüşüne sebep olmuştur (Şekil 27).

Notch1 geninin miR-193b-3p için bir bağlanma bölgesi olmamasına rağmen mRNA ve protein ekspresyonlarında düşüş görülmesi ilgi çekicidir. Notch1 ve Notch2 arasındaki etkileşimi aydınlatmak için yapılan immünopresipitasyon deneyinde Notch1 proteininin Notch2'ye; Notch2 proteinin de Notch1'e bağlandığı bulunmuştur (Şekil 28).

Çalışmamızdaki bulgular, miR-193b-3p'nin azalmış ifadesinin, pankreas kanseri olan hastalarda kötü klinik prognoz ve sağkalım ile ilişkili olduğunu ve miR-193b-3p'nin klinik olarak önemli bir tümör baskılayıcı miRNA olduğunu açık bir şekilde göstermektedir. Pankreas kanserinde miR-193b-3p'nin ifadesi, Notch1 ve Notch2 ifadelerini doğrudan ve önemli ölçüde baskılayarak onların down-stream molekülleri olan ve nükleusa transloke olarak hedef genlerin ifadenmelerini tetikleyen N1ICD ve N2ICD'yi de baskılamaktadır (Şekil 24). Çalışmamız ayrıca miR-193b-3p'nin sistemik olarak enjekte edilerek nanoiletim mekanizması ile terapötik olarak kullanılmasının pankreas kanseri kök hücre modelinde tümör büyümesini engellediğine dair ilk kanıtları sağlamaktadır (Şekil 29a). Hayvanlarda miR-193b-3p tedavisi yolu ile Notch1 ve Notch2 inhibisyonunun, tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir (Şekil 29b). Notch sinyalinin down-stream moleküllerinin pankreas kanserinin regülasyonunda ne derecede etkili oldukları henüz tam olarak araştırılmamıştır.

Yapılan immünohistokimya çalışmasında da miR-193b-3p tedavisi uygulanan hayvanların tümör dokusunda Notch1 ve Notch2 ifadelerinin belirgin derecede düşmüş olduğu görülmüştür. Bununla birlikte tümör hücrelerinin proliferasyon kapasitelerini görmek için immünohistokimya metodu ile ki67 ekspresyonu; ve anjiyogenez belirteci olan CD31 ekspresyonları da incelenmiştir (Şekil 29c). miR-193b-3p tedavisi uygulanan hayvanların tümörlerinde hem ki67 hemde CD31 ekspresyonlarında ciddi düşüş gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada miR-193b-3p'nin pankreas kanseri hücrelerinde çok düşük seviyede ifade edildiği ve miR-193b-3p'nin pankreas tümörlerinde ifadesinin düzensiz olduğu görülmüştür. Bugüne kadar, birçok çalışma miR-193b-3p'nin kolorektal kanser, liposarkoma, mide kanseri, özofagus skuamöz hücreli karsinom, melanoma ve meme kanseri gibi farklı kanser türlerinde rol oynadığını göstermiştir (Hatfield et al., 2005; Ji et al., 2009; Kasinski & Slack, 2011; Shi, Xie, Gaod, & Xie, 2014; Xia & H Sarkar, 2012). Daha önce miR-193b-3p'nin Morc4, Notch, Wnt, Pdgfr, Rab22a ve Brca1 gibi genlerin ifadesini inhibe ettiği de bildirilmiştir. Bununla birlikte, miR-193b-3p' nin biyolojik rolü ve pankreas kanserindeki doğrudan fonksiyonel hedefleri henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Çalışmamızdaki anahtar bulgu, hem *in-vitro* hem de *in-vivo* olarak pankreas kanseri kök hücrelerinde tümör baskılayıcı bir etkiye neden olduğu gösterilen miR-193b-3p tarafından Notch1 ve Notch2' nin baskılanıyor olmasıdır.

Notch2 ifadesindeki anormal yükseklik, pankreas kanseri tanısı olan hastaların % 90'ından fazlasında tespit edilmiştir. Bu gibi anormal onkogenik aktiviteler, bu kanserdeki potansiyel moleküler hedefleri temsil etmektedir. Her ne kadar moleküler bulgular Notch2'yi hedef alan yeni terapötik tedaviler geliştirmek için güçlü bir ilişki sunmakta olsalar da, Notch2'nin doğrudan inhibisyonunun çok zor olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle, Notch sinyal yolağının aşırı aktif ve düzensiz seyrettiği pankreas kanserinde daha etkili tedaviler geliştirilmesi için Notch2 molekülünün direkt inhibisyonu üzerinden geliştirilecek tedavi modellerine ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, miR-193b-3p'nin pankreas kanseri kök hücrelerinde apoptozu önemli ölçüde indüklediğinin gösterilmesi, pankreas kanseri ksenograft fare modelinde miR-193b-3p' nin lipid bazlı nanolipozomlar yoluyla verilmesi ve tümör büyümesinin inhibisyonu, miR-193b-3p/Notch eksenini hedefleyen stratejilerin, çoklu onkogenik yolların inhibisyonu üzerinden geniş anti-tümör etkileri sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Biraraya getirilen bu bulgular pankreas kanser kök hücresi hedeflemede miR-193b-3p tarafından Notch sinyal yolağının post-transkripsiyonel düzenlenmesinde yeni bir bakış açısı sunmaktadır. Özellikle miR-193b-3p'nin kanser kök hücrelerinin hedeflenmesi yoluyla hücre çoğalması, apoptoz ve invazyon gibi önemli tümörögenез mekanizmalarını regüle ettiği çalışmamızda gösterilmiştir. Dolayısıyla, bu bulguların

kliniğe uygulanabilir tedavi geliştirme yolunda önemli etkileri olabilir; miR-193b-3p bazlı terapi, kanser kök hücrelerini elimine etmek için önemli bir terapötik strateji potansiyeli barındırmaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

K çalışmamızda da gösterilmişti ki, yaptığımız çalışmalarla umut vaat edici gelişmeler kaydedilmektedir. Kanser kök hücreleri (KKH), normal kök hücrelerde bulunan kendi kendini yenileyebilme ve sınırsız çoğalma özelliklerini taşıyan ve tümör içinde çok az sayıda var olan bir alt popülasyondur (6). Tümör nüksünden, metastazdan, ilaca, kemoterapi ve radyoterapiye dirençten sorumlu olan bu hücrelerin moleküler mekanizmaları hala tam olarak açığa çıkarılamamıştır (6–8). Yüksek dirence sahip pankreas kanser kök hücrelerinde NOTCH1 ifadesi hedef alınarak bu hücreleri apoptoza götürmenin mümkün olduğu da gösterilmiştir. Böylece tümör nüksünden ve tedaviye dirençten temel olarak sorumlu olan bu hücreler elimine edebilir.

miRNA'lar kök hücrelerin çevresel sinyallere duyarsızlaşarak normal G1 / S kontrol noktasının üstesinden gelmeleri ve bölünmeyi sürdürmeleri için de gereklidirler. Bu nedenle, miRNA, kanser kök hücre regülasyonundaki bozuklukları ele alan hayati bir araç olabileceği de çalışmamızda gösterilmiştir.

Bulgularımız pankreas tümör genезinde miR-193b tarafından Notch1 ve Notch2'nin post-transkripsiyonel düzenlenmesinde yeni bir fikir vermektedir. Özellikle, miR-193b'nin Notch yolağı kaynaklı sinyalleri içeren çoklu onkojenik yolların hedeflenmesi üzerinden hücre çoğalması, apoptoz ve invazyon dahil olmak üzere önemli kanser özelliklerini düzenlediğini gösterdik. Dolayısıyla, bu bulguların önemli çeviri etkileri olabilir; miR-193b bazlı tedavi, pankreas kanserini tedavi etmek için umut vaadeden bir terapötik strateji olabilir.

7. KAYNAKLAR

Abel, E. V., Kim, E. J., Wu, J., Hynes, M., Bednar, F., Proctor, E., ... Simeone, D. M. (2014). The notch pathway is important in maintaining the cancer stem cell

- population in pancreatic cancer. *PLoS ONE*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091983>
- Abel, E. V., & Simeone, D. M. (2013). Biology and clinical applications of pancreatic cancer stem cells. *Gastroenterology*.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.072>
- Apelqvist, Å., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., ... Edlund, H. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/23716>
- Arora, S., Swaminathan, S. K., Kirtane, A., Srivastava, S. K., Bhardwaj, A., Singh, S., ... Singh, A. P. (2014). Synthesis, characterization, and evaluation of poly (D,L-lactide-co-glycolide)-based nanoformulation of miRNA-150: Potential implications for pancreatic cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S61949>
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., & Lake, R. J. (1999). Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.284.5415.770>
- Bader, A. G. (2012). MiR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Frontiers in Genetics*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00120>
- Bao, B., Azmi, A. S., Aboukameel, A., Ahmad, A., Bolling-Fischer, A., Sethi, S., ... Sarkar, F. H. (2014). Pancreatic cancer stem-like cells display aggressive behavior mediated via activation of FoxQ1. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.532887>
- Bao, B., Wang, Z., Ali, S., Kong, D., Li, Y., Ahmad, A., ... Sarkar, F. H. (2011). Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *Cancer Letters*, 307(1), 26–36.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.03.012>
- Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., ... Diaz, L. A. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Science Translational Medicine*.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007094>
- Bjornson, C. R. R., Cheung, T. H., Liu, L., Tripathi, P. V., Steeper, K. M., & Rando, T. A. (2012). Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1002/stem.773>
- Blanpain, C., & Fuchs, E. (2006). Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annual Review*

- of Cell and Developmental Biology*, 22(1), 339–373.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104357>
- Brabletz, S., Bajdak, K., Meidhof, S., Burk, U., Niedermann, G., Firat, E., ...
 Brabletz, T. (2011). The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *The EMBO Journal*, 30(4), 770–782.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2010.349>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bray, S. J. (2016). Notch signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(11), 722–735. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.94>
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., ... Israël, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: The role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Molecular Cell*.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80417-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80417-7)
- Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W., & Pasquinelli, A. E. (2016). Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.004>
- Büchler, P., Gazdhar, A., Schubert, M., Giese, N., Reber, H. A., Hines, O. J., ... Tuynman. (2005). The Notch signaling pathway is related to neurovascular progression of pancreatic cancer. *Annals of Surgery*.
<https://doi.org/10.1097/01.sla.0000189115.94847.fl>
- Chacón-Martínez, C. A., Koester, J., & Wickström, S. A. (2018). Signaling in the stem cell niche: regulating cell fate, function and plasticity. *Development*.
<https://doi.org/10.1242/dev.165399>
- Chan, C. J., Heisenberg, C. P., & Hiiragi, T. (2017). Coordination of Morphogenesis and Cell-Fate Specification in Development. *Current Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.010>
- Chen, J., Feilotter, H. E., Paré, G. C., Zhang, X., Pemberton, J. G. W., Garady, C., ... Tron, V. A. (2010). MicroRNA-193b represses cell proliferation and regulates cyclin D1 in melanoma. *American Journal of Pathology*.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091061>
- Cheng, C. J., Bahal, R., Babar, I. A., Pincus, Z., Barrera, F., Liu, C., ... Slack, F. J.

- (2015). MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature13905>
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., ... Ducreux, M. (2011). FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1011923>
- Cook, N., Frese, K. K., Bapiro, T. E., Jacobetz, M. A., Gopinathan, A., Miller, J. L., ... Tuveson, D. A. (2012). Gamma secretase inhibition promotes hypoxic necrosis in mouse pancreatic ductal adenocarcinoma. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20111923>
- Davis-Dusenbery, B. N., & Hata, A. (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq096>
- De La Cruz, M. S. D., Young, A. P., & Ruffin IV, M. T. (2014). Diagnosis and management of pancreatic cancer. *American Family Physician*.
- De La O, J.-P., Emerson, L. L., Goodman, J. L., Froebe, S. C., Illum, B. E., Curtis, A. B., & Murtaugh, L. C. (2008). Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810111105>
- De La O, J. P., & Murtaugh, L. C. (2009). Notch and Kras in pancreatic cancer: At the crossroads of mutation, differentiation and signaling. *Cell Cycle*. <https://doi.org/10.4161/cc.8.12.8744>
- De Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., ... De Hoon, M. J. L. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.3947>
- Demitrack, E. S., Gifford, G. B., Keeley, T. M., Horita, N., Todisco, A., Turgeon, D. K., ... Fernandez-piqueras, J. F. (2019). Defective expression of Notch1 and Notch2 in connection to alterations of c-Myc and Ikaros in -radiation-induced mouse thymic lymphomas Defective expression of Notch1 and Notch2 in connection to alterations of c-Myc and Ikaros in g -radiation-induced mous. *The Nucleus*, (0123456789), 133–144. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh124>
- Deng, T., Yuan, Y., Zhang, C., Zhang, C., Yao, W., Wang, C., ... Ba, Y. (2016). Identification of Circulating miR-25 as a Potential Biomarker for Pancreatic Cancer Diagnosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1159/000447872>

- Dobranowski, P., Ban, F., Contreras-Sanz, A., Cherkasov, A., & Black, P. C. (2018). Perspectives on the discovery of NOTCH2-specific inhibitors. *Chemical Biology and Drug Design*. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13132>
- Driessens, G., Beck, B., Caauwe, A., Simons, B. D., & Blanpain, C. (2012). Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11344>
- Facompre, N., Nakagawa, H., Herlyn, M., & Basu, D. (2012). Stem-Like Cells and Therapy Resistance in Squamous Cell Carcinomas. In *Advances in Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397927-8.00008-7>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., ... Bray, F. (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D., & Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature03589>
- Friedländer, M. R., Lizano, E., Houben, A. J. S., Bezdan, D., Báñez-Coronel, M., Kudla, G., ... Estivill, X. (2014). Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-4-r57>
- García-Silva, S., Frias-Aldeguer, J., & Heeschen, C. (2013). Stem cells & pancreatic cancer. *Pancreatology*. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2012.12.003>
- Garzon, R., Marcucci, G., & Croce, C. M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 9(10), 775–789. <https://doi.org/10.1038/nrd3179>
- Gastaldi, C., Bertero, T., Xu, N., Bourget-Ponzio, I., Lebrigand, K., Fourre, S., ... Rezzonico, R. (2014). miR-193b/365a cluster controls progression of epidermal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt490>
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., Van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm952>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hacıkamiloğlu, E., Gültekin, M., Boztaş, G., Dündar, S., Utku, E. Ş., Kavak Ergün,

- A., ... Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. (2017). Türkiye Kanser İstatistikleri. *Türkiye Halk Sağlığı Kurumu*.
- Haeberle, L., & Esposito, I. (2019). Pathology of pancreatic cancer. *Translational Gastroenterology and Hepatology*. <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.06.02>
- Hald, J., Hjorth, J. P., German, M. S., Madsen, O. D., Serup, P., & Jensen, J. (2003). Activated Notch1 prevents differentiation of pancreatic acinar cells and attenuate endocrine development. *Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00326-9](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00326-9)
- Hamada, S., Satoh, K., Fujibuchi, W., Hirota, M., Kanno, A., Unno, J., ... Shimosegawa, T. (2012). MiR-126 Acts as a Tumor Suppressor in Pancreatic Cancer Cells via the Regulation of ADAM9. *Molecular Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-11-0272>
- Hamada, Shin, Satoh, K., Miura, S., Hirota, M., Kanno, A., Masamune, A., ... Shimosegawa, T. (2013). miR-197 induces epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells by targeting p120 catenin. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.24280>
- Hatfield, S. D., Shcherbata, H. R., Fischer, K. a, Nakahara, K., Carthew, R. W., & Ruohola-Baker, H. (2005). Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature*, 435(7044), 974–978. <https://doi.org/10.1038/nature03816>
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., ... Heeschen, C. (2007). Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.06.002>
- Hsu, Y. C., Li, L., & Fuchs, E. (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.3643>
- Hu, H., Zhou, L., Awadallah, A., & Xin, W. (2013). Significance of Notch1-signaling pathway in human pancreatic development and carcinogenesis. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM / Official Publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*, 21(3), 242–247. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3182655ab7>
- Hu, Q. L., Jiang, Q. Y., Jin, X., Shen, J., Wang, K., Li, Y. B., ... Li, Z. H. (2013). Cationic microRNA-delivering nanovectors with bifunctional peptides for

- efficient treatment of PANC-1 xenograft model. *Biomaterials*.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.12.016>
- Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i44.9694>
- Jamieson, N. B., Morran, D. C., Morton, J. P., Ali, A., Dickson, E. J., Carter, C. R., ... Oien, K. A. (2012). MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0679>
- Janssen, H. L. A., Reesink, H. W., Lawitz, E. J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., ... Hodges, M. R. (2013). Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *New England Journal of Medicine*.
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1209026>
- Jensen, J., Pedersen, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., ... Madsen, O. D. (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/71657>
- Ji, Q., Hao, X., Zhang, M., Tang, W., Meng, Y., Li, L., ... Xu, L. (2009). MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS ONE*, 4(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006816>
- Jin, X., Sun, Y., Yang, H., Li, J., Yu, S., Chang, X., ... Chen, J. (2015). Deregulation of the MiR-193b-KRAS axis contributes to impaired cell growth in pancreatic cancer. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125515>
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C. H., Leary, R. J., Angenendt, P., ... Kinzler, K. W. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1164368>
- Jopling, C. L., Yi, M. K., Lancaster, A. M., Lemon, S. M., & Sarnow, P. (2005). Molecular biology: Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1113329>
- Kasinski, A. L., & Slack, F. J. (2011). Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 11(12), 849–864.
<https://doi.org/10.1038/nrc3166>
- Kim, Y. K., & Kim, V. N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO*

- Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601512>
- Kimura, K., Satoh, K., Kanno, A., Hamada, S., Hirota, M., Endoh, M., ... Shimosegawa, T. (2007). Activation of Notch signaling in tumorigenesis of experimental pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice. *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00369.x>
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V., ... Neoptolemos, J. P. (2016). Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16022. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>
- Kong, X., Du, Y., Wang, G., Gao, J., Gong, Y., Li, L., ... Li, Z. (2011). Detection of differentially expressed microRNAs in serum of pancreatic ductal adenocarcinoma patients: MiR-196a could be a potential marker for poor prognosis. *Digestive Diseases and Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1285-3>
- Kumar, R., Juillerat-Jeanneret, L., & Golshayan, D. (2016). Notch Antagonists: Potential Modulators of Cancer and Inflammatory Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01516>
- Kumazoe, M., Takai, M., Hiroi, S., Takeuchi, C., Kadomatsu, M., Nojiri, T., ... Tachibana, H. (2017). The FOXO3/PGC-1 β signaling axis is essential for cancer stem cell properties of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.772111>
- Lafkas, D., Shelton, A., Chiu, C., de Leon Boenig, G., Chen, Y., Stawicki, S. S., ... Siebel, C. W. (2015). Therapeutic antibodies reveal Notch control of transdifferentiation in the adult lung. *Nature*, 528(7580), 127–131. <https://doi.org/10.1038/nature15715>
- Lee, L. S., Szafranska-Schwarzbach, A. E., Wylie, D., Doyle, L. A., Bellizzi, A. M., Kadiyala, V., ... Conwell, D. L. (2014). Investigating MicroRNA expression profiles in pancreatic cystic neoplasms. *Clinical and Translational Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1038/ctg.2013.18>
- Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1065329>
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., ... Simeone, D. M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Research*, 67(3), 1030–1037. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2030>
- Li, S. C., Chan, W. C., Hu, L. Y., Lai, C. H., Hsu, C. N., & Lin, W. chang. (2010).

- Identification of homologous microRNAs in 56 animal genomes. *Genomics*.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.03.009>
- Li, Y., & Sarkar, F. H. (2016). MicroRNA targeted therapeutic approach for pancreatic cancer. *International Journal of Biological Sciences*.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.15017>
- Ling, H., Fabbri, M., & Calin, G. A. (2013). MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd4140>
- Lomberk, G., & Urrutia, R. (2008). Primers on molecular pathways - Notch. *Pancreatology*. <https://doi.org/10.1159/000123603>
- Long, J., Ji, Z., Jiang, K., Wang, Z., & Meng, G. (2015). MIR-193b Modulates Resistance to Doxorubicin in Human Breast Cancer Cells by Downregulating MCL-1. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/373574>
- Makarova, K. S., Zhang, F., & Koonin, E. V. (2017). SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas Systems. *Cell*, 168(5), 946-946.e1.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.018>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>
- Matano, E., Tagliaferri, P., Libroia, A., Damiano, V., Fabbrocini, A., De Lorenzo, S., & Bianco, A. R. (2000). Gemcitabine combined with continuous infusion 5-fluorouracil in advanced and symptomatic pancreatic cancer: a clinical benefit-oriented phase II study. *British Journal of Cancer*.
<https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.1139>
- Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C. A., ... Leach, S. D. (2003a). Notch mediates TGF beta-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell*, 3(6), 565–576. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00140-5](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00140-5)
- Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C. A., ... Leach, S. D. (2003b). Notch mediates TGF α -induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell*.
[https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00140-5](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00140-5)
- Morimura, R., Komatsu, S., Ichikawa, D., Takeshita, H., Tsujiura, M., Nagata, H., ... Otsuji, E. (2011). Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*.

<https://doi.org/10.1038/bjc.2011.453>

- Mullendore, M. E., Koorstra, J. B., Li, Y. M., Offerhaus, G. J., Fan, X., Henderson, C. M., ... Feldmann, G. (2009). Ligand-dependent notch signaling is involved in tumor initiation and tumor maintenance in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2004>
- Munding, J. B., Adai, A. T., Maghnouj, A., Urbanik, A., Zöllner, H., Liffers, S. T., ... Hahn, S. A. (2012). Global microRNA expression profiling of microdissected tissues identifies miR-135b as a novel biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.26466>
- Nair, R. M., Balla, M. M. S., Khan, I., Kalathur, R. K. R., Kondaiah, P., & Vemuganti, G. K. (2017). In vitro characterization of CD133 lo cancer stem cells in Retinoblastoma Y79 cell line. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3750-2>
- Nalls, D., Tang, S. N., Rodova, M., Srivastava, R. K., & Shankar, S. (2011). Targeting epigenetic regulation of miR-34a for treatment of pancreatic cancer by inhibition of pancreatic cancer stem cells. *PLoS One*, 6(8), e24099. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024099>
- Nguyen, P. H., Giraud, J., Chambonnier, L., Dubus, P., Wittkop, L., Belleannée, G., ... Varon, C. (2017). Characterization of Biomarkers of Tumorigenic and Chemoresistant Cancer Stem Cells in Human Gastric Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 23(6), 1586–1597. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2157>
- Ohno, S. I., Takanashi, M., Sudo, K., Ueda, S., Ishikawa, A., Matsuyama, N., ... Kuroda, M. (2013). Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Molecular Therapy*. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.180>
- Pai, P., Rachagani, S., Are, C., & Batra, S. (2013). Prospects of miRNA-Based Therapy for Pancreatic Cancer. *Current Drug Targets*. <https://doi.org/10.2174/13894501113149990181>
- Pang, R. T. K., Leung, C. O. N., Ye, T. M., Liu, W., Chiu, P. C. N., Lam, K. K. W., ... Yeung, W. S. B. (2010). MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells. *Carcinogenesis*, 31(6), 1037–1044.

<https://doi.org/10.1093/carcin/bgq066>

Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., ... Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*.

<https://doi.org/10.1038/35040556>

Pellegrinet, L., Rodilla, V., Liu, Z., Chen, S., Koch, U., Espinosa, L., ... Radtke, F. (2011). Dll1- and Dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterology*.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.005>

Philippou, M., Sambasivan, R., Castel, D., Rocheteau, P., Bizzarro, V., & Tajbakhsh, S. (2012). A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells*.

<https://doi.org/10.1002/stem.775>

Pierce, G. B., Pantazis, C. G., Caldwell, J. E., & Wells, R. S. (1982). Specificity of the Control of Tumor Formation by the Blastocyst. *Cancer Research*, 42(3), 1082–1087.

Plentz, R., Park, J. S., Rhim, A. D., Abravanel, D., Hezel, A. F., Sharma, S. V., ... Bardeesy, N. (2009). Inhibition of γ -Secretase Activity Inhibits Tumor Progression in a Mouse Model of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.

Gastroenterology. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.008>

Pramanik, D., Campbell, N. R., Karikari, C., Chivukula, R., Kent, O. A., Mendell, J. T., & Maitra, A. (2011). Restitution of Tumor Suppressor MicroRNAs Using a Systemic Nanovector Inhibits Pancreatic Cancer Growth in Mice. *Molecular Cancer Therapeutics*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-11-0152>

Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>

Rasheed, Z. A., Yang, J., Wang, Q., Kowalski, J., Freed, I., Murter, C., ... Matsui, W. (2010). Prognostic Significance of Tumorigenic Cells With Mesenchymal Features in Pancreatic Adenocarcinoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(5), 340–351. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp535>

Rebelo, A., Molpeceres, J., Rijo, P., & Pinto Reis, C. (2017). Pancreatic Cancer Therapy Review: From Classic Therapeutic Agents to Modern

- Nanotechnologies. *Current Drug Metabolism*.
<https://doi.org/10.2174/1389200218666170201151135>
- Renz, B., D'Haese, J., Werner, J., Westphalen, C., & Ilmer, M. (2017). Repurposing Established Compounds to Target Pancreatic Cancer Stem Cells (CSCs). *Medical Sciences*. <https://doi.org/10.3390/medsci5020014>
- Sai, S., Wakai, T., Vares, G., Yamada, S., Kamijo, T., Kamada, T., & Shirai, T. (2015). Combination of carbon ion beam and gemcitabine causes irreparable DNA damage and death of radioresistant pancreatic cancer stem-like cells *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3584>
- Sawey, E. T., Johnson, J. A., & Crawford, H. C. (2007). Matrix metalloproteinase 7 controls pancreatic acinar cell transdifferentiation by activating the Notch signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705953104>
- Schultz, N. a, Dehlendorff, C., Jensen, B. V, Bjerregaard, J. K., Nielsen, K. R., Bojesen, S. E., ... Johansen, J. S. (2014). MicroRNA biomarkers in whole blood for detection of pancreatic cancer. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 311(4), 392–404. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.284664>
- Seto, A. G., Beatty, X., Lynch, J. M., Hermreck, M., Tetzlaff, M., Duvic, M., & Jackson, A. L. (2018). Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*. <https://doi.org/10.1111/bjh.15547>
- Seufferlein, T., Bachet, J. B., Van cutsem, E., & Rougier, P. (2012). Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds224>
- Shaya, O., Binshtok, U., Hersch, M., Rivkin, D., Weinreb, S., Amir-Zilberstein, L., ... Sprinzak, D. (2017). Cell-Cell Contact Area Affects Notch Signaling and Notch-Dependent Patterning. *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.02.009>
- Shen, Q., Goderie, S. K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., ... Temple, S. (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1095505>
- Shi, M., Xie, D., Gaod, Y., & Xie, K. (2014). Targeting miRNAs for pancreatic

- cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design*, 20(33), 5279–5286.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>.Innate
- Slattery, M. L., Herrick, J. S., Mullany, L. E., Samowitz, W. S., Sevens, J. R., Sakoda, L., & Wolff, R. K. (2017). The co-regulatory networks of tumor suppressor genes, oncogenes, and miRNAs in colorectal cancer. *Genes Chromosomes and Cancer*. <https://doi.org/10.1002/gcc.22481>
- Stewart, B. W., & Wild, C. P. (2014). World cancer report 2014. *World Health Organization*. <https://doi.org/9283204298>
- Tanzer, A., & Stadler, P. F. (2004). Molecular evolution of a microRNA cluster. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.065>
- Tchorz, J. S., Tome, M., Cloëtta, D., Sivasankaran, B., Grzmil, M., Huber, R. M., ... Bettler, B. (2012). Constitutive Notch2 signaling in neural stem cells promotes tumorigenic features and astroglial lineage entry. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.65>
- Totaro, A., Castellan, M., Battilana, G., Zanconato, F., Azzolin, L., Giulitti, S., ... Piccolo, S. (2017). YAP/TAZ link cell mechanics to Notch signalling to control epidermal stem cell fate. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms15206>
- Van Cutsem, E., van de Velde, H., Karasek, P., Oettle, H., Vervenne, W. L., Szawlowski, A., ... Von Hoff, D. (2004). Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.10.112>
- Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., ... Bernstein, I. D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/81390>
- Vasudevan, S. (2012). Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. <https://doi.org/10.1002/wrna.121>
- Vorvis, C., Koutsioumpa, M., & Iliopoulos, D. (2016). Developments in miRNA gene signaling pathways in pancreatic cancer. *Future Oncology (London, England)*, 12(9), 1135–1150. <https://doi.org/10.2217/fon-2015-0050>
- Wang, Jialiang, Wakeman, T. P., Lathia, J. D., Hjelmeland, A. B., Wang, X. F., White, R. R., ... Sullenger, B. A. (2010). Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells*, 28(1), 17–28. <https://doi.org/10.1002/stem.261>

- Wang, Jing, Fu, L., Gu, F., & Ma, Y. (2011). Notch1 is involved in migration and invasion of human breast cancer cells. *Oncology Reports*, 26(5), 1295–1303. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1399>
- Wang, M., Wang, J., Wang, L., Wu, L., & Xin, X. (2010). Notch1 expression correlates with tumor differentiation status in ovarian carcinoma. *Medical Oncology*, 27(4), 1329–1335. <https://doi.org/10.1007/s12032-009-9384-8>
- Wang, Y. H., Li, F., Luo, B., Wang, X. H., Sun, H. C., Liu, S., ... Xu, X. X. (2009). A side population of cells from a human pancreatic carcinoma cell line harbors cancer stem cell characteristics. *Neoplasma*. https://doi.org/10.4149/neo_2009_05_371
- Wang, Z., Li, Y., Ahmad, A., Azmi, A. S., Banerjee, S., Kong, D., & Sarkar, F. H. (2010). Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.06.001>
- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Azmi, A. S., ... Sarkar, F. H. (2009). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4312>
- Wang, Z., Zhang, Y., Li, Y., Banerjee, S., Liao, J., & Sarkar, F. H. (2006). Down-regulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(3), 483–493. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0299>
- Weijzen, S., Rizzo, P., Braid, M., Vaishnav, R., Jonkheer, S. M., Zlobin, A., ... Miele, L. (2002). Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm754>
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4)
- Wu, S. L., Li, Y. J., Liao, K., Shi, L., Zhang, N., Liu, S., ... Ying, W. (2017). 2-Methoxyestradiol inhibits the proliferation and migration and reduces the radioresistance of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 stem cells via NF- κ B/HIF-1 signaling pathway inactivation and EMT reversal. *Oncology Reports*.

<https://doi.org/10.3892/or.2016.5319>

- Wu, Y., Crawford, M., Mao, Y., Lee, R. J., Davis, I. C., Elton, T. S., ... Nana-Sinkam, S. P. (2013). Therapeutic delivery of MicroRNA-29b by cationic lipoplexes for lung cancer. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*.
<https://doi.org/10.1038/mtna.2013.14>
- Xia, J., & H Sarkar, F. (2012). Emerging Role of MicroRNA in Pancreatic Cancer. *Pancreatic Disorders & Therapy*, 02(03), 2–4. <https://doi.org/10.4172/2165-7092.1000e114>
- Xiao, W., Gao, Z., Duan, Y., Yuan, W., & Ke, Y. (2017). Notch signaling plays a crucial role in cancer stem-like cells maintaining stemness and mediating chemotaxis in renal cell carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0507-3>
- Xu, C., Liu, S., Fu, H., Li, S., Tie, Y., Zhu, J., ... Zheng, X. (2010). MicroRNA-193b regulates proliferation, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma cells. *European Journal of Cancer*.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.06.127>
- Ying, H., Dey, P., Yao, W., Kimmelman, A. C., Draetta, G. F., Maitra, A., & Depinho, R. A. (2016). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes and Development*.
<https://doi.org/10.1101/gad.275776.115>
- Zhang, H. Da, Sun, D. W., Mao, L., Zhang, J., Jiang, L. H., Li, J., ... Tang, J. H. (2015). MiR-139-5p inhibits the biological function of breast cancer cells by targeting Notch1 and mediates chemosensitivity to docetaxel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 465(4), 702–713.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.053>
- Zhu, Z., Xu, Y., Zhao, J., Liu, Q., Feng, W., Fan, J., & Wang, P. (2015). MiR-367 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells by targeting the Smad7-TGF- β signalling pathway. *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.102>
- Zlobin, A., Bloodworth, J. C., Baker, A. T., Osipo, C., Bloodworth, J. C., & Baker, A. T. (2018). Predictive Biomarkers in Oncology. *Predictive Biomarkers in Oncology*, 223–230. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-95228-4>



EKLER

EK 1. TUBİTAK Destek Belgesi



T.C.
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY
Vice Presidency
Science Fellowships and Grant Programmes Department

OUR REF: 53325897-115.02-170549

DATE : 02/08/2017

TO WHOM IT MAY CONCERN,

Ümmü GÜVEN is awarded a grant by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBİTAK).

The fellow will receive 12 ay/month x USD1800 = USD21600 in total and perform a research at UNIVERSITY OF TEXAS MD ANDERSON CANCER CENTER. The Scientific and Technological Research Council of Turkey is to be informed in case the fellow is supported financially by other institutions.

Travel expenses (from residence to the research base and return) will be covered by the Council.

Sincerely,

Assoc. Prof. Dr. Samettin GÜNDÜZ
Acting Head of Department of Research
Fellowship Programs

P.S:This document is valid provided that the fellow starts the stated research until 18 July 2018
This document is not a permission letter for the fellow to go abroad. It is prepared as a proof of the financial support of The Scientific and Technological Research Council.

TEŞEKKÜR

Başta, yaşamım boyunca her koşulda maddi-manevi beni destekleyen, bu uzun, stresli ve yorucu yüksek öğrenim sürecim boyunca yanımda olan aileme,

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca tecrübelerini, bilgisini her zaman benimle paylaşan, desteğini her zaman hissettiğim değerli danışmanım Prof. Dr. Gülperi Öktem'e,

Bu tez çalışmasını yapmak üzere beni Texas Üniversitesi MD Anderson Kanseri Merkezi, Deneysel Tedaviler Departmanı'ndaki laboratuvarına kabul eden; bilgisini ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan değerli hocam Dr. Bülent Özpolat'a,

Çalışmalarım süresince her zaman yardım ve destekleri ile yanımda olan sevgili Nermin Kahraman, Şeyda Baydoğan ve Hamada Ahmed Mokhlis'e,

Çalışma ve araştırma hayatında ömürlük arkadaşlıklar edinmenin ne kadar zor olduğunu ve bu konuda ne kadar şanslı olduğumu bana hissettiren, mesafeler önemli olmaksızın her zaman sevgi ve desteklerini hissettiğim sevgili arkadaşlarım Fahriye Düzağaç ve Eda Açıkgöz'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TUBİTAK 2214-A Doktora Sırası Yurtdışı Araştırma Bursu (2016 II. Dönem) ile desteklenerek Dr. Bülent Özpolat danışmanlığında Texas Üniversitesi, MD Anderson Kanseri Merkezi, Deneysel Tedaviler Departmanı'nda (Houston, Texas, ABD) tamamlanmıştır.

Ümmü GÜVEN

29/07/2019

ÖZGEÇMİŞ

Lisans eğitimimi Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde 2011 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2014 yılında tamamladığım yüksek lisans eğitimimden sonra aynı yıl Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. TUBİTAK 2214-A Doktora Sırası Yurtdışı Araştırma Bursu almaya hak kazanarak doktora tez çalışmamı Şubat 2018 – Şubat 2019 tarihleri arasında Texas Üniversitesi, MD Anderson Kanseri Merkezi, Deneysel Tedaviler Departmanı'nda (Houston, Texas, ABD) tamamladım.

İletişim:

ummu.guven@hotmail.com

