

**T.C.
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**PANKREAS KANSERİ KÖK HÜCRESİNİN İZOLASYONU ve
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Kübra YILDIRIM**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Muradiye ACAR**

Ankara-2016

**T.C.
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**PANKREAS KANSERİ KÖK HÜCRESİNİN İZOLASYONU ve
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Kübra YILDIRIM**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Muradiye ACAR**

**Bu Tez TÜBİTAK Tarafından 3501 Projesi (Proje No: 113S941)
Kapsamında Desteklenmiştir**

Ankara-2016

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Turgut Özal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,

- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,

- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,

- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

Kübra YILDIRIM

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme, bilgilendirmeleriyle ve manevi desteği ile çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren tez danışmanım sayın hocam Yrd. Doç. Muradiye ACAR 'a, her zaman bize engin bilgisi, karakteri, hem bilim dünyasında ki başarı hem de özel hayatında ki anne kişiliği ile örnek olan sayın hocam Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Esra GÜNDÜZ'e, disiplinli çalışma yöntemi, kararlılığı, araştırmacı ruhu ile her zaman örnek alacağım Sayın Prof. Dr. Mehmet Gündüz' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimleriyle proje, deneyler ve birçok konuda bana yardımcı olan Yrd. Doç. Ömer Faruk HATİPOĞLU' na ve Yrd. Doç. Sultan YILMAZ' a teşekkür ederim.

Tezimi bilimsel ve maddi olarak destekleyen TÜBİTAK' a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca hem çalışmalarım da bana yardımcı olan, güzel günler geçirdiğim bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, beni cesaretlendiren sevgili ailem, babam Kemal YILDIRIM' a, annem Kamile YILDIRIM' a, kardeşim Büşra YILDIRIM' a ve varlıklarıyla bana destek olan Kemal Arda EREN'e ve Hüseyin EFE EREN' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

[YILDIRIM, Kübra]. [Pankreas Kanseri Kök Hücrelerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu], [Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2016].

Kanser, günümüzde kardiyovasküler sisteme ait hastalıklardan sonra ölümlerin en sık ikinci nedenidir. Batı toplumlarında her üç kişiden birinde kanser görülmekte ve bu kişilerden beşte biri yaşamını yitirmektedir. Tanı ve tedavinin gelişmesi ile her yıl kanser vakası teşhisi daha da artmaktadır.

Pankreas kanseri mortalitesi yüksek bir hastalıktır. 5 yıllık sağkalım %5'den az olup hastaların büyük bir kısmı bir yıldan daha kısa sürede kaybedilmektedir. Tedavisi en zor kanser türlerinden biri olup etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Ayrıca erken tanı için spesifik bir belirteci olmaması hastalığın geç evrelerde teşhis edilmesine sebep olmaktadır.

Kök hücrede meydana gelen genetik ve epigenetik değişiklikler hücrenin invaziv ve metastatik özellik kazanarak kanser kök hücre (KKH) özelliği kazanmasına sebep olur. KKH tümörün etiyogenezinden ve tümör dokusu içindeki kanser hücrelerinin oluşumundan sorumludur. KKH, kendi-kendini yenileme, sınırsız çoğalma potansiyeline ve metastaz yeteneğine sahiptir. KKH'nın kanser hücresi oluşturma özelliği, kanser hücreleri ve KKH arasındaki genetik ve epigenetik farklılığa işaret etmektedir.

Pankreas kanserinin tedavisindeki başarısızlıklar ve hastaların ölüm oranlarının yüksek olması dikkati KKH'lere çekmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla KKH'nın varlığı meme, beyin, prostat, yumurtalık ve pankreas kanserlerini kapsayan birçok solid tümör tiplerinde bildirilmiştir. Pankreas kanseri kök hücrelerinin varlığı ise ilk kez 2007 yılında Li ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Fare xenograft modeli ile yaptıkları çalışmada, az sayıda olan CD44, CD24 ve epithelial-specific antigen (ESA) hücre yüzey markırlarını ekspres eden hücrelerin yüksek tümörjenik özelliğe sahip olduklarını saptamışlardır. Bu hücrelerin tümör oluşturma potansiyellerinin, tümörjenik özelliği olmayan hücrelere kıyasla 100 kat fazla olduğu gösterilmiştir.

Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda, pankreas kanserine ait AsPC-1 ve Capan-2 hücre hatlarında CD44, CD24 ve ESA biomarkırları kullanılarak KKH ve kanser hücresi izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen hücrelerin validasyonu morfolojik olarak, küre oluşum deneyi ve markır genlerin ekspresyonuna bakılarak kontrol edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: kanser kök hücre, pankreas kanseri

ABSTRACT

[YILDIRIM, Kübra]. [Isolation and Characterization of Pancreatic Cancer Stem Cells], [Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2016].

Today, cancer is the second most common cause of death after cardiovascular related diseases. In Western societies, cancer is seen in one in every three people and of these, one in five will lose their life. Each year, along with diagnosis and treatment developments, the number of cancer diagnoses increases.

Pancreatic cancer is a disease with a high mortality rate. The 5-year survival rate is less than 5% and a large number of these patients lose their lives in less than one year. It is one of the most difficult cancer types with no effective treatment method. Furthermore, since there is no specific indicator for early diagnosis the disease is diagnosed at late stages. Genetic and epigenetic changes in stem cells that lead to invasive and metastatic ability are what cause the development of the cancer stem cell (CSC) characteristic. KKH are responsible for the development of cancer cells in tumor tissue and a tumor's etiology. KKH have the characteristics of self-renewal, unlimited growth potential, and metastatic capacity. The ability of cancer stem cells to generate cancer cells is indicated by genetic and epigenetic differences between cancer cells and cancer stem cells.

The lack of success in treatment of pancreas cancer and high rate of death among patients has turned attention to CSCs. In recent years, studies have shown the presence of CSCs in many solid tumor types including those of the breast, brain, prostate, ovaries and pancreas. The existence of cancer stem cells in pancreas cancer was first shown in 2007 by Li et al. Using a mouse xenograft model, they showed that a small number of cells expressing the surface markers CD44, CD24 and epithelial-specific antigen (ESA) had a high tumorigenic potential. The capacity of these cells to develop tumors was shown to be 100 times higher than that of cells without tumorigenic potential.

Based on this data, in this study cancer stem cell and cancer cell isolation was carried out in pancreatic cancer cell lines AspC-1 and Capan-2 using the biomarkers CD44, CD24 and ESA. The isolated cells were then validated morphologically, as well as by sphere formation assay and analysis of the expression of marker genes.

Key Words: cancer stem cell, pancreatic cancer

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. KANSER.....	1
1.2. KANSER ÇEŞİTLERİ	2
1.3. PANKREAS KANSERİ	2
1.3.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi	2
1.3.2. Risk Faktörleri	3
1.3.3. Tanı, Evreleme ve Tedavi.....	4
1.4. Pankreas Kanserinde Moleküler Genetik	6
1.4.1. K-RAS Onkogeni ve Uyarım Yolu.....	6
1.4.2. PI3K (Fosfoinositid 3-kinaz) Yolu	7
1.4.3. NFκB (Nükleer faktör κB).....	7
1.4.4. 9p21 Lokusu, INK4A (Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 2A, Multiple Tumor Suppressor 1) ve ARF (Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 2A) Tümör Süpresörleri.....	8
1.4.5. p53 Tümör Süpresörü	8
1.4.6. SMAD4/DPC4 (Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4) Tümör Süpresörü ve TGF.....	8
1.4.7. LKB1/ (STK11 Serine/threonine kinase 11/ liver kinase B1) Tümör Süpresörü	9
1.4.8. BRCA2 (Breast Cancer Type 2) Tümör Süpresörü	9
1.5. Kök Hücre.....	9
1.5.1. Farklılaşma Kaynaklarına göre;.....	10
1.5.2. Elde edildikleri yere göre:	11

1.6.	Kanser Kök Hücreleri	16
1.6.1.	Kanser Kök Hücrelerinin Kökeni ve Oluşumu.....	17
1.6.2.	Pankreas Kanseri Kanser Kök Hücre ve Markırları.....	18
2.	MATERYAL ve METODLAR	24
2.1.	Hücre Kültürü	24
2.1.1.	Kullanılan Hücre Hatlarının Genel Özellikleri.....	24
2.1.2.	Hücre Kültüründe Kullanılan Medyumların Hazırlanışı	24
2.1.3.	Stoktan Hücre Ekimi.....	25
2.1.4.	Hücre Pasajlanması	25
2.2.	Kök Hücre İzolasyonu	26
2.2.1.	Flow Sitometri.....	26
2.2.2.	MACS (Magnetic-activated cell sorting)	28
2.2.3.	%2'lik agarlı flask hazırlanması	30
2.3.	KKH Validasyonu	31
2.3.1.	Küre Oluşum Analizi.....	31
2.3.2.	Hücreden Total RNA izolasyonu	31
2.3.3.	Primer Tasarımı.....	33
2.3.4.	qRT-PCR.....	36
3.	BULGULAR.....	38
3.1.	Hücre Kültürü	38
3.2.	Kök Hücre İzolasyonu	39
3.2.1.	Flow Sitometri.....	39
3.1.2.	MACS (Magnetic-activated cell sorting)	41
3.2.	İzole Edilen KKH'ların Validasyonu	42
3.2.1.	Küre Oluşum Deneyi	42
3.2.2.	KKH ve KH' den RNA İzolasyonu	44
3.2.3.	qRT-PCR.....	44
4.	TARTIŞMA	47
	KAYNAKLAR	51

KISALTMALAR

KKH	: Kanser kök hücre
KH	: Kanser Hücresi
ESA	: Epithelial-specific antigen
PDAC	: pankreatik duktal adenokarsinoma
PanIN	: pancreatic intraepithelial neoplasia
CD44	: Cluster of Differentiation 44
CD24	: Cluster of Differentiation 24)
EpCAM	: Epithelial cell adhesion molecule
EGF	: Epidermal growth factor
FGF	: Fibroblast growth factor

ŞEKİLLER

Şekil 1.	Pankreas hücresinde kanser oluşumu	3
Şekil 2.	K-RAS geninin lokalizasyonu	6
Şekil 3.	Transkripsiyon faktörleri tüm kök hücrelerde eksprese edilir.	12
Şeki 4.	Sox-2, Oct-4 ve Nanog etkinliği. Ucu sivri oklar uyarımı, ucu kapatılmış oklar engellemeyi gösterir. Oct-4'un ve Sox-2'nin belli bir düzeyde ifade edilmesi embriyonik kök hücrenin kendini yenilemesini pluripotensiyi korurken, trofoektroderm hücre yönünde farklılaşmalarını engeller. Nanog da benzer şekilde embriyonik kök hücrenin etkinliğinin sürmesini sağlarken, hipoblast yönünde farklılaşmayı engeller.	14
Şekil 5.	Transkripsiyon faktörlerinin ortak özelliği farklılaşmayı yönlendirmeleridir.....	15
Şekil 6.	KKH'in tümör oluşturma mekanizması	16
Şekil 7.	KKH oluşum modelleri.....	18
Şekil 8.	Pankreas kanseri kök hücresi yüzey markırları.	19
Şekil 9.	KKH ve KH grubu.....	26
Şekil 10.	DynaMag.....	28
Şekil 11.	AsPC-1 hücre hattı.....	38
Şekil 12.	Capan-2 hücre hattı	39
Şekil 13.	AsPC-1 hücre hattının flow sitometri analizi. a.antikor eklenmemiş, boyanmamış negatif hücreler, b.ESA ve CD24 antikor ile yapılan boyama, c.CD44 antikor ile yapılan boyama	40
Şekil 14.	Capan-2 hücre hattının flow sitometri analizi. a.antikor eklenmemiş, boyanmamış negatif hücreler, b.ESA ve CD24 antikor ile yapılan boyama, c.CD44 antikor ile yapılan boyama.....	41
Şekil 15.	AsPC-1 hücre hattının küre oluşum deneyi.....	42
Şekil 16.	Capan-2 hücre hattının küre oluşum deneyi	43

Şekil 17. AsPC-1 hücre hattında KLF-4, OCT-4, SOX-2 ve CD24 genlerinin ekspresyon seviyeleri	45
Şekil 18. Capan-2 hücre hattında OCT-4, SOX-2 ve CD24 genlerinin ekspresyon seviyeleri	46

TABLolar

Tablo 1.	Kök hücre çeşitleri.....	10
Tablo 2.	Pankreas kanseri hücre hatları özellikleri.....	24
Tablo 3.	cDNA sentezi için kullanılan kit ve miktarları.....	33
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan primeler.....	34
Tablo 5.	Gradient PCR mix oranları.....	35
Tablo 6.	qRT-PCR mix oranları.....	37
Tablo 7.	Flow sitometri analiz sonucu, AsPC-1 ve Capan-2 hücre hatlarının yüzey markır pozitiflikleri.....	41
Tablo 8.	KKH ve KH' lerinin RNA izolasyon sonuçları.....	44

1. GİRİŞ

1.1. KANSER

Kanser büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin bölgesel olarak yayılımıdır. Basit bir ifadeyle kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilir. Kontrolsüz çoğalmanın yanı sıra kanser hücresinin bölünebilmek için dış uyaranlara ihtiyaç duymama, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarmama ve metastaz yapabilme özellikleri sayılabilir [1,2].

Kanser multifaktöriyel bir hastalık olup, bakteriler, virüsler, radyasyon kalıtım, çevresel faktörler, beslenme alışkanlığı ve kimyasallar gibi birçok faktör kanser oluşumundan sorumludur [3]. Tüm kanserler, DNA dizisindeki birtakım anormalliklerle oluşmaktadır. Kanserlerin %10-15'inin kalıtsal olduğu, %85-90'lık kısmını ise canlı hücrelerdeki DNA'nın, mutajenlere maruz kalması, hücre DNA'sındaki hafif devamlı değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması ile şekillendiği düşünülmektedir. Oluşan bu mutasyonlardan biri, içinde bulunduğu hücrenin büyümesini ve bu hücreden türeyen bir kanserli hücrenin oluşmasını sağlar.

Günümüzde kanser, kardiyovasküler sisteme ait hastalıklardan sonra ölümlerin en sık ikinci nedenidir [4]. Oluştığı bölgeye göre isimlendirilmesi ve sınıflandırılması sonucu 80 farklı kanser türü olduğu belirlenmiştir [5].

Batı toplumlarında her üç kişiden birinde kanser görülmekte ve bu kişilerden beşte biri yaşamını yitirmektedir [1,7]. Gelişmiş ve az gelişmiş ülkelere bakıldığında, bu ülkelerdeki kanserlerin büyüme hızlarının ve profillerinin farklı olduğu görülür. Gelişmiş ülkelerde, erkeklerde akciğer ve prostat kanseri, kadınlarda ise meme kanseri ve kolorektal kanserler daha sık görülürken, az gelişmiş ülkelerde ise erkeklerde akciğer, mide ve karaciğer kanseri, kadınlarda da meme ve serviks kanseri daha sık görülmektedir [6]. Türkiye'de ise erkeklerde akciğer, mesane ve mide kanserleri, kadınlarda da meme kanseri ve kolorektal kanserler daha sık görülmektedir. Ülkemizin

gelişmiş ülkelere göre en önemli farkı tütün nedenli kanserlerin daha fazla olmasıdır. Türkiye'de akciğer kanseri insidansı %63 ve larinks kanseri insidansı %10 iken Avrupa Birliği ülkelerinde ise aynı insidanslar %55 ve %8 dir [8].

1.2. KANSER ÇEŞİTLERİ

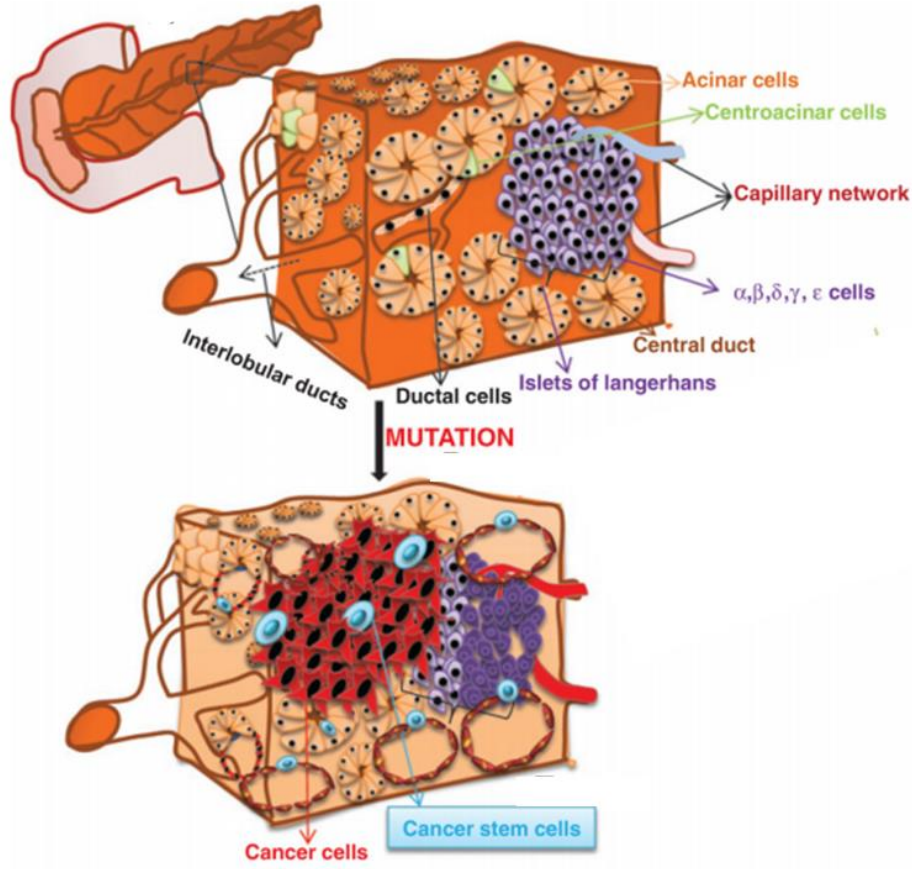
Kanser insan vücudunda oluştuğu bölgeye ve organa göre çeşitlilik göstermektedir. Örneğin; Rahim Ağzı Kanseri, Meme Kanseri, Göz Kanseri, Pankreas Kanseri, Melanoma, Prostat Kanseri, Anal Kanal Kanseri, Kan Kanseri, Rahim Kanseri, Karaciğer Kanseri olmak üzere birçok kanser çeşidi vardır [9].

1.3. PANKREAS KANSERİ

Pankreas kanseri, ileri yaşlarda daha sık ortaya çıkan, agresif seyirli, ölümcül, malign kanserlerden biridir [10].

1.3.1. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi

Pankreas kanseri dünya çapında malignite kanserler arasında 12. sırada yer almaktadır. Erkeklerde kanser ilişkili ölüm oranları sıralamasında yedinci sırada, kadınlarda ise sekizinci sıradadır [11]. Gelişmiş ülkelerde kanser ile ilişkili ölüm sıralamasında dördüncü sıradadır [12]. Pankreas kanseri görülme sıklığını gittikçe artmaktadır, 2030'da ABD kanser ilişkili ölüm sıralamasında ikinci sırada yer alması beklenmektedir [13]. Hastalığın 5 yıllık sağ kalım oranı %5-%7 arasındadır. Metastatik olan hastalarda sağ kalım 20-24 ay iken, lokal olarak ilerlemiş pankreatik duktal adenokarsinoma (PDAC)'da 6-9 aydır [14].



Şekil 1. Pankreas hücresinde kanser oluşumu [123].

1.3.2. Risk Faktörleri

Şişmanlık, yaş, alkol kullanımı, bireyde pankreatit bulunması, genetik faktörler, diabetes mellitus, sigara içimi önemli risk faktörleridir. Özellikle sigara içimi çok önemli bir faktör olup sigara içenlerde içmeyenlere göre 2,2 kat daha fazla pankreas kanseri riski vardır [1,15]. Epidemiyolojik çalışmalara en sık rastlanan risk faktörleri yaş ve sigara içimidir [16]. Aynı zamanda yapılan çalışmalar naftilamin, benzidin ve petrol ürünlerinin kullanıldığı bazı endüstri kuruluşlarında çalışanlarında pankreas kanserinin daha sık görüldüğü belirlenmiştir [17].

Pankreas kanserinde artmış risk faktörü hasta yakınlarında da gösterilmiş, %10'unun genetik ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Tümör süpresör genleri (INK4A, BRCA2 ve LKB1) ve DNA mismatch tamir genlerinin ailesel PDAC ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir [18,19].

1.3.3. Tanı, Evreleme ve Tedavi

Pankreas kanseri belirtileri ile birçok malign ve benign diğer organ hastalıkları ile benzer bulguları taşıyabilir [20].

Pankreas kanseri yayılım gösterinceye kadar sessiz kalmaktadır. Tanı koyulan hastaların yaklaşık olarak %20'si müdahale edilebilir olmaktadır [21]. Hastalarda en sık görülen pankreatik neoplazm PDAC'dır ve tümör vakalarının %85'inde görülür [21,22].

Hastalar en sık ağrı, kilo kaybı, sarılık şikâyeti ile gelmektedir. İleri evre ile gelen hastaların %80-85'inde ağrı mevcuttur [19, 23].

Pankreas kanserinin tanısında bir dizi serum belirleyici ve görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır. Belirleyiciler pankreas kanserinin belirlenmesinde yeterli doğruluğa ve güvenilirliğe ne yazık ki sahip değildir. En sık kullanılan serum markırları karsinoembriyjenik antijen (CEA) ve karbonhidrat antijen (CA) 19-9'dur. Bu serumların düzeyinde ki artış tümör dokusunun büyüklüğü ile doğru orantılıdır [25,26]. CA 19-9 seviyesi en kullanışlı olanıdır, özellikle de CA 242 seviyesi ile kombine edildiğinde toplam spesifikte artmaktadır [27].

Pankreas kanserinin tanısal görüntüleme teknikleri arasında bilgisayarlı tomografi (BT) en sık kullanılandır, tümörlü bölgeden alınan hızlı ve ince kesitler, pankreas kanserinin tanısal değerlendirmesinde dönüm noktası olmuştur [28]. Rutin olarak kullanılan Magnetik Rezonans Görüntüleme (MRG), pankreas kanseri açısından BT ile kıyaslandığında, tanısal bir avantaj sağlamamaktadır [29].

Evrelendirilmesinde American Joint Commision on Cancer (AJCC) evrelendirilme sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu evrelendirme

sistemde tümörün yayılımı, nodal metastaz ve uzak metastazların tanımlanması sistemi kullanılır [30,31].

Tümör boyutu:

TX: Primer tümör değerlendirilemeyen

T0: Primer tümör saptanamayan

Tis: Karsinoma insitu (PanIN-3 dahil)

T1: ≤ 2 cm pankreasa sınırlı tümör

T2: > 2 cm pankreasa sınırlı tümör

T3: Peripankreatik dokulara invaze tümör

T4: Çölyak aks veya süperior mezenterik artere invaze tümör

Bölgesel lenf nodları:

NX: Bölgesel lenf nodu metastazı değerlendirilemeyen

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok

N1: Bölgesel lenf nodu metastazı var

Uzak Metastaz:

MX: Uzak metastaz varlığı değerlendirilemeyen

M0: Uzak metastaz yok

M1: Uzak metastaz var

Pankreas kanseri tedavisinde cerrahi tedavi yaklaşımları, kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları yapılmaktadır. Hastalığın ilerleyişi, tümörün evresi, komplikasyon varlığı gibi çeşitli faktörlere göre değişmektedir. Pankreas tümörlerinin %70'i baş, boyun ve ucinat bölgesinde bulunur [32]. Pankreas başı tümörünün çıkarılması tek ve en etkili tedavi yöntemidir. Bu tedavi yöntemi, başlangıç semptomu olarak sarılık şikayeti ile gelen hastaların %10-15'inde işe yaramaktadır [32,33].

Bir başka tedavi yöntemi olan kemoterapide ise 30'dan fazla kemoterapik ilaçtan sadece Gemcitabin ve 5-Fluorourasil (5-FU), hastaların %10-20'sinde belirgin bir yanıt oluşturmuştur fakat sağ kalım süresini arttırmamıştır [34,35]. Yapılan çalışmalar radyasyon tedavisinin 5-FU ile

birlikte kullanılmasının daha etkin sonuçlar verdiğini ve bu tedaviyi alan hastaların almayanlara göre ortalama yaşam sürelerinin arttığı (20 aya karşı 11 ay) gözlemlenmiştir [36,37].

1.4. Pankreas Kanseri Moleküler Genetik

PDAC'a yönelik yapılan moleküler çalışmalar, kanser etiyogenezinde rol oynayan gen ve sinyal yollarının bu hastalığın gelişiminde ve histopatolojik evrelerinde etkili olduğunu göstermiştir.

1.4.1. K-RAS Onkogeni ve Uyarım Yolu

K-RAS 12. kromozomun kısa kolu üzerinde (12p12.1) yer alır, hücre membranı ve sitoplazma yerleşimli, intraselüler sinyal iletiminde rol oynayan bir proto-onkogendir [38] (Şekil1). RAS ailesi proteinleri, proliferasyon, diferansiyasyon gibi çeşitli hücre işlevlere aracılık eden GTP bağlayıcı proteinlerdir. İnsan kanserlerindeki RAS mutasyonlarının %90'nı K-RAS mutasyonlarından kaynaklanmaktadır [39].



Şekil 2. K-RAS geninin lokalizasyonu [38]

Bu mutasyonlar normal pankreas dokusunda sporadik olarak meydana gelirler ve erken evre

neoplazmların yaklaşık yüzde 30'unda görülürken ileri evre PDAC'lerde bu oran neredeyse %100'dür [40,41]. K-RAS^{G12D} mutasyonununa sahip farelerin uygun genetik zeminde, PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) lezyonları taşıdıkları gözlemlenmiştir [42].

1.4.2. PI3K (Fosfoinositid 3-kinaz) Yolu

Hücrede bir sinyal çevirici olarak görev yapan Fosfoinositid 3-kinaz hücre hayatta kalımını, boyutunu ve proliferasyonu düzenlemektedir [43]. PDAC'lerin %10-20'sinde PI3K alt efektörlerinin arttığı gözlemlenmiştir [44,45]. PI3K'nin farmakolojik inhibisyonunun PDAC'ta kemoterapiye olan hassasiyetini arttırdığı ve serum aracılıklı proliferasyonu azalttığı tahmin edilmektedir [46,47].

1.4.3. NFκB (Nükleer faktör κB)

NFκB, immün yanıtta yer alan, hücre proliferasyonuna ve apoptoza katılan, yaygın bulunan enhancer bağlayıcı bir transkripsiyon faktörüdür [48]. NFκB aktivitesi pek çok kanser türünde gözlemlenmektedir ve bu kanserlerde hücre hayatta kalımına, anjiyogenezise ve invazyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir [49]. Primer pankreatik kanserler ve hücre dizilerinde bulunan fakat normal pankreas örneklerinde bulunmayan NFκB aktivitesi gözlenmiştir [50,51].

1.4.4. 9p21 Lokusu, INK4A (Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 2A, Multiple Tumor Suppressor 1) ve ARF (Cyclin-Dependent Kinase İnhibitor 2A) Tümör Süpresörleri

PDAC'lerin %85-60'ında INK4A fonksiyon kaybı mutasyonla, delesyonla veya promoter hipermetilasyonu ile sporadik olarak görülmektedir [52]. Aynı zamanda INK4A'daki germline mutasyonları yüksek melanoma insidansının yanında, 13 kat artmış pankreas kanseri ile karakterize olan Ailesel Atipik Nevüs - Malign melanoma (Familial atypical mole-malignant melanoma = FAMMM) sendromu ile ilişkilidir. INK4A'nın PDAC patogenezindeki önemi, KRAS ile birlikte çalıştığını ve eş zamanlı p53 mutasyonları zemininde tümör ilerleyişini hızlandığını gösteren araştırmalar yapılarak desteklemiştir [53].

1.4.5. p53 Tümör Süpresörü

p53, 17. kromozomun kısa kolunun p13 gen bölgesinde bulunur [54]. P53, DNA hasarına yanıt olarak hücreyi apoptoza veya senesense götürür [55]. PDAC vakalarının %50'den fazlasında DNA bağlayıcı alanda missense mutasyonuna sahiptir [56]. p53 mutasyonu önemli displazi özellikleri kazanmış ileri evre PanIN'lerde ortaya çıkmaktadır [57]. PDAC'taki bu önüne geçilemeyen genomik kararsızlığın ilerlemiş hastalığın çıkışını hızlandığı, hem de tedavi yaklaşımlarında direnci artırdığı düşünülmektedir [58].

1.4.6. SMAD4/DPC4 (Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4) Tümör Süpresörü ve TGF (Transforming Growth Factor Beta)

TGF- β , sitokin ailesinin doku homeostazının sürdürülmesi ve embriyonik gelişimin kontrolünde önemli rolleri olan başlıca üyesidir. Hücre bölünmesi, farklılaşması, adhezyon, morfogenez, ekstraselüler matriks oluşumu ve programlı hücre ölümü gibi çeşitli hücresel süreçlerin kontrolünü sağlamaktadır [59,60]. SMAD proteinleri ise, TGF- β 'nin sinyalizasyonunda

görev yapmaktadır [61]. SMAD4 proteini TGF- β 'nin sinyalizasyonunun çekirdeğe aktarılmasında görevlidir [62]. PDAC vakalarının %50'sinde SMAD4 delesyonu belirlenmiştir [63]. SMAD4 ekspresyonu ve sağ kalım arasında ters orantı mevcuttur. SMAD4 ekspresyonu artmış olan tümörler diferansiye özelliği göstermeye daha meyillidir [64].

1.4.7. LKB1/ (STK11Serine/threonine kinase 11/ liver kinase B1) Tümör Süpresörü

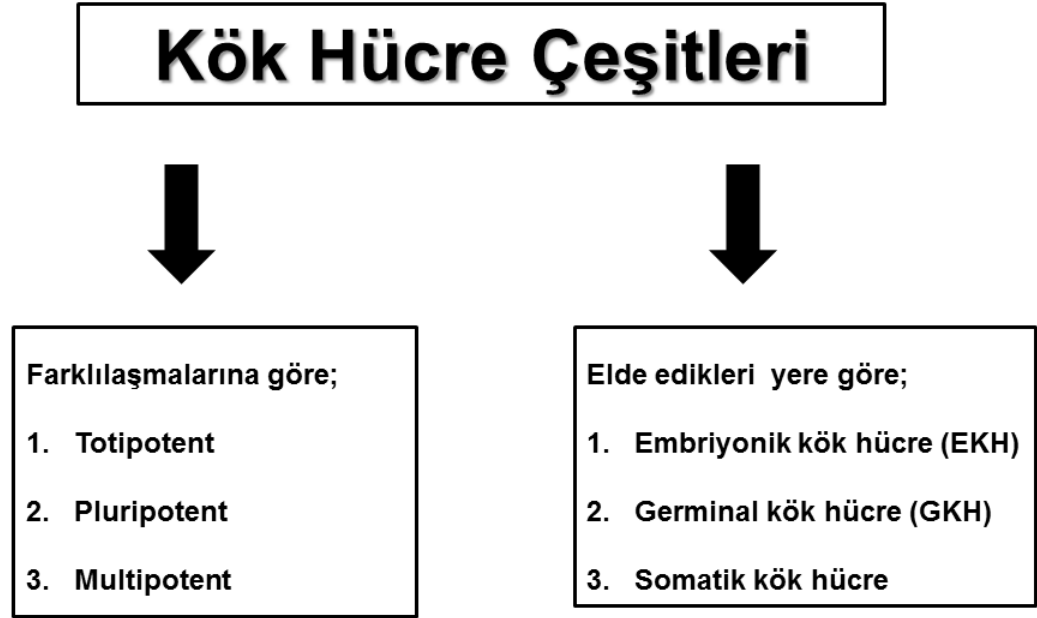
Peutz-Jeghers sendromu (PJS) PDAC'ta insidansının arttığı LKB1/STK11 mutasyonları ile ilişkili, ailesel kanser sendromudur [65]. Bu mutasyon gastrointestinal malignensi riski doğurmaktadır [66]. PDAC'de görülen somatik LKB1 mutasyonu nadirdir, incelenen sporadik vakaların yalnızca %4-6'sında görülmektedir [67].

1.4.8. BRCA2 (Breast Cancer Type 2) Tümör Süpresörü

Ailesel meme ve over kanser sendromları ile ilişkili kalıtsal BRCA2 mutasyonları aynı zamanda pankreas kanseri gelişimi için de belirgin risk sahibidirler. Ailesel zeminde gelişen pankreas kanserlerinin yaklaşık %17'sinin bu gen mutasyonuna sahip olduğu belirlenmiştir [68].

1.5. Kök Hücre

Kök hücre, kendini yenileme ve çoğalma kapasitesine sahip, hiyerarşik olarak çeşitli hücre tiplerine dönüşebilen ve çok hücreli canlıların doku ve organlarını oluşturan temel hücrelerdir [69,70]. Kök hücreler özelliklerine, farklılaşmalarına ve elde edildikleri yere göre sınıflandırılabilir.

Tablo 1. Kök hücre çeşitleri

1.5.1. Farklılaşma Kaynaklarına göre;

1.5.1.1. Totipotent

Embriyonun blastosit evresinin üçüncü gününde alınan, yeni bir canlı oluşturacak genetik bilgi ve donanımına sahip hücrelerdir. Zigotun mitoz bölünmeleri sonucu meydana gelen blastomerler, canlılardaki en yüksek farklılaşma kapasitesine sahip olan hücrelerdir [71].

1.5.1.2. Pluripotent

Embriyonun blastokist evresinde oluşan embriyonik hücrelerdir ve gelişmiş bir organizmanın her tabakasında (mezodermal, endodermal ve

ekdodermal) yer alan hücre ve dokuları oluşturma yeteneğine sahip hücrelerdir. Totipotensiden farklı olarak daha kısıtlı bir farklılaşma sınırına sahiptir [69].

1.5.1.3. Multipotent

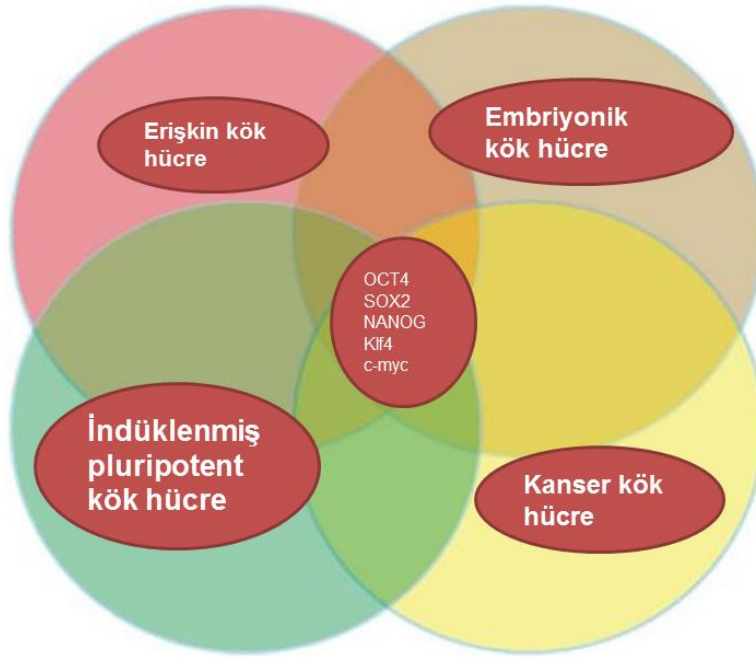
Totipotent ve pluripotent karakterdeki hücelere göre daha kısıtlı farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Buldukları dokunun hücre tipini üretirler. Doğumla beraber kordon kanında, kemik iliğinde ve yağ dokusunda bulunurlar [71].

1.5.2. Elde edildikleri yere göre:

1.5.2.1. Embriyonik Kök Hücre

Blastokist evresindeki embriyodan elde edilir [72]. Embriyonik kök hücreler pluripotent hücreler olup, uygun sinyaller ile uyarıldıklarında vücutta yaklaşık 200 hücre tipine dönüşebilirler [73]. Embriyonik kök hücreler rejeneratif tıbbın odak noktasıdır. Özellikle kendini yenileme sürecinde farklılaşmaksızın değişmeden kalma ve uyarıldıklarında özelleşmiş hücre türleri oluşturma özellikleri odak noktası oluşturmalarında büyük etkindir [74,75].

Embriyonik kök hücrelerin kültür ortamında farklılaşmasının yönlendirilmesi için çeşitli büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin bir arada, dengede olması gerekmektedir [76]. Farklılaşma düzeyinin korunması için çekirdek ve genomda mevcut olan bazı genlerin ifadenmesi bazı genlerin ise baskılanması gerekmektedir. Bu durumu kontrol altında tutan etkenlere transkripsiyon faktörleri denir [77].



Şekil 3. Transkripsiyon faktörleri tüm kök hücrelerde eksprese edilir.

1.5.2.1. 1 Oct-4 (Octamer-binding transcription factor-4)

Kök hücrelerin en önemli transkripsiyon faktörüdür, iç hücre kitlesinden salınır. Oct-4 geninin ifadesi 4 hücreli evreye kadar düşük düzeyde tutulur, bu embriyoda gen aktivasyonu dönemine karşılık gelir. Yani embriyoda gen aktivasyonunun artması ile Oct-4 ifadesi de artar ve bu artış tıkkızlaşma evresine kadar sürer.

Oct-4 farklılaşmış hücrelerde ifade edilmez, Oct-4'un dozu ile embriyonik kök hücrenin kendini yenilemesi arasında doğrudan bir ilişki olduğu ortaya konmuştur. Deneysel olarak Oct-4 düzeyi %50'ye düşürüldüğüne embriyonik kök hücrenin trofoektoderm hücresine, buna karşın %150'ye çıkarıldığında embriyo dışı mezoderm ve endoderm hücrelerine farklılaştığı gözlemlenmiştir. Bunun için embriyonik kök hücrenin pluripotensi özelliğinin korunması için Oct-4 düzeyi optimum düzeyde olmak

zorundadır. Oct-4'un optimum düzeyde kalmasını, distal yükselticiler ve proksimal yükselticiler sağlar.

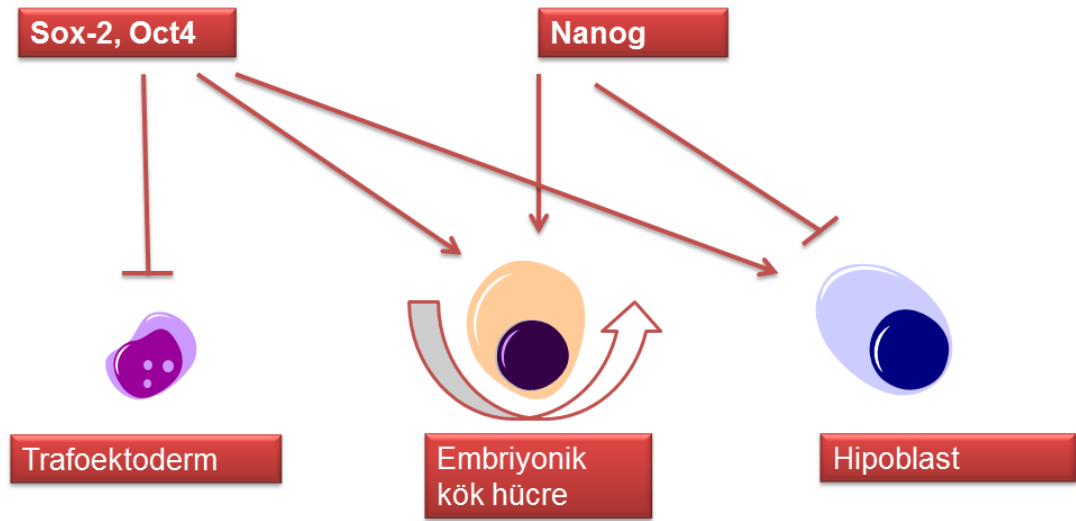
Oct-4 pluripotensi belirteci olmanın yanı sıra üç germ tabakasının oluşturan hücreler için "hücre kaderini belirleme belirteci" olarak da kabul edilir [78].

1.5.2.1.2. Sox-2 (SRY(sex determining region Y)-box 2)

Preimplantasyon evresindeki embriyoda, embriyonik kök hücre ve erişkin kök hücrede ifade edilir. Oct-4'ün kofaktörüdür. Sox-2'nin fonksiyonu Oct-4 ile aynıdır [79]. Sox-2'nin diğerlerinden farklı özelliği Oct-4'ün ifadesini belli bir düzeyde tutmasıdır. Yapılan çalışmalar bu ilişkinin Sox-2 tarafından kontrol edilen bir dizi transkripsiyon faktörleri kodlayarak kontrol ettiğini göstermiştir [80,81].

1.5.2.1.3. Nanog

İlk olarak tıkkızlaşma evresinde görülür, implantasyonda varlığını sürdürür ve implantasyondan hemen sonra ekspresyon düzeyi düşer. Vücut dışında kültürü yapılan pluripotent hücrelerde görülür. Embriyonik kök hücrede ifadesinin azalması hücrelerde farklılaşma eğilimini başlatır. Nanog'un yokluğunda embriyonik hücreler hipoblast hücrelerine farklılaşır. Nanog'un aşırı ifadenmesi durumunda pluripotensinin sürdürüldüğü gösterilmiştir. Embriyonik kök hücrelerin yenilenmesinde ve farklılaşmanın inhibisyonunda görev alır. Salınımı embriyonik kök hücre ve embriyonik germinal hücrelerde gözlenmiştir [82]. Nanog, germ hücrelerinin oluşumunda gerekli olan ve in vitro ortamda da farklılaşmanın engellenmesinde görev alan transkripsiyon faktörüdür. Yapılan bazı çalışmalar Nanog'un pluripotensinin koruma görevlisi olarak görev yaptığı öne sürmektedir [83].



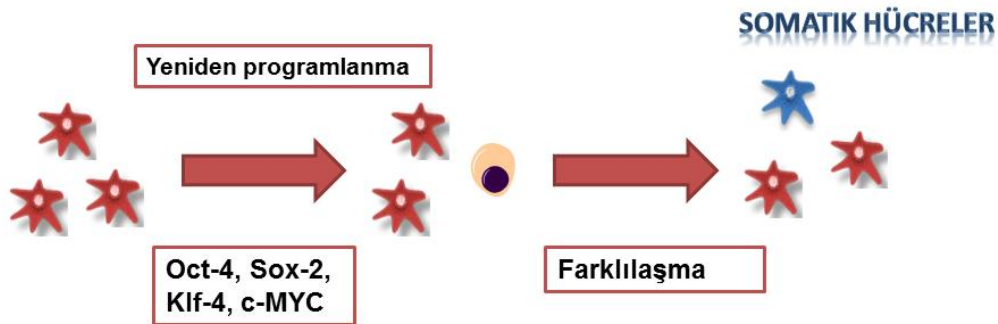
Şeki 4. Sox-2, Oct-4 ve Nanog etkinliği. Ucu sivri oklar uyarımı, ucu kapatılmış oklar engellemeyi gösterir. Oct-4'un ve Sox-2'nin belli bir düzeyde ifade edilmesi embriyonik kök hücrenin kendini yenilemesini pluripotensiyi korurken, trofoektroderm hücre yönünde farklılaşmalarını engeller. Nanog da benzer şekilde embriyonik kök hücrenin etkinliğinin sürmesini sağlarken, hipoblast yönünde farklılaşmayı engeller.

1.5.2.1.4. KLF-4 (Kruppel-Like Factor-4)

Somatik hücrelerin programlanmasında Oct-4 ve Sox-2 ile birlikte kullanılır. Üç pluripotensiyi faktörüyle benzer DNA bölgelerine bağlandığı bilinmektedir. Aynı zamanda yüksek seviyede ifade edildiğinde hücre bölünmesini baskılar ve hücrenin G1-S fazında kalmasını sağlar [84].

1.5.2.1.5. c-Myc (v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog)

Pluripotent özelliği sağlayan genlerden biridir [85]. Aynı zamanda hücre döngüsü, apoptozis, sinyal iletimi, transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzenleme mekanizmaları, kök hücre biyolojisi ve kanser moleküler biyolojisinde önemli olan faktörlerdendir [86].



Şekil 5. Transkripsiyon faktörlerinin ortak özelliği farklılaşmayı yönlendirmeleridir.

1.5.2.2. Germinal Kök Hücre

Bu hücreler farklılaşarak belli organı oluştururlar. Embriyonun germinal tabakasından köken alırlar [87].

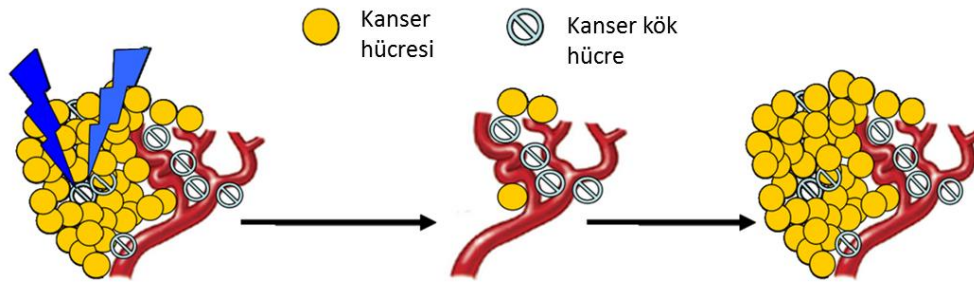
1.5.2.3. Somatik Kök Hücre

Köken aldığı organın spesifik hücresine dönüşebilen hücrelerdir. Buldukları bölgede hücrelerin hasar görmesi durumunda hasarın verdiği

zarara bağılı olarak uygun sinyallerle çoğalarak ve farklılaşarak hasarlı doku veya organın onarılmasını sağlarlar [87].

1.6. Kanser Kök Hücreleri

Son yıllarda tümörlerin kendine ait, dokulardaki hücrelerin kaynağına benzeyen kök hücrelere sahip olduğu görüşü oldukça ilgi çekmektedir. Kanser kök hücresi (KKH) adı verilen bu hücreler büyük oranda normal kök hücrelere benzemektedirler. Farklı olarak klasik kanser tedavilerine dirençli olup, tümör kitlesi oluşturma ve metastazdan sorumludur [88].



Şekil 6. KKH'in tümör oluşturma mekanizması [88].

KKH'in varlığı ilk kez 1983 yılında Mackillop tarafından öne sürülmüştür. Mackillop'a göre tümör içerisinde sadece küçük bir grup tümör oluşturma yetisine sahiptir ve tümör dokusu içerisindeki diğer hücreler KKH'den oluşmaktadır [89].

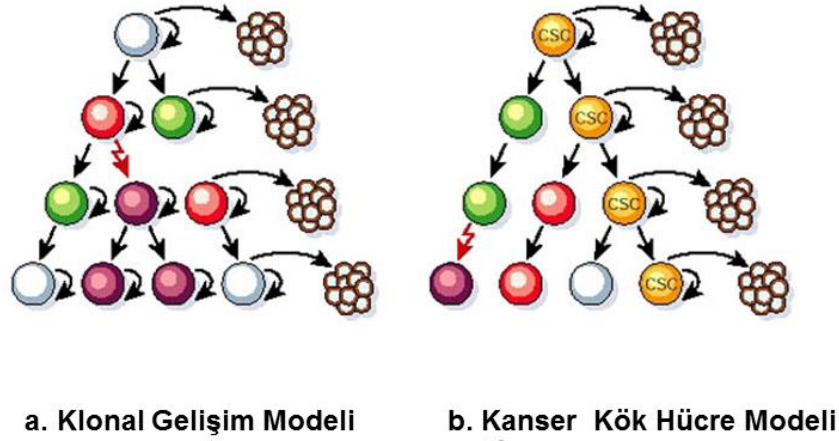
KKH ilk defa Bonnet ve Dick tarafından 1997 yılında akut myeloid lösemi (AML) de tanımlanmıştır [90]. Araştırmacılar AML'li hastadan lösemik hücreleri izole etmiş ve bunları hücre zarı antijenik yapılarına göre ayırmıştır. CD34+\CD38- yüzey markırlarına sahip az sayıdaki lösemik hücrelerin, bağışıklık sistemi çökertilmiş farelere transferiyle primer neoplazmaya benzer

tümörlerin oluştuğunu göstermiştir. Aynı tür fareye yüzey markırları CD34+\CD38- den farklı karaktere sahip lösemik hücreler transfer edildiğinde tümör oluşumu gözlenmemiştir. Daha sonraki yıllarda KKH'nin varlığı meme [91], beyin [92], prostat [93], yumurtalık [94] ve baş-boyun kanserlerini [95] kapsayan birçok solid tümör tipinde bildirilmiştir.

1.6.1. Kanser Kök Hücrelerinin Kökeni ve Oluşumu

KKH'nin oluşumu için üç model ortaya sürülmüştür.

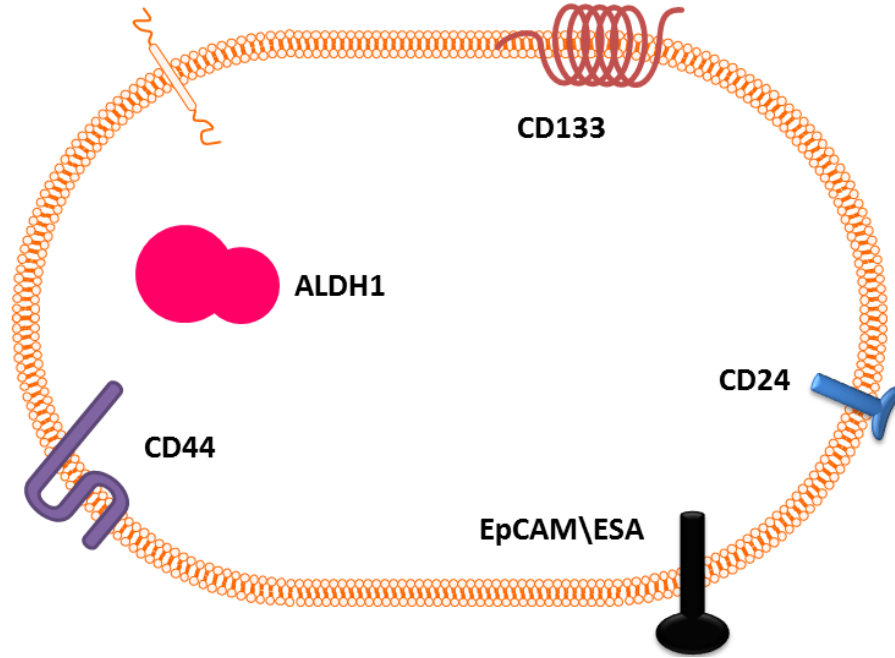
- a. Klonal gelişim modelinde epitelde yer alan normal bir grup hücre mutasyon geçirdikten sonra olağan üstü çoğalarak benign bir tümör oluşturur. Daha sonra ki mutasyonlar bu hücreler daha saldırgan kök hücrelerin ortaya çıkmasına sebep olur ve malign tümör kitlesi oluşur [96].
- b. Kanser kök hücre modelinde, hücrelerin hiyerarşisi vurgulanır. Hiyerarşi hücre kitlesinin içindeki heterojen yapıyı ifade eder. Tümördeki belli grup hücre (KKH hücreleri) tümör oluşturma kapasitesine sahip olurken, diğer hücre gruplarının böyle bir özelliği yoktur. Bu hücreler aynı zamanda metastazdan da sorumludur [97].
- c. KKH öncü hücrelerden kaynaklanmaktadır, bu varsayım fetüs ya da yetişkin dokularında bulunan kısmen farklılaşmış olan öncü hücrelerin kısmen kendini yenileme yetisine sahip olma özelliğinin bu hücrelerin KKH'nin kaynağı olabileceğini öne sürmüşlerdir [98].



Şekil 7. KKH oluşum modelleri [124].

1.6.2. Pankreas Kanseri Kanser Kök Hücresi ve Markırları

Pankreas kanserinde ilk defa 2007 yılında Li ve arkadaşları kanser kök hücrelerinin varlığını ispat etmişlerdir [99]. Fare xenograft modeli ile yaptıkları çalışmada, az sayıda olan CD44, CD24 ve epithelial-specific antigen (ESA) hücre yüzey markırlarını eksprese eden hücrelerin yüksek tümörjenik özelliğe sahip olduklarını ve kök hücre özelliği gösterdiklerini saptamışlardır. Aynı yıl Hermann ve arkadaşları KKH'nin CD133 eksprese ettiklerini bildirmişlerdir [100]. 2011 yılında Lee ve arkadaşları CD133 pozitif hücrelerin, CD44 ve CD24 pozitif hücelere benzer şekilde yüksek tümörjenik ve metastatik potansiyele sahip olduğunu göstermişlerdir [101].



Şekil 8. Pankreas kanseri kök hücresi yüzey markırları.

Farklı araştırma gruplarının yaptığı çalışmalarla pankreas kanseri kök hücrelerinin aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH-1) eksprese ettikleri ve ALDH-1'in kök hücre markırı olabileceği bildirilmiştir [102,103]; fakat 2010 yılında Deng ve arkadaşlarının normal pankreas dokusunun da yüksek miktarda ALDH-1 eksprese ettiklerini göstermeleriyle ALDH-1'in pankreas kanseri kök hücreleri için uygun bir markır olmadığı saptanmıştır [104]. Pankreas kanseri kök hücreleri, kanser hücrelerinin küçük bir kısmını (%1-%5) oluştururlar [105].

1.6.2.1. CD44 (Cluster of Differentiation 44)

İnsan CD44 geni, kromozomal lokus 11p13'te haritalandırılmıştır. 1980 yılının başlarında tanımlanan daha sonra 3. Uluslararası Lökosit Diferansiyasyon Antijenleri Çalıştayı sırasında adlandırılan ve glikoprotein moleküllerinin bir üyesi olan CD44, malign değişim sürecinde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere giden tipik bir hücre adezyon proteini [106,107]. CD44, CD44s ve CD44v olarak adlandırılan iki varyattan oluşmaktadır. Memeli hücrelerinin çoğu belirgin olarak CD44s eksprese eder, varyant izoformlar hematopoetik hücrelerde, periferik kandaki mononükleer hücrelerde ve reaktif lenf nodu hücrelerinde saptanabilir. Meme parankiminde CD44v izoformlarının hücreler arası farklılaşmanın bir belirleyicisi olabilecekleri, duktal epitelin hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşiminin sürdürülmesinden sorumlu oldukları düşünülmektedir.

Transforme bir hücrenin vücutta metastazı için adezyon kaybı, çevredeki ekstraselüler matrikse invazyon, vasküler sisteme giriş ve uzak organlara yapışma süreçlerinin gerçekleşmesi gerekir. CD44 gibi adezyon reseptörlerinin bu süreçte kritik bir rolü olduğu düşünülmektedir. CD44'ün fizyolojik rolü, hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonu yoluyla organ ve doku yapısını korumanın yanı sıra hücre motilitesinden, migrasyonundan, diferansiyasyonundan, hücre sinyalizasyonundan ve gen transkripsiyonundan sorumludur [106].

CD44'ün metastaz ile ilişkisi araştırmalar ilk olarak 1991'de başlamıştır [107]. Yüksek CD44 ekspresyonu düzeyinin, birçok karsinomada önemli bir metastaz belirleyicisi olduğu gösterilmiştir. Yüksek düzeyde CD44 eksprese eden kanserlerin düşük düzeyde CD44 eksprese eden kanserlere göre daha kötü bir seyir gösterdiği saptanmıştır [108].

Buna bağlı olarak yapılan çalışmalarda karaciğer ve kemik metastazı olan meme kanserli olgularda CD44v seviyesinin arttığı bulunmuştur [107].

CD44, ayrıca başlıca hyaluronan için reseptör olarak hareket eden bir tip I transmembran proteini ve "kıkırdak ilişkili protein ailesinin" bir üyesi olarak da tanımlanmıştır. Kondroitin sülfat, heparan sülfat, fibronektin,

serglisin ve osteopontin gibi diğer bazı ekstraselüler matriks ligandlarına da daha düşük bir afinite ile bağlanabilir. CD44'ün sitoplazmik tarafı, ezrin-moezin-radiksin ailesine mensup proteinler ve ankrin yoluyla hücre yapısı ile bağlantı kurar. Hyaluronana bağlanan CD44 pozitif hücrelerin tümör oluşturma potansiyeli, CD44'ün plazma membranına bağlı durumda olması veya ekstraselüler boşlukta olması ile ilişkilidir. Hyaluronana afinitedeki değişiklikler, hücre membranında eksprese edilen CD44 moleküllerinin sayısındaki değişiklikler ile ilişkilidir [106].

1.6.2.2. CD24 (Cluster of Differentiation 24)

CD24 geni kromozom 6q21'de lokalize, 27 aminoasitden oluşan, yoğun şekilde glikozile protein kor içeren ve fosfotidil inozitol bir ağ ile hücre membranına bağlanan bir hücre yüzey proteindir [109].

CD24 hücre proliferasyonunun düzenlenmesi, hücre-hücre etkileşiminde ve adezyon molekülü olarak görev yapar [109]. Aynı zamanda CD24, P-selektin eksprese eden aktive endotel hücrelere veya trombositlere monositlerin ve nötrofillerin adezyonunu destekleyerek ve CD24'ün fonksiyonel olarak, P-selektin yoluyla tümör hücrelerinin metastazında önemli rol oynadığı düşünülmektedir [109,110].

Selektinler, lökositlerin aktive olmuş endotel hücreleri ve aktif trombositler ile temasında önemli rol oynayan yüzey adezyon molekülleridir. P-selektin ise endotel hücreleri ve trombositler üzerinde eksprese edilmektedirler. P-selektin inflamasyon veya travma sonrasında aktiflenen endotel hücrelerinde eksprese edildiğinde, lökositlerin endotel üzerinde yuvarlanmasını, trombositler üzerinde eksprese edildiğinde tromboz alanına lökositlerin toplanmasını sağlar. P-selektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1) P-selektinin 15 nötrofil, monosit, lenfosit ve küçük miktarda trombositler üzerinde bulunan yüksek afiniteli reseptörüdür [111].

Birçok tümör hücre dizisi P-selektin yoluyla trombositlere bağlanabilmektedir. Tümör hücrelerinin kanda trombositlere bağlanma

yeteneğinin önemli olduğu düşünülmektedir, stabilize trombosit-tümör birlikteliği tümör hücrelerini yıkımdan koruyabilir, tümör ekstrasvazasyonunu ve doku penetrasyonunu destekler. Bu şekilde CD24'ün tümör hücrelerinin metastatik potansiyelini artırdığı düşünülmektedir.

CD24 ekspresyon varlığı ve bunun prognostik önemi ile ilgili olarak akciğer, safra kesesi, safra yolları, karaciger, gastrointestinal sistem, pankreas, prostat, böbrek over, meme ve nazofarenks karsinomları, koryokarsinom, gliom, medulloblastom, santral nörositom, andiferansiye nöroblastom ve B hücre kaynaklı neoplaziler gibi çok sayıda organ tümörlerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, yüksek CD24 ekspresyonunun kısa sağ kalım oranı ile ilişkili olduğu ve özellikle küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu, intrahepatik kolanjiokarsinom, kolorektal karsinom, prostat, over ve meme karsinomlarında önemli bir belirleyici olduğu gösterilmiştir. CD24 ile mide ve kolon karsinomlarında tümör komşuluğundaki normal mukozada zayıf ekspresyon izlenirken, safra kesesi ve over karsinomlarında normal mukozada ekspresyon görülmediği bildirilmiş; malign tümörlerde pozitif ekspresyon ve pozitiflik derecesinin, benign tümörlerden daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır [109,110,111].

1.6.2.3. EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule)

Hücre zarını bir kez geçen tip 1 homofilik hücre adezyon molekülüdür. Litvinov ve arkadaşları tarafından 1979 yılında kolon kanserinde tanımlanmıştır [112].

Farklı dokulara ait normal epitel ve karsinomlarda EpCAM ekspresyon düzeylerine bakılmış ve EpCAM'ın bazı dokularda bazal düzeyde eksprese olurken, karsinomlarda eksprese olmaya başladığı ve ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [113]. Yine Litvinov ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada EpCAM'ın adheziv olmayan hücrelerde eksprese olarak, bu hücrelerin adheziv bir yapı kazanmasına ve agregatlar oluşturmasına yardımcı olduğu, EpCAM'ın özellikle hücrede E-kadherinin bir

antagonisti gibi davrandığı ortaya konmuştur. Bunun sonucunda EpCAM eksprese eden hücrelerde adhezyonun azaldığı ve metastazın ilk aşamalarından olan motil hücreler ortaya çıktığı gösterilmiştir. [114,115].

EpCAM; intraselüler domaininde bir adet NPXY internalization motif ve birkaç α -aktinin bağlanma bölgesi içerir. Hücre ve ekstraselüler matriks arasında bağlantıyı intraselüler kısmındaki α -aktin bağlanma bölgeleri aracılığıyla yaptığı gösterilmiştir. EpCAM ekstraselüler domaininin özellikle EGF-like domainde birçok farklı glikozillenme bölgesi içerdiği ortaya konmuştur. Bu glikozillenme bölgeleri EpCAM'in adhezif özelliğini etkiler ve bunun sonucu olarak hücre daha motil bir hal kazanabilir. Bu bulgular özellikle EpCAM'in renal hücreli karsinomlarda pozitif bir prognostik belirteç kabul edilirken, diğer birçok karsinom türünde kötü prognostik faktör kabul edilmesi fenomeninide açıklar [112].

2. MATERYAL ve METODLAR

2.1. Hücre Kültürü

Çalışmada AsPC-1 ve Capan-2 pankreas kanseri hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları ATCC'den temin edildi.

2.1.1. Kullanılan Hücre Hatlarının Genel Özellikleri

Bu hücre hatlarının özellikleri şöyledir. AsPC-1, pankreas başı kanseridir ve birçok karın içi organa metastaz vardır. Capan-2, primer tümör pankreas başında yer alır ve ampulla distalinde duodenal duvara infiltre olmuştur, metastazı yoktur.

Tablo 2. Pankreas kanseri hücre hatları özellikleri [119].

HÜCRE HATTI	YAŞ	KÖKEN	CİNSİYET	METAZTAS	POLİFERASYON	FARKLIŞMA	KRASa	TP53	CDKN2A/16	SMAD4/DPC4
AsPC-1	62	Ascites	KADIN	VAR	38-40 saat	zayıf	12 Asp,	Intron 4 Δ200 bp splice site, HD exon5	WT, Δ2 bp, HD,	100Thr, WT, HD,
Capan-2	56	Primer tümör	ERKEK	YOK	96 saat	iyi	12 Val	WT, Intron 4 Δ200 bp splice site	WT,6 bp ins, 7 bp ins	WT

2.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Medyumların Hazırlanışı

AsPC-1 hücre hattı için, 500 mL RPMI1640 (SH30027.01) medyumu içerisine, Capan-2 hücre hattı için ise McCoy's 5a (SH30200.01) besiyeri içine aşağıdaki bileşenler eklenerek kullanıldı:

- 50 mL FBS (HY-CH30160.02)
 - 5 mL penisilin/streptomysin (HY-SV30010)
 - 4 mL L-Glutamin (Wisent-609-065-ZL)
 - 0,5 mL Plasmocin (ant-mpt-Invivogen)
- olacak şekilde medyum hazırlandı. Medyum +4°C'de muhafaza edildi.

2.1.3. Stoktan Hücre Ekimi

Azot tankında bulunan hücreler, 37°C'de benmaride 2 dk eritildi. Eritilen hücreler 15 ml falkon içerisine alındı. Besiyeri ile karıştırılan hücreler 3 dk 1100 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı, pellet (hücre) besiyerinde çözüldü ve hücre yoğunluğuna uygun flaska ekilip, 37°C'de %5 CO₂'lik inkübatörde kültüre edildi.

2.1.4. Hücre Pasajlanması

Kültüre edilen hücreler %70-80 doluluk oranına ulaştığında, hücreler daha büyük yüzey alanına sahip flaslara alındı. Pasajlama işlemi,

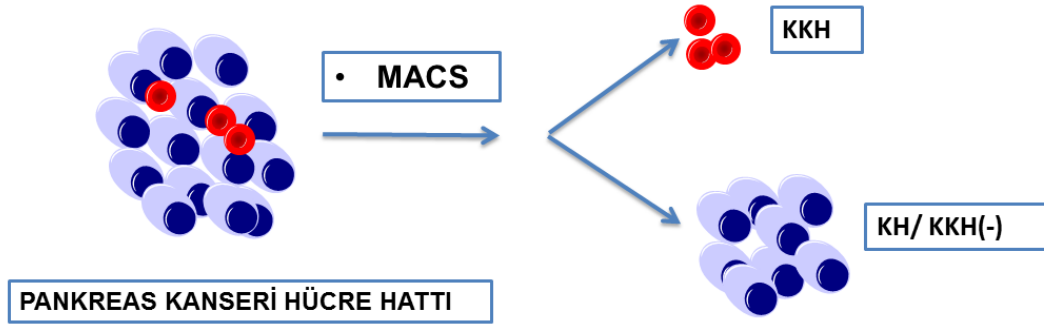
- ❖ Flaskdaki medyum uzaklaştırıldı.
- ❖ Hücreler PBS (Phosphate Buffered Saline) (SH30256.01) ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı.
- ❖ Flask yüzeyini kaplayacak miktarda Trypsin-EDTA (%0.25) (HY-SV30031.01) ile muamele edildi. Tripsinin aktif hale gelebilmesi için flask inkübatörde 5 dk inkübe edildi.
- ❖ Flask yüzeyinden ayrılan hücrelerin üzerine besiyeri eklenerek hücreler toplandı ve falkon tüpe alındı.
- ❖ 3 dk 1100 rpm'de santrifüj edildi.
- ❖ Tripsin içeren süpernatant atıldı.

- ❖ Pellet (hücre) besiyerinde homojen olacak şekilde çözüldü ve hücre sayısına uygun bir flaska ekilip, 37°C'de %5 CO₂'lik inkübatörde kültüre edildi.

2.2. Kök Hücre İzolasyonu

Çalışmada CD44, CD24 ve ESA yüzey markırları kullanılarak AsPC-1 ve Capan-2 hücre hatlarından Kanser Kök Hücre (KKH) ve Kanser Hücre (KH) izole edildi.

KKH izolasyonu, flow sitometri yöntemi ile yüzey markırları belirlenen hücre hatlarından MACS yöntemi ile izole edildi.



Şekil 9. KKH ve KH grubu

2.2.1. Flow Sitometri

Aşağıdaki boyama protokolüne göre hücreler boyandı ve CD24, CD44 ve ESA yüzey markırlarının ekspresyonları belirlendi.

FACS analizleri 'Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesinde' bulunan FACSariaIII (BD) cihazı kullanılarak cihazdan sorumlu teknik personel ile birlikte yapıldı.

Flow Sitometri Boyama Protokolü;

- 1- 75 flaskta kültüre edilen hücreler 4 mL Tripsin-EDTA ile kaldırıldı.
- 2- 8 mL medyum eklendi, 1100 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- 3- Süpernatant döküldü ve hücreler 5 mL medyumda çözüldü ve hücre sayısı belirlendi.
- 4- 1100 rpm'de 3 dk santrifüj edildi ve süpernatant döküldü.
- 5- Hücreler 5 mL PBS ile pipetaj yapılarak çözüldü ve 1100 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldı.
- 6- Süpernatant döküldü hücreler 5 mL PBS'te çözüldü ve $3 \cdot 10^6$ /mL olacak şekilde 10 mL'lik tüplere bölündü.
- 7- Bölünen hücreler 1 mL PBS ile yıkandı ve 1100 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- 8- Süpernatant döküldü. Süpernatantın tamamen uzaklaşması için hücreler peçete üzerinde 2 sn bekletildi ve hücreler 3 sn vortekslendi.
- 9- Kullanılan antikolar (anti-human CD44-PE 0,5 µl; anti-human CD24-BV421 5 µl; anti-human ESA-APC 5 µl) hücrelerin üzerine eklendi, 3 sn vortekslendi ve 30 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

NOT: Bu aşamada boyamadığımız hücelere (kontrol olarak kullanılan hücreler) antikor eklenmedi.

- 10-30 dk sonunda hücrelerin üzerine 1 mL PBS eklendi, 3 sn vortekslendi ve 1100 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldı.
- 11-Süpernatant döküldü hücreler 3 sn vortekslendi. 1 mL PBS eklendi ve 1100 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldı.
- 12-Süpernatant döküldü. Kontrol olarak kullanılacak hücre 300 µl'de, antikor eklenen hücreler ise 500 µl'de çözümlü vortekslendi ve FACSArialIII (BD) cihazında okutuldu.

2.2.2. MACS (Magnetic-activated cell sorting)

- ❖ Örnek sayısınıca 1,5 mL'lik eppendorf tüp çıkarıldı.
- ❖ Goat anti-mouse IgG magnetic beads +4°C'den alındı, spin down yapıldı, vortekslendi.
- ❖ 1000 µl soğuk 1XPBS içine 1 µl beads eklendi ve +4°C'de bulunan shakerda hızlı bir şekilde 2 dk inkübe edildi.
- ❖ 1,5 mL'lik eppendorf tüp alındı manyetik racka (life tec. DynaMag™-2 cat no:13221D) yerleştirildi ve 2 dk inkübe edildi.



Şekil 10. DynaMag

- ❖ PBS çekildi (beadslere zarar verilmeden). Eppendorf tüp racktan alındı üzerine 1000 µl temiz soğuk 1XPBS eklendi ve pipetaj yapıldı (yavaş bir şekilde beadslerin eppendorf tüpün duvarından ayrıldığını görülene kadar).
- ❖ Bu işlem 3 defa tekrarlandı (yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmış oldu).
 - En son yıkama işleminde rackta 2 dk bekleme süresinden sonra 1,5 mL'lik eppendorf tüp racktan çıkarıldı ve beadsler 20

- µl soğuk 1XPBS ile çözüldü ve 5 µl CD24 antikor eklendi, +4°C'de 90 dk shakerda bekletildi.
- 90 dklık inkübasyon sırasında kullanılacak olan hücreler kaldırıldı.
 - ❖ Inkübasyon sonunda örnek 2 dk manyetik rackta bekletildi süpernatant atıldı.
 - ❖ 1000 µl temiz soğuk 1XPBS eklendi ve pipetaj yapıldı (yavaş bir şekilde beadslerin eppendorf tüpün duvarından ayrıldığını görülene kadar).
 - ❖ +4°C'de shakerda 2 dk inkübe edildi (yavaş ayarda), süpernatant atıldı
 - ❖ Eppendorf tüp racktan alındı üzerine 1000 µl temiz soğuk 1XPBS eklendi ve pipetaj yapıldı.
 - ❖ Yıkama işlemi toplamda 4 kez tekrarlandı.
 - ❖ Inkübasyon sonunda örnek 2 dk manyetik rackta bekletildi, süpernatant atıldıktan sonra racktan çıkarıldı ve beads+antikor karışımı 100 µl 1XPBS te çözüldü.
 - ❖ Yıkama sonrasında hücreler 900 µl PBS te çözüldü ve non-spesifik bağlanmaları engellemek için 50 µl FBS eklendi.
 - ❖ 30 dk shakerda +4°C'de bekletildi.
 - ❖ Inkübasyon sonrasında eppendorf manyetik rackta 10 dk bekletildi.
 - ❖ 10 dk sonunda manyetik rackta tutunan hücreler pozitif hücrelerdir. Tutunmayan hücreler ise negatif ya da beads bağlanmamış hücrelerdir.
 - ❖ Negatif ya da beads bağlanmamış hücreler, bağlanmış (pozitif) hücrelere zarar verilmeden çekildi.
 - ❖ Eppendorf tüp manyetik racktan alındı hücreler 500 µl kök hücre medyumu ile yavaşça pipetaj yapılarak çözüldü.
 - ❖ Hücreler 4 mL kanserli kök hücre medyumu ile 25'lik flaska ekildi.

2.2.3. %2'lik agarlı flask hazırlanması

- ✓ 100 mL distile suya 2 gr agarose (Lonza SeaKem ® LE Agorase Catalog no: 50005) ve 0.9 gr NaCl (Sigma Cat no: 31434-1KG-R) eklendi.
 - ✓ Sıvı otoklavda 121°C'de 20 dk otoklavlandı.
 - ✓ 40-70°C'de iken Greiner Bio-one 690175 katalog numaralı 25'lik flaskın içine 8 mL konuldu. Flask kabin içinde düz bir yere konularak agarın kurumması beklendi. Bu işlem Class II Biyogüvenlik kabini içinde yapıldı.
 - ✓ Kuruyan agarlı flasklar alimünyum folyoya sarılarak 4°C'de saklandı.
- NOT: Agarlı flasklar kullanılmadan önce 5 mL 1XPBS ile yıkandı.

2.2.3.1. KKH Medyumu Hazırlanması

- ❖ KKH medyumu kullanılacağı kadar taze hazırlandı.
- ❖ 50 mL medyum için;
- ❖ 50 mL medyum (hücrenin kültüre edildiği medyum fakat FBS, Penisilin, PI, L-glutamin eklenmemiş)
- ❖ AsPC-1 KKH medyumu RPMI1640
- ❖ Capan-2 KKH medyumu McCoy's 5a
- ❖ 20 µl EGF (ab179628)
- ❖ 50 µl FGF (ab9596)
- ❖ 1 mL B27 (17504-044)
- ❖ 500 µl N2 (17502-048)
- ❖ 150 µL Penicillin-Streptomycin (HY-SV30010)
- ❖ Tüm maddeler eklendikten sonra medyum 0,22 µm'lik enjektör filtresinden geçirildi ve 4°C'de saklandı.

2.3. KKH Validasyonu

2.3.1. Küre Oluşum Analizi

KKH'leri %2 agar içeren katı yüzeyde KKH medyumunu ile kültüre edildi ve küre oluşumu incelendi. KKH'ler ekildikten sonraki her 2 günde taze KKH medyumunu eklendi. Hücre morfolojisindeki değişimler 2-4 hafta boyunca gözlemlendi. Küre oluşumu hücre hattına ve hücre yoğunluğuna göre değişmekle birlikte genellikle 2.günde hücrelerin şekilleri değişip ortalama 5 gün sonra küreler oluşmaya başladı.

2.3.2. Hücreden Total RNA izolasyonu

AsPC-1 ve Capan-2 hücre hatlarından izole edilen KKH ve KH'lerden Fenol-Kloroform yöntemi ile Total RNA izolasyonu yapıldı.

- ❖ Hücreler 6 well plate ekildi ve %70 doluluk oranına ulaşıncaya kadar kültüre edildi.
- ❖ Hücreler 2 defa 1 mL 1XPBS ile yıkandı.
- ❖ 1000 µl Trizol isolation reagent eklendi. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ❖ Hücreler pipet ucu yardımıyla kazınarak 1,5 mL'lik eppendorf tüpe alındı.
- ❖ Hücrelerin homojenize olması için yaklaşık 2 dk karıştırıldı.
- ❖ Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
- ❖ 200 µl kloroform eklendi ve renk değişene kadar 2-3 dk sallandı.
- ❖ 12.000 rpm'de 15 dk 4°C'de santrifüj yapıldı.
- ❖ Üstteki şeffaf kısım yeni 1,5 mL'lik eppendorf tüpe aktarıldı.
- ❖ 500 µl 2-propanol eklendi. Sallanarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- ❖ 12.000 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj yapıldı.

- ❖ Süpernatant RNA ya zarar vermeden dikkatlice atıldı. %75'lik etanolden 1000 µl eklendi ve hafifçe sallandı.
- ❖ 12.000 rpm'de 5 dk 4°C'de santrifüj yapıldı.
- ❖ Süpernatant atıldı ve alkolün uzaklaşması için 10-15 dk oda sıcaklığında kapakları açık olarak bekletildi.
- ❖ 40 µl DEPC-treated su eklenerek RNA pipetajla çözüldü ve Thermo Nanodrop 2000c' de ölçüldü.
- ❖ İzole edilen RNA'lar -85°C'de saklandı.

2.3.2.1. cDNA sentezi

cDNA sentezi için Thermo-Scientific Reveraid First Strand cDNA sentez kiti kullanıldı.

- ❖ İzole edilen Total RNA'lar 1 µg'a eşitlendi.
- ❖ Eşitleme işleminden sonra örnek sayısı kadar 1,5 mL'lik eppendorf tüp çıkarıldı.
- ❖ Her tüpe 1 µl oligo(dT) primer konuldu ve her bir örnek için hesaplanan miktarda RNA sırasıyla eppendorf tüpe konuldu.
- ❖ Her bir örnek için hesaplanan miktarda DEPC-treated su sırasıyla eppendorf tüplere konuldu (örneğin RNA 2 µl ise 11 µl'ye tamamlayacak şekilde yani 9 µl DEPC-treated su tüplere konuldu).
- ❖ Ayrı bir temiz eppendorf tüpün içine aşağıdaki oranlarda mix hazırlandı.

Tablo 3. cDNA sentezi için kullanılan kit ve miktarları

5xReaction Buffer	4 µl
Ribolock RNase İnhibitor	1 µl
10mM DNTP mix	2 µl
RevertAid Reverse Transcriptase	1 µl

- ❖ Hazırlanan mix örnek tüplerinin üstüne 8 µl olacak şekilde dağıtıldı ve toplam hacim 20 µl oldu.
- ❖ 42°C'de 60 dk ve 70°C'de 5 dk inkübasyondan sonra spin attırıldı.
- ❖ cDNA'lar -20°C'de saklandı.

2.3.3. Primer Tasarımı

NCBI, Ensembl ve PrimerQuest veri tabanlarından yararlanılarak KLF-4, OCT-4, SOX-2, CD24 ve β-aktin genlerine spesifik primer dizaynı yapıldı.

KLF-4, OCT-4, SOX-2, CD24 ve β-aktin genlerine spesifik primer dizileri;

Tablo 4. Çalışmada kullanılan primeler

Gen adı	Forward primer	Reverse primer	PCR ürün büyüklüğü (bp)
SOX-2	5'AACCCCAAGATGCA CAACTC3'	5'CGGGGCCGGTATTTA TAATC 3'	152
OCT-4	5'CAGTGCCCGAAACC CACAC3'	5'GGAGACCCAGCAGC CTCAA 3'	161
KLF-4	5'AAACCAAAGAGGGG AAGACG 3'	5'ATGTGTAAGGCGAGG TGGTC 3'	287
CD24	5'ACATGGGCAGAGCA ATGGTG 3'	5'GAGACCACGAAGAGA CTGGC 3'	217
β-aktin	5'TTCCTGGGCATGGA GTCCT 3'	5'AGGAGGAGCAATGAT CTTGAC 3'	204

2.3.3.1. Gradient PCR

Primerlerin bağlanma ısısını belirlemek için gradient PCR yapıldı. Tm sıcaklığı $2(A+T)+4(G+C)$ şeklinde hesaplandı ve bu sıcaklığın 2 şer derece artırılması ve azaltılması ile PCR kuruldu. Her bir örnek için aşağıda belirten oranlarda mix hazırlandı ve belirlenen sıcaklıklarda Techne 5000 cihazı kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 5. Gradient PCR mix oranları

NH₄ buffer	x2,5 µl
Forward primer (20pmol)	x0,5 µl
Reverse primer (20 pmol)	x0,5 µl
dNTP	x0,5 µl
MgCl₂	x2,5 µl
Taq Polimeraz	x0,2 µl
Nuclease free water	x16,3 µl
cDNA	2 µl

2.3.3.2. Agaroz jel elektroforezi

Gradient PCR işleminin sonrasında primerlerin hedef bölgeyi spesifik bir şekilde çoğaltıp çoğaltmadığını kontrol etmek için PCR ürünleri agaroz jele yüklendi.

Agaroz jel şu şekilde hazırlandı:

- ❖ 100 mL TBE buffer'ın içine 2 gr agaroz konuldu.
- ❖ Mikrodalga fırında sıvı şeffaf bir görünüm kazanana kadar ısıtıldı, biraz soğuması için beklenildi.
- ❖ DNA için interkalasyon ajanı olan EtBr'dan 3,16 µl eklendi.
- ❖ Agaroz jel, jel tabaklarına döküldü ve kurumaya bırakıldı.

Kuruma işleminden sonra örnekler loading dye ile birlikte kuyucuklara yüklendi (5 µl örnek:1 µl loading dye). 100 voltta 30 dk yürütme işleminden sonra görüntüleme işlemi yapıldı. DNA bölgeleri UV ışığının altında kesilerek eppendorf tüpe alındı ve jel ekstraksiyonu basamağına geçildi.

2.3.3.3. Jel ekstraksiyonu

5 gen için yapılan agaroz jel elektroforez işlemi sonrasında;

- ❖ DNA jel ekstraksiyonu ucu ile dikkatli bir şekilde jelden geri alındı.
- ❖ Kesilen DNA'lar 1,5 mL'lik eppendorf tüpüne alındı ve üzerine 40 µl Binding buffer eklendi.
- ❖ Tüpler 55°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sırasında 2-3 dakikada tüpler hafifçe vortekslendi.
- ❖ Tüplere 40 µl isopropanol eklendi ve vortekslendikten sonra spin atırıldı.
- ❖ Tüm içerik spin kolona aktarıldı ve 13.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı.
- ❖ Spin kolona 40 µl Binding buffer eklendi ve 13.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı.
- ❖ Spin kolona 700 µl wash buffer eklendi. 13.000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı.
- ❖ Alkolün tamamen uzaklaşması için toplama tüpü boş olacak şekilde 13.000 g'de 1 dk boş olarak santrifüj edildi.
- ❖ Spin kolon 1,5 mL'lik yeni ve temiz bir eppendorf tüpe aktarıldı.
- ❖ Spin kolonun merkezine doğru 30 µl elution buffer eklendi ve 13.000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- ❖ Nanodrop'ta ölçüldü. qRT-PCR için standartların hazırlanmasında kullanıldı.

2.3.4. qRT-PCR

Housekeeping gen olarak β -aktin kullanıldı ve KLF-4, OCT-4, SOX-2 ve CD24 genlerinin ekspresyon seviyeleri kantitatif olarak tespit edildi.

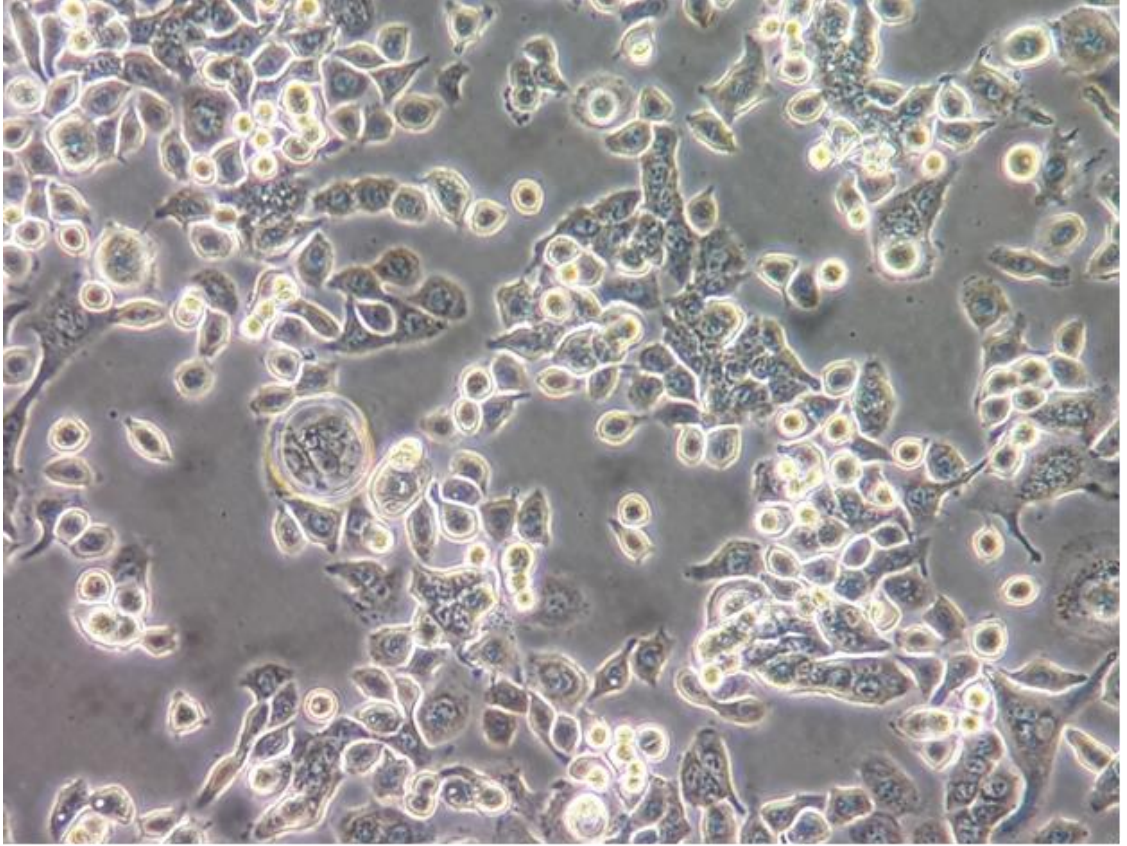
Tablo 6. qRT-PCR mix oranları

SYBR Green mix	x10 μ l
Forward primer (20pmol)	x0,5 μ l
Reverse primer (20 pmol)	x0,5 μ l
DEPC-treated water	x7 μ l
cDNA	2 μ l

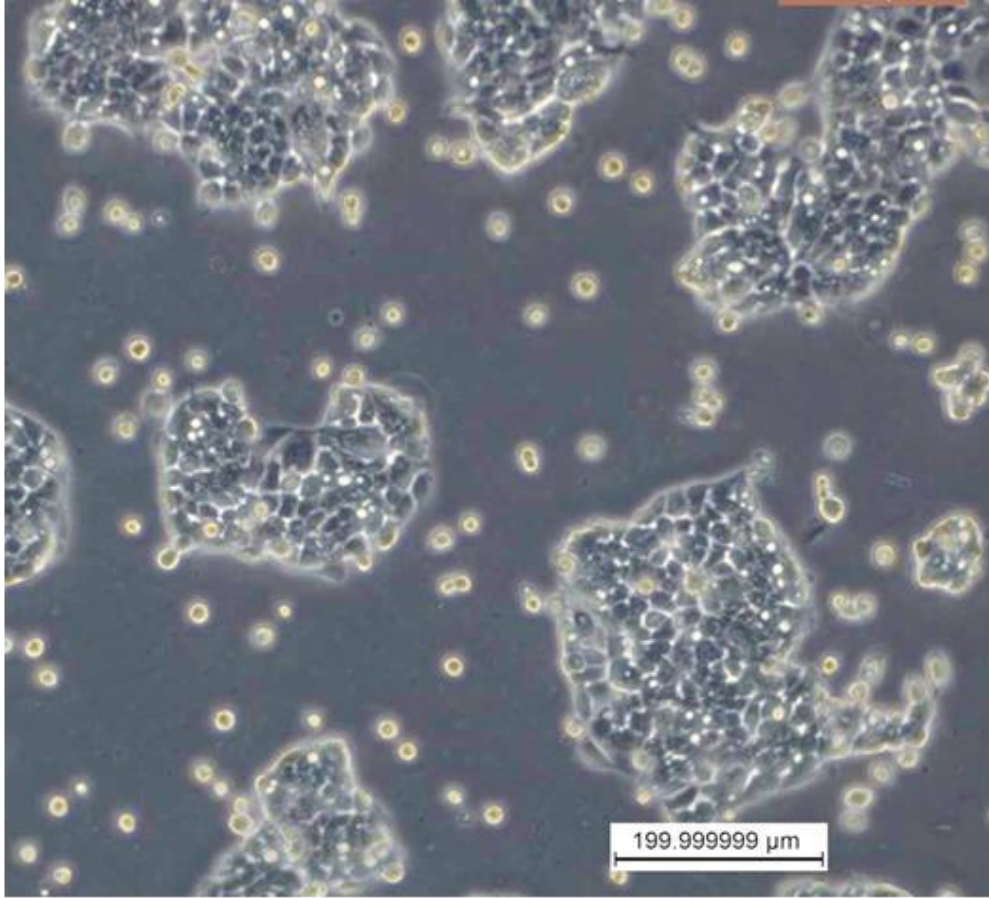
3. BULGULAR

3.1. Hücre Kültürü

AsPC-1 ve Capan-2 hücre hatlarının kltrdeki grnmleri.



ekil 11. AsPC-1 hücre hattı

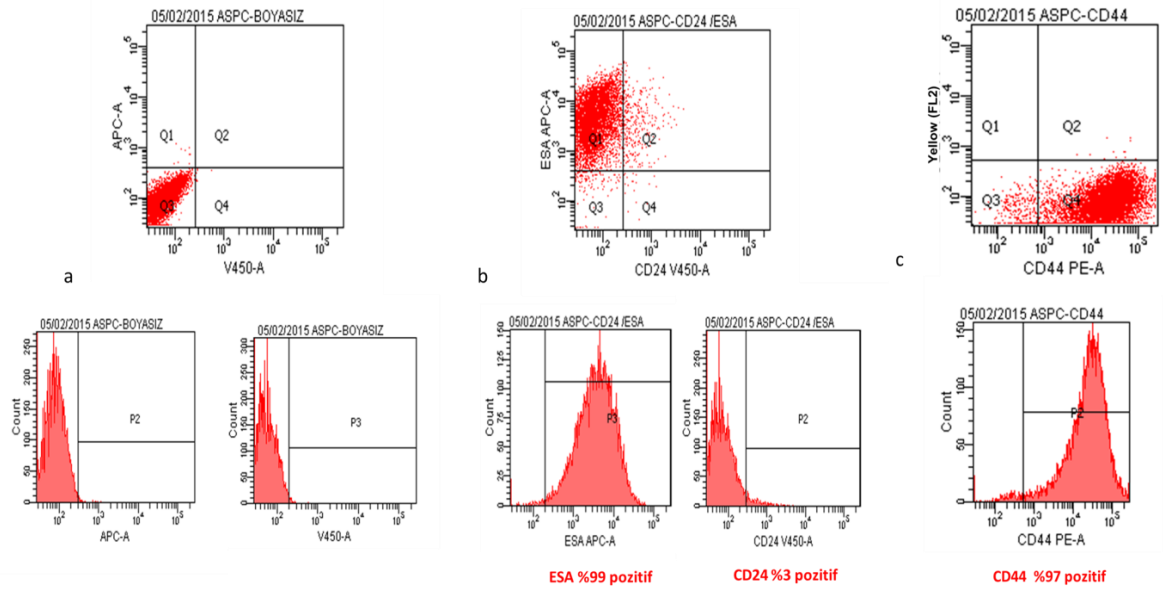


Şekil 12. Capan-2 hücre hattı

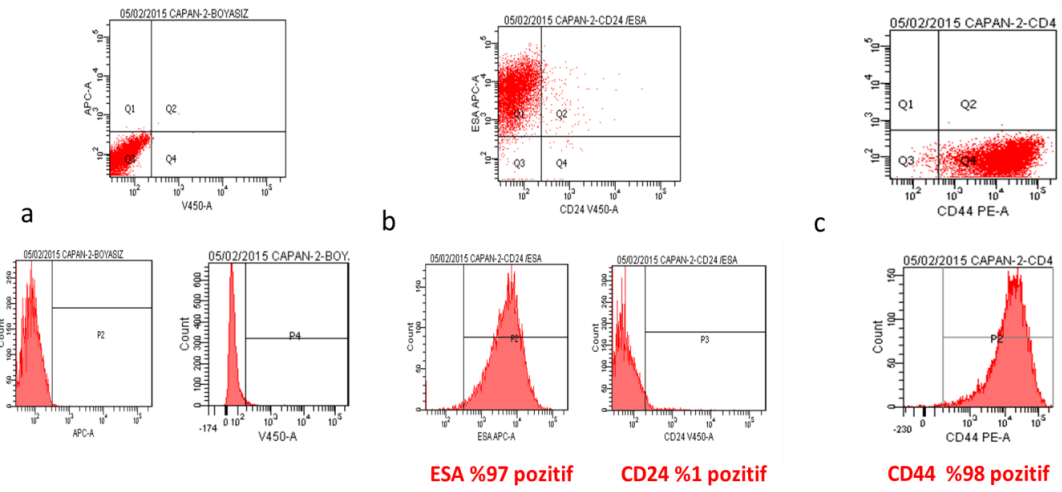
3.2. Kök Hücre İzolasyonu

3.2.1. Flow Sitometri

AsPC-1 ve Capan-2 hücre hatlarında CD24, CD44 ve ESA yüzey markırlarının yüzdeleri belirlendi.



Şekil 13. ASPC-1 hücre hattının flow sitometri analizi. a.antikor eklenmemiş, boyanmamış negatif hücreler, b.ESA ve CD24 antikoruna ile yapılan boyama, c.CD44 antikoruna ile yapılan boyama



Şekil 14. Capan-2 hücre hattının flow sitometri analizi. a.antikor eklenmemiş, boyanmamış negatif hücreler, b.ESA ve CD24 antikorunu ile yapılan boyama, c.CD44 antikorunu ile yapılan boyama

Tablo 7. Flow sitometri analiz sonucu, AsPC-1 ve Capan-2 hücre hatlarının yüzey markır pozitiflikleri

HÜCRE HATTI	YÜZEY MARKIRLARI POZİTİFLİK(%)		
	ESA	CD44	CD24
AsPC-1	99	97	3
Capan-2	97	98	1

3.1.2. MACS (Magnetic-activated cell sorting)

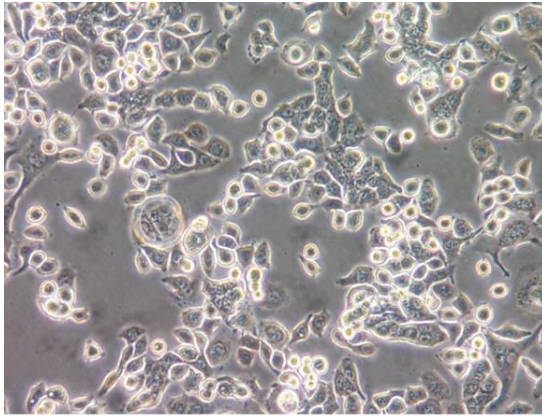
Kültüre edilen AsPC-1 ve Capan-2 hücre hatlarından Magnetic Beads yöntemi ile KKH ve KH izolasyonu yapıldı.

3.2. İzole Edilen KKH'ların Validasyonu

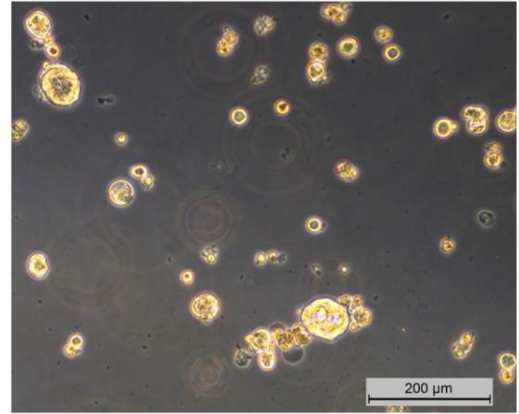
3.2.1. Küre Oluşum Deneyi

MACS yöntemi ile izole edilen KKH'lar küre oluşum deneyi için, KKH medyumuna ile agarlı flaska ekildi.

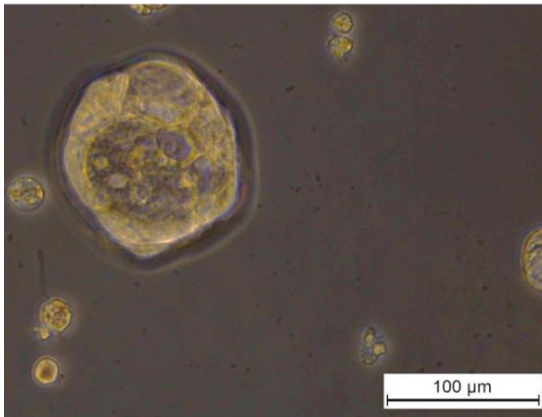
AsPC-1 KKH'larının 7 günde küre oluşturduğu gözlemlenirken, Capan-2 KKH'larının 4 günde küre oluşturduğu gözlemlendi.



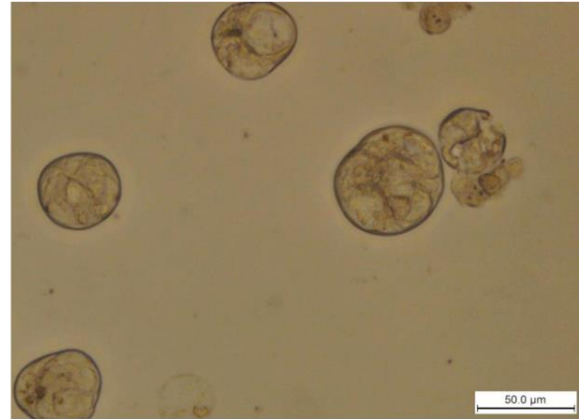
AsPC-1 hücre hattı (10x)



AsPC-1 KKH küre oluşumu 7.gün (10x)

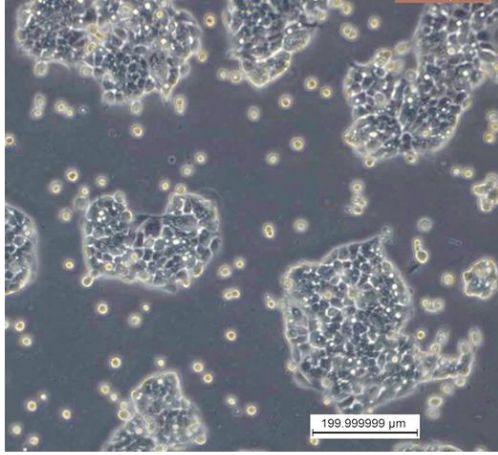


AsPC-1 KKH küre oluşumu 7.gün (20x)

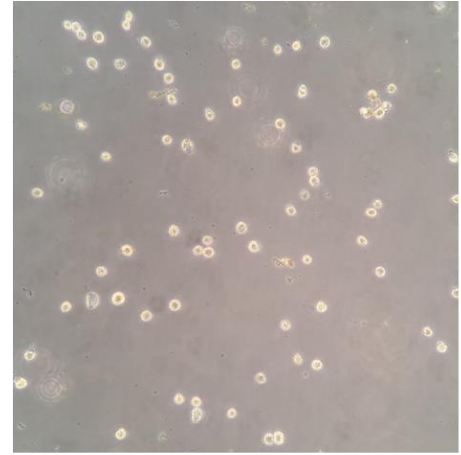


AsPC-1 KKH küre oluşumu 7.gün (40x)

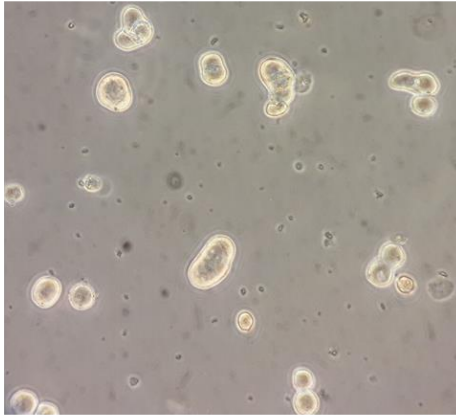
Şekil 15. AsPC-1 hücre hattının küre oluşum deneyi



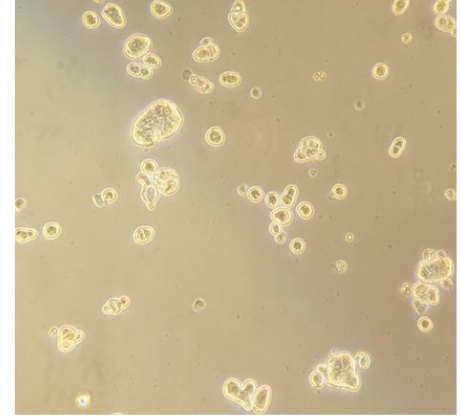
Capan-2 hücre hattı (10x)



Capan-2 KKH küre oluşumu 1.gün (10x)



Capan-2 KKH küre oluşumu 2.gün (20x)



Capan-2 KKH küre oluşumu 4.gün (20x)

Şekil 16. Capan-2 hücre hattının küre oluşum deneyi

3.2.2. KKH ve KH' den RNA İzolasyonu

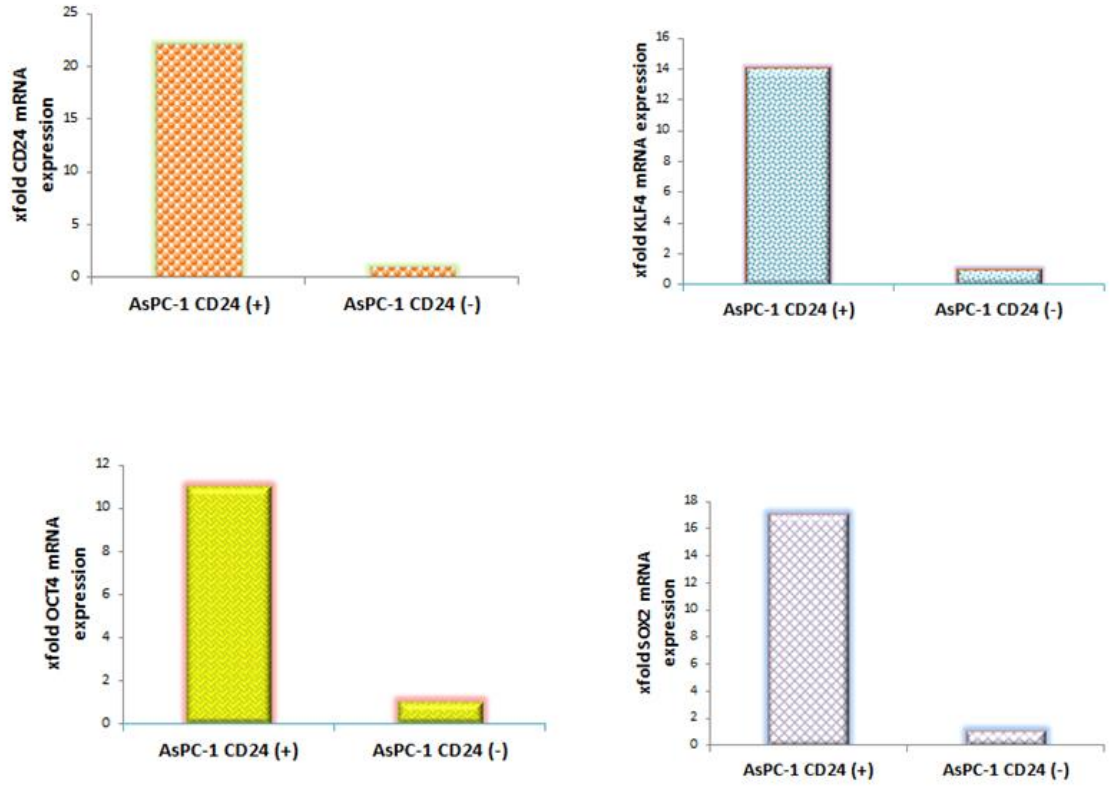
Tablo 8. KKH ve KH' lerinin RNA izolasyon sonuçları

HÜCRE HATTI ADI	NÜKLEİK ASİT (RNA) DEĞERİ (ng/µl)	OD 260\280
AsPC-1 KKH (+)	1087	1,99
AsPC-1 KKH (-)	1015,1	1,99
Capan-2 KKH (+)	760,3	1,96
Capan-2 KKH (-)	795,6	1,96

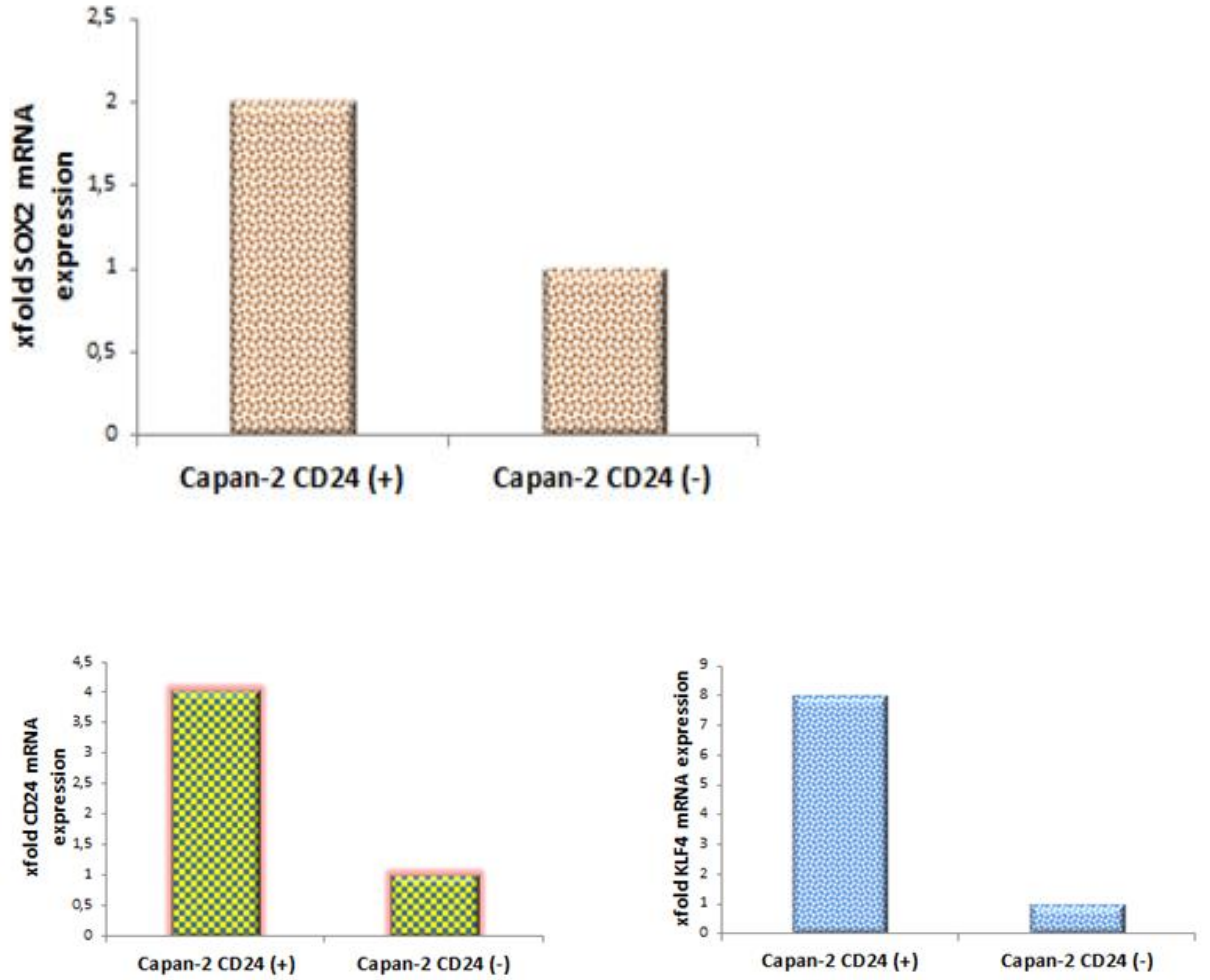
3.2.3. qRT-PCR

KLF-4, OCT-4, SOX-2 ve CD24 genlerinin ekspresyon seviyeleri kantitatif olarak tespit edildi.

MACS yöntemi ile izole edilen KKH ve KH grubu arasındaki CD24 ve KKH grubunda artmasını beklediğimiz KLF-4, SOX-2, ve OCT-4 ekspresyonlarına bakıldı.



Şekil 17. AsPC-1 hücre hattında KLF-4, OCT-4, SOX-2 ve CD24 genlerinin ekspresyon seviyeleri



Şekil 18. Capan-2 hücre hattında OCT-4, SOX-2 ve CD24 genlerinin ekspresyon seviyeleri

4. TARTIŞMA

Kanser multifaktöryel bir hastalık olup, bakteriler, virüsler, radyasyon kalıtım, çevresel faktörler, beslenme alışkanlığı ve kimyasallar gibi birçok faktör kanser oluşumundan sorumludur [3]. Kardiyovasküler sisteme ait hastalıklardan sonra ölümlerin en sık ikinci nedenidir [4]. Oluştığı bölgeye göre isimlendirilmesi ve sınıflandırılması sonucu 80 farklı kanser türü olduğu belirlenmiştir [5].

Pankreas kanseri, ileri yaşlarda daha sık ortaya çıkan, agresif seyirli, ölümcül malign kanserlerden biridir [10]. Pankreas kanseri dünya çapında malignite kanserler arasında 12. sırada yer almaktadır [11], 5 yıllık sağ kalım oranı %5-%7 arasındadır [14]. Şişmanlık, yaş, alkol kullanımı, bireyde pankreatit bulunması, genetik faktörler, diabetes mellitus, sigara içimi önemli risk faktörleridir. Özellikle sigara içimi çok önemli bir faktör olup sigara içenlerde içmeyenlere göre 2,2 kat daha fazla pankreas kanseri riski vardır [1,15].

Tıpta yaşanan gelişmelere bağlı olarak pankreas kanseri için etkin ve sağ kalım oranını artırıcı bir tedavi yöntemi henüz geliştirilememiştir. Dokunun cerrahi olarak çıkarılması, radyoterapi ve kemoterapi gibi birçok tedavi yöntemi birlikte ve tek olarak kullanılmaktadır fakat tümörün agresif yapısı ve metastaz yeteneğinin ortadan kaldırılması için yeterli gelmemektedir. Bu nedenle daha etkili ve hasta için daha az toksik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için hastalığın genetiğinin ve biyolojisinin daha iyi bilinmesi yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için büyük önem arz etmektedir.

Günümüzde kanser tedavisinde etkin olabilmek için seçilen hedeflerden biri de kanser kök hücreleridir. Kanser kök hücresi büyük oranda normal kök hücrelere benzemektedir. Farkı; klasik kanser tedavilerine direnç oluşturması, tümör kitlesi oluşturma ve metastazdan sorumlu olmasıdır [88]. Literatür çalışmaları KKH'ların tümörün oluşması ve metastazından sorumlu olduğunu desteklemektedir.

KKH ilk defa Bonnet ve Dick tarafından 1997 yılında akut myeloid lösemi (AML) de tanımlanmıştır [90]. Araştırmacılar AML'li hastadan lösemik hücreleri izole etmiş ve bunları hücre zarı antijenik yapılarına göre ayırmıştır. CD34+/CD38- yüzey markırlarına sahip az sayıdaki lösemik hücrelerin, bağışıklık sistemi çökertilmiş farelere transferiyle primer neoplazmaya benzer tümörlerin oluştuğunu göstermiştir. Aynı tür fareye yüzey markırları CD34+/CD38- den farklı karaktere sahip lösemik hücreler transfer edildiğinde tümör oluşumu gözlenmemiştir. Daha sonraki yıllarda KKH'nın varlığı meme [91], beyin [92], prostat [93], yumurtalık [94] ve baş-boyun kanserlerini [95] kapsayan birçok solid tümör tipinde bildirilmiştir.

Pankreas kanserinin tedavisindeki başarısızlıklarda ve hastaların ölüm oranlarının yüksek olmasında esas sorumlunun pankreas kanseri kök hücrelerinin olduğu düşünülmektedir.

Pankreas kanserinde ilk defa 2007 yılında Li ve arkadaşları kanser kök hücrelerinin varlığını ispat etmişlerdir. Fare xenograft modeli ile yaptıkları çalışmada, az sayıda olan CD44, CD24 ve epithelial-specific antigen (ESA) hücre yüzey markırlarını eksprese eden hücrelerin yüksek tümörjenik özelliğe sahip olduklarını ve kök hücre özelliği gösterdiklerini saptamışlardır [100].

Li ve ark. 2007 primer tümörden elde ettikleri hücre hattında Flow sitometri yöntemi ile yüzey markırlarının pozitifliklerini belirlemişler; CD44 pozitifliğini %2-9, CD24 pozitifliğini %3-28 ve ESA pozitifliğini ise %11-70 şeklinde olduğunu göstermişlerdir. Yine Shah ve ark. 2007 yaptığı benzer bir çalışmada AsPC-1'in yüzey markırı pozitiflikleri, CD24 %0.4, CD44 %16.7, ESA %2.4 ve üçlü boyama sonucu %0.4 şeklinde bulmuştur. Biz projemizde AsPC-1'in hücre hattında KKH yüzey markırlarını ESA %99, CD44 %97 ve CD24 %3 oranında pozitif olarak tespit ettik.

Shi-Neng ve ark Capan-2 hücre hattında KKH belirleme tekniklerinden biri olan Hoechst boyamayı kullanmışlardır ve KKH popülasyonunun %3.6 ± %1.2 arasında olduğu belirlemişlerdir (117). Kabashima ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada KKH popülasyonu %8.2 ± %5.2 arasında belirlenmiştir (118). Çalışmamızda Capan-2 hücre hattında KKH yüzey

markırlarını flow sitometri yöntemi ile ESA %97, CD44 %98 ve CD24 %1 oranında pozitif olarak belirledik.

KKH'nın Bonnet ve Dick tarafından 1997 yılında akut myeloid lösemi (AML) de tanımlanması [90] ardından KKH'lara özgü hücre yüzey markırlarının bulunarak KKH'ların belirlenmesi ve karakterize edilmesi, nişlerinin, biyolojilerinin anlaşılması KKH'ların potansiyellerinin anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır. Bunun içinde in vivo ortamda belirlenen özelliklerin in vitro ortamda da değerlendirilmesi önemlidir. Bu değerlendirmede kullanılan deneylerden biri de bizim çalışmamızda yaptığımız küre oluşum deneyidir (sphere from assay). Küre oluşum deneyi, kök hücre biyolojisinde çok sık kullanılan bir yöntemdir. Teorik olarak kök hücrenin farklılaşma ve kendini yenileme özelliğinin tek hücre seviyesinde in vivo ortamda değerlendirilmesini sağlar. Kök hücre özelliği taşıyan hücrelerin kültür ortamında küre benzeri yapı oluşturdukları tespit edilmiştir [120].

Pankreas kanseri KKH'lerinin de, KKH medyumunda belli bir süre sonra küre oluşturduğu gözlemlenmiştir [102,117,121]. Yue ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada pankreas kanserinde KKH çalışmalarında elde ettikleri küreler için Pancreatospheres terimini kullanmışlardır (121). Yine aynı çalışmada AsPC-1 hücre hattı KKH'larının 7 gün içerisinde küre oluşturduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise 7 günde küre oluşturmuştur. Literatürde Capan-2 hücre hattının 5-7 gün arasında küre oluşturduğu belirtilirken çalışmamızda 4 günde küre oluşumu gözlemlenmiştir [121].

KKH izolasyonu ve küre oluşum deneyinden sonra KKH'da ekspresyonunun artması beklenen kök hücre markırlarının (OCT-4, KLF-4 ve SOX-2) ve CD24 [77] ekspresyonlarına bakıldı.

KKH'lerde CD24, OCT-4, KLF-4 ve SOX-2 ekspresyonlarının KH'lara göre daha fazla ekspresyon olmasını bekliyorduk. qRT-PCR sonucu AsPC-1 hücre hattında KKH grubu ile KH arasında CD24 ekspresyon farkının yaklaşık 23 kat olduğunu belirledik. Bu sonuç bizim MACS ile yaptığımız KKH izolasyonunun doğru olduğunu göstermiş oldu. Yine KKH markırı olan OCT-4 da 11 kat, KLF-4' te 14 kat, SOX-2' de ise 17 kat fark bulduk.

Capan-2 hücre hattında ise CD24 pozitif KKH hücre grubu ile CD24 negatif KH arasında CD24 ekspresyon farkı 4,5 kat, OCT-4 için 4 kat, SOX-2 için 2 kat ve KLF-4 için ise 7 kat fark bulduk.

Sonuç olarak KKH, pankreas kanserinin de içinde bulunduğu birçok kanser tipinin etyopatogenezinde ve tedaviye direnç göstermesinde önemli rol oynamaktadır. Bunun içinde KKH'nın sinyal yollarının, genetik ve epigenetik özelliklerinin iyi anlaşılması daha etkin tedavi yöntemlerinin oluşturulması önemlidir. Bu çalışmaların temel başlangıç noktası da KKH'ların izolasyonu ve karakterizasyonudur. Bu çalışmaların yapılabilmesi için KKH izolasyonunun ve karakterizasyonunun doğru şekilde yapılması önem arz etmektedir. Biz de bu çalışmamız ile pankreas kanseri KKH izolasyonunu MACS yöntemi ile yaparak, KKH'ların karakterizasyonunu küre oluşum deneyi ve qRT-PCR ile doğruladık.

KAYNAKLAR

- [1] Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton M. (2001). Cancer and genomics. *Nature* 6822: 850-2
- [2] Genes and Cancer. In: Weaver RF, Hedrick PW; eds. *Genetics*. 3rd ed. Wm. Dubuque C: Brown Publishers; 1997: 482-503.
- [3] Fearnhead HO. (2004). Getting back on track, or what to do when apoptosis is de-railed: recoupling oncogenes to the apoptotic machinery. *Cancer Biol Ther.* 3(1):21-8
- [4] Foye, W.O., Sengupta, S.K., "Cancer Chemotherapy", *Principles of Medicinal Chemistry*, 4th edition, U.S.A., 822-845 (1995).
- [5] Hayat MJ1, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK.(2007) Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *The oncologist*,12(1),20-37
- [6] Williams GM. (1992). DNA reactive and epigenetic carcinogens. *Experimental and Toxicologic Pathology.* 44: 457– 64.
- [7] Fearnhead HO. (2004). Getting back on track, or what to do when apoptosis is de-railed: recoupling oncogenes to the apoptotic machinery. *Cancer Biol Ther.* 3(1):21-8
- [8] http://www.ssuk.org.tr/eski_site_verileri/pdf/Ulusal_Kanser_Kontrol_Programi_2009-2015.pdf T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI KANSERLE SAVAŞ DAİRESİ BAŞKANLIĞI ULUSAL KANSER PROGRAMI 2009-2015
- [9] <http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/kanser.pdf>
- [10] Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH.Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin.* 2013 Sep;63(5):318-48.
- [11] Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65(2), 87-108. doi: 10.3322/caac.21262
- [12] Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*, 65(1), 5-29. doi:10.3322/caac.21254
- [13] 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 Res*, 74(11), 2913-2921. doi: 10.1158/0008- 5472.CAN-14-0155
- [14] Ryan, D. P., Hong, T. S., & Bardeesy, N. (2014a). Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 371(22), 2140-2141. doi: 10.1056/NEJMc1412266
- [15] Silverman DT, Dunn JA, Hoover RN, et al. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews.J Natl Cancer Inst 1994; 86:1510-6.

- [16] Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, Bergkvist L, Bernstein L, van den Brandt PA, et al. Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18: 765-76
- [17] Keith AK, Michael GS, Ronald AH. Pancreatic and periampullar cancer. In : Mayo Clinic Gastrointestinal Surgery 2004, 271-299
- [18] Petersen, G.M. and Hruban, R.H. Familial pancreatic cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003; 95: 180–181.
- [19] Ozkan H. Pankreas Kanserinde son goruşler. *Klinik Bilimler & Doktor* 1999;5(5):598-606
- [20]. Whitcomb, D.C., Gorry, M.C., Preston, R.A., Furey, W., Sossenheimer, M.J., Ulrich, C.D., Martin, S.P., Gates Jr., L.K., Amann, S.T., Toskes, P.P., et al. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat. Genet.* 1996;14: 141–145.
- [21] Warshaw, A.L. and Fernandez-del Castillo, C. Pancreatic carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326: 455–465.
- [22] Li, D., Xie, K., Wolff, R., and Abbruzzese, J.L. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2004; 363: 1049–1057.
- [23] Kalser MH, Barkin J, MacIntyre JM. Pancreatic cancer. Assessment of prognosis by clinical presentation. *Cancer* 1985; 56:397
- [24] Ozkan H, Yamaguchi T, Saisho H, Ohto M. Kucuk pankreas kanseri erken pankreas kanseri mi. *MN Doktor* 1995;3(3):209-212
- [25] Steinberg WM, Gelfand R, Anderson KK, Glenn J, Kurtzman SH, Sindelar WF, et al. Comparison of the sensitivity and specificity of the CA 19-9 and carcinoembryonic antigen assays in detecting cancer of the pancreas. *Gastroenterology* 1986; 90 : 343-349.
- [26] Cameron JL, Nordback IH : Periampullary cancer : In : Current surgical therapy, edited by , Cameron JL, St Louise : Mosby Year Book, 1992; 441-445.
- [27] Beretta E, Malesci A, Zerbi A, et al: Serum CA 19-9 in the postsurgical follow-up of patients with pancreatic cancer. *Cancer.* 1987; 60: 2428-2431.
- [28] Tamm EP, Silverman PM, Charnsangavej C, Evans DB. Diagnosis, staging, and surveillance of pancreatic cancer. *Am J Roentgenol* 2003; 180: 1311-1323.
- [29] Steiner E, Stark DD, Hahn PF, Saini S, ve ark. Imaging of pancreatic neoplasms: comparison of MR and CT. *Am J Roentgenol* 1989; 152: 487-491.
- [30] AJCC Canser Staging Handbook, 6 th ed. New York, Springer, 2002. pp 179-188.
- [31] Casciato DA. Manual of clinical oncology. USA, Lippincott Williams&Wilkins,2004, p:213-219.

- [32] Goggins M, Koopmann J, Yang D et al. National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) guidelines for the use of tumor markers in pancreatic ductal adenocarcinoma 2007, USA
- [33] Braunwald K, Hauser F, Jameson L. Harrison's principles of internal medicine. USA, Mc Graw Hill, 2004, p:537-539.
- [34] Arbuck SG: Chemotherapy for pancreatic cancer. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1990; 4: 953-968.
- [35] Van Riel JM, Van Groeningen CJ, Pinedo HM, et al. Current chemotherapeutic possibilities in pancreaticobiliary cancer. *Ann Oncol* 1999;10(4):157-61)
- [36] Foo ML, Gunderson LL : Adjuvant postoperative radiation therapy +/- 5-FU in resected carcinoma of the pancreas. *Hepatogastroenterology* 1998, 45 : 613-623.
- [37] Gastrointestinal Tumor Study Group : Further evidence of effective adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection of pancreatic cancer. 1987. *Cancer* 59 : 2006-2010.
- [38] Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987, 56: 779-827.
- [39] Ismail Savas. *Onkogenler. T Klin Tıp Bilimleri.* 1995, 15: 374-377.
- [40] Klimstra, D.S. and Longnecker, D.S. K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. *Am. J. Pathol.* 1994; 145: 1547–1550.
- [41] Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S.A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S.N., Sohn, T.A., Hruban, R.H., Yeo, C.J., et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 1997; 57: 1731–1734.
- [42] Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & Depinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 20(10), 1218-1249. doi: 20/10/1218 [pii]
- [43] Luttges, J., Galehdari, H., Brocker, V., Schwarte-Waldhoff, I., Henne-Bruns, D., Kloppel, G., Schmiegel, W., and Hahn, S.A. Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 2001; 158: 1677–1683.
- [44] Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K., and Testa, J.R. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93: 3636–3641
- [45] Schlieman, M.G., Fahy, B.N., Ramsamooj, R., Beckett, L., and Bold, R.J. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br. J. Cancer.* 2003; 89: 2110–2115
- [46] Ng, S.S.W., Tsao, M.S., Chow, S., and Hedley, D.W. Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60: 5451–5455.

- [47] Shah, S.A., Potter, M.W., Hedeshian, M.H., Kim, R.D., Chari, R.S., and Callery, M.P. PI-3_ kinase and NF-_B crosssignaling in human pancreatic cancer cells. *J. Gastrointest. Surg.* 2001; 5: 603–612.
- [48] Kierszenbaum AL. *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology*. Second edition. Canada: Elsevier 2007; 85-104.
- [49] Hruban, R.H., Wilentz, R.E., and Kern, S.E. Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 1821– 1825.
- [50] Wang, W., Abbruzzese, J.L., Evans, D.B., Larry, L., Cleary, K.R., and Chiao, P.J. The nuclear factor-_ B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 119–127.
- [51] Chandler, N.M., Canete, J.J., and Callery, M.P. Increased expression of NF-_ B subunits in human pancreatic cancer cells. *J. Surg. Res.* 2004; 118: 9–14.
- [52] Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S.A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S.N., Sohn, T.A., Hruban, R.H., Yeo, C.J., et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 1997; 57: 1731–1734.
- [53] Bardeesy, N., Aguirre, A., Chu, G., Cheng, K., Lopez, L., Hezel, A.F., Feng, B., Brennan, C., Weissleder, R., Mahmood, U., et al. Both p16Ink4a and the p19Arf–p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006; 103: 5947–5952.
- [54] Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991 Jun 6;351(6326):453–456.
- [55] Andrei L. Gartel and Angela L. Tyner, The Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21 in Apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1: 639-649, 2002.
- [56] Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S.A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S.N., Sohn, T.A., Hruban, R.H., Yeo, C.J., et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 1997; 57: 1731–1734.
- [57] Boschman, C.R., Stryker, S., Reddy, J.K., and Rao, M.S. Expression of p53 protein in precursor lesions and adenocarcinoma of human pancreas. *Am. J. Pathol.* 1994; 145: 1291–1295.
- [58] Gorunova, L., Hoglund, M., Andren-Sandberg, A., Dawiskiba, S., Jin, Y., Mitelman, F., and Johansson, B. Cytogenetic analysis of pancreatic carcinomas: Intratumor heterogeneity and nonrandom pattern of chromosome aberrations. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998; 23: 81–99.
- [59] Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 807-21.
- [60] Ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta Smad signaling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 265-73.
- [61] Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005; 19: 2783-810.

- [62] Kang Y, Chen CR, Massague J. A self-enabling TGF-beta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 2003; 11: 915-26.
- [63] Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluk, C.A., da Costa, L.T., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Fischer, A., Yeo, C.J., Hruban, R.H., et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996; 271: 350–353.
- [64] Biankin, A.V., Morey, A.L., Lee, C.S., Kench, J.G., Biankin, S.A., Hook, H.C., Head, D.R., Hugh, T.B., Sutherland, R.L., and Henshall, S.M. DPC4/Smad4 expression and outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 4531–4542.
- [65] Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Hoglund, P., et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*. 1998; 391: 184–187.
- [66] Giardiello, F.M., Brensinger, J.D., Tersmette, A.C., Goodman, S.N., Petersen, G.M., Booker, S.V., Cruz-Correa, M., and Offerhaus, J.A. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*. 2000; 119: 1447–1453.
- [67] Su, G.H., Hruban, R.H., Bansal, R.K., Bova, G.S., Tang, D.J., Shekher, M.C., Westerman, A.M., Entius, M.M., Goggins, M., Yeo, C.J., et al. Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am. J. Pathol.* 1999; 154: 1835–1840.
- [68] Murphy, K.M., Brune, K.A., Griffin, C., Sollenberger, J.E., Petersen, G.M., Bansal, R., Hruban, R.H., and Kern, S.E. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: Deleterious BRCA2 mutations in 17. *Cancer Res.* 2002; 62: 3789–3793.
- [69] Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., 2011. *Moleküler Hücre Biyolojisi Altıncı Baskıdan Çeviri* (Çev Ed. Geçkil, H., Özmen, M., Yeşilada, Ö.). Palme Yayıncılık, Ankara, 1150 pp.
- [70] Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annual review of medicine.* 2007; **58**:267-84.
- [71] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6; 282 (5391):1145-1147.
- [72] Evans MJ, Kaufman mh. Establishment in culture of pluripotential cells from Mouse embryos. *Nature* 292:154-156,1981.
- [73] Baran ÖP, Nergiz Y, Bahçeci S. Göbek kordonu kan ve stromal kökenli hücrelerin sinir hücrelerine farklılaşması. *Dicle Tıp Dergisi*, 2007; 34:233-8.
- [74] Smith AG. Embryo derived stem cells: of mice and men. *Annual Review of Cell and Dev Biol*, 2001; 17:435-62.

- [75] Türkşen K. İnsan embriyonik kök hücreleri izolasyon, idame ve farklılaşma (diferensiyasyon). Türk Hematoloji Derneği 9. Mezuniyet Sonrası Eğitim Bursu, 2006; 9-15.
- [76] Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev.* 2006; 27(2): 208-219.
- [77] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 2005;122:947–956.
- [78] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000 Apr;24(4):372-6.
- [79] Graham V, Khudyakov J, Ellis P, Pevny L. SOX2 Functions To Maintain Neural Progenitor Identity. *Neuron* 2003; 39:749–765.
- [80] Zhao S¹, Nichols J, Smith AG, Li M. SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol Cell Neurosci.* 2004 Nov;27(3):332-42.
- [81] Kopp JL, Ormsbee BD, Desler M, Rizzino A. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2008 Apr;26(4):903-11. doi: 10.1634/stemcells.2007-0951. Epub 2008 Jan 31.
- [82] Koestenbauer S, Zech NH, Juch H, Vanderzwalmen P, Schoonjans L, Dohr G. Embryonic Stem Cells: Similarities and Differences Between Human and Murine Embryonic Stem Cells. *American J. Reprod. Immun* 2006; 55(3):169-180.
- [83] Cavaleri F, Schöler H. Molecular bases of pluripotency, Essentials of stem cell Biology. Lanza R(ed.), San Diego, USA, Academic Press, pp: 39-60,2009.
- [84] Zhao W, Hisamuddin IF, Nandan MO et al. Identification of Kruppel-like Factor 4 As a Potential Tumor Suppressorgene In Colorectal Cancer: *Oncogene* 2004;23:395–402. doi:10.1038/sj.onc.1207067.
- [85] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived From Human Somatic Cells. 2007;318:1917-20. doi:10.1126/science.1151526

- [86] Köse O, Özdoğan S. Epidermal Kök Hücreler ve Klinik Kullanımları, *Türkiye Klinikleri J Dermatol* 2010;20:74-80
- [87] Kakarala M, Wicha MS. Cancer stem cells: Implications for cancer treatment and prevention. *Cancer J* 2007;13(5):271-5.
- [88] Nguyen GH, Murph MM, Chang JY, Cancer stem cell radioresistance and enrichment: where frontline radiation therapy may fail in lung and esophageal cancers, *Cancers (Basel)*. 2011 Mar;3(1):1232-52. doi: 10.3390/cancers3011232.
- [89] Yang YM, Chang JW. Current status and issues in cancer stem cell study. *Cancer Invest*. 2008 Aug;26(7):741-55. doi: 10.1080/07357900801901856.
- [90] BONNET, D. and Dick, J.E., Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell, *Nat Med*, 3(7), 730-7, (1997).
- [91] AL-HAJJ, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F., Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 3983-8, (2003).
- [92] SINGH, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B., Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors, *Cancer Res*, 63(18), 5821-8, (2003).
- [93] COLLINS, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J., Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells, *Cancer Res*, 65(23), 10946-51, (2005).
- [94] SZOTEK, P.P., Pieretti-Vanmarcke, R., Masiakos, P.T., Dinulescu, D.M., Connolly, D., Foster, R., Dombkowski, D., Preffer, F., Maclaughlin, D.T., and Donahoe, P.K., Ovarian Cancer Side Population Defines Cells with Stem Cell-Like Characteristics and Mullerian Inhibiting Substance Responsiveness, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(30), 11154-9, (2006).
- [95] PRINCE, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F., and Ailles, L.E., Identification of a Subpopulation of Cells with Cancer Stem Cell Properties in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3), 973-8, (2007).
- [96] Allan AL, Vantghem SA, Tuck AB, Chambers AF. Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis. *Breast Dis*. 2006-2007;26:87-98.
- [97] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72..
- [98] Kucia M, Ratajczak MZ. Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation. *J Physiol Pharmacol*. 2006 Nov;57 Suppl 7:5-16

- [99] LI, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M., Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells, *Cancer Res*, 67(3), 1030-7, (2007).
- [100] HERMANN, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., and Heeschen, C., Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer, *Cell Stem Cell*, 1(3), 313-23, (2007).
- [101] LEE, H.J., You, D.D., Choi, D.W., Choi, Y.S., Kim, S.J., Won, Y.S., and Moon, H.J., Significance of Cd133 as a Cancer Stem Cell Markers Focusing on the Tumorigenicity of Pancreatic Cancer Cell Lines, *J Korean Surg Soc*, 81(4), 263-70, (2011).
- [102] FELDMANN, G., Dhara, S., Fendrich, V., Bedja, D., Beaty, R., Mullendore, M., Karikari, C., Alvarez, H., Iacobuzio-Donahue, C., Jimeno, A., Gabrielson, K.L., Matsui, W., and Maitra, A., Blockade of Hedgehog Signaling Inhibits Pancreatic Cancer Invasion and Metastases: A New Paradigm for Combination Therapy in Solid Cancers, *Cancer Res*, 67(5), 2187-96, (2007).
- [103] JIMENO, A., Feldmann, G., Suarez-Gauthier, A., Rasheed, Z., Solomon, A., Zou, G.M., Rubio-Viqueira, B., Garcia-Garcia, E., Lopez-Rios, F., Matsui, W., Maitra, A., and Hidalgo, M., A Direct Pancreatic Cancer Xenograft Model as a Platform for Cancer Stem Cell Therapeutic Development, *Mol Cancer Ther*, 8(2), 310-4, (2009).
- [104] DENG, S., Yang, X., Lassus, H., Liang, S., Kaur, S., Ye, Q., Li, C., Wang, L.P., Roby, K.F., Orsulic, S., Connolly, D.C., Zhang, Y., Montone, K., Butzow, R., Coukos, G., and Zhang, L., Distinct Expression Levels and Patterns of Stem Cell Marker, Aldehyde Dehydrogenase Isoform 1 (Aldh1), in Human Epithelial Cancers, *PLoS One*, 5(4), e10277, (2010).
- [105] HIDALGO, M., Pancreatic Cancer, *N Engl J Med*, 362(17), 1605-17, (2010).
- [106] Goodison, S., Urquidi, V., Tarin, D., CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol.*, 52 (1999), 189-196.
- [107] Rudzki, Z., Jothy, S., CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *J Clin Pathol: Mol Pathol.*, 50 (1997), 57-71.
- [108] Bourguignon, L.Y., CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 6 (2001), 287-297.
- [109] Kristiansen, G., Sammar, M., Altevogt, P., Tumour biological aspect of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol.*, 35 (2004), 255-262.
- [110] Lim, S.C., Oh, S.H., The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathol Res Pract.*, 201 (2005), 479-486.
- [111] Aigner, S., Ramos, C.L., Hafezi-Moghadam, A., Lawrence, M.B., Friederichs, J., Altevogt, P., Ley, K., CD24 mediates rolling of

- breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J.*, 12 (1998), 1241–1251.
- [112] van Meer S, de Man RA, Siersema PD, van Erpecum KJ. Surveillance for hepatocellular carcinoma in chronic liver disease: Evidence and controversies. *World J Gastroenterol.* 2013 Oct 28;19(40):6744-6756.
- [113] Gouas D, Shi H, Hainaut P. The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer Lett.* 2009 Dec 1;286(1):29-37.
- [114] Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AE, Rees-Bakker HA, et al. Expression of Ep-CAM shifts the state of cad-herin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res* 2003, 285:50–58
- [115] Balzar M, Winter MJ, De Boer CJ, Litvinov SV: The biology of the 17–1A antigen (EpCAM). *J Mol Med* 1999, 77:699–712
- [116] Ami N. Shah, Justin M. Summy, Jing Zhang, Serk In Park, Nila U. Parikh, and Gary E. Gallick, Development and Characterization of Gemcitabine-Resistant Pancreatic Tumor Cells, *Annals of Surgical Oncology* 14(12):3629–3637 DOI: 10.1245/s10434-007-9583-5
- [117] Shi-Neng Zhang, Feng-Ting Huang, Yi-Jun Huang, Wa Zhong, and Zhong Yu1, Characterization of a Cancer Stem Cell-Like Side Population Derived From Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells, *Tumori*, 96: 985-992, 2010.
- [118] Kabashima A, Higuchi H, Takaishi H, Matsuzaki Y, Suzuki S, Izumiya M, Iizuka H, Sakai G, Hozawa S, Azuma T, Hibi T, Side population of pancreatic cancer cells predominates in TGF-beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and invasion, *Int J Cancer.* 2009 Jun 15;124(12):2771-9. doi: 10.1002/ijc.24349.
- [119] Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ, Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines, *Pancreas.* 2010 May;39(4):425-35. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181c15963.
- [120] Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F, Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells, *Cell Stem Cell.* 2011 May 6;8(5):486-98. doi: 10.1016/j.stem.2011.04.007.
- [121] Wei HJ, Yin T, Zhu Z, Shi PF, Tian Y, Wang CY, Expression of CD44, CD24 and ESA in pancreatic adenocarcinoma cell lines varies with local microenvironment, *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2011 Aug;10(4):428-34.
- [122] Bin Bao, Zhiwei Wang, Shadan Ali, Dejuan Kong, Sanjeev Banerjee, Aamir Ahmad, Yiwei Li, Asfar S. Azmi, Lucio Miele and Fazlul H. Sarkar, Over-expression of FoxM1 leads to epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells, *J Cell Biochem.* Author manuscript; available in PMC 2012 Sep 1, Published in final edited form as: *J Cell Biochem.* 2011 Sep; 112(9): 2296–2306. doi: 10.1002/jcb.23150.

- [123] Arokia Priyanka Vaz , Moorthy P. Ponnusamy , Parthasarathy Seshacharyulu , and Surinder K. Batra, A concise review on the current understanding of pancreatic cancer stem cells, *Journal of Cancer Stem Cell Research* (2014), 2:e1004 2013 Creative Commons. All rights reserved ISSN 2329-5872 DOI: 10.14343/JCSCR.2014.2e1004.
- [124] <https://www.sciencebasedmedicine.org/the-complexity-of-cancer/>