

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**MİDE KANSERİ HÜCRE HATLARINDA VINCRIStİNE
İLE İNDÜKLENMİŞ KANSER KÖK HÜCRELERİNİN
TAYİNİ VE İLAÇ HASSASİYETİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan

Pınar AYDINDAĞ

Danışman

Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU

İSTANBUL – 2018

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**MİDE KANSERİ HÜCRE HATLARINDA VINCRIStINE
İLE İNDÜKLENMİŞ KANSER KÖK HÜCRELERİNİN
TAYİNİ VE İLAÇ HASSASİYETİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan

Pınar AYDINDAĞ

Danışman

Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU

İSTANBUL – 2018

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Pınar AYDINDAĞ tarafından hazırlanan “**Mide Kanseri Hücre Hatlarında Vincristine ile İndüklenmiş Kansere Kök Hücrelerinin Tayini ve İlaç Hassasiyetinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışma jürimizce Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22.01.2018

Jüri Üyesinin Unvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu

İmzası

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU
: Haliç Üniv./Danışmanı



Jüri Üyesi : Prof. Dr. Cengiz YAKICIER
: Acıbadem Üniv./ Üye



Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Özlem SAĞLAM UÇAR
: Haliç Üniv./ Üye



Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr Temel SAVAŞKAN
Fen Bilimleri Enstitüsü
Vekil Müdür

Urkund Analysis Result

Analysed Document: Pınar Aydınadağ Tez.docx (D34242375)
Submitted: 12/29/2017 1:10:00 PM
Submitted By: burcuyazicioglu@halic.edu.tr
Significance: 6 %

Sources included in the report:

<https://doi.org/10.1038/nrd4252>
<https://doi.org/10.1038/aps.2013.27>
<https://doi.org/10.1101/gad.291004>
<https://doi.org/10.1038/onc.2011.282>
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2011.02774.x>
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0969>
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1373>
<https://doi.org/10.1002/jcb.23356>
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4021>
<https://doi.org/10.1002/cam4.962>

Instances where selected sources appear:

ÖNSÖZ

Bu çalışma 2015 – 2018 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır.

Öncelikle deneyim boyunca desteğini sağlayan danışmanım **Sn. Doç. Dr. M. Burcu IRMAK YAZICIOĞLU**'na teşekkürü borç bilirim,

Eğitim hayatımın ilk basamaklarında beni “gelecekteki bilim kadını” diyerek bu yolculuğa çıkararak, her yönü ile örnek aldığım ilköğretim öğretmenim **Yadigar KÖSEOĞLU**'na,

Bilgi ve birikimini hiçbir zaman paylaşmaktan çekinmeyen **Sn. Yrd. Doç. Dr. Ayyub EBRAHİMİ**'ye ve **Sn. Yrd. Doç. Dr. Özlem SAĞLAM UÇAR**'a,

Pozitif enerjileri ile her anımda yanımda olup yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım **Özge BARIM, Gizem SÜMER, Feyza Nur ARGÜÇ, Ferhat ERDOĞAN, Şafak ŞENER, Meryem OSUM** ve özellikle **Ezgi KESKE**'ye,

Maddi manevi olarak her daim yanımda olan, beni özveri ile yetiştirmiş ve bu günlere her zorluğa karşı azimle karşı koyacak bir karakterde getirmiş, mutluluk ve sıkıntılarımı benimle birlikte yaşamış aileme; annem **Aysun AYDINDAĞ**, babam **Mehmet Ali AYDINDAĞ**, kardeşim **M. Uğur AYDINDAĞ**'a,

Sosyal hayatımda karşılaştığım olumlu ve olumsuz tüm olaylarda, stresli ve sıkıntılı günlerimde sevgi ve desteği ile yanımda olan **Murat TEMEL**'e,

Sonsuz teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
KISALTMALAR	iii
ÇİZELGELER	v
ŞEKİLLER	vi
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.1.1. Mide Kanseri	3
1.1.2 Mide Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması	3
1.2. Kök Hücreler	4
1.2.1. Kanser Kök Hücreleri	4
1.2.2. Mide Kanseri Kök Hücreleri	4
1.2.3 Mide Kanseri Kök Hücre Biyobelirteçleri	5
1.2.3.1. CD44	5
1.3 Hücre İçi Yolaklar	5
1.3.1. Notch Sinyalizasyon Yolağı	8
1.3.2. DBL4-Notch Sinyalizasyonu	11
1.3.3.DBL4 ve Anjiyogenez.....	11
1.4 Kanser Tedavi Yöntemleri	12
1.4.1. Vincristine	13
2.AMAÇ	15
3. MATERYAL	17
3.1 Araştırmada Kullanılan Örnekler	17
3.2 Kimyasallar	17
3.3 Cihazlar	18
3.4 Sarf Malzemeler	19
3.5 Kullanılan Kitler	20
3.6 Hücre Hatları Büyüme Ortamları	20
3.7 Primerler	21
4. YÖNTEM	23
4.1. Hücre Hatlarının Kültürü	23
4.2. Hücrelerin Çözülmesi.....	23
4.3. Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması.....	23
4.4 Hücrelerin Dondurulması	25
4.5. MTT Analizi İle Hücre Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	25
4.6. Vincristine ve anti-DBL4 Uygulaması	26
4.7. Hücrelerin Farklılaştırılması	27
4.8.Sferoid Oluşumu	28

4.9. Çekirdek Boyaması	28
4.10. Total RNA izolasyonu	29
4.11. cDNA Sentezi	30
4.12. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR)	32
5. BULGULAR	34
5.1.MTT İle Sitotoksitenin Gösterilmesi	34
5.1.1. VCR ve DBL4 İnhibitörünün AGS, MKN45 ve dH1f Hücrelerinin Canlılığına Etkisi	34
5.2. VCR, anti-DBL4 ve Kombinasyon Uygulamalarının Ardından Hücre Morfolojilerinin Gösterilmesi	36
5.3. VCR ve VCR ile anti-DBL4 Birlikte İndüklenmiş Hücrelerin Farklılaşma Görüntüleri	39
5.4. Çekirdek Boyaması	41
5.5. Sferoid Oluşumu	42
5.6. Gerçek Zamanlı PZR	42
5.6.1. Gerçek Zamanlı PZR İle Kanser Kök Hücrelerinin Saptanması	42
5.6.2. Gerçek Zamanlı PZR İle anti-DBL4 Dozajının Belirlenmesi	44
5.6.3. Gerçek Zamanlı PZR İle Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi	45
6. TARTIŞMA	47
7. KAYNAKLAR	52
8. ÖZGEÇMİŞ	58

KISALTMALAR

- AGS:** İnsan Kafkasya adenokarsinoma hücre hattı
DBL: Delta Benzeri Ligant
L: Litre
ml: Mililitre
µl: Mikrolitre
mg: miligram
µg: mikrogram
g: Gram
ng: Nanogram
µM: mikromolar
nM: Nanomolar
mM: Milimolar
FBS: Fetal sığır serumu
Cm: Santimetre
PBS: Fosfat tamponlu salin
DMSO: Dimetil sülfoksit
DNA: Deoksiribonükleik asit
RNA: Ribonükleik asit
RT-PZR: Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
cDNA: Komplementer DNA
bp: Baz çifti
kDa: Kilo Dalton
DK: Dakika
SN: Saniye
MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromürün
M.Ö.: Milattan önce
M.S.: Milattan sonra
TGCA: The Cancer Genome Atlas
KKH: Kanser kök hücresi
VCR: Vinkristin

KKHBH: Kanser kök hücre benzeri hücreler
RTK: Reseptör tirozin kinaz
ALDH: Aldehid dehidrogenazlar
HA: Hiyalüronik asit
TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TAD: Transaktivasyon domaini
LN: Lin-12-Notch
bFGF: Temel fibroblast büyüme faktörü
EBF: Epidermal büyüme faktörü
HES: Hairy and enhancer of split
HEY: Hes-related repressor
bHLH: temel heliks-loop-heliks
GTP: Guanozin trifosfat
VEGF: Vaskülatör endotelial büyüme faktörü

ÇİZELGELER

	Sayfa No.
Çizelge 3.1. Kimyasallar	17
Çizelge 3.2. Cihazlar	18
Çizelge 3.3. Sarf Malzemeler	19
Çizelge 3.4. Kullanılan Kitler	20
Çizelge 3.5. Hücre Hatları Büyütme ve Dondurma Ortamları	20
Çizelge 3.6 Gerçek Zamanlı PZR’de Kullanılan Primerler	22
Çizelge 4.1 Hücrelerin Ekim Koşulları ve Kullanılan Malzemeler	24
Çizelge 4.2. MTT Uygulaması.....	26
Çizelge 4.3 İlaç Uygulamalarında Kullanılan Malzemeler ve Ekilen Hücre Sayısı..	27
Çizelge 4.4. cDNA Sentezinde Kullanılacak RNA ve Oluşacak cDNA Sentez Ürün Miktarı.....	30
Çizelge 4.5. cDNA Sentez Ürünlerinin Dilüsyonu	31
Çizelge 4.6. GZ-PZR Reaktifleri	32
Çizelge 4.7: PZR Koşulları.....	32
Çizelge 4.8: Uygulanan İlaç Ve İncelenen Genlerin Kombinasyonları.	33

ŞEKİLLER

Sayfa No.

Şekil 1.1 Kanser Türlerinin Dünya Genelinde Kadın ve Erkeklerde Görülme Oranı .	1
Şekil 1.2 Kanserlin Evrimi.....	2
Şekil 1.3. Kanser Kök Hücrelerinde Etkili Hücre İçi Yolaklar	6
Şekil 1.4 Kanser Kök Hücrelerinin Hedeflenmesi.....	7
Şekil 1.5. Notch, Shh ve Wnt Yolağının Tümörögeneze Etkisi	7
Şekil 1.6. <i>Drosophila Melanogaster</i> 'in Normal ve Notch Mutasyonlu Kanat Yapıları	8
Şekil 1.7. Notch Reseptör ve Ligantlarının Yapıları.....	9
Şekil 1.8. Notch-Ligant Etkileşimi ve Nükleustaki Yeri	10
Şekil 1.9. Notch Reseptörünün Susturulmasının Hedef Genlerdeki Etkisi.....	12
Şekil 1.10. VCR'nin Kimyasal Yapısı.....	14
Şekil 4.1: İlaç Uygulaması.....	27
Şekil 5.1: VCR ve anti-DBL4 Konsantrasyonlarının AGS Hücre Hattı Üzerindeki MTT Analizi.....	35
Şekil 5.2: VCR ve anti-DBL4 Konsantrasyonlarının MKN45 Hücre Hattı Üzerindeki MTT Analizi.....	35
Şekil 5.3: VCR ve anti-DBL4 Konsantrasyonlarının dH1f Hücre Hattı Üzerindeki MTT Analizi.....	36
Şekil 5.4: dH1f VCR Öncesi ve Sonrası Hücre Görüntüleri	37
Şekil 5.5: İlaç Uygulamasının Ardından AGS Hücre Görüntüleri	38
Şekil 5.6: İlaç Uygulamasının Ardından MKN45 Hücre Görüntüleri.....	39
Şekil 5.7: Farklılaşmış AGS Hücre Görüntüleri.....	40
Şekil 5.8: Farklılaşmış MKN45 Hücre Görüntüleri	40
Şekil 5.9: Hoechst Boyaması Sonrası AGS Hücre Görüntüleri	41
Şekil 5.10: Hoechst Boyaması Sonrası dH2f Hücre Görüntüleri	41
Şekil 5.11: AGS ve MKN45 Hücrelerinin Sferoid Görüntüleri	42
Şekil 5.12: Uygulama Yapılmış ve Yapılmamış AGS Hücre Hattında CD44 Ekspresyonu	43
Şekil 5.13: Uygulama Yapılmış ve Yapılmamış MKN45 Hücre Hattında CD44 Ekspresyonu	43
Şekil 5.14: AGS Hücre Hattında anti-DBL4 Dozaj Grafiği	44

Şekil 5.15: AGS Hücre Hattında Genlerin Ekspresyonu.....	45
Şekil 5.16: MKN45 Hücre Hattında Genlerin Ekspresyonu	46



GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Pınar AYDINDAĞ
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOĞLI
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Aralık 2017

ÖZET

MİDE KANSERİ HÜCRE HATLARINDA VINCRIStINE İLE İNDÜKLENMİŞ KANSER KÖK HÜCRELERİNİN TAYİNİ VE İLAÇ HASSASİYETİNİN BELİRLENMESİ

Yakın zamanda, kanser kök hücreleri (KKH) kanser tedavi çalışmalarında ve tümör anjiyogenezinde odak haline gelmiştir. Ayrıca KKH'ler kanser terapileri için önemli bir hedeftir. KKH'ler kendini yenileme ve pluripotent kapasiteye sahiptir.

Vincristine (VCR) çeşitli kanserlerin tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapik anti kanser ilaçtır. Bununla beraber, VCR hakkında son zamanlarda yapılan çalışmalar VCR'nin kanser hücreleri ile KKH'leri arasındaki ayrımı sağladığını göstermektedir. Ayrıca tümör anjiyogenezinin KKH devamlılığı ve kemoterapik ilaç direnci arasında bağlantılı olduğu rapor edilmiştir. Notch sinyal yolağı hücre farklılaşması, devamlılığı ve anjiyogenezde kritik bir rol oynar. Ve bu yolda Delta Benzeri Ligand 4 (DBL4) anjiyogenezde önemli bir anahtar role sahiptir. Buradan yola çıkarak AGS mide kanseri hücre hattında anti-DBL4 antikoru ile Notch yolağının susturulması ve VCR'nin etkisi ilk defa incelenecektir.

AGS hücre hatlarında VCR ve anti-DBL4 antikorusunun sitotoksitesisi MTT analizi ile belirlendi. VCR uygulamasının ardından, AGS hücre popülasyonundaki KKH'leri seçildi. Seçilen hücrelerde morfoloji, kolonizasyon, sferoid oluşumu ve farklılaşma analizi yapıldı. Ardından DBL4 ligandının inhibisyonu ile Notch yolağının susturulması için anti-DBL4 antikoru kullanıldı. Bu işlem sonucunda uygulama yapılmamış AGS kontrol hücreleri ile anti-DBL4 uygulanmış AGS hücrelerinin karşılaştırılması sonucunda damar benzeri yapıların gerilediği görüldü. Son olarak, VCR ve anti-DBL4 antikorusunun damar benzeri yapı oluşumu üzerine kombine etkisi, AGS KKH'leri üzerinde belirlendi.

Anahtar Kelimeler: AGS, Vincristine, Demcizumab, CD44, Kanser kök hücreleri

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Pınar AYDINDAĞ
Field : Molecular Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Doç. Dr. Meliha Burcu IRMAK YAZICIOĞLI
Degree Awarded and Date : Master of Science – Aralık 2017

ABSTRACT

INDICATION INDUSED CANCER STEM CELLS WITH VINCRIStINE AND DESIGNATE OF DRUG SENSIBILITY IN GASTRIC CELL LINES

In recent years, cancer stem cells (CSCs) have come into focus in cancer treatment studies and tumor angiogenesis and it is an important target for cancer therapy. CSCs have self-renewal and pluripotent capacity.

Vincristine is widely used as a chemotherapeutic anticancer drug to treat various cancers. Nevertheless, recent research about Vincristine indicates that it can distinguish between cancer cells and cancer stem cells. Tumor angiogenesis has also been reported to be related to CSC survival and chemotherapeutic drug resistance. The Notch pathway plays a critical role in cellular differentiation, survival and angiogenesis and in this pathway DLL4 ligand is as a key player in angiogenesis. Based on these, for the first time we searched for the effect of Vincristine and blockage of Notch pathway with anti DLL4 antibody in AGS gastric cancer cell line.

Cytotoxicity of Vincristine and anti DLL4 on AGS cell line was determined by MTT analysis. Cancer stem cells in AGS cell population were selected following the application of Vincristine. The morphology, colonization, spheroid formation and differentiation of the selected cells were analyzed. Then, Anti DLL4 antibody was used to block Notch pathway by inhibiting DLL4 ligand to see whether vessel like structures are reversed in anti DLL4 treated AGS cells compared to the untreated control AGS cells. Finally, the combined effect of vincristine and anti DLL4 on vessel like structure formation was determined on cancer stem cell like AGS cells.

Anahtar Kelimeler: AGS, Vincristine, Demcizumab, CD44, Cancer Stem Cells

1.GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser dünya genelinde hasta ve hasta yakınlarını etkileyen, yaşam kalitesini düşüren, yüksek ölüm oranına sahip hastalıklardan biridir. Dünya genelinde kadın ve erkeklerde bilinen vakaların %58.3'ü ölümle sonuçlanmaktadır. 2012 yılında belirlenen istatistiksel veriler sonucunda dünya genelinde 14.1 milyon yeni kanser vakası ile 8.2 milyon kanser kaynaklı ölümlerin olduğu ve 32.6 milyon kişinin kanserle yaşadığı açıklanmıştır (Jemal, Bray, & Ferlay, 1999). Kanser türlerinin dünya genelindeki mevcut vakalar ve ölümlerin kadın ve erkeklerdeki sayısı Şekil 1.1'de gösterilmiştir.

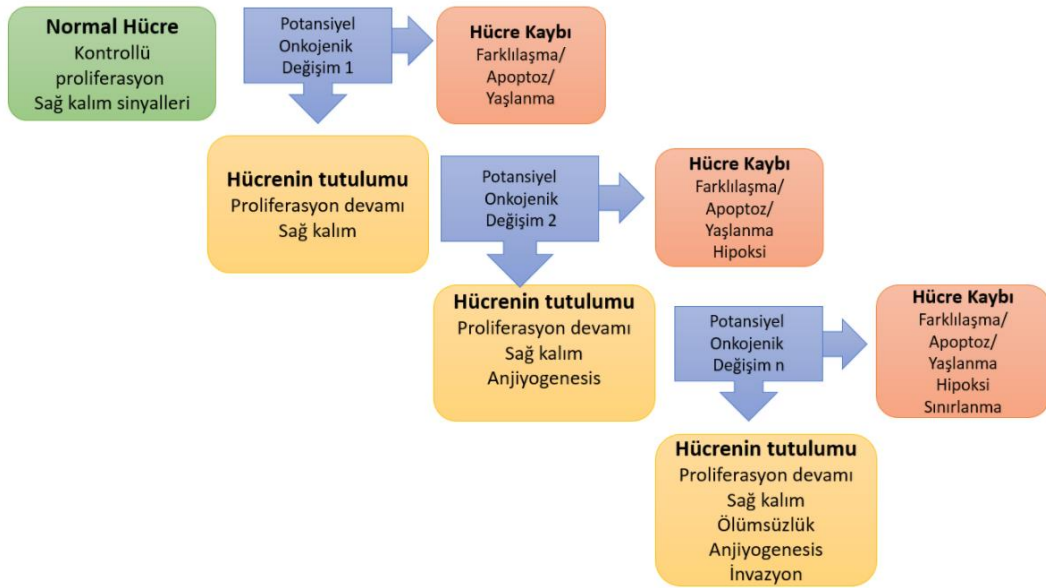
Hesaplanmış Yeni Vakalar		Dünya Çapında	Hesaplanmış Ölümler	
Erkek	Kadın		Erkek	Kadın
Akciğer ve bronşit 1.095.200	Göğüs 1.383.500		Akciğer ve bronşit 951.000	Göğüs 458.400
Prostat 903.500	Kolon ve kalın bağırsak 570.100		Karaciğer 478.300	Akciğer ve bronşit 427.400
Kolon ve kalın bağırsak 663.600	Serviks uteri 529.800		Mide 464.400	Kolon ve kalın bağırsak 288.100
Mide 640.600	Akciğer ve bronşit 513.600		Kolon ve kalın bağırsak 320.600	Serviks uteri 275.100
Karaciğer 522.400	Mide 349.000		Yutak 276.100	Mide 273.600
Yutak 326.600	Korpus uteri 287.100		Prostat 258.400	Karaciğer 217.600
Mesane 297.300	Karaciğer 225.500		Lösemi 143.700	Over 140.200
Non- Hodgkin Lenfoma 199.600	Over 225.500		Pankreas 138.100	Yutak 130.700
Lösemi 195.500	Tiroid 163.000		Mesane 112.300	Pankreas 127.900
Ağız boşluğu 170.900	Non-Hodgkin Lenfoma 156.300		Non- Hodgkin Lenfoma 109.500	Lösemi 113.800
Deri hariç bütün bölgeler 6.629.100	Deri hariç bütün bölgeler 6.038.400		Deri hariç bütün bölgeler 4.225.700	Deri hariç bütün bölgeler 3.345.800

Şekil 1.1. Kanser türlerinin dünya genelinde kadın ve erkeklerde görülme ve ölüm oranları (Jemal, Bray, & Ferlay, 1999).

Bir hücrenin gelişimi ve ilerleyişini kontrol eden, G2, S, G1 ve M fazı olmak üzere 4 biyokimyasal organizasyonlar vardır. Hücreler kontrol altında büyür, bölünür ve canlılığın devamını sağlarlar. Normal koşullarda hücrenin gelişimi ya da bölünmesi sırasında DNA'da ya da kromozomlarda canlılığın gelişimini etkileyebilecek bir hata, zarar veya mutasyon olduğu durumda kontrol mekanizmaları hücrenin bölünmesini durdurur, hata tamir edilir ya da hücre apoptoza yönlendirilir. Ancak kontrol noktalarında meydana gelebilecek bir mutasyon hücrenin kontrolsüz bölünmesine, beraberinde mutasyon biriktirmesi ve bir tümör kitlesi oluşturmaya neden olabilir (Bresciani, 1968; Torre & Pincheira, n.d.).

Kanserin kökeni konusundaki modern teori, her tümörün eşsiz bir doğa deneyi olduğunu, anahtar genlerdeki mutasyonların ikinci genlerdeki mutasyonlarla beraber birikerek insan vücudunda çoğalmaya ve hayatta kalmaya çabalayan kanser klonu olduğunu tanımlar (Gatto & Nielsen, 2016).

Kanser evrimi çok karmaşıktır. Potansiyel olarak onkojenik proliferatif sinyaller, apoptoz, farklılaşma veya yaşlanma indüksiyonu gibi çeşitli büyümeyi önleyici süreçlerle birleşir. Tümör ilerlemesi, yalnızca büyümeyi önleyici mekanizmaların telafi edici mutasyonlar tarafından engellendiği nadir durumlarda meydana gelir (Evan & Vousden, 2001). Kanser evriminin aşamaları Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Kanser evrimi (Evan & Vousden, 2001).

1.1.1. Mide Kanseri

Mide kanseri dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin arasında 3. sırada gelen (J. P. Smith, Nadella, & Osborne, 2017), kompleks ve heterojen bir hastalıktır (Lim et al., 2016).

2011 yılında yapılan bir çalışmada kanser türlerinin dünya genelinde kadınlarda ve erkeklerdeki görülme sıklığı ve ölüm oranı gösterilmiştir. Bu oranlar arasında mide kanseri göz ardı edilemeyecek bir orana sahiptir (Jemal et al., 1999). En ölümcül kanser türlerinden biri olan mide kanseri yoğun olarak Doğu Asya, Doğu Avrupa ve Güney Amerika'da görülürken, Kuzey Amerika'da seyrek görülme sıklığına sahiptir (Jemal et al., 1999).

İlk olası mide kanseri vakası M.Ö 1600'lerde yazılan Ebers papirüsünde ve M.S. 4. yüzyılda Galen tarafından Hippocrates raporlarında bildirilmiştir (Santoro, 2005). Hippocrates M.Ö. 4. yüzyılda, günümüzde mide kanseri olarak tanımlanan "kanseri" ("Karkinos") terimini, bir gastrik hastalığın tanımında kullanmıştır. On dokuzuncu yüzyılın ilk yarısında Cruveilhier ve Rokitansky gastrik bir malignitenin ilk anatomik tanımını yapmış ve mide ülseri ile gastrik kanser arasındaki bağlantıyı tarif etmiştir (Rugge, Fassan, & Graham, 2015).

Massimo Rugge ve arkadaşları primer gastrik kanserin önlemesinin birincil olarak ana onkojenik ajan olan *Helicobacter pylori*'nin yok edilmesine dayandığını söylemiş ve ikincil olarak, ikinci düzey tanı yöntemleri için uygun hasta popülasyonlarının tanımlanmasında, güvenilir olduğu kanıtlanan serolojik testlerin daha kapsamlı bir şekilde uygulanmasını talep etmişlerdir (Rugge et al., 2015). Şu anda mide kanseri için ana tedavi seçenekleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir (Lim et al., 2016).

1.1.2. Mide Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması

The Cancer Genome Atlas (TCGA) arama ağı Epstein-Barr virus, mikrosatelit kararsızlık, genomic denge ve kromozomal kararsızlık olmak üzere mide kanserinin moleküler sınıflandırılmasının 4 grubunu keşfetmiştir (Adam J. Bass¹, Vestinn Thorsson², Ilya Shmulevich², Sheila M. Reynolds², Michael Miller², Brady Bernard², Toshinori Hinoue³, Peter W. Laird³, Christina Curtis⁴, Hui Shen³,

Daniel J. Weisenberger³, Nikolaus Schultz⁵, Ronglai Shen⁶, Nils Weinhold⁵, David P, 2014; J. P. Smith et al., 2017).

1.2. Kök Hücreler

Kök hücreler kendilerini yenileyerek sürekli kılma ve farklılaşma yoluyla belli bir dokunun olgun hücrelerini üretme yeteneğine sahip hücreler olarak tanımlanır. Çoğu dokuda kök hücreler çok az yoğunlukta bulunur (Tannishtha, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001).

1.2.1. Kanser Kök Hücreleri

Kanser kök hücreleri kendini yenileme ve pluripotent özelliğine sahip ölümsüz hücrelerdir ve bir çok kanser türünde tanımlanmışlardır. Günümüzde KKH'leri, akciğer kanseri, kolon kanseri, prostat kanseri, yumurtalık kanseri, beyin kanseri ve melanom dahil olmak üzere geniş bir solid tümör spektrumunda keşfedilmiştir. Kanseri kök hücreleri tümörü oluşturan hücre popülasyonunun oluşumu, gelişimi ve devamlılığında önemli rolü olan hücrelerdir. Çoğu tümörler tek bir hücreden köken alan heterojenik popülasyonlardır (Chen, Huang, & Chen, 2013).. Farklı özelliklere sahip hücre popülasyonlarının aynı tümör içerisinde bir arada bulunması KKH hipotezinin doğrudan bir sonucudur. Aynı zamanda KKH'ler klinik tümörlerde yaygın olarak gözlemlenen hücresel heterojenliği oluşturma kabiliyetine sahiptir (Rycak & Tang, 2014). Bir tümörü oluşturan hücre popülasyonunda kanser kök hücrelerinin sayısı tümörü oluşturan hücrelere oranla çok az sayıdadır (Chen et al., 2013).

1.2.2. Mide Kanseri Kök Hücreleri

Mide kanseri kök hücreleri ilk olarak Yang ve arkadaşları tarafından 2007 yılında keşfedilmiştir (Yang et al.). Mide kanseri kök hücrelerinin kökeni ile ilgili iki hipotez bulunmaktadır. Bunlardan birincisi; mide kanseri kök hücrelerinin mide kök hücrelerinden türemeleridir. İkincisi; mide kanseri kök hücrelerinin kemik iliğinden türemiş mezankimal kök hücrelerden türemeleridir. Mide kanseri kök hücrelerinin kemik iliğinden türeyen mezankimal kök hücrelerden oluştuğu hipotezi daha güçlüdür ve bu hipotezi destekleyen fareler üzerinde yapılan deneyler bulunmaktadır (Fu, Li, & Hao, 2017).

İnsan gastrik tümör örneklerinde ya da bu tür hücrelerin izolasyonunda KKH'lerin saptanması üzerine bildirilen çok az çalışma vardır (Jiang et al., 2012).

1.2.3. Mide Kanseri Kök Hücre Biyobelirteçleri

Kanser tedavileri için yapılan çalışmalar, tümör etiyojisi ile kanser kök hücrelerinin ilişkisine dayanmaktadır. Kanser kök hücrelerinin diğer tümör hücrelerinden ve normal kök hücrelerden ayrımını sağlamak için ilgilenilen kanser kök hücresine özgü spesifik yüzey biyobelirteçleri kullanılmaktadır.

Yakın zamanda laboratuvar ortamlarında hücrelerin VCR ile indüklenmesi sonucunda VCR'ye bağlı KKHBH'lerde hem simetrik hem de asimetric bölünmeler olduğu gösterilmiştir (Xue et al., 2012).

CD44, CD133, reseptör tirozin kinaz (RTK), aldehid dehidrogenazlar (ALDH) gibi birçok KKH belirteçleri yoğun tümörlerdeki KKH popülasyonunu tanımlamak için kullanılırlar (Ranji, Salmani Kesejini, Saedikhoo, & Alizadeh, 2016).

1.2.3.1. CD44

CD44, 1989'da klonlandı ve kartilaj bağlantı proteini ailesinin bir üyesi olarak tanımlandı (Zöller, 2011).

CD44, çeşitli bağışıklık ve kanser hücrelerinin dış yüzeyinde bulunan tip I transmembran reseptördür ve bu hücrelerin mikro ortamındaki değişiklikleri algılar ve buna cevap vermesine yardımcı olur (Liu & Finzel, 2014). CD44 melanom, meme, mide, yumurtalık ve baş boyun dahil olmak üzere bazı kanserlerin ilerlemesiyle ilişkilendirilen önemli bir yüzey hiyalüronan (HA) reseptörüdür. Aynı zamanda önemli KKH yüzey belirteçlerinden biridir (Ranji et al., 2016).

1.3. Hücre İçi Yolaklar

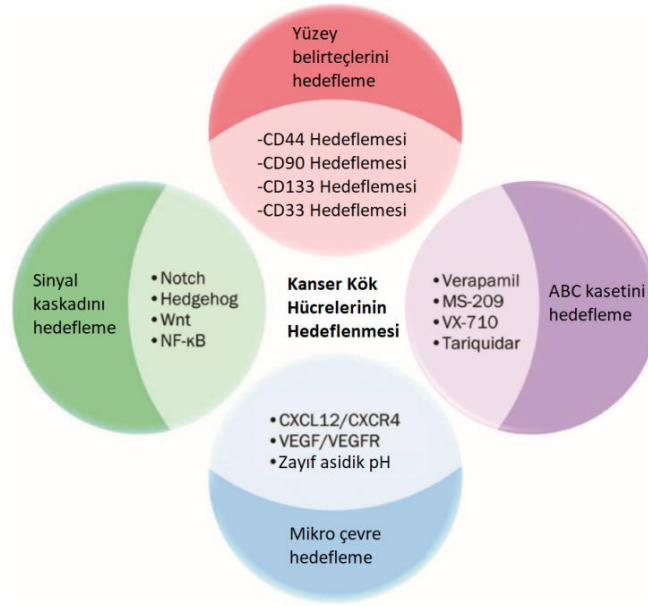
Bir hücrenin gelişimi, farklılaşması, bölünmesi ve ölmesi gibi tüm faaliyetleri hücre içi yolaklar tarafından gerçekleştirilir ve bu yolaklar hücre yaşamında anahtar görevindedir. Bu nedenle hücre içi yolaklar kanser kök hücrelerinde çok önemli bir yere sahiptir. Bu yolaklarda görev alan elementler hücrenin gelişimini, kendini yenilemesini, farklılaşmasını ve apoptozu düzenler. Özellikle hücre gelişimi ve

farklılaşmasında rol oynayan yolak ve elementler kanser kök hücrelerinde çok önemlidir. Kanser kök hücrelerinde önemli yere sahip hücre içi yolaklar Şekil 1.3'te gösterilmiştir.



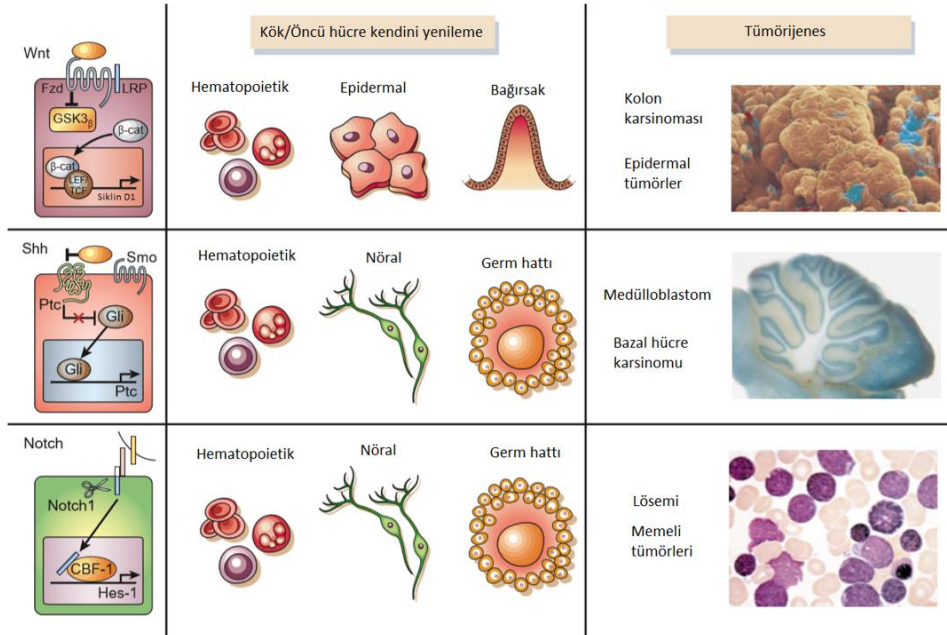
Şekil 1.3. Kanser kök hücrelerinde etkili hücre içi yolaklar (Chen et al., 2013).

Son yıllarda kanser kök hücrelerini ortadan kaldırmayı amaçlayan terapiler geliştirilmiştir. Dört farklı alanda özetlenebilen bu yöndeki mevcut popüler fikirler Şekil 1.4'te gösterilmiştir. KKH yüzey belirteçlerinin (kırmızı alan) seçici olarak hedeflenmesiyle daha doğru ve daha az yan etki elde edilebilir. Modern moleküler biyoloji tekniklerinin yardımı ile gittikçe daha önemli sinyal unsurları ve yolları ortaya çıkarılmıştır (yeşil alan). Anormal yollara müdahale ederek KKH'lerinin spesifik karakteristikleri bastırılmakta ve umut verici sonuçlar bildirilmektedir. Moleküler ilaçlar ABC kasetini (mor bölge) inhibe ederek üçüncü nesillere (tariquidar) ulaşmıştır. Buna ek olarak, KKH'lerin tümör mikro-çevresi de çok dikkat çekmektedir (mavi alan). Ayrıca kan damarlarının büyümesini kesmek ya da özel pH ortamını kullanmak da çekici ihtimalleri göstermiştir (Chen et al., 2013).



Şekil 1.4. Kanser Kök Hücrelerinin Hedeflenmesi (Chen et al., 2013).

Çok hücreli organizmaları düzenleyen ve çoğu doku için gelişme ve homeostazda kritik olan, evrimsel olarak oldukça iyi korunmuş az sayıda sinyal mekanizması vardır. Şekil 1.5'te gösterilen bu mekanizmalar, WNT yolağı, sonik hedgehog yolağı, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF β) yolağı ve Notch sinyal yolağıdır (Richards & Degan, 2009).

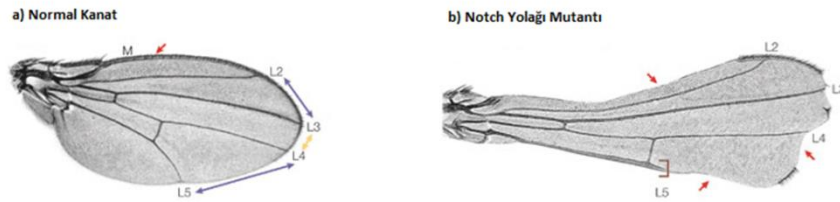


Şekil 1.5. Notch, Shh ve Wnt yolağının tümörogeneze etkisi (Tannishtha et al., 2001).

Sinyal yolları normal kök hücre gelişiminde ve dönüşüm sırasında kendini yenileme mekanizmalarını düzenlerler (Tannishtha et al., 2001).

1.3.1. Notch Sinyalizasyon Yolağı

Notch, ilk olarak Thomas Hunt Morgan tarafından keşfedilmiştir. *Drosophila melanogaster* üzerine yapılan bir çalışmada anormal kanat yapısına sahip sineklerin bu kanat yapılarının “çentik” (notched) kanatlı bir genin mutasyonlarından kaynaklandığı keşfedilmiş ve anormal kanat yapılarından ilham alınarak bu gen Notch olarak tanımlanmıştır (Andersson & Lendahl, 2014; Cheng Ting Chien, 2013). Normal ve mutasyonlu kanat yapıları Şekil 1.6’da gösterilmiştir.



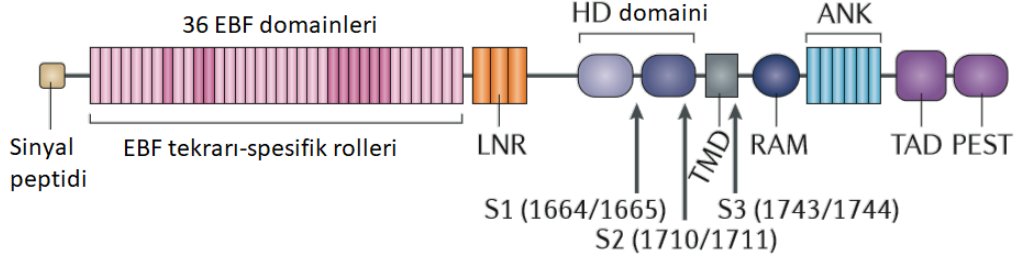
Şekil 1.6: *Drosophila melanogaster*'in normal ve Notch mutasyonlu kanat yapıları.

Notch sinyal yolağı; hücre-hücre etkileşiminde, gen ekspresyonunda, hücre yaşayabilirliğinde, hücre farklılaşmasında, hücre kaderinin kontrolünde ve kök hücre popülasyonunun devamlılığında kritik bir role sahiptir (Andersson & Lendahl, 2014; Mailhos et al., 2001). Notch yolağı ayrıca tümör oluşumunun kontrolünde önemli bir rol oynar. Tümör hücrelerinde aktif Notch reseptörü prodüktif tümör damarlanmalarında ve tümör büyümesinin gelişiminin indüklenmesinde işlev görür (Scihick A, 2008).

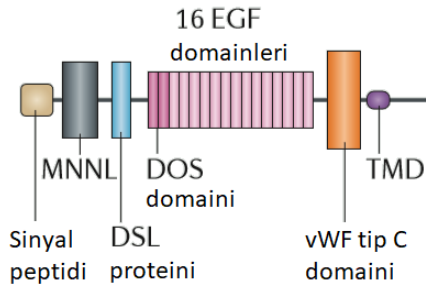
Şekil 1.7’de yapısı gösterilen Notch geni tek geçişli transmembran reseptörüdür. Sinyale yani liganda bağlanan ekstraselüler domain ve spesifik bölünmeler sonucu nükleusa transfer edilen intraselüler domain olmak üzere iki kısımdan oluşur (“Notch / Delta Yolağı Notch / Delta Yolağı,” n.d.). Ekstraselüler domaininde, yük ligand etkileşimini sağlayan 36 epidermal büyüme faktörü (EBF)-benzeri tekrarlar, intraselüler ve ekrtaselüler domain arasındaki etkileşimi sağlayan 3

juxtamembran tekrarları ve Lin-12-Notch (LN) olarak bilinen tekrarlar bulunmaktadır. İntraselüler domainde, iki ucunda nükleer lokalizasyon sinyali bulunan 7 ankyrin tekrarları, prolinc, glutamin, serin ve treonince zengin PEST domaini ve transaktivasyon domaini (TAD) bulunmaktadır.

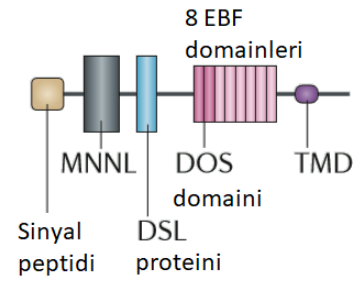
Notch reseptörleri (Notch 1)



Notch Ligant (JAG1)



Notch Ligant (DBL1)

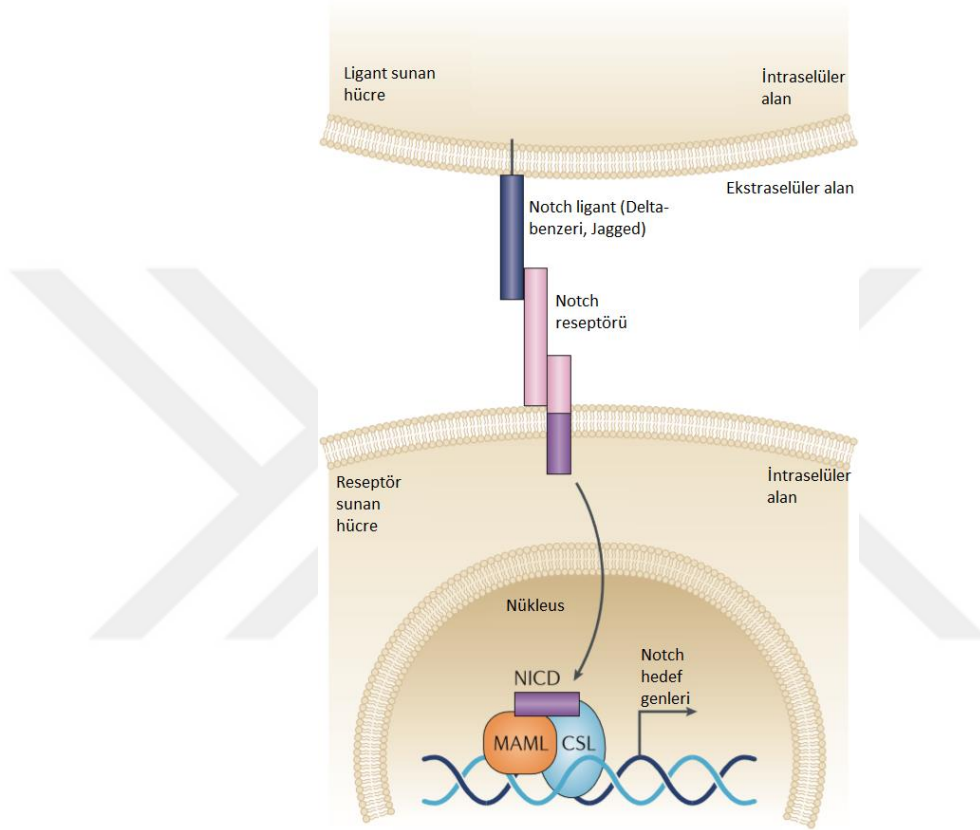


Şekil 1.7: Notch reseptör ve ligantlarının yapıları (andersson2014).

Memelilerde, beş standart (DBL1, DBL2, DBL4, Jagged1, Jagged2) ligant ve dört tek geçişli transmembran reseptörü (Notch1, 2, 3, 4) içeren Notch sinyal yolağı tümör neovaskülarizasyonu ile ilişkilidir (Kamikihara et al., 2012). Notch ligantlarının yapısı Şekil 1.7’de gösterilmiştir. Ayrıca Notch ligandı ve reseptör ailesinin de damar-spesifik ekspresyonu sergilediği yakın zamanda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Fischer, Schumacher, Maier, Sendtner, & Gessler, 2004). Bunların arasından DBL4, tümör bağımlı anjiyogenezle aşırı derecede ilişkilidir. DBL4’ün susturulması durumunda üretken olmayan tümör damarlanmalarının oluştuğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Mailhos et al., 2001).

Notch geni S1, S2 ve S3 bölgelerinden gerçekleşen 3 adet kırılma sonrası işlev kazanır. S1 bölgesindeki kırılma Notch reseptörünün oluşumu sırasında gerçekleşir. Reseptör-ligand etkileşiminin sağlanmasının ardından S2 bölgesinde

ADAM metalloproteazlar tarafından kesim gerçekleşir. Notch reseptör ve ligant etkileşimi Şekil 1.8’de gösterilmiştir. Bu kırımın ardından S3 bölgesinde γ -sekretaz tarafından kesim gerçekleşir. Bu 3 kırılmanın sonucunda hücre içinde serbest kalan NICD bölgesi hücre çekirdeğine gider ve hedef genlerin yazılımını sağlar (“Notch / Delta Yolağı Notch / Delta Yolağı,” n.d.).



Şekil 1.8: Notch-ligant etkileşimi ve nükleustaki yeri (Andersson & Lendahl, 2014).

HES (hairy and enhancer-of-split) ailesi genleri (*HES1*, *HES5*) ve *HEY* (Hes-related repressor) ailesi genleri (*HEY1*, *HEY2*) *Drosophila* genlerinin memeli karşılığı olup Delta-Notch sinyal yolağının ana hedef genleridir. Bunlar temel heliks-loop-heliks (bHLH) transkripsiyon faktörleridir (Fischer et al., 2004).

Notch 1 sinyal yolağı mide kanserinin ilerleyişini regüle eder (Yeh et al., 2009).

Delta-Notch sinyal yolu, çoğu omurgalı organın gelişiminde merkezi bir rol oynamaktadır. bHLH transkripsiyon faktörlerinden Hey ailesi Notch

sinyalizasyonunun hedef genlerindedir ve damarlanmada görev almaktadır (Fischer et al., 2004).

1.3.2. DBL4-Notch Sinyalizasyonu

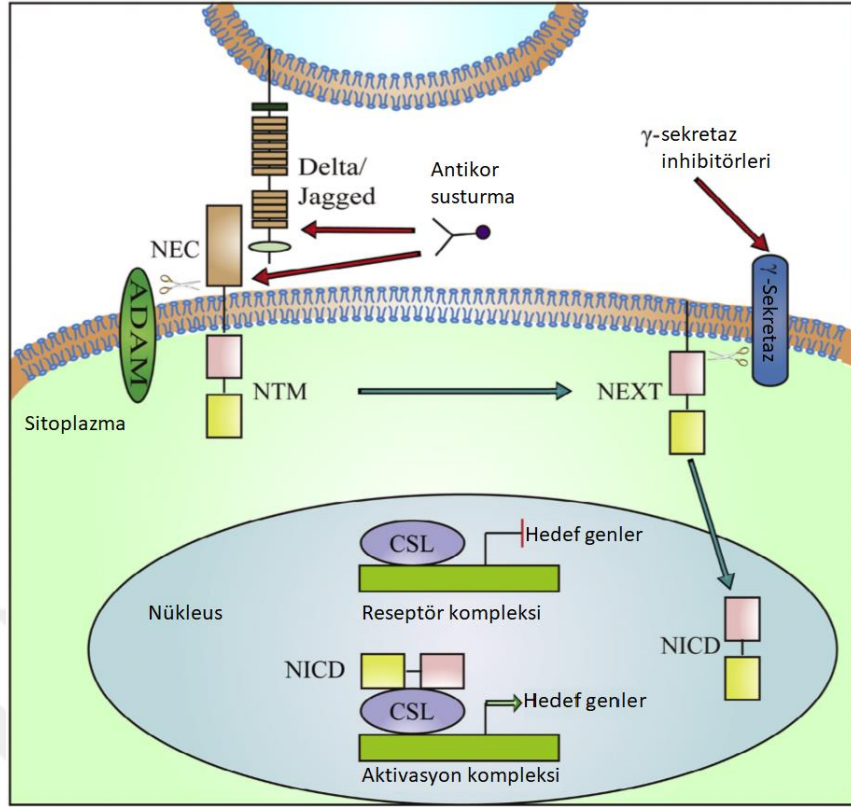
DBL4, birçok damar gelişimi ile ilişkilendirilmiş Notch ligantlarından biridir. DBL4, büyük damar kusurlarına ve embriyonik ölüme yol açan tek genidir. DBL4/Notch sinyal yolağı sadece embriyonik damarlanmayı kontrol etmez, aynı zamanda tümör anjiyogenezini de kontrol eder (Lee et al., 2016).

DBL4 Notch yolağının aktivasyonunu düzenleyen ligantlardan biridir ve ekspresyonu tümör anjiyogenezi ve metastaz ile ilişkilidir (Z.-F. et al., 2017). DBL4 böbrek kanseri, mide kanseri, akciğer kanseri, mesane kanseri, pankreas kanseri, kolorektal kanser ve meme kanseri gibi birçok insan kanserlerinde yüksek oranda eksprese edilir (Lee et al., 2016).

1.3.3. DBL4 ve Anjiyogenez

Notch yolağının antikor ile susturulması durumunda Notch aktivasyonu için gerekli kırılmalar, beraberinde aktif bölgenin nükleusa geçişi ve sonucunda hedef genlerin yazılımı gerçekleşemez. Bu durum Şekil 1.9'da gösterilmiştir.

DBL4, tümör hücrelerinde Notch sinyalini aktive eder, sinyal sonucunda kan damarlarının boyutu artar ve tümörlerdeki vasküler işlev yükselir. Tümör büyümesinin teşvik edilmesi, bir dereceye kadar, tümör hipoksisinin ve apoptozun azaltılmasına bağlıdır (Li et al., 2007). Demcizumab, Notch yolağını durduran birinci sınıf anti-DBL4 antikorudur. DBL4 ve hedef genleri anjiyogenezde önemli bir role sahip olduğundan tümörlerde bu yolağı hedef alan antianjiyogenik çalışmalar yapılmaktadır (D. C. Smith et al., 2014).



Şekil 1.9: Noch reseptörünün susturulmasının hedef genlerdeki etkisi (Yuan et al., 2015).

1.4. Kanser Tedavi Yöntemleri

Günümüzde kanser tedavisini gerçekleştirmek amacıyla uygulanan çeşitli kanser tedavisi vardır. Kanserli bazı insanlara bu tedavilerden sadece birinin uygulanması yeterlidir. Ancak çoğu insana, kemoterapi ve/veya radyoterapi ile cerrahi yöntemler gibi tedavilerin kombinasyonu uygulanmaktadır (NCI, 2018).

Cerrahi yöntemler, kanser tedavisinde kanserin vücuttan uzaklaştırıldığı bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Radyoterapi, kanser hücrelerini öldürmek ve tümörleri küçültmek için yüksek dozda radyasyon kullanan kanser tedavisinin bir türüdür. Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek için ilaçlar kullanan bir çeşit kanser tedavisidir. İmmünoterapi, bağışıklık sisteminin kanserle savaşmasına yardımcı olan bir tedavi türüdür. Hedeflenen tedavi, kanser hücrelerindeki büyümeleri, bölünmelerini ve yayılmalarını sağlayan değişiklikleri hedef alan kanser tedavisinin bir türüdür. Hormon tedavisi, büyümek için hormon kullanan meme ve prostat kanserlerinin büyümesini yavaşlatan veya durduran bir tedavidir. Kök hücre nakilleri, çok yüksek dozlarda kemoterapi veya radyoterapi ile tahrip olan kanser

hastalarında kan yapan kök hücrelerini eski durumuna getiren prosedürlerdir. (NCI, 2018).

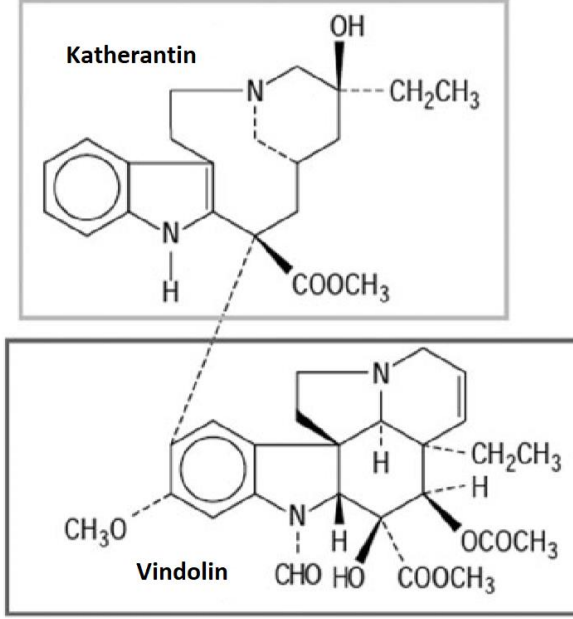
1.5. Vincristine

Vincristine (VCR), Pervane Çiçeği diğer adları Madagaskar Periwinkle ve *Cathartus Roseus* olarak bilinen bitkide bulunan bulunan bir vinca alkaloididir. Çeşitli kanserleri tedavi etmek için yaygın olarak bir anti kanser ilacıdır (Mohammadgholi, Rabbani-Chadegani, & Fallah, 2013).

VCR başlangıçta, yaygın olarak yetiştirilen beyaz veya pembe renkte Pervane Çiçeği bitkisi olan *Cantharanthus roseus*'un ekstraktlarının potansiyel antidiyabetik özelliklerini araştıran bir tarama programında keşfedilmiştir (Johnson, Armstrong, & Gorman, 1963; Noble, Beer, & Cutts, 1958).

VCR, hücre döngüsüne etki eden ve aktif olarak kullanılan bir anti kanser ilacıdır. Vindolin ve katherantin denilen iki çoklu halkadan oluşur (Mohammadgholi et al., 2013). Bu yapı Şekil 1.10'da gösterilmiştir.

Geniş çaplı araştırmalar sonucunda VCR'nin etki mekanizması keşfedilmiştir Bu çalışmalar VCR'nin Vinca bölgesi olarak bilinen GTP bağlanma alanına komşu bir bölgede b-tübülün ile etkileşerek (Mohammadgholi et al., 2013) mitoz geçiren hücrelerin mikrotübül depolimerizasyonuna, sonucunda metafazın durmasına ve apoptotik ölümüne neden olduğunu ortaya koymuştur (Gidding, Kellie, Kamps, & De Graaf, 1999). Kromozomları hizalamak ve taşımak için görevli iğ mikrotübüllerinin oluşumunu hücre mekanizmasını devre dışı bırakarak engeller (Mohammadgholi et al., 2013).



Şekil 1.10. Vincristine'in kimyasal yapısı (Mohammadgholi et al., 2013).

Tubulin, mitotik iğ mikrotübüllerinin normal polimerizasyonu için gereklidir. Vasküler mikrotübüllere bağlanan VCR, iğlerin yapısını ve işlevini konsantrasyona bağlı olarak değiştirir. VCR Düşük konsantrasyonlarda, kromozom ayrımını önleyen, metafazı durduran ve mitoz inhibisyonuna neden olan iğ aparatını stabilize eder. Daha yüksek VCR konsantrasyonlarında, mikrotübüllerin bozulması ve toplam depolimerizasyon gözlemlenmiştir. Kısa süreli VCR uygulamasında mitotik duraklama hücre için geri dönüşümlüdür, ilacın hücreden çıkartılması durumunda hücre döngüsü normal şekilde ilerleyebilir. Buna karşılık, hücrelerin yüksek konsantrasyonlarda VCR'ye uzun süreli maruz kalması ölümcül sitotoksositeye neden olur (Takano, Okudaira, & Harmon, 1993).

VCR'nin antitümör aktivitesi ayrıca antivasküler ve antianjiyojenik özellikleri de içerebilir. *In vitro* olarak yapılan çalışmalarda VCR'nin, vaskülatör endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiyojenik faktörlerinin normal ve ilaç dirençli insan tümör hücreleri tarafından salgılanmasını önlediği, endotel hücre kültürü analizlerinde proliferatif aktiviteyi ve kılcal damar ağlarının oluşumunu engellediği ve matrigel analizlerinde tümör hücrelerinde migrasyon aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (Hayot et al., 2002; Silverman & Deitcher, 2013).

2.AMAÇ

Kanser kök hücreleri (KKH) tümörü oluşturan hücre popülasyonunun oluşumu, gelişimi ve devamlılığında önemli rolü olan hücrelerdir ve birçok kanser türünde tanımlanmışlardır. KKH'leri kanser başlangıcı, progresyon, metastaz özelliklerine ve ilaç direncine sahiptir (Chen et al., 2013).

Kanser terapilerinden sağ kalan kanser kök hücreleri direnç geliştirirler (Xue et al., 2012). Bu nedenle kanser kök hücrelerine karşı etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi kanser hastalığına karşı verilen savaşın kazanılmasında etkili olacaktır. Vincristine güçlü bir anti kanser ilacıdır ve hayvan tümörlerinde geniş vasküler hasara neden olduğu bilinmektedir (Hayot et al., 2002).

Notch sinyal yolağı; hücre-hücre etkileşiminde, gen ekspresyonunda, hücre yaşayabilirliğinde, hücre farklılaşmasında ve kök hücre popülasyonunun devamlılığında kritik rol oynar (Andersson & Lendahl, 2014; Mailhos et al., 2001). Memelilerde, beş standart (DBL1, DBL2, DBL4, Jagged1, Jagged2) ligant ve dört tek geçişli transmembran reseptörü (Notch1, 2, 3, 4) içeren Notch sinyal yolağı tümör neovaskülarizasyonu ile ilişkilidir (Kamikihara et al., 2012). Ayrıca DBL4-Notch1 etkileşiminin hedefinde damar spesifik ekspresyonu ile bilinen HEY ve HES ailesinin üyeleri olduğu yakın zamanda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Notch ligantları arasından DBL4, tümör bağımlı anjiyogenezle aşırı derecede ilişkilidir (Fischer et al., 2004).

DBL4'ün inhibisyonu sonucunda üretken olmayan tümör damarlanmalarının oluştuğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Mailhos et al., 2001). Ancak Vincristine ile indüklenerek zenginleştirilmiş kanser kök hücrelerinde DBL4 inhibisyonuna dair bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca kanser hücrelerinde kemoterapik ajan olan VCR ve DBL4 inhibitörünün beraber uygulanması sonrası anjiyogenezde önemli bir role sahip DBL4-Notch1 sinyal yolağının hedef genleri olan HEY ve HES ailesi genlerinin ekspresyonlarına bakılmamıştır. Literatürde mide kanseri hücrelerinin Vincristine gibi kemoterapik ajanlarla indüklenmesi ile mide kanseri kök

hücrelerinin elde edildiği ve elde edilen bu hücrelerin farklılaştırılması sonucunda damar benzeri yapıların oluşumunun gözlemlendiği çalışmalar bulunmaktadır (Xue et al., 2012). Fakat elde edilen bu yapılara sahip hücrelerde DBL4-Notch yolağının ve hedef genlerinin ifadesinin tespiti ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır.

Tüm bunlara bağlı olarak bu çalışmada ilk defa mide kanseri hücre hattı olan AGS ve MKN45 hücrelerinde VCR ile DBL4 inhibitörü olarak anti-DBL4 antikorunun kombine uygulamasının KKHBH'lerde vasküler yapıların üzerindeki morfolojik ve moleküler düzeydeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Öncelikle mide kanseri hücre hatlarında KKHBH'lerin varlığını tespit edebilmek için VCR'nin tek başına ve anti-DBL4 kombinasyonu ile uygulanması sonucu dirençli hücrelerde bir mide kanseri kök hücre biyobelirteci olan CD44 geninin ekspresyon seviyelerinin değişimlerinin incelenmesi düşünülmüştür. VCR ile muamele edilerek elde edilen KKHBH'lerin morfolojik olarak sferoid oluşumunun incelenmesi, farklılaştırılması ve farklılaştırma sonucu damar benzeri yapıların elde edilmesi, VCR indüklemesi sonucu elde edilen mide KKHBH'lere anti-DBL4 uygulaması yapılarak damar benzeri yapılardaki değişimin incelenmesi amaçlanmıştır. Moleküler düzeyde ise DBL4-Notch1 etkileşimi sonucu damar spesifik ekspresyonu ile literatüre geçmiş olan HEY1, HEY2, HES1, HES5 genleri ve ayrıca aynı yolağın hedef geni olan p21 geninin ekspresyon seviyelerinin kantitatif gerçek zamanlı PZR ile incelenmesi hedeflenmiştir.

Bu bağlamda, çalışmamız ilk defa VCR ile anti-DBL4'ün kombine uygulamasının erken veya geç evre kanserlerde kanser kök hücrelerini hedef alan tedavi yöntemlerinin oluşturulabilmesi yönünde fikir vermesi açısından bir ön çalışma ve örnek niteliği taşımaktadır.

3.MATERYAL

3.1. Araştırmada Kullanılan Biyolojik Örnekler

Bu çalışmadaki mide adenokarsinoma hücreleri; AGS ve MKN45 Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC) alınmıştır. Çalışmadaki kontrol grubu fibroblast hücreleri; dH1f hücreleri donmuş olarak okulumuzda bulunmaktadır. Tez alışması boyunca bu hücrelerin kültürleri kullanılmıştır ve her hücre uygun besiyerinde büyütölmüştür.

1.2 Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, markaları ve kullanım alanları izelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1: Kimyasallar

Kimyasallar	Marka	Kullanım Alanı
Absolute ethanol	Sigma-Aldrich	Genel
2-merkaptoethanol	Merck	RNA izolasyonu
Molecular Biology Grade ethanol ≥ 99.8	Sigma-Aldrich	Genel
DMEM	Thermo Fisher	Hücre kültürü
DMEM F12	Thermo Fisher	Hücre Kültürü
RPMI-1640	Thermo Fisher	Hücre Kültürü
Penicilin Streptomisin	Thermo Fisher	Hücre kültürü
FBS (Fetal Bovine Serum)	Thermo Fisher	Hücre kültürü
PBS (Phosphate Buffer Saline)	GİBCO	Hücre kültürü
Trypsin	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	Sigma-Aldrich	Hücre kültürü
Epidermal Growth Factor (EGF)	PepröTech	Hücre kültürü
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	PepröTech	Hücre kültürü
Gelatin (1890)	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü

Vincristine	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
Anti-DLL4 antibody (ab7280)	Abcam	Hücre Kültürü

1.3 Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, markaları ve kullanım alanları Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2: Cihazlar

Cihazlar	Marka	Kullanım Alanı
Finnpipette™ F2 Variable Volume Single-Channel Pipettes	Thermo Fisher	Hücre Kültürü
-80 Buzdolabı	Haier-Biomedikal	Genel
Hassas Terazi	Precisa XB220A	Genel
Distile Su Cihazı Barnstead™ Smart2Pure™	Thermo Fisher	Genel
Dik Tip Otoklav	BES	Genel
Mini Spin Plus Mikrosantrifüj	Eppendorf	Genel
Manyetik Karıştırıcı MR3001K	Heidolph	Genel
Thermal cycler T100™ PCR	BioRad	PCR reaksiyonları
CFX Connect™ Real-Time PCR System	BioRad	PCR reaksiyonları
Minisipin	Four E’S Scientific	Genel
MultiSkan™ GO µDrop	Thermo Fisher	RNA izolasyonu ve MTT ölçümü
Laminar Flow	Faster SafeFast Classic	Hücre Kültürü
Dri-block DB-2D	Techne	
AF 80 Buz Cihazı	Scotsman	Genel
Universal 320 R Santrifüj Cihazı	Hettich	Genel
Vorteks	Heidolph Reax top	Genel
Su banyosu WNB 14	Memmert	Hücre Kültürü
İnkübaktör INCO2	Memmert	Hücre Kültürü
Azot Tankı	Thermo Fisher	Hücre Kültürü
pH Metre Table top	İsolab	Genel

Etüv FN 500	NÜVE	Genel
AXIO invert Vert.A1 mikroskop	Zeiss	Hücre Kültürü
CK40 ışık mikroskobu	Olimpus	Hücre Kültürü
S1 Pipet Filler	Thermo Fisher	Hücre Kültürü
SafeVac Vacuum Aspirator	SCIOGEX	Hücre Kültürü

1.4 Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler, markaları ve kullanım alanları Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3: Sarf Malzemeler

Sarf Malzemeler	Marka	Kullanım Alanı
Filtreli uç (10µl, 120µl,200µl 1000µl)	İsolab	Hücre Kültürü
Pipet ucu (10µl, 200µl, 1000µl)	İsolab	Hücre Kültürü
Eppendorf (0.5ml, 1.0ml, 1.5ml, 2.0ml)	Axygen	Hücre Kültürü
PCR tüpü (0.2ml)	Axygen	Genel
Falcon (15ml, 50ml)	Isolab	Genel
Cryo tüp (2ml)	Greiner Bio-one	Hücre Kültürü
Rack	İsolab	Genel
Platemax® UltraClear Sealing Film	Axygen	PCR Reaksiyonları
PCR ® Microplate	Axygen	PCR Reaksiyonları
PCR ® Stripe Tubes	Axygen	PCR Reaksiyonları
Parafilm	BEMIS	Genel
Erlen (250ml, 500ml, 2000ml)	Isolab	Genel
Mezür (50ml, 500ml, 1000ml)	Isolab	Genel
Flask (25cm²,75cm²)	Corning (Sigma-Aldrich)	Hücre Kültürü
Corning Dish (150cm²)	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
Cam pastör pipet	Marienfeld	Hücre Kültürü
Corning® Costar® Stripette® serological pipettes (5ml-10ml-25ml-50ml)	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
Beher	Isolab	Genel
Eldiven	Beybi	Genel

Corning® 150mL Vacuum Filter	Sigma-Aldrich	Hücre Kültürü
Thoma lamı	Marienfeld	Hücre Kültürü

1.5 Kullanılan Kitler

Tez çalışmasında kullanılan kitler, markaları ve kullanım alanları Çizelge 3.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4: Kullanılan Kitler

Kitler	Marka	Kullanım Alanı
NucleoSpin® RNA	Machery-Nagel	mRNA izolasyonu
cDNA Synthesis Mix	Sigma-Aldrich	cDNA sentezi
SensiFAST SYBR® No-ROX Kit	Bioline	Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu
MTT analizi Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche	MTT analizi

1.6 Hücre Hatları Büyüme Ortamları

Deney sırasında hücrelerin büyütüldükleri tüm ortam ve bileşenlerinin oranları Çizelge 3.5’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5: Hücre hatlarının büyütülme ve dondurma ortamları

AGS Hücre Hattı	Oranlar
Büyütme Medyumu	
DMEM/F12	% 89
FBS	% 10
Penicilin Streptomisin	% 1
Dondurma Medyumu	
DMEM/F12	% 50
FBS	% 40
DMSO	% 10
MKN45 Hücre Hattı	Oranlar
Büyütme Medyumu	
RPMI-1640	% 89
FBS	% 10

Penicilin Streptomycin	%1
Dondurma Medyumu	
RPMI-1640	%50
FBS	%40
DMSO	%10
Penicilin Streptomycin	%1
dH1f Hücre Hattı	Oranlar
Büyütme Medyumu	
dH1f Hücre Hattı	Oranlar
DMEM	%89
FBS	%10
Penicilin Streptomycin	%1
Dondurma Medyumu	
DMEM	%50
FBS	%40
DMSO	%10
Farklılaşma Medyumu	Oranlar
DMEM/F12	%89
FBS	%10
Penicilin Streptomycin	%1
bFGF	10ng/ml
Sferoid Medyumu	Oranlar
DMEM/F12	%89
Penicilin Streptomycin	%1
bFGF	10ng/ml
EGF	10ng/ml

3.7. Primerler

Bu çalışmada kullanılan primerler Primer BLAST, Primer3, UCSC Genome Browser ve IDT programları kullanılarak dizayn edilmiştir.

100µM İleri (F) Primer (Sentromer)

100µM Geri (R) Primer (Sentromer)

Çalışmada kullanılan primer dizileri Çizelge 3.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6: RT-PCR’da kullanılan primerler

Gen İsimleri	5’-3’
CD44	
İleri primer	CGCCAAACACCCAAAGAAGA
Geri primer	TTCCTGCTTGATGACCTCGT
GAPDH	
İleri primer	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
Geri primer	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
DLL4	
İleri primer	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
Geri primer	CCGACACTCTGGCTTTTCAC
HEY1	
İleri primer	GGCAGGAGGGAAAGGTTACT
Geri primer	GCGTAGTTGTTGAGATGCGA
HEY2	
İleri primer	CTCTCTTGTCCTCTCTGCC
Geri primer	GACTGGACGTGGCTGATACT
HES1	
İleri primer	CTGGAGAAGGCGGACATTCT
Geri primer	GGTCATGGCATTGATCTGGG
HES5	
İleri primer	CCGCATCAACAGCAGCATC
Geri primer	TGCAGGCACCACGAGTAG
P21	
İleri primer	CACCGAGACACCACTGGAG
Geri primer	AGGCACAAGGGTACAAGACA

4.YÖNTEMLER

4.1. Hücre Hatlarının Kültürü

Mide adenokarsinoma hücreleri; AGS ve MKN45 Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC) alındı. Çalışmadaki kontrol grubu fibroblast hücreleri; dH1f hücreleri kullanıldı. Tez çalışması boyunca bu hücrelerin kültürleri kullanıldı ve her hücre uygun besiyerinde büyütüldü.

4.2. Hücrelerin Çözülmesi

Hücrelerin patlamaması amacıyla çözme işleminin çok hızlı yapılması gerekmektedir. -196°C'de sıvı azottan çıkarılan hücreler direk 37°C'de su banyosunda yaklaşık 1-2 dakika bekletilerek çözüldü. Son kristal yapının görülmesinin ardından 37°C'de ısıtılmış ve 15'lik farklonda önceden hazırlanmış 5ml besiyeri içerisine dikkatlice karıştırıldı ve 4°C 400g'de 5dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant atıldı, pellet üzerine 1 ml Complete Medyum konuldu, pipetaj yapılarak hücrelerin homojen olarak çözülmesi sağlandı. Çözeltiden 10ul alındı ve Thoma lamına konularak ışık mikroskopunda hücreler sayıldı.

$$\text{Hücre sayısı / mL} = \text{Hücre sayısı (tüm lam üzerinde sayılan)} \times 10^4$$

Sayım sonrası hücreler istenilen yoğunlukta büyütülecekleri flaska ekildi. Hücrelerin kap içerisinde eşit yoğunluklarda dağılması amacı ile kap yavaşça yukarı, aşağı, sağa ve sola hareketleri yapılarak dikkatlice çalkalandı. Hücreler 37°C %5 CO₂ inkübatöre kaldırıldı.

4.3. Hücrelerin Büyütülmesi ve Pasajlanması

Her hücrenin büyümek için ihtiyaç duyduğu farklı ortamlar vardır. Çalışmada kullanılan hücrelere özel medyumlar Çizelge 3.5'te gösterildi. Her hücrenin büyütüleceği medyumlar tek tek hazırlandı ve 0.22 µm'lik filtreden geçirildi.

Hücrelerin 3 günde 1 medyumunu değiştirildi ve %70-90 yoğunluğa ulaşıldığında pasaj işlemi gerçekleştirildi.

Pasaj işlemi için hücre medyumunu aspiratör ile çekilerek uzaklaştırıldı, hücreler iki defa PBS ile yıkandı. PBS çekildi ve hücrelerin büyütüldükleri kaba bağlı hacimde Tripsin-EDTA eklenerek hücreler 37°C %5 CO₂ inkübatörde 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücrelerin kalkıp kalkmadıkları mikroskopta incelendi. Hücreler tam olarak kalkmadılarsa flaska vurularak mekanik kuvvet uygulandı. Kalkan hücreler bir araya toplandı ve üzerlerine tripsin inaktivitesi için büyüme medyumunu eklendi. Flask bir iki kez büyüme medyumunu ile yıkanarak hücreler faklona toplandı ve 24°C 300g'de 5dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant atıldı, Pellet üzerine 1 ml Complete Medyum konuldu, pipetaj yapılarak hücrelerin homojen çözülmesi sağlandı. Çözültiden 10µl alındı ve Thoma lamına konularak ışık mikroskobunda hücreler sayıldı. Sayım sonrası hücreler istenilen yoğunlukta büyütülecekleri flaska ekildi. Hücrelerin kap içerisinde eşit yoğunluklarda dağılması amacı ile kap yavaşça yukarı, aşağı, sağa ve sola hareketleri yapılarak dikkatlice çalkalandı. Hücreler 37°C %5 CO₂ inkübatöre kaldırıldı.

Hücrelerin çözülmesi ve pasaj sonrası hangi malzemeye ne oranda ekildiği, o malzemeden elde edilecek maksimum hücre sayısı, kullanılacak medyum, tripsin ve PBS miktarları Çizelge 4.1'de gösterildi. Tüm kimyasallar hücrelere tek kullanımlık steril serolojik pipetlerle verildi.

Çizelge 4.1: Hücrelerin ekim koşulları ve kullanılan malzemeler.

	Ekim Oranı	Max Hücre	Medyum	Tripsin	PBS
6-Well Plate	10x10 ⁴	4.2x10 ⁵	2ml	0,5ml	1ml
150 Dish	1x10 ⁶	15x10 ⁶	22ml	3ml	6ml
T-25 Flask	1x10 ⁵	2.5x10 ⁶	5ml	1ml	2ml
T-75 Flask	5x10 ⁵	7.2x10 ⁶	15ml	2ml	5ml
T-175 Flask	1.5x10 ⁶	17.5x10 ⁶	25ml	5ml	10ml

4.4. Hücrelerin Dondurulması

İlk olarak hücrelerden medium uzaklaştırıldı ardından iki defa PBS ile yıkandı. PBS çekildi ve hücrelerin büyütüldükleri kaba bağlı hacimde Tripsin-EDTA eklenerek hücreler 37C %5CO₂ inkübatörde 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücrelerin kalkıp kalkmadıkları mikroskopta incelendi. Hücreler tam olarak kalkmadıysa flaska vurularak mekanik kuvvet uygulandı. Kalkan hücreler bir araya toplandı ve üzerlerine tripsin inaktivitesi için büyüme medyumunu eklendi. Flask bir iki kez büyüme medyumunu ile yıkanarak hücreler faklona toplandı ve 24°C 300g'de 5dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant atıldı, pellet üzerine 1 ml soğuktan korunma amaçlı DMSO ve zengin besin içeren %10DMSO, %40FBS, %50 Medyum içeren dondurma medyumunda çözülerek kriyo tüpe aktarıldı. DMSO toksik etkiye sahip olduğundan en son ve yavaş bir şekilde eklendi. Ardından hücreler -80°C'de bir gece bekletildi ve sonrasında -196°C sıvı azota kaldırıldı. Her dondurma işleminde ml'de yaklaşık 5 milyon hücre donduruldu. Dondurulan hücreler gerektiği durumlarda tekrardan açılarak kullanıldı.

4.5. MTT Analizi İle Hücre Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

MTT analizi, 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromürün (MTT) canlı hücreler tarafından mor formazan kristallerine dönüştürülmesine dayanan, mitokondriyal aktiviteyi belirleyen bir analiz yöntemidir. Çoğu hücre popülasyonu için toplam mitokondriyal aktivite canlı hücrelerin sayısı ile ilişkili olduğundan bu tahlil, ilaçların hücre hatları veya birincil hasta hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik etkilerini ölçmek için genel olarak kullanılır (Jafargholizadeh, Zargar, Yassa, & Tavakoli, 2016).

Çalışmada kullanılan kimyasalların hücre hatları üzerindeki toksik etkisi MTT yaşayabilirlik analizi ile belirlendi. MTT analizi Cell Proliferation Kit I (MTT) kiti protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Hücreler kuyu başı 30.000 hücre olacak şekilde 96-well plate'e ekildi. Hücrelerin oturmaları ve büyümeleri için 24 saat beklendi. 24 saatin ardından hücre medyumunu aspirasyonla uzaklaştırıldı ve hücrelere ilgili dozajlarda ilaç uygulandı.

MTT analizi için hücrelerin 96-well plate kuyularına ekim şekilleri,

uygulanan ilaç dozajları Çizelge 4.2’de gösterildi. İlgili dozajların 24, 48 ve 72 saat sonrası toksisitesi incelendi. İstenilen saate gelindiğinde ilaç uygulanmış hücrelerin üzerine 10µl MTT Labeling Reagent eklendi ve 4 saat 37C %5 CO₂’de inkübe edildi. 4 saat inkübasyonun ardından kuyulara 100µl MTT Solubilisation Solution eklendi ve bir gece 37°C %5 CO₂’de inkübe edildi. İnkübasyonun ardında mikropilaka okuyucuda (Biorad) 570 nm’de kolorimetrik olarak okuma gerçekleştirildi ve ScanIt RE 4.1 programında sonuçlar alındı.

Çizelge 4.2. MTT uygulaması

Kontrol	0,5 µg/ml VCR	1 µg/ml VCR	1,5 µg/ml VCR	2 µg/ml VCR	BLANK
Kontrol	0,5 µg/ml VCR	1 µg/ml VCR	1,5 µg/ml VCR	2 µg/ml VCR	BLANK
Kontrol	0,5 µg/ml VCR	1 µg/ml VCR	1,5 µg/ml VCR	2 µg/ml VCR	BLANK
Kontrol	100 ng/ml anti-DBL4	50 ng/ml anti- DBL4	25 ng/ml anti- DBL4	5 ng/ml anti- DBL4	BLANK
Kontrol	100 ng/ml anti-DBL4	50 ng/ml anti- DBL4	25 ng/ml anti- DBL4	5 ng/ml anti- DBL4	BLANK
Kontrol	100 ng/ml anti-DBL4	50 ng/ml anti- DBL4	25 ng/ml anti- DBL4	5 ng/ml anti- DBL4	BLANK

Her 3 hücre tipi için de bu uygulama yapıldı. Uygulamalar tabloda da gösterildiği gibi 3 tekrarlı olarak ve 24, 48 ve 72 saat gerçekleştirildi. Kontrol grubunda uygulama yapılmamış hücreler bulunmaktadır. Blank grubunda ise yalnızca hücrelere ait büyüme medyumunu bulunmaktadır.

4.6. Vincristine ve anti-DBL4 Uygulaması

Toz halindeki 1mg Vincristine, 1ml otoklavlanmış ve filtreden geçirilmiş distile su ile çözüldü ve hücrelere son konsanrasyon 1µg/ml olacak şekilde verildi.

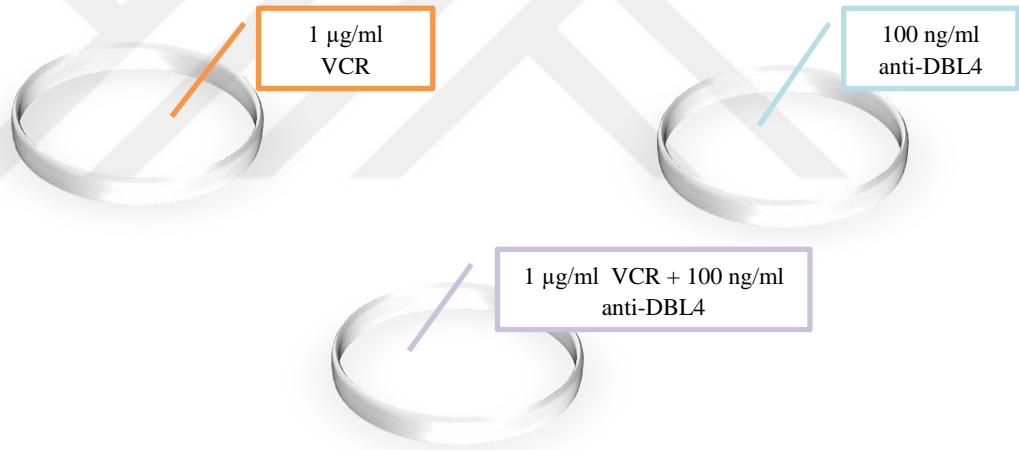
Hücreler istenilen miktara ulaştıklarında işleme geçilmek üzere pasajlandı. Thoma lamında hücre sayımının ardından hücreler Çizelge 4.3’te belirtildiği şekilde ekim yapıldı.

Çizelge 4.3: İlaç uygulamasında kullanılan malzemeler ve ekilen hücre sayısı

	Adet	Ekilen hücre Sayısı
150 Dish	3	6×10^6
6-Well	4	5×10^4
6-Well	1	$5 \times 10^4 / 3 \times 10^5$
T25	6	1×10^6
96-Well	3	3×10^4

Hücreler ekildikten sonra 37C %5 CO² inkübatöre kaldırıldı. Hücrelerin oturmaları ve büyümesi için 24 saat beklendi. 24 saatin ardından hücrelere 72 saat ilaç uygulaması yapıldı.

İlaç uygulamaları Şekil 4.1’de gösterildiği gibi yapıldı.



Şekil 4.1: İlaç uygulaması

4.7. Hücrelerin Farklılaştırılması

%0.1’lik jelatin hazırlamak amacıyla 10ml stok jelatin 1L ddH₂O’da ile çözüldü ve otoklavlandı. Ardından 150ml filtreden geçirildi. 6-well plate’lerin her kuyusuna 2ml %0.1 jelatin konuldu ve jelatinin plate’in zeminine yapışması amacıyla 15-30 dakika beklendi, ardından sıvı jelatin aspirasyonla kuyudan uzaklaştırıldı. Kuyuda hiç sıvı jelatin kalmamasına dikkat edildi. Jelatinin kuyulardan uzaklaştırılmasının ardından kuyulara ilgili medyum eklendi. Bu işlem hızlı yapılmalı ve jelatinin kurummasına izin verilmemelidir.

72 saat ilaç uygulamasının ardından hücreler invert mikroskopta incelendi, görüntüleri alındı. Ardından hücreler tripsinle kaldırıldı ve thoma lamında sayıldı. Sayım sonrasında kuyu başı 50.000 hücre olacak şekilde önceden %0.1 Jelatin ile kaplanmış 6-well plate'lere farklılaşma medyumunu kullanılarak ekildi. Hücreler farklılaşma medyumunda 1 hafta büyütüldü.

1 hafta farklılaşmanın ardından hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Kuyulardan biri Hoechst 33342 boyaması için ayrıldı. VCR uygulamasının ardından farklılaştırılmış 6-well plate'teki hücreler üzerine 72 saat 100 ng/ml anti-DBL4 uygulaması yapıldı. 72 saat uygulamanın ardından hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Kuyulardan biri Hoechst 33342 boyaması için ayrıldı.

4.8. Sferoid Oluşumu

72 saat ilaç uygulamasının ardından hücreler invert mikroskopta incelendi, görüntüleri alındı. Ardından hücreler tripsinle kaldırıldı ve thoma lamında sayıldı. Sayım sonrasında kuyu başı 200 hücre olacak şekilde ultra-low-attachment 96-well plate'e sferoid medyumunu kullanılarak ekildi. Hücreler sferoid medyumunda 5 hafta büyütüldü ve belli aralıklarda invert mikroskopta incelenerek hücrelerin görüntüleri alındı.

4.9 Çekirdek Boyaması

Uygulama yapılan ve yapılmayan hücrelerin canlılıklarının belirlenmesi amacıyla hücreler Hoechst 33342 çekirdek boyası ile boyandı.

5 mg 20 mM Hoechst 33342 stoktan 1ml 1mM stok hazırlandı.

1ml 1mM stoktan her çalışma öncesi kullanılacak miktarda 3µg/ml boya hazırlandı. Dilüsyon stok hazırlama aşamalarında PBS kullanıldı.

Boyama yapılacak kuyudaki hücre medyumunu aspirasyonla uzaklaştırıldı ve iki kere 1ml PBS ile yıkandı.

PBS ile yıkamanın ardından PBS aspirasyonla uzaklaştırıldı ve kuyulara 1 ml soğuk %90 etanol eklendi. Hücreler 4°C'de 10 dakika fikse edildi.

Ardından etanol aspirasyonla uzaklaştırıldı ve kuyulara 1 ml 3µg/ml Hoechst33342 boyası eklendi. Hücreler oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 5 dakika inkübe edildi.

Inkübasyonun ardından boya aspirasyonla uzaklaştırıldı. Hücreler bir kere 1ml PBS ile yıkandı ve invert mikroskobun floresan ışığında görüntülendi. Görüntüler hem normal hem de floresan çekirdek görüntüsü olmak üzere iki şekilde kaydedildi.

4.10. Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için gerekli uygulamaları tamamlanmış hücrelerin hücre medyumu aspiratör ile çekilerek uzaklaştırıldı, hücreler iki defa PBS ile yıkandı. PBS çekildi ve hücrelerin büyütüldükleri kaba bağlı hacimde Tripsin-EDTA eklenerek hücreler 37°C %5CO₂ inkübatörde 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücrelerin kalkıp kalkmadıkları mikroskopta incelendi. Hücreler tam olarak kalkmadılarsa flaska vurularak mekanik kuvvet uygulandı. Kalkan hücreler bir araya toplandı ve üzerlerine tripsin inaktivitesi için büyüme medyumu eklendi. Flask bir iki kez büyüme medyumu ile yıkanarak hücreler faklona toplandı ve 24°C 300g'de 5dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant atıldı, Hücre pelletlerinden Total RNA izolasyonu, NucleoSpin® RNA kiti protokollerine uygun olarak gerçekleştirildi.

RNA izolasyonu yapılan hücreler;

- Uygulama yapılmamış AGS ve MKN45 hücre hatları
- 72 saat 1µg/ml VCR uygulanmış AGS ve MKN45 hatları
- 72 saat 100 ng/ml anti-DBL4 uygulanmış AGS ve MKN45 hücre hatları
- 72 saat 1µg/ml VCR ve 100 ng/ml anti-DBL4 birlikte uygulanmış AGS ve MKN45 hücre hatları
- 72 saat 1µg/ml VCR uygulanmış ve 1 hafta farklılaştırılmış AGS ve MKN45 hücre hatları
- 72 saat 1µg/ml VCR ve 100 ng/ml anti-DBL4 birlikte uygulanmış ve 1 hafta farklılaştırılmış AGS ve MKN45 hücre hatları
- 72 saat 1µg/ml VCR uygulanmış ve 1 hafta farklılaştırmanın ardından 72 saat 100 ng/ml anti-DBL4 uygulanmış AGS ve MKN45 hücre hatları

Tüm RNA izolasyonlarının saflığı ve konsantrasyonu μ Drop ile tespit edildi. RNA konsantrasyonu A_{260}/A_{280} formülü ile, RNA saflığı ise A_{260}/A_{280} oranıyla tespit edildi. RNA'nın saf olarak kabul edilebilmesi için A_{260}/A_{280} oranının 1.8- 2.1 arasında olması gerekmektedir.

4.11. cDNA Sentezi

İzolasyonu yapılan total RNA'lardan cDNA izolasyonu First Strand cDNA Synthesis Kit protokollerine uygun olarak gerçekleştirildi. Tüm AGS örneklerinin cDNA konsantrasyonları 300ng'a, MKN45 örneklerinin cDNA konsantrasyonları 500ng'a sabitlendi.

RNA konsantrasyonu ve cDNA sentezinde kullanılacak RNA ve oluşacak cDNA sentez ürün miktarı Çizelge 4.4'te gösterildi.

Çizelge 4.4. cDNA sentezinde kullanılacak RNA ve oluşacak cDNA sentez ürün miktarı

Örnek	RNA Konsantrasyonu	cDNA sentezinde kullanılan RNA Hacmi	cDNA ürün miktarı	Nükleazsız su
AGS (1) Hücre hattı				
Kontrol	232,1 ng/ μ l	1,3 μ l	300ng	4,7 μ l
Anti-DBL4 +	217,6 ng/ μ l	1,4 μ l	300ng	4,6 μ l
VCR +	117,2 ng/ μ l	2,5 μ l	300ng	3,5 μ l
VCR + anti-DBL4 +	139,2 ng/ μ l	2,1 μ l	300ng	3,9 μ l
VCR + 1W	112,1 ng/ μ l	2,7 μ l	300ng	3,3 μ l
VCR + anti-DBL4 + 1W	135,1 ng/ μ l	2,2 μ l	300ng	3,8 μ l
VCR + 1W + anri-DBL4 +	468,6 ng/ μ l	1,3 μ l	300ng	4,7 μ l
MKN45 Hücre hattı				
Kontrol	650 ng/ μ l	1,5 μ l	500ng	5,5 μ l
Anti-DBL4 +	653,9 ng/ μ l	1,5 μ l	500ng	5,5 μ l
VCR +	97,54 ng/ μ l	4,1 μ l	500ng	4,1 μ l
VCR + anti-DBL4 +	206,8 ng/ μ l	4,8 μ l	500ng	4,8 μ l
VCR +	111 ng/ μ l	4,5 μ l	500ng	2,5 μ l

1W				
VCR + anti-DBL4 + 1W	365 ng/μl	2,7ul	500ng	4,3 μl
AGS Hücre hattı	DBL4 DOZAJ			
Kontrol		1,7 μl	500ng	5,5 μl
24h- 100ng/ml	251,5 ng/μl	2 μl	500ng	4 μl
24h- 50ng/ml	292,2 ng/μl	1,7 μl	500ng	4, μl l
24h- 25ng/ml	178,2 ng/μl	2,8 μl	500ng	3,2 μl
24h- 5ng/ml	119,2 ng/μl	4,2 μl	500ng	1,8 μl
48h- 100ng/ml	362,15 ng/μl	1, 1μl	500ng	4,6 μl
48h- 50ng/ml	501,1 ng/μl	1 μl	500ng	5 μl
48h- 25ng/ml	438,7 ng/μl	1,1 μl	500ng	4,9 μl
48h- 5ng/ml	236,6 ng/μl	2,1 μl	500ng	3,9 μl
72h- 100ng/ml	468,15 ng/μl	1,07 μl	500ng	4,93 μl
72h- 50ng/ml	271,6 ng/μl	1,8 μl	500ng	4,2 μl
72h- 25ng/ml	389,1 ng/μl	1,3 μl	500ng	4,7 μl
72h- 5ng/ml	281,5 ng/μl	1,8 μl	500ng	4,2 μl

Kantitatif gerçek zamanlı PZR reaksiyonunda kullanılacak cDNA 30ng/μl’de optimize edildi. Bu nedenle kullanılacak 20μl 500ng cDNA 1ul’de 30ng olacak şekilde nükleazsız suyla dilüe edildi. cDNA sentez ürünlerinin dilüsyonu Çizelge 4.5’te gösterildi.

Çizelge 4.5. cDNA sentez ürünlerinin dilüsyonu

Örnek	cDNA sentez ürün miktarı	Seyreltme-eklenecek nükleazsız su hacmi	Son konsantrasyon
AGS(2) hücre hattı örnekleri	20ul’de 500ng	13ul	33ul’de 300ng 15ng/ul
MKN45 hücre hattı örnekleri	20ul’de 500ng	13ul	33ul’de 300ng 15ng/ul

4.12. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR)

Notch yolağı reseptörlerinden Notch1 reseptörünün DBL4 ligandı ile etkileşimi sonrası bu yolağın hedef genleri olan Hey ailesi (HEY1, HEY2), Hes ailesi (HES1, HES5) ve p21 genlerinin yazılımı gerçekleşir. Hücreler üzerinde gerçekleştirilen VCR, anti-DBL4 uygulamaları ve farklılaştırma işlem kombinasyonlarının bu hedef genlerin yazılımı üzerindeki etkisini incelemek amacı ile gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi.

Bu çalışmada GZ-PZR reaksiyonları SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit protokollerine uygun olarak gerçekleştirildi. GZ-PZR reaktifleri çizelge 4.6'da ve GZ-PZR koşulları çizelge 4.7'de gösterildi.

Çizelge 4.6. GZ-PZR reaktifleri

Reaktif	Stok Konsantrasyon	Hacim
SensiFAST SYBR® Non-ROX Mix	2X	10 µl
MystiCq Universal PCR Primer	10 µM	0.8 µl
cDNA	20ng/µl	2 µl
Nuclease –free-water	-	6,4 µl
Toplam hacim	-	20 µl

Çizelge 4.7. GZ-PZR koşulları.

GZ-PZR KOŞULLARI		
İlk Denatürasyon	95°C, 2 dk	
Denatürasyon	95 °C, 5 sn	
Bağlanma	59.4 °C, 30 sn	Döngü Sayısı: 40
Uzama	72°C, 20 sn	
Son Uzama	72°C, 5 dk	
Erime Sıcaklığı	65°C - 95°C	

PCR’da uygulama yapılmış hücreler ile ekspresyonları incelenen genlerin kombinasyonları Çizelge 4.8’de verildi.

Çizelge 4.8. Uygulanan ilaç ve incelenen genlerin kombinasyonları

GAPDH Kontrol	GAPDH VCR	GAPDH DBL4	GAPDH V+D	GAPDH V+1W	GAPDH V+D+1W	GAPDH V+1W+D
CD44 Kontrol	CD44 VCR	CD44 DBL4	CD44 V+D	CD44 V+1W	CD44 V+D+1W	CD44 V+1W+D
DBL4 Kontrol	DBL4 VCR	DBL4 DBL4	DBL4 V+D	DBL4 V+1W	DBL4 V+D+1W	DBL4 V+1W+D
HEY1 Kontrol	HEY1 VCR	HEY1 DBL4	HEY1 V+D	HEY1 V+1W	HEY1 V+D+1W	HEY1 V+1W+D
HEY2 Kontrol	HEY2 VCR	HEY2 DBL4	HEY2 V+D	HEY2 V+1W	HEY2 V+D+1W	HEY2 V+1W+D
HES1 Kontrol	HES1 VCR	HES1 DBL4	HES1 V+D	HES1 V+1W	HES1 V+D+1W	HES1 V+1W+D
HES5 Kontrol	HES5 VCR	HES5 DBL4	HES5 V+D	HES5 V+1W	HES5 V+D+1W	HES5 V+1W+D
P21 Kontrol	P21 VCR	P21 DBL4	P21 V+D	P21 V+1W	P21 V+D+1W	P21 V+1W+D

Gerçek zamanlı PZR reaksiyonları çift teknik tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Çift tekrar olarak gerçekleştirilen reaksiyonlar referans gen olan GAPDH ile normalize edildi ve ΔCt 'si elde edildi. ΔCt değeri, örneklerin çift tekrar ortalamasından GAPDH değerinin çıkartılması ile elde edildi. Elde edilen ΔCt değerleri kullanılarak $\Delta\Delta Ct$ değerleri hesaplandı. $\Delta\Delta Ct$ değerlerinin elde edilmesinin ardından $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile ekspresyon değişimi hesaplandı. Çift teknik tekrarlar arasındaki hata payı hesaplandı ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ seviyeleri üzerinde gösterildi

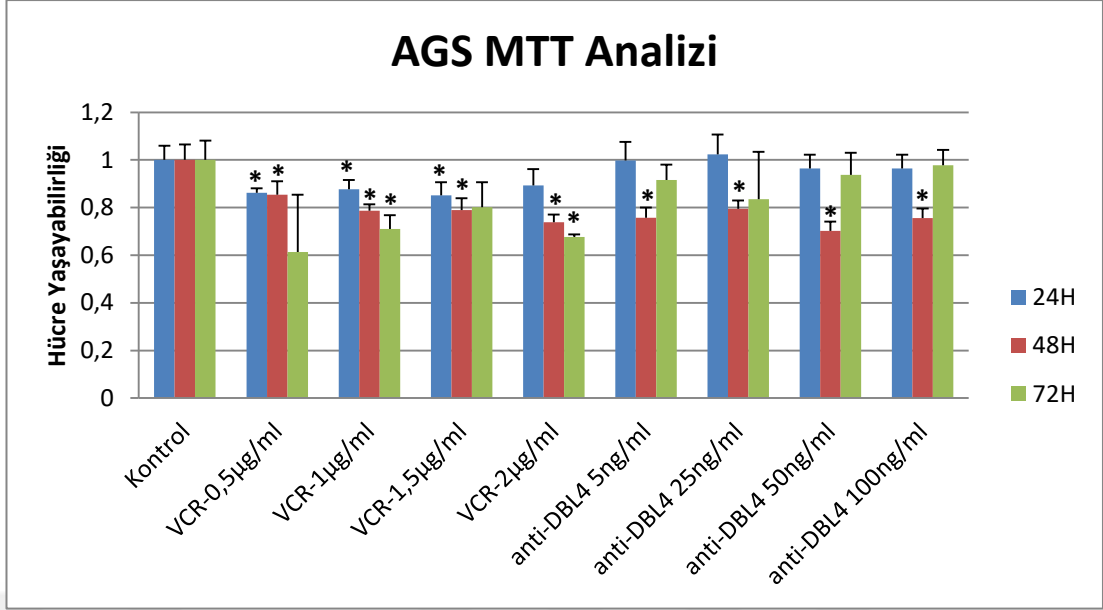
5.BULGULAR

5.1. MTT ile sitotoksitenin gösterilmesi.

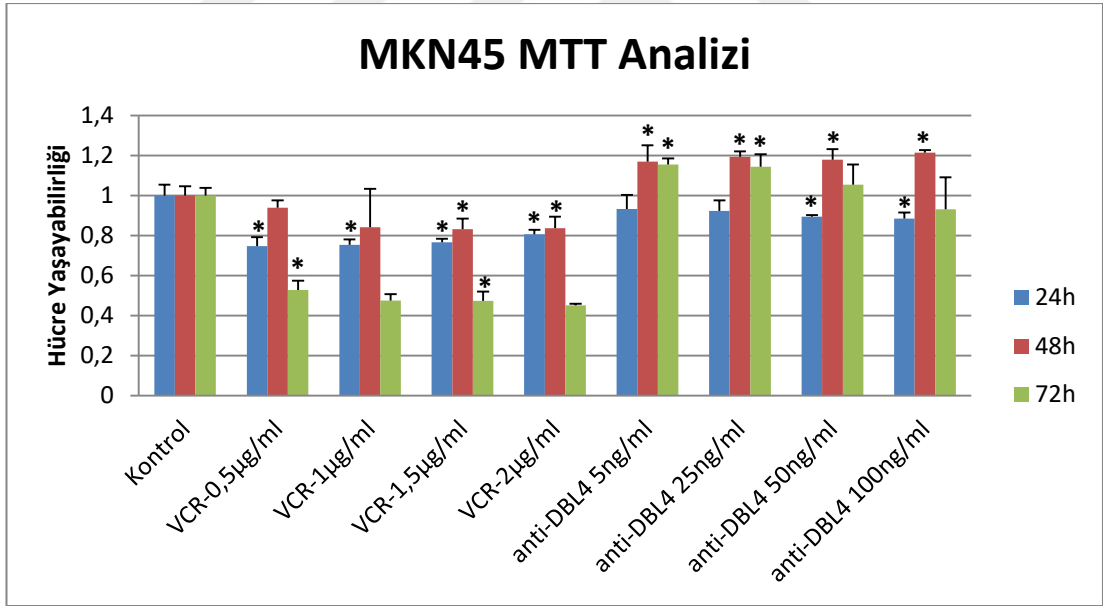
Kemoterapi ilacı olan VCR ve anti-DBL4 antikorunun hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacı ile AGS ve MKN45 mide kanseri hücrelerine ve kontrol grubu olarak kullanılacak dH1f fibroblast hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda uygulama yapıldı. Uygulama yapılmamış kontrol hücreler ve uygulama yapılmış örnekler 4 saat boyunca 37°C' de 10 µl MTT Reagent ile bekletildi. Hücre canlılığı 100 µl Solubilisation Solution ile bir gece 37°C' de bekletilmesinin ardından 570 nm dalga boyunda analizi gerçekleştirildi.

5.1.1. VCR ve anti-DBL4'ün AGS, MKN45 ve dH1f Hücrelerinin Canlılığına Etkisi

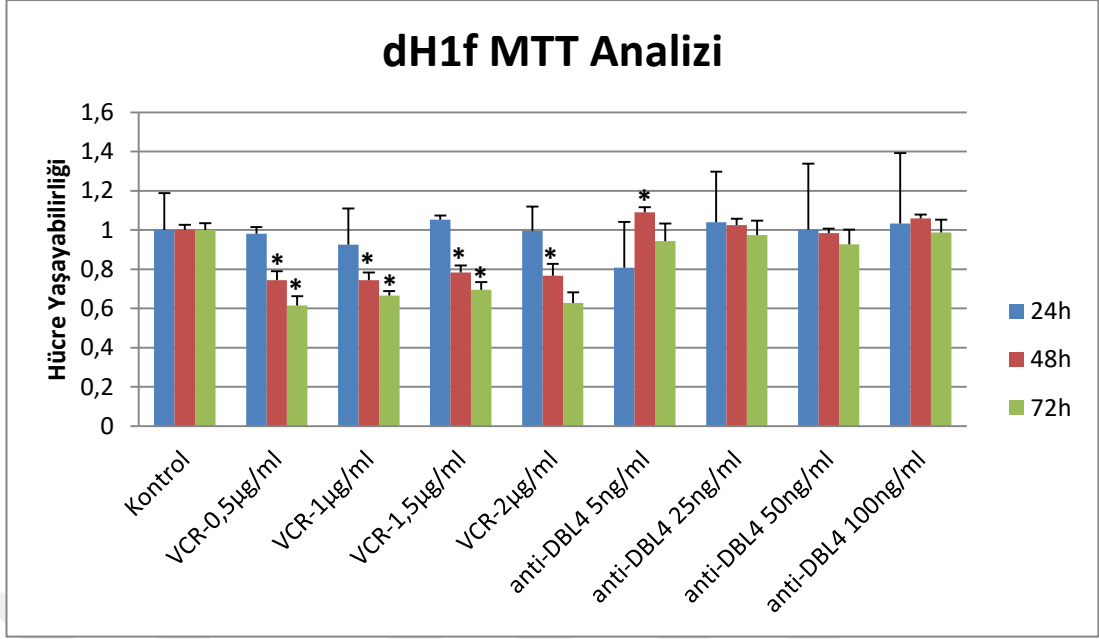
VCR ve anti-DBL4 farklı konsantrasyonlarda (0,5-1-1,5-2 µg/ml VCR, 100-50-25-5 ng/ml anti-DBL4) seyreltilerek AGS, MKN45 ve dH1f hücre hatları üzerinde 24, 48, 72 saat boyunca uygulandı. Uygulama sonrası elde edilen grafikler Şekil 5.1'de gösterildi. MTT sonuçları VCR'in her üç hücre hattı için de anti-DBL4'e oranla daha fazla toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca AGS hücre hattının MKN45 ve dH1f hücre hatlarına oranla VCR'ye daha dirençli olduğunu yine MTT sonuç grafiğine bakarak söyleyebiliriz. AGS, MKN45 ve dH1f hücrelerinin MTT analizi sonucu elde edilen grafikler sırasıyla Şekil 5.1, Şekil 5.2 ve Şekil 5.3'te gösterildi.



Şekil 5.1. VCR ve anti-DBL4'ün farklı konsantrasyonlarının AGS hücre hattı üzerindeki MTT analizi. (*) = P value ≤ 0,05.



Şekil 5.2. VCR ve anti-DBL4'ün farklı konsantrasyonlarının MKN45 hücre hattı üzerindeki MTT analizi. (*) = P value ≤ 0,05.



Şekil 5.3. VCR ve anti-DBL4'ün farklı konsantrasyonlarının dH1f hücre hattı üzerindeki MTT analizi. (*) = P value ≤ 0,05.

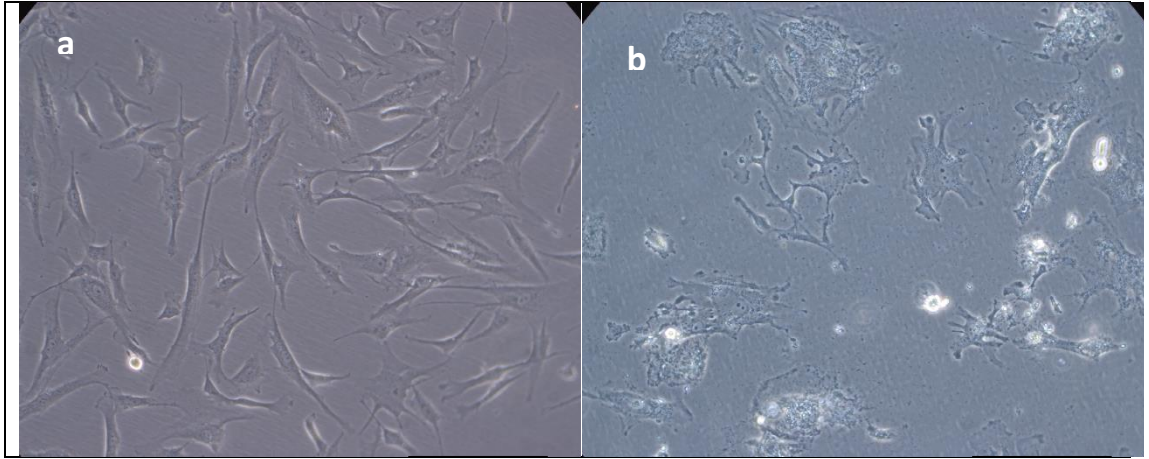
MTT analizleri sonucunda 270nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Ölçüm sonrası elde edilen değerler kullanılarak hücre canlılığı hesaplandı. Standart sapma çubukları barlar üzerinde gösterildi. İstatistiksel olarak Ttest yapıldı ve Ttest sonuçları 0,05'ten küçük olanlar anlamlı kabul edilerek standart sapma çubukları üzerinde (*) ile gösterildi.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda 72 saat 1µg/ml VCR uygulamasının mide kanseri hücreleri üzerindeki toksisitesi uygun bulunmuştur. Bu sonuçlar literatürdeki VCR uygulamaları referansları ile uyum göstermektedir. Anti-DBL4'ün hücre hatları üzerindeki toksik etkisi dozaj belirlemeye yeterli değildir. Bu nedenle uygulanacak anti-DBL4 konsantrasyonu ve saati gerçek zamanlı PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen ekspresyon değişimleri ile belirlendi.

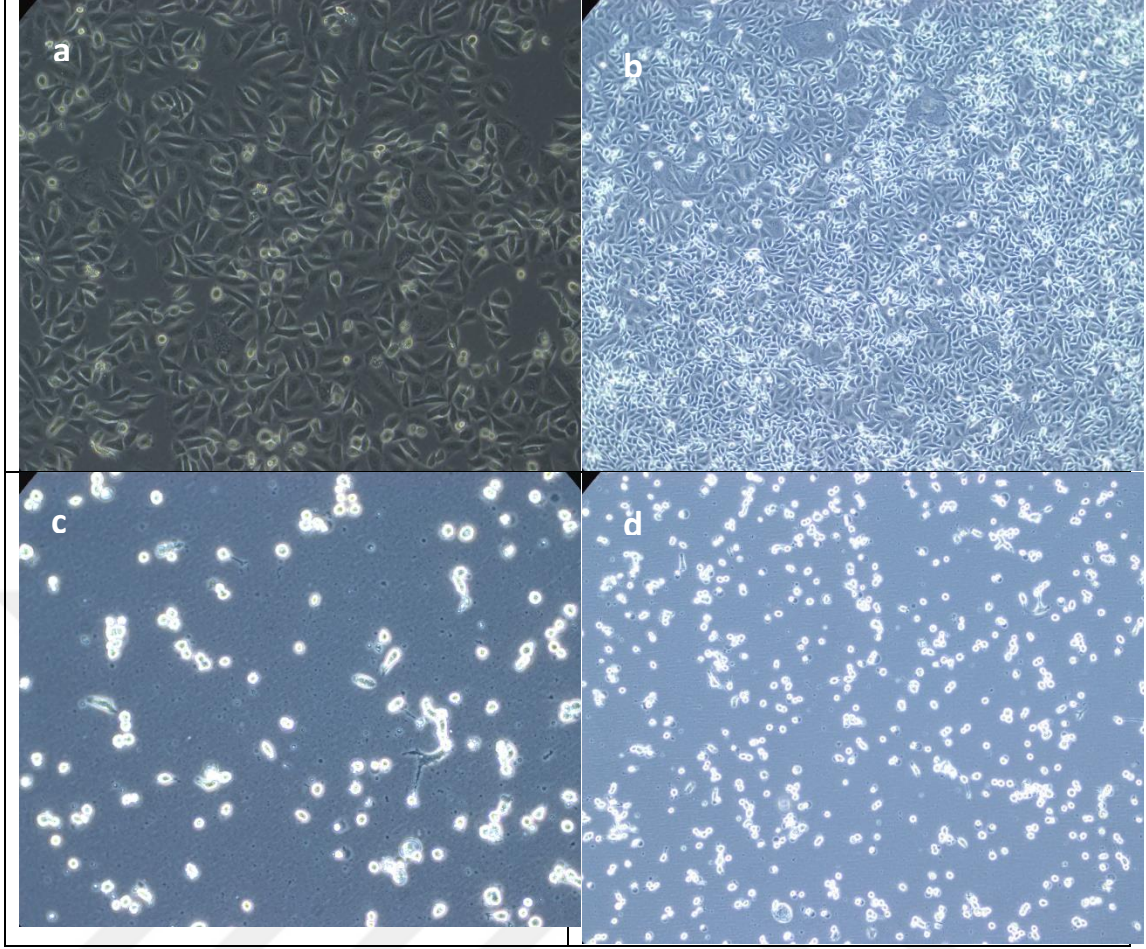
5.2. VCR, anti-DBL4 ve kombinasyon uygulamalarının ardından hücre morfolojilerinin gösterilmesi.

AGS hücreleri damla tarzı bir şekle sahip olan, hızlı çoğalan mide kanseri hücreleridir. MKN45 hücreleri çubuk şekline sahip, koloni halinde çoğalan mide kanseri hücreleridir. dH1f hücreleri ince uzun çubuksu şekle sahip, fibroblast hücreleridir.

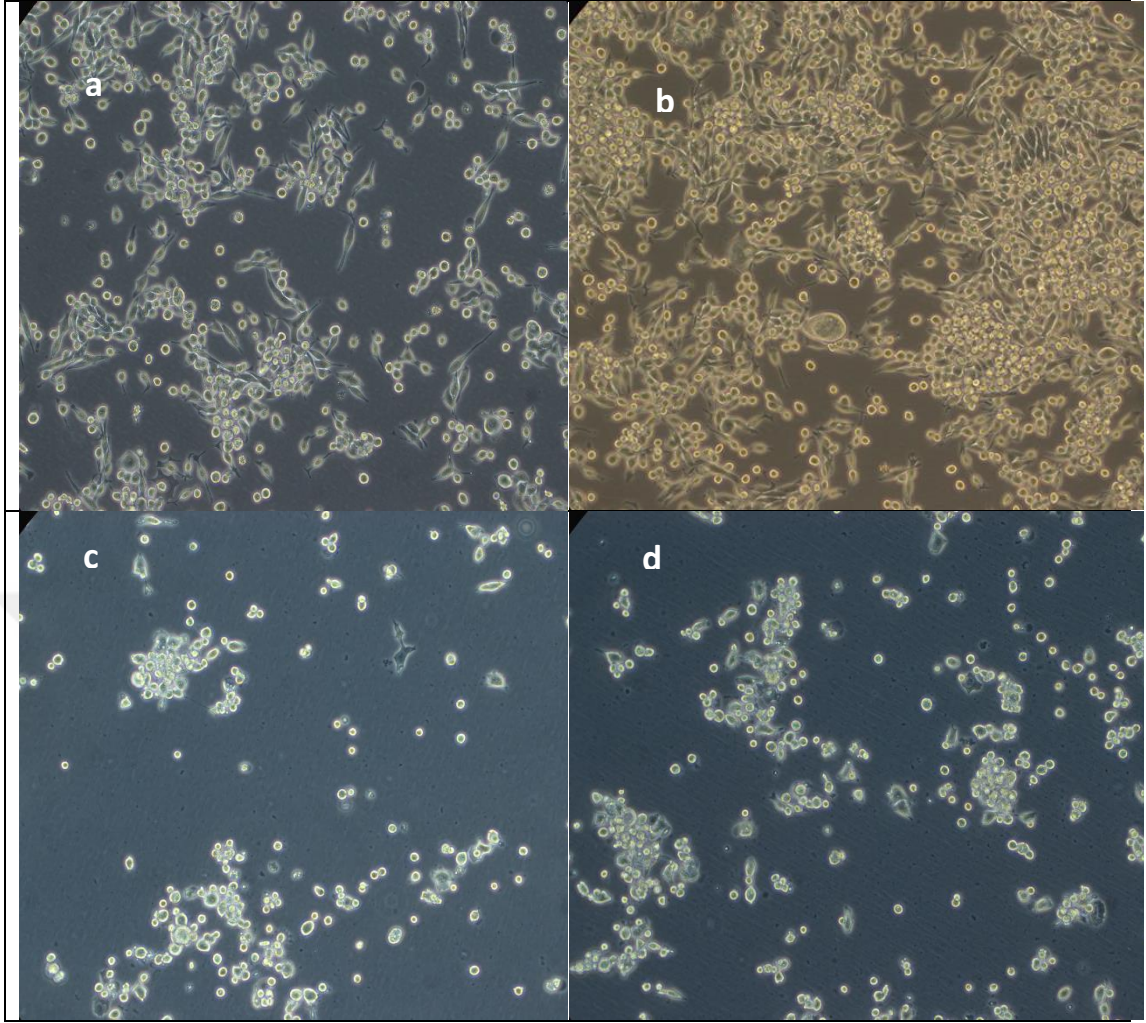
Çalışmanın ilk aşamasında bu hücreler 72 saat bir kemoterapi ilacı olan VCR ile 1µg/ml hacimde olacak şekilde muamele edildi. VCR uygulaması ardından Şekil 5.4, 5.5 ve 5.6'da görüldüğü üzere üç hücre kültüründe de yüksek oranda hücre ölümü gerçekleşti. dH1f hücrelerinin morfolojileri ciddi anlamda değiştiği görüldü. Bir kemoterapi ilacı kullanıldığından dolayı bu beklenen bir olaydır. Ancak AGS ve MKN45 mide kanser hücre hatlarında yüksek oranda hücre ölümünün olmasına rağmen yaşanan hücrelerin sayısı göz ardı edilemeyecek sayıdadır. Kanser tedavilerinin kesin sonuç verebilmesi açısından bu dirençli hücrelerin incelenmesi gerekmektedir. Aynı zamanda anjiyogenezde ve farklılaşmada önemli bir role sahip DBL4-Notch yolağının tümör anjiyogenezinde rol aldığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Bu yolağın kanser ve dirençli kanser hücrelerinde susturulması tümörü önlemek amacıyla önemlidir. Bu nedenle AGS ve MKN45 hücrelerine 72 saat 100ng/ml anti-DBL4 ve 72 saat 1µg/ml VCR ve 100ng/ml anti-DBL4 kombinasyonu uygulandı. Uygulama sonrasında sadece anti-DBL4 uygulaması yapılan hücrelerin kontrol grubu ile aynı seyirde çoğaldıkları görülürken kombine uygulamanın yapıldığı hücrelerin sayısında ciddi azalma görüldü. Kombine uygulama ile sadece VCR uygulaması yapılan hücrelerde gerçekleşen ölüm oranı neredeyse birbirine eşittir.



Şekil 5.4. dH1f hücrelerinin VCR öncesi ve sonrası 20X görüntüleri. Uygulama yapılmamış kontrol dH1f hücreleri (a), 72 saat 1µg/ml VCR uygulanmış dH1f hücreleri (b).



Şekil 5.5: AGS hücrelerinin ilaç uygulamasının ardından hücre görüntüleri. Uygulanma yapılmamış kontrol grubu AGS hücre hatlarının görüntüsü (a, 20X), 72 saat 100ng/ml anti-DBL4 uygulamasının ardından AGS hücre hatlarının görüntüsü (b, 10X), 72 saat 1µg/ml VCR uygulamasının ardından AGS hücre hatlarının görüntüsü (c, 20X), 72 saat 1µg/ml VCR ve 100 ng/ml anti-DBL4'ün beraber uygulamasının ardından AGS hücre hatlarının görüntüsü (d, 10X).



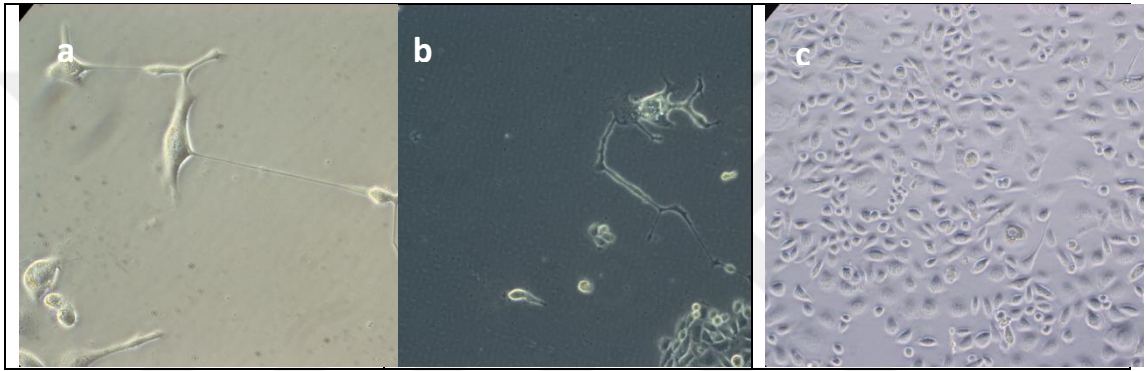
Şekil 5.6. MKN45 hücrelerinin ilaç uygulamasının ardından 20X görüntüleri. Uygulama yapılmamış kontrol grubu MKN45 hücre hatlarının görüntüsü (a), 72 saat 100ng/ml anti-DBL4 uygulamasının ardından MKN45 hücre hatlarının görüntüsü (b), 72 saat 1µg/ml VCR uygulamasının ardından MKN45 hücre hatlarının görüntüsü (c), 72 saat 1µg/ml VCR ve 100 ng/ml anti-DBL4'ün beraber uygulamasının ardından MKN45 hücre hatlarının görüntüsü (d).

5.3. VCR ve VCR ile anti-DBL4 birlikte indüklenmiş hücrelerin farklılaştırma görüntüleri.

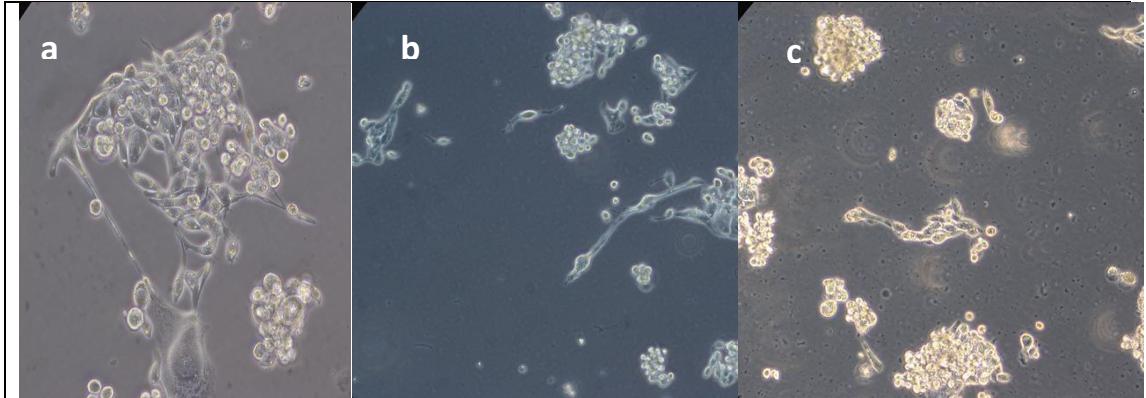
Çalışmanın ikinci aşamasında VCR direnci gösteren hücreler alındı ve 1 hafta boyunca farklılaşma medyumunda büyütülerek morfolojik değişimleri incelendi. Bir haftanın sonunda şekil 5.7'de görüldüğü üzere bu hücrelerde damar benzeri yapıların ve uzantıların oluşumu gözlenmiştir. Aynı şekilde birlikte uygulama yapılmış hücreler de 1 hafta farklılaşmaya tabi tutulmuş ve Şekil 5.7 ve Şekil 5.8'de görüldüğü üzere benzer derecede damar benzeri yapıların ve uzantıların oluştuğu gözlenmiştir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında VCR ile indüklenmiş kanser hücrelerinden, KKH'lerinin elde edilmesinden yola çıkarak ilk defa AGS ve MKN45 mide kanseri

hücrelerinden KKHBH'lerin elde edilmesinde VCR ve DBL4 inhibitörünün beraber kullanımını gerçekleştirdik. Aynı zamanda elde edilen KKHBH'in farklılaştırılması sonucunda damar benzeri yapılar elde edildi ve bu damar benzeri yapılar üzerinde DBL4 inhibitörünün morfolojik olarak ve moleküler düzeyde incelemelerini gerçekleştirildi. Farklılaşmış VCR direncine sahip hücelere anjiyogenezde ve farklılaşmada önemli bir role sahip DBL4-Notch yolağını susturmak amacıyla 72 saat 100 ng/ml anti-DBL4 antikoru uygulanmıştır. Şekil 5.7 ve Şekil 5.8'de görüldüğü üzere farklılaşmış, damar benzeri yapılar ile uzantılara sahip hücrelerin sayısında azalma gerçekleşmiştir.



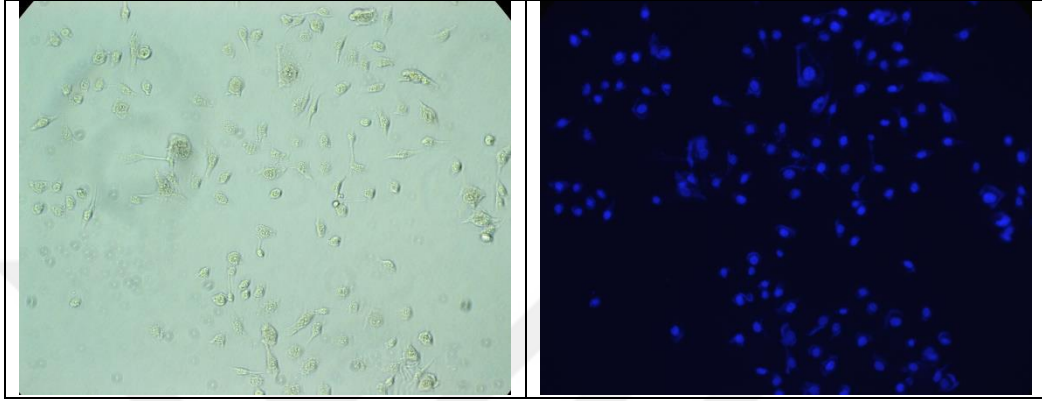
Şekil 5.7: AGS hücrelerinin farklılaşmış hücre görüntüleri. 1µg/ml VCR uygulanmasının ardından 1 hafta farklılaşma medyumunda büyütülen hücrelerin damar benzeri yapılar oluşturmuş görüntüleri (a, 40X), 72 saat 1µg/ml VCR ve 100 ng/ml anti-DBL4'ün beraber uygulamasının ardından 1 hafta farklılaşma medyumunda büyütülen hücrelerin damar benzeri yapılar oluşturmuş görüntüleri (b, 20X), 1µg/ml VCR uygulanmasının ardından 1 hafta farklılaşmanın ardından 100 ng/ml anti-DBL4 uygulanmış hücrelerin görüntüleri (c, 20X).



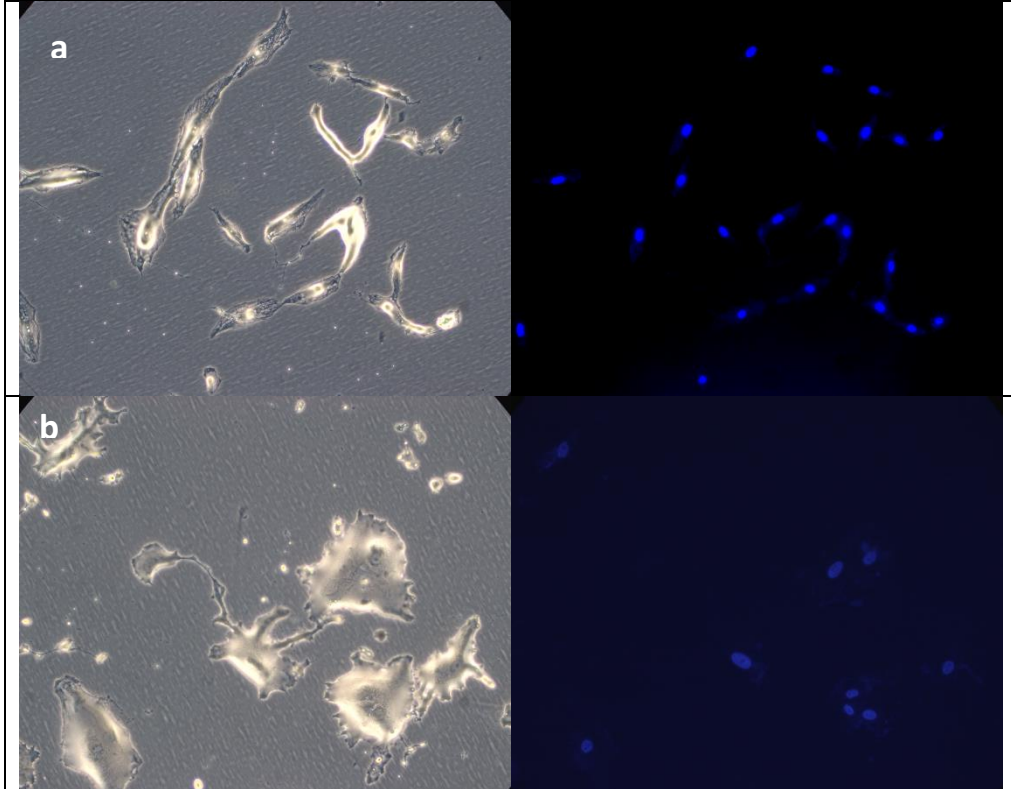
Şekil 5.8: MKN45 hücrelerinin farklılaşmış hücre görüntüleri. 1µg/ml VCR uygulanmasının ardından 1 hafta farklılaşma medyumunda büyütülen hücrelerin damar benzeri yapılar oluşturmuş görüntüleri (a, 40X), 72 saat 1µg/ml VCR ve 100 ng/ml anti-DBL4'ün beraber uygulamasının ardından 1 hafta farklılaşma medyumunda büyütülen hücrelerin damar benzeri yapılar oluşturmuş görüntüleri (b, 20X), 1µg/ml VCR uygulanmasının ardından 1 hafta farklılaşmanın ardından 100 ng/ml anti-DBL4 uygulanmış hücrelerin görüntüleri (c, 20X).

5. 4. Çekirdek Boyaması

Hücre çekirdeklerinin görüntülenmesi amacıyla hücreler Hoechst33342 çekirdek boyası ile boyandı. Boyama sonucu elde edilen görüntüler Şekil 5.9 ve Şekil 5.10'da gösterildi.



Şekil 5.9. AGS hücrelerinin Hoechst boyaması sonrası 20X görüntüleri. 72 saat 1µg/ml VCR ve 100 ng/ml anti-DBL4'ün beraber uygulamasının ardından 1 hafta farklılaşma medyumunda büyütülen hücrelerin boyanmış çekirdek görüntüleri.

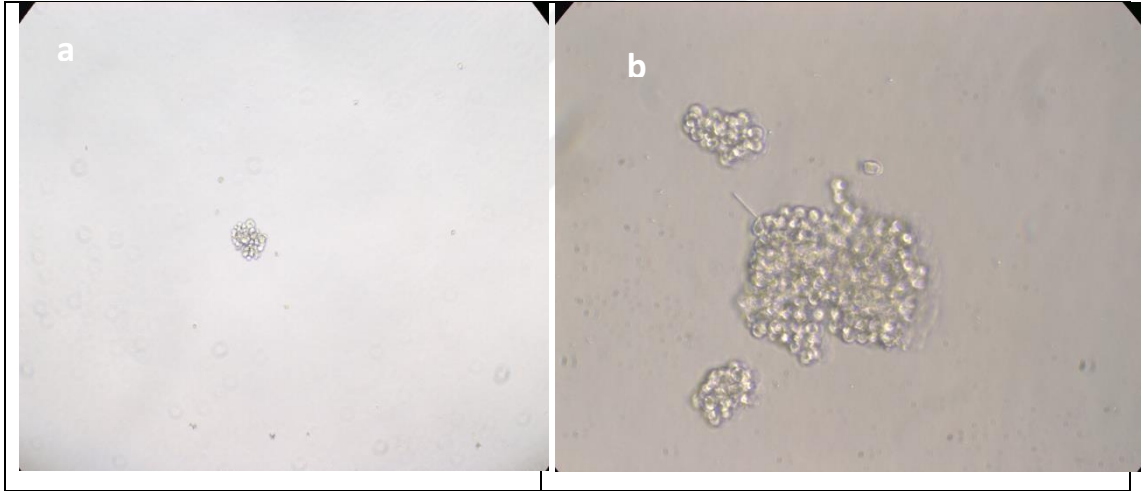


Şekil 5.10. dH1f hücrelerinin Hoechst boyaması sonrası 20X görüntüleri. Uygulama yapılmamış kontrol dH1f hücrelerinin boyanmış çekirdek görüntüleri (a). 72 saat 1µg/ml VCR uygulanmış hücrelerin boyanmış çekirdek görüntüleri (b).

5.5. Sferoid Oluşumu

Son zamanlarda, KKH'lerin büyüme faktörleri ile zenginleştirilmiş serum içermeyen bir in vitro ortamda sınırlı sayıda ekildiğinde yüzen sfero oluşturmak üzere yetiştirilebileceği bildirilmiştir (Sukach & Ivanov, 2007). Sferoitler çok yönlü şekilleri, kanser hücrelerinin varlığı ve tümör topluluğuna kıyasla KKH'lerin in vitro genişlemesini teşvik etme kapasiteleri ile karakterize edilmektedir (Shaheen, Ahmed, Lorenzi, & Nateri, 2016).

VCR indüklemesi ardından dirençli AGS ve MKN45 hücreleri sferoid oluşumunu sağlamak amacıyla temel fibroblast büyüme faktörü (bFbF) ve epidermal büyüme faktörü (EBF) içeren sferoid medyumunda büyütüldü. Belli aralıklarla hücreler invert mikroskopta incelendi. 15. günde sferoid yapılarının oluşumları görüldü ve kaydedildi. Kaydedilen görüntüler Şekil 5.11'de gösterildi.



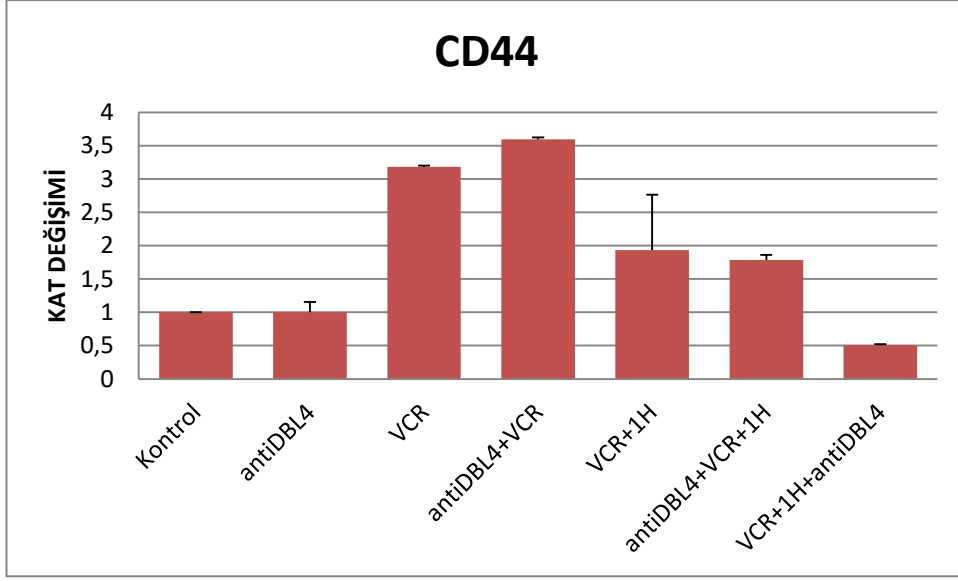
Şekil 5.11. AGS ve MKN hücrelerinin sferoid görüntüleri. Sferoid medyumunda büyütülmüş AGS (a, 10X) ve MKN45 (b, 20X) hücrelerinin 15. günde oluşturdukları sferoid görüntüleri.

5.6 Gerçek Zamanlı PZR

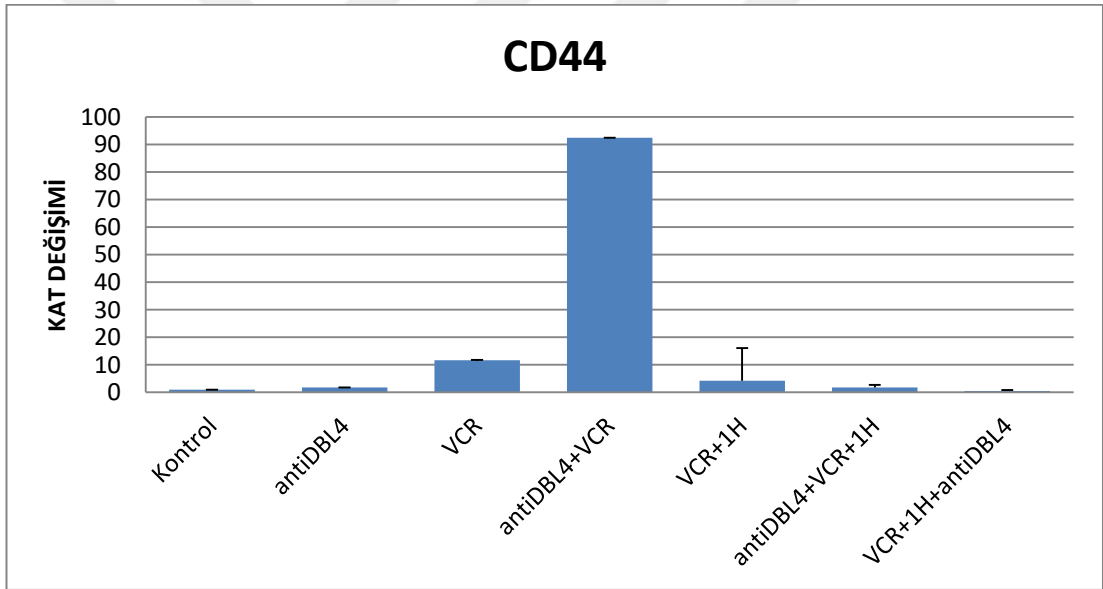
5.6.1. Gerçek Zamanlı PZR ile Kanser Kök Hücrelerinin Spatanması

CD44, başka birkaç kanser türü de dahil olmak üzere mide kanserinin ilerlemesiyle ilişkilendirilen önemli bir yüzey reseptörü ve aynı zamanda önemli KKH yüzey belirteçlerinden biridir (Ranji et al., 2016).

Uygulama öncesi ve sonrası AGS ve MKN45 hücre kültürlerindeki CD44 ekspresyon grafikleri Şekil 5.12 ve Şekil 5.13'te gösterildi.



Şekil 5.12. Uygulama yapılmış ve yapılmamış AGS hücre hattında CD44 ekspresyonu.

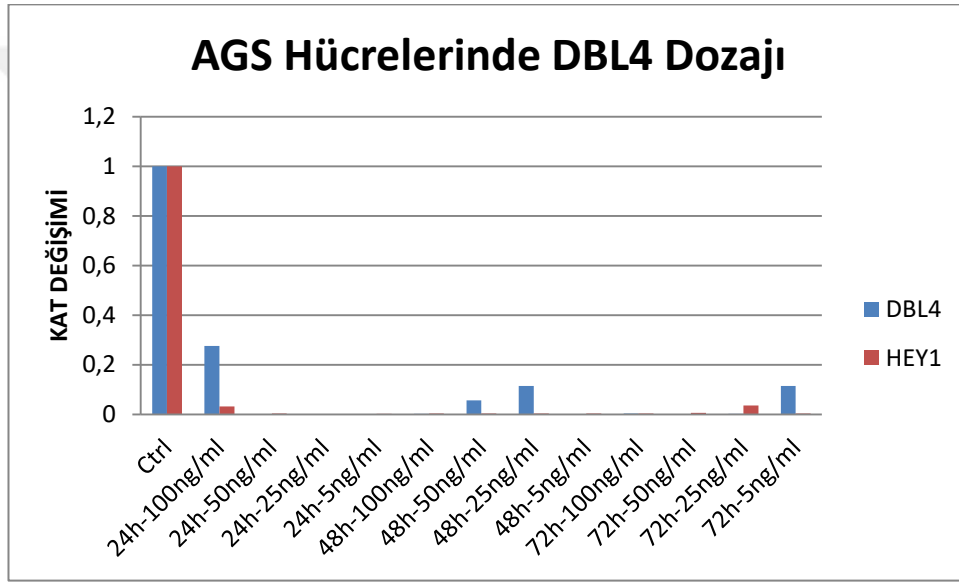


Şekil 5.13. Uygulama yapılmış ve yapılmamış MKN45 hücre hattında CD44 ekspresyonu.

Her iki hücre tipinde de anti-DBL4 uygulaması yapılan hücrelerdeki CD44 ekspresyonu kontrol hücre grubu ile aynı orandadır. VCR uygulaması yapılan hücrelerdeki CD44 ekspresyonunda ve VCR ile anti-DBL4 birlikte uygulaması yapılan hücrelerdeki CD44 ekspresyonunda ciddi bir artış gerçekleşmedi. VCR ve VCR ile anti-DBL4 birlikte uygulaması yapıp farklılaştırılmış hücrelerde CD44 ekspresyonunda kontrol hücre grubuna oranla belli bir miktar artış gerçekleşmiştir. VCR ile anti-DBL4 birlikte uygulaması yapıp farklılaştırılmış hücrelerde ise CD44 ekspresyonunda azalma gerçekleşti.

5.7. Gerçek Zamanlı PZR ile anti-DBL4 Dozajının Belirlenmesi

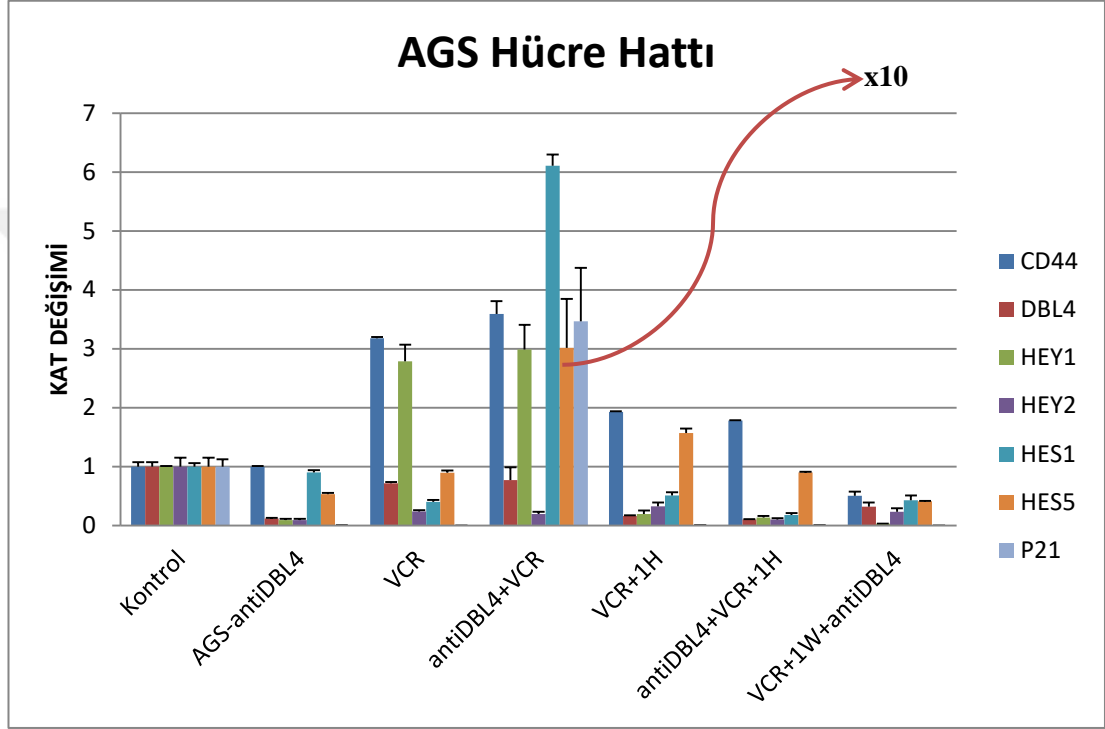
Anti-DBL4'ün hücelere hangi oranda kullanılacağıının belirlenmesi amacıyla hücelere farklı dozajlarda anti-DBL4 uygulaması yapıldı. Uygulama sonucu DBL4 ekspresyonları gerçek zamanlı PZR ile incelenerek kontrol hücre grubunun ekspresyonları ile kıyaslandı ve Şekil5.14'te gösterildi. 50, 25 ve 5 ng/ml anti-DBL4'ün 48 ve 72 saat uygulamasında DBL4 ve hedef genlerinden biri olan HEY1 genlerinde az miktarda da olsa ekspresyon olduğu görüldü. Bunlara karşın 100 ng/ml anti-DBL4'ün 48 ve 72 saat uygulamasında DBL4 ve hedef genlerinden biri olan HEY1 genlerinde ekspresyon gerçekleşmedi.



Şekil 5.14. AGS hücre hattında anti-DBL4 dozaj grafiği

5.8. Gerçek Zamanlı PZR ile Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

VCR ve anti-DBL4'ün farklı kombinasyonlarda uygulamaları yapılan AGS ve MKN45 hücrelerinde kök hücre biyobelirteci olan CD44 geninin ekspresyonuna, DBL4 geni ve hedef genleri olan HEY1, HEY2, HES1, HES5 ve p21 genlerinin ekspresyonlarına bakıldı. Elde edilen grafikler sırasıyla Şekil 5.15 ve Şekil 5.16'da gösterildi.

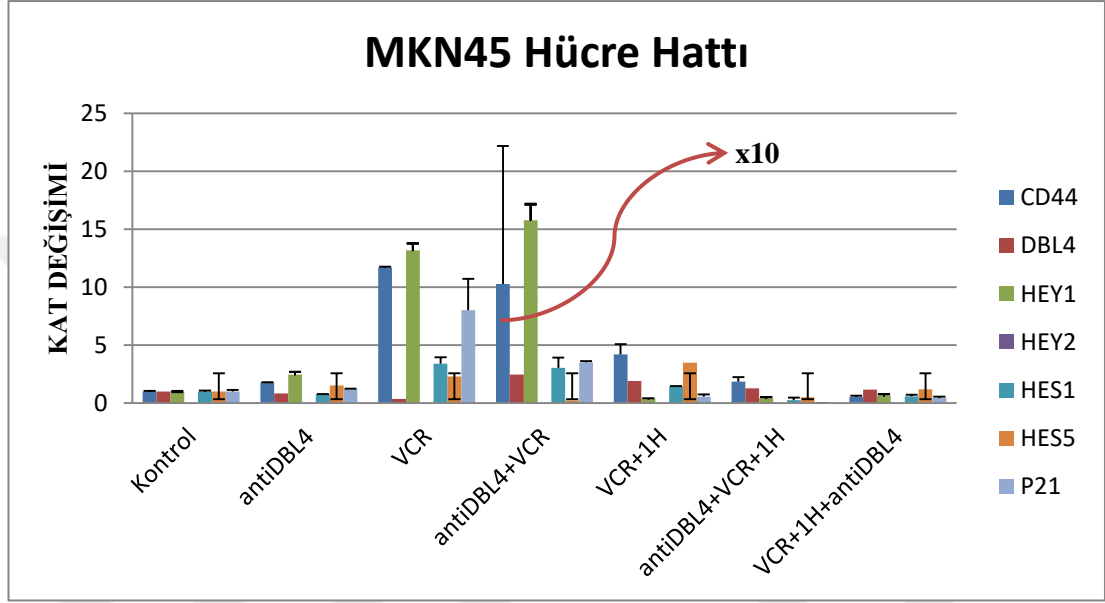


Şekil 5.15. AGS hücre hattında genlerin ekspresyonu.

VCR ve anti-DBL4'ün beraber uygulandığı durumda HES5 geninin ekspresyonunda 30 kat artış gerçekleşti. Grafik düzeni açısından 3 kat girildi ve grafik üzerinde x10 olarak gösterildi.

Gerçek zamanlı PZR sonucunda anti DBL4 uygulaması yapılan AGS hücrelerinde kontrol hücrelerine kıyasla DBL4 ve hedef genlerinin ekspresyonunda azalma gerçekleşti. Ancak CD44 gen ekspresyonunda bir değişim gerçekleşmedi. VCR uygulaması yapılan hücrelerde CD44 ve HEY1 genlerinde ekspresyon artışı, DBL4 HEY2, HES1, HES5 ve p21 genlerinin ekspresyonunda azalma gerçekleşti. VCR ve anti-DBL4'ün birlikte uygulaması yapılan hücrelerde CD44, HEY1, HES1 ve p21 gen ekspresyonlarında artış, HES5 gen ekspresyonunda 90 kat artış, DBL4 ve HEY2 gen ekspresyonlarında azalma gerçekleşti. Farklılaşma yapılmış hücre

gruplarından yalnız VCR uygulanmış hücrelerde CD44 ve HES5 gen ekspresyonlarında artışı diğer genlerin ekspresyonlarında azalma gerçekleşti. VCR ve anti-DBL4'ün beraber uygulandığı hücrelerde CD44 ekspresyonunda artış, diğer genlerin ekspresyonlarında azalma gerçekleşti. VCR uygulaması yapıp farklılaştırılmanın ardından anti-DBL4 uygulaması yapılan hücrelerde tüm genlerin ekspresyonunda azalma gerçekleşti.



Şekil 5.16. MKN45 hücre hatlarında genlerin ekspresyonları.

Gerçek zamanlı PZR sonucunda VCR uygulaması yapılan MKN45 hücrelerinde tüm genlerin ekspresyonunda artış gerçekleşmiştir. VCR ve anti-DBL4'ün birlikte uygulaması yapılan hücrelerde tüm genlerin ekspresyonunda artış, CD44 gen ekspresyonunda kontrol grubuna oranla 92,4 kat artış gerçekleşti. Farklılaşma yapılmış hücre gruplarında gen ekspresyonlarında belirli bir değişim gerçekleşmedi.

VCR ve anti-DBL4'ün beraber uygulandığı durumda CD44 geninin ekspresyonunda 92.4 kat artış gerçekleşti. Grafik düzeni açısından 10,2 kat girildi ve grafik üzerinde x10 olarak gösterildi.

6.TARTIŞMA

Kanser hücresi popülasyonlarının içinde az bir oranda da olsa kanser kök hücreleri bulunmaktadır ve bu hücreler kanser popülasyonunun oluşumu, gelişimi ve devamlılığında çok önemli role sahiptir. Bu kanser hücreleri kendini yenileyebilen dirençli hücrelerdir. Kanser tedavisi sonrası, özellikle kemoterapi sonrası kanserin hastalarda tekrar nüksettiği sık sık görülmektedir (Chen et al., 2013). Bunun nedeni kanser terapileri ardından yaşayan hücrelerin terapiye karşı direnç geliştirmesidir (Xue et al., 2012). Bu nedenle kemoterapiye karşı dirençli hücreler üzerinde çalışılmalı ve bu hücrelerin çoğalmalarının kontrol altına alınması sağlanmalıdır.

Kanser kök hücrelerinin diğer tümör hücrelerinden ve normal kök hücrelerden ayrımını sağlamak için ilgilenilen kanser kök hücresine özgü spesifik yüzey biyobelirteçleri kullanılmaktadır. Mide kanseri kök hücreleri ilk olarak Yang ve arkadaşları tarafından 2007 yılında keşfedilmiştir (Yang et al.). CD44 çok önemli bir mide kanseri yüzey biyobelirteçidir (Ranji et al., 2016).

Kanser hastalığını yenmek adına çeşitli kanser türüne karşı, kemoterapi ve/veya radyoterapi ile cerrahi yöntemler gibi tedavilerin bir kombinasyonu uygulanmaktadır (NCI, 2018). VCR çeşitli kanserleri tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan, mikrotübüllerin yıkımını hedefleyen bir kemoterapi ilacıdır (Mohammadgholi et al., 2013). Ayrıca hayvan tümörlerinde geniş vasküler hasara neden olduğu da bilinmektedir (Hayot et al., 2002).

Notch sinyalizasyon yolağı vaskülarizasyonda anahtar bir role sahiptir. Ayrıca hücre-hücre etkileşiminde, gen ekspresyonunda, hücre yaşayabilirliğinde, hücre farklılaşmasında ve kök hücre popülasyonunun devamlılığında kritik rol oynar (Andersson & Lendahl, 2014; Mailhos et al., 2001). Notch ligantları arasından DBL4'ün, tümör bağımlı anjiyogenezle ilişkilendiğine dair yapılmış çalışmalar mevcuttur (Fischer et al., 2004).

Gerçekleştirilen MTT analizi sonuçlarından VCR'in AGS ve MKN45 mide kanseri hücreleri ile kontrol olarak kullanılan fibroblast dH1f hücreleri üzerinde toksik etkisi olduğunu ancak DBL4 inhibitörünün aşırı derecede bir toksik etkisinin olmadığı görüldü. VCR bir kemoterapi ilacı olduğundan toksik etkisi beklenen bir durumdu. Ayrıca AGS hücre hattının VCR'ye MKN45 hücre hattına oranla daha dayanıklı olduğu, en az dayanıklı olan hücre hattının ise dH1f olduğu yine MTT analizi sonuçları ile belirlendi.

VCR'nin toksik etkisinin kanser olmayan normal hücre grupları üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla dH1f fibroblast hücreleri AGS ve MKN45 ile aynı şartlarda VCR ile muamele edildi. 72 saat VCR muamelesinin ardından dH1f hücrelerinin sayısında %40'luk bir düşüş gerçekleşti. Yaşayan hücrelerin morfolojilerinde farklılık olduğu gözlemlendi. Bu olay kemoterapi ilaçlarının kanser hücrelerinin yanısıra normal hücreleri de ciddi bir şekilde etkilediğine bir örnek teşkil etmektedir. VCR sonrası morfolojileri bozulmuş dH1f hücrelerinin çekirdekleri Hoechst 33342 çekirdek boyası ile boyandı. Boyama sonrası sağlam çekirdek yapıları mavi floresan rengi veren hücre çekirdeklerinde gözlemlendi. Sağlam çekirdek yapıları ile bozulmuş morfolojileri ile VCR uygulanmış dH1f hücreleri literatürdeki bilgiler ile karşılaştırıldığında bu hücrelerin senesense girmiş hücreler olduğu düşünüldü. Hücrelerin senesense girip girmediklerinin anlaşılabilmesi için gerekli testlerin yapılması gerekir.

VCR indüklemesi ardından dirençli AGS ve MKN45 hücreleri sferoid oluşumunu sağlamak amacıyla bFGF ve EGF içeren sferoid medyumunda büyütüldü. Belli aralıklarla hücreler invert mikroskopta incelendi. 15. günde sferoid yapılarının oluşumları görüldü ve kaydedildi. Elde edilen bu veriler literatür ile uyum göstermektedir.

VCR ve DBL4 inhibitörünün birlikte ve ayrı ayrı kullanıldığı durumlarda mide kanseri hücre popülasyonlarında ciddi bir azalma gerçekleşti. Bu uygulama sonrası hayatta kalan dirençli hücrelerin farklılaştırılması sonucunda da damar benzeri yapılar elde edildi. Bu sonuç literatürü desteklemektedir. VCR direncine sahip mide kanseri hücrelerin farklılaştırılması ile elde edilen damar benzeri yapıların DBL4 inhibitörü kullanılması durumunda ise azaldığı morfolojik olarak tespit edildi.

VCR ve DBL4 inhibitörünün birlikte ve ayrı ayrı kullanıldığı durumlarda AGS ve MKN45 mide kanseri hücre hatlarında mide kanseri kök hücre biyobelirteci olan CD44'ün gen ekspresyonu incelendi. Elde edilen sonuçlarda;

- VCR uygulanan grupta CD44 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla AGS hücrelerinde 3 kat, MKN45 hücrelerinde 11 kat arttığı,
- Kontrol grubu ile kıyaslandığında anti-DBL4'ün yalnız kullanılmasının CD44 ekspresyon seviyesinin değişiminde bir etkisinin olmadığı,
- VCR ve DBL4 inhibitörünün beraber kullanıldığı durumlarda ise AGS hücrelerinde 3,5 kat, MKN45 hücrelerinde ise 92,4 kat daha fazla bir ekspresyon artışının gerçekleştiği görüldü.

Bu ekspresyon artışı VCR ve DBL4 inhibitörünün beraber kullanılması durumunun mide KKHBBH'lerin oluşumuna etkisi olduğunu düşünüldü. CD44 ekspresyon artışı MKN45 hücrelerinde çok daha fazla gerçekleşmiştir.

VCR ve VCR ile DBL4 inhibitörünün beraber kullanılıp farklılaştırıldığı durumlarda;

- AGS hücrelerindeki CD44 ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 2 kat artış gerçekleştiği,
- MKN45 hücrelerindeki CD44 ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 kat artış gerçekleştiği görüldü.

VCR ve VCR ile DBL4 inhibitörünün beraber kullanıldığı durumdaki CD44 ekspresyonu, VCR ve VCR ile DBL4 inhibitörünün beraber kullanılıp farklılaştırılmasından elde edilen hücre grupları ile karşılaştırıldığında her iki hücre kültüründe de azalma meydana gelmiştir. Bu ekspresyon düşüşü KKHBBH'lerin farklılaşma ile beraber artık KKH özelliğini yitirdiği sonucuna varabiliriz.

VCR uygulamasının ardından farklılaştırılıp, sonrasında DBL4 inhibitörünün kullanıldığı durumda;

- AGS hücrelerindeki CD44 ekspresyonunun VCR uygulandığı durumlarla karşılaştırıldığında 7 kat,
- MKN45 hücrelerinde 184 kat azaldığı görüldü.

Bu çalışmada ilk defa VCR ile indüklenerek mide KKBH'lerinin farklılaştırılma sonucu damar benzeri yapıların elde edilmesinin ardından DBL4 inhibitörünün kullanılması ile vaskülarizasyonda önemli bir role sahip DBL4-Notch1 hedef genlerinin ve bu hücrelerde bir yüzey biyobelirteci olan CD44 geninin ekspresyonunda azalma gözlemlenmiştir. Bu bulgularımız sonucunda VCR ve DBL4 inhibitörünün farklılaşma sonrası geç evrede beraber kullanılması halinde CD44 ekspresyonunun düşüşüne bağlı olarak mide kanseri tümörlerinde KKBH popülasyonunun azaltılabileceği fikrini vermektedir.

VCR ve DBL4 inhibitörünün birlikte ve ayrı ayrı kullanıldığı, farklılaşmanın gerçekleştirildiği ve farklılaşma sonrası DBL4 inhibitörünün kullanıldığı tüm durumlarda DBL4 geninin, DBL4-Notch1 sinyalizasyon yolağının hedef genleri olan ve vaskülarizasyonda önemli bir yere sahip HEY1, HEY2, HES1 ve HES5 genleri ile yine bu sinyal yolağının hedef genlerinden biri olan p21 genlerinin ekspresyon değişimleri kantitatif gerçek zamanlı PZR ile incelendi.

Elde edilen PZR sonuçlarında her iki hücre tipinde de DBL4 inhibitörünün kullanıldığı durumlarda DBL4 geninin ekspresyonun ve DBL4-Notch sinyalizasyon yolağı hedef genlerinin ekspresyonunda kontrol gruba göre azalma gerçekleştiği görüldü. DBL4 inhibitörü ile DBL4'ün protein düzeyinde inhibisyonu gerçekleştirildi. Yapılan ekspresyon analizleri sonucunda DBL4 inhibitörü uygulanan hücre hatlarında DBL4 geninin ekspresyonunda da düşüş gerçekleştiği görüldü. DBL4'ün hedef genlerinin ekspresyonlarındaki düşüş beklenen bir durumdur. DBL4 gen ekspresyonundaki düşüş DBL4'ün hedef genlerinin DBL4 geninin yazılımında da bir etkisi olduğunu düşündürmektedir.

VCR ve DBL4 inhibitörünün birlikte kullanıldığı durumlarda, DBL4 ve hedef genlerinin gen ekspresyonlarında kontrol grubuna kıyasla artış gerçekleştiği görüldü. VCR'ye dirençli hücrelerin farklılaştırılmasının ardından anti-DBL4 uygulanan hücrelerdeki DBL4 ve hedef genlerinin ekspresyonları, VCR'ye dirençli hücrelerin farklılaştırıldığı grup ile kıyaslandığında DBL4 ve hedef gen ekspresyonlarında azalma gerçekleştiği görüldü. Bu sonuç amacımız doğrultusunda beklediğimiz bir durumdur.

Çalışma sonucunda VCR ile anti-DBL4'ün kombine uygulamasının damar benzeri yapılar oluşturmuş dirençli ileri evre mide kanserlerinde kanser kök hücrelerinin popülasyonlarının azaltılmasında kullanılabileceği söylenebilir.



7.KAYNAKLAR

- Adam J. Bass¹, Vesteynn Thorsson², Ilya Shmulevich², Sheila M. Reynolds², Michael Miller², Brady Bernard², Toshinori Hinoue³, Peter W. Laird³, Christina Curtis⁴, Hui Shen³, Daniel J. Weisenberger³, Nikolaus Schultz⁵, Ronglai Shen⁶, Nils Weinhold⁵, David P. M. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517), 202–209. <https://doi.org/10.1038/nature13480>. Comprehensive
- Andersson, E. R., & Lendahl, U. (2014). Therapeutic modulation of Notch signalling—are we there yet? *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(5), 357–378. <https://doi.org/10.1038/nrd4252>
- Bresciani, F. (1968). Cell proliferation in cancer. *European Journal of Cancer*, 4(4), 343–366. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(68\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0014-2964(68)90025-X)
- Chen, K., Huang, Y., & Chen, J. (2013). Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), 732–740. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.27>
- Cheng Ting Chien, S. S. (2013). RNAi Induced Wing Modification in Leon Mutant *Drosophila* Females: Exploring the Tissue Specificity and Physiological Interference. *Gene Technology*, 2(1), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2329-6682.1000104>
- Evan, G. I., & Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835), 342–8. <https://doi.org/10.1038/35077213>
- Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M., & Gessler, M. (2004). The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes and Development*, 18(8), 901–911. <https://doi.org/10.1101/gad.291004>
- Fu, Y., Li, H., & Hao, X. (2017). The self-renewal signaling pathways utilized by

gastric cancer stem cells. *Tumor Biology*, 39(4).

<https://doi.org/10.1177/1010428317697577>

Gatto, F., & Nielsen, J. (2016). In search for symmetries in the metabolism of cancer.

Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 8(1), 23–35.

<https://doi.org/10.1002/wsbm.1321>

Gidding, C. E. M., Kellie, S. J., Kamps, W. A., & De Graaf, S. S. N. (1999).

Vincristine revisited. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 29(3), 267–

287. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(98\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(98)00023-7)

Hayot, C., Farinelle, S., De Decker, R., Decaestecker, C., Darro, F., Kiss, R., & Van Damme, M. (2002). In vitro pharmacological characterizations of the anti-

angiogenic and anti-tumor cell migration properties mediated by microtubule-affecting drugs, with special emphasis on the organization of the actin

cytoskeleton. *International Journal of Oncology*, 21(2), 417–425.

Jafargholizadeh, N., Zargar, S. J., Yassa, N., & Tavakoli, S. (2016). Purification of Cucurbitacins D, E, and I from *Ecballium elaterium* (L.) A. rich fruits and study of their cytotoxic effects on the AGS cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(10), 4631–4635.

<https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.10.4631>

Jemal, A., Bray, F., & Ferlay, J. (1999). Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin*,

49(2), 1,33-64. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>. Available

Jiang, J., Zhang, Y., Chuai, S., Wang, Z., Zheng, D., Xu, F., ... Chen, Z. (2012).

Trastuzumab (herceptin) targets gastric cancer stem cells characterized by CD90 phenotype. *Oncogene*, 31(6), 671–682. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.282>

Johnson, I. S., Armstrong, J. G., & Gorman, M. (1963). The Vinca Alkaloids : A

New Class of Oncolytic Agents The Vinca Alkaloids : A New Class of Oncolytic Agents, (77), 1390–1427.

Kamikihara, T., Ishigami, S., Arigami, T., Matsumoto, M., Okumura, H., Uchikado,

Y., ... Natsugoe, S. (2012). Clinical implications of N-cadherin expression in gastric cancer. *Pathology International*, 62(3), 161–166.

<https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2011.02774.x>

Lee, D., Kim, D., Choi, Y. Bin, Kang, K., Sung, E. S., Ahn, J. H., ... You, W. K. (2016). *Simultaneous blockade of VEGF and Dll4 by HD105, a bispecific antibody, inhibits tumor progression and angiogenesis. mAbs* (Vol. 8).

<https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1171432>

Li, J. L., Sainson, R. C. A., Shi, W., Leek, R., Harrington, L. S., Preusser, M., ... Harris, A. L. (2007). Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Research*, 67(23), 11244–11253. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0969>

Lim, J. Y., Kim, D., Kim, B. R., Jun, J. S., Yeom, J. S., Park, J. S., ... Rhee, K. H. (2016). Vitamin C induces apoptosis in AGS cells via production of ROS of mitochondria. *Oncology Letters*, 12(5), 4270–4276.

<https://doi.org/10.3892/ol.2016.5212>

Liu, L. K., & Finzel, B. (2014). High-resolution crystal structures of alternate forms of the human CD44 hyaluronan-binding domain reveal a site for protein interaction. *Acta Crystallographica Section:F Structural Biology Communications*, 70, 1155–1161. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14015532>

Mailhos, C., Lewis, J., Ish-Horowicz, D., Modlich, U., Harris, A., & Bicknell, R. (2001). Delta4, an endothelial specific Notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation*, 69(2–3), 135–144.

<https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2001.690207.x>

Mohammadgholi, A., Rabbani-Chadegani, A., & Fallah, S. (2013). Mechanism of the Interaction of Plant Alkaloid Vincristine with DNA and Chromatin: Spectroscopic Study. *DNA and Cell Biology*, 32(5), 228–235.

<https://doi.org/10.1089/dna.2012.1886>

Noble, R. L., Beer, C. T., & Cutts, J. H. (1958). Role of chance observations in chemotherapy: Vinca Rosea. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 76, 882–894.

Notch / Delta Yolağı Notch / Delta Yolağı. (n.d.).

- Ranji, P., Salmani Kesejini, T., Saeedikhoo, S., & Alizadeh, A. M. (2016). Targeting cancer stem cell-specific markers and/or associated signaling pathways for overcoming cancer drug resistance. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(10), 13059–13075. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5294-5>
- Richards, G. S., & Degnan, B. M. (2009). The dawn of developmental signaling in the metazoa. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 74, 81–90. <https://doi.org/10.1101/sqb.2009.74.028>
- Rugge, M., Fassan, M., & Graham, D. Y. (2015). Gastric Cancer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-15826-6>
- Rycaj, K., & Tang, D. G. (2014). Cancer stem cells and radioresistance. *International Journal of Radiation Biology*, 90(8), 615–621. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.892227>
- Santoro, E. (2005). The history of gastric cancer: Legends and chronicles. *Gastric Cancer*, 8(2), 71–74. <https://doi.org/10.1007/s10120-005-0325-8>
- Shaheen, S., Ahmed, M., Lorenzi, F., & Nateri, A. S. (2016). Spheroid-Formation (Colonsphere) Assay for in Vitro Assessment and Expansion of Stem Cells in Colon Cancer. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(4), 492–499. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9664-6>
- Silverman, J. A., & Deitcher, S. R. (2013). Marqibo®(vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(3), 555–564. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-2042-4>
- Smith, D. C., Eisenberg, P. D., Manikhas, G., Chugh, R., Gubens, M. A., Stagg, R. J., ... Sikic, B. (2014). A phase I dose escalation and expansion study of the anticancer stem cell agent demcizumab (Anti-DLL4) in patients with previously treated solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 20(24), 6295–6303. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1373>
- Smith, J. P., Nadella, S., & Osborne, N. (2017). Gastrin and Gastric Cancer. *Cmgh*,

4(1), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.03.004>

Sukach, A. N., & Ivanov, E. N. (2007). Formation of spherical colonies as a property of stem cells. *Tsitologiya*, 49(11), 916–922.

<https://doi.org/10.1134/S1990519X07060028>

Takano, Y., Okudaira, M., & Harmon, B. V. (1993). Apoptosis Induced by Microtubule Disrupting Drugs in Cultured Human Lymphoma Cells: Inhibitory Effects of Phorbol Ester and Zinc Sulphate. *Pathology Research and Practice*, 189(2), 197–203. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(11\)80092-0](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(11)80092-0)

Tannishtha, R., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature*, 414(November), 105–111.

<https://doi.org/10.1007/978-1-60327-933-8>

Torre, C. De, & Pincheira, J. (n.d.). Histopathology Invited Review Cell proliferation and cancer, (1998).

Xue, Z., Yan, H., Li, J., Liang, S., Cai, X., Chen, X., ... Fan, D. (2012).

Identification of cancer stem cells in vincristine preconditioned SGC7901 gastric cancer cell line. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(1), 302–312.

<https://doi.org/10.1002/jcb.23356>

Yeh, T. S., Wu, C. N., Hsu, K. W., Liao, W. J., Yang, M. C., Li, A. F. Y., ... Chi, C. W. (2009). The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2. *Cancer Research*, 69(12), 5039–5048. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4021>

Yuan, X., Wu, H., Xu, H., Xiong, H., Chu, Q., Yu, S., ... Wu, K. (2015). Notch signaling: An emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer Letters*, 369(1), 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.048>

Z.-F., M., H., X., H.-M., X., Z.-N., W., T.-T., Z., Y.-X., S., & Y.-Y., X. (2017).

DLL4 overexpression increases gastric cancer stem/progenitor cell self-renewal ability and correlates with poor clinical outcome via Notch-1 signaling pathway activation. *Cancer Medicine*, 6(1), 245–257. <https://doi.org/10.1002/cam4.962>

Zöller, M. (2011). CD44: Can a cancer-initiating cell profit from an abundantly

expressed molecule? *Nature Reviews Cancer*, 11(4), 254–267.
<https://doi.org/10.1038/nrc3023>



8. ÖZGEÇMİŞ

Pınar AYDINDAĞ

Feyzullah Mah. Bağdat Cad. No:260 Palmiye Aprt. A Blok Daire:13
Maltepe/İSTANBUL

Telefon: 0 (216) 442 97 89

Cep: 0 (536) 833 46 25

E-posta: pinar.aydindag@gmail.com

Kişisel Bilgiler

Doğum Tarihi: 11.02.1993

Doğum Yeri: Üsküdar/İSTANBUL

Medeni Hali: Bekar

Ehliyet: 01.07.2011 (B)

Eğitim

1999-2007 Feyzullah-Turgay Ciner 1 İ.Ö Okulu

2007-2011 Atilla Uras Lisesi

2011-2015 Haliç Üniversitesi

2015-2018 Haliç Üniversitesi (Yüksek Lisans)

Teknik Bilgiler

PCR ve RT-PCR Optimizasyonları ve Uygulamaları

Spektrofotometrik Ölçümler

Jel Görüntüleme Sistemi (UV)

Elektroforez Sistemi

İzolasyon teknikleri (DNA, RNA, plazmid)

MS Office

Hücre kültürü çalışmaları.

Staj

Florance Nightingale Hastanesi - Biyokimya ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Sertifikalar

İstanbul Tıp Fakültesi Sinirbilim Kongresi 6-7 Mayıs 2017

XIIIth IUGEN International Molecular Biology And Genetics Student's Winter School 4-6 Mart 2016

Dünya Göz Vakfı Konuşan Kitaplar Projesi 1 Ocak 2016

T.C. Haliç Üniversitesi Genetik Klübü (HÜGEN) I. Kök Hücre Sempozyumu 18 Nisan 2015

T.C. Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümü I. Adli Bilimler Sempozyumu 7 Mart 2015

T.C. Haliç Üniversitesi Genetik Klübü (HÜGEN) I. Onkoloji Sempozyumu 19 Nisan 2014

T.C. Haliç Üniversitesi Genetik Klübü (HÜGEN) I. Tüp Bebek Paneli 14 Aralık 2013

Boğaziçi Üniversitesi Bilim Klübü Moleküler Biyoloji Ve Genetik Hafta Sonu VIII Sempozyumu 23-24 Mart 2013

Amerikan Kültür Dil Okulları B2 Seviye İngilizce Dili Sertifikası

Dünya Göz Vakfı Konuşan Kitaplar Projesi Sertifikası

Yabancı Diller

İngilizce (Intermediate)