

T.C.

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**miR-150 İFADESİNİN MEZENKİMAL KARAKTERLERE ETKİSİNİN
ÜÇ BOYUTLU PANKREAS KANSERİ HÜCRE FORMLARINDA
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra Naz SARIKAYA

2000006393

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI

OCAK 2023

T.C.

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**miR-150 İFADESİNİN MEZENKİMAL KARAKTERLERE ETKİSİNİN
ÜÇ BOYUTLU PANKREAS KANSERİ HÜCRE FORMLARINDA
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra Naz SARIKAYA

2000006393

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI

Jüri Üyeleri : Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ

Dr. Öğr. Üyesi Yasemin YILMAZER

OCAK 2023

ÖNSÖZ

Tezimin her aşamasında tecrübe ve bilgisini esirgemeyen, beni motive ederek destekleyen çok değerli tez danışmanım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI' na teşekkürlerimi sunarım.

Tez jüri üyeleri Sayın Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yasemin YILMAZER' e katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez sürecimde laboratuvardaki çalışmalarında beni destekleyen ve bilgilerini paylaşan değerleri hocalarım Dr. Burcu AYHAN ŞAHİN, Dr. Öğr. Üyesi Alp AYAN, Araş. Gör. Sinan MERİÇ ve Araş. Gör. Tamer GÜMÜŞ' e çok teşekkür ederim.

Laboratuvarında birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Ayşe Simay METİN, Ebrar KARAKAYA, Didem SEZGİN, Mine Yıldırım BORUCU ve Kaan DİNÇKURT' a bu süreçteki yardım ve destekleri için çok teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimimde bana yol gösteren tüm hocalarıma ve güzel anıları paylaştığımız tüm bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni her zaman destekleyen, bu süreçlerde özveride bulunan annem Nursel SARIKAYA' ya, bugünlere beraber geldiğimiz beni her zaman destekleyen ve her anımda yanımda olan ikiz kardeşim Ceren Nur SARIKAYA' ya çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans tez çalışmamı Lisansüstü Tez Projesi Bilimsel Araştırma Projesi (LTP BAP) (Proje no: BAP2210) olarak destekleyen İstanbul Kültür Üniversitesi Teknoloji Proje Destek Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamı, kıymetli babam “Ali SARIKAYA” ya ithaf ediyorum.

Ocak, 2023

Esra Naz SARIKAYA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
KISALTMALAR	vi
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xvi
ÖZET	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Pankreas Kanseri	4
2.1.1. Pankreas Kanseri Tanımı ve Evreleri	4
2.1.2. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi ve Oluşumundaki Risk Faktörleri	6
2.1.3. Pankreas Kanseri Hücre Hatları ve Karakteristik Özellikleri	8
2.1.4. Pankreas Kanseri Neden Olan Mutant Genler.....	9
2.1.5. Pankreas Kanseri Güncel Terapötik Yöntemler	11
2.2. Epitelial Mezenkimal Geçiş ve Kanseri İlişkisi.....	13
2.3. Hücre Kültüründe Üç Boyutlu Hücre Formları.....	15
2.3.1. Kanseri Tedavisinde Üç Boyutlu Hücre Modelleri ve Kişiyeye Özel Tedavinin Geliştirilmesi	17
2.4. Kodlama Yapmayan mikroRNA Sınıfı	19
2.4.1. Kanonik mikroRNA Oluşumu	20
2.4.2. Kanseri Patogeneğinde mikroRNA Sınıfı	22
2.4.3. miRNA ve Pankreas Kanseri İlişkisi.....	23
2.4.4. miR-150.....	24
2.5. Hücre Döngüsü ve Kontrol Mekanizması.....	26

2.5.1. Siklin D/CDK4/6 Kompleksi ve Kanser	27
2.5.2. Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü: Palbosiklib	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. Materyaller	30
3.1.1. Kullanılan Cihazların Listesi.....	30
3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Donanımların Listesi	30
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	30
3.1.4. Kullanılan Tamponların İçeriği.....	30
3.2. Yöntemler.....	30
3.2.1. Hücre Kültürü.....	30
3.2.2. Hücrelerin Açılması ve Dondurulması.....	31
3.2.3. Hücelere miR-150 Mimik Transfeksiyonu	32
3.2.4. Hücrelerin Palbosiklib ile Muamele Edilmesi	33
3.2.5. miRNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu .	33
3.2.6. Üç Boyutlu Hücre Formunun Oluşturulması	33
3.2.7. Koloni Oluşturma Deneyi	35
3.2.8. Hücre Sağkalım Testi	36
3.2.9. Yara Kapanma Deneyi Uygulanması.....	36
3.2.10. Hücrelerin Floresan Boyalar Yardımı ile Floresan Mikroskobu Altında Görüntülenmesi	37
3.2.11. İmmunoblotlama	38
3.2.12. RNA İzolasyonu ve Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	41
3.2.13. İstatiksel Analiz.....	42
4. SONUÇLAR.....	43
4.1. MIAPaCa-2 ve Capan-2 Pankreas Kanseri Hücrelerine miR-150 Transfeksiyonu ve Palbosiklib (Ibrance) Uygulaması	43

4.2. Pankreas Kanseri Hücrelerine miR-150 Mimik Transfeksiyonunun Hücrelerin Üç Boyutlu (3B) Hücre Formlarına Etkisinin Yumuşak Agar Koloni Oluşturma Deneyi ile İncelenmesi.....	44
4.3. Palbosiklib (Ibrance) ve Gemsitabin Uygulamalarının miR-150 Transfekte Edilen Hücrelerde Üç Boyutlu Hücre Formlarına Etkisinin İncelenmesi.....	46
4.4. Asılı Damla Deneyi ile Pankreas Kanseri Hücrelerinde miR-150 Mimik Transfeksiyonu ile Palbosiklib (Ibrance) Uygulamalarının Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşturulmasındaki Etkilerinin Gösterilmesi	48
4.5. Matrigel Deneyi ile Pankreas Kanseri Hücrelerin miR-150 Mimik Transfeksiyonu veya miR-506 Transfeksiyonu ile Palbosiklib (Ibrance) ve Gemsitabin Uygulamalarının Ardından Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşturulmasındaki Etkilerinin Gösterilmesi	51
4.6. miR-150 Mimik Transfeksiyonu ve Palbosiklib (Ibrance) Uygulamasının 2 Boyutlu ve 3 Boyutlu Pankreas Kanseri Hücrelerinde Koloni Oluşturma Etkisinin Gösterilmesi.....	52
4.7. Pankreas Kanseri Hücrelerinin miR-150 ve Palbosiklib (Ibrance) Uygulamaları ile Zamana Bağlı Sağkalım Analizi	55
4.8. Pankreas Kanseri Hücrelerinde miR-150 Mimik Transfeksiyonu ile Palbosiklib (Ibrance) Uygulamalarının Migrasyona Etkisinin İncelenmesi .	56
4.9. Pankreas Kanseri Hücrelerinde miR-150 Mimik Transfeksiyon ile Palbosiklib (Ibrance) Uygulamalarının EMT Mekanizmasında Görev Alan Protein İfadelerine Etkisi	60
4.10. Pankreas Kanseri Hücrelerinde miR-150 Mimik Transfeksiyon ile Palbosiklib (Ibrance) Uygulamalarının EMT Mekanizmasında Görev Alan Gen İfadeleri Üzerindeki Etkisinin Gerçek Zamanlı PZR Analizi ile İncelenmesi.....	63
5. TARTIŞMA.....	66
6. KAYNAKÇA.....	79
7. EKLER	92

7.1. EK A: Cihaz Listesi.....	92
7.2. EK B: Hücre Kültürü Donanım Listesi.....	94
7.3. EK C: Kimyasal Listesi.....	95
7.4. EK D: Kullanılan Tamponların İçeriği.....	98



KISALTMALAR

AGO	: Argonot
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
AKT3	: Protein Kinaz B Gama
APS	: Amonyum Persülfat
ATCC	: American Tissue Culture Collection
BCL9L	: B Hücresi Lenfoma 9 Benzeri
BSA	: Sığır Serum Albumin
C. elegans:	Caenorhabditis elegans
CBL	: Proto-onkogen
CDK	: Sikline Bağımlı Kinaz
CDK13	: Sikline bağımlı kinaz 13
CDK5R1	: Sikline bağımlı kinaz 5, aktivatör 1
CDKi	: Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü
CLB	: Hücre Lizis Tamponu
COL4A4	: Kollajen tip IV alfa 4
CTNNB1	: Katenin Beta 1
DGCR8	: DiGeorge Sendromu Kritik Bölge
dH ₂ O	: Distile Su
DKK3	: Dickkopf WNT Sinyal Yolu İnhibitörü 3
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
ECM	: Ekstraselüler matriks
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EGR2	: Early Growth Response 2

EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
FBS	: Fetal Sığır Serumu
FDA	: Food and Drug Administration
FNDC5	: Fibronektin Tip III Domain İçeren Protein 5
FOXO4	: Forkhead Box 4
FT	: Farnesil Transferaz
GAB1	: GRB2 ile İlişkili Bağlayıcı Protein 1
GAPDH	: Gliseraldehid-3-Fosfat Dehidrogenaz
GEM	: Gemsitabin
GSK3B	: Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta
HIF1A	: Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör 1 Alfa
HSP	: Isı çok Proteinleri
IGFR	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
IRF2BP2	: İnterferon Düzenleyici Faktör 2 Bağlayıcı Protein 2
ITGB3	: İntegrin Beta 3
KRAS	: Kirsten Sıçan Sarkoma Virüsü
MAP2K6	: Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz Kinaz 6
MAP3K12	: Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz Kinaz Kinaz 12
MAP3K3	: Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz Kinaz Kinaz 3
miRNA	: MikroRNA
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MRE	: miRNA Yanıt Elementi
mTOR	: Rapamisinin Memeli Hedefi
MUC21	: Müsin 21
MYB	: Proto-onkogen
NOTCH3	: Notch Reseptör 3

Nsp10	:	Yapısal Olmayan Protein 10
PARP	:	Poli ADP Riboz Polimeraz
PBS	:	Fosfat Tamponlu Tuz
PCDH1	:	Protokadherin 1
PD	:	Palbosiklib
PK	:	Pankreas Kanseri
PVDF	:	Poliviniliden Diflorür
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAB9A	:	RAS Onkogen Ailesi Üyesi
RISC	:	RNA-İndükleyici Susturma Kompleksi
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE:		SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SRCIN1	:	SRC Kinaz Sinyal İnhibitörü 1
STAT1	:	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 1
TBS	:	Tris Tamponlu Tuz
TBS-T	:	Tris Tamponlu Tuz – Tween 20
TCF23	:	Transkripsiyon Faktörü 23
TEMED	:	Tetrametiletildiamin
TP53	:	Tümör Proteini p53
TRBP	:	Transaktivasyon Yanıtı (TAR) RNA Bağlayıcı Protein
VEGFR	:	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü
WNT2B	:	Wnt Aile Üyesi 2B
XPO5	:	Exportin5
ZEB1	:	Zinc Finger E-box Binding Homeobox 1

SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

% : Yüzde

⁰C : Santigrat derece

μl : Mikrolitre

μM : Mikromolar

A : Amper

gr : Gram

kDA: KiloDalton

L : Litre

M : Molar

mM : Milimolar

ml : Mililitre

pH : Hidrojen kuvveti

rpm: Dakikadaki dönüş sayısı

V : Volt

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Kanser Genom Atlası veritabanı analizine dayanarak pankreas karsinogenezinde tanımlanan genler ve mutasyon çeşitlerinin gösterimi [24].	9
Şekil 2.2. Pankreas kanseri ile ilişkili genlerin tümör lezyonlarının ilerlemesindeki ilişkisi [24].	10
Şekil 2.3. EMT mekanizmasında epitelyal ve mezenkimal hücrelerin tanımlanmasını sağlayan belirteçlerin gösterimi [40].	14
Şekil 2.4. 3B sferoid yapıları oluşturan hücrelerin dağılımı [57].	16
Şekil 2.5. Pluripotent hücrelerden oluşturulan organoidler ve gelişimlerinde rol alan sinyallerin gösterimi [58].	17
Şekil 2.6. Kanonik mikroRNA Biyogenez Yolağının Resmedilişi [82].	21
Şekil 2.7. miR-150 Genomik Lokasyonunun ve Dizisinin Gösterilmesi (miR-150-5p ve miR-150-3p) [96].	24
Şekil 2.8. hsa-miR-150 diziliminin gösterimi (miRBase) [97].	25
Şekil 2.9. Siklin D/CDK4/6 kompleksinin G1/S hücre döngüsü geçiş fazındaki etki mekanizmasının gösterimi [112].	28
Şekil 2.10. Hücre siklusunda CDK4 ve CDK6 inhibitörleri tarafından hücrenin S fazına geçişinin engellenmesi [117].	29
Şekil 2.11. CDKi Ibrance (PD) kimyasal yapısının gösterimi [119].	29
Şekil 4.1. MIAPaCa-2 hücrelerinde miR-150 mimik transfeksiyon sonrası Palbosiklibin belirtilen miRNA ifadesine etkisi. MIAPaCa-2 hücreleri sentetik miR-150 ve negatif kontrol (NC) ile 48 saat boyunca transfekte edildi. miRNA izolasyonu sonrası miRNA ifadeleri gerçek zamanlı PZR kullanılarak belirlendi. Normalizasyon internal endojen kontrol RNU6 ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar iki farklı deneyin 2 tekrarlı verilerinin ortalama/St. Sapma değerleridir (*p<0,05, ****p<0,0001).	43

Şekil 4.2. Capan-2 hücrelerinde miR-150 mimik transfeksiyon sonrası Palbosiklibin belirtilen miRNA ifadesine etkisi. Capan-2 hücreleri sentetik miR-150 ve negatif kontrol (NC) ile 48 saat boyunca transfekte edildi. miRNA izolasyonu sonrası miRNA ifadeleri gerçek zamanlı PZR kullanılarak belirlendi. Normalizasyon internal endojen kontrol RNU6 ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar iki farklı deneyin 2 tekrarlı verilerinin ortalama/St. Sapma değerleridir (*p<0,05, ****p<0,0001).	44
Şekil 4.3. Yumuşak agar deneyi ile miR-150 mimik transfeksiyonunun koloni oluşumundaki etkisinin gösterilmesi. a. MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine miR-150 mimik transfeksiyonunun sferoid yapılarına etkisi üçüncü ve dördüncü haftalarda ışık mikroskobu altında gözlemlendi. b. İki yönlü ANOVA testi kullanılarak üçüncü ve dördüncü haftalardaki sferoid çaplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri bulundu ve sferoid çaplarının zamana bağlı analizi sütun grafiği ile belirtildi (***p=0,0007, ****p<0,0001).	45
Şekil 4.4. Yumuşak agar deneyi ile miR-150 mimik transfeksiyonunun koloni oluşumundaki etkisinin gösterilmesi. a. Capan-2 pankreas kanseri hücrelerine miR-150 mimik transfeksiyonunun sferoid yapılarına etkisi üçüncü ve dördüncü haftalarda ışık mikroskobu altında gözlemlendi. b. İki yönlü ANOVA testi kullanılarak üçüncü ve dördüncü haftalardaki sferoid çaplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri bulundu ve sferoid çaplarının zamana bağlı analizi sütun grafiği ile belirtildi (**p=0,0014, ****p<0,0001).	46
Şekil 4.5. Yumuşak agar koloni formasyon deneyi ile Palbosiklib, Gempitabin ve/veya miR-150 transfeksiyonunun koloni oluşturma üzerindeki etkisinin gösterilmesi. a. MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde Palbosiklib, Gempitabin uygulamaları ve miR-150 transfeksiyonu ile gerçekleştirilen kombine uygulamalarının 3B formasyon oluşumundaki etkisi 3 hafta sonra gözlemlendi ve sferoid çapları ölçüldü. DAPI ve DiOC6 boyalarının uygulanmasının ardından deney gruplarının oluşturduğu sferoidler ışık ve floresan mikroskobu altında uygun filtreler aracılığı ile görüntülendi. b. 3. haftada deney gruplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri bulundu ve sütun grafiği ile belirtildi (****p<0,0001).	47

Şekil 4.6. Asılı damla yöntemi ile MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine Palbosiklib uygulamasının ve/veya miR-150 transfeksiyonunun 3B hücre formlarının oluşturulmasındaki etkisinin gösterilmesi. a. MIAPaCa-2 hücrelerinde deney gruplarının oluşturduğu sferoid formların çapları 48 ve 72. saatlerde ölçüldü. 72 saat ışık çekiminden önce DAPI ve DiOC6 boyaması gerçekleştirildi ve sferoid formlar floresan mikroskobu altında uygun filtreler kullanılarak görüntülendi. b. 72 saat sonunda deney gruplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri sütun grafiği ile belirtildi (**p=0,0005, **p=0,0096). 49

Şekil 4.7. Asılı damla yöntemi ile Capan-2 pankreas kanseri hücrelerine Palbosiklib uygulamasının ve/veya miR-150 transfeksiyonunun 3B hücre formlarının oluşturulmasındaki etkisinin gösterilmesi. a. Capan-2 hücrelerinde deney gruplarının oluşturduğu sferoid formların çapları ışık mikroskobu altında ölçüldü. 72 saat sonunda DAPI ve DiOC6 boyaması gerçekleştirildi ve sferoid formlar floresan mikroskobu altında uygun filtreler kullanılarak görüntülendi. b. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda deney gruplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri sütun grafiği ile belirlendi (****p<0,0001, ***p=0,0002)..... 50

Şekil 4.8. Matrigel deneyi ile MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde 3B hücre formlarının oluşturulması. a. MIAPaCa-2 hücrelerinde miR-150+ ve miR-506+ hücrelerine PD ve GEM uygulamaları ile oluşturulan 3B hücre formlarının 3. ve 4. haftalarda sferoid çaplarındaki etkisi gözlemlendi ve sferoid çapları ölçüldü. 4. haftada DAPI ve DiOC6 boyamaları uygulandı ve sferoidlerin ışık ve floresan mikroskobu altındaki görüntüleri çekildi. b. Mimik miRNA transfeksiyonu ve ilaç uygulamalarına göre oluşturulan deney grupları arasında yapılan çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri bulundu. 52

Şekil 4.9. 2B ve 3B MIAPaCa-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyellerinin incelenmesi. a. miR-150+ ve/veya PD uygulanan 2B ve 3B MIAPaCa-2 hücrelerinin koloni deneyi için ekimlerinin yapılması ile kristal viyole boyamasının ardından koloni oluşturma potansiyelleri tespit edildi. 3B MIAPaCa-2 hücrelerinden elde edilen kolonilerin çapları ışık mikroskobu altında görüntülendi ve çapları ölçüldü. b. 3B MIAPaCa-2 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyellerinde deney grupları arasında çoklu karşılaştırma analizi ile anlamlı fark bulundu. 53

Şekil 4.10. 2B Capan-2 hücrelerinde miR-150 mimik transfeksiyonu ve/veya PD uygulamasının koloni oluşturma potansiyellerinin kristal viyole ile boyanmasının ardından gösterimi.....	54
Şekil 4.11. 2B MIAPaCa-2 hücrelerinde miR-150 ifadesi ile ilişkili olarak Palbosiklibin hücre canlılığına etkisinin incelenmesi. 6 kuyucuklu petri kaplarına ekilen hücrelere miR-150 ifadesinin arttırılmasının ardından, miR-150+ ve normal MIAPaCa-2 hücrelerinde 3 µM Palbosiklib varlığında (24 sa) ve yokluğunda DiOC6 boyaması yapılarak hücre canlılığı analizi gerçekleştirilmiştir. Boyanmanın ardından hücreler floresan mikroskop altında gözlenmiştir.....	55
Şekil 4.12 . 2B Capan-2 hücrelerinde miR-150 ifadesi ile ilişkili olarak Palbosiklibin hücre canlılığına etkisinin incelenmesi. 6 kuyucuklu petri kaplarına ekilen hücrelere miR-150 ifadesinin arttırılmasının ardından, miR-150+ ve normal Capan-2 hücrelerinde 3 µM Palbosiklib varlığında (24 sa) ve yokluğunda DiOC6 boyaması yapılarak hücre canlılığı analizi gerçekleştirilmiştir. Boyanmanın ardından hücreler floresan mikroskop altında gözlenmiştir.....	56
Şekil 4.13. Palbosiklib ve/veya miR-150 mimik transfeksiyonu yapılmasının ardından 2B MIAPaCa-2 hücre formlarında migrasyon etkilerinin gösterilmesi. 2B MIAPaCa-2 hücre formlarının 6 kuyucuklu hücre tabakalarına ekimleri ile gerçekleştirilen yara iyileşme deneyinde 0, 24 ve 48. saatlerde ışık mikroskobu altında yara çaplarının ölçümü yapıldı. 48. saatin sonunda DiOC6 boyaması yapılarak uygun filtre yardımıyla hücreler floresan mikroskobu altında görüntülendi.	57
Şekil 4.14. Palbosiklib ve/veya miR-150 mimik transfeksiyonu yapılmasının ardından oluşturulan 3B MIAPaCa-2 hücre formlarından yapılan ekimler ile deney gruplarının migrasyon üzerindeki etkilerinin gösterilmesi. a. 3B MIAPaCa-2 hücre formlarının 6 kuyucuklu hücre tabakalarına ekimleri ile gerçekleştirilen yara iyileşme deneyinde 0, 24 ve 48. saatlerde ışık mikroskobu altında yara çaplarının ölçümü yapıldı. 48. saatin sonunda DiOC6 boyaması yapılarak uygun filtre yardımıyla hücreler floresan mikroskobu altında görüntülendi. b. Zamana bağlı olarak yara çaplarının deney grupları arasındaki karşılaştırması sütun grafiği ile belirtildi.	58

Şekil 4.15. Palbosiklib ve/veya miR-150 mimik transfeksiyonu yapılmasının ardından 2B Capan-2 hücre formlarında migrasyon etkilerinin gösterilmesi. 2B Capan-2 hücre formlarının 6 kuyucuklu hücre tabakalarına ekimleri ile gerçekleştirilen yara iyileşme deneyinde 0, 24 ve 48. saatlerde ışık mikroskobu altında yara çaplarının ölçümü yapıldı. 48. saatin sonunda DiOC6 boyaması yapılarak uygun filtre yardımıyla hücreler floresan mikroskobu altında görüntülendi.	59
Şekil 4.16. Palbosiklib ve/veya miR-150 mimik transfeksiyonunun ardından asılı damla yöntemi ile oluşturulan 3B Capan-2 hücre formlarından yapılan ekimle hücrelerin migrasyon etkisinin gösterilmesi. Yaranın açılmasından 24 saat sonra kapandığı gözlemlenen Capan-2 hücrelerine DiOC6 boyaması gerçekleştirildi ve ışık ile floresan mikroskobu altında yaralar görüntülendi.	60
Şekil 4.17. MIPaCa-2 2B ve 3B hücre formlarında miR-150'nin Palbosiklib varlığında EMT sinyal yolağına etkisi. miR-150 transfeksiyonlarını takiben 24 sa 3 µM Palbosiklib uygulaması yapıldı. Total protein izolasyonu sonrası 30 µg protein %12'lik SDS-PAGE jelde yürütüldü. Listelenen antikorlarla problandı. E-kaderin, β-katenin, Vimentin ve PARP ifadeleri immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.	62
Şekil 4.18. Capan-2 2B ve 3B hücre formlarında miR-150'nin Palbosiklib varlığında EMT sinyal yolağına etkisi. miR-150 transfeksiyonlarını takiben 24 sa 3 µM Palbosiklib uygulaması yapıldı. Total protein izolasyonu sonrası 30 µg protein %12'lik SDS-PAGE jelde yürütüldü. Listelenen antikorlarla problandı. ZEB-1 ve β-katenin ifadeleri immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.	63
Şekil 4.19. MIPaCa-2 2B ve 3B formlarında EMT mekanizmasında görev alan gen ifadelerinde Palbosiklib uygulamasının miR-150 ifadesine bağlı olarak neden olduğu değişimin gerçek zamanlı PZR analizi ile incelenmesi. E-kaderin, Snail, Twist ve MMP-2 ifadeleri incelenmiştir. Normalizasyon β-aktin ifadesine göre gerçekleştirilmiştir. Kıyaslamalar 2B kontrol grubuna göre yapılmıştır. n=2 2B: 2 boyutlu, 3B: 3 boyutlu.	64

Şekil 4.20. 2B ve 3B Capan-2 formlarında EMT mekanizmasında görev alan gen ifadelerinde Palbosiklib uygulamasının miR-150 ifadesine bağlı olarak neden olduğu değişimin gerçek zamanlı PZR analizi ile incelenmesi. E-kaderin, Snail, Twist ve MMP-2 ifadeleri incelenmiştir. Normalizasyon β -aktin ifadesine göre gerçekleştirilmiştir. Kıyaslamalar 2B kontrol grubuna göre yapılmıştır. n=2 2B: 2 boyutlu, 3B: 3 boyutlu. 65



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. TNM Evreleme Sisteminin Tanımlamaları (AJCC) [3]	5
Tablo 2.2. Pankreas Kanseri Evrelerinin Karşılaştırılması [3]	5
Tablo 2.3. Pankreas Kanseri Hücre Hatlarının Karakteristik Özellikleri [25]	8
Tablo 2.4. miR-150-5p Tarafından Hedef Alınan Protein Örnekleri [98]	26
Tablo 3.1. Çalışmaya Yönelik Oluşturulan Deney Grubu	31
Tablo 7.1. Kullanılan Cihazların Listelenmesi.....	92
Tablo 7.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Donanımların Listesi.....	94
Tablo 7.3.1. Kullanılan Kimyasalların Listesi	95
Tablo 7.3.2. %12'lik SDS-PAGE Jel Hazırlama (1 Jel İçeriği)	96
Tablo 7.3.3. Kullanılan Primer Dizileri	97
Tablo 7.3.4. Kullanılan Antikorlar	97

ÖZET

Pankreas kanseri (PK) cerrahi müdahale ve kemoterapi ilaçlarının kullanımına rağmen tedavilere karşı geliştirdiği direnç ile beş yıllık sağkalım oranı oldukça düşük agresif yapıda olan ve dünyada kanser ölümlerinde yedinci sırada yer alan bir tümördür. Hücre döngüsünde önemli rolü olan CDK4/6'yı spesifik olarak hedef alan CDK inhibitör ajanı Palbosiklib (PD), hücrenin G1 fazından S fazına geçişini baskılayarak hücre döngüsünün devamlılığını engeller. PK'de ifade seviyesi düşük olan ve tümör baskılayıcı görevi gören miR-150 ifade seviyesinin arttırılması ile tümörigenez ile ilişkili süreçler baskılanmaktadır. Üç boyutlu (3B) hücre kültürü, tümörlere benzer genetik özelliklere sahip olduklarından tümörün ilaca karşı oluşturduğu cevabı mimik edebilmektedir. Bu çalışmanın amacı, artan miR-150 ifadesi ile ilişkili olarak PD'nin 3B hücre kültürü formlarında hücre sağkalımı, hücre çoğalması ve migrasyona etkisinin, farklı metastatik karaktere sahip MIAPaCa-2 ve Capan-2 PK hücrelerinde transkriptomik ve proteomik çalışmalar ile incelenmesidir. Yumuşak agar koloni oluşturma deneyi, Matrigel testi ve asılı damla modeli ile 3B PK hücre formları elde edilmiştir. miR-150 ifadesi arttırılan 3B formlarındaki PK hücrelerinde PD'nin koloni oluşturma potansiyelini inhibe edici etkisinin arttığı gözlenmiştir. Aynı zamanda artan miR-150 ifadesine bağlı olarak PD'nin hücre migrasyonunu baskıladığı incelenmiştir. Epitel-mezenkimal geçiş mekanizmasında görev alan mRNA ve protein ifadeleri incelendiğinde 2B hücre formlarına göre 3B formlarında mezenkimal belirteçlerin ifadesindeki artışın, artan miR-150 ifadesi ile PD uygulamasına bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, miR-150 ifadesi ile PD sinerjistik etki göstererek MIAPaCa-2 ve Capan-2 PK 3B hücre formlarında mezenkimal karakteri baskılamıştır. miR-150 ifadesinin PK kombine terapilerinde kullanılabileceği yönelik umut verici öncül sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pankreas kanseri, üç boyutlu kültür, miRNA, miR-150, CDK4/6 inhibitörü

ABSTRACT

Pancreatic cancer (PC) is an aggressive tumor with a very low five-year survival rate due to its resistance to treatments, despite the use of surgical intervention and chemotherapy drugs, and is the seventh in the world in cancer deaths. The CDK inhibitor agent Palbociclib (PD), which specifically targets CDK4/6, which has an important role in the cell cycle, suppresses the transition of the cell from the G1 phase to the S phase, thus preventing the continuity of the cell cycle. Tumorigenesis-related processes are suppressed by increasing the expression level of miR-150, which has a low expression level in PC and acts as a tumor suppressor. Three-dimensional (3D) cell culture can mimic the response of the tumor to the drug, as they have genetic characteristics similar to tumors. The aim of this study is to investigate the effect of PD on cell survival, cell proliferation and migration in 3D cell culture forms, in relation to increased miR-150 expression, by transcriptomic and proteomic studies in MIAPaCa-2 and Capan-2 PC cells with different metastatic characters. 3D PC cell forms were obtained by soft agar colony formation assay, Matrigel test and hanging drop model. It was observed that the inhibitory effect of PD on colony formation potential increased in PC cells in 3D forms with increased miR-150 expression. At the same time, it was investigated that PD suppressed cell migration due to increased miR150 expression. When mRNA and protein expressions involved in the epithelialmesenchymal transition mechanism were examined, it was observed that the increase in the expression of mesenchymal markers in 3D forms compared to 2D cell forms decreased due to increased miR-150 expression and PD application. In conclusion, miR-150 expression and PD showed synergistic effect and suppressed mesenchymal character in MIAPaCa-2 and Capan-2 PC 3D cell forms. Promising preliminary results have been obtained that miR-150 expression can be used in PC combined therapies.

Keywords: Pancreas cancer, three-dimensional culture, miRNA, miR-150, CDK4/6 inhibitor

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya çapında kanser, başlıca ölüm nedenlerinden biri olarak insan sağlığı üzerinde uzun yıllardır ciddi bir tehdit oluşturmaya ve yayılmaya devam etmektedir. Kişilerin yaşam kalitesine ve aile öyküsüne bağlı olarak değişiklik gösterebilen birçok etiyolojik faktörün hücrelerde sebep olduğu mutasyonlar sonucu kontrol dışı çoğalan hücreler ortaya çıkmaktadır [1]. Pankreas hücrelerinin gerekli durumlarda hücre ölümünün gerçekleşmesi yerine sürekli olarak bölünmesiyle ortaya çıkan pankreas kanseri agresif kanser olarak tanımlanan ve pankreasın vücutta bulunduğu konumdan ötürü kanser tespiti erken evrelerde yapılamayan bir kanser türüdür [2].

Dört evre olarak gözlemlenen pankreas kanserinin genelde metastatik evre olarak tanımlanan kanser hücrelerinin vücuda yayıldığı son evredeki tespiti insan sağlığını büyük ölçüde etkilemektedir [3]. 2020 yılındaki veriler cinsiyete bağlı olmaksızın kanser ölümlerindeki 7. sıradaki yeri ile pankreas kanserinin [4], ABD’de 2030 yılına kadar 2. sırada yer alabileceği öngörülmektedir [5]. Pankreas kanserinin kötü prognoza sahip olması hastaların sağkalım oranının önemli derecede düşük olmasıyla ilişkilendirilmekle birlikte güncel terapi modelleri kanser tedavisinde yeterli gelmemektedir. Bu durum kanserin moleküler mekanizmasının derinliğine inildikçe terapötik stratejilerin araştırılmasıyla tümörigenez ilişkili sinyal yollarının, spesifik proteinlerin hedeflenmesi üzerine geliştirilen yeni kimyasal ajanlara yönelmesi gerektiğini göstermektedir. Özellikle heterojen moleküler mekanizması pankreas kanserinin tedavisinde potansiyel hedeflerin kombine ilaç kullanımı ile daha etkili yanıt verebileceği üzerine durmaktadır [6].

Kısa nükleotit uzunluğuna sahip kodlama yapmayan RNA sınıfı olarak tanımlanan mikroRNA’ların, hücresel birçok süreçte görev alan genlerin %60’ı gibi büyük bir bölümünü etkileyebildikleri bilinmektedir [7].

İnsan hastalıklarıyla ilişkili olarak literatürde geniş bir çalışma alanı yaratan miRNA'lar, özellikle hücre proliferasyonu, farklılaşması ve metastaz gibi tümörigenez süreçlerinde görev alarak etkileyici bir şekilde ifade seviyelerindeki değişikliklere bağlı olarak onkogen özellik gösterebildikleri gibi tümör baskılayıcı olarak da rol alabilirler [8]. miRNA'lar birden fazla mRNA'nın 3' çevrilmemiş bağlanma bölgelerini seçip bağlanabilir ya da eş zamanlı olarak hedef mRNA, çeşitli miRNA'lar tarafından hedef olarak alınabilmekte ve böylelikle post-transkripsiyonel düzenlemelerde görev almaktadırlar [9].

Pankreas kanserinde *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla miRNA'ların sağkalımı üzerindeki arttırıcı etkilerinin belirlenmesi tedavide umut verici adımlardan biri olmuş ve pankreas kanseri ilişkili miRNA'lar üzerine araştırmaları arttırmıştır [10]. Kanser türlerinde miRNA'lar farklı ifade seviyelerine sahip olduğundan biyolojik süreçlerde çeşitli rollere sahiptirler. Hücre göçünde ve anjiyogenez gibi süreçlerde etkili olduğu bilinen miR-150, pankreas kanserinde düşük ifade seviyesi olan ve bu kanserde hedef aldığı genlerle tümör baskılayıcı görevinde bulunan miRNA'lardan biridir. miR-150 ifade seviyesinin arttırılması ile migrasyon, invazyon ve proliferasyon gibi önemli hücresel süreçleri baskılandığına dair çalışmalar miR-150'nin pankreas kanseri tedavisine umut verici yeni bir terapötik yaklaşım olmaktadır [11].

Kanserin ilerlemesini engellemek amacı ile son yıllarda hücre döngüsünün düzenlenmesinden sorumlu CDK'yı hedef alan tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Hücrenin kontrolsüz büyümesini engelleyen retinoblastoma proteinini fosforile eden SiklinD-CDK4/6 kompleksi, hücrenin G1 fazından S fazına geçerek bölünmesini sağlar [12]. Kanserde onkogen özellikle gösteren bu kompleksin seçici olarak CDK4/6'nın baskılanması için geliştirilen Palbosiklib, FDA onaylı ilk CDK inhibitörüdür ve kadınlardaki menopoz sonrası östrojen reseptörü pozitif ve ilerlemiş HER2-negatif meme kanserinde kullanılmak üzere seçilmiştir [13]. Kanser tedavilerinde düşük dozlarda etkili olabilen ve seçici olarak hedef aldığı CDK'yı inhibe ederek toksik etkiyi azaltan Palbosiklib, pankreas kanserinde de hücre proliferasyonu, koloni oluşturma kapasitesi gibi özelliklerin baskılanmasında etkili olduğu bulunmuştur [14].

Farklı pankreas kanseri hücre hatlarında farklı derecede etkili gösterdiği belirtilmekte olup kombine tedavi yöntemleri ile Palbosiklib uygulamasının etkisinin artırılması ile ilgili çalışmalara dikkat çekilmelidir [15]. Kanser tedavi araştırmalarında kullanılan iki boyutlu hücre kültürü ve hayvan deneylerinin insan hastalıklarını birebir yansıtamaması kanser tedavilerinde de yeterli olmamaktadır. Bu durum bir organizmaya ait organların fizyolojik özelliklerini taklit edebilme potansiyeline sahip organoidlerin tedavi araştırmalarında ön plana çıkması ile umut verici bir adım olmuştur [16]. Güncel kanser tedavi yöntemlerinin hasta sağ kalımı üzerindeki etkileri kanser türleri arasında olduğu gibi hastaya göre de farklılık göstermektedir. Bunun nedeni kanser tedavilerinde sınırlamaları oluşturan kişiye özgü olarak tümör moleküler profillerinin olmasıdır [17]. Üç boyutlu hücre grupları olan organoidler, kanserde tümör dokularıyla benzer özellikleri gösterebildikleri için kişiye özel tedavi uygulamalarının geliştirilmesi için öncü olmaktadır [16].

Bu bilgiler kapsamında bu tez çalışmasında, MIAPaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinden elde edilecek sferoid modelleri üzerinde hücre sağkalımını ve çoğalmasını baskılayan miR-150 ve Palbosiklibin kombine uygulamalarının tümörsfer oluşumuna ve metastatik sürece etkisini incelemek amaçlanmıştır. Kişiye özgü terapi modellerinin geliştirilmesinde önem arz eden 3B hücre formlarının projemizde kullanılması ile elde edilecek sonuçlar pankreas kanseri tedavi süreci konusunda önemli ipuçları verecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas Kanseri

2.1.1. Pankreas Kanseri Tanımı ve Evreleri

Pankreas kanseri teşhisi zor ve tedavisi kısıtlı olan ölümcül bir kanser türüdür. Dokusundaki hücrelerin kontrol dışında sürekli bölünmesiyle meydana gelen pankreas kanseri genellikle tümör büyüdüğünde semptomlar tespit edilebildiğinden ve erken metastaz aşamasına geçtiğinden agresif bir kanser olarak karakterize edilmektedir. Birçok kanser türünün teşhisinde kullanılan görüntüleme yöntemleri, pankreasın insan vücudundaki konumu itibarıyla kolay tespit edilememektedir [2].

Pankreas kanserinin ilerleyişi Evre 0, Evre 1 (1A,1B), Evre 2 (2A,2B), Evre 3 ve Evre 4 olarak gözlemlenmektedir. Yapılan testlerin sonucunda kanser, primer tümörün boyutuna göre ve kanserin kan damarlarına, sinirlere, lenf düğümlerine veya diğer organlara yayılmasına bağlı olarak yaygın olarak kullanılan ve “TNM Evreleme Sistemi” adı verilen bir derecelendirme sistemi ile belirlenir. Amerikan Kanser Komitesi’nin (AJCC) hazırladığı bu sisteme dayanarak Tablo 2.1.’deki tanımlamalara göre pankreas kanserinin ilerleyişi ve evresi tespit edilir [3]. Belirlenen evreye ve duruma göre cerrahi müdahale ve kemoterapi ile tedavi süreci başlatılır [18]. Tablo 2.2.’de tanımlanan pankreas kanseri evrelerinin karşılaştırılması verilmektedir.

Tablo 2.1. TNM Evreleme Sisteminin Tanımlamaları (AJCC) [3]

Kategori T <i>Tümör</i> Tümörün büyüklüğü ve konumu değerlendirilir.	TX	Primer tümör değerlendirilmesi yapılamaz.
	T0	Primer tümör tespit edilmemiştir.
	Tis	Pankreas dışına yayılım göstermemiş tümör tespit edilmiştir.
	T1	Pankreas içinde tespit edilen tümör <2 cm'dir.
	T2	Pankreas içinde tespit edilen tümör >2 cm ve <4 cm'dir.
	T3	Pankreas sınırları içinde tespit edilen tümör >4 cm'dir.
	T4	Tümörün pankreas çevresindeki ana kan damarlarının yakınlıkta büyüdüğü tespit edilmiştir.
Kategori N <i>Nod</i> Tümörün lenf düğümlerine yakınlığı değerlendirilir.	NX	Lenf düğümlerinin değerlendirilmesi yapılamaz.
	N0	Lenf düğümlerinin çevresinde tümör tespit edilmemiştir.
	N1	Tümör en fazla 3 lenf düğümlerinin çevresine yayılmıştır.
	N2	Tümörün 4 ya da 4'ten fazla lenf düğümlerinin çevresine yayıldığı tespit edilmiştir.
Kategori M <i>Metastaz</i> Tümörün lenf düğümlerine, organlara yayılıp yayılmadığı değerlendirilir.	M0	Kanserin diğer organlara yayılımı tespit edilmemiştir.
	M1	Kanser lenf düğümlerine, vücuttaki diğer organlara yayılmıştır.

Tablo 2.2. Pankreas Kanseri Evrelerinin Karşılaştırılması [3]

	Evre 0	Evre 1A	Evre 1B	Evre 2A	Evre 2B	Evre 3	Evre 4
Tis	✓						✓
T1		✓			✓	✓	✓
T2			✓		✓	✓	✓
T3				✓	✓	✓	✓
T4						✓	✓
N0	✓	✓	✓	✓		✓	✓
N1					✓	✓	✓
N2						✓	✓
M0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
M1							✓

2.1.2. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi ve Oluşumundaki Risk Faktörleri

Pankreas kanserinin, Küresel Kanseri Gözlemevi (Globocan) 2020 istatistiksel verilerinin dünya genelinde kanser çeşitleri arasındaki kapsamlı karşılaştırma analizlerine dayanarak ölüm oranlarındaki sıralamada 7. olduğu belirtilmektedir. Kadınlarda meme, akciğer, kolorektal, rahim ağzı, mide, karaciğer kanserlerinden sonra 7. sırada; erkeklerde ise akciğer, karaciğer, kolorektal, mide, prostat, yemek borusu kanserlerinden sonra 7. sırada gelmektedir. 2020 yılı için elde edilen veriler yeni konan pankreas kanseri teşhisindeki vaka sayısının 495,773 olarak belirlendiğini, bu kanserden ölenlerin sayısının ise yeni vaka sayısına yakın olarak 466,003 olduğunu belirtmektedir [4]. ABD'deki kanser vakalarının ve kansere bağlı ölümlerin analiz edildiği bir çalışmanın öngördüğü üzere, kadın ve erkeklerdeki mortalite oranının artarak 2030 yılına varmadan kanserden ölümlerde ikinci sırada yer alanın pankreas kanseri olacağını belirtmektedir [5]. Dünya genelinde sağkalım oranı 2009 yılından 2015 yılına karşılaştırıldığında ırk ayrımı olmadan %9 oran ile pankreas kanseri en düşük sağkalım oranı ile ciddi bir tehdit oluşturmaktadır [19]. Pankreas kanserinin, Dünya Sağlık Örgütü 2020 yılındaki verileri incelendiğinde ülkemizdeki toplam ölümlere bakıldığında %1.77'lik oranla 14. sırada olduğu ve kanser türleri ile karşılaştırıldığında 6. Sırada yer aldığı gösterilmektedir [20].

Kanser türlerinde insidans ve mortalite oranları coğrafya, yaşam kalitesi ve aile genetiği gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Sigara tüketicilerinin, sigara içmeyenlere göre pankreas kanserine yakalanma oranlarının neredeyse iki katı kadar olduğu ve tüketicilerin sigarayı bırakmalarına rağmen riskin en az 10 yıl daha devam ettiği belirtilmektedir. Sigara kullanımı kanser riskinin %25'ini oluşturmasıyla pankreas kanserini önemli derecede etkileyen bir faktördür. Vücut kitle endeksi 30 veya 30'dan fazla olan ve obez olarak tanımlanan kişiler %20 daha fazla risk altındadır. Özellikle 30 yaşından sonra obeziteyle birlikte pankreas kanserine yakalanan kişilerin sağkalım oranı oldukça azdır. Yıllar içerisinde düzensiz beslenme, aşırı alkol tüketimi ve fiziksel hareketsizlik gibi faktörlere bağlı olarak gençlerde ve yetişkinlerde obezitenin artması özellikle tip 2 olmak üzere diyabet hastalık oranının artmasına sebep olmaktadır.

Pankreas kanseri için önemli bir belirteç olabileceği gibi diyabet tanısı konan kişilerde artan kanser riskinin en az 20 yıl boyunca %30 oranında sürebileceği belirtilmiştir. İşlenmiş gıdalardan uzak durmak, narenciye, antioksidan tarafından zenginleştirilmiş gıdaları tüketmek, yanlış beslenme ile %30-50 oranında artan pankreas kanserini azaltmaktadır [21] [22]. Bununla beraber iş hayatında karşılaşılan kanserojen maddelerinde kansere yakalanma oranını %12 arttırdığı belirtilmektedir [22]. Aile öyküsü içerisindeki genetik faktörler önemlidir. Birinci derece aile bireylerinden bir kişide pankreas kanseri varsa kişinin pankreas kanserine yakalanma olasılığı 9 kat, en az iki kişide varsa 32 kat arttığı belirtilmektedir. Genetik varyasyonlar sonucu oluşabilen pankreas kanseri ile ilişkili olan genlerdeki mutasyonlar diğer kanser türlerinin ya da başka hastalıkların ortaya çıkma olasılığını arttırmaktadır.

Pankreas kanserine yakalanma olasılığı yaygın olarak 50 yaş üstü insanlarda görülmektedir ve 40 yaş öncesinde görülmesi nadirdir. Aşırı alkol tüketimi gibi yaşam kalitesini etkileyen etkenler ve mesleki maruziyetlerdeki risk olanakları daha yüksek olduğu için pankreas kanserinin kadınlardan daha çok erkeklerde görüldüğü belirtilir. Yine de tespit edilemeyen başka genetik faktörlerinde olabileceği düşünülmektedir. Etnik köken ile pankreas kanseri arasındaki ilişkiye bakıldığında beyaz ırkın siyah ırka göre daha az risk taşıdığı bilinmektedir. Bu ilişki beslenme, obezite, D vitamini alımı gibi değişebilen etkenlere bağlanabildiği gibi farklı ırklara ait farklı moleküler varyasyonlardan kaynaklanabildiği tanımlanmaktadır. Bu etkenler ve ırk eşitsizlikleri göz önüne alındığında sağkalım oranlarındaki farklılıklar ortaya çıkmaktadır.

Yapılan çalışmalar çeşitli kanserlerde rol oynayan AB0 kan gruplarından 0 kan grubunun pankreas kanserine yakalanma olasılığının diğer kan gruplarına göre (A, B, AB) daha az olduğuna değinilmiştir. Genetik mutasyondan ya da aşırı sigara ve alkol tüketiminden kaynaklı ortaya çıkabilecek olan kronik pankreatit, pankreasa hasar veren bir enfeksiyondur. Uzun süreli etkisinden dolayı kronik pankreatite sahip kişilerde erken pankreas kanseri teşhisinde önemli bir belirteç olarak rol oynamaktadır. Dünya genelinde pankreas kanserinin görülme sıklığı değişebilen ve değiştirilemeyen bu risk faktörleri nedeniyle 10 yıl içerisinde artmıştır [23].

2.1.3. Pankreas Kanseri Hücre Hatları ve Karakteristik Özellikleri

Pankreas kanserinin moleküler mekanizmalarının araştırılması ve yeni terapötik yaklaşımların bulunması amacı ile yapılan in vitro çalışmalarda iki boyutlu hücre hatlarının kullanılması araştırmalarda kolaylık sağlamaktadır. Hücre hatlarının genomik analizleri sonucunda KRAS, p53, p16 ve SMAD4 mutasyonlarının yanı sıra kanser patogenezi ile ilişkili farklı genlerde de mutasyonlar olduğu bilinmektedir [24]. Yapılacak olan çalışmaya göre hücre hatlarının sahip olduğu karakteristik özelliklerinin dikkate alınarak seçilmesi önemli bir adımdır. Tablo 2.3.'de bazı pankreas kanseri hücre hatlarının donör bilgisi ve hücrelerin çoğalma süresi dahil olmak üzere karakteristik özellikleri listelenmiştir.

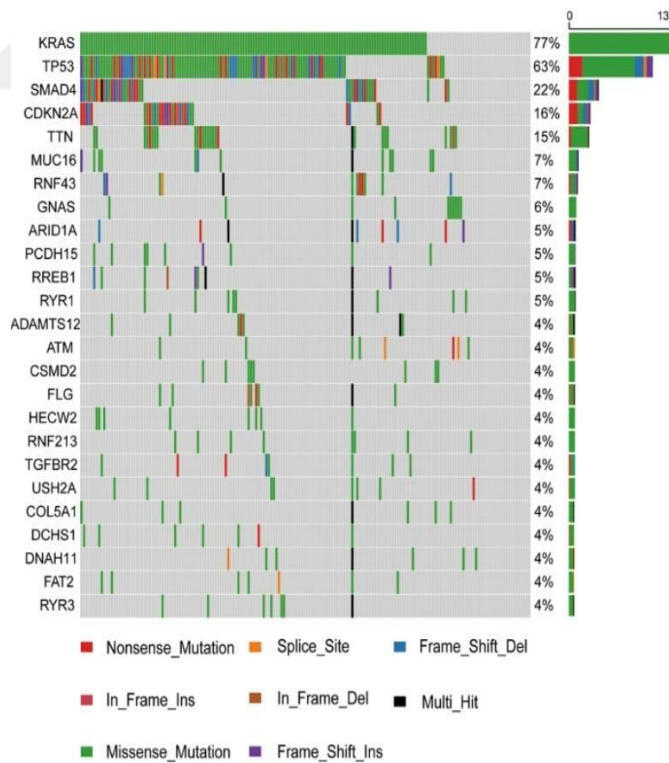
Tablo 2.3. Pankreas Kanseri Hücre Hatlarının Karakteristik Özellikleri [25]

Hücre Hatları	Kişisel Bilgi	Köken	Metastaz	Çoğalma Süresi
Colo357	77/Kadın	Lenfatik metastazı	Metastatik	21 saat
CFPAC-1	26/Erkek	Karaciğer metastazı	Metastatik	31 saat
AsPC-1	62/Kadın	Karın boşluğu sıvısı	Metastatik	38-40 saat
MIAPaCa-2	65/Erkek	Primer tümör	Metastatik	40 saat
HPAF-II	44/Erkek	Karın boşluğu sıvısı	Metastatik	42 saat
BxPC-3	61/Kadın	Primer tümör	Metastatik değil	48-60 saat
PANC-1	56/Kadın	Primer tümör	Metastatik	52 saat
Capan-1	40/Erkek	Karaciğer metastazı	Metastatik	60-70 saat
SW1990	56/Erkek	Dalak metastazı	Metastatik	64 saat
SU.86.86	57/Kadın	Karaciğer metastazı	Metastatik	77 saat
Capan-2	56/Erkek	Primer tümör	Metastatik değil	96 saat
HS 766T	46/Erkek	Lenf düğümü metastazı	Metastatik	6-7 saat

2.1.4. Pankreas Kanserine Neden Olan Mutant Genler

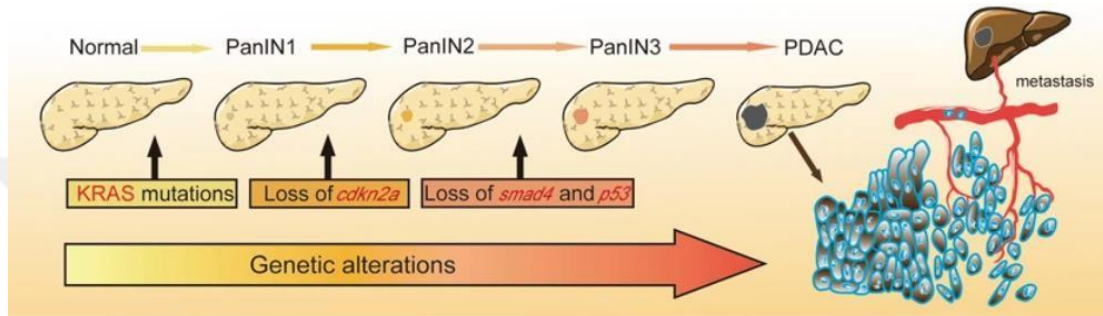
Hücrel işlevlerin kontrollü bir şekilde sürdürülmesinde rol oynayan genlerde meydana gelebilecek mutasyonlar tümör oluşumuna neden olur. Bu görevlerin düzenlenmesinde görev alan, hücrelerin anormal bir şekilde çoğalmalarını engelleyerek apoptotik süreçlerin kontrolünü sağlayan genlere tümör baskılayıcı genler denir. DNA diziliminde oluşabilecek hasarların tamirini yaparak hücrelerin epitelial mezenkimal geçişini önlerler. Belirli tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar sonucu aile öykülerinde çeşitli kanser hastalığı bulunan kişilere kalıtsal olarak geçebildiği gibi bu mutasyonlar çoğunlukla kalıtsal olmayabilir. Bu genlerin baskılanması ya genlerin kaybolması ya da inaktive olması ile gerçekleşir ve hücrel süreçler etkilenir [26].

Şekil 2.1.'de pankreas kanserleri ile ilişkisi tespit edilen genler ve farklı mutasyonlara sahip olan bu genlerden yaygın olarak karşılaşılan dört gen olduğu öne çıkmaktadır [24].



Şekil 2. 1. Kanser Genom Atlası veritabanı analizine dayanarak pankreas karsinogenesinde tanımlanan genler ve mutasyon çeşitlerinin gösterimi [24].

Hücresel süreçlerden sorumlu fakat mutasyona uğrayarak tümörigenez ile ilişkili anormal proteinleri kodlayan genlere de onkogen denilmektedir [27]. Pankreas kanserinde genel olarak dört ana gen bulunmaktadır. Hücrenin mezenkimal karakter kazanmasında önemli rol oynayan bu genler tümör baskılayıcı görevi olan CDKN2A/p16, TP53 ve DPC4/SMAD4 ile KRAS onkogenidir. Bağımsız gerçekleşen ve pankreatik intraepitelyal neoplazilerle (panIN) öncü lezyonların oluşumuyla ilişkilendirilen bu genler, pankreas tümörigenezinin Şekil 2.2.'de gösterildiği gibi kademeli olarak kanserin ilerleyişinde görev almaktadırlar [24].



Şekil 2.2. Pankreas kanseri ile ilişkili genlerin tümör lezyonlarının ilerlemesindeki ilişkisi [24].

- KRAS yolağı

12p kromozomunda bulunan ve G12. kodonda nokta mutasyon sonucu %90'dan fazla pankreas kanserinde aktive olan onkogen KRAS, hücrenin farklılaşması, mikro çevrenin değişmesi gibi tümörigenezin başlangıcında önemli rol oynamaktadır. Aktive olan KRAS pankreas kanseri hücrelerinin ilaca ve radyasyona karşı direncini artırarak hücrelerin metastazını destekler [28] [29].

- P16(INK4)

9p21 kromozomu üzerinde bulunan CDKN2A geni tarafından kodlanan p16(INK4A) proteini hücre döngüsünde görevli CDK4 veya CDK6'yı inaktif ederek hücrenin kontrolsüz çoğalmasını engellemektedir. CDKN2A geninin pankreas kanserlerinin %95'inde görüldüğü ve homozigot olarak iki allelinde silinme durumuna (%40), aynı gende oluşabilen bir allelde intragenik mutasyonla birlikte diğer allelin kayıp olmasına (%40) ve gen promotöründe meydana gelen hipermetilasyona bağlı olarak oluşan mutasyonlar (%15) sonucu aktivitesini kaybettiği belirtilmektedir [28].

- P53 yolağı

17p kromozomu üzerinde bulunan TP53 geninin ise kodladığı p53 proteini, eksojen veya endojen etkenler sonucu hücrede oluşan DNA hasarına bağlı olarak hücre döngüsünün devam edip etmeyeceğinin belirlenmesinde görevlidir, bu nedenle ona “genomun gardiyanı” denilmektedir. Hasarın tamir edilememe durumuna göre hücrenin apoptoz sürecini başlatır ve DNA hasarlı hücrelerin bölünmesini önleyerek tümörün oluşmasını engeller. Genin bir allelinde olan intragenik mutasyonla birlikte öteki alelin kaybolması ile p53 proteini aktivitesini kaybeder ve DNA hasarlı hücreler çoğalmaya devam eder. Bu mutasyonda pankreas kanserlerinin %60’ında görülmektedir [28] [30].

- SMAD4 yolağı

18q21.1 kromozomu üzerinde bulunan SMAD4(DPC4), pankreas kanserlerinin %55’inde yaklaşık %30’u homozigot silinmeye yaklaşık %25’ide heterozigotluk kaybına (LOH) bağlı oluşan mutasyonlar sonucu aktivasyonunu kaybeder. İnaktif SMAD4, hücrenin farklılaşmasını, çoğalmasını ve apoptoza gitmesini sağlayan büyüme faktörü beta (TGF- β) ailesinin sinyal iletimini engeller. SMAD4 mutasyonuna sahip pankreas kanseri hastalarındaki sağkalım oranının mutasyona sahip olmayan kişilere göre daha az olduğu belirtilmiştir [28] [30] [31].

2.1.5. Pankreas Kanseri Güncel Terapötik Yöntemler

İnsanların bireysel risk faktörleri, pankreas kanseri tanısı konan kişilerin sağkalım oranlarını önemli ölçüde etkilemekle birlikte, yaşam şartları içerisinde geç tanımlanan belirtiler kanser teşhisini zorlaştırarak genellikle metastaz durumunda fark edilebilmektedir [32]. Tanı konulmasının ardından tümörün evresine ve konumuna göre tercih edilen tedavi yaklaşımları belirlenir.

Muayene sonucu hastanın küratif amaçlı tedaviye uygun olması ile cerrahi operasyonla tümörün ortadan kaldırılarak temizlenmesinin hedeflenmesi pankreas kanseri tedavisinde öncelikli yaklaşımdır. Kanser nüks etme olasılığını (>%90) azaltmak nedeniyle adjuvan tedavi yöntemlerine dahil olan kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarına başvurulması sağkalım oranını %30 yapmaktadır [33] .

İlk tedavide tümörün alınamadığı durumlarda, kemoterapi ve radyoterapiyi içeren destekleyici tedavi planlarını içeren neoadjuvan tedavi seçeneği sunulmaktadır. Bu tedavi hasta tümörlerinin pankreas sınırında yer aldığı durumda veya lokal olarak yakın damarlara invazyonu söz konusu olduğunda uygulanır. Tümörün rezeksiyon işlemi için uygun konuma getirilmesi sağlanarak ardından cerrahi işlem uygulanmasıyla sağkalımda artış amaçlanır [34].

Adjuvan ve neoadjuvan terapide kullanılan kemoterapi ilaçlarının tedavide tek başlarına kullanıldıklarında %8-%12 oranlarında verdikleri yanıtların yetersiz kalmaları nedeniyle kombine ilaç uygulamalarına yönelinmiştir. İlaçların birlikte kullanıldıklarında daha etkili sonuçların alınması ile, hasta sağkalımının arttığı belirtilmektedir [35]. İleri seviye pankreas kanserine sahip hastalara cerrahi müdahale yapılamamakta ve kombine ilaç tedavisi içeren kemoterapi yöntemleri uygun bir tedavi süreci olmaktadır. Monoterapi yöntemi yerine kombine tedavinin hasta sağkalımını 2-6 ay kadar arttırdığı belirtilmektedir [36]. Kombine terapinin uygulanabilirliği olmayan hastalara Gemsitabin kullanımı ile monoterapi tercih edilir [37]. En yaygın olarak kullanılan ilaçlar Gemsitabin (Gemzar), 5-Florourasil (5-FU), Kapesitabin (Xeloda), İrinotekan (Camptosar), Oksaliptatin (Eloksatin), Albümine bağlı paklitaksel (Abraxane), Sisplatin olarak listelenebilir ve oral yol ya da damar yolu ile hastaya verilebilen bu ilaçların birlikte kullanımı ile oluşturulan kombine ilaçlarda mevcuttur [38]. Folinik asit, florourasil, irinotekan ve oksaliptatin ilaçlarından oluşturulan ve gemsitabine oranla çok daha yüksek toksisiteye sahip FOLFIRINOX kombine ilacı, içerik oranının değiştirilmesine yönelik araştırmalarla daha uygun hale getirilmeye çalışılmaktadır [37].

Yeni terapötik yaklaşımlar tümörigenezle ilişkili hedeflere yönelik kimyasal ajanların geliştirilmesi üzerine ilerlemektedir. Anjiyogenezde rolü olan vasküler endotelial büyüme faktörlerinin (VEGFR), büyüme faktörü reseptörlerinin (EGFR, IGFR) ve tümörigenezi teşvik eden protein STAT3'ün inhibisyonunu sağlayacak ajanlar geliştirilmiştir. Aktif Ras-Raf-Mek-ERK, PI3K-Akt-mTOR ve Hedgehog sinyal yollarında da görevli olan, ifade seviyesi artmış onkojenik proteinlerin hedeflenmesine yönelik çalışmalar geliştirilmiştir [6].

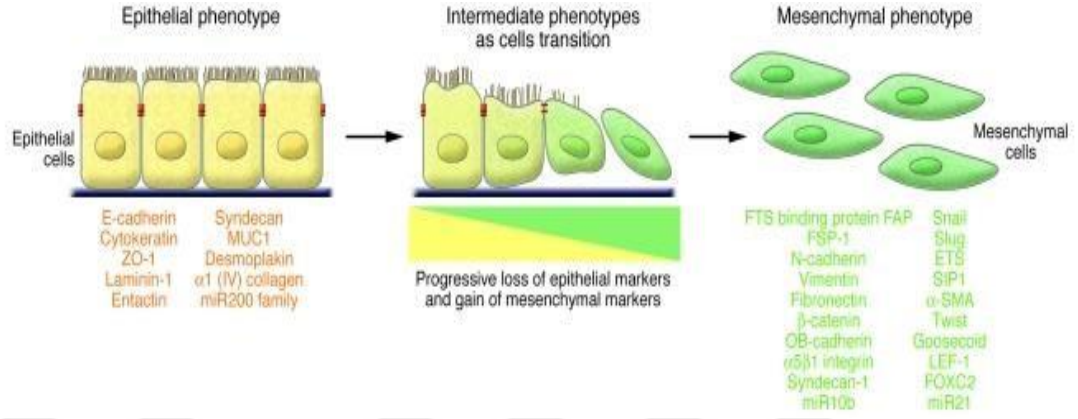
Geliştirilen kimyasal ajanlar ve hedefleri aşağıda belirtilmektedir [6].

- EGFR inhibitörleri: Erlotinib, Gefitinib, Cetuximab;
- IGF-1R: AMG-479, CP-751871, NVP-AEW541;
- VEGF inhibitörleri: Bevacizumab, Sorafenib, Sunitinib;
- MEK inhibitörleri; FT inhibitörleri: CI-1040, PD0325901, AZD6244; Tipifarnib, Lonafernib, BMS214662, Salirasib;
- mTOR inhibitörleri: Everolimus, Temsirolimus, Deforolimus;
- Apoptozu teşvik edici ajanlar: Mapatumumab, AMG 655;
- Hedgehog yolağı: GDC-0449, IPI-269609, LDE-225;
- HSP90 inhibitörleri: Tanespimycin, IPI-504;
- Src inhibitörleri: Dasatinib, AZD0530;
- STAT3 inhibitörleri: RTA-402.

2.2. Epitelyal Mezenkimal Geçiş ve Kansere İlişkisi

Vücudun her yerinde bulunan epitel hücreler, kısıtlı hareket kabiliyetleriyle birlikte, birbirleriyle kurdukları sıkı bağlantı ve iletişimle doku bütünlüğünün korunmasını sağlarlar. Hücreler arası etkileşimlerinin az olduğu ve belirli bir düzende bulunmamalarıyla göç edebilme kapasitesine sahip mezenkimal hücreler ise epitel hücrelerden farklı morfolojik yapıda bulunmaktadır [39]. EMT olarak kısaltılan epitel-mezenkimal geçiş, bazal membrana tutunan epitel hücrelerin mezenkimal hücre karakterine sahip olmalarını sağlayan bir mekanizmadır. EMT'nin gerçekleşmesi, aktive edilen transkripsiyon faktörleri, hücre yüzeyinde ve hücre iskeletinde görev alan bazı proteinlerin ifade değişimleri, hücre dışı matriksin bozulmasına neden olan enzimler ve süreçle ilişkili miRNA'ların düzenlenmesi gibi birtakım biyolojik değişimlere bağlıdır. Bu değişimlerle birlikte epitel hücreler göç etme ve istila özelliklerinin yanı sıra apoptoz direnci kazanmaktadır [40]. Bu değişim süreci, kanser malignitesinde önemli rol oynamanın dışında fibrosisle normal dokulardaki rejenerasyon ve yara iyileşmesinde gerçekleşir.

Epitel hücrelerin hareketliliği, sitoplazmada hücre iskeleti tarafından sağlanan hücre şekli ve düzenli yapısal destek ağının bozulmasıyla sağlanır. Bu düzensizlik ekstraselüler matris (ECM) yapılanmasında değişime, hücre polaritesinin kaybına ve hücrelerin birbiri olan iletişiminin bozulmasıyla sonuçlanmaktadır [41].



Şekil 2.3. EMT mekanizmasında epitelyal ve mezenkimal hücrelerin tanımlanmasını sağlayan belirteçlerin gösterimi [40].

Epitel hücreler ile mezenkimal hücrelerin farklı karakterizasyonu, Şekil 2.3.'de yer alan belirteçlerin ifade seviyelerindeki değişiklikler tarafından tanımlanmaktadır. İki epitel hücresinin birbirlerine yapışması, adheren bağlantı, sıkı bağlantı ve dezmosomlar ile sağlanır. Adheren bağlantının kurulmasında transmembran glikoprotein E-kaderinler, etkileşime girdiği hücre ile teması başlatan proteinlerdir. Bu proteinin β -katenin, p120-katenin ve α -katenin sitoplazmik proteinlerle oluşturduğu kompleks, çeşitli sinyal yolları ile aktin hücre iskeleti bağlantı kurmasını sağlar [42]. Hücre proliferasyonu sinyal yollarından WNT yolağının aktivasyonu, sitoplazmada yer alan β -kateninin nükleer translokasyonunun sağlanmasıyla tümörigenez ilişki genleri uyarır [43].

Hücrelerin invazyonu, başta bazal membranın temel elemanlarından kollajen IV olmak üzere hücre dışı matriks elemanlarının parçalanması ile devam etmektedir. Metalloproteinazlar (MMP-2, MMP-9) tarafından parçalan ECM bileşenleri, invazyonla birlikte birincil tümör büyümesi ve anjiyogenezle ilişkilendirilmektedir [44].

2.3. Hücre Kültüründe Üç Boyutlu Hücre Formları

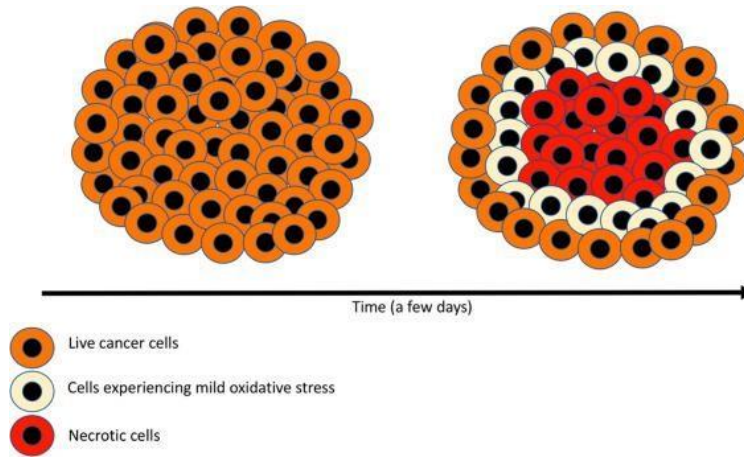
Hücre biyolojisi üzerine yıllardır yapılan araştırmalar ilk hücre hattı HeLa'nın dahil olmasından bu yana iki boyutlu hücre kültürü (2B) sistemiyle insan hastalıklarının moleküler mekanizmalarının çalışılmasına olanak sağlamıştır [45]. 2B hücre kültüründe köken, çoğalma süresi ve morfolojik özellikleri bakımından farklılık gösteren hücre hatları kullanılmakta ve hücresel süreçlerin incelenmesinde etkili olmaktadır. Laboratuvar ortamında kullanımının ve takip edilmesinin kolay olmasına rağmen düz alt tabakalara sahip iki boyutlu hücre büyüme kaplarında ve kontrollü bir ortamda besin eksikliği yaşamadan büyütüldükleri için belli bir adaptasyon sürecine maruz kalarak kültürlendikleri süreç içerisinde farklı morfolojik özellikler göstermektedirler [46]. Bulundukları hücre büyüme kaplarında hücreler arası etkileşimin sınırlı olması, vücut içerisinde dokuların üç boyutlu (3B) mikro ortamının mimarisini gösterememektedir [46] [47].

Hastalık durumlarında hücresel sinyal yollarının işleyişinin belirlenebilmesiyle belirlenebilen terapötik hedeflere yönelik potansiyel ilaçların keşfedilmesinde farklı tür hayvanların kullanımı oldukça avantaj sağlamak ve insanlardaki klinik araştırmalar öncesi bulgular test edilebilmektedir [16]. Hücre kültüründeki dezavantajların çalışmalarda elde edilen bulguları etkileyebildikleri gibi deney hayvanların kullanımı da insan fizyolojisine ait hastalıkları yansıtmada yetersiz kalması sonucu insan hastalıklarında tedavi stratejilerin geliştirilmesinde sınırlar ortaya koymaktadır [46].

Sınırların çözülebilmesine yönelik yapılan araştırmalarda hücrelerin kültür kaplarına yapışmadan süspansiyon bir kültür içerisinde üç boyutlu hücre formu almalarını sağlayacak teknikler geliştirilmiştir. Üç boyutlu hücrelerin oluşturuldukları kültür süspansiyonları, in vivo mikro ortamının taklit edilebilmesinde oldukça başarılı sayılmaktadır [48]. Kök hücre araştırmalarındaki gelişmelerle birlikte üretilen, organizmaya ait organların fizyolojik özelliklerini taklit edebilen üç boyutlu hücreler 'organoid' olarak adlandırılan kendi kendilerini organize etme kapasitesine sahip çok hücreli yapılardır. Taklit ettikleri doku ve organlara ait hücre kümelerinden oluşurlar [49].

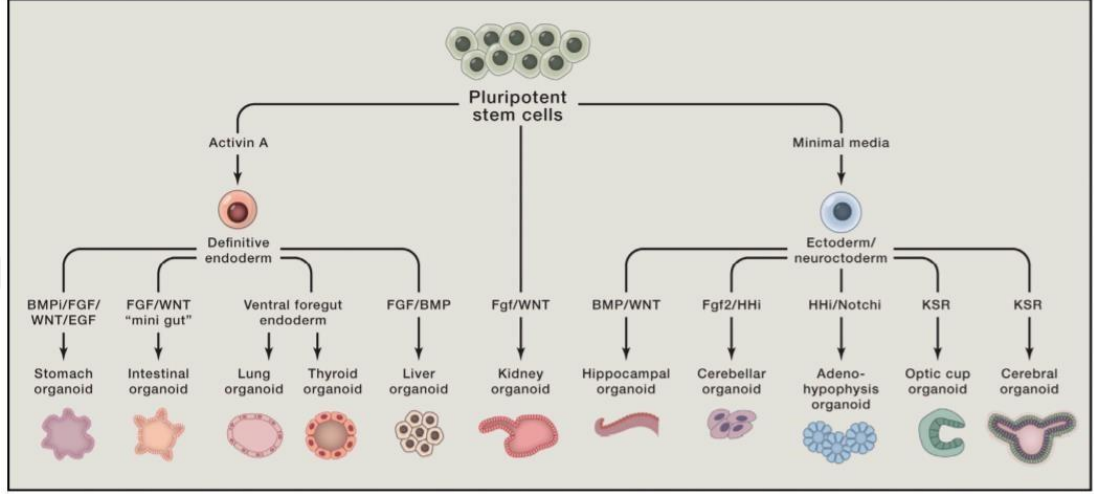
Hücrelerin organizasyonunu sağlamakla görevli ekstrasellüler matriksin integrinler aracılığı ile oluşan hücre kümeleri bir araya gelerek küre formunu oluşturmaktadır [50]. Tek katmanlı hücre kültürü sistemine göre hücrelerin 3B form oluşturmaları daha uzun sürmesine rağmen fenotip ve yapı bakımından belirtildiği gibi güçlü avantajları bulunmaktadır [51]. Organoid ve sferoid olarak isimlendirilen 3B hücre formları farklı teknik özellikleri içeren yöntemler ile oluşturulabilir [52] [53]. Kanser, beyin gelişimi gibi hastalıkların modellemelerinin geliştirilmesinde doku yapılarına benzerliği ile 3B hücre kültürünün kullanımına ilgi artmaktadır [54] [55] [56].

Şekil 2.4.'te gösterildiği gibi 3B sferoid hücre formunda yer alan hücreler küre şeklindeki yapıları oluştururken, zamana bağlı olarak hücre yapılanmasında değişimler meydana gelmektedir. Sferoid formun çapının artmasıyla birlikte merkezdeki hücrelere oksijen ve besine ulaşımı zorlaşmaktadır. Hipoksiye bağlı olarak merkezde nekrotik hücreler görülmektedir. Nekrotik hücrelere yakın hücrelerde dış katmana daha yakın oldukları için hafif oksidatif stres geçiren hücre grubunu oluşturmaktadır. Oksijen ile besin ulaşımına en yakın olan sferoidin dış katmanındaki kanser hücreleri ise canlıdır ve uygun koşullarda çoğalmaya ve canlılıklarını korumaya devam etmektedirler [57].



Şekil 2.4. 3B sferoid yapıları oluşturan hücrelerin dağılımı [57].

İn vitro hücre kültüründe organoidler mide, bağırsak, pankreas dahil olmak üzere birçok organın gelişimsel sürecinin araştırılması için pluripotent özellikteki embriyonik kök hücrelerinden veya yetişkin kök hücrelerden oluşturulabilirler. Şekil 2.5.'te belirtildiği gibi FGF, WNT, BMP, TGF gibi organların ihtiyacı olan spesifik sinyaller ve büyüme faktörleri oluşturulacak organoid kültürüne göre kullanılabilir [49] [58].



Şekil 2.5. Pluripotent hücrelerden oluşturulan organoidler ve gelişimlerinde rol alan sinyallerin gösterimi [58].

2.3.1. Kanser Tedavisinde Üç Boyutlu Hücre Modelleri ve Kişiyi Özel Tedavinin Geliştirilmesi

Pankreas kanseri, meme kanseri, kolorektal kanser gibi çeşitli kanser türlerinde alınan tümör dokularından geliştirilen organoid modellemeler, in vivo benzerlikleri sayesinde moleküler yolları inceleme ve ilaç uygulamalarında toksisite etkisini öngörme çalışmalarında umut verici yeni terapötik stratejiler sağlamaktadır [59] [60] [61] [62] [63]. Kansere yönelik ilaç çalışmalarının geliştirilmesinde yıllardır etkili hücre kültürü modelleri olarak 2B kültür sistemi kullanılmaktadır. İlaça verdikleri yanıtların güçsüz kalması, dokuya özgü karakteristik bulguları yansıtamamalarından kaynaklı olarak in vivo çalışmalardakilerine benzer sonuçlar veremedikleri gözlemlenmiştir [50] [52].

Kanser araştırmalarında tek tabakalı kültürleme sisteminden uzaklaşarak 3B kültür sisteminin kullanılmasıyla hücresel süreçlerde ihtiyaç duyulan hücrelerin ekstraselüler matriks arasındaki sinyalleşmeler sağlanabilmekte, tümör mikro çevresinin heterojenliğini temsil edebilmektedirler [64]. 3B kültürleme yöntemi ile hücrelerin sinyalleşme ve çoğalma, metastaz, invazyon gibi hücresel hareketlerinin taklit edilebildiği bir tümör mikro çevresi yaratılabilmekte ve kanser hücrelerinin hayatta kalmalarını sağlayabilmektedir [65].

Kanser araştırmalarında tümör mikro  evresinin 3B modellenmesi ilacın etki etme potansiyelinin araştırılmasında önemli bir adımdır. 3B hücre modelleri, kültürlenme süresince merkezinde hareketsiz kalan ve nekrotik bir tabaka sergileyebilen hücreler ile merkez etrafında çoğalarak büyümeyi sağlayan hücrelerin bulunduğu birden fazla katmana sahip olarak doku yapısını sunmaktadır [50]. Kanser hücrelerinin büyütüldükleri tek katmanlı hücre kültürü ile karşılaştırıldığında, uygulanan potansiyel ilacın sferoid formların merkezine erişiminin yeterli olamaması ilacın etki kapasitesini önemli ölçüde değiştirmektedir [51]. Yapısal ve morfolojik bu farklılıklar antikanser ilaçların doz oranıyla toksisite ve ilaç direncinin belirlenebilmesinde 3B hücre kültürünün etkili terapötik adayların seçilmesinde tercih edilmesini sağlamaktadır [66].

Kanser çeşitlerine ve hastaların prognozu göz önüne alındığında uygulanan terapötik ilaçlar her hasta için olumlu bir sonuç vermemektedir. Kanser prognozu, tedavi yöntemlerinin aynı olmasına rağmen her hastanın sahip olduğu kanser genomığindeki farklılıklardan kaynaklı aynı şekilde seyretmemektedir [67]. Tümörün moleküler profilinin kişiye özgü değişkenlik göstermesi her hastanın tedavi edilebilmesinde sınırlar ortaya koymaktadır. Yeni ve gelişen tedavi yöntemlerinin kanser araştırma merkezleri, vakıflar tarafından desteklenmesi ile kişiye yönelik terapinin araştırılmasına ve yaygınlaşmasına yönelik çalışmalar artmaktadır [17]. Kanser  eşitlerinde tümör heterojenliğine bağlı olarak hastalara uygulanan tedavi yöntemlerinde alınan farklı sonuçlar, yeni kişiselleştirilmiş terapötik stratejilerin geliştirilmesindeki önemi ortaya koymaktadır [68] [69] [70].

3B hücre kültür yöntemlerinin avantajları göz önüne alındığında her kanser hastasına özgü organoid modelleri ile aday ilaçların hastalar üzerinde daha verimli sonuçların elde edilebileceği vurgulanmaktadır [71].

Organoidler, pankreas kanseri hastalarından elde edilen tümör hücreleri ile oluşturulan modellemelerle, potansiyel etki gösteren ya da göstermeyen terapötik ilaçların tespit edilebilmesine yönelik kullanımındaki başarısı ile dikkat çekmektedir [72][73][74]. Araştırmalar, pankreas kanseri hastalarına ait organoid hücre formlarının, oluşturuldukları tümör dokularının profillerinde genetik farklılıklar bulundurduklarını göstermektedir [72].

Farklı pankreas kanseri hastalarından elde edilen organoid modellemeler, çeşitli kemoterapötik ilaçlara maruz bırakıldıklarında ilaç duyarlılıklarının kişiye özgü farklı yanıtlar sundukları ortaya çıkmıştır. Farklı ilaç duyarlılıkları göz önüne alındığında hastaya uygun tedavi seçiminin belirlenebilmesi adına kişiye özgü terapinin önemi ve 3B kültür sisteminin bu alandaki kullanımı önem kazanmaktadır [75].

2.4. Kodlama Yapmayan mikroRNA Sınıfı

MikroRNA, organizmaların evrimi ve gelişimi gibi önemli biyolojik süreçlerde rol oynayan, farklı nükleotit uzunluklarına ve karakteristik özelliklere sahip endojen RNA sınıflarından biridir. Birçok RNA sınıfından farklı olarak ortalama 22 ila 23 nükleotit dizilimine sahip olan bu grup, protein kodlama şifrelerini içermedikleri için genellikle kısa kodlama yapmayan RNA'lar olarak tanımlanmaktadır. 1993 yılında Victor Ambros ve Gary Ruvkun'un *C.elegans* nematodunun gelişiminin araştırılması sırasında, lin14'ün dizilimine bağlanarak ifade seviyesini baskılayan lin4 ilk miRNA olarak tanımlanmıştır. Bu keşfin ardından gen ifadelerinin baskılanması ya da arttırılmasına yönelik süreçlerin düzenlenmesinde görev alan miRNA'lar kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır [76]. Bir miRNA birden fazla haberci RNA'ya bağlanarak farklı genleri düzenleyebildiği gibi farklı mikroRNA'larda eş zamanlı olarak aynı mRNA üzerindeki farklı MRE bölgelerine bağlanabildiği bildirilmiştir [9].

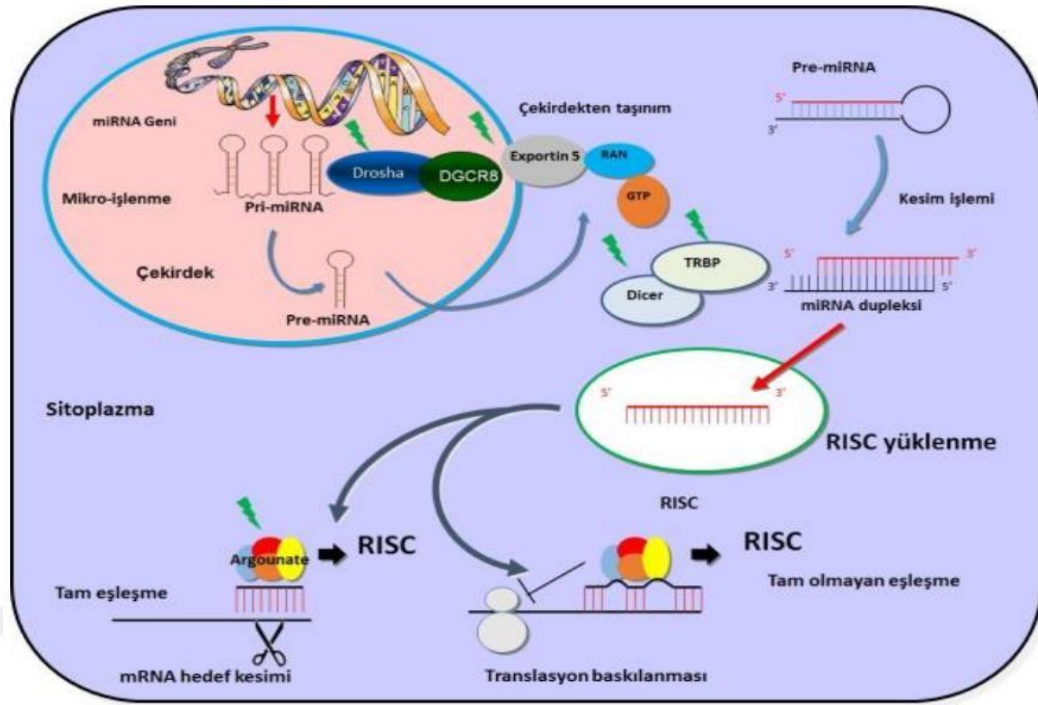
Post-transkripsiyonel süreci etkileyerek insan hastalıklarındaki potansiyel ilişkileri ile terapötik süreçlerde yeni biyobelirteçlerin geliştirilmesine yönelik umut verici yaklaşımlar sağlarlar [76][77].

İntragenik ya da introjenik olarak transkripte edilen endojen miRNA'ların yanı sıra eksojen kaynaklı miRNA'larda bulunabilir. Eksojen kaynaklı olanlar, deneysel çalışmalarda miRNA dizilerini taklit eden yapay RNA dizilerinin kullanımını sağlayan mimik transfeksiyonu yolu ile aktarılabilir veya günlük hayatta aldığımız bitkisel besinler ile farkında olmadan vücudumuza alabiliriz. miRNA'lar etkileşim kurdukları haberci RNA'ların yanı sıra AGO proteinleri ya da vezikül gibi taşıyıcılar sayesinde hücreler arası kimyasal iletimi sağlamak amacı ile hücre dışına salgılanabilirler [76]. mikroRNA'lar insan ve hayvanların periferik kan, plazma, serum, idrar, dışkı, ve dalak, karaciğer, böbrek gibi organların dokularında tespit edilebilmektedir [7][78]. Memelilerdeki %60'ı mikroRNA'lar tarafından düzenlendikleri değerlendirilen kodlama yapan genlerin gelişiminde önemli birçok hücre fonksiyonunun değişmesinde görev alarak farklı hastalıkları etkiledikleri bilinmektedir [7].

Küçük kodlama yapmayan bu RNA'ların birçok farklı kanser türü ile [79][80], kardiyovasküler hastalıklardaki düzensizlikler, romatoid artrit, inflamasyon, sistemik lupus eritematozus ve sedef hastalığı gibi otoimmün hastalıklarla, nöronal gelişim Down sendromu gibi genetik bozukluklarla, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarla, kas ve deri hastalıkları ile ilişkilendirilmektedir [81].

2.4.1. Kanonik mikroRNA Oluşumu

Hücre çekirdeğinde mikroRNA'lar yer aldıkları DNA dizilimdeki konumlarına göre intragenik veya introjenik olmak üzere RNA polimeraz II ile transkripte olmaktadır. Başka bir deyiş ile DNA üzerinde intergenik bir mikroRNA kendi geni üzerinden transkripte olabilirken, aynı zamanda bir konakçı gen üzerinde bulunan ekzon bölgelerinden ya da kodlama yapmayan intronlardan transkripte olabilen introjenik miRNA'lar bulunmaktadır [76].



Şekil 2.6. Kanonik mikroRNA Biyogenez Yolağının Resmedilişi [82].

Şekil 2.6.'da görüldüğü gibi, RNA polimeraz 2 ile transkripsiyon işleminden oluşan pri-mikroRNA, mikroişlemci kompleks olarak adlandırılan Drosha ve DGCR8 proteininin oluşturduğu yapı tarafından işlenerek pre-miRNA'yı oluşturur. DiGeorge sendromu kritik bölge 8 olarak adlandırılan DGCR8 birimi, seçici motif dizilimlerini tanıyarak pri-miRNA'yı tespit eder, böylelikle hedef pri-miRNA RNA polimeraz 3 enzimi olan DROSHA tarafından kesilir. Pri-miRNA'nın karakteristik yapısının kesiminin ardından pre-miRNA oluşur. Oluşan pre-miRNA, yolcu iplik ve kılavuz iplik olarak tanımlanan dubleks bir yapıya sahiptir [83]. Nükleustan sitoplazmaya aktarılabilecek olan moleküllerin taşınmasında görevli olan exportin proteinleridir. Exportinler arasında XPO5 RANGTP'nin bağlanması ile pre-miRNA'ların nükleustan dışarı çıkmasını sağlar. GTP hidrolizinin ardından ayrılan pre-miRNA sitoplazmada RNaz III enzimi Dicer tarafından karakteristik saç tokası olarak betimlenen yapısının kesilmesi ile süreç devam eder. RNA bağlayıcı proteinlerden TRBP'nin birleşimi ile Dicer'in etkisi artar ve tek iplikli olgun miRNA oluşturulur [84].

Bu olgun miRNA, kılavuz olarak tanımlanan ve hedef mRNA'ya bağlanacak olan ipliklidir. Kılavuz miRNA'ların oluştuktan sonra hedeflerine ulaşmak için gereken adımlardan biri de RISC yüklenmesidir. Kesilen dubleks miRNA'nın daha az kararlı 5' ucunun olgun miRNA olarak seçilmesinde Ago proteini görevlidir. AGO proteini 5' ucunu bağlarken yolcu ipliği olarak tanımlanan 3' ucunu ise parçalar. Seçilen ipliği bağlayan AGO proteini insanlarda AGO1, AGO2, AGO3 ve AGO4 olarak bulunabilir ve bu ikili RISC kompleksini oluşturarak ekspresyon seviyesi değiştirilecek olan hedef mRNA'ya yönelir. Bu kompleksin hangi mRNA'ya bağlanacağını seçmesi, hedefte bulunan tamamlayıcı nükleotitlere bağlanmasını sağlayan ve 3' çevrilmemiş bölgelerinde bulunan MRE sayesinde gerçekleşir. Tamamlayıcı olan bu dizilerin ise, kılavuz miRNA'ların 5' çevrilmemiş bölgesindeki evrim boyunca muhafaza edildiği bilinen "tohum" dizileri sayesinde tespit edilebildiği bilinmektedir [77][85]. miRNA'ların hedef MRE ile kurdukları dinamik etkileşimlerinin seviyesine bağlı olarak hedef mRNA'nın hangi post-transkripsiyon modifikasyonuna uğrayacağı belirlenir ve ona göre mRNA bozunur ya da translasyonu durdurur [76][86]. Bir başka yol ise mikroRNA seçili 3' poliadenilason kuyruğuna sahip mRNA'larda deadenilasyona yol açabilir [87].

2.4.2. Kanser Patogenezinde mikroRNA Sınıfı

Karsinogenez sürecini etkileyen hücre proliferasyonu, migrasyon, hücre farklılaşması, apoptoz ve metastaz ile ilişkilendirilerek kanser hastalığında düzensiz miRNA seviyelerinin yıllar içerisinde kritik öneme sahip oldukları belirtilmiştir. Hücre proliferasyonunda, farklılaşmasında, hücrelerin programlı ölümlerinde ve sinyal iletimindeki genlerin endojen kaynaklı düzenlenmesindeki ilişkisi kanser patogenezinin gelişiminde miRNA sınıfının önemini vurgulamaktadır [8] [88].

Tümörigenezde onkojen veya tümör baskılayıcı olarak rol üstlenebilen kodlama yapmayan farklı miRNA'ların hastalıklarla karakterize edilmesi, teşhis ve hasta prognozunda etkili olma potansiyelleri için önemli bir adımdır [80]. Örneğin; meme kanseri hastalarının plazma seviyeleri ile yapılan bir çalışmada aşırı ekspresyonunun tümörigenez ile ilişkili olduğu belirlenen miR-21 seviyesinin normal hastalarınkine oranla yüksek olduğunun tespit edilmesi, meme kanseri teşhisinde ve hedef terapi çalışmalarında etkili bir biyobelirteç olabilmektedir [89].

100'den fazla kolon kanseri hastası ile yapılan bir başka çalışmada, kaspazlardan bağımsız hücre ölümünü ifade eden nekroptosis mekanizmasıyla ilişkilendirilen 7 miRNA'nın risk belirteci olarak kullanılmasının kolon adenokarsinoma teşhisi için önemli olabileceği değerlendirilmektedir [90][1]. Akciğer kanseri hücrelerinde ifade seviyesinin az olduğu belirtilen miR-1246'nın mimik transfeksiyon yöntemi kullanılarak arttırılması ile epitelyal mezenkimal geçiş proteinlerinin düzenlenmesi ve hücre invazyonunun baskılandığı bildirilmiştir [91].

Kanser tedavilerinde hastaların kullandığı antikanser ilaçların yeteri kadar etkili olamamasının altında yatan en önemli etkenlerden biri kemorezistanstır ve gelişmesinde mikroRNA'lar görev almaktadır. Akciğer kanseri ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde birden fazla miRNA'nın kemoterapideki farklı ilaçlarla ilişkileri bulunmaktadır [92]. Yapılan bazı çalışmalarda transfekte edilen eksojen mikroRNA'ların seçili ilaçlar ile kombine tedavilerinin özellikle ilaçlara olan direnci kırmak ve kanserin ilerlemesini durdurdukları bildirilmiştir. Hasta prognozunun iyileştirilmesine yönelik in vitro tedavi çalışmalarında transfekte edilen sentetik miRNA'ların seçili ilaçlar ile kombine tedavilerinin özellikle hücrelerin ilaçlara karşı duyarlılığı arttırdıkları ve kanserin ilerlemesini durdurdukları bildirilmiştir. Örneğin, miRNA analizleri ile HER2+ meme kanseri tedavisinde kanser hücrelerini kullanan ilaçlara duyarlı hale getirmeye yönelik belirlenen 8 miRNA, hücre canlılığını azaltmaya destek olarak ilaçlarla kombinasyonu ile tedaviyi arttırıcı uygunluğu öne sürülmektedir [93].

2.4.3. miRNA ve Pankreas Kanseri İlişkisi

Pankreas kanseri üzerine yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda da miRNA'ların anormal ifade seviyelerindeki incelemeler, kanser prognozuna yönelik sağ kalımı arttırmak için yeni stratejik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde umut vaat etmektedir. Pankreas kanserinde rol alan mikroRNA'ların spesifik olarak etkileşim kurdukları haberci RNA'ların moleküler mekanizmasının net olarak anlaşılması klinik tedavi çalışmalarından önce gereklidir. Sağlıklı CD-1 erkek farelere, MIAPaCa-2 hücre hatlarına transfekte edilmiş miR34a ve miR143/145 vektörlerin aktarılması ile tümör boyutunun küçüldüğü ve apoptozun arttığı bildirilmiştir [10].

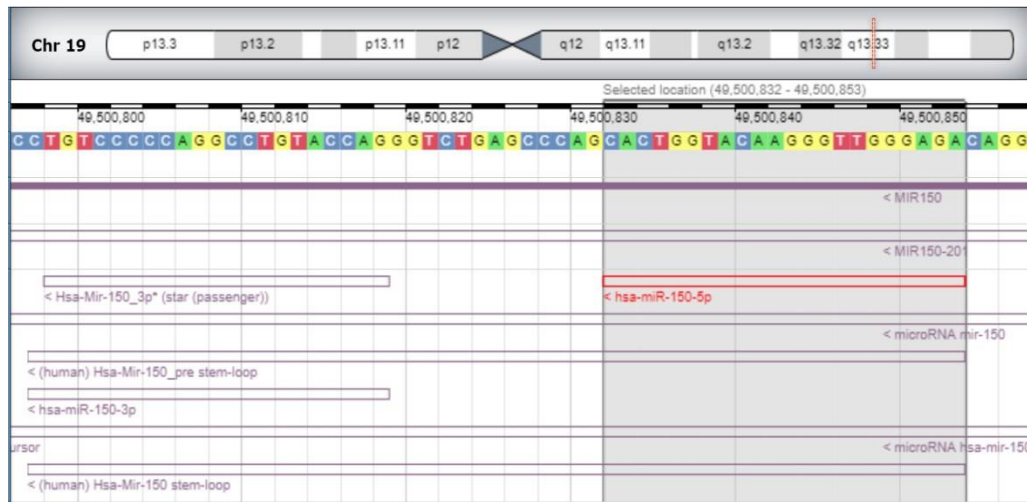
Pankreatik duktal adenokarsinomuna sahip hastalardan alınan plazma örneklerinde iki mikroRNA'nın (miR21 ve miR483-3p) ifade seviyelerinin kanserin ileri evre prognoz ile ilişkilendirildiği belirtilmiştir [78]. Özellikle pankreas kanseri tedavisinde gelişen ilaç direnci hasta sağkalımdaki etkisi büyüktür. Bu nedenle yeni stratejik gelişmeler için kombine tedavilerde miRNA'ların kullanımına da yönelenilmiştir. Bir başka çalışma, pankreas kanseri tedavisinde kullanılan Gemsitabinin duyarlılığını arttırmaya yönelik yapılan bir çalışmada ilacın, pankreas kanseri hücre hatlarında tümör baskılayıcı etkisi bilinen miR217 ile kombinasyonunun ilacın etkisini arttırdığı belirtilmiştir [94].

2.4.4. miR-150

2.4.4.1. Karakteristik Özellikleri ve Hastalık İlişkisi

Kodlama yapmayan RNA sınıfından olan miR-150, genomda 19q13.33 kromozom lokasyonunda bulunmaktadır [95]. Şekil 2.7.'de miR-150'nin yer aldığı kromozomu ile olgun kılavuz (hsa-miR-150-5p) ve yolcu (hsa-miR-150-3p*) ipliklerinin karakteristik özellikleri gösterilmektedir. 22 nükleotit uzunluğa sahip olduğu bilinen bu mikroRNA'nın 3260 yayında yer aldığı ve 170 türde tespit edildiği bildirilmiştir.

Geniş bir veri tabanı olan RNA central veri tabanında miR-150'nin 177 tane spesifik proteini hedeflediği belirtilmektedir [96].



Şekil 2.7. miR-150 Genomik Lokasyonunun ve Dizisinin Gösterilmesi (miR-150-5p ve miR-150-3p) [96].

Şekil 2.8.'de miRBase veritabanında alınan hsa-miR-150'nin dizilimi verilmektedir.

```
>hsa-mir-150 MI0000479  
CUCCCCAUGGCCUGUCUCCCAACCCUUGUACCAGUGCUGGGCUCAGACCCUGGUACAGGCCUGGGGGACAGGGACCUGGGGAC
```

Şekil 2.8. hsa-miR-150 diziliminin gösterimi (miRBase) [97].

miR-150-5p, bir mikroRNA olarak post-transkripsiyonel modifikasyonlarda görev almanın yanı sıra, ekstrasellüler boşlukta bulunabildiği gibi, endotelial ve mezodermal hücreler ile anjiyogenez sürecinde yer alan hücre göçünün farklılaşmalarını düzenlenmek de görevleri arasında bulunduğu fakat vasküler endotel hücrelerin çoğalmasında görev almadığı belirtilmektedir [96]. Tablo 2.4.'de TargetScanHuman veri tabanındaki verilerden alınan, miR-150'nin hedef aldığı genlerden bazı örnekler gösterilmektedir [98].

Hücrel süreçlerin etkileneşini sağlayan miR-150-5p'nin değışen ifade seviyesinin farklı hastalıklardaki işlevi birçok yayında yer almaktadır. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmaya göre SARS-CoV-2 ile ilişkili nsp10 geninin miR-150-5p'nin hedefi olduğu ve mimik transfeşiyonunun ardından genin baskılanması sonucu enfeksiyonu azalttığı gösterilmiştir [99].

Nörodegeneratif hastalıklarda da rol alan ve Parkinson hastalığında ise azaldığı belirlenen miR-150-5p ifade seviyesinin artırılmasının sinir sisteminde aktif halde bulunan AKT3'ü hedefleyerek nöroinflamasyonun baskılanmasını sağladığı belirtiliyor [100].

Tablo 2.4. miR-150-5p Tarafından Hedef Alınan Protein Örnekleri [98]

Hedef Proteinler			
AKT3 (Protein kinaz B gama)	BCL9L (B hücresi lenfoma 9 benzeri)	CBL (Proto-onkogen)	CDK13 (Sikline bağımlı kinaz 13)
CDK5R1 (Sikline bağımlı kinaz 5, aktivatör 1)	COL4A4 (Kollajen tip IV alfa 4)	CTNNB1 (Katenin beta 1)	DKK3 (Dickkopf WNT sinyal yolu inhibitörü 3)
EGR2 (Early growth response 2)	FNDC5 (Fibronektin tip III domain içeren protein 5)	FOXO4 (Forkhead box 4)	GAB1 (GRB2 ile ilişkili bağlayıcı protein 1)
GSK3B (Glikojen sentaz kinaz 3 beta)	HIF1A (Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 alfa)	IRF2BP2 (İnterferon düzenleyici faktör 2 bağlayıcı protein 2)	ITGB3 (İntegrin beta 3)
MAP2K6 (Mitojenle aktive edilen protein kinaz kinaz 6)	MAP3K12 (Mitojenle aktive edilen protein kinaz kinaz kinaz 12)	MAP3K3 (Mitojenle aktive edilen protein kinaz kinaz kinaz 3)	MMP-14 (Matriks metalloproteinaz 14)
MMP-16 (Matriks metalloproteinaz 16)	MUC21 (Müsin 21)	MYB (Proto-onkogen)	NOTCH3 (Notch reseptör 3)
PCDH1 (Protokadherin 1)	RAB9A (RAS onkogen ailesi üyesi)	SRCIN1 (SRC kinaz sinyal inhibitörü 1)	STAT1 (Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 1)
TCF23 (Transkripsiyon faktörü 23)	TP53 (Tümör proteini p53)	WNT2B (Wnt aile üyesi 2B)	ZEB1 (Zinc finger E-box binding homeobox 1)

Farklı kanser türlerinin patogenezindeki rolünün incelenmesine yönelik araştırmalar miR-150-5p'nin tümörigenezi teşvik edebildiğini ya da baskılayabildiğini göstermektedir. Örnek olarak küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde [101] ve servikal kanserinde [102] onkogen özellik göstermesine rağmen pankreas kanseri [103] prostat kanseri [104] ve üçlü negatif meme kanserinde [105] tümör baskılayıcı özellik göstererek farklı ifade seviyelerinde tümörigenez ile ilişkilendirilmektedir.

2.5. Hücre Döngüsü ve Kontrol Mekanizması

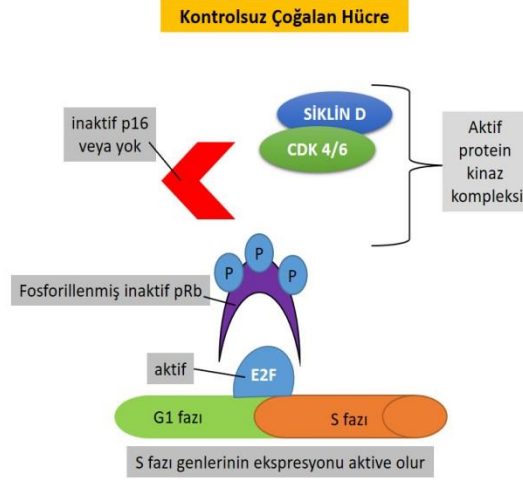
Hücre döngüsü, siklin ve ilişkili oldukları sikline bağımlı kinazların (cdk) kontrolünde gerçekleşen ve hareketsiz durumdaki hücrelerin organizmanın gelişiminde ihtiyaç duyulduğu durumlarda mitoz bölünme geçirerek hücrelerin çoğalmasını sağlayan bir düzendir [106]. Bu süreçte gerçekleşen düzensizlikler hücrenin apoptoza gitmesine neden olarak sağlıklı hücrelerin çoğalmasına izin verir.

Karmaşık hücre döngüsü elemanlarında meydana gelen mutasyonların düzeltilmemesi durumunda ise karsinogenez gelişiminde kritik rol oynamaktadır. G1, S, G2 ve M aşamalarında kompleks oluşturdıkları spesifik siklinler tarafından aktif hale getirilen serin/treonin kinaz ailesinden sikline bağımlı kinazlar, farklı fazlarda görev alarak hücre döngüsünün ilerlemesini koordine etmektedirler [107].

2.5.1. Siklin D/CDK4/6 Kompleksi ve Kanser

Hücre G1 fazında aldığı gerekli büyüme sinyalleri aracılığıyla büyüyerek, iki eş yavru hücre oluşması için kendisini S fazında gerçekleştirecek DNA eşleme aşamasından önce hazırlaması gerekir [108]. Bu fazda CDK4 ve CDK6, siklin D vasıtasıyla görev almaktadır. Notch sinyal yolağı, PI3K-Akt-mTOR yolağı ile Ras-Raf-MEK-ERK yolağı tarafından aktive edilen mitojenler c-Jun, cFos, ATF2, MYC dahil olmak üzere birçok transkripsiyon faktörü yardımıyla siklin D seviyesinde artış olmaktadır. Sitokinlerin ve büyüme faktörü reseptörlerindeki artışın da etkisinin yanı sıra kendini fosforile ederek stabile olabilen siklin D, kompleks oluşturduğu CDK'lar sayesinde retinoblastoma (Rb) proteinini fosforile edebilmektedir [12] [109]. Böylelikle S fazına geçişi sağlayan E2F transkripsiyon faktörünün aktivasyonu sağlanır. Siklin D artışı olmadığında E2F transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu etkisiz hale getirmesiyle hücre döngüsünün ilerleyişini düzenleyen Rb, tümör baskılayıcı görevinde hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını durdurmaktadır (Şekil 2.9.) [109].

D tipi siklin seviyesindeki artışın birden fazla kanser türü ile ilişkili olarak onkogen özellik gösterdiği ve buna bağlı yapılan araştırmalarda kemoterapötik ajanlardaki direnç oluşumuna dahil olabildiği belirtilmektedir [110] [111].

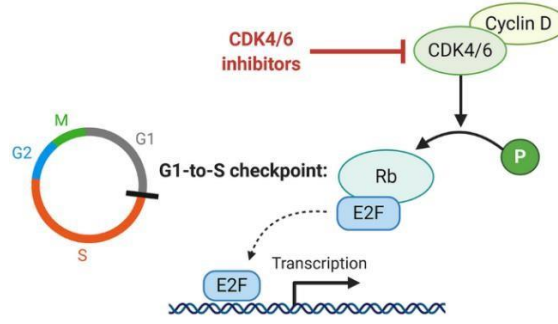


Şekil 2.9. Siklin D/CDK4/6 kompleksinin G1/S hücre döngüsü geçiş fazındaki etki mekanizmasının gösterimi [112]

2.5.2. Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü: Palbosiklib

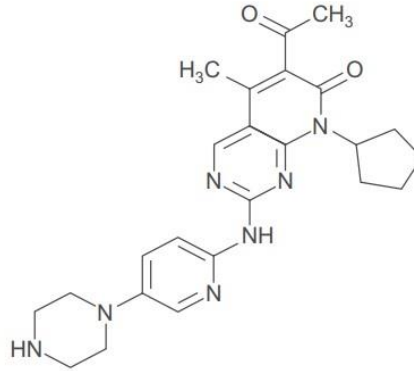
Hücre siklusunun, meydana gelebilecek gen mutasyonları ve proteinlerin işlev kaybına bağlı olarak ilerlemesinin durdurulmasını sağlayan endojen sikline bağımlı kinaz inhibitörleri mevcuttur. Bu inhibitörler, Cip/Kip ailesi p21, p27 ile p57 ve özellikle CDK4 ve CDK6'nın negatif düzenlenmesinden sorumlu INK4 ailesi p16, p15, p18 ile p19 olarak sınıflandırılmaktadır [113]. CDK4/6'ya bağlanmasıyla hücrenin S fazına ilerlemesini durdurarak hücre çoğalmasının sürekliliğine izin vermeyen p16 proteini, tümör baskılayıcı özelliğinin mutasyon sonucu kaybına bağlı olarak tümörigenezle ilişkilendirilmiştir [114].

Hücre döngüsü sırasında ortaya çıkan sorunlar kontrol altına alınamayan hücre çoğalmasındaki rolleri ile kanser tedavisindeki çalışmaları siklin-CDK komplekslerinin hedef alınmasına yöneltmiştir [115]. Belirli bir CDK'nın hedef alınmaması durumunda tedavide yüksek toksisiteye sebep olması araştırmalarda özellikle hücre bölünmesini engellemek adına G1/S fazındaki kritik görevleri ile seçili olarak CDK4/6'yı hedef alan terapötik ajanların geliştirilmesine odaklanılmıştır (Şekil 2.10.) [116].



Şekil 2.10. Hücre siklusunda CDK4 ve CDK6 inhibitörleri tarafından hücrenin S fazına geçişinin engellenmesi [117].

Sitotoksik etkinin azaltılmasının yanı sıra kompleksin aktivasyonunun baskılandığı durumda başka CDK'lar CDK4/6 kompleksin görevini tamamlamamaktadır [116]. Hedefe yönelik yapılan farmakolojik çalışmalarda geliştirilen Palbosiklib (PD), Ibrance ya da PD0332991 olarak bilinen CDK inhibitör ajanıdır. CDK4/6'nın spesifik olarak baskılanması üzerine geliştirilmiş ve diğer CDK4/6 inhibitörleri Abemasiklib ve Ribosiklib (CDK4/6i) arasından FDA (Food and Drug Administration) tarafından, kadınlardaki menopoiz sonrası östrojen reseptörü (ER) pozitif ve ilerlemiş HER2negatif meme kanserinde kullanılmak üzere kabul edilen ilk ilaç olmuştur [13] [118]. Şekil 2.11.'de Palbosiklibin kimyasal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.11. CDKi Ibrance (PD) kimyasal yapısının gösterimi [119].

Oral yolla alınan PD, ileri meme kanseri tedavisinde kullanılan Letrozol ve Tamoxifen gibi östrojen seviyesini azaltan ve kanserin ilerlemesini engelleyen ilaçlarla kombinasyonunun tedavide daha etkili olabildiği belirtilmektedir [13].

Meme kanserinin yanı sıra farklı kanser türlerinde de yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar neticesinde PD'nin CDK4/6i etkisinin hücreyi apoptoza götürmesiyle tümörigenezi engellediği belirtilmiştir [120]. Farklı pankreas kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyonu, koloni oluşturma kapasitesi, tümör büyüklüğü gibi özelliklerin farklı derecede etkili sonuçlar elde edilmesine rağmen kombine tedavi yaklaşımları pankreas kanserinde daha başarılı olmaktadır [15].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan Cihazların Listesi

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Ekler bölümünde EK A'da yer almaktadır.

3.1.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Donanımların Listesi

Çalışmada hücre kültüründe kullanılan donanımların listesi Ekler bölümünde EK B'de yer almaktadır.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Ekler bölümünde EK C'de yer almaktadır.

3.1.4. Kullanılan Tamponların İçeriği

Çalışmada kullanılan tamponların içeriği Ekler bölümünde EK D' de yer almaktadır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü

MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücre hatlarının kültürü için, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeriğine sahip, 1X Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) hücre besiyeri hazırlanmış ve ana stok +4°C'de saklanmıştır. Pankreas kanseri hücreleri T25 hücre kültürü kaplarında DMEM besiyer ile %5 CO₂ içeren 37°C'li inkübatörde büyütülmüşlerdir.

MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücre hatlarının çoğalma süreleri sırasıyla 40 saat ve 96 saattir. Hücreler, hücre kültürü kaplarının yüzeyinde, %70-80 yoğunluğa ulaştıktan sonra, pasaj işlemi ile yeni hücre kültürü kaplarına geçirilmiş ya da yapılacak deneyler için gerekli hücre tabaklarına ekimleri yapılmıştır. Bu hücreleri yüzeyden kaldırmak için, önce eski besiyeri atılmış sonra 1X PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücrelerine tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek, yapışan hücrelerin kalkması için inkübatörde 5 dakika boyunca bekletilmiştir. Çözeltiye fazla maruz kalan hücrelere, toksik etki yaratacağı için bekleme süresi kısa tutulmuştur. Hücreler kalkınca eklenen çözelti miktarı kadar hücre besiyeri eklenerek tripsin aktivitesi engellenen hücreler, 15 ml'lik falkon tüpe toplanmıştır. Falkon tüp 2500 rpm 4 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz atılmış ve pellet 1 ml hücre besiyeri ile çözülmüştür. Homojen bir hücre süspansiyonu elde edildikten sonra süspansiyondan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresi ile hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hemositometre üzerindeki karelerdeki hücrelerin sayısının 10^4 ile çarpımı, 1 ml de çözünen pellet içerisindeki toplam hücre miktarını belirtmektedir. Hücre sayımının hesaplanmasının ardından, yapılacak olan deney için gerekli hücre sayımı için hesaplama yapılmış ve MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücre hatları için ayrı hücre kültürü kaplarına belirlenen 4 deney grubu için ekimleri yapılmıştır. Oluşturulan deney grupları Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmaya Yönelik Oluşturulan Deney Grubu

Deney Grubu			
Kontrol	miR-150	Palbosiklib	Palbosiklib+miR-150 Kombinasyonu

3.2.2. Hücrelerin Açılması ve Dondurulması

Pankreas kanseri hücrelerinin kültüründe oluşabilecek kontaminasyon durumuna bağlı olarak küçük pasaj numaralarına sahip hücreler dondurularak hücreler stoklanmıştır. Hücre kültürü kabının yüzeyini kaplayacak yoğunluğa geldiğinde hücrelere tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve hücreler yüzeyden kaldırılmıştır.

Tripsinin aktivitesinin engellenmesi için eklenen hücre besiyeri ile santrifüj tüpüne hücreler toplanmıştır. Santrifüj sonrası üst faz atılarak 1 ml eritilmiş hücre dondurma medyası ile pellet çözdürülmüştür. Homojen hücre süspansiyonu elde edildikten sonra 1 adet kriyo tüp içerisine konularak -80°C’de saklanmıştır.

Ana stoktaki kültürlenmiş hücrelerin morfolojilerinin bozulduğu ya da hücrelerde kontaminasyon görüldüğü durumlarda kriyoprezerve edilen hücreler açılmıştır.

-80°C’den alınan kriyo tüpün içine 1 ml hücre besiyeri (DMEM) eklenmiştir. Homojen süspansiyon elde edildikten sonra yeni T25 hücre kültürü kabına hücre ekimi yapılmıştır.

3.2.3. Hücrelere miR-150 Mimik Transfeksiyonu

MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücreleri, hücre kültürü kabının yüzeyini kaplayacak yoğunluğa geldiğinde, kaldırılarak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hemositometre sayımının ardından gerçekleştirilecek olan deney için uygun hücre kabına, her bir deney grubunun kuyucuğuna transfeksiyon ekimi hesaplaması yapılmıştır. Her bir kuyucuğa, kullanılan hücre kabına göre 1X hücre besiyeri (DMEM) eklendikten sonra hücre ekimi yapılmış ve 6 kuyucuklu hücre kabı inkübatöre konulmuştur. Hücreler yeterli yoğunluğa geldiklerinde transfeksiyon karışımı hazırlanmış ve transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer karışımı için +4°C’de saklanan, FBS ve antibiyotik içermeyen DMEM hücre besiyeri kullanılmıştır.

Transfer işlemi kontrol grubu ve Palbosiklib grubu hariç iki gruba (Deney grupları: miR-150, miR-150+3PD) gerçekleştirileceği için her kuyucuk için 100 µl olacak şekilde toplam 200 µl FBS ve antibiyotik içermeyen hücre besiyeri içerisine bir kuyucuk için eklenecek miRNA oranının 3 katı olacak şekilde 3 µl (3:1) transfeksiyon ajanı (İN-fect™ in vitro transfection reagent, Cat No. 15081) eklenmiştir. 5 dakika boyunca laminarda inkübasyona bırakılan karışımın içerisine medya oranına bağlı olacak şekilde toplam miR-150-5p mimik (Qiagen, Ana stok: 20 µM, İstenen miktar: 5nM) eklenmiştir ve transfeksiyon karışımı 20 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Ardından hücre kaplarındaki eski besiyerler atılmış ve yeni besiyer eklendikten sonra transfeksiyon karışımı, transfeksiyon gerçekleştirilecek her kuyucuk başına 100 µl eklenmiş ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Mimik miRNA -20°C’de, transfeksiyon ajanı ise +4°C’de saklanmıştır.

3.2.4. Hücrelerin Palbosiklib ile Muamele Edilmesi

Seçili hücre tabakalarına MIAPaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinin ekimlerinin ardından gerçekleştirilen mimik miR-150 transfeksiyonundan 24 saat sonra hücrelere belirlenen dozda (3 µM) Palbosiklib ilaç uygulaması yapıldı. Hesaplanan ilaç miktarı hücrelere hücre besiyeriyle (DMEM) birlikte, Palbosiklib ile muamele edilecek olan deney gruplarına verilerek inkübasyona konulmuştur.

3.2.5. miRNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MIAPaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinde miRNA ve diğer küçük RNA’ların da bulunduğu total RNA purifikasyonu mirNeasy miRNA isolation kit (Qiagen, Kat: 217004) ile ticari kitin öngördüğü protokol ile gerçekleştirildi. İzole edilen total RNA konsantrasyonu ölçümleri Implen nanodrop ile ölçüldü. Seçili miRNA’ların ifade analizi için ilk basamak cDNA’ya çevirme işlemidir. Bu işlem için miscript II RT Kit (Qiagen, Kat: 218161) kullanılarak ve ticari kitin önerdiği protokol basamakları takip edildi. cDNA’ya çevrim işleminin ardından Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu, CFX Connect (BioRad) cihazında, kullanılan miRNA primerleri miR-150 ve endojen kontrol RNU6B primeri ile miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen, Kat No: 218073) kullanılarak, 94°C’de 15 sn denatürasyon, 55°C’de bağlanma ve 70°C’de 30 sn uzama basamaklarını takiben 40 siklus devam ettirildi. Veri analizi, her örneğe ait miRNA’ların Δ CT değerleri ile internal kontrol RNU6B’ye göre normalize edildi ve en az 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.6. Üç Boyutlu Hücre Formunun Oluşturulması

3.2.6.1. Yumuşak Agar Koloni Formasyon Deneyi

Hücre kültürü tabakalarına deney hücre gruplarının ekimi yapıldı ve miR-150 transfeksiyonu ve Palbosiklib uygulamalarının ardından MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinden üç boyutlu tümörsfer modellemelerinin oluşturulması amacıyla, 6 kuyulu hücre kültürü kaplarında yumuşak agar koloni formasyon deneyi gerçekleştirildi.

Distile su ile hazırlanan %0.1'lik ve %0.6'lık agar (Agarose, Type1, Molecular Biology Grade, Calbicohem), otoklavlandıktan sonra +4°C'de saklandı ve deney öncesinde mikrodalgada ısıtılarak uygun sıcaklığa gelince kullanıldı. 6 kuyucuklu hücre tabaklarında alt tabakanın oluşturulması için 1:1 oranında 2X DMEM (%20 FBS, %1 penisilin/streptomisin) ile iyice karıştırılan %0.1'lik agar, her kuyucuğa eşit olacak şekilde paylaştırıldı ve 30 dakika boyunca inkübasyon için oda sıcaklığında bekletildi.

miR-150 mimik transfeksiyonu gerçekleştirilen ve Palbosiklib uygulanan hücreler tripsin ile kaldırılarak hücre sayımının ardından her deney grubu için her kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde hesaplamaları yapılarak 2X DMEM ile hücre süspansiyonu elde edildi. Her deney grubuna ait hücre süspansiyonları 1:1 oranında %0.6'lık agar ile iyice karıştırılarak alt agar donduktan sonra üstüne eklenmesinin ardından inkübatöre bırakıldı ve haftada iki kere 1X DMEM hücre besiyeri (500 µl) eklendi. Yaklaşık üç haftanın ardından deney gruplarının oluşturduğu üç boyutlu hücreler ışık mikroskobu altında beş gün boyunca görüntülendi. Üçüncü haftanın sonunda hücre canlılıkları DAPI ve DiOC6 ile boyanarak floresan mikroskobu ile görüntülendi.

3.2.6.2. Asılı Damla Modeli Deneyi

Mimik miR-150 transfeksiyonu uygulanan pankreas kanseri hücreleri tripsin ile enzimatik yolla kaldırıldı ve asılı damla modeli tayini ile deney gruplarının oluşturduğu tümörler incelendi. Hücre sayımı her damla içerisinde 2.500 hücrenin olmasını sağlayacak şekilde yapıldı ve PD deney gruplarının hücre süspansiyonlarına 3 µM PD eklendi. 10 µl'lik damlalar petri kaplarının kapaklarına ekilerek, ekildikleri gün dahil olmak üzere dört gün boyunca inkübasyona bırakıldı.

1X PBS, petri kaplarının altına eklenerek damlaların kurumamaları sağlandı ve her gün ekilen damlalar ışık mikroskobu altına görüntülendi. 4. günün sonunda DAPI ve DiOC6 boyaları eklenen hücre besiyerinden 10 mikrolitre her bir damlaya verilerek hücre canlılıkları görüntülendi.

3.2.6.3. Matrigel Tabanlı Deney

MIAPaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücre hatları ile oluşturulacak organoid kültürler için 24 kuyucuklu plakalarda 5000 hücre/kuyu olacak şekilde büyüme faktörü azaltılmış Matrigel (Corning) üzerine (kuyu başına 1 ml) ekildi. Kültürler, ek olarak % 2 (v/v) büyüme faktörü ile takviye edilen Matrigel ile inkübe edildi. % 2 Matrigel ile desteklenen kültür ortamı her 3-4 günde bir yenilendi. Matrigel kültürüne % 0,02 EDTA eklenen 1X PBS ile pipetajlama ile homojen hale getirilen matrigelin 500 g'de 5 dk santrifüjlenmesi ile hücreler elde edilebilir. Olası mikoplazma kontaminasyonlarına karşı örnekler ayda bir olmak üzere MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza) ile kontrol edilebilir. 3B tümör formları 500 µm çapına ulaştıklarında pasajlama işlemi ile homojen edilip, 6 kuyucuklu petri kaplarına ekildi. 3 boyutlu sfer yapılarının homojenizasyonu ile sfer yapısının iç, orta ve dış kısmında bulunan hücre gruplarının tümör heterojenitesi ile benzer özellik gösterdiğinde, hücreler bu süreçten sonra miR-150 mimik ile transfekte edildi. 24 saat süren transfeksiyon işlemi sonrası, 3 µM Palbosiklib uygulaması 24 saat olarak gerçekleştirildi.

3.2.7. Koloni Oluşturma Deneyi

3.2.7.1. İki Boyutlu Hücre Kültüründe Koloni Oluşturma Deneyi

6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücreleri kaldırıldıktan sonra hemositometre sayımı ile her kuyuya 2×10^3 hücre ekimi yapıldı. miR-150 mimik transfeksiyon uygulaması yapılmasından 24 saat geçtikten sonra 3 µM PD belirlenen deney gruplarına uygulandı. 2B hücrelerin ekildiği kültür kaplarındaki kontrol grubundaki hücreler %80 yoğunluğa gelene kadar gerektiğinde yeni hücre besiyerleri ile değiştirildi. Yaklaşık 14 gün sonra eski medya atılarak 1x PBS ile dikkatlice yıkandı. 1:3 oranında hazırlanan asetik asit/metanol solüsyonundan her kuyuya eklendi ve 10 ila 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılarak fiksasyon gerçekleştirildi. Fikse edilen hücreler eklenen %0,5 kristal viyole ile boyandı.

30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra fazla boyadan arındırılan hücreler kurumaya bırakıldı ve her bir deney grubundaki koloni oluşumları Kemilüminesans cihazı ve ışık mikroskobu altında görüntüleri alındıktan sonra koloni sayıları Image J programı kullanılarak analizi yapıldı.

3.2.7.2. Üç Boyutlu Hücre Kültüründe Koloni Oluşturma Deneyi

Üç boyutlu hücrelerden koloni oluşturma deneyinin yapılması amacıyla asılı damla modeli deneyinde oluşturulan sferoid hücre formları kullanıldı. Her kondisyon için ayrı medya içeren 1,5 ml'lik mikrofij tüplerine iki veya üç damlanın alınmasının ardından süspansiyonun çözülmesiyle hemositometre sayımı gerçekleştirildi. Sayım sonrası 6 kuyucuklu hücre kültürü kabına hücre hatlarının koloni deneyi için ekimi yapıldı ve kontrol grubu %80 yoğunluğa ulaştığında kristal viyole ile boyanan hücrelerin görüntüsü alındı.

3.2.8. Hücre Sağkalım Testi

MIAPaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücreleri tripsinle kaldırıldı ve hücre sayımının gerçekleştirilmesinin ardından hücrelerin 6 kuyucuklu petri kaplarına ekimleri yapıldı. Hücreler transfeksiyon için yeterli yoğunluğa ulaştığında miR-150 mimik transfeksiyonu gerçekleştirilmesini takiben 3 µM Palbosiklib uygulandı. PD uygulamasından 24 saat sonra canlı hücrelerin mitokondrilerini boyayan DiOC6 ile floresan boyaması yapıldı. 4 nM DiOC6 uygulamasının ardından 15 dk inkübasyona bırakılan hücrelerde, artan miR-150 ifadesi ile PD uygulamalarının hücre sağkalım üzerindeki etkilerinin incelenmesi için mavi filtre ile floresan mikroskobu altında görüntülenmiştir.

3.2.9. Yara Kapanma Deneyi Uygulanması

3.2.9.1. İki Boyutlu Hücre Kültüründe Yara Kapanma Deneyinin Oluşturulması

MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinin tripsinle kaldırılması ile hemositometre sayımı gerçekleştirildi ve miRNA mimik transfeksiyon işlemi için gerekli hücre ekimi 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına yapıldı. miR-150 mimik transfeksiyonunun yapılacağı deney gruplarının (miR-150 ve miR-150+PD) medya değişimleri yapıldı. Transfeksiyon uygulamasının ardından hücreler kültür kabının yüzeyini kaplayana kadar inkübasyona bırakıldı. Her kuyucuğun yüzeyi hücreler tarafından kaplandığında eski medya atılmadan 10 µl'lik pipet ucu yardımı ile yara açıldı. 1x PBS ile gerçekleştirilen yıkamadan sonra kuyulara %5 FBS içeren medya konuldu, ilaçlı deney gruplarına ise ilaçlı %5 FBS medya eklendi. Yaraların açıldığı gün 0. saat olmak üzere 24, 48 ve 72. saatlerde ışık mikroskobu altında yara çapları görüntülendi.

72. saatin sonunda %5 FBS ve DiOC6 içeren medya ile 6 kuyucuklu hücre kültür kabının medya değişimi yapılmıştır. 15 dk inkübatörde inkübasyona bırakıldıktan sonra yara çaplarının ışık ve floresan çekimleri yapılmıştır.

3.2.9.2. Üç Boyutlu Hücre Kültüründe Yara Kapanma Deneyinin Oluşturulması

Asılı damla modeli deneyinde oluşturulan sferoid hücre formları, üç boyutlu hücre formlarının yara kapanma deneyindeki etkisinin incelenmesinde kullanılmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü kabına her kondisyon için eşit sayıda olacak şekilde damlalar ekilmiştir. 1,5 ml'lik mikrofüj tüplerine dikkatlice petri kapağından alınan damlalar, süspansiyonun çözülmesiyle hemositometre sayımı yapılmadan kültür kabına eşit sayıda damlalar alınarak ekimleri yapılmıştır. Kültür kabının yüzeyini kapladıkları durumda 10 µl'lik pipet ucu yardımı ile yaralar açılmıştır. 24 ve 48. saatlerdeki ışık mikroskobu altındaki görüntüleri ile 72. saatteki ışık mikroskobu ve DiOC6 boyamasının gerçekleştirilmesiyle floresan mikroskobu altında yara çaplarının görüntüleri çekilmiştir.

3.2.10. Hücrelerin Floresan Boyalar Yardımı ile Floresan Mikroskobu Altında Görüntülenmesi

İki boyutlu hücreler ve üç boyutlu hücre formları DAPI ve DiOC6 floresan probları kullanılarak hücreler floresan mikroskobu altında ve karanlıkta görüntülenmiştir.

3.2.10.1. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) Floresan Boyama

Yumuşak agar koloni formasyon deneyi ve Matrigel tabanlı deneyler ile 3B sferoid yapıların oluşturulmasının ardından ışık mikroskobu altındaki çekimlerinin son gününde, hücre kültürü tabakalarına 5mg/ml DAPI içeren hücre besiyerleri eklenmiş ve 10 dakika inkübasyonunun ardından boyanan sferoid yapılar floresan mikroskobu altında görüntülenmiştir. DNA'daki adenin ve timin zengini bölgelere bağlanan DAPI floresan probu, floresan mikroskobu altında aqua filtrenin kullanımı ile hücrelerin nükleusunun mavi renkte görünümünü vermektedir. 358 nm eksitasyon, 461 nm emisyon dalga boylarında canlı hücreler görüntülenmiştir.

3.2.10.2. DiOC6 (3,3'-Diheksiloksakarbosiyanin İyodür)

Matrigel, yumuşak agar koloni formasyon deneyi, yara kapanma deneyi ve sağkalım deneylerine DiOC6 boyaması gerçekleştirilmiştir. Mikrofüj tüplerine alınan yeni medya içerisine 4 nM DiOC6 eklenmiş ve atılan eski medya ile değiştirilmiştir.

İnkübatörde 15 dakika inkübasyonun ardından hücreler floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir. DiOC6 kullanımı canlı hücrelerin mitokondrilerinin floresan mikroskobu altında mavi filtrenin kullanımı ile 482 nm eksitasyon ve 504 nm emisyon dalga boylarında yeşil renkteki görünümünü vermektedir.

3.2.10.3. Sferoid Formlarının DAPI ve DiOC6 ile Boyanması

Asılı damla modeli deneyinde oluşturulan üç boyutlu sferoid formlarının floresan mikroskobu altında DNA kırıklarının ve canlı hücre mitokondrilerinin görüntülenmesi üzerine DAPI ve DiOC6 ile boyamaları yapılmıştır. Bir mikrofüj tüpünde 1 ml yeni medya içerisine 5 mg/ml DAPI ve 4 nM DiOC6 eklenmiş ve pipetaj yardımıyla karıştırıldıktan sonra her bir damla içerisine 10 µl eklenmiştir. Ardından petriler inkübatörde 15-20 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Sferoid formlarının bozulmasını önlemek için petri kapağı ters çevrilmeden kaldırılmış ve boya-medya karışımından 10 µl, asılı kalan damlaların kenarından dikkatlice verilmiştir. İnkübatördeki 15-20 dk inkübasyonun ardından ortalama 5 damla seçilerek floresan mikroskobu altında görüntülenmiştir.

3.2.11. İmmunoblotlama

3.2.11.1. İki Boyutlu Hücrelerden Protein İzolasyonu

Her bir deney grubu için 60 mm'lik petri kaplarına 3×10^5 hücre kuyu başına olacak şekilde yapıldı. Mimik miR-150 transfeksiyonunu takiben 3 µM PD ile muamele edilen hücreler 24 saat sonra eski medyaları atılarak petri kaplarına eklenen, +4°C'de saklanan 1X PBS ve kazıyıcılar ile hücreler yüzeyden kaldırılarak mikrofüj tüplerine alındı. Protein için ekilen asılı damla modeli örnekleri de 1X PBS ile petri kapağından toplandı ve isimlendirilen mikrofüj tüplerine kondu. Mikrofüj tüplerine alınan tüm örnekler +4°C ve 16000 rpm ayarlı santrifüje kondu ve elde edilen hücre pelletlerinin miktarına bağlı olarak hücre özütleme tamponu (CLB) ile çözüldü. Oda sıcaklığındaki bir çalkalayıcıya 20 dakika boyunca bekletilen mikrofüj tüpleri, ardından 20 dakika +4°C ve 16000 rpm ayarlı santrifüje konuldu. Steril mikrofüj tüplerine aktarılan üst fazda bulunan proteinler, -20°C'de saklandı.

3.2.11.2. Üç Boyutlu Hücrelerden Protein İzolasyonu

Üç boyutlu hücre formlarının asılı damla deneyi ile oluşturulmasının ardından üç gün boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra deney gruplarındaki damlalar 1X PBS ile ayrı mikrofüt tüplerine toplandı.

Gerekli santrifüt aşamalarından sonra CLB ile çözülen hücre pelletleri, 20 dakikalık çalkalayıcı ve santrifüt cihazlarına konuldu ve üst faz -20°C’de saklandı.

3.2.11.3. Bradford Analizi Kullanılarak Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Yöntemde konsantrasyonu bilinen bir protein (BSA) referans alınarak örneklerin bilinmeyen protein konsantrasyonlarının belirlenebilmesi amacı ile Bradford yöntemi 96 kuyucuklu petri kullanılarak yapıldı. Bradford solüsyonu içerisinde bulunan Coomassie Brilliant Blue G-250, mavi rengi proteinlere bağlanarak yansıtır ve proteinlerin konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak yoğun renk değişimi gözlenir. Standart eğrinin çizilebilmesi için ikişer tekrarlı yapılan yöntemde BSA proteinin sırasıyla kuyucukla 1,5-3-4,5-6-7,5 µl/µl konulmasının ardından deney grubu sırası dikkate alınarak her bir protein örneğinden 1 µl konuldu. Kuyuların her birine 200 µl Bradford solüsyonu eklenerek beş dakika boyunca karanlık bir ortamda inkübe edilen hücre kabı, iMark mikroparka okuyucuda 595 nm dalga boyu seçilerek proteinlerin absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen veriler ile hesaplanan standart eğrinin oluşturduğu R² değeri ve denklemi kullanılarak örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

3.2.11.4. Protein Örneklerinin SDS-PAGE Jel Elektroforezi için Hazırlanması

Bradford tayini ile elde edilen veriler doğrultusunda belirlenen protein konsantrasyonuna bağlı olarak örnekler 5:1 oranında 5x Laemmli çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra ısıtıcı blokta 5 dakika boyunca 95°C’de inkübe edildi.

3.2.11.5. Örneklerin SDS-PAGE Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

İki cam arasına %12’lik jel içeriğindeki ayırma jeli hazırlanarak döküldü ardından jelin düzgün polimerleşmesini sağlamak amacıyla üzerine izopropanol eklendi. Oda sıcaklığında alt jel polimerleştikten sonra izopropanol distile su ve filtre kağıtları ile uzaklaştırıldı ve yürütme jeli hazırlandı. Üst jel döküldükten hemen sonra 1 mm’lik taraklar camların arasına dikkatlice yerleştirildi.

Üst jelin polimerleşmesinin ardından jel kasete takıldı ve örneklerin yüklenmesi için yürütme tamponu döküldükten sonra taraklar çıkartıldı. Deney grubu sırasına göre jele yüklenen protein örnekleri 70-100 V'de yürütüldü.

3.2.11.6. Proteinlerin Membrana Transfer İşlemi ve Bloklama

Yürütme işleminin tamamlanmasının ardından camlar birbirinden ayrıştırıldı. Yükleme jelinin kesilerek uzaklaştırılması ile ayırma jeli önce distile suya konuldu. Ardından ayırma jeliyle birlikte süngerler, filtre kağıtları ve transfer kaseti transfer tamponu içeren kaba alındı. Ayırma jeline uygun poliviniliden diflorür (PVDF) membran kesildi ve aktifleştirilmek üzere 30 sn metanolde bekletilmesinin ardından transfer tamponu içeren kaba alındı. Akım yönü doğrultusunda transfer kasetinin siyah tarafından başlayarak sırasıyla sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı, sünger olmak üzere hazırlanan sandviç kapatıldı ve transfer kasetine yerleştirildi. Kaset tanka konulduktan sonra tank transfer tamponu ile dolduruldu ve akım 300 A ayarlanarak transfer işlemi istenilen protein büyüklüğüne göre belirlenen sürede gerçekleştirildi. Transfer aşamasının tamamlanmasından sonra %5 yağsız süt tozu içeren bloklama sütüne konulan membran, çalkalayıcıda bir saat boyunca oda sıcaklığında bekletilerek bloklandı. Transfer sandviçinden alınan jel ise Coomassie Brilliant Blue R-250 içeren kaba konularak boyanmıştır.

3.2.11.7. Antikorlar ile Proteinlerin İşaretlenmesi

Birincil antikorlar 1:1000, ikincil antikorlar 1:3000 olmak üzere %5 yağsız süt ile hazırlanarak -20°C'de saklandı. Membranların bloklama işleminin ardından belirlenen epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) birincil antikorlar Vimentin, β -katenin, ZEB-1, E-Kaderin ile PARP, β -Aktin ve GAPDH antikorları (Cell Signaling Technology) +4°C'de çalkalayıcı üzerinde gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Birincil antikor ile inkübasyon sonrası membran TBS-T ile 3 kere 10 dakika boyunca yıkandıktan sonra kullanılan birincil antikorun kökenine bağlı olarak seçilen ikincil antikor (anti-tavşan, anti-fare, anti-keçi) ile gece boyunca +4°C sıcaklıkta çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. İkincil antikor uygulamasını takiben TBS-T ile 3 kere 10 dakika, 1 kere de 5 dakika boyunca TBS ile yıkandı.

3.2.11.8. Protein Bant Profillerinin Görüntülenmesi ve Analizi

Membranların birincil ve sekonder antikor uygulamalarının ardından protein bantlarının görüntülerinin elde edilebilmesi için Ekler bölümünde belirtilen içeriğe sahip A ve B kemilüminesans membran görüntüleme çözeltileri hazırlandı ve karanlık bir ortamda karıştırıldı. Membranlar karışıma alınarak 3 dakika boyunca bekletildikten sonra kemilüminesans cihazı (BioRad) ile protein bant çekimleri yapılarak profil analizi yapıldı.

3.2.11.9. Membranların Mild Striplenmesi

Membranların kemilüminesans çekimlerinin ardından muamele edildiği antikorların uzaklaştırılması ve aynı membranda farklı bir antikorun bant profilinin incelenmesi amacı ile mild strip tamponu ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Membran ikişer defa 10'ar dakika mild strip tamponu, ikişer defa 10'ar dakika 1X PBS, ikişer defa 10'ar dakika 1X TBS ve bir defa 5 dakika 1X TBS-T ile yıkama sürecini takiben 1 saat boyunca %5 yağsız süt ile bloklama işleminin ardından belirlenen yeni bir birincil antikor ile uygulama tekrarlandı.

3.2.12. RNA İzolasyonu ve Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

3.2.12.1. RNA İzolasyonu

MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinin miRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen/gerçekleştirilmeyen ve Palbosiklib varlığında/yokluğunda oluşturulan deney gruplarının iki boyutlu ve üç boyutlu hücre kültürü formlarından RNA izolasyonu yapıldı. Pankreas kanseri hücrelerinin 60 mm hücre kültür kaplarına ekimi yapıldıktan sonra miRNA transfeksiyonu gerçekleştirildi ve 24 saat sonrasında Palbosiklib uygulandı. İlaç ile muamele edilen hücrelerin 24 saat sonra besiyerleri uzaklaştırılarak 1 ml RNA izolasyon ajanı PureZol ile hücreler hücre kabından kaldırılıp toplandı ve 1,5 ml santrifüj tüpüne alınarak 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından üzerine kloroform eklenen lizat 15 sn boyunca çalkalandı ve tekrar oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 15 dk boyunca 12000 x g'de +4°C'de santrifüj yapıldıktan sonra oluşan faz ayrımında en üstteki şeffaf faz dikkatlice yeni bir 1,5 ml santrifüj tüpe alındı. İzopropanolün eklenmesinden sonra çalkalanıp 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bıraktıktan sonra +4°C'de 10 dk 12000 x g'de santrifüj yapıldı.

Üst faz atıldıktan sonra pellete DEPC'li su ile hazırlanan %75 etanol eklendi ve 7500 x g'de +4°C'de 5 dk santrifüjlendikten sonra üst faz atıldı. Santrifüj tüpünün kapağı açık şekilde 5 dk boyunca pellet kurumaya bırakıldı ve DEPC'li su ile çözdürülür ve 55°C'ye ayarlı ısıtıcı blokta 2 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından -80°C'de saklandı.

Palbosiklib ile muamele edildikten sonra asılı damla deneyi ile oluşturulan üç boyutlu hücre formları 1X PBS ile toplandı ve 16000 x g'de 4°C'de 2 dk santrifüj yapıldıktan sonra üst faz atıldı. Pellet üzerine eklenen PureZol'ün ardından 5 dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonraki RNA izolasyon süreci 2B RNA izolasyon aşamaları ile aynı adımlarla gerçekleştirildi. Nanodrop cihazı ile izole edilen RNA'ların konsantrasyonları ölçüldü ve ardından %1'lik agaroz jel hazırlandı ve RNA'lar kontrol edilmek amacıyla jelde yürütüldü.

3.2.12.2. RNA'nın cDNA'ya Dönüştürülmesi ve Gerçek Zamanlı PZR

RNA örneklerinin cDNA'ya çevirmek için kullanılan malzemeler ve miktarları kullanılan iScript cDNA sentezi ticari kitin önerdiği protokole (BioRad) göre 5x iScript reaksiyon karışımı 4 µl, iScript Reverse Transkriptaz 1 µl olarak alındı. RNA örnek sayısına göre total olarak hazırlanan karışımı, reaksiyon karışımı ve reverse transkriptaz içermektedir. Ardından karışım, tüm örnekler için ayrılan mikrofüj tüplerine paylaştırıldı. RNA'lar konsantrasyonlarına göre 1000 ng olarak hesaplandı ve son hacim 20 µl olacak şekilde kalan miktar nükleaz içermeyen su ile tamamlandı. Mikrofüj tüpüne alınırken en son RNA eklenmiştir. cDNA'ya sentezlenmesi amacıyla mikrofüj tüpleri termal döngüleyici cihazına alınmış, nanodrop cihazı ile konsantrasyonlarının ölçülmesinin ardından -20°C'de saklanmıştır. cDNA örnekleri, BioRad SYBR Green Supermix ve E-kaderin, Snail, Twist, MMP2, β-aktin primerleri PZR striplerine hesaplanarak hazırlanmıştır. 95°C'de 10 sn denatürasyon, 55°C'de 30 sn bağlanma ve 72°C'de 30 sn uzama basamakları ile 40 siklus ile gerçek zamanlı PZR gerçekleştirilmiştir.

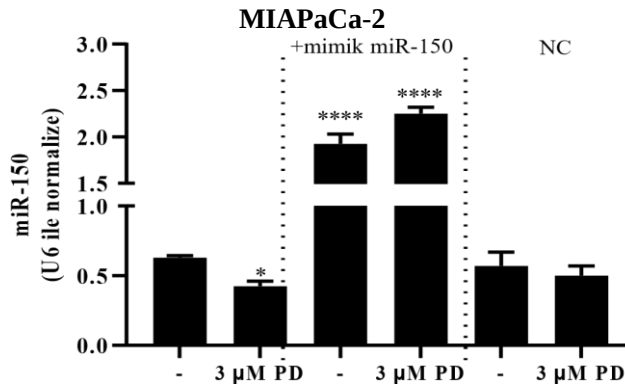
3.2.13. İstatiksel Analiz

Çalışmamda elde edilen sonuçların anlamlı olarak farklılık gösterip göstermediğini belirlemek adına GraphPad Prism (8.0) programı kullanılarak analizi yapıldı ve deney sonuçlarının grafikleri oluşturuldu.

4. SONUÇLAR

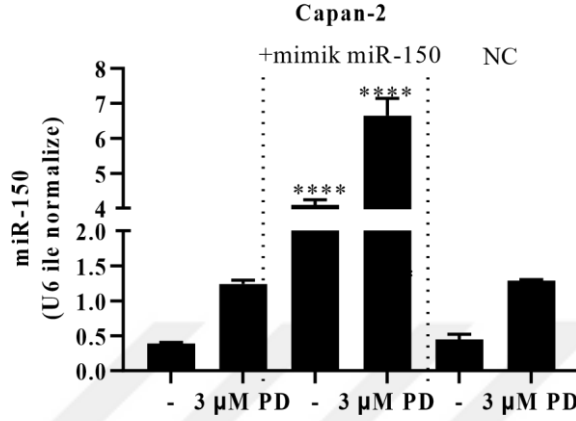
4.1. MIAPaCa-2 ve Capan-2 Pankreas Kanseri Hücrelerine miR-150 Transfeksiyonu ve Palbosiklib (Ibrance) Uygulaması

MIAPaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerine Palbosiklib uygulamaları ve sentetik miR-150 transfeksiyonu sonrası miR-150 ifadesi gerçek zamanlı PZR analizi ile incelenmiştir. MIAPaCa-2 hücrelerinde 3 μ M Palbosiklib uygulamasını takiben gerçekleştirilen miRNA analizinde, ilaç uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla miR-150 seviyesinde azalma görülmüştür. Sentetik miR-150 transfeksiyonu ile MIAPaCa-2 hücrelerinde miR-150 ifadesi 3,2 kat artmıştır. Kontrol grubuna kıyasla miR-150 mimik transfekte edilen MIAPaCa-2 hücrelerine Palbosiklib uygulaması miR-150 ifadesini 3,6 kat arttırmıştır. NC ise negatif kontrol olarak, bilinen miRNA işlevi üzerinde tanımlanabilir bir etkisi olmayan transfeksiyon kalitesini kontrol etmek ve hedef gen ekspresyonu üzerinde deneysel miRNA mimik/anti-miR'nin değerlendirilmesi için kullanıldı. Kontrol grubu ile kıyaslandığında NC transfeksiyonunu ile anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MIAPaCa-2 hücrelerinde miR-150 mimik transfeksiyon sonrası Palbosiklibin belirtilen miRNA ifadesine etkisi. MIAPaCa-2 hücreleri sentetik miR-150 ve negatif kontrol (NC) ile 48 saat boyunca transfekte edildi. miRNA izolasyonu sonrası miRNA ifadeleri gerçek zamanlı PZR kullanılarak belirlendi. Normalizasyon internal endojen kontrol RNU6 ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar iki farklı deneyin 2 tekrarlı verilerinin ortalama/St. Sapma değerleridir (*p<0,05, **p<0,0001).**

Capan-2 hücrelerinde miR-150 ifadesi Palbosiklib uygulaması ile 3 kat artış göstermiştir. miR-150 mimik transfeksiyonu sonrası miR-150 ifadesi 4,5 katına çıkmıştır. Bu hücelere Palbosiklib uygulandığında miR-150 ifadesinde 6,5 kat gibi önemli bir artış gözlenmiştir. NC transfeksiyonu sonrası Palbosiklib varlığında ve yokluğunda kontrol grubu gibi sonuç vermiştir (Şekil 4.2).



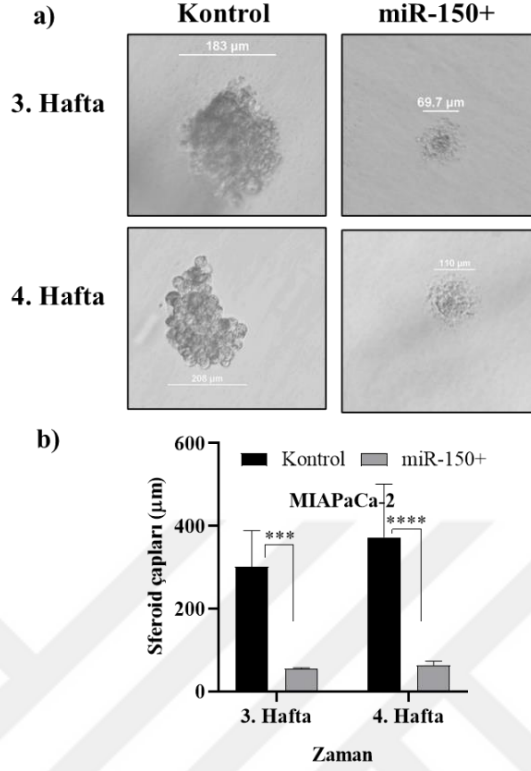
Şekil 4.2. Capan-2 hücrelerinde miR-150 mimik transfeksiyon sonrası Palbosiklibin belirtilen miRNA ifadesine etkisi. Capan-2 hücreleri sentetik miR-150 ve negatif kontrol (NC) ile 48 saat boyunca transfekte edildi. miRNA izolasyonu sonrası miRNA ifadeleri gerçek zamanlı PZR kullanılarak belirlendi. Normalizasyon internal endojen kontrol RNU6 ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar iki farklı deneyin 2 tekrarlı verilerinin ortalama/St. Sapma değerleridir (*p<0,05, **p<0,0001).**

4.2. Pankreas Kanseri Hücrelerine miR-150 Mimik Transfeksiyonunun Hücrelerin Üç Boyutlu (3B) Hücre Formlarına Etkisinin Yumuşak Agar Koloni Oluşturma Deneyi ile İncelenmesi

Çalışmamızda miR-150 ifadesi arttırılan MIAPaCa-2 hücrelerinin hücresel yüzeyden bağımsız ortamda oluşturdukları üç boyutlu formları yumuşak agar yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Hücrelerin oluşturdukları 3B formların çapları 3. ve 4. haftalarda ışık mikroskobu altında ölçülmüştür. Zamana bağlı olarak sferoid çaplarında artış gözlenmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında ise miR-150 ifadesi arttırılan hücrelerde, koloni formlarının çaplarındaki azalmaya bağlı olarak 3B hücre formu oluşumunun önemli ölçüde baskılandığı gözlenmiştir (Şekil 4.3.a.).

Zamana bağlı olarak MIAPaCa-2+miR-150 hücrelerin kontrol grubu ile karşılaştırılmasında miR-150 ifadesindeki artışın koloni oluşumunu anlamlı olarak engellediği grafik analizinde gösterilmiştir (4.3.b.).

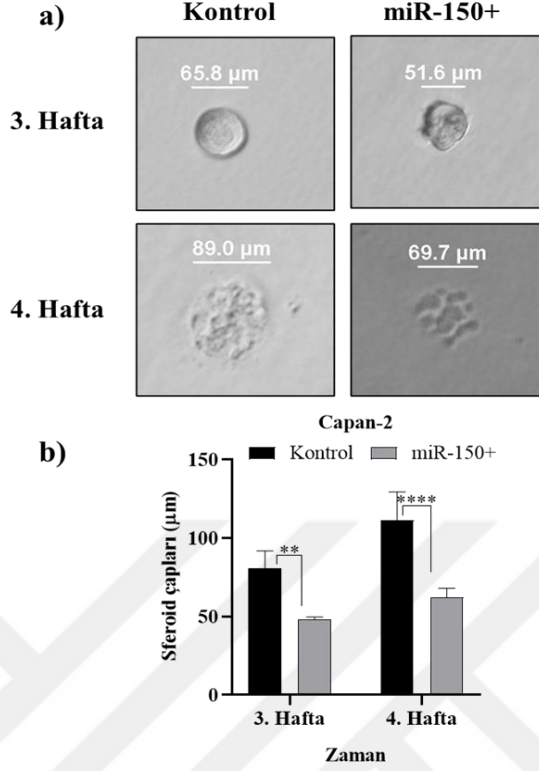
MIAPaCa-2



Şekil 4.3. Yumuşak agar deneyi ile miR-150 mimik transfeksiyonunun koloni oluşumundaki etkisinin gösterilmesi. a. MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine miR-150 mimik transfeksiyonunun sferoid yapılarına etkisi üçüncü ve dördüncü haftalarda ışık mikroskobu altında gözlemlendi. b. İki yönlü ANOVA testi kullanılarak üçüncü ve dördüncü haftalardaki sferoid çaplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri bulundu ve sferoid çaplarının zamana bağlı analizi sütun grafiği ile belirtildi (*p=0,0007, ****p<0,0001).**

Yumuşak agar deneyinde Capan-2 hücrelerinin hücreSEL yüzeyden bağımsız ortamda oluşturdukları üç boyutlu formlarının 3. ve 4. haftalardaki görüntüleri ve koloni formlarının çap ölçümleri ışık mikroskobu altında incelenmiştir (Şekil 4.4.a.). Zamana bağlı olarak sferoid çaplarında artış gözlenmiştir. miR-150 ifadesi arttırılan Capan-2 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla koloni formlarının çaplarındaki azalmaya bağlı olarak 3B hücre formu oluşumunu önemli derecede baskıladığı gözlenmiştir. Zamana bağlı olarak kontrol grubu ile Capan-2+miR-150 hücrelerinin karşılaştırılmasında miR-150 ifadesindeki artışın koloni oluşumunu anlamlı ölçüde engellediği grafik analizinde gösterilmiştir (Şekil 4.4.b.).

CAPAN-2

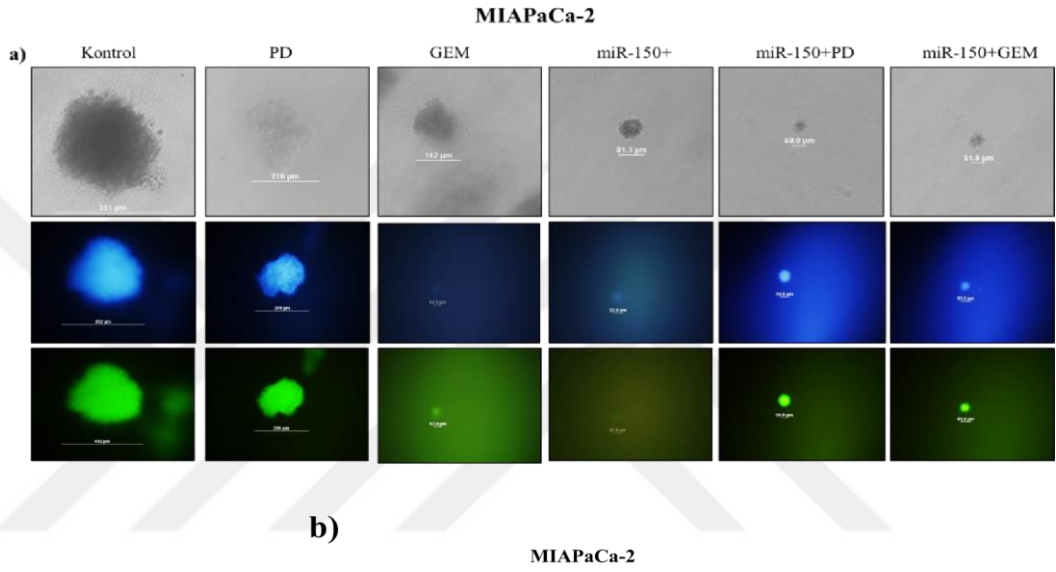


Şekil 4.4. Yumuşak agar deneyi ile miR-150 mimik transfeksiyonunun koloni oluşumundaki etkisinin gösterilmesi. a. Capan-2 pankreas kanseri hücrelerine miR-150 mimik transfeksiyonunun sferoid yapılarına etkisi üçüncü ve dördüncü haftalarda ışık mikroskobu altında gözlemlendi. b. İki yönlü ANOVA testi kullanılarak üçüncü ve dördüncü haftalardaki sferoid çaplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri bulundu ve sferoid çaplarının zamana bağlı analizi sütun grafiği ile belirtildi (p=0,0014, ****p<0,0001).**

4.3. Palbosiklib (Ibrance) ve Gempitabin Uygulamalarının miR-150 Transfekte Edilen Hücrelerde Üç Boyutlu Hücre Formlarına Etkisinin İncelenmesi

Çalışmamızda miR-150 ifadesi arttırılan pankreas kanseri hücrelerinde, Palbosiklib ve Gempitabin uygulamalarının 3B hücre formlarına etkisi yumuşak agar deneyi ile incelenmiştir (Şekil 4.5.a.). Gempitabin pankreas kanseri tedavilerinde faz çalışmalarında kullanılan bir kemoterapötik ajan olduğundan projemizde bir pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda Gempitabin uygulanan hücrelerde yüzeyden bağımsız 3B hücre kültür formlarında, koloni çaplarının kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde baskılandığı gözlenmiştir.

Bununla birlikte projemizin başlıca araştırma konusu bir CDK4/6 inhibitörü Palbosiklibin etkisi incelendiğinde, koloni formlarının çaplarının anlamlı ölçüde baskılandığı gözlenmiştir. miR-150 ifadesi arttırılan hücrelerde, koloni form oluşumu önemli ölçüde baskılanmış ve bu hücre grubuna Palbosiklib uygulandığında hem koloni sayılarının hem de koloni çaplarının azaldığı gözlenmiştir. Koloni sayısı ve çapları, MIAPaCa-2+ 3PD grubu ile MIAPaCa-2+miR-150 + 3PD grubu arasında kıyaslandığında miR-150 ifadesindeki artışın koloni oluşumuna inhibe edici etkisinin anlamlı olduğu grafik analizinde gösterilmiştir (Şekil 4.5.b).

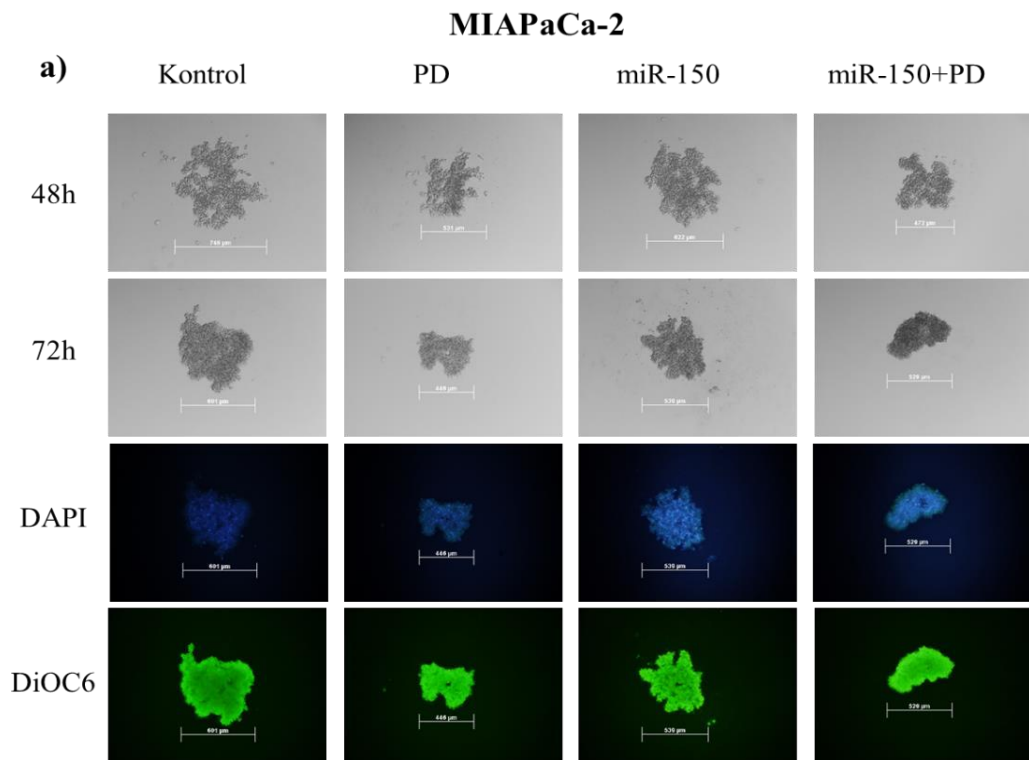


Şekil 4.5. Yumuşak agar koloni formasyon deneyi ile Palbosiklib, Gemitabin ve/veya miR-150 transfeksiyonunun koloni oluşturma üzerindeki etkisinin gösterilmesi. a. MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde Palbosiklib, Gemitabin uygulamaları ve miR-150 transfeksiyonu ile gerçekleştirilen kombine uygulamalarının 3B formasyon oluşumundaki etkisi 3 hafta sonra gözlemlendi ve sferoid çapları ölçüldü. DAPI ve DiOC6 boyalarının uygulanmasının ardından deney gruplarının oluşturduğu sferoidler ışık ve floresan mikroskobu altında uygun filtreler aracılığı ile görüntülendi. b. 3. haftada deney gruplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri bulundu ve sütun grafiği ile belirtildi (**p<0,0001).**

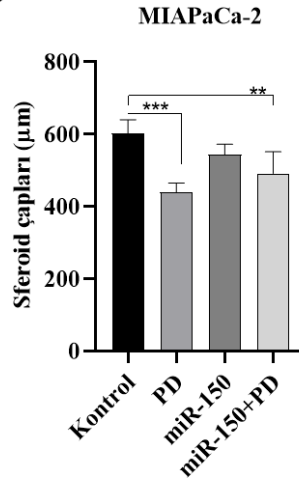
4.4. Asılı Damla Deneyi ile Pankreas Kanseri Hücrelerinde miR-150 Mimik Transfeksiyonu ile Palbosiklib (Ibrance) Uygulamalarının Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşturulmasındaki Etkilerinin Gösterilmesi

Projemizde üç boyutlu hücre kültürü oluşturmak üzere kullanılan bir diğer yöntem ise asılı damla yöntemidir. Hücrelerin yumuşak agar koloni oluşturma deneyinde agar içerisinde oluşturdukları 3B hücre formasyonlarından farklı olarak, hücre süspansiyonu ile oluşturulan bir damla içerisindeki ortamda hücreler arası etkileşimle sferoid formlarının oluşturulmasını sağlayan asılı damla modelidir [121].

Çalışmada MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinin asılı damla modeli ile oluşturdukları 3B hücre formlarında kontrol grubuna kıyasla miR-150 ifadesi arttırılan hücre grubu ile tek başına Palbosiklib uygulaması gerçekleştirilen hücre grubundaki sferoid çaplarında anlamlı ölçüde azalma görülmektedir. MIAPaCa-2+miR-150+3PD grubunda da kontrol grubuna kıyasla sferoid çaplarında anlamlı ölçüde azalma görülmektedir (Şekil 4.6.a). MIAPaCa-2 hücrelerinde artan miR-150 ifadesi ve Palbosiklib uygulamalarının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde sferoid çaplarının küçülmesine neden olduğu grafik analizi ile gösterilmektedir (Şekil 4.6.b).

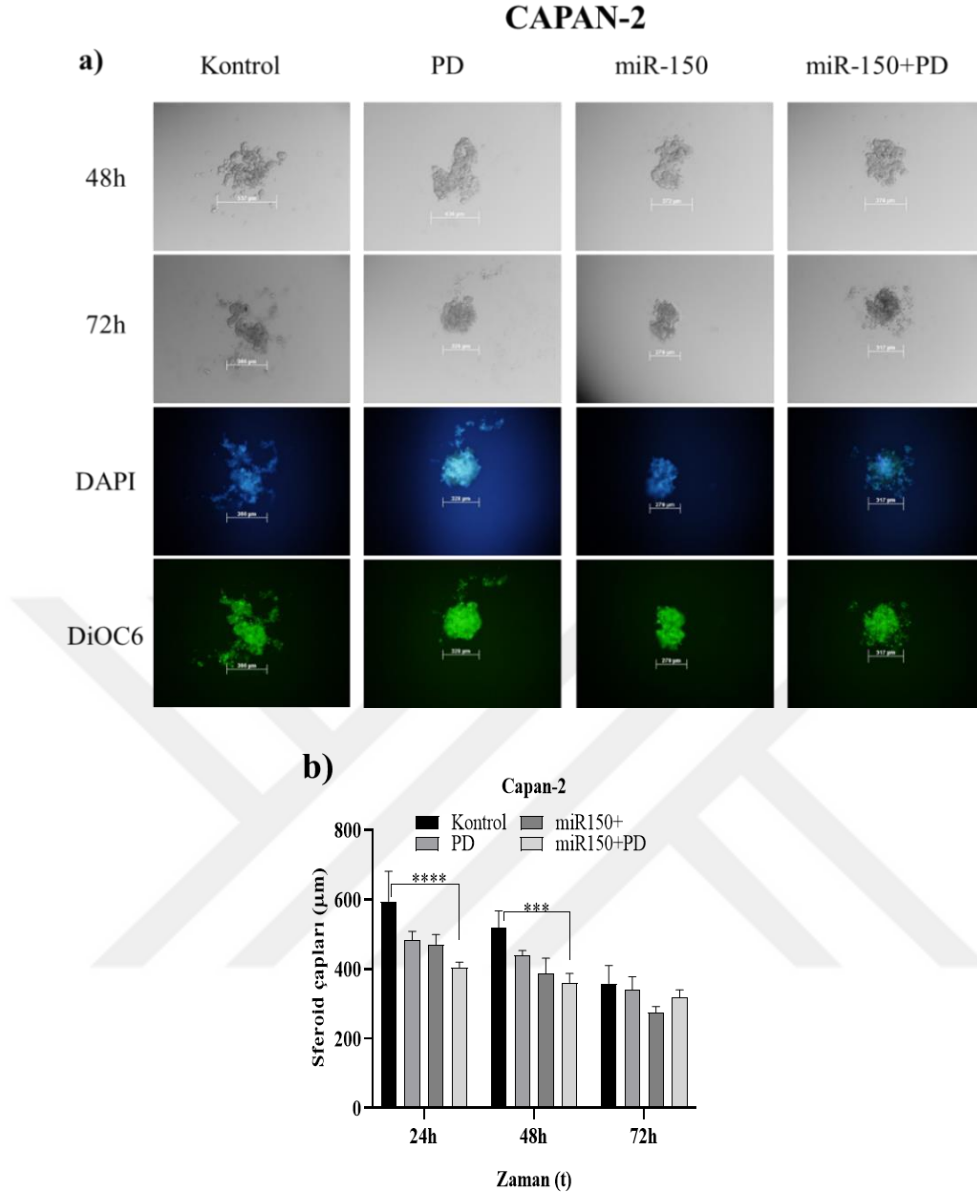


b)



Şekil 4.6. Asılı damla yöntemi ile MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine Palbosiklib uygulamasının ve/veya miR-150 transfeksiyonunun 3B hücre formlarının oluşturulmasındaki etkisinin gösterilmesi. a. MIAPaCa-2 hücrelerinde deney gruplarının oluşturduğu sferoid formların çapları 48 ve 72. saatlerde ölçüldü. 72 saat ışık çekiminden önce DAPI ve DiOC6 boyaması gerçekleştirildi ve sferoid formlar floresan mikroskobu altında uygun filtreler kullanılarak görüntülendi. b. 72 saat sonunda deney gruplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri sütun grafiği ile belirtildi (*p=0,0005, **p=0,0096).**

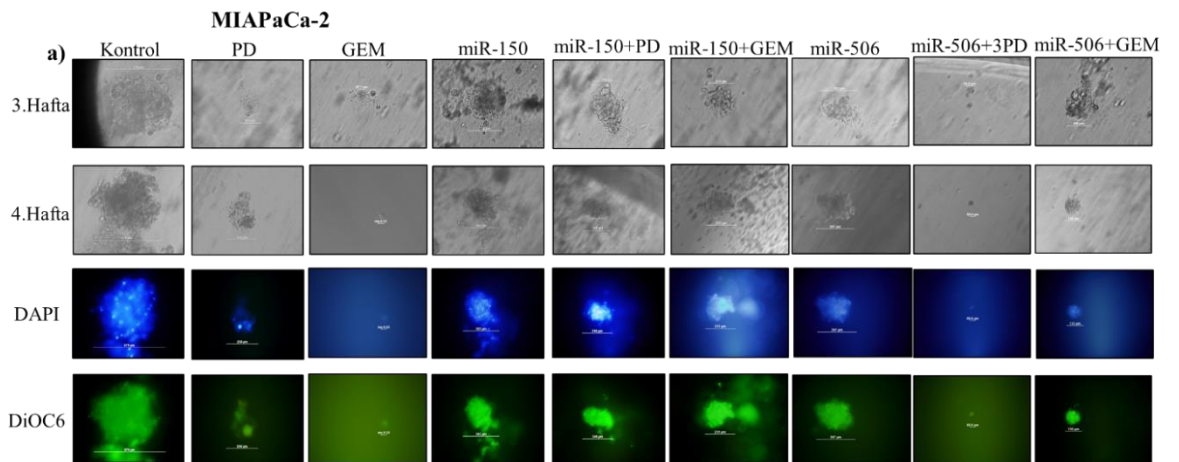
Asılı damla modeli ile Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinin deney gruplarında oluşturduğu 3B hücre formlarının karşılaştırılması sonucunda ilaç ve miRNA uygulamaları yapılan deney gruplarının kontrol gruplarına göre anlamlı ölçüde sferoid çaplarının küçüldüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.7.a). Tek başına Palbosiklib uygulaması gerçekleştirilen deney grubundaki sferoid çaplarının miR-150 transfeksiyonuyla kombinasyonu ile daha anlamlı ölçüde azaldığı grafik analizinde gösterilmiştir (Şekil 4.7.b).



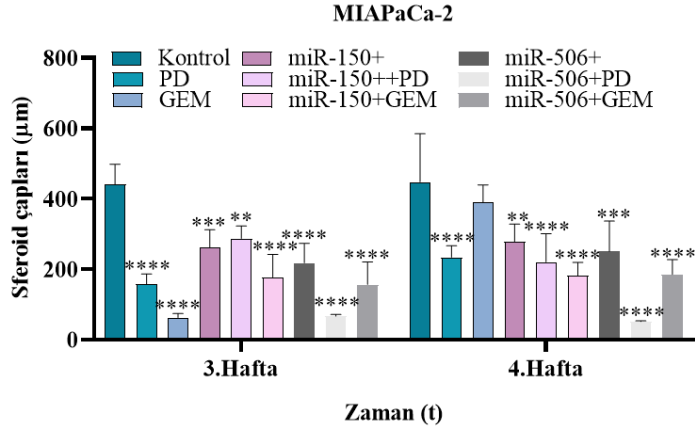
Şekil 4.7. Asılı damla yöntemi ile Capan-2 pankreas kanseri hücrelerine Palbosiklib uygulamasının ve/veya miR-150 transfeksiyonunun 3B hücre formlarının oluşturulmasındaki etkisinin gösterilmesi. a. Capan-2 hücrelerinde deney gruplarının oluşturduğu sferoid formların çapları ışık mikroskobu altında ölçüldü. 72 saat sonunda DAPI ve DiOC6 boyaması gerçekleştirildi ve sferoid formlar floresan mikroskobu altında uygun filtreler kullanılarak görüntüldü. b. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda deney gruplarının çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri sütun grafiği ile belirlendi (**p<0,0001, ***p=0,0002).**

4.5. Matrigel Deneyi ile Pankreas Kanseri Hücrelerin miR-150 Mimik Transfeksiyonu veya miR-506 Transfeksiyonu ile Palbosiklib (Ibrance) ve Gemsitabin Uygulamalarının Ardından Üç Boyutlu Hücre Formlarının Oluşturulmasındaki Etkilerinin Gösterilmesi

Normal dokudaki ekstraselüler matriks ortamında bulunan faktörleri içeren Matrigelin kullanımı ile pankreas kanseri hücrelerinin in vivodaki uygun ECM koşullarında 3B hücre formlarını oluşturması amaçlanmıştır. Çalışmada MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinin Matrigel karışımı kullanılarak 3B hücre formları oluşturulmaları incelenmiştir. Deney gruplarında oluşan 3B hücre formlarının 3. ve 4. haftalardaki çapları ışık mikroskobu altında ölçülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında CDK inhibitörü Palbosiklibin sferoid çaplarını önemli ölçüde baskıladığı görülmektedir. Gemsitabin uygulamasının ise sferoid form çaplarında zamana bağlı olarak önemli derecede artış gösterdiği fakat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sferoid çaplarının azaldığı gözlemlenmiştir. miR-150+ hücrelere uygulanan PD ve GEM ilaç uygulamaları kontrol grubuna göre kıyaslandığında sferoid çaplarının oldukça anlamlı olarak azaldığı görülmektedir. miR-506+ hücrelerdeki PD ve GEM uygulamalarında da kontrol grubuna göre sferoid çaplarında oldukça önemli derecede küçülmenin görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 4.8.a). Artan miR-150 ifadesi ile PD kombinasyonunun anlamlı olarak 3B sferoid oluşumunu kontrol grubuna kıyasla önemli derecede engellediği grafik analizinde gösterilmiştir. (Şekil 4.8.b).



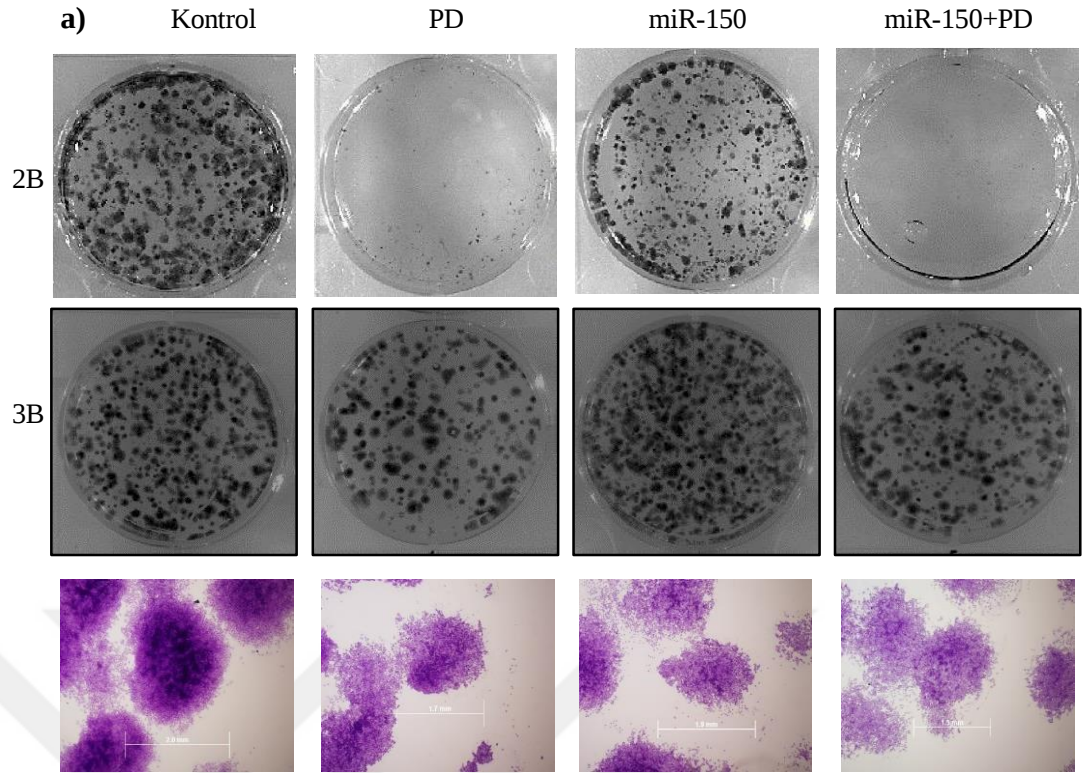
b)



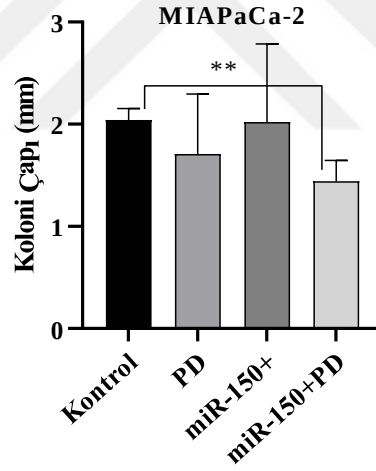
Şekil 4.8. Matrigel deneyi ile MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde 3B hücre formlarının oluşturulması. a. MIAPaCa-2 hücrelerinde miR-150+ ve miR-506+ hücrelerine PD ve GEM uygulamaları ile oluşturulan 3B hücre formlarının 3. ve 4. haftalarda sferoid çaplarındaki etkisi gözlemlendi ve sferoid çapları ölçüldü. 4. haftada DAPI ve DiOC6 boyamaları uygulandı ve sferoidlerin ışık ve floresan mikroskobu altındaki görüntüleri çekildi. b. Mimik miRNA transfeksiyonu ve ilaç uygulamalarına göre oluşturulan deney grupları arasında yapılan çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel anlamlılık değerleri bulundu.

4.6. miR-150 Mimik Transfeksiyonu ve Palbosiklib (Ibrance) Uygulamasının 2 Boyutlu ve 3 Boyutlu Pankreas Kanseri Hücrelerinde Koloni Oluşturma Etkisinin Gösterilmesi

Asılı damla modeli ile MIAPaCa-2 hücrelerinden oluşturulan sferoid formlardan 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekim yapılmış ve deney gruplarının üç boyutlu hücre formlarındaki koloni oluşturabilme potansiyelleri incelenmiştir. Ek olarak 2B hücrelerine miR-150 transfeksiyonunu takiben PD'nin koloni oluşturma potansiyeline etkisi incelenmiştir. Kristal viyole ile boyamanın ardından ışık mikroskobu altında kolonilerin çapları ölçülmüş ve MIAPaCa-2+miR-150+3PD grubunun koloni formasyon potansiyelinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı görülmektedir (Şekil 4.9.a).



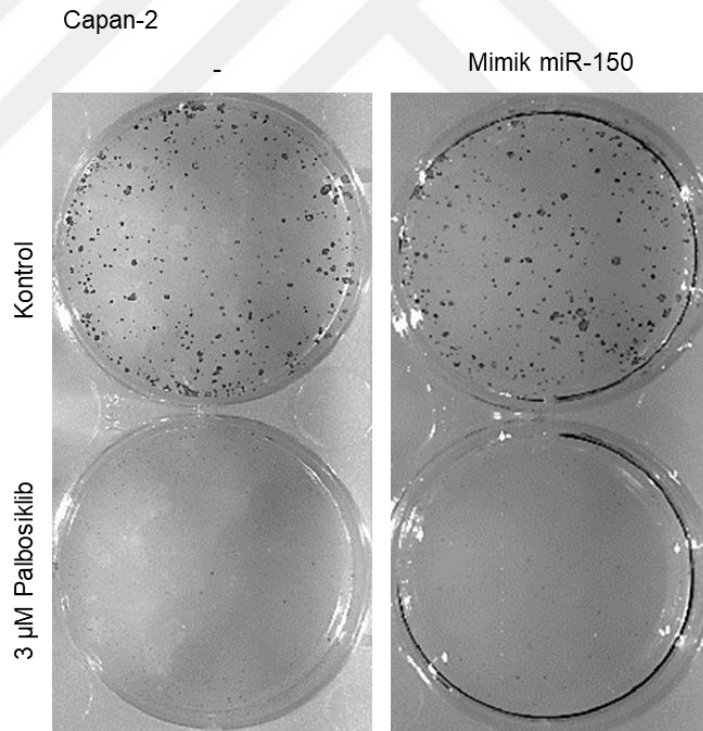
b)



Şekil 4.9. 2B ve 3B MIAPaCa-2 hücrelerinde koloni oluşturma potansiyellerinin incelenmesi. a. miR-150+ ve/veya PD uygulanan 2B ve 3B MIAPaCa-2 hücrelerinin koloni deneyi için ekimlerinin yapılması ile kristal viyole boyamasının ardından koloni oluşturma potansiyelleri tespit edildi. 3B MIAPaCa-2 hücrelerinden elde edilen kolonilerin çapları ışık mikroskobu altında görüntülendi ve çapları ölçüldü. b. 3B MIAPaCa-2 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyellerinde deney grupları arasında çoklu karşılaştırma analizi ile anlamlı fark bulundu.

2B hücreleri ile kıyaslandığında aynı sayıda ekim yapılan hücrelerin 3B hücrelerinden elde edilen sonuçlara göre anlamlı ölçüde daha koloni oluşturduğu gözlenmiştir. Üç boyutlu MIAPaCa-2 hücre formlarından yapılan ekim sonucunda deney grupları arasında miR-150 ifadesindeki artış ile Palbosiklib kombine uygulamasının koloni çaplarının anlamlı ölçüde küçülmesine neden olduğu grafik analizi ile gösterilmektedir (Şekil 4.9.b).

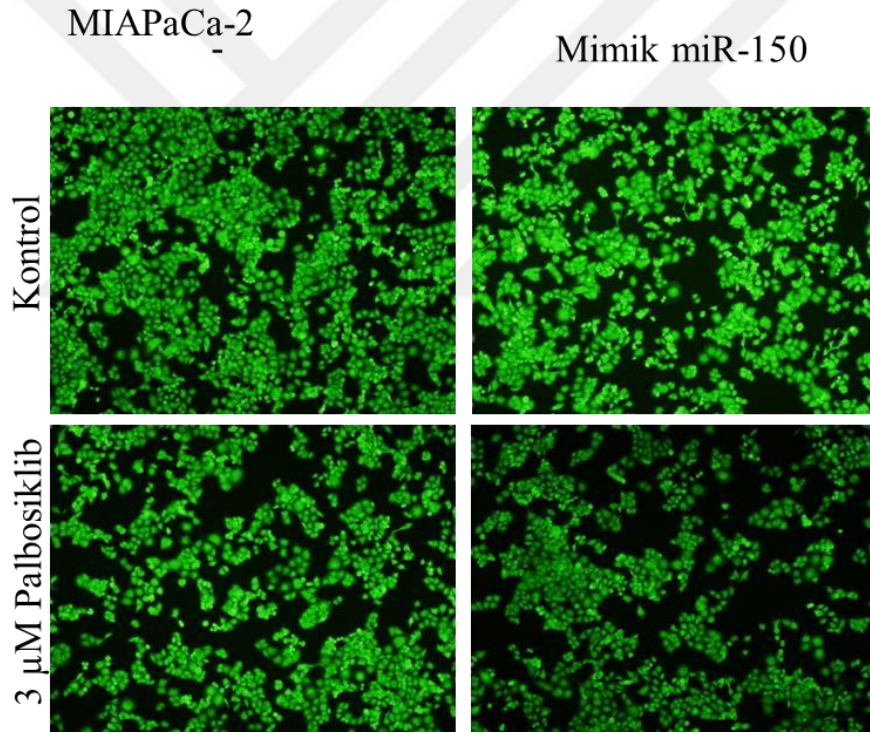
Capan-2 hücrelerine uygulanan miR-150 transfeksiyonunun ardından PD ile kombinasyonunun koloni oluşturma potansiyeli üzerindeki etkisi incelenmiştir. Fikse edilen hücreler kristal viyole ile boyanmış ve koloni oluşturma potansiyelleri incelenmiştir. İki boyutlu Capan-2 hücrelerinde Capan-2+miR150+3PD grubunun kontrol grubuna göre koloni formasyon potansiyelinin önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. 2B Capan-2 hücrelerinde miR-150 mimik transfeksiyonu ve/veya PD uygulamasının koloni oluşturma potansiyellerinin kristal viyole ile boyanmasının ardından gösterimi.

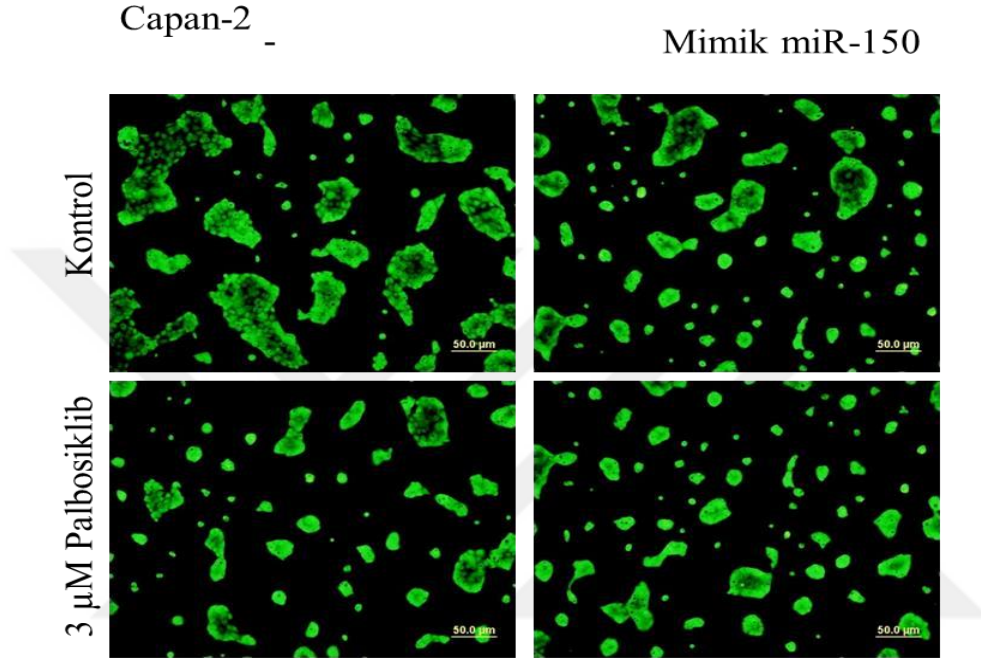
4.7. Pankreas Kanseri Hücrelerinin miR-150 ve Palbosiklib (Ibrance) Uygulamaları ile Zamana Bağlı Sağkalım Analizi

2B MIAPaCa-2 hücrelerinde transfeksiyon protokolünü takiben hücreler 24 saat Palbosiklib ile muamele edildi. Ardından canlı hücrelerin mitokondriyel membranlarına nüfuz eden DiOC6 floresan boyası ile canlı hücreler floresan mikroskobu ile incelenmiştir (Şekil 4.11). miR-150 ifadesi arttırılan hücrelerin mitokondriyel membran potansiyelinde (MMP) kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiş, hücre canlılığında bir fark gözlenmemiştir. Ancak miR-150+ hücrelere Palbosiklib uygulandığında hücre canlılığında, normal MIAPaCa-2 hücrelerine kıyasla anlamlı bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.11. 2B MIAPaCa-2 hücrelerinde miR-150 ifadesi ile ilişkili olarak Palbosiklibin hücre canlılığına etkisinin incelenmesi. 6 kuyucuklu petri kaplarına ekilen hücrelere miR-150 ifadesinin arttırılmasının ardından, miR-150+ ve normal MIAPaCa-2 hücrelerinde 3 µM Palbosiklib varlığında (24 sa) ve yokluğunda DiOC6 boyaması yapılarak hücre canlılığı analizi gerçekleştirilmiştir. Boyanmanın ardından hücreler floresan mikroskop altında gözlenmiştir.

2B Capan-2 hücrelerinde Palbosiklib hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya sebep olmuştur. Capan-2 hücreleri morfolojileri gereği küme halinde çoğalan hücrelerdir ve Palbosiklib uygulaması ile miR-150 mimik transfeksiyonu sonrası küçülen hücre kümelerinin oranı kontrol grubuna göre artmıştır. miR-150+ Capan-2 hücrelerine Palbosiklib uygulandığında tek başına Palbosiklib uygulaması yapılan Capan-2 hücreleri gibi bir cevap oluşturmuştur (Şekil 4.12).

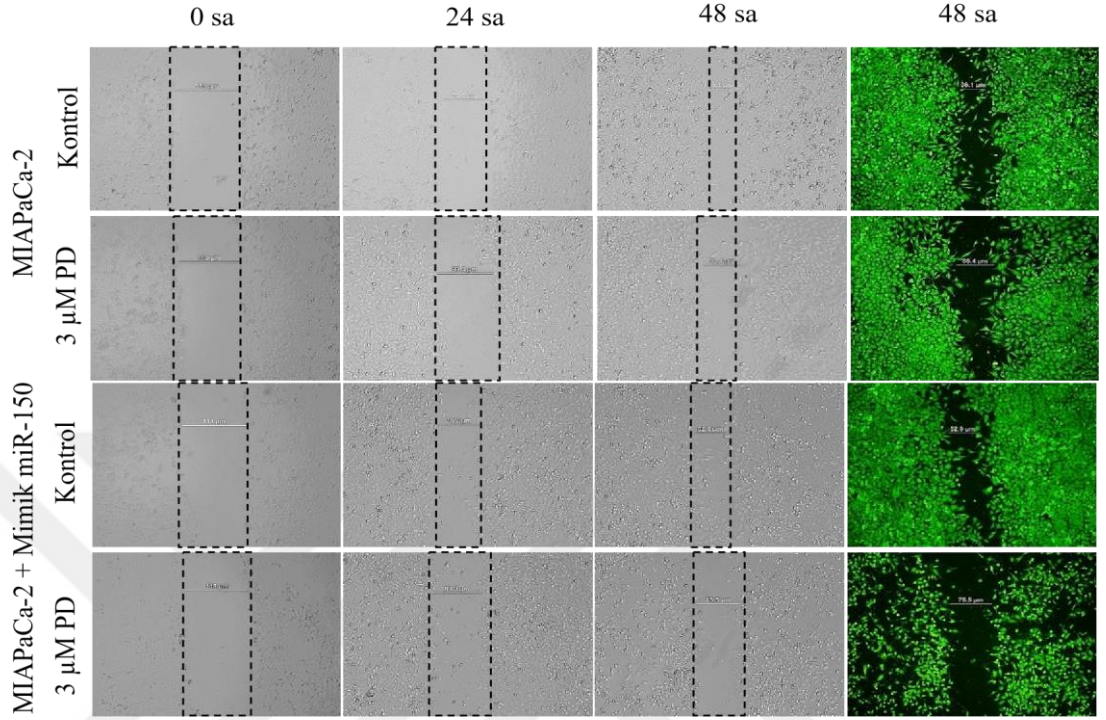


Şekil 4.12. 2B Capan-2 hücrelerinde miR-150 ifadesi ile ilişkili olarak Palbosiklibin hücre canlılığına etkisinin incelenmesi. 6 kuyucuklu petri kaplarına ekilen hücrelere miR-150 ifadesinin arttırılmasının ardından, miR-150+ ve normal Capan-2 hücrelerinde 3 µM Palbosiklib varlığında (24 sa) ve yokluğunda DiOC6 boyaması yapılarak hücre canlılığı analizi gerçekleştirilmiştir. Boyanmanın ardından hücreler floresan mikroskop altında gözlenmiştir.

4.8. Pankreas Kanseri Hücrelerinde miR-150 Mimik Transfeksiyonu ile Palbosiklib (Ibrance) Uygulamalarının Migrasyona Etkisinin İncelenmesi

2B MIAPaCa-2 hücrelerinin miR-150 ifadesi ile ilişkili olarak Palbosiklib varlığında migrasyon yetenekleri yara iyileşme testi ile incelenmiştir (Şekil 4.13). Elde edilen sonuçlar, beş farklı bölgeden yapılan ölçümlerin ortalaması alınarak yapılmıştır.

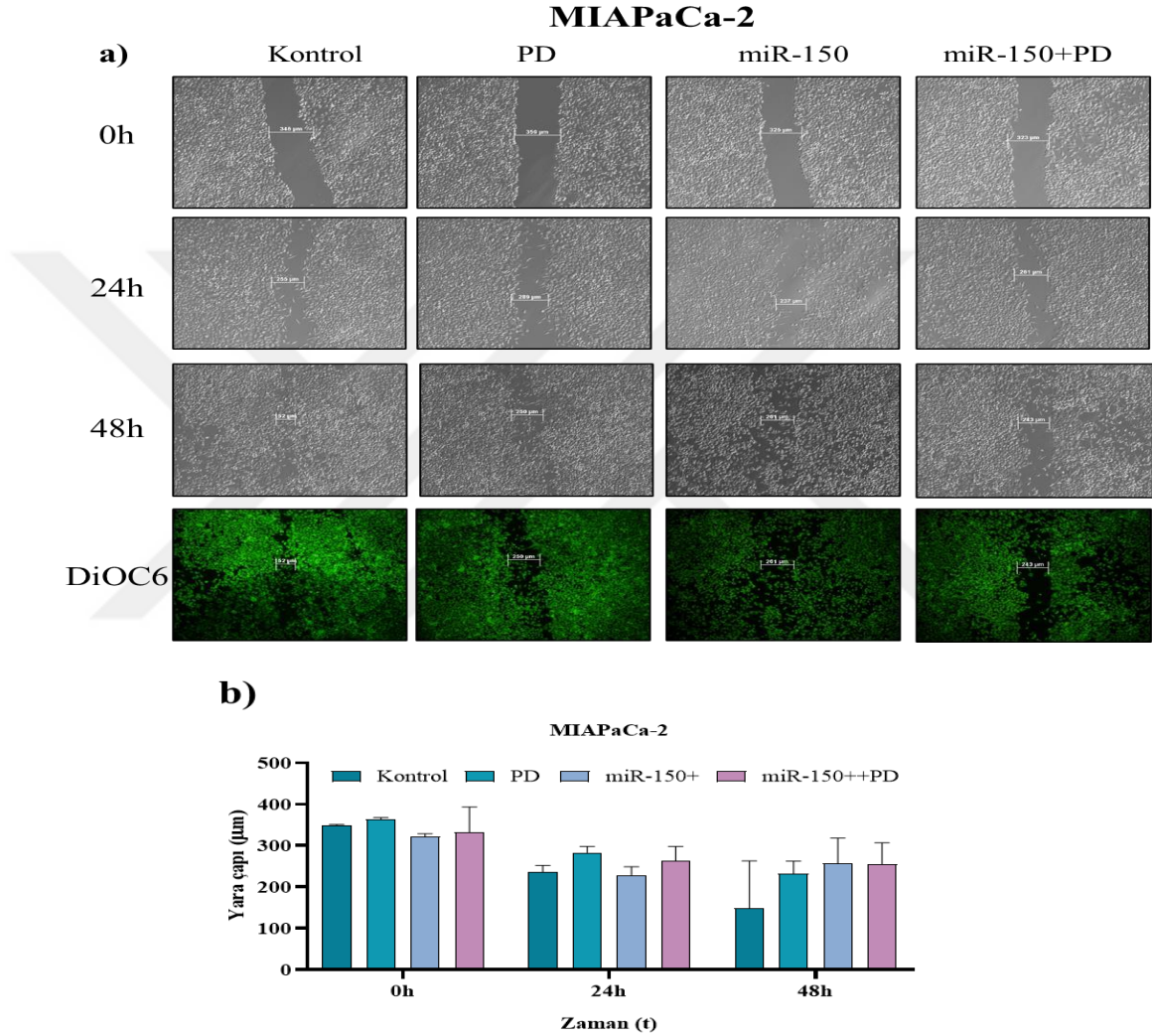
Palbosiklibin yara iyileşmesini baskılayıcı etkisi, hücre içi miR-150 seviyesi artırıldığında anlamlı bir şekilde artmış, aynı zamanda hücre canlılığında da azalma gözlenmiştir (*p<0,05).



Şekil 4.13. Palbosiklib ve/veya miR-150 mimik transfeksiyonu yapılmasının ardından 2B MIAPaCa-2 hücre formlarında migrasyon etkilerinin gösterilmesi. 2B MIAPaCa-2 hücre formlarının 6 kuyucuklu hücre tabakalarına ekimleri ile gerçekleştirilen yara iyileşme deneyinde 0, 24 ve 48. saatlerde ışık mikroskobu altında yara çaplarının ölçümü yapıldı. 48. saatin sonunda DiOC6 boyaması yapılarak uygun filtre yardımıyla hücreler floresan mikroskobu altında görüntülendi.

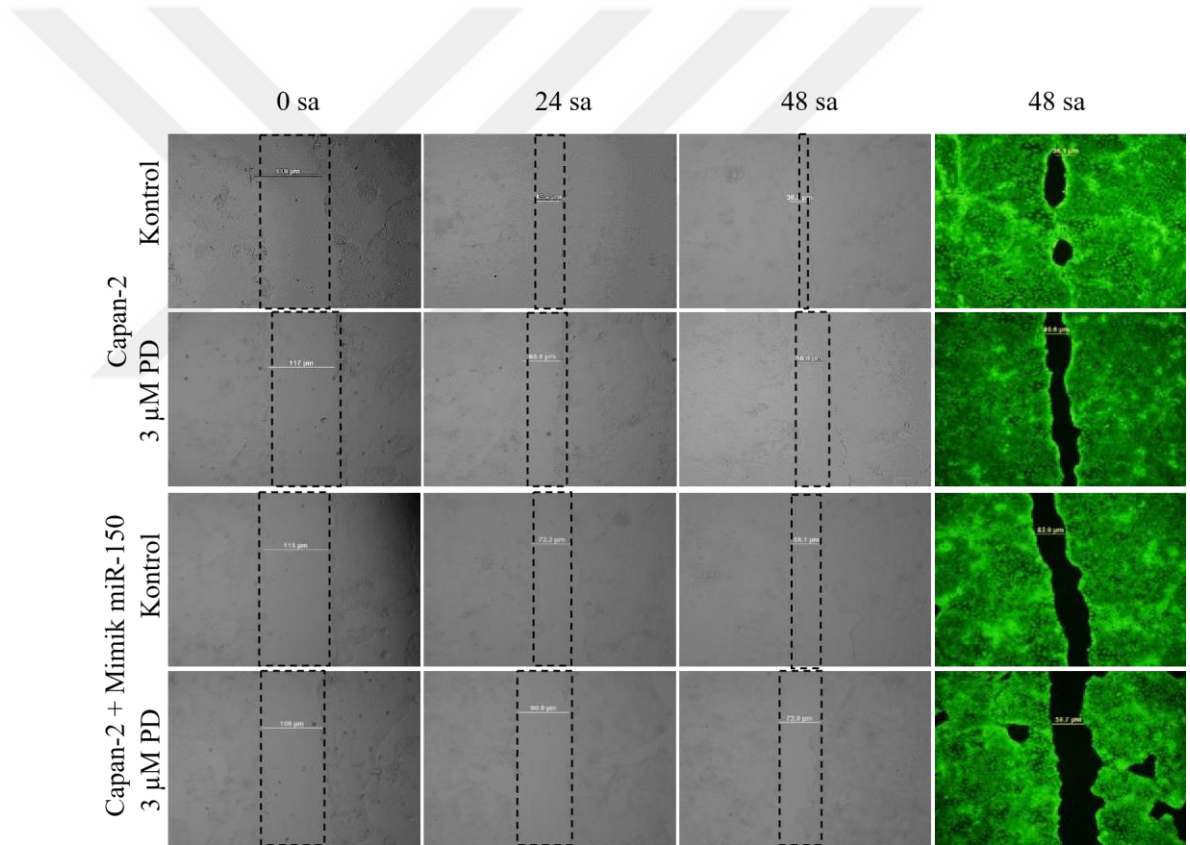
miR-150 mimik transfeksiyonu ve/veya Palbosiklib uygulaması gerçekleştirilerek asılı damla modeli ile 3B MIAPaCa-2 hücre formlarının elde edilmesinin ardından yara kapanma deneyinin gerçekleştirilebilmesi için 6 kuyucuklu hücre tabakalarına sferoid formlardan ekim yapılmıştır. Bu deney ile 3B hücre formlarında deney gruplarının migrasyonda ne kadar etkili olduğunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Zamana bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla diğer deney gruplarının yara iyileşmesinde etkili oldukları belirtilmiştir.

Yara iyileşmesinin 72. saat incelemesi sonucunda MIAPaCa2+miR-150+3PD grubunun MIAPaCa-2+3PD grubu karşılaştırıldığında daha anlamlı ölçüde etkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.14.a). Üç boyutlu MIAPaCa-2 hücre ekimi sonucunda miR-150 ifadesinin artırılması ile Palbosiklib uygulamasının kombine edilmesi durumunda yara iyileşmesini anlamlı olarak engellediği grafik analizi ile gösterilmektedir (Şekil 4.14.b).



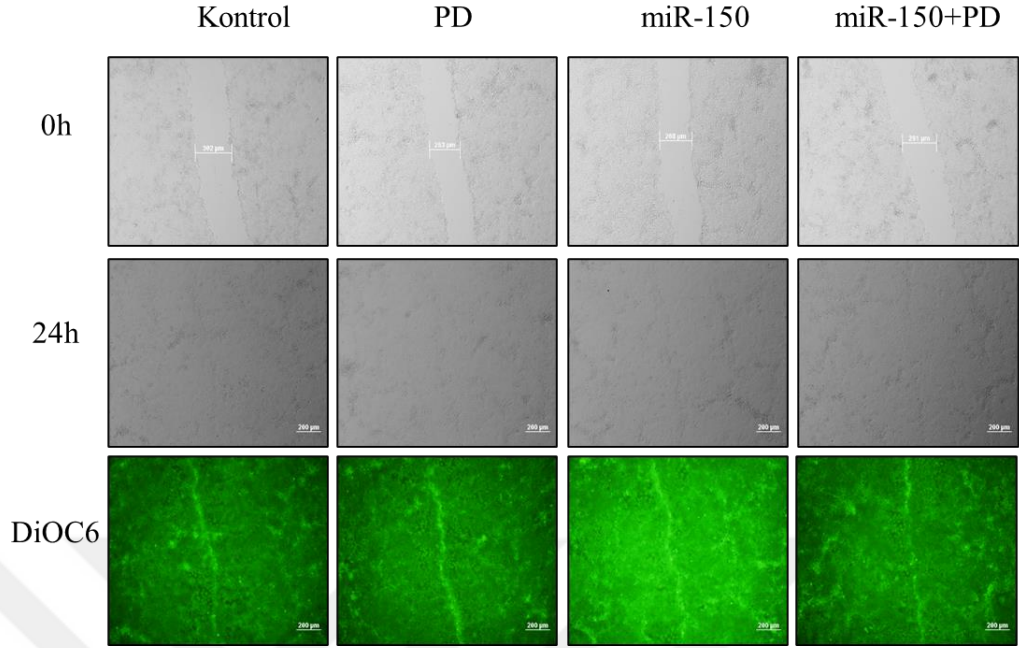
Şekil 4.14. Palbosiklib ve/veya miR-150 mimik transfeksiyonu yapılmasının ardından oluşturulan 3B MIAPaCa-2 hücre formlarından yapılan ekimler ile deney gruplarının migrasyon üzerindeki etkilerinin gösterilmesi. a. 3B MIAPaCa-2 hücre formlarının 6 kuyucuklu hücre tabakalarına ekimleri ile gerçekleştirilen yara iyileşme deneyinde 0, 24 ve 48. saatlerde ışık mikroskobu altında yara çaplarının ölçümü yapıldı. 48. saatin sonunda DiOC6 boyaması yapılarak uygun filtre yardımıyla hücreler floresan mikroskobu altında görüntülendi. b. Zamana bağlı olarak yara çaplarının deney grupları arasındaki karşılaştırması sütun grafiği ile belirtildi.

Capan-2 2B hücre formlarının %80 yoğunluğa ulaşmalarının ardından oluşturulan yaraların, kontrol grubunda 48 saatte neredeyse kapandığı gözlenmiştir. Hücrelerin migrasyon yeteneği dikkat çekmiştir. Palbosiklib uygulaması migrasyon potansiyelini baskılamıştır. miR-150 ifadesinin arttırılmasının ardından, Capan-2 hücrelerinin migrasyon potansiyelinde azalma gözlenmiş ve bu hücelere Palbosiklib uygulandığında normal Capan-2 hücrelerine kıyasla migrasyon kapasitelerinde anlamlı bir inhibisyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.15). Capan-2 hücrelerine miR-150 mimik transfeksiyonu ve/veya Palbosiklib uygulamasının gerçekleştirildikten sonra asılı damla modeli ile oluşturulan 3B hücre formlarından 6 kuyucuklu hücre tabakalarına sferoid formlardan ekim yapılmıştır. 24 saatin sonunda ışık mikroskobu altında yaraların tüm deney gruplarında kapandığı görüntülenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. Palbosiklib ve/veya miR-150 mimik transfeksiyonu yapılmasının ardından 2B Capan-2 hücre formlarında migrasyon etkilerinin gösterilmesi. 2B Capan-2 hücre formlarının 6 kuyucuklu hücre tabakalarına ekimleri ile gerçekleştirilen yara iyileşme deneyinde 0, 24 ve 48. saatlerde ışık mikroskobu altında yara çaplarının ölçümü yapıldı. 48. saatin sonunda DiOC6 boyaması yapılarak uygun filtre yardımıyla hücreler floresan mikroskobu altında görüntüldü.

Capan-2



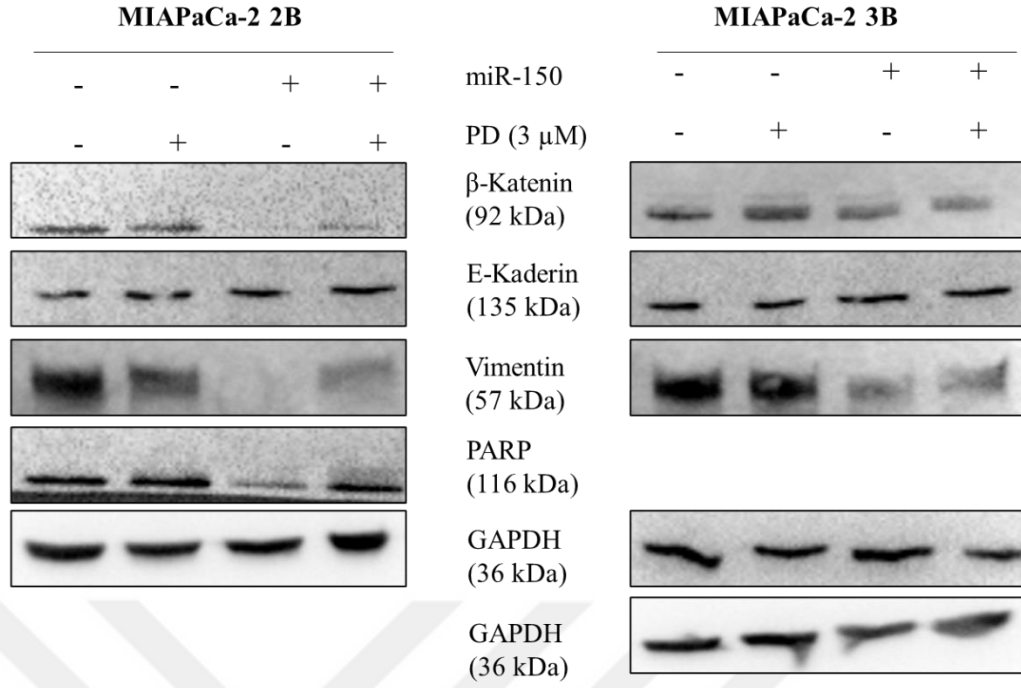
Şekil 4.16. Palbosiklib ve/veya miR-150 mimik transfeksiyonunun ardından asılı damla yöntemi ile oluşturulan 3B Capan-2 hücre formlarından yapılan ekimle hücrelerin migrasyon etkisinin gösterilmesi. Yaranın açılmasından 24 saat sonra kapandığı gözlemlenen Capan-2 hücrelerine DiOC6 boyaması gerçekleştirildi ve ışık ile floresan mikroskobu altında yaralar görüntülendi.

4.9. Pankreas Kanseri Hücrelerinde miR-150 Mimik Transfeksiyon ile Palbosiklib (Ibrance) Uygulamalarının EMT Mekanizmasında Görev Alan Protein İfadelerine Etkisi

2B ve 3B hücre formlarında EMT mekanizması miR-150 transfeksiyonlarını takiben Palbosiklib varlığında ve yokluğunda immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 4.17). Epitel belirteç olan E-kaderin, mezenkimal belirteç olan vimentin ve β -katenin seviyeleri incelenmiştir. MIAPaCa-2 hücrelerinde yapılan immunoblotlama sonuçlarına göre 2B hücre formlarında Palbosiklib β -katenin seviyesinde anlamlı bir fark yaratmazken, miR-150 ifadesi arttırıldığında MIAPaCa-2 hücrelerinin Palbosiklibe duyarlılığının arttığı gözlenmiştir. miR-150+ MIAPaCa-2 hücrelerinde Palbosiklib varlığında ve yokluğunda β -katenin seviyesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Sferoid formlarda yapılan incelemede, β -katenin seviyesi Palbosiklib uygulaması ile artış göstermiştir.

miR-150 ifadesi arttırılan MIAPaCa-2 hücrelerinden elde edilen sferoid formlarda, 2B MIAPaCa-2 miR-150+ hücrelerine kıyasla β -katenin seviyesi daha yüksektir. 3B miR150+ MIAPaCa-2 hücrelerine Palbosiklib uygulandığında β -katenin ifadesinde azalma gözlenmiştir. E-kaderin seviyesi 2B hücrelerinde, Palbosiklib uygulamasına bağlı olarak artış göstermiştir. miR-150'nin yüksek ifadesi, E-kaderin seviyesinde kontrol grubuna kıyasla artışı sağlamıştır.

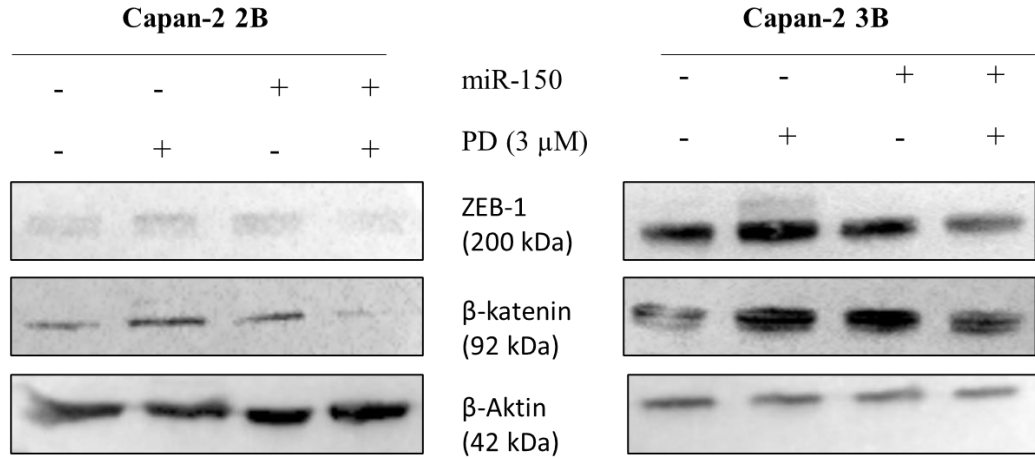
Bu hücrelere Palbosiklib uygulandığında kontrol grubuna kıyasla E-kaderin seviyesinde bir artış gözlenmiştir. miR-150+ hücrelere PD uygulandığında E-kaderin seviyesindeki artış, yalnızca PD uygulanan gruba kıyasla daha yüksektir. 3B MIAPaCa-2 formlarında E-kaderin seviyesi 2B MIAPaCa-2 hücre formlarına göre artış göstermiştir. miR-150 ifadesi arttırılan MIAPaCa-2 hücrelerinden elde edilen sferoid formlardan yapılan total protein izolasyonu sonrası E-kaderin seviyesindeki artış dikkat çekmiştir. Bu hücrelere PD uygulandığında kontrol grubuna kıyasla E-kaderin seviyesinde artış gözlenmiştir. Mezenkimal bir belirteç olan vimentin ifadesi, 2B hücre formlarında Palbosiklib uygulaması ile azalırken, 3B formlarında değişmemiştir. miR-150 ifadesinde artışa bağlı olarak vimentin seviyesinde dikkat çeken bir azalma gözlenmiştir. 3B formlarında bu seviyenin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Hem 2B hem de 3B formlarında miR-150+ MIAPaCa-2 hücrelerine Palbosiklib uygulandığında vimentin seviyesinde kontrol grubuna kıyasla azalma gözlenmiştir. DNA tamir mekanizması ve apoptotik mekanizmada önemli rolleri olan PARP, EMT mekanizmasının düzenleyicisi olarak birçok kanser türevinde araştırılmıştır. Çalışmamızda, Palbosiklib'in MIAPaCa-2 hücrelerinde PARP ifadesine belirli bir etkisi gözlenmemiştir. İnaktif formdaki 116 kDa PARP ifadesinde, hücre içi miR150'nin artışına bağlı olarak kayda değer bir azalma gözlenmiştir. miR-150+ MIAPaCa-2 hücrelerine Palbosiklib uygulandığında, PARP (116 kDa) ifadesinde kontrol grubuna kıyasla azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.17. MIAPaCa-2 2B ve 3B hücre formlarında miR-150'nin Palbosiklib varlığında EMT sinyal yolağına etkisi. miR-150 transfeksiyonlarını takiben 24 sa 3 µM Palbosiklib uygulaması yapıldı. Total protein izolasyonu sonrası 30 µg protein %12'lik SDS-PAGE jelde yürütüldü. Listelenen antikorlarla problandı. E-kaderin, β-katenin, Vimentin ve PARP ifadeleri immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. GAPDH yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

ZEB-1 karsinomalarda tümör migrasyonunu ve invazyonunu arttıran ve bu şekilde EMT mekanizmasını indükleyen bir transkripsiyon faktörüdür. 2B Capan-2 hücrelerinde ZEB-1 ifadesi, 3B formundaki Capan-2 ye göre daha düşüktür. Palbosiklib ZEB-1 ifadesinde artışa sebep olurken, hücre içinde miR-150 ifadesi arttırıldığında Palbosiklibin sebep olduğu bu artış geri çekilmiştir.

β-katenin seviyesi Palbosiklib uygulaması Capan-2 hücrelerinde artmıştır. 3B sferoid formlarda β-katenin seviyesinin 2B kontrol Capan-2 hücrelerine kıyasla önemli oranda artış gösterdiği belirlenmiştir. Palbosiklib β-katenin seviyesinde 3B formlarındaki Capan-2 hücrelerinde de artışa sebep olmuştur. miR-150+ Capan-2 hücreleri ile yapılan 3B formlarında Palbosiklibin sebep olduğu β-katenin seviyesindeki artış engellenmiştir (Şekil 4.18).

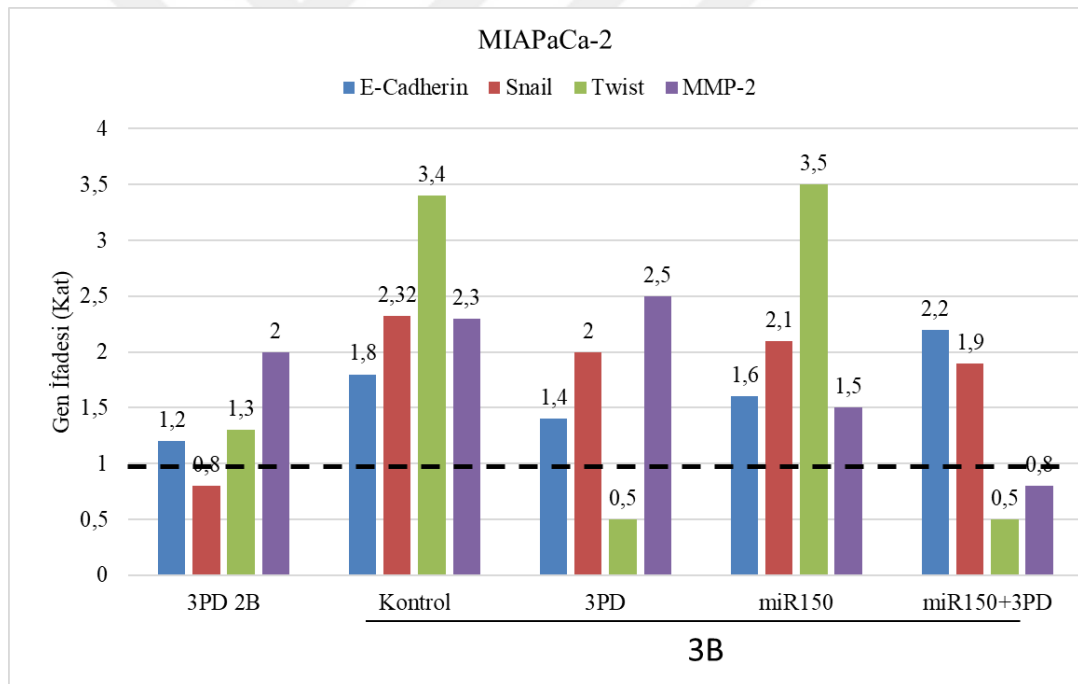


Şekil 4.18. Capan-2 2B ve 3B hücre formlarında miR-150'nin Palbosiklib varlığında EMT sinyal yolağına etkisi. miR-150 transfeksiyonlarını takiben 24 sa 3 μ M Palbosiklib uygulaması yapıldı. Total protein izolasyonu sonrası 30 μ g protein %12'lik SDS-PAGE jelde yürütüldü. Listelenen antikorlarla problandı. ZEB-1 ve β -katenin ifadeleri immunoblotlama yöntemi ile incelenmiştir. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

4.10. Pankreas Kanseri Hücrelerinde miR-150 Mimik Transfeksiyon ile Palbosiklib (Ibrance) Uygulamalarının EMT Mekanizmasında Görev Alan Gen İfadeleri Üzerindeki Etkisinin Gerçek Zamanlı PZR Analizi ile İncelenmesi

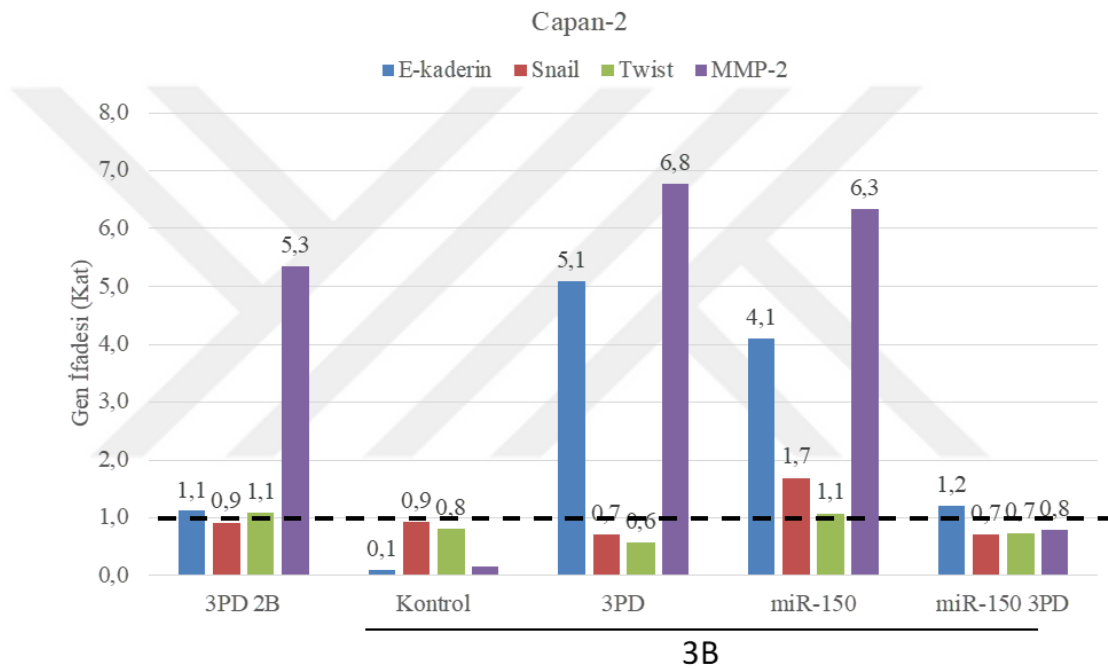
İki boyutlu ve üç boyutlu hücre formlarında miR-150 ile ilişkili olarak Palbosiklibin EMT mekanizmasında görev alan epitel belirteç, E-kaderin, mezenkimal belirteçler, Snail, Twist, MMP-2, gen ifadelerine etkisi gerçek zamanlı PZR analizi ile MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde incelenmiştir. İki boyutlu ve ilaç uygulanmayan kontrol grubu ile kıyaslandığında Palbosiklib uygulanan MIAPaCa-2 hücrelerinde E-kaderin ifadesinin arttığı gözlenmiştir. 3B formlarından elde edilen total RNA izolasyonlarını takiben incelenen E-kaderin gen ifadesinde 3B kontrol grubunda 2B kontrol grubuna kıyasla artış gözlenmiş ve Palbosiklib uygulamasının epitel belirteç olan E-kaderin seviyesinde azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. miR-150 ifadesi arttırılmasından sonra elde edilen 3B formlarında E-kaderin seviyesi artmış ve bu hücreler Palbosiklib uygulandığında 2B kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenmiştir.

2B MIAPaCa-2 hücrelerinde Palbosiklib uygulaması ile Snail ifadesi azalmıştır. 3B MIAPaCa-2 hücrelerinde Snail ifadesinin 2B kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir. miR-150 ifadesi arttırılan Palbosiklib uygulanan 3B MIAPaCa-2 hücrelerinde Snail ifadesinin 3B kontrol grubuna göre azaldığı dikkat çekmiştir. Diğer bir mezenkimal belirteç olan Twist ifadesi diğer gen ifadelerine kıyasla 3B kontrol formlarında 3,4 kat artış göstermiştir. Palbosiklib varlığında Twist ifadesinde 3B kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 6 kat bir azalma gözlenmiştir. miR-150 ifadesinin artışı Twist gen ifadesinde anlamlı bir fark yaratmamıştır. MMP-2 ifadesinin 2B MIAPaCa-2 hücrelerine Palbosiklib uygulandığında 2 kat bir artış gösterdiği incelenmiştir. 3B formlarında da MMP-2 seviyesi 2B kontrol grubuna kıyasla yüksektir. Ancak miR-150 ifadesindeki artış ile birlikte Palbosiklib uygulamasının sinerjistik olarak MMP-2 gen ifadesini azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. MIAPaCa-2 2B ve 3B formlarında EMT mekanizmasında görev alan gen ifadelerinde Palbosiklib uygulamasının miR-150 ifadesine bağlı olarak neden olduğu değişimin gerçek zamanlı PZR analizi ile incelenmesi. E-kaderin, Snail, Twist ve MMP-2 ifadeleri incelenmiştir. Normalizasyon β -aktin ifadesine göre gerçekleştirilmiştir. Kıyaslamalar 2B kontrol grubuna göre yapılmıştır. n=-2 2B: 2 boyutlu, 3B: 3 boyutlu.

Capan-2 hücrelerinde E-kaderin, Snail, Twist ve MMP-2 gen ifadeleri incelendiğinde özellikle 2B Capan-2 formlarına Palbosiklib uygulandığında MMP-2 ifadesinde yaklaşık 5 kat bir artış gözlenmiştir. 3B formlarında kontrol grubunda E-kaderin ve MMP-2 gen ifadelerinde kayda değer bir azalma göze çarpmıştır. Ancak bu hücrelere Palbosiklib uygulandığında her iki gen ifadesinde 2B kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 5,1 ve 6,8 kat bir artış olmuştur. miR-150 varlığında ve Palbosiklib uygulandığında ise bu gen ifadelerinin sırasıyla 1,2 ve 0,8 kata azaldığı gösterilmiştir. Snail ve Twist gen ifadeleri 3B formlarda miR-150 ifadesinin arttırıldığı ve Palbosiklib uygulanan hücre grubunda 2B kontrol grubuna kıyasla azalmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. 2B ve 3B Capan-2 formlarında EMT mekanizmasında görev alan gen ifadelerinde Palbosiklib uygulamasının miR-150 ifadesine bağlı olarak neden olduğu değişimin gerçek zamanlı PZR analizi ile incelenmesi. E-kaderin, Snail, Twist ve MMP-2 ifadeleri incelenmiştir. Normalizasyon β -aktin ifadesine göre gerçekleştirilmiştir. Kıyaslamalar 2B kontrol grubuna göre yapılmıştır. n=-2 2B: 2 boyutlu, 3B: 3 boyutlu.

5. TARTIŞMA

Kanser, kişisel risk faktörlerine bağlı olarak ortaya çıkan mutant genlerin yarattığı hücrel değişikliklerin sebep olduğu tehlikeli bir hastalıktır. Dünya çapında çeşitli kanserler üzerine yıllardır yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilmekte ve hastaların tedavisinde kullanılmak üzere klinik araştırmalar desteklenmeye devam etmektedir. Hastaların neoadjuvan, adjuvan ya da cerrahi operasyondaki güncel terapötik yöntemlere karşı verdikleri olumsuz yanıtlar hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarına odaklanılmasına sebep olmaktadır.

2020 yılına dair Dünya Sağlık Örgütü verileri pankreas kanserinin cinsiyete bağlı olmaksızın ülkemizde toplam ölümlerde 14. sırada, kanser çeşitleri arasında ise 6. sırada yer aldığını göstermektedir [20]. Sıralamanın yanı sıra pankreasın vücuttaki konumu ve belirtilerinin tespitindeki zorlukla pankreas kanseri hastalarının sağkalım oranı oldukça düşük olmakla birlikte agresif yapıdaki kanser ciddi tehdit oluşturmaya devam etmektedir. ABD, pankreas kanseri mortalite oranının 2030 yılına kadar artış göstermesiyle kanser ilişkili ölümlerin sıralamasında ikinci olarak yer alabileceğini belirtmiştir [5].

mikroRNA'lar ortalama 22 ila 23 nükleotit dizilimindeki endojen kodlama yapmayan RNA sınıfı olarak tanımlanmaktadır. Tek bir miRNA'nın hedefinde birden fazla farklı haberci RNA sınıfının (mRNA) bulunabilmesinin yanı sıra eş zamanlı olarak tek bir mRNA çeşitli mikroRNA grubu tarafından seçilebilir [9]. Hedeflenen mRNA ile posttranskripsiyonel düzenlemede gerçekleşecek olan değişiklikler önemli biyolojik süreçleri etkilediği gibi çeşitli insan hastalarında rol oynamaktadırlar [76][77]. miR150, gen ifadelerinin düzenlenmesine bağlı olarak kanser çeşitlerinde tümör baskılayıcı karakter gösterebildiği gibi onkogen olarak da bulunabilir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri üzerinde miR-150 görevinin incelendiği bir çalışma FOXO4 hedeflenmesi ve azalan ifade seviyesine bağlı olarak miR-150'nin hücre metastazını teşvik ettiği bulunmuştur [101]. Servikal kanser hastalarından alınan kanser doku örneklerindeki çalışmada programlı hücre ölümü proteininin (PDC4) miR-150 tarafından hedef alınmasıyla hücre proliferasyonu, hücre göçü ile invazyonunu desteklediği tespit edilmiştir [102].

Onkogen olarak ifade edildiği bazı kanser türlerinin yanı sıra pankreas kanserindeki ifade seviyesinin az olması ile önemli bir tümör baskılayıcı görevinde olan miR-150, prostat kanseri [104] ve üçlü negatif meme kanseri [105] gibi farklı kanserlerde de önemli bir terapötik hedef olarak ele alınmaktadır.

Pankreas kanseri çalışmalarında son yıllarda iki boyutlu hücre kültüründen farklı olarak in vivo tümör dokularının mimarisi ile benzerlik oluşturulması amacıyla üç boyutlu hücre kültürlerinin kullanımı tercih edilmektedir [46]. İnsan hastalıklarının moleküler düzeyde incelenmesi ile uygun terapötik ilaç dozlarının belirlenmesinde daha fazla avantaj sağlamaktadır. 2B hücre kültürü ve hayvan deneylerine kıyasla insan fizyolojisinin incelenbilmesinde daha etkin yanıtlar vermektedir [16]. Tedavideki zorlu mücadeleden biri de kanser heterojenliği nedeniyle kanser çeşitlerine göre uygun görülen tedavi yöntemlerinin ilaç duyarlılıkları da ele alındığında her hasta için uygun olmamasıdır. Bu durum dokuları taklit edebilme özellikleri sayesinde 3B hücre kültürünün kişiselleştirilmiş yeni tedavi arayışları için kullanılmasında diğer tedavi yöntemlerinden çok daha öne çıkarmaktadır. Böylelikle hastalara daha etkin tedavi uygulamaları ile hasta sağkalımını arttırmak en önemli amaç olmaktadır [75].

Normal hücrelerde kanser hücrelerinin aksine hücre döngüsünde gerçekleşebilecek problemler hücrelerin programlı ölümleri ile sonuçlanmaktadır. Siklinler ve sikline bağımlı kinaz elemanları tarafından sağlanan hücre döngüsündeki düzenin bozulmasıyla kanser hücrelerinin çoğalması kontrol altına alınamamaktadır. Yeni tedavi arayışında özellikle hücre döngüsünden sorumlu bu elemanların terapötik hedef olarak ele alınması dikkat çeken bir yaklaşım olarak görülmüştür. Böylelikle, seçili olarak ele alınacak siklin-CDK kompleksleri hücre döngüsünün sürekliliğini sağlayamamakla birlikte hücre proliferasyonunu engellemektedir [107]. G1 ile S hücre döngüsü fazları arasındaki geçişin gerçekleşmesinden sorumlu elemanlar siklin D ve CDK4/6'nın oluşturduğu komplekstir. Hücre sağkalımı ve proliferasyon ilişkili sinyal yollarının aktive ettiği mitojenlerle ifade seviyesi artan siklin D, CDK4/6 ile kompleks aktivasyonunu arttırmakta ve hücreler çoğalmaya devam etmektedir.

CDK4/6 spesifik inhibitörü olarak geliştirilen Palbosiklib, ilk kullanımı kadınlarda menopoz sonrasında östrojen reseptörü pozitif ve ilerlemiş HER2-negatif meme kanseri tedavisine yönelik olan bir ilaçtır ve tedavi başka ilaçlar ile kombinasyonunun daha etkili sonuç verdiği belirtilmektedir [13] [118]. Prostat [122], kolorektal [123], lenfoma [124], liposarkom [125], küçük hücreli olmayan akciğer kanseri [126], Hodgkin dışı lenfoma ve Rb-pozitif katı tümörlerde [127] de meme kanserinin yanı sıra CDKi Palbosiklib uygulaması ile ilişkili klinik araştırmalarda etkili sonuçlar gösterdiği bulunmaktadır. Kanser hücreleri arasındaki genomik ve metabolik özelliklerin aynı olmaması, kanser türleri karşılaştırıldığında da ilaca karşı verilen farklı yanıtlarla sonuçlanmaktadır.

PK hücrelerine uygulanacak olan CDK4/6 inhibitörü Palbosiklib'in seçili dozu, yapılan bir çalışmada 3 μ M PD'nin PK hücrelerinde 24 saatte G1 hücre döngüsünü durduran apoptotik bir ajan olduğunun ve epitelial-mezenkimal geçiş üzerindeki etkilerinin tespit edilmesi üzerine tez çalışmasında 3 μ M PD olarak belirlenmiştir [14].

Pankreas kanseri patogeneğinde miR-150-5p, azalan ifade seviyesiyle karsinogenez ile negatif ilişkili olduğu yapılan araştırmalar literatürde yer almaktadır. Bir çalışmada PK hücre hatlarında arttırılan miR-150-5p seviyesinin hedefindeki karsinogenezde görevli MUC4'ü baskılamasıyla hücre-hücre yapışmasında arttırdığı etkiyle birlikte koloni oluşumu ve hücre göçünü etkileyerek tümörigenezin ilerlemesini engellediği bulunmuştur [103]. Pankreas kanseri hastalarından alınan doku örneklerinin incelenmesiyle miR-150 ifade seviyesinin pankreas kanserinde düşük olduğu ve ifade seviyesinin arttırılmasına bağlı olarak tümörigenez ilişkili hedefindeki c-Myb ve MUC4 seviyelerini azaltarak hücre göçünü, invazyonunun baskıladığı, koloni oluşturma etkisini azalttığı ve in vivo çalışmada da tümör büyümesini azalttığı belirtilmiştir [11]. LINC0015'in, uzun kodlama yapmayan RNA olarak miR-150-5p'yi baskılayarak pankreas kanserinde onkogen karakter gösterdiği belirtilmiştir [128].

Bu bilgiler göz önüne alındığında CDK4/6 inhibitörü Palbosiklibin, epitelyal mezenkimal geçişin düzenlenmesini anlamlı olarak etkilemesi ve pankreas kanserinde tümör baskılayıcı özellikte bulunmasıyla miR-150 kombinasyonu ile genomik özelliklerine göre farklılık gösteren KRAS, TP53, CDK2N/p16 mutasyonlarına sahip metastatik MIAPaCa-2 ile KRAS mutasyonu bulunan metastatik olmayan Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinin iki boyutlu ve üç boyutlu hücre kültüründeki etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

MIAPaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinde sentetik miR-150 transfeksiyonu ile 3 µM Palbosiklib kombinasyonunun hücrelerdeki miR-150 ifade seviyelerindeki etkisi gerçek zamanlı PZR analizi ile belirlenmiştir. Kontrol grubu ile sadece ilaç uygulanan deney grubu karşılaştırıldığında, iki hücre hattında analiz edilen miR-150 seviyesinde farklılık tespit edilmiştir. Analiz sonucuna göre hücrelerin kendi kontrol gruplarına kıyasla Palbosiklibin, MIAPaCa-2 hücrelerindeki miR-150 ifade seviyesini anlamlı olarak azalttığı, Capan-2 hücrelerinin ise miR-150 seviyesinin 3 kat arttığı belirlenmiştir. miR-150 mimik transfeksiyonunun ardından MIAPaCa-2+miR-150 hücrelerindeki seçili miRNA ifade seviyesi 3,2 kat, Palbosiklib varlığında ise 3,6 kat artmıştır. Capan-2 hücrelerine miRNA transfeksiyon uygulaması ile Capan-2+miR-150 hücrelerinde miR-150 ifadesinin 4,5 kat, Palbosiklib varlığında ise 6,5 kat arttığı tespit edilmiştir. İki hücre hattı karşılaştırıldığında miR-150 mimik transfeksiyonu ile 3 µM Palbosiklib kombinasyonunun MIAPaCa-2 hücrelerine kıyasla Capan-2 hücrelerinde miR-150 ifade seviyesinin anlamlı olarak daha çok arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.). PZR analizi sonucu, tek başına ilaç uygulamasının genomik farklılıklara sahip iki hücre hattında farklı yanıtlar verdiği, fakat sentetik miR-150 transfeksiyonunun PD ile kombine edilmesiyle pankreas kanserinde tümör baskılayıcı rolü bulunan miR-150 ifade seviyesinin iki hücre hattında da arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç doğrultusunda, arttırılan miR-150 ifadesi ile Palbosiklib uygulamasının 3B PK hücre formlarında incelenmesi üzerine 3B hücre kültürü yöntemlerinin kullanımı ile 3B hücre formları oluşturulmuştur.

Kanser hücreleri normal hücrelerin aksine hücreSEL yüzeyden bağımsız olarak büyüme özelliğine sahiptirler ve yumuşak agar deneyinde oluşturulan in vitro ortam kanser hücrelerinin koloni oluşturma potansiyellerinin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır [129]. Bu amaçla yumuşak agar koloni oluşturma deneyinde miR-150 mimik transfeksiyonunun MIAPaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinin agar ortamında 3B hücre formu oluşturmaları sağlanmıştır. 3. ve 4. haftalarda zamana bağlı olarak MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinin deney gruplarındaki sferoid çaplarında artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile sentetik miR-150 ifadesi arttırılan gruplar karşılaştırıldığında her iki hücre hattında (Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.) miRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen gruptaki sferoid çaplarının zamana bağlı olarak anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, pankreas kanseri hücre hatlarında miR-150 ifadesinin koloni oluşumunu engelleyici etkisi ile 3B form oluşturma potansiyelindeki etkisini göstermektedir.

HPAF, Panc10.05 ve Colo357 pankreas hücre hatlarının kullanıldığı başka bir çalışmada da yapılan asılı damla deneyi arttırılan miR-150 ifadesinin hücreler arasında etkileşimin artış gösterdiği belirlenmiştir [103]. MIAPaCa-2 hücrelerinde miR-150 mimik transfeksiyonu ile PD kombine uygulamasının, Palbosiklibin etkisini arttırarak, sferoid çapını anlamlı ölçüde azalttığı görülmektedir. Benzer şekilde, bir pozitif kontrol olarak kullanılan Gempitabin uygulamasının da sferoid çaplarını azalttığı görülmüştür (Şekil 4.5). Farklı pankreas kanseri hücreleri ile yapılan çalışmalardaki aynı doz (3 µM) PD uygulamalarının ve/veya miR-150 transfeksiyonu ile artan miR-150 ifadesinin yumuşak agar deneylerinde incelenmesiyle oluşan 3B hücre formlarında da sferoid çaplarının kontrol gruplarına göre azaldığı belirtilmiştir [14] [130]. miR-150 ile ilişkili olarak tümör baskılayıcı miR-150'nin ifadesinin arttırılması, CDK inhibitörü Palbosiklib etkinliğini üç boyutlu pankreas kanserlerinde önemli derecede arttırdığını söylemek mümkün.

Asılı damla deneyi, yumuşak agar koloni oluşturma deneyi gibi 3B hücre kültürü tekniklerinden biridir ve çok daha az bir sürede sferoid yapılarının oluşumu incelenmiştir. Hücre süspansiyonundan oluşturulan damla içerisinde hücreler yakınlarındaki hücrelerle kurduğu etkileşimle sferoid form almaktadır [121].

MIAPaCa-2 hücrelerinin asılı damla deneyinin üçüncü gününde oluşturdukları sferoid formlardaki çapları karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre diğer deney gruplarındaki sferoid çaplarının azaldığı görülebilmektedir. Capan-2 hücrelerinde de zamana bağlı olarak sferoid çaplarının kontrol grubuna göre ilaçlı ve miRNA ifadesi arttırılan deney gruplarında küçüldüğü görülmüştür. MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinin oluşturduğu 3B formlarda miR-150 + hücrelerdeki Palbosiklibin birlikte uygulandığındaki etkisi incelendiğinde hücre topluluğunun azaldığı görülmektedir (Şekil 4.6-Şekil 4.7).

Pankreas kanseri hücrelerinin normal dokudaki bazal membran mikroortamına benzer bir ortamda 3B hücre formunun oluşturulması amacıyla Matrigel yöntemi MIAPaCa-2 hücrelerinde kullanılmıştır. Matrigel, fare tümör hücrelerinden elde edilen laminin, tip IV kollajen, perlekan (heparan sülfat proteoglikan), nidojen, proteaz gibi bazal membran elemanlarını içeren bir hücre dışı matriks karışımıdır [131]. MIAPaCa-2 hücrelerinin Matrigel ekimi ile oluşturuldukları 3B hücre formlarında kontrol grubuna kıyasla, miR-150 ve miR-506 ifadelerinin arttırılması ile PD ve GEM uygulamalarının sferoid çaplarını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Şekil 4.8). Bu sonuçlarla birlikte, MIAPaCa-2 hücreleri ile üç boyutlu hücre formunun oluşturulmasında artan miRNA ifadelerinin ve PD ya da GEM ilaç uygulamalarının kontrol grubuyla kıyaslandığında koloni oluşumunda önemli derecede etkili olduğunu söylemek mümkün. 3B hücre kültürü yöntemlerinde sferoid formlarda DNA kırıklarını göstermek amacıyla DAPI, mitokondrilerini göstermek için DiOC6 hücre canlılığı boyamaları yapılmıştır.

Palbosiklib ve/veya miR-150 mimik transfeksiyon uygulamalarının 2B ve 3B MIAPaCa-2 hücrelerindeki koloni oluşturma potansiyelleri koloni formasyon deneyi ile incelenmiştir. Koloni oluşumları, hücre kolonilerinin fiks edilip kristal viyole ile boyanmasıyla birlikte değerlendirilmiştir. Üç boyutlu MIAPaCa-2 hücrelerinde artan miR-150 ifadesine ve Palbosiklib uygulamasına bağlı olarak koloni oluşturma potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır ve deney gruplarının 3B hücre formlarındaki etkisi 2B MIAPaCa-2 hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelleri ile karşılaştırılmıştır.

2B MIAPaCa-2 hücrelerinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Palbosiklib uygulamasına karşı oldukça hassas olduğu ve artan miR-150 ifadesi ile kombine edildiğinde hücrelerin koloni oluşumunu neredeyse tamamen inhibe edebildiği görülmektedir. Benzer bir sonuç olarak, 2B farklı pankreas kanserleriyle yapılan bir çalışmada, miR-150 ifade artışının koloni oluşturma deneyinde incelenmesiyle koloni sayısını azalttığı belirtilmiştir [103]. Başka bir çalışmada da iki boyutlu pankreas kanseri hücrelerinde çalışmada kullanılan aynı dozdaki 3 µM Palbosiklibin koloni oluşumunu yüksek oranda kontrol grubuna göre inhibe ettiği tespit edilmiştir [14]. 3B hücrelerdeki koloni oluşturma potansiyelinde, kontrol grubuna kıyasla PD ile artan miR-150 ifadesinin kombinasyonunda koloni çaplarının grafik analizine göre küçüldüğü görülebilmektedir. Fakat 3B MIAPaCa-2 hücrelerinin kontrol grubuna göre ilaç ve sentetik miRNA transfeksiyon uygulamalarına karşı 2B hücrelerdeki koloni oluşumu sonuçlara göre daha az etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Bu sonuçlarla, miR-150+ MIAPaCa-2 hücrelerinin PD uygulaması ile koloni oluşturma potansiyelleri üzerindeki etkilerinin 2B ve 3B hücreler arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte 3B hücre formlarının daha agresif oldukları ve ilaca duyarlılıklarının 2B hücrelere göre daha az oldukları söylenebilir. 2B Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinin de uygulanan Palbosiklibe karşı hassas olduğu ve miR-150+ Capan-2 hücreleriyle birlikte kullanıldığında ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında koloni oluşumunu önemli derecede engellediği görülmektedir (Şekil 4.10). 2B ve 3B üçlü negatif meme kanseri hücrelerinin farklı antikanser ilaçlarına karşı duyarlılıklarının karşılaştırıldığı bir çalışma da 3B hücre formlarının 2B hücrelere kıyasla daha dirençli olduğunu belirtmiştir [132].

2B MIAPaCa-2 ve 2B Capan-2 hücrelerinde miR-150 ifade seviyesinin arttırılmasını takiben 24 saat Palbosiklib ile muamele edilen pankreas kanseri hücrelerinde DiOC6 boyama ile hücre canlılığına bakılmıştır. miRNA mimik transfeksiyonu ve/veya ilaç uygulamasının ardından DiOC6 boyama ile canlı hücrelerin mitokondriyel membran potansiyelleri karşılaştırılmıştır. 2B MIAPaCa-2 ve 2B Capan-2 hücrelerinde miR-150 ifadesinin artışı ile PD CDK inhibitörünün birlikte kullanılmasının kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığının anlamlı olarak azaldığı görülmektedir (Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.).

Epitelyal-mezenkimal geçiş sürecinde artan miR-150 ifadesi ile ilişkili olarak Palbosiklibin rolünün incelenmesi amacıyla yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır. 2B pankreas kanseri hücreslerinde migrasyonun Palbosiklib uygulaması ile baskılanması, arttırılan miR-150 ifadesi ile anlamlı ölçüde artmıştır (şekil 4.13 ve şekil 4.15). Literatürdeki başka bir çalışma da pankreas kanseri hücreslerinde artan miR-150 ifadesi ve PD ile ilişkili kombine uygulamanın migrasyonu baskılayıcı etkisine benzer sonuçlar elde edilmiştir [130]. 3B pankreas kanseri hücreleri ile yapılan yara iyileşmesi deneyi, asılı damla modelinden elde edilen sferoid formların hücre kültürü kaplarına ekimleri ile yapılmıştır. 3B MIAPaCa-2 hücrelerinden yapılan yara iyileşmesi deneyinde artan miR-150 ifadesiyle birlikte Palbosiklib uygulamasının migrasyonu anlamlı derecede baskıladığı tespit edilmiş, 3B Capan-2 hücrelerinden yapılan deneyde ise tüm deney gruplarında yaraların kapanmasının gözlenmesi oldukça dikkat çekmiştir (şekil 4.14 ve şekil 4.16). Bu sonuçlar doğrultusunda 2B pankreas kanseri hücrelerinde artan miR-150 ifadesiyle ilişkili olarak Palbosiklibin etkisini arttırarak migrasyonu inhibe ettiği, bu durumun 3B hücre formlarından yapılan ekimlerdeki etkisine bakıldığında ise 2B pankreas kanseri hücrelerine göre 3B pankreas kanseri hücrelerinin daha agresif özellikte olduğu desteklenmektedir.

2B ve 3B MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücrelerinde tek başına Palbosiklib varlığında ve yokluğunda artan miR-150 ifadesinin EMT sinyal yolağına etkisi immunoblotlama analizi ile incelenmiştir. 3B hücrelerde immunoblotlama analizi, asılı damla modeli ile oluşturulan 3B hücre formlarından elde edilen protein lizatlar ile elde edilmiştir. GSK-3β fosforilasyonu ile hücre çoğalmasında görevli büyüme faktörü TGB-β, Snail ve Slug transkripsiyon ifade seviyelerini arttırarak E-kaderin baskılanmasını destekler. Böylelikle nükleer translokasyon gerçekleştiren β-katenin, hücre döngüsü ve metastaz ilişkili Wnt yolağının hedef genleri TCF-4 ve LEF-1 transkripsiyon faktörlerini aktive ederek vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin aktivasyonuna neden olmaktadır [133]. Bilgiler göz önüne alınarak, 2B ve 3B pankreas kanseri hücre formlarındaki EMT ilişkili belirteçlerin ifade seviyelerinin karşılaştırılması incelenmiştir. Hücre-hücre adezyon moleküllerinden biri olan E-kaderin seviyesi incelendiğinde, 3B hücrelerdeki ifade seviyesi 2B MIAPaCa-2 hücrelerine kıyasla artış gösterdiği dikkat çekmektedir.

Mezenkimal belirteçlere bakıldığında, 2B MIAPaCa-2 hücrelerinde, Palbosiklib uygulamasında β -katenin seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmezken, sferoid formlarındaki incelemede PD ile β -katenin seviyesinde artış gözlenmiştir. Vimentin ifade seviyesinin ise PD uygulaması ile azaldığı fakat 3B hücre formlarında anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. PD'nin, apoptotik mekanizmada görevli PARP üzerinde etkisi gözlenmemiştir. Özellikle artan miR-150 ifadesi ile PD ilişkisi incelendiğinde hem 2B hem de 3B hücre formlarında E-kaderin ifadesi artarken β -katenin, vimentin ifadelerinde ve 2B MIAPaCa-2'de PARP ifadelerinin seviyelerinde azalma görülmüştür. MIAPaCa-2 hücre formları karşılaştırıldığında epitel belirteç E-kaderin ve mezenkimal belirteçlerin ifade seviyelerinin sferoid formlarda 2B hücrelere göre daha yüksek olduğu dikkat çekmiştir (Şekil 4.17).

Literatürdeki farklı pankreas kanseri hücreleri ve prostat kanserleri ile yapılan farklı çalışmalarda da E-kaderin protein seviyesinin üç boyutlu hücre formlarında iki boyutlu hücrelere göre artış gösterdiği belirtilmektedir. E-kaderin seviyesindeki bu artışın 3B hücre formunu oluşturan hücreler arasındaki kuvvetli adezyonu belirttiği ve böylelikle hücrelerin toplu göç edebilmesini desteklediği öne sürülmektedir [134] [135].

Tümör migrasyonunda görevli ZEB-1, EMT sürecinde E-kaderini baskılamakta ve β -kateninin nükleer translokasyonunun gerçekleşmesi ile invaziv hedeflerin aktivasyonuna sebep olduğu bilinmektedir [136]. 2B ve 3B Capan-2 hücrelerinde de artan miR-150 ifadesi ile Palbosiklib ilişkisinin ZEB-1 ve β -katenin protein ifade seviyelerine etkisi incelenmiştir. Farklı 2B PK hücre hatları ile yapılan başka bir çalışma da Capan-2 hücrelerinde immunoblotlama analizi sonucu, EMT ilişkili olan transkripsiyon faktörlerinden ZEB-1 ifadesinin tespit edilemediği belirtilmiştir [137]. Bu çalışmada, ZEB-1 ve β -katenin ifadeleri, 2B Capan-2 hücrelerinde 3B hücre formundaki Capan-2'ye göre daha düşük seviyede olduğu dikkat çekmektedir. Palbosiklibin, β -katenin ve ZEB-1 mezenkimal belirteçlerin ifade seviyelerini Capan-2 hücrelerinde arttırdığı görülmektedir. Artan miR-150 ifadesi, Palbosiklib ile artan ZEB-1 ve β -katenin ifade seviyelerinin baskılanmasını sağladığı gözlenmiştir (Şekil 4.18).

Protein ifadeleri incelendiğinde, 2B MIAPaCa-2 ve 2B Capan-2 hücrelerinde Palbosiklib tarafından baskılanmayan β -katenin ifadesinin, miR-150 ifadesinin hücre içinde artması ile engellendiği görülmektedir. Pankreas kanseri hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada da aynı doz (3 μ M) Palbosiklib tarafından β -kateninin engellenmediğine dair çalışmalar yer almaktadır [14] [130]. Elde edilen sonuçlara benzer olarak miR-150 ifade artışı ve PD kombinasyonu ile 2B pankreas kanseri hücrelerinde mezenkimal belirteçlerin seviyelerinin baskılandığı, E-kaderin seviyesinin de arttığı görülmüştür [130]. 2B Prostat kanseri hücre hatları ile yapılan bir çalışmada miR-150'nin arttırılan ifade seviyesi ile EMT ilişkili TRPM4 hedeflemesine bağlı olarak β -katenin sinyal yolunun bloke edilmesinde etkili olabileceği ve prostat kanserinde tümör baskılayıcı görevinde yer alabileceği belirtilmektedir [104]. Ayrıca 2B üçlü negatif meme kanseri ile yapılan başka bir çalışma da EMT ve metastaz ilişkili HMGA2 proteininin in vivo ve in vitro çalışmalarda miR-150 tarafından hedeflenmesi ile migrasyon ile metastazı engelleyici özellik gösterdiği de ifade edilmiştir [105]. Bu sonuçlar doğrultusunda incelenen, 2B ve 3B MIAPaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücre formlarında protein seviyeleri incelenen mezenkimal karakterlerin baskılanmasının belirlenmesi, artan miR-150 ifadesi ilişkili Palbosiklib uygulamalarının EMT inhibe etkisini vurgulamaktadır.

MIAPaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinden yapılan asılı damla deneyi ile türetilen sferoidleri daha fazla karakterize etmek ve böylelikle 3B kültür koşullarındaki miR-150 ifade artışı ve Palbosiklib uygulamalarının epitelyal mezenkimal geçiş ile ilişkili gen ifadeleri üzerindeki etkisi değerlendirilmek üzere gerçek zamanlı PZR analizi gerçekleştirildi. EMT mekanizmasında görevli dört gen; epitel belirteç E-kaderin, mezenkimal belirteçlerde Snail, Twist, MMP-2 gen ifadeleri incelendi. Normalizasyon 2B kontrol grubu ile yapıldı ve 3B MIAPaCa-2 hücrelerdeki gen ifadeleri 2B Palbosiklib uygulaması yapılan MIAPaCa-2 hücrelerle karşılaştırılmıştır. E-kaderin gen ifadesi 2B kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3B hücre formlarından elde edilen total RNA izolasyonlarındaki ifade seviyesinde de artış görülmüştür. Palbosiklib uygulaması ile azalan bu artış, Palbosiklib ile miR-150 ifadesi arttırılan 3B hücrelerde anlamlı olarak arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.19.).

2B ve 3B prostat kanseri hücrelerindeki gen ifadelerinin karşılaştırıldığı literatürdeki bir çalışma da 3B formlardaki E-kaderin mRNA seviyelerinin daha yüksek çıkması ve bunun protein seviyeleri ile desteklenmesinin hücre yapışmasının kuvvetli olması ile ilişkilendirilmiştir [135]. Projemizde 2B hücrelerde Palbosiklib tarafından gen ifadesi azaldığı görülen mezenkimal belirteçlerden Snail, 2B kontrol grubuna göre 3B MIAPaCa-2 tüm deney gruplarında artış gösterdiği belirlenmiştir. EMT mekanizmasında mezenkimal belirteç olarak ele alınan transkripsiyon faktörlerinden biri olan TWIST [138] ise, çalışmamızda diğer mezenkimal belirteçlere göre 3B kontrol grubundaki hücre formlarında 3,4 kat kadar arttığı görülürken, Palbosiklib uygulanan gruplarda ise bu gen ifadesinde 6 kat gibi önemli bir azalma olduğu dikkat çekmektedir. Ana ECM bileşenlerinden biri olan kollajen IV'ün, matris metalloproteinazlardan biri olan MMP-2 tarafından parçalanmasıyla tümör gelişiminde MMP-2'nin invazyonla ilişkisi bilinmektedir [139]. Çalışmamızda MMP-2 gen ifadesi incelendiğinde, 2B kontrol grubuna kıyasla, 3B hücre formlarında miR-150 ile PD kombine grubu haricinde diğer deney gruplarında, ifadesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. 3B MIAPaCa-2 hücre formlarında artan miR-150 ifadesi ile Palbosiklib uygulamalarının kombinasyonunun, mezenkimal belirteçler üzerindeki etkilerine bakıldığında, gen ifadelerinin 3B kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde baskılandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.19.). EMT ilişkili genlerin iki farklı kolorektal kanser hücre hattının 2B ve 3B hücre formlardaki ifade analizinin gerçekleştirildiği bir çalışmada da 3B hücrelerde 2B hücrelere göre mezenkimal belirteçlerin (ZEB1, TWIST1, SNAIL1, Vimentin) artan ifade seviyeleriyle birlikte E-kaderin ifadesinde de artış olduğu görülmüştür [140]. Farklı pankreas kanseri hücre hatlarının kullanıldığı bir çalışmada ise Twist, Snail, ZEB1 ve ZEB2 EMT belirteçlerinin, yüksek ifade seviyesi tespit edilen E-kaderin ile ilişkili olarak ifadelerinin neredeyse belirlenemediği belirtilmiştir [134].

Capan-2 hücrelerinde bu dört genin ifade seviyeleri incelendiğinde ise, E-kaderin ve MMP-2 genlerinin 3B hücre formlarındaki ifadeleri dikkat çekmiştir. 2B kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 3B kontrol grubunda E-kaderin ile MMP-2 gen ifadelerindeki dikkat çeken azalma, Palbosiklib uygulaması ile önemli derecede arttığı öne çıkmıştır.

3B Capan-2 hücre formlarında miR-150 ifadesinin artışının PD ile kombinasyonu 3B kontrol grubu ile karşılaştırıldığında E-kaderin ve MMP-2 gen seviyelerinde görülen artışla birlikte Snail ve Twist gen ifadelerini baskıladığı gözlemlenmiştir (Şekil.4.20.).

Gerçek zamanlı PZR ile elde edilen bu sonuçlar göz önüne alındığında, 3B MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücre formlarında, miR-150 artışı ile ilişkili olarak PD uygulamalarının EMT ilişkili genler üzerinde etkili oldukları belirlenmiştir. Epitel belirteç E-kaderin gen ifadesi kombine uygulama ile iki hücre hattında da 3B kontrol grubuna göre artış gösterirken, mezenkimal belirteçlerin gen seviyelerini ise genel olarak baskılanmasını sağladığı anlaşılmıştır.

Literatürdeki bir çalışmada matriks metalloproteinaz gen ifadelerinin (MMP-2, MMP9), 2B ve 3B yapılarıdaki yumurtalık kanseri hücrelerinde incelenmesi yapılmıştır. Sonuçlarda, kullanılan iki farklı 3B hücre kültürü yöntemi ile oluşturulan hücre formlarında da MMP ifadelerinin bu çalışmadakine benzer olarak 2B hücrelere göre oldukça yüksek olması dikkat çekmiştir. MMP seviyelerinin özellikle agaroz hidrojel ile oluşturulan 3B hücrelerdeki bu artışın, hücreler arası ve hücre-matriks ilişkili davranışlarının tümör büyümesini teşvik edebilmesiyle in vivo koşulları daha iyi yansıtabilmesini belirtmiştir [141]. Karsinom hücre hattında yapılan başka bir çalışmada da incelenen MMP-2 ifadesinin 3B hücre formlarında 2B hücrelere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiş ve üç boyutlu hücre formlarındaki yüksek MMP seviyelerinin daha kompleks yapıdaki ECM mimarilerini parçalama gereksinimlerinden kaynaklı olabileceği belirtilmiştir [142].

Çalışmada E-kaderin gen ifade seviyesi, 3B MIAPaCa-2 kontrol hücre formlarında 2B MIAPaCa-2 kontrol grubuna göre artış gösterirken, 3B Capan-2 hücrelerindeki ifade seviyesi 2B Capan-2 hücrelere göre çok daha az olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Benzer bir sonuç, gerçek zamanlı PZR ile 2B ve 3B hücre formlarındaki gen ifadelerinin incelendiği başka bir çalışmada da farklı pankreas kanseri hücre hatlarında farklı E-kaderin ifadeleri görülmüştür. Mezenkimal belirteçlerinde farklı ifadelerde görülmesi, hücre hatlarının sahip olduğu farklı davranış profillerinden kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir [134].

Tez çalışmasında elde edilen bulgular göz önüne alındığında, MIAPaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücrelerinde mimik miR-150 transfeksiyonu ile miR-150 ifadesinin arttırılması ile önemli bir CDK inhibitörü olan PD uygulamalarının, sferoid çaplarını kontrol gruplarına göre önemli ölçüde azaltmasına neden olarak 3B hücre formlarını oluşumunda etkili olduğu gözlenmiştir. miR-150 ifade seviyesinin arttırılması ile oluşturulan 3B PK hücre formlarında PD'nin koloni oluşturma potansiyelini azaltmış, PD'nin miR-150 ile ilişkili olarak hücre migrasyonunu baskıladığı sonucuna varılmıştır. 2B ve 3B MIAPaCa-2 ve Capan-2 hücre formlarından elde edilen epitel-mezenkimal geçiş süreci ilişkili mRNA ve protein ifade analizlerinin karşılaştırılmasında 2B ve 3B hücre formları arasında dikkat çeken farklılıklar tespit edilmiştir.

Bu karşılaştırmalarda 2B hücrelere göre 3B hücre formlarında mezenkimal belirteçlerin arttığı ve artan miR-150 ifadesi ve PD uygulamaları ile bu ifadelerin azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 3B hücre formlarında 2B hücrelere göre daha yüksek olan E-kaderin seviyesinin gösterdiği üzere korunan kuvvetli hücre-hücre yapışmasının, miR-150 ve PD uygulamaları ile arttığı gözlemlenmiştir. Projede amaçlandığı gibi, sonuç olarak 3B MIAPaCa-2 ve Capan-2 pankreas kanseri hücre formlarında, miR-150 ile CDK4/6 inhibitörü Palbosiklib sinerjistik etki göstererek mezenkimal karakterlerin baskılanmasını sağlamıştır. Hasta modelleri üzerinde yapılacak klinik araştırmalarda ve PK kombine terapilerinde miR-150 ifadesinin kullanılabileceğine yönelik umut verici öncül sonuçlar elde edilmiştir.

6. KAYNAKÇA

- [1] C. M. Friedenreich, C. Ryder-Burbidge, and J. McNeil, “Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms,” *Mol. Oncol.*, vol. 15, no. 3, p. 790, Mar. 2021.
- [2] E. S. Lee and J. M. Lee, “Imaging diagnosis of pancreatic cancer: A state-of-the-art review,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 24, p. 7864, Jun. 2014.
- [3] “Pancreatic Cancer Stages.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>. [Accessed: 14-Dec-2022].
- [4] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021.
- [5] L. Rahib, B. D. Smith, R. Aizenberg, A. B. Rosenzweig, J. M. Fleshman, and L. M. Matrisian, “Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states,” *Cancer Res.*, vol. 74, no. 11, pp. 2913–2921, Jun. 2014.
- [6] D. Mahalingam, K. R. Kelly, R. T. Swords, J. Carew, S. T. Nawrocki, and F. J. Giles, “Emerging drugs in the treatment of pancreatic cancer,” <http://dx.doi.org/10.1517/14728210902972502>, vol. 14, no. 2, pp. 311–328, Jun. 2009.
- [7] Z. Li, R. Xu, and N. Li, “MicroRNAs from plants to animals, do they define a new messenger for communication?,” *Nutr. Metab. 2018 151*, vol. 15, no. 1, pp. 1–21, Oct. 2018.
- [8] Z. A. Syeda, S. S. S. Langden, C. Munkhzul, M. Lee, and S. J. Song, “Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 5, Mar. 2020.
- [9] O. Plotnikova, A. Baranova, and M. Skoblov, “Comprehensive Analysis of Human microRNA–mRNA Interactome,” *Front. Genet.*, vol. 10, p. 933, Oct. 2019.

- [10] D. Pramanik *et al.*, “Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 10, no. 8, p. 1470, Aug. 2011.
- [11] K. Yang *et al.*, “A decrease in miR-150 regulates the malignancy of pancreatic cancer by targeting c-Myb and MUC4,” *Pancreas*, vol. 44, no. 3, pp. 370–379, Apr. 2015.
- [12] S. Goel, M. J. DeCristo, S. S. McAllister, and J. J. Zhao, “CDK4/6 inhibition in cancer: beyond cell cycle arrest,” *Trends Cell Biol.*, vol. 28, no. 11, p. 911, Nov. 2018.
- [13] J. Ettl, “Palbociclib: First CDK4/6 Inhibitor in Clinical Practice for the Treatment of Advanced HR-Positive Breast Cancer,” *Breast Care*, vol. 11, no. 3, p. 174, Jul. 2016.
- [14] O. Rencuzogulları, P. O. Yerlikaya, A. Ç. Gürkan, E. D. Arısan, and D. Telci, “Palbociclib, a selective CDK4/6 inhibitor, restricts cell survival and epithelial-mesenchymal transition in Panc-1 and MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 121, no. 1, pp. 508–523, Jan. 2020.
- [15] B. Salvador-Barbero *et al.*, “CDK4/6 Inhibitors Impair Recovery from Cytotoxic Chemotherapy in Pancreatic Adenocarcinoma,” *Cancer Cell*, vol. 37, no. 3, pp. 340353.e6, Mar. 2020.
- [16] J. Kim, B. K. Koo, and J. A. Knoblich, “Human organoids: model systems for human biology and medicine,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020 2110, vol. 21, no. 10, pp. 571– 584, Jul. 2020.
- [17] I. F. Tannock and J. A. Hickman, “Limits to Personalized Cancer Medicine,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 375, no. 13, pp. 1289–1294, Sep. 2016.
- [18] S. Isaji *et al.*, “International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017,” *Pancreatology*, vol. 18, no. 1, pp. 2–11, Jan. 2018.
- [19] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2020,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 70, no. 1, pp. 7–30, Jan. 2020.

- [20] “HEALTH PROFILE TURKEY.” [Online]. Available: <https://www.worldlifeexpectancy.com/country-health-profile/turkey>. [Accessed: 13Dec-2022].
- [21] “Pancreatic Cancer Risk Factors.” [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/causes-risks-prevention/riskfactors.html>. [Accessed: 13-Dec-2022].
- [22] P. Rawla, T. Sunkara, and V. Gaduputi, “Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors,” *World J. Oncol.*, vol. 10, no. 1, pp. 10–27, 2019.
- [23] W. Luo, J. Tao, L. Zheng, and T. Zhang, “Current epidemiology of pancreatic cancer: Challenges and opportunities,” *Chinese J. Cancer Res.*, vol. 32, no. 6, p. 705, Dec. 2020.
- [24] H. feng Hu *et al.*, “Mutations in key driver genes of pancreatic cancer: molecularly targeted therapies and other clinical implications,” *Acta Pharmacol. Sin.* 2021 4211, vol. 42, no. 11, pp. 1725–1741, Feb. 2021.
- [25] K. Kong, M. Guo, Y. Liu, and J. Zheng, “Progress in Animal Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma,” *J. Cancer*, vol. 11, no. 6, p. 1555, 2020.
- [26] C. Joyce, A. Rayi, and A. Kasi, “Tumor-Suppressor Genes,” *StatPearls*, Aug. 2022.
- [27] G. M. Cooper, “Oncogenes,” 2000.
- [28] R. H. Hruban *et al.*, “Emerging Molecular Biology of Pancreatic Cancer,” *Gastrointest. Cancer Res.*, vol. 2, no. 2.
- [29] S. Eser, A. Schnieke, G. Schneider, and D. Saur, “Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer,” *Br. J. Cancer*, vol. 111, no. 5, p. 817, Aug. 2014.
- [30] J. H. Monkman, E. W. Thompson, and S. H. Nagaraj, “Targeting Epithelial Mesenchymal Plasticity in Pancreatic Cancer: A Compendium of Preclinical Discovery in a Heterogeneous Disease,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 11, Nov. 2019.
- [31] M. Miyaki and T. Kuroki, “Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 306, no. 4, pp. 799–804, Jul. 2003.

- [32] A. McGuigan, P. Kelly, R. C. Turkington, C. Jones, H. G. Coleman, and R. S. McCain, "Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes," *World J. Gastroenterol.*, vol. 24, no. 43, p. 4846, Nov. 2018.
- [33] H. Zhu, T. Li, Y. Du, and M. Li, "Pancreatic cancer: challenges and opportunities," *BMC Med.* 2018 161, vol. 16, no. 1, pp. 1–3, Nov. 2018.
- [34] A. M. Soweid, "The borderline resectable and locally advanced pancreatic ductal adenocarcinoma: Definition," *Endosc. Ultrasound*, vol. 6, no. Suppl 3, p. S76, Dec. 2017.
- [35] J. Zheng, A. Panaccia, and A. H. Zureikat, "Advances in the Surgical Treatment of Pancreatic Cancer," *Surg. Pathol. Clin.*, vol. 15, no. 3, pp. 479–490, Sep. 2022.
- [36] W. Park, A. Chawla, and E. M. O'Reilly, "Pancreatic Cancer: A Review," *JAMA*, vol. 326, no. 9, p. 851, Sep. 2021.
- [37] T. J. Ettrich and T. Seufferlein, "Systemic Therapy for Metastatic Pancreatic Cancer," *Curr. Treat. Options Oncol.*, vol. 22, no. 11, p. 106, Nov. 2021.
- [38] "Chemotherapy for Pancreatic Cancer." [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/treating/chemotherapy.html>. [Accessed: 15-Dec-2022].
- [39] M. Singh, N. Yelle, C. Venugopal, and S. K. Singh, "EMT: Mechanisms and therapeutic implications," *Pharmacol. Ther.*, vol. 182, pp. 80–94, Feb. 2018.
- [40] R. Kalluri and R. A. Weinberg, "The basics of epithelial-mesenchymal transition," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 6, p. 1420, Jun. 2009.
- [41] A. Datta *et al.*, "Cytoskeletal Dynamics in Epithelial-Mesenchymal Transition: Insights into Therapeutic Targets for Cancer Metastasis," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 8, Apr. 2021.
- [42] A. Hartsock and W. J. Nelson, "Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1778, no. 3, p. 660, 2008.
- [43] S. G. Pai *et al.*, "Wnt/beta-catenin pathway: Modulating anticancer immune response," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, May 2017.

- [44] C. Gilles, D. F. Newgreen, H. Sato, and E. W. Thompson, “Matrix Metalloproteases and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Implications for Carcinoma Metastasis,” 2013.
- [45] M. Ravi, V. Paramesh, S. R. Kaviya, E. Anuradha, and F. D. Paul Solomon, “3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 230, no. 1, pp. 16–26, Jan. 2015.
- [46] J. Lee, M. J. Cuddihy, and N. A. Kotov, “Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art.”
- [47] S. Alhaque, M. Themis, and H. Rashidi, “Three-dimensional cell culture: from evolution to revolution,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 373, no. 1750, Jul. 2018.
- [48] C. Corrò, L. Novellademunt, and V. W. Li, “A brief history of organoids,” *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 319, pp. 151–165, 2020.
- [49] T. Takahashi, “Organoids for Drug Discovery and Personalized Medicine,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 59, pp. 447–462, Jan. 2019.
- [50] R. Z. Lin and H. Y. Chang, “Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research,” *Biotechnol. J.*, vol. 3, no. 9–10, pp. 1172–1184, Oct. 2008.
- [51] M. Kapałczyńska *et al.*, “2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures,” *Arch. Med. Sci.*, vol. 14, no. 4, pp. 910–919, 2018.
- [52] Y. Fang and R. M. Eglen, “Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development,” *Slas Discov.*, vol. 22, no. 5, p. 456, Jun. 2017.
- [53] K. Duval *et al.*, “Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture,” *Physiology*, vol. 32, no. 4, pp. 266–277, Jun. 2017.
- [54] J. Drost and H. Clevers, “Organoids in cancer research,” *Nat. Rev. Cancer* 2018 187, vol. 18, no. 7, pp. 407–418, Apr. 2018.
- [55] X. Qian, H. Song, and G. L. Ming, “Brain organoids: advances, applications and challenges,” *Development*, vol. 146, no. 8, Apr. 2019.
- [56] C. A. Trujillo and A. R. Muotri, “Brain Organoids and the Study of Neurodevelopment,” *Trends Mol. Med.*, vol. 24, no. 12, pp. 982–990, Dec. 2018.

- [57] E. Velliou, P. Gupta, C. Ricci, and S. Danti, “Biomaterial-based in vitro models for pancreatic cancer,” *Biomater. 3D Tumor Model.*, pp. 235–249, Jan. 2020.
- [58] H. Clevers, “Modeling Development and Disease with Organoids,” *Cell*, vol. 165, no. 7, pp. 1586–1597, Jun. 2016.
- [59] L. Huang *et al.*, “Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids,” *Nat. Med.*, vol. 21, no. 11, pp. 1364–1371, Nov. 2015.
- [60] D. Gao *et al.*, “Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer,” *Cell*, vol. 159, no. 1, pp. 176–187, Sep. 2014.
- [61] N. L. C. Phan *et al.*, “Hopea odorata Extract Can Efficiently Kill Breast Cancer Cells and Cancer Stem-Like Cells in Three-Dimensional Culture More Than in Monolayer Cell Culture,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1292, pp. 145–155, 2020.
- [62] N. Sachs *et al.*, “A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity,” *Cell*, vol. 172, no. 1–2, pp. 373–386.e10, Jan. 2018.
- [63] A. Barbáchano *et al.*, “Organoids and Colorectal Cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 11, Jun. 2021.
- [64] S. L. Ryan *et al.*, “Drug Discovery Approaches Utilizing Three-Dimensional Cell Culture,” *Assay Drug Dev. Technol.*, vol. 14, no. 1, pp. 19–28, Jan. 2016.
- [65] Q. Chen and Y. Wang, “The application of three-dimensional cell culture in clinical medicine,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 42, no. 11, pp. 2071–2082, Nov. 2020.
- [66] E. T. Verjans, J. Doijen, W. Luyten, B. Landuyt, and L. Schoofs, “Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort?,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 4, pp. 2993–3003, Apr. 2018.
- [67] R. L. Schilsky, “Implementing personalized cancer care,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2014 117, vol. 11, no. 7, pp. 432–438, Apr. 2014.
- [68] F. A. Sinicrope, K. Okamoto, P. M. Kasi, and H. Kawakami, “Molecular Biomarkers in the Personalized Treatment of Colorectal Cancer,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 14, no. 5, pp. 651–658, May 2016.

- [69] E. S. Kim and K. J. Pandya, “Advances in personalized therapy for lung cancer,” <http://dx.doi.org/10.1517/17530059.2013.826645>, vol. 7, no. 5, pp. 475–485, 2013.
- [70] N. Marino *et al.*, “Breast Cancer Metastasis: Issues for the Personalization of Its Prevention and Treatment,” *Am. J. Pathol.*, vol. 183, no. 4, pp. 1084–1095, Oct. 2013.
- [71] H. Aboulkheyr Es, L. Montazeri, A. R. Aref, M. Vosough, and H. Baharvand, “Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach,” *Trends Biotechnol.*, vol. 36, no. 4, pp. 358–371, Apr. 2018.
- [72] H. Tiriach *et al.*, “Organoid profiling identifies common responders to chemotherapy in pancreatic cancer,” *Cancer Discov.*, vol. 8, no. 9, p. 1112, Sep. 2018.
- [73] P. O. Frappart *et al.*, “Pancreatic cancer-derived organoids – a disease modeling tool to predict drug response,” *United Eur. Gastroenterol. J.*, vol. 8, no. 5, p. 594, Jun. 2020.
- [74] I. Romero-Calvo *et al.*, “Human Organoids Share Structural and Genetic Features with Primary Pancreatic Adenocarcinoma Tumors,” *Mol. Cancer Res.*, vol. 17, no. 1, p. 70, Jan. 2019.
- [75] E. Driehuis *et al.*, “Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 52, pp. 26580–26590, Dec. 2019.
- [76] J. O’Brien, H. Hayder, Y. Zayed, and C. Peng, “Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 9, no. AUG, p. 402, Aug. 2018.
- [77] S. M. Hammond, “An overview of microRNAs,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 87, p. 3, Jun. 2015.
- [78] A. Z. Daoud, E. J. Mulholland, G. Cole, and H. O. McCarthy, “MicroRNAs in Pancreatic Cancer: biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators,” *BMC Cancer*, vol. 19, no. 1, Nov. 2019.
- [79] M. M. Naeini and A. M. Ardekani, “Noncoding RNAs and Cancer,” *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, vol. 1, no. 2, p. 55, Jul. 2009.

- [80] R. Rupaimoole and F. J. Slack, "MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases," *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017 163, vol. 16, no. 3, pp. 203–222, Feb. 2017.
- [81] A. M. Ardekani and M. M. Naeini, "The Role of MicroRNAs in Human Diseases," *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, vol. 2, no. 4, p. 161, Oct. 2010.
- [82] E. KURAR Necmettin Erbakan Üniversitesi *et al.*, "Atatürk Üniversitesi Vet. Bil MikroRNA Biyogenezi," *Derleme/Review*, vol. 10, no. 3, pp. 211–218, 2015.
- [83] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, and S. Diederichs, "R E V I E W Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation," 2009.
- [84] M. T. Bohnsack, K. Czapinski, and D. Görlich, "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs," *RNA*, vol. 10, no. 2, p. 185, Feb. 2004.
- [85] M. E. Peter, "Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step," *Oncogene* 2010 2915, vol. 29, no. 15, pp. 2161–2164, Mar. 2010.
- [86] T. Treiber, N. Treiber, and G. Meister, "Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018 201, vol. 20, no. 1, pp. 5–20, Sep. 2018.
- [87] J. J. Forman and H. A. Collier, "The code within the code: microRNAs target coding regions," *Cell Cycle*, vol. 9, no. 8, p. 1533, Apr. 2010.
- [88] F. Wang, X. Ren, and X. Zhang, "Role of microRNA-150 in solid tumors (review)," *Oncol. Lett.*, vol. 10, no. 1, pp. 11–16, Jul. 2015.
- [89] H. Wang *et al.*, "microRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1," *BMC Cancer*, vol. 19, no. 1, Jul. 2019.
- [90] Y. Huang *et al.*, "Development of a novel necroptosis-associated miRNA risk signature to evaluate the prognosis of colon cancer patients," *Ann. Transl. Med.*, vol. 9, no. 24, pp. 1800–1800, Dec. 2021.
- [91] X. Xu, L. Cao, Y. Zhang, H. Lian, Z. Sun, and Y. Cui, "MicroRNA-1246 inhibits cell invasion and epithelial mesenchymal transition process by targeting CXCR4 in lung cancer cells," *Cancer Biomark.*, vol. 21, no. 2, pp. 251–260, Feb. 2018.

- [92] P. Magee, L. Shi, and M. Garofalo, "Role of microRNAs in chemoresistance," *Ann. Transl. Med.*, vol. 3, no. 21, p. 332, Dec. 2015.
- [93] L. S. Normann *et al.*, "MicroRNA in combination with HER2-targeting drugs reduces breast cancer cell viability in vitro," *Sci. Reports* |, vol. 11, p. 10893, 123AD.
- [94] C. Panebianco *et al.*, "Improving gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cells by restoring mirna-217 levels," *Biomolecules*, vol. 11, no. 5, 2021.
- [95] "MIR150 microRNA 150 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406942>. [Accessed: 15-Dec-2022].
- [96] "Homo sapiens (human) hsa-miR-150-5p | URS000016FD1A." [Online]. Available: <https://rnacentral.org/rna/URS000016FD1A/9606>. [Accessed: 15-Dec-2022].
- [97] "miRNA Entry for MI0000479." [Online]. Available: https://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000479. [Accessed: 15-Dec-2022].
- [98] "TargetscanHuman 7.1: predicted miRNA targets of miR-150-5p." [Online]. Available: https://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_71/targetscan.cgi?mirg=hsa-miR-150-5p. [Accessed: 15-Dec2022].
- [99] S. M. Akula, P. Bolin, and P. P. Cook, "Cellular miR-150-5p may have a crucial role to play in the biology of SARS-CoV-2 infection by regulating nsp10 gene," *RNA Biol.*, vol. 19, no. 1, p. 1, 2022.
- [100] H. Li *et al.*, "MicroRNA-150 serves as a diagnostic biomarker and is involved in the inflammatory pathogenesis of Parkinson's disease," *Mol. Genet. Genomic Med.*, vol. 8, no. 4, Apr. 2020.
- [101] H. Li *et al.*, "MiR-150 promotes cellular metastasis in non-small cell lung cancer by targeting FOXO4," *Sci. Rep.*, vol. 6, Dec. 2016.
- [102] Z. Zhang, J. Wang, J. Li, X. Wang, and W. Song, "MicroRNA-150 promotes cell proliferation, migration, and invasion of cervical cancer through targeting PDCD4," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 97, pp. 511–517, Jan. 2018.

- [103] S. K. Srivastava *et al.*, “MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells,” *Carcinogenesis*, 2011.
- [104] X. Hong and J. J. Yu, “MicroRNA-150 suppresses epithelial-mesenchymal transition, invasion, and metastasis in prostate cancer through the TRPM4-mediated β -catenin signaling pathway,” *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 316, no. 4, pp. C463–C480, Apr. 2019.
- [105] W. Tang *et al.*, “MicroRNA-150 suppresses triple-negative breast cancer metastasis through targeting HMGA2,” *Onco. Targets. Ther.*, vol. 11, pp. 2319–2332, Apr. 2018.
- [106] K. A. Schafer, “The cell cycle: a review,” *Vet. Pathol.*, vol. 35, no. 6, pp. 461–478, 1998.
- [107] P. Łukasik, M. Załuski, and I. Gutowska, “Cyclin-Dependent Kinases (CDK) and Their Role in Diseases Development–Review,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 6, pp. 1–33, Mar. 2021.
- [108] K. J. Barnum and M. J. O’Connell, “Cell Cycle Regulation by Checkpoints,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1170, p. 29, 2014.
- [109] Y. J. Choi and L. Anders, “Signaling through cyclin D-dependent kinases,” *Oncogene* 2014 3315, vol. 33, no. 15, pp. 1890–1903, May 2013.
- [110] “Relevance of cyclin D1 and other molecular markers to cancer chemoprevention - Weinstein - 1996 - Journal of Cellular Biochemistry - Wiley Online Library.” [Online]. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-4644%281996%2925%2B%3C23%3A%3AAID-JCB3%3E3.0.CO%3B2-4>. [Accessed: 15-Dec-2022].
- [111] E. Tashiro, A. Tsuchiya, and M. Imoto, “Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression,” *Cancer Sci.*, vol. 98, no. 5, pp. 629–635, May 2007.
- [112] G. Arslan, T. Önköl, and A. B. Özçelik, “SİKİLİN BAĞIMLI KİNAZ 4/6 VE İNHİBİTÖRLERİ CYCLIN DEPENDENT KINASE 4/6 AND INHIBITORS,” *Ankara Ecz. Fak. Derg. / J. Fac. Pharm. Ankara*, vol. 46, no. 1, pp. 193–208, 2022.

- [113] S. Lim and P. Kaldis, “Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation,” *Development*, vol. 140, no. 15, pp. 3079–3093, Aug. 2013.
- [114] W. H. Liggett and D. Sidransky, “Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 16, no. 3, pp. 1197–1206, 1998.
- [115] J. M. Suski, M. Braun, V. Strmiska, and P. Sicinski, “Targeting Cell-cycle Machinery in Cancer,” *Cancer Cell*, vol. 39, no. 6, p. 759, Jun. 2021.
- [116] B. O’Leary, R. S. Finn, and N. C. Turner, “Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016 137, vol. 13, no. 7, pp. 417–430, Mar. 2016.
- [117] S. L. Groenland *et al.*, “Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Cyclin-Dependent Kinase 4 and 6 Inhibitors Palbociclib, Ribociclib, and Abemaciclib,” *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 59, no. 12, pp. 1501–1520, Dec. 2020.
- [118] “Palbociclib (IBRANCE) | FDA.” [Online]. Available: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/palbociclib-ibrance>. [Accessed: 15-Dec-2022].
- [119] M. Ehab and M. Elbaz, “Profile of palbociclib in the treatment of metastatic breast cancer,” *Breast Cancer Targets Ther.*, vol. 8, pp. 83–91, May 2016.
- [120] F. Schettini *et al.*, “CDK 4/6 Inhibitors as Single Agent in Advanced Solid Tumors,” *Front. Oncol.*, vol. 8, p. 608, 2018.
- [121] R. Foty, “A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids,” *J. Vis. Exp.*, vol. 51, no. 51, 2011.
- [122] C. Wu *et al.*, “PARP and CDK4/6 Inhibitor Combination Therapy Induces Apoptosis and Suppresses Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 20, no. 9, pp. 1680–1691, Sep. 2021.
- [123] G. L. Rampioni Vinciguerra *et al.*, “p27kip1 expression and phosphorylation dictate Palbociclib sensitivity in KRAS-mutated colorectal cancer,” *Cell Death Dis.*, vol. 12, no. 10, Oct. 2021.
- [124] J. P. Leonard *et al.*, “Selective CDK4/6 inhibition with tumor responses by PD0332991 in patients with mantle cell lymphoma,” *Blood*, vol. 119, no. 20, pp. 4597–4607, May 2012.

- [125] M. A. Dickson *et al.*, “Phase II trial of the CDK4 inhibitor PD0332991 in patients with advanced CDK4-amplified well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 16, pp. 2024–2028, Jun. 2013.
- [126] P. K. Gopalan, M. C. Pinder, A. Chiappori, A. M. Ivey, A. G. Villegas, and F. J. Kaye, “A phase II clinical trial of the CDK 4/6 inhibitor palbociclib (PD 0332991) in previously treated, advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with inactivated CDKN2A,” https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.8077, vol. 32, no. 15_suppl, pp. 8077–8077, May 2014.
- [127] K. T. Flaherty *et al.*, “Phase I, dose-escalation trial of the oral cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor PD 0332991, administered using a 21-day schedule in patients with advanced cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 2, pp. 568–576, Jan. 2012.
- [128] Z. J. Yuan, C. Yu, X. F. Hu, Y. He, P. Chen, and S. X. Ouyang, “LINC00152 promotes pancreatic cancer cell proliferation, migration and invasion via targeting miR-150,” *Am. J. Transl. Res.*, 2020.
- [129] S. Borowicz *et al.*, “The Soft Agar Colony Formation Assay,” *J. Vis. Exp.*, no. 92, p. 51998, Oct. 2014.
- [130] Ö. Rencüzoğullari and E. D. Arisan, “Palbociclib suppresses the cancer stem cell properties and cell proliferation through increased levels of miR-506 or miR-150 in Panc-1 and MiaPaCa-2 cells,” *Turkish J. Biol.*, vol. 46, no. 5, pp. 342–360, Jan. 2022.
- [131] H. K. Kleinman and G. R. Martin, “Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 15, no. 5, pp. 378–386, Oct. 2005.
- [132] M. Muguruma *et al.*, “Differences in drug sensitivity between two-dimensional and three-dimensional culture systems in triple-negative breast cancer cell lines,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 533, no. 3, pp. 268–274, Dec. 2020.
- [133] D. Medici, E. D. Hay, and B. R. Olsen, “Snail and slug promote epithelial-mesenchymal transition through β -catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor- β 3,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, no. 11, pp. 4875–4887, Nov. 2008.

- [134] N. Gagliano *et al.*, “Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma: Characterization in a 3D-cell culture model,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 22, no. 18, p. 4466, May 2016.
- [135] F. Fontana, M. Raimondi, M. Marzagalli, M. Sommariva, P. Limonta, and N. Gagliano, “Epithelial-To-Mesenchymal Transition Markers and CD44 Isoforms Are Differently Expressed in 2D and 3D Cell Cultures of Prostate Cancer Cells,” *Cells*, vol. 8, no. 2, Feb. 2019.
- [136] O. Schmalhofer, S. Brabletz, and T. Brabletz, “E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 28, no. 1–2, pp. 151–166, 2009.
- [137] E. P. Kopantzev, M. R. Kopantseva, E. V. Grankina, A. Mikaelyan, V. I. Egorov, and E. D. Sverdlov, “Activation of IGF/IGF-IR signaling pathway fails to induce epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells,” *Pancreatology*, vol. 19, no. 2, pp. 390–396, Mar. 2019.
- [138] S. Wang, S. Huang, and Y. L. Sun, “Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer: A Review,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, 2017.
- [139] V. Ellenrieder *et al.*, “ROLE OF MT-MMPs AND MMP-2 IN PANCREATIC CANCER PROGRESSION,” *J. Cancer*, vol. 85, pp. 14–20, 2000.
- [140] E. Gheytanchi *et al.*, “Morphological and molecular characteristics of spheroid formation in HT-29 and Caco-2 colorectal cancer cell lines,” *Cancer Cell Int.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–16, Dec. 2021.
- [141] G. Xu, F. Yin, H. Wu, X. Hu, L. Zheng, and J. Zhao, “In vitro ovarian cancer model based on three-dimensional agarose hydrogel,” *J. Tissue Eng.*, vol. 5, Jan. 2014.
- [142] E. J. Silva, P. P. Argyris, X. Zou, K. F. Ross, and M. C. Herzberg, “S100A8/A9 regulates MMP-2 expression and invasion and migration by carcinoma cells,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 55, p. 279, 2014.

7. EKLER

7.1. EK A: Cihaz Listesi

Tablo 7.1. Kullanılan Cihazların Listelenmesi

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMANIN ADI
Buharlı Sterilizatör	OT 90L	Nüve
Buz Makinesi	AF80	Scotsman
CO ₂ inkübatörü	50116047	Thermo Fsiher Scientific
Çalkalayıcı	GyroTwister	Labnet
Derin Dondurucu	Ultra Low Temperature Freezer (ULTF)	ARCTIKO
Dikey Jel Elektrophorezi Sistemi	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad
Distile Su Cihazı	Tank 30 Liter PE/Milipore	Labor Teknik
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer Innova U725	New Brunswick Scientific
Elektrophorez Donanımları		BioRad
Floresan Mikroskop	IX71	Olympus
Gerçek Zamanlı PZR Cihazı	CFX Connect	BioRad
Güç Kaynağı	PowerPac Basic	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Hemositometre	Neubauer Improved	Assistent Germany
Isıtıcı Blok	HB120-S	DLAB
İnvert Mikroskop	Model adı: XDS-1B	SOIF
Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı	ChemiDoc MP System 1708280	BioRad
Kuru Hava Sterilizatör	FN120	Nüve
Laminar Flow	HERASAFE KS	Thermo Scientific
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart
Mikrodalga Fırın	MD 595	Arçelik
Mikropipetler 10 µl, 200 µl, 1000 µl		CAPP
Mikroplaka Okuyucu	iMark	BioRad
Mini Santrifüj Cihazı	CR-1512	CAPP
Mini Spin Cihazı	Fisherbrand 15358266	ThermoFisher Scientific
Optik Mikroskop	TH4-200	Olympus
Otoklav	OT032	Nüve
Otomatik Hücre Sayacı	EVE™/EVE-MC	NanoEntek
pH Metre	Orion STAR A211	Thermo Scientific

pH Metre	Seven Easy	Mettler Toledo
PCR Kapakları, Stripler	AB-0783	Thermo Scientific
Saf Su Cihazı	Direct-Q 5UV	Labor Teknik
Santrifüj	NF 200	Nüve
Silindir Döndürücü	SRT6D	Stuart
Spektrofotometre	IMPLEN NanoPhotometer	BO-GA
Su Banyosu	BM302	Nüve
Termal Döngüleyici	MyCycler Thermal Cycler	BioRad
Üstten Donduruculu Buzdolabı	KSU40631NE	Bosch
Yüksek Hızlı Santrifüj	5430 R	Eppendorf



7.2. EK B: Hücre Kültürü Donanım Listesi

Tablo 7.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Donanımların Listesi

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMANIN ADI
Capan-2	HTB-80	ATCC
MIAPaCa-2	CRL-1420	ATCC
Eğimli Boyun 25 cm ² Hücre Büyütme Kapları	707001	NEST
25 cm ² Hücre Büyütme Kapları	90026	TPP
75 cm ² Hücre Büyütme Kapları	90076	TPP
40 mm Hücre Büyütme Kapları	93040	TPP
60 mm Hücre Büyütme Kapları	93060	TPP
100 mm Hücre Büyütme Kapları	704001	NEST
150 mm Hücre Büyütme Kapları	715001	NEST
Kriyojenik Şişe	607001	NEST
96 Kuyucuklu Hücre Kabı	92096	TPP
15 ml Santrifüj Tüpleri	5100015	CAPP
50 ml Santrifüj Tüpleri	430828	CORNING
DMEM	P04-03590	PAN Biotech
Fetal Sığır Serumı Gelişmiş (FBS)	FBS-11A	Capricorn Scientific
miScript miRNA Mimic		Qiagen
Palbosiklib (PD-0332991) HCl	S1116	Selleck Chemicals
Penisilin/Streptomisin	P06-07100	PAN Biotech
Serolojik Pipet (10 ml)	SP-10-C	CAPPHarmony
Transfeksiyon Ajanı	15081	İNtRON BIOTECHNOLOGY
Tripsin-EDTA (0.25%) (1X)	SH40003.01	HyClone

7.3. EK C: Kimyasal Listesi

Tablo 7.3.1. Kullanılan Kimyasalların Listesi

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMANIN ADI
Agaroz (Tip 1)	121853	MERCK
Akrilamid/Bis-Akrilamid (%30 çözelti, 37.5:1)	A0011	BIOBASIC
APS	A2941	AppliChem
Asetik Asit	901.013	ISOLAB
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution	1610436	BioRad
DEPC	A0881	AppliChem
DMSO	D1370	Duchefa Biochemie
1 kb DNA Ladder	GeneRuler SM0311	Thermo Scientific
DNA Jel Yükleme Boyası (6X)	R0611	Thermo Scientific
DPBS (10x)	P04-53500	PAN Biotech
Etanol	TK.200650	Teksoll
Glisin	1275KG001	BIOFROXX
Hidrojen Peroksit %35	1086001000	MERCK
iScript cDNA Sentez Kit	1708891	BioRad
2-Propanol (İzopropanol)	1096342500	MERCK
Metanol	34860	Honeywell
miRNeasy Mini Kit	217004	Qiagen
miScript II RT Kit	218161	Qiagen
miScript SYBR Green PCR Kit	218073	Qiagen
Kloroform	1024452500	MERCK
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK
Luminol	A2185	AppliChem
M-PER Memeli Protein Ekstraksiyon Reaktifi	78505	ThermoFisher Scientific

p-Kumarik Asit	C9008-1G	Sigma-Aldrich
Ponceau S Solüsyonu	A2935	Applichem
Proteaz İnhibitör Kokteyli	87786	ThermoFisher Scientific
Proteaz İnhibitör Tablet (EDTA içermeyen)	A32955	ThermoFisher Scientific
Protein Marker	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 26619	Thermo Scientific
PureZOL RNA İzolasyon Ajanı	7326890	BioRad
Saf Etanol	920.026	ISOLAB
SDS	1177GR100	BIOFROXX
Sybr Safe	MG-SSGD-01-1000	Hibrogen
TEMED	8027ML100	BIOFROXX
Tris Hidroklorür	648317	CALBIOCHEM
Tween-20	A600560-0500	Sangon Biotech
Yağsız Süt Tozu	1172KG001	BIOFROXX

Tablo 7.3.2. %12'lik SDS-PAGE Jel Hazırlama (1 Jel İçeriği)

%12'lik Jel İçeriği	Ayırma Jeli (Alt jel)	Yürütme Jeli (Üst Jel)
dH₂O	1,7 ml	1,5 ml
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	1,25 ml	-
0,5M Tris-HCl (pH 6.8)	-	625 µl
%10 SDS	50 µl	25 µl
Akrilamid/bisakri	2 ml	335 µl
Amonyum persülfat (APS, %10)	40 µl	25 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl

Tablo 7.3.3. Kullanılan Primer Dizileri

Gen İsmi	Forward Primer Dizisi	Reverse Primer Dizisi
E-Kaderin	5'ATTTTTCCTCGACACCCGAT3'	5'TCCCAGGCGTAGACCAAGA3'
MMP-2	5'GATACCCCTTTGACGGTAAGGA3'	5'CCTTCTCCCAAGGTCCATAGC3'
Snail1	5'ACTGCAACAAGGAATACCTCAG3'	5'GCACTGGTACTTCTTGACATCTG3'
Twist1	5'GTCCGCAGTCTTACGAGGAG3'	5'GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT3'
β -Aktin	5'TTCCTGGG...GGAGTCCT3'	5'AGGAGGAG...TCTTGATC3'

Tablo 7.3.4. Kullanılan Antikorlar

Antikor İsmi	Katalog Numarası	Firmanın Adı
Anti-rabbit HRP-linked	7074	Cell Signaling Technology
E-Kaderin	24E10	Cell Signaling Technology
GAPDH	607904	BioLegend
PARP	9542	Cell Signaling Technology
Vimentin	D21H3	Cell Signaling Technology
ZEB1	D80D3	Cell Signaling Technology
β -Aktin	664804	BioLegend
β -Katenin	D10A8	Cell Signaling Technology

7.4. EK D: Kullanılan Tamponların İçeriği

- Amonyum Persülfat (%10)

1 g tartılan APS 10 ml distile su ile çözündürülür. Hazırlanan çözelti -20°C’de saklanır.

- Bloklama sütü (%5)

50 ml olarak hazırlanan bloklama sütü için 2,5 g tartılan yağsız süt tozu TBS-T (TBSTween20) ile tamamlanarak karıştırıcı yardımı ile çözünür.

- Bradford Reaktifi

Ana stok 100 mg Coomassie Brilliant Blue(G-250) boyası, %95’lik etanolden 50 ml, %85’lik fosforik asitten 100 ml, 1000 ml distile su içerisinde çözünür. Tamamen çözünen ana stok 0,22 µm por çapına sahip filtreler yardımı ile süzülür ve alüminyum folyo ile kaplanarak +4°C’de saklanır.

- Etanol (%70)

500 ml olarak hazırlanan çözeltide 350 ml saf etanol 150 distile su ile dilüe edilerek kullanılır.

- Hücre Besiyeri

DMEM besiyeri (500 ml) içerisine 0,22 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek kullanılan %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 Penisilin/Streptomisin eklenerek hazırlanır. Kullanıma hazır olarak 50 ml santrifüj tüpler içerisinde +4°C’de saklanır.

- Hücre Dondurma Medyası

9 ml fetal sığır serumuna (FBS) ve 1 ml dimetil sülfoksit (DMSO) içeren hücre dondurma medyası 0,22 µm por çapına sahip filtre ile süzülerek hazırlanır ve medya 20°C’de saklanır.

- Kemilüminesans Membran Görüntüleme Çözeltisi

Görüntüleme için A ve B olmak üzere iki çözelti hazırlanır. A çözeltisi, 9 ml distile suya 1 ml 1M Tris-HCl pH=8,5 ardından 50 µl Kumarik asit ve 200 µl Luminol eklenerek hazırlanır. B çözeltisinde ise 9 ml distile suya 1 ml 1M Tris-HCl pH=8,5 ardından 10 µl Hidrojen Peroksit eklenerek hazırlanır.

- Kristal Viyole

Kristal viyole 0,05 gr tartılarak 2,5 ml %100 metanol içerisinde eklenir ve distile su eklenerek solüsyon 10 ml'e tamamlanır.

- Kumarik Asit

0,15 g tartılan Kumarik asit 10 ml etanol ile çözündürülür ve +4°C'de saklanır.

- Laemmli (5X) Tamponu

10 ml olarak hazırlanacak Laemmli yükleme tamponu; 2 ml Tris-Cl çözeltisi (1,5 M, pH=6,8), 0,5 ml Bromofenol mavisi (%1), 5 ml Gliserol, 2,5 ml β -merkaptoetanol, 2,0 gr SDS içermektedir. Hazırlandıktan sonra -20°C'de saklanır.

- Luminol

0,44 g tartılan Luminol 10 ml dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözündürülür ve -20°C'de alüminyum ile sarılarak saklanır.

- Mild Strip Tamponu

1l için tartılan 15 g Glisin ve 1 g SDS ile 10 ml Tween 20, 800 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanarak çözündürülür ve pH'ı 2,2 olarak ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'e tamamlanarak hazırlanır.

- Memeli Hücre Lizis Tamponu (CLB)

10 ml M-PER memeli protein ekstraksiyon reaktifi içerisinde 1X dilüe edilerek eklenen proteaz inhibitör kokteyli ile hazırlanan hücre lizis tamponu +4°C'de saklanır.

- Palbosiklib

10 mM ana stok dH₂O içinde çözülerek hazırlanır. 1:10 dilüe edilerek kullanıldı.

- SDS (%10)

1 g tartılan SDS 10 ml distile su içerisinde çözünerek hazırlanır.

- 5X TBE

800 ml distile su içerisinde alınan 54 g Tris baz, 27,5 Borik asit ve 20 ml 0,5 M EDTA, pH= 8 olarak ayarlandıktan sonra çözelti 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanır. Ana stok konsantrasyonu 5X olarak hazırlandıktan sonra kullanılmak üzere 1X TBE'e çevrilir.

- 10X TBS

5,6 g Tris-baz, 88 g NaCl ve 24 g Tris-HCl 900 ml’de manyetik karıştırıcı kullanılarak çözülür. 5M HCl ve 5M NaOH yardımı ile pH=7,6 olarak ayarlanır ve çözelti 1000 ml’ye tamamlanarak hazırlanır. Ana stok olarak hazırlanan 10X TBS, distile su ile 1X TBS’e çevrilir.

- 1X TBS-T

10X TBS’ten çevrilen 1X TBS’e Tween 20 eklenerek hazırlanır.

- Transfer Tamponu (10X)

10X ana stok transfer çözeltisinden 1l hazırlamak için 30,3 g Tris-Baz, 144 g Glisin tartılır ve önce 800 ml distile su ile manyetik karıştırıcı kullanılarak çözülür. 8 ila 9 pH aralığında ayarlandıktan sonra 1000 ml’ye tamamlanır. 1X’e çevirirken 100 ml transfer tamponuna 700 ml distile eklendikten sonra 200 ml metanol eklenerek 1000 ml’ye tamamlanır.

- Yürütme tamponu (10X)

1l 10X ana stok hazırlanması için 30,3 g Tris Baz, 144 g Glisin ve 10 g Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) tartılır ve önce 800 ml distile su ile çözülür. 8 ila 9 pH aralığında ayarlandıktan sonra 1000 ml’ye tamamlanarak hazırlanan ana stok, distile su ile 1X’e çevrilerek kullanılır.