



**NÖRAL KREST HÜCRELERİ İLE BİRLİKTE KÜLTÜRE EDİLEN
PANKREAS ORGANOİDLERİNDE İNNERVASYONUN BELİRLENMESİ**

Hüseyin Erdinç BEŞİKCİOĞLU

**DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EKİM 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Hüseyin Erdiç BEŞİKCİOĞLU

11/10/2021

NÖRAL KREST HÜCRELERİ İLE BİRLİKTE KÜLTÜRE EDİLEN PANKREAS ORGANOİDLERİNDE İNNERVASYONUN BELİRLENMESİ

(Doktora Tezi)

Hüseyin Erdinç BEŞİKCİOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ekim 2021

ÖZET

Pankreas sempatik ve parasempatik sinir lifleri tarafından yoğun olarak innerve edilen bir organ olmasına karşın pankreas organoidleri yalnızca epitelyal hücre türevlerinden oluşmaktadır. Pankreas kanserinde, nöronlar ile nöral olmayan pankreas hücreleri arasında nöral plastisite ile karakterize çift yönlü bir ilişki mevcuttur. Bu tez çalışmasında ilk olarak "innerve pankreas organoidleri" oluşturmak ve bu organoidlerde pankreatik nöropatiyi incelemek amaçlanmıştır. Bu amaçla, normal C57BL/6 ve $Kras^{+/LSLG12D} Trp53^{fl/fl} p48^{+/Cre}$ (KPC) farelerden pankreas organoidleri izole edildi ve bu organoidler ayrı ayrı, insan kaynaklı uyarılmış pluripotent kök hücreleri (UPKH) farklandırarak elde edilen nöral krest hücreleriyle (NKH) ve C57BL/6 yenidoğan farelerden izole edilen dorsal kök gangliyonu (DKG) birlikte kültüre edildi. Birlikte kültürün yaklaşık 3. gününden itibaren, pankreas organoidleriyle birlikte kültüre edilen NKH'lerin nöronal morfoloji sergilediği ve pankreas organoidleriyle birlikte kültüre edilen DKG'ların nöronal uzantılarının ortaya çıkmaya başladığı görüldü. Birlikte kültürler 7. gün sonlandırılarak örnekler Anti-E-cadherin, Anti- β 3-Tubulin ve Anti-GFAP antikorları ile wholemount IF yöntemiyle işaretlenerek ve konfokal mikroskopisi ile görüntülendi. Her iki birlikte kültür modelinde de β 3-Tubulin pozitif nöronların gelişerek uzantılarının E-cadherin pozitif organoidlere doğru yöneldiği ve kısmen etkileşime girdiği görüldü. Geliştirilen innerve pankreas organoidleri pankreatik nöropati açısından incelendiğinde, KPC pankreas organoidlerinin hem NKH hem de DKG birlikte kültürü neticesinde oluşan innerve organoid modellerinde nöral plastisiteyi artırdığı belirlendi. Bu çalışmada literatürde ilk kez NKH'den türetilen nöronların veya DKG kökenli olgun nöronların pankreas organoidlerinin innervasyonuna yol açabileceği ve pankreas kanseri mikroçevresinde nöron-ekzokrin hücre etkileşiminin modülasyonu ile sonuçlanabileceği gösterildi.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : Organoid, Nöral krest, Pankreas kanseri, Pankreatik nöropati
Sayfa Adedi : 81
Danışman : Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL

DETERMINATION OF INNERVATION IN PANCREAS ORGANIDS CO-CULTURED WITH NEURAL CREST CELLS

(Ph. D. Thesis)

Hüseyin Erdinç BEŞİKCİOĞLU

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

October 2021

ABSTRACT

Although, the pancreas is an organ intensely innervated by sympathetic and parasympathetic nerve fibers, pancreatic organoids consist only of epithelial cell derivatives. In pancreatic cancer, there is a bidirectional relationship between neurons and non-neural pancreatic cells characterized by neural plasticity. In this thesis, it was first aimed to create "innervated pancreatic organoids" and to examine pancreatic neuropathy in these organoids. For this purpose, pancreatic organoids were isolated from normal C57BL/6 and $Kras^{+/LSLG12D}$ $Trp53^{fl/fl}$ $p48^{+/Cre}$ (KPC) mice, and these organoids were respectively co-cultured with human induced pluripotent stem cells (hiPSC) derived neural crest cells (NCCs) and dorsal root ganglion (DRG) isolated from C57BL/6 neonatal mice. It was observed that NCCs co-cultured with pancreatic organoids exhibited neuronal morphology and neuronal extensions of DRGs co-cultured with pancreatic organoids began to emerge on the 3rd day of co-culturing. The co-cultures were terminated on the 7th day and the samples were labeled with Anti-E-cadherin, Anti- β 3-Tubulin and Anti-GFAP antibodies with the wholemount IF method and visualized by confocal microscopy. In both co-culture models, it was observed that β 3-Tubulin positive neurons developed and their extensions directed towards E-cadherin positive organoids and partially interacted. When the developed innervated pancreatic organoids were examined in terms of pancreatic neuropathy, it was determined that KPC pancreatic organoids increased neural plasticity in innervated organoid models formed as a result of both NCCs and DRG co-culture. In this study, it was shown for the first time in the literature that neurons derived from NCCs or mature neurons from DRG can lead to innervation of pancreatic organoids and result in modulation of neuro-exocrine cell interaction in the pancreatic cancer microenvironment.

Science Code : 1033
Key Words : Organoid, Neural crest, Pancreas cancer, Pancreatic neuropathy
Page Number : 81
Supervisor : Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarına, 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı kapsamında destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim boyunca bilgi ve birikimlerinden çok şey öğrendiğim, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji – Embriyoloji Anabilim Dalında görev yapmış ve halen görev yapmakta olan saygıdeğer hocalarıma ve saygıdeğer mesai arkadaşlarıma her şey için teşekkür ederim. Akademik yolculuğa beraber başladığımız İsmail TÜRKOĞLU ve diğer bölümlerde görev yapan arkadaşlarıma da her zaman keyifli bir çalışma ortamı sağladıkları için teşekkür ederim.

Münih Teknik Üniversitesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Pankreatik Nöropati ve Ağrı araştırma grubu eski lideri Prof. Dr. Güralp Onur CEYHAN'a ve başta Ümmügülsüm YURTERİ ve Rouzanna ISTWANFFY olmak üzere tüm mesai arkadaşlarıma yardımları için teşekkür ederim.

2013 yılında başladığım lisans üstü eğitim sürecinde danışman seçiminin ne kadar önemli olduğunu ve bu konuda çok şanslı olduğumu anladım. Yüksek lisans eğitimimden bu yana bilgi birikimi ve tecrübesini benimle paylaşan, bana vizyonel bir bakış açısı kazandırarak hedeflerime ulaşmamda desteğini esirgemeyen ve dünyanın neresinde, günün hangi saatinde olursa olsun tüm nezaketiyle her zaman yardımına koşan danışmanım Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimimin ilk yılında, henüz bir stajyer olamama rağmen bana güvenerek fikirlerimi deneme şansı tanıyan, doktora tez çalışmam sırasında elindeki tüm imkanları seferber ederek beni destekleyen, dehası ve çalışkanlığıyla bana yol gösteren diğer danışmanım (Almanların deyimiyle "Doktorvater") Prof. Dr. İhsan Ekin DEMİR'e sonsuz teşekkür ederim. Doktoramı böyle harika iki biliminsanı'nın danışmanlığında yapmış olmaktan her zaman onur duyduğumu belirtmek isterim.

Türkiye'de beraber büyüdüğümüz çocukluk arkadaşlarım ve Münih'te onların yokluğunu aratmayan Osman ÇAKIR, Metin ŞAHİN ve Ailesi'ne biriktirdiğim tüm güzel anılar için teşekkür ederim.

Beni her zaman koşulsuz destekleyen, sevgi ve mutluluk dolu büyük aileme sonsuz teşekkürler.

Çocukken bilim yaptığımı düşünerek bozduğum tüm elektronik cihazlar ve ziyan ettiğim deterjanlar için Anne ve Babamdan özür diler, sabırları ve anlayışları için de teşekkür ederim.

Birlikte paylaştığımız bu hayatta, doğru kararlar almamı sağlayan ve bu kararları uygularken hep yanımda olarak bana güç veren harika eşim Burcu ÇİMEN BEŞİKCİOĞLU'na hayatımda olduğu her saniye için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Pankreas	5
2.1.1. Pankreas anatomisi	5
2.1.2. Pankreas embriyolojisi	6
2.1.3. Pankreas histolojisi.....	7
2.1.4. Pankreas kanseri	11
2.2. Organoidler	13
2.2.1. Gastrointestinal sistem organoidleri	14
2.2.2. Pankreas organoidleri	14
2.3. Nöral Krest Hücreleri (NKH).....	16
2.4. Dorsal Kök Gangliyonu (DKG).....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Kullanılan Cihazlar	19
3.2. Kullanılan Kimyasallar, Rekombinant Proteinler ve Kitler	19
3.3. Kullanılan Hücre Hattı ve Model Organizmalar	21

Sayfa

3.4. Kullanılan Antikorlar	22
3.5. Kullanılan Bilgisayar Yazılımları	22
3.6. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı	23
3.7. Deneysel Yöntem	26
3.7.1. R-Spondin1 conditioned besiyeri hazırlanışı.....	26
3.7.2. Western Blot yöntemi kullanılarak R-Spondin1 conditioned besiyerinin kalite kontrolü	27
3.7.3. Pankreas organoidlerinin izolasyonu.....	27
3.7.4. Pankreas organoidlerinin kültürü ve pasajlanması	28
3.7.5. Pankreas organoidlerinin genotiplerinin belirlenmesi.....	29
3.7.6. Pankreas organoidlerin Cryo-Kesitlerinin alınması ve H&E boyama	30
3.7.7. UPKH kültürü ve pasajlanması	30
3.7.8. UPKH hücrelerin NKH'lere farklandırılması	31
3.7.9. Pankreas organoidlerinin NKH ile birlikte kültürü	33
3.7.10. Dorsal kök ganglionu (DKG) izolasyonu	34
3.7.11. Pankreas organoidlerinin DKG ile birlikte kültürü	34
3.7.12. Wholmount immunfloresan boyama	35
3.8. İstatistiksel Yöntem.....	36
4. BULGULAR	37
4.1. R-Spondin1 Conditioned Besiyeri İçeriğinin Western Blot Yöntemi ile Doğrulanması.....	37
4.2. Organoid İzolasyonu ve Kültürü	37
4.3. Pankreas Organoidlerinin Karakterizasyonu.....	38
4.4. UPKH'lerin NKH'lere Farklandırılması ve NKH Karakterizasyonu	40
4.5. Organoid+NKH ve Organoid+DKG Birlikte Kültürlerinde İnervasyonun Belirlenmesi	42
4.6. İnnerve Pankreas Organoidlerin İncelenmesi	44

Sayfa

5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	63
EKLER.....	71
EK-1. Etik Kurul Onayı	72
EK-2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Katılım Sertifikası	78
EK-3. UPKH Hattı Analiz Sertifikası	79
ÖZGEÇMİŞ	81

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Pankreas organoid besiyeri bileşenleri ve işlevleri belirtilmiştir.....	16
Çizelge 3.1. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar	19
Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal, rekombinant protein ve kitler	20
Çizelge 3.3. Kullanılan primer antikorlar	22
Çizelge 3.4. Kullanılan sekonder antikorlar	22
Çizelge 3.5. Organoid izolasyon besiyeri	23
Çizelge 3.6. Pankreas parçalama çözeltisi	23
Çizelge 3.7. Organoid temel besiyeri.....	23
Çizelge 3.8. Tam organoid besiyeri	24
Çizelge 3.9. DKG izolasyon besiyeri.....	24
Çizelge 3.10. Birlikte kültür besiyeri	24
Çizelge 3.11. 30% Sükroz çözeltisi:	25
Çizelge 3.12. Jelatin gömme çözeltisi.....	25
Çizelge 3.13. PBS-Glisin çözeltisi.....	25
Çizelge 3.14. IF yıkama çözeltisi.....	25
Çizelge 3.15. Fruktoz-gliserol çözeltisi	26
Çizelge 3.16. Genotip belirlenmesinde kullanılan primer dizileri	29
Çizelge 3.17. NKH karakterizasyonunda kullanılan primer dizileri.....	33
Çizelge 3.18. İmmunfloresan deneylerde kullanılan primer antikor konsantrasyonları ve sekonder antikorlar	36

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Pankreas innervasyonu	6
Şekil 2.2. Pankreas histolojisinin şematik gösterimi	8
Şekil 2.3. Göç bölgelerine göre NKH türleri ve oluşumuna katıldıkları periferik sinir sistemi yapıları	17
Şekil 4.1. NKH ile birlikte kültür sonucu innerve olan normal ve KPC (Tümör) pankreas organoid kültürlerinde 7. gün sonunda yapılan nöralplastisite analizlerinin grafiksel gösterimi	45
Şekil 4.2. DKG ile birlikte kültür sonucu innerve olan normal ve KPC (Tümör) pankreas organoid kültürlerinde 7. gün sonunda yapılan nöralplastisite analizlerinin grafiksel gösterimi	46
Şekil 4.3. NKH ve DKG ile birlikte kültür sonucu innervasyonun 7. gün sonunda normal ve KPC (Tümör) pankreas organoid büyüklüklerine etkisinin grafiksel gösterimi	47



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.2. Ha-Tag (A) ve GAPDH (B) western blot analiz sonuçları.....	37
Resim 4.3. Pasaj sonrası 6. günde organoid morfolojisi (Işık mikroskobu, 4X).....	38
Resim 4.4. Wholemout immunfloresan yöntemle işaretlenen E-Cadherin (yeşil) ve SOX9 (kırmızı) pozitif normal ve KPC (Tümör) organoidleri (Floresan mikroskop, 20X)	38
Resim 4.5. H&E boyama uygulanmış 10µm KPC pankreas organoid kesitlerinde farklı derecelerde PanIN histomorfolojisi (A)[71] (Işık mikroskobu, 20X). Pasaj sonrası 7. günde normal ve KPC organoid büyüklüklerinin karşılaştırılması (B) (Işık mikroskobu, 10X).....	39
Resim 4.6. Organoid genotip analizlerin jel görüntüleri.....	40
Resim 4.7. NKH farklandırma işlemi öncesi kompakt merkezli ve düzgün sınırlar içeren optimum UPKH kolonileri (Işık mikroskop, 10X)	41
Resim 4.8. NKH farklanması sırasında UPKH morfolojisinin günlük olarak değişimi (Işık mikroskop, 10X).....	41
Resim 4.9. UPKH'lerden farklandırılan PAX6 (kırmızı) negatif ve SOX10 (yeşil) pozitif NKH'lerin immunfloresan görüntüsü (A) (Floresan mikroskop, 40X). Farklanma sonrası PAX3, Snail-2 ve SOX10 mRNA miktarındaki artışın grafiksel gösterimi (B)	42
Resim 4.10. Organoid + NKH birlikte kültürün 3. gününde nöronal uzantılar (→) (A) ve Organoid + DKG birlikte kültürün 3. gününde nöronal uzantılar (→) (B) (Işık mikroskop, 10X).....	43
Resim 4.11. Birlikte kültürde 7. gün sonunda β3-Tubulin (cyan) pozitif nöronlara farklanan NKH tarafından innerve olan E-Cadherin (yeşil) pozitif normal ve KPC (Tümör) pankreas organoidleri (A) ve DKG kökenli β3-Tubulin (cyan) ve GFAP (kırmızı) pozitif nöronlar tarafından innerve olan E-Cadherin (yeşil) pozitif normal ve KPC (Tümör) pankreas organoidleri (Konfokal mikroskop, 20X)	44
Resim 4.12. E-Cadherin (yeşil) pozitif Normal pankreas organoidlerinde ve NKH ve DKG ile birlikte kültür sonucu innerve olan E-Cadherin (yeşil) pozitif normal pankreas organoidlerinde Ki67 (kırmızı) pozitif epitelyal hücreler ve pozitif Ki67 pozitif hücre miktarının grafiksel gösterimi. (Konfokal mikroskop, 20X)	48

Resim**Sayfa**

Resim 4.13. E-Cadherin (yeşil) pozitif KPC (Tümör) pankreas organoidlerinde ve NKH ve DKG ile birlikte kültür sonucu innerve olan E-Cadherin (yeşil) pozitif KPC (Tümör) pankreas organoidlerinde Ki67 (kırmızı) pozitif epitelyal hücreler ve pozitif Ki67 pozitif hücre miktarının grafiksel gösterimi. (Konfokal mikroskop, 20X)	48
---	----



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Derece Celsius
μL	Mikro litre
μm	Mikro metre
μM	Mikro molar
cm ²	Santimetre kare
g	G kuvveti
mL	Mili litre
mm	Mili metre
mM	Mili molar
rpm	Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta

Kısaltmalar	Açıklamalar
2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
BSA	Sığır serum albumin
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribo nükleik asit
DKG	Dorsal kök gangliyonu
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPBS	Dublecco fosfat tamponlu tuz çözeltisi
ECL	Güçlendirilmiş kemiluminesans
EGF	Epitelyal büyüme faktörü
EtOH	Etil Alkol

Kısaltmalar**Açıklamalar**

GCDR	Gentle Cell Dissociation Reagent
GIP	Gastrik inhibitör peptit
H&E	Hematoksilen & eozin
hFGF-10	İnsan fibroblast büyüme faktörü 10
IPMN	İntraduktal papiller müsinöz neoplazm
KPC	Kras ^{+/LSLG12D} Trp53 ^{fl/fl} p48 ^{+/Cre}
Lgr5	Leucine-rich repeat-containing g-protein coupled receptor 5
MCN	Müsin üreten kistik neoplazm
mEGF	Fare Epitelyal büyüme faktörü
NGS	Normal keçi serumu
NKH	Nöral krest hücre
NRG3	Neurogenin3
PanIN	Pankreatik intraepitelyal neoplazi
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PBS-T	Tween20 içeren fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDAC	Pankreatik duktal adeno karsinom
PVDF	Polyvinylidiflorid
RNA	Ribo nükleik asit
RT-qPCR	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
UPKH	Uyarılmış pluripotent kök hücre

1. GİRİŞ

Geleneksel iki boyutlu (2B) hücre kültürleri, ortamdaki ekstraselüler matriks eksikliği nedeniyle uygun hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks ilişkilerini sağlamakta yetersiz kalmaktadır. Bu yetersizlik 2B hücre kültür modellerinin yapısal olarak in vivo ortamdaki hücre organizasyonu ve hücreler arası ilişkileri tam olarak sağlayamadığını göstermektedir [1]. Ayrıca 2B hücre kültürlerin pasajlanarak uzun süre kullanılabilir olması amacıyla immortalize hücre hattı kullanımının gerekliliği ve bu hücre hatlarının tek bir hücre tipinden oluşması, in vivo ortamdaki hücresel heterojenitenin oluşturulmasını da imkânsız hale getirmektedir. Birçok hücre tipinden oluşan heterojen primer hücre ve doku kültürleri ise genellikle pasajlanarak uzun süre kullanıma elverişli değildir.

Dokudan izole edilebilen yetişkin kök hücreler ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerin (UPKH) keşfi histogenez ve organogenezin nasıl gerçekleştiğini anlama yolunda bilim dünyasına yeni ufuklar açmıştır. Kök hücrelerin kendi kendine organize olmasını sağlayan üç boyutlu (3B) kültür modelleri in vitro ortamda, karmaşık organ yapısına benzer özellikler sergileyen organoidlerin elde edilmesine imkan sağlamaktadır [2]. Organoidler, ekstraselüler matriks içerisinde 3B olarak kültüre edilen yetişkin ya da pluripotent kök hücrelerin diğer hücre tiplerine farklılaşıp kendi kendine organize olarak, in vivo ortamdaki organ yapı ve fonksiyonlarına benzer işlev gösteren organotipik kültür modelleridir [3]. Organoid kültür modellerinde ekstraselüler matriks varlığı, hücrelerin birbirleri ve ekstraselüler matriks ile 3B olarak etkileşimde bulunabilmelerini sağlamaktadır. Ayrıca organoidlerin içerisinde kök hücrelerin de bulunduğu heterojen bir hücre popülasyonundan oluşması sayesinde defalarca pasajlanarak uzun süreler kullanılabilmesi mümkündür. 2B hücre kültür modellerinin dezavantajlarını ortadan kaldıran organoid kültürleri; embriyoloji çalışmaları, hastalıkların aydınlatılması [4, 5], ilaç etkinlik ve toksisite [6, 7] çalışmalarında kullanılabilir. Ayrıca in vitro ortamda geliştirilen bu modellerin genetik düzenlemeye elverişli olmaları ve transplante edilebilmeleri [8] kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında da kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır.

Barker ve arkadaşlarının 2007 yılında Leucine-rich repeat containing G-protein-coupled reseptör 5 (Lgr5) 'i bağırsak kök hücre belirteci olarak tanımlanmasının ardından primitif bağırsaktan köken alan gastrointestinal sistem organoidlerinin hücresel kaynağı olan Lgr5 pozitif kök hücrelerin saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu mümkün olmuştur [9].

Tanımlanan Lgr5 pozitif kök hücrelerin bir ekstraselüler matriks içerisinde, Epitelyal büyüme faktörü (EGF), Noggin ve R-spondin-1 ile desteklenmiş besiyeri ile kültüre edilerek epitelyal organoid kültürü gerçekleştirilmiştir [10].

Lgr5 pozitif kök hücrelerin, pankreas kanallarında inaktif halde bulunduğu ve doku hasarına yanıt olarak aktive olduğunun keşfedilmesi pankreas organoidlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır [11]. 2015 yılında Boj ve arkadaşları fare ve insan pankreas adenokarsinom organoid modeli oluşturduklarını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar bu modelin farelerde ve insanlardaki normal ve tümör dokularına, fizyolojik olarak benzerliklerini ortaya koymuşlardır [12]. Pankreas organoid modellerinin epitelyal hücre türevlerini barındırması fakat pankreasın in vivo koşullarda mikro çevresinde bulunan diğer hücre tiplerini içermemesi; mikroçevre ve hücre-hücre etkileşimlerinin belirlenmesi için gereken uygun fizyolojik koşulların elde edilmesinde kısıtlamalara neden olmaktadır [13, 14]. Yalnızca epitelyal hücreleri içeren organoidlerin, mezenkimal hücreler [15], lenfositler [16], fibroblastalar, nöronlar [17] ve nöral krest hücreleri [8] gibi farklı hücre tipleri ile birlikte kültür edilmesi (co-culture), in vivo eşdeğerlerine benzer mikroçevreye sahip kompleks organoid modelleri elde edilmesinde etkili bir yöntem olarak görünmektedir.

Ektodermal nöral plağın nöral tüpü şekillendirmek üzere katlanması sırasında nöral oluğun her iki kenarında ortaya çıkan nöral krest hücreleri (NKH), nöral tüpün farklı seviyelerinden köken alarak; kranial, kardiyak, vagal, sakral ve trunkal olmak üzere, farklı göç yollarına ve farklılaşma kapasitelerine sahip gruplara ayrılarak göç eder ve gelişmekte olan embriyonun yapısına katılır [18] [19]. Workman ve ark. uyarılmış pluripotent kök hücrelerden elde ettikleri nöral krest hücreleri ve bağırsak organoidlerini birlikte kültür (co-culture) ederek oluşturduğu modelde; nöral krest hücrelerinin mezenşim içerisine göç ederek fonksiyonel nöronlara ve glial hücrelere farklılaştığını göstermişlerdir [8].

Sempatik ve parasempatik nöronlar tarafından yoğun olarak innerve edilen pankreas kronik pankreatit ve pankreas kanseri gibi hastalıklarda şiddetli abdominal ağrı ile karakterizedir [20, 21]. Pankreas kanserinde, Schwann hücrelerinin kanser hücrelerine yönelerek göç ettiği [22], kanser hücrelerinin nöral invazyonuyla ilişkili olarak nöral hiperplazi ve hipertrofinin abdominal ağrıyla doğru orantılı şekilde arttığı bilinmektedir [23]. Güncel deneysel pankreas kanseri ve kronik pankreatit modelleri, intrapancreatik sinirlerin nöropatisini araştırmakta yetersiz kalmaktadır [24]. Nöral yapıları içeren pankreas organoid modellerinin

oluşturulması, bu modellerin pankreatik nöropatide rol oynayan mekanizmaların aydınlatılmasında ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde oldukça elverişli bir model olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Yukarıda özetlenen bilgiler ışığında bu tez çalışmasının amacı;

- Epitelyal hücrelerden oluşan pankreas organoidlerini, nöral krest hücreleri ile birlikte kültüre ederek nöral yapıları içeren sağlıklı ve kanser pankreas organoid modelleri oluşturmak,
- Oluşturulan bu modellerde nöral hiperplazi, nöral hipertrofi gibi nöropati olgularını incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas

Karın boşluğunda skeletotopik olarak sağda L1-L2 seviyesinden solda T12 seviyesine doğru uzanan pankreas, sindirim enzimlerini (lipaz, amilaz ve proteazlar) üreterek ekzokrin ve karbonhidrat metabolizmasını düzenleyici (insülin, glukagon gibi) hormonları üreterek endokrin işlev gören gastrointestinal sisteme ait bir organdır [25-27].

2.1.1. Pankreas anatomisi

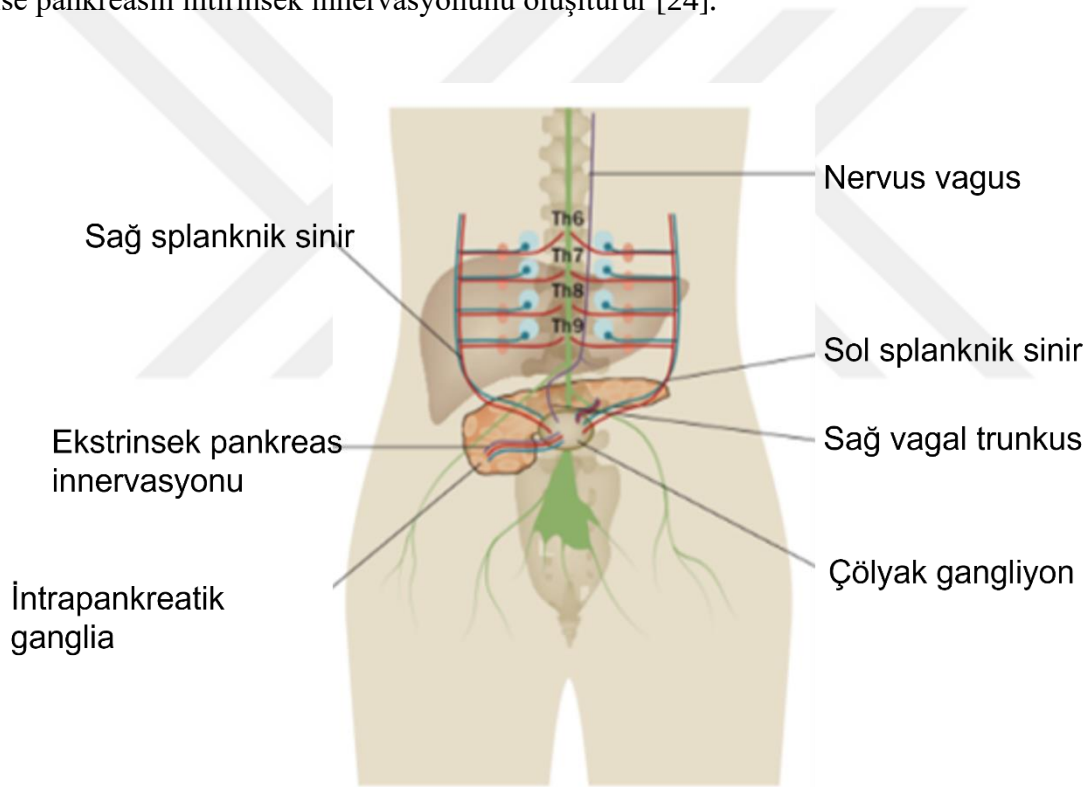
Pankreas anatomik olarak; *caput*, *processus uncinatus*, *collum*, *corpus* ve *cauda* olmak üzere beş bölüme ayrılır. Caput kısmı duodenumun “C” şeklindeki girintisinden başlayarak dalağa kadar uzanan pankreas caudanın küçük bir bölümü haricinde retroperitoneal yerleşim gösterir. *Processus uncinatus*, *arteria* ve *vena mesenterica superior*ların arkasından sola doğru uzanırken *collum pancreatis* bu damarların önünde yerleşim gösterir. *Collum* ve *cauda* arasında bulunan uzun parça *corpus pancreatis* adlandırılır. Pankreasın en sol tarafta bulunan parçası *cauda pancreatis* ise *ligamentum splenorenale* içerisinden geçerek dalağın hilumuna uzanır [28, 29].

Pankreas, ekzokrin bez işlevinin bir gerekliliği olarak kanallar sisteminden oluşur. Ana pankreas kanalı *ductus pancreaticus* (Wirsung kanalı) *cauda pancreatis*den başlayarak *caput pancreatis*’e doğru ilerler ve aşağı sağa doğru yönelerek *ductus cysticus* ile birleşerek *ampulla hepatopancreatica* (Ampulla vater) oluşturur. *Ampulla hepatopancreatica*, *pars descendes duodeni* ile temas ettiği yerde düz kaslarla çevrilerek oddi sphinkterini oluşturur ve *papilla duodeni major* duodenuma açılır [28, 29]. Embryolojik olarak dorsal pankreas tomurcuğunun proksimal kalıntısı olan aksesuar pankreas kanalı *ductus pancreaticus accessorius* (santorini kanalı), *caput pancreatis*’in alt kısmından başlar ve *papilla duodeni major*’un yaklaşık 2 cm yukarısında yer alan *papilla duodeni minor*’den duodenuma açılır [28, 30].

Pankreasın kanlanması *arteria splenica*, *arteria gastroduodenalis* ve *arteria mesenterica superior*’un dallarından sağlanarak, *vena splenica* ve *vena mesenterica superior*’a dökülür [25].

Pankreasın innervasyonu

Pankreas da diğer abdominal organlar gibi ekstresek ve intrinsek olarak innerve edilir. Ekstresek innervasyona sahip gastrointestinal sistem organları; sempatik ve parasempatik otonom sinir sisteminin visseral afferent lifleri aracılığıyla duysal verileri merkezi sinir sistemine iletir ve visseral efferent lifler aracılığıyla da motor impulsalar alır [29]. Pankreasın ekstresek innervasyonunu sağlayan nervus vagus, dorsal kök gangliyonundan gelen duysal sinir lifleri ve sempatik gangliyonundan uzanan sempatik sinir liflerini içeren splanknik sinir lifleri çölyak gangliyonunda bir araya gelerek ana pankreas damarlarıyla birlikte pankreasa girerler. Genellikle langerhans adacıklarının yakınında bulunan intrapankreatik gangliyonlar ise pankreasın intrinsek innervasyonunu oluşturur [24].



Şekil 2.1. Pankreas innervasyonu [24]

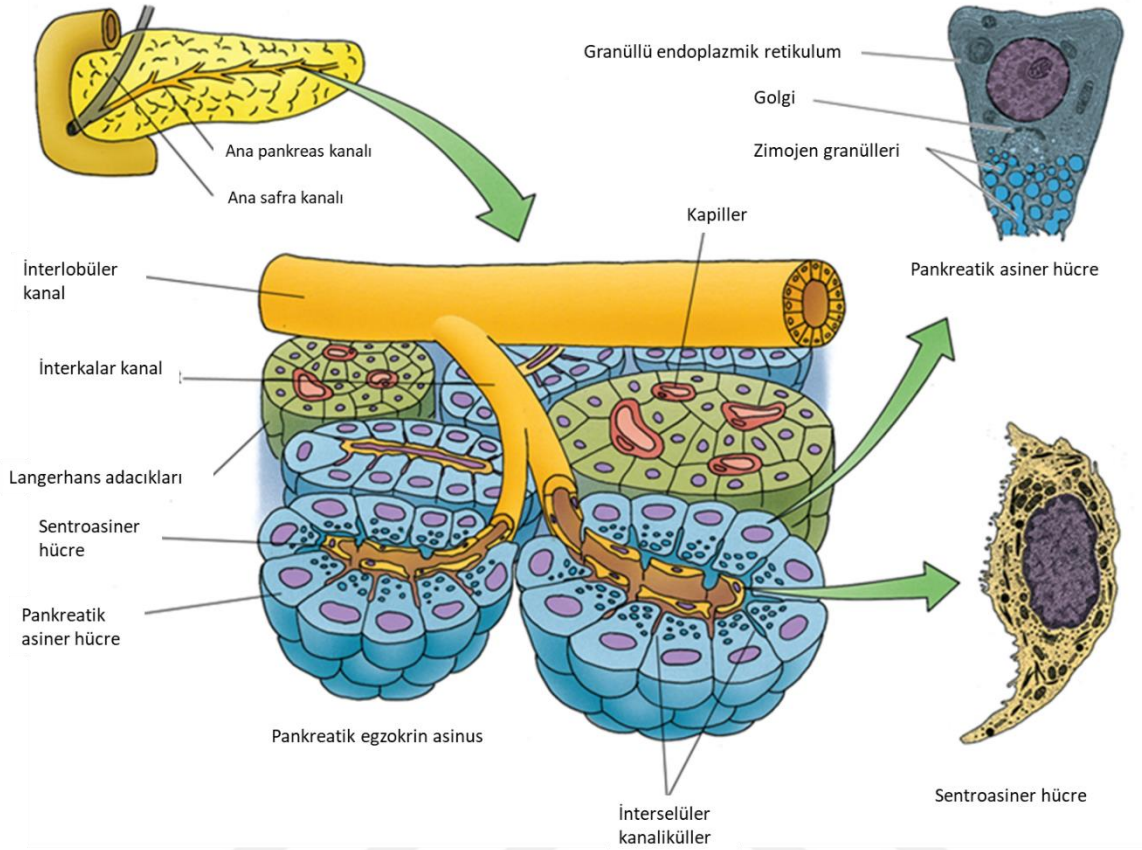
2.1.2. Pankreas embriyolojisi

Pankreas, içi endodermle döşeli yolk kesesinin, embriyonun sefalokaudal ve lateral yönde katlanması sırasında embriyo içinde kalmasıyla oluşan primitif ön bağırsağın kaudalinden gelişen iki tomurcuktan gelişir. Postkoital 26.-35. günler arasında dorsal pankreas tomurcuğu dorsal mezenter içerisinde, ventral pankreas tomurcuğu ise koledok kanalı yakınında gelişir. Duedenum “C” şeklini almak üzere sağa doğru yaptığı rotasyonun

etkisiyle ventral pankreas tomurcuğu da yer değiştirerek dorsal pankreas tomurcuğunun alt arka kısmına yerleşir. Bir araya gelen dorsal ve ventral pankreas tomurcuklarının kanalları ve parankim dokusu insanda intrauterin 37.-42. günlerde kaynaşır. Bu kaynaşma sonucu ventral tomurcuk *processus uncinatus* ve *caput pancreatis*'in inferiorunu oluştururken, pankreasın geri kalanı (*caput pancreatis*'in superior kısmı, *collum*, *corpus* ve *cauda*) dorsal pankreas tomurcuğu tarafından oluşturulur. Pankreasın ana kanalı olan *ductus pancreaticus* ventral tomurcuk kanalı ve dorsal tomurcuk kanalının distal parçası tarafından oluşurken dorsal tomurcuk kanalının proksimal kısmı geriler. İnsanların 10% 'unda dorsal tomurcuğun proksimal ucu gerilemeyerek durumda aksesuar pankreas kanal (*ductus pancreaticus accessorius*) olarak kalır. Pankreas tomurcuklarının endoderm tabakası gelişip dallanarak ağ şeklinde kanallar oluşturur. Bu kanalların uçlarında kümeleşen endodermal hücreler ekzokrin pankreasın asinuslarını oluşturur. Embriyonik gelişimin 8.-9. Haftasında endodermal tomurcuk hücreleri endokrin pankreası (langerhans adacıkları) oluşturmak üzere farklılaşmaya başlar. 14.-15. Hafta civarında langerhans adacıkları, ortada insülin salgılayan β hücreleri ve etrafını çevreleyen glukagon salgılayan α ve somatostatin salgılayan δ hücrelerinden oluşan kümeler şeklinde belirir. İnsanda insülin salgısı gelişimin 5. Ayı civarında başlar. Pankreasın bütün parankim dokusu tomurcukların endoderminden köken alırken, pankreasın bağdokusu ve interlobüler septumları splanknik mezoderm kökenlidir [30].

2.1.3. Pankreas histolojisi

Posterior vücut duvarına yaslanmış retro peritoneal bir organ olan pankreas, en dışta ince gevşek bağ dokusundan bir kapsülle kaplanmıştır. Pankreas stromasını oluşturan gevşek bağdokusu kapsül iç kısımlara doğru septalar oluşturarak organı ekzokrin ve endokrin pankreasın işlevlerini yerine getiren parankimatik lobüllere ayırır. Pankreasın damarları sinirleri ve ekzokrin pankreasın interlobüler boşaltım kanalları bu septalar içerisinde ilerler [31]. Pankreas stroması içerisinde çok sayıda yağ hücreleri ve interlobüler pankreatik kanalların etrafında bu kanala salgı yapan küçük müköz bezler de bulunmaktadır [32, 33]. Ekzokrin pankreasın asinus ve kanalları tüm organ boyunca yerleşim gösterirken endokrin pankreası oluşturan hücre kordonları (Langerhans adacıkları) *cauda pancreatis*'de daha yoğun olmakla birlikte tüm organ içerisinde asinuslar arasında dağınık şekilde görünür.



Şekil 2.2. Pankreas histolojisinin şematik gösterimi [31]

Egzokrin pankreas

Histolojik olarak ekzokrin pankreas tubuloalveoler saf seröz bez yapısındadır. Çok az miktarda periasiner bağdoku ile çevrili asinuslar, yaklaşık 40-50 adet asiner hücrenin bir araya gelmesiyle oluşur ve ortalarında yer alan sentroasiner hücre ile başlayan kanallar sistemine açılır [31, 33]. Bazal tarafı geniş, apikal yüzü dar piramidal şekilli asiner hücrelerin lümene bakan apikal sitoplazmaları, protein içeriği yüksek seröz salgı içeren zimojen granülleri nedeniyle asidofilik özellik gösterirken, granüllü endoplazmik retikulum açısından zengin bazal kısımları bazofilik yapıdadır. Çekirdek ve zimojen granülleri arasında, granül miktarına bağlı olarak boyutu değişen golgi aparatı bulunur. Asiner hücrelerin bazal sitoplazmasında bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum ve mitokondri bulunmaktadır. Ayrıca bazal hücre membranında, ince bağırsaktaki DNES hücreleri tarafından salgılanan kolesistokinin hormonu ve post ganglionik parasempatik sinir liflerinden salgılanan bir nörotransmitter olan asetilkolin'e özgü reseptörler bulunur [31]. Pankreasın kanallar sistemi, asinus merkezinde bulunan asidofilik özellikte, yassı sentroasiner hücrelerle başlayan interkalar kanallar ile devam eder. İnterkalar kanal hücreleri

asiner hücrelerden salgılanan proteinden zengin sıvıya su ve bikarbonat (HCO_3^-) iyonu ekler. Eklenen bu bikarbonat, pankreatik enzimler için uygun pH seviyesini ayarlamak üzere duodenumda kimusu nötralize eder. İnterkalar kanalların hücre zarında ince bağırsağın enteroendokrin hücrelerinden salınan sekretin hormonu ve post ganglionik parasempatik sinirlerden salgılanan asetilkolin nörotransmitterine özgü reseptörler de bulunur. Ekzokrin pankreasta çizgili kanal bulunmaması ve sentroasiner hücrelerin varlığı ekzokrin pankreasın histomorfolojik olarak sıkça karıştırılan parotis bezinden ayrımını sağlayan karakteristik özelliklerdir [31-33]. Boyları kısa olan interkalar kanallar, tek katlı prizmatik epitel ile örtülü çapı dar intralobüler kanallara açılır. İntralobüler kanallar ise dallanarak interlobüler septumlar içerisinde bulunan geniş çaplı ve tek katlı pirizmatik epitel ile örtülü interlobüler kanallara bağlanırlar. İnterlobüler kanalların tek katlı pirizmatik epiteli içerisinde az sayıda enteroendokrin hücreler ve goblet hücreleri de bulunabilir. İnterlobüler kanallar ana ductus pancreaticus'a drene olarak *ampulla hepatopancreatica*'dan duodenum'a açılır [29, 31-33].

Duodenumda sindirim metabolizmasına katılan amilaz, lipaz, ribonükleaz ve deoksiribonükleaz enzimlerinin yanı sıra tripsinojen, kimotripsinojen, prokarboksipeptidaz ve elastaz proenzimleri ekzokrin pankreas tarafından üretilip salgılanır. Bu enzimlerin üretilip salgılanması duodenumda enteroendokrin hücreler tarafından üretilen sekretin ve DNES hücrelerince üretilen kolesistokinin hormonları tarafından kontrol edilir. Polipeptit yapıda bir hormon olan sekretin interkalar kanal hücrelerini bikarbonat salgılanması için uyarırken, diğer bir polipeptit olan kolesistokinin proenzimlerin asiner hücrelerden salgılanmasını uyarır. Sempatik sinir lifleri pankreatik kan akımını düzenlerken ve parasempatik sinirler sentroasiner hücrelerin aktivitelerini düzenleyerek bu hormonal kontrole yardımcı olur [31, 33].

Endokrin pankreas

Endokrin pankreas, farklı boyutlarda düzensiz hücresel kordonlar şeklinde seröz asinusların aralarında yerleşim gösterir. Langerhans adacıkları olarak da isimlendirilen bu hücresel kordonlar hematoksilin & eozin boyamalarda açık renkli olarak görünür [33]. İnsan pankreasında cauda pancreatis'de yoğun olmakla birlikte yaklaşık bir milyon Langerhans adacığı bulunmaktadır. Langerhans adacıkları retiküler bağ doku lifleri ve fenestralı kapiller ağ ile kuşatılmıştır [31].

Langerhans adacıkları yaklaşık 3000 hücreden meydana gelmektedir. Adacıkları oluşturan beş farklı hücre tipini rutin histokimyasal yöntemlerle birbirinden ayırmak mümkün olmasa da zenker-formol fiksasyonu'nu takiben uygulanan mallory-azan boyaması ile üç ana hücre tipini ayırt etmek mümkündür. Bu üç ana hücre tipi insülin hormonu üreten β -hücreleri, glukagon hormonu üreten α -hücreleri ve somatostatin hormonu üreten δ -hücreleridir. Adacıkta bulunan tüm hücre tiplerini tanımlamak, içerdikleri salgı granüllerinin boyut ve yoğunluklarının taramalı elektron mikroskop kullanılarak incelenmesi ya da bu hücrelere özgü proteinlerin immünohistokimyasal yöntemlerle işaretlenmesiyle mümkün olmaktadır. Adacıklarda bulunan diğer iki minör hücre tipi gastrin üreten G hücreleri ve pankreatik polipeptin üretiminden sorumlu PP (F) hücreleridir [31, 33].

Adacığın merkezinde β -hücreleri yoğun olarak bulunurken, α ve δ hücreleri periferde yerleşim göstermektedir. Merkezdeki β -hücreleri adacık hücre popülasyonunun yaklaşık 70% 'ini oluşturur. İnsülin salgılanmasından sorumlu olan β -hücreleri sitoplamalarında merkezli 300nm çapında yoğun polihedral salgı granülleri içerir. Glukagon salgılayan α -hücreleri'nin miktarı adacık hücrelerinin 15-20% 'sine karşılık gelmektedir. α -hücreleri'nde ise 250nm çapında daha yoğun merkezli granüller bulunmaktadır. δ -hücreleri'nin glukagon'a ek olarak gastrin inhibitör peptit (GIP), kolesistokinin ve adrenokortikotropik hormon (ACTH) salgıladığı da belirlenmiştir. Adacığın periferinde bulunan bir diğer ana hücre tipi olan δ -hücreleri, popülasyonun 5-10% 'unu oluşturur ve somatostatin üretirler. Bu hücreler düşük – orta yoğunlukta 300-350nm çapında granüller ihtiva eder [33]. Adacık hücrelerinin çok az bir kısmını oluşturan gastrin üreten G hücreleri ve pankreatik polipeptit üreten PP (F) hücreleri ise adacık içerisinde dağınık halde bulunur.

İşlevi kandaki glukoz seviyesini düşürmek olan insülin, etkisini karaciğer, iskelet kası ve aipoz doku üzerinde etki gösterir. İnsülin, kandaki glukoz seviyesi 70mg/100mL seviyesini aştığında β -hücreleri tarafından salgılanır. İnsülin kan dolaşımındaki glukozun hücreye alınmasını, glikojen sentaz enziminin aktive edilerek glikojen sentezini ve depolanmasını ve hücre içerisinde glikolizisin artışı uyarır. Ayrıca insülin adipoz dokuda gliserol sentezini de uyarır. Kan glukoz seviyesinin 70mg/100mL seviyesinden fazla olmasının yanı sıra yağ asiti seviyesindeki artış ve gastrin, kolesistokinin ve sekretin hormonlarının varlığı da insülin salgılanmasını indükler. α -hücreleri'nden salgılanan kolesistokinin ve glukagon da parakrin etki göstererek β -hücreleri'nin insülin salgılamasını artırır. Glukagon ise kandaki glukoz seviyesinin artışından sorumludur. Dolaşımdaki glukoz seviyesi 70mg/100mL 'nin altına

düştüğünde α -hücreleri'nden salgılanan glukagon, karaciğerde glukoneogenez ve glikojenolizi indükler ve kana glukoz salınmasını sağlar.

Adacık etrafında bulunan arteriyoller dallanarak fenestralı kapiller halinde adacık içerisine doğru ilerlerler. Önce adacık periferindeki α ve δ hücreleriyle temasa geçen kapiller ağ merkeze doğru ilerledikçe β -hücreleriyle etkileşir. Adacı eferent kapillerler halinde çıkan bu damarlar seröz asinuslar arasında dağılarak bir ağ oluşturur. Bu sistem adacıkların ve asinüslerin kademeli olarak perfüzyonunu sağlar [33].

Adacık hücrelerinin aktivitelerini düzenlenmesinde sempatik ve parasempatik sinir sisteminin de rolü olması muhtemeldir. Parasempatik sinirler (kolinerjik) insülin ve glukagon salgılanmasını uyarırken sempatik sinir lifleri (adrenerjik) glukagon salınımını artırır. Sempatik ve parasempatik innervasyonu olan adacıklarda, hücre popülasyonunun yaklaşık 10% 'unda direk sinir sonlanmaları bulunmaktadır. Sinir sonlanmalarındaki nörotransmitterler tarafından harekete geçirilen iyonik olaylar, adacık hücreleri arasında sıkça bulunan oluklu bağlantılar sayesinde bir hücreden diğerine aktarılır [33].

2.1.4. Pankreas kanseri

GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında dünyada 19,3 milyon yeni kanser vakası görülmüştür [34]. Bu yeni vakaların yaklaşık 4,7% 'sini oluşturan pankreas kanseri kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer alarak en ölümcül kanser türlerinden biri olduğu görülmektedir [35]. Hastaların çok ileri evrelerde semptom göstermeleri ile uygun teşhis yöntemleri ve tedavinin geliştirilememiş olması pankreas kanserinde mortalite oranının yüksek olmasına neden olmaktadır. Cerrahi günümüzde en geçerli tedavi olsa da ameliyat sonrası beş yıl sağ kalım oranı yalnızca 9% 'dur. Pankreas kanserinin nedenleri halen araştırılmaya devam edilmektedir. Şimdiye kadar sigara kullanımı, diyabet, obezite, diyet faktörleri, alkol kullanımı, yaş, etnik köken, aile öyküsü ve genetik faktörler, *helicobacter pylori* enfeksiyonu ve kronik pankreatit gibi belirli risk faktörleri tanımlanmıştır [36, 37].

Pankreatik neoplazmlar; seröz asinuslar, pankreatik boşaltım kanalları ve endokrin pankreasın bileşenlerinden kaynaklanabilir. Langerhans adacıklarından kaynaklanan tümörler pankreatik nöroendokrin tümörler olarak adlandırılır. Nadiren görülen asinus kaynaklı tümörler asiner hücre karsinomu ya da pankreatoblastoma olarak adlandırılır.

Pankreatik kanallardan kaynaklanan pancreatic ductal adeno karsinom (PDAC) ise pankreas kanserinin en sık görülen (85%) ve en ölümcül türüdür. PDAC çok sayıda vakuol ve intraselüler müsin içeren, alçak kübik yada prizmatik epitel hücreleri ile örtülü büyük kanal yapıları ile karakterizedir [38].

PDAC patogenezinin neden olan genetik hasarlar kromozomal ve gen düzeyinde görülmektedir. PDAC hücreleri çok sayıda kromozomal translokasyon ve delesyon içerir. KRAS (95%) geninin aktivasyonu, TP53, SMAD4 ve CDKN2A genlerinin inaktivasyonu (>50%) en sık görülen nokta mutasyonlarıdır [39, 40].

Pankreas kanseri ve pankreatik nöropati

Pankreas kanseri sıklıkla şiddetli abdominal ağrı nedeniyle kliniğe başvuran hastalarda teşhis edilir. Ağrı şiddeti prognozla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu için en ağırlı kanserler arasındadır (Lohse and Brothers, 2020). Pankreas sempatik ve parasempatik nöronlar tarafından yoğun olarak innerve edilen bir organdır (Rodriguez-Diaz et al., 2011) ve pankreas kanserinin belirgin bir özelliği olan perinöral invazyon, nöropatik ağrı ile sonuçlanan ilk metastaz yoludur (Lohse and Brothers, 2020). Perinöral invazyonun pankreas kanseri hastalarında görülme oranı 90% olarak rapor edilmiştir (Chen et al., 2019).

Yapılan araştırmalarda; Schwan hücrelerinin kanser hücrelerine yönelerek göç ettiği (Demir et al., 2014), kanser hücrelerinin nöral invazyonuyla ilişkili olarak nöral hiperplazi ve hipertrofinin abdominal ağrıyla doğru orantılı şekilde arttığı (Ceyhan et al., 2009) ve bu olayların nöral büyüme faktörü (NGF), neuritin ve artemin gibi moleküler aracılığıyla düzenlendiği belirtilmiştir (Ceyhan et al., 2010, Demir et al., 2012, Wang et al., 2014). Güncel pankreas kanseri ve kronik pankreatit fare modelleri, pankreastaki sinir gövdelerinin intra pankreatik nöropatisini araştırmakta yetersiz kalmaktadır (Demir et al., 2015). Pankreas kanserinde nöropatinin moleküler nedenlerinin aydınlatılması ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için in vivo ve in vitro deney modellerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.2. Organoidler

Kendi kendini yenileyebilen ve dokuya özgü hücrelere farklılaşabilen yetişkin kök hücrelerin izole edilebilmesi, embriyonik kök hücrelerin in vitro olarak çoğaltılabilmesi ve hemen hemen vücuttaki her hücre tipine farklılaştırılabilen uyarılmış pluripotent kök hücrelerin keşfi, araştırmacıların tek bir hücreden nasıl karmaşık bir organizma oluştuğu sorusuna cevap bulmada büyük bir ilerleme kaydetmesine yardımcı olmuştur. Fakat, organogenez için gerekli olan hücre-hücre etkileşimlerine uygun kültür ortamlarının eksikliği, in vitro histogenez ve organogenez çalışmalarında engel oluşturmaktadır [3]. Son 50 yıldır yapılan çalışmalar iki boyutlu (2B) hücre kültür modellerinin, yapısal olarak in vivo ortamdaki hücre organizasyonu ve hücreler arası ilişkileri tam olarak sağlayamadığını göstermektedir (Simian & Bissell, 2016).

Kök hücrelerin kendi kendine organize olmasını sağlayan 3B kültür modelleri in vitro ortamda, karmaşık organ yapısına benzer özellikler sergileyen organoidlerin elde edilmesine imkan sağlamaktadır [2]. Dokuya özgü kök hücrelerin ekstraselüler matriks benzeri bir doku iskelesi içerisinde, çeşitli büyüme faktörleriyle desteklenen kültür ortamında gelişen organotipik 3B kültür modeli olan organoidlerin en kapsayıcı tanımı Huch & Koo tarafından *“Pluripotent kök hücreler, neonatal hücreler veya yetişkin kök hücrelerden köken alarak, kendiliğinden organize olan, fonksiyonel hücrelere ve progenitörlere farklılaşarak in vivo örneklerine benzeyen, dokuya özgü en az birkaç fonksiyonu gerçekleştirebilen üç boyutlu yapılar.”* olarak yapılmıştır. Bu üç boyutlu yapılar genelde epitelyal türevleri ve bazı mezenkimal bileşenlerden oluşmaktadır [3].

Günümüzde özofagial, gastrik, intestinal, karaciğer ve pankreas gibi gastrointestinal sistem organoidleri [41-44], böbrek, uterus endometriumu, ovaryum, prostat gibi ürogenital sistem organoidleri [45-48], retinal ve beyin gibi sinir sistemi organoidleri ve bu sistemlere özgü hastalıkları modelleyen organoidler [49, 50] başarıyla üretilmiş ve bu modellere gün geçtikçe bir yenisi eklenmektedir.

Geliştirilen bu organoid modellerin hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks etkileşimlerine olanak tanınması ve niş oluşturma potansiyeline sahip olmaları fizyolojik olarak in vivo koşullara daha yakın özellikler göstermelerini sağlamaktadır. İnsan dokusundan elde edilebilen organoidler, uzun süreler kültüre edilebilmekte, genetik olarak

modifiye edilebilmekte ve doku bankalarında saklanabilmektedir. Organoidler bu özellikleri sayesinde hastalıkların moleküler mekanizmalarını araştırılmasının yanı sıra, ilaç duyarlılık testlerinin yapılması ve genetik tedavi gibi kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarının da yolunu açmaktadır [51-54]. Bu modellerin kök hücre kaynaklı olması, histogenez ve organogenez çalışmalarında kullanımlarına olanak sağlamaktadır [55]. Ayrıca insan dokusuyla çalışma fırsatı deney hayvanı kullanımının azalmasına da yardımcı olmaktadır.

2.2.1. Gastrointestinal sistem organoidleri

Endodermle döşeli yolk kesesi boşluğu, embriyonik gelişim sırasında sefalokaudal ve lateral yönde katlanmaya bağlı olarak embriyonun içinde kalır ve pirimitif bağırsak oluşturur [18]. Ağız boşluğundan anüse uzanan pirimitif bağırsak, gastrointestinal sistem organlarının temelini oluşturmaktadır [18, 56]. Leucine-rich repeat containing G-protein-coupled reseptör 5 (Lgr5) in bağırsak kök hücre belirteci olarak tanımlanması, pirimitif bağırsaktan köken alan gastrointestinal sistem organoidlerinin hücrel kaynağı olan Lgr5 pozitif kök hücrelerin saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu sağlamıştır [9]. Ekstraselüler matriks içerisine gömülü Lgr5 pozitif kök hücrelerin, Epitelyal büyüme faktörü (EGF), Noggin ve R-spondin-1 içeren besiyeri ile kültüre edilmesi sonucu epitelyal organoid kültürü 2009 yılında Sato ve Ark. tarafından tanımlanmıştır [10]. Bu gelişmeyi takiben besiyeri içeriğinin modifiye edilmesiyle aynı kökenden farklılaşan gastrointestinal organlara ait organoidlerin üretimi hız kazanmıştır [53].

2.2.2. Pankreas organoidleri

Normal pankreas kanallarında inaktif halde bulunan Wnt sinyal yolağı reseptörü Lgr5 pozitif kök hücrelerin, doku hasarına yanıt olarak aktive olduğunun keşfedilmesi ile 2013 yılında Huch ve arkadaşları tarafından pankreas dokusu için bir organoid modeli geliştirmiştir. Aynı çalışmada in-vitro ortamda kanal yapısı sergileyen bu organoidlerin, embriyonik pankreas progenitör hücreler ile birlikte fare böbrek kapsülü altına transplante edildiğinde endokrin pankreas hücrelerine benzer özellikler segilediği rapor edilmiştir [11]. Aynı yıl Sugiyama ve arkadaşları in vitro ortamda NEUROG3, MAFA, PDX1 ve PAX6 genlerinin ekspresyonunun indüklenmesi sonucu pankreatik kanal hücrelerin, β -hücrelerinin insülin sentezleme, depolama ve salgılama özelliklerinden sorumlu genleri eksprese eden endokrin benzeri hücrelere farklılaşma gösterdiğini bildirmiştir [57]. 2015 yılında Boj ve arkadaşları fare ve

insan pankreas adenokarsinom organoid modeli oluşturduklarını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar bu modelin farelerde ve insanlardaki normal ve tümör dokularına, fizyolojik olarak benzerliklerini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada organoidlerin kanal epitel hücreleri ile aynı belirteçleri taşıdığı fakat asiner ya da endokrin hücrelere özü genlerin ifadenlenmediğı de österilmiştir. Bu pankreas tümör organoidlerinin, farelere transplante edildiğinde önce pankreatik intraepitelyal neoplazma (PanIN) ilerleyen süreçte adenokarsinoma ve takiben metastaza yol açtığını rapor etmişlerdir [12]. İnsan ve fare dokusundan pankreas organoidlerinin izolasyonu, bu organoidlerin immunohistokimyasal yöntemle işaretlenmesi ve genetik manipölasyonlarını açıklayan detaylı bir protokolün 2016 yılında Broutier ve arkadaşları tarafından yayınlanması birçok araştırma grubun da pankreas organoidleri ile çalışmasına imkân sağlamıştır [58]. Azzarelli ve ark. tarafından yapılan çalışmada; Embriyonik dönemde endokrin pankreas oluşumunu indükleyen Neurogenin3 (NRG3) proteinin, pankreas organoidlerinde epitelial hücrelerin α -hücrelerine farklılaşmasını, NRG3 proteininin defosforile halinin ise β -hücrelerine farklılaşmayı indüklediğı österilmiştir [59].

Pankreas organoidlerinin kendi kendine organize olmaları, ilerleyen pasaj sayıları sonrası hücre canlılığını ve kök hücre havuzunu koruyabilmeleri için çok sayıda büyüme faktörü ve supplement içeren bir besiyeri karışımı kullanılmaktadır. İlk kez Huch ve arkadaşları tarafından tanımlanan bu besiyerinin içeriğı ve bileşenlerinin temel özellikleri izelge 2.1. 'de belirtilmiştir [11].

Çizelge 2.1. Pankreas organoid besiyeri bileşenleri ve işlevleri belirtilmiştir

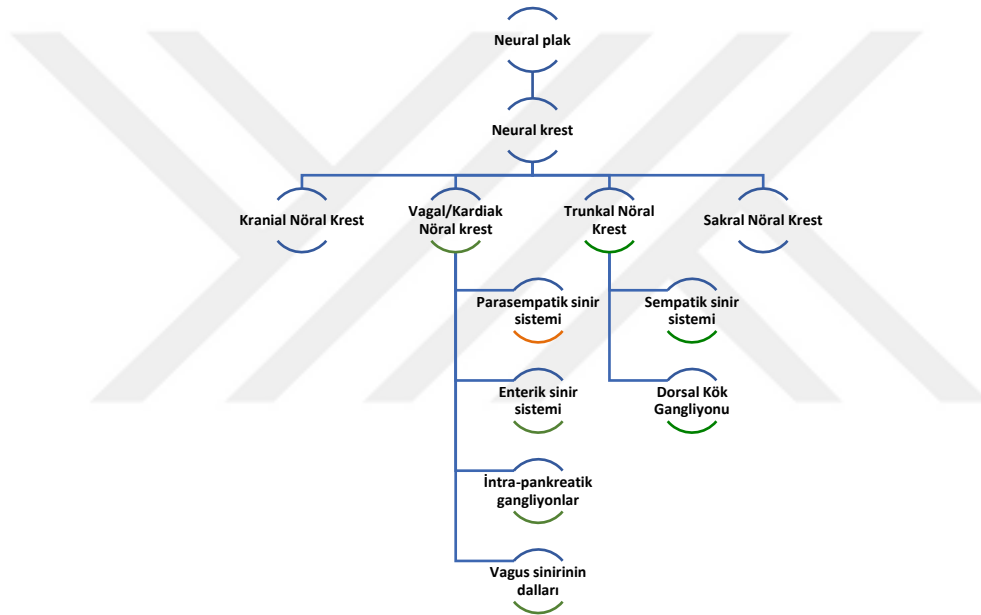
Besiyeri Bileşeni	İşlevi
Advanced DMEM/F-12	Temel besiyeri. Bu besiyerinde bulunan BSA, organoidlerin ve büyüme faktörlerinin kullanılan pipet ucu, tüp gibi sarf malzemelerine yapışmasını önlemeye yardımcı olur.
HEPES	Besiyeri pH seviyesini dengelemeye yardımcı olan tampon çözelti
GlutaMAX	Glutamine takviyesi
Penicillin/Streptomycin	Antibiyotik
BSA	Organoidlerin ve büyüme faktörlerinin uçlara, tüplere ve pipetlere yapışmasını önleyen moleküler taşıyıcı protein
A 83-01	TGF beta yolağının inhibasyonuna yol açan activin receptor kinase (ALK) molekülünü inhibe eder
mEGF	Epitelyal büyüme faktörü
hFGF-10	Fibroblast büyüme faktörü, NOTCH sinyal yolağını aktive eder
hGastrin I	Pankreas asiner hücrelerini sindirim enzimleri salgılaması için uyaran bir hormondur, pankreas büyüme faktörü olarak da görev alır.
mNoggin	TGF beta yolağının inhibasyonuna yol açan bone morphogenic protein 4 (BMP4), chordin, follistatinmoleküllerini inhibe eder
N-acetylcysteine	Antioksidan – glutatyon depolarını yeniler
Nicotinamide	B vitamini; poli(ADP-riboz) polimerazları (PARP-1) inhibe eder, endokrin hücre farklılaşmasını destekler
B27 supplement	İnsülin ve progesteron hormonlarını içerir. Retinoik asit aktivasyonuna yol açar; steroidler ve antioksidanlar içerir.
R-spondin1	Wnt sinyal yolağını aktive eder, kök hücre havuzunun kendini yenileyerek devamlılığını sağlar

Pankreas organoid modelleri endoderm kökenli dokuların araştırılma potansiyelleri açısından ilgi çekici olmasına rağmen, gelişim aşamasındaki bir teknik olarak çeşitli kısıtlamalara sahiptir. Mevcut pankreas organoid modellerinde, organın in vivo koşullarda taşıdığı; fibroblastlar, endotelyal hücreler, immün hücreler ve nöral yapıların eksikliği mikroçevre ve hücre-hücre etkileşimlerinin belirlenmesi için gereken uygun fizyolojik koşulların elde edilmesinde kısıtlamalara neden olmaktadır [13, 14]. Yalnızca epitelyal hücreleri içeren organoidlerin, mezenkimal hücreler [15], lenfositler [16], fibroblastalar, nöronlar [17] ve nöral krest hücreleri [8] gibi farklı hücre tipleri ile birlikte kültür edilmesi, in vivo eşdeğerlerine benzer mikroçevreye sahip kompleks organoid modelleri elde edilmesinde etkili bir yöntem olarak görünmektedir.

2.3. Nöral Krest Hücreleri (NKH)

Nöral krest hücreleri, ektodermal nöral plağın ileride merkezi sinir sistemini oluşturacak olan nöral tüpü şekillendirmek üzere katlanması sırasında nöral oluğun her iki kenarında ortaya çıkan hücrelerdir [18]. Nöral krest hücrelerinin ortaya çıkışını takiben bu hücrelerde epitelyal mezenkimal geçiş başlar ve nihai hedeflerine ulaşmak üzere dorso-lateral ve ventral-caudal

yönde göç ederler [60, 61]. Normal memeli embriyogenesinde nöral krest hücrelerinin oluşumu ve göçü, orta beynin seviyesinde başlar ve kaudal yönde devam eder. Bu nedenle, nöral krest hücreleri, nöral tüpün farklı seviyelerinden köken alarak; kranial, kardiyak, vagal, sakral ve trunkal olmak üzere, farklı göç yollarına ve farklılaşma kapasitelerine sahip gruplara ayrılır [19]. Vagal NKH'ler somit 1-7 seviyelerinde ortaya çıkar ve esas olarak parasempatik sistemin periferik yapılarını, Vagus Sinirinin dallarını, enterik sinir sistemini ve pankreasın intirinek ganglionlarını oluşturur [62]. Trunkal NKH'ler ise yolculuklarına daha kaudal bir pozisyondan (6.-7.'den 18-24 somit seviyelerine kadar) başlar ve duyuusal ve motor liflerle sempatik sinir dalları ve dorsal kök gangliyonlarını (DKG) oluşturur [63].



Şekil 2.3. Göç bölgelerine göre NKH türleri ve oluşumuna katıldıkları periferik sinir sistemi yapıları

Uyarılmış pluripotent kök hücrelerin (UPKH) farklılandırılması yöntemiyle in vitro ortamda nöral krest hücrelerin elde edilmesini açıklayan çalışmalar mevcuttur [64-67]. Bu yöntemlerin hepsi temelde TGF- β sinyal yolağının inhibisyonu, Wnt sinyal yolağının aktivasyonu ve BMP moderasyonuna dayanmaktadır. Uyarılmış pluripotent kök hücrelerin, nöral krest hücrelerine farklılandırılması için hazırlanmış ticari ürün (Stemdiff Neural Crest Differentiation Kit®) de bulunmaktadır.

2.4. Dorsal Kök Gangliyonu (DKG)

Periferik sinirlerin hücre gövdeleri, merkezi sinir sistemi içinde veya merkezi sinir sistemi dışındaki periferik ganglionlarda bulunabilir. Gangliyon nöronal hücre gövdelerinin kümelerini ve sinir liflerini içerir. Dorsal kök gangliyonları omurga boyunca intervertebral foramina içerisinde çift halinde bulunurlar. Dorsal kök gangliyonlarındaki hücre gövdeleri, otonom sinir sisteminin somatik afferent ve visseral afferent duyu nöronlarına aittir [68, 69]. Dorsal kök gangliyonundan gelen bu duysal sinirler nervus vagus ve splanknik sinir lifleri ile   lyak gangliyonda bir araya gelir ve ana damarlarla birlikte pankreasa girerek pankreasın ekstrinsik innervasyonunu sa ırlar [24].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar çizelge 3.1. 'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Cihaz	Marka	Katalog numarası
Class II Biological Safety Cabinet	Thermo Scientific	Cat#51023654
CO ₂ Inkübatör	New Brunswick	-
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf	-
37°C su banyosu	-	-
Pipet tabancası	-	-
Mikro pipet	Eppendorf	Cat#3120000909
Invert mikroskop	Olympus	-
Hemocytometer	Sigma	Cat#Z359629
Clean bench cabinet	Thermo Scientific	-
Stereo mikroskop	Nikon	-
Işık mikroskobu	Leica	-
Floresan mikroskop	KEYENCE	-
Leica SP8 Konfokal mikroskop	Leica	-
Termal döngü cihazı (PCR thermal cycler)	Eppendorf	-
Jel elektroforez cihazı		-
LightCycler® 480 Real-Time PCR System	ROCHE	-
Cryo-Mikrotom	Leica	CM1950
Termal Çalkalayıcı	Thermo Scientific	-
Ultra ince mikro vannas makas (düz uçlu)	-	-
Ultra ince mikro vannas makas (eğik uçlu)	-	-
Ultra ince mikro pens (düz uçlu)	-	-
Ultra ince mikro pens (eğik uçlu)	-	-

3.2. Kullanılan Kimyasallar, Rekombinant Proteinler ve Kitler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar, rekombinant proteinler ve kitler Çizelge 3.2. 'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal, rekombinant protein ve kitler

İsim	Marka	Katalog numarası
TeSR™-E8™	Stemcell Technologies	Cat#05990
STEMdiff™ Neural Krest Farklandırma Kit	Stemcell Technologies	Cat#08610
DMEM/F-12 +15mM HEPES ve +sodyum bicarbonate, -L-glutamine	Sigma-Aldrich	Cat#D6421
Gentle Cell Dissociation Reagent (GCDR)	Stemcell Technologies	Cat#07174
Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, Phenol Red-free, LDEV-free	Corning	Cat#356231
Matrigel® hESC-Qualified Matrix, LDEV-free	Corning	Cat#354277
DPBS (-)CaCl ₂ , (-)MgCl ₂	Sigma-Aldrich	Cat#D8537
Y27632	Miltenyi Biotec	Cat#130-103-922
Advanced DMEM/F-12	Thermo Fisher/Gibco	Cat#12634010
GlutaMAX 100X	Thermo Fisher/Gibco	Cat# 35050061
HEPES (1 M)	Thermo Fisher/Gibco	Cat#15630080
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Thermo Fisher/Gibco	Cat#15140122
N-Asetilsistein	Sigma-Aldrich	Cat#A9165-5G
Nikotinamid	Sigma-Aldrich	Cat#N0636-100G
Recombinant Murine Noggin	Peptotech	Cat#250-38
EGF Recombinant Mouse Protein	Thermo Fisher/Gibco	Cat#PMG8043
Recombinant Human FGF-10	Peptotech	Cat#100-26
Gastrin I (insan)	Tocris	Cat#3006
A83-01	Tocris	Cat#2939
B27 supplement 50x (serum-free)	Thermo Fisher/Gibco	Cat#17504044
Minimum Essential Medium (MEM)	Thermo Fisher/Gibco	Cat#11095080
RLT tampon çözeltisi	Qiagen	Cat# 79216
2-Mercaptoethanol	Sigma	Cat#63689
Trypan Mavisi solusyonu, 0.4%	Thermo Fisher/Gibco	Cat#15250061
Bovine Serum Albumin solusyonu 30% in DPBS, sterile	Sigma-Aldrich	Cat#A9576-50ML
Collagenase crude type XI	Sigma-Aldrich	C9407-500MG
Dispase-II	Thermo Fisher	17105041
Fötal sığır serumu	VWR	97068-085
Sükroz	Merck	S8501
Domuz jelatini	Sigma-Aldrich	G2500
PBS	Sigma-Aldrich	P3813-1PAK
Glisin	Roth	3908.3
NaN ₃	Sigma-Aldrich	S200-2
BSA (Fraction V)	Merck	10735108001
TritonX-100	Roth	3051.3
Tween20	Roth	9127.2
Gliserol	Sigma-Aldrich	G5516

Çizelge 3.2. (devam) Kullanılan kimyasal, rekombinant protein ve kitler

İsim	Marka	Katalog numarası
D-(–)-Fructose	Sigma-Aldrich	F0127
Gentamicin solusyonu 50 mg/mL	Sigma-Aldrich	Cat#G1397
DNeasy DNA izolasyon kiti	Qiagen	
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher	4368814
KAPA SYBR® FAST qPCR Mix	ROCHE	KK4600
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich	R2523
RNeasy RNA izolasyon kiti	Qiagen	
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X)	Invitrogen	NP0007
Süt Tozu	Roth	T145.1
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher	32106
Formaldehyde solution 4%, buffered, pH 6.9	Sigma-Aldrich	1.00496
Hematoxylin Solution, Mayer's	Sigma-Aldrich	MHS032
Eosin Y solution, alcoholic	Sigma-Aldrich	HT110132
Normal Goat Serum (10%)	Thermo Fisher	50197Z
μ-Slide 8 Well 15pcs/Box	Ibidi	80826

3.3. Kullanılan Hücre Hattı ve Model Organizmalar

N-terminal ucundan HA etiketi ile işaretlenmiş murin R-Spondin1'i eksprese etmek için stabil bir şekilde transfeke edilmiş HA-R-pondin1-Fc 293T hücre hattı R-Spondin1 conditioned besiyeri üretiminde kullanılmak üzere Trevigen firmasından (Katalog numarası: 3710-001-01) satın alınmıştır.

Adipoz doku kökenli hücrelerin, KLF4, LIN28, MYC, POU5F1, SOX2 genleri ifadelemek üzere epizomal yöntemle transfeke edilerek yeniden programlanmış BIONi014-A UPKH hattı Avrupa Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Bankası'ndan (EBiSC) satın alınarak NKH farklandırılmasında kullanılmıştır.

Normal pankreas organoidlerinin ve DKG izolasyonunda, araştırma sonuçlarını etkileyebilecek genetik farklılıklardan arındırılmış C57BL/6 fareler kullanılmıştır. Pankreas tümör organoileri ise pankreatik duktal adenokarsinom oluşturmak amacıyla genetik olarak modifiye edilmiş $Kras^{+/LSLG12D}$ $Trp53^{fl/fl}$ $p48^{+/Cre}$ (KPC) fareler kullanılarak izole edilmiştir.

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen hayvan deneyleri "Government of Upper Bavaria, approval nr: 55.2-1-54-2532-223-2015" numaralı etik kurul onayı ile uluslararası etik kurallara uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.4. Kullanılan Antikorlar

Bu çalışmada kullanılan primer antikorlar aşağıda listelenmiştir:

Çizelge 3.3. Kullanılan primer antikorlar

Primer Antikor	Marka	Katalog Numarası
Anti-HA-Tag (C29F4)	Cell signalling	3724T
Anti-PAX6	Atlas	AMAb91372
Anti-SOX10	R&D	AF2864-SP
Anti-E-Cadherin	BD	BD610182
Anti-SOX9	Abcam	Ab185966
Anti-Ki-67	Invitrogen	14-5698-82
Anti-GFAP	Dako	Z0334
Anti- β 3-Tubulin	Novus Bio	N100-1612

Bu çalışmada kullanılan sekonder antikorlar aşağıda listelenmiştir:

Çizelge 3.4. Kullanılan sekonder antikorlar

Sekonder Antikor	Marka	Katalog Numarası
Anti-rabbit HRP conjugated	GE Healthcare	Na9340v
Anti-mouse HRP conjugated	GE Healthcare	Na9310v
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse	Thermo Fisher	A11001
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit	Thermo Fisher	A11008
Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Mouse	Thermo Fisher	A11032
Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Rabbit	Thermo Fisher	A11037
Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Rat	Thermo Fisher	A11007
Alexa Fluor® 647 Goat Anti-Chicken	Thermo Fisher	A21449

3.5. Kullanılan Bilgisayar Yazılımları

3B konfokal mikroskopik görüntüler Leica SP8 konfokal mikroskop ile koordineli olarak çalışan LAS X yazılımı kullanılarak elde edildi. İnnerve pankreas organoid kültürlerinde nörit analizleri simple neurite tracer plug-in ile desteklenmiş imageJ (FIJI) 1.53c yazılımı kullanılarak yapıldı. İnnerve pankreas organoid kültürlerinde Ki67 pozitif hücreler İmaris 9.6 yazılımı kullanılarak sayıldı. Elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri için Graphpad prism 9 yazılımından faydalanıldı.

3.6. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

Kullanılan besiyeri ve çözeltiler, aşağıda belirtilen oran ve konsantrasyonlarda karıştırılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5. Organoid izolasyon besiyeri

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
DMEM + glucose, L-glutamine, sodium pyruvate	n/a	485 mL
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml)	1000 U/ml	5 mL
Fötal Sığır Serum	10 mM	5 mL
Toplam	n/a	500 mL

+ 4°C sıcaklıkta 1 aya kadar saklanabilir.

Çizelge 3.6. Pankreas parçalama çözeltisi

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
Organoid izolasyon besiyeri	n/a	200 mL
Collagenase crude type XI	0,125 mg/mL	25 mg
Dispase-II	0,125 mg/mL	25 mg
Toplam	n/a	200 mL

Çizelge 3.7. Organoid temel besiyeri

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
Advanced DMEM/F-12	n/a	485 mL
Glutamax (100X)	1X	5 mL
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml)	1000 U/ml	5 mL
HEPES (1 M)	10 mM	5 mL
Toplam	n/a	500 mL

+ 4°C sıcaklıkta 1 aya kadar saklanabilir.

Çizelge 3.8. Tam organoid besiyeri

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
Oganoid temel besiyeri	n/a	18 mL
1000X mEGF (50 µg/mL)	1X (0.05 µg/mL)	20 µL
1000X hFGF-10 (100 µg/mL)	1X (0.1 µg/mL)	20 µL
1000X A 83-01 (0.21 mg/mL)	1X (0.21 µg/mL)	20 µL
1000X mNoggin (100 µg/mL)	1X (0.1 µg/mL)	20 µL
1000X hGastrin I (0.021mg/mL)	1X (0.021 µg/mL)	20 µL
400X N-acetylcysteine (81.5 mg/mL)	1X (0.2 mg/mL)	50 µL
100X Nicotinamide (122 mg/mL)	1X (1.22 mg/mL)	200 µL
50X B27 Supplement	1X	400 µL
10X RSpondin-1 conditioned medium	1X	2 mL
Toplam	n/a	20 mL

+ 4°C sıcaklıkta 14 güne kadar saklanabilir

Çizelge 3.9. DKG izolasyon besiyeri

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
MEM	n/a	500 mL
Gentamicin solution (50 mg/mL)	40 µg/mL	400 µL
Toplam	n/a	500 mL

+ 4°C sıcaklıkta 1 aya kadar saklanabilir.

Çizelge 3.10. Birlikte kültür besiyeri

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
Oganoid temel besiyeri	n/a	19.53 mL
50X B27 Supplement	1X	400 µL
400X N-acetylcysteine (81.5 mg/mL)	1X (0.2 mg/mL)	50 µL
Y27632 (10mM)*	10 µM	20 µL
Toplam	n/a	20 mL

+ 4°C sıcaklıkta 10 güne kadar saklanabilir.

[*Not: Y27632 birlikte kültür ilk hazırlandığında kullanılmıştır. Besiyeri değişikliklerinde Y27632 eklenmesine ihtiyaç duyulmamaktadır.]

Çizelge 3.11. 30% Sükroz çözeltisi:

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
PBS	n/a	1000 mL
Sükroz	0,3 g/ml	300 g
Toplam	n/a	1000 mL

Çizelge 3.12. Jelatin gömme çözeltisi

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
PBS	n/a	100 mL
Sükroz	0,1 g/ml	10 g
Domuz jelatini	0,075	7,5 g
Toplam	n/a	100 mL

Çizelge 3.13. PBS-Glisin çözeltisi

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
PBS	n/a	1000 mL
Glisin	0,075	0,75 g
Toplam	n/a	1000 mL

Çizelge 3.14. IF yıkama çözeltisi

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
PBS	n/a	1000 mL
NaN ₃	0,5 ng/mL	0,05 g
BSA	1 ng/mL	0,1 g
TritonX-100	0,2 µL/mL	0,2 mL
Tween20	0,05 µL/mL	0,05 mL
Toplam	n/a	1000 mL

Çizelge 3.15. Fruktoz-gliserol çözeltisi

Bileşen	Konsantrasyon	Miktar
Gliserol	n/a	33 mL
dH ₂ O	n/a	7 mL
Fruktoz	0,74 g/mL	29,72 g
Toplam	n/a	40 mL

3.7. Deneysel Yöntem

Bu tez çalışmasında, fare pankreas organoidlerini NKH ile birlikte kültür ederek innerve olmuş pankreas organoidleri elde etmek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak pankreas organoid besiyerinin hazırlanmasında kullanılmak üzere, R-Spondin1 conditioned besiyeri elde edilmiş ve western blot yöntemi ile kalite kontrolü yapılmıştır. Daha sonra C57BL/6 sağlık farelerden ve pankreatik duktal adenokarsinom taşıyan Kras^{+/LSLG12D} Trp53^{fl/fl}p48^{+Cre} (KPC) farelerden pankreas organoidleri izole edilmiş ve bu organoidlerin karakterizasyonu yapılmıştır. Pankreas organoidleri pasajlanarak organoid hatlarının elde edilmesinin ardından, UPK'ler NKH'e farkedirilmişdir. Gerçek zamanlı kantitatif RT-qPCR ve immunositokimyasal yöntemler kullanılarak elde edilen hücrelerin NKH'leri olduğu doğrulanmıştır. Pankreas organoidleri ve NKH 3B ortamda birlikte kültür edilerek pankreas organoidlerin innerve olması sağlanmıştır. Pankreas organoidlerinin innervasyonu wholemount immunfloresan yöntemle doğrulanmıştır. Son olarak pankreas organoidleri olgun nöronlar içeren DKG ile birlikte kültür edilerek innervasyonu sağlanmış, NKH+organoid ve DKG+organoid kültür modelleri pankreatik nöropati açısından değerlendirilerek karşılaştırılmıştır.

3.7.1. R-Spondin1 conditioned besiyeri hazırlanışı

N-terminal ucundan HA etiketi ile işaretlenmiş murin R-Spondin1'i eksprese etmek için stabil bir şekilde transfekte edilmiş HA-R-pondin1-Fc 293T hücre hattı 10% FBS, 5% penisilin/streptomisin, 5% glutamax içeren DMEM besiyeri kullanılarak, 5% CO₂ içeren 37°C sıcaklıkta nemli ortam sağlayan inkübatörde kültüre edilerek çoğaltılmıştır. Çoğaltılan hücreler pasajlanarak 175cm² flaklara ekilmiş ve hücreler yaklaşık 90% doluluk oranına ulaştığında besiyeri ortamdan alınarak hücreler 20mL DPBS ile yıkanmış ve 50mL organoid temel besiyeri eklenerek hücreler bir hafta bounca kültüre edilmiştir. Bir hafta sonunda

besiyeri kültür ortamından alınarak 50mL konikal tüplere transfer edilerek +4°C soğutulmuş santrifüjde, 300g kuvvetle, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatant steril biyolojik kabin içerisinde 0.2µm filtreden geçirilerek R-Spondin1 conditioned besiyeri alikotları hazırlanmış ve organoid kültüründe kullanılmak üzere -20°C 'de saklanmıştır.

3.7.2. Western Blot yöntemi kullanılarak R-Spondin1 conditioned besiyerinin kalite kontrolü

Üretilen conditioned besiyerindeki R-Spondin1 protein varlığı, HA-R-pondin1-Fc 293T tarafından üretilen R-Spondin1 proteinin N-terminal ucunda bulunan HA etikeniye özgü Anti-HA-tag primer antikor kullanılarak western blot yöntemiyle tayin edilmiştir. Negatif kontrol olarak HEK293 hücre lisatı ve AdvancedDMEM/F12 besiyeri kullanılmıştır. Bu amaçla 7,5µL örnekler 7,5µL NuPAGE Loading tampon ile karıştırılmış, örneklerin protein içeriğinin denaturasyonu için 2 dakika boyunca ısıtılarak karıştırılmıştır. Hazırlanan örnek çözeltileri 1mm kalınlığında 10% yoğunlukta polyakrilamid jele yüklenerek elektroforez uygulanmıştır. Elektroforez sonrası moleküler ağırlıklarına göre ayrılan moleküller, semi-dry yöntemle polyvinylidiflorid (PVDF) membrana aktarılmıştır. Transfer sonrası membran 5% süt tozu ve 0,1% Tween20 içeren PBS-T çözeltisi (blocking çözeltisi) ile 1 saat oda sıcaklığında incube edilerek protein blocking yapılmıştır. Blocking çözeltisi içerisinde 1:1000 oranında dilüe edilmiş Anti- HA-Tag(C29F4) primer antikoru ve housekeeping protein olarak blocking çözeltisi içerisinde 1:1000 oranında dilüe edilmiş Anti-GAPDH primer antikoru ile +4°C 'de bir gece inkübasyonu takiben PBS-T çözeltisi ile 3 kere yıkanan membrane, blocking çözeltisi içerisinde 1:1000 oranında dilüe edilmiş HRP konjuge anti-rabbit sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Membran inkübasyon sonrası 3 kez 5 dakika PBS-T ve 2 kez 5 dakika PBS çözeltisi ile yıkandıktan sonra ECL kit kullanılarak görüntülenmiştir.

3.7.3. Pankreas organoidlerinin izolasyonu

Pankreas organoidlerinin izolasyonu için 12-14 haftalık C57BL/6 sağlıklı fareler ve pankreatik duktal adenokarsinoma taşıyan $Kras^{+/LSLG12D}$ $Trp53^{fl/fl}$ $p48^{+/Cre}$ (KPC) fareler kullanılmıştır. Fareler yüksek doz izofluran ile ötenazi sonrası dekapasite edilmiştir. Abdomen açılarak bağırsaklara zarar verilmeden pankreas çıkartılmış ve organoid izolasyon besiyeri içeren konikal tüplere aktarılmıştır. Prosedüre aseptik koşullar altında devam

edilmiştir. Fareden alınan pankreas dokusu bir miktar besiyeri ile birlikte 100mm petri kabı içerisine aktarılmış ve bistüri yardımıyla 1mm boyutunda parçalara kesilerek mekanik olarak parçalanmıştır. Mekanik olarak parçalanan pankreas dokusu 15mL konikal tüp içerisine alınarak tüp 12mL organoid izolasyon besiyeri ile doldurulmuştur. Yaklaşık 1 dakikalık bekleme sonucu parankimatik doku tüpün dibine otururken, yüzmeye devam eden stromal doku aspire edilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra tüp içerisindeki besiyeri ve stromal doku aspire edilerek tüp içerisinde kalan pankreas parankiması kimyasal parçalanma işlemi için 10mL pankreas parçalama solüsyonu eklenerek 37°C sıcaklıkta 150rpm kuvvetle 90 dakika çalkalanmaya bırakılmıştır. Kimyasal parçalama işlemi sonrası büyük oranda parçalanan pankreas dokusu 40µm filtereden geçirilerek yeni bir tüpe alınmıştır. 900rpm kuvvetle +4°C de 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant dikkatlice aspire edilmiş ve pellet organoid temel besiyeri ile karıştırılarak tekrar 900rpm kuvvetle +4°C de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası supernatant aspire edilip geriye kalan pellet büyüklüğüne göre 200-400µL Matrigel ile karıştırılarak buz içerisinde muhafaza edilmiştir. Daha önceden 37°C ısıtılmış 48-well plate kuyucuklarına 1-2°C üzerinde katılaşmaya başlayan matrigelin katılaşmasına fırsat tanımadan, hızlı bir şekilde 25µL 'lik damlalar yapılmıştır. Matrigel damlacıklarının katılaşması için 5%CO₂ ve nemli ortam içeren inkübatörde 37°C sıcaklıkta 15 dakika inkübe edilmiş ve her kuyucuğa daha önceden 37°C su banyosunda ısıtılmış 250µL Y27632 içeren tam organoid besiyeri eklenerek 5% CO₂ ve nemli ortam içeren inkübatörde 37°C sıcaklıkta kültüre edilmiştir.

3.7.4. Pankreas organoidlerinin kültürü ve pasajlanması

İzolasyon sonrası 3. Günde invert mikroskop altında yapılan incelemede pankreas organoidlerinin oluşmaya başlanmıştır. Ortamdaki besi yeri her üç günde bir aspire edilerek yeni tam organoid besiyeri ile değiştirilmiştir. Yaklaşık 6.-7. Günde bir matrigel damlacığı içerisindeki organoid popülasyonu 80% 'den fazla olduğunda veya organoid büyüklüğü matrigel damlacık hacminin %70 den fazlasını kapladığında organoidler pasajlanmıştır. Kuyucuklardaki eski besiyeri aspire edilerek ortamdaki uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 500µL buz içerisinde soğutulmuş organoid temel besiyeri eklenerek mikropipet yardımıyla bir kez karıştırıldıktan sonra 15mL konik tüplere aktarılmıştır. Organoidleri içeren tüp hacmi 9,5mL organoid temel besiyeri eklenerek 10mL 'ye tamalanmıştır. 900rpm kuvvetle +4°C de 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant tüp içerisinde 1,5-2 mL kalana kadar aspire edilmiştir. 1000µL filtreli pipet ucuna 10µL filtresiz pipet ucu takılarak modifiye edilmiş

mikropipet kullanılarak organoidler 9 kez karıştırılmış ve mekanik olarak küçük parçalara bölünmesi sağlanmıştır. Tüp hacmi tekrar soğuk organoid temel besiyeri ile 10mL 'ye tamamlanmış ve 900rpm kuvvetle +4°C de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrasında supernatant dikkatlice aspire edilerek pellet matrigel ile karıştırılmış, organoid matrigel karışımı buz içerisine konulmuştur. Organoidler 1:6 oranında (1 well organoid 6 yeni well'e ekilerek) daha önceden ısıtılmış 24 well plate içerisine her kuyucuğa 50µL damlacıklar halinde ekilmiş ve matrigel'in katılaşması içi 15 dakika 37°C inkübatörde inkübe edilmiştir. Matrigel damlacıklarının katılaştıktan sonra her kuyucuğa önceden 37°C su banyosunda ısıtılmış 500µL tam organoid besiyeri eklenerek 5% CO₂ ve nemli ortam içeren inkübatörde 37°C sıcaklıkta kültüre edilmiştir.

3.7.5. Pankreas organoidlerinin genotiplerinin belirlenmesi

Yaklaşık bir hafta kültür sonucu 70-80% doluluk oranına ulaşan organoidler soğuk organoid temel besiyeri kullanılarak konikal tüplere aktarılmış ve mikro pipet yardımıyla mekanik olarak parçalanması sağlanmıştır. 900rpm kuvvetle +4°C sıcaklıkta 5 dakika santrifüj edilip supernatant aspire edilmiş ve tekrar 10 mL soğuk organoid temel besiyeri ile süspanse edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi 2 kere daha tekrarlanarak ortamdaki matrigel iyice uzaklaştırmış ve DNeasy DNA izoalsyon kiti kullanılarak genomik DNA izole edilmiştir. İzole edilen DNA 'lar REDTaq® PCR Reaction Mix, dH₂O ve çizelge 3.16. 'da belirtilen primer dizileri kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmış ve PCR gerçekleştirilmiştir. Amlifiye olan genomik DNA agaroz jel elektroforez yöntemiyle moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış ve görüntülenmiştir.

Çizelge 3.16. Genotip belirlenmesinde kullanılan primer dizileri

Gen	Primer Adı	Dizilim
p53	Forward	5'-GGTTAAACCCAGCTTGACCA-3'
	Rewerse	5'-GGAGGCAGAGACAGTTGGAG-3'
p48	Cre487	5'-GTCCAATTTACTGACCGTACACCAA-3'
	p48as1642	5'-CCTCGAAGGCGTCGTTGATGGACTGCA-3'
Kras	Mutant	5'-GCAGGTCGAGGGACCTAATA-3'
	Wild Type	5'- TGTCTTTCCCCAGCACAGT-3'
	Common	5'- CTGCATAGTACGCTATACCCTGT-3'

3.7.6. Pankreas organoidlerin Cryo-Kesitlerinin alınması ve H&E boyama

Yaklaşık 6-7 gün kültür sonrası 90% doluluk oranına ulaşan organoid kültürler ortamından besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılmış ve her kuyucu oda sıcaklığında PBS çözeltisi ile bir kez yıkanmıştır. Organoidlerin tespit işlemi için her kuyucuğa 1mL 2% paraformaldehit solüsyonu eklenerek odasıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Fiksatif çözeltisi aspire edildikten sonra örnekler PBS çözeltisi ile 5 dakika boyunca 3 defa yıkanmıştır. Örnekler pastör pipeti yardımıyla dikkatlice 5mL 30% süktroz çözeltisi içeren konik tüplere aktırılmış ve 3 gün +4°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. 30% süktroz çözeltisinin difüzyonu sonrası tüpün dibine oturan örnekler jelatin gömme çözeltisi içerisine alınarak bir saat 37°C de inkübe edilmiş ve örnek yapısının bozulmamasına dikkat edilerek doku gömme kalıpları içiçerisine alınmıştır. Örneklerin yerleştirildiği doku kalıpları sıvı nitrojen üzerinde yüzdürülerek, doku içiçerisinde kristalizasyon oluşması engellenerek jelatin gömme çözeltisinin donması sağlanmış ve hazırlanan bloklar cryo-kesit işlemi için -80°C 'de saklanmış. Örneklerden Leica CM1950 cryo-mikrotom kullanarak 10µm kalınlığında seri kesitler alınarak organoid histomorfolojisi incelenmek üzere -20°C sıcaklıkta saklanmış ve hematoksilin & eozin (H&E) boyama uygulanmıştır.

H&E boyaması uygulanmak üzere pozitif yüklü lam üzerine alınan organoid kesitleri oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 5 dakika distile su ile muamele edilmiştir. 7 dakika mayer's hematoksilin çözeltisi içiçerisinde bekletilen örnekler 10 dakika musluk suyu ile yıkanmış ve ardından 12 dakika eozin çözeltisi içiçerisinde bekletilmiştir. Eozin boyama sonrası örnekler 10 dakika musluk suyu ile yıkayıp sırasıyla distile su ve artan etil alkol serilerinden geçirelek dehidrasyonu yapılmıştır. Dehidre edilen örnekler 2 kez 10 dakika ksilen içiçerisinde bekletilip entallan kullanılarak kapama işlemi tamamlanmıştır. Örnekler ışık mikroskobu kullanılarak görüntülenmiş ve histomorfolojik açıdan değerlendirilmiştir.

3.7.7. UPKH kültürü ve pasajlanması

Bu tez çalışmasında BIONi014-A insan UPKH hattı kültürü için hESC-Qualified Matrigel® Matrix kaplı plateler kullanılmıştır. hESC-Qualified Matrigel üretici firma tarafından belirtilen dilüsyon oranına göre DMEM/F12 besiyeri ile dilüe edilerek kaplama besiyeri hazırlanmıştır. 6mL kaplama besiyeri 100mm petri kapları içiçerisine eklenmiş ve oda sıcaklığında bir buçuk saat bekletilmiştir. Bir buçuk saat sonrasında hESC-Qualified

Matrigel ile kaplanmış olan petri kaplarından kaplama besiyeri aspire edilmiş ve 10 μ M Y27632 içeren 11,5 mL TesR_E8 besiyeri eklenmiştir. 37°C su banyosunda çözölen UPKH kolonileri 10mL TesR_E8 besiyeri içeren konik tüplere aktarılmış oda sıcaklığında 200g kuvvattle 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası supernatant aspire edilerek UPKH kolonileri 0,5mL TesR_E8 besiyeri ile süspanse edilip hazırlanan petri kabına ekilmiştir. Besiyeri günlük olarak taze TesR_E8 besiyeri ile değıştirilmiştir. Yaklaşık 5-6 gün içerisinde 70% doluluk oranına ulaşan kültür yeni hESC-Qualified Matrigel® kaplı petrilere pasajlanmıştır. 70% doluluk oranına ulaşan UPKH kolonilerin invert mikroskopla altında kompakt bir merkeze sahip ve koloni sınırlarının düzgün olduğu doğrulandıktan sonra eğer varsa farklılaşmış hücreler mikro pipet ucuyla kazınarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Besiyeri aspire edildikten sonra hücre kolonileri DPBS ile bir kez yıkanmış ve 6mL gentle cell disassociation reagent (GCDR) eklenerek oda sıcaklığında yaklaşık 8 dakika inkübe edilmiştir. GCDR inkübasyon sonrası aspire edilmiş ve ortama 6mL TesR_E8 besiyeri eklenerek koloniler fazla parçalanmadan daha önceden hazırlanmış 11,5mL TesR_E8 besiyeri içeren hESC-Qualified Matrigel® kaplı 100mm petri kaplarına 0,5mL ekilmiştir. Günlük besiyeri değışimi takiben 5-6 gün içerisinde 70% doluluk oranına ulaşan UPKH'ler tekrar pasajlanmış veya NKH farklanası için kullanılmıştır.

3.7.8. UPKH hücrelerin NKH'lere farklandırılması

UPKH kolonileri NKH farklandırılması için tek hücre seviyesinde parçalanmış ve hESC-Qualified Matrigel® kaplı 6-well platelere ekilmiş ve STEMdiff™ Neural Krest Farklandırma Kit kullanılmıştır. 70% doluluk oranına ulaşan UPKH kültürleri invert mikroskop kullanılarak incelenmiş eğer varsa farklılaşmış hücreler mikro pipet ucuyla kazınarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Besiyeri aspire edildikten sonra hücre kolonileri DPBS ile bir kez yıkanmış ve 6mL GCDR eklenerek oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika inkübe edilmiştir. GCDR inkübasyon sonrası aspire edilmiş ve ortama 6mL DMEM/F12 besiyeri eklenerek koloniler 15mL konikal tüpe tansfe edilmiştir. Serolojik pipet ile 9-10 kez pipetlenerek kolonilerin tek hücre seviyesine parçalanması sağlandıktan sonra 4mL DMEM/F12 eklenerek tüp hacmi 10mL 'ye tamamlanmış ve hücre sayımı için 200 μ L hücre süspansiyonu 1,5mL tüpe aktarılmıştır. UPKH süspansiyonu +4°C sıcaklıkta 200g kuvvettle 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi devam ederken hemositometre kullanılarak hücre sayımı yapılmıştır. Santrifüj sonrası supernatant aspire edilmiş, hücre pelleti 2*10⁶ hücre/mL konsantrasyonu sağlayacak şekilde 10 μ M Y27632 içeren STEMdiff™ Neural

Krest Farklandırma besiyeri ile süspanse edilerek önceden hazırlanmış hESC-Qualified Matrigel® kaplı 6-well platelere ekilmiştir. STEMdiff™ Neural Krest Farklandırma besiyeri günlük olarak değiştirilmiş ve 6 gün sonrasında NKH farklanması tamamlanmıştır. Yeni farklandırılmış NKH'lerde nöral krest belirteçleri immunositokimyasal olarak ve nöral krest genleri RT-qPCR yöntemiyle belirlenmiştir.

İmmunositokimya uygulaması için hESC-Qualified Matrigel® kaplı lamellar üzerinde farklandırılan NKH DPBS ile yıkandıktan sonra 2% paraformaldehit çözeltisi ile 10 dakika inkübe edilerek fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası hücreler 3 kez 10 dakika boyunca PBS-T çözeltisi ile yıkanmış ve hücre zarı geçirgenliğini artırmak amacıyla 0,1% TritonX100 içeren PBS çözeltisi ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. PBS-T çözeltisi ile 10 dakika boyunca tekrar yıkanan hücreler 10% normal keçi serumu (NGS) ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilerek blocking işlemi tamamlanmıştır. Blocking sonrası örnekler, blocking çözeltisi içerisinde 1:250 oranda dilüe edilmiş PAX6 ve SOX10 primer antikorları eklenerek +4°C de bir gece inkübe edilmiştir. Primer antikor inkübasyonunun tamamlanmasının ardından örnekler 3 kez 10 dakika PBS-T çözeltisi ile yıkanmış ve blocking çözeltisi içerisinde 1:500 oranında dilüe edilmiş floresan etiketli sekonder antikorlar ve çekirdek işaretlemesi için 1:1000 oranında DAPI karışımı ile odasıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Sekonder antikor inkübasyonu sonrası örnekler PBS-T çözeltisi ile 3 kez 10 dakika boyunca yıkanmış ve su bazlı floresan kapama çözeltisi kullanılarak lam üzerine kapatılmıştır. Hazırlanan örnekler KEYENCE floresan mikroskop kullanılarak görüntülenmiş ve incelenmiştir.

Yeni farklandırılmış NKH'ler DPBS ile yıkandıktan sonra 1mL GCDR ile oda sıcaklığında 8 dakika inkübe edilmiş ve hücreler 9mL organoid temel besiyeri içeren konikal tüp içerisine transfer edilerek 200g kuvvetle +4°C sıcaklıkta 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant aspire edilerek hücre pelleti 10 mL organoid temel besiyeri ile süspanse edilmiştir. Hücre süspanسیونunun bir kısmı organoidlerle birlikte kültür edilmek için kullanılmış ve geri kalanı 200g kuvvetle +4°C sıcaklıkta 5 dakika santrifüj edilip supernatant aspire edilerek hücre pelleti RNA izolasyonu yapılmak üzere 1% β-merkaptoetanol içeren RLT tampon ile süspanse edilmiştir. Qiagen RNeasy mini kit kullanılarak RNA izolasyonu yapılmış ve Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit kullanılarak cDNA sentezi tamamlanmıştır. Sentezlenen cDNA'lar, PAX3, Snail-2 e SOX10 mRNA 'larına uygun primerler (Çizelge 3.17.), KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix ve

distile su kullanılarak 20µL hacimde reaksiyon karışımı hazırlanmış ve RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. GAPDH housekeeping gen olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.17. NKH karakterizasyonunda kullanılan primer dizileri

Gen	Dizilimi	
GAPDH	Sense	AGCCACATCGCTCAGACAC
	Anti-sense	GCCCAATACGACCAAATCC
Pax3	Sense	GCCGCATCCTGAGAAGTAAA
	Anti-sense	CTTCATCTGATTGGGGTGCT
Snail2	Sense	TGACCTGTCTGCAAATGCTC
	Anti-sense	CAGACCCTGGTTGCTTCAA
Sox10	Sense	AGCTCAGCAAGACGCTGG
	Anti-sense	CTTTCTTGTGCTGCATACGG

3.7.9. Pankreas organoidlerinin NKH ile birlikte kültürü

24-well plate içerisinde kültüre edilen pankreas organoidleri pasaj sonrası 6.-7. Günde 80% hücre doluluk oranına ulaştığında 1 kuyucuktan (yaklaşık 40.000 hücre) besiyeri aspire edilmiş ve 500µL soğuk organoid temel besiyeri eklenerek mikro pipet yardımıyla bir kez karıştırıldıktan sonra 15mL konik tüplere aktarılmıştır. Organoidleri içeren tüpe 9,5mL organoid temel besiyeri eklenerek 900rpm kuvvetle +4°C de 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant tüp içerisinde 1,5-2 mL kalana kadar aspire edilmiştir. 1000µL filtreli pipet ucuna 10µL filtresiz pipet ucu takılı mikropipet yardımıyla 7 kez süspanse edilerek organoidler mekanik olarak parçalanmıştır. Hazırlanan organoid süspansiyonu NKH hazırlanma sürecinde buz içerisinde beklemeye bırakılmıştır.

NKH'ler besiyeri aspire edilip DPBS ile yıkandıktan sonra 1mL GCDR ile oda sıcaklığında 8 dakika inkübe edilmiş ve hücreler 9mL organoid temel besiyeri içeren konikal tüp içersine transfer edilerek 200g kuvvetle +4°C sıcaklıkta 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant aspire edilerek hücre peleti 10 mL organoid temel besiyeri ile süspanse edilip hücre sayısı hemositometre kullanılarak belirlenmiştir. Birlikte kültür için 5000 organoid hücresi ile 10000 NKH içeren süspansiyonu hazırlamak amacıyla, 24-well palte'in 1 kuyucuğundan (50µL damlacık) elde edilen organoidler için (40000 hücre) 80000 NKH içeren NKH hücre süspansiyonu organoid süspansiyonuna kelnerek organoid+NKH

süspansiyonu hazırlanmıştır. Organoid+NKH süspansiyon hacmi organoid temel besiyeri ile 10mL 'ye tamamlanarak 900rpm kuvvetle +4°C sıcaklıkta 5 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant dikkatlice aspire edilerek pellet 400µL matrigel ile karıştırılmış ve önceden ısıtılmış 24-well plate'in 8 kuyucuğuna 50µL damlacıklar, konfokal mikroskopi için ise 8-well ibidi chamber kuyucuklarına 20µL damlacıklar oluşturulmuştur. 37°C inkübatörde 15 dakika inkübe edilerek matrigel'in katılaşması sağlanmış ve 10µM Y27632 içeren önceden ısıtılmış birlikte kültür besiyeri eklenerek 5% CO₂ ve nemli ortam içeren 37°C sıcaklıktaki inkübatörde inkübe edilmiştir. Kültürün 3. Gününde besiyeri taze birlikte kültür besiyeri ile değiştirilmiş ve 7. günün sonunda immunfloresanl deneyler için kültüre son verilmiştir.

3.7.10. Dorsal kök gangliyonu (DKG) izolasyonu

Bu çalışmada dorsal kök gangliyonu izolasyonu için C57BL/6 türü yeni doğan (2-7 günlük) fareler kullanılmıştır. Fare yüksek dozda izoflurana maruz bırakıla ötenazi işlemi uygulanmış ve dekapasitasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fare 70% EtOH ile temizlenerek diseksiyon kabini içerisine alınarak abdomen açılmış ve iç organlar çıkarılmıştır. Stero diseksiyon mikroskobu altında mikro makas ve mikro pens kullanılarak anterior laminektomi işlemi gerçekleştirildikten sonra omurganın sağında ve solunda çift olarak intervertebral foraminada bulunan servikal ve lumbar DKG 'ları pens yardımıyla toplanarak buz üzerinde bulunan DKG izolasyon besiyeri içeren 35mm petri kabı içerisine biriktirilmiştir. Biriktirilen DKG'ler stero mikroskop altında gözlenerek, periferik uzantıları kesilerek atılmıştır. DKG gövdeleri organoid temel besiyeri içeren yeni bir petri kabına alınıp organoid+DKG birlikte kültürü için buz üzerine alınmıştır.

3.7.11. Pankreas organoidlerinin DKG ile birlikte kültürü

24-well plate içerisinde kültüre edilen ve 6.-7. Günde 80% hücre doluluk oranına ulaşan pankreas organoidlerinin 1 kuyucuktan pasajlama işleminde olduğu gibi besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve 500µL soğuk organoid temel besiyeri eklenerek mikro pipet yardımıyla bir kez karıştırıldıktan sonra 15mL konik tüplere aktarılmıştır. Organoidleri içeren tüpe 9,5mL organoid temel besiyeri eklenerek 900rpm kuvvetle +4°C de 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant tüp içerisinde 1,5-2 mL kalana kadar aspire edilmiştir. 1000µL filtreli pipet ucuna 10µL filtresiz pipet ucu takılı mikropipet yardımıyla 7 kez süspanse edilerek organoidler mekanik olarak parçalanmıştır. Tüp hacmi organoid emel besiyeri ile

10mL tamamlandıktan sonra bir kez daha 900rpm kuvvetle +4°C de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra supernatant aspire edilmiş ve pellet 400µL matrigel ile süspanse edilerek buz üzerine alınmıştır. Önceden ısıtılmış 24-well plate kuyucuklarına 50µL damlacık oluşturulduktan sonra matrigel katılaşmasına izin verilmeden her kuyucuğa bir adet DKG gövdesi pens kullanılarak dikkatlice yerleştirilmiş ve ardından matrigelin katılaşmasını sağlamak için 37°C sıcaklıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. Konfokal mikroskopik incelemeler için 8-well ibidi chamber kuyucuklarına 20µL damlacık oluşturulup pens yardımıyla DKG 'ler eklenmiştir. Matrigel katılaşması sağlandıktan sonra 10µM Y27632 içeren önceden ısıtılmış birlikte kültür besiyeri eklenerek 5% CO₂ ve nemli ortam içeren 37°C sıcaklıktaki inkübatörde inkübe edilmiştir. Kültürün 3. Gününde besiyeri taze birlikte kültür besiyeri ile değiştirilmiş ve 7. günün sonunda immunfloresan deneyler için kültüre son verilmiştir.

3.7.12. Wholemout immunfloresan boyama

Kültüre edilen örneklerden 7. gün sonunda besiyeri aspire edilerek oda sıcaklığında ısıtılmış PBS çözeltisi ile yıkandıktan sonra örnekler 2% paraformaldehit çözeltisi ile 15 dakika oda sıcaklığın düşük hızda çalkalanarak fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemi sonrası 3 kez PBS-Glisin çözeltisi ile ve takiben 5 kez IF yıkama çözeltisi ile 10 dakika boyunca oda sıcaklığında düşük hızda çalkalanarak yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra IF yıkama çözeltisi ile dilüe edilmiş 2% normal keçi serumu kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat blocking işlemi gerçekleştirilmiş ve primer antikorlar tablo*'da belirtilen oranlarda blocking çözeltisi içerisinde dilüe edilmiş ve örnekler +4°C sıcaklıkta 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. 2 günlük primer antikor inkübasyonu tamamlandığında örnekler buzdolabından çıkartılarak jel bütünlüğünü korumak amacıyla 1 saat oda sıcaklığına ulaşması beklenmiştir. Primer antikor çözeltisi aspire edilerek IF yıkama çözeltisi ile 3 kez 10 dakika boyunca oda sıcaklığında düşük hızda çalkalanarak yıkama işlemi yapılmıştır. Uygulanan primer antikorlara reaksiyon gösteren sekonder antikorlar 1:500 oranında, nükleus işaretleme için DAPI 1:1000 oranında blocking çözeltisi içerisinde dilüe edilmiş ve örnekler bu antikor kokteyli ile +4°C sıcaklıkta 1 gün boyunca inkübe edilmiştir. Sekonder antikor kokteyli inkübasyon sonrası ortamdaki uzaklaştırılıp örnekler 3 kez 20 dakika boyunca IF yıkama çözeltisi ve 3 kez 20 dakika PBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Örnekler PBS çözeltisinden iyice arındırıldıktan sonra her kuyucuğa fruktoz-gliserol çözeltisi eklenmiş ve örnekler konfokal mikroskopik inceleme için +4°C de saklanmıştır.

Çizelge 3.18. İmmunfloresan deneylerde kullanılan primer antikor konsantrasyonları ve sekonder antikorlar

Primer Antikor	Dilüsyon oranı	Host	Sekonder antikor
Anti-E-Cadherin	1:250	Fare	Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse
Anti-SOX9	1:250	Tavşan	Alexa Fluor 594 Goat Anti-Rabbit
Anti-Ki-67	1:400	Sıçan	Alexa Fluor 594 Goat Anti-Rat
Anti-GFAP	1:250	Tavşan	Alexa Fluor 594 Goat Anti-Rabbit
Anti-β3-Tubulin	1:250	Tavuk	Alexa Fluor 647 Goat Anti-Chicken

3.8. İstatistiksel Yöntem

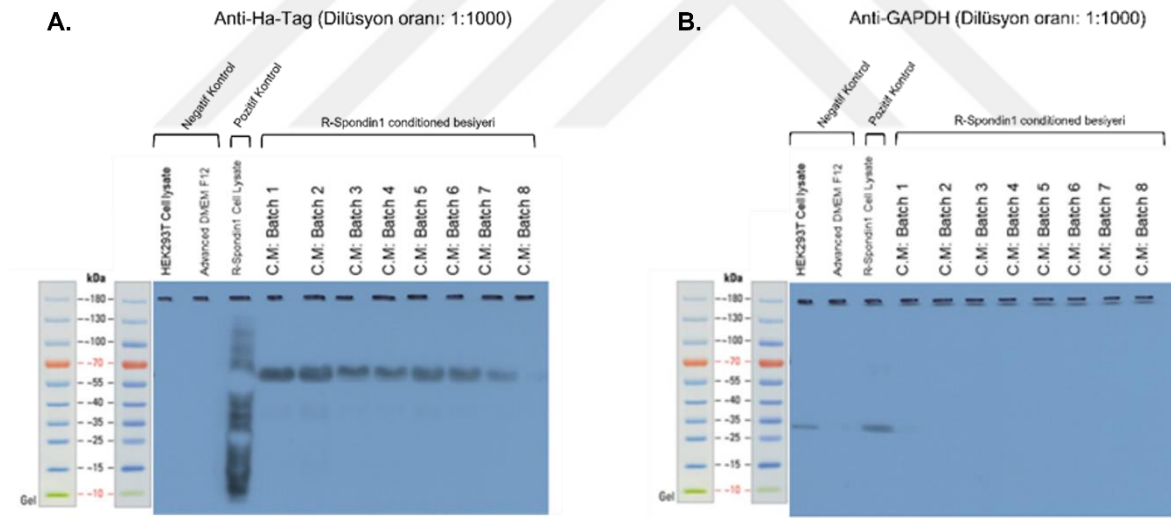
Bu çalışmada deneyler, üç farklı normal pankreas organoid hattı ve üç farklı KPC (Tümör) pankreas organoid hattı kullanılarak üç kez tekrar edilmiştir. Elde edilen veriler, Graphpad Prism 9 yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu, Shaphiro-Wilk ev D'Agostino & Pearson normalite testleri ile belirlenmiştir. Normal dağılım gösteren (parametrik veriler) mono-kültürde organoid büyüklükleri, PAX3, Snail-2 ve SOX10 genlerinin Rt-qPCR sonuçları, Organoid + NKH ve Organoid +DKG birlikte kültürlerinde nörit analiz sonuçları, KPC (Tümör) organoid + NKH birlikte kültürlerinde organoid büyüklükleri ve Normal organoid + DKG birlikte kültürlerinde organoid büyüklüklerine ikili karşılaştırma için Unpaired T-Test uygulanmıştır. Normal dağılım gösteren parametrik Ki67 verilerine tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanarak Tukey'in çoklu karşılaştırma yöntemi uygulanmıştır. Normal dağılım göstermeyen Normal organoid + NKH birlikte kültürlerinde ve KPC (Tümör) organoid + DKG birlikte kültürlerinde organoid büyüklükleri Kolmogorov-Smirnov testi uygulanarak karşılaştırılmıştır.

Tüm veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiş ve “p” değeri 0,05 ‘ten küçük olan sonuçlar ($p<0,05$, $p<0,001$, $p<0,0001$) istatistiksel olarak anlamlı Kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. R-Spondin1 Conditioned Besiyeri İçeriğinin Western Blot Yöntemi ile Doğrulanması

HA-R-pondin1-Fc 293T hücre hattı kullanılarak üretilen conditioned besiyeri, N-terminal ucundan Ha etiketi ile işaretlenmiş 70-75kDa büyüklükte R-Spondin1 proteini içermektedir [70]. Bu Ha etiketine özgü Anti-Ha-Tag primer antikoru ile yapılan western blot deneyi sonucunda HA-R-pondin1-Fc 293T hücre lisatında ve üretilen ilk 7 batch conditioned besiyerinde R-Spondin1 proteininin bulunduğunu doğrulandı (Resim 4.1. A). Negatif kontrol olarak kullanılan HEK293 hücre lizatı ve AdvancedDMEM/F12 besiyerinde bant görülmedi. Housekeeping protein olarak kullanılan GAPDH proteininin sadece hücre lizatında bant göstermesi, western blot deneyinin başarı ile gerçekleştiğini ve conditioned besiyeri içerisinde hücrel kontaminasyon olmadığını kanıtlamaktadır (Resim 4.1. B).



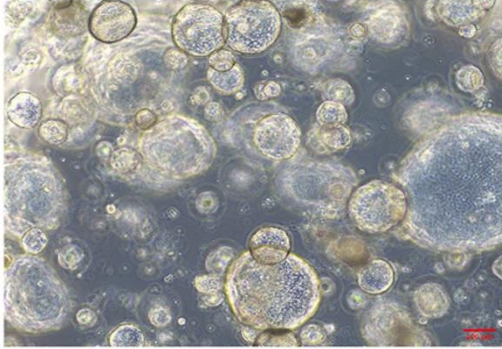
Resim 4.1. Ha-Tag (A) ve GAPDH (B) western blot analiz sonuçları

4.2. Organoid İzolasyonu ve Kültürü

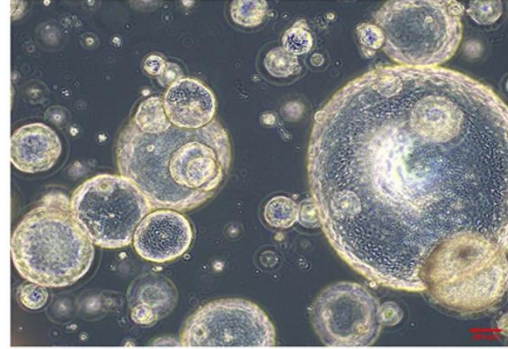
Fare pankreas organoidleri izolasyon sonrası 3. Günde görülemeye başlar ve yüksek pasaj sayılarına kadar uzun süre kullanılabilir [58]. Işık mikroskopik incelemelerde hem normal hem de KPC (Tümör) pankreas organoidlerinin başarılı bir şekilde izole edildiği ve pasaj sonrası canlılıklarını koruduğu gözlemlendi (Resim 4.2.)

6. Gün Organoid Morfolojisi

Normal Organoid



KPC (Tümör) Organoid

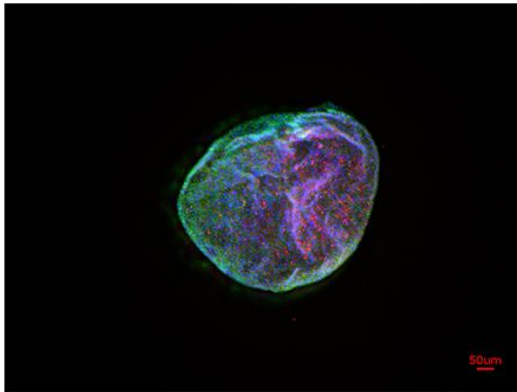


Resim 4.2. Pasaj sonrası 6. günde organoid morfolojisi (Işık mikroskobu, 4X)

4.3. Pankreas Organoidlerinin Karakterizasyonu

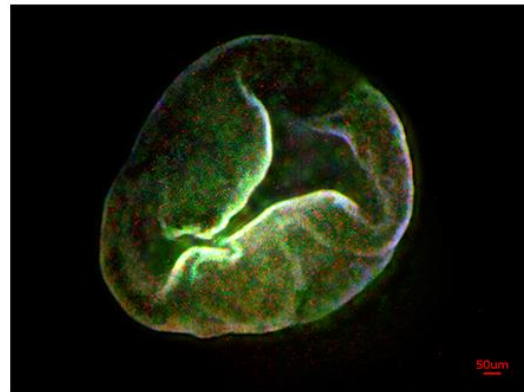
Wholemout immunfloresan yöntemle epitelyal hücre belirteci E-cadherin ve pankreatik kanal hücre soyu belirteci SOX9 ‘a özgü antikorlarla işaretlenen Normal ve KPC (Tümör) pankreas organoidlerin, bu iki belirteç içinde pozitiflik göstererek pankreatik epitel krakterine sahip olduğu belirlenmiştir (Resim 4.3.).

Normal Pankreas Organoid



E-Cadherin, SOX9, DAPI, 20x

KPC (Tumor) Pankreas Organoid

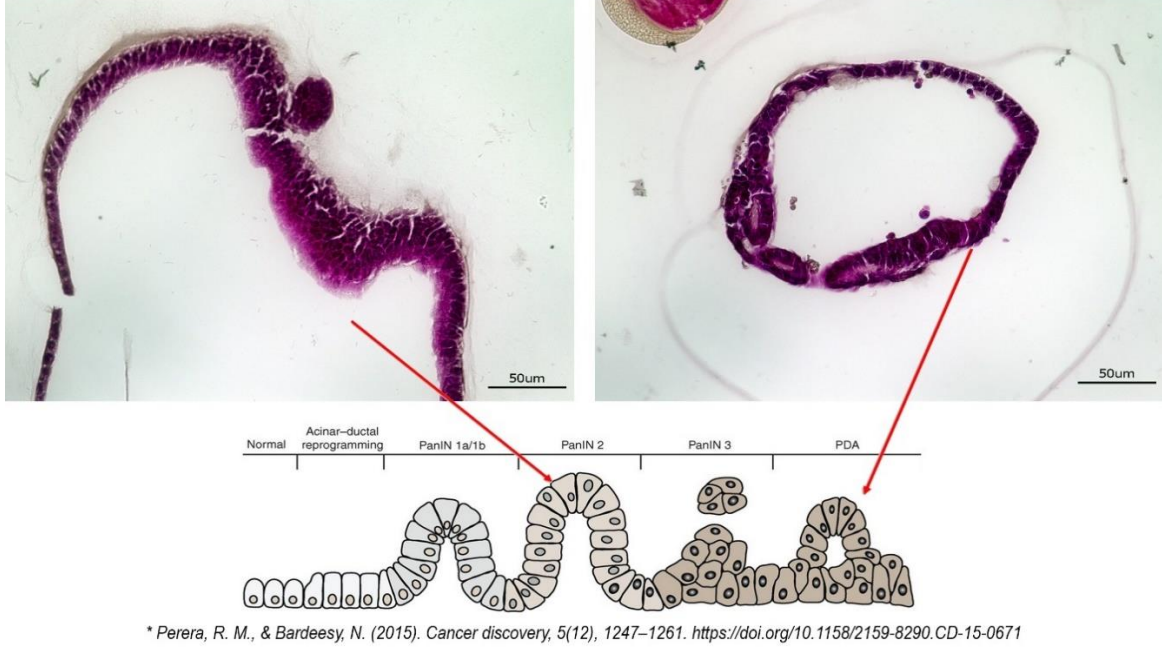


Resim 4.3. Wholemount immunfloresan yöntemle işaretlenen E-Cadherin (yeşil) ve SOX9 (kırmızı) pozitif normal ve KPC (Tümör) organoidleri (Floresan mikroskop, 20X)

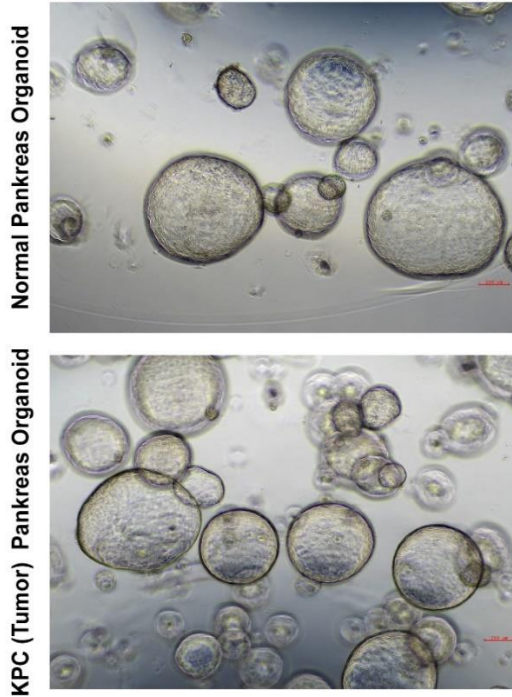
Hematoksilen & eozin boyama sonrası yapılan histomorfolojik incelemelerde, KPC (Tümör) pankreas organoidlerinde farklı seviyelerde pankreas kanserine özgü morfoloji gözlenmiştir (Resim 4.4. A). Organoid kültürünün 7. Gününde normal ve KPC (Tümör) oranoidlerinin

çevresi ölçülerek karşılaştırılmış ve KPC organoidlerin boyut olarak normal pankreas organoidlerinden büyük olduğu belirlenmiştir (Normal: $689,5 \pm 281,5$ vs. KPC: $1129 \pm 738,9$, $p < 0,0001$) (Resim 4.4. B).

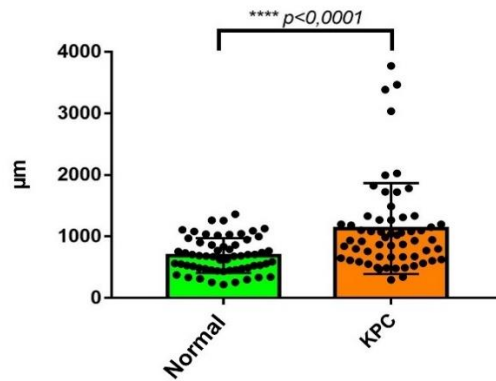
A



B

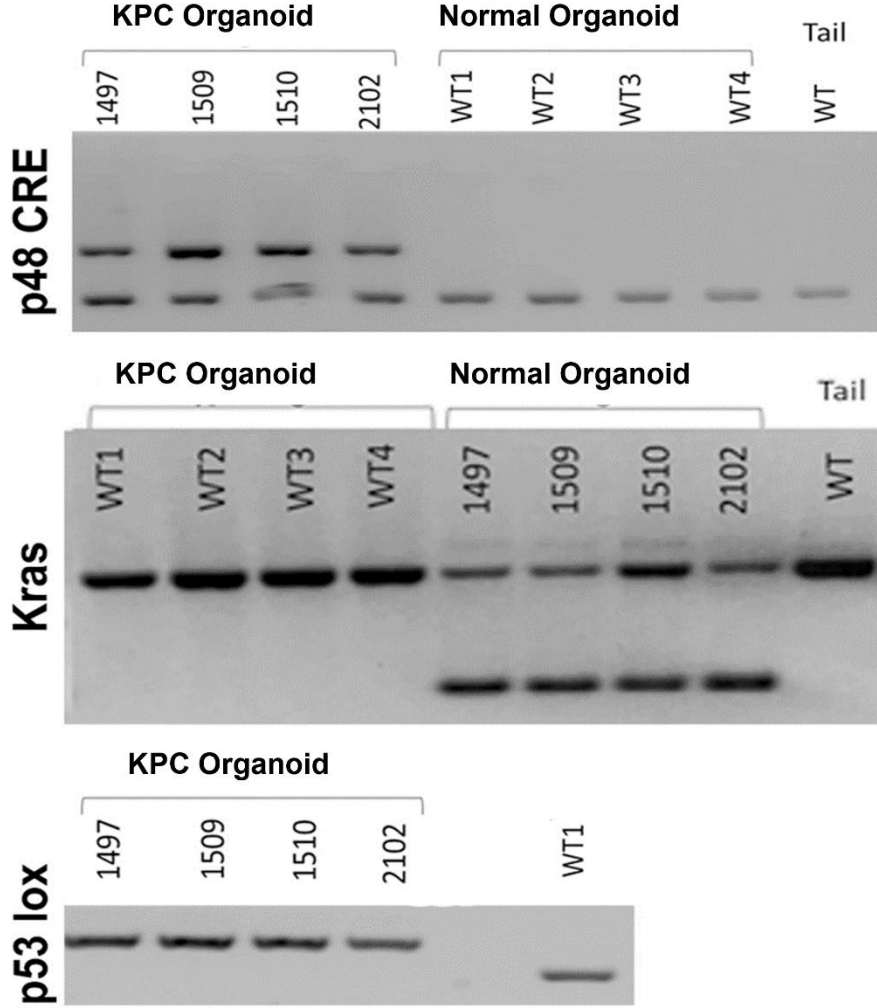


7. Günge sonunda organoid büyüklüğü



Resim 4.4. H&E boyama uygulanmış 10µm KPC pankreas organoid kesitlerinde farklı derecelerde PanIN histomorfolojisi (A)[71] (Işık mikroskobu, 20X). Pasaj sonrası 7. günde normal ve KPC organoid büyüklüklerinin karşılaştırılması (B) (Işık mikroskobu, 10X)

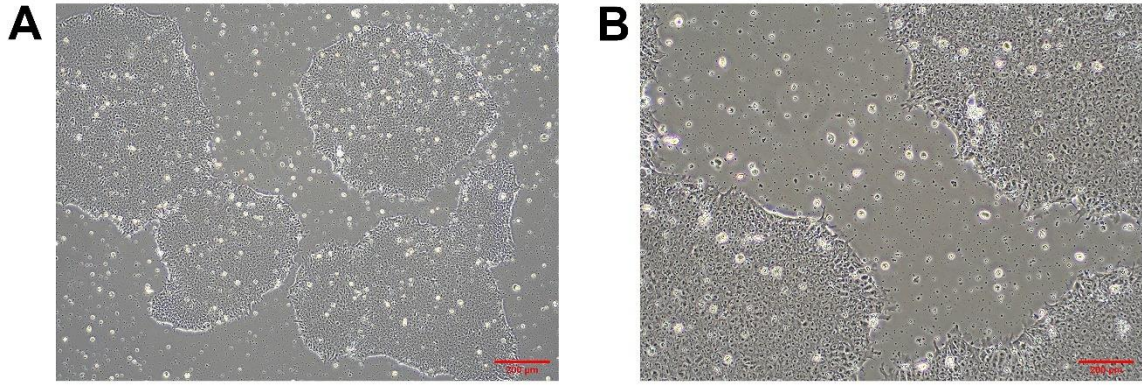
KPC farelerden izole edilen pankreas organoidlerinin genotipik olarak pankreas kanserine neden olan mutasyonları taşıdığı belirlenirken, C57BL/6 sağlıklı farelerden izole edilen normal pankreas organoidlerinde bu mutasyonlar görülmemiştir (Resim 4.5.).



Resim 4.5. Organoid genotip analizlerin jel görüntüleri

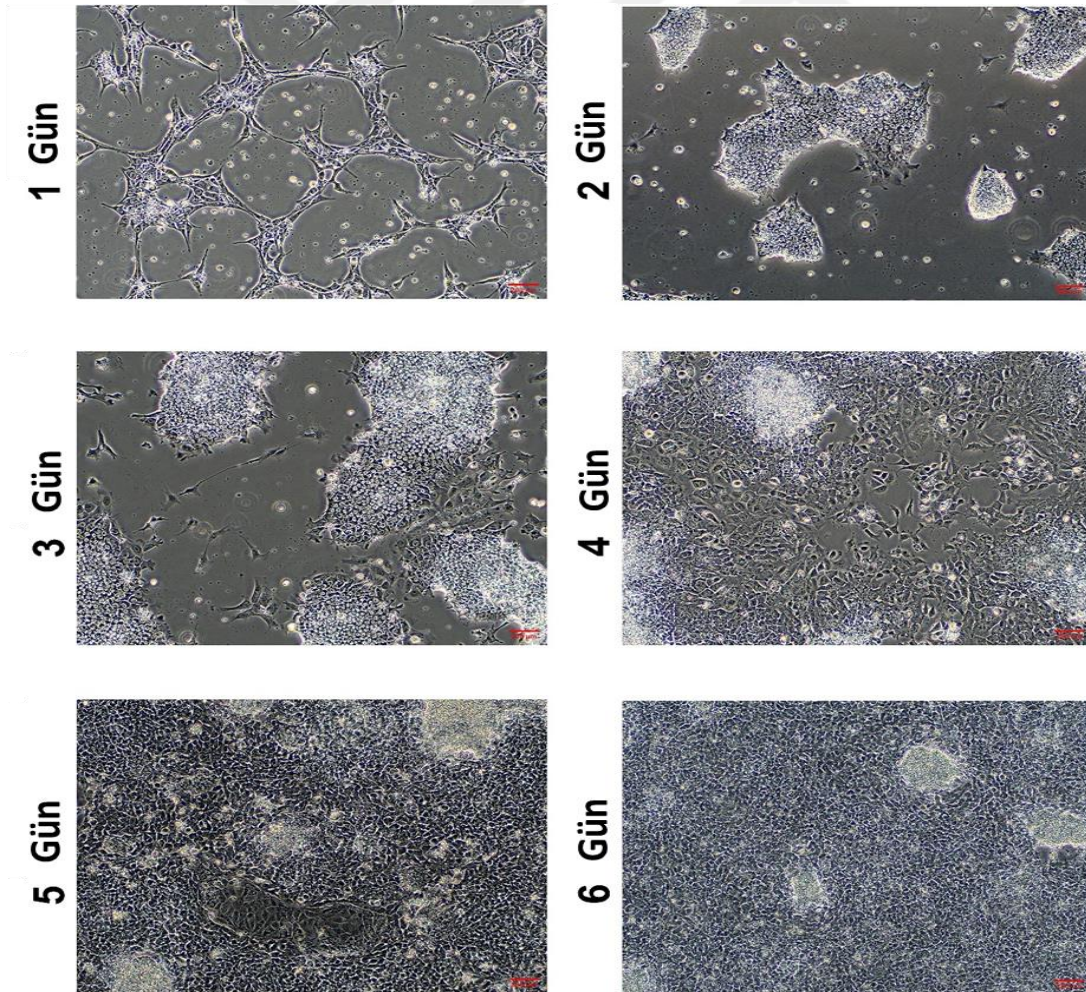
4.4. UPKH'lerin NKH'lere Farklandırılması ve NKH Karakterizasyonu

Farklılaşma işleminde kullanılan UPKH kolonilerinin sınırlarının düzgün ve kompakt bir merkeze sahip optimum koloni morfolojisi göstermektedir (Resim 4.6.).



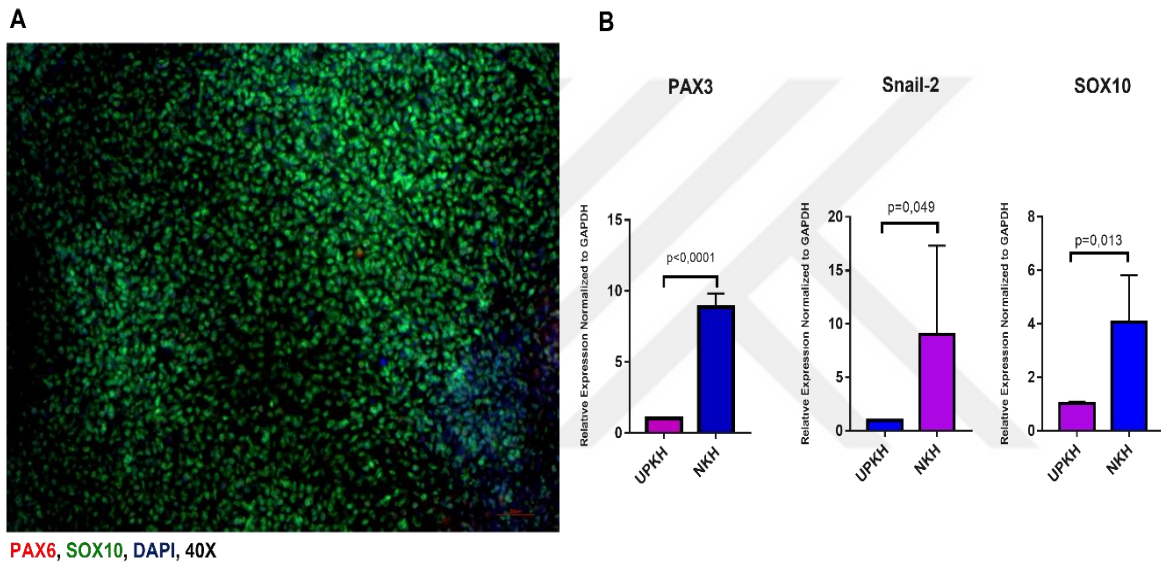
Resim 4.6. NKH farklandırma işlemi öncesi kompakt merkezli ve düzgün sınırlar içeren optimum UPKH kolonileri (Işık mikroskop, 10X)

Optimum morfoloji gözlenen UPKH'lerin, NKH farklılaşma ortamında morfolojik olarak değişime uğradığı ışık mikroskopisi ile gözlemlenmiştir (Resim 4.7.).



Resim 4.7. NKH farklılaşması sırasında UPKH morfolojisinin günlük olarak değişimi (Işık mikroskop, 10X)

Farklılaşma sonrası yapılan immunfloresan boyamada, yeni elde edilen NKH'lerin nöral krest belirteci SOX10 için pozitif fakat nöro epitelyal belirteç olan PAX6 için negatif olduğu belirlendi (Resim 4.8. A). Kantitatif RT-PCR analizleri, erken dönem nöral krest hücrelerde ifadelenen PAX3 mRNA ifadelenenmesi (UPKH: $1,019 \pm 0,107$ vs. NKH: $8,887 \pm 0,951$ $p < 0,0001$) ve nöral krest hücrelerde ifadelenen Snail-2 (UPKH: $0,9774 \pm 0,045$ vs. NKH: $9,039 \pm 8,266$ $p = 0,049$) ve SOX10 (UPKH: $1,027 \pm 0,066$ vs. NKH: $4,074 \pm 1,749$ $p = 0,0131$) mRNA ifadelenenmesinin farklandırılmamış UPKH'lere göre artış gösterdiği belirlenmiştir (Resim 4.8. B).

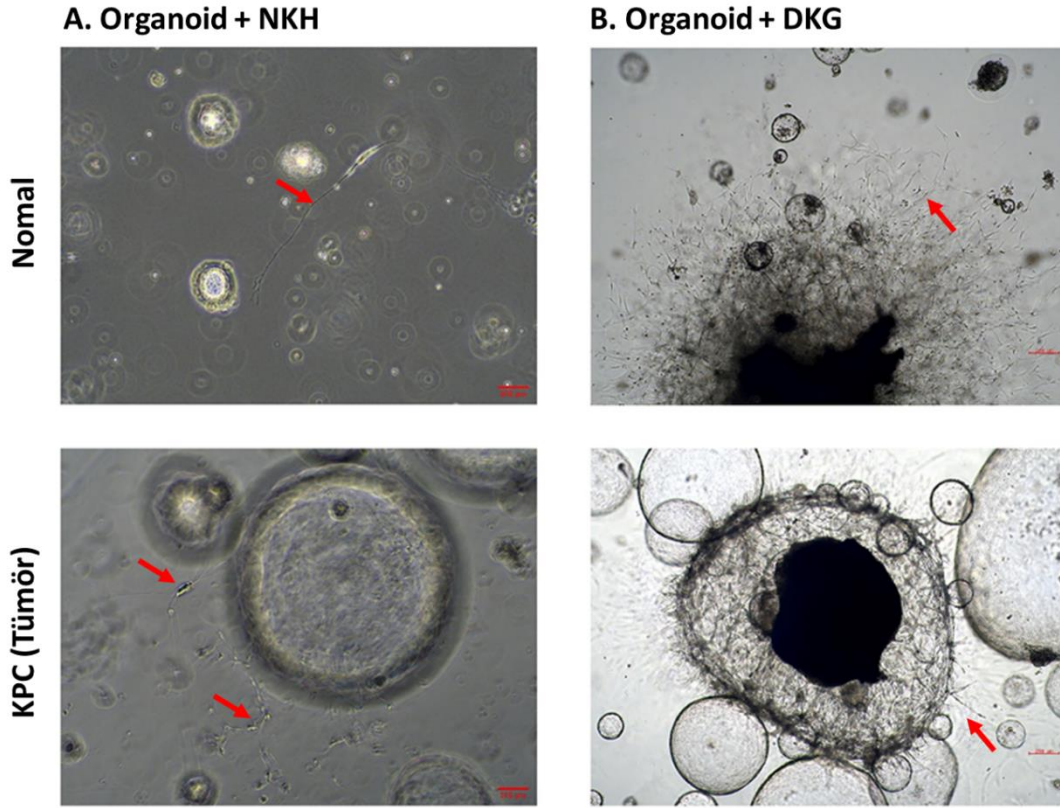


Resim 4.8. UPKH'lerden farklandırılan PAX6 (kırmızı) negatif ve SOX10 (yeşil) pozitif NKH'lerin immunfloresan görüntüsü (A) (Floresan mikroskop, 40X). Farklanma sonrası PAX3, Snail-2 ve SOX10 mRNA miktarındaki artışın grafiksel gösterimi (B)

4.5. Organoid+NKH ve Organoid+DKG Birlikte Kültürlerinde İnnervasyonun Belirlenmesi

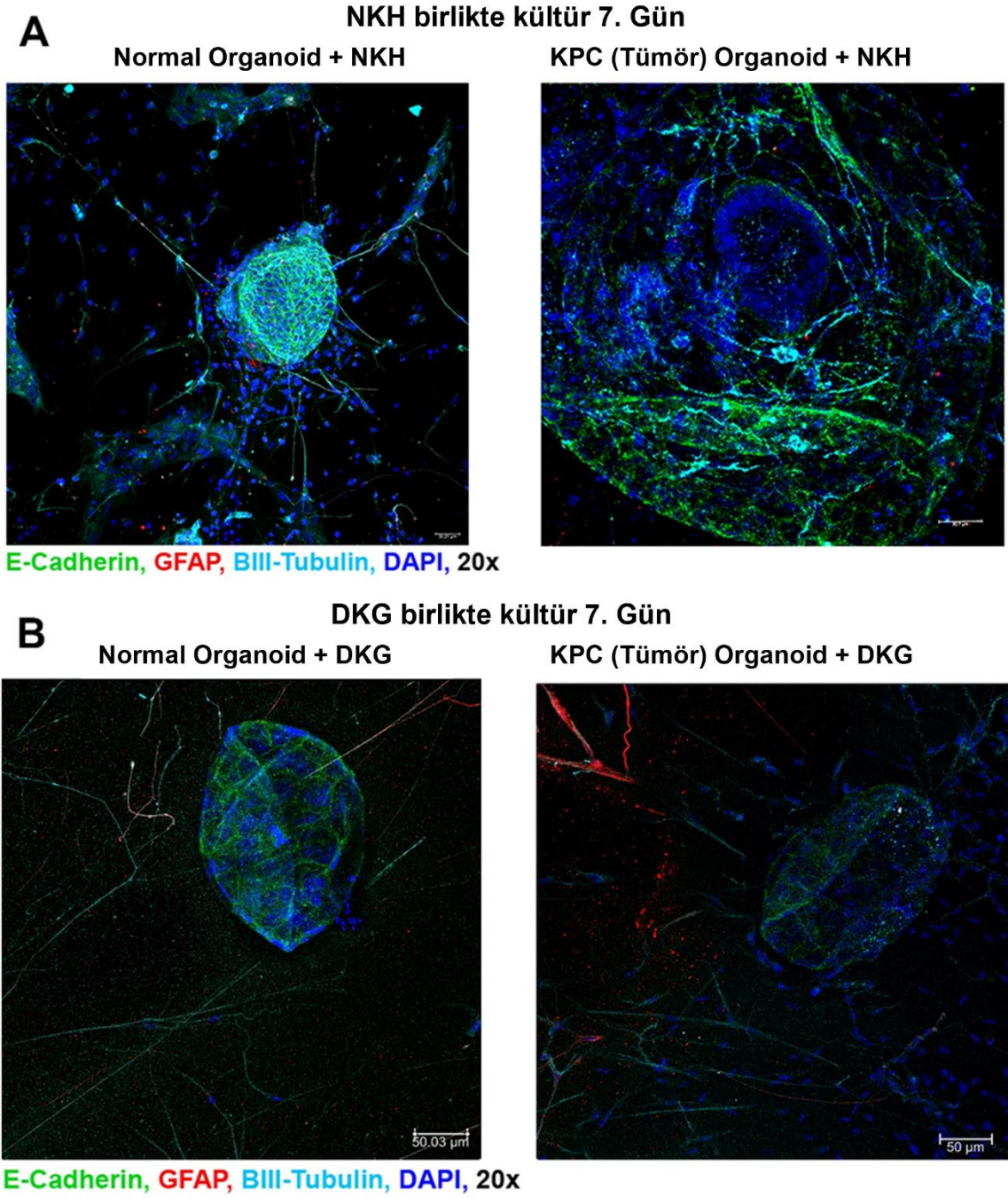
Organoid+NKH birlikte kültürlerde 2.-3. Gününde NKH'lerin nöronal morfoloji gösterdiği ve aksonal uzantıların oluşmaya başladığı gözlemlenmiştir (Resim 4.9. A). Organoid+DKG birlikte kültürlerde ise nörit oluşumun başladığı görülmüştür (Resim 4.9 B).

3. Gün Nöronal Morfoloji



Resim 4.9. Organoid + NKH birlikte kültürün 3. gününde nöronal uzantılar (→) (A) ve Organoid + DKG birlikte kültürün 3. gününde nöronal uzantılar (→) (B) (Işık mikroskop, 10X)

Organoid+NKH ve Organoid+DKG birlikte kültürler 7. gün sonunda uygulanan üçlü immunofloresan boyama ile her iki birlikte kültür modelinde de E-Cadherin pozitif pankreas organoidlerinin, $\beta 3$ -Tubulin pozitif nöronlar tarafında innerve edildiği fakat sadece Organoid+DKG birlikte kültürlerinde GFAP pozitif glia bulunduğu görülmüştür (Resim 4.10.).



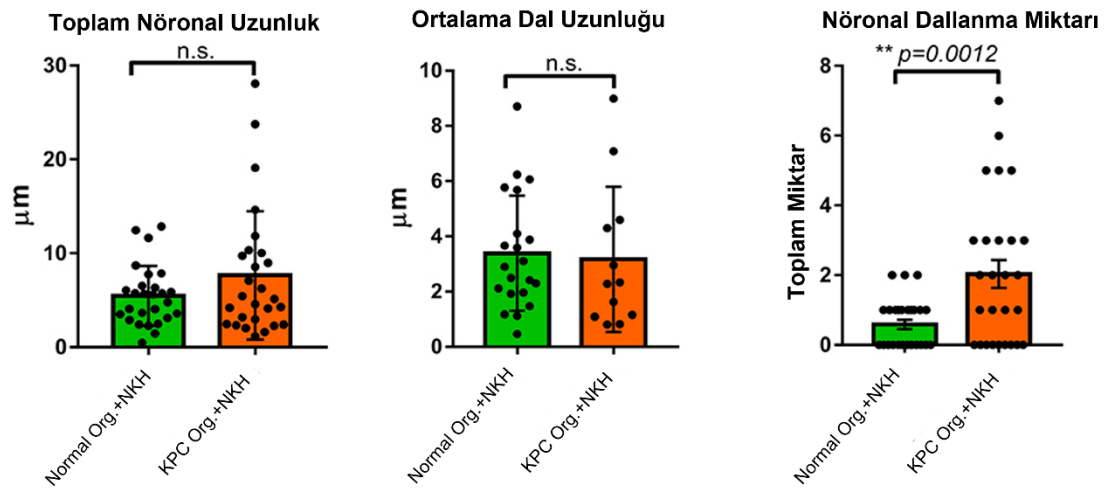
Resim 4.10. Birlikte kültürde 7. gün sonunda β 3-Tubulin (cyan) pozitif nöronlara farklanan NKH tarafından innerve olan E-Cadherin (yeşil) pozitif normal ve KPC (Tümör) pankreas organoidleri (A) ve DKG kökenli β 3-Tubulin (cyan) ve GFAP (kırmızı) pozitif nöronlar tarafından innerve olan E-Cadherin (yeşil) pozitif normal ve KPC (Tümör) pankreas organoidleri (Konfokal mikroskop, 20X)

4.6. İnnerve Pankreas Organoidlerin İncelenmesi

NKH veya DKG ile birlikte 7 gün boyunca kültüre edilen E-Cadherin pozitif normal ve KPC (Tümör) pancreas organoidlerinin ve bu organoidleri innerve eden β 3-Tubulin

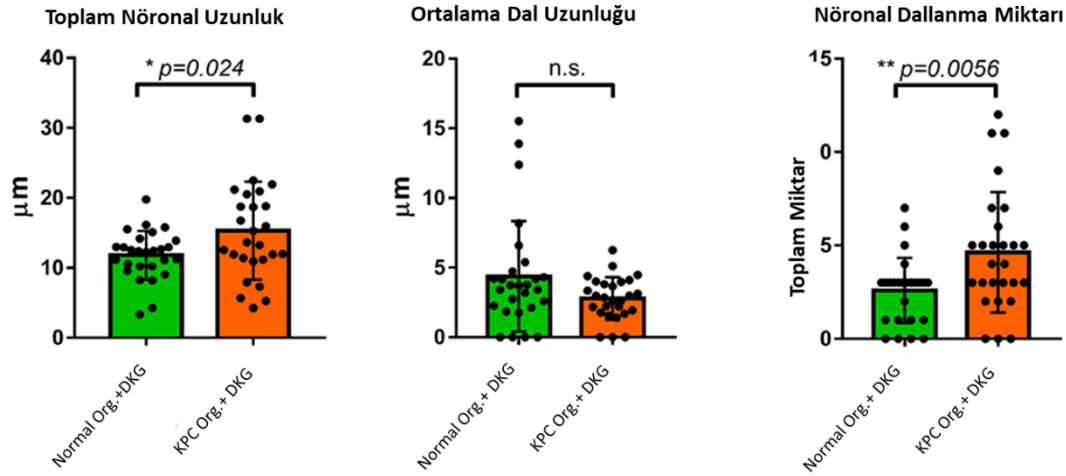
pozitif nöronların 3 boyutlu görüntüleri konfokal mikroskopisi ile elde edildi. Bu 3B görüntüler Simple Neurite Tracer plug-in ile desteklenmiş imageJ yazılımı ile analiz edilerek toplam nörit uzunluğu, nöritlerde dallanma sayısı ve bu dalların toplam uzunluğu analiz belirlendi.

NKH ile birlikte kültüre edilerek innervasyonu sağlanan normal pankreas organoidleri ile KPC (Tümör) pankreas organoidleri karşılaştırıldığında bu iki grup arasında toplam nöronal uzunluk (Normal Org. + NKH: $7,222 \pm 4,191$ vs. KPC Org. + NKH: $10,1 \pm 9,027$ $p=0,139$) ve ortalama dal uzunluğu (Normal Org. + NKH: $4,467 \pm 2,746$ vs. KPC Org. + NKH: $4,18 \pm 3,466$ $p=0,794$) arasında anlamlı bir fark olmadığı fakat KPC (Tümör) organoidlerinin nöral dallanma miktarını (Normal Org. + NKH: $0,592 \pm 0,693$ vs. KPC Org. + NKH: $2,037 \pm 2,084$ $p=0,0012$) artırdığı belirlendi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. NKH ile birlikte kültür sonucu innerve olan normal ve KPC (Tümör) pankreas organoid kültürlerinde 7. gün sonunda yapılan nöralplastisite analizlerinin grafiksel gösterimi

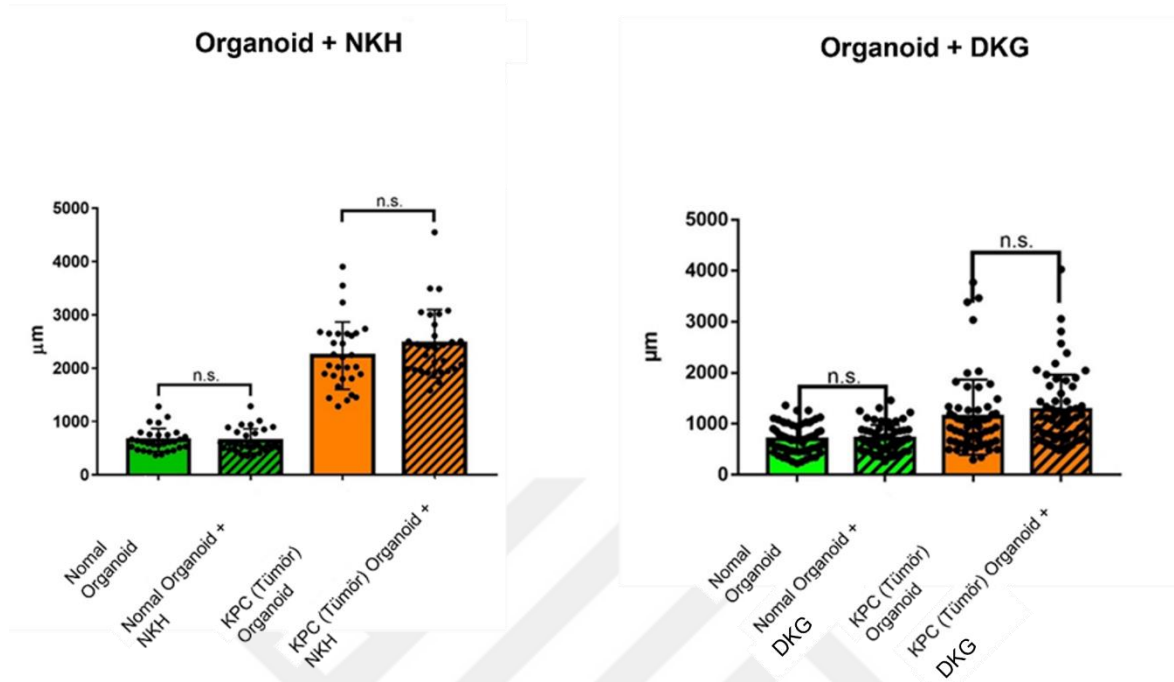
DKG ile birlikte kültüre edilerek innerve edilen pankreas organoidlerinde ise KPC (Tümör) organoidlerin toplam nöronal uzunluğu (Normal Org. + DKG: $15,57 \pm 4,59$ vs. KPC Org. + DKG: $20,18 \pm 9,234$ $p=0,024$) ve dallanma miktarını (Normal Org. + DKG: $2,593 \pm 1,738$ vs. KPC Org. + DKG: $4,63 \pm 3,224$ $p=0,005$) artırdığı fakat ortalama dal uzunluğunda anlamlı bir farklılık olmadığı (Normal Org. + DKG: $5,768 \pm 5,234$ vs. KPC Org. + DKG: $3,68 \pm 2,012$ $p=0,058$) belirlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. DKG ile birlikte kültür sonucu innerve olan normal ve KPC (Tümör) pankreas organoid kültürlerinde 7. gün sonunda yapılan nöralplastisite analizlerinin grafiksel gösterimi

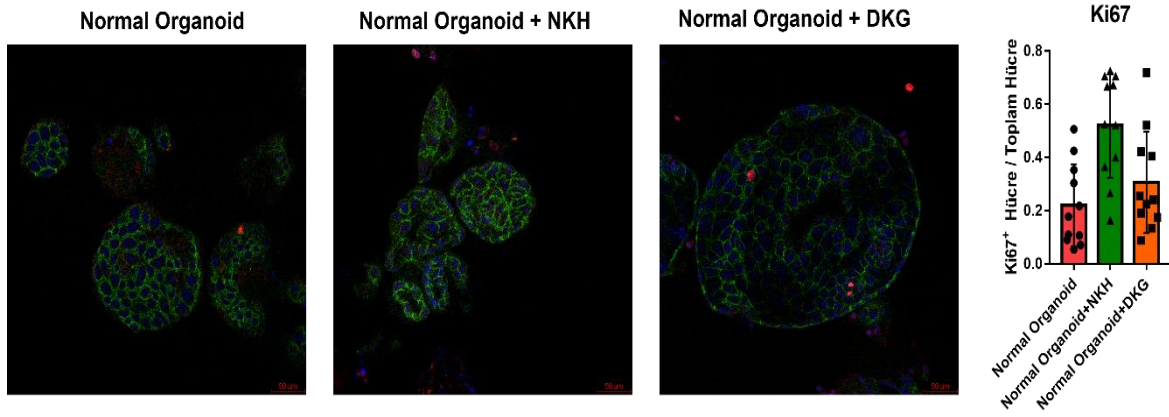
7 gün birlikte kültür sonrası pankreas organoid büyüklüklerinin incelenmesi sonucu; ne NKH ile sağlanan innervasyonun (Normal Org.: $651,6 \pm 213,3$ vs. Normal Org. + NKH: $636,6 \pm 226,4$ $p=0,586$), (KPC Org.: 2233 ± 631 vs. KPC Org. + NKH: $2458 \pm 637,8$ $p=0,176$) ne de DKG ile sağlanan innervasyonun (Normal Org.: $689,5 \pm 281,5$ vs. Normal Org. + DKG: $707,5 \pm 267,9$ $p=0,719$), (KPC Org.: $1129 \pm 738,9$ vs. KPC Org. + DKG: $1264 \pm 701,6$ $p=0,265$) normal ve KPC (Tümör) pankreas organoid büyüklüğüne bir etkisi olmadığı görüldü (Şekil 4.3.).

7. Günde organoid büyüklüğü

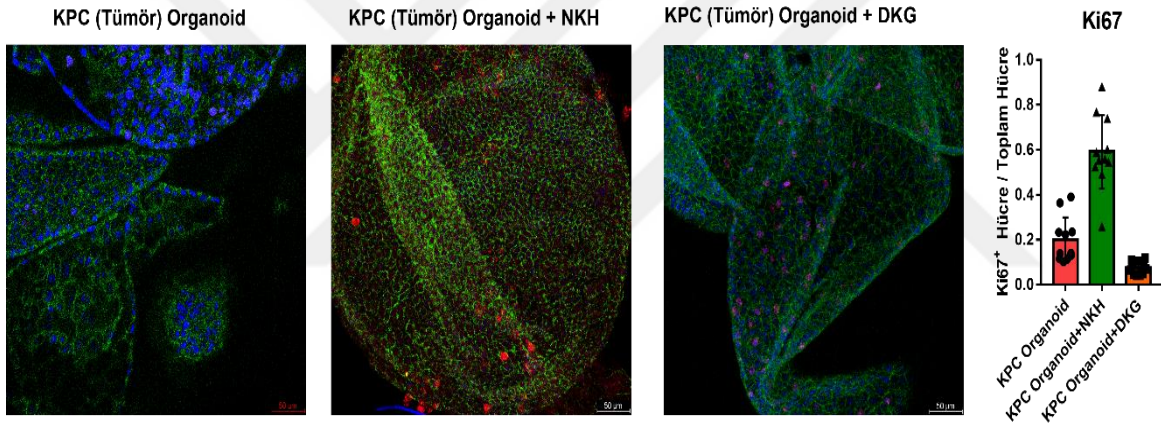


Şekil 4.3. NKH ve DKG ile birlikte kültür sonucu innervasyonun 7. gün sonunda normal ve KPC (Tümör) pankreas organoid büyüklüklerine etkisinin grafiksel gösterimi

Organoid mono kültürleri, organoid+NKH ve organoid+DKG birlikte kültürleri 7 gün boyunca kültüre edildikten sonra, Anti-Ki67 primer antikoru kullanılarak immunfloresan yöntemle işaretlenmiş ve konfokal mikroskop ile görüntülenerek innervasyonun organoid hücre proliferasyonuna etkisi incelenmiştir. Ki67 pozitif hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı hesaplanarak yapılan analiz sonucu; NKH ile birlikte kültür sonucu elde edilen innerve normal ve KPC (Tümör) pankreas organoidlerinde Ki67 pozitif hücre sayısının mono kültüre göre arttığı (Resim 4.11.), DKG ile birlikte kültür sonucu elde edilen innerve normal pankreas organoidlerde ve innerve KPC (Tümör) organoidlerde Ki67 pozitif hücre sayısında mono kültüre göre anlamlı bir farklılık olmadığı belirlendi (Resim 4.12.). Ki67 pozitif epitelyal hücre sayısının tüm epitelyal hücrelere oranı hesaplanarak elde edilen değerlerin tüm gruplar için ortalama $\pm$ standart sapma değerleri çizelge 4.1. 'de ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi sonrası uygulanan Tukey'in çoklu karşılaştırma testi "p" değerleri çizelge 4.2. 'de belirtilmiştir.



Resim 4.11. E-Cadherin (yeşil) pozitif Normal pankreas organoidlerinde ve NKH ve DKG ile birlikte kültür sonucu innerve olan E-Cadherin (yeşil) pozitif normal pankreas organoidlerinde Ki67 (kırmızı) pozitif epitelyal hücreler ve pozitif Ki67 pozitif hücre miktarının grafiksel gösterimi. (Konfokal mikroskop, 20X)



Resim 4.12. E-Cadherin (yeşil) pozitif KPC (Tümör) pankreas organoidlerinde ve NKH ve DKG ile birlikte kültür sonucu innerve olan E-Cadherin (yeşil) pozitif KPC (Tümör) pankreas organoidlerinde Ki67 (kırmızı) pozitif epitelyal hücreler ve pozitif Ki67 pozitif hücre miktarının grafiksel gösterimi. (Konfokal mikroskop, 20X)

Çizelge 4.1. Ortalama Ki67 pozitif hücre/toplam hücre oranları

	Normal Organoid	Normal Organoid+DKG	Normal Organoid+NKH	KPC Organoid	KPC Organoid+DKG	KPC Organoid+NKH
Ortalama	0,2196	0,3068	0,52	0,1989	0,07677	0,5917
±Standart Dağılım	±0,1555	±0,19	±0,1963	±0,1008	±0,02983	±0,1634

Çizelge 4.2. Gruplar arasında karşılaştırılan Ki67 pozitif hücre oranlarının Tukey'in çoklu karşılaştırma test sonuçlarına göre "p" değerleri

Karşılaştırılan gruplar	P Değeri
Normal Organoid vs. KPC Organoid	0,9995
Normal Organoid vs. Normal Organoid+NKH	0,0002
KPC Organoid vs. KPC Organoid+NKH	<0,0001
Normal Organoid vs. Normal Organoid+DKG	0,7531
KPC Organoid vs. KPC Organoid+DKG	0,4134
Normal Organoid+DKG vs. Normal Organoid+NKH	0,0186
KPC Organoid+DKG vs. KPC Organoid+NKH	<0,0001



5. TARTIŞMA

İn vitro hücre kültürü modelleri, insan embriyolojisini, hastalık mekanizmalarını anlamak ve yeni ilaç ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için güvenilir, hızlı ve uygun maliyetli sonuçlar sağlamak için umut verici araçlar olarak ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda, in vivo organ yapısını ve fonksiyonunu taklit etmek için karmaşık organizasyona ve mikro çevreye sahip in vitro modeller geliştirilmiştir. Kendi kendini organize etme yoluyla kök hücrelerden kaynaklanan ve doğal organ mimarisini ve işlevselliğini simüle edebilen çoklu hücre tiplerinden oluşan üç boyutlu organoidlerin icadı, yepyeni bir biyomimikri seviyesine ulaşılmasına izin verdi [72].

Organoid modeller geleneksel 2B kültürlerle göre çok sayıda avantaj sağlamaktadır. Fizyolojik açıdan in vivo organ yapısına benzer hücresel kompozisyon ve davranışlar sergileyebilirler. Birçok organoid modeli, kültür ortamında genom stabilitesini koruyarak çoğaltılabilir ve bu da onları biyo-bankacılık için uygun hale getirir. Hayvan modelleriyle karşılaştırıldığında, organoidler deneysel karmaşıklığı azaltabilir, gerçek zamanlı görüntüleme tekniklerine uygundur ve daha da önemlisi, hayvanlarda kolay veya doğru bir şekilde modellenemeyen insan gelişimi ve hastalıkların incelenmesini sağlar [73].

Barker ve arkadaşlarının, yetişkin memelilerde kendini en hızlı yenileyen doku olarak bilinen bağırsak epitelinde, kript tabanındaki hücrelerde Lgr5'in ifadelendiğini belirlemesi ve Rosa26-lacZ raportör, kullanılarak, yetişkin farelerde soy izleme deneyleri sonucu Lgr5 pozitif hücrelerin, 60 günlük bir süre boyunca tüm epitelyal hücreleri ürettiğini göstermiştir. Bu bulgular Lgr5 pozitif hücrelerin ince bağırsak ve kolonun kök hücrelerini temsil ettiğini düşündürmüştür [9]. Bu gelişmenin ardından, Sato ve arkadaşları Lgr5 pozitif hücreleri izole ederek, bu hücrelerden in vitro ortamda farklı hücre tiplerinin mevcut olduğu villus benzeri uzun süreli organoid kültür koşullarını tanımladı ve bağırsak kript-villus birimlerinin, tek bir kök hücreden oluşturulabilen kendi kendini organize eden yapılar olduğunu kanıtladı [10]. Bu gelişmeyi takiben besiyeri içeriği modifiye edilerek, pirimitif bağırsaktan köken alarak farklılaşan; mide, karaciğer pankreas gibi gastrointestinal organlara ait organoidler üretilmiştir. [11, 53, 74].

R-Spondin protein ailesi, yakın zamanda tanımlanmış 4 ayrı proteinden oluşur. R-Spondin proteinleri, omurgalı gelişiminde temel işlevlere sahiptir ve bu proteinlerin ligand tipi aktiviteleri, Wnt/ β -katenin yolağının aktivasyonu ile sonuçlanır [75]. Wnt/ β -katenin sinyal sistemi, embriyonik gelişimde ve yetişkin kök hücrelerin kendi kendini yenilemesinde ve korunmasında önemli roller oynar. R-spondinler, Wnt/ β -katenin sinyalini artıran ve gelişim ve kök hücre büyümesinde pleiotropik fonksiyonlara sahip bir grup salgılanan proteindir. G protein-bağlı reseptör (GPCR) süper ailesinin bir reseptörü olan LGR5, özellikle bağırsak kriptinin ve saç follikülünün kök hücrelerinde eksprese edilir [76]. Lgr5 ligandı ve Wnt agonisti olan R-Spondin1, gastrointestinal sistem organoid kültürlerinde besiyerinin önemli bir bileşenidir [11].

Gastro intestinal organoid besiyerine eklemek üzere R-Spondin1 proteini içeren conditioned besiyeri üretimi, recombinant protein kullanımına göre maliyeti daha az bir yöntem olarak tercih edilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, HA-R-Spondin1-Fc 293T hücre hattı kullanılarak R-Spondin1 conditioned besiyeri üretimi ve western blot yöntemi ile içeriğinin belirlenmesi tanımlanmıştır [58, 70]. Bu tez çalışmasında da HA-R-Spondin1-Fc 293T hücre hattı kullanılarak elde edilen R-Spondin1 conditioned besiyerindeki R-Spondin1 protein varlığı western blot deneyi sonucu doğrulanmıştır. Bu conditioned besiyeri kullanılarak kültüre edilen pancreas organoidlerinin pasajlanarak uzun süre kültüre edilmesi, üretilen proteinin fonksiyonel olduğunu da kanıtlamaktadır.

2013 yılında Huch ve arkadaşları, kısmi kanal ligasyonu ile yaralanma sonrası yenilenen pankreas kanallarında Lgr5 ekspresyonunun indüklendiği ve Wnt sinyal yolağının aktive olduğunu belirlediler. Fare pankreasından izole edilen kanal fragmanları, bir ekstraselüler matriks içerisinde, R-Spondin1 içeren besiyeri ile kültüre edildiğinde Lgr5 ekspresyonunun başladığını ve tomurcuklanan kist benzeri yapılara (organoidler) dönüştüğünü bildirdiler. Ayrıca izole edilmiş tek kanal hücrelerinin de klonal olarak çoğalabilen Lgr5 pozitif kök hücreleri de içeren pankreas organoidlerini oluşturabileceğini gösterdiler. Bu pankreas organoidlerinin, transplantasyon sonrasında kanal hücrelerinin yanı sıra endokrin hücrelere de farklılaşmaya indüklenebileceğini rapor ettiler [11].

2015 yılında Boj ve arkadaşları normal ve neoplastik ($Kras^{+/LSL-G12D}$; $Pdx1^{Cre}$ “KC” ve $Pdx1^{Cre}$; $Kras^{+/LSL-G12D}$; $Trp53^{+/LSL-R172H}$ “KPC”) fare ve neoplastik insan pankreas dokularından organoid modeller oluşturdular. Pankreas organoidlerinin, reseksiyon sonrası

biyopsilerden üretilebileceğini, kriyoprezervasyon sonrası hayatta kalabileceğini ve duktal adenokarsinoma özgü özellikler sergileyebileceğini gösterdiler. Ortotopik olarak transplantasyonu yapılan neoplastik organoidlerin, erken neoplazmik yapılardan lokal invaziv ve metastatik karsinomlara, tümör gelişiminin tam spektrumunu sergilediğini rapor ettiler [12].

Broutier ve arkadaşları tarafın 2016 yılında, temelde Huch ve Boj tarafından tanımlanan besiyeri ve kültür şartlarının kullanılmasıyla insan ve fare dokusundan pankreas organoidlerinin izolasyon ve kültürünü açıklayan detaylı bir protokol yayınlanmıştır [58]. Biz de yayınlanan bu protokolden faydalanarak normal ve KPC (Tümör) fare pankreas organoidlerini başarıyla izole ederek daha önce yapılan çalışmalarla paralel şekilde kriyoprezervasyon sonrası da dahil olmak üzere uzun süre kültüre canlılıklarını kaybetmeyen organoid hatları ürettik.

Onkojenik KRAS mutasyonu, pankreas duktal adenokarsinomunun ilerlemesinde ve büyümesinde karakteristik bir genetik olaydır. Onkojenik KRAS'ın, glikoz alımının uyarılması, glikoz ara maddelerinin farklı şekilde kanalize edilmesi, yeniden programlanmış glutamin metabolizması, artan otofaji ve makropinositoz dahil olmak üzere çoklu metabolik değişiklikleri düzenleyerek tümör metabolizmasını kontrol etmede merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir [77]. p53 tümör baskılayıcı gendeki mutasyonlar, kanser türlerinde en yaygın genetik hasardır. Normal p53'ün, premalign hücrelerin çoğalmasını ve hayatta kalmasını sınırlayan bir dizi antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu bilinmektedir. p53, bu aktiviteleri, gen ekspresyonunu düzenlemek için diziye özgü bir şekilde DNA'yı bağlama yeteneği yoluyla uygular ve insan tümörlerinde meydana gelen mutasyonların büyük çoğunluğu, p53'ün bu özelliğini ve dolayısıyla onun antiproliferatif etkilerini devre dışı bırakarak hücrelerin kontrolsüz şekilde prolifer olmasına yol açar [78]. KRAS veya TGFb'deki aktive edici mutasyonlar ve/veya p53, INK4A/ARF BRCA2 ve Smad4 gibi tümör baskılayıcıların inaktivasyonu gibi genetik değişiklikler, pankreas karsinogenezinin en yaygın itici güçleridir ve transgenik fareler oluşturmak için kullanılmaktadır. Bu fare modelleri, pankreatik intraepitelyal neoplaziden, histolojik olarak tamamen invaziv ve metastatik hastalıkla sonuçlanan lezyonlara kadar geniş bir patolojik değişiklik spektrumuna sahiptir. PDX-1 ve p48, pankreasın gelişim programında kritik transkripsiyon faktörleridir. Hingorani ve arkadaşları inaktif p53 içeren ve endojen Kras lokusuna yerleştirilmiş Cre ile aktive olan KrasG12D alelini eksprese eden bir fare modeli geliştirdiler. Bu fareler bir PDX-

1 veya Ptf1-p48 güdümlü transgen sayesinde Cre rekombinaz eksprese eden farelerle çaprazlayarak KPC fare modelini tanımladılar [79, 80]. Bu tez çalışmasında da Normal ve KPC farelerden elde edilen pankreas organoidlerinin genotipleri incelendiğinde, KPC pankreas organoidlerinin KPC farelerle aynı genotipte olduğu belirlendi.

Histolojik, genetik ve klinik çalışmalar, PDAC'ın potansiyel öncüleri olarak üç farklı duktal preneoplastik lezyon tanımlamıştır. Bunlar, intralobüler kanallardan kaynaklanan pankreatik intraepitelyal neoplazileri (PanIN'ler), ana pankreas kanalında veya ana dallarında ortaya çıkan intraduktal papiller müsinöz neoplazmaları (IPMN) ve karakteristik olarak müsin üreten müsinöz kistik neoplazmalarıdır (MCN). Bu lezyonlar metastatik yapı gösterdiğinde PDAC olarak tanımlanır. PanIN'ler, histopatolojik ve moleküler seviyelerde en iyi karakterize edilen pre-neoplastik lezyonlardır. PanIN'ler, displazinin derecesine göre PanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2 ve PanIN-3 üzere dört sınıfta sınıflandırılabilir [81]. Normal pankreas kanal epiteli tek katlı kübik yapıdadır. PanIN-1A lezyonlar, bazal yerleşimli küçük ve yuvarlak-oval çekirdekler ve bol supra-nükleer müsin içeren uzun prizmatik hücrelerden oluşan epitelyal lezyonlardır. PanIN-1B lezyonlarda PanIN1A lezyonlara ek olarak papiller, mikropapiller veya bazal olarak psödostratifiye bir histolojik yapı görünür. PanIN-2 lezyonlar çoğunlukla papillerdir. Sitolojik olarak bu lezyonlar bir miktar polarite kaybı, genişlemiş çekirdekler, psödostratifikasyon ve hiperkromatizm ile karakterizedir. PanIN-3 lezyonlar ise histolojik olarak genellikle papiller veya mikropapillerdir. Dokuda kalbur biçiminde görünümlü küçük epitel hücre kümelerinin lümene "tomurcuklanması" ve luminal nekroz görünür [82]. KPC fareden izole edilen pankreas tümör organoidlerinde bu çalışmada da literatürdeki çalışmalarda olduğu gibi pankreas kanserinin farklı evreleri olan PanIN-1 seviyesinden PanIN-3 seviyesine kadar geniş spektrumda histomorfoloji görülmüştür.

Cadherin ailesinin bir üyesi olan E-cadherin, epitel hücrelerin birbiri ile bağlantı kurmasını sağlayan, doku oluşumunda ve kanserin baskılanmasında önemli roller üstlenen Ca^{2+} bağımlı bir hücre-hücre adezyon molekülüdür [83, 84]. Antijen-antikor ilişkisi temeline dayanan immunohistokimyasal/immunfloresan deneylerde epitelyal hücrelerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan E-cadherin, pankreas kanalındaki epitelyal hücrelerden oluşan pankreas organoidlerinin karakterizasyonunda da yaygın olarak kullanılmaktadır [11, 85, 86].

SRY bağımlı HMGbox transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesi olan SOX9, pankreasın embriyonik gelişiminde ve yetişkin pankreasın homeostazının sağlanmasında önemli görevler üstlenmektedir. Pankreas gelişimi sırasında hem ekzokrin hem de endokrin hücreler, ortak bir progenitör hücre havuzundan olgun pankreas kanal hücrelerine benzerlikler göstererek farklılaşır. SOX9, erken pankreas epitelinde eksprese edilir ve insanlarda normal pankreas ekzokrin ve endokrin gelişimi için gereklidir. Lynn ve arkadaşları 2006 yılında yayınladıkları çalışmada SOX9'un, farelerde de hem pankreas progenitör hücrelerinde hem de yetişkin pankreastaki kanal hücrelerinde diğer progenitör transkripsiyon faktörleriyle spesifik olarak eksprese edildiğini ve SOX9'un pankreas progenitör hücrelerinde ikili bir rol oynayarak hem stabil bir transkripsiyonel network sağladığını hem de bu hücrelerin farklı hücre tiplerine farklılaşmasını desteklediğini gösterdiler [87]. SOX9'un insan pankreas gelişiminde de endokrin farklılaşmayı indüklediği McDonald ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yayınlanan çalışmada rapor edildi [88]. Seymour ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Sox9'un yetişkin pankreasında pankreatik kök hücrelerin farklılaşmamış bir durumda çoğalmalarını ve hayatta kalmalarını uyararak pankreatik kök hücre havuzunu koruduğunu gösterdi [89]. Pankreas gelişiminde ve homeostazında son derece önemli Sox9, pankreas organoidlerinin de pankreatik hücre soyundan geldiğini belirlemek amacıyla kullanılan bir belirteçtir [6, 11].

Bu çalışmada yapılan immunfloresan deneyler sonucunda normal ve KPC (Tümör) farelerden izole edilerek oluşturulan pankreas organoid hatları E-Cadherin ve SOX9 için pozitiflik göstermiş ve bu organoidlerin pankreatik hücrelerden oluştuğu ispatlanmıştır.

Nöral krest hücreleri, gebeliğin 3.-4. haftasında, ektodermal nöral plağın ileride merkezi nöral tüpü şekillendirmek üzere katlanması sırasında nöral oluğun her iki kenarında ortaya çıkar ve dorso-lateral ve ventral-caudal yönde göç ederek periferik sinir sisteminin oluşumuna katılırlar [18, 60, 61]. BMP, Wnt, FGF, RA ve Notch gibi hücre dışı sinyallerin uyumlu hareketi, ektodermal hücreleri nöral krest hücrelerine dönüştürmek için gereken genetik programı aktive eder. Bu genetik program nöral krest hücrelerinde aktive edildiğinde, Snail-2, SOX10, Foxd3 ve Twist gibi nöral krest genleri olan ikinci bir gen seti ifadenmeye başlar. Bu ikinci gen grubunun önemli işlevlerinden biri, yeni farklılaşmış nöral krest hücrelerinin canlılığını korumaktır [90].

NKH göç etmeye başlamadan önce AP2, Gbx2, Pax3 ve Zic1 gibi transkripsiyon faktörlerinin birleşik etkisi ile nöral plağın yan sınırında indüklenir. Bunlar arasında, Pax3 ve Zic1, eksiksiz bir nöral krest gelişim programını tetiklemek için hem gerekli hem de yeterlidir. Plouhunc ve arkadaşlarının 2013 yılında yayınladıkları çalışmada, nöral sınırın transkriptome analizini yaparak göç öncesi nöral krest oluşumu için genleri belirlediler. Araştırmacılar bu çalışmada Pax3 ve Zic1'in nöral krest belirleyicileri Snail1/2, Foxd3, Twist1 ve Tfap2b'nin ifadenmesini artırdığını ve nöral krest gelişiminde yer alan çoklu sinyal yollarını modüle ettiğini belirlediler. Ayrıca, Pax3'ün pozitif bir oto-düzenleyici geri besleme döngüsü aracılığıyla kendi ifadenmesini koruyabildiğini buldular [91]. Minchin ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yayınlanan çalışmada; Pax3'ün, zebra balığı nöral krest gelişiminin başlarında eksprese olduğu gösterildi. Pax3 proteininin antisens oligonükleotidleri ile inhibe edilmesi sonucunda enterik sinir sistemi gelişiminin başlangıcından itibaren durduğunu bulundu [92].

Nöral krest hücrelerinin indüklenmesinin ardından aktive olan ikinci gen grubunda bulunan Snail genlerinin, nöral krest hücrelerinde hücre döngüsü ilerlemesini kontrol ettiği ve Bcl-xL ve spesifik kaspazların ekspresyonunu kontrol ederek nöral krest hücrelerinde apoptozu inhibe ettiği ve bu anti-apoptotik gen grubunun nöral krestte eksprese edildiğini kanıtlayan çalışmalar ve yine nöral krestte en çok çalışılan SOX9 ve SOX10 gibi Sox genlerinin mutasyona uğradığı embriyolarda, nöral krest hücrelerinin farklılaşmadan önce apoptoza uğradığı Steventon ve arkadaşları tarafından yazılan derleme makalede rapor edilmiştir [90]. Ayrıca SOX10'un nöral krest hücrelerinin nöral farklılaşmasını geciktirerek bu hücrelerin multipotent özelliğini koruduğu [93, 94] ve nihai hedeflerine ulaşan nöral krest hücrelerinin duyu nöronlarına [95] ve melanositlere [96] farklılaşmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir.

Nöral krest hücrelerin, TGF- β inhibisyonu, Wnt aktivasyonu ve BMP moderasyonu sağlanarak UPKH'lerden elde edilmesi mümkündür. Erken nöral krest indükleyici PAX3 ve nöral krest hücrelerin canlılığının korunmasında etkili olan Snail-2 ve SOX10 transkripsiyon faktörleri UPKH'lerden elde edilen NKH karakterizasyonu için kullanılmaktadır [64-67]. Bu tez çalışmasında da UPKH'ler kullanılarak elde edilen NKH'lerin immunositokimyasal deneylerde nöroektodermal hücre belirteci PAX6 için negatif ve nöral krest belirteci yaygın olarak kullanılan SOX10 için pozitif olduğu görüldü. Elde edilen NKH'lerdeki PAX3, Snail-2 ve SOX10 mRNA ifadenmesi RT-qPCR ile incelendiğinde, bu genlerin ifadenmesinin

faklandırılmamış UPKH'lere göre anlamlı derece arttığı belirlendi. Bu sayede innervasyonu sağlamak amacıyla organoidlerle birlikte kültüre edilen yeni farklanmış hücrelerin nöral krest karakterinde olduğu doğrulandı.

Hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks etkileşimlerini sağlaması, genetik manipülasyona elverişli olması gibi avantajları nedeniyle popüleritesi her geçen gün artan deneysel bir model olan organoid kültürü gelişmekte olan bir deneysel modeldir. Gastrointestinal organoidlerin genelde epitelyal hücre türevlerinden oluşması, bu deneysel modelin fizyolojik olarak in vivo organ koşullarını sağlamasında bir engel olarak karşımıza çıkmaktadır. Gastrointestinal organoidlerin immün hücreler ve nöronlar gibi diğer hücrelerle birlikte kültüre edilerek in vivo koşullara daha yakın bir mikroçevre elde edilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

Pastula ve arkadaşları 2016 yılında yayınladıkları çalışmada, gastrointestinal epitel için organoid kültürü ve organotipik hücre kültürü ve bağırsak doku parçalarının ex vivo kültürünü karşılaştırmış ve bu deneysel yöntemlerin, bağırsak kriptlerinin fizyolojik durumunu yansıtan 3B kültür koşulları oluşturarak in vivo durumu in vitro ortamda taklit ettiğini bildirmişlerdir. Dahası bu 3B modellerin miyofibroblastlar, kollajen ve nöronlar gibi hücresel bileşenlerle birlikte kültüre edilerek, epitelyal organoidlerin niş etkileşimlerini in vitro araştırmak için elverişli modeller olabileceğini göstermişlerdir [17].

Workman ve arkadaşları 2017 yılında yayınlanan çalışmalarında, UPKH'lerden elde ettikleri nöral krest hücreleri ve bağırsak organoidlerini birlikte kültür ederek oluşturduğu modelde; nöral krest hücrelerinin mezenşim içerisine göç ederek fonksiyonel nöronlara ve glial hücrelere farklılaştığını göstermişlerdir. İn vitro ortamda nöral aktivite gösteren bu organodiler in vivo transplantasyonu yapıldığında fonksiyonel bağırsak hücre tiplerini, submukozal ve myenterik plexusları içeren, vaskülerizasyonun sağlandığı yapılar elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Oluşturdukları bu modeli PHOX2B geni mutasyonuna bağlı enterik sinir sisteminin yokluğuyla karakterize bir hastalık olan Hirchpurg's hastalığının moleküler temellerini araştırmada kullanmışlardır [8].

Bu tez çalışmasında da epitelyal hücre türevlerinden oluşan normal ve KPC (Tümör) fare pankreas organoidleri, UPKH'lerden farklandırılarak elde edilmiş NKH veya C57BL/6 farelerden izole edilmiş DKG ile birlikte kültüre edilerek pankreas organoidlerinde innervasyon sağlanmıştır.

β 3-Tubulin ağırlıklı olarak merkezi ve periferik sinir sistemlerinin nöronlarında eksprese edilen bir hücre iskeleti bileşenidir. β 3-tubulin olgun nöronların karakterizasyonunda en çok kullanılan belirteçlerden biri olmasının yanı sıra, nöral gelişimdeki rolü nedeniyle multipotent progenitörlerden nöral hücre farklılaşmasının erken bir belirteci olarak da kullanılmaktadır [97, 98]. Glial fibriler asidik proteinin (GFAP), merkezi sinir sisteminin (CNS) olgun astrositlerinde ara filament olarak bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca GFAP, ilk olarak embriyonik gelişimin 18. gününde ortaya çıkarak; Schwann hücrelerinin gelişimine katılır. Periferik sinir sisteminde GFAP ekspresyonu doğum sonrası, miyelin oluşturan hücrelerde baskılanır, ancak miyelin oluşturmeyen Schwann hücrelerinde devam eder [99, 100]. GFAP merkezi ve periferik sinir sistemindeki rolü ve yoğun olarak eksprese edilmesi nedeniyle glial hücre belirteci olarak kullanılır.

Bu çalışmada NKH veya DKG ile birlikte kültüre edilen normal ve KPC (Tümör) pankreas organoidleri, E-cadherin, β 3-Tubulin ve GFAP pozitif yapılar immunfloresan olarak belirlenerek pankreas organoidlerinin innerve olduğu doğrulanmıştır. NKH'lerin normal ve KPC (Tümör) pankreas organoidleri ile 7 gün boyunca kültüre edildiğinde β 3-Tubulin pozitif nöronlara farklılaştığı ve bu nöronların uzantılarının E-cadherin pozitif organoidlere doğru yönelerek geliştiği görülmüştür. Olgun nöral yapılardan oluşan DKG ile birlikte kültür neticesinde elde edilen innerve normal ve KPC (Tümör) organoid modellerinde β 3-Tubulin pozitif nöronların yanı sıra GFAP pozitif periferik glianın da olduğu belirlendi. GFAP pozitif yapıların NKH + Organoid birlikte kültürlerinde görülmemesinin nedeni, 7 günlük birlikte kültür süresinin glial hücre farklılaşması için yeterli olmaması ve/veya bu kültürlerde NKH 'lerde glial hücre farklılaşmasını indükleyecek etkenlerin bulunmaması olabilir.

Kronik pankreatit ve pankreas kanseri hastalarında pankreatik sinirlerde belirgin bir değişiklik görülür. Pankreatik sinirlerin boyutu (nöral hipertrofi) ve sayısı (nöral hiperplazi) artar. Otonom ve duyuşal liflerin oranı (nöral remodelling) değişir ve sinir lifleri inflamatuvar hücreler veya pankreas kanseri hücreleri tarafından infiltre (nöral invazyon) edilir. Bu

nöropatik değişiklikler, pankreas kanseri hastalarının hemen hemen hepsinde görülen şiddetli abdominal ağrı ile de doğrudan ilişkilidir [24]. Ceyhan ve arkadaşları 2009 yılında 546 denek üzerinde yaptıkları araştırmalarında, pankreas kanseri ve kronik pankreatit hastalarında Artan nöral hiperplazi ve nöral hipertrofi'nin abdominal ağrı ile paralel şekilde şiddetli bir artış gösterdiğini rapor ettiler. Nöral invazyona bağlı nöral iltahaplanmanın da nöral hiperplazi ve nöral hipertrofiyle bağlantılı olarak pankreas kanser hastalarında yoğun olarak bulunduğunu bildirdiler. Ceyhan ve arkadaşları 2010 yılında yayınladıkları çalışmalarında ise nöral hiperplazi ve nöral hipertrofi'nin sadece pankreas kanser dokusunda değil, etrafındaki normal pankreas dokusunda da artış gösterdiğini bu artışın pankreas kanser dokusunda artan artemin ve nöral büyüme faktörünün (NGF) peritümöral dokulara nörotrofik etkisinden kaynaklandığını bildirdiler [101]. Demir ve arkadaşları 2014 yılında yayınlanan çalışmalarında, Schwann hücre göçünün ve periferik nöronlara yönelik kanser invazyonunun zamanlamasını ve özgüllüğünü izlemek için yeni bir 3B göç deneyi geliştirildi. Bu modeli kullanarak gerçekleştirdikleri deneyler sonucunda Schwann hücrelerinin, kanser hücrelerine özel ve spesifik afiniteye sahip olduğunu ve pankreas ve kolon kanserinin premalign fazında nöral invazyon sırasında ilk önce Schwann hücrelerinin kanser hücrelerine doğru göç ettiğini gösterdiler [22]. Demir ve arkadaşlarının 2015 yılında yayınladıkları ve kronik pankreatit ve pankreas kanserinde nöral plastisiteyi detaylı şekilde ele aldıkları derlemede mevcut deneysel modellerin pankreatik nöropati çalışmalarında yetersiz kaldığını ve yeni deneysel modellerin geliştirilmesi gerektiğini vurguladılar.

Bu çalışmada NKH veya DKG ile birlikte kültür sonucu elde edilen innerve normal ve KPC (Tümör) pankreas organoidlerindeki farklılıklar karşılaştırılarak incelendiğinde NKH ile birlikte kültür sonucu innerve edilen pankreas oranoid modelinde KPC (Tümör) organoidlerin normal organoidlere göre nöral dallanmada artışa neden olduğu, DKG ile birlikte kültür sonucu innerve edilen pankreas oranoid modelinde ise KPC (Tümör) organoidlerin normal organoidlere göre hem nöral dallanma miktarında hem de nöral uzantıların büyüklüğünde artışa neden olduğu bulundu. Bu bulgular neticesinde yeni geliştirilen innerve pankreas organoid modellerinin pankreas kanserinde görülen nöral hipertrofi ve nöral hiperplaziyi in vitro ortamda taklit edebildiği görüldü.

Ki-67, tüm proliferen olan hücrelerde eksprese olan nükleer bir proteindir ve bölünen hücrelerin tümörlere oranını tahmin etmek için yaygın olarak kullanılan bir belirteçtir [102]. Bu çalışmada da tek başına kültüre edilen normal ve KPC (Tümör) pankreas organoidlerindeki Ki67 pozitif hücrelerin oranı, NKH veya DKG ile birlikte kültür sonucu innerve olmuş normal ve KPC (Tümör) pankreas organoidlerindeki Ki67 pozitif hücrelerin oranlarıyla karşılaştırılarak innervasyonun epitelyal pankreas organoid hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi incelenmiştir. NKH ile birlikte kültür ile sağlanan innervasyonun hem normal hem de KPC (Tümör) organoidlerde epitelyal hücrelerin proliferasyonunda artışa neden olduğu belirlendi. DKG ile birlikte kültür ile sağlanan innervasyonun ise ne normal organoid hücrelerinin ne de KPC (Tümör) organoid hücrelerinin proliferasyonunda önemli bir değişikliğe neden olmadığı bulundu. Bu ilginç bulgu, DKG birlikte kültürlerinde bulunan olgun nöronların ve/veya glial yapıların kanserli organoid hücrelerinde proliferasyon yerine epitelyal mesenkimal geçişi indüklemiş olma olasılığını akla getirmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Organoid kültürleri, 2B hücre kültürüne göre sağladığı avantajlar ve in vivo organ fizyolojisini in vitro ortamda sağlayabilme potansiyeli sayesinde bilim dünyasına pre-klinik uygulamalarda yeni bir ufuk açmıştır. Hasta dokusundan alınabilecek biyopsilerden üretilebilmesi, hassas ilaç duyarlılık testlerini gerçekleştirmeye imkân tanınması, genetik manipülasyona açık olması ve transplante edilebilir olması, organoidlerin klinik çalışmalarda da kısa zamanda yer alacağını düşündürmektedir. Görece yeni sayılabilecek bir teknik olan organoid kültür modellerinin geliştirilerek fizyolojik olarak in vivo koşullara daha benzer modellerin oluşturulması, organogenez ve hastalık modellerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Bu tez çalışmasında, daha önce tanımlanmış ve yalnızca epitelyal hücre türevlerinden oluşan fare pankreas organoidleri, embriyogenez sırasında periferik sinir sistemin oluşumunu sağlayan nöral krest hücreleri ile birlikte kültüre edilerek ve pankreasın duyu sinir liflerini barındıran dorsal kök ganglionu ile birlikte kültüre edilerek innerve pankreas organoidleri elde edilmiştir.

Yeni üretilen normal ve KPC (Tümör) innerve pankreas organoid modelleri, pankreas kanserinde pankreatik nöropati açısından karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve pankreas kanser hastalarında görülen nöral hiperplazi ve nöral hipertrofi'nin bu yeni modellerde de oluştuğu belirlendi.

Elde edilen bulgular sonucu, literatürde ilk kez tanımlanan innerve pankreas organoidlerinin pankreas organogenezinin araştırılmasında etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu yeni innerve pankreas organoidleri kullanılarak, yine literatürde ilk kez, pankreas kanserinde pankreatik nöropati için bir organoid modeli tanımlanmıştır. Geliştirilen in vitro pankreatik nöropati modelinin, hastalığın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına sağlayacağı katkının yanı sıra, ileride hastaya özel innerve pankreas modelleri oluşturulabileceği ve ilaç duyarlılık testleri gibi kişisel tıp uygulamalarının yapılabileceği tanslasyonel modellerin oluşturulabilmesi konusunda umut vermektedir.



KAYNAKLAR

1. Simian, M. and Bissell, M.J. (2016). Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions. *Journal of Cell Biology*, 216, 31-40.
2. Xinaris, C. Brizi, V. and Remuzzi, G. (2015). Organoid Models and Applications in Biomedical Research. *Nephron*, 130, 191-199.
3. Huch, M. and Koo, B.K. (2015). Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development*, 142, 3113-3125.
4. Kruitwagen, H.S. Oosterhoff, L.A. Vernooij, I. Schrall, I.M. van Wolferen, M.E. Bannink, F. Roesch, C. van Uden, L. Molenaar, M.R. Helms, J.B. Grinwis, G.C.M. Verstegen, M.M.A. van der Laan, L.J.W. Huch, M. Geijssen, N. Vries, R.G. Clevers, H. Rothuizen, J. Schotanus, B.A. Penning, L.C. and Spee, B. (2017). Long-Term Adult Feline Liver Organoid Cultures for Disease Modeling of Hepatic Steatosis. *Stem Cell Reports*, 8, 822-830.
5. Xue, X. and Shah, Y.M. (2013). In vitro organoid culture of primary mouse colon tumors. *Jornal of Visual Experiments*, 75, e50210.
6. Huang, L. Holtzinger, A. Jagan, I. BeGora, M. Lohse, I. Ngai, N. Nostro, C. Wang, R. Muthuswamy, L.B. Crawford, H.C. Arrowsmith, C. Kalloger, S.E. Renouf, D.J. Connor, A.A. Cleary, S. Schaeffer, D.F. Roehrl, M. Tsao, M.S. Gallinger, S. Keller, G. and Muthuswamy, S.K. (2015). Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nature Medicine*, 21, 1364-1371.
7. Wills, E.S. and Drenth, J.P. (2017). Building pancreatic organoids to aid drug development. *Gut*, 66, 393-394.
8. Workman, M.J. Mahe, M.M. Trisno, S. Poling, H.M. Watson, C.L. Sundaram, N. Chang, C.F. Schiesser, J. Aubert, P. Stanley, E.G. Elefanty, A.G. Miyaoka, Y. Mandegar, M.A. Conklin, B.R. Neunlist, M. Brugmann, S.A. Helmrich, M.A. and Wells, J.M. (2017). Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nature Medicine*, 23, 49-59.
9. Barker, N. Van Es, J.H. Kuipers, J. Kujala, P. Van Den Born, M. Cozijnsen, M. Haegebarth, A. Korving, J. Begthel, H. and Peters, P.J. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 449, 1003-1007.
10. Sato, T. Vries, R.G. Snippert, H.J. Van De Wetering, M. Barker, N. Stange, D.E. Van Es, J.H. Abo, A. Kujala, P. and Peters, P.J. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459, 262-265.
11. Huch, M. Bonfanti, P. Boj, S.F. Sato, T. Loomans, C.J. van de Wetering, M. Sojoodi, M. Li, V.S. Schuijers, J. Gracanin, A. Ringnalda, F. Begthel, H. Hamer, K. Mulder, J. van Es, J.H. de Koning, E. Vries, R.G. Heimberg, H. and Clevers, H. (2013). Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *Embo Journal*, 32, 2708-2721.

12. Boj, S.F. Hwang, C.I. Baker, L.A. Chio, II Engle, D.D. Corbo, V. Jager, M. Ponz-Sarvisé, M. Tiriác, H. Spector, M.S. Gracanin, A. Oni, T. Yu, K.H. van Boxtel, R. Huch, M. Rivera, K.D. Wilson, J.P. Feigin, M.E. Ohlund, D. Handly-Santana, A. Ardito-Abraham, C.M. Ludwig, M. Elyada, E. Alagesan, B. Biffi, G. Yordanov, G.N. Delcuze, B. Creighton, B. Wright, K. Park, Y. Morsink, F.H. Molenaar, I.Q. Borel Rinkes, I.H. Cuppen, E. Hao, Y. Jin, Y. Nijman, I.J. Iacobuzio-Donahue, C. Leach, S.D. Pappin, D.J. Hammell, M. Klimstra, D.S. Basturk, O. Hruban, R.H. Offerhaus, G.J. Vries, R.G. Clevers, H. and Tuveson, D.A. (2015). Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*, 160, 324-338.
13. Moreira, L. Bakir, B. Chatterji, P. Dantes, Z. Reichert, M. and Rustgi, A.K. (2018). Pancreas 3D Organoids: Current and Future Aspects as a Research Platform for Personalized Medicine in Pancreatic Cancer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 5, 289-298.
14. Grapin-Botton, A. (2016). Three-dimensional pancreas organogenesis models. *Diabetes Obesity and Metabolism*, 18, 33-40.
15. Bertaux-Skeirik, N. Centeno, J. Feng, R. Schumacher, M.A. Shivdasani, R.A. and Zavros, Y. (2016). Co-culture of gastric organoids and immortalized stomach mesenchymal cells. *Gastrointestinal Physiology and Diseases: Methods and Protocols*, 1422, 23-31.
16. Nozaki, K. Mochizuki, W. Matsumoto, Y. Matsumoto, T. Fukuda, M. Mizutani, T. Watanabe, M. and Nakamura, T. (2016). Co-culture with intestinal epithelial organoids allows efficient expansion and motility analysis of intraepithelial lymphocytes. *Journal of gastroenterology*, 51, 206-213.
17. Pastula, A. Middelhoff, M. Brandtner, A. Tobiasch, M. Hohl, B. Nuber, A.H. Demir, I.E. Neupert, S. Kollmann, P. Mazzuoli-Weber, G. and Quante, M. (2016). Three-Dimensional Gastrointestinal Organoid Culture in Combination with Nerves or Fibroblasts: A Method to Characterize the Gastrointestinal Stem Cell Niche. *Stem Cells International*, 2016, 3710836.
18. Sadler, T.W. (2011). *Langman's medikal embriyoloji*. (Çev. A.C. Başaklar). Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2010'da yayımlandı), 294-295
19. Bhatt, S. Diaz, R. and Trainor, P.A. (2013). Signals and switches in Mammalian neural crest cell differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, a008326.
20. Rodriguez-Diaz, R. Abdulreda, M.H. Formoso, A.L. Gans, I. Ricordi, C. Berggren, P.O. and Caicedo, A. (2011). Innervation patterns of autonomic axons in the human endocrine pancreas. *Cell Metabolism*, 14, 45-54.
21. Lohse, I. and Brothers, S.P. (2020). Pathogenesis and treatment of pancreatic cancer related pain. *Anticancer research*, 40, 1789-1796.
22. Demir, I.E. Boldis, A. Pfitzinger, P.L. Teller, S. Brunner, E. Klose, N. Kehl, T. Maak, M. Lesina, M. Laschinger, M. Janssen, K.P. Algul, H. Friess, H. and Ceyhan, G.O. (2014). Investigation of Schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion. *Journal of the National Cancer Institute*, 106, dju184.

23. Ceyhan, G.O. Bergmann, F. Kadihasanoglu, M. Altintas, B. Demir, I.E. Hinz, U. Muller, M.W. Giese, T. Buchler, M.W. Giese, N.A. and Friess, H. (2009). Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology*, 136, 177-186.
24. Demir, I.E. Friess, H. and Ceyhan, G.O. (2015). Neural plasticity in pancreatitis and pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12, 649-659.
25. Yildirim, M. (2013). *Resimli sistematik anatomi*. (2). Istanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 519-521.
26. Marieb, E.N. Hoehn, K. and Tatar, I. (2017). *Anotomi ve fizyoloji = Anatomy & physiology*. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık, 774-776.
27. Longnecker, D.S. (2014). *Anatomy and Histology of the Pancreas* (Version 1.0). Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base.
28. Chung K.W., Chung H.M. and Hallday N.L. (2017). *BRS Gross Anatomi*. (Çev. Arifoğlu, Y.). İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri. 124-126.
29. A. Wayne Vogl , A.W.M.M., Richard L. Drake (2018). *Grays Anatomi Öğrenciler için*. (3). Ankara Nobel Tıp Kitabevleri, 333-336.
30. Sadler, T.W. (2011). *Langman's medikal embriyoloji*. (Çev. A.C. Başaklar). Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2010'da yayımlandı), 215-220.
31. Gartner, L.P. and Hiatt, J.L. (2007). *Color textbook of histology* (Third edition). Philadelphia, Saunders Elsevier, 417-422.
32. Eşrefoğlu, M. (2016). *Özel Histoloji*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 167-174.
33. Ross, M.H. and Pawlina, W. (2011). *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology* (Sixth edition). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 647-655.
34. Sung, H. Ferlay, J. Siegel, R.L. Laversanne, M. Soerjomataram, I. Jemal, A. and Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71, 209-249.
35. Aier, I. Semwal, R. Sharma, A. and Varadwaj, P.K. (2019). A systematic assessment of statistics, risk factors, and underlying features involved in pancreatic cancer. *Cancer epidemiology*, 58, 104-110.
36. Rawla, P. Sunkara, T. and Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of pancreatic cancer: global trends, etiology and risk factors. *World journal of oncology*, 10, 10-27.
37. Fogel, E.L. Shahda, S. Sandrasegaran, K. DeWitt, J. Easler, J.J. Agarwal, D.M. Eagleson, M. Zyromski, N.J. House, M.G. and Ellsworth, S. (2017). A multidisciplinary approach to pancreas cancer in 2016: a review. *The American journal of gastroenterology*, 112, 537-554.

38. Reid, M.D. Bagci, P. and Adsay, N.V. (2013). Histopathologic assessment of pancreatic cancer: does one size fit all?. *Journal of surgical oncology*, 107, 67-77.
39. Jaffee, E.M. Hruban, R.H. Canto, M. and Kern, S.E. (2002). Focus on pancreas cancer. *Cancer cell*, 2, 25-28.
40. Waddell, N. Pajic, M. Patch, A.-M. Chang, D.K. Kassahn, K.S. Bailey, P. Johns, A.L. Miller, D. Nones, K. and Quek, K. (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*, 518, 495-501.
41. McCracken, K.W. Catá, E.M. Crawford, C.M. Sinagoga, K.L. Schumacher, M. Rockich, B.E. Tsai, Y.-H. Mayhew, C.N. Spence, J.R. and Zavros, Y. (2014). Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*, 516, 400-404.
42. Ramachandran, S.D. Schirmer, K. Müntz, B. Heinz, S. Ghafoory, S. Wölfl, S. Simon-Keller, K. Marx, A. Øie, C.I. and Ebert, M.P. (2015). In vitro generation of functional liver organoid-like structures using adult human cells. *PLoS One*, 10, e0139345.
43. Trisno, S.L. Philo, K.E. McCracken, K.W. Catá, E.M. Ruiz-Torres, S. Rankin, S.A. Han, L. Nasr, T. Chaturvedi, P. and Rothenberg, M.E. (2018). Esophageal organoids from human pluripotent stem cells delineate Sox2 functions during esophageal specification. *Cell Stem Cell*, 23, 501-515.
44. Serra, D. Mayr, U. Boni, A. Lukonin, I. Rempfler, M. Meylan, L.C. Stadler, M.B. Strnad, P. Papasaikas, P. and Vischi, D. (2019). Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development. *Nature*, 569, 66-72.
45. Drost, J. Karthaus, W.R. Gao, D. Driehuis, E. Sawyers, C.L. Chen, Y. and Clevers, H. (2016). Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nature protocols*, 11, 347-358.
46. Turco, M.Y. Gardner, L. Hughes, J. Cindrova-Davies, T. Gomez, M.J. Farrell, L. Hollinshead, M. Marsh, S.G. Brosens, J.J. and Critchley, H.O. (2017). Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nature cell biology*, 19, 568-577.
47. Czerniecki, S.M. Cruz, N.M. Harder, J.L. Menon, R. Annis, J. Otto, E.A. Gulieva, R.E. Islas, L.V. Kim, Y.K. and Tran, L.M. (2018). High-throughput screening enhances kidney organoid differentiation from human pluripotent stem cells and enables automated multidimensional phenotyping. *Cell Stem Cell*, 22, 929-940.
48. Hill, S.J. Decker, B. Roberts, E.A. Horowitz, N.S. Muto, M.G. Worley, M.J. Feltmate, C.M. Nucci, M.R. Swisher, E.M. and Nguyen, H. (2018). Prediction of DNA repair inhibitor response in short-term patient-derived ovarian cancer organoids. *Cancer discovery*, 8, 1404-1421.
49. Kelava, I. and Lancaster, M.A. (2016). Dishing out mini-brains: current progress and future prospects in brain organoid research. *Developmental biology*, 420, 199-209.

50. Cowan, C.S. Renner, M. De Gennaro, M. Gross-Scherf, B. Goldblum, D. Hou, Y. Munz, M. Rodrigues, T.M. Krol, J. and Szikra, T. (2020). Cell types of the human retina and its organoids at single-cell resolution. *Cell*, 182, 1623-1640.
51. Artegiani, B. and Clevers, H. (2018). Use and application of 3D-organoid technology. *Human molecular genetics*, 27, R99-R107.
52. Dutta, D. Heo, I. and Clevers, H. (2017). Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends in Molecular Medicine*, 23, 393-410.
53. Kretzschmar, K. and Clevers, H. (2016). Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Developmental Cell*, 38, 590-600.
54. Park, J. Wetzel, I. Dréau, D. and Cho, H. (2018). 3D miniaturization of human organs for drug discovery. *Advanced healthcare materials*, 7, 1700551.
55. Rookmaaker, M.B. Schutgens, F. Verhaar, M.C. and Clevers, H. (2015). Development and application of human adult stem or progenitor cell organoids. *Nature Reviews Nephrology*, 11, 546-554.
56. Lewis, S.L. and Tam, P.P. (2006). Definitive endoderm of the mouse embryo: formation, cell fates, and morphogenetic function. *Developmental dynamics*, 235, 2315-2329.
57. Sugiyama, T. Benitez, C.M. Ghodasara, A. Liu, L. McLean, G.W. Lee, J. Blauwkamp, T.A. Nusse, R. Wright, C.V. and Gu, G. (2013). Reconstituting pancreas development from purified progenitor cells reveals genes essential for islet differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 12691-12696.
58. Broutier, L. Andersson-Rolf, A. Hindley, C.J. Boj, S.F. Clevers, H. Koo, B.K. and Huch, M. (2016). Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nature Protocols*, 11, 1724-1743.
59. Azzarelli, R. Hurley, C. Sznurkowska, M.K. Rulands, S. Hardwick, L. Gamper, I. Ali, F. McCracken, L. Hindley, C. McDuff, F. Nestorowa, S. Kemp, R. Jones, K. Gottgens, B. Huch, M. Evan, G. Simons, B.D. Winton, D. and Philpott, A. (2017). Multi-site Neurogenin3 Phosphorylation Controls Pancreatic Endocrine Differentiation. *Developmental Cell*, 41, 274-286.
60. Kuo, B.R. and Erickson, C.A. (2010). Regional differences in neural crest morphogenesis. *Cell Adhesion & Migration*, 4, 567-585.
61. Srinivasan, A. and Toh, Y.C. (2019). Human Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Crest Cells for Tissue Regeneration and Disease Modeling. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 39.
62. Hutchins, E.J. Kunttas, E. Piacentino, M.L. Howard, A.G.A.t. Bronner, M.E. and Uribe, R.A. (2018). Migration and diversification of the vagal neural crest. *Developmental Biology*, 444, S98-S109.

63. Vega-Lopez, G.A. Cerrizuela, S. and Aybar, M.J. (2017). Trunk neural crest cells: formation, migration and beyond. *The International Journal of Developmental Biology*, 61, 5-15.
64. Frith, T.J. Granata, I. Wind, M. Stout, E. Thompson, O. Neumann, K. Stavish, D. Heath, P.R. Ortmann, D. and Hackland, J.O. (2018). Human axial progenitors generate trunk neural crest cells in vitro. *Elife*, 7, e35786.
65. Frith, T. J., Gogolou, A., Hackland, J. O., Hewitt, Z. A., Moore, H. D., Barbaric, I., ... & McCann, C. J. (2020). Retinoic acid accelerates the specification of enteric neural progenitors from in-vitro-derived neural crest. *Stem cell reports*, 15(3), 557-565.
66. Frith, T.J.R. and Tsakiridis, A. (2019). Efficient Generation of Trunk Neural Crest and Sympathetic Neurons from Human Pluripotent Stem Cells Via a Neuromesodermal Axial Progenitor Intermediate. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 49, e81.
67. Hackland, J.O.S. Frith, T.J.R. Thompson, O. Marin Navarro, A. Garcia-Castro, M.I. Unger, C. and Andrews, P.W. (2017). Top-Down Inhibition of BMP Signaling Enables Robust Induction of hPSCs Into Neural Crest in Fully Defined, Xeno-free Conditions. *Stem Cell Reports*, 9, 1043-1052.
68. Ross, M.H. and Pawlina, W. (2011). *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology* (Sixth edition). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 390-391.
69. Sleight, J.N. Weir, G.A. and Schiavo, G. (2016). A simple, step-by-step dissection protocol for the rapid isolation of mouse dorsal root ganglia. *BMC research notes*, 9, 1-7.
70. Degese, S. and Benton, G. Production of R-Spondin 1 conditioned medium using Cultrex® Rspol cells.
71. Perera, R.M. and Bardeesy, N. (2015). Pancreatic cancer metabolism: breaking it down to build it back up. *Cancer discovery*, 5, 1247-1261.
72. Yu, F. Hunziker, W. and Choudhury, D. (2019). Engineering microfluidic organoid-on-a-chip platforms. *Micromachines*, 10, 165.
73. Li, M. and Izpisua Belmonte, J.C. (2019). Organoids—preclinical models of human disease. *New England Journal of Medicine*, 380, 569-579.
74. Barker, N. Huch, M. Kujala, P. van de Wetering, M. Snippert, H.J. van Es, J.H. Sato, T. Stange, D.E. Begthel, H. van den Born, M. Danenberg, E. van den Brink, S. Korving, J. Abo, A. Peters, P.J. Wright, N. Poulson, R. and Clevers, H. (2010). Lgr5(+) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell*, 6, 25-36.
75. Kim, K.-A. Zhao, J. Andarmani, S. Kakitani, M. Oshima, T. Binnerts, M.E. Abo, A. Tomizuka, K. and Funk, W.D. (2006). R-Spondin proteins: a novel link to β -catenin activation. *Cell cycle*, 5, 23-26.

76. Carmon, K.S. Gong, X. Lin, Q. Thomas, A. and Liu, Q. (2011). R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/ β -catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 11452-11457.
77. Bryant, K.L. Mancias, J.D. Kimmelman, A.C. and Der, C.J. (2014). KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in biochemical sciences*, 39, 91-100.
78. Weissmueller, S. Manchado, E. Saborowski, M. Morris IV, J.P. Wagenblast, E. Davis, C.A. Moon, S.-H. Pfister, N.T. Tschaharganeh, D.F. and Kitzing, T. (2014). Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor β signaling. *Cell*, 157, 382-394.
79. Herreros-Villanueva, M. Hijona, E. Cosme, A. and Bujanda, L. (2012). Mouse models of pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology*, 18, 1286.
80. Hingorani, S.R. Petricoin III, E.F. Maitra, A. Rajapakse, V. King, C. Jacobetz, M.A. Ross, S. Conrads, T.P. Veenstra, T.D. and Hitt, B.A. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer cell*, 4, 437-450.
81. Guerra, C. and Barbacid, M. (2013). Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Molecular Oncology*, 7, 232-247.
82. Hruban, R.H. Wilentz, R.E. and Maitra, A. (2005). Identification and analysis of precursors to invasive pancreatic cancer. *Pancreatic Cancer*, 1-13.
83. Bryant, D.M. and Stow, J.L. (2004). The ins and outs of E-cadherin trafficking. *Trends in cell biology*, 14, 427-434.
84. Van Roy, F. and Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and molecular life sciences*, 65, 3756-3788.
85. Kaneta, Y. Sato, T. Hikiba, Y. Sugimori, M. Sue, S. Kaneko, H. Irie, K. Sasaki, T. Kondo, M. and Chuma, M. (2020). Loss of pancreatic E-cadherin causes pancreatitis-like changes and contributes to carcinogenesis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 9, 105-119.
86. Li, X. Nadauld, L. Ootani, A. Corney, D.C. Pai, R.K. Gevaert, O. Cantrell, M.A. Rack, P.G. Neal, J.T. and Chan, C.W. (2014). Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture. *Nature medicine*, 20, 769-777.
87. Lynn, F. Smith, S. Wilson, M. Yang, K. Nekrep, N. and German, M. (2007). Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 10500-10505.
88. McDonald, E. Li, J. Krishnamurthy, M. Fellows, G.F. Goodyer, C.G. and Wang, R. (2012). SOX9 regulates endocrine cell differentiation during human fetal pancreas development. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44, 72-83.
89. Seymour, P.A. Freude, K.K. Tran, M.N. Mayes, E.E. Jensen, J. Kist, R. Scherer, G. and Sander, M. (2007). SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 1865-1870.

90. Steventon, B. Carmona-Fontaine, C. and Mayor, R. (2005). Genetic network during neural crest induction: from cell specification to cell survival. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16, 647-654.
91. Plouhinec, J.-L. Roche, D.D. Pegoraro, C. Figueiredo, A.L. Maczkowiak, F. Brunet, L.J. Milet, C. Vert, J.-P. Pollet, N. and Harland, R.M. (2014). Pax3 and Zic1 trigger the early neural crest gene regulatory network by the direct activation of multiple key neural crest specifiers. *Developmental biology*, 386, 461-472.
92. Minchin, J.E. and Hughes, S.M. (2008). Sequential actions of Pax3 and Pax7 drive xanthophore development in zebrafish neural crest. *Developmental biology*, 317, 508-522.
93. Kelsh, R.N. (2006). Sorting out Sox10 functions in neural crest development. *Bioessays*, 28, 788-798.
94. Kim, J. Lo, L. Dormand, E. and Anderson, D.J. (2003). SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron*, 38, 17-31.
95. Carney, T.J. Dutton, K.A. Greenhill, E. Delfino-Machín, M. Dufourcq, P. Blader, P. and Kelsh, R.N. (2006). A direct role for Sox10 in specification of neural crest-derived sensory neurons. *Development*, 133, 4619-4630.
96. Cunningham, R.L. Kramer, E.T. DeGeorgia, S.K. Godoy, P.M. Zarov, A.P. Seneviratne, S. Grigura, V. and Kaufman, C.K. (2021). Functional in vivo characterization of sox10 enhancers in neural crest and melanoma development. *Communications biology*, 4, 1-15.
97. Karki, R. Mariani, M. Andreoli, M. He, S. Scambia, G. Shahabi, S. and Ferlini, C. (2013). β III-Tubulin: biomarker of taxane resistance or drug target?. *Expert opinion on therapeutic targets*, 17, 461-472.
98. Sieber-Blum, M. Schnell, L. Grim, M. Hu, Y.F. Schneider, R. and Schwab, M.E. (2006). Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 32, 67-81.
99. Eng, L.F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of neuroimmunology*, 8, 203-214.
100. Jessen, K.R. and Mirsky, R. (1991). Schwann cell precursors and their development. *Glia*, 4, 185-194.
101. Ceyhan, G.O. Schäfer, K.-H. Kerscher, A.G. Rauch, U. Demir, I.E. Kadihasanoglu, M. Böhm, C. Müller, M.W. Büchler, M.W. and Giese, N.A. (2010). Nerve growth factor and artemin are paracrine mediators of pancreatic neuropathy in pancreatic adenocarcinoma. *Annals of surgery*, 251, 923-931.
102. Sobecki, M. Mrouj, K. Colinge, J. Gerbe, F. Jay, P. Krasinska, L. Dulic, V. and Fisher, D. (2017). Cell-cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels. *Cancer research*, 77, 2722-2734.



EK-1. Etik Kurul Onayı



Regierung von Oberbayern



Regierung von Oberbayern • 80534 München

**Tierschutzgesetz (TierSchG):
Genehmigung Ihres beantragten Tierversuchsvorhabens**

Anlagen:

- 1 Empfangsbekenntnis g.R.
- 1 Kostenrechnung
- 1 Merkblatt zur Kostenbegleichung

Sehr geehrte Damen und Herren,

die Regierung von Oberbayern erlässt folgenden

Bescheid:

1. Der Tierversuch mit dem Titel „Generierung und Zucht von genetisch veränderten Mäusen zur Untersuchung der Pathogenese und der Metastasierung bei gastrointestinalen (GI) Tumoren“
 - Leiter/-in: Dr. Güralp Ceyhan
 - Stellvertreter/-in: Dr. Ihsan Ekin Demir
 - Tierschutzbeauftragte/-r: Dr. Sabine Schwamberger

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

Seite 2

- Tierzahl/Tierart:	4500 Mäuse
- Dauer:	28.04.2016 bis einschließlich 31.05.2021
- Haltungsort:	Zentrum für Präklinische Forschung Klinikum rechts der Isar, TU München Bau 545, Raum 45.0.39 OP: Bau 545, Raum 45.0.32 Ismaninger Str. 22 81675 München
- Durchführungsort:	Zentrum für Präklinische Forschung Klinikum rechts der Isar, TU München OP: Bau 545, Raum 45.0.32 Ismaninger Str. 22 81675 München

wird gemäß Ihrem Antrag vom 24.11.2015 genehmigt. Ihr Antrag ist Bestandteil dieses Bescheides.

2. Folgende Personen sind berechtigt am o.g. Tierversuch mitzuarbeiten:
 - Dr. Stephan Schorn
 - Dr. Steffen Teller
3. Die Belastung wurde prospektiv mit mittel eingestuft.
4. Die Tierkörper werden als Material der Kategorie 1 gem. Artikel 8 Buchst. a Nr. iv der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 eingestuft und sind nach den Vorgaben des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsrechts zu entsorgen.
5. Es werden folgende Nebenbestimmungen verfügt:
 - a. Über die Tierversuche sind Aufzeichnungen zu führen. Die Aufzeichnungen müssen den mit dem Versuchsvorhaben verfolgten Zweck, sowie die Zahl und Art der verwendeten Tiere und die Art und Durchführung der Versuche, sowie die Namen der Personen, die die Tierversuche durchgeführt haben, angeben. Außerdem ist bei Wirbeltieren die Herkunft einschließlich des Namens und der Anschrift des Vorbesitzers anzugeben. Die Aufzeichnungen sind von

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

Seite 3

den Personen, die die Versuche durchgeführt haben, und von dem Leiter des Versuchsvorhabens, oder seinem Stellvertreter zu unterzeichnen; werden die Aufzeichnungen elektronisch erstellt, sind sie unverzüglich nach Abschluss jedes Teilversuchs des Versuchsvorhabens auszudrucken und von dem Leiter des Versuchsvorhabens oder seinem Stellvertreter zu unterzeichnen. Die Aufzeichnungen sind fünf Jahre lang nach Abschluss des Versuchsvorhabens aufzubewahren und der zuständigen Behörde auf Verlangen vorzulegen.

- b. Spätestens 4 Wochen nach Abschluss des Versuchsvorhabens ist die Beendigung des Versuchsvorhabens der Regierung von Oberbayern mitzuteilen. Dabei ist ein Abschlussbericht über die Ergebnisse vorzulegen. Der Abschlussbericht hat insbesondere auch Informationen über die in § 35 Abs. 2 Nm. 1 bis einschließlich 5 TierSchVersV genannten Punkte zu enthalten.
- c. Diese Genehmigung kann jederzeit ganz oder teilweise widerrufen werden.

- 6. Der Antragsteller trägt die Kosten des Verfahrens.
- 7. Für diesen Bescheid wird eine Gebühr in Höhe von 500,00 € festgesetzt. Die Auslagen betragen 45,44 €.

Gründe:**I.**

Mit Datum vom 24.11.2015, eingegangen am 28.11.2015, stellten Sie bei der Regierung von Oberbayern einen Antrag auf Genehmigung eines Tierversuches „Generierung und Zucht von genetisch veränderten Mäusen zur Untersuchung der Pathogenese und der Metastasierung bei gastrointestinalen (GI) Tumoren“. Ihr Antrag wurde am 13.04.2016 von der Kommission nach § 15 Abs. 1 TierSchG beraten und befürwortet. Das Score Sheet wurde entsprechend der Anmerkung der Kommission überarbeitet.

II.

- 1. Die Regierung von Oberbayern ist zur Entscheidung über den Antrag auf Erteilung der Genehmigung sachlich und örtlich zuständig (§ 15 TierSchG i.V.m. §

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

Seite 4

1 Abs. 2 Spiegelstrich 1 Verordnung zum Vollzug tierschutzrechtlicher Vorschriften –TierSchRVV-, Art. 3 Abs. 1 Nr. 2 Bayer. Verwaltungsverfahrensgesetz –BayVwVfG-).

Die Regierung von Oberbayern ist zur Einstufung der tierischen Nebenprodukte als Kategorie 1 nach Artikel 8 Buchst. a Nr. iv der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009 zuständig (§ 3 Abs. 2 der Verordnung über Zuständigkeiten zum Vollzug des Rechts der Beseitigung tierischer Nebenprodukte – ZustVTierNebG).

2. Rechtsgrundlage für den Erlass dieses Bescheides ist § 8 TierSchG. Nach § 8 Abs. 1 TierSchG sind Versuche an Wirbeltieren genehmigungspflichtig. Die Genehmigung ist zu erteilen, da die Genehmigungsvoraussetzungen gem. § 8 Abs. 1 Satz 2 TierSchG erfüllt sind.
3. Eine rückblickende Bewertung ist nicht vorzunehmen, weil das Versuchsvorhaben nach Artikel 15 Abs. 1 in Verbindung mit Anhang VII der Richtlinie 2010/63/EU nicht als „schwer“ eingestuft wurde.
4. Die Einstufung in Kategorie 1 war erforderlich, da diese Tiere oder deren Körperteile infolge dieses Verfahrens/dieser Verfahren schwerwiegende Gesundheitsrisiken für Menschen und andere Tiere darstellen können (Art. 8 Buchst. a Nr. iv der Verordnung (EG) Nr. 1069/2009).
5. Rechtsgrundlage für die Nebenbestimmungen ist Art. 36 Abs. 2 Nr. 3 (Widerrufsvorbehalt) und Nr. 4 (Auflagen) BayVwVfG i.V.m. §§ 29 und 35 TierSchVersV, § 1 Abs. 1 und Abs. 2 Versuchstiermeldeverordnung –VersTierMeldV-. Sie sind erforderlich, um die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes bei der Durchführung der genehmigten Versuche zu sichern.
6. Die Kostenentscheidung beruht auf Art. 1, 2 Abs. 1 Satz 1, Art. 6 Abs. 1 Satz 1 i.V.m. Abs. 2 Satz 1 des Kostengesetzes –KG-. Die Entscheidung hinsichtlich der Gebührenbemessung beruht auf Art. 6 Abs. 1 Satz 1 KG in Verbindung mit der Tarifstelle 7.IX.10/2.2 des Kostenverzeichnisses –KVZ-. Demnach bemisst sich die Gebühr für die Genehmigung nach § 8 TierSchG im Rahmen zwischen 100,- € und 1.000,- €. Die Festsetzung von

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

Seite 5

500,- € entspricht dem entstandenen Verwaltungsaufwand. Die Auslagen sind Sitzungsentschädigungs- und Reisekostenvergütungen.

Hinweise

- Personen, die Eingriffe und Behandlungen innerhalb des Versuchsvorhabens durchführen sollen und die Voraussetzungen nach § 16 Abs. 1 Sätze 1 bis einschließlich 3 TierSchVersV nicht erfüllen, dürfen erst nach Erteilung einer Ausnahmegenehmigung gemäß § 16 Abs. 1 Satz 5 TierSchVersV bzw. nach Vorlage der Nachweise der erforderlichen Kenntnisse und Fähigkeiten eingesetzt werden.
- Ein Wechsel der Leitung oder der stellvertretenden Leitung ist der Regierung von Oberbayern unverzüglich anzuzeigen, § 34 Abs. 2 Satz 1 TierSchVersV.
- Bei Verstößen gegen diese Genehmigung bzw. die darin enthaltenen Nebenbestimmungen behalten wir uns die Einleitung eines Ordnungswidrigkeitenverfahrens vor, in dem auch Bußgelder verhängt werden können. Dies gilt insbesondere bei Nichteinhaltung der genehmigten Versuchsdauer.
- Auf die Aufbewahrungspflicht gemäß § 40 TierSchVersV weisen wir hin.
- Ein Tierversuchsantrag, der mit weniger als fünf Jahren genehmigt wurde, kann gemäß § 33 Abs. 2 TierSchVersV nur zweimal um jeweils 1 Jahr verlängert werden, sofern dadurch die Gesamtdauer des genehmigten Versuchsvorhabens fünf Jahre nicht überschreitet und sofern seit der erstmaligen Erteilung oder ersten Verlängerung der Genehmigung keine Änderungen des genehmigten Versuchsvorhabens oder nur solche Änderungen eingetreten sind, die
 1. nach § 34 Abs. 1 Satz 1 Nr. 4 oder Abs. 2 Satz 1 TierSchVersV angezeigt und von der zuständigen Behörde nicht beanstandet oder
 2. nach § 34 Abs. 3 TierSchVersV genehmigt worden sind.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid können Sie Klage erheben. Die Klage müssen Sie innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe dieses Bescheides beim Bayerischen Verwaltungsgericht München, Bayerstraße 30, 80335 München (Postanschrift: Postfach 20 05 43, 80005 München), schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle dieses Gerichts erheben. In der Klage müssen Sie den Kläger, den Beklagten (Freistaat Bayern) und den Gegenstand des Klagebegehrens bezeichnen, ferner sollen Sie einen bestimmten Antrag stellen und die zur Begründung dienenden Tatsachen und Beweismittel angeben. Der Klageschrift sollen Sie diesen Bescheid beifügen (in Urschrift, in Abschrift oder in Ablichtung),

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

Seite 6

ferner zwei Abschriften oder Ablichtungen der Klageschrift für die übrigen Beteiligten.

Hinweise zur Rechtsbehelfsbelehrung

- Die Klageerhebung in elektronischer Form (z. B. durch E-Mail) ist unzulässig.
- Kraft Bundesrechts ist bei Prozessverfahren vor den Verwaltungsgerichten grundsätzlich ein Gebührenvorschuss zu entrichten.

Mit freundlichen Grüßen

Zwickl



EK-2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Katılım Sertifikası



XIV. DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ETİK KURSU

30 EKİM – 07 KASIM 2013

KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, Hüseyin Erdiç BEŞİKCİOĞLU

Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı ile
Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yerleştirme ve
Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından
30 Ekim - 7 Kasım 2013 tarihleri arasında düzenlenen
Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu XIV'e katılarak,
Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve
bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

Sertifika no: 2013-14/02

EK-3. UPKH Hattı Analiz Sertifikası

Certificate of Analysis (CoA)
for induced Pluripotent Stem Cells

This product is for research only



ECACC Catalogue No: 66540265

Cell Line Name	BIONI014-A	Batch Number	P001
Donor ID	H270715		
Disease Association	No Disease Association	Phenotype of Donor	Low Birth Weight
Tissue of Origin	Adipose tissue derived mesenchymal stem cell	Sex	Male
Reprogramming Method	Non-integrating Episomal (POU5F1, SOX2, MYC, KLF4 and LIN28)		
Passage Number	Passage 12	Cell number / vial	0.92 x 10 ⁶
Culture Matrix	Matrigel/Geltrex	Culture Medium	Essential 8™
O ₂ Concentration	5%	CO ₂ Concentration	5%
Passaging Method	EDTA	Additional Culture Information	N/A
Cryopreservation Medium	40% FBS* / 50% medium / 10% DMSO *Serum of Zone 1 origin		
Recommendation for thawing	Recommended thaw into 1 well of a 6-well plate or per 10cm ² Refer to cell line user protocols for further guidance at www.EBiSC.org		
Additional Comments	Slow recovery after thaw, slow growth to confluency		
Associated Publications	PubMed ID: N/A		

Please see www.EBiSC.org for further information on Quality Control applied to lines released by EBiSC. The following standard testing criteria have been determined within EBiSC, prior to release of this product:

Test	Assay	Acceptance Criteria	Result
Sterility	Inoculation for microbiological growth	Not Detected	Pass
	qPCR for Mycoplasma	Not Detected	Pass
Cell Line Identity	Short Tandem Repeat analysis using PCR	N/A	Allele data recorded and available upon request. Gender match to donor
Viability	Visual Assessment	Growth to confluence post-thaw	Low, slow recovery
Phenotype	Continuous visual assessment of iPSC colony morphology	Recorded	Typical iPSC colonies with low differentiation levels

EK-3. (devam) UPKH Hattı Analiz Sertifikası

Certificate of Analysis (CoA)
for induced Pluripotent Stem Cells

This product is for research only



ECACC Catalogue No: 66540265

Additional cell line characteristics have been determined by original reprogramming centres and have not been independently verified by EBiSC. Historical cell line data displayed here is accurate according to data provided by depositors on 10-MAY-2017

Test	Assay	Result
Sterility	Virology (HBV, HCV, HIV1, HIV2)	Pass
Phenotype	Flow Cytometry	TRA-1-81: 96.0%; OCT 4: 90.1%; SOX2: 94.3%; SSEA-1: 0.02%; SSEA-4: 92.0%
Karyotype	G-banding	46, XY
Cell Line Identity	STR	Match to donor
Clearance of Reprogramming Factors	QPCR for LIN28, SOX2 and OCT-4	Not Detected
Directed Differentiation	Flow Cytometry	Endoderm : Detected Mesoderm : Detected Ectoderm : Detected

The following guidance can be found in the Instructions for Use	
Intended use	Expiry Date
Product Format	Recommended storage conditions
Volume	Hazardous Information

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BEŞİKCİOĞLU Hüseyin Erdinç
Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji ABD	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji ABD	2015
Lisans	Ankara Üniversitesi - Biyoloji	2010
Lise	Süleyman Demiral Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2013-Devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Araş. Gör. (35.Madde)
2019-2021	Münih Teknik Üniversitesi	Misafir Araştırmacı
2011-2012	BMT Calsis Ltd. Şti	Üretim Personeli

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Mutgan, A. C., Besikcioglu, H. E., Wang, S., Friess, H., Ceyhan, G. O., & Demir, I. E. (2018). Insulin/IGF-driven cancer cell-stroma crosstalk as a novel therapeutic target in pancreatic cancer. Molecular cancer, 17(1), 1-11.
2. Besikcioglu, H. E., Saribas, G. S., Ozogul, C., Tiryaki, M., Kilic, S., Pınarlı, F. A., & Gulbahar, O. (2019). Determination of the effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells and ovarian stromal stem cells on follicular maturation in cyclophosphamide induced ovarian failure in rats. Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology, 58(1), 53-59.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...